

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Uji Sitotoksik MTT Assay

a. Penanaman sel kanker kolon WiDr

Sel kanker kolon WiDr yang dipakai dalam penelitian ini didapatkan dari CCRC Universitas Gadjah Mada. Setelah pengambilan sel kanker dari Universitas Gadjah Mada, sel kanker kemudian dihitung jumlahnya dengan cara disentrifuse terlebih dahulu lalu diambil sebanyak 10 μ L untuk ditaruh di atas hemasitometer kemudian dihitung setiap lapang pandang. Setelah itu sel kanker kolon WiDr ditanam pada *96 well plate* sebanyak 5000 sel/ sumuran. Kemudian sel yang telah ditanam diinkubasi selama 2 hari pada suhu 37°C.

b. Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun bandotan dan obat antikanker Doxorubicin. Ekstrak etanol daun bandotan yang masih kental harus dilarutkan terlebih dahulu sebelum dipakai untuk uji sitotoksik. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah DMSO dan air. Perbandingan antara DMSO dan air yang dipakai untuk melarutkan ekstrak kental daun bandotan adalah 1:9. Konsentrasi awal ekstrak etanol daun bandotan yang dibuat adalah 50mg/mL. Kemudian dari konsentrasi awal ini ditambahkan media kultur RPMI untuk membuat seri konsentrasi sebesar 160-800 μ g/mL. Doxorubicin yang berguna sebagai larutan uji kontrol positif diambil dari

konsentrasi awal 2mg/mL kemudian diencerkan dengan menggunakan media kultur untuk membuat seri konsentrasi 7,5-20µg/mL. Setelah semua larutan uji dibuat dengan konsentrasi yang berbeda kemudian larutan uji ditambahkan ke dalam *96 well plate* sebanyak 100µL/sumuran yang dilanjutkan dengan kembali diinkubasi selama 24-48 jam untuk dapat melihat kemampuan sitotoksik larutan uji.

c. Hasil Uji Sitotoksik MTT

Penelusuran efek sitotoksik ekstrak daun bandotan terhadap sel kanker kolon WiDr dilakukan dengan metode uji sitotoksik MTT *Assay* tunggal. Uji MTT dilakukan dengan cara menambahkan reagen MTT yang telah dencerkan dengan PBS sebanyak 100µL ke dalam tiap sumuran untuk membentuk kristal formazan yang akan mengetahui jumlah sel hidup pada setiap sumuran. Setelah kristal formazan terbentuk lalu ditambahkan *stopper* agar menghentikan proses pembentukan kristal formazan. Hasil uji sitotoksik tunggal ini diperoleh dengan menghitung absorbansi sel kanker kolon WiDr menggunakan rumus perhitungan seperti di bawah ini untuk mengetahui persentase jumlah sel yang hidup.

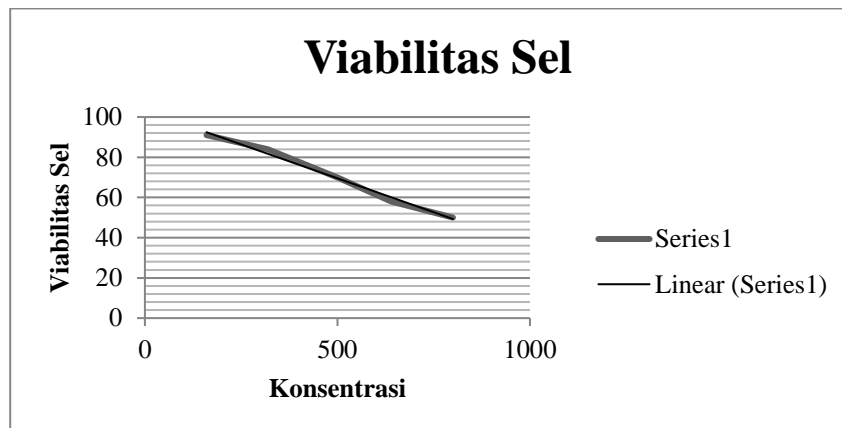
$$\% \text{Sel hidup} = \frac{\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi media}}{\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi media}} \times 100 \%$$

Persentase sel hidup ini dihitung dengan menggunakan regresi linier untuk mencari nilai IC_{50} dari larutan uji. Nilai IC_{50} yang didapatkan nantinya akan digunakan sebagai acuan pemberian konsentrasi pada uji antimigrasi pada sel kanker kolon WiDr.

Tabel 1. Viabilitas sel WiDr dengan perlakuan EDB

| Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) | Rata-rata Absorbansi Sampel | Viabilitas Sel (%) |
|--|--|-----------------------------------|
| 160 | $1,10 \pm 0,06$ | 91 |
| 320 | $1,05 \pm 0,01$ | 84 |
| 500 | $0,96 \pm 0,02$ | 70 |
| 640 | $0,88 \pm 0,14$ | 58 |
| 800 | $0,83 \pm 0,08$ | 50 |

Berdasarkan hasil uji sitotoksik tunggal EDB, konsentrasi ekstrak terendah 160 $\mu\text{g/mL}$ mampu membunuh 9% sel WiDr, sedangkan pada konsentrasi tertinggi yaitu 800 $\mu\text{g/ml}$ mampu membunuh 50% sel WiDr. Adapun nilai IC50 EDB adalah 794,029 $\mu\text{g/ml}$. Pada gambar 3 ini menunjukkan penurunan viabilitas sel berbanding lurus dengan kenaikan pemberian konsentrasi ekstrak yang mengikuti persamaan grafik regresi linier $y = -0,025x + 75,36$. Sel kanker yang diberi ekstrak dengan konsentrasi paling rendah hanya dapat membunuh sel kanker yang sedikit, demikian juga jika konsentrasi EDB ditingkatkan maka akan membunuh sel kanker semakin banyak.



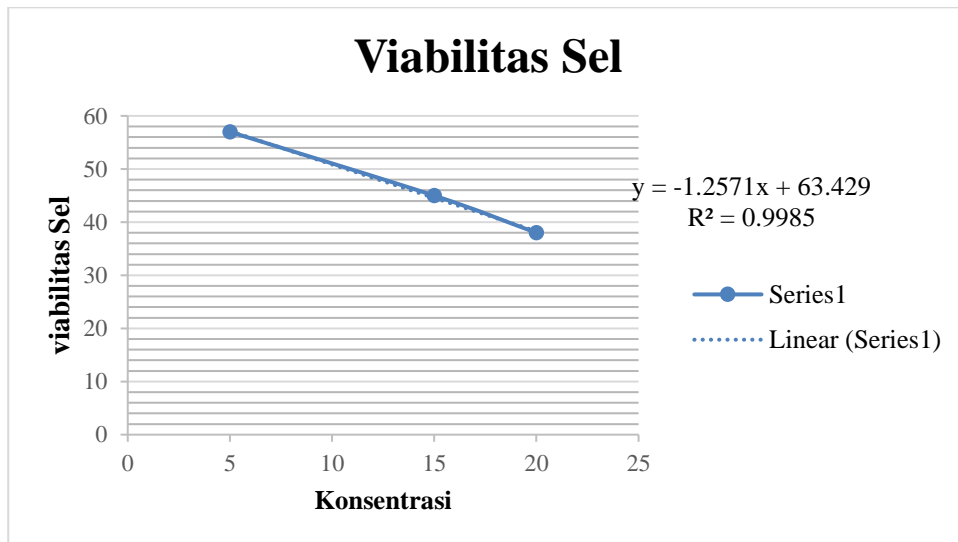
Gambar 1. Grafik efek sitotoksik EDB tunggal terhadap Sel WiDr

Tabel 2. Viabilitas sel WiDr terhadap Doxorubicin

| Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) | Rata-rata Absorbansi Sampel | Viabilitas Sel (%) |
|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 75 | $0,75 \pm 0,05$ | 57 |
| 150 | $0,80 \pm 0,006$ | 45 |
| 200 | $0,88 \pm 0,01$ | 38 |

Pada tabel 3 disajikan besar viabilitas sel kanker kolon WiDr yang diberi perlakuan Doxorubicin menunjukkan pada dosis terbesar akan membunuh sel kanker paling banyak. Nilai IC_{50} Doxorubicin dalam efek sitotoksik pada sel kanker kolon WiDr jauh lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak etanol daun bandotan, yaitu $10,73\mu\text{g/mL}$ sehingga potensi ekstrak daun bandotan lebih rendah

dibandingkan Doxorubicin. Hasil IC_{50} ini sesuai dengan grafik persamaan linier $y = -1,257x + 63,42$ seperti yang ditampilkan pada gambar 4.

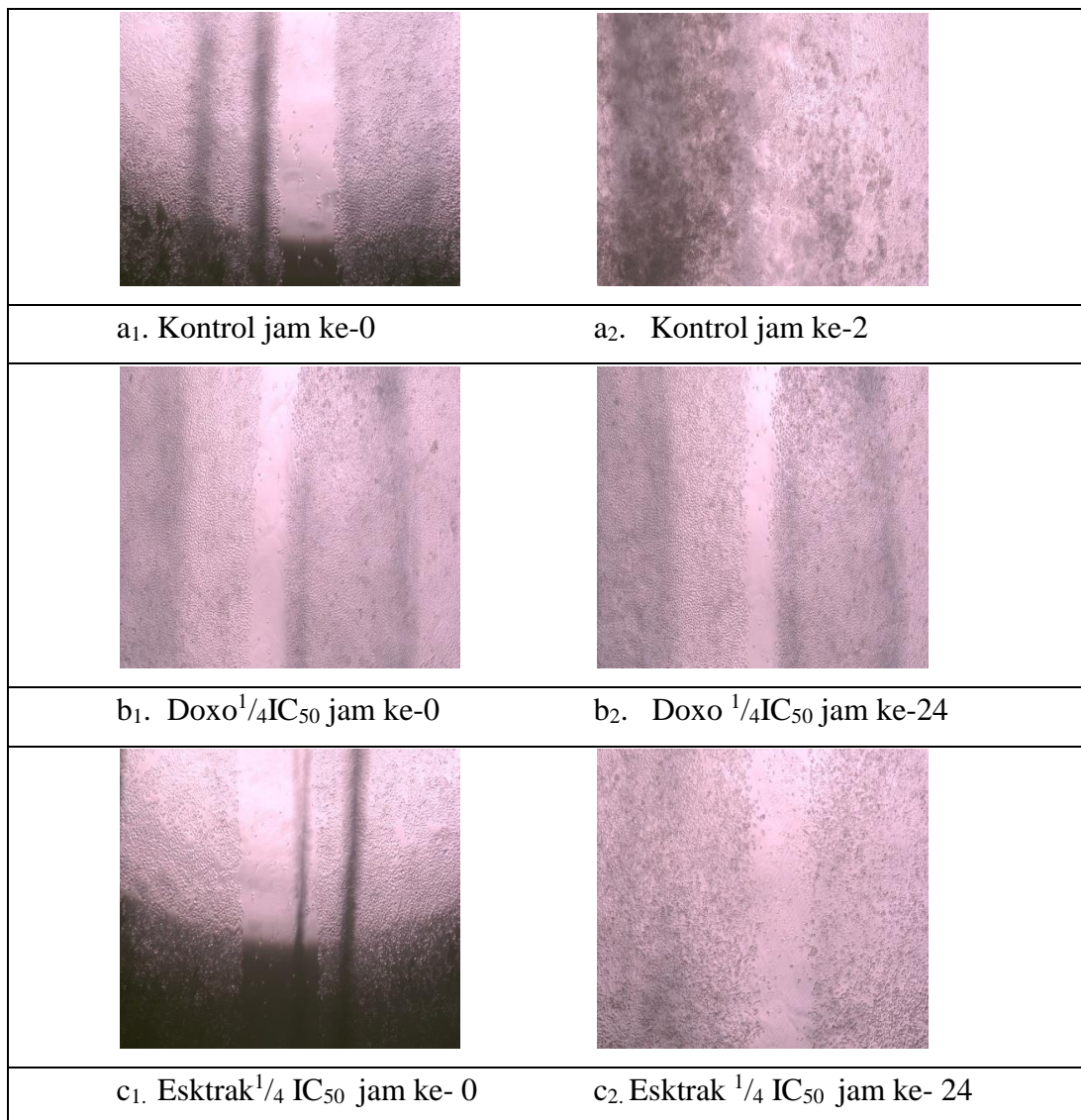


Gambar 2. Grafik efek sitotoksik Doxorubicin terhadap Sel WiDr

2. Uji Antimigrasi *Scracth Wound Healing*

Metode *Scracth Wound Healing* adalah metode yang mudah untuk mengetahui kemampuan suatu sel untuk melakukan migrasi (CCRC,2015). Cara melakukan metode ini yaitu dengan membuat goresan luka secara vertikal pada sel yang telah konfluen di dalam kultur *dish*, yang kemudian secara berkala sel tersebut akan berpindah dan menutup goresan luka yang telah dibuat (Liang, et al., 2007). Waktu pengamatan berkala untuk mengetahui tingkat perpindahan sel ini diukur saat mulai membuat goresan kemudian dilanjutkan pada jam ke 12 dan jam ke 24. Kepentingan pengukuran waktu secara berkala ini dilakukan untuk mengetahui perbandingan penutupan luka yang telah dibuat (Haryanti, et al., 2017).

Pemberian konsentrasi larutan uji pada *Scracth Wound Healing* adalah $\frac{1}{4}$ dari IC_{50} , $\frac{1}{2}$ dari IC_{50} dan $\frac{3}{4}$ IC_{50} . Penentuan konsentrasi larutan uji tidak melebihi nilai IC_{50} dari ekstrak etanol daun bandotan agar dapat diamati kemampuan menghambat migrasi sel kanker, karena jika melebihi nilai IC_{50} efek ekstrak etanol daun bandotan akan lebih besar memperlihatkan kemampuan sitotoksiknya. Pengamatan uji migrasi dilakukan dengan menggunakan mikroskop *inverted* dan kamera yang diamati pada jam ke 0, 12 dan jam ke 24. Analisis hasil migrasi yang telah didapatkan, diukur dengan *software ImageJ* untuk menentukan luas area penutupan yang kemudian dibuat persentase.



Gambar 3. Penutupan *scarath wound healing* sel kanker WiDr berdasarkan dosis perlakuan pada jam ke 0 sampai jam ke-24

Gambar 5 menunjukkan bahwa kontrol sel memperlihatkan penutupan yang sangat konfluen dibandingkan dengan penutupan sel kanker yang diberi Doxorubicin dan ekstrak etanol daun bandotan.

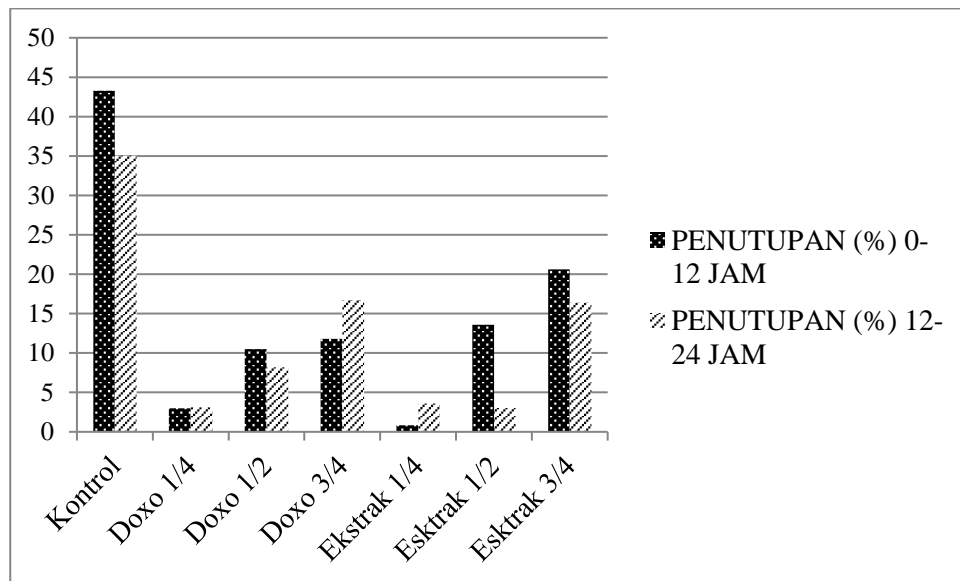
Tabel 3. Rerata luas persentase penutupan (migrasi sel) berdasarkan perlakuan pada sel kanker kolon WiDr

| Perlakuan | Penutupan (%) | |
|---------------------|---------------|--------------|
| | Jam ke-12 | Jam ke-24 |
| Kontrol | 43,27 ± 1,22 | 78,32 ± 3,06 |
| Doxo ¼ | 3,00 ± 1,91 | 6,11 ± 5,81 |
| Doxo ½ | 10,52 ± 2,14 | 18,69 ± 3,96 |
| Doxo ¾ | 11,78 ± 2,91 | 28,48 ± 6,18 |
| Ekstrak ¼ | 0,81 ± 0,78 | 4,42 ± 2,94 |
| Ekstrak ½ | 13,57 ± 2,22 | 16,60 ± 2,72 |
| Ekstrak ¾ | 20,62 ± 5,66 | 37,00 ± 0,85 |
| Signifikansi | 0.000 | 0.000 |

Rata-rata penutupan migrasi sel kanker (tabel 4) pada kontrol menunjukkan persentase penutupan sebanyak 43,27± 1,22% di jam ke 12. Pesentase penutupan migrasi pada sel kanker yang diberikan ekstrak etanol daun bandotan dengan konsentrasi ¼, ½, dan ¾ IC₅₀ besarnya secara berturut-turut adalah 0,81± 0,78%, 13,57± 2,22%, dan 20,62± 5,66%. Sedangkan penutupan migrasi sel pada peberian Doxorubicin dengan konsentrasi, ¼, ½, dan ¾ dari IC₅₀ secara berturut-turut adalah 3,00±1,91%, 10,52± 2,14%, 11,78± 2,91%.

Pada pengamatan pada jam ke 24 menunjukkan penutupan pada kontrol yang sangat meningkat menjadi $78,32 \pm 3,06\%$ dibandingkan goresan awal. Selain itu, perubahan penutupan luka juga diperlihatkan oleh sel yang diberi ekstrak etanol daun bandotan. Penutupan pada perlakuan ini besarnya bertambah dibandingkan dengan pengamatan pada jam ke 12. Persentase perubahan aktivitas migrasi pada jam ke 24 pada pemberian ekstrak etanol daun bandotan secara berturut-turut adalah $4,42 \pm 2,94\%$, $16,60 \pm 2,72\%$ dan $37,00 \pm 0,85\%$. Pada perlakuan Doxorubicin yang berfungsi sebagai kontrol positif memperlihatkan penutupan migrasi sel pada jam ke 24 secara berturut-turut adalah $6,11 \pm 5,81\%$, $18,69 \pm 3,96\%$, $28,48 \pm 6,18\%$.

Kecepatan penutupan goresan luka yang diberikan pada sel kanker kolon WiDr yang ditunjukkan oleh gambar 6 menunjukkan aktivitas migrasi sel yang berbeda beda kecepatannya. Pada perlakuan kontrol tidak diberikan larutan uji apapun memiliki kecepatan yang paling tinggi pada aktivitas migrasinya. Sedangkan kecepatan migrasi paling rendah ditunjukkan oleh perlakuan yang diberikan ekstrak etanol daun bandotan dengan konsentrasi $1/4 IC_{50}$. Hal ini sesuai dengan hasil mikroskopik pada saat pengamatan migrasi sel kanker kolon WiDr.



Gambar 4. Kecepatan penutupan sel kanker WiDr pada interval waktu pengamatan setiap 12 jam

Sililah kecepatan sel kanker kolon WiDr yang diberikan perlakuan ekstrak etanol daun bandotan dengan dosis tertentu dalam bermigrasi pada jam ke 12 dan ke 24 setelah dianalisis dengan *One way annova* menunjukkan hasil yang signifikan dengan nilai $p < 0,00$. Hal ini menunjukkan bahwa kecepatan sel kanker kolon WiDr dalam bermigrasi memiliki pola tidak konstan yang berarti masing – masing perlakuan memiliki kecepatan yang bervariasi dalam aktivitas migrasi selnya.

Persentase dari hasil pengamatan migrasi sel kemudian dianalisis dengan SPSS menggunakan uji *one way anova* untuk mengetahui tingkat signifikansi pemberian ekstrak etanol daun bandotan terhadap kemampuan menghambat migrasi sel kanker kolon WiDr. Dari hasil tersebut didapatkan nilai signifikansi pemberian ekstrak daun bandotan pada jam ke 12 dan ke 24 secara berturut –turut

adalah 0,00. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun bandotan sangat berpengaruh terhadap aktivitas migrasi sel kanker kolon WiDr. Pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun bandotan pada $\frac{1}{4}IC_{50}$ menunjukkan persentase penutupan migrasi yang paling kecil jika dibandingkan dengan konsentrasi lainnya. Hal ini menunjukkan ekstrak etanol daun bandotan mampu menghambat migrasi sel kanker colon WiDr dengan konsentrasi yang sangat kecil yaitu $\frac{1}{4} IC_{50}$. Hasil ini menunjukkan perbedaan yang nyata dibandingkan dengan pemberian konsentrasi yang lain, karena menurut uji *Post Hoc* didapatkan perbedaan yang sangat bermakna dengan nilai $p = >0,05$.

B. Pembahasan

1. Uji Sitotoksik MTT Assay

Efek sitotoksik merupakan kemampuan suatu senyawa yang mampu membunuh sel. Senyawa yang menyebabkan kematian padasel ini bisa terdapat pada tumbuh – tumbuhan. Hal ini dikarenakan selain menghasilkn produk primer seperti lemak, protein dan karbohidrat, tumbuhan juga mameliki produk metabolik sekunder atau sampingan. Produk – produk metabolik sekunder itu antara lain adalah flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan acetogenin yang juga dimiliki oleh daun bandotan (*Ageratum conyzoides*).

Hasil IC₅₀ ekstrak etanol daun bandotan terhadap sitotoksik sel kanker WiDr yang diperoleh dari penelitian ini adalah sebesar 794,029 µg/ml. Hal ini meunjukkan bahwa ekstrak etanol daun bandotandapat diklasifikasikan sebagai agen sitotoksik kanker yang *moderate*, artinya ekstrak etanol daun bandotan ini disimpulkan dapat dijadikan agen preventif terjadinya kanker kolon WiDr karena efek toksisitasnya. Toksisitas adalah kemampuan suatu senyawa yang dapat menimbulkan kerusakan pada sel. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Maharani (2017)menyebutkan bahwa ekstrak etanol utuh yang masih memiliki senyawa polar, non polar dan semi polar dapat menghambat lebih besar dibandingkan dengan ekstrak yang telah dipisahkan fraksi-fraksinya karena senyawa polar, non polar dan semi polar tersebut akan bekerja secara sinergis bersama-sama untuk menghambat aktivitas sel kanker. Selain itu efek sitotoksik suatu tumbuhan pada dasarnya disebabkan oleh kandungan senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan tersebut seperti golongan alkaloid, flavonoid,

glikosid, saponin, dan tanin (Zhou, dkk., 2006). Pada penelitian yang dilakukan oleh Huang (1998) menyebutkan bahwa flavonoid adalah salah satu senyawa yang berperan besar dalam kemampuan sitotoksik terhadap sel kanker. Cara kerja flavonoid dalam kemampuan sitotoksik dilaporkan oleh Ren (2003) menyatakan bahwa senyawa flavonoid berperan dengan cara menghambat kinerja enzim CDK (*cyclin-dependent kinase*) yang merupakan regulator dari daur sel. Senyawa flavonoid dan chalcon pada flavonoid mengandung nitrogen yang berfungsi sebagai inhibitor CDK1 (Liu, 2007). Senyawa-senyawa ini memiliki kandungan flavopiridol, yang menginduksi penghentian siklus sel pada fase G1 dan G2, dan merupakan inhibitor kompetitif ATP yang potensial dari CDK1, 2, 4, dan 6 (Navarro, 2016). Adanya mekanisme tersebut maka proses kematian sel akan sangat mudah terjadi.

Sedangkan golongan tanin dan saponin berperan dengan cara menghambat replikasi DNA (Yildirim & Kutlu, 2015). Pada penelitian yang dilakukan oleh Tong dan kawan-kawan pada tahun 2012 menyebutkan bahwa steroid saponin yang berasal dari *Dioscorea Zingiberensis* Wright (DZW) memiliki kemampuan yang besar dalam memberikan efek sitotoksik pada sel kanker kolon C26. Efek sitotoksik dari saponin ini berperan dengan cara mengaktifkan jalur apoptosis dari kaspase 3, kaspase 9 dan proteolitik tertentu polimerase (ADP- ribosa). Hasil IC_{50} pemberian obat kemoterapi doxorubicin pada penelitian ini sebesar $10,73\mu\text{g/mL}$, hal ini menunjukkan bahwa potensi sitotoksik ekstrak etanol daun bandotan lebih rendah dibandingkan Doxorubicin.

2. Uji Antimigrasi *Scratch Wound Healing Assay*

Pada penelitian uji antimigrasi dilakukan dengan metode *Scratch Wound Healing*. Metode ini memudahkan peneliti untuk mengamati pergerakan dan perpindahan sel kanker. Ekstrak etanol daun bandotan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ekstrak mentah dari daun bandotan, sehingga penghambatan aktivitas migrasi dari sel kanker dapat dipengaruhi oleh senyawa kimia yang terkandung di dalam daun bandotan. Beberapa senyawa kimia yang terkandung di dalam ekstrak etanol daunbandotan antara lain seperti tanin,alkaloid, flavonoid, dan saponin. Amadi, dkk., (2012) menyebutkan bahwa senyawa flavonoid memiliki potensi sebagai anti inflamasi, anti alergi,dan anti mutagenik. Sejauh ini cara kerja senyawa flavonoid mampu menghambat migrasi sel kanker yaitu dengan cara menghambatprotein tirosin kinase yang memiliki potensi dalam penghambatan migrasi sel danproses angiogenesis (Kumar, 2013).

Penelitian lain juga menyebutkan bahwa saponin dan tanin memiliki potensi dalam menghambat aktivitas sel tumor dengan cara menghambat replikasi sel kanker (Iwu, 1989). Saponin mampu menghambat migrasi sel kanker kolon WiDr karena senyawa ini dapat menghambat ekspresi *matrix metalloproteinase* (Chen, dkk., 2011) yang berguna sebagai enzim pendegradasi matriks ekstraseluler. Hasil penelitian tersebut hampir sama dengan hasil penelitian yang dipaparkan oleh Man pada tahun 2010 jika saponin pada kedelai mampu menghambat metastasis sel tumor dengan menekan produksi MMP-2 dan MMP-9, dan merangsang sekresi TIMP-2. Selain itu ekstrak mentah yang masih memiliki banyak produk metabolik sekunder menurut Kamylla

(2018) menunjukkan dapat melindungi matriks ekstraseluler dari degradasi, sehingga sulit bagi sel tumor untuk bermigrasi, memperlambat invasi kapiler dan, akibatnya, menurunkan pembentukan metastasis dan invasi jaringan lain.

