

Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol 96% Daun Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) pada Sel hFOB 1.19 dengan Metode *Microtetrazolium* (MTT) Assay

Cytotoxicity Test of 96% Ethanol Extract of Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) on hFOB 1.19 Cells Using the *Microtetrazolium* (MTT) Assay Method

Burhan Ma'arif^{1*}, Nabila Rosa¹, Meilina Ratna Dianti¹, Alif Firman Firdausy¹, Hening Laswati², Mangestuti Agil³

¹Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang, 65151

²Departemen Ilmu Kedokteran Fisik dan Rehabilitasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya, 60132

³Departemen Farmakognosi dan Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, 60115

Received: 26/7/2020 Accepted: 11/9/2020 Published: 26/9/2020

*Korespondensi: burhan.maarif@farmasi-uin.malang.ac.id

Abstract

Semanggi (Marsilea crenata Presl.) is a plant that has been used by Indonesian people, especially East Java, as a food ingredient for decades. Marsilea crenata Presl. was known to contain phytoestrogens which have structure and function similar to estrogen in the human body. The aim of this study was to do a cytotoxicity test and determine the IC₅₀ value of 96% ethanol extract of Marsilea crenata Presl. against hFOB 1.19 cells. The method used was microtetrazolium (MTT) assay method with microplate reader. The cells were cultured in the microplate-96 well and were given the extract with various doses of 62.5 ppm; 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm; 1000 ppm; 2000 ppm and 4000 ppm. Then 100µL of MTT reagent was added, incubated for 2-4 hours and 10% SDS was added as a stopper and readings were carried out using an microplate reader. The results of these readings were used as a calculation of the IC₅₀ value which indicated the cytotoxicity level of 96% ethanol extract of Marsilea crenata Presl. leaves. The IC₅₀ value obtained was 2074.965 µg/ml, and based on these results, the 96% ethanol extract of Marsilea crenata Presl. was concluded to be safe and not cytotoxic for developing into a medicinal product.

Keywords: *Marsilea crenata Presl., Cytotoxicity Test, 1.19 hFOB Cells, MTT Assay*

Abstrak

Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) merupakan salah satu tanaman yang telah dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia, khususnya Jawa Timur, sebagai bahan makanan selama beberapa dekade. *Marsilea crenata* Presl. mengandung senyawa fitoestrogen memiliki struktur dan fungsi mirip estrogen dalam tubuh. Tujuan penelitian melakukan uji sitotoksitas dan menentukan nilai IC₅₀ dari ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* Presl. terhadap sel hFOB 1.19. Metode yang digunakan adalah *microtetrazolium* (MTT) assay dengan *microplate reader*. Sel dikultur pada *microplate-96 well* dan diberikan ekstrak dengan variasi dosis 62,5 ppm; 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm; 1000 ppm; 2000 ppm dan 4000 ppm, kemudian ditambahkan reagen MTT 100µL, diinkubasi selama 2-4 jam dan ditambahkan SDS 10% sebagai *stopper*. Pembacaan hasil menggunakan *microplate reader*. Hasil dari pembacaan tersebut digunakan sebagai perhitungan nilai IC₅₀ yang dapat menunjukkan tingkat sitotoksitas ekstrak etanol 96% *Marsilea crenata* Presl. Nilai IC₅₀ yang didapatkan sebesar 2074,965 µg/ml. Berdasarkan hasil tersebut ekstrak etanol 96% *Marsilea crenata* Presl. dapat dikatakan aman dan tidak bersifat sitotoksik jika dikembangkan menjadi bahan obat.

Kata Kunci: *Marsilea crenata Presl., Uji Sitotoksitas, Sel hFOB 1.19, MTT Assay*

PENDAHULUAN

Pascamenopause merupakan salah satu fase yang dialami seorang wanita yang menunjukkan adanya proses penuaan yang dapat ditandai dengan adanya penurunan kadar estrogen dalam tubuh yang disebut juga defisiensi estrogen (Baziad, 2003). Banyak sekali permasalahan yang ditimbulkan dari defisiensi estrogen tersebut, salah satunya yaitu berkurangnya densitas tulang yang dapat mengakibatkan osteoporosis (Biannchi, 2014; Mustofa, 2019).

Permasalahan tersebut biasanya diatasi dengan penggunaan *Hormonal Replacement Therapy* (HRT), namun karena penggunaan terapi ini memiliki efek samping yang kurang menguntungkan maka dibutuhkan alternatif lain yaitu fitoestrogen (Achdiat, 2003; Wulandari, 2015). Fitoestrogen merupakan suatu substrat yang memiliki struktur dan aktivitas mirip dengan estrogen (Glover dan Assinder, 2006). Fitoestrogen ini ditemukan pada tanaman salah satunya yaitu tanaman semanggi.

Semanggi (*Marsilea crenata* Presl.) ini merupakan salah satu tanaman yang banyak tumbuh di Jawa Timur dan telah dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai bahan makanan dan obat tradisional (Ma'arif, 2016). Berdasarkan penelitian yang dilakukan (Laswati, 2013; Nurjanah, 2012; Ma'arif, 2016; Widiyanti, 2017; Ma'arif, 2018) *Marsilea crenata* Presl. terbukti memiliki kandungan fitoestrogen. Namun seiring berjalannya waktu tanaman itu mulai sulit untuk ditemukan keberadaannya.

Pada penelitian ini ekstrak etanol 96% *Marsilea crenata* Presl. akan diujikan terhadap sel h.FOB 1.19 dengan berbagai variasi konsentrasi menggunakan metode MTT Assay dan pembacaan menggunakan *microplate reader* yang berfungsi untuk mencari nilai IC_{50} menggunakan *webtool IC₅₀ calculator* (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator/>).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu *Marsilea crenata* Presl. yang diambil dari sawah daerah Benowo, Surabaya, etanol 96%, sel h.FOB 1.19 *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 9%, Antibiotik *Penicillin-Streptomycin* (PenStrep) 1%, *Tripsin Na-EDTA*, Kit MTT, PBS, dan alkohol 70%. *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO), pereaksi MTT 5 mg/ml, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (50 mg MTT dan 10 ml PBS), *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 10% dalam 0,1 N HCl.

Alat

Bahan sel yang digunakan adalah sel h.FOB 1.19 yang di kultur menggunakan *ThermoScientific Hera Safe KS Bio Safety Cabinet* (BSC), L W C5 *Centrifuge*, *ThermoScientific Hera Cell 150i CO₂ Incubator*, *ThermoScientific Aquabath 18022AQ Waterbath*, *Olympus IX 71 Inverted Microscope* dan pembacaan dilakukan menggunakan *microplate reader*.

Metode

Ekstraksi

Daun *Marsilea crenata* Presl. kering diserbuk dan ditimbang sebanyak 30 gram. kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 200 mL, proses ekstraksi metode UAE 2x3 menit dan disaring. Kemudian residu ditambahkan pelarut sebanyak 150mL, dan diekstraksi. Filtrat diuapkan pada *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dan kecepatan 70rpm. Ekstrak kental diuapkan dalam oven dengan suhu 40°C.

Uji sitotoksitas pembuatan media kultur

Disterilkan alat dengan alcohol 70%, pembuatan dilakukan di dalam BSC. Kemudian dimasukkan 100 µL PenStrep dalam *conical tube*, ditambahkan FBS 1000 mL, dan ditambahkan media DMEM ad 10 µL. Kemudian disterilisasi menggunakan mikrofilter 0,22 µm.

Kultur sel hFOB 1.19

Sel dicairkan dengan suhu 37°C dalam waktu 2-3 menit (Thawing sel). Ditambahkan 5mL media komplit dalam *conical tube* 15mL, disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 1600rpm. Kemudian diambil pellet sel dan ditambahkan 5mL media komplit. Kemudian suspensi sel dipindahkan dalam *flask culture* dan diinkubasi suhu 37°C dengan 5%CO₂.

Flask culture dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. lalu ditambahkan 2-3 mL 0,2% (w/v) tripsin 0,53 mM EDTA, dilakukan *scraper* dan ditambahkan 5mL media komplit. Kemudian dipindahkan suspensi sel pada *conical tube* 15mL dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan putaran 1600rpm.

Pembuatan larutan sampel

Ditimbang 2,5mg ekstrak pekat etanol 96% semanggi. ditambahkan tween 80 0,5 &, ditambahkan 10mL DMSO dan disterilisasi menggunakan *milipore* 0,22 µm dan disimpan dalam tabung steril. Kemudian dilakukan pengenceran menjadi konsentrasi 4000 ppm; 2000 ppm; 1000 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm dan 62,5 ppm.

Pemberian larutan sampel dan MTT

Microplate 96 well dibagi dalam beberapa perlakuan (Blanko, perlakuan sel, kontrol sel, kontrol pelarut dan kontrol media). Dikeluarkan sel dari inkubator dan dibuang media sel. Kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali dan ditambakan larutan sampel pada masing-masing sumuran dengan pengulangan sebanyak 3 kali dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan 5% CO₂ selama 24 jam.

Dicuci setiap *well* menggunakan PBS. Kemudian ditambahkan 100µL larutan MTT dan diinkubasi suhu 37°C dengan 5% CO₂ selama 4 jam. Lalu ditambahkan *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 10% dalam 0,1 M HCl dan ditutup menggunakan aluminium foil kemudian di inkubasi selama 24 jam.

Analisa data

Intensitas ungu yang terbentuk diukur dengan *ELISA Reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Kemudian data absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung viabilitas sel dengan rumus:

$$\frac{\text{Absorbansi Perlakuan} - \text{Absorbansi Kontrol Media}}{\text{Absorbansi Kontrol Perlakuan} - \text{Absorbansi Kontrol Media}} \times 100\%$$

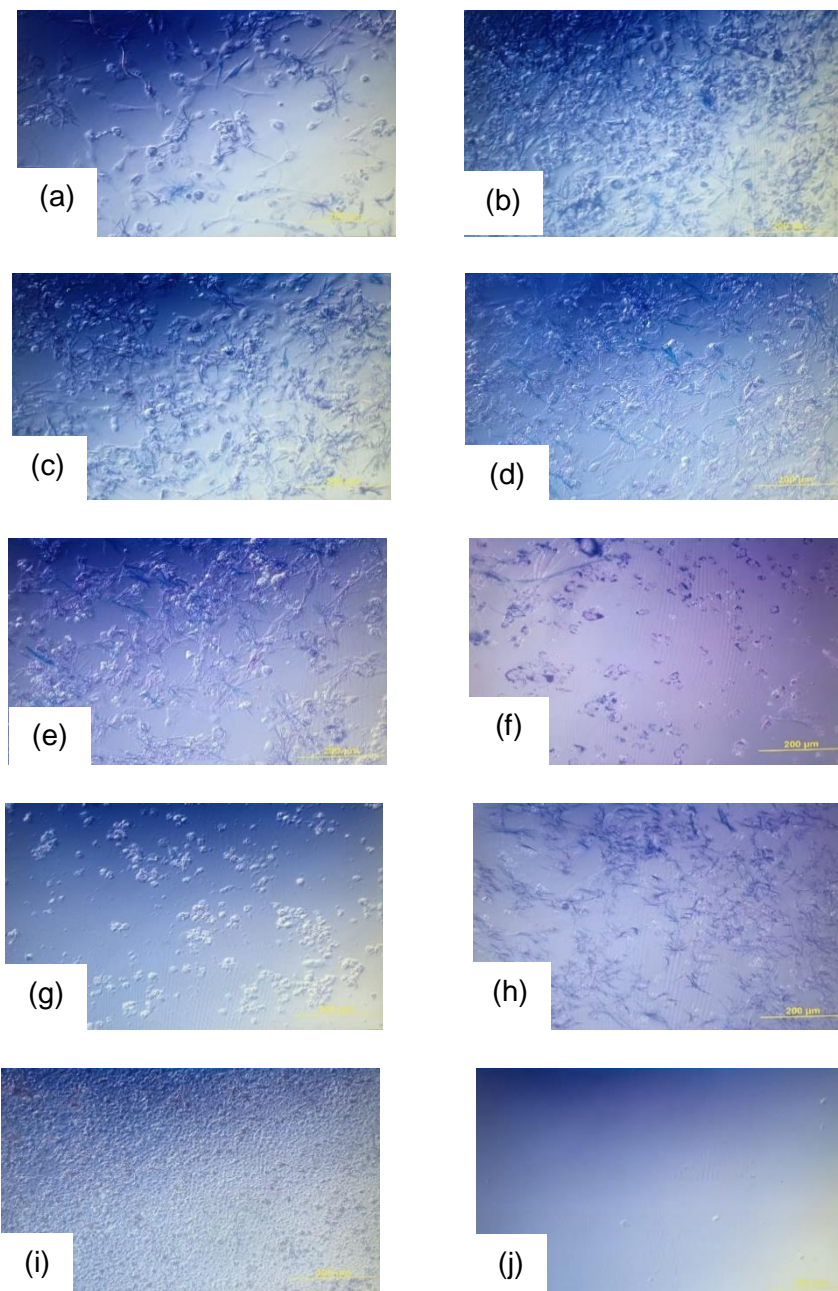
Hasil perhitungan viabilitas digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ dengan *webtool IC₅₀ calculator* (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>)

HASIL DAN PEMBAHASAN

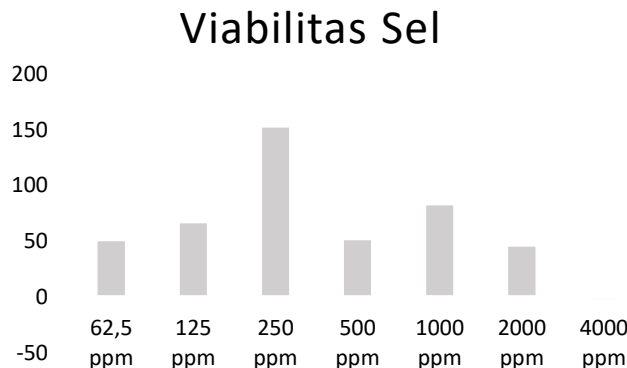
Penelitian ini menggunakan sel hFOB 1.19 yang merupakan sel preosteoblast progenitor yang dapat diinduksi dan berdiferensiasi menjadi sel osteoblast. Sel ini diberi perlakuan dengan ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* Presl.. Ekstrak ini diperoleh melalui proses reaksi ultrasonik menggunakan pelarut etanol 96% karena merupakan pelarut ideal yang memiliki *extractive power* terbaik untuk hampir semua senyawa (Afrianti, dkk.2014). Tujuan dari pemberian ekstrak ini untuk mengetahui sitotoksitas dengan variasi dosis yang digunakan.

Uji sitotoksitas dilakukan dengan metode MTT Assay. Metode ini akan menimbulkan reaksi enzimatik yaitu garam tetrazolium akan bereaksi dengan sel hidup dan membentuk kristal formazan yang dibantu oleh enzim suksinat dehidrogenase. Terbentuknya formazan berwarna ungu ini menunjukkan adanya sel hidup, semakin banyak dan semakin pekat warna ungu yang terbentuk, menandakan semakin banyak sel yang hidup (Doyle and Griffiths, 2000; Siregar dan Hadijono, 2000; Meizarini, et al., 2005; Vajhrabaya dan Suwanna, 2018).

Pengamatan setelah pemberian MTT dilakukan menggunakan mikroskop *inverted* dengan hasil pada Gambar 1.



Gambar 1. Gambaran mikroskopik sel hFOB 1.19 setelah pemberian larutan MTT (a) Konsentrasi ekstrak 62.5 ppm (b) Konsentrasi ekstrak 125 ppm (c) Konsentrasi ekstrak 250 ppm (d) Konsentrasi ekstrak 500 ppm (e) Konsentrasi ekstrak 1000 ppm (f) Konsentrasi ekstrak 2000 ppm (g) Konsentrasi ekstrak 4000 ppm (h) Kontrol sel (i) Kontrol pelarut (j) Kontrol media



Gambar 2. Grafik viabilitas sel

Hasil perhitungan viabilitas sel ditunjukkan pada Gambar 2. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa grafik yang terbentuk tidak linear dan presentase viabilitas sel tertinggi pada dosis 250 ppm yaitu sebesar 153,774% dan presentase terendah terletak pada dosis 4000 ppm yaitu sebesar -3,774%. Hasil perhitungan dengan *webtool* IC₅₀ calculator (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>) menunjukkan nilai IC₅₀ sebesar 2074,965 µg/mL.

Dari perhitungan viabilitas sel, terlihat grafik yang tidak linear. Hasil yang tidak linear ini dapat disebabkan oleh adanya mekanisme biokimiawi kematian sel, yaitu penipisan *Adenosin Triphosphate* (ATP) dan defek membrane sel. Penipisan ATP ini disebabkan oleh adanya enzim suksinat dehidrogenase yang berfungsi sebagai penghasil ATP kurang optimal dalam memproduksi ATP. Ketika enzim tersebut tidak atau kurang aktif dalam menghasilkan ATP maka aktivitas fungsional sel akan terhambat sehingga dapat menurunkan kinerja sel bahkan hingga kematian sel (Emilda, dkk. 2014)

Defek ini dapat mempengaruhi aktivitas mitokondria dalam sel yang merupakan penghasil ATP menjadi rendah produksinya, sehingga menimbulkan kematian sel. Kerusakan tersebut menyebabkan sel menjadi non viabel yang kemudian akan menyebabkan

kematian sel. Kerusakan atau kurangnya permeabilitas membran adalah gambaran umum dari jejas membran sel. Prinsip umum dari jejas sel ada dua, yaitu (a) Sistem intraseluler tersebut sensitive, (b) Respon seluler tergantung pada jenis jejas sel yang masuk (Obat-obatan, bahan kimia dan lain sebagainya), lama simulasi (waktu paparan jejas sel) dan berat ringannya stimuli (dosis atau konsentrasi) (Emilda, dkk.2014).

Viabilitas sel yang didapatkan selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ menggunakan *webtool* IC₅₀ calculator (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>) dan hasil yang diperoleh sebesar 2074,965 µg/mL. Pada beberapa literatur disebutkan bahwa suatu ekstrak dikatakan tidak bersifat sitotoksik terhadap sel vero apabila memiliki nilai IC₅₀ > 30 µg/ml (Kalaivani et al., 2011; Fadeyi et al., 2013; Masfria and Hafni, 2015), literatur lain menyebutkan batas lain yaitu IC₅₀ > 100 µg/ml (Srivastava et al., 2016; Chiamenti et al., 2019; Rai et al., 2019; Tavares-Carreon et al., 2020), IC₅₀ > 500 µg/ml (Chothiphirat et al., 2019), dan IC₅₀ > 1000 µg/ml (Muti'ah, dkk., 2017; Handayani, dkk., 2018; Ervina et al., 2020). Sitotoksitas ekstrak sangat tergantung pada jenis ekstrak dan jenis sel yang digunakan, ekstrak yang berbeda mengandung senyawa yang berbeda, dan jenis sel yang berbeda memiliki ketahanan yang berbeda

terhadap senyawa, sehingga tidak ada batas sitotoksitas yang pasti untuk digunakan secara umum.

Pada penelitian ini digunakan ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* Presl. pada sel hFOB 1.19, dan didapatkan nilai IC50 sebesar 2074,965 µg/ml. Pada pengamatan visual dengan mikroskop inverted, hasil menunjukkan bahwa sel hFOB 1.19 masih dalam kondisi adherent (melekat) pada dinding flask culture setelah pemberian ekstrak etanol 96% daun *Marsilea crenata* Presl. konsentrasi 62,5; 125; 250; 500; 1.000; 2.000; dan 4.000 µg/ml. Sel tidak menunjukkan tanda-tanda kematian seperti swelling atau shrinking, dan terdapat warna ungu formazan yang mengindikasikan sel masih hidup.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan ekstrak etanol 96% *Marsilea crenata* Presl. tidak bersifat toksik terhadap sel hFOB 1.19 karena memiliki nilai IC₅₀ 2074,965 µg/mL. yang memenuhi syarat sitotoksitas adalah <1000 µg/mL sehingga aman digunakan untuk bahan obat.

DAFTAR PUSTAKA

- Baziad, A. 2003. *Menopause dan Andropouse*. 1st ed. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono.
- Chiamanti, L., da Silva, F.P., Schalleberger, K., Demoliner, M., Rigotto, C. and Fleck, J. D. 2019. Cytotoxicity and antiviral activity evaluation of *Cymbopogon* spp hydroethanolic extracts. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp.1-9.
- Chothiphirat, A., Nittayaboon, A., Kanokwiroon, K., Srisawat, T. and Navakanitworakul, R., 2019. Anticancer potential of fruit extracts from *Vatica diospyroides* symington type SS and their effect on program cell death of cervical cancer cell lines. *The Scientific World Journal*, 2019, pp.1-9.
- Emilda, Yulie., E. Budipramana., S. Kuntari. 2014. Uji Sitotoksitas Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum*) Terhadap Kultur Sel Fibroblast. *Dental Journal*, **47** (4).
- Ervina M., Poerwono H., Widyowati R., Matsunami K. and Sukardiman., 2020. Bio-selective Hormonal Breast Cancer Cytotoxic and Antioxidant Potencies of *Melia azedarach* L. Wild Type Leaves. *Biotechnology Reports*.
- Fadeyi, 2013. *In Vitro* anticancer screening of 24 locally used Nigerian medical plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **13** (79).
- Glover A. and Assinder S.J. 2006. Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogen reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression. *Jour. Endoc.*, 189: 565-573
- Handayani, D., Rasyid, W., Rustini, Zainudin, E.N., and Hertiani, T. 2018. Cytotoxic activity screening of fungal extracts derived from the west Sumatran marine sponge *Haliclona fascigera* to several human cell lines: Hela, WiDr, T47D and Vero. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **8** (01), pp.055-058.
- Kalaivani, T., Rajasekaran, C., Suthindhiran, K., and Mathew, L., 2011. free radical scavenging, cytotoxic and hemolytic activities from leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. ex. Delile subsp. *indica* (Benth.) Brenan. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, pp. 1-8.
- Ma'arif, B., Mangestuti A., Hening L., 2018. Alkaline Phosphatase Activity of *Marsilea crenata* Presl. Extract and Fractions as Marker of MC3T3-E1 Osteoblast Cell Differentiation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **8** (3): 55-59.
- Ma'arif, Burhan., Mangestutu, A., dan Hening, L. 2016. Phytochemical Assessment on n-heksana ekstrak and fractions of *Marsilea crenata* Presl. Leaves Through GC-MS. *Journal Traditional Medicine*, **21** (2).
- Masfria and Hafni, A., 2015. Cytotoxicity of

- “Ekor naga” leaf (*Rhaphidophora pinnata* (Lf) Schott) chloroform extract against T47D cancer cells. *International Journal of PharmTech Research*, **7** (2), pp.238-242.
- Muti'ah R., Ma'arif B., Bhagawan W.S. and Amalia O.M., 2017. Toxicity Test of Ethanol Extract 96% Malayan Mistletoe Leaf (*Dendrophyhoe pentandra*) from Various regions in Indonesia Against Vero Cell. *Proceeding of International Conference on Green Technology*, **8** (1), pp.358-362.
- Nurjanah., Aulia, Azka., Asadatun, Abdullah. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Masilea crenata* C.Presl). *Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan*, **1** (3).
- Rai, V., Kumar, A., Das, V. and Ghosh. S., 2019. Evaluation of chemical constituents and *in vitro* antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity potential of rhizome of *Astilbe rivularis* (Bodho-okhati), an indigenous medicinal plant from eastern Himalayan region of India. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **19**, pp.1-10.
- Srivastava, A.N., Ahmad, R., and Khan, M.A., 2016. Evaluation and comparison of the *in vitro* cytotoxic activity of *Withania somnifera* methanolic and ethanolic extracts against MDA-MB-231 and vero cell lines. *Scientia Pharmaceutica*, **84**, pp 41-59.
- Tavares-Carreón, F., la Torre-Zavala, S.D., Arocha-Garza, H.F., Souza, V., Galán-Wong, L.J. and Avilés-Arnaut, H., 2020. In vitro anticancer activity of methanolic extract of *Granulocystopsis* sp., a microalgae from an oligotrophic oasis in the Chihuahuan desert. *PerrJ*, pp.1-21.
- Wulandari, R.C.L, 2015. Terapi Sulih Hormon Alami Untuk Menopause. *Jurnal Involusi Kebidanan*, **5** (10).