

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL CANGKANG BUAH DAN
BIJI NYAMPLUNG (*Calophyllum inophyllum* L.) TERHADAP SEL KANKER
KOLOREKTAL WiDr**

Karya Tulis Ilmiah

**Untuk Memenuhi Sebagian Syarat
Memperoleh Derajat Sarjana Kedokteran**

**Program Studi Kedokteran
Program Sarjana**



Oleh:

Irfan Jaen Fathani

17711130

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
2020**

**CYTOTOXICITY ASSAY OF ETHANOLIC EXTRACT OF FRUIT SHELL AND
SEED OF NYAMPLUNG (*Calophyllum inophyllum* L.) ON WiDr
COLORECTAL CANCER CELL LINE**

Scientific Writing

as A Requirement for the Degree of Undergraduate Program in Medicine

Undergraduate Program in Medicine



By :

**Irfan Jaen Fathani
17711130**

**FACULTY OF MEDICINE
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
2020**

HALAMAN PENGESAHAN

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL CANGKANG BUAH DAN BIJI
NYAMPLUNG (*Calophyllum inophyllum* L.) TERHADAP SEL KANKER
KOLOREKTAL WiDr**

Karya Tulis Ilmiah

Disusun dan diajukan oleh :

Irfan Jaen Fathani

17711130

Telah diseminarkan tanggal : 13 November 2020

dan telah disetujui oleh :

Penguji

Pembimbing

dr. Intannuary Paringga, Sp.PA

Dr. dr. Isnatin Miladiyah M.Kes.

NIK 187111308

NIK 017110409

Ketua Program Studi Kedokteran

Program Sarjana

dr. Umatul Khoiriyah, M.Med.Ed, Ph.D

NIK 047110101

Disahkan



dr. Lina Kusita, M.Kes, Sp.PK(K)

NIK 017110102

PERNYATAAN PUBLIKASI

Bismillahirrahmaanirrahiim

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya

Nama : Irfan Jaen Fathani
NIM : 17711130
Judul KTI : Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Cangkang Buah
dan Biji Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.)
Dosen Pembimbing : Dr. dr. Isnatin Miladiyah, M.Kes.

Dengan ini menyatakan bahwa :

Memberi Ijin kepada Perpustakaan FK UII mempublikasikan di repository UII, berupa :

- Laporan KTI (full text)
- ~~Abstrak saja~~

(coret yang tidak diperlukan)

Demikian pernyataan ini dibuat dengan sesungguhnya dan dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 13 November 2020

Dosen Pembimbing

Dr. dr. Isnatin Miladiyah M.Kes.

NIK 017110409

Yang Menyatakan

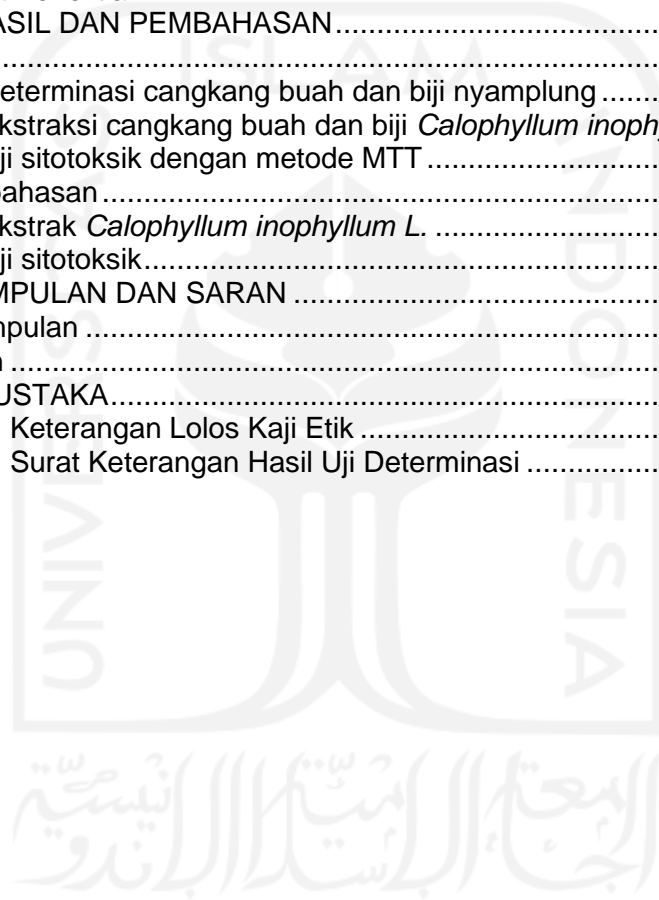
Irfan Jaen Fathani

NIM 17711130

DAFTAR ISI

Halaman Judul (Bahasa Indonesia)	i
Halaman Judul (Bahasa Inggris)	ii
Halaman Pengesahan	iii
Halaman Pernyataan Publikasi	iv
Daftar Isi	v
Daftar Tabel	vii
Daftar Gambar	viii
Halaman Pernyataan	ix
Kata Pengantar	x
Intisari	xii
<i>Abstract</i>	xiii
BAB I . PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Keaslian Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II . TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Telaah Pustaka	5
2.1.1 Karsinogenesis	5
2.1.2 Kanker kolorektal dan permasalahan terapi kanker	5
2.1.3 Tanaman nyamplung (<i>Calophyllum inophyllum</i> L.)	10
2.1.4 Uji sitotoksik	12
2.1.5 5-Flourourasil (5-FU)	13
2.1.6 Sel kanker kolorektal WiDr	14
2.1.7 Sel Vero	14
2.2 Kerangka Teori	16
2.3 Kerangka Konsep	16
2.4 Hipotesis	17
BAB III . METODE PENELITIAN	18
3.1 Jenis dan Desain Penelitian	18
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.3 Subjek Penelitian	18
3.4 Variabel Penelitian	18
3.4.1 Variabel bebas	18
3.4.2 Variabel terikat	18
3.5 Definisi Operasional	19
3.6 Instrumen Penelitian	19
3.6.1 Alat dan bahan	19
3.7 Alur Penelitian	20
3.7.1 Pengambilan sampel cangkang buah dan biji nyamplung	20
3.7.2 Uji determinasi cangkang buah dan biji nyamplung	20
3.7.3 Ekstraksi cangkang buah dan biji nyamplung	20
3.7.4 Kultur sel WiDr dan sel Vero	21
3.7.5 Pemanenan sel WiDr dan sel Vero	21
3.7.6 Perhitungan dan penanaman sel WiDr dan sel Vero	21
3.7.7 Pembuatan larutan stok	22

3.7.8 Pembuatan serial konsentrasi larutan uji.....	23
3.7.9 Uji sitotoksik.....	24
3.8 Analisis Data	26
3.9 Skema jalannya penelitian.....	27
3.9.1 Ekstraksi - pembuatan serial konsentrasi sampel	27
3.9.2 Kultur sel - penanaman dan penghitungan sel	28
3.9.3 Uji sitotoksik.....	29
3.9.4 Skema analisis data.....	30
3.9.5 <i>Dummy Table</i> perlakuan ekstrak cangkang buah dan biji nyamplung	31
3.9.6 <i>Dummy Table</i> perlakuan 5-FU	31
3.10 Etika Penelitian	32
BAB IV . HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.1 Hasil.....	32
4.1.1 Determinasi cangkang buah dan biji nyamplung	32
4.1.2 Ekstraksi cangkang buah dan biji <i>Calophyllum inophyllum L.</i>	32
4.1.3 Uji sitotoksik dengan metode MTT	33
4.2 Pembahasan.....	45
4.2.1 Ekstrak <i>Calophyllum inophyllum L.</i>	45
4.2.2 Uji sitotoksik.....	45
BAB V . SIMPULAN DAN SARAN	49
5.1 Kesimpulan	49
5.2 Saran	49
DAFTAR PUSTAKA.....	50
Lampiran 1. Keterangan Lolos Kaji Etik	54
Lampiran 2. Surat Keterangan Hasil Uji Determinasi	55



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Penelitian terdahulu.....	3
Tabel 2. Derajat tumor primer (T) (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).....	7
Tabel 3. Derajat penyebaran ke nodus limfatikus (N) (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).....	7
Tabel 4. Derajat metastasis (M) (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).....	8
Tabel 5. Klasifikasi stadium kanker (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).....	8
Tabel 6. Tatalaksana kanker kolon (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).....	9
Tabel 7. Tatalaksana kanker rektum (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).....	9
Tabel 8. Alat dan bahan untuk penelitian.....	19
Tabel 9. Dummy Table perlakuan ekstrak cangkang buah dan biji nyamplung... 31	31
Tabel 10. Dummy Table perlakuan 5-FU	31
Tabel 11. Hasil absorbansi dan hasil perhitungan IC ₅₀ ekstrak etanol biji nyamplung terhadap sel WiDr.....	35
Tabel 12. Hasil absorbansi dan hasil perhitungan IC ₅₀ ekstrak etanol cangkang buah nyamplung terhadap sel WiDr.....	36
Tabel 13. Hasil absorbansi dan hasil perhitungan IC ₅₀ 5-FU terhadap sel WiDr. 36	36
Tabel 14. Hasil absorbansi dan hasil perhitungan IC ₅₀ ekstrak etanol biji nyamplung terhadap sel Vero.	41
Tabel 15. Hasil absorbansi dan hasil perhitungan IC ₅₀ ekstrak etanol cangkang buah nyamplung terhadap sel Vero.	41
Tabel 16. Hasil absorbansi dan hasil perhitungan IC ₅₀ Doxorubicin terhadap sel Vero.....	41
Tabel 17. Hasil absorbansi dan hasil perhitungan IC ₅₀ Doxorubicin terhadap sel WiDr.	42
Tabel 18. Nilai indeks selektivitas.....	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Gambaran histopatologi Adenokarsinoma Kolorektal	7
Gambar 2. Tanaman Nyamplung (<i>Calophyllum inophyllum</i> L.)	10
Gambar 3. Bagian-bagian Nyamplung	12
Gambar 4. Morfologi sel WiDr.....	14
Gambar 5. Morfologi sel Vero	15
Gambar 6. Kerangka teori.....	16
Gambar 7. Kerangka konsep	16
Gambar 8. Proses Pengenceran pada Ekstrak Biji nyamplung dan cangkang buah nyamplung	23
Gambar 9. Proses pengenceran 5-FU	24
Gambar 10. Proses pengenceran doxorubicin	24
Gambar 11. Pemetaan pada 96-well microplate sel WiDr	25
Gambar 12. Pemetaan pada 96-well microplate sel Vero	25
Gambar 13. Skema ekstraksi - pembuatan serial konsentrasi sampel	27
Gambar 14. Skema kultur sel - penanaman dan penghitungan sel	28
Gambar 15. Skema uji sitotoksik.....	29
Gambar 16. Skema analisis data	30
Gambar 17. Hasil ekstraksi	32
Gambar 18. Pemetaan pada 96-well microplate 1 setelah diberi perlakuan oleh sampel.....	33
Gambar 19. Sel WiDr pada kontrol sel sebelum ditambahkan MTT (kiri), sesudah ditambahkan MTT (kanan).....	34
Gambar 20. Keadaan 96-well microplate 1 setelah pemberian MTT	34
Gambar 21. Grafik analisis regresi linear log konsentrasi ekstrak etanol biji nyamplung terhadap viabilitas sel WiDr	37
Gambar 22. Grafik analisis regresi linear log konsentrasi ekstrak etanol cangkang buah nyamplung terhadap viabilitas sel WiDr	37
Gambar 23. Grafik analisis regresi linear log konsentrasi 5-FU terhadap viabilitas sel WiDr.....	38
Gambar 24. Pemetaan pada 96-well microplate 2 setelah diberi perlakuan oleh sampel.....	39
Gambar 25. Sel Vero pada kontrol sel sebelum ditambahkan MTT (kiri), sesudah ditambahkan MTT (kanan).....	40
Gambar 26. Keadaan 96-well microplate 2 setelah pemberian MTT	40
Gambar 27. Grafik analisis regresi linear log konsentrasi ekstrak etanol biji nyamplung terhadap viabilitas sel Vero.....	43
Gambar 28. . Grafik analisis regresi linear log konsentrasi ekstrak etanol cangkang buah nyamplung terhadap viabilitas sel Vero.....	43
Gambar 29. Grafik analisis regresi linear log konsentrasi doxorubicin terhadap viabilitas sel Vero.....	44
Gambar 30. Grafik analisis regresi linear log konsentrasi Doxorubicin terhadap viabilitas sel WiDr	44

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Karya Tulis Ilmiah ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 13 November 2020



Irfan Jaen Fathani

17711130

الجمعة الامتداد الاندونيسيا

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullah Wabarakaatuh,

Alhamdulillah, segala puji bagi Allah yang telah memberikan rahmat dan segala karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah (KTI) yang berjudul "Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Cangkang Buah dan Biji Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) Terhadap Sel Kanker Kolorektal WiDr" dengan lancar. Shalawat serta salam selalu tercurahkan kepada kami Nabi Muhammad SAW yang telah membawa umatnya dari zaman jahiliyah menuju zaman penuh rahmat seperti saat ini.

Karya Tulis Ilmiah ini dibuat untuk memenuhi salah satu persyaratan kelulusan dalam memperoleh gelar S.Ked pada Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Penulisan karya tulis ilmiah ini tentu saja mengalami banyak kesulitan. Untuk itu penulis ingin menyampaikan apresiasi dan rasa terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua penulis yang sangat dicintai, Bapak Jaenudin dan Ibu Azizah Rochani yang selalu memberikan pengorbanan, motivasi, dan doa yang *Insyaa Allah* senantiasa mengiringi penulis selama masa studi di Fakultas Kedokteran hingga penulis dapat menyelesaikan KTI ini.
2. Dr. dr. Isnatin Miladiyah, M.Kes selaku dosen pembimbing yang telah membimbing penulis dengan segenap hati hingga dapat menyelesaikan KTI ini.
3. dr. Intannuary Paringga Sp.PA selaku dosen penguji yang turut membimbing, menguji serta memberi masukan sehingga karya tulis ini menjadi lebih baik.
4. dr. Nur Aisyah Jamil, M.Sc. selaku dosen pembimbing akademik yang selalu memberi dukungan dan doa serta membersamai penulis selama masa studi di Fakultas Kedokteran.
5. dr. Linda Rosita, M. Kes, Sp.PK selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia yang telah memberikan banyak kesempatan bagi penulis untuk mengeksplorasi lebih ilmu pengetahuan dan penelitian selama menimba ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.
6. Laboran Laboratorium Farmasi FMIPA UII yang telah membantu dalam proses jalannya penelitian ini.
7. Laboran Laboratorium Parasitologi FKKMK UGM yang telah membantu dalam proses jalannya penelitian ini.
8. Teman-teman yang telah membantu atas berjalannya penelitian ini, Raihan Izzudin Daffa, Yusup Habibullah, Alma Natasya, Nida Zahrotun, Almas Maulana Jauhar, Reza Estiko, Alissa Anna Safira, Nurin Jannatin, Hanif Al-As'ad, Mochammad Alif Ramadhan, Mohammad Afifudin.
9. Teman-teman dekat penulis lainnya yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang selalu memberikan *support* dalam menyelesaikan KTI.
10. Teman-teman seperjuangan DHAKTARKA ARVESTY FK UII 2017 yang selalu memotivasi dan menemani hari-hari penulis selama fase pendidikan prelinik.

Penulis menyadari bahwa karya tulis ilmiah ini jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, dengan segenap kerendahan hati penulis memohon kritik dan

masukannya. Semoga karya tulis ini dapat diterapkan dan dapat memberikan manfaat bagi masyarakat Indonesia secara luas.

Yogyakarta, 13 November 2020



Irfan Jaen Fathani



UJI SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL CANGKANG BUAH DAN BIJI NYAMPLUNG (*Calophyllum inophyllum* L.) TERHADAP SEL KANKER KOLOREKTAL WiDr

Irfan Jaen Fathani¹, Isnatin Miladiyah²

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

²Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

INTISARI

Latar Belakang: Kasus kanker di dunia terus meningkat. Kanker kolorektal termasuk dalam tiga besar keganasan, baik dalam hal insidensi maupun mortalitasnya. Kanker kolorektal merupakan keganasan yang berasal dari jaringan usus besar yang terdiri dari kolon dan/atau rektum. Penanganan kemoterapi kanker kolorektal dinilai kurang baik akibat adanya efek samping yang ditimbulkan, seperti kurangnya selektivitas terhadap sel yang ganas dan harga yang mahal, sehingga perlu pencarian terapi alternatif dengan efek samping yang lebih rendah, contohnya obat herbal. Tanaman nyamplung dilaporkan mengandung calophyllolide, triterpenoid, kumarin, biflavonoids, benzophenones dan neoflavanoids yang berpotensi sebagai zat antikanker. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa kandungan zat-zat tersebut dapat menghasilkan efek sitotoksik ataupun efek anti-proliferatif pada sel kanker manusia.

Tujuan Penelitian: Mengetahui aktivitas sitotoksik dan selektivitas ekstrak etanol cangkang buah dan biji nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) terhadap sel kanker kolorektal WiDr.

Metode Penelitian: Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu uji in vitro yang berupa uji sitotoksik dengan metode 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Analisis menggunakan *microsoft excel* dengan metode analisis regresi linear. Indikator toksisitas menggunakan IC₅₀ dan indikator selektivitas menggunakan indeks selektivitas.

Hasil: Pada penelitian ini didapatkan hasil IC₅₀ ekstrak etanol cangkang buah nyamplung terhadap sel WiDr sebesar 42,472 µg/ml dengan indeks selektivitas 1,503 dan IC₅₀ ekstrak etanol biji nyamplung terhadap sel WiDr sebesar 1.030,410 µg/ml dengan indeks selektivitas 67.982.414,710. Doxorubicin sebagai kontrol positif didapatkan hasil IC₅₀ terhadap sel WiDr 3,499 µg/ml dengan indeks selektivitas 764,416.

Kesimpulan: Ekstrak etanol biji nyamplung belum dapat dibuktikan efektivitasnya pada sel kanker kolorektal WiDr dikarenakan tidak memiliki aktivitas sitotoksik. Ekstrak etanol cangkang buah nyamplung memiliki efek sitotoksik yang sedang namun memiliki indeks selektivitas yang rendah, sehingga perlu diteliti kembali bagaimana untuk memaksimalkan potensi sitotoksiknya dan selektivitasnya di bidang pengobatan herbal antikanker.

Kata kunci: *Calophyllum inophyllum*, sitotoksik, WiDr, IC₅₀

CYTOTOXICITY ASSAY OF ETHANOLIC EXTRACT OF FRUIT SHELL AND SEED NYAMPLUNG (*Calophyllum inophyllum* L.) ON WiDr HUMAN COLORECTAL CANCER CELL

Irfan Jaen Fathani¹, Isnatin Miladiyah²

¹Student of the Faculty of Medicine Universitas Islam Indonesia

²Department of Pharmacology Faculty of Medicine Universitas Islam Indonesia

ABSTRACT

Background: Cancer case in the world continue to increase. Colorectal cancer is included in the top three cancers, both in incidence and mortality rate. Colorectal cancer is a malignancy originating from the large intestine tissue consisting of the colon and or rectum. Chemotherapy treatment of colorectal cancer cases is considered poor due to side effects, such as a lack of selectivity to malignant cells and expensive. It is necessary to seek alternative therapies with lower side effects, for example herbal medicines. Nyamplung is reported to contain calophyllolide, triterpenoids, coumarin, biflavonoids, benzophenones and neoflavanoids which are potential anticancer agents. Previous studies have shown that the content of these substances can produce cytotoxic or anti-proliferative effects on human cancer cells.

Objective: To look for cytotoxic activity and selectivity of ethanolic extract of nyamplung fruit shells and seeds (*Calophyllum inophyllum* L.) against WiDr colorectal cancer cells.

Methods: The method used in this study is an *in vitro* cytotoxic assay with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. Analysis using Microsoft Excel with linear regression analysis method. The indicator of toxicity uses the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) and the selectivity indicator uses the selectivity index.

Results: In this study, the IC_{50} results of the ethanolic extract of nyamplung fruit shells against WiDr cells were 42,472 $\mu\text{g/ml}$ with a selectivity index 1,503 and IC_{50} of ethanolic extract of nyamplung seeds against WiDr cells were 1.030,41 $\mu\text{g/ml}$ with a selectivity index 67.982.414,710. Doxorubicin as a positive control obtained IC_{50} results against WiDr cells 3,499 $\mu\text{g/ml}$ with a selectivity index of 764,416.

Conclusion: The ethanolic extract of nyamplung seed has not effective on WiDr colorectal cancer cells because it doesn't have cytotoxic activity. The ethanolic extract of nyamplung fruit shells has a moderate cytotoxic effect but has a low selectivity index, so it is necessary to re-examine how to maximize its cytotoxicity and selectivity as an anticancer herbal medicine.

Keywords: *Calophyllum inophyllum*, cytotoxic, WiDr, IC_{50}

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kasus kanker di dunia terus meningkat. Pada 2018 tercatat 18.078.957 kasus kanker baru muncul dari berbagai belahan penjuru dunia dan 9.555.027 di antaranya meninggal dunia. Kanker paru, kanker payudara, dan kanker kolorektal merupakan tiga jenis kanker dengan insidensi tertinggi di dunia. Lima besar peringkat kanker dengan mortalitas tertinggi ditempati oleh kanker paru, kanker kolorektal, kanker perut, kanker hati dan kanker payudara. Penyebab kanker paling sering pada laki-laki adalah kanker paru, sedangkan pada perempuan adalah kanker payudara (*The Global Cancer Observatory*, 2019). Insidensi kanker pada negara dengan Indeks Pembangunan Manusia (IPM) tinggi 2-3 x lebih tinggi daripada negara dengan IPM rendah. Namun tingkat mortalitasnya tidak jauh berbeda karena perawatan kanker di negara dengan IPM rendah masih belum baik, termasuk di Indonesia. Dalam lima tahun terakhir, tercatat sebanyak 775.120 kasus kanker terjadi di Indonesia. Kanker paru masih menjadi peringkat pertama dengan insidensi tertinggi di Indonesia disusul oleh kanker payudara dan kanker kolorektal (*World Health Organization [WHO]*, 2019). Melihat data tersebut, kanker kolorektal menjadi kanker yang harus menjadi perhatian dunia kesehatan Indonesia karena termasuk dalam tiga besar kanker, baik dalam hal insidensi maupun mortalitasnya (*The Global Cancer Observatory*, 2019).

Kanker kolorektal merupakan keganasan yang berasal dari jaringan usus besar yang terdiri dari kolon dan/atau rektum. Kanker ini dapat terjadi akibat turunan genetik, mutasi genetik, ataupun lesi pada kolon akibat infeksi (Kuipers, *et al.*, 2015). Kanker kolorektal termasuk kanker yang sangat jarang terjadi pada tahun 1950-an, namun saat ini termasuk dalam tiga besar kanker tersering di dunia. Hal ini terjadi akibat perubahan gaya hidup masyarakat modern yang cenderung tidak sehat, seperti merokok, konsumsi alkohol, kurangnya olahraga, ataupun obesitas (Kusuma, Nurulita, Hartanti, 2010; Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).

Penanganan kasus kanker kolorektal biasanya dilakukan dengan pengangkatan jaringan kanker untuk stadium kanker yang masih dini, menggunakan kemoterapi untuk tujuan paliatif, dan penggunaan radioterapi. Penggunaan kemoterapi dinilai kurang baik akibat adanya efek samping yang ditimbulkan, seperti kurangnya selektivitas terhadap sel yang ganas dan harga yang mahal. Perlu pencarian terapi alternatif dengan efek samping yang lebih rendah, contohnya obat herbal. Penggunaan obat herbal bersama dengan kemoterapi dilaporkan dapat menurunkan efek samping dan meningkatkan efektivitas terapi (Fu *et al.*, 2018). Penelitian tentang zat antikanker yang didapat dari tumbuhan sudah banyak dilakukan. *Calophyllum inophyllum L.* merupakan salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai antikanker (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).

Calophyllum inophyllum L. memiliki nama lain, yaitu nyamplung, yang tersebar di Indonesia dari pulau Sumatra hingga Papua. Tanaman ini merupakan tanaman yang dapat dimanfaatkan seluruh bagian tanamannya, seperti akar, daun, biji, bunga, buah dan batang. Tanaman nyamplung dilaporkan mengandung *calophyllolide*, *triterpenoid*, *kumarin*, *biflavonoids*, *benzophenones* dan *neoflavanoids* yang berpotensi sebagai zat antikanker (Ragasa *et al.*, 2015). Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa kandungan zat-zat tersebut dapat menghasilkan efek sitotoksik ataupun efek anti-proliferasi pada sel kanker manusia. Pada penelitian sebelumnya, ditemukan bahwa ekstrak buah nyamplung bersifat efek sitotoksik terhadap sel kanker MCF-7. Ekstrak buah nyamplung menginduksi apoptosis melalui aktivasi kaspase-3 dan menghambat pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) pada sel kanker payudara MCF-7 (Shanmugapriya, *et al.*, 2017). Bagian batang dan daunnya juga terbukti memberikan efek inhibisi pertumbuhan kepada sel leukemia HL-60 (Li, *et al.*, 2010). Minyak dari biji nyamplung juga berkhasiat menyembuhkan luka dengan meningkatkan proliferasi sel, produksi kolagen dan glikosaminoglikan (Ansel, *et al.*, 2016). Selain digunakan di bidang kesehatan, biji nyamplung juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan bakar *biodiesel* (Leksono, Windyarini dan Hasnah, 2014). Sejauh ini, pengujian aktivitas sitotoksik buah nyamplung terhadap sel kanker kolorektal belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, dalam penelitian uji sitotoksik cangkang dan biji

nyamplung (*Calophyllum inophyllum L.*) pada sel kanker kolorektal WiDr dan sel normal Vero ini perlu dilakukan. Diharapkan penelitian ini dapat menjadi dasar untuk penelitian selanjutnya dalam menggali potensi tanaman nyamplung sebagai alternatif obat antikanker yang sudah ada saat ini.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak etanol cangkang buah dan biji nyamplung (*Calophyllum inophyllum L.*) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker kolorektal WiDr?
2. Bagaimana indeks selektivitas ekstrak etanol cangkang buah dan biji nyamplung (*Calophyllum inophyllum L.*) terhadap sel kanker WiDr?

1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui aktivitas sitotoksik dan selektivitas ekstrak etanol cangkang buah dan biji nyamplung (*Calophyllum inophyllum L.*) terhadap sel kanker kolorektal WiDr.

1.4 Keaslian Penelitian

Tabel 1. Penelitian terdahulu.

No	Judul	Peneliti (Tahun)	Hasil	Persamaan	Perbedaan
1	<i>Anticancer Activity and Molecular Mechanism of Polyphenol Rich Calophyllum inophyllum Fruit Extract in MCF-7 Breast Cancer Cells</i>	Shanmugapriya et al. (2017)	Terjadi apoptosis pada sel kanker MCF-7 yang diinduksi ekstrak buah <i>C. inophyllum</i> tergantung pada p53 dan dimediasi melalui aktivasi caspase-3. Ekstrak buah <i>C. inophyllum</i> dapat menjadi agen kemopreventif dalam pengobatan kanker payudara dan	Sama-sama uji sitotoksik, sama-sama menggunakan ekstrak <i>C. inophyllum</i>	Pada penelitian tersebut menggunakan sel kanker payudara, tidak uji sitotoksik dan antiproliferatif menggunakan uji MTT

Tabel 1. Lanjutan (Penelitian Terdahulu)

No	Judul	Peneliti (Tahun)	Hasil	Persamaan	Perbedaan
			memiliki potensi untuk dieksplorasi sebagai agen antikanker herbal		
2	Identifikasi Senyawa Toksik Ekstrak Kloroform Kulit Biji Nyamplung (<i>Calophyllum inophyllum</i> L.)	Santi <i>et al.</i> (2012)	Terdapat senyawa toksik (LC ₅₀ = 8,241 ppm) dari isolat di duga mengandung asam heksadekanoat atau asam palmitat (21,02%); asam 8-oktadekanoat (59,55%); asam oktadekanoat atau asam stearat (19,43%).	Sama-sama menggunakan ekstrak bagian buah nyamplung	Pada penelitian tersebut mengidentifikasi senyawa toksik
3	<i>Yellow and green pigments from Calophyllum inophyllum</i> L. seed oil induce cell death in colon and lung cancer cells	Hsieh <i>et al.</i> (2018)	Kedua pigmen menginduksi kematian sel DLD-1 dan bersifat toksik pada sel A549 dan H1975 dengan IC ₅₀ 0.1206 pada pigmen hijau dan 0.0434 pada pigmen kuning.	Sama-sama uji sitotoksik, sama-sama menggunakan ekstrak <i>C. inophyllum</i>	Dilakukan pada sel kanker kolon DLD-1 dan paru H1975 dan A549

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar awal penelitian mengenai tumbuhan nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) untuk dikembangkan sebagai antikanker.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Telaah Pustaka

2.1.1 Karsinogenesis

Karsinogenesis merupakan mekanisme bagaimana sel kanker dapat tumbuh. Secara umum, proses ini diawali oleh adanya proses inisiasi dan promosi. Agen inisiator merupakan mutagen eksogen dan endogen, seperti sinar ultraviolet (UV), tembakau rokok, dan *reactive oxygen species* (ROS). Mutagen ini menyebabkan kerusakan *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) sehingga dapat mengubah proto-onkogen menjadi onkogen dan mematikan *Tumor Suppressor Gene* (TSG), seperti TP53. TP53 berfungsi sebagai regulator siklus sel agar perkembangan sel terkontrol. TP53 menginduksi apoptosis dan perbaikan sel (Hyndman, 2016). Karakteristik dari proses inisiasi yaitu irreversibel. Proses inisiasi tidak akan langsung menimbulkan kanker, namun memerlukan promotor agar sel tersebut dapat berkembang menjadi sel kanker. Promotor hanya memiliki atau tidak mempunyai efek karsinogenik, tetapi memiliki kemampuan untuk mempromosikan pertumbuhan tumor ketika tumor sudah terpapar agen inisiasi. Promotor menyebabkan sel yang diinisiasi berkembang secara klonal tanpa mempengaruhi sel sehat yang belum diinisiasi. Proses dari inisiasi menuju promosi dapat berlangsung selama 1 tahun (Malarkey, Hoenerhoff dan Maronpot, 2013).

Sel-sel kanker dapat terus berproliferasi yang awalnya hanya pada satu organ dapat menyebar ke organ-organ lain melalui pembuluh darah ataupun melalui pembuluh limfa. Proses ini disebut metastasis. Proses metastasis meliputi proliferasi, angiogenesis, invasi lokal, intravasasi, ekstravasasi hingga pertumbuhan tumor di lokasi yang baru (Hyndman, 2016).

2.1.2 Kanker kolorektal dan permasalahan terapi kanker

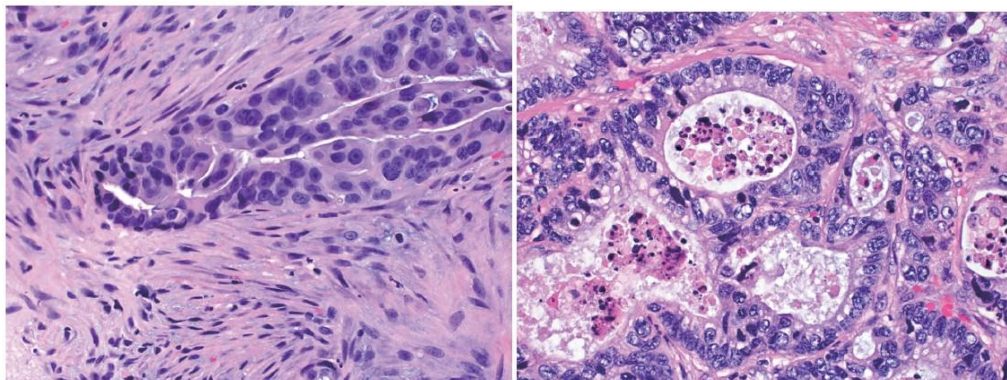
Kanker kolorektal merupakan keganasan yang berasal dari jaringan usus besar, yang terdiri atas kolon dan/atau rektum. Faktor risiko terjadinya kanker kolorektal meliputi usia tua, laki-laki, riwayat keturunan kanker kolorektal di keluarga, mengidap *inflammatory bowel disease*, merokok, konsumsi alkohol

berlebihan, konsumsi tinggi daging merah dan olahan, obesitas, dan diabetes. Keturunan keluarga yang mengidap kanker kolorektal dan seseorang yang terjangkit *inflammatory bowel disease* menjadi faktor risiko yang paling sering muncul. *Familial Adenomatous Polyposis* (FAP) dan *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* (HNPCC atau sindrom Lynch) merupakan penyimpangan genetik yang dapat diturunkan pada kasus kanker kolorektal. Studi terkini juga menunjukkan infeksi *Helicobacter pylori* dan *Fusobacterium spp* dapat meningkatkan risiko terkena kanker kolorektal (Brenner, Kloor, dan Pox, 2014).

Mekanisme terjadinya kanker kolorektal timbul dari 1 atau kombinasi dari 3 mekanisme, yaitu *chromosomal instability* (CIN), *CpG island methylator phenotype* (CIMP), dan *microsatellite instability* (MSI). Jalur CIN dimulai dengan mutasi pada gen *adenomatous polyposis coli* (APC), diikuti dengan mutasi onkogen KRAS dan inaktivasi TP53. Pada CIN, terjadi aneuploidi dan *Loss Of Heterozygosity* (LOH). Aneuploidi muncul karena kegagalan pada pos *checkpoint* mitosis, yang menyebabkan misagregasi kromosom. LOH adalah hilangnya salah satu alel orangtua, yang disebabkan oleh *non-disjunction* proses mitosis. Pada jalur MSI terjadi karena mutasi pada gen yang memperbaiki kesalahan replikasi DNA. Komponen penting dari sistem perbaikan gen ini adalah ATPases hMSH2, hMSH6, hMSH3, hMLH1, hPMS2, hPMS1, dan hMLH3. Jalur CIMP ditandai oleh hipermetilasi promotor dari berbagai *Tumor Supreessing Gen* (TSG), terutama yaitu gen MGMT dan MLH1 (Tariq dan Ghias, 2016). Pada awalnya mekanisme ini menimbulkan terbentuknya adenoma, namun 10-15 tahun tanpa terapi dan monitoring dapat berlanjut menjadi kanker kolorektal (Kuipers *et al.*, 2015).

Lebih dari 90% karsinoma kolorektal memiliki jenis adenokarsinoma. Adenokarsinoma kolorektal adalah pertumbuhan ganas epitel kelenjar mukosa kolon atau rektum. Analisis histopatologi adenokarsinoma kolorektal invasif diketahui dengan melihat gambaran lapisan muskularis mukosa, reaksi desmoplastik, dan debris nekrotik. Lapisan muskularis mukosa yang sudah tidak utuh dan ditembus oleh kelenjar menandakan bahwa sel kelenjar sudah bersifat invasif. Reaksi desmoplastik di sekitar kelenjar disebabkan adanya proses hialinisasi stroma (Gambar 1A). Reaksi desmoplastik merupakan reaksi tumbuhnya jaringan ikat fibrosa yang berlebih di area tumor dikarenakan respon

imun terhadap sel tumor. Gambaran debris nekrotik dapat dilihat pada Gambar 1B (Fleming *et al.*, 2012).



Gambar 1. Gambaran histopatologi Adenokarsinoma Kolorektal. (A) Gambaran reaksi desmoplastik stroma. (B) Debris nekrotik di dalam kelenjar. (Fleming *et al.*, 2012)

Klasifikasi kanker kolorektal berdasar pada *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* 2010, yang dilihat dari kedalaman invasi tumor (T), penyebaran ke kelenjar limfe (N), dan keberadaan metastasis jauh (M) (Tabel 2-4). Derajat TNM digabungkan untuk menentukan keputusan terapeutik bagi pasien sesuai stadiumnya. Stadium kanker kolorektal merujuk pada *Union Internationale Contre le Cancer (UICC)* (Tabel 5) (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).

Tabel 2. Derajat tumor primer (T) (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).

Derajat	Penjelasan
Tx	Tumor primer tidak dapat dinilai.
T0	Tidak ditemukan tumor primer.
Tis	Karsinoma <i>in situ</i> : <i>intraepitelial</i> atau menginvasi <i>lamina propia</i> .
T1	Tumor menginvasi hingga submukosa.
T2	Tumor menginvasi hingga jaringan otot.
T3	Tumor menembus jaringan otot hingga <i>pericolorectal</i> .
T4a	Tumor menembus hingga permukaan dari peritoneum.
T4b	Tumor menginvasi hingga ke jaringan dan organ lainnya.

Tabel 3. Derajat penyebaran ke nodus limfatikus (N) (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).

Derajat	Penjelasan
Nx	Nodus limfa regional tidak dapat dinilai
N0	Tidak terdapat metastasis pada nodus limfa regional
N1	Metastasis pada 1-3 nodus limfa regional
N2	Metastasis pada ≥ 4 nodus limfa regional
N2a	Metastasis pada 4-6 nodus limfa regional

Tabel 3. Lanjutan (Derajat penyebaran ke nodus limfatikus (N) (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015)).

Derajat	Penjelasan
N2b	Metastasis pada ≥ 7 nodus limfa regional

Tabel 4. Derajat metastasis (M) (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).

Derajat	Penjelasan
M0	Tidak terdapat metastasis jauh
M1	Terdapat metastasis jauh
M1a	Metastasis terbatas pada 1 organ
M1b	Metastasis pada lebih dari 1 organ

Tabel 5. Klasifikasi stadium kanker (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	Semua derajat T	Semua derajat N	M1a
IVB	Semua derajat T	Semua derajat N	M1b

Penanganan kanker kolorektal dilakukan berdasarkan letaknya, yaitu kanker kolon dan/atau kanker rektum (Tabel 6 dan Tabel 7). Pilihan dan rekomendasi terapi tergantung pada klasifikasi stadium kanker tersebut. Terapi bedah merupakan terapi utama untuk kanker stadium dini dengan tujuan kuratif. Kemoterapi adalah pilihan pertama pada kanker stadium lanjut dengan tujuan paliatif. Radioterapi dapat dilakukan khusus pada kanker rektum sebagai neoadjuvan (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).

Tabel 6. Tatalaksana kanker kolon (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).

Stadium	Terapi
0	- Eksisi lokal atau polipektomi sederhana - Reseksi <i>en-bloc</i> segmental untuk lesi yang tidak memenuhi syarat eksisi lokal
I	<i>Wide surgical resection</i> dengan anastomosis tanpa kemoterapi ajuvan
II	- <i>Wide surgical resection</i> dengan anastomosis - Terapi ajuvan setelah pembedahan pada pasien dengan resiko tinggi
III	- <i>Wide surgical resection</i> dengan anastomosis - Terapi ajuvan setelah pembedahan pada pasien dengan resiko tinggi
IV	- Reseksi tumor primer pada kasus kanker kolorektal dengan metastasis yang dapat direseksi - Kemoterapi sistemik pada kasus kanker kolorektal dengan metastasis yang tidak dapat direseksi dan tanpa gejala

Tabel 7. Tatalaksana kanker rektum (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).

Stadium	Terapi
I	Eksisi <i>Transanal Endoscopic Microsurgery</i> (TEM) atau reseksi transabdominal + pembedahan <i>Total Mesorectal Excision</i> (TME) jika resiko tinggi
Ila-IIIC	- Kemoradioterapi neoajuvan (5-FU jangka pendek atau <i>capecitabine</i> jangka pendek) - Reseksi transabdominal dengan teknik TME dan terapi ajuvan (5-FU ± <i>leucovorin</i>)
IIIC (tidak dapat direseksi secara lokal)	- Neoajuvan : 5-FU atau <i>capecitabine</i> - Reseksi transabdominal + teknik TME bila memungkinkan dan ajuvan
IVA/B (metastasis dapat direseksi)	Kombinasi kemoterapi atau reseksi <i>staged/synchronous</i> lesi metastasis + lesi rektum
IVA/B (metastasis <i>borderline resectable</i>)	Kombinasi kemoterapi
IVA/B (Metastasis <i>synchronous</i> tidak dapat direseksi atau secara medis tidak dapat dioperasi)	- Terapi simptomatik - Kemoterapi paliatif

Untuk tatalaksana sistemik, biasanya digunakan kemoterapi seperti 5-Flourourasil (5-FU), leucovorin, capecitabine, doxorubicin dan oxaliplatin. Kemoterapi dapat bersifat tunggal atau kombinasi dari dua atau lebih obat. Kemoterapi memiliki efek samping anemia, leukopenia, neutropenia, trombositopenia, mual, muntah, diare, mukositis, alopesia, sindroma kolinergik, neuropati, panas, asthenia, gangguan jantung, gangguan kulit ataupun reaksi hipersensitivitas. Akibat adanya berbagai macam efek samping ini, maka

seringkali penggunaan kemoterapi dilakukan secara kombinasi (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).

2.1.3 Tanaman nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.)

Tanaman nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) memiliki sebaran yang luas di dunia, seperti Afrika, India, Asia Tenggara, Australia Utara, dan lain-lain. Di Indonesia, tanaman ini dijumpai di hampir seluruh wilayah, terutama di daerah pesisir pantai, seperti Taman Nasional (TN) Alas Purwo, TN Kepulauan Seribu, TN Baluran, TN Ujung Kulon, Cagar Alam (CA) Pananjung Pangandaran, Kawasan Wisata (KW) Batu Karas, Pantai Carita Banten, wilayah Papua (pulau Yapen, Jayapura, Biak, Nabire, Manokwari, Sorong, Fakfak), Maluku Utara (Halmahera dan Ternate) dan TN Berbak (Pantai Barat Sumatera). Bentuk tanaman nyamplung tampak seperti pada Gambar 2. Tanaman nyamplung dapat tumbuh dengan mengikuti beberapa kriteria kondisi alam berikut: komposisi tanah mineral dan pantai berpasir marginal, tanah yang mengandung liat berdrainase baik dan toleran terhadap kadar garam, ketinggian tempat 0–200 meter di atas permukaan laut, tipe curah hujan A dan B (1000–3000 mm per tahun dengan 4–5 bulan kering), Temperatur rata-rata 18-33 °C, pH antara 4-7,4 (Leksono, Windyarini dan Hasnah, 2014).



Gambar 2. Tanaman Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.)
(Leksono, Windyarini dan Hasnah, 2014)

Klasifikasi taksonomi :

Kingdom : Plantae

Subkingdom	: Viridiplantae
Divisi	: Tracheophyta
Sub-divisi	: Spermatophytina
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Malpighiales
Family	: Calophyllaceae
Genus	: Calophyllum
Species	: <i>Calophyllum inophyllum</i> L.

Gambar 3 menunjukkan bagian-bagian dari tanaman nyamplung. Karakteristik pohon nyamplung (a) terlihat rimbun-hijau dengan akar tunjang. Tinggi pohon dapat mencapai 25 m, diameter dapat mencapai 150 cm. Kulit batang (b) bagian luar berwarna kelabu atau putih, beralur dangkal dan mengelupas besar-besar tipis. Pada kulit kayu terdapat saluran getah berwarna kuning. Daun (c) berwarna hijau membentuk memanjang atau bulat telur, ujung tumpul, pangkal membulat, tepi rata, tulang menyirip, panjang mencapai 20-21 cm, lebar 6-11 cm, tangkai 1,5 - 2,5 cm. Bunga (d) membentuk tandan di ketiak daun yang teratas, berkelamin dua, diameter mencapai 2-3 cm, daun kelopak empat tidak beraturan, benang sari banyak, tangkai putik membengkok, kepala putik berbentuk perisai, daun mahkota empat, lonjong, putih. Buah (e) muda berwarna hijau dan yang sudah tua berwarna kekuning-kuningan, apabila dibiarkan lama buah berwarna seperti kayu. Buah berbentuk bulat seperti peluru dengan mancong kecil di depannya. Diameter buah mencapai antara 2,5 - 5 cm. Biji (f) berbentuk bulat tebal dan keras, berukuran relatif besar berdiameter 2,5-4 cm, daging biji tipis dan biji yang telah kering dapat tahan disimpan selama 1 bulan, inti biji mengandung minyak berwarna kuning kecoklatan (Leksono, Windyarini dan Hasnah, 2014).



Gambar 3. Bagian-bagian Nyamplung
Sumber : (Leksono, Windyarini dan Hasnah, 2014)

Biji nyamplung dapat diolah menjadi minyak sebagai bahan bioenergi. Minyak dari biji nyamplung juga berkhasiat menyembuhkan luka dengan meningkatkan proliferasi sel, produksi kolagen dan glikosaminoglikan (Ansel *et al.*, 2016). Tanaman nyamplung juga diketahui memiliki sifat anti bakteri, antivirus, anti-HIV, bahkan antikanker. Kandungan tersebut seperti kumarin, *isoflavonoid*, *xanthone*, *calophyllolide*, *biflavonoids*, *benzophenones*, *neoflavanoids* dan *triterpene* (Kusuma, Nurulita, Hartanti, 2010; Sundur *et al.*, 2014; Ragasa *et al.*, 2015; Shanmugapriya *et al.*, 2017).

2.1.4 Uji sitotoksik

Uji sitotoksik secara *in vitro* menggunakan kultur sel telah banyak digunakan sebagai uji sitotoksisitas bahan kimia dan untuk pengujian obat. Saat ini, uji sitotoksik juga digunakan dalam penelitian di bidang onkologi untuk mengevaluasi toksisitas senyawa dan penghambatan pertumbuhan sel tumor selama pengembangan obat. Kelebihan dari uji sitotoksik *in vitro* ini yaitu cepat, murah, dan dapat menguji sampel dalam jumlah besar. Namun, tes ini memiliki beberapa kelemahan karena secara teknis mereka belum mampu untuk menggantikan tes pada hewan coba (Aslantürk, 2018). Terdapat beberapa klasifikasi dari uji sitotoksik berdasarkan tujuan apa yang diukur, yaitu perubahan warna, fluoresensi, luminensi, dan lain-lain. Berikut klasifikasinya :

1. *Dye exclusion* : *Trypan blue*, *eosin*, *Congo red*, *erythrosine B assays*

2. Uji kolorimetrik : Uji MTT, uji MTS, uji XTT, uji WST-1, uji WST-8, Uji LDH, Uji SRB, Uji NRU dan uji kristal violet.
3. Uji florometrik : Uji alamarBlue dan uji CFDA-AM
4. Uji Luminometrik : Uji ATP dan *real-time viability assay*

Uji 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) merupakan salah satu uji sitotoksik dengan metode kolorimetri dengan melihat fungsi mitokondria sel dengan mengukur aktivitas enzim mitokondria seperti suksinat dehidrogenase. Dalam pengujian ini, MTT direduksi menjadi kristal formazan berwarna ungu oleh *Nikotinamida Adenosin Dinukleotida Hidrogen* (NADH). Hasil akhir dapat diukur dengan melihat absorbansi cahaya pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) reader. Parameter nilai *the half maximal inhibitory concentration* (IC₅₀) digunakan untuk menilai toksisitas. Nilai IC₅₀ menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar nilai IC₅₀ maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Akhir dari uji sitotoksik dapat memberikan informasi persentase sel yang mampu bertahan hidup. Kelebihan dari uji MTT yaitu mudah digunakan, aman, memiliki daya reproduksi tinggi, dan sudah banyak digunakan sebagai uji sitotoksik sel. Sedangkan kekurangan dari uji MTT ini adalah formazan MTT tidak larut dalam air, dan membentuk kristal berbentuk jarum ungu di dalam sel. Oleh karena itu, sebelum mengukur absorbansi, pelarut organik seperti dimetil sulfoksida (DMSO) atau isopropanol diperlukan untuk melarutkan kristal. Selain itu, sitotoksitas dari formazan MTT membuat sulit untuk menghilangkan media kultur sel dari sumur plat karena sel mengambang dengan jarum formazan MTT dan memberikan kesalahan dalam interpretasi hasil (Aslantürk, 2018).

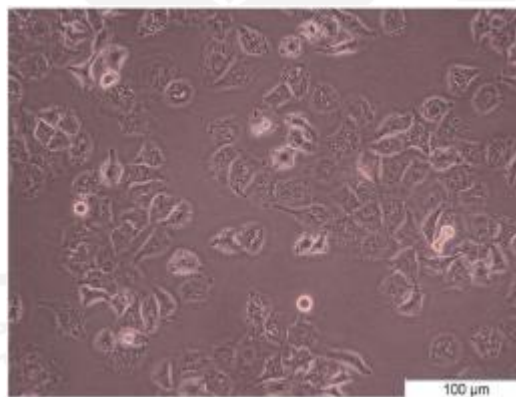
2.1.5 5-Flourourasil (5-FU)

5-Flourourasil (5-FU) adalah obat kemoterapi golongan antimetabolit pirimidin. Mekanisme kerja obat ini yaitu dengan menghambat enzim timidilat sintase yang berfungsi dalam proses metilasi asam deoksiuridilat menjadi asam timidilat. Akibat terhambatnya proses tersebut, terjadi defisiensi timin sehingga menghambat sintesis asam deoksiribonukleat (DNA), dan dalam tingkat yang lebih kecil dapat menghambat pembentukan asam ribonukleat (RNA). Diperlukan

kofaktor folat tereduksi (Leucovorin) agar terjadi ikatan yang kuat antara 5-FdUMP dan timidilat sintase untuk terjadinya mekanisme penghambatan timidilat sintase tersebut. 5-FU efektif untuk terapi karsinoma kolon, rektum, payudara, gaster dan pankreas. Kontraindikasi 5-FU adalah pasien dengan status nutrisi buruk, depresi sumsum tulang, infeksi berat dan hipersensitivitas terhadap 5-FU (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015).

2.1.6 Sel kanker kolorektal WiDr

Sel WiDr adalah salah satu turunan sel adenokarsinoma kolorektal. Sel WiDr didapatkan pertama kali dari wanita berusia 78 tahun pada tahun 1971 (Noguchi *et al.*, 1979). Ciri dari sel ini yaitu memacu pengeluaran siklooksigenase-2 (COX-2) yang tinggi. COX-2 digunakan oleh sel WiDr untuk berproliferasi (Palozza *et al.*, 2005). Sel WiDr merupakan sel yang sesuai untuk digunakan sebagai model dalam skrining suatu senyawa baru sebagai agen kokemoterapi dengan 5-FU. Sel ini memiliki morfologi bentuk lonjong seperti jarum seperti pada Gambar 4 (Chen *et al.*, 1987).

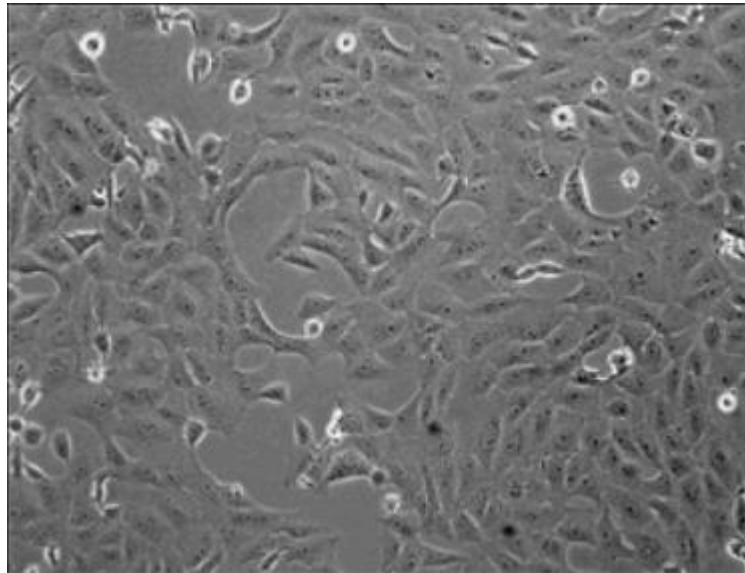


Gambar 4. Morfologi sel WiDr
(Peng *et al.*, 2016)

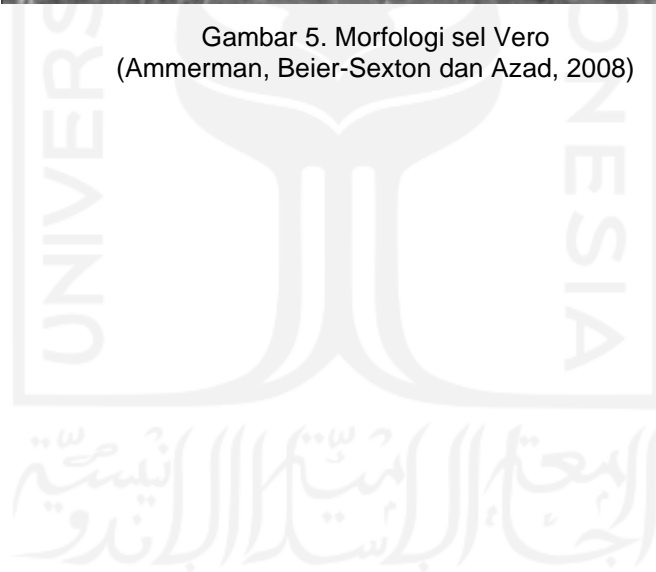
2.1.7 Sel Vero

Sel Vero merupakan *continuous cell line* mamalia yang berasal dari ginjal monyet hijau Afrika (*Cercopithecus aethiops*), yang ditemukan pada 27 Maret 1962 oleh Yasumura dan Kawakita dari Universitas Chiba di Jepang dan saat ini banyak dipergunakan untuk pembuatan vaksin. Sel ini memiliki morfologi

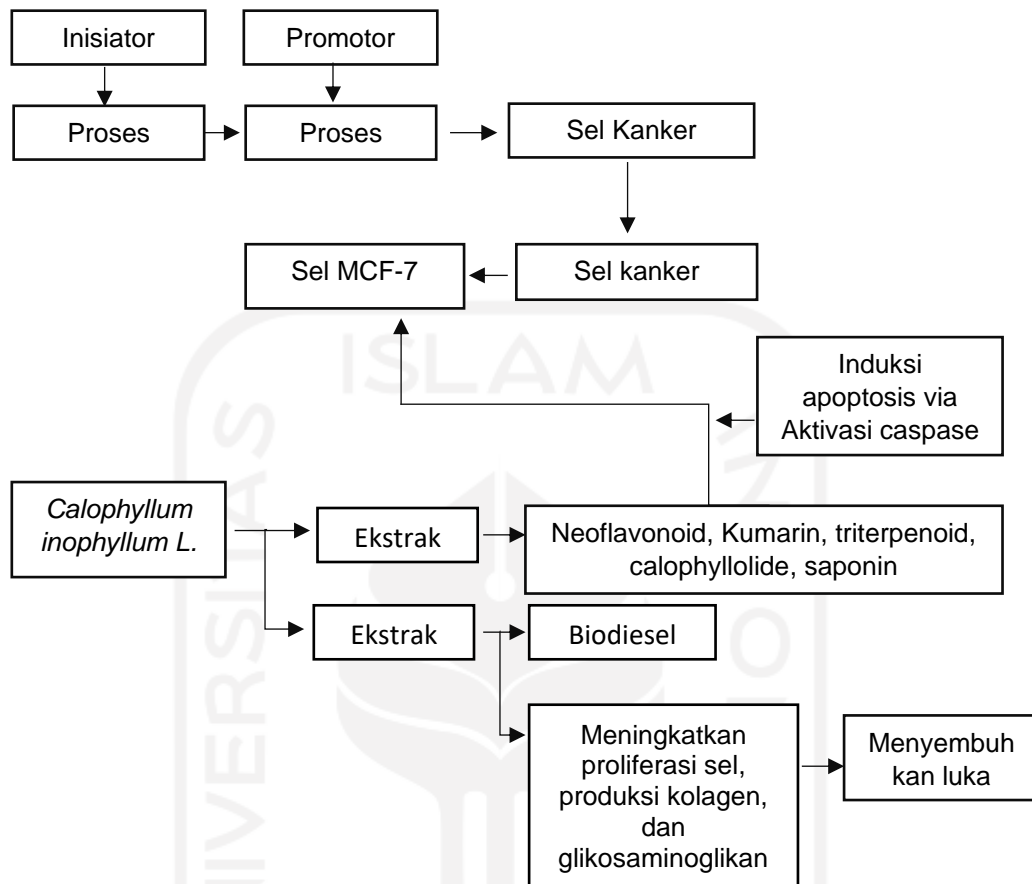
poligonal dan pipih seperti pada Gambar 5 (Ammerman, Beier-Sexton dan Azad, 2008)



Gambar 5. Morfologi sel Vero
(Ammerman, Beier-Sexton dan Azad, 2008)

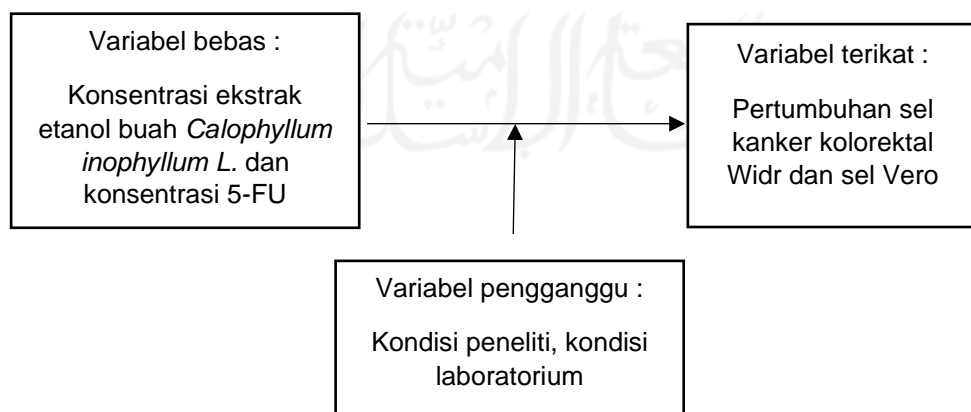


2.2 Kerangka Teori



Gambar 6. Kerangka teori

2.3 Kerangka Konsep



Gambar 7. Kerangka konsep

2.4 Hipotesis

1. Ekstrak etanol cangkang buah dan biji nyamplung (*Calophyllum inophyllum L.*) memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker kolorektal WiDr.
2. Ekstrak etanol cangkang buah dan biji nyamplung (*Calophyllum inophyllum L.*) memiliki indeks selektivitas yang baik.



BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan design *post-test only control group design*. Pada penelitian ini dilakukan uji sitotoksik dengan metode 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli 2020 hingga September 2020. Uji determinasi nyamplung dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada. Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmasi FMIPA Universitas Islam Indonesia. Uji sitotoksik dilakukan pada Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan (FKKMK) Universitas Gadjah Mada.

3.3 Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini menggunakan sel kanker WiDr dan sel normal Vero yang didapatkan dari Laboratorium Parasitologi FKKMK Universitas Gadjah Mada.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol buah nyamplung yang terbagi menjadi 2 bentuk sampel masing-masing dari biji dan cangkang buah yang dibuat terpisah dengan serial konsentrasi 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml dan obat standar 5-FU dengan konsentrasi 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml.

3.4.2 Variabel terikat

Variabel terikat yang digunakan pada penelitian ini adalah kematian sel WiDr dan sel Vero.

3.5 Definisi Operasional

- a) Aktivitas sitotoksik adalah aktivitas penghambatan pertumbuhan sel terhadap senyawa uji yang dinyatakan dalam *the half maximal inhibitory concentration* (IC_{50}).
- b) Nilai IC_{50} adalah konsentrasi ekstrak buah nyamplung atau 5-FU yang menghasilkan hambatan proliferasi sel WiDr dan sel Vero sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel.
- c) Ekstrak etanol buah nyamplung adalah ekstrak dari bagian biji dan cangkang buah nyamplung yang dibuat terpisah dengan menggunakan pelarut etanol 70% yang didapatkan dari metode maserasi.
- d) Sel kanker WiDr adalah *cell line* kanker kolorektal yang didapat dari Laboratorium Parasitologi FKKMK UGM.
- e) Sel normal Vero adalah *cell line* normal yang didapat dari Laboratorium Parasitologi FKKMK UGM.
- f) Indeks selektivitas adalah rasio yang didapatkan dari perbandingan IC_{50} terhadap sel normal dan sel kanker, yang menandakan keselektivitasan terhadap sel kanker baik atau tidak.

3.6 Instrumen Penelitian

3.6.1 Alat dan bahan

Tabel 8. Alat dan bahan untuk penelitian.

Tahapan	Alat	Bahan
Pembuatan Ekstrak	- Oven - Grinder - <i>rotary evaporator</i>	- Etanol 70% - Buah nyamplung
Kultur Sel, Pemanenan Sel, Penghitungan Sel, dan Pembuatan Larutan Stok	- Penangas Air - <i>Laminar Air Flow</i> (LAF) - Tabung <i>Conical</i> - Sentrifuge - <i>Tissue Culture Flask</i> - Inkubator CO_2 - Pipet Pasteur Steril - Hemasitometer - <i>Cell Counter</i> - Mikroskop inverted	- Sel WiDr - Sel Vero - Media Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 - Media DMEM - Media Komplit atau MK (Fetal Bovine Serum (FBS) 10% + Penstrep 2% + Amphotericin B 0,5% + 87.5% Media RPMI 1640 atau Media DMEM) - Phosphat Buffer Saline

Tabel 8. Lanjutan (Alat dan bahan penelitian)

Tahapan	Alat	Bahan
		(PBS) - Larutan Tripsin-EDTA 0,25% - DMSO
Uji Sitotoksik	- Mikropipet 200, 1000 μ L - Tabung reaksi kecil - Rak tabung kecil - <i>96-well plate</i> - Tabung <i>conical</i> - Yellow tip dan blue tip - ELISA reader	- Phosphat Buffer Saline - Ekstrak Etanol cangkang buah dan biji nyamplung - Media Kultur RPMI - DMSO - MTT 5mg/mL PBS (50 mg MTT and 10 mL PBS) - SDS 10% dalam 0,1 N HCl - Tissue makan - Aluminium foil - Suspensi Sel Kanker WiDr - Suspensi Sel normal Vero

3.7 Alur Penelitian

3.7.1 Pengambilan sampel cangkang buah dan biji nyamplung

Cangkang buah dan biji nyamplung didapatkan dari toko Qiara Herbal Collection (Jakarta Barat).

3.7.2 Uji determinasi cangkang buah dan biji nyamplung

Uji determinasi sampel dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada. Uji ini dilakukan untuk mengidentifikasi agar sampel yang didapatkan benar-benar buah nyamplung (*Callophyllum inophyllum L.*). Hasil determinasi sampel dapat dilihat di Lampiran 1.

3.7.3 Ekstraksi cangkang buah dan biji nyamplung

Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmasi FMIPA UII. Proses ini dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Buah nyamplung dipecah terlebih dahulu untuk dipisahkan antara biji dan cangkang buah. Sebanyak 1 kg biji dan 1 kg cangkang buah nyamplung dicuci dengan air mengalir, dikeringkan, dan selanjutnya dimasukkan ke dalam *cabinet dryer* dengan suhu 50°C selama 2 jam. Hasil pengeringan dihaluskan menggunakan grinder hingga menjadi bubuk, selanjutnya dimaserasi dengan pelarut etanol 70% selama 24 jam. Hasil maserasi disaring dengan *corong buchner* hingga diperoleh maserat. Selanjutnya maserat dimasukkan ke dalam *rotary evaporator*

hingga didapatkan ekstrak dari biji dan cangkang buah nyamplung secara terpisah. Ekstrak tersebut diuapkan di atas *waterbath* untuk memaksimalkan penguapan terhadap sisa pelarut.

3.7.4 Kultur sel WiDr dan sel Vero

Sel WiDr dan sel Vero diambil dari tangki nitrogen cair lalu dicairkan dalam penangas air pada suhu 37°C sampai gumpalan di dalam vial mencair. Di dalam *Laminary Air Flow* (LAF), sel dimasukkan ke dalam tabung *conical* steril yang berisi media kultur (RPMI 1640 untuk sel WiDr dan DMEM untuk sel Vero). Kemudian disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh dibuang, kemudian sel ditumbuhkan dalam 3-4 buah *tissue culture flask* dalam media RPMI 1640 yang mengandung 10% FBS. *Flask* kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO₂ dengan tutup *flask* dikendorkan untuk mengoptimalkan aerasi yang sangat penting untuk pertumbuhan sel. Medium diganti setelah 3-4 hari dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen 80% dan jumlahnya cukup untuk penelitian. Sel dipanen setelah konfluen yang ditandai dengan sel memenuhi *tissue culture flask* (Junedi, 2009a).

3.7.5 Pemanenan sel WiDr dan sel Vero

Sel dipanen setelah 80% konfluen ditandai dengan sel memenuhi *tissue culture flask*. Sel dilepaskan dari dinding *flask* dengan cara media disedot dengan pipet pasteur steril. Sel dicuci 2 kali dengan PBS volume 5 ml. Selanjutnya sel ditambah larutan tripsin-EDTA 0,25% untuk melepas sel, lalu diinkubasi selama 3 menit dalam inkubator CO₂. Ditambahkan MK sebanyak 5 ml ke dalam sel dan diresuspensi dengan pipet hingga tidak bergerombol. Jika sudah tidak bergerombol, suspensi sel ditransfer ke dalam tabung *conical* steril baru (Junedi, 2009a).

3.7.6 Perhitungan dan penanaman sel WiDr dan sel Vero

Setelah dilakukan pemanenan sel WiDr dan sel Vero, ditambahkan media kultur 2 ml kemudian sel diresuspensi. Sel yang telah dipanen diambil sebanyak 10 µL dan dipipetkan ke hemositometer. Sel dihitung di bawah mikroskop dengan *cell counter* kemudian dimasukkan ke dalam rumus berikut:

$$\text{Jumlah sel terhitung /mL} = \frac{\Sigma \text{sel kamar A} + \Sigma \text{sel kamar B} + \Sigma \text{sel kamar C} + \Sigma \text{sel kamar D}}{4} \times 10^4$$

Selanjutnya dihitung volume panen sel yang diperlukan untuk ditanam di *96 well microplate* dengan rumus berikut:

$$\text{Volume panen sel yang ditransfer} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel terhitung /mL}}$$

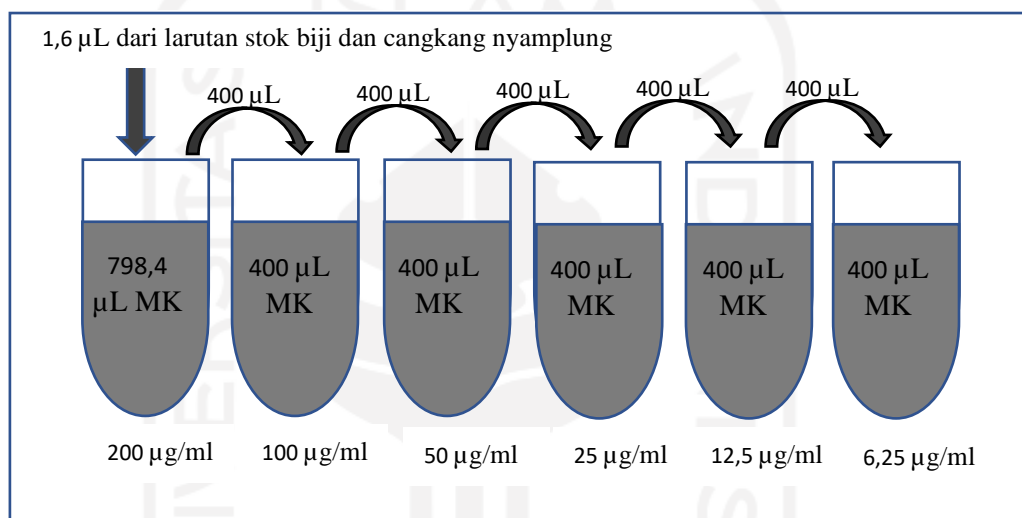
Volume yang didapatkan selanjutnya ditambahkan MK hingga mendapat total volume 10 mL. Penanaman sel WiDr dilakukan pada *plate* 1 sedangkan penanaman sel Vero dilakukan pada *plate* 2. Disisakan 3 sumuran kosong untuk kontrol media pada masing-masing *plate*. Selanjutnya sel diinkubasikan dalam inkubator selama semalam agar sel pulih kembali. Media sel dibuang dengan membalikkan *plate* 180° di atas tempat buangan dengan jarak 10 cm, kemudian *plate* ditekan secara perlahan di atas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan. Dimasukkan 100 µl PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian PBS dibuang dengan cara membalik *plate* lalu ditiriskan menggunakan tissue (Junedi, 2009b).

3.7.7 Pembuatan larutan stok

Larutan stok sampel (biji dan cangkang buah) dibuat dengan konsentrasi 100.000 µg/ml. Sebanyak 21,5 mg ekstrak etanol biji nyamplung dilarutkan dalam 215 µl DMSO dan sebanyak 14 mg ekstrak etanol cangkang buah nyamplung dilarutkan dalam 140 µl DMSO kemudian ditambahkan media RPMI 1640 (untuk sel WiDr) atau media DMEM (untuk sel Vero). Larutan stok dimasukkan ke dalam *microtube* steril yang tertutup, dan disimpan dalam lemari es. Obat standar 5-FU sudah tersedia dalam konsentrasi 50.000 µg/ml. Obat standar Doxorubicin sudah tersedia dalam konsentrasi 2.000 µg/ml

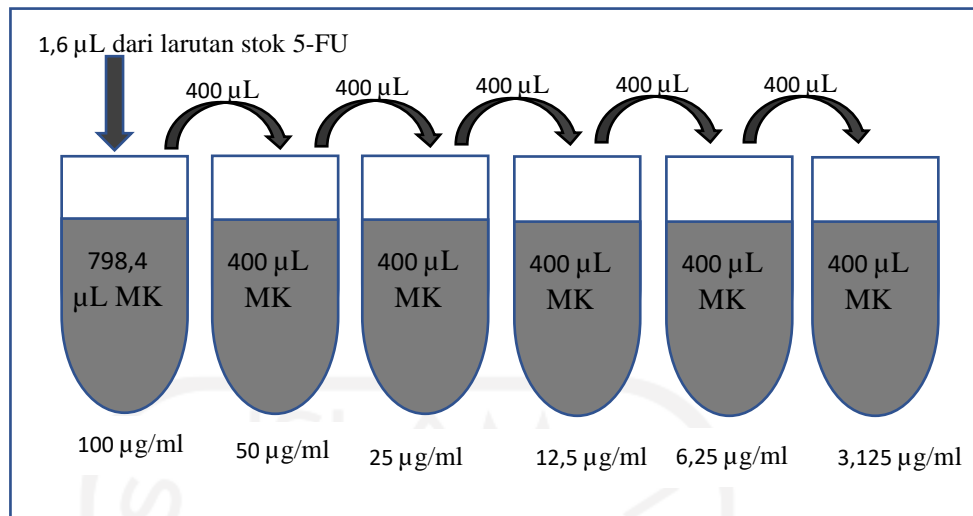
3.7.8 Pembuatan serial konsentrasi larutan uji

Terdapat 3 larutan uji yang akan dibuat serial konsentrasi, yaitu ekstrak etanol biji nyamplung, ekstrak etanol cangkang buah nyamplung dan 5-FU. Ekstrak etanol biji dan cangkang buah nyamplung masing-masing dibuat sebanyak 6 konsentrasi, yaitu 200 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 6,25 $\mu\text{g/ml}$. Konsentrasi tersebut dibuat masing-masing dua kali untuk perlakuan pada sel WiDr dan sel Vero. Konsentrasi ini didapatkan dengan ilustrasi dalam Gambar 6.

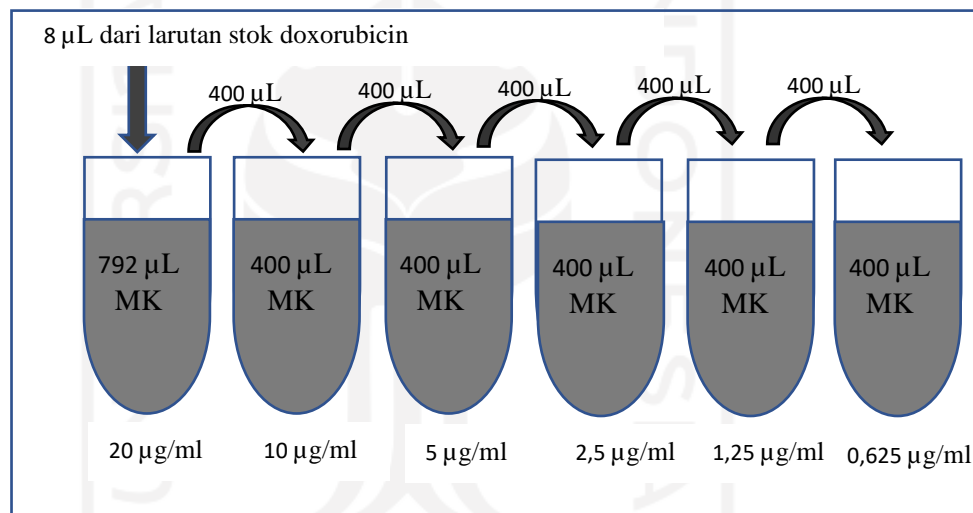


Gambar 8. Proses Pengenceran pada Ekstrak Biji nyamplung dan cangkang buah nyamplung

Pada 5-FU dibuat 6 konsentrasi juga, yaitu 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 6,25 $\mu\text{g/ml}$, dan 3,125 $\mu\text{g/ml}$. Konsentrasi tersebut didapatkan seperti ilustrasi pada Gambar 7. Pada saat penelitian berlangsung, terdapat hasil IC_{50} 5-FU yang kurang baik sebagai kontrol positif sehingga dilakukan perubahan kontrol positif menjadi doxorubicin. Doxorubicin dibuat dengan 6 konsentrasi, yaitu 20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 1,25 $\mu\text{g/ml}$, 0,625 $\mu\text{g/ml}$. Cara pembuatannya sesuai dengan ilustrasi pada Gambar 8.



Gambar 9. Proses pengenceran 5-FU



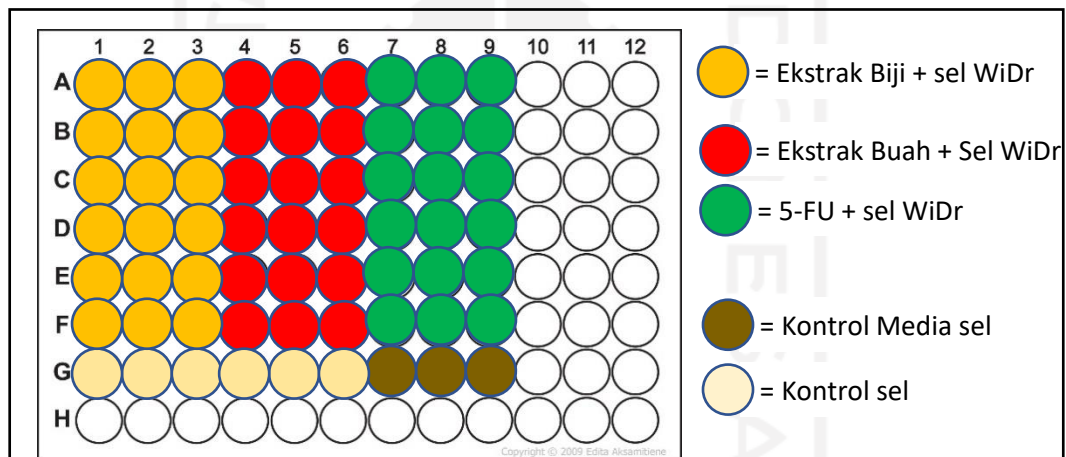
Gambar 10. Proses pengenceran doxorubicin

3.7.9 Uji sitotoksik

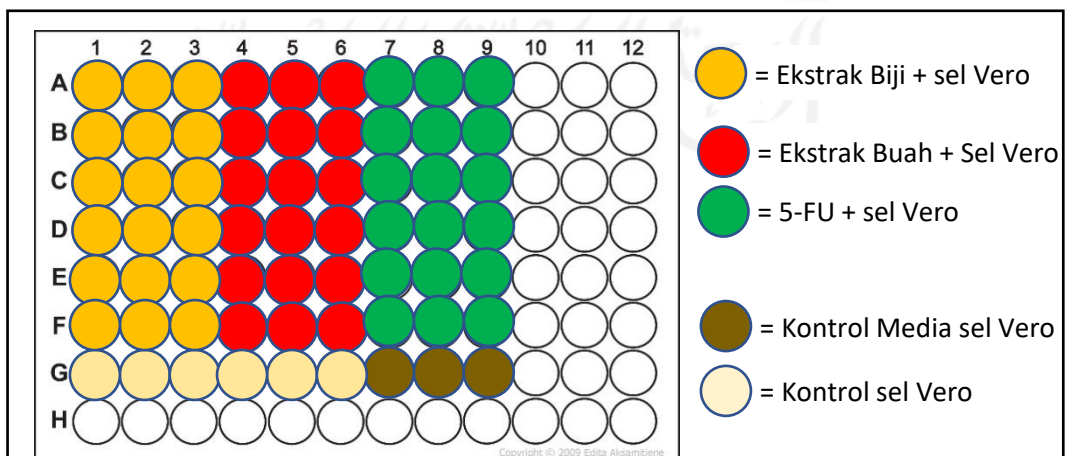
Metode yang digunakan dalam uji sitotoksitas ini adalah metode MTT karena mudah digunakan, aman, memiliki daya reproduksi tinggi, dan sudah banyak digunakan sebagai uji sitotoksik sel. Dari uji sitotoksitas ini dapat diketahui kisaran kadar zat yang berefek toksik terhadap sel kanker.

Sebelum melakukan uji sitotoksik, dilakukan pemetaan pada *96 well plate* seperti pada gambar 9 dan gambar 10. Pada tiap subjek sel diperlakukan 1 kelompok perlakuan, 1 kelompok kontrol positif, 1 kelompok kontrol sel dan 1 kelompok kontrol media. Kelompok perlakuan yakni kelompok sel dengan pemberian ekstrak etanol cangkang buah dan biji nyamplung. Kontrol positif adalah kelompok sel yang diberi 5-FU. Kontrol sel yaitu berisi sel dan media

kultur. Kontrol media yaitu berisi media kultur saja tanpa sel. Pada sumuran kontrol media dan sel ditambahkan 100 μ l media sesuai sel masing-masing. Selanjutnya pada tiap sumuran ditambahkan 100 μ l dari serial konsentrasi yang telah dibuat sesuai pembagian yang sudah ditentukan dalam *96 well plate*. Sel yang telah diberi perlakuan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam, setelah itu tiap sumuran diberi reagen MTT sejumlah 100 μ L. Larutan MTT akan bereaksi dengan sel hidup dan akan dipecah menjadi garam formazan yang tidak larut oleh enzim dehidrogenase. *Microplate* diinkubasi selama 4 jam di inkubator dengan suhu 37°C, kemudian kondisi sel diperiksa dengan *inverted microscope*. Jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan larutan *stopper* 100 μ L yaitu SDS 10% dalam 0,01 N HCl. Hasil kemudian diamati menggunakan ELISA *Reader* pada panjang gelombang 550-600 nm (Putri, 2013).



Gambar 11. Pemetaan pada *96-well microplate* sel WiDr



Gambar 12. Pemetaan pada *96-well microplate* sel Vero

3.8 Analisis Data

Analisis data dari uji sitotoksitas dilakukan untuk menghitung nilai IC_{50} dengan analisa regresi linier. Langkah awal yaitu penghitungan presentase sel hidup dengan rumus berikut:

$$\% \text{ sel hidup} = \left(\frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media}} \right) \times 100\%$$

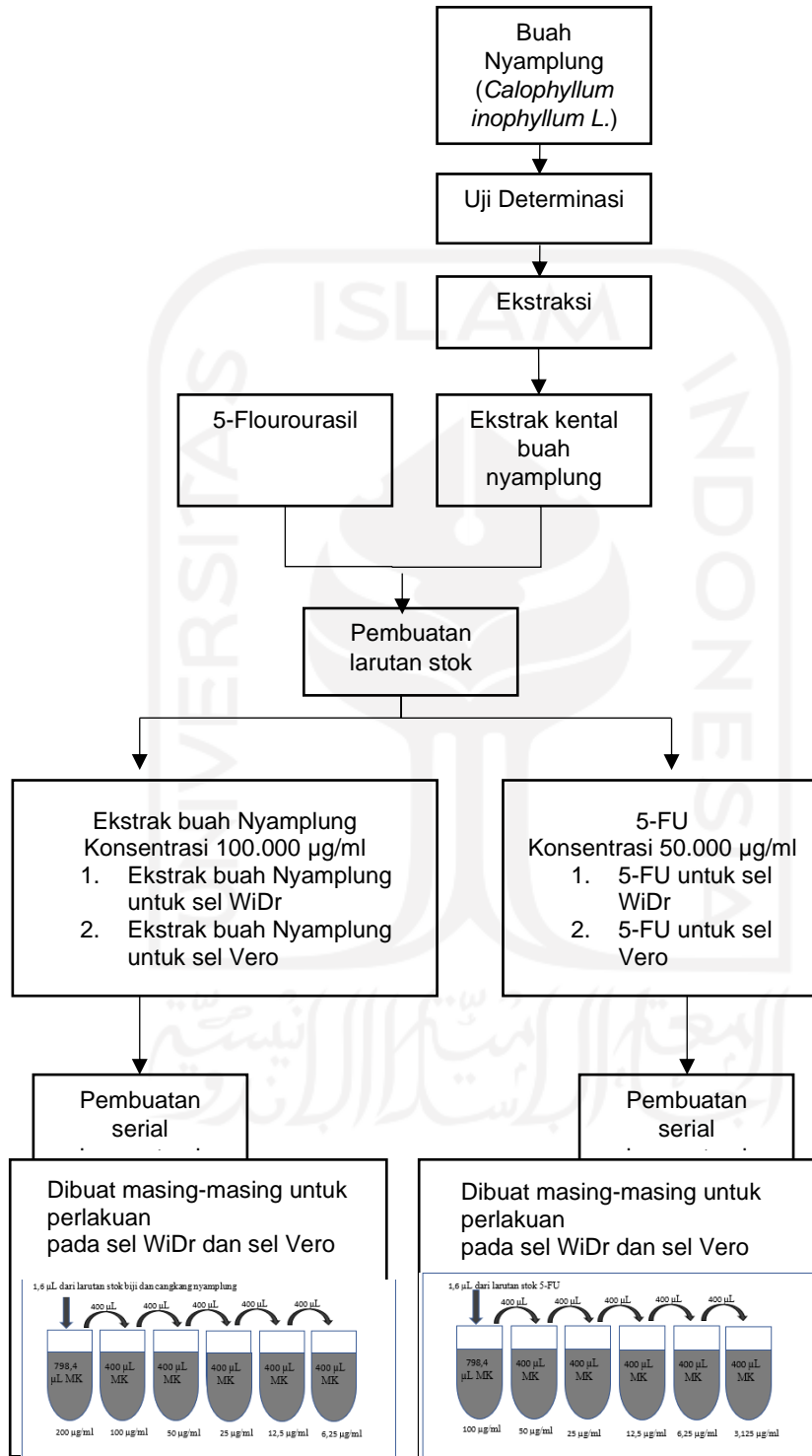
Selanjutnya dibuat grafik log konsentrasi vs persentase sel hidup dengan *chart type scatter*. Lalu dicari persamaan regresi linear dengan menampilkan *trendline*. Selanjutnya dimasukkan $y=50\%$ hingga mendapat nilai x . Selanjutnya dihitung antilog dari x tersebut hingga mendapat nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} yang kecil menunjukkan bahwa terdapat efek sitotoksik yang tinggi pada senyawa uji, sedangkan nilai IC_{50} besar menunjukkan bahwa efek sitotoksik rendah. Nilai $IC_{50} > 501 \mu\text{g/ml}$ dikatakan tidak memiliki efek sitotoksik, $201-500 \mu\text{g/ml}$ berarti memiliki sitotoksitas yang lemah, $21-200 \mu\text{g/ml}$ berarti memiliki sitotoksitas yang sedang, dan nilai kurang dari $20 \mu\text{g/ml}$ berarti memiliki sifat sitotoksik yang tinggi (Sajjadi *et al.*, 2015). Selanjutnya dilakukan perhitungan indeks selektivitas dengan rumus:

$$\text{Indeks Selektivitas (IS)} = \frac{(IC_{50} \text{ Sel Vero})}{(IC_{50} \text{ Sel WiDr})}$$

Dikatakan memiliki selektivitas yang baik jika $IS > 2$ (Demirgan *et al.*, 2016).

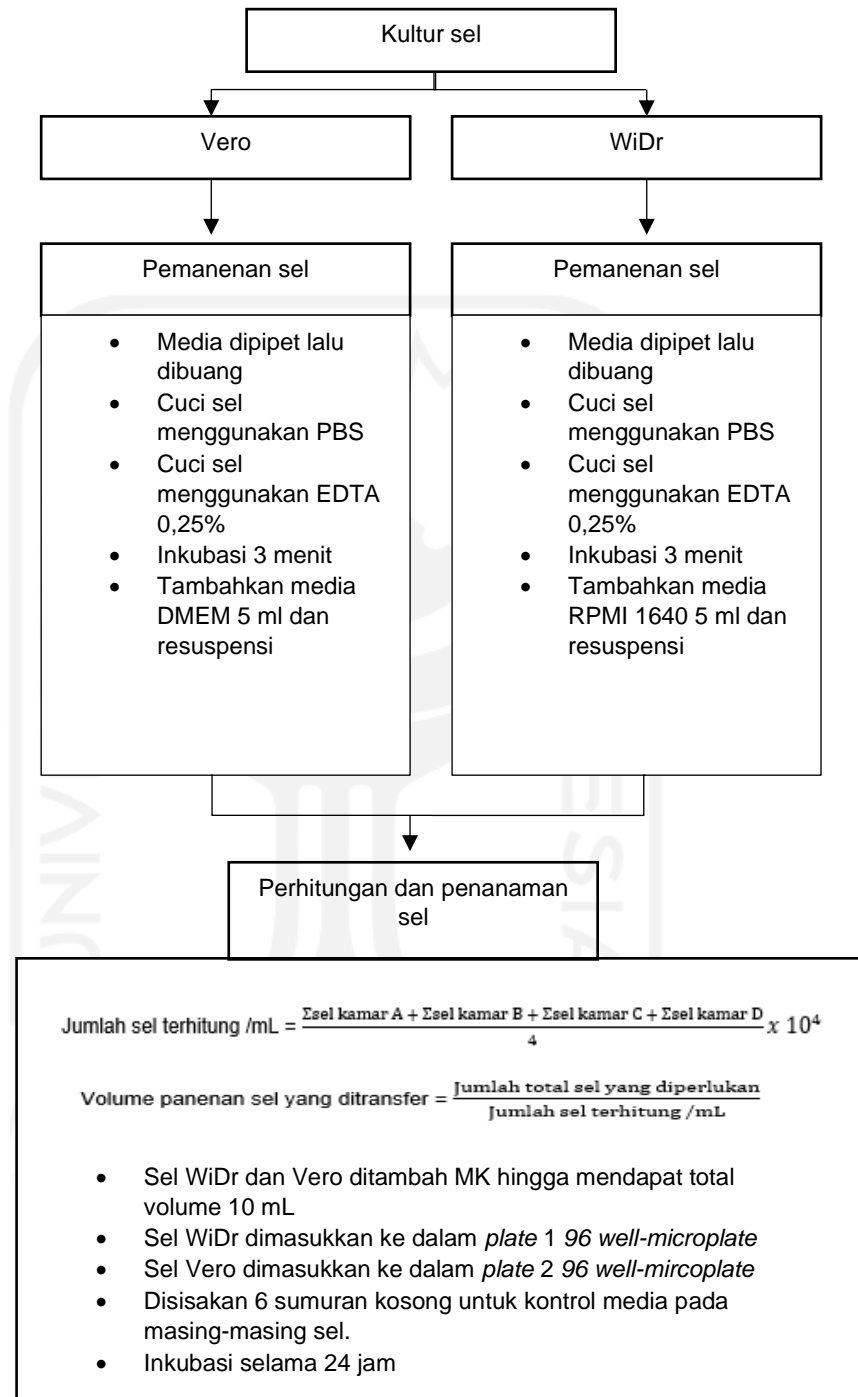
3.9 Skema jalannya penelitian

3.9.1 Ekstraksi - pembuatan serial konsentrasi sampel



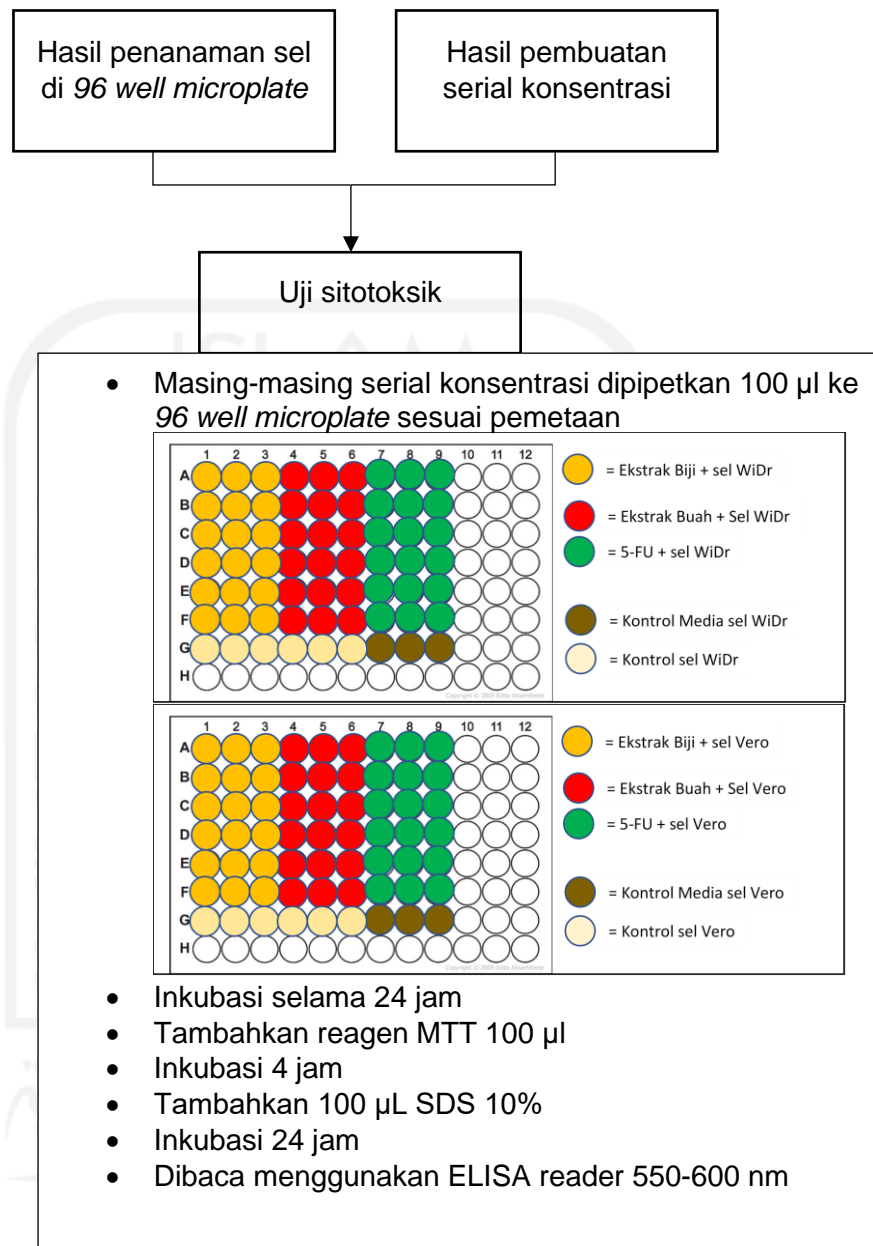
Gambar 13. Skema ekstraksi - pembuatan serial konsentrasi sampel

3.9.2 Kultur sel - penanaman dan penghitungan sel



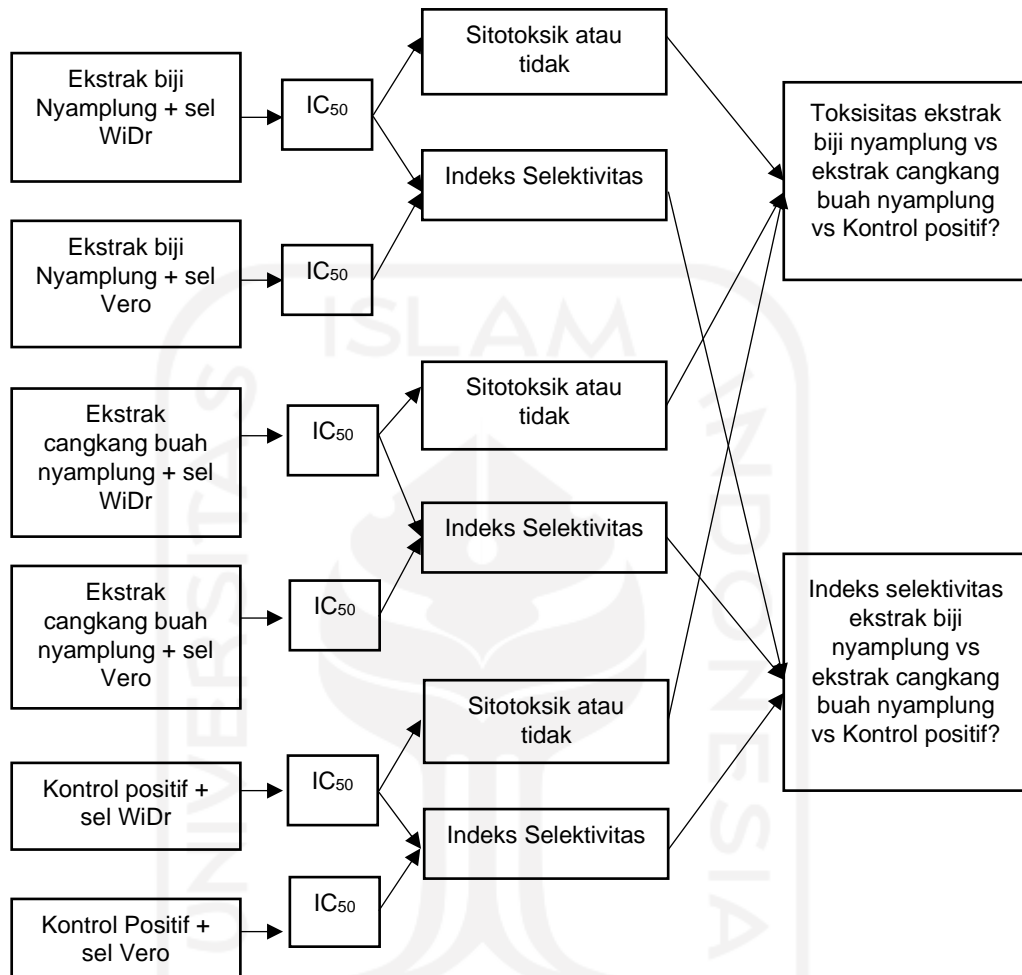
Gambar 14. Skema kultur sel - penanaman dan penghitungan sel

3.9.3 Uji sitotoksik



Gambar 15. Skema uji sitotoksik

3.9.4 Skema analisis data



Gambar 16. Skema analisis data

3.9.5 Dummy Table perlakuan ekstrak cangkang buah dan biji nyamplung

Tabel 9. *Dummy Table* perlakuan ekstrak cangkang buah dan biji nyamplung

Konsent rasi ($\mu\text{g/ml}$)	Log Konsent rasi	Absorbansi			Rata- rata Absorb ansi	Viabili tas Sel (%)	Kemat ian Sel (%)
		Replikas i 1	Replik asi 2	Replik asi 3			
200							
100							
50							
25							
12,5							
6,25							
Kontrol Sel						-	
Kontrol Media						-	
Persama an							
IC ₅₀							

3.9.6 Dummy Table perlakuan 5-FU

Tabel 10. *Dummy Table* perlakuan 5-FU

Konsent trasi ($\mu\text{g/ml}$)	Log Konsent trasi	Absorbansi			Rata- rata Absorb ansi	Viabili tas Sel (%)	Kema tian Sel (%)
		Replikas i 1	Replik asi 2	Replika si 3			
100							
50							
25							
12,5							
6,25							
3,125							
Kontrol Sel						-	
Kontrol Media						-	
Persam aan							
IC ₅₀							

3.10 Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik dari Komite Etika Penelitian dan Kesehatan Fakultas Kedokteran UII dengan nomor No 3/Ka. Kom. Et/70/KE/VII/2020 (Lampiran 1).



BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Determinasi cangkang buah dan biji nyamplung

Cangkang buah dan biji nyamplung didapatkan dari toko Qiara Herbal Collection, Jakarta Barat pada bulan Juli 2020. Berdasarkan hasil uji determinasi oleh Departemen Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada bahwa sampel merupakan asli dan benar *Calophyllum inophyllum L.* Hasil identifikasi dapat dilihat di Lampiran 2.

4.1.2 Ekstraksi cangkang buah dan biji *Calophyllum inophyllum L.*

Hasil ekstraksi menghasilkan 2 bentuk yang berbeda untuk cangkang dan biji. Pada ekstraksi 1 kg cangkang dan kulit, dihasilkan 12,853 gram ekstrak kental, sedangkan pada ekstraksi 1 kg biji dihasilkan 190 gram minyak dan endapan. Hasil ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 17. Hasil ekstraksi

4.1.3 Uji sitotoksik dengan metode MTT

4.1.3.1 Perlakuan pada 96-well microplate 1

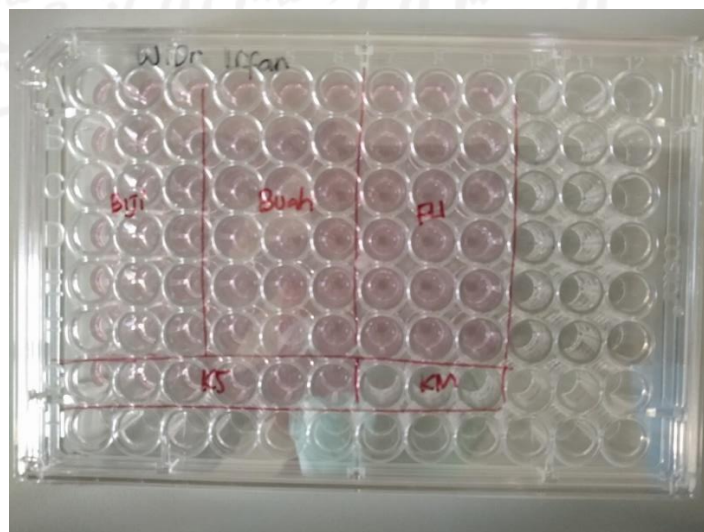
Pada 96-well microplate 1 dilakukan untuk perlakuan kepada sel WiDr. Setelah sel WiDr dikultur dan dipanen, selanjutnya sel dihitung dengan mengambil 10 μ l dari panen sel diletakkan di hemositometer. Hasil perhitungan sel WiDr di bawah *inverted microscope* yaitu sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Jumlah sel terhitung /ml} &= \frac{213 + 230 + 223 + 236}{4} \times 10^4 \\ &= 225,5 \times 10^4 \text{ sel/ml} \end{aligned}$$

Selanjutnya dilakukan perhitungan volume panen sel yang diperlukan untuk ditanam di 96 well microplate, berikut hasil perhitungannya:

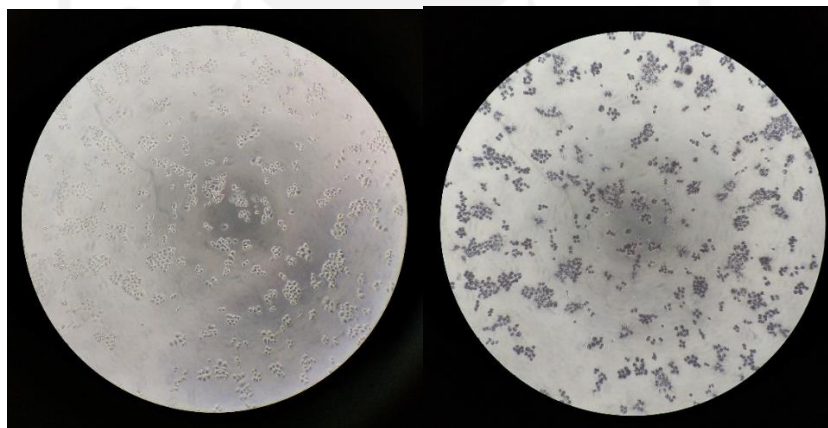
$$\begin{aligned} \text{Volume panen sel yang ditransfer} &= \frac{100 \times 10^4}{225,5 \times 10^4} \\ &= 0,44 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jadi untuk mendapatkan 10^4 sel/well maka perlu mengambil 0,44 ml dari sel WiDr yang sudah dipanen lalu ditambahkan MK hingga volumenya 10 ml dalam 1 well. Gambar 12 menunjukkan pembagian *plate* yang sudah dilakukan penanaman sel WiDr dan pemberian sampel yang sudah dilakukan pembagian serial konsentrasi. Pada kontrol media hanya berisi media kultur saja tanpa sel WiDr.

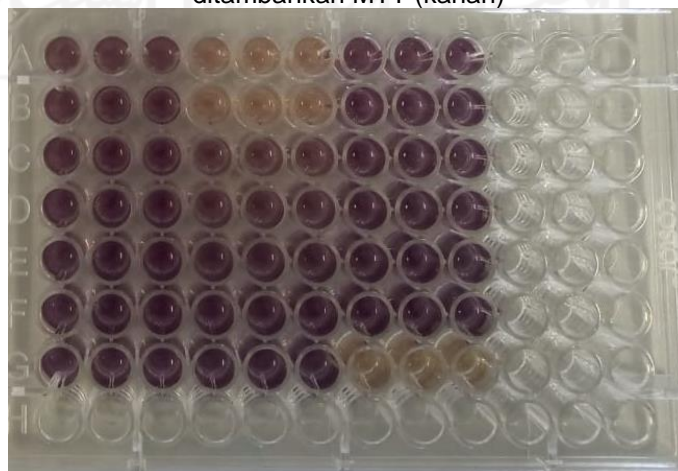


Gambar 18. Pemetaan pada 96-well microplate 1 setelah diberi perlakuan oleh sampel

Setelah 24 jam inkubasi, MTT ditambahkan pada *96-well microplate* sebanyak 100 $\mu\text{l/well}$. Enzim dehidrogenase pada mitokondria sel akan mengubah MTT berwarna kuning yang larut air menjadi bentuk formazan berwarna ungu yang tidak larut air. Dengan demikian, warna ungu menunjukkan banyaknya sel yang masih hidup karena enzim dehidrogenase-nya masih berfungsi. Warna ungu akibat kristal formazan menunjukkan jumlah sel hidup tampak pada Gambar 13, adapun perubahan warna setelah pemberian MTT dapat dilihat pada Gambar 14. Setelah diberi MTT, sel diinkubasi 4 jam karena waktu yang dibutuhkan untuk membentuk kristal formazan yang optimal yaitu selama 4 jam. Setelahnya diberikan SDS (*Sodium dodecyl sulphate*) yang merupakan reagen *stopper* yang berfungsi untuk menghentikan reaksi MTT dengan diinkubasi selama 24 jam.



Gambar 19. Sel WiDr pada kontrol sel sebelum ditambahkan MTT (kiri), sesudah ditambahkan MTT (kanan)



Gambar 20. Keadaan *96-well microplate* 1 setelah pemberian MTT

Setelah inkubasi 24 jam paska pemberian SDS, 96-well microplate dibaca menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 595 nm. Hasil absorbansi pada plate sel WiDr disajikan dalam Tabel 9, 10, dan 11. Dari hasil absorbansi selanjutnya dihitung viabilitas sel untuk dilakukan analisis regresi linear menggunakan microsoft excel. Grafik analisis regresi linear log konsentrasi terhadap viabilitas sel disajikan pada Gambar 15, 16, dan 17. Diketahui nilai R^2 tidak ada yang negatif menandakan semua variabel memiliki linearitas yang masih baik. Dari persamaan $y = bx+a$, nilai y dapat diubah 50 untuk menghitung nilai x. Selanjutnya nilai x perlu diubah menjadi antilog untuk mendapatkan IC_{50} . Pada perlakuan ekstrak etanol biji nyamplung terhadap sel WiDr didapatkan IC_{50} 1030,410 $\mu\text{g/ml}$, pada perlakuan ekstrak etanol cangkang buah nyamplung terhadap sel WiDr didapatkan IC_{50} 42,472 $\mu\text{g/ml}$, dan pada perlakuan 5-FU terhadap sel WiDr didapatkan IC_{50} 118.585,699 $\mu\text{g/ml}$. Hasil IC_{50} kontrol positif 5-FU terhadap sel WiDr dinilai terlalu tinggi dan tergolong tidak toksik, maka dilakukan perubahan obat untuk kontrol positif yaitu dengan doxorubicin.

Tabel 11. Hasil absorbansi dan hasil perhitungan IC_{50} ekstrak etanol biji nyamplung terhadap sel WiDr.

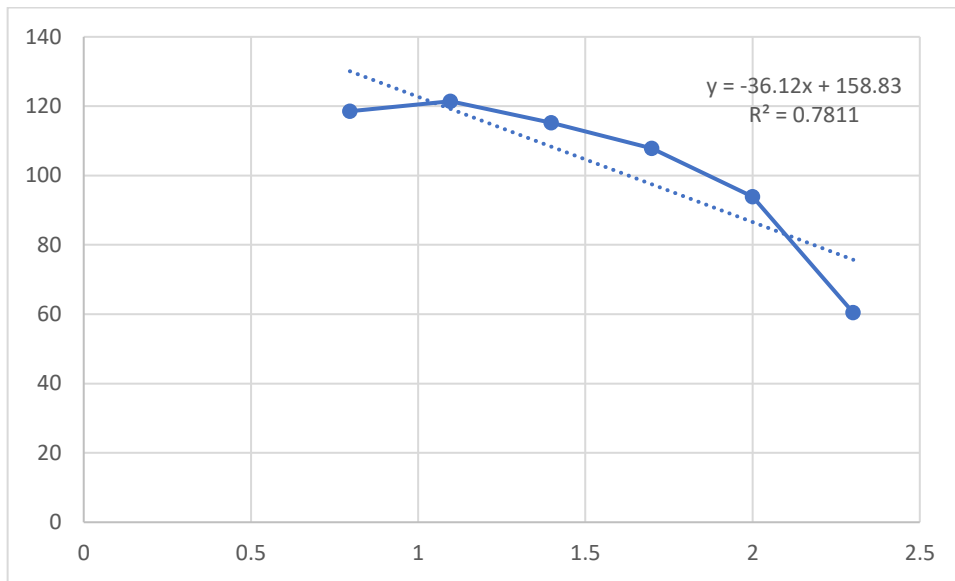
Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Log Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata Absorbansi	Viabilitas Sel (%)	Kematian Sel (%)
		Replika si 1	Replika si 2	Replika si 3			
200	2,301	0,439	0,428	0,451	0,439	60,438	39,562
100	2	0,566	0,615	0,626	0,602	93,908	6,092
50	1,699	0,628	0,682	0,700	0,670	107,80	-7,803
25	1,398	0,649	0,740	0,730	0,706	115,26	-15,263
12,5	1,097	0,663	0,765	0,781	0,736	121,42	-21,424
6,25	0,796	0,658	0,761	0,748	0,722	118,54	-18,549
Kontrol Sel	-	0,648	0,622	0,626	0,632	-	-
Kontrol Media	-	0,140	0,148	0,147	0,145	-	-
Persamaan	$y = -36,12x + 158,83$						
IC_{50}	1030,410						

Tabel 12. Hasil absorbansi dan hasil perhitungan IC₅₀ ekstrak etanol cangkang buah nyamplung terhadap sel WiDr.

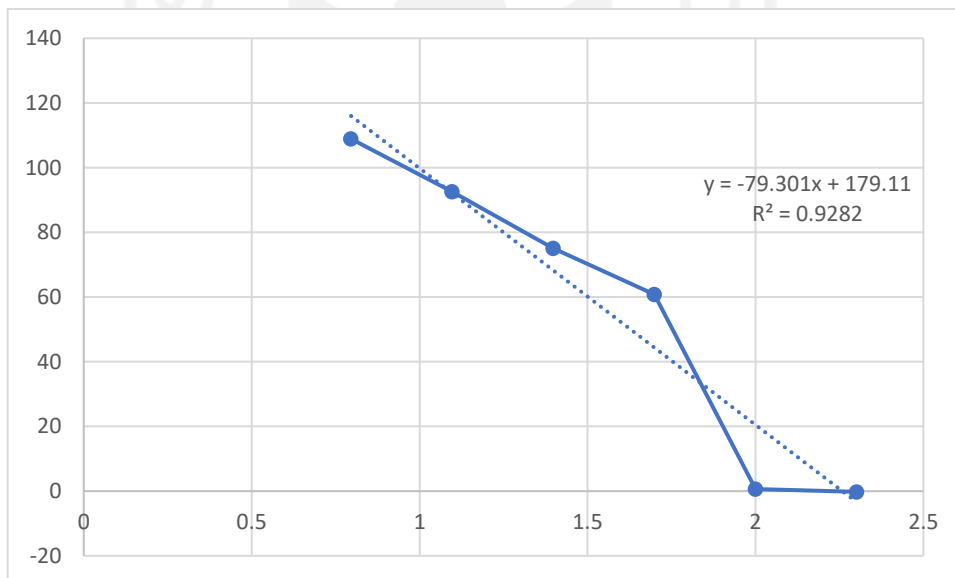
Konsentrasi (µg/ml)	Log Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata Absorbansi	Viabilitas Sel (%)	Kematian Sel (%)
		Replika si 1	Replika si 2	Replika si 3			
200	2,301	0,143	0,145	0,144	0,144	-0,205	100,205
100	2	0,147	0,147	0,151	0,148	0,684	99,316
50	1,699	0,441	0,430	0,453	0,441	60,849	39,151
25	1,398	0,510	0,508	0,514	0,511	75,086	24,914
12,5	1,097	0,597	0,585	0,606	0,596	92,608	7,392
6,25	0,796	0,662	0,663	0,701	0,675	108,89	-8,898
Kontrol Sel	-	0,648	0,622	0,626	0,632	-	-
Kontrol Media	-	0,140	0,148	0,147	0,145	-	-
Persamaan	$y = -79,301x + 179,11$						
n	42,472						
IC ₅₀	42,472						

Tabel 13. Hasil absorbansi dan hasil perhitungan IC₅₀ 5-FU terhadap sel WiDr.

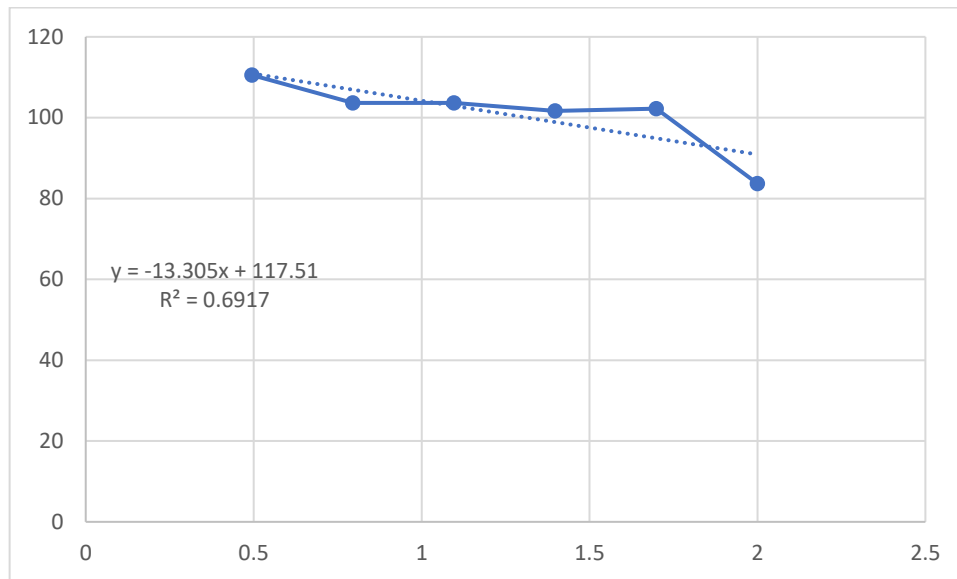
Konsentrasi (µg/ml)	Log Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata Absorbansi	Viabilitas Sel (%)	Kematian Sel (%)
		Replika si 1	Replika si 2	Replika si 3			
100	2	0,554	0,554	0,550	0,553	83,710	16,290
50	1,699	0,687	0,638	0,604	0,643	102,25	-2,259
25	1,398	0,680	0,669	0,572	0,640	101,71	-1,711
12,5	1,097	0,662	0,659	0,628	0,650	103,62	-3,628
6,25	0,796	0,653	0,698	0,598	0,650	103,62	-3,628
3,125	0,495	0,701	0,707	0,642	0,683	110,54	-10,541
Kontrol Sel	-	0,648	0,622	0,626	0,632	-	-
Kontrol Media	-	0,140	0,148	0,147	0,145	-	-
Persamaan	$y = -13,305x + 117,51$						
n	118585,699						
IC ₅₀	118585,699						



Gambar 21. Grafik analisis regresi linear log konsentrasi ekstrak etanol biji nyamplung terhadap viabilitas sel WiDr



Gambar 22. Grafik analisis regresi linear log konsentrasi ekstrak etanol cangkang buah nyamplung terhadap viabilitas sel WiDr



Gambar 23. Grafik analisis regresi linear log konsentrasi 5-FU terhadap viabilitas sel WiDr

4.1.3.2 Perlakuan pada 96-well microplate 2

Pada 96-well microplate 2 dilakukan untuk perlakuan kepada sel Vero dan WiDr. Pada sel WiDr dilakukan hanya untuk mengulang kontrol positif yaitu mengganti 5-FU menjadi Doxorubicin. Setelah sel Vero dan WiDr dikultur dan dipanen, selanjutnya sel dihitung dengan mengambil 10 μ l dari panen sel diletakkan di hemasitometer. Hasil perhitungan sel Vero dan WiDr di bawah *inverted microscope* yaitu sebagai berikut:

$$\text{Jumlah sel Vero terhitung /ml} = \frac{34 + 42 + 53 + 51}{4} \times 10^4$$

$$= 45 \times 10^4 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Jumlah sel WiDr terhitung /ml} = \frac{123 + 111 + 142 + 133}{4} \times 10^4$$

$$= 127,25 \times 10^4 \text{ sel/ml}$$

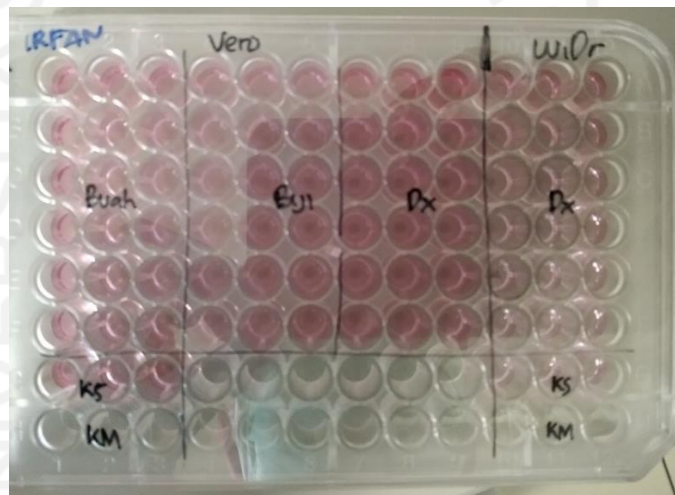
Selanjutnya dilakukan perhitungan volume panen sel yang diperlukan untuk ditanam di 96 well microplate, berikut hasil perhitungannya:

$$\text{Volume panen sel Vero yang di transfer} = \frac{100 \times 10^4}{45 \times 10^4}$$

$$= 2,22 \text{ ml}$$

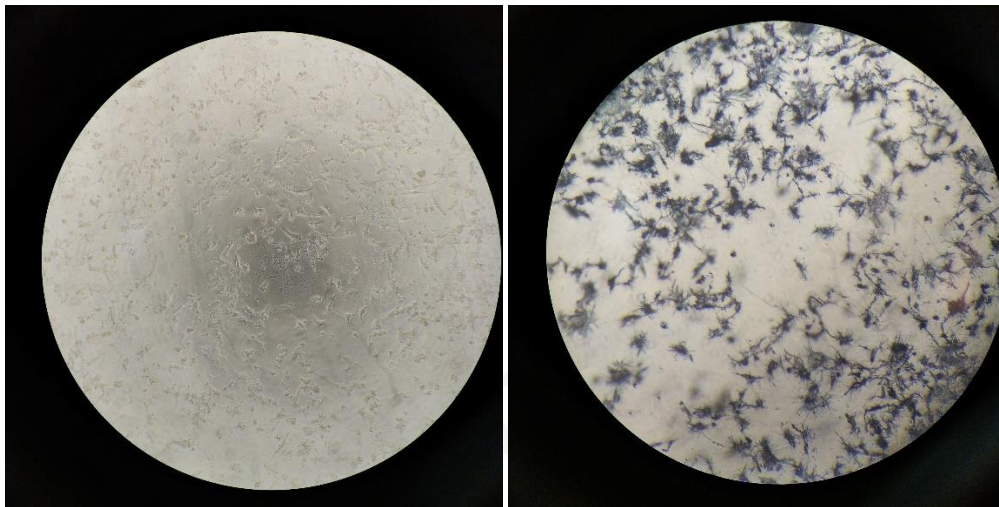
$$\begin{aligned} \text{Volume panen sel WiDr yang di transfer} &= \frac{100 \times 10^4}{127,25 \times 10^4} \\ &= 0,78 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jadi untuk mendapatkan 10^4 sel/well maka perlu mengambil 2,22 ml dari sel Vero dan 0,78 ml dari sel WiDr yang sudah dipanen lalu ditambahkan MK hingga volumenya 10 ml dalam 1 well. Pada Gambar 18 merupakan pembagian *plate* yang sudah dilakukan penanaman sel dan pemberian sampel yang sudah dilakukan pembagian serial konsentrasi. Pada kontrol media hanya berisi media kultur saja tanpa sel WiDr.

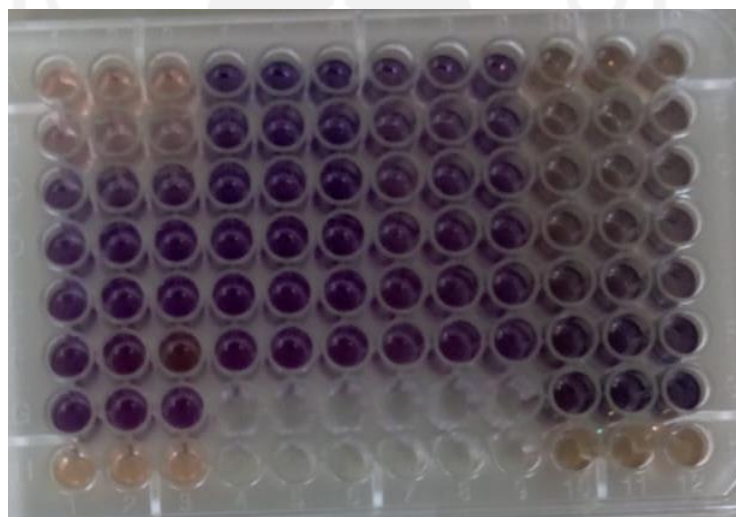


Gambar 24. Pemetaan pada 96-well microplate 2 setelah diberi perlakuan oleh sampel

Setelah 24 jam inkubasi, MTT ditambahkan pada 96-well microplate sebanyak 100 μ l/well. Enzim dehidrogenase pada mitokondria sel akan mengubah MTT berwarna kuning yang larut air menjadi bentuk formazan berwarna ungu yang tidak larut air. Warna ungu berbentuk kristal formazan menunjukkan jumlah sel yang hidup ditampilkan pada Gambar 19, dan perubahan warna setelah penambahan MTT dapat dilihat pada Gambar 20.



Gambar 25. Sel Vero pada kontrol sel sebelum ditambahkan MTT (kiri), sesudah ditambahkan MTT (kanan)



Gambar 26. Keadaan 96-well microplate 2 setelah pemberian MTT

Hasil pembacaan absorbansi menggunakan ELISA reader pada plate sel WiDr disajikan dalam Tabel 12, 13, 14, dan 15. Dari hasil absorbansi selanjutnya dihitung viabilitas sel untuk dilakukan analisis regresi linear menggunakan microsoft excel dan grafik analisis regresi linear log konsentrasi terhadap viabilitas sel disajikan pada Gambar 21, 22, 23, dan 24. Diketahui nilai R^2 tidak ada yang negatif menandakan semua variabel memiliki linearitas yang masih baik. Dari persamaan $y = bx+a$, nilai y dapat diubah 50 untuk menghitung nilai x . Selanjutnya nilai x perlu diubah menjadi antilog untuk mendapatkan IC_{50} . Pada perlakuan ekstrak etanol biji nyamplung terhadap sel Vero didapatkan IC_{50}

70.049.759.940 µg/ml, pada perlakuan ekstrak etanol cangkang buah nyamplung terhadap sel Vero didapatkan IC₅₀ 63,828 µg/ml, dan pada perlakuan Doxorubicin terhadap sel Vero didapatkan IC₅₀ 2.674,444 µg/ml. Hasil IC₅₀ kontrol positif Doxorubicin terhadap sel WiDr didapatkan nilai IC₅₀ 3,499.

Tabel 14. Hasil absorbansi dan hasil perhitungan IC₅₀ ekstrak etanol biji nyamplung terhadap sel Vero.

Konsentrasi (µg/ml)	Log Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata Absorbansi	Viabilitas Sel (%)	Kematian Sel (%)
		Replika si 1	Replika si 2	Replika si 3			
200	2,301	0,618	0,658	0,636	0,637	87,409	12,591
100	2	0,679	0,697	0,702	0,693	96,046	3,954
50	1,699	0,700	0,670	0,730	0,700	97,190	2,810
25	1,398	0,682	0,695	0,711	0,696	96,566	3,434
12,5	1,097	0,697	0,722	0,661	0,693	96,150	3,850
6,25	0,796	0,724	0,711	0,675	0,703	97,711	2,289
Kontrol Sel	-	0,734	0,722	0,698	0,718	-	-
Kontrol Media	-	0,072	0,080	0,080	0,077	-	-
Persamaan	$y = -4,8592x + 102,7$						
n							
IC ₅₀	70.049.759.940						

Tabel 15. Hasil absorbansi dan hasil perhitungan IC₅₀ ekstrak etanol cangkang buah nyamplung terhadap sel Vero.

Konsentrasi (µg/ml)	Log Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata Absorbansi	Viabilitas Sel (%)	Kematian Sel (%)
		Replika si 1	Replika si 2	Replika si 3			
200	2,301	0,129	0,144	0,145	0,139	9,677	90,323
100	2	0,244	0,228	0,263	0,245	26,171	73,829
50	1,699	0,560	0,546	0,602	0,569	76,795	23,205
25	1,398	0,659	0,653	0,710	0,674	93,132	6,868
12,5	1,097	0,669	0,698	0,687	0,685	94,797	5,203
6,25	0,796	0,710	0,701	0,590	0,667	92,040	7,960
Kontrol Sel	-	0,734	0,722	0,698	0,718	-	-
Kontrol Media	-	0,072	0,080	0,080	0,077	-	-
Persamaan	$y = -60,177x + 158,62$						
n							
IC ₅₀	63,828						

Tabel 16. Hasil absorbansi dan hasil perhitungan IC₅₀ Doxorubicin terhadap sel Vero.

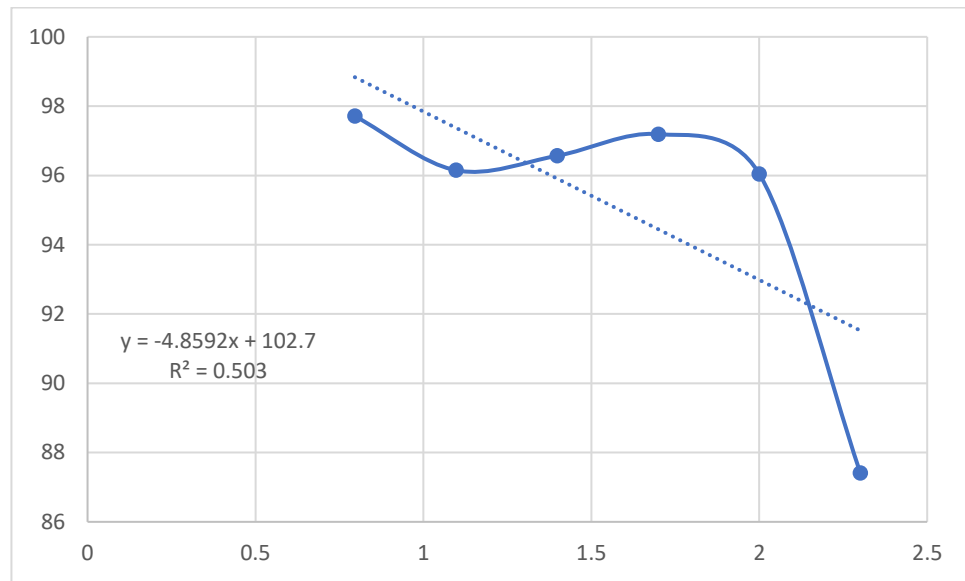
Konsentrasi (µg/ml)	Log Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata Absorbansi	Viabilitas Sel (%)	Kematian Sel (%)
		Replika si 1	Replika si 2	Replika si 3			
20	1,301	0,495	0,487	0,507	0,496	65,401	34,599

Tabel 16. Lanjutan (Hasil absorbansi dan hasil perhitungan IC50 Doxorubicin terhadap sel Vero.

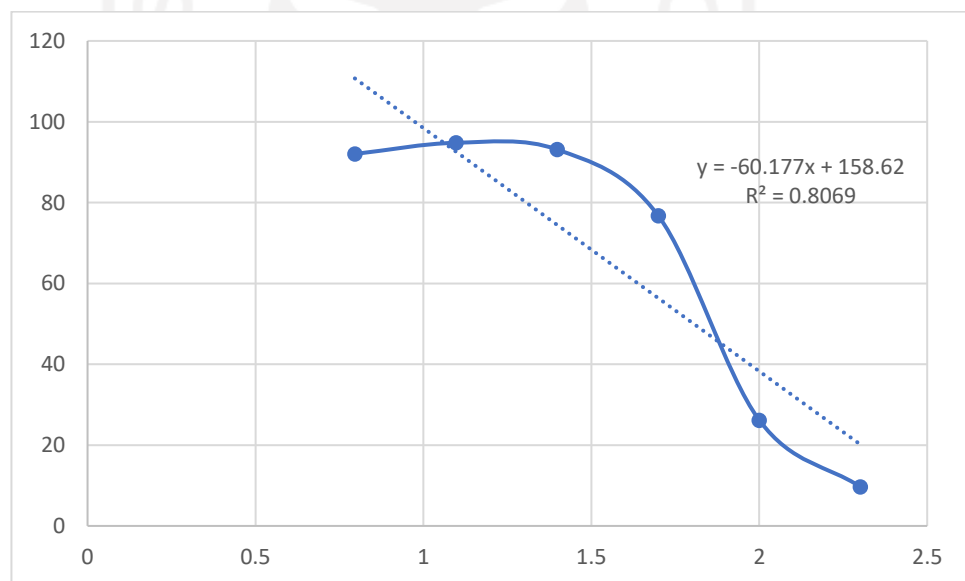
Konsentrasi (µg/ml)	Log Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata Absorbansi	Viabilitas Sel (%)	Kematian Sel (%)
		Replika si 1	Replika si 2	Replika si 3			
10	1	0,522	0,503	0,547	0,524	69,719	30,281
5	0,699	0,511	0,535	0,561	0,536	71,540	28,460
2,5	0,398	0,590	0,583	0,592	0,588	79,761	20,239
1,25	0,097	0,570	0,573	0,566	0,570	76,847	23,153
0,625	-0,204	0,552	0,563	0,588	0,568	76,535	23,465
Kontrol Sel	-	0,734	0,722	0,698	0,718	-	-
Kontrol Media	-	0,072	0,080	0,080	0,077	-	-
Persamaan	$y = -8,0937x + 77,739$						
n							
IC ₅₀	2.674,444						

Tabel 17. Hasil absorbansi dan hasil perhitungan IC₅₀ Doxorubicin terhadap sel WiDr.

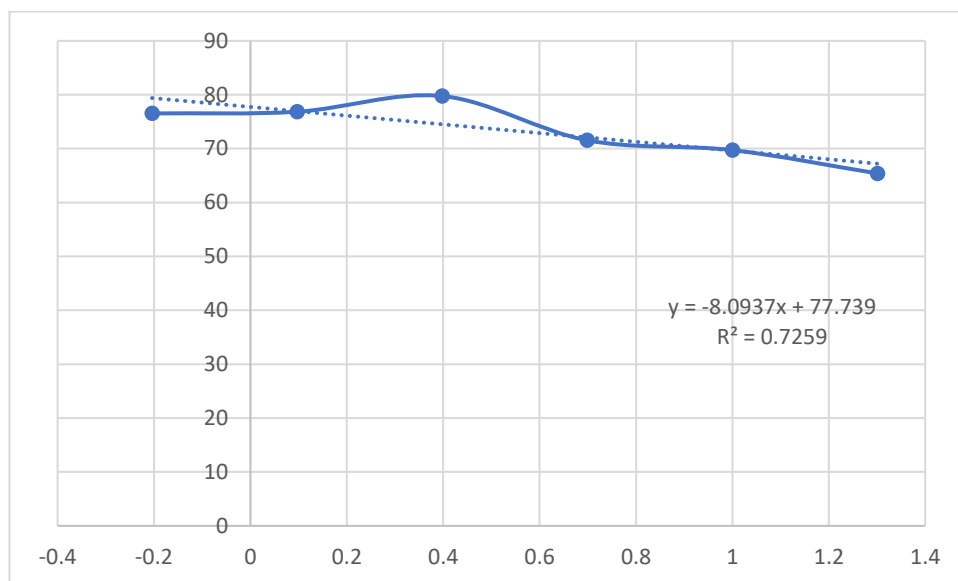
Konsentrasi (µg/ml)	Log Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata Absorbansi	Viabilitas Sel (%)	Kematian Sel (%)
		Replika si 1	Replika si 2	Replika si 3			
20	1,301	0,276	0,263	0,258	0,266	19,338	80,662
10	1	0,354	0,343	0,373	0,357	37,417	62,583
5	0,699	0,367	0,37	0,385	0,374	40,861	59,139
2,5	0,398	0,415	0,409	0,410	0,411	48,278	51,722
1,25	0,097	0,504	0,502	0,474	0,493	64,570	35,430
0,625	-0,204	0,614	0,621	0,605	0,613	88,411	11,589
Kontrol Sel	-	0,656	0,676	0,683	0,672	-	-
Kontrol Media	-	0,163	0,16	0,182	0,168	-	-
Persamaan	$y = -41,215x + 72,417$						
n							
IC ₅₀	3,499						



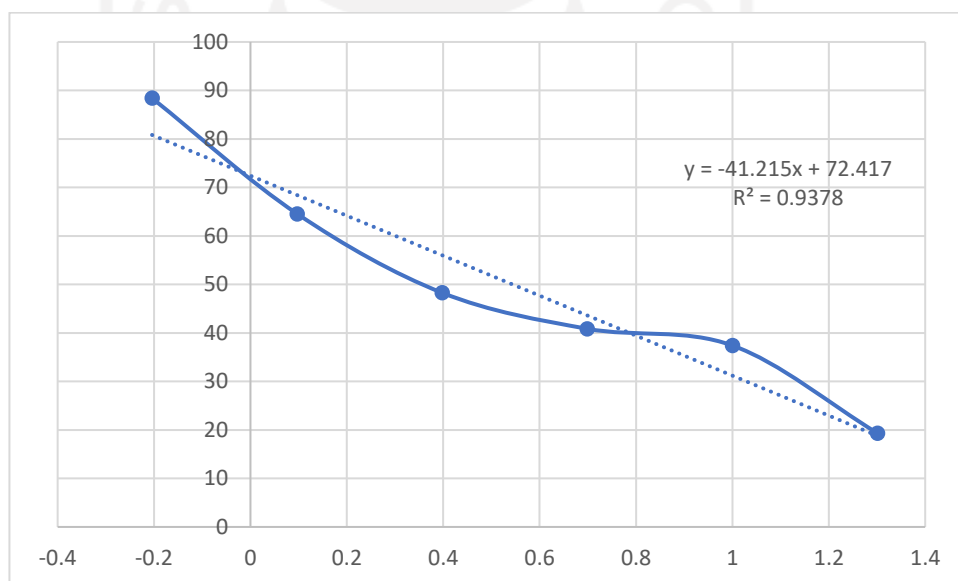
Gambar 27. Grafik analisis regresi linear log konsentrasi ekstrak etanol biji nyamplung terhadap viabilitas sel Vero



Gambar 28. Grafik analisis regresi linear log konsentrasi ekstrak etanol cangkang buah nyamplung terhadap viabilitas sel Vero



Gambar 29. Grafik analisis regresi linear log konsentrasi doxorubicin terhadap viabilitas sel Vero



Gambar 30. Grafik analisis regresi linear log konsentrasi Doxorubicin terhadap viabilitas sel WiDr

4.1.3.3 Perhitungan Indeks selektivitas

Nilai indeks selektivitas menunjukkan tingkat keamanan dari ekstrak terhadap sel kanker dan sel normal, yang dihitung dengan membandingkan nilai IC_{50} ekstrak terhadap sel normal (sel Vero) dan IC_{50} ekstrak terhadap sel kanker kolorektal WiDr. Ekstrak dikatakan memiliki selektivitas yang tinggi apabila nilai

indeks selektivitasnya > 2 (Demirgan *et al.*, 2016). Tabel 16 menunjukkan hasil indeks selektivitas dari sampel. Berdasarkan tabel tersebut menunjukkan bahwa nilai indeks selektivitas ekstrak etanol biji nyamplung memiliki tingkat selektivitas yang paling tinggi. Namun dari sampel ekstrak ini nilai IC_{50} tidak cukup toksik untuk sel WiDr. Pada ekstrak etanol cangkang buah nyamplung bersifat cukup toksik pada sel WiDr, namun pada penilaian indeks selektivitasnya rendah. Artinya ekstrak etanol cangkang buah nyamplung tidak memiliki tingkat keamanan yang baik pada sel normal. Pada obat doxorubicin indeks selektivitasnya tinggi yang artinya doxorubicin memiliki potensi sitotoksik terhadap sel kanker dan memiliki tingkat keamanan yang baik terhadap sel normal.

Tabel 18. Nilai indeks selektivitas.

BAHAN	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		IS
	Sel Vero	Sel WiDr	
Ekstrak etanol biji nyamplung	70.049.759.940	1.030,410	67.982.414,710
Ekstrak etanol cangkang buah nyamplung	63,828	42,472	1,503
Doxorubicin	2.674,444	3,499	764,416

4.2 Pembahasan

4.2.1 Ekstrak *Calophyllum inophyllum* L.

Buah nyamplung terdiri atas biji dan cangkang. Menurut Kartika *et al.* (2018), pada bagian biji nyamplung memiliki kandungan minyak yang melimpah. Oleh sebab itu ketika dilakukan ekstraksi menghasilkan bentuk minyak. Pada ekstraksi cangkang didapatkan ekstrak kental. Etanol merupakan pelarut polar yang dapat menarik senyawa polar yang terdapat dari suatu bahan alam. Pada cangkang dan biji nyamplung diketahui terdapat senyawa-senyawa toksik potensial yang bersifat polar, seperti triterpenoid, calophyllolid, kumarin, flavonoid, saponin, dan resin (Leksono *et al.*, 2013; Ragasa *et al.*, 2015; Kartika *et al.*, 2018).

4.2.2 Uji sitotoksik

Menurut *U.S. National Cancer Institute (NCI)* terdapat 4 kategori senyawa toksik dilihat dari IC_{50} nya yaitu : $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/ml}$ = tinggi, $IC_{50} 21-200 \mu\text{g/ml}$ =

sedang, IC_{50} 201-500 $\mu\text{g/ml}$ = lemah dan $IC_{50} > 501 \mu\text{g/ml}$ = tidak toksik (Sajjadi *et al.*, 2015). Nilai IC_{50} 5-FU terhadap sel WiDr didapatkan hasil 118.585,699 $\mu\text{g/ml}$ yang ini artinya tidak toksik. Hal ini kemungkinan terjadinya resistensi pada sel WiDr. Menurut Sigmond *et al.* (2003), sel WiDr dapat resisten terhadap 5-FU dikarenakan adanya peningkatan ekspresi timidilat sintetase dan P-glycoprotein (PGP) pada sel WiDr. Resistensi 5-flourourasil terjadi akibat tingginya *Multidrug Resistance Protein 5* (MRP5) dan tingginya timidilat sintetase (Dyah *et al.*, 2018). MRP5 adalah transporter yang terletak di membran basolateral duodenum, ileum terminal, dan beberapa lokasi di colon. Timidilat sintetase merupakan enzim untuk sintesis DNA. Perubahan MRP5 dan timidilat sintetase di sinyalir dikarenakan adanya mutasi/kerusakan pada p53 sel sehingga menurunkan sensitivitas 5-FU (Giovannetti *et al.*, 2007). Karena nilai IC_{50} 5-FU terhadap sel WiDr pada penelitian ini tidak toksik dikarenakan kemungkinan terjadi resistensi maka dipilih doxorubicin untuk menggantikan kontrol positif. Pada kasus kanker kolorektal terdapat peningkatan enzim topoisomerase II (Hendricks *et al.*, 2019). Doxorubicin memiliki mekanisme menghambat enzim topoisomerase II yang mengakibatkan kerusakan DNA dan apoptosis sel (Thorn *et al.*, 2011). Doxorubicin merupakan kemoterapi kanker dengan spektrum luas yang memiliki efisiensi harga yang baik dan banyak digunakan pada pengujian terhadap kanker kolorektal (Utami *et al.*, 2020). Doxorubicin merupakan obat kanker yang cukup toksik terhadap sel kanker kolon WiDr (Nuryastuti *et al.*, 2017). Doxorubicin dapat digunakan sebagai kontrol positif pada model kanker kolorektal dikarenakan dapat menginduksi proses apoptosis (Rangkuti *et al.*, 2020). Menurut penelitian Papatungan, Rotinsulu dan YamLean (2017) yang menggunakan sel WiDr di Laboratorium Parasitologi FKKMK UGM mengatakan doxorubicin memiliki IC_{50} 9,215 $\mu\text{g/mL}$ terhadap sel WiDr yang artinya bernilai toksik. Menurut penelitian Wijaya L. (2015), doxorubicin memiliki IC_{50} 5,219 $\mu\text{g/mL}$ terhadap sel WiDr. Pada penelitian kali ini didapatkan hasil IC_{50} doxorubicin 3,499 $\mu\text{g/mL}$ yang bernilai toksik bagi sel WiDr dengan indeks selektivitas yang baik yaitu 764,416.

Potensi sitotoksik ekstrak etanol cangkang buah nyamplung terhadap sel WiDr tergolong sedang, yaitu dengan IC_{50} 42,472 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini kemungkinan terdapat senyawa saponin dan triterpenoid pada cangkang buah nyamplung (Santi, 2009; Kartika, Rabbani dan Yuliana, 2019). Senyawa saponin merupakan

salah satu senyawa antikanker yang bisa didapatkan dari alam. Terdapat berbagai penelitian mengenai mekanisme sitotoksik dari senyawa saponin, dari berbagai penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa saponin menimbulkan efek kematian sel secara apoptosis ataupun non-apoptosis. Mekanisme apoptosis yang paling banyak dilaporkan yaitu melalui jalur intrinsik mekanisme apoptosis. Contoh mekanisme non-apoptosisnya yaitu seperti menurunkan produksi NO, disintegrasi sitoskeleton, dan stimulasi kematian sel secara autofagi (Podolak, Galanty dan Sobolewska, 2010). Triterpenoid diketahui memiliki sifat antikanker melalui mekanisme pencegahan aktivasi *nuclear factor-kappa B* dan induksi apoptosis (Petronellia, Pannitterib and Testaa, 2009). Meskipun ekstrak etanol cangkang buah nyamplung ini memiliki kadar toksik yang sedang pada sel WiDr, namun juga memiliki kadar toksik yang sedang pada sel Vero. Sehingga diperoleh hasil Indeks selektivitas yang rendah yaitu 1,503. Hal ini menandakan bahwa ekstrak etanol cangkang buah nyamplung belum aman bagi sel normal.

Pada ekstrak etanol biji nyamplung didapatkan hasil IC_{50} 1.030,410 $\mu\text{g/ml}$ pada sel WiDr dan 70.049.759.940 $\mu\text{g/ml}$ pada sel Vero. Hasil tersebut memiliki kesimpulan bahwa ekstrak etanol biji nyamplung tidak memiliki efek sitotoksik terhadap sel WiDr maupun sel Vero. Hal ini berbeda halnya pada penelitian Hsieh *et al.* (2018) yang ditemukan bahwa biji nyamplung dengan pelarut metanol memiliki sifat menghambat proliferasi sel kanker kolon DLD-1. Menurut Ginigini *et al.* (2019), biji nyamplung mengandung banyak senyawa flavonoid, triterpenoid, dan xanton. Dibandingkan dengan pelarut etanol, pelarut metanol memiliki kemampuan menyaring bahan aktif flavonoid, triterpenoid, alkaloid dan senyawa fenol lebih baik (Truong *et al.*, 2019). Hal ini dapat menjelaskan, mengapa penggunaan ekstrak metanol biji nyamplung memberikan hasil sitotoksik yang lebih baik daripada pelarut etanol dalam penelitian ini. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini kemungkinan besar mempengaruhi hasil IC_{50} .

Keterbatasan penelitian ini adalah tidak meneliti kandungan zat pada buah nyamplung dan juga terbatas pada sel WiDr. Dengan demikian perlu dilakukan penelitian lanjutan berupa analisis kandungan zat pada buah nyamplung dan juga uji sitotoksik terhadap *cell line* kanker lainnya. Selain itu, juga perlu

dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut selain etanol untuk mengetahui tingkat sitotoksik yang terbaik terhadap sel WiDr dan memiliki indeks selektivitas yang baik.



BAB V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Dari hasil dan pembahasan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol cangkang buah nyamplung memiliki tingkat toksisitas yang sedang pada sel WiDr dan memiliki tingkat toksisitas yang sedang pada sel Vero sehingga didapatkan indeks selektivitas yang rendah. Hal ini memiliki arti bahwa meskipun cangkang buah nyamplung memiliki efek sitotoksik pada sel WiDr, namun keamanannya pada sel normal masih belum baik. Pada ekstrak etanol biji nyamplung tidak memiliki hasil sitotoksik sama sekali pada sel WiDr maupun sel Vero. Pada penelitian ini doxorubicin memiliki tingkat toksisitas yang tinggi dan selektivitas yang tinggi pada sel WiDr. Maka dari keseluruhan dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol biji nyamplung belum dapat dibuktikan efektivitasnya pada sel kanker kolorektal WiDr dikarenakan tidak memiliki aktivitas sitotoksik dan ekstrak etanol cangkang buah nyamplung memiliki sitotoksik yang sedang namun memiliki indeks selektivitas yang rendah, sehingga perlu diteliti kembali bagaimana untuk memaksimalkan potensi sitotoksiknya dan selektivitasnya di bidang pengobatan herbal antikanker.

5.2 Saran

Sebelum dilakukan pengembangan lebih lanjut, ekstrak etanol cangkang buah dan biji nyamplung harus melalui berbagai proses pengujian preklinis dan klinis terlebih dahulu. Uji preklinis secara *in vitro* dan *in vivo* harus dilakukan sebelum memasuki uji klinis pada manusia. Pada uji *in vitro* peneliti menyarankan untuk analisis senyawa kandungan cangkang buah dan biji nyamplung. Melihat potensi toksisitas dari cangkang buah nyamplung, maka kedepannya perlu diteliti kembali toksisitas dan selektivitasnya pada sel kanker lain serta dapat diteliti toksisitas dan selektivitasnya ketika dikombinasikan dengan obat kemoterapi pada sel WiDr.

DAFTAR PUSTAKA

- Ammerman N. C., Beier-Sexton M., Azad A. F., 2008, Growth And Maintenance Of Vero Cell Lines, *Current Protocols in Microbiology*, Appendix 4E, 1-7.
- Ansel J. L., Lupo E., Mijouin L., Guillot S., Butaud J. F., Ho R., *et al.*, 2016, Biological Activity of Polynesian *Calophyllum inophyllum* Oil Extract on Human Skin Cells, *Planta Medica*, 82(11-12), 961–966.
- Aslantürk Ö. S., 2018, In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*, 1–18.
- Brenner H., Kloor M., Pox C. P., 2014, Colorectal Cancer, *The Lancet*, 383(10207), 1467–1480.
- Chen T. R., Drabkowski D., Hay R. J., Macy M., Peterson Jr W., 1987, WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 27(1), 125–134.
- Demirgan R., Karagöz A., Pekmez M., Önay-Uçar E., Artun F., Gürer Ç, Mat A, 2016, In Vitro Anticancer Activity And Cytotoxicity Of Some Papaver Alkaloids On Cancer And Normal Cell Lines, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 65(4), 275-284.
- Dyah K. Y., Astuti I., Pratiwi W. R., 2018, The Expression Of Multidrug Resistance Protein 5 And Thymidilate Synthase On Fluorouracil Resistance Widr Colon Cancer Cell Line, *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, 9(2), 68–71.
- Fleming M., Ravula S., Tatishchev S. F., Wang H. L., 2012, Colorectal Carcinoma: Pathologic Aspects, *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 3(3), 153–173.
- Fu B., Wang N., Tan H., Li S., Cheung F., Feng Y., 2018, Multi-Component Herbal Products In The Prevention And Treatment Of Chemotherapy-Associated Toxicity And Side Effects: A Review On Experimental And Clinical Evidences, *Frontiers in Pharmacology*, 9(1394), 1-15.
- Ginigini J., Lecellier G. J., Nicolas M., Nour M., Hnawia E., Lebouvier N., *et al.*, 2019, Chemodiversity of *Calophyllum inophyllum* L. Oil bioactive components related to their specific geographical distribution in the South Pacific region, *PeerJ*, 7(6896), 1-21.
- Giovannetti E., Backus H. H. J., Wouters D., Ferreira C. G., Van Houten V. M. M., Brakenhoff R. H., *et al.*, 2007, Changes In The Status Of P53 Affect Drug Sensitivity To Thymidilate Synthase (Ts) Inhibitors By Altering Ts Levels, *British Journal of Cancer*, 96(5), 769–775.
- Hendricks A., Gieseler F., Nazzal S, Bräsen J. H., Lucius R., Sipos B., *et al.*, 2019, Prognostic relevance of topoisomerase II α and minichromosome maintenance protein 6 expression in colorectal cancer, *BMC Cancer*, 19(1), 1–10.

- Hsieh C., Lin Y. W., Chen C. H., Ku W., Ma F., Yu H., *et al.*, 2018, Yellow and green pigments from *Calophyllum inophyllum* L. Seed oil induce cell death in colon and lung cancer cells, *Oncology Letters*, 5(4), 5915–5923.
- Hyndman I. J., 2016, Review: the Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours, *Cancer Microenvironment*. *Cancer Microenvironment*, 9(1), 63–69.
- Junedi S., 2009a, Prosedur Tetap Panen Sel, *Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi UGM*. 1-3.
- Junedi, S., 2009b, Prosedur Tetap Perhitungan Sel, *Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta*. 1-4.
- Kartika I. A., Cerny M., Vandenbossche V., Rigal L., Sablayrolles C., Vialle C., *et al.*, 2018, Direct Calophyllum Oil Extraction And Resin Separation With A Binary Solvent Of N-Hexane And Methanol Mixture, *Fuel*, 221, 159-164.
- Kartika I. A., Rabbani R. I., Yuliana N. D., 2019, Potensi Cangkang Buah Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) Sebagai Sumber Resin Alami, *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, 29(3), 269–277.
- Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2015, Panduan Penatalaksanaan Kanker kolorektal, *Panduan Penatalaksanaan Kanker kolorektal*, Jakarta, 1-21.
- Kuipers E. J., Grady W. M., Lieberman D., Seufferlein T., Sung J. J., Boelens P. G., van de Velde C. J. H., Watanabe T., 2015, Colorectal Cancer, *Nature reviews : disease primers*, 1(15065), 1-25.
- Kusuma A. W., Nurulita N. A., Hartanti D., 2010, Efek Sitotoksik Dan Antiproliferatif Kuersetin Pada Sel Kanker Kolon WiDr, *Jurnal Pharmacy*, 7(3), 107-122.
- Leksono B., Hendrati R., Widyarini E., 2013, Coumarins Content of Seed and Crude Oil of Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) from Forest Stands In Indonesia, *International Seminar Proceedings Forests & Medicinal Plants for Better Human Welfare*. 107-118
- Leksono B., Windyarini E., Hasnah T. M., 2014, Budidaya Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) untuk Bioenergi dan Prospek Pemanfaatan Lainnya, *IPB Press*. Jakarta, 5-9.
- Li Y. Z., Li Z. L., Yin S. L., Shi G., Liu M. S., Jing Y. K., Hua H. M., 2010, Triterpenoids from *Calophyllum inophyllum* and their growth inhibitory effects on human leukemia HL-60 cells. *Fitoterapia*, 81(6), 586-589.
- Malarkey D. E., Hoenerhoff M., Maronpot R. R., 2013, Carcinogenesis: Mechanisms and Manifestations, *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*, 1, 107-146
- Noguchi P., Wallace R., Johnson J., Earley E. M., O'Brien S., Ferrone S., *et al.*, 1979, Characterization of WiDr: A human colon carcinoma cell line, *In Vitro*, 15(6), 401–408.
- Nuryastuti T., Pratiwi R., Puniawati S. N., 2017, Efek Sitotoksik, Antiproliferatif

- dan Apoptosis Serum Tikus (*Rattus novergicus Berkenhout*, 1769) diberi Serbuk Tokek (*Gekko gecko L.*) Per Oral Terhadap Sel WiDR, *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi*, 5(2), 128–137.
- Palozza P., Serini S., Maggiano N., Tringali G., Navarra P., Ranelletti F.O., *et al.*, 2005, β -Carotene Downregulates the Steady-State and Heregulin- α -Induced COX-2 Pathways in Colon Cancer Cells, *The Journal of Nutrition*, 135(1), 129–136.
- Paputungan W. A., Rotinsulu H., YamLean P. V., 2017, Standarisasi Parameter Spesifik Dan Uji Aktivitas Antikanker Terhadap Sel Kanker Kolon (WiDr) Dari Ekstrak Etanol Lamun (*Enhalus Acoroides*), *PHARMACON*, 6(3), 189–199.
- Petronellia A., Pannitterib G., Testaa U., 2009, Triterpenoids As New Promising Anticancer Drugs, *Anti-Cancer Drugs*, 20(10), 880–892.
- Podolak I., Galanty A., Sobolewska D., 2010, Saponins As Cytotoxic Agents: A Review, *Phytochemistry Reviews*, 9(3), 425–474.
- Putri H., 2013, Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT, *Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi UGM*, 1–8.
- Ragasa C. Y., Ebajo V., Reyes M. M. D. L., Mandia E. H., Brkljača R., Urban S., 2015, Triterpenes from *Calophyllum inophyllum* linn, *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(4), 718–722.
- Rangkuti I. Y., Bestari R., Lubis A. I., 2020, Ethyl Acetate Extract Of Sabrang Onion (*E. Bulbosa (Mill.) Urb.*) Increases Apoptosis Of WiDr Cells, *International Journal Of Scientific & Technology Research*, 9(2), 5027–5030.
- Sajjadi S. E., Ghanadian M., Haghighi M., Mouhebat L., 2015, Cytotoxic Effect Of *Cousinia Verbascifolia Bunge* Against Ovc3r-3 And Ht-29 Cancer Cells, *Journal of HerbMed Pharmacology*, 4(1), 15–19.
- Santi S., 2009, Penelusuran senyawa sitotoksik pada kulit biji nyamplung (*calophyllum inophyllum* l.) dan kemungkinan korelasinya sebagai antikanker, *Jurnal Kimia*, 3(2), 101–108.
- Shanmugapriya, Chen Y., Kanwar J. R., Sasidharan S., 2017, Anticancer Activity and Molecular Mechanism of Polyphenol Rich *Calophyllum inophyllum* Fruit Extract in MCF-7 Breast Cancer Cells, *Nutrition and Cancer*, 69(8), 1308–1324.
- Sigmond J., Backus H. H. J., Wouters D., Temmink O. H., Jansen G., Peters G. J., 2003, Induction of resistance to the multitargeted antifolate Pemetrexed (ALIMTA) in WiDr human colon cancer cells is associated with thymidylate synthase overexpression, *Biochemical Pharmacology*, 66(3), 431–438.
- Sundur S., Shrivastava B., Sharma P., Raj S. S., Jayasekhar V. L., 2014, A Review Article of Pharmacological Activities and Biological Importance of *Calophyllum inophyllum*, *International Journal of Advanced Research (IJAR)*, 2(12), 599–603.

- Tariq K., Ghias K., 2016, Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms, *Cancer Biology and Medicine*, 13(1), 120–135.
- The Global Cancer Observatory, 2019, Cancer fact sheet, *World Health Organization*, 876, 2018–2019.
- Thorn C. F., Oshiro C., Marsh S., Hernandez-Boussard T., McLeod H., Klein T. E., et al., 2011, Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects, *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(7), 440–446.
- Truong D. H., Nguyen D. H., Ta N. T. A., Bui A. V., Do T. H., Nguyen H. C., 2019, Evaluation Of The Use Of Different Solvents For Phytochemical Constituents, Antioxidants, And In Vitro Anti-Inflammatory Activities Of *Severinia Buxifolia*, *Journal of Food Quality*, 1, 1-9.
- Utami D. T., Nugraheni N., Jenie R. I., Meiyanto E., 2020, Co-treatment of Brazilein Enhances Cytotoxicity of Doxorubicin on WiDr Colorectal Cancer Cells Through Cell Cycle Arrest, *The Indonesian Biomedical Journal*, 12(4), 288–389.
- Wijaya L., 2015, Uji sitotoksik ekstrak etanol kulit kayu manis (*cinnamomum burmanni nees & t. Nees.*) terhadap sel kanker kolon WiDr, *Skripsi thesis*, Universitas Setia Budi Surakarta.
- World Health Organization, 2019, Estimated number of cancer cases in Indonesia, 256, 2018–2019.

LAMPIRAN 1. Keterangan Lolos Kaji Etik



FAKULTAS
KEDOKTERAN

Gedung Dr. Soekiman Wirjosandjojo
Kampus Terpadu Universitas Islam Indonesia
Jl. Kaliurang km 14,5 Yogyakarta 55584
T. (0274) 898444 ext. 2096, 2097
F. (0274) 898459 ext 2007
E. fk@uii.ac.id
W. fk.uui.ac.id

Nomor : 3/Ka.Kom.Et/70/KE/VII/2020

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran dan kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Islamic University of Indonesia, with regards of the protection of human rights and welfare in medical and health research, has carefully reviewed the research protocol entitled :

“Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Buah Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) terhadap Sel Kanker Kolorektal Widr Secara In Vitro”

Peneliti Utama : Irfan Jaen Fathani
Principal Investigator

Nama Institusi : Program Studi Pendidikan Dokter FK UII
Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
and approved the above-mentioned protocol.

Yogyakarta, 6 Juli 2020
Ketua
Chairman
[Signature]
Dr. Bahma Yuantari, M.Sc, Sp.PK

***Ethical Approval** berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan

****Peneliti berkewajiban**

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila :
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical clearance* harus diperpanjang
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*

LAMPIRAN 2. Surat Keterangan Hasil Uji Determinasi



UNIVERSITAS GADJAH MADA
FAKULTAS FARMASI
 Sekip Utara, Yogyakarta 55281 Telp./Fax. +62 274 543120
<http://www.farmasi.ugm.ac.id>, Email: farmasi@ugm.ac.id

SURAT KETERANGAN
 No.: 19.30.07/UN1/FFA/BF/PT/2020

Yth. Irfan Jaen Fathani
 NIM : 17711130
 Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia
 Sleman, DIY

30 Juli 2020

Berikut kami sampaikan hasil identifikasi sampel yang diterima oleh Departemen Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada:


No. Pendaftaran	Jenis	Suku
35	<i>Calophyllum inophyllum</i> L.	<i>Clusiaceae</i>

Surat ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Mengesahkan
 Dekan

 Prof. apt. Agung Endro Nugroho, M.Si., Ph.D.

Ketua Departemen Biologi Farmasi,


 Dr. apt. Indah Purwantini, M.Si.