

Standardisasi Ekstrak Khaya (*Khaya anotheca*) Sebagai Antikanker Payudara MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*)

Standardization Of Khaya (*Khaya anotheca*) Extract As Breast Anticancer MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*)

Parwaz Setaviani¹, Nani Suryani^{2*}, Zahra Khaerul Kamila¹, Siti Amaliya¹, Eneng Elda Ernawati¹, Tarso Rudiana², Arini Khaerunnisa¹

¹Program Studi Farmasi. Fakultas Sains, Farmasi dan Kesehatan Universitas Mathla'ul Anwar Banten. Pandeglang-Banten

²Program Studi Kimia. Fakultas Sains, Farmasi dan Kesehatan Universitas Mathla'ul Anwar Banten. Pandeglang-Banten

Article Info	ABSTRAK
<p>Article history:</p> <p>Received 08 13, 2024 Revised 09 28, 2024 Accepted 10 01, 2024</p>	<p>Setelah penyakit kardiovaskular, kanker merupakan penyakit tidak menular kedua yang paling sering mengakibatkan kematian. Kandungan senyawa kimia yang terkandung dalam tumbuhan <i>Khaya anotheca</i> dan memiliki aktivitas antikanker diantaranya adalah <i>methyl angolensate</i>, <i>7-deacetylkhivorin</i>, <i>grandifolione</i>, <i>gedunin</i>, <i>obacunone</i> dan <i>Cathecin</i>. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui standardisasi ekstrak dan mengetahui aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara MCF-7. Metode yang digunakan pada penelitian ini yakni standardisasi parameter spesifik dan non-spesifik, dan pengujian sitotoksik menggunakan <i>Prestoblue</i>. Hasil standardisasi ekstrak parameter spesifik memiliki nilai kadar sari larut dalam air dan etanol sebesar 4,68% dan 5,80% (memenuhi syarat). Parameter non-spesifik susut pengeringan 0,739%, kadar abu 8,02%, cemaran mikroba 0 koloni, timbal (Pb) 0,2976 mg/kg, kadmium (Cd) $\leq 0,001$ mg/kg (memenuhi syarat) dan Nilai IC_{50} aktivitas antikanker payudara MCF-7 dari ekstrak <i>Khaya anotheca</i> sebesar 194,20 $\mu\text{g/mL}$ dengan kategori sedang/moderat.</p>
<p>Kata kunci</p> <p>Antikanker <i>Khaya anotheca</i> MCF-7 Standardisasi <i>Prestoblue</i></p>	<p>ABSTRACT</p> <p>After cardiovascular disease, cancer is the second non -communicable disease that most often results in death. The chemical compounds contained in the <i>Khaya anotheca</i> plant which have anticancer activity include <i>methyl angolensate</i>, <i>7-deacetylkhivorin</i>, <i>grandifolione</i>, <i>gedunin</i>, <i>obacunone</i>, and <i>Cathecin</i>. This research aims to determine extracts' standardization and anticancer activity against MCF-7 breast cancer cells. The method used in this research is standardization of specific and non-specific parameters, and cytotoxic testing using <i>Prestoblue</i>. The results of extract standardization of specific parameters have values for soluble essence in water and ethanol of 4.68% and 5.80% (meeting the requirements). Non-specific parameters drying loss 0.739%, ash content 8.02%, microbial contamination 0 colonies, lead (Pb) 0.2976 mg/kg, cadmium (Cd) ≤ 0.001 mg/kg (qualified) and IC_{50} value of anticancer activity breast MCF-7 from <i>Khaya anotheca</i> extract was 194.20 $\mu\text{g/mL}$ in the medium/moderate category.</p>
<p>Keywords:</p> <p>Anticancer <i>Khaya anotheca</i> MCF-7 Standardization <i>Prestoblue</i></p>	

Corresponding Author:

Nani Suryani

Program Studi Kimia, Fakultas Sains, Farmasi dan Kesehatan Universitas Mathla'ul Anwar Banten

Jl. Raya Labuan Km 23, Cikaliung, Saketi. Pandeglang Banten. 42273

email: nanisuryani7688@gmail.com; nanisuryani@unmabanten.ac.id

This is an open-access article under the [CC BY-SA](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/) license.



1. PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyebab utama kematian kedua setelah penyakit kardiovaskular, dengan faktor-faktor seperti genetik, lingkungan, dan gaya hidup berperan penting [1], [2]. Di Indonesia, prevalensi kanker terus meningkat, termasuk kanker payudara yang signifikan [3]. Kanker payudara terjadi akibat pertumbuhan sel yang tidak terkendali, sering kali diobati dengan kemoterapi yang memiliki efek samping serius seperti *Multidrug Resistance* (MDR) [4].

Tanaman herbal, seperti *Khaya anotheca*, menawarkan potensi sebagai sumber senyawa antikanker yang lebih aman (Zafrial dkk., 2018). Pada genus yang sama dengan *K. anotheca* yaitu *K. senegalensis* pada bagian kulit batangnya telah dilaporkan memiliki aktivitas antikanker payudara (MCF-7) pada konsentrasi 200 ppm dapat menghambat pertumbuhan sel kanker sebesar 66%. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa *K. anotheca* mengandung senyawa seperti methyl angolensate, Grandifolione, Obacunone, Limonoid gedunin dan katekin. Senyawa-senyawa ini juga ditemukan pada berbagai jenis tanaman yang telah dilaporkan pada berbagai penelitian memiliki aktivitas antikanker [6]–[10].

Ekstrak n-heksana, etil asetat dan etanol kulit batang *K. anotheca* sudah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, dimana ekstrak etil asetat memiliki aktivitas yang paling tinggi dengan nilai IC₅₀ 47,82 ppm (Kategori kuat). Namun, ekstrak etil asetat *K. anotheca* belum pernah dilakukan pengujian aktivitas terhadap sel kanker payudara (MCF-7) dan standardisasi ekstrak. Standardisasi ekstrak perlu dilakukan karena sebelum dijadikan obat, ekstrak tanaman perlu disesuaikan dengan standar mutu, keamanan, dan kemanfaatannya [12]. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi dan standardisasi ekstrak etil asetat dari kulit batang *Khaya anotheca* serta menguji aktivitasnya terhadap sel kanker payudara MCF-7.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Bahan dan Alat

Bahan : Ekstrak etil asetat kulit batang khaya (*Khaya anotheca*), aquadest, kloroform, etanol 96%, buffer pepton water, kloroform, media PCA (*Plate Count Agar*), Sel MCF7, 1,5 mL microtube, 15 mL tube, 75 mL T-flask, 96 well plate, Ciplastin, Antibiotik, DMSO (*Dimethyl sulfoxide*), PBS (*Phosphate Buffered Saline*), Resazurin Sodium Salt-Power, BioReagent, Medium RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*, FBS (*Fetal Bovine Serum*), Trypsin-EDTA dan Trypan blue.

Alat : Alat – alat yang digunakan meliputi neraca analitik, seperangkat alat gelas, oven, desikator, cawan petri, *Biosafety Cabinet* (BSC), *Centrifuge*, CO₂ *Incubator*, *Microscope* dan *Multimode Reader*.

2.2 Cara Kerja

Determinasi

Sampel kulit batang Khaya (*Khaya anotheca*) diambil dari Taman Hutan Raya (Tahura), Carita, Pandeglang Banten dan dideterminasi di Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Serpong.

Pembuatan Simplisia

Sebanyak ± 20 kg kulit batang *K. anotheca* dicuci bersih kemudian di kupas kulitnya, Selanjutnya dikeringkan di bawah sinar matahari langsung hingga kering. Setelah kering, dilakukan sortasi kembali, kemudian dihaluskan menggunakan grinder, dan serbuk simplisia yang didapatkan selanjutnya diayak dengan mesh 60.

Ekstraksi

Sebanyak 2000 g serbuk simplisia kulit batang Khaya (*Khaya anotheca*) pada masing masing ukuran diekstraksi secara maserasi bertingkat, maserasi bertingkat



digunakan untuk memisahkan metaboit sekunder sesuai dengan kepolarannya. Pelarut yang digunakan adalah *n*-heksana, etil asetat dan etanol. Filtrat kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

Skrining Fitokimia

Ekstrak kental kulit batang *K.anthotheca* yang diuji fitokimia meliputi senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, tannin, saponin, steroid dan terpenoid.

Standardisasi Ekstrak Parameter Spesifik

Uji Organoleptik

Uji organoleptik merupakan pengenalan awal yang sederhana seobjektif mungkin. Mendeskripsikan menggunakan panca indera meliputi, bentuk, warna, bau dan rasa. Penetapan dilakukan dengan mengamati bahan setelah terkena udara selama 15 menit dalam cawan penguap [13].

Kadar Sari Larut dalam Air

Ekstrak etil asetat kulit batang *K.anthotheca* sebanyak 5 g dimasukan ke dalam labu bersumbat, lalu tambahkan 100 mL air jenuh kloroform. Kocok campuran tersebut berkali-kali selama 6 jam pertama, dan biarkan selama 18 jam. Setelah itu, 20 mL filtrat disaring dan diuapkan hingga kering dalam krus yang telah dipanaskan hingga suhu 105°C dan telah ditimbang terlebih dahulu. Lalu didinginkan dan ditimbang hingga bobotnya tetap [13].

Kadar Sari Larut dalam Etanol

Ekstrak etil asetat kulit batang *K.anthotheca* sebanyak 5 g dimasukkan ke dalam labu sumbat, lalu ditambahkan 100 mL etanol dan dikocok berkali-kali selama 6 jam pertama, dan biarkan selama 18 jam. Saringlah campuran tersebut dengan cepat untuk menghindari penguapan etanol. Uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam krus porselen yang telah dipanaskan hingga suhu 105°C kemudian didinginkan dan ditimbang hingga bobot tetap [13].

Standardisasi Ekstrak Parameter non-Spesifik

Susut Pengerinan

Timbang 1-2 g ekstrak etil asetat kulit batang *K.anthotheca* dalam krus porselen yang sebelumnya telah dipanaskan dan ditimbang. Ratakan bahan dalam krus porselen dengan digoyangkan sehingga membentuk lapisan setebal sekitar 5 hingga 10 mm, lalu dimasukkan ke dalam oven. Buka krus sebelum memulai pengeringan, dan keringkan pada suhu penetapan hingga bobotnya tetap. Biarkan botol dalam keadaan tertutup agar mendingin dalam desikator hingga mencapai suhu ruang kemudian ditimbang hingga bobot tetap [13]

Kadar Abu

Sebanyak 2 g ekstrak dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan. Pijarkan hingga arang habis, kemudian dinginkan dan ditimbang. Pijarkan sisa kertas dan kertas saring dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan [14].

Cemaran Mikroba

Sebanyak 1 g ekstrak ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung. Kemudian, ekstrak tersebut dilarutkan dalam 9 mL larutan *buffer pepton water* dan dihomogenkan. Kemudian dilakukan pengenceran dengan cara diambil 1 mL dan ditempatkan di cawan petri steril secara duplo. Setelah itu, ditambahkan 15 mL media PCA (*Plate Count Agar*) yang telah dicairkan ke setiap cawan petri. Cawan petri digoyangkan untuk meratakan larutan, kemudian dibiarkan hingga membeku. Selanjutnya, cawan petri diletakkan



terbalik dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 72 jam. Setelah inkubasi, dilakukan penghitungan jumlah koloni bakteri yang tumbuh [15].

Cemaran Logam Berat Pb dan Cd dengan metode AAS

Pembuatan kurva baku Pd dan Cd : Dari larutan baku $Pb(NO_3)_2$, sebanyak 5 ml diambil menggunakan pipet, lalu volumenya disesuaikan menjadi 50 mL dengan larutan HNO_3 2%. Dari larutan ini, diambil sejumlah 1, 2, 3, 4 dan 5 mL yang masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan dicukupkan volumenya sampai batas tanda. Hasilnya adalah larutan-larutan baku dengan konsentrasi berturut-turut 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Dari larutan baku $Cd(NO_3)_2$ sebanyak 1000 ppm, diambil 5 mL menggunakan pipet, kemudian volumenya disesuaikan menjadi 50 mL dengan larutan HNO_3 2% (100 ppm). Dari larutan ini, diambil sejumlah 1, 2, 3, 4, dan 5 mL masing-masing dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan volumenya dicukupkan hingga mencapai batas tanda. Hasilnya adalah larutan-larutan baku dengan konsentrasi berturut-turut 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 dan 0,5 ppm.

Larutan Uji : sampel 5 g diletakkan ke dalam gelas beaker. Ditambahkan 5 mL HNO_3 p.a dan 1 mL $HClO_4$ p.a, lalu dipanaskan pada suhu 200°C hingga larutan menjadi jernih. Setelah didinginkan, larutan disaring menggunakan kertas saring Whatman No 40-41. Kemudian dituangkan ke dalam labu ukur 50 mL.

Pengukuran kadar logam : Konsentrasi logam Pb diukur menggunakan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang 217 nm, logam cadmium diukur pada panjang gelombang 288,8 nm [16].

Uji Sitotoksik dengan Metode Prestoblue

Preparasi Media/Kontrol Positif/Sampel

Seluruh media kultur cair dibuat yang disebut sebagai Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), yang terdiri dari 10% Fetal Bovine Serum (FBS) dan 50 μ L/50 mL antibiotik. Cisplatin berfungsi sebagai kontrol positif. Sampel dilarutkan menggunakan stok pada konsentrasi akhir yang telah ditentukan, dimana pelarut ini tidak merusak sel. Larutan yang berfungsi untuk uji antiproliferasi juga disiapkan. Resazurin Sodium Salt-Powder, BioReagent, adalah larutan kerja yang akan digunakan.

Preparasi Sel

Sel yang digunakan telah konfluen min 70%. Media dibuang lalu sel dibilas sebanyak 2x dengan PBS 1 mL, lalu ditambahkan 1 mL larutan Trypsin-EDTA dan diinkubasi selama 5 menit agar lapisan sel terdispersi (di bawah mikroskop *inverted* sel akan tampak melayang). Kemudian sel dipindahkan kedalam tube yang telah berisi media, kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, dan pelet dilarutkan kedalam tube berisi media.

Seeding Sel ke dalam 96 well plate

Jumlah dan viabilitas sel (dengan *trypan blue exclusion*), dan *resuspend* sel ditentukan dengan kepadatan sel akhir 170.000 sel/mL dalam media (17.000 sel/well). 10 μ L trypan blue disiapkan dalam microtube steril, lalu ditambahkan 10 μ L suspensi sel dan dihomogenkan. Hemacytometer dibersihkan dan ditutup slip menggunakan etanol 70% kemudian dikeringkan. Perlahan-lahan dimasukkan 10 μ L larutan sel- trypan blue ke salah satu sisi bilik/*chamber*. Dihitung jumlah sel yang sehat dan tentukan jumlah sel (viabel) per mL. *Seeding*/kultur sel kedalam 96 wellplate, kemudian diinkubasi selama 24 jam (atau sampai sel konfluen min. 70%) pada suhu 37°C dan 5% gas CO_2 .

Perlakuan sel dengan sampel/kontrol positif/kontrol negative.

Delapan buah *microtube* 1,5 mL disiapkan lalu diberi label konsentrasi pengenceran yang sesuai, kemudian stock sampel diencerkan menjadi delapan varian konsentrasi menggunakan pelarut media. Dikeluarkan 96 *well plate* yang telah berisi sel dari



inkubator. Diberi label pada plate sepanjang margin kiri untuk baris mana yang akan diberi perlakuan oleh standar dan baris mana yang akan diberi sampel. Lalu dibuang media dari setiap *well*. Dengan menggunakan mikropipet dipindahkan 100 μ L masing-masing sampel dan kontrol positif dari microtube ke dalam masing-masing *well* yang sesuai pada 96 *well plate* yang telah berisi sel. Kemudian di inkubasi kembali selama 48 jam.

Pemberian reagen Resazurin dan Pengukuran absorbansi

Media pada setiap *well* dibuang, kemudian disiapkan 9 mL media pada *tube* yang ditambahkan 1 mL "*Resazurin Sodium Salt- Powder, BioReagent*" (10 μ L reagen untuk 90 μ L media), lalu dimasukkan 100 μ L campuran larutan tersebut kedalam tiap *well microplate* kemudian diinkubasi selama 1-2 jam sampai terlihat perubahan warna (Saat memasuki sel hidup, reagen *Resazurin Sodium Salt* akan direduksi dari senyawa biru resazurin tanpa nilai fluorescent intrinsik, menjadi senyawa resorufin yang berwarna merah dan sangat berpendar). Konversi nilai sebanding dengan jumlah sel yang aktif secara metabolik dan oleh karena itu dapat diukur secara kuantitatif. Untuk mengukur absorbansi, digunakan spektrum absorbansi untuk resazurin dan resorufin). Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 570 nm menggunakan multimode reader.

3. HASIL

3.1 Hasi Pembuatan Simplisia dan Ekstraksi

Tabel 1 Hasil Pembuatan Simplisia dan ekstrak *K.anthotheca*

Sampel	Berat (g)	% Rendemen
Kulit batang basah	20.000	
Simplisia	8.000	
Simplisia serbuk yang akan diekstraksi	2.000	
Ekstrak n-heksana	2,65	0,13
Ekstrak etil asetat	89,40	4,47
Ekstrak etanol	335,78	16,79

3.2 Skrining Fitokimia

Tabel 1. Hasil Identifikasi senyawa

Golongan Senyawa	Preaksi	Hasil Pengamatan	Keterangan
Alkaloid	Mayer	Endapan putih	Positif
	Wagner	Endapan coklat	Positif
	Dragendroff	Warna coklat	Positif
Flavonoid	Mg + Amil alcohol + alcohol	Warna jingga	Positif
Fenolik	FeCl ₃ 0,1%	Hitam pekat	Positif
Tanin	Aquadest + FeCl ₃ 0,1%	Hitam	Positif
Saponin	Aquadest	Terbentuk busa	Positif
Steroid	Lieberman Buchard	Warna hijau	Positif
Terpenoid	KLT	Noda oranye kemerahan	Positif

3.3 Standardisasi Ekstrak

Tabel 2. Hasil Standardisasi Ekstrak Parameter Spesifik

Parameter	Hasil
Orgaoleptis	Bentuk : Kental Warna : Hitam Kemerahan Bau : Bau Khas
Kadar sari larut dalam air	4,68%
Kadar sari larut dalam etanol	5,80%



Tabel 3. Hasil Standardisasi Ekstrak Parameter non-spesifik

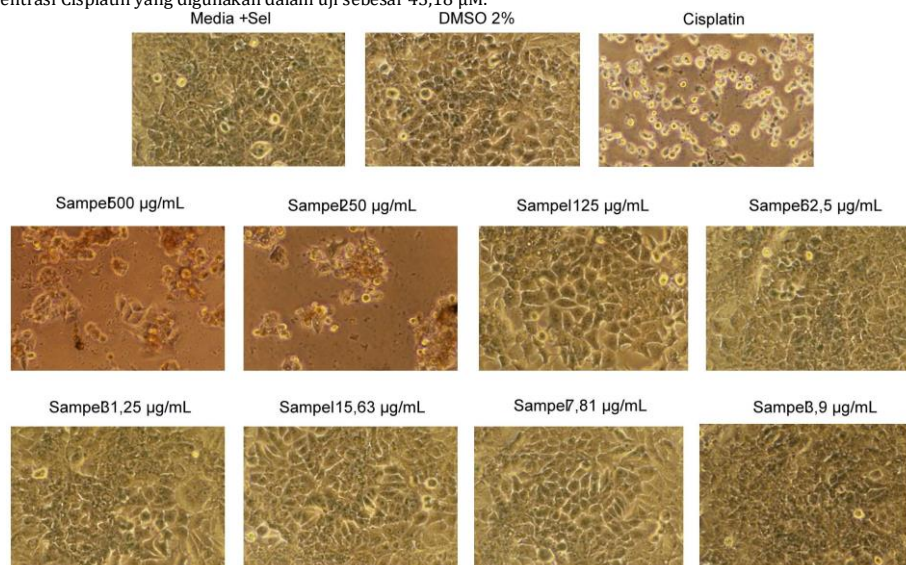
Parameter	Hasil	Syarat
Susut Pengeringan	0,739%	<10% [17]
Kadar abu	8,02%	≤ 16,6% [13]
Cemaran Mikroba	0 koloni	≤ 5 x 10 ⁷ koloni/g [17]
Timbal (Pb)	0,2976 mg/kg	≤ 10 mg/kg [17]
Kadmium (Cd)	≤0,001 mg/kg	≤ 0,3 mg/kg [17]
Merkuri (Hg)	80,2949	≤ 0,5 mg/kg [17]

3.4 Hasil Uji Sitotoksik MCF-7 dengan Metode Presto blue

Tabel 4. Absorbansi Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang *K.anthothea*

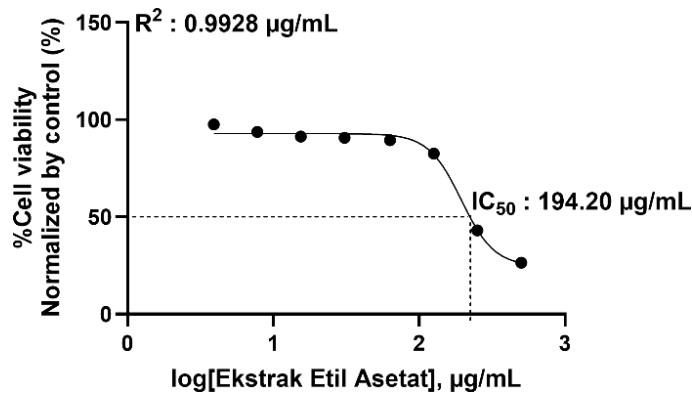
	Media	Media + Sel	Cisplatin	Pelarut	Konsentrasi Sampel (µg/mL)							
					3,91	7,81	15,63	31,25	62,50	125,00	250,00	500,00
Abs 570 nm	0,6046	0,8975	0,6705	0,9248	0,9252	0,9034	0,8913	0,8890	0,8819	0,8783	0,7468	0,6832
	0,6007	0,9300	0,6752	0,9269	0,9280	0,9000	0,8927	0,8892	0,8839	0,8796	0,7497	0,6835
Abs 600 nm	0,7811	0,2506	0,6855	0,2677	0,2797	0,2830	0,2943	0,2903	0,3022	0,3569	0,5613	0,6347
	0,7754	0,2596	0,6892	0,2420	0,2729	0,2860	0,2958	0,3027	0,3000	0,3539	0,5568	0,6346
Δ Abs	-	0,6469	-	0,6571	0,6455	0,6204	0,5970	0,5987	0,5797	0,5214	0,1855	0,0485
	0,1765		0,0150									
	-	0,6704	-	0,6849	0,6551	0,6140	0,5969	0,5865	0,5839	0,5257	0,1929	0,0489
	0,1747		0,0140									
% Sel hidup		98,59	19,25	99,81	98,42	95,41	92,60	92,82	90,54	83,55	43,28	26,86
		101,41	19,37	103,15	99,57	94,65	92,60	91,35	91,04	84,07	44,17	26,91
Rata-rata % sel hidup		100,00	19,31	101,48	99,00	95,03	92,60	92,08	90,79	83,81	43,73	26,89
SEM		1,41	0,06	1,67	0,58	0,38	0,00	0,73	0,25	0,26	0,44	0,03
Normalisasi data % Sel hidup		98,54	19,03	100,00	97,55	93,64	91,25	90,74	89,47	82,59	43,09	26,49

Keterangan: Konsentrasi Cisplatin yang digunakan dalam uji sebesar 43,18 µM.



Gambar 1 Morfologi sel MCF-7 Hasil uji sampel Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang *K.anthothea*





Gambar 2 Kurva Hasil Uji Sampel Ekstrak *K.anthotheca*

Tabel 4. Nilai IC₅₀ Uji Sitotoksitas Ekstrak *K.anthotheca*

Sampel	IC ₅₀ (µg/mL)
Ekstrak <i>K.anthotheca</i>	194,20

4. PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi

Ekstraksi yang digunakan adalah maserasi bertingkat terhadap serbuk kering kulit batang *K. anthotheca*, ekstraksi menggunakan 3 jenis pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda, yaitu n-heksana, etil asetat, dan etanol. Ekstrak etanol memiliki % rendemen paling tinggi yaitu 16,79%, sedangkan ekstrak etil asetat sebesar 4,47% dan ekstrak n-heksana sebesar 0,13%. Tingginya rendemen ekstrak etanol kulit batang *K. Anthotheca* menunjukkan kemungkinan bahwa senyawa polar pada kulit batang *K. anthotheca* terekstrak pada pelarut etanol lebih banyak dibandingkan senyawa non polar atau semi polar, karena tingginya rendemen menunjukkan kesamaan sifat kepolaran terhadap pelarut. Perbedaan polaritas pelarut dapat memberikan pengaruh terhadap rendemen yang dihasilkan, penyebab sedikitnya persen rendemen pada n-heksana kemungkinan karena senyawa non polar yang terkandung pada simplisia hanya sedikit. Senyawa yang tertarik pada ekstrak n-heksana adalah senyawa yang bersifat non polar, seperti saponin, terpenoid. Senyawa yang tertarik pada ekstrak etil asetat adalah senyawa yang bersifat semi polar, kemungkinan adalah fenolik, sedangkan senyawa yang tertarik pada ekstrak etanol adalah senyawa yang bersifat polar seperti flavonoid, fenolik, glukosa.

Etil asetat adalah pelarut semipolar yang efektif dalam mengekstraksi senyawa-senyawa seperti flavonoid, alkaloid, dan steroid. Flavonoid, salah satu golongan senyawa ini, dapat berfungsi sebagai agen antikanker melalui mekanisme apoptosis atau inhibisi sel, tergantung pada substituen yang dimilikinya (Lazaro, 2002) memodulasi enzim, terlibat dalam menahan siklus sel, menginduksi apoptosis, autophagy, dan menekan kanker proliferasi dan invasi sel.

Prinsip pada metode maserasi yaitu cairan penyari akan menembus dinding sel, zat aktif akan terdistribusi karena perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel, sehingga larutan dengan konsentrasi tinggi akan terdesak ke luar sel (Salamah dkk., 2017). Keunggulan maserasi bertingkat dapat menghasilkan ekstrak yang bervariasi sesuai dengan jenis pelarut yang digunakan.

4.2 Standardisasi Ekstrak

Standardisasi merupakan penetapan sifat berdasarkan parameter-parameter tertentu untuk untuk menentukan kualitas ekstrak. Ekstrak distandardisasi dengan dua parameter yaitu parameter spesifik dan parameter non spesifik [16]. Parameter spesifik



meliputi organoleptik, senyawa kimia larut air dan etanol, kandungan kimia. Sedangkan parameter non spesifik meliputi susut pengeringan, kadar abu, cemaran logam dan cemaran mikroba.

Uji organoleptik melibatkan evaluasi indera manusia, seperti penglihatan, penciuman, dan perasa, terhadap karakteristik fisik ekstrak. Ini dapat mencakup penilaian bentuk, warna, dan bau. Hasil pengujian ekstrak etil asetat kulit batang *K.anthotheca* secara organoleptis (Tabel 2) memiliki bentuk ekstrak kental, berwarna hitam kemerahan, dan memiliki bau yang khas. Organoleptis Bau yang tercium hanya diberikan deskripsi dan tidak dapat dijadikan sebagai standar kemurnian dari bahan tersebut [13].

Senyawa yang terlarut dalam air dan etanol ditetapkan kadarnya dengan tujuan untuk menunjukkan jumlah kandungan senyawa yang bersifat polar [18]. Untuk mengekstrak senyawa yang larut dalam air menggunakan pelarut air-kloroform sedangkan untuk senyawa yang larut dalam etanol menggunakan pelarut etanol 95%. Kedua pelarut ini dan campuran keduanya merupakan cairan pelarut yang diperbolehkan dan memenuhi syarat kefarmasian. Hasil pengujian kadar sari larut dalam air dan etanol menyatakan bahwa senyawa-senyawa ekstrak etil asetat kulit batang *K.anthotheca* lebih larut dalam etanol dibandingkan dalam pelarut air (Tabel 2), dimana kadar sari larut dalam etanol yaitu 5,80% sedangkan kadar senyawa yang terlarut dalam air yaitu 4,68%.

Proses pengeringan dilakukan bertujuan untuk memberikan batasan maksimal (rentang) jumlah senyawa yang hilang selama proses pengeringan [14]. Pada penentuan parameter susut pengeringan ekstrak etil asetat kulit batang *K.anthotheca* (Tabel 3) didapatkan nilai susut pengeringan sebesar 0,739% berarti ekstrak dalam keadaan kering, yang mana pada saat dipanaskan air dan minyak atsiri yang terdapat pada ekstrak sudah menguap. Standar besarnya nilai susut pengeringan suatu ekstrak adalah <10% [17], maka ekstrak etil asetat kulit batang *K.athotheca* memenuhi standar.

Parameter kadar abu dalam ekstraksi mengacu pada sisa mineral atau senyawa anorganik setelah pemanasan ekstrak pada suhu tinggi, di mana senyawa organik dan turunannya menguap. Tujuannya yakni memberikan informasi tentang kandungan mineral baik yang berasal dari internal maupun eksternal dalam proses pembentukan ekstrak, setelah melewati tahapan pemanasan tersebut [14]. Hasil pemeriksaan kadar abu ekstrak etil asetat kulit batang *K.anthotheca* (Tabel 3) diperoleh nilai 8,02% yang mana hasil tersebut masuk kedalam standar besarnya nilai kadar abu suatu ekstrak yakni sebesar $\leq 16,6\%$ [13].

Pengujian cemaran mikroba merupakan termasuk salah satu kemurnian ekstrak. Uji ini mencakup penentuan jumlah mikroorganisme yang diperbolehkan dan untuk menunjukkan tidak adanya bakteri tertentu dalam ekstrak. Pengujian cemaran bakteri dilakukan terhadap ekstrak etil asetat kulit batang *K.anthotheca* dengan metode TPC (*Total Plate Count*) dengan nilai yang diperoleh 0 koloni atau negative terdapat bakteri pada ekstrak (Tabel 3). Hal ini sesuai dengan peraturan BPOM RI No. 29 Tahun 2023 tentang Persyaratan Keamanan dan Mutu Obat Tradisional. Proses pembuatan simplisia dan ekstrak berpengaruh terhadap hasil uji cemaran mikroba.

Pengujian cemaran logam berat terhadap ekstrak etil asetat kulit batang *K.anthotheca* dilakukan terhadap timbal (Pb) dan Kadmium (Cd). Berdasarkan hasil pengukuran menggunakan metode AAS pada (Tabel 2) menunjukkan bahwa kadar cemaran logam berat timbal (Pb) 0,2976 mg/Kg, Cd $\leq 0,001$ mg/Kg. Cemaran logam berat ekstrak etil asetat kulit batang *K.anthotheca* tidak melebihi batas yang telah ditetapkan dalam parameter BPOM RI No.29 tahun 2023. Penting untuk melakukan pengujian konsentrasi logam dalam ekstrak tanaman obat sesuai dengan standar. Jika konsentrasi logam berat



dalam ekstrak melebihi batas aman, dapat menimbulkan risiko toksisitas yang berbahaya bagi kesehatan [14].

4.3 Sitotoksik MCF-7 dengan *Presto blue*

Potensi suatu ekstrak sebagai agen antikanker dapat ditentukan melalui pengujian sitotoksik in vitro pada kultur sel. Parameter yang digunakan dalam pengujian sitotoksik adalah nilai IC_{50} (*Inhibition Concentration 50%*). Nilai IC_{50} ini mencerminkan konsentrasi yang diperlukan untuk membunuh 50% dari sel-sel kanker yang diuji [19]. Uji sitotoksik yang digunakan adalah metode Presto Blue, yang merupakan metode terbaru yang telah banyak dimanfaatkan dalam penelitian antikanker. Metode ini memiliki sensitivitas tinggi dalam mengukur viabilitas sel, larut dalam air, tidak beracun, mudah menembus membran sel, serta menawarkan sensitivitas dan selektivitas yang baik dibandingkan dengan metode lainnya. Selain itu, metode ini mudah digunakan, ekonomis, memungkinkan pengujian cepat pada sampel yang besar, dan tidak menyebabkan toksisitas. Dengan demikian, metode Presto Blue ini merupakan pilihan yang komprehensif yang memperbaiki kekurangan serta memanfaatkan kelebihan dari metode-metode sebelumnya (Aslanturk, 2018; Syahputra, 2015).

1. Pengamatan Morfologi Sel MCF-7 Pasca Pemaparan Sampel Uji

Setelah inkubasi selama 48 jam, ada atau tidaknya perubahan morfologi pada sel MCF-7 digunakan untuk menilai secara kualitatif dampak paparan ekstrak *K. anthotheca* pada sel ini. Morfologi sel MCF-7 diamati, dan hasilnya (Gambar 1) menunjukkan bahwa ekstrak *K. anthotheca* memiliki dampak sitotoksik pada sel MCF-7, yang menyebabkan perubahan morfologi yang akhirnya mengakibatkan kematian sel. Efek sitotoksik, yang menyebabkan kematian sel, diduga disebabkan oleh stimulasi apoptosis dan pencegahan proliferasi sel. Teori ini telah divalidasi oleh penelitian sebelumnya, yang menemukan bahwa variasi bentuk sel terkait dengan penurunan pembelahan sel dan peningkatan pembelahan sel [21].

2. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak *K.anthotheca*

Kekuatan efek sitotoksik ditentukan dengan melakukan analisis secara kuantitatif terhadap nilai absorbansi sel MCF-7 yang diperoleh dari hasil pembacaan menggunakan *multimode reader* pada masing-masing sumuran. Nilai absorbansi yang diperoleh sangat dipengaruhi oleh perubahan warna reagen PrestoBlue, semakin banyak senyawa resorufin (semakin pekat intensitas warna merah muda) maka nilai absorbansi akan semakin besar [22]. Hasil analisis nilai absorbansi berupa persen viabilitas sel dan nilai IC_{50} digunakan sebagai dasar untuk mengevaluasi aktivitas sitotoksik ekstrak dan fraksi daun Patindis terhadap sel MCF-7.

Berdasarkan hasil penelitian (Gambar 2) menunjukkan bahwa pemaparan ekstrak *K.anthotheca* dengan berbagai konsentrasi berpengaruh terhadap proses pembelahan/pertumbuhan sel MCF-7 yang dinyatakan sebagai persen viabilitas sel. Semakin besar konsentrasi ekstrak dan fraksi yang dipaparkan terhadap sel MCF-7 maka akan meningkatkan efek kematian sel sehingga persen viabilitas sel menurun. Begitupun sebaliknya, semakin kecil konsentrasi sampel yang dipaparkan akan meningkatkan persen viabilitas sel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penurunan persen viabilitas terjadi pada sel MCF-7 yang terpapar ekstrak etil asetat kulit batang *Kanthotheca*.

Penentuan nilai IC_{50} dilakukan dengan menggunakan persamaan regresi linear antara *corrected absorbance* dan konsentrasi sampel uji. Berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh (Tabel 2) memperlihatkan bahwa ekstrak etil asetat kulit batang *K.anthotheca* 192,20 $\mu\text{g/ml}$. Menurut Sajjadi *et al.*, (2015), tingkat toksisitas suatu ekstrak terhadap sel kanker dibedakan menjadi empat kategori. Kategori toksik kuat jika nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$,



kategori toksik moderat jika nilai IC_{50} 21-200 $\mu\text{g/mL}$, kategori kurang toksik jika nilai IC_{50} 201-500 $\mu\text{g/mL}$ dan kategori tidak toksik jika nilai $IC_{50} \geq 500 \mu\text{g/mL}$.

Hal ini memperlihatkan bahwa ekstrak etil asetat kulit batang *K.anthotheca* memiliki potensi sitotoksitas dengan nilai toksik moderat. Selain itu, hasil penelitian ini juga memberikan petunjuk bahwa ekstrak etil asetat kulit batang *K.anthotheca* diduga mengandung senyawa kimia yang bertanggung jawab atas aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7. Tumbuhan *K. anthotheca* dilaporkan memiliki senyawa methyl angolensate, Limonoid 7-deacetylkhivorin, Grandifolione, limonoid gedunin, Limonoid Obacunone dan catechin. Senyawa methyl angolensate telah terbukti mencegah perkembangan tumor dengan menghambat proliferasi sel dan menginduksi jalur apoptosis intrinsik (Chiruvella et al., 2016). Limonoid gedunin dapat menghambat proliferasi sel, induksi apoptosis, dan efek pada invasi tumor dan angiogenesis (Braga et al., 2020). Obacunone telah terbukti menghambat aktivitas proliferasi sel kanker kolorektal (Luo et al., 2020). Catechin memiliki potensi untuk mencegah kanker dan menghambat aktivitas karsinogen, tumorigenesis, proliferasi, induksi apoptosis, penghentian siklus sel, metastasis, dan angiogenesis (Sari, 2019).

Penelitian ini masih terbatas pada pengujian fraksi *K.anthotheca*, merujuk dari hasil studi aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat kulit batang *K.anthotheca* yang memiliki aktivitas sedang/moderat sehingga selanjutnya dapat dilakukan studi lebih lanjut dengan mengisolasi kandungan senyawa kimia yang bertanggung atas aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 di dalam ekstrak etil asetat kulit batang *K.anthotheca* sehingga nantinya senyawa tersebut diharapkan dapat dikembangkan sebagai kandidat agen terapi kanker payudara baru.

5 KESIMPULAN

Ekstrak etil asetat kulit batang *K.anthotheca* memiliki senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, steroid, tannin, saponin dan terpenoid. Ekstrak *K.anthotheca* berdasarkan pengujian standarisasi meliputi parameter spesifik dan no-spesifik memenuhi standarisasi mutu ekstrak dan memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 dengan IC_{50} 192,20 $\mu\text{g/mL}$ (kategori toksik moderat). Dengan demikian ekstrak memiliki potensi untuk dikembangkan lebih lanjut menjadi kandidat agen terapi anti kanker payudara.

6 UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Direktorat Pembelajaran dan Kemahasiswa Ditjen DKiktiristek-Kemendikbudristek dan Universitas Mathla'ul Anwar Banten yang mendanai seluruh penelitian ini.

7 DAFTAR PUSTAKA

- [1] dr. W. Supriyanto, *Kanker Deteksi dini, Pengobatan dan Penyembuhannya*, Parama ilm. Yogyakarta, 2019.
- [2] Kemenkes RI, *Profil Kesehatan Indonesia 2021*. 2021.
- [3] Kemenkes RI, "Hasil Riset Kesehatan Dasar Tahun 2018," *Kementrian Kesehat. RI*, vol. 53, no. 9, pp. 1689–1699, 2018.
- [4] A. Hosseini and A. Ghorbani, "Cancer therapy With Phytochemicals: Evidence From Clinical Studies," *Avicenna J. phytomedicine*, vol. 5, no. 2, pp. 84–97, 2015.
- [5] R. M. Zafrial and R. Amalia, "Artikel Tinjauan : Anti Kanker Dari Tanaman Herbal," *Farmaka*, vol. 16, no. 1, pp. 15–23, 2018.
- [6] K. Chiruvella et al., "Plant-derived Tetranortriterpenoid, Methyl Angolensate



- Activates Apoptosis and Prevents Ehrlich Ascites Carcinoma Induced Tumorigenesis in Mice," *Br. J. Med. Med. Res.*, vol. 12, no. 11, pp. 1–10, 2016, doi: 10.9734/bjmmr/2016/21952.
- [7] Q. W. Zhang, L. G. Lin, and W. C. Ye, "Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review," *Chinese Med. (United Kingdom)*, vol. 13, no. 1, pp. 1–26, 2018, doi: 10.1186/s13020-018-0177-x.
- [8] X. Luo *et al.*, "Obacunone reduces inflammatory signalling and tumour occurrence in mice with chronic inflammation-induced colorectal cancer," *Pharm. Biol.*, vol. 58, no. 1, pp. 886–897, 2020, doi: 10.1080/13880209.2020.1812673.
- [9] T. M. Braga *et al.*, "Biological activities of gedunin—A limonoid from the Meliaceae family," *Molecules*, vol. 25, no. 3, pp. 9–11, 2020, doi: 10.3390/molecules25030493.
- [10] L. M. Sari, "Catechin : Molecular Mechanism of Anti-Cancer Effect," *Dentika Dent. Journa*, vol. 22, no. 1, pp. 20–25, 2019.
- [11] W. Y. Zhang, L. Qiu, Q. P. Lu, M. M. Zhou, J. Luo, and Y. Li, "Furan fragment isomerized mexicanolide-type Limonoids from the stem barks of *Khaya senegalensis*," *Phytochem. Lett.*, vol. 24, no. October 2017, pp. 110–113, 2018, doi: 10.1016/j.phytol.2018.01.020.
- [12] F. Maryam, B. Taebe, and D. P. Toding, "Pengukuran Parameter Spesifik Dan Non Spesifik Ekstrak Etanol Daun Matoa (*Pometia ponnata* J.R & G.Forst)," *J. Mandala Pharmacol Indones.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–12, 2020.
- [13] Kementerian Kesehatan RI, "Farmakope Herbal Indonesia Herbal edisi II," *Pocket Handb. Nonhum. Primate Clin. Med.*, pp. 307–310, 2017.
- [14] R. Depkes, "Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat." 2000.
- [15] C. R. Tjampakasari, A. Kiranasari, and I. Ningsih, "Microbial Contamination in Processed Food According to Indonesian National Standards and The food and Drug Supervisory Agency at The Microbiology," *Eur. J. Mol. &Clinical ...*, vol. 08, no. 03, pp. 2515–8260, 2021.
- [16] A. Najib, A. Malik, A. R. Ahmad, V. Handayani, R. A. Syarif, and R. Waris, "Standardisasi Ekstrak Air Daun Jati Belanda dan Daun Jati Hijau," *J. Fitofarmaka Indones.*, vol. 4, no. 2, pp. 241–245, 2018.
- [17] BPOM RI, "Persyaratan Keamanan dan Mutu Obat Alam," *Badan Pengawas Obat dan Makanan*, vol. 11, pp. 1–16, 2023.
- [18] H. Rosyidah, "Standardisasi Ekstrak Etil Asetat Anting-Anting (*Acalypha Indica* Linn.) Sebagai Herba Antimalaria," Universitas Islam Negeri Malang, 2016.
- [19] O. S. Aslanturk, "In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages," *Intechopen*, pp. 1–17, 2018.
- [20] G. Syahputra, "Resazurin si indikator aktivitas sel," *Bio Trends*, vol. 6, no. 2, pp. 26–28, 2015.
- [21] E. Rachmawati, S. Karyono, and H. Suyuti, "Efek Ekstrak Etanolik Daun Sirsak pada Proliferasi dan Apoptosis Sel HeLa yang Dimediasi oleh p53 The Effect of *Annona Muricata* Leaf on Proliferation and Apoptosis of HeLa Cells Mediated by p53," *J. Kedokt. Brawijaya*, vol. 27, no. 1, pp. 28–33, 2012.
- [22] R. Csepregi *et al.*, "Complex formation of resorufin and resazurin with β -cyclodextrins: Can cyclodextrins interfere with a resazurin cellviability assay?," *Molecules*, vol. 23, no. 2, pp. 3–16, 2018, doi: 10.3390/molecules23020382.
- [23] S. E. Sajjadi, M. Ghanadian, M. Haghghi, and L. Mouhebat, "Cytotoxic effect of *Cousinia verbascifolia* Bunge against OVCAR-3 and HT-29 cancer cells," *J. HerbMed Pharmacol.*, vol. 4, no. 1, pp. 15–19, 2015.

