

Cytotoxic Activity of *Eugenia polyantha* Wight Leaves Extract, Purified Extract and Ethyl Acetate Fraction in T47D and Determination of Flavonoid Levels

Devi Nisa Hidayati ✉, Intan Meyta Parusiza, Nisa Fauzizah

Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim, Jalan Menoreh Tengah X/22 Sampangan, Semarang, Jawa Tengah, 50236, Indonesia

Info Artikel

Diterima November 2021

Disetujui Desember 2021

Dipublikasikan Mei 2022

Keywords:

Eugenia polyantha

Purifikasi

Fraksi etil asetat

T47D

Flavonoid

Abstrak

Kanker payudara merupakan salah satu kanker dengan angka kejadian tertinggi pada perempuan di Indonesia. Ekstrak daun salam (*Eugenia polyantha* Wight) tua terbukti mengandung flavonoid sehingga memiliki aktivitas antikanker. Senyawa flavonoid tersebut dapat ditarik dengan pelarut etyl acetate. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak, ekstrak terpurifikasi, dan fraksi etil asetat daun salam tua terhadap sel kanker payudara T47D serta menyelidiki kadar flavonoid totalnya. Ekstraksi menggunakan metode maserasi pada serbuk daun salam tua dengan pelarut metanol, dilanjutkan dengan purifikasi dan fraksinasi menggunakan larutan etil asetat. Aktivitas sitotoksik menggunakan metode MTT assay. Sel T47D diberi perlakuan dengan masing-masing sampel uji seri konsentrasi 31,25; 62,5; 125; 250; 500 dan 1000 µg/mL. Absorbansi dilihat dengan ELISA reader dan dihitung persentase sel hidup untuk mendapatkan IC50. Penetapan kadar flavonoid total menggunakan larutan pembanding kuersetin dan dianalisis dengan spektrofotometer UV-Visibel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak, ekstrak terpurifikasi dan fraksi etil asetat daun salam tua memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC50 masing-masing sebesar 798,808 µg/mL; 593,826 µg/mL dan 171,946 µg/mL. Sedangkan kadar flavonoid total berturut-turut yaitu 1,60 mgQE/g; 9,3 mgQE/g dan 5,27 mgQE/g.

Abstract

Breast cancer is one of the cancers with the highest incidence in women in Indonesia. Old bay leaf extract (*Eugenia polyantha* Wight) has been proven to contain flavonoids so that it has anticancer activity. The flavonoid compounds can be extracted with ethyl acetate as solvent. The purpose of this study was to determine the cytotoxic activity of extracts, purified extracts, and the ethyl acetate fraction of old bay leaves against T47D breast cancer cells and to investigate their total flavonoid levels. Extraction using maceration method on old *Eugenia polyantha* Wight powder with methanol solvent, followed by purification and fractionation using ethyl acetate solvent. Cytotoxic activity using the MTT assay method. T47D cells were treated with each test sample with concentration of 31.25; 62.5; 125; 250; 500 and 1000 µg/mL. The absorbance was seen with an ELISA reader and viability cells (%) were calculated to obtain IC₅₀. Determination of flavonoid levels with quercetin and analyzed by UV-Visible spectrophotometry. The result showed that the extract, purified extract, and ethyl acetate fraction of old *Eugenia polyantha* Wight had a cytotoxic activity with IC₅₀ values of 798.808 g/mL; 593.826 g/mL, and 171.946 g/mL, respectively. Meanwhile, the flavonoid levels were 1.60 mgQE/g, 9.3 mgQE/g, and 5.27 mgQE/g, respectively.

Pendahuluan

Kanker masih menjadi penyakit penyebab utama kematian di Amerika Serikat ditandai dengan hilangnya mekanisme kontrol normal yang mengatur kelangsungan hidup sel, proliferasi, diferensiasi. Kejadian tersebut terhitung hampir 1,7 juta kasus kanker dengan perkiraan 600.000 kematian pada tahun 2016 (Dipiro, *et al.*, 2017). Kanker payudara merupakan keganasan pada jaringan payudara yang dapat berasal dari epitel duktus maupun lobulusnya. Di Indonesia, kanker payudara menjadi salah satu kanker dengan angka kejadian tertinggi pada perempuan sebesar 42,1 per 100.000 penduduk dengan rata-rata kematian 17 per 100.000 penduduk. Pengobatan untuk penyakit kanker payudara dapat dilakukan dengan pembedahan, terapi radiasi, terapi hormonal dan agen antikanker sistemik atau kemoterapi. Pengobatan pada kanker payudara selain memberikan efek terapi yang diharapkan, juga mempunyai efek yang tidak diinginkan (Kemenkes RI, 2018). Hal tersebut dapat terjadi akibat obat-obat kemoterapi yang tidak hanya menyerang sel kanker namun juga menyerang sel-sel normal yang ada ditubuh, sehingga banyak peneliti yang melakukan penelitian menggunakan bahan alam sebagai alternatif untuk pengobatan kanker (Sugiarto, 2006).

Daun salam (*Eugenia polyantha* Wight) merupakan salah satu tanaman yang sering dimanfaatkan masyarakat untuk pengobatan alternatif karena keberadaan daun salam yang sudah umum dalam masyarakat dan mudah didapatkan, sehingga mempermudah masyarakat menggunakannya sebagai obat herbal (Harismah dan Chusniatun, 2016). Menurut penelitian Wilapangga dan Sari (2018) hasil uji fitokimia ekstrak metanol daun salam positif memiliki kandungan senyawa kimia yaitu flavonoid, alkaloid, saponin, steroid, terpenoid dan tanin. Ekstrak kental daun salam mengandung flavonoid kuersetin (Kemenkes RI, 2017). Menurut Khoirunnisa dan Sumiwi (2019) senyawa flavonoid memiliki berbagai aktivitas farmakologi salah satunya yaitu dapat digunakan sebagai antikanker. Flavonoid merupakan senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D yang dapat dijadikan sebagai agen antikanker (Herlina dan Parubak, 2019). Ekstrak daun salam terbukti berpotensi sebagai antikanker terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan 4T1 (Nordi, *et al.*, 2019). Menurut Holliday dan Speirs (2011) sel kanker payudara MCF-7 dan sel T47D memiliki beberapa kesamaan dimana termasuk kedalam klasifikasi yang sama yaitu luminal A dan memiliki profil imun yang sama yaitu ER+, PR+/HER2.

Tanaman obat biasanya mengandung banyak senyawa kimia dan senyawa lainnya, sehingga perlu dilakukan pemurnian untuk mendapatkan senyawa yang lebih spesifik dengan tingkat kemurnian yang tinggi, pemurnian dapat dilakukan dengan cara purifikasi ataupun fraksinasi, dimana purifikasi merupakan proses menghilangkan atau memisahkan senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa berpengaruh pada senyawa kandungan yang dikehendaki (Ditjen POM, 1986). Purifikasi berpengaruh terhadap kadar flavonoid, dimana kadar rata-rata flavonoid total pada ekstrak terpurifikasi dengan pelarut etil asetat dari bee propolis lebah madu sebelum dan sesudah dilakukan purifikasi terdapat perbedaan. Purifikasi ekstrak bee propolis dengan pelarut etil asetat menghasilkan kadar flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol bee propolis (Puspita dan Pramono, 2015). Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan senyawa aktif dari ekstrak yang dihasilkan berdasarkan tingkat kepolarannya. Flavonoid dapat ditarik dengan pelarut etil asetat dengan proses fraksinasi menurut penelitian dari Susilowati dan Anggraini, (2018). Menurut hasil penelitian dari Tehubijuluw, *et al.*, (2018) bahwa faktor usia daun dapat mempengaruhi metabolit sekunder dan senyawa bioaktif yang dihasilkan, dimana pada daun lamun muda dan tua memiliki kadar flavonoid yang berbeda. Duval, *et al.*, (2014) menyatakan bahwa makin tua umur tanaman makin terakumulasi senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya.

Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya aktivitas sitotoksik serta kadar flavonoid total dari ekstrak, ekstrak terpurifikasi dan fraksi etil asetat daun salam tua terhadap sel kanker payudara T47D.

Metode

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu timbangan elektrik (Ohaus), almari pengering (Memmet), blender (Mapion), *moisture balance*, toples kaca, pengaduk, corong *butchner*, penguap vakum putar (Heidolph), kertas saring, *magnetic stirrer*, spektrofotometer UV-Vis 1800 (Shimadzu), inkubator CO₂ (Thermoscience), mikropipet 2-20 µL, 20-200 µL dan 200-1000 µL (Socorex), *blue tip* dan *yellow tip*, *Biosafety cabinet level 2* (Esco airstream), tabung reaksi, rak tabung kecil, pipet Pasteur steril, mikroskop *inverted* (Magnus), *96-well plate*, *Aluminium foil*, *Conical tube*, *Centrifuge* (Hettick ebba), *Vortex* (Cleaver), *ELISA reader* (Tecan infinite) dan peralatan gelas yang umumnya digunakan di laboratorium (Iwaki dan pyrex).

Bahan utama yang digunakan yaitu daun salam yang masih segar. Daun salam diambil dari Desa Kalisidi, Kecamatan Ungaran Barat, Semarang Jawa Tengah, Indonesia. Subjek uji menggunakan sel kanker payudara T47D koleksi dari Laboratorium Kultur Sel Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas

Muhammadiyah Yogyakarta. Maserasi menggunakan pelarut metanol, purifikasi dengan pelarut etil asetat (teknis), fraksinasi menggunakan pelarut n-heksan (teknis) dan etil asetat (teknis). Uji kadar flavonoid total menggunakan pembanding kuersetin, etanol p.a, kalium asetat 1M dan pereaksi aluminium klorida ($AlCl_3$). Uji sitotoksik menggunakan medium RPMI 1640 (Gibco), PBS, FBS 10% (Rmbio), pen-strep 1% (Gibco), fungizone 0,5% (Gibco), tripsin-EDTA, larutan MTT 5 mg/ml PBS (Invitrogen thermo), larutan SDS 10% dalam HCl 0,01 N sebagai larutan *stopper*.

Pengumpulan bahan dan determinasi tanaman

Daun salam diambil dari Desa Kalisidi, Kecamatan Ungaran Barat, Semarang Jawa Tengah, Indonesia. Proses pengambilan daun salam dilakukan pada pagi hari dengan kriteria daun yang digunakan yaitu daun salam tua dalam keadaan segar dan tidak rusak ataupun dimakan hama. Determinasi tanaman salam dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Jurusan Biologi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro Semarang.

Pembuatan serbuk daun salam

Daun tua dengan kriteria berwarna hijau tua, tekstur tebal, diambil dibawah daun muda dan dipilih daun yang belum menguning (Kemenkes RI, 2011). Daun salam dicuci bersih dengan air yang mengalir. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan debu dan pengotor lainnya yang melekat pada daun salam. Setelah proses pencucian, daun salam dikeringkan dalam almari pengering dengan suhu $50^{\circ}C$. Simplisia yang sudah kering ditandai dengan ciri yang mudah patah, mudah diremas dan tidak berjamur, kemudian dihaluskan menggunakan blender dan diukur kadar airnya menggunakan *moisture balance* dengan kadar air tidak lebih dari 10% (Depkes RI, 1989).

Pembuatan ekstrak metanol daun salam tua

Ekstrak metanol daun salam dibuat dengan perbandingan 1:10 sehingga 500 gram serbuk daun salam dilarutkan dalam 5 L pelarut metanol. Proses maserasi dilakukan selama 5 hari. Maserasi tahap I dimana 500 gram serbuk daun salam dimasukkan dalam toples kaca yang terhindar dari cahaya matahari, kemudian direndam dalam 75% dari total pelarut yang digunakan yaitu sebanyak 3.750 mL metanol, dilakukan selama 3 hari dengan 2 kali pengadukkan selama 15 menit setiap 24 jam kemudian saring dan dipisahkan filtrat dengan ampas. Maserasi tahap II dilakukan dengan merendam ampas dari maserasi tahap I dengan 25% dari total pelarut yang tersisa yaitu sebanyak 1.250 mL metanol dan dilakukan selama 2 hari kemudian dipisahkan antara filtrat dan ampas, filtrat tahap I dan tahap II digabungkan dalam satu toples (Hidayati, *et al.*, 2019). Hasil ekstraksi selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan penguap vakum putar pada suhu $50^{\circ}C$ (Ditjen POM, 1986).

Pembuatan ekstrak terpurifikasi daun salam tua

Sebanyak 20 gram ekstrak metanol daun salam diaduk dengan 400 mL air panas lalu didiamkan hingga warna air berubah menjadi hijau, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan dengan etil asetat (1:1) yaitu sebanyak 400 mL kemudian dikocok selama 1 menit. Fase etil asetat yang ada di bagian atas dipisahkan dari fase air, diulangi lagi sampai didapatkan filtrat berwarna bening. Proses yang sama dilakukan sebanyak 3 kali sehingga total ekstrak yang digunakan yaitu 60 gram dengan pelarut air panas dan etil asetat masing-masingnya sebanyak 1200 mL. Fase etil asetat yang sudah ditampung kemudian diuapkan pelarutnya dengan alat penguap vakum putar pada suhu $50^{\circ}C$ sampai diperoleh konsistensi kental yang disebut ekstrak terpurifikasi etil asetat dari daun salam (Puspitasari dan Pramono, 2015).

Pembuatan fraksi etil asetat daun salam tua

Ekstrak metanol daun salam tua diambil untuk difraksinasi, proses dimulai dari pelarut non polar yaitu n-heksan dan pelarut semi polar etil asetat. Ekstrak metanol daun salam tua diambil sebanyak 20 gram dan direplikasi 4 kali, kemudian ditambahkan 200 ml air lalu dimasukkan dalam corong pisah ditambahkan pelarut n-heksan sebanyak 200 ml (perbandingan 1:1) pengojokan dilakukan hingga terbentuk dua fase yaitu n-heksan dan air. n-heksan dan air dipisahkan, replikasi dilakukan sampai n-heksan menjadi jernih kemudian ditampung dalam erlenmeyer. Fase air ditambahkan pelarut etil asetat sebanyak 200 ml (perbandingan 1:1), dilakukan pengojokan dan dipisahkan antara dua fase yaitu air dan etil asetat. Replikasi dilakukan sampai pelarut etil asetat jernih lalu dipisahkan dua fase yaitu etil asetat dan air kemudian ditampung dalam erlenmeyer. Fraksi etil asetat dipekatkan menggunakan penguap vakum putar pada suhu $50^{\circ}C$ (Hanifa, *et al.*, 2015).

Pengujian sitotoksik ekstrak, ekstrak terpurifikasi dan fraksi etil asetat daun salam tua sebagai berikut:

Preparasi sampel uji

Sampel yang digunakan ada 3 yaitu ekstrak, ekstrak terpurifikasi dan fraksi etil asetat daun salam tua. Larutan stok dibuat 100 mg/ml dengan menimbang masing-masing sampel sebanyak 5 mg dilarutkan dalam 50 μ L DMSO, kemudian dilakukan pengenceran dengan DMSO hingga diperoleh seri konsentrasi 31,25; 62,5; 125; 250; 500; dan 1000 μ g/mL (CCRC, 2009).

Penanaman sel T47D

Penanaman sel kanker payudara T47D dilakukan dengan mengambil sel dari inkubator CO₂ dengan mengamati kondisi sel, kultur sel yang digunakan dalam kondisi 80% konfluen untuk dipanen. Setelah sel dipanen lakukan perhitungan sel, jumlah yang dibutuhkan untuk uji sitotoksik dengan metode MTT pada penelitian adalah 10.000 sel/sumuran. Selanjutnya dilakukan transfer sel ke dalam sumuran masing-masing 100 μ L. Untuk media kontrol digunakan sumuran yang kosong tanpa sel. Keadaan sel diamati dengan mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi dan dokumentasi. Sel diinkubasi selama minimal 4 jam dan maksimal 24 jam di dalam inkubator CO₂ (CCRC, 2009).

Pengujian sitotoksik

96 *well-plate* diambil dalam inkubator CO₂ dan dibawa ke BSC, kemudian dimasukkan ke sumuran masing-masing konsentrasi sampel uji yaitu ekstrak, ekstrak terpurifikasi, dan fraksi etil asetat daun salam dengan seri konsentrasi 31,25; 62,5; 125; 250; 500; dan 1000 μ g/mL sebanyak 100 μ L per sumuran, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam. Setelah diinkubasi ditambahkan 100 μ L reagen MTT ke dalam setiap sumuran termasuk kontrol media tanpa sel, kemudian diinkubasi kembali selama 2–4 jam dalam inkubator CO₂. Kondisi sel diperiksa dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan reagen *stopper* 100 μ L. Bungkus *plate* dengan kertas atau aluminium foil dan diinkubasikan di tempat gelap pada temperatur kamar selama satu malam, pembungkus *plate* dan tutup *plate* dibuka, kemudian dimasukkan ke dalam ELISA *reader*, baca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA *reader* dengan $\lambda = 600$ nm (CCRC, 2009).

Penetapan kadar flavonoid (Safitri, *et al.*, 2018) sebagai berikut.

Pembuatan larutan induk kuersetin (100 ppm), larutan induk AlCl₃ 10% dan larutan induk kalium asetat 1M

Kuersetin ditimbang sebanyak 100 mg dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga larut kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL tambahkan etanol p.a hingga tanda batas, dilakukan pengenceran 10x dengan mengambil 1 mL larutan kuersetin dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL kemudian ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas. Pembuatan larutan induk AlCl₃ dengan menimbang sebanyak 1 gram dilarutkan ke dalam 10 mL etanol p.a pada labu takar hingga tanda batas. Pembuatan larutan induk kalium asetat sebanyak 1 gram dilarutkan ke dalam 10 mL etanol p.a pada labu takar hingga tanda batas.

Pembuatan larutan induk ekstrak, ekstrak terpurifikasi, dan fraksi etil asetat daun salam

Ekstrak, ekstrak terpurifikasi dan fraksi etil asetat daun salam masing-masing ditimbang seberat 1 gram kemudian dilarutkan dengan etanol p.a. menggunakan bantuan *magnetic stirrer* dalam beaker glass 100 mL dengan kecepatan 300 ppm sampai terlarut sempurna. Larutan disaring menggunakan kertas saring ke dalam labu takar 100 mL kemudian ditambahkan menggunakan etanol p.a. sampai tanda batas.

Pembuatan seri konsentrasi kuersetin (2, 4, 6, 8, 10 dan 12 ppm)

Larutan induk 100 ppm dipipet sebanyak 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L, 500 μ L, dan 600 μ L, masing-masing larutan induk dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL dan dicukupkan dengan etanol p.a. sampai tanda batas, sehingga dihasilkan konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10 dan 12 ppm.

Penetapan panjang gelombang (λ) maksimum.

Penetapan panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan pembandingan kuersetin. Sebanyak 1000 μ L dari seri konsentrasi 6 ppm ditambahkan AlCl₃ 10% 200 μ L dan 200 μ L kalium asetat 1M, dibaca pada spektrofotometer UV-Vis dari range 400-500 nm dengan nilai absorbansi larutan antara 0,2-0,8.

Penetapan *operating time* (OT).

Penetapan *operating time* menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan pembandingan kuersetin. Sebanyak 1000 μ L dari seri konsentrasi 6 ppm ditambahkan AlCl₃ 10 % 200 μ L dan 200 μ L kalium asetat

1M, dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum dan *operating time* yang telah ditentukan yaitu pada menit 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60.

Penetapan kurva baku kuersetin

Seri konsentrasi kuersetin sebanyak 1000 µL pada masing-masing konsentrasi (2, 4, 6, 8, 10, dan 12 ppm) ditambahkan AlCl₃ 10 % sebanyak 200 µL dan 200 µL kalium asetat 1M. Absorbansi dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum dan *operating time* yang telah ditentukan. Perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

Penetapan kadar flavonoid total ekstrak, ekstrak terpurifikasi dan fraksi etil asetat daun salam

Masing-masing sampel daun salam dipipet 1000 µL, ditambahkan AlCl₃ 10% sebanyak 200 µL dan 200 µL kalium asetat 1M. Absorbansi dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum dan *operating time* yang telah diperoleh. Perlakuan dilakukan 3 kali replikasi.

Analisis Data

Analisis data uji sitotoksik

Uji sitotoksik dianalisis dengan cara melihat hasil absorbansi, kemudian dibaca dengan ELISA reader dengan panjang gelombang 600 nm, viabilitas sel (%) dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Viabilitas sel (\%)} = \frac{\text{Abs sel dengan perlakuan} - \text{Abs kontrol media}}{\text{Abs kontrol dengan media sel} - \text{abs kontrol media}} \times 100\%$$

Selanjutnya untuk mendapatkan nilai IC₅₀ dianalisis dengan persamaan regresi linier (CCRC, 2009). Nilai IC₅₀ adalah konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel, digunakan sebagai parameter sitotoksik. Kriteria sitotoksitas yang dikelompokkan menjadi tiga, yaitu sitotoksik potensial jika IC₅₀ <100 µg/ml, sitotoksik moderat jika IC₅₀ berkisar 100 µg/ml hingga 1000 µg/ml, dan tidak toksik jika IC₅₀ >1000 µg/ml (Prayong, *et al.*, 2008).

Analisis data penetapan kadar flavonoid

Penetapan kadar flavonoid dianalisis dengan membuat deret konsentrasi dari baku kuersetin kemudian dibuat persamaan kurva baku $y = \text{absorbansi}$, $x = \text{kadar kuersetin dalam mgEQ/gram}$. Absorbansi larutan uji yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier $y = bx + a$ sehingga didapatkan kadar flavonoid total ekstrak terpurifikasi etil asetat daun salam dalam mgEQ/gram (Safitri, *et al.*, 2018).

Hasil dan Pembahasan

Determinasi tanaman daun salam merupakan langkah awal dalam penelitian untuk mengidentifikasi tanaman salam yang digunakan pada penelitian ini yaitu benar *Eugenia polyantha* Wight. Tanaman daun salam dipanen pada satu pohon agar tidak terjadi variasi kandungan senyawa akibat dari lingkungan yang berbeda. Bagian tanaman yang digunakan pada penelitian ini yaitu bagian daunnya. Daun salam dipanen pada pagi hari dengan dasar bahwa kandungan senyawa berkhasiat yang ada pada tumbuhan berada dalam keadaan maksimal di pagi hari (Hernani, 2012). Daun salam basah sebanyak 4.100 gram dihasilkan daun salam kering sebanyak 2.280 gram, sehingga susut pengeringan sebesar 44,4%. Secara makroskopis hasil warna ekstrak metanol daun salam yaitu berwarna hijau pekat kehitaman dengan bau yang khas. Data berat dan rendemen ekstrak, ekstrak terpurifikasi dan fraksi etil asetat daun salam tua dapat dilihat pada tabel I.

Tabel I. Data berat dan rendemen ekstrak, ekstrak terpurifikasi dan fraksi etil asetat daun salam tua

Bahan (daun salam tua)	Berat bahan awal yang digunakan (gram)	Berat yang didapatkan (gram)	Randemen (%)
Ekstrak metanol	500 gram serbuk	127,7	25,54
Ekstrak terpurifikasi	60 gram ekstrak	16,4	27,33
Fraksi Etil asetat	80 gram ekstrak	16,4	20,50

Pembuatan fraksi etil asetat ekstrak metanol daun salam dilakukan karena menurut penelitian Fadhillah, *et al.*, (2017) pada fraksi etil asetat ekstrak daun kelubut memiliki rata-rata kadar flavonoid total lebih tinggi dibandingkan ekstrak metanolnya. Selain itu, menurut hasil penelitian Bahriul, *et al.*, (2014) makin tua umur tanaman maka akan makin terakumulasi senyawa bioaktifnya.

Penetapan kadar flavonoid total

Analisis kuantitatif senyawa flavonoid total dengan menggunakan spektrofotometri UV-Visibel dilakukan untuk mengetahui seberapa besar kadar flavonoid total yang terkandung pada ekstrak, ekstrak terpurifikasi dan fraksi etil asetat daun tua. Metode tersebut dilakukan karena senyawa flavonoid mengandung sistem aromatik sehingga menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum sinar ultraviolet dan spektrum sinar tampak (Harborne, 1987). Penetapan kadar flavonoid total pada penelitian ini menggunakan pembanding kuersetin, dimana merupakan jenis flavonoid yang terdapat dalam daun salam (Kemenkes RI, 2017). Reagen $AlCl_3$ dapat menyebabkan reaksi kompleks dengan flavonoid yang ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi lebih kuning dikarenakan pergeseran panjang gelombang ke arah visibel (tampak) (Suharyanto dan Prima, 2020). Penetapan kadar flavonoid total juga memanfaatkan kalium asetat yang bertujuan untuk mempertahankan panjang gelombang pada daerah visibel (tampak) (Chang, 2002). Hasil penetapan kadar flavonoid ekstrak, ekstrak terpurifikasi dan fraksi etil asetat daun salam tua dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil penetapan kadar flavonoid ekstrak, ekstrak terpurifikasi dan fraksi etil asetat daun salam tua.

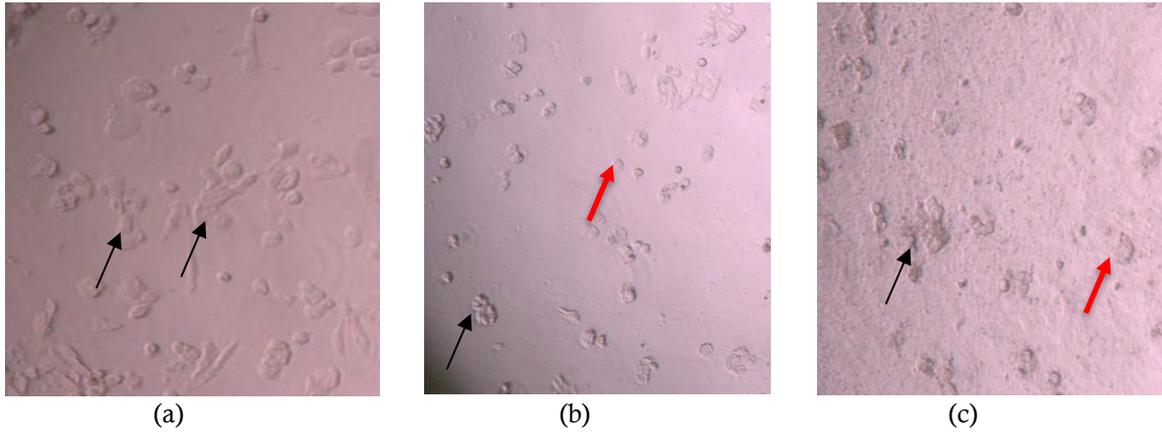
Sampel Uji	Kadar flavonoid (mgQE/gram ekstrak) (3 replikasi)	Rata-rata kadar	
		(mgQE/gram ekstrak)	
Ekstrak metanol daun salam tua	1,86	1,60 ± 0,25	0,160 ± 0,025
	1,36		
	1,60		
Ekstrak terpurifikasi	8,629	9,3 ± 0,83	0,93 ± 0,083 %
	9,031		
	10,24		
Fraksi etil asetat ekstrak metanol daun salam tua	5,14	5,27 ± 0,13	0,527 ± 0,013
	5,26		
	5,40		

Hasil penetapan kadar ekstrak metanol daun salam tua memperlihatkan kadar flavonoid yang lebih kecil apabila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya oleh Rivai, *et al.*, (2019) yang menyatakan bahwa ekstrak daun salam mengandung kadar flavonoid total sebesar 0,512%. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh tempat pengambilan tanaman serta usia tanaman yang digunakan (Duval, *et al.*, 2014).

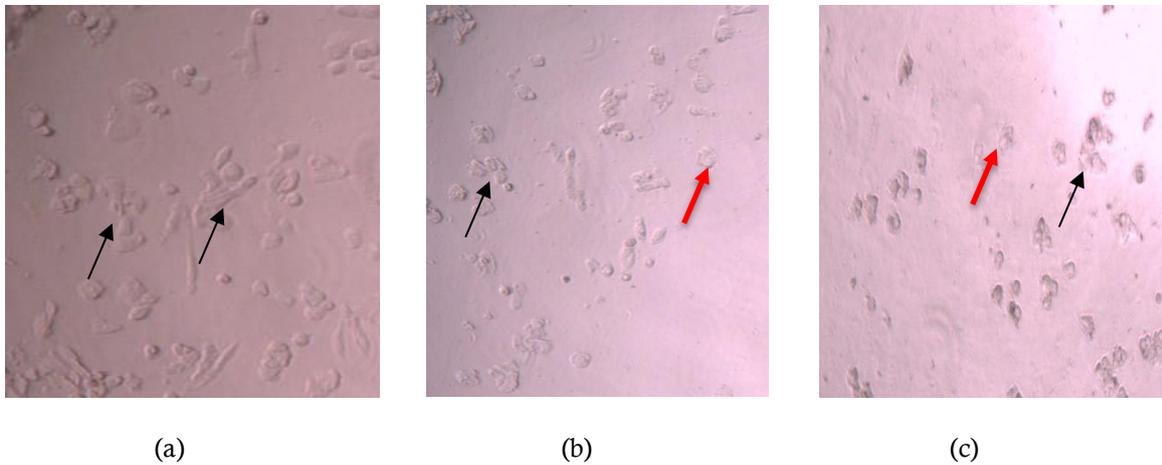
Hasil penetapan kadar flavonoid pada ketiga sampel uji yaitu ekstrak, ekstrak terpurifikasi dan fraksi etil asetat memperlihatkan kadar flavonoid pada ekstrak terpurifikasi dan fraksi etil asetat memiliki kadar yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak metanol daun salam tua. Hal ini diduga dikarenakan salah satunya yaitu proses ekstraksi menggunakan pelarut metanol dimana pelarut metanol merupakan pelarut bersifat universal yakni mampu menarik senyawa yang bersifat polar dan non polar (Kemenkes RI, 2017), sehingga metanol akan menyari senyawa non polar dan polar yang menyebabkan senyawa lain masih terkandung pada saat penetapan kadar flavonoid. Hal tersebut memperlihatkan bahwa pada proses purifikasi dan fraksinasi mampu menarik senyawa flavonoid lebih besar dibandingkan dengan ekstraksi. Proses purifikasi dikatakan mampu menghilangkan atau memisahkan senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin (Ditjen POM, 1986), sedangkan pada proses fraksinasi dengan pelarut etil asetat akan mengurangi jumlah senyawa lain seperti alkaloid dan menarik lebih banyak flavonoid (Dewi, 2007). Berdasarkan penelitian Wilapangga dan Sari (2018) ekstrak metanol daun salam mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, steroid, terpenoid dan saponin. Menurut penelitian Mar'atussolikhah (2021) fraksi etil asetat ekstrak metanol daun salam mengandung flavonoid dan steroid.

Uji Sitotoksik

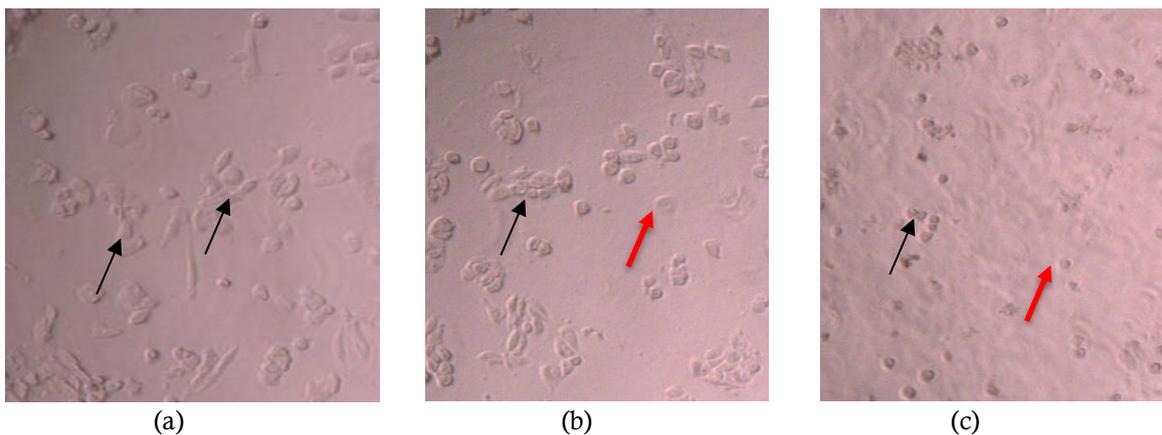
Uji sitotoksik dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui potensi aktivitas sitotoksik dari ketiga sampel uji yaitu ekstrak, ekstrak terpurifikasi dan fraksi etil asetat daun salam tua terhadap sel kanker payudara T47D. Gambar 1, 2 dan 3 memperlihatkan morfologi sel dari kontrol sel dan setelah perlakuan masing-masing sampel uji.



Gambar 1. Ekstrak metanol daun salam tua (a) kontrol sel tanpa perlakuan, (b) sel dengan perlakuan konsentrasi 31,25 µg/mL pada perbesaran 40 kali, dan (c) sel dengan perlakuan konsentrasi 500 µg/mL pada perbesaran 40 kali. —→ sel hidup, —→ sel mati



Gambar 2. Ekstrak terpurifikasi (a) kontrol sel tanpa perlakuan, (b) sel dengan perlakuan konsentrasi 31,25 µg/mL pada perbesaran 40 kali, dan (c) sel dengan perlakuan konsentrasi 500 µg/mL pada perbesaran 40 kali. —→ sel hidup, —→ sel mati.



Gambar 3. Fraksi etil asetat ekstrak metanol daun salam (a) kontrol sel tanpa perlakuan, (b) sel dengan perlakuan konsentrasi 31,25 µg/mL pada perbesaran 40 kali, dan (c) sel dengan perlakuan konsentrasi 500 µg/mL pada perbesaran 40 kali. —→ sel hidup, —→ sel mati

Intensitas warna ungu yang terbentuk menyatakan banyaknya sel aktif yang hidup karena sel aktif memetabolisme garam tetrazolium sehingga terjadi pemutusan cincin tertrazolium oleh enzim dehidrogenase yang menyebabkan tertrazolium berubah menjadi formazan (Suhendi, *et al.*, 2013). Intensitas

warna yang terbentuk kemudian ditetapkan absorbansinya dengan pembacaan ELISA *reader* (CCRC, 2009). Nilai rata-rata % viabilitas sel dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai rata-rata viabilitas sel (%) tiap konsentrasi serta nilai IC₅₀ pada ekstrak, ekstrak terpurifikasi dan fraksi etil asetat daun salam tua

Sampel Uji	Konsentrasi (µg/mL)	Rata-rata viabilitas sel (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
Ekstrak metanol daun salam tua	1000	77,50	798,808
	500	104,52	
	250	126,36	
	125	123,92	
	62,5	110,94	
	32,25	112,18	
Ekstrak terpurifikasi	1000	24,78	593,826
	500	41,70	
	250	81,00	
	125	91,91	
	62,5	85,26	
	32,25	98,21	
Fraksi etil asetat ekstrak metanol daun salam tua	1000	5,00	171,946
	500	5,97	
	250	47,93	
	125	95,61	
	62,5	103,71	
	32,25	105,14	

Berdasarkan hasil pada Tabel 3 didapatkan nilai IC₅₀ berturut-turut pada ekstrak, ekstrak terpurifikasi, dan fraksi etil asetat daun salam tua sebesar 798,808; 593,826; dan 171,946 µg/mL. Dari data nilai IC₅₀ yang didapatkan disimpulkan bahwa ketiga sampel ekstrak termasuk dalam kategori moderat karena nilai IC₅₀ berkisar antara 100 µg/mL sampai 1000 µg/mL (Prayong, *et al.*, 2008). Namun, apabila melihat hasil nilai IC₅₀ yang didapatkan maka potensi sitotoksik fraksi etil asetat daun salam tua terhadap sel T47D memperlihatkan aktivitas sitotoksik yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak dan ekstrak terpurifikasinya.

Senyawa yang diduga berperan dalam aktivitas sitotoksik yaitu flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa yang berperan sebagai antikanker dengan mekanisme yaitu menghambat kerja ekspresi protein p53 (Schafer, *et al.*, 2000). Dari hasil pengujian kadar flavonoid total ketiga senyawa uji memperlihatkan pada ekstrak terpurifikasi memiliki kadar yang lebih besar dibandingkan dengan fraksi etil asetat namun aktivitas sitotoksiknya malah lebih kecil. Hal tersebut memperlihatkan bahwa tahapan proses fraksinasi pada pengujian ini lebih baik digunakan dibandingkan dengan proses terpurifikasi jika menginginkan aktivitas sitotoksik yang lebih besar. Hasil tersebut juga memperlihatkan bahwa semakin tinggi kandungan senyawa yang diduga belum tentu menghasilkan aktivitas sitotoksik yang lebih besar. Namun, masih perlu ditelusuri terkait dengan kaitan senyawa lain yang mungkin ikut berperan dalam aktivitas sitotoksik di dalam fraksi etil asetat daun salam tua sehingga mengakibatkan aktivitasnya lebih tinggi.

Simpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak, ekstrak terpurifikasi dan fraksi etil asetat daun salam tua memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC₅₀ masing-masing sebesar 798,808 µg/mL; 593,826 µg/mL dan 171,946 µg/mL. Sedangkan kadar flavonoid total berturut-turut yaitu 1,60 mgQE/g; 9,3 mgQE/g dan 5,27 mgQE/g

Daftar Referensi

- Bahriul, P., Rahman, N., & Diah, A.W.M. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) Dengan Menggunakan 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil. *Jurnal Akademika Kimia*, 3: 144 – 149.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., & Chern, J.C. 2002. Estimation Of Total Flavonoid Content In Propolis By Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal Of Food And Drug Analysis*, 10: 178 – 182.

- CCRC. 2009. *Standar Operating Procedure*. Cancer Chemoprevention Research Cancer. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1989. *Material Medika Indonesia Jilid V*. Depkes RI. Jakarta.
- Dewi, A.S. 2007. Uji Antioksidan Fraksi Etil Asetat Dan Fraksi Air Ekstrak Etanol Teh Hijau Melalui Penangkapan Radikal Hidroksil Dengan Metode Deoksiribosa. *Skripsi*. Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
- Dipiro, J. T., Tolbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G., & Posey, L. M. 2017. *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*. Edisi X dalam Shord, S. S., & Cordes, L. M., *Cancer Treatment And Chemotherapy*. McGraw-Hill Education.
- Ditjen POM., 1986, *Sediaan Galenik*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Duval, R.E., Clarot, I., Carbonnier, F.D., Fontanay, S., & Marsura, A. 2012. Interest Of Designed Cyclodextrin-tools In Gene Delivery. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 6: 360 – 369.
- Fadhillah, A., Rahmadani, A., & Rijai, L. 2017. Analisis Kadar Total Flavonoid Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kelubut (*Passiflora foetida* L.). *Pharmaceuticals*, 5: 21–29.
- Hanifa, R.A., Lukmayani, Y. & Syafnir, L. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Serta Penetapan Kadar Flavonoid Total Dari Ekstrak Dan Fraksi Daun Paitan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray), *Prosiding Penelitian SPeSIA Unisba*, 5: 164 –171.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*. Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan. ITB. Bandung.
- Harismah, K. & Chusniatun. 2016. Pemanfaatan Daun Salam (*Eugenia polyantha*) Sebagai Obat Herbal Dan Rempah Penyedap Makanan. *WARTA LPM*, 19:110–118.
- Herlina, T. & Parubak, A.S. 2019. Flavonoid Dari Kulit Batang Akway (*Drimy beccariana*, Gibbs) dan Aktivitas Sitotoksik Terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, 37:59–66.
- Hernani, T. M. 2012. *Teknologi Pascapanen Tanaman Obat*. Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, 1:1-50.
- Hidayati, D.N., Hidayati, N., Evinda, E., Fitriana, N.R., & Kusumadewi, A.P., 2019., Antibacterial activity of fractions from papaya seeds (*Carica papaya* L.) extract against *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* and the contributing compounds, *Pharmaciana*, 9, 1
- Holliday, D.A. & Speirs, V. 2011, Choosing The Right 11 Cell Line For Breast Cancer Research, *Breast Cancer Research*, 13, 215.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2011. *Pedoman Umum Panen Dan Pascapanen Tanaman Obat*. Badan Litbang Kesehatan Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional. Jakarta.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2017. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi Kedua*. Menteri Kesehatan Indonesia.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2018. *Panduan Penatalaksanaan Kanker Payudara*. Komite Penanggulangan Kanker Nasional.
- Khoirunnisa, I., & Sumiwi, S. A. 2019. Review Artikel: Peran Flavonoid Pada Berbagai Aktivitas Farmakologi, *Farmaka*, 17:131-142.
- Mar'atussolikhah. 2021. Uji Sitotoksik Beberapa Fraksi Ekstrak Metanol Daun Salam (*Eugenia polyantha* Wight) Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 Dan Kandungan Senyawa Kimianya. *Skripsi*. Universitas Wahid Hasyim. Semarang.
- Nordin, M. L., Othman, A. A., Kadir, A. A., Shaari, R., Oaman, A. Y., & Mohamed, M. 2019. Antibacterial Dan Cytotoxic Activities Of The *Syzygium polyanthum* Leaf Extract From Malaysia. *Veterinary World*. 12:236-241.
- Prayong, P., Barusrux, S., & Weerapreeyakul, N. 2008. Cytotoxic Activity Screening Of Some Indigenous. *Thai Plant Fitoterapia*. 7:598 – 601.

- Puspitasari, A. D., dan Pramono, S. 2015. Perbandingan Metode Pembuatan Ekstrak Terpurifikasi Bee Propolis Dari Lebah Madu (*Apis mellifera*) Berdasarkan Kadar Flavonoid Total Dihitung Sebagai Rutin, *Traditional Medicine Journal*. 2:76 – 81.
- Rivai, H., Yulianti, S., dan Chandra B. 2019. Analisis Kualitatif Dan Kuantitatif Dari Ekstrak Heksan, Aseton, Etanol, Dan Air Dari Daun Salam (*Syzygium polyanthum* Wight) Walp), *STIFARM Padang*, Pp, 1 – 13.
- Tehubijuluw, H., Watuguly, T., dan Tuapattinaya, P.M.J. 2018. Analisis Kadar Flavonoid Pada Teh Daun Lamun (*Enhalus acoroides*) Berdasarkan Tingkat Ketuaan Daun, *Biopendix*, 5:1 – 7.
- Safitri, I., Nuria, M.C., Puspitasari, A. D., 2018, Perbandingan Kadar Flavonoid dan Fenolik total Ekstrak Metanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) pada berbagai metode ekstraksi, *Jurnal Inovasi Teknik Kimia*, 3, 1
- Schafer, J. M., Lee, E. S., Oregan, R. M., Yao, K., dan Jordan, V.C. 2000. *Rapid Developed Of Tamoxifen-Stimulated Mutant P53 Breast Tumors (T47D) In Athimic Mice*, *Clinical Cancer Research*, 6:4373– 4380.
- Suharyanto, dan Prima, D.A.N. 2020. Penetapan Kadar Flavonoid Total Pada *Juice* Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L.) Yang Berpotensi Sebagai Hepatoprotektor Dengan Metode Spektrofotometri UV-VIS, *Cendekia Journal Of Pharmacy*, 4: 110 – 119.
- Suhendi, A., Azizah, T., Indrayudha, P., Muhtadi, dan Haryoto. 2013. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Tumbuhan Sala (*Cynometra ramiflora* Linn) Terhadap Sel HeLa, T47D Dan WiDR. *Jurnal Penelitian Sainstek*, 18:21 – 28.
- Sugiarto. 2006. Pendekatan Baru Terapi Kanker. *Medikora*: 2, 39-56.
- Wilapangga, A. dan Sari, L.P. 2018. Analisis Fitokimia Dan Antioksidan Metode DPPH Ekstrak Metanol Daun Salam (*Eugenia polyantha*). *IJOB*, 2: 19 – 24.