

SEMINAR NASIONAL SAINS DAN TEKNIK FST UNDANA (SAINSTEK-IV) Hotel Swiss-Belinn Kristal Kupang, Kupang - 25 Oktober 2019

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIKANKER EKSTRAK P-100 DARI BUAH *Eucalyptus alba*

Dodi Darmakusuma^{1,4*}, Suwari¹, Luther Kadang¹, Tengku Mohammad Ariff Raja Hussin², Amor T. Karyawati³, Hendriana L.L. Belli⁴, Ongki Haumri S. Fobia¹, Yublina Lidrawati Boru¹, Senkoen A. Manek⁴, Viktor A. Payong⁴, Leny Heliawati⁵

¹Jurusan Kimia, Universitas Nusa Cendana, Kupang, Indonesia

²Institut Pembangunan (Kesehatan) Masyarakat, UniSZA, Kuala Terengganu, Malaysia

³Jurusan Biologi, Universitas Nusa Cendana, Kupang, Indonesia

⁴Laboratorium Riset Terpadu, Universitas Nusa Cendana, Kupang, Indonesia

⁵Program Pascasarjana, Universitas Pakuan, Bogor, Indonesia

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian aktivitas antioksidan dan aktivitas antikanker ekstrak P-100 dari buah *Eucalyptus alba*. Ekstrak P-100 adalah salah satu varian ekstrak air buah *Eucalyptus alba* yang dibuat pada suhu tinggi. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi peredaman radikal bebas dan penghambatan proliferasi sel lestrai MCF-7 dari ekstrak P-100. Ekstrak P-100 dibuat dari buah *Eucalyptus alba* yang diekstraksi dengan pelarut aquadest pada temperatur 100 °C dan dikeringkan pada temperatur 80 °C hingga diperoleh ekstrak kering. Total kapasitas antioksidan ekstrak ditentukan sebagai aktivitas peredaman radikal bebas 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH). Sebagai pembanding digunakan ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 80%. Uji potensi antikanker ekstrak P-100 dilakukan dengan uji sitotoksik terhadap sel lestari tumor payudara MCF-7 sebagai sel uji dengan metode 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Total kandungan fenol ekstrak P-100 diukur secara spektroskopi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak P-100 memiliki aktivitas antioksidan ($IC_{50}=18.25$ ppm) yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol 70% ($IC_{50} = 22.18$ ppm) dan ekstrak etanol 80% ($IC_{50} = 24.53$ ppm). Ekstrak P-100 memiliki aktivitas menghambat proliferasi sel lestari tumor payudara MCF-7 sebesar 83.42% pada konsentrasi 50 ppm. Aktivitas antioksidan dan penghambatan proliferasi ekstrak P-100 diduga berkorelasi dengan kandungan fenol total. Fenol ekstrak P-100 (42.04 ± 0.17 mg of GAE/g) diketahui lebih tinggi daripada ekstrak etanol 70% (22.81 ± 0.35 mg of GAE/g) dan ekstrak etanol 80% (15.11 ± 0.13 mg of GAE/g). Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Ekstrak P-100 dari buah *Eucalyptus alba* memiliki aktivitas antioksidan dan antikanker.

Keywords: antioxidant, antikanker, *eucalyptus alba*

1. PENDAHULUAN

Provinsi Nusa Tenggara Timur (NTT) berada di wilayah semi-ringkai memiliki kekayaan sumber tumbuhan yang khas. Salah satu kekayaan khas tersebut adalah kekayaan sumberdaya hayati obat tradisional. Sumberdaya hayati obat tradisional masih lekat dengan masyarakat NTT yang menghargai kearifan lokal. Pengobatan tradisional berbasis terapi herbal menjadikan provinsi ini sebagai area potensial bagi eksplorasi sumber tumbuhan obat tradisional. Eksplorasi ini merupakan langkah awal penting dalam pengembangan obat modern di era revolusi industri 4.0.

Perkembangan ilmu pengetahuan mendorong pergeseran paradigma pengobatan penyakit menjadi upaya pencegahan penyakit. Penyakit kanker merupakan salah satu penyakit yang mendorong pergeseran paradigma ini. Pencegahan penyakit kanker berkaitan erat dengan penanganan stress oksidatif. Hal ini mendorong eksplorasi terhadap bahan alam yang memiliki aktivitas antioksidan dan sekaligus berpotensi antikanker. Salah satu tumbuhan obat asal NTT yang berpotensi sebagai bahan aktif antioksidan dan berpotensi antikanker adalah Huek (*Eucalyptus alba*). Buah tumbuhan ini telah lama digunakan oleh sebagian masyarakat di Pulau Timor untuk menyembuhkan

penyakit kanker.

Penelitian awal menunjukkan bahwa buah tumbuhan ini berpotensi dikembangkan untuk menjadi bahan aktif antioksidan berpotensi sebagai antikanker. Saat ini tengah dilakukan pengembangan bahan ekstrak dengan menggunakan berbagai metode pembuatan yang diupayakan dapat dilakukan langsung oleh masyarakat. Ekstrak P-100 adalah salah satu varian ekstrak air buah *Eucalyptus alba* yang dibuat pada suhu tinggi yang memungkinkan ekstrak dibuat dengan peralatan sederhana. Ekstrak P-100 dibuat dari buah *Eucalyptus alba* yang diekstraksi dengan pelarut aquadest pada temperatur 100 °C dan dikeringkan pada temperatur 80 °C hingga diperoleh ekstrak kering. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi peredaman radikal bebas dan penghambatan proliferasi sel lestari MCF-7 dari ekstrak P-100.

2. BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: Buah *E. alba*, ethanol, metanol, etanol, aquadest, 2,2'diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) yang diperoleh dari Sigma-Aldrich, fetal bovine serum (FBS) (sigma), penisilin, streptomisin (sigma), Dimethyl sulfoxide (DMSO), tripsin-EDTA (sigma) (tripsin 0.25%), Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Sodium Duodecyl Sulfate (SDS) and Phosphat Buffer Saline (PBS) (Invitrogen), HCl, Pereaksi Folin-Ciocalteu, NaHCO₃ (Merck) dan Sel Lestari MCF-7 (ATCC HTB 22).

Pengambilan Sampel, Pembuatan Simplisia dan Ekstraksi

Pengambilan sampel dilakukan pada bulan ulan September 2018 di daerah Amarasi Kabupaten Kupang, Provinsi Nusa Tenggara Timur. Pembuatan simplisia dan ekstraksi dilaksanakan di Laboratorium Obat-Obatan dan Pengobatan Holistik – Laboratorium Riset Terpadu Universitas Nusa Cendana. Sebanyak 500 g sampel buah Huek dikeringkan pada temperature 50 °C selama 72 jam. Simplisia buah Huek ini ditempatkan pada wadah kedap udara yang terlindung dari cahaya. Sebanyak 300 g simplisia buah dihancurkan hingga ukuran 60 mesh. Masing-masing sebanyak 100 g serbuk simplisia diekstraksi dengan teknik maserasi menggunakan 500 mL etanol 70% selama 7 hari, 500 mL etanol 80% selama 7 hari dan perebusan menggunakan 500 mL aquadest pada temperature 100°C selama 2 jam. Ekstrak dipisahkan ampas dengan cara penyaringan. Maserat etanol dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental dikering bekukan dengan menggunakan Freeze Dryer hingga diperoleh ekstrak kering etanol 70% dan ekstrak kering etanol 80%. Ekstrak air dikeringkan dengan menggunakan open pengering pada temperatur 80°C hingga diperoleh ekstrak kering air. Selanjutnya dilakukan perhitungan rasio bahan terhadap ekstrak mengadaptasi perhitungan rasio obat herbal terhadap sediaan obat herbal asli (DER_{native}) yang dikemukakan oleh Gaedcke dan Steinhoff (2003) yang dihitung dengan rumus:

$$X = [\text{Bahan(kg)} / \text{Ekstrak(kg)}] \times 1$$

Penentuan Aktivitas Antioksidan In Vitro

Penentuan aktivitas antioksidan menggunakan metode uji kapasitas total antioksidan yang mengadaptasi metode yang dikemukakan oleh Stef *et al.* (2009), Que *et al.* (2006), dan Darmakusuma *et al.* (2015). Dibuat larutan uji dengan berbagai tingkat konsentrasi. Masing-masing 2 mL larutan uji ditambahkan 2 mL larutan radikal

2,2'-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) 0,1 mM dalam methanol. Campuran diinkubasi selama 40 menit dalam kondisi tanpa cahaya. Prosedur yang sama dilakukan terhadap blanko yang berupa 2 mL larutan metanol. Parameter yang diukur adalah absorbansi pada panjang gelombang dengan serapan maksimum (± 517 nm). Berdasarkan parameter yang diukur ditentukan kapasitas antioksidan total (TAC) yang dinyatakan sebagai penghambatan radikal bebas DPPH dalam persen dihitung dengan cara :

$$\text{TACDPPH (\%)} = (\text{Ablanko} - \text{Asampel}) / \text{Ablanko} \times 100$$

Selanjutnya dibuat kurva regresi TAC vs Konsentrasi, berdasarkan kurva regresi ini ditentukan parameter IC₅₀. Larutan uji yang memiliki IC₅₀ paling rendah merupakan larutan uji dengan aktivitas antioksidan tertinggi.

Uji Potensi Antikanker In Vitro

Uji potensi antikanker ekstrak P-100 dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pusat Studi Satwa Primata IPB, Bogor. Uji potensi antikanker dilakukan dengan uji penghambat proliferasi sel lestari tumor payudara MCF-7 dengan metode 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Prosedur yang digunakan mengadaptasi metode yang dikemukakan oleh Hong, Jia dan Zhang Liping (2011). Dibuat larutan uji ekstrak dengan konsentrasi 75 ppm dalam media Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) dan disterilkan dengan penyaringan menggunakan membran filter 0.45 μm . Sebanyak 100 μl sel MCF-7 dengan konsentrasi $1,5 \times 10^4$ sel/ml dikultur pada 96 well plate dengan medium DMEM yang ditambah 10% (v/v) FBS, 100 U Penicilin dan 100 mg/mL Streptomycin pada kondisi 37°C, 5% CO₂. Larutan uji ditambahkan setelah mencapai konfluen 50% (24 jam), kemudian diinkubasi selama 72 jam. Uji MTT dilakukan dengan menambahkan 200 μl MTT (5 mg/mL), lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Kristal formajan dilarutkan dalam 0,1 N HCl dalam isopropanol dan diukur adalah serapan pada panjang gelombang 595 nm dengan menggunakan microplate reader. Selanjutnya ditentukan parameter persentase penghambatan proliferasi sel kanker.

Penentuan Total Kandungan Fenolik dalam Formula

Kandungan fenol total ekstrak ditentukan dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu yang mengadaptasi metode Asami *et. al.* (2003). Asam galat digunakan sebagai standar fenol. Disiapkan 0.2 mg/mL larutan standar asam galat dalam air suling. Dibuat seri larutan standar dengan konsentrasi 0.01 sampai 0,1 mg/mL. Sebanyak 0.5 mL larutan ekstrak dipindahkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0.25 mL pereaksi Folin-Ciocalteu 10%. Setelah 5 menit, campuran ditambahkan 0.25 mL NaHCO₃ 20% dan didiamkan pada suhu kamar. Setelah 90 menit, absorbansi dibaca pada 765 nm menggunakan spektrofotometer (Agilent cary 100). Total kandungan fenol ekstrak ditentukan berdasarkan pada plot kurva kalibrasi standar asam galat. Total kandungan fenol dari ekstrak dinyatakan sebagai mg ekuivalen asam galat /g ekstrak (mg GA /g).

3. PEMBAHASAN

Rasio obat herbal terhadap sediaan obat herbal asli

Rasio obat herbal terhadap sediaan obat herbal asli DER_{native} adalah rasio massa obat herbal (bahan awal) terhadap massa hasil sediaan obat herbal asli (ekstrak asli). Nilai DER_{native} dapat pada tabel 1 berikut:

Table 1. DER_{native} Ekstraksi buah *E. alba*

Ekstrak	DER _{native}
Ekstrak Air P-100	15.37

Ekstrak Etanol 70%	25.86
Ekstrak Etanol 80%	30.43

DER_{native}: Rasio obat herbal terhadap sediaan obat herbal asli

Berdasarkan tabel 1 diketahui bahwa ekstraksi dengan menggunakan air dan pemanasan pada temperatur 100°C selama 2 jam dan pengeringan pada 80°C menghasilkan ekstrak (P-100) lebih banyak dibandingkan ekstraksi dengan menggunakan pelarut alkohol. Hal ini menunjukkan bahwa metode ekstraksi pemanasan ini akan memberikan jumlah ekstrak lebih banyak dibandingkan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol. Metode ekstraksi pemanasan juga memerlukan waktu yang lebih singkat dibandingkan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol.

Aktivitas Antioksidan dan Aktivitas Antikanker

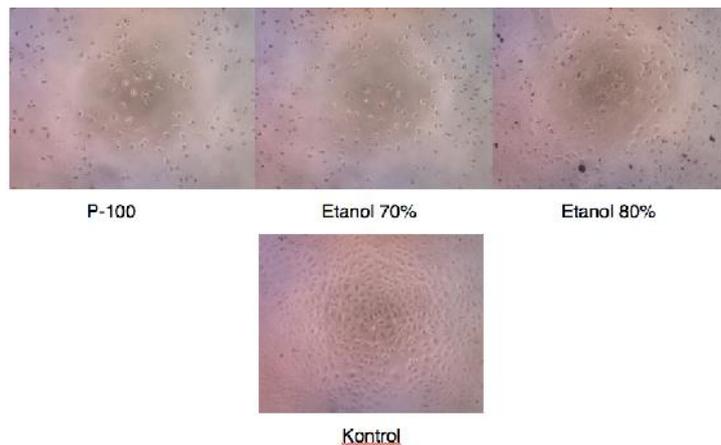
Aktivitas antioksidan ekstrak yang diuji dapat dilihat pada tabel berikut ini,

Tabel 2. Nilai IC₅₀ (ppm) aktivitas antioksidan ekstrak buah *E. alba*

Ekstrak	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak Air P-100	18.25
Ekstrak Etanol 70%	22.18
Ekstrak Etanol 80%	24.53

Berdasarkan tabel tersebut di atas diketahui bahwa ekstrak air (P-100) memiliki aktivitas antioksidan tertinggi (IC₅₀ = 18.25 ppm) dibandingkan ekstrak lainnya.

Gambar 1 berikut ini merupakan hasil fotomikrograf pengamatan terhadap sel MCF-7 menunjukkan adanya aktivitas penghambatan proliferasi ekstrak.



Gambar 1. Fotomikrograf sel MCF-7

Fotomikrograf morfologi sel MCF-7 pada gambar 1 menunjukkan bahwa jumlah sel MCF-7 pada perlakuan ekstrak lebih sedikit dibandingkan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa sel MCF-7 mengalami penghambatan proliferasi oleh perlakuan ekstrak.

Hasil penentuan aktivitas penghambatan proliferasi sel MCF-7 oleh ekstrak pada konsentrasi 75 ppm dapat dilihat pada tabel berikut ini:

Tabel 3. Aktivitas penghambatan proliferasi sel MCF-7 oleh ekstrak pada konsentrasi 75 ppm

Ekstrak	Aktivitas Penghambatan proliferasi pada 75 ppm (%)
Ekstrak Air P-100	83.42 ± 0.19
Ekstrak Etanol 70%	82.23 ± 0.33
Ekstrak Etanol 80%	81.01 ± 0.25

Berdasarkan data tabel 3 di atas, diperoleh fakta bahwa ekstrak air memiliki aktivitas penghambatan proliferasi sel MCF-7 tertinggi (83.42%) dibandingkan ekstrak lain.

Mencermati data pada tabel 2 dan 3 diketahui bahwa terdapat korelasi antara aktivitas antioksidan dan potensi antikanker ekstrak buah *E. alba*. Fakta ini merupakan suatu topik yang menarik bila dihubungkan dengan kandungan fenol total pada ekstrak. Kandungan fenol total pada ekstrak dapat dilihat pada tabel 4,

Tabel 4. Kandungan fenol total pada Ekstrak

Ekstrak	Kandungan fenol total (mg of GAE/g)
Ekstrak Air P-100	42.04 ± 0.17
Ekstrak Etanol 70%	22.81 ± 0.35
Ekstrak Etanol 80%	15.11 ± 0.13

Beberapa hasil penelitian menunjukkan adanya korelasi antara kandungan fenol total dalam suatu ekstrak dan aktivitas antioksidan (De Oliveira *et. al.*, 2012; Do *et. al.*, 2014; Hossain and Shah, 2015; Zlotek *et. al.*, 2016; Kalaycıo lu and Erim, 2017; Beta and Hwang, 2018; de Falco *et. al.*, 2018). Korelasi langsung antara kandungan fenol total dalam suatu ekstrak dan aktivitas antikanker tampaknya masih memerlukan fakta-fakta penelitian yang lebih banyak.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Ekstrak P-100 dari buah *Eucalyptus alba* memiliki aktivitas antioksidan dan antikanker. Aktivitas antioksidan dan antikanker ekstrak P-100 diduga berkorelasi erat dengan kandungan fenol total dalam ekstrak tersebut.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didukung oleh Hibah "Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi" oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Ketua Laboratoium Riset Terpadu Undana, dan Kepala LPPM Undana,.

DAFTAR PUSTAKA

Asami, D. K., Hong, Y. J., Barrett, D. M., & Mitchell, A. E. (2003). "Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices". *Journal of agricultural and food*

- chemistry*, 51(5), 1237-1241.
- Beta, T., & Hwang, T. (2018). *Influence of heat and moisture treatment on carotenoids, phenolic content, and antioxidant capacity of orange maize flour*. *Food chemistry*, 246, 58-64.
- Darmakusuma, D., Datta, F. U., Suwari, Karyawati, A. T., & Kadang, L. (2015). "Antioxidant and Anticancer Activities of Ethanolic Extract of Laportea sp Fruit. *Bull*". *Env. Pharmacol. Life Sci*, Vol 4, Hal 109-112.
- de Falco, B., Fiore, A., Rossi, R., Amato, M., & Lanzotti, V. (2018). "Metabolomics driven analysis by UAE-GC-MS and antioxidant activity of chia (*Salvia hispanica* L.) commercial and mutant seeds". *Food chemistry*, Vol 254, Hal 137-143.
- De Oliveira, A. M. F., Pinheiro, L. S., Pereira, C. K. S., Matias, W. N., Gomes, R. A., Chaves, O. S., de Assis, T. S. (2012). "Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Some Malvaceae Family Species. *Antioxidants*", 1(1), 33-43.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). "Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*". *Journal of food and drug analysis*, Vol 22(3), Hal 296-302.
- Gaedcke, Dr. Frauke, and Dr. Barbara Steinhoff. (2003). "Herbal Medicinal Products". Stuttgart : Medpharm Scientific Publishers, Hal 1-10.
- Hong, Jia dan Zhang Liping. (2011). "Screening of Anticancer Materials from Myxobacteria and Evaluation of Their Bioactivity in Vivo". *International Journal of Biology* 3(2), Hal 168-173
- Kalaycıoğlu, Z., & Erim, F. B. (2017). "Total phenolic contents, antioxidant activities, and bioactive ingredients of juices from pomegranate cultivars worldwide". *Food chemistry*, Vol 221, Hal 496-507.
- Kumari, D., Madhujith, T., & Chandrasekara, A. (2017). "Comparison of phenolic content and antioxidant activities of millet varieties grown in different locations in Sri Lanka". *Food science & nutrition*, Vol 5(3), Hal 474-485.
- Que, F., Mao, L., Zhu, C., & Xie, G. (2006). "Antioxidant properties of Chinese yellow wine, its concentrate and volatiles". *LWT-Food Science and Technology*, Vol 39(2), Hal 111-117.
- tef, D. S., Gergen, I., Tra c , T. I., Monica H rm nescu, . L., Ramona, B., & Heghedu , M. (2009). "Total antioxidant and radical scavenging capacities for different medicinal herbs". *Romanian Biotechnological Letters*, Vol 14(5), Hal 4705-4710.
- Złotek, U., Mikulska, S., Nagajek, M., & wieca, M. (2016). "The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts". *Saudi journal of biological sciences*, Vol 23(5), Hal 628-633.