

Pengujian Toksisitas Seluler SNEDDS Ekstrak Daun Kangkung (*Ipomoea reptans*, Poir) Terstandar

Lutfi Chabib^{1,2*}, Farida Hayati^{1,2}, Rizki Awaluddin³, Muh Iqbal Pangestu²

¹Prodi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta

²Prodi Profesi Apoteker, Fakultas MIPA, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta

³Program Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

* Email: lutfi.chabib@uii.ac.id

ABSTRAK

Kangkung darat (*Ipomea reptans* Poir) adalah salah satu tanaman di Indonesia yang secara empiris telah dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat untuk terapi Diabetes Melitus (DM). Riset sebelumnya telah dilakukan untuk memperoleh data ilmiah dari pemanfaatan kangkung darat sebagai terapi DM, dan pengembangannya dalam bentuk sediaan *Self Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sitotoksisitas sediaan SNEDDS ekstrak daun kangkung terstandar dengan menggunakan metode MTT (Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium). Pengujian MTT dilakukan dengan cara *well plate* diplotkan terlebih dahulu untuk sampel uji 70 sumuran (*well*), kontrol sel 6 sumuran, dan kontrol media 6 sumuran. Terakhir tiap sumuran ditambahkan *stopper* SDS sebanyak 100µl. Plate dibungkus *aluminium foil* dan diinkubasi semalaman pada suhu ruang. Hari berikutnya dilakukan pembacaan absorbansi sampel, kontrol media, dan kontrol sel menggunakan *ELISA reader*. Uji sitotoksik SNEEDS kangkung pada sel vero diperoleh hasil bahwa SNEEDS kangkung tidak menyebabkan kematian pada sel uji. Pada pengujian sel dilakukan pemaparan sampel *excipient* dari SNEEDS kangkung sebagai pembanding, dengan hasil menyebabkan kematian <50% sel uji pada dua kadar tertinggi dari sampel *excipient*. Namun pada hasil uji SNEEDS kangkung diperoleh data bahwa toksisitas *excipient* pada kadar tersebut tidak mempengaruhi timbulnya toksisitas pada sampel SNEEDS kangkung. Sehingga berdasarkan uji *in vitro*, SNEEDS kangkung tidak toksik terhadap sel vero.

Kata kunci: *Ipomoea reptans*, sitotoksisitas, SNEDDS

ABSTRACT

Kangkong (*Ipomea reptans* Poir) is a type of Indonesian plant empirically utilized by many people to treat diabetes mellitus (DM). A study has been conducted to obtain scientific data from the use of kangkung for DM treatment as well as to develop

kangkong in SNEDDS preparation. This current study aimed to examine the cytotoxicity of kangkong leaf standardized extract in SNEDDS preparation through the MTT (Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium) method. MTT assay was performed by initially plotting well plates for test sample (70 wells), control cell (6 wells), and control medium (6 wells). As much as 100µl SDS stopper was added into each well, and then plates were wrapped in aluminum foil and incubated all night at ambient temperature. On the following day, the absorbance of test sample, control medium, and control cell was identified using ELISA reader. The cytotoxicity test of kangkong SNEDDS on Vero cell lines showed that kangkong SNEDDS did not cause cell death. The cell was tested through exposure of excipient sample from kangkong SNEDDS as a comparison, resulting in <50% cell death by the two highest concentrations of excipient sample. However, the test result of kangkong SNEDDS indicated that excipient toxicity at such concentrations did not affect kangkong SNEDDS. Therefore, based on *in vitro* test, kangkong SNEDDS is not toxic against Vero cell lines.

Keywords: Ipomoea reptans, cytotoxicity, SNEDDS

I. PENDAHULUAN

Obat tradisional merupakan alternatif pengobatan hiperglikemia yang dipilih oleh masyarakat. Data WHO menyebutkan bahwa 80% populasi di Afrika dan Asia pada tataran pelayanan kesehatan primer masih bergantung pada penggunaan obat tradisional (Sahoo *et al.*, 2010). Penelitian sebelumnya telah berhasil menentukan tahapan standarisasi dari proses tanam sampai pembuatan ekstrak sehingga dapat diperoleh ekstrak yang berkualitas (Hayati *et al.*, 2014^a, 2015^a).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka kangkong memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat alternative untuk mengatasi Diabetes Melitus. Namun belum dilakukan kajian formulasi untuk mendapatkan bentuk sediaan terbaik, dan belum dilakukan studi fitokimia yang menelusuri senyawa aktif

yang berperan dalam menimbulkan efek anti DM. Salah satu metode formulasi nanoemulsi yang berupa campuran isotropik minyak, surfaktan dan ko-surfaktan yang secara cepat dan mudah membentuk nanoemulsi pada pencampuran dengan air disebut *Self Nano Emulsifying Drug Delivery system* (SNEDDS) (Patel, *et al.*, 2011). Proses *self-nano-emulsifying* terjadi secara spontan karena tidak memerlukan tambahan perlakuan atau energi dari luar. Nanoemulsi yang terbentuk biasanya memiliki ukuran 20-200 nm (Gutiérrez *et al.*, 2008). SNEDDS memiliki komponen utama berupa minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan. Minyak sebagai fase pembawa obat, surfaktan sebagai pengemulsi minyak ke dalam air, dan ko-surfaktan untuk membantu tugas surfaktan sebagai pengemulsi. Kelebihan sediaan SNEDDS,

diantaranya dapat mempercepat waktu kelarutan senyawa lipofilik, mampu mengurangi metabolisme lintas pertama di hati, dan meningkatkan absorpsi (Kyatanwar et al., 2010). Teknik ini juga relatif murah dan mudah untuk dilakukan (Azeem et al., 2009), sehingga sangat potensial untuk diaplikasikan.

Salah satu metode untuk mengetahui toksisitas sel terhadap sampel ialah dengan uji sitotoksik terhadap sel mammalia dan sejauh ini belum pernah dilakukan penelitian uji sitotoksitas ekstrak daun kangkung khususnya dalam bentuk sediaan SNEDDS. Sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak yang tidak membunuh sel. Oleh karenanya diperlukan pengujian efek sitotoksik ekstrak etanolik daun kangkung dengan metode MTT.

II. METODE

A. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : timbangan analitik, pengaduk kaca, pisau, lemari pengering, toples kaca, *Rotary Evaporator* (Heidolph- L4000), Mikropipet 200, 1000 μ L, Tabung reaksi kecil, 96-well plate, Conical tube, Yellow tip dan blue tip, incubator CO₂ dan ELISA reader. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : daun kangkung darat yang diperoleh dari daerah Dusun Turen, Desa Sardonoarjo,

Kecamatan Ngaglik, Kabupaten Sleman. Tanaman kangkung dipanen pada umur 21 hari, etanol 96% , akuabidestilata, etanol, asam nitrat, natrium klorida 0,9% Phosphat Buffer Saline 1x, Media Kultur (MK) (RPMI), DMSO, MTT 5mg/mL PBS (50 mg MTT and 10 mL PBS), SDS 10% dalam 0,1 N HCl

B. Jalannya Penelitian

Bagian ini memuat jalannya penelitian yang secara spesifik digunakan dalam penelitian. Alur kerja yang sederhana tidak perlu dibuat skema. Cara kerja yang sudah umum tidak perlu dijelaskan secara detail. Langkah penelitian yang panjang dapat dibuat dalam sub sub bab tahapan-tahapan penelitian dengan numbering angka arab.

1. Pengumpulan dan Determinasi

Tumbuhan

Tanaman kangkung darat organik dipanen dari daerah Dusun Turen, Desa Sardonoarjo, Kecamatan Ngaglik, Kabupaten Sleman pada pagi hari setelah tanaman berusia 21 hari. Pemanenan langsung menggunakan tangan yang bersih dan langsung dicuci dari sisa tanah. Pelaksanaan determinasi dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi Universitas Islam Indonesia dengan seluruh hasil pemanenan tumbuhan kangkung darat.

2. Sortasi dan Pengeringan Daun

Kangkung Darat

Tumbuhan yang telah dipanen kemudian dicuci dengan air bersih dan disortasi antara batang dan daunnya, bagian tumbuhan yang dipakai hanyalah bagian daunnya saja. Daun yang telah disortasi kemudian dirajang halus dan dikeringkan pada lemari pengering selama ± 1 hari.

3. Ekstraksi Serbuk Simplisia

Serbuk simplisia kering diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Proses ekstraksi dilakukan kurang lebih selama 12 hari dengan remaserasi pada hari ke 6. Setelah didapatkan ekstrak cair maka dapat dilakukan pemekatan ekstrak menggunakan rotary evaporator sampai didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang didapat akan digunakan untuk dilakukan uji parameter spesifik dan non spesifik.¹³

4. Pembuatan sediaan SNEDDS Ekstrak Daun Kangkung

Metode formulasi nanoemulsi yang berupa campuran isotropik minyak, surfaktan dan ko-surfaktan yang secara cepat dan mudah membentuk nanoemulsi pada pencampuran dengan air hingga terbentuk SNEDDS. Proses self-nano-emulsifying terjadi secara spontan karena tidak memerlukan tambahan perlakuan atau energi dari luar. Nanoemulsi yang terbentuk biasanya memiliki ukuran tetesan yang kecil yaitu kurang dari 100

nm. SNEDDS memiliki komponen utama berupa minyak, surfaktan, dan ko-surfaktan. Minyak sebagai fase pembawa ekstrak kangkung, surfaktan sebagai pengemulsi minyak ke dalam air, dan ko-surfaktan untuk membantu tugas surfaktan sebagai pengemulsi.

5. Pengujian sitotoksitas

Sesuai dengan protokol Uji Sitotoksitas dengan metode MTT yang dikeluarkan oleh CRCC dengan no dokumen CCRC-02-010-00

C. Analisis Data

Hasil absorbansi yang didapat dari pengujian sitotoksik digunakan untuk mengetahui persentase jumlah sel yang hidup, dengan persamaan:

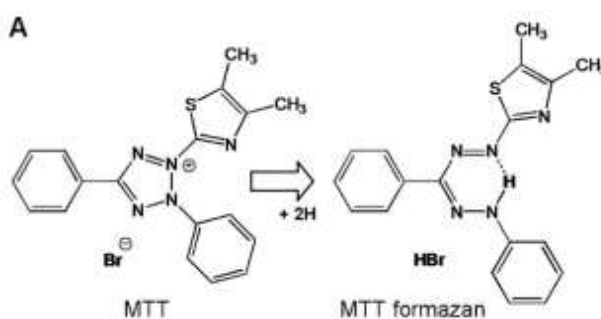
$$\% \text{ hidup} = \frac{\text{absorbansi sel dengan perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media}}{\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Persentase penghambatan sel yang diperoleh dianalisis untuk menentukan presentase viabilitas (kemampuan hidup sel) terhadap ekstrak *Centella asiatica*

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji sitotoksik SNEEDS kangkung dilakukan pada sel vero menggunakan metode Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium (MTT). Uji sitotoksik merupakan

pengujian kemampuan suatu senyawa mengakibatkan toksisitas pada sel uji. Metode MTT menjadi salah satu metode uji sitotoksik yang sering dilakukan karena prosedurnya yang relatif sederhana. Metode MTT dapat menilai toksisitas suatu senyawa terhadap sel dengan cara reagen MTT yang berwarna kuning mereduksi enzim mitokondria dehidrogenase pada sel yang masih hidup, sehingga hasil reduksi tersebut menghasilkan kristal formazan yang berwarna ungu. Jika diperoleh hasil uji berwarna kuning, maka kemungkinan banyak sel uji yang mati akibat pemaparan sampel. Intensitas warna ungu pada hasil uji berbanding lurus dengan jumlah sel yang masih hidup.

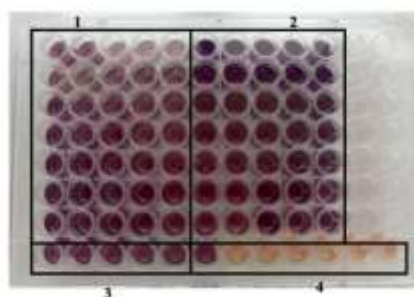


Gambar 1. Reaksi MTT⁽¹⁾

Pengujian MTT dilakukan dengan cara *well plate* diplokan terlebih dahulu untuk sampel uji 70 sumuran (*well*), kontrol sel 6 sumuran, dan kontrol media 6 sumuran. Sumuran untuk sampel ekstrak dan kontrol sel dibuat dengan menumbuhkan sel dalam

plate sebanyak 10^4 sel vero tiap *well*, sedangkan untuk kontrol media hanya diisi dengan media kultur. *Well plate* diinkubasi selama 24 jam. Media kultur M199 untuk sel vero yang telah dicampur dengan sampel ekstrak ditambahkan pada setiap *well* sampel uji sebanyak 100 μ l, kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam. Seluruh media pada *plate* dibuang kemudian ditambahkan 100 μ l reagen MTT pada tiap sumuran, diinkubasi selama 4 jam. Terakhir tiap sumuran ditambahkan *stopper* SDS sebanyak 100 μ l. *Plate* dibungkus *aluminium foil* dan diinkubasi semalaman pada suhu ruang. Hari berikutnya dilakukan pembacaan absorbansi sampel, kontrol media, dan kontrol sel menggunakan *ELISA reader*. Hasil absorbansi yang didapat digunakan untuk mengetahui persentase jumlah sel yang hidup, dengan persamaan:

$$\% \text{ hidup} = \frac{\text{absorbansi sel dengan perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media}}{\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$



Gambar 2. Hasil pengamatan *plate* hasil uji MTT pada sel vero : 1) Excipient, 2)SNEDDS ekstrak daun kangkung, 3) Kontrol Sel, 4) Kontrol Media

Uji sitotoksik SNEEDS kangkung pada sel vero diperoleh hasil bahwa SNEEDS kangkung tidak menyebabkan kematian pada sel uji. Pada pengujian sel dilakukan pemaparan sampel *excipient* dari SNEEDS kangkung sebagai pembanding, dengan hasil menyebabkan kematian <50% sel uji pada dua kadar tertinggi dari sampel *excipient*. Namun pada hasil uji SNEEDS kangkung diperoleh data bahwa toksisitas *excipient* pada kadar tersebut tidak mempengaruhi timbulnya toksisitas pada sampel SNEEDS kangkung. Sehingga berdasarkan uji *in vitro*, SNEEDS kangkung tidak toksik terhadap sel vero.

Tabel I. Persen hidup sel vero vs sampel uji (SNEEDS kangkung dan *excipient*)

Excipient (%)	SNEEDS (%)
66.37	287.76
87.92	291.52
134.57	313.39
129.86	265.69
170.50	230.49
187.29	159.73
172.07	132.32



Gambar 3. Sel Vero terpapar SNEEDS daun kangkung

Tabel II. Hasil pengamatan rata-rata absorbansi *excipient*, sediaan SNEEDS, dan kontrol

Kelompok	Rata-Rata % \pm SD
Eksipien	1,18 \pm 0,27
SNEEDS kangkung	0,929 \pm 0,09
Kontrol Sel	0,72 \pm 0,023
Kontrol media	0,086 \pm 0,008

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil uji sitotoksik SNEEDS ekstrak daun kangkung kangkung tidak menunjukkan toksisitas pada sel Vero, karena tidak menyebabkan kematian pada sel vero sebagai sel uji. Bahkan, pertumbuhan kultur sel meningkat pada kelompok yang diberikan sampel. Sehingga SNEEDS ekstrak daun kangkung dapat dikembangkan pada penelitian lebih lanjut

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih penulis sampaikan kepada DRPM Kemenristekdikti yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi Tahun 2017 melalui kontrak dengan nomer 032/ST-DirDRPM/70/DPPM/Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi-PEMENRISTEK DIKTI/IV/2017

DAFTAR PUSTAKA

- Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett.* 2006;160(2):171–7.
- Hayati F, Widyarini S, Helminawati. Efek Antihiperlipidemik Infusa Kangkung Darat (*Ipomoea reptans* Poir) pada mencit jantan galur Swiss yang diinduksi Streptozotocin. *Jurnal Ilmiah Farmasi.* 2010. 7(1): 13-22
- Hayati F, Murwanti R, Ningrum LS. Acute Toxicity Test of *Ipomoea reptans*, Poir Ethanolic Extract In DDY Male Mouse. *Proceeding 1st International Pharmacy Conference on Research and Practice “Toward Excellent In Natural Products: Preserving Traditions, Embracing Innovations”.* Yogyakarta. 13-14 November 2012 : 127-131
- Jenie R.I. dan Meiyanto E. Aplikasi kemoterapi fraksi daun sambung nyawa pada sel kanker payudara mcf-7. *Majalah Ilmu Kefarmasian.* 2009;VI(3):132–41.
- Sahoo N, Manchikanti P, Dey S. Herbal Drugs: Standards and Regulation. *Fitoterapia.* 2010. 81: 462–471
- Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 2012;114(8):785–96.
- Pal SK, Shukla Y. Herbal Medicine: Current Status and The future. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 2003. 4:281-288
- Wibowo JT, Djuwarno EN, Hayati F, Prabowo H. Standardization of Kangkung (*Ipomoea reptans* Poir) Ethanolic Extract, proceeding in The 1st International Pharmacy conference on Research and Practice “Toward Excellent In Natural Product : Preserving Traditions, Embaracing Innovations”. Yogyakarta. 13-14 November . 2012 :132-136.