**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK, FRAKSI n-HEKSAN, ETIL ASETAT, DAN AIR UMBI MENTIMUN PAPASAN (*Coccinia grandis* (L.) Voigt) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D DAN ANTIANGIOGENESIS *Chorio Allantoic Membrane* (CAM) EMBRIO AYAM YANG DIINDUKSI bFGF**

**Agustinus Alfred Seran1), Jason M. Peranginangin1), Rizal M. Rukmana2)**

**1)Program Studi S2 Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta,**

**2)Program Studi Analis Kesehatan, Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Setia Budi Surakarta**

e-mail : [alfredagustinus16@gmail.com](mailto:alfredagustinus16@gmail.com) ; [Jason.merari@yahoo.com](mailto:Jason.merari@yahoo.com)

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air umbi mentimun papasan (*Cocconia grandis* (L.) Voigt). Ekstrak diperoleh melalui metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak etanol selanjutnya difraksinasi dengan metode partisi cair-cair. Fraksi yang diperoleh dilakukan analisis kualitatif dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Dari analisis KLT menunjukan bahwa terdapat beberapa golongan senyawa aktif yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan terpen. Uji sitotoksik dilakukan menggunakan sel kanker payudara T47D dan sel VERO dengan metode MTT *assay* kemudian dibaca absorbansinya pada ELISA *reader* dengan parameter pengamatan nilai IC50. Uji antiangiogenesis dilakukan menggunakan metode *Chorio Allantoic Membrane* (CAM) embrio ayam yang diinduksi protein bFGF dengan parameter pengamatan jumlah pembuluh darah baru. Hasil penelitian menunjukan bahwa ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air memiliki nilai IC50 berturut-turut adalah 500,167; 353,131; 109,975; dan 303,990 µg/mL. Fraksi etil asetat memiliki nilai IC50 paling kecil sehingga dilanjutkan ke uji antiangiogenesis. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antiangiogenesis terhadap *Chorio Allantoic Membrane* (CAM) dengan konsentrasi efektif sebesar 219,95 µg/mL ditandai dengan persentase penghambatan angiogenesis sebesar 56,78%.

**Kata Kunci**: Mentimun Papasan (*Cocconia Grandis* (L.) Voigt) Sitotoksik, T47D, Antiangiogenesis, *Chorio Allantoic Membrane* (CAM).

CYTOTOXIC ACTIVITY OF EXTRACT, n-HEKSANE, ETIL ASETAT, and THE LIQUID FRACTION OF *Coccinia grandis* (L.) Voigt) BASE TOWARDS T47D BREAST CANCER CELLS and ANTIANGIOGENESIS *Chorio Allantoic Membrane* (CAM) OF CHICKEN EMBRYO INDUCED BY bFGF.

**ABSTRACT**

This study aims to identify the cytotoxic activity of extract, n-heksane fraction, ethyl asetate fraction, and the liquid fraction of (Coccinia Grandis (L.) Voigt). The extract was extracted throught maceration method with ethanol 96% soluble. The ethanol extract was then fractionated by the liquid-liquid partition method. The fractions obtained were analyzed qualitatively by the thin layer chromatography (TLC) method. The TLC analysis shows that there are several classes of active compounds, namely alkaloids, flavonoids, tannins, saponons and terpenes. The ethanol extraction was then fractionated using the liquid-liquid extraction. The cytotoxic test was conducted using the T47D breast cancer cells and VERO cells with the MTT assay method which their absorbance were read on ELISA reader with the value of observation parameters IC50. The antiangiogenesis test was conducted using the Chorio Allantoic Membrane (CAM) method of chicken embryo induced with bFGF protein with the new blood vessels count as the observation parameters. The results showed that the extract, n-hexane fraction, ethyl acetate fraction, and water fraction had IC50 values ​​of 500.167; 353.131; 109.975; and 303.990 µg/mL, respectively. Ethyl acetate fraction has the smallest IC50 value so it is continued to the antiangiogenesis test. Ethyl acetate fraction had an antiangiogenesis activity towards Chorio Allantoic Membrane (CAM) with the effective concentration 219,95 µg/mL marked by the angiogenesis inhibitors percentage of 56,78%.

**Keywords**: *Coccinia grandis* (L.) Voigt), cytotoxic, T47D, antiangiogenesis, *Chorio Allantoic Membrane* (CAM).

**PENDAHULUAN**

penelitian terhadap penanganan kanker sekarang ini mulai diarahkan pada pengujian potensi bahan alam sebagai agen kemopreventif yang berpotensi sebagai agen pendamping kemoterapi. Tujuannya adalah untuk meningkatkan sensitifitas sel kanker serta mengurangi efek samping yang ditimbulkan oleh agen kemoterapi (Adelina *et al*., 2014).

Tanaman mentimun papasan (*Coccinia grandis* (L*.*) Voigt) merupakan salah satu tanaman asli Nusa Tenggara Timur (NTT) yang secara empiris digunakan untuk mengobati demam pada anak, mengobati gatal-gatal pada kulit, dan juga untuk mengobati atau menurunkan gula darah. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui aktivitas tanaman mentimun papasan ini, beberapa diantaranya adalah antimikroba, antidiabetes dan antikanker. Penelitian terkait kandungan kimia dari bagian-bagian tumbuhan ini juga telah dilakukan oleh (Nagare *et all*., 2015) yang mengatakan bahwa daun dan batang mengandung senyawa sitosterol, cephalandrol, cephalandrine A & B, heptacosane. Akar mengandung senyawa alkaloid, amirin sitosterol, asam karbonat, saponin, Coccinoside, flavonoid, lupeol, resin. Buah mengandung amirin asetat, sitosterol, carotene, cucurbitacin B, lycopene, lupeol, taraxerol, taraxerone. Sedangkan pada biji mengandung minyak lemak terutama ester linoleat, oleat dan asam palmitat.

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Sathees dan Muruga, 2011) dari College University Kerala India, mengatakan bahwa daun tanaman mentimun papasan memiliki aktivitas antimikroba. Penelitian lain juga telah dilakukan oleh (Munasinghe *et al*., 2011) dari Fakultas Kedokteran Universitas Kelaniya Sri Lanka dalam studi klinis dengan pemberian daun mentimun papasan pada pasien penderita diabetes melitus mengatakan bahwa kadar gula darah secara keseluruhan pada kelompok eksperimen secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Telah dilaporkan sebelumnya oleh (Churiyah dan Harran, 2010) dari Departemen Biologi Fakultas MIPA Institut Pertanian Bogor, bahwa fraksi protein bioaktif dari buah matang, buah belum matang dan akar mentimun papasan dalam uji toksisitas terhadap galur sel kanker menunjukan bahwa semua fraksi protein bioaktif dari ketiga protein yang dihasilkan, beracun pasa BSLT dengan LC50 dalam kisaran 23-32 μg/mL. Uji sitotoksik dari fraksi protein buah yang belum matang menggunakan galur sel kanker menunjukan bahwa protein ini dapat menghambat proliferasi sel hela hingga 34,4% dan sel K-562 hingga 40,98%. Selain itu penelitian lain terkait aktivitas *in vitro* dan *in vivo* terkait aktivitas antikanker juga telah dilaporkan oleh (Bhattacharya *et al*., 2011) dari Departemen Teknologi Farmasi Universitas Jadavpur India, mengatakan bahwa ekstrak etanol daun mentimun papasan pada parameter *in vitro* dan *in vivo* memiliki aktivitas antikanker terhadap sel EAC sehingga senyawa terisolasi dari ekstrak etanol dapat digunakan untuk desain rasional obat antikanker. Oleh karena itu peneliti ingin melakakuan pengujian aktivitas sitotoksik umbi tanaman mentimun papasan (*Coccinia grandis* (L.) Voigt) terhadap sel kanker T47D serta ingin megetahui efek antiangiogenik terhadap *Chorioallantoic membrane* (CAM) yang diinduksi protein bFGF.

# BAHAN DAN METODE

# Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Parasitologi Fakultas kedokteran dan laboratorium Anatomi Hewan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta pada bulan Mei - November 2019.

**Metode Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Penelitian ini dilakukan untuk melihat aktivitas sitotoksik ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air umbi mentimun papasan (*Coccinia grandis* (L.) Voigt) pada kultur sel kanker payudara T47D, dan aktivitas antiangiogenesis fraksi etil asetat terhadap *Chorio Allantoic Membrane* (CAM) embrio ayam yang diinduksi protein bFGF. Aktivitas sitotoksik dilakukan dengan metode MTT *Assay* sedangkan pengamatan angiogenesis dilakukan dengan menggunakan metode CAM.

**Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, di antaranya: alat penyari terdiri atas bejana maserasi, kain flanel, ayakan no. 40, batang pengaduk, blender, corong pisah, klem & batang statip, *moisture balance* O’haus MB23, kertas saring, eksikator, timbangan elektrik, corong Buchner, oven, evaporator dan alat gelas. Alat uji sitotoksik meliputi tangki nitrogen cair, *sentrifuge* Sigma 3K12 (B. Braun Biotech Internasional), *autoclave*, inkubator 370C aliran CO2 5% model 6200 (Napco), l*aminar air flow class II* (Labconco), spektrokolorimeter pada alat ELISA *reader* (SLT 240 ATC), *Nebauer haemocytometer* (Olympus CKX41), tabung konikal steril (Nunclone), *tissue culture flask* (Nunclone), *mikroplate* 96 sumuran (Nunclone), lampu ultraviolet, neraca elektrik (Sartorius), mikropipet 20-200 μL dan 200-1000 μL (Pipetman), mesin *vortex*, mikroskop *inverted* (Axiovert-25), *magnetic* *stirrer* dan kamera digital, pinset, gunting, minidril, dan inkubator embrio

Bahan yang digunakan adalah serbuk umbi mentimun papasan (*Coccinia grandis* (L.) Voigt) dan ekstraksi menggunakan etanol 96%, serta pelarut *n* heksana, etil asetat dan air untuk fraksinasi, sel kanker payudara *cell line*; T47D; media stok: DMEM (Gibco); media kultur sel: media DMEM (Gibco), NaHCO3,*Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% v/v (Gibco), Penisillin-Streptomisin (Penstep)2% v/v (Gibco), *Fungizone* (Amphoterisin B) 0,5% v/v (Gibco), Dimetil sulfoksida (DMSO), Tripsin 0,5%, MTT 5mg/mL dalam PBS; media pencuci sel: larutan *Phospat Buffer Saline* (PBS) pH 7,2; *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS) 10% dalam HCl 0,1 N sebagai penghenti (*stopper*), telur ayam berembrio SPF, protein bFGF, NaCl fisiologis, formalin, aquadest, alkohol, *paper disc*, paraffin cair, plastik parafilm.

**Determinasi Tanaman**

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman mentimun papasan sesuai kepustakaan dan dibuktikan di laboratorium B2P2TOOT Tawangmangu.

**Pembuatan Serbuk**

Pembuatan serbuk umbi mentimun papasan dilakukan dengan cara digiling dan diblender kemudian diayak, dan hasil berupa serbuk kering yang disimpan dalam wadah kering serta tertutup rapat, kemudian dilakukan refluks dan penetapan susut pengeringan serbuk umbi mentimun papasan.

**Pembuatan Ekstrak Etanol**

Sebanyak 500 gram serbuk umbi mentimun papasan kemudian dimasukan kedalam wadah berwarna gelap lalu ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan 1 : 10 selanjutnya direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk kemudian didiamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara disaring, dekantasi atau filtrasi. Ulangi proses penyaringan sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *vacumrotary evaporator* (suhu dijaga pada 50oC) sampai diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 2000).

**Penetapan Susut Pengeringan**

Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan metode gravimetrik. Alat yang digunakan adalah *Moisture Balance* dengan 3 kali replikasi. Caranya dengan memasukan 2 g serbuk umbi mentimun papasan dalam wadah yang sudah ditara. Wadah tersebut kemudian dimasukkan ke dalam alat *Moisture Balance.* Pengoperasian alat telah selesai jika alat tersebut berbunyi dengan ditandai adanya bunyi tertentu, kemudian catat hasil susut pengeringan (dalam satuan %). Cara yang sama diulangi 2 kali (Depkes RI, 2001).

**Penentuan Bobot Jenis**

Bobot jenis ekstrak ditentukan terhadap hasil pengenceran ekstrak 10% dalam pelarut tertentu (etanol) dengan alat piknometer. Bobot jenis ekstrak ditentukan terhadap hasil pengenceran ekstrak 10% dalam pelarut etanol dengan alat piknometer kering, bersih dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru didihkan pada suhu 250C, masukkan kedalam piknometer yang telah diisi hingga suhu 250C (Depkes RI, 2001).

**Penetapan Kadar Air**

Menimbang sebanyak 1 gram ekstrak umbi mentimun papasan kemudian dimasukan kedalam labu alas bulat pada alat *sterling-bidwell* kemudian ditambahkan xylen sebanyak 100 ml dan panaskan sampai tidak ada tetesan air lagi kemudian dilihat volume tetesan tadi dan dihitung kadarnya dalam satuan persen (Depkes RI, 2001).

**Pembuatan Fraksi**

Ekstrak etanol umbi mentimun papasan sebanyak 10 gram dilarutkan sedikit dengan air panas, kemudian dipartisi dengan air 50 ml dan pelarut n-heksana 50 ml ke dalam corong pisah diulang sebanyak 3 kali. Fraksi n-heksana merupakan filtrat yang terletak diatas dan fraksi air merupakan filtrat yang terletak dibawah. Fraksi *n*-heksana dipisahkan dari fraksi air ditampung dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu penangas 50°C. Fraksi air sisa dari fraksi n-heksana kemudian difraksinasi kembali dengan pelarut etil asetat 50 ml menggunakan corong pisah proses ini diulang sebanyak 3 kali. Fraksi etil asetat merupakan filtrat yang terletak diatas dan fraksi air terletak dibawah. Fraksi etil asetat dipisahkan dari fraksi air kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu penangas 50°C. Filtrat sisa fraksinasi dengan etil asetat adalah fraksi air, yang kemudian dikentalkan dengan penangas air sampai kental.

**Identifikasi kandungan senyawa dengan Kromarografi Lapis Tipis (KLT)**

1. **Identifikasi polifenol**

Sampel ditotolkan pada lempeng Silika Gel 60 F254. Lempeng kemudian dimasukkan ke dalam bejana jenuh berisi fase gerak etil asetat : asam formiat : toluena : air (6:1,5:3:0,5) lalu dieluasikan hingga batas, lempeng dikeringkan dan diamati di bawah sinar UV. Deteksi senyawa polifenol dilakukan dengan pereaksi FeCl3. Setelah dipanaskan selama 5 menit pada suhu 100°C akan terjadi fluoresensi hijau tua kehitaman pada UV 366 nm (Harborne, 1987).

1. **Identifikasi tanin**

Tanin diidentifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada fase diam silica gel 60 F254 dan dielusi dengan fase gerak yaitu kloroform, etil asetat dan asam formiat (0,5:9:0,5). Bercak diamati di bawah lampu UV 254 nm dengan pembanding tanin 10 mg/1 ml etanol. Hasil positif jika terjadi bercak hijau lembayung pada lempeng KLT.

1. **Identifikasi flavonoid**

Sampel ditotolkan pada lempeng Silika Gel F254. Lempeng kemudian dimasukkan ke dalam bejana jenuh berisi fase gerak etil asetat : asam formiat : asam asetat glasial : air (100:11:11:27) lalu dieluasikan hingga batas, lempeng dikeringkan dan diamati di bawah sinar UV. Deteksi senyawa flavonoid dilakukan dengan pereaksi sitroborat. Setelah dipanaskan selama 5 menit pada suhu 100°C akan terjadi fluoresensi kuning, kehijauan pada UV 366 nm (Harborne, 1987).

1. **Identifikasi alkaloid**

Sampel ditotolkan pada lempeng silika gel 60 F254, dimasukkan ke dalam bejana jenuh berisi fase gerak toluen : etil asetat : dietilamin (7:2:1), dieluasi hingga batas, diangkat dan dikeringkan, kemudian disemprot dengan pereaksi dragendorff. Senyawa alkaloid menggunakan Dragendorff memberikan warna orange atau coklat setelah dipanaskan selama 5-10 menit pada suhu 100°C. Hasil analisis menunjukkan bercak warna orange (Harborne, 1987).

**Uji Aktivitas Sitotoksik**

1. **Pembuatan media stok dan media komplit DMEM**

Media padat DMEM disiapkan, kemudian dimasukkan 950 mL *aquabidest* steril dalam gelas beker 1 liter di dalam LAF. Media bubuk dituang ke dalam *aquabidest* steril ke dalam gelas beker, aduk hingga rata. Bagian dalam pembungkus media bubuk dibilas dengan *aquabidest*, tuang cairannya kedalam gelas beker di atas. NaHCO3 ditambahkan sebanyak 2,2 gram untuk setiap liter media yang dibuat, diaduk rata. *Aquabidest* steril ditambahkan hingga volume 1 liter. Media padat dan NaHCO3 diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga semua dapat larut. *Adjusting* pH dilakukan (seharga 0,2-0,3 dibawah pH yang diinginan) dengan menambahan NaOH 1 N atau HCl 1 N. Filtrasi media dilakukan dengan menggunakan filter 0,2 mikron, tamping ke dalam botol duran 500 mL. Media diberi penanda dan simpan di kulkas dengan suhu 40C. Pembuatan media komplit DMEM dibuat dari 100 mL DMEM *stock* ditambah *Fetal Bovine Serum* (FBS) sebanyak 10%, antibiotika penisillinstreptomisin 2% dan *Fungizone* (Amphoteresin) 0,5%.

1. **Pengaktifan sel kanker payudara T47D**

Sel yang inaktif diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan dalam *water bath* (suhu 370C) kemudian vial disemprot dengan etanol 70%. Di dalam LAF, sel kanker payudara T47D dimasukkan dalam tabung sentrifuge lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, endapan yang terbentuk ditambah media komplit DMEM dengan FBS 10%. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil (2-3 buah) dan diamati di bawah mikroskop untuk memperkirakan jumlah sel. Sel hidup kelihatan bulat, jernih dan bersinar. *Flask* dimasukkan dalam inkubator beraliran CO2 5% pada suhu 370C. Setelah 24 jam, medium diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen serta jumlahnya cukup untuk penelitian.

1. **Pemanenan dan perhitungan jumlah sel**

Media dalam *tissue culture flask* dibuang lalu dicuci dengan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) kurang lebih 7 mL sebanyak 2 kali. Kemudian ditambahkan tripsin ½ dari jumlah PBS. Diinkubasi selama 3-5 menit, lalu diamati pelepasan sel dari dasar *flask* dengan mikroskop. Sel dipipet masuk ke *conical* steril, ditambah media penumbuh sebanyak 2-3 mL untuk menghentikan kerja tripsin. Sel dilakukan pencampuran dengan pipet sampai sel terlepas, kemudian diamati keadaan sel di mikroskop. Sel yang terlepas dipindahkan ke dalam tabung *conical* baru dan disisakan sedikit di dalam *flask* yang kemudian ditambahkan media kultur 2-3 mL, diresuspensikan. Suspensi sel diambil 10 μl dan dipipetkan ke hemositometer, kemudian sel dihitung di bawah mikroskop *inverted*.

1. **Treatmen sel (pemberian ekstrak dan MTT)**

Sumuran-sumuran yang berisi sel tersebut ditambahkan 100 μL larutan uji yaitu ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air yang dilarutkan dalam pelarut DMSO, sehingga diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi konsentrasi tertentu (100; 500; 250; 125; 62,5; 31,25;) μg/mL tiap sumuran. Sebagai kontrol sel digunakan sel dengan penambahan media komplit DMEM. Sebagai kontrol media digunakan hanya larutan uji media komplit DMEM. Kemudian sel tersebut diinkubasi pada inkubator CO2 5% pada suhu 370C selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media masing-masing sumuran dibuang dengan cara *microplate* dibalikkan 1800C di atas tempat buangan kemudian *plate* ditekan untuk meniriskan sisa cairan. Setelah itu, ditambahkan 100 μL MTT 0,3% dalam PBS. *Microplate* diinkubasikan kembali selama 4 jam pada inkubator CO2 5% pada suhu 370C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan berwarna ungu, sedangkan sel yang mati akan memberikan warna kuning. Untuk menghentikan reaksi antara sel dengan MTT serta melarutkan formazan maka ditambahkan 100 μL SDS 10% dalam 0,1 N HCl. *Plate* kemudian dibungkus dengan kertas aluminium foil, diinkubasikan semalaman pada suhu kamar, kemudian sel dikocok dengan *shaker* selama 10 menit. Serapan dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada alat ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Hasil uji sitotoksik berupa respon serapan dikonversikan ke dalam persen kehidupan sel dengan persamaan sebagai berikut:

Dilanjutkan analisis untuk menentukan regresi linear antara log konsentrasi sampel uji (ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air umbi mentimun papasan) *versus* persen sel hidup menggunakan *Microsoft Excel* 2010, hingga akan didapatkan persamaan: Y = a + bx

Ket: Y= log konsentrasi sampel uji

X= % viabilitas sel

Hasil antilog x dari persamaan di atas, merupakan nilai IC50. Analisis lanjutan untuk melihat adanya keefektifitasan pada ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air umbi mentimun papasan dilakukan analisis *Independent T-test* menggunakan SPSS versi 17.

**Uji Aktivitas Antiangiogenesis**

Preprasi bFGF yang digunakan sebanyak 25 mikro gram dibuat stok kadar 50 nano gram/mikro liter dengan menggunakan larutan tris-HCL 10 mM pH 7,5 kemudian diencerkan sehingga mendapatkan kadar 1 nano gram/ mikro liter. Preparasi bFGF dilakukan secara aseptis di dalam *laminar air flow.* Dosis bFGF untuk setiap telur perlakuan terinduksi adalah 10 nano gram (Sun *et al*., 2004).

Fraksi etil asetat umbi mentimun papasan dilarutkan dengan DMSO-aquades 0,8% streril untuk kemudian dibuat seri kadar dan distrerilkan menggunakan mikrofilter. Preparasi dilakukan secara aseptis didalam *laminar air flow.*

Telur ayam SPF umur 8 hari (inkubasi) segera diinkubasikan lagi dalam inkobator laboraturium pada suhu 390 C. tahap awal yaitu dengan memberi tanda pada kerabang telur yang meliputi batas ruang udara, lokasi embrio dan daerah yang akan dibuat segiempat (jendela) berukuran 1x1 cm diatas embrio. Lokasi embrio diketahui melalui *candling* pada telur. Kerabang telur pada bagian kutub yang mengandung udara dan kerabang diatas embrio disucihamakan dengan alkohol. Selanjutnya pada kedua daerah tersebut dibuat lubang kecil menggunakan sebuah *mini drill.*

Udara dari ruang udara diaspirasi atau disedot dengan bola karet sampai berpindah dari kutub ke kerabang bagian atas telur. Perlakuan ini dilakukan pada posisi horizontal di ruang gelap dan melalui *candling,* sehingga ruang udara buatan yang terbentuk diatas embrio dapat terlihat. Kerabang telur diatas embrio dipotong dengan gergaji atau (*mini drill*)*,* untuk membuat lubang segiempat dengan luas 1 cm2.. Melalui lubang ini bFGF dan larutan uji di implantasi kedalam membran korio alantois yang telah terbentuk, setelah sebelumnya telur disucihamakan lagi dan dimasukan dalam *laminar air flow* dengan posisi horizontal dengan ruang udara buatan terlentak dibagian atas. Subjek uji berupa telur yang dibagi dalam 8 kelompok. (Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 5 telur).

1. Kelompok I adalah sebagai kontrol, untuk memastikan bahwa paper disc yang digunakan sebagai pembawa tidak berpengaruh pada membran korio alantois telur ayam.
2. Kelompok II adalah telur dengan implantasi paper disc yang telah ditambahkan 10 mikro liter bFGF 1 nano gram/mikro liter, sebagai kelompok kontrol bFGF untuk melihat pengaruh induksi bFGF terhadap angiogenesis.
3. Kelompok III adalah kelompok telur dengan implantasi paper disc yang berisi 10 mikro liter bFGF 1 nano gram/mikro gram + 10 ml pelarut DMSO 0,8% sebagai control bFGF + pelarut untuk mengetahui pengaruh pelarut terhadap angiogenesis pada membrane korio allantois.
4. Kelompok IV, V, VI, merupakan kelompok telur yang digunakan untuk melihat efek penghambatan fraksi etil asetat umbi mentimun papasan terhadap angiogenesis membrane korio allantois. Telur pada kelompok ini diberi implantasi dengan variasi konsentrasi 59,987 µg/ml, 109,975 µg/ml, dan 219,950 µg/ml.
5. Telur yang sudah diberi perlakuan kemudian diinkubasi dengan kelembaban relatif 60 % selama 3 hari pada suhu 38,5-390 C. telur kemudian dimatikan dengan cara disimpan kedalam lemari es selama 24 jam dengan suhu 4-50 C dan dibuka (umur 12 hari) kemudian isi telur dikeluarkan. Telur dibuka dengan cara menggunting cangkang telur menjadi 2 bagian dari cangkang yang terdekat dengan rongga udara, setelah itu CAM yang melekat pada cangkang dicuci dengan larutan isotonis NaCl 0,9%.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Sampel** | **Berat basah (g)** | **Berat kering (g)** | **Rendemen (%)** |
| Serbuk umbi mentimun papasan | 2.100 | 1000 | 47,61 |

Langkah terakhir adalah CAM yang didapatkan diamati secara makroskopis. Hasil pengamatan makroskopis difoto dengan kamera. Parameter yang diamati dalam penelitian adalah banyaknya pembuluh darah baru atau respon angiogenesis pada CAM setelah pemberian fraksi umbi mentimun papasan. Evaluasi efek antiangiogenesis secara makroskopik dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode

Jumlah pembuluh darah baru yang terbentuk pada membran korio alantois dihitung dan diolah sehingga diperoleh persentase pertumbuhan angiogenesis, selanjutnya dihitung nilai persentase penghambatan angiogenesis dengan persamaan:

% penghambatan angiogenesis

100% - % pertumbuhan angiogenesis.

setelah diperoleh persentase pertumbuhan angiogenesis kemudian dilakukan perhitungan nilai persentase penghambatan angiogenesis dengan persamaan:

# HASIL DAN PEMBAHASAN

## **Pengumpulan bahan, pengeringan, dan pembuatan serbuk**

Umbi tanaman mentimun papasan yang akan digunakan merupakan umbi dengan ukuran besar berwarna putih dan memiliki tekstur kulit yang kasar, kemudian dilakukan sortasi kering terlebih dahulu, untuk memisahkan sampel dengan pengotor atau bagian tanaman lain yang terbawa bersama sampel. Proses pencucian bertujuan untuk menghilangkan sampel dengan tanah atau debu. Perajangan pada umbi mentimun papasan bertujuan untuk memperkecil ukuran sampel sehingga mudah untuk dilakukkan pengeringan. Proses pengeringan umbi mentimun papasan bertujuan untuk mencegah terjadinya proses kimiawi yang terjadi pada sampel dan mencegah sampel dari kerusakan akibat bakteri dan jamur. Berat sampel basah umbi mentimun papasan yang didapat dari proses sebelumnya sekitar 2100 gram, sedangkan sampel kering yang didapat setelah proses pengeringan yaitu sebanyak 1000 gram. Data perhitungan rendemen serbuk dapat dilihat pada tabel 1.

Hasil pembuatan ekstrak etanol umbi mentimun papasan dan perhitungan % rendemen ekstrak dapat dilihat pada tabel 2.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Sampel** | **Berat serbuk (g)** | **Etanol (ml)** | **Berat ekstrak (g)** | **Rendemen (%)** |
| Serbuk umbi mentimun papasan | 500 | 2500 | 97.65 | 19,53 |
| 500 | 2500 | 99.27 | 19,85 |
| **Total** | 1000 | 5000 | 196.92 | 39,38 |

Hasil penetapan kadar air ekstrak umbi Mentimun Papasan dapat dilihat pada tabel 3

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Bobot ekstrak (g)** | **Skala terbaca (ml)** | **Kadar air (%)** |
| 20 | 1,8 | 9 |
| 20 | 1,7 | 8,5 |
| 20 | 1,6 | 8 |
| **Rata-rata** | 1,7 | 8,5 |

Data hasil pembuatan fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air umbi mentimun papasan dilihat pada tabel 4.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Berat ekstrak (g)** | **Berat fraksi n-heksan (g)** | **Berat fraksi etil asetat (g)** | **Berat fraksi air (g)** |
| 40 | 10,35 | 6,21 | 12,37 |
| **% rendemen** | 25,87 | 15,52 | 30,92 |

**Hasil Pengujian Sitotoksik**

Pada penelitian ini jumlah sel kanker hidup dalam suspensi yang digunakandalam kultur adalah 99,75 x 104 sel/ml. Sedangkan jumlah sel VERO hidup dalam suspensi yang digunakandalam kultur adalah 102,5 x 104 sel/ml. Perhitungan pemanenan sel kanker payudara T47D dan sel VERO dapat dilihat pada lampiran 6. Kemudian dilakukan pengenceran suspensiuntuk mendapatkan konsentrasi sel kanker payudara T47D dan sel VERO untuk 96 sumuran dimanatiap sumuran sebanyak 100 μL/sumuran. Pada tahap kedua dilakukan *treatment*sampel menggunakan sampel uji ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air. DMSO berfungsisebagai *buffer* agar fraksi dapat larut dengan baik. Pelarut DMSO (*dimetil sulfoksida*)digunakan secara luas untuk melarutkan senyawa polar maupun non polar dan tidakbersifat toksik. Seri konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2 μg/mL. Sedangkan konsentrasi untuk fraksi-fraksi yang digunakan adalah 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,81 μg/mL, dan konsentrasi doxorubicin adalah 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 μg/mL. Nilai IC50 untuk masing-masing perlakuan ekstrak dan fraksi-fraksi terhadap sel kanker payudara T47D dan sel VERO, serta penentuan indeks selektivitas dapat dilihat pada tabel 5.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Sampel** | **Nilai IC50 (µg/ml)** | | **SI** | **Hasil** |
| **Sel Kanker T47D** | **Sel VERO** |
| **Ekstrak** | 500,167 | 377,631 | 0,75 | Kurang selektif |
| **n-Heksan** | 353,131 | 426,940 | 1,20 | Kurang selektif |
| **Etil Asetat** | 109,975 | 208,057 | 1,89 | Kurang selektif |
| **Air** | 303,990 | 542,847 | 1,78 | Kurang selektif |
| **Doxorubicin** | 16,612 | 23,330 | 1,40 | Kurang selektif |

Menurut USA National Cancer Institut mengatakan bahwa rentan nilai IC50 ≤ 20 μg/ml sangat toksik, 21-200 μg/ml moderat/cukup aktif, 201-500 μg/ml lemah/sedang, dan ≥ 500 μg/ml tidak toksik (Abdel - Hameed *et al*., 2012) Berdasarkan kriteria tersebut kelompok pengujian sitotoksik terhadap sel kanker T47D menunjukan bahwa perlakuan ekstrak termasuk dalam kategori tidak toksik, fraksi n-heksan dan fraksi air termasuk dalam kategori lemah/ sedang, fraksi etil asetat termasuk dalam kategori moderat/cukup aktif, dan pembanding doxorubicin sangat toksik. Perlakuan uji sitotosik terhadap sel Vero menunjukan bahwa fraksi air termasuk dalam kategori tidak toksik, sedangkan ekstrak, fraksi n-heksan, dan fraksi etil asetat tergolong memiliki aktivitas sitotoksik lemah dan pembanding doxorubisin termasuk dalam kategori moderat atau cukup aktif terhadap sel VERO.

Senyawa kimia pada tanaman terdapat dalam metabolit primer dan metabolit sekunder. Sebagian besar produk metabolit sekunder berfungsi sebagai agen pelindung terhadap berbagai pathogen atau molekul pengatur pertumbuhan (misalnya zat yang merangsang hormon atau menghambat pembelahan sel dan morfogenesis). Potensi obat antikanker memiliki fungsi-fungsi fisiologis, metabolit sekunder yang bekerja secara langsung pada sel kanker dengan memodulasi sehingga akan menghambat pertumbuhan sel kanker. Beberapa komponen metabolit pada tanaman yang memiliki khasiat antikanker (antitumor): aldehid, alkaloid, *annonaceous* *acetogenins*, flavonoid, glikosida, lignin, lipid, lipid (*unsaponified*), asam nukleat, fenol dan turunannya, polisakarida, protein, terpenoid, serta beberapa senyawa yang tidak teridentifikasi (Kintzios dan Barberaki, 2003).

**Uji Aktivitas Antiangiogenesis**

Uji anti angiogenesis ini dilakukan menggunakan metode yang telah dimodifikasi yaitu tidak menggunakan *gelatin sponges* sebagai pembawa sediaan uji tetapi menggunakan *paper disc* steril. Penggunaan paper disc memiliki kelemahan terutama berkaitan dengan kemampuan daya serapnya. Selain itu pengamatan terhadap pembuluh darah baru terganggu oleh adanya pembuluh darah asal dimana *paper disc* diimplankan dan adanya reaksi inflamasi non-spesifik, sehingga menyulitkan ketika dilakukan kuantifikasi respon angiogenesis. Namun modifikasi ini kemudian dikontrol dengan menambah satu variabel pada percobaan yaitu kelompok kontrol *paper disc* untuk meminimalisir kelemahan tersebut (Salamah *et al*.,2010).

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan beberapa kontrol pada variabel percobaan meliputi kontrol *paper disc*, kontrol pelarut, kontrol bFGF. Konsentrasi yang digunakan untuk kontrol bFGF dan kontrol pelarut yaitu tiap *paper disc* mengandung 10 μg/mL pelarut dan bFG.

Rata-rata pertumbuhan pembuluh darah baru pada tiap-tiap kelompok kontrol dan kelompok uji tersaji dalam diagram pada gambar 1.

Diagram di atas menunjukan jumlah rata-rata pembuluh darah pada tiap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan fraksi etil asetat umbi mentimun papasan. Terlihat jelas bahwa kontrol bFGF mempunyai pengaruh yang sangat kuat dalam menginduksi pertumbuhan pembuluh darah baru dengan jumlah rata-rata terbanyak dibandingkan dengan kontrol *paper disc* dan kontrol pelarut. Rata-rata pembuluh darah terbanyak pada kelompok bFGF kemudian mengalami penurunan saat diberi perlakuan konsentrasi larutan uji fraksi etil asetat. Hal ini dapat dikatakan bahwa fraksi etil asetat dapat menghambat pertumbuhan pembuluh darah baru pada *Membrane Chorio Allantoic* (CAM) pada konsentrasi tertentu. Semakin besar konsentrasi fraksi etil asetat yang diberikan, maka semakin sedikit jumlah pembuluh darah baru yang dihasilkan.

Peningkatan persentase penghambatan angiogenesis seperti yang tertera pada gambar diatas menunjukan bahwa setiap konsentrasi perlakuan fraksi etil asetat memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan pembuluh darah. Seiring peningkatan konsentrasi fraksi etil asetat yang diujikan, maka semakin besar pula persentase penghambatan yang dihasilkan. Hal ini dapat dikatakan bahwa kemungkinan besar beberapa golongan senyawa aktif yang terkandung dalam fraksi etil asetat memiliki aktivitas antiangiogenesis

**KESIMPULAN**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa:

1. Fraksi etil asetat umbi mentimun papasan (*Coccinia Grandis* (L). Voigt) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan kategori moderat/cukup.
2. Nilai IC50 fraksi etil asetat umbi mentimun papasan (*Coccinia Grandis* (L). Voigt terhadap sel kanker payudara T47D sebesar 109,975 μg/mL, dan 208,057 μg/mL terhadap sel VERO sehingga dinyatakan kurang selektif dengan nilai selektivitas indeks dibawah 3 yaitu sebesar 1,891.
3. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antiangiogenesis terhadap CAM embrio ayam yang diinduksi bFGF.
4. Konsentrasi efektif dari fraksi etil asetat terhadap CAM embrio ayam yang diinduksi bFGF yaitu sebesar 219,95 μg/mL.

**DAFTAR PUSTAKA**

Adelina R, Febriyanti R, Oktoberia IS, Intan PR. 2014. Ekstrak Daun *Annona muricata* Linn. sebagai Antiproliferasi terhadap Sel Hepar Tikus Terinduksi 7,12 Dimetilbenz [a] antracene (DMBA). *Jurnal Kefarmasian Indonesia.* Vol. 4. 1: 1-12.

Sajata Nagare, Deokar G.S, Nagare Rupali, Phad Nilesh. 2015. Review on coccinia grandis (L) Voigt (Ivy Gourd). *World journal of pharmaceutical research*. Vol. 4, Issue. 10, 2015. 728-743

L.Shilpa Sathees dan K. Murugan. 2011. Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt. *Indian Journal of Experimental Biology*. Vol. 49, May 2011, pp. 366-374.

M.A.A.K. Munasinghe, C. Abeysena. I.S. Yaddehige, T. Vidanapathirana, K.P.B. Piyumal. Blood sugar Lowering Effect of Coccinia grandis (L.) Voigt: Path for a New Drugs for Diabetes Mellitus. *Eksperimen Diabete Research*. Vol. 2011.

Churiyah dan Said Harran. 2010. The Bioactive Proteins of Coccinia grandis (L). Voigh Plant Parts and Their Activity on Cancer Cells Lines. *Jurnal Farmasi Sains*. Vol. 1, No. 1. April 2010.

Bolay Bhattacharya, Pinaki Pal, Asif Lalee, Dipak Kumar Mal, Amalesh Samanta. *In Vivo* and *In Vitro* anticancer activity of *Coccinia grandis* (L.) Voigt (Family: Curcubitaceae) on Swiss albino mice. *Journal of Pharmacy Research*. 2011, 4(3), 567-569.

DEPKES RI., Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2001. Invertaris Tanaman Obat. Jilid I. Jakarta: Depkes RI.

Harbone, J.B. 1987. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern menganalisis Tumbuhan. Penerbit ITB. Bandung.

Sun, X., Ding, Y., Yan, X., Wu, L., Li, Q., Ceng, N., Qiu, Y., Zhang, M., 2004, Angiogenic synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in an *in vitro* quantitative microcarrier-based three-dimensional fibrin angiogenesis system, *World J Gastroenterol* 2004; 10(17): 2524-2528.

Kintzios, S.E and Baberaki, M.G. (Eds). 2004. *Plants that fight cancer*. Washington, D.C.CRC Press 296p.

Salamah N, Sugiyanto, Hartanti MS, Hayati F. 2010. efek antiangiogenik ekstrak metanol akar pasak bumi (*eurycoma longifolia*, jack) pada membran korio alantois (cam) embrio ayam yang terinduksi bFGF. *Majalah Obat Tradisional.*15(1). 2010.