

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Peranan tanaman obat dalam pengobatan serta pencegahan penyakit di Indonesia maupun di dunia saat ini sudah semakin berkembang. Banyak produk obat-obatan herbal yang terbuat dari bahan alam memiliki jenis dan sifat kandungan yang sangat beragam. Penggunaan obat-obatan herbal di negara berkembang maupun negara maju mampu diterima dengan sangat baik (Oktora, 2006). Di Indonesia tanaman herbal seringkali dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri seperti kesehatan, kosmetik, makanan, dan lain sebagainya. Salah satu metode pengaplikasian tanaman herbal yakni dengan dijadikan sebagai obat tradisional secara turun temurun, yaitu bahan atau ramuan yang digunakan sebagai pengobatan atau penyembuhan beberapa jenis penyakit (Sambara, *et al.*, 2016). Indonesia merupakan negara yang sangat kaya akan hasil alam berupa tanaman dengan khasiatnya sebagai obat, obat herbal masih sering digunakan secara luas di berbagai lapisan masyarakat baik itu di pedesaan maupun diperkotaan dengan peran penting obat-obatan tersebut bagi kesehatan (Waruwu, *et al.*, 2020). Salah satu tanaman yang berkhasiat sebagai alternatif pengobatan di Indonesia dan telah banyak digunakan oleh masyarakat Indonesia adalah kayu manis (*Cinnamomum burmanii*).

Kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) merupakan sejenis pohon penghasil rempah – rempah dengan ciri khas rasa pedas dan berbau khas. Kayu manis terdapat di hampir seluruh wilayah di Indonesia, salah satunya kabupaten Kerinci

sebagai produsen kayu manis terbesar di dunia dengan 43% dari total produk dunia (Nurhayani dan Rosmeli, 2019). Tanaman kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) memiliki potensi yang cukup besar dalam penggunaannya sebagai tanaman obat. Menurut Kasahara and Hemmi (1986) Kandungan kulit kayu manis adalah alkaloid, flavonoid, tannin dan minyak atsiri yang terdiri dari kamfer, safrol, sineol, sitral, sitronelal, eugenol, sinamaldehyd, sinamilasetat, terpen, polifenol dan benzaldehyd. Kayu manis juga mengandung beberapa komponen flavonoid seperti quercetin dan kaempferol yang dapat berperan sebagai antioksidan (Prasad, *et al.*, 2007).

Kayu manis memiliki aktivitas sebagai antimikroba, karena mengandung senyawa aktif seperti minyak atsiri (Mursyida dan Wati, 2021). Kulit batang kayu manis mengandung 1-2% minyak atsiri (Praseptianga, *et al.*, 2018). Minyak atsiri kayu manis sangat efektif dalam menghambat pertumbuhan beberapa bakteri antara lain *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* dan *Klebsiella sp.* Penghambatan bakteri oleh minyak atsiri kayu manis ini disebabkan oleh senyawa aktif seperti sinamaldehyd dan asam sinamat (Gupta, *et al.*, 2008). Selain itu komponen minyak atsiri kayu manis juga diketahui efektif sebagai agen antifungal terhadap pertumbuhan *Candida albicans* (Harmoko, 2012).

Salah satu mekanisme toksik yang dapat disebabkan oleh sinamaldehyd adalah menghambat metabolisme energi pada sel yang akan menyebabkan sel tidak mampu beradaptasi dengan bahan ini (Adriani, dkk., 2010). Kemampuan sinamaldehyd dalam menghambat pertumbuhan koloni *Candida albicans* juga disebabkan oleh gugus bebas yaitu 3-phenyl yang dapat mengikat enzim yang ada

pada dinding sel *Candida albicans* dan juga mengikat oksigen yang dibutuhkan oleh *Candida albicans* untuk metabolisme sel. Dengan adanya ikatan tersebut maka sinamaldehyd dapat menghambat sintesis enzim pada dinding sel *Candida albicans* serta menghambat proses metabolisme *Candida albicans*, dengan demikian *Candida albicans* tersebut akan mati. Di samping itu, permeabilitas sel bakteri dan jamur juga akan meningkat dikarenakan denaturasi protein serta penurunan tegangan permukaan oleh senyawa sinamaldehyd.

Kulit batang kayu manis sebagai salah satu tanaman obat untuk dapat dikonsumsi dan terjamin keamanannya maka harus dikembangkan menjadi obat herbal terstandart dan fitofarmaka. Salah satu tahapan pengembangan obat herbal menjadi fitofarmaka adalah tahapan uji preklinik yang terdiri atas uji toksisitas yang dapat dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo* (Dewoto, 2007). Metode pengujian toksisitas *in vitro* (secara harfiah “dalam gelas”) digunakan terutama untuk mengidentifikasi bahan biologi atau kimia yang berpotensi berbahaya pada tahap awal pengembangan zat baru yang berpotensi berguna, seperti obat terapeutik, bahan kimia pertanian dan aditif makanan (Roggen, 2011). Tes yang digunakan untuk evaluasi biologis dan tes skrining yang menggunakan sel-sel jaringan secara *in vitro* ini disebut uji sitotoksitas.

Uji sitotoksitas merupakan salah satu teknik atau metode evaluasi biologi dan tes skrining yang menggunakan sel-sel jaringan *in vitro* untuk mengamati respon pertumbuhan, reproduksi dan efek morfologis sel dengan menggunakan bantuan peralatan medis (Li *et al.*, 2015). Keunggulan uji sitotoksitas *in vitro* sebagai tes skrining yaitu lebih sederhana, lebih cepat, memiliki sensitivitas

tinggi, dan menyelamatkan hewan coba dari toksisitas. Penelitian mengenai efek sitotoksitas suatu bahan atau zat tertentu menggunakan kultur sel sebagai salah satu metode yang sering digunakan. Kultur sel digunakan untuk pengujian efek biologi pada tingkat awal dari suatu material yang digunakan untuk mengetahui efek toksisitasnya (Anussavice, 2003). Penggunaan sel punca mesenkimal limbus untuk screening uji toksikologi secara *in vitro* terkait realisasi bahwa mesenchymal stem cell dapat dengan mudah diisolasi, siap diekspansi dalam kultur, dan berdiferensiasi dengan baik dibawah stimulasi yang cocok. Salah satu metode untuk menilai sitotoksitas suatu bahan adalah dengan menggunakan pereaksi 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT).

Microculture Tetrazolium (MTT) assay merupakan salah satu metode yang tepat untuk penelitian yang berhubungan dengan uji sitotoksitas suatu bahan. Dasar uji pada metode MTT assay yakni berupa jumlah pembentukan kristal formazan oleh mitokondria sel hidup yang memiliki korelasi positif dengan jumlah dan aktivitas sel, serta nilai absorbansi kolimetrinya menunjukkan aktivitas metabolik yang dilakukan oleh sel dan banyaknya sel yang masih hidup. Untuk mengukur proliferasi selular secara kuantitatif atau untuk mengukur jumlah sel yang hidup, uji menggunakan metode MTT ini sering kali digunakan (Siregar, 2000). Parameter yang umum digunakan untuk menentukan sitotoksitas adalah *Lethal Concentration* 50% (LC_{50}). Nilai LC_{50} digunakan untuk menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50%, semakin besar nilai LC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Djajanegara, dkk., 2009).

Penggunaan obat-obatan baik yang digunakan secara sistemik maupun lokal tidak boleh bersifat toksik dan tidak boleh memiliki efek merugikan terhadap tubuh manusia (Freshney, 2000). Pengembangan penggunaan minyak atsiri kulit batang kayu manis sebagai bahan obat harus dilakukan suatu uji toksisitas. Dari latar belakang permasalahan diatas maka diperlukan adanya uji sitotoksitas pada minyak atsiri kulit batang kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) terhadap sel punca mesenkimal limbus mata kelinci, sehingga dapat diketahui efek sitotoksik serta nilai LC_{50} .

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah minyak atsiri kulit batang kayu manis (*Cinnamomum burmanii* cortex) memiliki potensi sitotoksitas terhadap sel punca mesenkimal limbus mata kelinci?
2. Berapakah *Lethal Concentration* (LC_{50}) minyak atsiri kulit batang kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) terhadap sel punca mesenkimal limbus mata kelinci?

1.3 Landasan Teori

Tanaman Kayu manis merupakan tumbuhan berkayu yang umumnya dikenal sebagai tanaman penghasil rempah-rempah dan termasuk kedalam spesies dari genus *Cinnamomum* dengan famili *Lauraceae* (Syarif, 2006 dalam Yulianis, dkk., 2011). *Cinnamomum burmanii* merupakan jenis kayu manis yang berasal dari Indonesia (Inna, dkk., 2010). Kayu manis memiliki sekitar 250 spesies yang

termasuk genus *Cinnamomum* dan tersebar di beberapa negara Asia Tenggara, Cina dan Australia. Empat spesies yang utama adalah *Cinnamomum zeylanicum*, *C. loureirii*, *C. burmannii* dan *Cinnamomum aromaticum* (Bandara, 2011).

Komponen kimia terbesar pada kayu manis adalah alkohol sinamat, kumarin, asam sinamat, sinamaldehyd, antosinin dan minyak atsiri dengan kandungan gula, protein, lemak sederhana, pektin dan lainnya (Al-Dhubiab, 2012). Kandungan utama minyak atsiri kayu manis adalah senyawa sinamaldehyd dan eugenol. Penelitian Wardatun, dkk., (2017) menemukan dari 100 gr kulit kayu manis *C. burmannii* kering yang diekstraksi dengan teknik maserasi etanol 96% diperoleh sinamaldehyd sebanyak 124.14 ± 1.17 mg/g. Shan B (2007) dalam penelitiannya menyatakan, identifikasi senyawa minyak atsiri batang *C. burmannii* dengan Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) dan Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) menemukan adanya senyawa utama sinamaldehyd dan beberapa polifenol terutama proanthocyanidin dan epicatechin. Komponen mayor minyak atsiri yang terkandung pada daun *cinnamomum burmannii* adalah kumarin 13,39%, eugenol 17,62%, dan transsinamaldehyd 60,17% (Wang, *et al.*, 2009 dalam Hasan, 2011). Joshi *et al.*, (2009) dalam Yusof (2012) menyebutkan sinamaldehyd memiliki aktifitas biologi sebagai antioksidan, antivirus, antifungi dan antibakteri.

Sel punca adalah sel khusus yang mempunyai potensi dalam waktu tidak terbatas serta dapat menghasilkan berbagai jenis sel spesifik seperti halnya sel embrionik fase awal (blastomer), kemampuan tersebut dikenal sebagai daya plastisitas (Rantam, dkk., 2009). Sel punca secara efektif dapat tumbuh dan

berkembang dengan lingkungan yang tepat. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C, dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂ merupakan lingkungan yang ideal untuk pertumbuhan sel punca (Freshney, 1986). Sel punca dibagi menjadi 4 jenis yaitu sel punca embrio (*embryonic stem cell*), sel punca dewasa (*adult stem cell*), sel punca fetus (*fetal stem cell*) dan sel punca pluripotent yang diinduksi (*induced pluripotent stem cells* / iPSc) (Jusuf, 2018). Sel punca dewasa merupakan sel punca yang ditemukan di antara sel-sel lain yang telah berdiferensiasi. Sel punca ini diduga berperan dalam menjaga homeostasis jaringan. Sel punca dewasa mempunyai sifat plastis yang berarti selain berdiferensiasi menjadi sel yang sesuai dengan jaringan asalnya juga dapat berdiferensiasi menjadi sel jaringan lain. Sel punca dewasa dibedakan menjadi 2 jenis yaitu sel punca hematopoetik (*hematopoietic stem cells*) dan sel punca mesenkimal (*mesenchymal stem cells*) (Jusuf, 2018). Sel punca mesenkimal adalah sel punca multipotensi yang dapat berdiferensiasi menjadi sel tulang otot ligamen, tendon dan lemak. Ada dugaan bahwa sel punca mesenkimal bersifat pluripotensi sehingga tidak hanya dapat berubah menjadi jaringan mesodermal tetapi juga ektoderm dan endodermal. Karakteristik in vitro sel punca mesenkim yang terpenting adalah kemampuan membelah diri dalam waktu yang tak terbatas dengan fenotipe embrionik (belum berdeferensiasi), serta kemampuan untuk berproliferasi, dan berkembang (Rif'ati, 2012).

Jumlah sel per ml suspensi dapat dihitung menggunakan zat warna seperti *trypan blue*, penghitungan sel yang hidup dan sel yang tidak hidup dapat dilakukan. *Trypan blue* ini hanya bisa menembus membran pada sel yang mati.

Ketika suspensi sel dilemahkan dengan *trypan blue*, sel yang sehat akan tetap kecil dan bergerak, sedangkan sel yang rusak atau mati akan membengkak, lebih luas dan berwarna biru tua (Doyle *and* Griffiths, 2000). Menurut Chang, dkk., (2005) menyatakan pada penelitiannya penggunaan *trypan blue* dengan empat konsentrasi berbeda yaitu 0,001%, 0,01%, 0,1% dan 0,4% dan didapatkan bahwa pada batas konsentrasi tersebut tidak menimbulkan toksisitas pada sel endotel kornea. Melles dkk., (1999) juga melaporkan hasil yang cukup baik pada penggunaan *trypan blue* dengan konsentrasi 0,1%.

Haemocytometer digunakan untuk mengukur jumlah sel ukuran lebih besar atau sama dengan 3 μ m (Mahreni dan Suhenry, 2011). Haemocytometer biasa digunakan untuk menghitung banyak jenis sel, seperti perhitungan sel sperma, sel jamur, sel yeast dan untuk sel yang lainnya secara mikroskopis. Haemocytometer awalnya dirancang untuk menghitung sel darah, namun sekarang banyak digunakan untuk kepentingan mikrobiologi, digunakan untuk menentukan sel per satuan volume. Dengan menggunakan haemocytometer bisa membedakan setiap jenis sel, dan menentukan sel hidup maupun sel mati (Kistler dan Michaelis, 2000).

Penggunaan kultur sel dalam uji sitotoksitas digunakan karena efek sitotoksitas diketahui dengan cepat, lebih hemat biaya, menghindari toksisitas pada hewan, potensi otomatisasi (Li *et al.*, 2015). Pengujian menggunakan sel punca dengan jumlah kepadatan 5×10^3 merupakan jumlah yang ideal untuk pengujian pada kultur sel punca (Freshney, 1986). Uji sitotoksitas *in vitro* digunakan untuk mendefinisikan sitotoksitas basal, misalnya kemampuan

intrinsik suatu senyawa untuk menyebabkan kematian sel sebagai konsekuensi dari kerusakan fungsi seluler dasar, uji sitotoksitas juga diperlukan untuk menentukan rentang konsentrasi untuk pengujian *in vitro* lebih lanjut dan lebih rinci dan memberikan informasi yang bermakna tentang parameter seperti genotoksitas, induksi mutasi atau kematian sel terprogram (Eisenbrand, *et al.*, 2002). Sitotoksitas suatu senyawa dapat diketahui dengan beberapa metode, diantaranya yang paling banyak digunakan adalah metode MTT *assay* (Berridge, *et al.*, 2005). Ukuran yang dipakai untuk menentukan toksisitas *in vitro* adalah LC_{50} yaitu konsentrasi zat yang diberikan mematikan 50% dari sel, jumlah ini tergantung pada waktu inkubasi dengan agen (Zhang, *et al.*, 2007).

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sitotoksitas dan *Lethal Concentration* (LC_{50}) minyak atsiri kulit batang kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) terhadap sel punca mesenkimal limbus mata kelinci dengan menggunakan metode *Microculture Tetrazolium* (MTT) *assay* yang kemudian dikuantifikasi dengan spektrofotometer ELISA *reader* dengan panjang gelombang 595nm.

1.5 Manfaat Hasil Penelitian

Memberikan informasi mengenai reaksi sitotoksik dan LC_{50} minyak atsiri kulit batang kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) dengan pengujian khusus menggunakan kultur sel punca mesenkimal limbus mata kelinci dengan metode MTT *assay*.

1.6 Hipotesis

Berdasarkan perumusan masalah, maka dapat diajukan hipotesis yaitu minyak atsiri kulit batang kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) memberikan efek sitotoksitas pada sel punca mesenkimal limbus mata kelinci. Serta terdapat perbedaan antara persentase kehidupan sel konsentrasi perlakuan dengan *Lethal Concentration* (LC_{50}) yang dihasilkan.