

INTISARI

Cengkih (*Syzigium aromaticum* L.) adalah salah satu tanaman asli Indonesia yang berasal dari daerah Maluku. Proses pascapanen dapat memengaruhi kandungan kimia di dalam cengkih, sehingga proses ini merupakan faktor kritis dalam menentukan profil fitokimia minyak atsiri yang akan dihasilkan. Komposisi minyak atsiri yang berbeda-beda mengakibatkan kemungkinan perbedaan efek yang dihasilkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan profil fitokimia minyak cengkih yang memiliki perbedaan pada masa penyimpanan dan efeknya terhadap aktivitas sitotoksik pada sel kanker.

Bahan kuncup bunga cengkih kering dengan 3 (tiga) waktu penyimpanan berbeda diperoleh dari petani di daerah Boyolali, didistilasi dengan teknik distilasi uap-air untuk mendapatkan minyak cengkih. Minyak tersebut kemudian dikarakterisasi dengan *gas chromatography-mass spectrometry* (GC-MS) untuk mendapatkan profil kandungan senyawa minyak atsirinya. Evaluasi aktivitas sitotoksik masing-masing minyak dilakukan terhadap sel kanker payudara 4T1 dengan MTT *assay* dengan luaran IC₅₀.

Distilasi minyak cengkih (MC) dari kuncup bunga cengkih kering dengan waktu penyimpanan berbeda yaitu 1 tahun, 4 tahun, dan 6 tahun menghasilkan jumlah rendemen yang berbeda-beda yaitu 2,53%, 5,61%, dan 9,95%. Semakin lama disimpan, minyak yang dihasilkan semakin banyak. Profil fitokimia GC-MS menunjukkan minyak dari cengkih dengan waktu penyimpanan berbeda memiliki komposisi senyawa yang berbeda-beda. Perbedaannya terdapat pada senyawa *guaiacol*, *eugenol*, *1-caryophyllene*, dan beberapa senyawa lainnya. Minyak dari cengkih dengan waktu penyimpanan lebih singkat (1 tahun) memiliki aktivitas sitotoksik lebih kuat (100 µg/mL) dibanding dengan minyak dari cengkih dengan waktu penyimpanan 4 tahun (178 µg/mL) dan 6 tahun (175 µg/mL). Penelitian ini menunjukkan bahwa cengkih yang disimpan dengan waktu yang berbeda-beda menghasilkan minyak dengan profil fitokimia yang berbeda serta aktivitas yang berbeda pula.

Kata kunci: minyak cengkih, sitotoksik, profil GC-MS, sel 4T1.

ABSTRACT

Cloves (*Syzygium aromaticum* L.) is one of Indonesia's native plants originating from the Moluccas region. The post-harvest process can affect the chemical content in cloves, so this process is a critical factor in determining the quality of the essential oil that will be produced. The different essential oil compositions may result in different effects. This study aims to determine differences in the phytochemical profiles of clove oil which have different storage periods and their effects on cytotoxic activity in cancer cells.

Dried clove flower buds with 3 (three) different ages were obtained from farmers in the Boyolali area, distilled by the water-steam distillation technique to obtain clove oil. The oil is then characterized by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) to profile its essential oil compound content. The evaluation of each oil's cytotoxic activity was carried out on breast cancer 4T1 cells using the MTT assay method with an IC₅₀ output.

Distillation of clove oil from dried clove flower buds with different ages (1 year, 4 years, and 6 years) resulted in different yields by 2,53%, 5,61%, and 9,95% respectively, indicated that the longer the storage of the oil, the more oil would be produced. The GC-MS phytochemical profile shows that oil from cloves with different ages had different compound compositions, including guaiacol, eugenol, and 1-caryophyllene. The oil from cloves with shortest storage time (1 year) has strongest cytotoxicity activity (100 µg/mL) than oil from clover with 4 years (178 µg/mL) and 6 years (175 µg/mL) of storage time. The result above reveals that cloves stored for different times produce oil with different qualities and different cytotoxic activities.

Keywords: cloves oil, cytotoxicity, GC-MS profile, 4T1 cells.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Cengkih merupakan salah satu tanaman yang melimpah di Indonesia. Minyak cengkih terkenal dengan berbagai kemanfaatannya, salah satunya dimanfaatkan sebagai aromaterapi karena baunya yang dapat menenangkan. Mayoritas kandungan senyawa dalam cengkih adalah golongan terpenoid (monoterpen dan seskuiterpen), alkohol serta derivatnya (aldehid, ester, keton, fenol, dan oksida) (Badawy dan Abdelgaleil, 2014). Kandungan senyawa-senyawa tersebut dapat memberikan pengaruh pada organoleptis minyak cengkih yang dihasilkan.

Fenilpropan, seskuiterpen, dan monoterpene merupakan golongan senyawa paling dominan yang terkandung dalam minyak cengkih, diantaranya adalah senyawa *eugenol*, *eugenol acetate*, serta β -*caryophyllene* (Das dkk., 2018). Kandungan dan komposisi senyawa di dalam cengkih sebelum diisolasi minyaknya, dapat mengalami perubahan saat pascapanen terutama saat pengeringan dan penyimpanan karena terjadi proses oksidasi dan pergeseran kimia.

Perubahan senyawa yang terjadi secara umum berupa hilangnya senyawa, bertambahnya konsentrasi suatu senyawa, atau pembentukan senyawa baru. Komposisi senyawa di dalam minyak cengkih kemungkinan besar dipengaruhi oleh oksidasi, esterifikasi, atau reaksi kimia lainnya (Murni dkk., 2017).

Cengkih diketahui memiliki efek farmakologi yang luas berdasarkan studi empiris dan penelitian. Beberapa aktivitas biologis yang dimiliki antara lain antioksidan, antrimikroba, antivirus, dan bersifat sitotoksik (Cortés-Rojas dkk., 2014). Perubahan komposisi kandungan senyawa di dalam minyak cengkih diperkirakan dapat mengubah efek biologis yang dihasilkan. Aktivitas sitotoksik dari cengkih diujikan pada model sel 4T1 yang memiliki *doubling time* 22,9 jam (Yerlikaya and Erin, 2008). Model sel 4T1 dipilih sebagai subjek pengujian karena dapat mewakili tipe kanker yang membahayakan bagi manusia serta relatif mudah untuk ditumbuhkan (Boyle, 2012; Dawood dkk., 2011).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan hasil distilasi minyak cengkih dari simplisia cengkih yang memiliki perbedaan pada masa penyimpanan terhadap profil fitokimia dan potensi sitotoksik pada sel 4T1. Sampel minyak cengkih diperoleh dari distilasi cengkih yang berbeda-beda masa penyimpanannya. Identifikasi profil fitokimia dilakukan dengan kromatografi gas-*mass spectrometry*. Efek sitotoksik minyak cengkih pada sel 4T1 diamati dengan uji sitotoksik menggunakan reagen *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dyphenil-tetrazolium bromide* (MTT).

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan pada latar belakang masalah di atas, maka dapat dibuat rumusan masalah sebagai berikut

1. Bagaimana perbedaan rendemen minyak atsiri dari tiga macam simplisia cengkih yang memiliki perbedaan pada masa penyimpanan (1 tahun, 4 tahun, dan 6 tahun)?

2. Bagaimana perbedaan profil fitokimia dari tiga macam minyak cengkih yang berasal dari simplisia yang berbeda masa penyimpanannya (1 tahun, 4 tahun, dan 6 tahun)?
3. Apakah semua minyak cengkih dari simplisia yang berbeda masa penyimpanan tersebut bersifat sitotoksik terhadap sel kanker 4T1?
4. Apakah perbedaan profil fitokimia minyak cengkih dari simplisia yang berbeda masa penyimpanan tersebut juga memberikan perbedaan efek sitotoksik terhadap sel kanker 4T1?

C. Tujuan Penelitian

1. Tujuan umum

Mengeksplorasi perbedaan profil fitokimia minyak cengkih dari simplisia cengkih yang memiliki perbedaan pada masa penyimpanan dan efeknya terhadap aktivitas sitotoksik pada sel kanker

2. Tujuan khusus

- a. Mengetahui rendemen minyak atsiri dari tiga macam simplisia cengkih yang berbeda masa penyimpanannya (1 tahun, 4 tahun, dan 6 tahun).
- b. Mengetahui perbedaan profil fitokimia dari tiga macam minyak cengkih yang berasal dari simplisia cengkih yang berbeda masa penyimpanannya (1 tahun, 4 tahun, dan 6 tahun).
- c. Mengetahui efek sitotoksik dari minyak cengkih yang berasal dari simplisia cengkih yang berbeda masa penyimpanannya terhadap sel kanker 4T1.

- d. Mengetahui pengaruh perbedaan profil fitokimia minyak cengkih dari simplisia cengkih yang berbeda masa penyimpanannya terhadap efek sitotoksik pada sel kanker 4T1.

D. Pentingnya Penelitian

Terapi kanker payudara *triple negative* dengan kemoterapi menyebabkan berbagai efek samping. Oleh sebab itu, penelusuran agen ko-kemoterapi perlu dilakukan untuk meminimalisir efek samping dan meningkatkan efektivitas kemoterapi. Penelitian ini dilakukan untuk menelusuri potensi bahan alam sebagai agen ko-kemoterapi kanker payudara melalui model sel 4T1 dan mengeksplorasi aktivitas sitotoksik dari bahan alam dengan perbedaan profil fitokimia minyak yang diperoleh dari bahan alam dengan masa penyimpanan yang berbeda. Bahan alam yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen ko-kemoterapi ialah kuncup bunga cengkih dengan kandungan senyawa minyak atsirinya bersifat sitotoksik. Penelitian ini sangat penting bagi mahasiswa, institusi, dan ilmu pengetahuan untuk menambah wawasan dan kebermanfaatan akan potensi bahan alam, khususnya kuncup bunga cengkih. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dipublikasikan dan selanjutnya menjadi sumber informasi bagi mahasiswa dan institusi untuk ekspansi data yang berkaitan dengan potensi cengkih maupun agen antikanker.

E. Tinjauan Pustaka

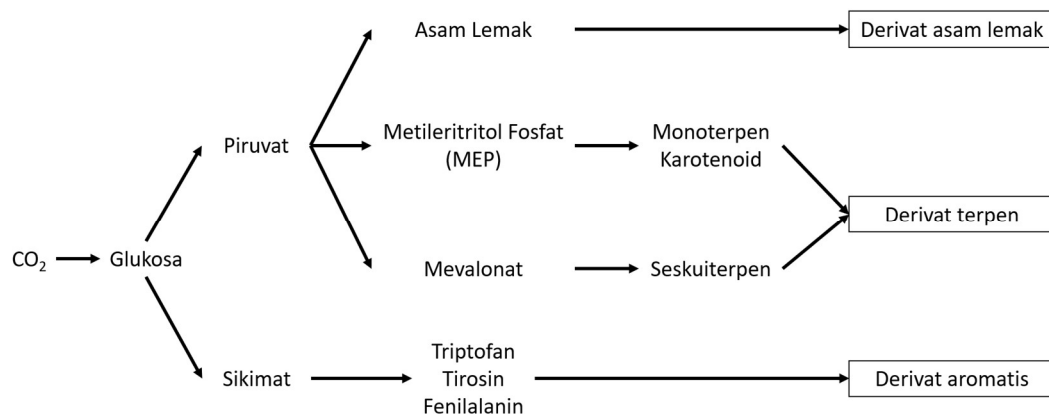
1. Minyak Atsiri

Minyak atsiri/minyak menguap adalah minyak berbahan dasar nabati dan memiliki bau khas sumber tanamannya. Minyak atsiri diesktraksi dari berbagai macam tanaman dan secara tradisional digunakan dalam pembuatan bahan makanan, kosmetik, produk pembersih, aromaterapi, herbisida, dan insektisida (Raveau dkk., 2020). Selanjutnya, beberapa tanaman telah digunakan di obat tradisional sebagai obat untuk saluran pencernaan, diuretik, ekspektoran, sedatif, dan lain-lain serta tersedia di pasaran dalam bentuk infusa, tablet dan/atau ekstrak (Fornari dkk., 2012).

Minyak atsiri merupakan kandungan kimia yang menjanjikan untuk diteliti karena dianggap mengandung banyak metabolit-metabolit tumbuhan bermanfaat (Ali dkk., 2015). Komposisi metabolit ini akan berbeda-beda tergantung dari waktu panennya, cara isolasinya, serta musim. Kandungan minyak atsiri mayoritas adalah golongan terpenoid (monoterpen dan seskuiterpen) serta alkohol dan derivatnya (aldehid, ester, keton, fenol, dan oksida) (Badawy dan Abdelgaleil, 2014). Minyak atsiri diperoleh dari berbagai bagian tanaman misal akar, kulit kayu, kayu, batang, daun, bunga, kuncup bunga, buah, serta biji dimana minyak atsiri tersimpan di sel sekret, sel epidermis, dan trikoma glandular (Miguel, 2010).

Minyak atsiri umumnya tidak berwarna dan titik didihnya tinggi (lebih dari 200°C). Minyak atsiri terdiri dari zat lipofilik, mengandung bau mudah menguap dari bahan nabati, serta termasuk dalam sistem pertahanan tanaman (Dhifi dkk., 2016). Minyak atsiri terbentuk oleh enzim *terpene synthases*. Komposisi zat dalam

minyak atsiri sangat bervariasi dengan jumlah yang sangat tinggi (Kumari dkk., 2014). Komposisi yang dapat terdeteksi ini penting karena semua bertanggung jawab atas bau dan rasa alami yang khas. Dengan demikian, penting untuk memilih prosedur ekstraksi minyak atsiri yang dapat menghasilkan proporsi kandungan senyawa sesuai dengan aslinya (Rehman dkk., 2016). Pembentukan minyak atsiri berawal dari CO₂ yang bereaksi dengan glukosa melalui jalur piruvat dan sikimat. Senyawa minyak atsiri dari biosintesis ini yaitu golongan derivat terpenoid dan derivat aromatis yang merupakan golongan utama minyak atsiri (Gambar 1) (Bakkali dkk., 2008; Caissard dkk., 2004)



Gambar 1. Jalur Biosintesis Minyak Atsiri. (Bakkali dkk., 2008; Caissard dkk., 2004)

Minyak atsiri dapat diperoleh dari berbagai macam tanaman misalnya kayu manis, lavender, mawar, melati, jahe, lemon, serai, dan lain-lain. Bagian tanaman yang diisolasi minyak atsirinya pun juga berbeda beda, yaitu kulit batang, akar, bunga, buah, kulit buah, daun, bahkan seluruh bagian tanaman. Hal ini tergantung pada dimana minyak atsiri paling banyak dihasilkan (Tabel I) (Battaglia, 2003)

Tabel I. Tanaman penghasil minyak atsiri dan bagian penghasilnya (Battaglia, 2003)

Tanaman	Bagian Tanaman
Lemon dan jeruk	Kulit buah
Kayu manis	Kulit batang
Serai	Daun
Lavender	Seluruh bagian
Jahe dan akar wangi	Akar
Mawar dan melati	Bunga
Cengkih	Kuncup bunga

2. Cengkih (*Syzigium aromaticum*)

Tanaman cengkih adalah tanaman cemara dengan tinggi sekitar 20 meter dan tekstur daun kasar. Cengkih dapat bercabang dua menjadi kepala dan daerah tangkai. Sifat organoleptik tanaman cengkih antara lain kuncup bunga cengkih memiliki panjang sekitar 10-17,5 mm dan tebal 2 mm serta berwarna coklat tua (hampir hitam). Cengkih memiliki rasa aromatik dan pedas yang kuat diikuti oleh analgesia dan bau pedas (Gambar 2) (Evans dan Trease, 2009).



(1)



(2)

Gambar 2. Morfologi cengkih. (1) Kuncup cengkih kering (2) Pohon cengkih

Klasifikasi Cengkih :

Kingdom : Plantae

Sub kingdom : Tracheobionta

Super divisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliphyta

Kelas : Magnoliopsida
Subkelas : Rosidae
Orde : Myrtales
Famili : Myrtaceae
Genus : *Syzygium*
Species : *aromaticum* (L.) (Kaur dan Kaushal, 2019).

Cengkih yang telah dipanen biasanya dikeringkan hingga kandungan airnya mencapai $13 \pm 1\%$. Hal ini dilakukan agar cengkih menjadi lebih awet saat disimpan (Najafian, 2014). Proses pengeringan bertujuan untuk menghentikan proses enzimatik di dalam tanaman. Selain itu, proses ini juga bertujuan untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme. Sehingga, proses pengeringan dapat mengawetkan suatu tanaman (Ebadi dkk., 2015). Kandungan air kurang dari 12% akan membuat cengkih menjadi rapuh, sedangkan kandungan air lebih dari 14% dapat mengakibatkan cengkih rentan akan mikroorganisme yang dapat mempengaruhi kualitas produk (Karwur dan Semangun, 2014). Proses pengeringan cengkih pada negara tropis biasanya dilakukan menggunakan bantuan sinar matahari. Namun sebenarnya hal ini kurang baik karena tergantung pada cuaca, menghabiskan waktu yang lebih lama, serta membuat cengkih terpapar lebih banyak mikroba (Ghasemi Pirbalouti dkk., 2013). Pengeringan dengan oven dapat menjadi pilihan karena lebih cepat, lebih sederhana, dan lebih terkontrol (Díaz-Maroto dkk., 2003). Efek lain yang ditimbulkan dari pengeringan yaitu perubahan kandungan kimia dan rasa (Díaz-Maroto dkk., 2004)

Setelah kering, cengkih biasanya disimpan sebelum selanjutnya dibuat menjadi produk lain. Proses pengeringan yang telah dilakukan sebelumnya akan membuat cengkih bertahan lebih lama. Namun, penyimpanan mempengaruhi kandungan senyawa di dalamnya terutama yang mudah menguap (Murni dkk., 2017). Hal ini terjadi pada merica hitam (*Piper nigrum* L.) dimana kandungan terpenoid berkurang dan kandungan terpenoid teroksidasi bertambah (Orav dkk., 2004). Konsentrasi minyak atsiri dapat berubah saat penyimpanan karena beberapa faktor. Proses oksidasi yang menyebabkan hilangnya atau munculnya senyawa kimia merupakan salah satunya (Sourestani dkk., 2014). Pada sampel teh, proses oksidasi dipengaruhi oleh banyak faktor, antara lain oksigen, suhu, kelembapan, bahan mentah, serta beberapa faktor lain (Meng dkk., 2021).

Konsentrasi minyak atsiri hingga 18% dapat ditemukan pada kuncup bunga cengkih. Sekitar 89% dari minyak atsiri cengkih yaitu senyawa eugenol dan 5-15% adalah eugenol asetat dan β -cariofileno. Senyawa penting lain ditemukan dalam minyak atsiri cengkih dengan konsentrasi hingga 2,1% adalah α -humulen. Senyawa volatil lainnya dengan konsentrasi lebih rendah adalah β -pinene, limonene, farnesol, benzaldehyde, 2-heptanone dan ethyl hexanoate (Cortés-Rojas dkk., 2014).

Minyak cengkih dimanfaatkan secara luas sebagai pengobatan tradisional infeksi jamur pada tubuh dan gulma pada tanaman (Khan dan Ahmad, 2012; Liu dkk., 2015; Rodriguez dkk., 2014). Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa minyak cengkih memiliki sifat antifungal (Chami dkk., 2005), antikarsinogen

(Zheng dkk., 1992), anti alergi (Kim dkk. 1998), dan anti aktivitas mutagenik (Mizawa dan Hisama, 2001).

3. Efek Sitotoksik Minyak Cengkih pada Kanker Payudara

Minyak cengkih telah diteliti aktivitas sitotoksiknya oleh Kouidhi, Zmantar, dan Bakhrouf (2010). Aktivitas sitotoksik diuji pada sel Hep-2 (sel karsinoma laring manusia), A549 (sel epitel basal adenokarsinoma manusia), MRC-5 (sel diploid fibroblas manusia), HT29 (sel kolorektal adenokarsinoma manusia), dan RAW264.7 (sel makrofag manusia) (Tabel II).

Tabel II. Aktivitas sitotoksik minyak cengkih pada berbagai macam sel (Kouidhi dkk., 2010)

<i>Cell line</i>	<i>IC₅₀ ± SD (µg/mL)</i>
Hep-2	500 ± 10.2
A549	112 ± 3.1
MRC-5	15.75 ± 1.6
HT29	30 ± 2.6
RAW264.7	18.8 ± 2.4

Perlakuan minyak cengkih pada sel MRC-5 menunjukkan efek sitotoksik yang kuat. Hasil lainnya menunjukkan bahwa minyak cengkih kurang memiliki efek toksik pada sel karsinoma yang diujikan. Penelitian lainnya oleh Kumar dkk. (2014) yang mengujikan minyak cengkih ke sel MCF-7 (sel kanker payudara) menunjukkan bahwa minyak cengkih memiliki efek sitotoksik kuat pada sel MCF-7. Adanya hasil penelitian ini menunjukkan potensi aktivitas anti kanker minyak cengkih terutama pada sel kanker payudara. Penelitian tentang aktivitas sitotoksik minyak cengkih belum pernah dilakukan pada sel kanker payudara 4T1.

4. Sel Kanker Payudara

Kanker telah menjadi satu penyakit paling berbahaya dalam beberapa tahun terakhir di dunia. Penyakit ini dapat disebabkan oleh banyak faktor terhadap

pertumbuhan tidak normal sel menuju tumor. Hal-hal yang diyakini menjadi faktor adalah kebiasaan makan yang berubah, konsumsi rokok dan alkohol, infeksi kronis, paparan radiasi berbahaya dan polusi (NCI Drug Dictionary, 2011).

Salah satu jenis kanker yang banyak terjadi adalah kanker payudara terutama pada wanita. Sebanyak 10-15% dari kasus kanker payudara merupakan tipe *Triple Negative Breast Cancer* (TNBC) yang lebih rawan menyebabkan kematian (Boyle, 2012; Dawood dkk., 2011). TNBC mengacu pada tidak adanya tiga macam reseptor yaitu reseptor estrogen, reseptor progesteron, dan reseptor HER2 (Foulkes dkk., 2010; Tariq dan Rana, 2013). Kanker tipe TNBC lebih berbahaya karena merupakan hasil mutasi dari sel kanker non-TNBC. Selain itu, kanker TNBC lebih mudah bermetastasis (Tariq dan Rana, 2013).

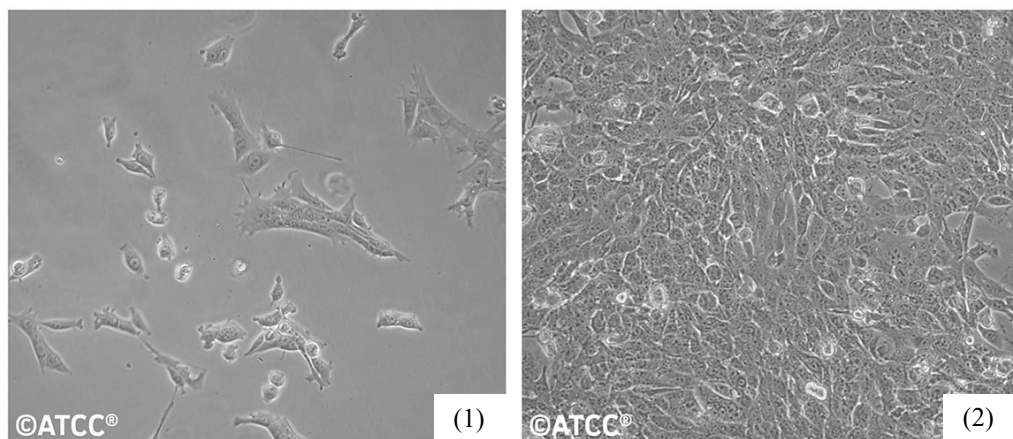
Penelitian terbaru menunjukkan TNBC merupakan entitas penyakit heterogen pada tingkat klinis, histologis, dan molekuler. *Sequencing* telah mengidentifikasi beberapa karakteristik molekuler :

1. inaktivasi jalur BRCA, MAP / ERK kinase (MEK) dan aktivasi jalur Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K),
2. tingginya tingkat Tumor Protein mutasi p53 (TP53),
3. aktivasi MYC yang tinggi, kehilangan protein retinoblastoma (RB1),
4. peningkatan untuk reseptor androgen (AR) dan gen AR (Burstein dkk., 2015; Cancer Genome Atlas Network, 2012; Lehmann dkk., 2011)

TNBC memiliki pola kambuh yang berbeda dengan resiko tinggi bermetastasis dan menyebabkan kematian dibandingkan dengan tipe kanker payudara lainnya (Oualla dkk., 2017; Lowery dkk., 2012; Montagna dkk., 2012; Voduc dkk., 2010; Freedman

dkk., 2009). Tumor ini memiliki kecenderungan untuk metastasis secara mendalam ke paru dan otak dibandingkan dengan tipe kanker payudara *Luminal A* yang cenderung kambuh kembali pada tulang dan kulit (Kennecke dkk., 2010; Heitz dkk., 2008; Lin dkk., 2004).

Model sel yang bisa digunakan untuk studi kanker TNBC adalah sel 4T1. Karsinoma mammae tikus 4T1 awalnya diisolasi dari tumor mammae yang muncul secara spontan pada tikus BALB/c (Dexter dkk., 1978; Heppner dkk., 1978). Sel 4T1 berkarakter *adherent*. Selain itu, ketika sel ini diinjeksi ke mencit BALB/c, sel akan spontan memproduksi tumor yang sangat mudah bermestastasis ke organ lain (paru-paru, liver, kelenjar getah bening dan otak) (ATCC, tanpa tahun). Sel ini merupakan model yang bagus untuk pemodelan kanker payudara metastasis pada manusia (Heppner dkk., 2000). Sel ini juga tumbuh secara progresif dan menyebabkan penyakit mematikan secara seragam, meskipun setelah pemotongan tumor primer (Morecki dkk., 1998; Pulaski dkk., 2000) (Gambar 3).

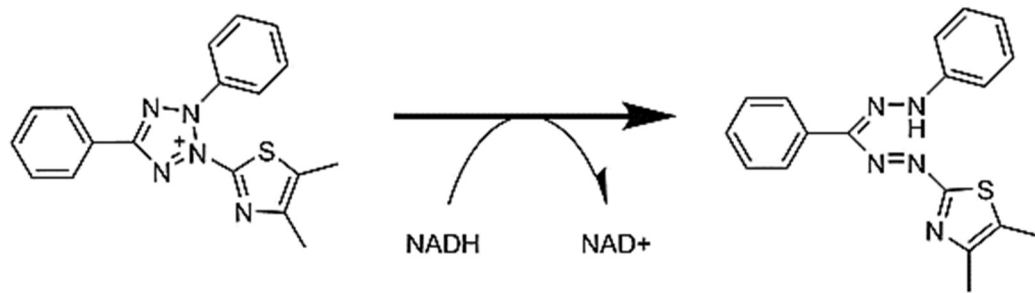


Gambar 3. Morfologi sel 4T1 dalam kondisi berbeda (1) kepadatan rendah (2) kepadatan tinggi

5. Uji Sitotoksik

Proliferasi sel dapat digunakan sebagai salah satu indikator penting untuk memahami mekanisme kerja gen, protein, dan jalur tertentu yang dikaitkan dengan kelangsungan hidup atau kematian sel setelah terpapar agen toksik (Adan dkk., 2016). Metode yang digunakan untuk menentukan viabilitas sel umumnya juga dapat digunakan untuk mendeteksi proliferasi sel. Viabilitas sel dan aktivitas metabolisme dapat ditentukan melalui pengukuran NADH dan NADPH yang terbentuk selama berlangsungnya aktivitas metabolisme (Präbst dkk., 2017). Uji sitotoksisitas dan proliferasi sel ini biasanya digunakan untuk skrining obat dan untuk mendeteksi efek proliferasi sel atau efek sitotoksik akibat dari perlakuan dengan senyawa tertentu.

Deteksi aktivitas sitotoksik pada sel kanker dengan cara reduksi tetrazolium dapat dilakukan dengan reagen MTT. MTT merupakan nama lain dari *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*, yaitu reagen yang digunakan untuk metode uji dengan kolorimetri ini. Reagen MTT akan tereduksi menjadi kristal formazan sehingga mengubah warna dari kuning menjadi ungu. Reaksi ini hanya terjadi pada sel hidup dimana semakin banyak sel hidup maka perpecahan *MTT* menjadi formazan juga semakin banyak. Peristiwa ini hanya dapat dilakukan oleh mitokondria sel yang aktif (Mosmann, 1983).



Gambar 4. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan (Mosmann, 1983)

Banyaknya sel yang hidup (viabilitas sel) dapat diketahui dengan cara sebagai berikut (1)

$$\% \text{sel hidup} = \frac{\text{Absorbansi sel dengan perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100 \% \dots (1)$$

(Doyle dan Griffiths, 2000).

Dari hasil % viabilitas sel, dapat dihitung nilai IC_{50} yaitu konsentrasi penghambatan untuk 50% populasi sel dan digunakan sebagai parameter awal skrining antikanker (Doyle dan Griffiths, 2000).

F. Landasan Teori

Cengkih yang telah dipanen kemudian dikeringkan dan disimpan. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kandungan air di dalam simplisia sehingga proses enzimatik di dalamnya akan melambat. Lamanya penyimpanan dapat menentukan lama proses metabolisme air di dalamnya. Semakin lama disimpan maka kandungan air di dalam simplisia akan semakin sedikit. Perbedaan kandungan air ini dapat menyebabkan perbedaan rendemen minyak yang dihasilkan.

Perlakuan pascapanen pada beberapa simplisia dapat menyebabkan perubahan kandungan kimia termasuk dalam cengkeh. Senyawa kimia cengkih pada umumnya adalah golongan terpenoid, aromatis, serta derivat-derivatnya. Saat

disimpan, akan terjadi perubahan seperti hilangnya senyawa, pertambahan senyawa tertentu, atau pembentukan senyawa baru. Oleh karena itu, perubahan kandungan tersebut akan menyebabkan perbedaan profil fitokimia senyawa di dalamnya.

Minyak cengkih mengandung senyawa golongan terpenoid yang memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker payudara. Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa yang umumnya selalu ada di dalam cengkeh. Dengan demikian roses penyimpanan yang berbeda akan mempengaruhi komposisinya, namun kandungan senyawa yang ada di dalamnya tetap memiliki aktivitas sitotoksik.

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa minyak cengkih mempunyai efek sitotoksik kuat terhadap sel kanker MCF-7, MRC-5, dan HT-9. Efek ini dikaitkan oleh keberadaan senyawa terpenoid dalam minyak cengkih yang diketahui memiliki aktivitas penghambatan proliferasi sel kanker. Namun adanya proses oksidasi selama proses penyimpanan dapat mengakibatkan perbedaan komposisi kandungan senyawa dalam minyak cengkih. Oleh karena itu, dimungkinkan dengan perbedaan penyimpanan akan memberikan efek sitotoksik yang berbeda.

G. Hipotesis

1. Terdapat perbedaan rendemen dari 3 macam minyak cengkih yang berbeda masa penyimpanannya (1 tahun, 4 tahun, dan 6 tahun).
2. Terdapat perbedaan profil fitokimia dari 3 macam minyak cengkih yang berbeda masa penyimpanannya (1 tahun, 4 tahun, dan 6 tahun).
3. Semua minyak cengkih dari masa penyimpanan tersebut bersifat sitotoksik terhadap sel kanker 4T1.