

## Effect of Manggu Leuweung (*Garcinia celebica* L.) Leaves Ethanol Extract on CCL 171 Cell Line Proliferation

Putri Maharani, Elma N. M. R. Sahila, Raden M. Febriyanti, Melisa I. Barliana

Department of Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy, Universitas Padjadjaran, West Java, Indonesia

Submitted 26 May 2023; Revised 23 August 2023; Accepted 25 August 2023; Published 30 August 2023

\*Corresponding author: putrimhrn04@gmail.com

### Abstract

The immune system is a complex system that acts as a natural defense by maintaining homeostasis, preparing the body to fight off infection, and supporting the healing process. However, several factors such as endogenous or exogenous factors can affect both the efficiency and efficacy of the immune system. To maintain homeostasis, immunomodulators can be used to optimize the immune system. The leaves of manggu leuweung (*Garcinia celebica* L.) from the genus *Garcinia* are known to have various compounds that potentially treat and maintain the immune system, such as an anti-inflammatory agent, antibacterial, antioxidant, and anticancer. Previous research has proven that *G. celebica* L. leaves contain various bioactive compounds such as flavonoid that acts as an anti-inflammatory agent by reducing the expression of pro-inflammatory cytokines, also triterpenoid that acts as an antioxidant by preventing the free oxidant. This study aims to see the effect of ethanol extract of manggu leuweung leaves on the immune response of human fetal lung fibroblast cells, CCL-171. The result shows that the ethanol extract had proliferative activity by maintaining the cell viability as indicated by the percentage survival rate in CCL-171 after exposure to ethanol extract at concentrations of 7.81 ppm, 15.62 ppm, and 31.25 ppm respectively are  $92.34 \pm 5.77\%$ ;  $90.20 \pm 3.05\%$ ;  $82.96 \pm 4.58\%$ .

**Keywords:** Manggu leuweung, *Garcinia celebica* L., Immunomodulator, Proliferation activity, WST-8

### Pengujian Ekstrak Etanol Daun Manggu Leuweung (*Garcinia celebica* L.) terhadap Proliferasi Lini Sel CCL-171

#### Abstrak

Sistem imun merupakan suatu sistem kompleks yang bertindak sebagai pertahanan tubuh yang secara umum bekerja dengan mempertahankan homeostasis, mempersiapkan tubuh dalam melawan infeksi, dan penyembuhan. Namun, beberapa faktor seperti faktor endogen atau eksogen dapat mengubah efisiensi dan efektivitas dari sistem imun. Immunomodulator merupakan suatu senyawa yang dapat digunakan untuk membantu mempertahankan homeostasis dengan mengatur sistem sistem imun serta mengoptimalkannya. Pada penelitian terdahulu, telah ditunjukkan bahwa senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun *Garcinia celebica* L. dapat berpotensi sebagai agen anti inflamasi yang baik dengan mereduksi ekspresi sitokin proinflamasi. Selain itu, daun *G. celebica* L. juga mengandung senyawa terpenoid yang berperan sebagai antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas. Pada penelitian ini dilakukan pengujian terhadap ekstrak etanol daun manggu leuweung terhadap respon imun dengan menggunakan sel fibroblast paru normal CCL-171. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol mampu meningkatkan proliferasi dengan mempertahankan viabilitas sel yang ditunjukkan dengan % survival rate pada sel CCL-171 pada konsentrasi 7,81; 15,62 dan 31,25 ppm secara berturut-turut adalah sebagai berikut  $92,34 \pm 5,77\%$ ;  $90,20 \pm 3,05\%$ ;  $82,96 \pm 4,58\%$

**Kata Kunci:** Manggu leuweung, *Garcinia celebica* L., Immunomodulator, Aktivitas proliferasi, WST-8

## 1. Pendahuluan

Sistem imun merupakan suatu sistem yang berperan sebagai pelindung tubuh dengan memproduksi antibodi untuk membunuh patogen dan melawan penyakit. Sistem imun melindungi tubuh melalui mekanisme homeostasis yang merupakan sebuah usaha untuk memelihara keadaan internal fisiologis tubuh dalam organisme multiseluler melalui mekanisme umpan balik yang memungkinkan tubuh memproses suatu rangsangan.<sup>1</sup> Secara umum, sistem imun dapat dibagi menjadi sistem imun bawaan (*innate immunity*) dan sistem imun adaptif (*adaptive immunity*).<sup>2,3</sup> Sistem imun bawaan (*innate immunity*) merupakan sistem pertahanan tubuh mendasar yang telah dimiliki oleh manusia sejak lahir.<sup>4</sup> Sistem imun bawaan akan memberikan respon non-spesifik yang tidak tergantung dengan memori imunologis sebelumnya. Respon tersebut berupa inflamasi yang akan terjadi pada tubuh segera setelah tubuh mendapat suatu rangsangan yang dapat berupa kondisi stress maupun serangan patogen.<sup>2,3</sup> Sementara itu, sistem imun adaptif (*adaptive immunity*) merupakan sistem imun yang dapat memberikan perlindungan seumur hidup pada tubuh dari infeksi berulang oleh patogen yang sama karena sistem imun ini dapat bekerja secara spesifik melalui ekspansi klonal dari memori sel limfosit B dan limfosit T yang memungkinkan sel pembawa antigen tertentu membelah dengan lebih cepat sehingga dapat menginduksi respon imun yang juga cepat dan efektif.<sup>5</sup> Kedua sistem imun tersebut bekerja secara sinergis dengan sistem imun bawaan berperan lebih aktif sebagai respon imun awal dan sistem imun adaptif mulai bekerja secara dominan seiring waktu.<sup>6</sup>

Keseimbangan sistem imun sangat penting untuk menjaga kinerja organ-organ tubuh karena ketidakseimbangan respon imun dapat mengakibatkan berbagai gangguan lain dalam kesehatan, seperti alergi, autoimun, AIDS, maupun immunosupresi.<sup>7</sup> Dalam menjaga keseimbangan sistem imun dalam tubuh, dapat digunakan imunomodulator. Imunomodulator merupakan suatu senyawa baik senyawa sintesis, senyawa alami, maupun senyawa biologis yang dapat yang dapat membantu

mengatur sistem kekebalan tubuh. Pengaturan tersebut yaitu proses normalisasi, yang dapat membantu mengoptimalkan respon imun. Imunomodulator yang berasal dari senyawa alami dapat digunakan dalam pemeliharaan kesehatan dan pencegahan serta pemulihan penyakit.<sup>8,9</sup>

Salah satu tumbuhan yang berpotensi untuk dikembangkan menjadi imunomodulator adalah manggu leuweung. Manggu leuweung (*Garcinia celebica* L.) merupakan salah satu tumbuhan dari genus *Garcinia* yang dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan karena kaya akan senyawa metabolit sekunder. *G. celebica* memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antiinflamasi, antikanker, antiplasmodial dan antioksidan.<sup>10-12</sup>

Penelitian mengenai senyawa yang terkandung dalam tumbuhan dari genus *Garcinia* telah banyak dilakukan dan telah diketahui bahwa tumbuhan dengan genus *Garcinia* memiliki manfaat sebagai agen terapeutik, diantaranya pada penyakit infeksi, obesitas, kanker dan diabetes.<sup>13</sup> Beberapa senyawa yang terkandung dari *Garcinia sp.* dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan, antijamur, antibakteri, penghambatan HIV, dan antilipidemik.<sup>14,15</sup> Salah satu tanaman dengan genus *Garcinia sp.* telah banyak diteliti salah satunya yaitu *Garcinia mangostana* yang dimanfaatkan sebagai agen imunomodulator. Akan tetapi, belum banyak penelitian yang melaporkan aktivitas imunomodulator daun *G. celebica*. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan pengujian ekstrak etanol daun *G. celebica* terhadap proliferasi lini sel CCL-171 sebagai salah satu tahap pengujian awal aktivitas *G. celebica* dalam mengaktifasi proses imunitas serta diharapkan mampu mempertahankan kehidupan sel.

## 2. Metode

### 2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas alat gelas yang digunakan di laboratorium, *rotary evaporator*, *Biosafety Cabinet* (BSC) level 2, inkubator CO<sub>2</sub> (Thermo scientific series 8000 DH), *culture flask*, *microplate 96 well*, *microplate reader* (INFINITE M200PRO TECAN), mikropipet,

hemocytometer, mikroskop *inverted* (ZEISS), penangas air, sentrifugator, tabung konikel dan vial.

## 2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu ekstrak etanol daun manggu leuweung (*G. celebica* L.) yang diperoleh dengan metode maserasi dengan menggunakan etanol 96%, Sel yang digunakan sebagai pengujian adalah lini sel paru normal CCL-171 (MRC-5), bahan lainnya yang digunakan adalah medium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) Catalog No. 30-2003, 15% *Foetal Bovine Serum* (FBS) (Wako), *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Wako), antibiotik penisilin/streptomisin (Sigma-Aldrich), kojic acid, WST-8 kit (Dojindo), larutan DMSO (Sigma-Aldrich), larutan tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich), etanol 70%.

## 2.3. Prosedur Rinci

### 2.3.1. Ekstraksi Daun *G. celebica*

Ekstrak etanol daun *G. celebica* didapatkan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%, kemudian didiamkan selama 24 jam. Lakukan pengulangan proses ekstraksi sebanyak tiga kali. Filtrat yang didapatkan ditampung dan dipisahkan dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40-50°C sehingga dihasilkan ekstrak kental.

### 2.3.2. Penyiapan Bahan Uji

Lipopolisakarida dibuat dengan konsentrasi 100 dan 200 ppm. Sampel ekstrak etanol daun manggu leuweung (*G. celebica*) dilarutkan dengan DMSO hingga diperoleh konsentrasi 20.000 ppm. Kemudian, dibuat variasi konsentrasi 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125 ppm dengan menggunakan medium pertumbuhan sel.

### 2.3.3. Kultur dan Perlakuan Sel

Fibroblas paru embrionik manusia CCL-171 yang telah disimpan pada fase uap nitrogen cair, dicairkan terlebih dahulu dengan menggunakan vial diatas penangas air dengan suhu 37°C secara cepat (sekitar 2 menit). Setelah dicairkan dengan

menggunakan penangas air, dilakukan dekontaminasi dengan etanol 70%. Suspensi sel disentrifugasi pada 125 x g selama 5 hingga 10 menit. Lalu, pelet sel yang telah disentrifugasi dilakukan resuspensi dengan media dan dipindahkan kedalam cawan kultur yang sesuai.

Lini sel CCL-171 dikultur dalam media *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) yang mengandung 15% *Fetal Bovine Serum* (FBS) dan 1% streptomisin/penisillin. Pelet sel dimasukkan kedalam cawan kultur yang telah diisikan dengan media pertumbuhan diinkubasi selama  $\pm$  15 menit untuk mencapai pH normal (pH 7.0-7.6). Setelah pellet masuk kedalam cawan kultur, inkubasi kembali pada suhu 37°C dengan kelembapan 5% CO<sub>2</sub>.

Penggantian media kultur dilakukan ketika sel mencapai sekitar 70-90% konfluensi. Sebelum melepaskan sel dari cawan kultur, sel dicuci terlebih dahulu menggunakan PBS 1000 µL sebanyak 2 kali. Selanjutnya, sel yang ada dalam cawan kultur ditambahkan 2,0 mL larutan Tripsin-EDTA sebanyak 2 kali dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan kelembapan 5% CO<sub>2</sub> selama 3 menit. Pengamatan sel dilakukan dengan mikroskop terbalik hingga terlihat persebaran sel.

Kemudian, ditambahkan 6,0 hingga 8,0 mL media pertumbuhan kedalam cawan kultur lalu pipet naik turun untuk memanen sel. Suspensi sel dipindahkan ke dalam tabung konikel dan dilakukan sentrifugasi pada 3000 rpm selama 3 menit. Larutan supernatan dibuang kemudian pellet sel dilarutkan dalam medium pertumbuhan. Aliquot ditambahkan kedalam cawan kultur baru. Sel diinkubasi kembali kedalam inkubator pada suhu 37°C dengan kelembapan 5% CO<sub>2</sub>. Perhitungan sel dihitung dengan hemocytometer dengan pewarnaan menggunakan *trypan blue*.

### 2.3.4. Pengujian Proliferasi dengan Metode WST-8

Pengujian proliferasi ekstrak etanol daun manggu leuweung (*G. celebica*) terhadap sel CCL-171 dengan metode WST-8 terbagi menjadi beberapa kelompok pengujian yaitu:

- Kontrol medium: Medium DMEM + 15% FBS + 1% streptomisin dan penisilin

- b. Kontrol sel: Medium DMEM + 15% FBS + 1% streptomisin dan penisilin + Lini Sel CCL-171
- c. Kontrol pelarut: Medium DMEM + 15% FBS + 1% streptomisin dan penisilin + Lini Sel CCL-171 + Larutan DMSO
- d. Kontrol uji: Medium DMEM + 15% FBS + 1% streptomisin dan penisilin + Lini Sel CCL-171 + Larutan DMSO + masing-masing variasi konsentrasi ekstrak etanol daun *G. celebica*
- e. Kontrol positif: Medium DMEM + 15% FBS + 1% streptomisin dan penisilin + Lini Sel CCL-171 + variasi konsentrasi kojic acid

Suspensi lini sel CCL-171 dimasukkan kedalam microplate 96-well plate sebanyak 100  $\mu$ l dengan jumlah sel 5000 sel/well. Kemudian plate diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C dengan konsentrasi CO<sub>2</sub> 5%. Setelah itu, sel diberi perlakuan berbeda yaitu 1) tidak diberi perlakuan; 2) ditambahkan ekstrak etanol; 3) kontrol positif (asam kojat). Pengamatan kultur dilakukan di jam ke-24. Setelah inkubasi selama 24 jam, ditambahkan 10  $\mu$ l larutan WST-8 ke dalam masing-masing well dan diinkubasi kembali selama 1 hingga 4 jam. Waktu inkubasi 1-4 jam dilakukan untuk memberi waktu bagi garam tetrazolium supaya tereduksi menjadi garam formazan berwarna kuning-oranye. Setelah diinkubasi, dilakukan pengukuran absorbansi pada Panjang gelombang 450 nm dengan menggunakan *microplate reader*.

### 2.3.5. Analisis Data

Analisis data dari uji proliferasi dilakukan dengan menghitung persentase kehidupan sel (*survival rate*) yang dihitung dari data absorbansi hasil dari pembacaan *microplate reader*. Nilai % *survival rate* dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ survival rate} = ((\text{Absorbansi sampel} - \text{Absorbansi kontrol medium}) / (\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol medium})) \times 100\%$$

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak statistik

Graphpad 9.4.1. Data pengukuran dinyatakan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi. Analisis perbandingan antar kelompok dianalisis dengan metode t-test dengan nilai signifikansi 5% ( $p < 0,05$ ).

## 3. Hasil

### 3.1. Ekstraksi daun *G. celebica*

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Setelah filtrat telah ditampung lalu dipekatkan menggunakan alat rotary evaporator. Diharapkan sampel ekstrak kental dengan rendemen sebanyak 14,9%. Pemeriksaan organoleptis ampel ekstrak kental yang telah dipekatkan menunjukkan bahwa ekstrak memiliki warna coklat pekat dan kental dan berbau khas daun manggu leuweung.

### 3.2. Hasil Pengujian Proliferasi dengan Metode WST-8

Pengujian proliferasi dengan Metode WST-8 dilakukan untuk mengetahui pembacaan absorbansi pada *microplate reader* yang selanjutnya data absorbansi tersebut akan digunakan dalam analisis data. Absorbansi yang terhitung berasal dari reaksi warna yang terbentuk setelah sel hidup bereaksi dengan reagen WST-8 yang membentuk garam formazan berwarna jingga, semakin banyak sel yang hidup maka akan semakin tinggi intensitas warna yang akan dihasilkan.

### 3.3. Hasil Analisis Data

Analisis data dari uji proliferasi dilakukan dengan menghitung persentase kehidupan sel (% *survival rate*) yang dihitung dari data absorbansi hasil dari pembacaan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm. Hasil analisis data dan grafik ditampilkan pada Tabel 1-2 dan Gambar 1-3.

## 4. Pembahasan

*Garcinia celebica* L. merupakan tanaman dengan genus *garcinia* yang biasa dikenal dengan manggu leuweung, adalah tanaman

Indonesia yang biasa ditemukan di hutan pada pulau Jawa.<sup>12,16</sup> *G. celebica* L. merupakan salah satu tumbuhan dengan genus *Garcinia* yang dilaporkan memiliki kandungan senyawa yang dapat menghasilkan efek terapeutik seperti sebagai antioksidan, antikanker, dan antimalaria.<sup>10</sup> Ekstrak tumbuhan *Garcinia celebica* L. dilaporkan mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder diantaranya yaitu sesquiterpen, terpenoid, flavonoid, dan tannin.<sup>17,18</sup>

Sebelum digunakan dalam pengujian, sel CCL-171 perlu dikultur terlebih dahulu. CCL-171 (MRC-5) merupakan sel fibroblas paru janin manusia yang dikultur dengan menggunakan medium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) dengan penambahan *foetal bovine serum* (FBS). FBS merupakan serum yang berasal dari hasil ekstraksi darah janin sapi yang umum digunakan untuk pengujian *in vitro* yang dapat mendukung pertumbuhan dan proliferasi sel. FBS memiliki fungsi sebagai faktor pendukung pertumbuhan, sumber mikronutrien, dan hormon yang dapat meningkatkan perlekatan, pertumbuhan dan proliferasi dari sel mamalia.<sup>19</sup>

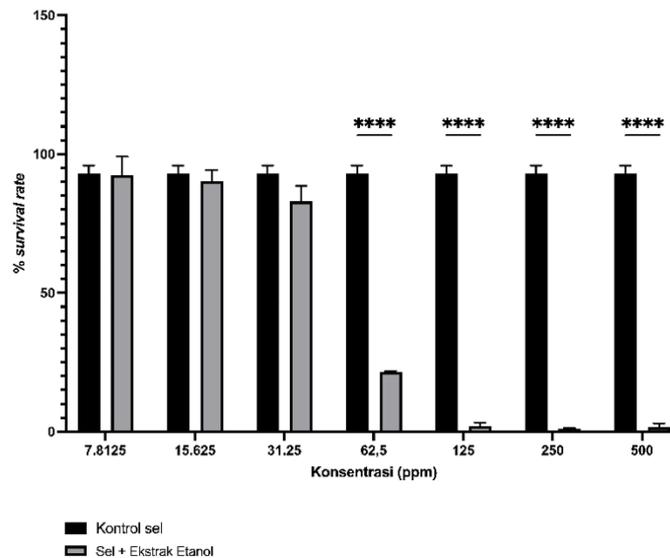
Selain itu, digunakan antibiotik berupa penisilin-streptomisin untuk mencegah adanya pertumbuhan kontaminan seperti bakteri, jamur, atau mikroorganisme lainnya dalam sel yang akan dikultur. Kultur sel diinkubasi dalam inkubator dengan kelembapan 5% CO<sub>2</sub> dan pada suhu 37°C yang disesuaikan dengan kondisi tubuh manusia. Selain itu, pengaturan kelembapan dalam inkubator berfungsi untuk menstabilkan pH melalui sistem buffer bikarbonat.<sup>20</sup> Lini sel CCL-171 termasuk

jenis sel adherent dimana sel tersebut dapat tumbuh jika melekat pada permukaan cawan kultur.<sup>21</sup> Subkultur dilakukan ketika sel telah mencapai kondisi yang cukup baik dengan melihat apakah sel tersebut telah mencapai konfluensi 70-90%. Sebelum dilakukan pengujian proliferasi, dilakukan perhitungan sel dengan hemositometer dengan pewarnaan menggunakan *trypan blue*. Perhitungan suspensi lini sel CCL-171 yang dibutuhkan untuk memenuhi jumlah sel 5000 sel/well yaitu sebesar 1,8 mL sel yang ditambahkan dengan 28,2 mL medium pertumbuhan.

Proliferasi sel didefinisikan sebagai peningkatan jumlah sel yang disebabkan karena ada pertumbuhan dan pembelahan sel. Pada pengujian proliferasi sel, dilakukan pengukuran atas tingkat pembelahan sel serta dilakukan pemantauan jumlah sel dari waktu ke waktu dengan menggunakan teknik pewarnaan.<sup>22</sup> Pengujian proliferasi ekstrak etanol daun *G. celebica* L. dilakukan dengan parameter yaitu nilai % *survival rate* atau persentase sel hidup. Tujuan dilakukannya perhitungan % *survival rate* adalah karena reagen WST-8 dapat memberikan perubahan warna sesuai dengan jumlah sel hidup yang dilihat dari aktivitas reduksi dari dehidrogenase selulernya. WST-8 memiliki mekanisme kerja yaitu garam tetrazolium WST-8 akan direduksi oleh dehidrogenase seluler menjadi produk formazan berwarna jingga yang larut dalam media kultur jaringan. Jumlah formazan yang dihasilkan akan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup.<sup>23</sup> Dapat disimpulkan bahwa Semakin besar nilai % *survival rate* maka sel yang hidup

**Tabel 1.** Nilai % *survival rate* dan IC<sub>50</sub> setelah perlakuan dengan ekstrak etanol daun manggu leuweung (*G. celebica* L.) terhadap lini sel CCL-171

Konsentrasi (ppm)	Survival rate (%) dan IC <sub>50</sub> terhadap lini sel CCL-171	
	Ekstrak Etanol	IC <sub>50</sub>
500	1,58 ± 1,48	
250	1,04 ± 0,27	
125	1,92 ± 1,37	
62,50	21,43 ± 0,45	48,48
31,25	82,96 ± 4,58	
15,62	90,20 ± 3,05	
7,81	92,34 ± 5,77	



**Gambar 1.** Grafik rata-rata % *survival rate* Ekstrak etanol *G. celebica* L. pada proliferasi sel CCL-171 (\*\*\*\* $P < 0,0001$  menurut uji t test).

semakin banyak. Pada penelitian ini, nilai % *survival rate* yang dihasilkan menurun seiring dengan peningkatan konsentrasi dari ekstrak etanol daun manggu leuweung.

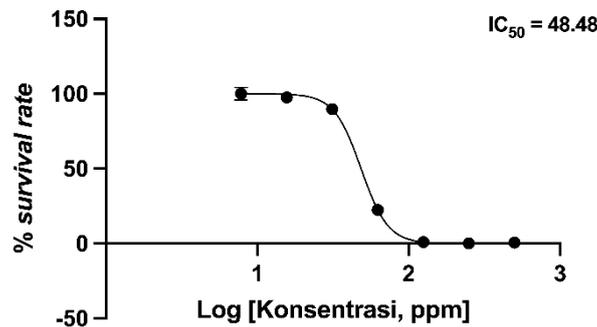
Pada pengujian proliferasi ini digunakan beberapa kontrol, seperti kontrol sel, kontrol medium, dan kontrol positif sebagai pembanding dalam pengujian. Kontrol sel digunakan pada pengujian proliferasi untuk melihat efektivitas dari WST-8 apakah dapat berinteraksi dengan sel hidup atau tidak yang ditandai dengan perubahan warna. Selain itu, digunakan kontrol medium dan diukur absorbansinya, dimana kontrol medium akan memberikan perubahan warna sehingga dapat digunakan dalam perhitungan presentasi sel hidup.

Kontrol positif merupakan kontrol yang digunakan sebagai pembanding dalam pengujian. Pada pengujian proliferasi ini digunakan kontrol positif berupa kojic acid. Kojic acid merupakan senyawa organik yang diproduksi oleh beberapa jenis jamur, seperti *aspergillus* dan *penicillium*. Pada penelitian ini, digunakan kojic acid yang merupakan senyawa organik berupa asam organik polifungsional yang merupakan senyawa aktif antioksidan, sehingga mampu mencegah terjadinya stres oksidatif yang disebabkan karena ketidakseimbangan radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh.<sup>24</sup> Pada penelitian sebelumnya, telah ditemukan

bahwa asam kojat memiliki efek non toksik pada monosit. Asam kojat juga dapat menginduksi perubahan morfologi pada monosit seperti meningkatkan ukuran sel dan meningkatkan diferensiasi monosit menjadi makrofag sehingga mampu bertindak sebagai agen imunomodulator.<sup>25</sup> Penggunaan senyawa organik sebagai kontrol positif didasari untuk melihat apakah sampel uji berupa ekstrak dan fraksi dapat menghasilkan hasil yang positif seperti senyawa organik yang dapat digunakan sebagai agen imunomodulator.

Selain pada monosit, telah dilakukan studi pada sel normal yaitu HGF-1 dan MRC-5 (CCL-171) dimana, asam kojat terbukti memiliki nilai  $IC_{50}$  yang tidak menyebabkan toksik terhadap sel yaitu sebesar  $2123 \pm 14.9 \mu\text{g/mL}$  ( $IC_{50} = \geq 501 \mu\text{g/mL}$ ; senyawa tidak toksik) dan dapat disimpulkan bahwa asam kojat tidak menimbulkan toksik atau berbahaya pada sel normal.<sup>24,26</sup>

Perhitungan persentase sel hidup (% *survival rate*) dari lini sel CCL-171 setelah diberi perlakuan dengan ekstrak etanol pada konsentrasi 7,81; 15,62; 31,25; 62,50; 125; 250; dan 500 ppm selama 24 jam. Peningkatan konsentrasi dari ekstrak etanol daun manggu leuweung secara signifikan menghambat proliferasi sel (Tabel 1). Selain dilakukan perhitungan % *survival rate*, dilakukan perhitungan  $IC_{50}$  dimana  $IC_{50}$  merupakan nilai konsentrasi yang dapat

IC<sub>50</sub> Ekstrak Etanol Daun *G. Celebica*

**Gambar 2.** Nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etanol daun manggu leuweung terhadap lini sel CCL-171

menyebabkan terhambatnya proliferasi sel hingga dapat menyebabkan kematian sel sebesar 50% dari total sampel sel.<sup>27</sup>

Pemberian ekstrak etanol *G. celebica* L. pada konsentrasi konsentrasi 7,81 ppm dinilai mampu mempertahankan proliferasi sel pada CCL-171 dengan % survival rate sebesar  $92,34 \pm 5,77\%$ . Perubahan proliferasi sel terjadi seiring dengan peningkatan konsentrasi. Pada konsentrasi 15,625 ppm dan 31,25 ppm terjadi penurunan % survival rate pada pemberian ekstrak etanol namun penurunan tidak terjadi secara signifikan karena sel masih tetap dapat mempertahankan viabilitas sel diatas 50%. Peningkatan konsentrasi pada pemberian ekstrak etanol *G. celebica* L. dinilai menghambat proliferasi sel terutama pada konsentrasi tinggi. Hal ini dapat dilihat dari penurunan % survival rate yang terus menerus terjadi. Penurunan % survival rate dapat dilihat pada tabel 1

Nilai IC<sub>50</sub> dari ekstrak etanol *G. celebica* menunjukkan bahwa ekstrak etanol memiliki

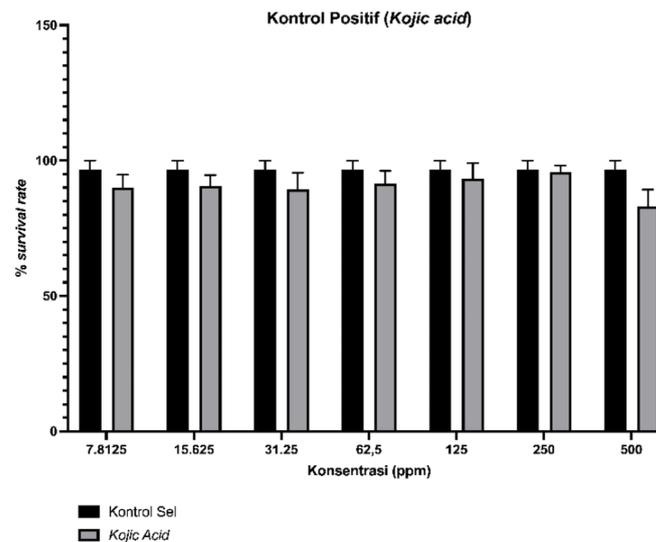
nilai IC<sub>50</sub> pada rentang moderat sitotoksik atau cukup toksik (IC<sub>50</sub> = 21-200 µg/mL; moderat sitotoksik atau cukup toksik). Meskipun dinilai cukup toksik, ekstrak etanol masih dinilai aman dan dapat mempertahankan viabilitas sel dengan dosis dibawah nilai IC<sub>50</sub>, yaitu pada konsentrasi ≤ 31,25 ppm. Meskipun demikian, berdasarkan penelitian sebelumnya, menunjukkan bahwa daun *G. celebica* L. berpotensi sebagai agen sitotoksik terhadap sel kanker MCF-7 dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 82 dan 70 µM setelah pengujian selama 24 dan 48 jam.<sup>12</sup>

Asam kojat merupakan kontrol positif yang digunakan sebagai pembanding dalam pengujian. Pada setiap konsentrasi, asam kojat mampu mempertahankan % survival rate > 50%. Hasil pengujian menunjukkan bahwa kojic acid memiliki aktivitas proliferasi terhadap sel CCL-171. % survival rate dapat dilihat pada tabel 2

Berdasarkan hasil dari nilai % survival rate dari uji proliferasi terhadap sel CCL-

**Tabel 2.** Nilai % survival rate setelah perlakuan dengan kojic acid terhadap lini sel CCL-171

Konsentrasi (ppm)	Survival rate (%)
500	$83,16 \pm 6,10$
250	$95,85 \pm 2,35$
125	$93,30 \pm 5,85$
62,50	$91,41 \pm 4,80$
31,25	$89,30 \pm 6,24$
15,62	$90,66 \pm 3,98$
7,81	$89,99 \pm 4,72$



**Gambar 1.** Grafik rata-rata % survival rate pada sel CCL-171 setelah perlakuan dengan kojic acid

171, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol memiliki aktivitas menstimulasi proliferasi yang berpotensi untuk dikembangkan menjadi agen imunomodulator, yaitu sebagai imunostimulan, yang dapat membantu mengoptimalkan respon imun dalam pemeliharaan kesehatan, pencegahan serta pemulihan penyakit dengan cara meningkatkan kekuatan sistem imun.<sup>8,28</sup> Hal ini didasari oleh beberapa penelitian mengenai metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak etanol flavonoid yang berperan sebagai anti-inflamasi dan senyawa terpenoid yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang tinggi sehingga dapat memberikan peran preventif dalam melindungi terhadap generasi radikal bebas dan melindungi tubuh dari penyakit yang dipicu oleh stres oksidatif.<sup>11,29</sup>

Terapi dengan menggunakan agen imunomodulator dapat memberikan terapi alternatif bagi berbagai kondisi seperti memberikan efek antitumor dengan meningkatkan pertahanan inang mekanisme melawan tumor, memberikan mekanisme pertahanan dalam kondisi khusus seperti autoimun.<sup>30</sup> Selain menjadi terapi alternatif, imunomodulator dapat dijadikan sebagai adjuvant terapi sehingga dapat menurunkan kejadian efek samping obat, meningkatkan imunitas tubuh pasien, serta meningkatkan keberhasilan terapi. Limitasi pada penelitian ini terdapat pada perlunya optimasi untuk mengetahui konsentrasi lipopolisakarida yang sesuai untuk dapat menginduksi

inflamasi dan menyebabkan penurunan % survival rate pada sel sebelum dilakukan penelitian lanjutan. Penelitian lanjutan perlu dilakukan dalam upaya pemanfaatan dan pengembangan agen imunomodulator dari ekstrak etanol daun manggu leuweung (*G. celebica*) yang diharapkan dapat dijadikan sebagai pengobatan alternatif atau tambahan dengan efek samping yang lebih kecil dibanding dengan pengobatan dengan menggunakan obat konvensional.

## 5. Simpulan

Persen proliferasi sel lini paru normal (CCL-171) yang diberi perlakuan ekstrak daun manggu leuweung (*Garcinia celebica* L.) dengan variasi konsentrasi 7,81 ppm, 15,62 ppm, 31,25 ppm, 62,50 ppm, 125 ppm, 250 ppm, dan 500 ppm secara berturut-turut adalah sebagai berikut:

Ekstrak:  $92,34 \pm 5,77\%$ ;  $90,20 \pm 3,05\%$ ;  $82,96 \pm 4,58\%$ ;  $21,43 \pm 0,45\%$ ;  $1,92 \pm 1,37\%$ ;  $1,04 \pm 0,27\%$ ;  $1,58 \pm 1,48\%$ .

## Daftar Pustaka

1. Soares MP, Teixeira L, Moita LF. Disease Tolerance and Immunity in Host Protection Against Infection. *Nat Rev Immunol*. 2017 Feb 3;17(2):83–96.
2. Chauhan S, Jena KK, Mehto S, Chauhan NR, Sahu R, Dhar K, et al. Innate Immunity and Inflammophagy: Balancing the Defence and Immune Homeostasis. *FEBS J*.

- 2022 Jul 14;289(14):4112–31.
3. Chowdhury MA, Hossain N, Kashem MA, Shahid MdA, Alam A. Immune Response in COVID-19: A Review. *J Infect Public Health*. 2020 Nov;13(11):1619–29.
  4. Hirayama D, Iida T, Nakase H. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2017 Dec 29;19(1):92.
  5. Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt. *Roitt's Essential Immunology*. 13th ed. Oxford: John Wiley and Sons; 2017.
  6. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editors. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed. New York: McGraw-Hill; 2006.
  7. Catanzaro M, Corsini E, Rosini M, Racchi M, Lanni C. Immunomodulators Inspired by Nature: A Review on Curcumin and Echinacea. *Molecules*. 2018 Oct 26;23(11):2778.
  8. Shukla S, Bajpai VK, Kim M. Plants as potential sources of natural immunomodulators. Vol. 13, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2014. p. 17–33.
  9. Jantan I, Ahmad W, Bukhari SNA. Plant-derived immunomodulators: An insight on their preclinical evaluation and clinical trials. Vol. 6, *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Research Foundation; 2015.
  10. Pasaribu YP, Fadlan A, Fatmawati S, Ersam T. Biological activity evaluation and in silico studies of polyprenylated benzophenones from *Garcinia celebica*. *Biomedicines*. 2021 Nov 1;9(11).
  11. Latief M. KARAKTERISASI SENYAWA DARI FRAKSI AKTIF ANTIBAKTERI DAUN *Garcinia celebica* linn (Kandis). 2015;1(1):1–6.
  12. Subarnas A, Diantini A, Abdulah R, Zuhrotun A, Nugraha PA, Hadisaputri YE, et al. Apoptosis-mediated antiproliferative activity of friedolanostane triterpenoid isolated from the leaves of *Garcinia celebica* against MCF-7 human breast cancer cell lines. *Biomed Rep*. 2016 Jan 1;4(1):79–82.
  13. Ansori A, Fadholly A, Hayaza S, Susilo R, Inayatillah B, Winarni D, et al. A Review on Medicinal Properties of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2020;13:974–82.
  14. Purbowati R, Ersam T. Exploration of Phenolic Compound from The Stem Bark of *Garcinia latissima* Miq. *Jurnal Sains dan Seni ITS*. 2019;8(2):12–4.
  15. Martel J, Ojcius DM, Chang CJ, Lin CS, Lu CC, Ko YF, et al. Anti-obesogenic and antidiabetic effects of plants and mushrooms. Vol. 13, *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 149–60.
  16. Kurniawan A, Parikesit. Tree species distribution along the environmental gradients in Pananjung Pangandaran Nature Reserve, West Java. *Biodiversitas* [Internet]. 2008 Sep 16;9(4). Available from: <https://smujo.id/biodiv/article/view/357>
  17. Tan WN, Tan ZH, Zulkifli NI, Nik Mohamed Kamal NNS, Rozman NAS, Tong WY, et al. Sesquiterpenes rich essential oil from *Garcinia celebica* L. and its cytotoxic and antimicrobial activities. *Nat Prod Res*. 2020;34(23):3404–8.
  18. Widyowati R, Rahman A. Kandungan Kimia dan Aktivitas Antimikroba Ekstrak *Garcinia Celebica* l. terhadap *Staphylococcus Aureus*, *Shigella Dysenteriae* dan *Candida Albicans*. *Majalah Farmasi Airlangga*. 2010;8(2):23–7.
  19. Guiotto M, Raffoul W, Hart AM, Riehle MO, Di Summa PG. Human platelet lysate to substitute fetal bovine serum in hMSC expansion for translational applications: A systematic review. Vol. 18, *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central Ltd; 2020.
  20. ECACC. CO2 concentration and pH control in the cell culture laboratory [Internet]. 2019 [cited 2023 Jan 19]. Available from: <https://www.culturecollections.org.uk/news/ecacc-news/co2-concentration-and-ph-control-in-the-cell-culture-laboratory.aspx#:~:text=CO2%20is%20not%20a,stable%20physiological%20pH%20through%20the>

21. ECACC. General Cell Collection Detail ECACC General Cell Collection: MRC-5 pd13 European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) ECACC General Collection MRC-5 pd13 [Internet]. 2022. Available from: [www.nibsc.org](http://www.nibsc.org)
22. Merck. Cell Viability and Proliferation Assays [Internet]. Merck. 2022 [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/ID/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/imaging-analysis-and-live-cell-imaging/cell-viability-and-proliferation>
23. Dojindo. Cell Counting Kit-8 Technical Manual Cell Proliferation Assay and Cytotoxicity Assay [Internet]. 2016. Available from: <http://www.dojindo.eu.com/>
24. Karakaya G, Ercan A, Öncül S, Aytemir MD. Kojic acid derivatives as potential anticancer agents: Synthesis and cytotoxic evaluation on A375 human malignant melanoma cells. *Journal of Research in Pharmacy*. 2019;23(4):596–607.
25. Da Costa JP, Rodrigues APD, Farias LHS, Frade PCR, Da Silva BJM, Do Nascimento JLM, et al. Biological effects of kojic acid on human monocytes in vitro. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018 May 1;101:100–6.
26. Nguyen NH, Hoai Ta QT, Pham QT, Han Luong TN, Phung VT, Duong TH, et al. Anticancer activity of novel plant extracts and compounds from *Adenosma bracteosum* (Bonati) in human lung and liver cancer cells. *Molecules*. 2020 Jun 1;25(12).
27. Haryoto, Muhtadi, Indrayudha P, Azizah T, Suhendi A, Pos T. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol (Haryoto dkk) AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL TUMBUHAN SALA (*Cynometra ramiflora* Linn) TERHADAP SEL HeLa, T47D dan WiDR. *Jurnal Penelitian Saintek*. 2013;18(2):21–8.
28. Swaroop AK, Motamarri Venkata Naga Lalitha C, Shanmugam M, Subramanian G, Natarajan J, Selvaraj J. Plant Derived Immunomodulators; A Critical Review. *Adv Pharm Bull*. 2021 Oct 2;
29. Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. In: *Proceedings of the Nutrition Society*. 2010. p. 273–8.
30. Singh N, Tailang M, Mehta SC. A REVIEW ON HERBAL PLANTS AS IMMUNOMODULATORS. *Int J Pharm Sci Res* [Internet]. 2016;7(9):3602. Available from: <http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7>