

UJI SITOTOKSISITAS MICROTETRAZOLIUM(MTT) HASIL DEGRADASI GLUKOMANNAN SECARA ENZIMATIS β -MANNANASE DAN IRRADIASI GAMMA PADA SEL RAW 264.7

MICROTETRAZOLIUM (MTT) CYTOTOXICITY TEST RESULTS OF GLUCOMANNAN DEGRADATION BY ENZYMATIC β -MANNANASE AND GAMMA IRRADIATION ON RAW 264.7 CELLS

Nuraini Nuraini^{1,2*}, Effionora Anwar³, Dian Ratih Laksmiawati³, Hendig Winarno^{3,4}

¹Program Doktor Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta Selatan, DKI Jakarta

²Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah A.R. Fachruddin, Tangerang, Banten

³Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta Selatan, DKI Jakarta

⁴Pusat Riset Teknologi Radiasi, Lembaga Penelitian Tenaga Nuklir, Badan Riset dan Inovasi Nasional, KST BJ Habibie, Tangerang Selatan, Banten

*Corresponding Author Email : nuraini.apt@unimar.ac.id

DOI : <http://dx.doi.org/10.47653/farm.v11i2.767>

ABSTRAK

Glukomanan adalah polisakarida hemiselulosa dengan rantai glukosa dan mannanosa. Glukomanan mempunyai banyak manfaat dalam bidang kesehatan, seiring dengan besarnya manfaat glukomanan perlunya ditetapkan dosis yang aman untuk digunakan. MTT banyak digunakan untuk menguji aktivitas metabolisme sel dan menyimpulkan proses sekunder atau keadaan sel seperti viabilitas. Penelitian ini bertujuan untuk menetapkan konsentrasi batas aman penggunaan glukomanan serta glukomanan hasil degradasi enzim dan iradiasi gamma pada sel RAW 264.7. Metode pengujian menggunakan uji sitotoksitas MTT. Hasil viabilitas dari dosis 200 $\mu\text{g/mL}$ pada semua sample $\leq 88\%$, dosis 100 $\mu\text{g/mL}$ pada semua sample $\leq 98\%$, dan dosis 50 $\mu\text{g/mL}$ pada semua sample $\leq 120,5\%$. Kesimpulan yang didapat bahwa hasil viabilitas yang berada pada rentang 80 – 100% diperoleh pada konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$, sehingga konsentrasi penggunaan glukomanan dan hasil degradasi glukomanan yang aman ditetapkan pada konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$.

Kata Kunci : Glukomanan, Enzimatis, Irradiasi Gamma, Sitotoksitas, MTT

ABSTRACT

Glucomannan is a hemicellulose polysaccharide with glucose and mannose chains. Glucomannan has many benefits in the health sector, along with the large benefits of glucomannan, it is necessary to determine a dose that is safe for use. MTT is widely used to examine cell metabolic activity and infer secondary processes or cell states such as viability. This research aims to determine the safe limit concentration for the use of glucomannan and glucomannan resulting from enzyme degradation and gamma irradiation in RAW 264.7 cells. The test method uses the MTT cytotoxicity test. The viability results from a dose of 200 $\mu\text{g/mL}$ in all samples were $\leq 88\%$, a dose of 100 $\mu\text{g/mL}$ in all samples $\leq 98\%$, and a dose of 50 $\mu\text{g/mL}$ in all samples $\leq 120.5\%$. The conclusion was that viability results in the range of 80 – 100% were obtained at a concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$, so that the safe concentration of glucomannan use and glucomannan degradation results was set at a concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: *Glucomannan, Enzymatic, Gamma Irradiation, Sitotoksitas, MTT*

PENDAHULUAN

Glukomanan merupakan polisakarida dari jenis hemiselulosa yang terdiri dari ikatan rantai glukosa dan mannanosa (Aryanti, 2015). Manfaat glukomanan dalam kesehatan sangat banyak antara lain sebagai antioksidan alami,

antiinflamasi (Faber dkk, 2012 and Baerova dkk, 2009), sumber karbohidat berindeks glikemik rendah (Laksmiawati dkk, 2017), sumber prebiotik, immunomodulator (Baerova dkk, 2009 , Nissa C dkk, 2016, Zhou dkk,

2021, Cinelli dkk, 2020) anti fatigue (Zheng Y dkk, 2018), anti virus (Akhtar dkk, 2016), dapat menurunkan kolesterol LDL dan kolesterol non-HDL (Vi H dkk, 2017), penyembuhan luka diabetes (Veerasubramanian dkk, 2009) antiobesitas (Nissa C dkk, 2016).

Sel makrofag RAW 264.7 diisolasi dari tumor virus leukimia Albelson marine pada mencit jantan. Sel ini terdapat dalam bentuk dibekukan dan harus disimpan dalam kondisi penyimpanan yang sesuai. Sel RAW 264.7 mampu melakukan pinositosis fagositosis. Makrofag merupakan sistem pertahanan utama (Sujono dkk, 2021). Reaktan MTT adalah garam monotetrazolium. Inti cincin tetrazole quartener bermuatan positif mengandung empat atom nitrogen yang dikelilingi oleh tiga cincin aromatik, termasuk satu cincin tiazolil dan dua gugus fenil. Cincin inti tetrazole terganggu dan molekul tidak larut dalam air ungu-biru yang disebut formazan dibentuk karena pengurangan MTT. Selain sangat berguna untuk menguji aktivitas sel, pengujian ini semakin banyak digunakan untuk menentukan proses sekunder atau keadaan sel seperti viabilitas (Ghasemi dkk, 2021).

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan dengan menguji sitotoksitas microtetrazolium (MTT) pada glukomannan serta hasil degradasi glukomannan dan irradiasi gamma yang diujikan secara invitro pada sel RAW 264.7. Sample yang digunakan merupakan glukomannan serta glukomannan hasil degradasi menggunakan enzim β -mannanase pada pH 7, pH 5,5, pH 9 dan glukomannan hasil irradiasi gamma dosis 20 kGy dan dosis 40 kGy.

Alat

Biological Safety Cabinet (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II), Microplate reader (TECAN, Infinite® 200 PRO), Inkubator CO2 (ThermoIH3543), Centrifuge 5430 R (Eppendorf), Microscope inverted (Olympus CKX41-F32FL), Pipet gun (Thermo Scientific), Micro ELISA Plate (Elabscience), Plate sealer (Elabscience).

Bahan

Sel RAW 264.7 (ECACC 91062702), Dulbecco's modified Eagle's medium High Glucose/DMEM High Glucose (Gibco, Amerika), Fetal bovine serum Premium/FBS

(Biowest, Eropa), Antibiotic dan Antimycotic/ABAM (Sigma Aldrich, Amerika).

Metode

1. Kultur sel RAW 264.7

a. Thawing sel RAW 264.7

Sel dikeluarkan dari botol dalam freezer pada suhu -80°C kemudian dicairkan selama dua menit di dalam waterbath pada suhu 37°C . Sel dimasukkan ke dalam centrifuge tube 15 mL berisi dengan 4 mL medium kultur. Medium kultur sel RAW 264.7 dibuat dengan menggabungkan medium basal DMEM tinggi glukosa, 1% antibiotik dan antimikotik dan 10% FBS. Selama 5 menit sel disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm. Supernatan dibuang, lalu pelet dicampur dengan 4 mL media kultur. Suspensi sel dimasukkan ke dalam flask T25. Sel diinkubasi dalam inkubator 5% dengan CO_2 , bersuhu 37°C .

b. Subkultur sel Raw 264.7

Sel-sel yang telah tumbuh pada flask T25 diamati di bawah mikroskop inverted hingga menggabungkan sekitar 70 – 80% dalam flask T25. Kultur tengah dibuang kemudian dibilas dengan PBS1 x dan sel-sel yang terikat dilepaskan dengan scrapper. Untuk memastikan bahwa sel benar-benar terlepas dari flask, pengujian dilakukan dengan menggunakan mikroskop inverted. Kemudian suspensi sel dimasukkan ke dalam tabung centrifuge 15 mL. Tabung disentrifugasi selama lima menit dengan kecepatan 1500 rpm dan supernatan dikeluarkan. Pellet diresuspensi dengan 1 mL medium kultur. Ambil 100 μL suspensi sel dan menambahkan 100 μL pewarna trypan blue (1: 1) ke dalam pipet 1,5 mL, campuran suspensi hingga tercampur merata. Selanjutnya sebanyak 10 μL suspensi sel dan trypan blue ditaruh ke hemositometer. Hemositometer diamati di bawah mikroskop inverted untuk selanjutnya dihitung jumlah sel yang hidup. Pewarna typan blue hanya dapat menembus membran sel yang rusak, ini menunjukkan bahwa sel mati akan berwarna biru oleh trypan blue sementara sel hidup tidak berwarna

biru. Jumlah densitas sel yang kita peroleh (jumlah sel yang hidup) memungkinkan kita untuk menentukan berapa jumlah sel yang akan kita tanam di dalam flask yang tersedia. Densitas sel sebanyak kurang lebih $1,0 \times 10^6$ sel/mL akan dimasukkan ke dalam satu flask T25. Jika jumlah sel kurang atau sama dengan $2,0 \times 10^6$ sel/mL maka suspensi sel tersebut akan dimasukkan dalam flask T75. Setelah suspensi sel dimasukkan dalam flask yang sesuai, sel kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C. Selama perawatan sel, medium pertumbuhan diganti atau ditambah setiap 2-3 hari sekali.

2. Uji Sitotoksik metode MTT Assay

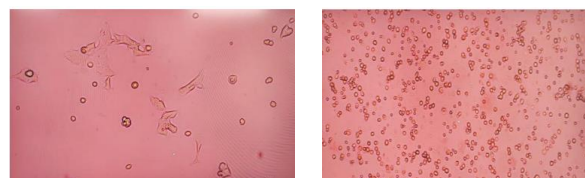
Sel RAW 264.7 ditanam dengan kepadatan 1×10^4 sel/well sebanyak 100 µL pada plat 96 well. Setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan 5% CO₂, sample 100 µL (200; 100 dan 50 µg/mL) ditambahkan ke dalam setiap well dan diinkubasi lagi selama 24 jam pada suhu 37°C dan 5% CO₂. Keesokan harinya 100 µL dari campuran suspensi sel dan sample yang telah diinkubasi selama 24 jam ditambahkan ke dalam larutan MTT. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan pembaca mikroplate yang dapat dibaca pada panjang gelombang 540 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil kultur sel RAW 264.7

Proses kultur sel terjadi pada saat sel masih hidup dan ditempatkan dalam suatu media supaya sel tersebut berkembang dan tumbuh secara in vitro. Proses pertumbuhan sel membutuhkan suatu media untuk memenuhi nutrisi pada sel (Andiana, 2017). Pada penelitian ini sel yang digunakan merupakan sel RAW 264.7, sel ini mampu melakukan pinositosis fagositosis (Taciak, 2018). Pada kultur sel RAW 264.7 perlu digunakan media sebagai tempat pertumbuhan dan untuk memenuhi nutrisi pada sel RAW 264.7. Penambahan DMEM digunakan untuk menambah nutrisi pada sel, penambahan FBS digunakan sebagai serum untuk meningkatkan faktor pertumbuhan, dan penambahan antibiotik serta antimikotik berguna untuk mengurangi jumlah kontaminasi fungi dan bakteri (Syahidah et al, 2016). Gambar 1

menunjukkan sel RAW 264.7 sesudah dilakukan subkultur dan sudah confluent 80% sehingga dapat digunakan untuk dilakukan pengujian.



Gambar 1. Sel RAW 264.7 perbesaran 40x

Hasil uji sitotoksik MTT Assay

Pengujian aktivitas bahan dengan menggunakan *cell line* perlu dilakukan uji sitotoksitas untuk menetapkan konsentrasi bahan yang aman pada sel tersebut, dalam hal ini menggunakan sel RAW 264.7. Uji sitotoksitas dengan metode Methyl Tiazolydiphenyl Tetrabromide (MTT) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji sitotoksitas Glukomannan dan hasil degradasinya terhadap viabilitas sel

Hasil degradasi glukomannan dari perlakuan Konsentrasi (µg/mL)	Viabilitas (%)	
Ir 20	200	66
	100	74,3
	50	85,9*
Ir 40	200	70,1
	100	80
	50	90,5*
pH 9 suhu 45	200	42,5
	100	51,8
	50	69,1
pH 7 suhu 45	200	71,2
	100	93,1*
	50	92,2*
pH 5,5 suhu 45	200	68,3
	100	74,8
	50	93,6*
Glukomannan	200	88
	100	98*
	50	120,5

Prinsip metode MTT adalah bahwa pengukuran dilakukan secara kolorimetri dan kristal formazan yang tidak larut berwarna ungu terbentuk dari reaksi reduksi tetrazolium yang sifatnya larut dalam air, yang menghasilkan larutan berwarna kuning. Pada sel yang masih hidup garam formazan dipecah

oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium membentuk formazan yang larut. membaca absorbansi dari formazan yang dihasilkan dengan microplate reader digunakan untuk mengetahui besarnya potensi aktivitas bahan alam (Amir et al, 2017). Berdasarkan hasil uji sitotoksitas yang telah dilakukan pada glukomannan serta hasil degradasi glukomannan enzimatis dan iradiasi gamma hasil viabilitas yang berada pada rentang 80% sampai 100% terlihat pada hasil iradiasi gamma dosis 20 kGy (Ir 20) dan hasil degradasi enzimatis pH 5,5 pada konsentrasi 50 µg/mL, hasil iradiasi gamma dosis 40 kGy (Ir 40) , hasil degradasi enzimatis pH 7 dan glukomannan pada konsentrasi 50 µg/mL sampai 100 µg/mL, sedangkan degradasi enzimatis pH 9 tidak ada yang menunjukkan rentang viabilitas yang dipersyaratkan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil uji sitotoksitas menggunakan MTT assay pada sel RAW 264.7 dapat diambil kesimpulan, konsentrasi glukomannan serta glukomannan hasil degradasi enzimatis maupun hasil iradiasi gamma yang optimal dan aman digunakan adalah penggunaan pada konsentrasi 50 µg/mL dengan rentang persen viabilitas 80% sampai 120,5%.

DAFTAR PUSTAKA

- Aryanti, N., Abidin, Y. K. 2015. Ekstraksi Glukomannan dari Porang Lokal. *Metana*;11(01): 21-30
- Faber, T. A., Dilger, R. N., Hopkins, A. C., Price, N. P., Jr. GCF. 2012. The Effects of a Galactoglucomannan Oligosaccharide-arabinoxylan (GGMO-AX) Complex In Broiler Chicks Challenged with *Eimeria acervulina* 1. *Poult Sci.* 91(5):1089-96
- Bauerová, K., Paulovi, E., Mihalová, D., Š. K., Poni, S. 2009. Study of New Ways of Supplementary and Combinatory Therapy of Rheumatoid Arthritis with Immunomodulators. Glucomannan and Imunogluván® In Adjuvant Arthritis. *Toxicol Ind. Health.*: 329-35
- Laksmiawati, Prilasari, R. D., Alia, S., Marwati, U. 2017. Nilai Indeks Glikemik dan Indeks Transit Usus Tepung Porang (*Amorphophallus muelleri* Blume.) pada Mencit Putih. *J. Farm. Indones.* 7;9: 317-23.
- Nissa, C., Madjid, I. J. 2016. Potensi glukomannan pada Tepung Porang Sebagai Agen Anti-obesitas pada Tikus dengan Induksi Diet Tinggi Lemak. *J. Gizi. Klin. Indones.* (1): 1-6.
- Zhou, Y., Qian, C., Yang, D., Tang, C., Xu, X., Liu, E. H., et al. 2020. Purification, Structural Characterization and Immunomodulatory Effects of Polysaccharides from *Amomum villosum* Lour. On raw 264.7 Macrophages. *Molecules* 26(9): 2672
- Cinelli, M. A., Do, H. T., Miley, G. P., Silverman, R. B. 2020. Inducible Nitric Oxide Synthase: Regulation, Structure, and Inhibition. *Med. Res. Rev.* 40(1): 158-89.
- Zeng, Y., Zhang, J., Zhang, Y., Men, Y., Zhang, B., Sun, Y. 2018. Prebiotic, Immunomodulating, and Antifatigue Effects of Konjac Oligosaccharide. *J. Food Sci.* 0(0):1-8.
- Akhtar, T., Ara, G., Ali, N., Ud Din Mufti, M., I. K. 2016. Effects of Dietary Supplementation of Mannan-oligosaccharide on Virus Shedding in Avian Influenza (H9N2) Challenged Broilers. *Iran J. Vet. Res.* 17(4): 268-72.
- Vi, H., Ho, T., Jovanovski, E., Zurbau, A., Mejia, S. B., Sievenpiper, J. L., et al. 2017. A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials of The Effect of Konjac Glucomannan , A Viscous Soluble Fiber , On LDL Cholesterol and The New Lipid Targets Non-HDL Cholesterol and Apolipoprotein B. *AJCN.* (C): 1-9.
- Veerasubramanian, P. K., Ponrasu, T., Kannan, R., Chakraborty, S., Ramachandran, B., Suguna, L., et al. 2018. An Investigation of Konjac Glucomannan-keratin Hydrogel Scaffold Loaded with *Avena sativa* Extracts for Diabetic Wound Healing [Internet]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* Elsevier B.V.; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.02.022>
- Sujono, T. A., Kusumowati. I. T. D., Munawaroh, R. 2021. Aktivitas Immunomodulator Ekstrak Metanol dan Fraksi Buah Talok (*Muntingia calabura* L.) pada Sel RAW 264.7. *J. Pharm. Sci. Clin. Res.*6(2): 82.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., Kempson, I. 2022. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int. J. Mol.*

- Sci. Available from:
<https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Andiana, M. 2017. Kultur Sel Baby Hamster Kidney (BHK) Menggunakan Media Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). *Biotropic. J. Trop. Biol.* 1(1): 1–8.
- Taciak, B., Białasek, M., Braniewska, A., Sas, Z., Sawicka, P., Kiraga, Ł., *et al.* 2018. Evaluation of Phenotypic and Functional Stability of RAW 264.7 Cell Line Through Serial Passages. *PLoS One.*13(6): 1–13.
- Syahidah, H. N., Hadisaputri, Y. E. 2016. Review Artikel: Media Yang Digunakan Pada Kultur Sel. *Farmaka*, 14(3): 27–36. Available from:
<http://jurnal.unpad.ac.id/farmaka/article/view/10615>
- Amir, H., Murcitra, B. G. 2017. Uji Microtetrazolium (MTT) Ekstrak Metanol Daun *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7. *Alotrop.* 1(1): 27–32.