

Evaluasi Potensi Toksisitas Seluler Ekstrak Daun Benger (*Lagerstroemia ovalifolia* Teijsm. & Binn) menggunakan Uji Microtetrazolium (MTT) pada Kultur Sel RAW 264.7

Weri veranita^{1*}, Effionora Anwar², Ni Made Dwi Sandhiutami³, Agung Eru Wibowo^{2,3}

^{1,4} Program Doktor Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta Selatan, DKI Jakarta

² Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional Organisasi Riset Kesehatan BRIN, KST BJ Habibie, Tangerang Selatan, Banten.

³Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta Selatan, DKI Jakarta

⁴ Prodi Sarjana Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Indonesia Maju, Jakarta Selatan, DKI Jakarta

e-mail: *¹weri.veranita@gmail.com

Article Info

Article history:

Submission Juni 2025

Review Juli 2025

Accepted September 2025

Abstrak

Tanaman Daun Benger (Lagerstroemia ovalifolia Teijsm. & Binn) merupakan salah satu tanaman lokal yang secara empiris digunakan dalam pengobatan tradisional. Namun saat ini belum tersedia data ilmiah yang memadai terkait aspek keamanannya, sehingga pemanfaatan lebih lanjut dalam pengembangan obat herbal masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis profil keamanan ekstrak etanol 70% daun benger secara in vitro sebagai dasar pengembangan produk herbal. Ekstrak benger diperoleh melalui ekstraksi dengan metode perkolasi dan diuji toksisitas selulernya menggunakan metode MTT assay pada kultur sel RAW 264.7. Hasil uji menunjukkan bahwa rentan konsentrasi 25-100 µg/mL. Ekstrak daun benger tidak menunjukkan efek toksisitas terhadap sel RAW 264.7, sedangkan pada konsentrasi lebih tinggi (hingga 200 µg/mL) mulai menunjukkan kategori toksisitas sedang. Studi ini memberikan informasi awal mengenai profil keamanan ekstrak daun Benger, dan dapat menjadi landasan penelitian selanjutnya terkait pengembangan obat herbal yang lebih aman dan efektif.

Kata kunci— *Lagerstroemia ovalifolia Teijsm. & Binn, MTT assay, RAW 264,7, Sitotoksitas*

Ucapan terima kasih:

Abstract

The Benger Leaf Plant (Lagerstroemia ovalifolia Teijsm. & Binn) is one of the local plants that has been empirically used in traditional medicine. However, there is currently insufficient scientific data regarding its safety aspects, limiting its further utilization in the development of herbal medicines. This study aims to analyze the safety profile of 70% ethanol extract of Benger leaves in vitro as a basis for the development of herbal products. The Benger extract was obtained through percolation extraction and its cellular toxicity was tested using the MTT assay on RAW 264.7 cell culture. The test results showed that the concentration range of 25–100 µg/mL was toxic. Benger leaf extract did not show any toxic effects on RAW 264.7 cells, while at higher concentrations (up to 200 µg/mL) it began to show moderate toxicity. This study provides initial information on the safety profile of benger leaf extract and can serve as a foundation for further

research on the development of safer and more effective herbal medicines.

Keyword – *Lagerstroemia ovalifolia* Teijsm. & Binn, MTT assay, RAW 264.7, Cytotoxicity

DOI

©2020 Politeknik Harapan Bersama Tegal

Alamat korespondensi:

Prodi DIII Farmasi Politeknik Harapan Bersama Tegal

Gedung A Lt.3. Kampus 1

Jl. Mataram No.09 Kota Tegal, Kodepos 52122

Telp. (0283) 352000

E-mail: parapemikir_poltek@yahoo.com

p-ISSN: 2089-5313

e-ISSN: 2549-5062

A. Pendahuluan

Indonesia dikenal sebagai salah satu negeri megabiodiversitas dengan kekayaan hayati yang sangat melimpah termasuk tanaman obat tradisional yang digunakan secara turun-temurun oleh Masyarakat sebagai bagian dari pengobatan tradisional. [1] Potensi ini merupakan aset strategis dalam mendukung ketahanan dan kemandirian industri farmasi nasional. Seiring perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, kapasitas riset menjadi kunci dalam mewujudkan penguasaan terhadap bahan alam lokal yang potensial. Salah satu tanaman lokal yang memiliki potensi besar namun belum banyak dieksplorasi secara ilmiah adalah daun benger (*Lagerstroemia ovalifolia* Teijsm. & Binn). Tanaman ini telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional, Daun benger memiliki nilai komersial yang telah digunakan sebagai obat dan memiliki sifat antiinflamasi [2] Berdasarkan penelitian pendahuluan pengujian secara *in silico* menunjukkan bahwa tanaman benger memiliki potensi sebagai antiinflamasi dalam menghambat COX-1 yang mempengaruhi regulasi peradangan. Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun benger dapat digunakan sebagai obat penenang dan pengobatan inflamasi. Tanaman ini memberikan efek antiinflamasi yang diinduksi dengan Liposakarida (LPS) pada makrofag RAW 264,7. Ekstrak Metanol daun benger juga dapat memberikan efek perbaikan respon inflamasi pada saluran pernafasan tikus yang memiliki cedera paru akut [3][4] Pengembangan obat herbal berbasis bahan alam memerlukan pendekatan ilmiah yang sistematis. Setiap obat yang akan diproduksi dan dipasarkan harus memenuhi syarat keamanan (Safety), Mutu (quality) dan Khasiat (efficacy) sehingga tidak menimbulkan resiko yang membahayakan penggunaannya. Dan untuk memenuhi syarat aman tersebut harus melalui rangkaian uji toksisitas [5] Salah satu faktor yang perlu diperhatikan yaitu keamanan bahan obat yang dapat dilihat dari toksisitasnya. [4] [6] Toksisitas didefinisikan sebagai sejauh mana suatu zat (toksin atau racun) dapat membahayakan manusia atau hewan [6]

Salah satu Langkah awal yang sangat penting adalah analisis toksisitas terhadap bahan aktif yang digunakan. Studi toksisitas untuk obat toksisitas *in vitro* dan *in vivo* merupakan metode utama dalam menentukan Tingkat keamanan senyawa herbal sebelum masuk kedalam tahap formulasi atau uji klinik. [7][8] Uji toksisitas pada Tingkat sel seperti uji toksisitas dan viabilitas sel dapat digunakan dalam menganalisis potensi resiko yang terkait dengan ekstrak herbal dalam mempengaruhi viabilitas sel dan juga memungkinkan identifikasi, analisis dan pengujian pada berbagai senyawa alami bioaktif. [7][9] Uji *in vitro* yang dilakukan sebelum uji *in vivo* dst] Pada penelitian ini digunakan metode uji toksisitas menggunakan methyl-thiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) yang dapat dengan mudah diserap oleh sel hidup melalui interaksi elektrostatis, MTT berwarna kuning direduksi oleh sel hidup menjadi kristal formazan berwarna ungu. [9][6]

B. Metode

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan pendekatan deskripsip melalui uji *In vitro*

Alat dan Bahan

Sel yang digunakan adalah Cell line makrofag RAW 264.7, Tanaman yang digunakan adalah

Alat : Seperangkat alat perkolasi, ELISA reader (Synergy, HTX), Mikropipet, Timbangan analitik (Sartorius), lemari pendingin, blender (kirin®), Magnetic stirrer, Evaporator (Buchi Rotavapor R-220). alat-alat gelas, alat-alat volumetric, pipet tetes, kaca objek, kertas saring, tisu, cawan penguap. Flask T25, Tip mikropipet kuning 200 uL, Tip mikropipet biru 1000 uL, Mikro plate 96 well, flat bottom, Nunc, sterile, 10 mL Serological Pipette.

Bahan : Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (Gibco-15140-122), DMEM High Glucose, (Gibco-12100-046), Etanol 70%, pakan tikus protein sedang, alas kandang individual. PBS

Metode ekstraksi yang digunakan yakni ekstraksi Perkolasi dengan waktu 5 jam dan rasio pelarut 1:15 menggunakan etanol 70%. Esktrak kental yang didapat dikentalkan

dengan rotary evaporator. Ekstrak yang didapat kemudian di encerkan menggunakan DMSO 1% hingga konsentrasi yang diinginkan.

Pengujian toksisitas secara in vitro [9]

Sub Kultur sel RAW 246.7.

Sel-sel yang sebelumnya telah di thawing dan ditanaman pada flask T25 dengan penambahan nutrisi DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) dan FBS (Fetal Bovine serum Premium). DMEM merupakan media kultur dengan kandungan asam amino, vitamin dan glikosa dalam konsentrasi tinggi, komposisi ini sangat mendukung proses metabolisme, pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel selama pemeliharaan di laboratorium termasuk pada pengujian viabilitas seperti MTT. [10]

Sel diamati dibawah bawah mikroskop untuk memastikan sel telah tumbuh. Kultur sel kemudian dibuang dan dicuci dengan menggunakan PBS 1 kali untuk melepaskan sel-sel yang terikat. Suspensi sel dimasukkan kedalam tabung sentrifugasi 15mL. tabung kemudian dicentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 1200rpm. Setelah 5 menit supernatan dibuang hingga menyisahkan pellet sel. Pellet diresuspensikan Kembali dengan menambahkan 1 mL medium kultur.

Sebanyak 20 µL suspense sel diambil dan ditambahkan dengan medium kultur sebanyak 180 µL, Hingga volume 200 µL kemudian diresuspensi. 20 µL suspense sel kemudian diambil kembali dan tambahkan trypan blue perbandingan 1 : 1 hingga tercampur merata. Campuran sel dan trypan blue diletakkan pada hemasitometer kurang lebih 10 µL dan diamati dibawah mikroskop inverter dan dihitung jumlah sel hidup. Dengan rumus :

$$\text{Jumlah sel/ml} = \text{Rata-rata jumlah sel/kuadran} \times \text{faktor pengenceran} \times 10^4$$

Plating sel RAW 264.7 plating cell line makrofag RAW 264.7 (1 x 10⁵ cells/well dalam 100 µL media kultur) pada 96-well plate dan diinkubasi didalam inkubator dengan kondisi suhu 37° C dan 5% CO₂ selama 24 jam. Pemberian sampel uji Setelah sel diinkubasi selama 24 jam, medium kultur dibuang, diganti dengan 100 µL. media/well yang mengandung sampel, sedangkan untuk

kontrol negatif ditambah dengan medium kultur tanpa perlakuan sampel, dan diinkubasi kembali selama 24 jam. Pemberian larutan MTT Setelah sel diinkubasi kembali selama 24 jam, medium yang mengandung sampel dibuang dan dicuci dengan PBS, kemudian ditambahkan dengan 100 ul medium yang mengandung MTT (0.5mg/mL), diinkubasi selama 4 jam, kemudian ditambahkan 100 µL SDS 10%, diinkubasi semalam dalam kondisi gelap, diukur serapannya pada panjang gelombang 570 nm menggunakan ELISA reader. Analisa data

Data dianalisis dengan menghitung :

a. Persentase penghambat sel =

$$\left(\frac{\text{Absorbansi kontrol positif} - (\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi media})}{\text{Absorbansi kontrol positif}} \right) \times 100$$

b. Data dianalisa dengan dibuat kurva regresi linier dari konsentrasi (x) dan rata-rata persen penghambatan (y) kemudian dihitung nilai IC50

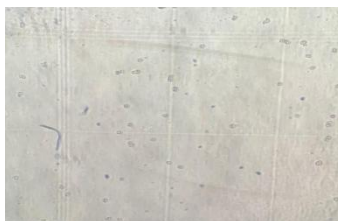
$$IC50 = \frac{50 - a}{b}$$

Hasil dan Pembahasan

Di dasarnya pada konversi garam tertrazolium menjadi formazan berwarna oleh aktivitas mitokondria sel hidup. Jumlah formazan yang dihasilkan bergantung pada jumlah sel yang hidup dalam kultur dan dapat diukur absorbansi dengan spektrofotometer sebagai indikator viabilitas sel. [11] Pengujian MTT dilakukan untuk mengevaluasi viabilitas sel setelah perlakuan dengan ekstrak perkolasi daun benger. Sebanyak 1 x 10⁵ 264,7 yang telah dipanen ditanam pada 96 wellplate pada masing-masing sumur kemudian diinkubasi selama 24 jam pada incubator pada suhu 37°C dengan atmosfer 5% CO₂ ini ditujukan agar sel dapat melekat dan beadaptasi.

Ekstrak perkolasi daun benger dilarutkan dengan penambahan DMSO 1% hingga diperoleh larutan stok, kemudian diencerkan dengan medium kultur dengan konsentrasi 400, 200, 100, 50, dan 25 µg/mL dan di inkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam dengan perlakuan ekstrak, ditambahkan larutan MTT dengan perbandingan MTT dan medium 1:10 inkubasi dilanjutkan selama 4 jam pada suhu 37°C untuk memungkinkan

pembentukan kristal formazan oleh sel yang masih hidup. Reaksi kemudiandihentikan dengan penambahan larutan SDS (sodium decocyl sulfate) dilanjutkan inkubasi kurang lebih 12-18 jam. Untuk melarutkan kristal formazan. Pembacaan absorpsi dilakukan menggunakan ELISA reader pada Panjang gelombang 570nm



Gambar A. Sel Raw 264,7 pada hemasitometer



Gambar B. Sel Raw 264,7 perbesaran 40x Pengujian sitotoksi menggunakan metode MTT menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak benger pada sel RAW 246,7 memberikan efek penurunan viabilitas secara bertahap dengan adanya peningkatan konsentrasi sampel. Penurunan viabilitas sel RAW 264.7 yang diamati secara dosis responsis mengindikasikan bahwa ekstrak perkolasi daun benger memiliki kandungan senyawa biotif yang mampu menghambat aktivitas mitokondria sel hidup.[10]

Tabel 1. Hasil Uji sitotoksik ekstrak perkolasi daun benger terhadap viabilitas sel

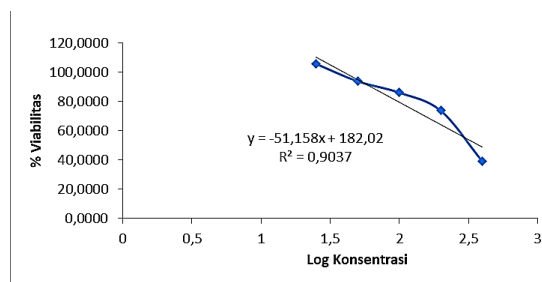
Konsentrasi Daun Benger (µg/mL)	Ekstrak	Viabilitas (%)
400		38,9198
200		73,7198
100		86,1198
50		93,9198
25		105,8198

Berdasarkan data tabel viabilitas sel yang telah diberikan perlakuan menggunakan ekstrak etanol daun benger dengan variasi konsentrasi. Terlihat bahwa aktivitas yang dipengaruhi oleh dosis. Pada

Weri veranita^{1*}, Effionora Anwar², Ni Made Dwi Sandhiutami³, Agung Eru Wibowo^{2,3},

Vol 14 (3) 2025, pages 275-280

konsetrasi tertinggi (400 µg/mL), viabilitas sel menurun menjadi 38,9% yang mengindikasikan adanya potensi toksisitas apabila digunakan dalam konsentrasi tinggi. Sebaliknya pada konsentrasi 200 µg/mL ke bawah viabilitas sel meningkat. Pada konsentrasi 25 µg/mL viabilitas melampaui 100% (105,82). Peningkatan viabilitas pada konsentrasi rendah dapat menunjukkan adanya hormesis yaitu respons biologis Dimana senyawa pada dosis rendah justru memberikan efek stimulatif terhadap sel [12]. Efek hormosis dapat terjadi akibat aktivasi mekanisme pertahanan sel, seperti peningkatan aktivitas antioksidan atau seluler, sehingga sel menjadi lebih resisten dan proliferaatif pada paparan zat dalam jumlah kecil.[13] Hal ini mengidentifikasi bahwa ekstrak memiliki potensi yang aman digunakan dalam rentang konsentrasi rendah.



Gambar 2. Kurva viabilitas Sel RAW 246,7 log konsentrasi 400, 200, 100, 50, dan 25 µg/mL.

Hasil analisis kurva dosis respon menunjukkan nilai IC50 ekstrak benger adalah sebesar 53 µg/mL yang berarti bahwa pada konsentrasi ini terjadi hambatan terhadap viabilitas sel sebesar 50%. Nilai ini menunjukkan bahwa ekstrak benger memiliki potensi sitotoksik yang sedang karena berada dalam rentang 20-100 µg/mL yang dikategorikan sebagai toksisitas moderat menurut standar klasifikasi in vitro cytotoxicity[14]

C. Simpulan

Hasil uji in vitro menunjukkan bahwa viabilitas sel RAW 264,7 menurun secara bertahap seiring dengan peningkatan konsentrasdi ekstrak, Dimana pada dosis tertinggi 400 µg/mL viabilitas sel menurun 38,9%, yang menandakan adanya efek toksik. Sebaliknya pada konsentrasi lebih rendah 25–100 µg/mL viabilitas meningkat

yakni pada 25 µg/mL (105,8%), yang mengindikasikan potensi efek hormesis. yakni respons stimulatif sel terhadap paparan zat pada dosis rendah. Nilai IC₅₀ sebesar 53 µg/mL menunjukkan bahwa ekstrak tergolong memiliki aktivitas sitotoksik moderat menurut kriteria in vitro *cytotoxicity* [15]

Pustaka

- [1] I. P. A. Husaini, R. I. Maulany, N. Nasri, and P. O. Ngakan, "Diversity and use of traditional medicinal plant species in Bantimurung-Bulusaraung National Park, Indonesia," *Biodiversitas*, vol. 23, no. 11, pp. 5539–5550, 2022, doi: 10.13057/biodiv/d231101.
- [2] M. O. Kim *et al.*, "Metabolomics approach to identify the active substances influencing the antidiabetic activity of Lagerstroemia species," *J. Funct. Foods*, vol. 64, no. November 2019, p. 103684, 2020, doi: 10.1016/j.jff.2019.103684.
- [3] W. Veranita, A. E. Wibowo, and T. A. Listyani, "Docking Molekuler Potensi Antiinflamasi Kandungan Senyawa Bengfer (Lagerstroemia ovalifolia Teijsm. & Binn) Terhadap 5KIR-Cyclooxygenase-2 (COX-2)," *J. Sains dan Kesehat.*, vol. 3, no. 1, pp. 242–247, 2024.
- [4] J. H. Min *et al.*, "Lagerstroemia ovalifolia exerts anti-inflammatory effects in Mice of LPS-induced ALI via downregulating of MAPK and NF-κB activation," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 31, no. 11, pp. 1501–1507, 2021, doi: 10.4014/jmb.2107.07023.
- [5] BPOM RI, "Peraturan Badan Pengawas Obat Dan Makanan Nomor 10 Tahun 2022 Tentang Pedoman Uji Toksisitas Praktikal Secara In Vivo," *Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indones.*, pp. 1–220, 2022.
- [6] S. Lama, O. Merlin-zhang, and C. Yang, "In Vitro and In Vivo Models for Evaluating the Oral Toxicity of Nanomedicines," 2020.
- [7] N. Zerbinati *et al.*, "A practical approach for the in vitro safety and efficacy assessment of an anti-ageing cosmetic cream enriched with functional compounds," *Molecules*, vol. 26, no. 24, 2021, doi: 10.3390/molecules26247592.
- [8] A. Ghica *et al.*, "In Vitro Toxicity Evaluation of Some Plant Extracts and Their Potential Application in Xerosis cutis," *Cosmetics*, vol. 11, no. 4, 2024, doi: 10.3390/cosmetics11040124.
- [9] S. Gavanji, A. Bakhtari, A. C. Famurewa, and E. M. Othman, "Cytotoxic Activity of Herbal Medicines as Assessed in Vitro: A Review," *Chem. Biodivers.*, vol. 20, no. 2, 2023, doi: 10.1002/cbdv.202201098.
- [10] W. Li and N. Li, "Uji Sitotoksik dan Anti-Inflamasi Ekstrak Buah Bengkuang (Pachyrizus erosus (L.) Urb.) terhadap Sel RAW 264.7 yang Distimulasi Lipopolisakarida," *eBiomedik*, vol. 8, no. 2, pp. 187–195, 2020.
- [11] L. H. Florindo, V. A. Armelin, D. J. McKenzie, and F. T. Rantin, "Control of air-breathing in fishes: Central and peripheral receptors," *Acta Histochem.*, vol. 120, no. 7, pp. 642–653, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.08.010>.
- [12] S. C. Bondy, "The Hormesis Concept: Strengths and Shortcomings," *Biomolecules*, vol. 13, no. 10, pp. 1–10, 2023, doi: 10.3390/biom13101512.
- [13] E. J. Calabrese and M. P. Mattson, "How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine?," *npj Aging Mech. Dis.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–8, 2017, doi: 10.1038/s41514-017-0013-z.
- [14] P. Prayong, S. Barusrux, and N. Weerapreeyakul, "Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants," *Fitoterapia*, vol. 79, no. 7, pp. 598–601, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2008.06.007>.
- [15] J. M. V. Rocha *et al.*, "In vitro and in vivo acute toxicity of a novel citrate-coated magnetite nanoparticle.," *PLoS One*, vol. 17, no. 11, p. e0277396, 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0277396.

Profil Penulis

Weri veranita, lahir di Tais, 9 Juni 1992. Bidang penelitian penulis adalah, Formulasi, dan teknologi bahan alam.