

**JURNAL METAMORFOSA**  
*Journal of Biological Sciences*

ISSN: 2302-5697

<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

**Sitotoksisitas Ekstrak Teh Hijau (*Camellia sinensis* L.) Dari Gambung, Jawa Barat Terhadap Sel Makrofag Raw 264.7**

**Cytotoxicity Of Green Tea (*Camellia sinensis* L.) Extract From Gambung, West Java Towards Raw 264.7 Macrophage Cells**

Arina Novilla<sup>1\*</sup>, Gina Khairinisa<sup>2</sup>, Dwi Davidson Rihibiha<sup>3</sup>, Heri Syahrian<sup>4</sup>, Shabri<sup>5</sup>

<sup>1,2,3</sup>Fakultas Ilmu dan Teknologi Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani, Cimahi, Jawa Barat

<sup>4,5</sup>Pusat Penelitian Teh dan Kina, Gambung, Jawa Barat

\*Email: [novillarin@gmail.com](mailto:novillarin@gmail.com)

**INTISARI**

Makanan dan minuman fungsional dengan manfaat kesehatan sangat penting untuk meningkatkan imun tubuh paska pandemi Covid-19. Salah satu tanaman kesehatan yang terkenal sejak lama adalah teh hijau (*Camellia sinensis* L.). Sitotoksisitas teh hijau baik pada sel normal maupun sel penyakit, masih terus dipelajari sampai dengan saat ini. Penelitian ini bertujuan untuk melihat viabilitas sel makrofag RAW 264.7 yang diberi perlakuan ekstrak teh hijau dari Pusat Penelitian Teh dan Kina (PPTK) Gambung, Jawa Barat. Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan untuk mencari konsentrasi yang aman digunakan pada sel RAW 264.7 secara in vitro. Sel makrofag RAW 264.7 diberi perlakuan ekstrak teh hijau dengan konsentrasi 12,5, 25, 50, dan 100 µg/ml, dan juga kuersetin 12,5, 25, 50, dan 100 µM sebagai senyawa pembanding. Viabilitas diukur dengan menggunakan analisis 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS). Perlakuan ekstrak teh hijau pada konsentrasi 12,5, 25, and 50 µg/ml menunjukkan viabilitas sel makrofag RAW 264.7 di atas 90% yang berarti konsentrasi tersebut tidak bersifat toksik terhadap sel RAW 264.7 sehingga dapat digunakan untuk uji efikasi ekstrak teh hijau.

**Kata kunci** : Teh hijau, Gambung, sitotoksisitas, sel RAW 264.7

**ABSTRACT**

Functional foods and beverages with nutritional and disease-preventive properties are much needed these days after Covid-19 pandemic. Tea (*Camellia sinensis* (L.)) has been long consumed for its medicinal benefits. Cytotoxicity of green tea on normal and abnormal cells, has been frequently evaluated. Thus, we aimed to observe cytotoxicity of green tea extract acquired from PPTK Gambung, Ciwidey, West Java in RAW 264.7 macrophages. This was a preliminary study to determine safe concentration for the subsequent efficacy test. RAW 264.7 cells were treated with green tea extract at concentration of 12,5, 25, 50, and 100 µg/ml, and quercetin at 12,5, 25, 50, and 100 µM as marker compound. The viability of RAW 264.7 cells was analyzed by using the 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay. More than 90% of RAW 264.7 cells treated with green tea extract were viable at concentration of 12,5, 25 and 50 µg/ml. This indicates that those concentrations were not toxic towards RAW 264.7 cells, makes it safe for further use.

**Keywords** : Green tea, Gambung, cytotoxicity, RAW 264.7 cells

## PENDAHULUAN

Setelah melalui masa pandemi Covid-19, kebutuhan akan minuman kesehatan untuk melawan serangan virus semakin meningkat (Hallak *et al.*, 2022). Begitu banyak manfaat yang dapat kita temui dari tanaman-tanaman yang ada disekitar kita. Teh (*Camellia sinensis* (L.)) merupakan tumbuhan yang sudah lama digunakan untuk keperluan kesehatan (Samanta, 2022). Teh hijau merupakan salah satu varian teh yang populer karena dilaporkan mengandung polifenol yang lebih tinggi dibandingkan teh hitam (Thea *et al.*, 2012). Teh hijau memiliki beragam manfaat kesehatan seperti antivirus, antibakteri, dan anti-inflamasi. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan teh hijau dapat menurunkan resiko kanker, mengurangi kecemasan, menurunkan kadar kolesterol, dan meningkatkan fungsi otak (Hayakawa *et al.*, 2016; Suzuki, *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016; Yang & Wang, 2016).

Manfaat kesehatan teh hijau berhubungan erat dengan senyawa polifenol yang terkandung di dalamnya, dimana flavonoid memegang peran paling penting. Flavonoid yang paling banyak terkandung dalam teh hijau adalah katekin yang memiliki proporsi 80%–90% dari total flavonoid, dan sekitar 40% dari teh hijau yang terlarut dalam air (Reygaert, 2018). Polifenol yang terkandung dalam teh diyakini dapat meregulasi faktor resiko yang berhubungan dengan penyakit kardiovaskular dan kanker melalui mekanisme penangkalan radikal bebas, kelasi besi, dan mengganggu jalur signaling sel (Hussain *et al.*, 2016).

Dalam pengembangan obat herbal, penelitian *in vitro* merupakan tahapan awal yang sangat penting. Penelitian *in vitro* terdiri dari studi sitotoksitas dan uji efikasi ekstrak pada sel (Aslantürk, 2018). Sel RAW 264.7 merupakan lini sel monosit atau makrofag yang berasal dari mencit Balb/c. Sel RAW 264.7 telah sering digunakan sebagai model makrofag untuk mempelajari respon imun, khususnya imun bawaan. Pada penelitian ini, teh hijau yang digunakan berasal dari Pusat Penelitian Teh dan Kina (PPTK), Gambung, Ciwidey. Studi *in vitro* teh hijau Gambung menggunakan kultur sel masih jarang dilakukan. Oleh karena itu,

penelitian ini adalah studi pendahuluan untuk melihat sitotoksitas teh hijau Gambung pada sel RAW 246.7, dimana hasil penelitian ini akan menentukan dosis yang tepat untuk uji efikasi.

## BAHAN DAN METODE

### Ekstraksi teh hijau

Teh hijau yang digunakan adalah klon tipe *sinensis* dari PPTK, Gambung, Ciwidey. Klon teh ini berusia sekitar 28 tahun dimana sudah ditanam di perkebunan PPTK sejak tahun 1994. Bagian teh yang diambil adalah pucuk segar (P+3). Sebanyak 10 kg pucuk teh diproses dengan metode *steaming* pada suhu 100°C selama 2.5 menit (Trinovani *et al.*, 2022)



**Gambar 1.** Klon teh di area perkebunan PPTK.

Selanjutnya, teh hijau diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol 96% (1:4). Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan pada suhu 40°C pada evaporator sampai mendapatkan pelet kering. Pelet kemudian disimpan pada suhu 4°C.

### Kultur Sel

Sel RAW 264.7 (ATCC TIB-71) diambil dari tanki nitrogen cair (-196°C), selanjutnya dicairkan di dalam Ultrasonic cleaner dengan suhu 37°C. Sel disentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, kemudian pellet diresuspensi dengan 5 ml medium kultur. Sel diinkubasi dalam inkubator 5% CO<sub>2</sub>, bersuhu 37°C. Sel yang tumbuh diamati di bawah mikroskop inverted hingga mencapai konfluensi 70-80% (Kim *et al.*, 2020). Medium kultur dibuang kemudian ditambahkan medium

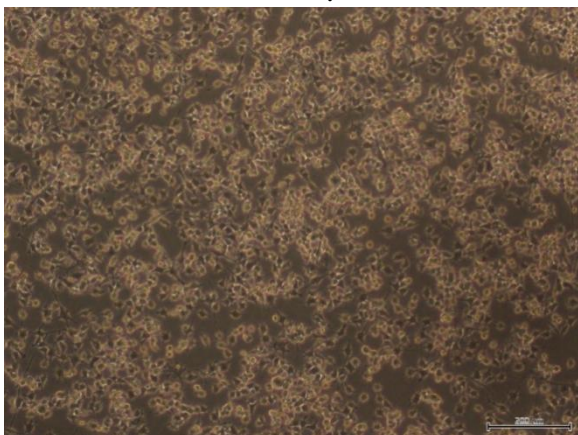
kultur baru sebanyak 2 ml. Sel selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pellet diresuspensi dengan 1 ml medium kultur. Sel diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37°C. Selama perawatan sel, medium pertumbuhan diganti atau ditambah setiap 2 – 3 hari sekali (Novilla *et al.*, 2017).

### Uji sitotoksik

Sel dengan kepadatan  $5 \times 10^3$  sel/well ditanam pada 96 well plate, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Setelah inkubasi 24 jam, medium kultur diganti dengan medium kultur baru sebanyak 180  $\mu$ l dan 20  $\mu$ l sampel yaitu ekstrak teh hijau (50, 25, 12,5, 100  $\mu$ g/ml) dan senyawa pembanding kuersetin (50, 25, 12,5, 100  $\mu$ M) pada setiap sumuran, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Setelah perlakuan selama 24 jam, ditambahkan 20  $\mu$ l MTS pada tiap well, diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 490 nm menggunakan spektrofotometer.

### HASIL

Sel RAW 264.7 (ATCC TIB-71) adalah sel monosit/makrofag berbentuk kubus atau gelendong yang melekat secara longgar dan akan berubah bentuk menjadi bulat ketika melekat secara berkelompok (Gambar 2). Ketika sel telah menjadi konfluen, sel hidup akan lepas dan mengangap.



**Gambar 2.** Morfologi sel RAW 264.7 (Perbesaran 40x)

Selanjutnya, viabilitas sel RAW 264.7 dianalisis dengan metode MTS. Prinsip dari metode MTS adalah pengukuran produk yang dihasilkan sel hidup dimana tetrazolium akan direduksi oleh sel membentuk formazan. Jumlah formazan terlarut menunjukkan jumlah sel hidup. Pada penelitian ini, sebanyak lebih dari 90% sel RAW 264.7 hidup pada konsentrasi ekstrak teh hijau (50, 25, 12,5  $\mu$ g/ml) dan kuersetin (50, 25, 12,5  $\mu$ M) (Tabel 1). Sementara itu, baik ekstrak maupun kuersetin pada konsentrasi yang lebih tinggi bersifat toksik pada sel dengan menurunkan viabilitas sel sebesar masing-masing 16,95% dan 13,46%.

**Tabel 1.** Sitotoksitas ekstrak teh hijau dan quercetin terhadap sel RAW 264.7

Perlakuan	Viabilitas sel (%)
Kontrol (tanpa perlakuan)	100 $\pm$ 2,07 <sup>cd</sup>
Kuersetin 12,5 $\mu$ M	103,86 $\pm$ 2,14 <sup>de</sup>
Kuersetin 25 $\mu$ M	101,59 $\pm$ 2,89 <sup>cde</sup>
Kuersetin 50 $\mu$ M	95,40 $\pm$ 5,45 <sup>cd</sup>
Kuersetin 100 $\mu$ M	86,54 $\pm$ 0,64 <sup>ab</sup>
ETH 12,5 $\mu$ g/ml	109,41 $\pm$ 4,12 <sup>e</sup>
ETH 25 $\mu$ g/ml	98,53 $\pm$ 1,49 <sup>cd</sup>
ETH 50 $\mu$ g/ml	94,41 $\pm$ 0,84 <sup>bc</sup>
ETH 100 $\mu$ g/ml	83,05 $\pm$ 4,35 <sup>a</sup>

Keterangan: ETH = Ekstrak Teh Hijau. Data ditampilkan dalam bentuk rata-rata $\pm$ standar deviasi. Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) yang dianalisis dengan Tukey HSD post hoc test.

### PEMBAHASAN

Makrofag merupakan bentuk dewasa dari monosit yang ditemukan pada hampir semua jaringan dan berperan penting dalam imunitas bawaan. Makrofag memiliki masa hidup yang relatif panjang dan dapat memiliki beberapa fungsi baik dalam respon imun bawaan maupun imun adaptif (Murphy, 2012). Pada penelitian ini, sel RAW 264.7 yang digunakan merupakan sel monosit/makrofag yang berasal dari sel mencit yang diinduksi virus leukemia Abelson. Sel ini sering digunakan sebagai model makrofag yang juga dapat melakukan pinositosis dan fagositosis. Pada induksi lipopolisakarida (LPS), sel RAW 264.7 akan meningkatkan produksi

nitrit oksida (NO) dan fagositosis (Fuentes *et al.*, 2014).

Sitotoksitas merupakan salah satu indikator penting untuk evaluasi penelitian *in vitro* (Aslantürk, 2018). Tingkat viabilitas sel dan/atau laju proliferasi sel merupakan parameter untuk melihat kesehatan sel. Agen mekanik dan kimiawi dapat memengaruhi kesehatan sel dan metabolisme. Agen tersebut dapat menyebabkan toksisitas pada sel melalui berbagai mekanisme, seperti kerusakan membran sel, terhambatnya sintesis protein, ikatan pada reseptor, inhibisi elongasi polideoksinukleotid, dan reaksi enzimatik (Proença *et al.*, 2021). Pada penelitian ini, sel RAW 264.7 hidup dengan baik pada perlakuan ekstrak teh hijau dengan konsentrasi 12,5, 25 dan 50 µg/ml, sedangkan pada konsentrasi 100 µg/ml bersifat toksik pada sel. Sitotoksitas ekstrak teh hijau sudah sering dipelajari. Penelitian Huang *et al.* (2008) menunjukkan ekstrak teh hijau pada konsentrasi antara 10-30 µg/ml tidak mempengaruhi viabilitas sel hepatosit tikus yang digunakan sebagai model sel normal. Akan tetapi, Elbling *et al.* (2005) melaporkan bahwa baik ekstrak teh hijau maupun epigallocatechin gallate (EGCG) dalam teh, menginduksi stres oksidatif dan kerusakan DNA pada sel RAW 264.7. Beberapa penelitian lain juga menunjukkan EGCG pada konsentrasi 40 and 50 µM memiliki sifat pro-oksidan dan sitotoksik pada sel normal dan beberapa sel kanker (*HaCat keratinocytes, human lymphocytes, Nalm6 leukemia cell line*) (Tobi *et al.*, 2002; Bertram *et al.*, 2003). Lu *et al.* (2013) melaporkan konsentrasi EGCG yang terbukti dapat merusak DNA dan kromosom adalah di atas 100 µM.

Sementara itu, sel RAW 264.7 juga dapat hidup pada perlakuan kuersetin konsentrasi 12,5-50 mM pada penelitian ini. Kuersetin telah dikenal lama dapat menginduksi sitotoksitas pada sel leukemia dan sel kanker payudara (Srivastava *et al.*, 2016). Walaupun demikian, efek kuersetin pada sel normal jarang muncul atau tidak ada. Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahydroxy-flavone), merupakan salah satu flavonoid yang paling banyak ditemukan pada buah dan tumbuhan. Makrofag diperkirakan menghasilkan tyrosinase, peroxidases, atau

quinone reductase untuk memetabolisme kuersetin di luar atau di dalam sel menjadi *O*-semiquinone (kemungkinan UQM2), *O*-quinone (kemungkinan UQM1) atau quercetin quinoid (quinine methide), dimana metabolit tersebut memasuki makrofag dan berperan sebagai immunoregulator dalam makrofag (Liu *et al.*, 2015).

## KESIMPULAN

Konsentrasi ekstrak teh hijau dari PPTK Gambung sebesar 12,5, 25, and 50 µg/ml tidak bersifat toksik terhadap sel RAW 246.7. Hasil ini selanjutnya dapat digunakan untuk uji efikasi ekstrak teh hijau.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aslantürk, Ö.S. 2018. In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world*. 2:64-80.
- Bertram, B., U. Bollow, N. Rajae-Behbahani, A. Bürkle, P. Schmezer. 2003. Induction of poly (ADP-ribosyl) ation and DNA damage in human peripheral lymphocytes after treatment with (-)-epigallocatechin-gallate. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 534(1-2):77-84.
- Elbling, L. *et al.* 2005. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *The FASEB journal*. 19(7):1-26.
- Fuentes, A.L., L. Millis, J. Vapenik, and L. Sigola. 2014. Lipopolysaccharide-mediated enhancement of zymosan phagocytosis by RAW 264.7 macrophages is independent of opsonins, laminarin, mannan, and complement receptor 3. *Journal of surgical research*. 189(2): 304-312.
- Hallak, R., I. Onur, and C. Lee. 2022. Consumer demand for healthy beverages in the hospitality industry: Examining willingness to pay a premium, and barriers to purchase. *Plos one*. 17(5): e0267726.
- Hayakawa, S., K. Saito, N. Miyoshi, T. Ohishi, Y. Oishi, M. Miyoshi, Y. Nakamura. 2016.

- Anti-cancer effects of green tea by either anti- or pro- oxidative mechanisms. *The Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 17:1649–1654.
- Huang, X., A. Kojima-Yuasa, S. Xu, T. Norikura, D.O. Kennedy, T. Hasuma, and I. Matsui-Yuasa. 2008. Green tea extract enhances the selective cytotoxic activity of Zizyphus jujuba extracts in HepG2 cells. *The American Journal of Chinese Medicine*. 36(04):729-744.
- Hussain, T., B. Tan, Y. Yin, F. Blachier, M.C. Tossou, and N. Rahu. 2016. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016.
- Kim, J.G., M.J. Kim, J.S. Lee, K. Sydara, S. Lee, S. Byun, and S.K. Jung. 2020. Smilax guianensis vitman extract prevents LPS-induced inflammation by inhibiting the NF- $\kappa$ B pathway in RAW 264.7 cells. *Journal of Microbiology and Biotechnoogy*. 30(6):822-829
- Liu, C.J., Y.R. Liao, and J.Y. Lin. 2015. Quercetin uptake and metabolism by murine peritoneal macrophages in vitro. *Journal of food and drug analysis*. 23(4):692-700.
- Lu, L.Y., N. Ou, and Q.B. Lu. 2013. Antioxidant induces DNA damage, cell death and mutagenicity in human lung and skin normal cells. *Scientific reports*. 3(1):1-11.
- Murphy, K. Cytokines and their receptors. 2012. In: Murphy K (ed). Janeway's immunobiology. 8th ed. New York: Garland Science Publishing Taylor and Francis Group.
- Novilla, A., D.S. Djamhuri, B. Nurhayati, D.D. Rihibiha, E. Afifah, and W. Widowati. 2017. Anti-inflammatory properties of oolong tea (*Camellia sinensis*) ethanol extract and epigallocatechin gallate in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*. 7(11): 1005-1009.
- Proença, S. et al. 2021. Effective exposure of chemicals in in vitro cell systems: A review of chemical distribution models. *Toxicology in Vitro*. 73:105133.
- Reygaert, W.C. 2018. Green tea catechins: Their use in treating and preventing infectious diseases. *BioMed research international*. 2018.
- Samanta, S. 2022. Potential bioactive components and health promotional benefits of tea (*Camellia sinensis*). *Journal of the American Nutrition Association*. 41(1):65-93.
- Srivastava, S. et al. 2016. Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. *Scientific reports*. 6(1):1-13.
- Suzuki, T., M. Pervin, S. Goto, M. Isemura, Y. Nakamura. 2016. Beneficial effects of tea and the green tea catechin epigallocatechin-3-gallate on obesity. *Molecules*. 21:1305.
- Thea, A.E., Lloret, M.A., Brumovsky, L.A. and Schmalko, M.E. 2012. Differences in quality parameters between types of commercial tea from Argentina. *International Journal of food studies*. 1(2).
- Tobi, S.E., M. Gilbert, N. Paul, and T.J. McMillan. 2002. The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, protects against the oxidative cellular and genotoxic damage of UVA radiation. *International journal of cancer*. 102(5):439-444.
- Trinovani, E., M.I. Prawira-Atmaja, M. Kusmiyati, S. Harianto, and H. Maulana. 2022. Total polyphenols and antioxidant activities of green tea powder from GMB 7 and GMB 9 tea clones. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 974(1): 012113.
- Yang, C.S., H. Wang. 2016. Cancer preventive activities of tea catechins. *Molecules*. 21:1679.
- Yang, C.S., J. Zhang, L. Zhang, J. Huang, Y. Wang. 2016. Mechanisms of body weight reduction and metabolic syndrome alleviation by tea. *Molecular Nutrition and Food Research*. 60: 160–174.