

Seminar Nasional
Riset Pangan, Obat-Obatan dan Lingkungan Untuk Kesehatan
ISBN : 978-602-14503-1-4
HAL 261-266
Diterbitkan : FMIPA Universitas Pakuan
Tahun November 2013

**Aktivitas Sitotoksik Dari Ekstrak Buah Gwang
(*Corypha Utan Lamk*) Terhadap Sel Kanker Murin Leukimia
P-388**

Leny Heliawati^{*1,2}, Tri Mayanti², Agus Kardinan³, Roekmi-ati Tjokronegoro²

¹Universitas Pakuan, Bogor

²Pascasarjana Universitas Padjadjaran, Bandung

³Balai Penelitian Obat dan Aromatik, Bogor

Email : leny_heliawati@yahoo.com

ABSTRAK

Buah gwang (*Corypha Utan lamk*) secara tradisional oleh masyarakat Timor Nusa Tenggara Timur biasa digunakan untuk meracuni ikan. Data empiris ini mengindikasikan adanya senyawa toksik dalam buah gwang. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak buah gwang terhadap sel kanker Murin Leukimia P-388. Metode penelitian diawali dengan maserasi biji dan daging buah gwang menggunakan pelarut methanol. Ekstrak metanol yang diperoleh diuji toksisitasnya menggunakan BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Ekstrak metanol dengan toksisitas tertinggi kemudian diuji aktivitas antikankernya terhadap sel Murin Leukimia P-388. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol biji gwang dengan toksisitas tertinggi memberikan nilai LC50 = 97 ppm dan uji sitotoksik terhadap sel Murin Leukimia P-388 memberikan nilai IC50 = 15,6 ppm.

Kata Kunci : *Corypha utan* Lamk, sel Murin Leukimia P-388, BSLT, ekstraksi.

Pengantar

Gwang (*Corypha utan* Lamk) adalah sejenis tanaman palem yang tumbuh liar di savana Nusa Tenggara Timur (NTT). Buah gwang biasa digunakan untuk meracuni ikan oleh masyarakat Nusa Tenggara Timur. Pemanfaatan tradisional ini menunjukkan adanya sifat toksik pada buah gwang sehingga menarik untuk diteliti lebih lanjut.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya aktivitas toksik dari buah gwang terhadap larva udang *Artemia salina* dan aktivitas sitotoksiknya terhadap sel murin leukimia P- 388 sehingga dapat diketahui potensinya sebagai antikanker.

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) merupakan salah satu metode skrining untuk menentukan aktivitas toksik suatu ekstrak ataupun senyawa. Metode BSLT juga sering digunakan untuk bioassay dalam usaha mengisolasi senyawa toksik tersebut dari ekstrak. Metode ini seringkali dimaknai lebih dari sekedar uji toksisitas. Bila bahan yang diuji memberikan efek toksik terhadap larva udang, maka hal ini merupakan indikasi awal dari efek farmakologi yang terkandung dalam bahan tersebut. Menurut Meyer *et al.*(1982)¹, beberapa penelitian menunjukkan bahwa *A. salina* memiliki korelasi positif terhadap ekstrak yang bersifat bioaktif, juga banyak digunakan dalam berbagai analisis biosistem seperti analisis terhadap residu pestisida, mikotoksin, polusi, senyawa turunan morfin, dan karsinogenik dari phorbol ester.

Penelitian Carballo dkk menunjukkan adanya hubungan yang konsisten antara toksisitas dan letalitas *Brine shrimp* pada ekstrak tanaman. Metode BSLT dapat dipercaya

untuk menguji aktivitas farmakologis dari bahan-bahan alami. Apabila suatu ekstrak tanaman bersifat toksik menurut harga LC50 dengan metode BSLT, maka tanaman tersebut dapat dikembangkan sebagai obat anti kanker. Namun, bila tidak bersifat toksik maka tanaman tersebut dapat diteliti kembali untuk mengetahui khasiat lainnya dengan menggunakan hewan coba lain yang lebih besar dari larva *Artemia salina* seperti mencit dan tikus secara in vivo (Carballo *et al.*, 2002)².

Sel murin Leukemia P-388 merupakan salah satu jenis sel tumor yang dijadikan sebagai salah satu uji protokol sitotoksik oleh lembaga NCI (National Cancer Institute) Amerika. Hasil pengujian menggunakan sel ini seringkali dijadikan dasar pada uji-uji sejenis, lebih lanjut dalam rangka mendapatkan senyawa model atau kandidat obat kanker (Hoettman and Hamburger, 1991). Berdasarkan Alley (1998) ekstrak dinyatakan aktif sitotoksik apabila memiliki nilai IC50 < 20 ppm.

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian buah gewang yang diperoleh daerah Buat So'e Kabupaten Timor Tengah Selatan, propinsi Nusa Tenggara Timur, sel Murin P-388, DMSO, PBS (Phosphate Buffer Solution), pereaksi MTT [3-(4,5-dimetiltiazo-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida], FBS (Fetal Bovine Serum), untuk BSLT : garam laut, larva udang *A. Salina*

Metode

Pengambilan Sampel dan Ekstraksi

Pengambilan sampel buah Gewang dilakukan di Daerah Buat, Soe Kabupaten Timor Tengah Selatan, Provinsi Nusa Tenggara Timur. Sebanyak 3,9 kg buah Gewang segar dipotong kemudian dipisahkan antara biji dan daging buahnya. Biji dan daging buahnya dihancurkan dengan menggunakan mesin penggiling dan dimaserasi dengan menggunakan masing-masing 4 dan 3 liter pelarut metanol. Maserasi dilakukan selama 3 hari. Setelah 3 hari maserat dipisahkan dari ampas dengan cara penyaringan. Maserat dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan tekanan vakum pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ sehingga diperoleh ekstrak pekat metanol.

Uji aktifitas toksik terhadap larva *A. Salina*

Prinsip kerja uji sifat toksik terhadap larva udang *A. Salina* sebagai berikut : sampel dipersiapkan dengan berbagai konsentrasi mulai konsentrasi 1000 sampai 15.725 ppm, menggunakan system triplo. Larva udang dimasukkan sampel tersebut dan dibiarkan selama 24 jam. Jumlah rata-rata larva udang yang mati kemudian dibandingkan dengan jumlah rata-rata total awal larva udang yang dijadikan sampel dan dihitung menggunakan —Bliss metodel (Meyer, 1982)

Uji aktifitas sitotoksik terhadap sel Murin leukimia P-388

Prinsip kerja pengukuran sifat sitotoksik terhadap sel kanker murin leukimia P-388 adalah sebagai berikut:aktivitas senyawa-senyawa dan artonin E (senyawa pembanding) dinyatakan dengan penentuan IC50 yaitu konsentrasi sampel atau pembanding yang di butuhkan untuk menginhibisi 50% sel tumor murin leukimia P-388 melalui pewarnaan pereaksi MTT, yang diamati dengan microplate reader pada 540 nm. Uji dilakukan dengan cara menambahkan berbagai konsentrasi senyawa dan artonin E pada sel tumor P-388.Setelah di inkubasi selama 48 jam , kedalam sampel ditambahkan pereaksi warna .Kemudian diinkubasi kembali selama 4 jam.Jumlah sel tumor yg terinhibisi oleh sampel di hitung serapan nya dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 540 nm

setelah penambahan pereaksi *stop solution*..Nilai IC50 dapat dihitung melalui ekstrapolasi garis 50% serapan control positif pada kurva serapan terhadap konsentrasi sampel diatas kertas semilogaritma

Hasil dan Pembahasan

Buah tumbuhan *Corypha utan* Lamk yang didapat dari daerah Bu'at So'e Kabupaten Timor Tengah Selatan, Provinsi Nusa Tenggara Timur dihancurkan dengan mesin penggiling dan diperoleh sebanyak 3,9 kg. Biji dan daging buahnya dipisahkan dan dimaserasi secara terpisah. Massa biji 1,3 kg sedangkan buah 2,6 kg. Pemotongan sampel dilakukan agar dapat memperbesar luas permukaan dan memecah dinding sel sampel sehingga senyawa-senyawa kimia yang terkandung di dalamnya dapat terekstraksi secara maksimal.

Sampel yang telah dihancurkan kemudian diekstraksi dengan cara maserasi dengan pelarut metanol selama 3x24 jam pada suhu ruang. Pengekstraksian dilakukan untuk memaksimalkan ekstraksi sampel karena dengan jangka waktu tersebut filtrat metanol sudah berkurang warnanya, artinya pelarut maksimal dalam mengambil senyawa-senyawa dalam sampel. Penggunaan metanol dalam proses maserasi dikarenakan metanol dapat melarutkan senyawa-senyawa polar dan nonpolar sehingga sangat baik untuk mengekstrak kandungan metabolit sekunder dalam tanaman (Cordell, 1981)⁴. Adapun pemilihan teknik maserasi sebagai metode ekstraksi dikarenakan senyawa-senyawa yang akan diisolasi belum diketahui karakteristik senyawanya, sehingga penggunaan ekstraksi bersuhu tinggi seperti sokletasi dihindari untuk mencegah terdekomposisi atau rusaknya senyawa-senyawa yang tidak tahan panas. Namun, maserasi memiliki kekurangan, yaitu prosesnya memerlukan waktu yang cukup lama dan pelarut yang lebih banyak bila dibandingkan dengan metode sokletasi.

Maserat kemudian disaring dan dipekatkan menggunakan *rotatory evaporator* pada tekanan rendah dan suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak pekat metanol biji dan buah. Teknik penguapan pelarut dengan evaporator ini dilakukan untuk mendapatkan ekstrak *n*-heksana, etil asetat, dan metanol pekat dengan cepat dan efisien. Evaporator dilengkapi pompa vakum atau *aspirator*, sehingga tekanan dalam sistem menjadi rendah. Pada tekanan yang rendah, titik didih suatu senyawa menjadi lebih rendah, sehingga waktu yang dibutuhkan untuk menguapkan pelarut menjadi lebih cepat. Penggunaan suhu 40°C bertujuan untuk mencegah dekomposisi senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Hasil ekstraksi buah-gewang seperti tertera dalam Tabel 1

Table 1 Hasil ekstraksi dari buah gewang

Sampel (kg)	Massa Ekstrak Metanol (g)
Biji (1,3)	21,99
Daging buah (2,6)	261,51

Bhrine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Metode *BSLT* ini digunakan untuk memantau adanya aktivitas toksik dari suatu ekstrak tanaman. Larva udang (*A. salina*) merupakan hewan avertebrata yang sangat sensitif dengan lingkungan sekitarnya, sehingga sangat cocok sebagai hewan uji aktivitas toksik . Selain itu, permukaan kulit *A. salina* yang sangat tipis sehingga mudah dimasuki oleh zat-zat tertentu. Senyawa yang bersifat toksik akan masuk ke dalam tubuh *A. salina* melalui kulitnya, karena kulitnya yang begitu halus dan berfungsi sebagai alat pernapasannya.

Sebagai panduan untuk tahapan selanjutnya, maka dilakukan uji toksisitas terhadap ekstrak metanol biji gawang dan daging buah gawang sehingga diketahui ekstrak mana yang mengandung senyawa aktif yang bersifat toksik. Aktivitas toksik diukur dengan metode *BSLT*. Bioindikator yang digunakan adalah *A. salina*. Metode *BSLT* dipilih sebagai pemandu bioaktivitas karena metodenya cepat, sederhana dan efektif (Steven, 1993)⁶. Selain itu juga, pada penelusuran literatur didapatkan informasi tentang korelasi aktivitas toksik terhadap larva udang (*A. salina*) dengan aktivitas antikanker (Babajide *et al.*, 2008)⁷.

Ekstrak metanol, dibuat dengan konsentrasi 15,725; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 ppm untuk uji toksisitas. Pelarutnya diuapkan hingga kering kemudian dimasukkan larva udang yang sudah berumur 24 jam sebanyak 15 ekor. Setelah itu dimasukkan larutan pemeliharaan sampai 2 ml. Larutan uji dibiarkan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva udang yang mati dan dihitung persentase mortalitasnya dari setiap ekstrak. Hasil penelitian toksisitas dalam berbagai ekstrak dari biji dan buah gawang diperlihatkan dalam Tabel 2 dan 3.

Tabel 2. Presentasi kematian larva udang ekstrak biji gawang

Sampel	Persentasi kematian larva udang						
	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,725
MeOH biji buah	20	40	20	0	33,3	0	26,67
MeOH daging buah	86,67	60	33.3	40	40	40	20

Tabel 3. Nilai LC50 dari biji dan daging buah gawang

Ekstrak Metanol Biji gawang Nilai LC ₅₀	Ekstrak Metanol Daging buah gawang Nilai LC ₅₀
97. ppm	341.002 ppm

Berdasarkan analisis hasil uji toksisitas terhadap ekstrak metanol menunjukkan bahwa ekstrak methanol biji gawang paling toksik dengan nilai LC₅₀ sebesar 97 ppm.

Uji sitotoksik sel murin leukimia P-388

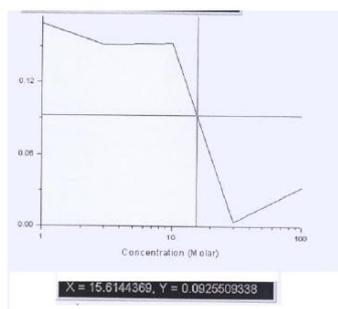
Sel murin leukimia P-388 merupakan salah satu jenis sel tumor yang di jadikan sebagai salah satu uji protocol sitotoksik oleh lembaga NCI (National Cancer Institute) Amerika . Hasil pengujian menggunakan sel ini sering kali di jadikan dasar pada uji-uji sejenis ,lebih lanjut dalam rangka mendapatkan senyawa model atau kandidat obat kanker (Hoettman and Hamburger,1991)

Sebagai panduan untuk tahapan selanjutnya maka dilakukan uji sitoksitas terhadap ekstrak methanol biji gawang yang mempunyai sifat toksik yang tinggi dengan LC₅₀=97 ppm. Hasil penelitian sitotoksik pada ekstrak methanol biji gawang diperlihatkan dalam tabel 4 dan gambar 1

Tabel 4. Serapan Nilai OD terhadap konsentrasi

Kosentrasi sampel ppm	Serapan

100	0,033
30	0,004
10	0,153
3	0,151
1	0,169
0,3	0,299
0,1	0,449



Gambar 1. Kurva serapan terhadap konsentrasi ekstrak metanol

Berdasarkan analisis hasil uji sitotoksik, ekstrak metanol biji gewang menunjukkan nilai $IC_{50} = 15,6$ ppm

Kesimpulan

Eksrak metanol biji gewang menunjukkan toksisitas yang tinggi dengan nilai LC_{50} sebesar 97.ppm dan sitotoksik terhadap sel murin leukimia P-388 dengan nilai IC_{50} sebesar 15.6 ppm

Daftar Pustaka

Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M.J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H., and Boyd, M. R. 1988. Feasibility of drug screening with panels of tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* 48: 589-601.

Babajide, O.J., Babajide, O.O., Daramola, A.O., & Mabusela, W.T. 2008. Flavonols and an oxychromonol from *Piliostigma reticulatum*. *Phytochemistry*, 69, 2245-2250

Carballo JL, Hernandez-Inda ZL, Perez P, Garcia-Gravaloz MD. 2002. Comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2:1472-6570.

Cordell, G.A. 1981. *Introduction to Alkaloid A Biogenetic Approach*. Jhon Willey and Sons, Inc. New York. 890-907. Finney, D.J. 1971. *Probit Analysis*. 3rd edition. Cambridge University Press.

Hostettman, K . 1991, Assay of bioactivity. Methode in plant biochemsitry, series editor P. M. Dey, J. B. hardorne, Vol 6, Academic Press, London.

Meyer, B.N., N.R. Ferrighni, J.E. Putnam, L.B. Jacobson, D.E. Nichols and J.L McLaughlin, 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent. *Planta Medica*. 45 : 31-34.

Steven, M.C. 1993. Bioactive Natural Product : Detection, isolation, anti Structural Determination, CRC Press.