

AKTIVITAS SITOTOKSIK FRAKSI *n*-HEKSANA : KLOOROFORM DARI EKSTRAK METANOL KULIT BATANG MANGROVE (*Rhizophora mucronata*) PADA SEL KANKER MYELOMA

CYTOTOXIC ACTIVITY OF FRACTION *n*-HEKSANA : CHLOROFORM FROM METHANOLIC EXTRACT OF *Rhizophora mucronata* STEM BARKS ON MYELOMA CELL-LINES

Harwoko*) dan Esti Dyah Utami

Jurusan Farmasi Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto

ABSTRAK

Tanaman mangrove telah lama digunakan sebagai obat tradisional oleh masyarakat untuk terapi penyakit gastroenteritis dan antikanker. *Rhizophora mucronata* termasuk satu jenis mangrove yang belum banyak diteliti potensinya sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik fraksi *n*-heksana: kloroform dari ekstrak metanol kulit batang *Rhizophora mucronata* pada sel Myeloma. Serbuk kulit batang *R. mucronata* diekstraksi dengan metanol dengan cara maserasi kemudian ekstrak metanol dipartisi berturut-turut dengan kloroform, etil asetat, dan metanol. Fraksi kloroform kemudian difraksinasi dengan campuran *n*-heksan dan kloroform (3 : 2) dan dilakukan uji sitotoksitas pada sel myeloma dengan metode MTT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksana : kloroform dari ekstrak metanol kulit batang *Rhizophora mucronata* bersifat sitotoksik pada sel myeloma dengan nilai IC_{50} sebesar 15 μ g/mL dan hasil uji kualitatif fraksi tersebut mengandung senyawa flavonoid dan terpenoid.

Kata kunci: *Rhizophora mucronata*, sitotoksik, myeloma

ABSTRACT

The Mangrove plants have been long used for traditional medicine to cure gastroenteritis and cancer therapy. *Rhizophora mucronata*, one species of Mangrove, is still rare studied that have potentiation as anti cancer. This research goals was to fractionation bioactive compound of *R. mucronata* with various organic solvent and cytotoxicity test of those fraction *n*-heksana : chloroform to cancer cell myeloma. The extract from *R. mucronata* stem barks was made by maseration with methanol. The extracts was partitioned with chloroform, etil acetate, and methanol. The fraction of chloroform was fractionation with *n*-heksana : chloroform (3 : 2). The fraction respectively was examined their cytotoxicity on Myeloma cell-line by MTT methods. Result showed that fraction *n*-heksana : chloroform from methanolic extract of *R. mucronata* stem barks was toxic on Myeloma cell, with the IC_{50} value was 15 μ g/mL and phytochemical study showed that the active fractions contained flavonoid and terpenoid.

Key words: *Rhizophora mucronata*, cytotoxic, myeloma

PENDAHULUAN

WHO melaporkan bahwa 12% dari seluruh kematian di dunia disebabkan oleh penyakit kanker. Di Indonesia kanker menduduki peringkat ke-6 penyakit yang mematikan dengan angka kejadian 4,3% (DepKes RI., 2005). Penyakit

kanker terjadi pada organisme multisel, ditandai dengan hilangnya fungsi kontrol sel terhadap regulasi siklus sel maupun fungsi homeostasis sel dan mengarah pada invasi jaringan sekitarnya serta dapat menyebar ke bagian lain dalam tubuh. Sel kanker dapat berproliferasi terus-menerus secara tidak normal menyebabkan timbulnya jaringan abnormal yang tidak terkontrol dan berlebihan (Fehrman and Laimins, 2003).

*Korespondensi : Harwoko
Jurusan Farmasi UNSOED Soedirman Purwokerto
email: woko_har84@yahoo.com

Terapi penyakit kanker dapat dilakukan dengan cara pembedahan dan radiasi, namun terbatas pada kanker lokal stadium awal dan tidak efektif pada kanker stadium lanjut yang telah mengalami metastasis. Saat ini terapi kanker dengan obat (kemoterapi) hanya efektif untuk beberapa periode dan belum mampu memberikan hasil yang memuaskan. Oleh karena itu, pemilihan alternatif terapi yang aman, efektif dan selektif pada penyakit kanker sangat penting seperti penggunaan obat tradisional (Ma'at, 2004).

Seperempat dari hutan mangrove dunia terdapat di Indonesia dengan luas 4.251.000 hektar dan memiliki keanekaragaman hayati yang beragam dengan 89 jenis tumbuhan mangrove (Achmad, 2004). Hutan mangrove di pantai Cilacap mencapai 15.145 hektar dengan 17 jenis tumbuhan mangrove (Hadiyati T, 2000), diantaranya *Rhizophora* sp.

Menurut Soetarno (2000) tumbuhan mangrove mengandung senyawa bioaktif golongan tanin, saponin, terpenoid, alkaloid dan steroid dengan aktivitas sebagai anti mikroba, antifungi, antivirus, antitumor, insektisida dan antileukemia. Warsinah dan Yulia (2007) telah membuktikan bahwa ekstrak metanol kulit batang *R. mucronata* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan IC₅₀ sebesar 308 µg/mL.

Beberapa penelitian tanaman obat yang berpotensi sebagai antikanker mengarahkan target aksi pada gen-gen pengatur pertumbuhan atau proliferasi sel (Gibbs, 2000). *Rhizophora mucronata* (bakau) potensial untuk dikembangkan sebagai antikanker melalui penelitian dengan mengetahui aktivitas sitotoksik fraksi *n*-heksana : kloroform dari ekstrak metanol kulit batang *Rhizophora mucronata* pada sel Myeloma secara in vitro dan menentukan nilai IC₅₀.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan uji adalah kulit batang *R. mucronata* diambil dari pantai Nusakambangan Cilacap pada Juni 2009 kemudian dilakukan determinasi. Subjek uji adalah sel Myeloma dari kultur di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM. Bahan kimia dan media yang digunakan merupakan bahan standar yang biasa digunakan pada percobaan di laboratorium. Alat uji menggunakan mikroskop kontras (Olimpus), mikroskop fluoresens, *cell counter*, dan ELISA reader.

Jalannya penelitian

Fraksinasi ekstrak

Sebanyak 500 g serbuk kulit batang *R. mucronata* dimaserasi dengan 5 L metanol selama 3 x 24 jam, kemudian disaring dan diuapkan sampai diperoleh filtrat yang pekat, bebas pelarut dan berwarna merah kecokelatan. Selanjutnya 65,4 g ekstrak dilakukan ekstraksi kembali dengan partisi cair-cair menggunakan *n*-heksana, kloroform dan etil asetat menghasilkan fraksi *n*-heksana (1,05 g), fraksi kloroform (2,26 g), fraksi etil asetat (1,56 g) dan residu. Fraksi kloroform kemudian difraksinasi kembali dengan *n*-heksana: kloroform (3 : 2) sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana : kloroform.

Identifikasi kandungan kimia

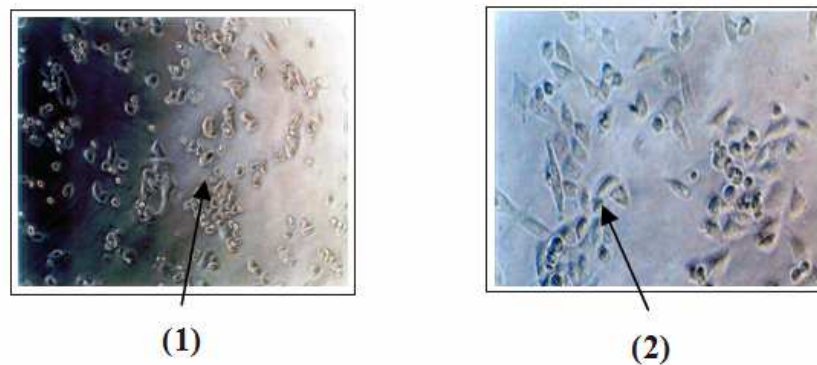
Uji kualitatif kandungan kimia dalam fraksi *n*-heksana : kloroform dari ekstrak metanol kulit batang *R. mucronata* dilakukan dengan pereaksi kimia untuk golongan flavonoid, terpenoid, dan alkaloid.

Uji sitotoksitas

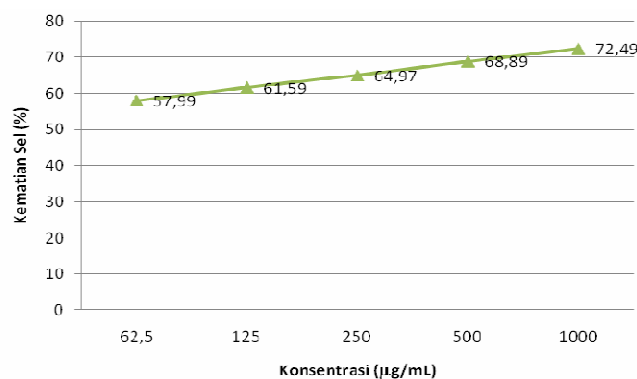
Sebanyak 100 µL suspensi sel Myeloma dengan kepadatan $2 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ didistribusikan ke dalam sumuran pada 96-well plate, ditambah fraksi *n*-heksana : kloroform dari ekstrak metanol kulit batang *R. mucronata* dengan seri kadar 1000, 500, 250, 125, 62,5 µg/mL. Kontrol adalah 100 µL suspensi sel Myeloma ditambah media dan sebagai blanko digunakan 100 µL suspensi sel ditambah DMSO 1,25% dalam media. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 24 jam. Pada akhir inkubasi ke dalam sumuran ditambahkan 10 µL MTT 5 mg/mL dalam RPMI. Kemudian diinkubasi 4 jam pada suhu 37° C. Sel uji yang hidup akan bereaksi dengan MTT ((3-(4,5-dimetiltiazolil-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida)) membentuk warna ungu. Reaksi dengan MTT dihentikan dengan *reagen stopper*. Kemudian diinkubasi semalam pada suhu kamar, serapan dibaca pada ELISA reader panjang gelombang 550 nm.

Pengecatan DNA

Sel (kepadatan 2×10^4 sel/sumuran) ditanam pada coverslips dalam 24-wellplate sampai 50% konfluen. Sehari sebelum perlakuan, medium diganti dengan medium PRF RPMI 1640 kemudian diinkubasi dengan sediaan uji selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan doublestaining dengan 1x *working solution*. Medium diambil kemudian sel pada sumuran ditambahkan 10 µL campuran Etidium Bromida dan Akridin Oranye



Gambar 1. Morfologi sel myeloma dengan penambahan MTT pada sel mati⁽¹⁾ berwarna gelap berbentuk bulat tanpa dikelilingi serabut formazan dan sel myeloma hidup⁽²⁾ berwarna ungu yang dikelilingi oleh serabut formazan.



Keterangan : kurva telah dikoreksi dengan jumlah kematian sel akibat pelarut.

Gambar 2. Persentase kematian sel myeloma pada berbagai konsentrasi fraksi *n*-heksana : kloroform kulit batang *R. mucronata*.

dan didiamkan selama 5 menit. *Coverslips* yang memuat sel diangkat, diletakkan di atas *object glass* dan segera diamati di bawah mikroskop fluoresens. Sel hidup akan berfluoresens hijau (dengan Akridin Oranye) dan sel mati akan berfluoresens merah (dengan Etidium Bromida).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji kualitatif kandungan kimia

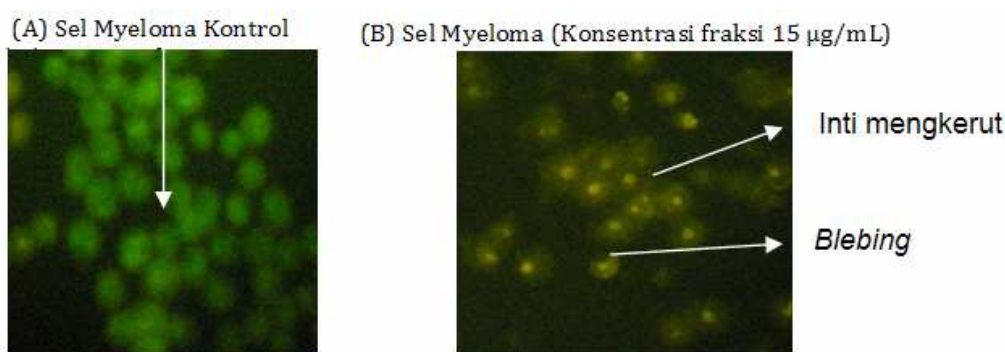
Kandungan kimia dalam fraksi aktif yaitu fraksi *n*-heksana : kloroform dari ekstrak metanol kulit batang *R. mucronata* yang berpotensi sebagai antikanker dilakukan uji dengan pereaksi warna dan memberikan hasil positif terhadap uji flavonoid, dan terpenoid. Diastuti *et al.*, (2008) melaporkan bahwa senyawa yang terdapat pada fraksi kloroform dari ekstrak etanol kulit batang *R. mucronata* adalah flavonoid, terpenoid dan alkaloid yang secara sinergis atau individual

diduga mampu menghambat *cell cycle progression* dari sel Myeloma.

Uji sitotoksitas

Hasil pengamatan sel Myeloma setelah penambahan sampel uji dan reagen MTT menunjukkan terjadi perubahan warna pada sumuran perlakuan sampel dari merah muda menjadi kuning muda, sedangkan pada perlakuan kontrol pelarut DMSO dan kontrol sel berubah warna dari merah muda menjadi ungu dan terdapat serabut formazan yang berwarna ungu berbentuk jarum (Gambar 1).

Sel kontrol tampak berbentuk seperti daun, menempel di dasar sumuran, sedangkan sel dengan perlakuan kadar 1000 µg/mL tampak banyak yang mati dan berubah bentuknya, keruh dan mengapung, tidak terbentuk serabut formazan. Harga serapan pada *ELISA reader* untuk



Gambar 3. Penampakan morfologi DNA sel myeloma setelah pengecatan dengan etidium bromida pada jam ke-48, perbesaran 100x.

tiap sumuran berkorelasi langsung dengan jumlah sel yang hidup, kemudian akan ditentukan persentase kematian sel Myeloma untuk menghitung harga IC_{50} dengan analisis probit.

Setelah dilakukan koreksi pengaruh pelarut pada kematian sel Myeloma, hasil uji sitotoksik fraksi *n*-heksana : kloroform kulit batang *R. mucronata* menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 15 µg/mL (Gambar 2). Nilai ini lebih kecil jika dibandingkan dengan IC_{50} dari fraksi kloroform ekstrak etanol kulit batang *R. mucronata* sebesar 91,49 µg/mL (Diastuti *et al.*, 2008) dan menyatakan tingkat sitotoksitas fraksi *n*-heksana : kloroform kulit batang *R. mucronata* pada sel kanker dengan IC_{50} kurang dari 1000 µg/mL sehingga dapat dilanjutkan pengecatan DNA.

Pengecatan DNA

Pengecatan DNA dilakukan untuk mendapatkan data kualitatif morfologi sel yang dilakukan dengan memfiksasi sel menggunakan metanol kemudian dicat dengan campuran akridin oranye dan etidium bromida yang dapat berinteraksi dengan DNA maupun RNA. Hasil pengecatan ini dapat diamati di bawah mikroskop fluoresens (Gambar 3).

Hasil pengecatan DNA terlihat bahwa sel kontrol (A) mengandung DNA yang masih utuh, tampak terang dan berwarna hijau, berbeda dari sel dengan perlakuan kadar 15 µg/mL (B) tampak berwarna jingga terang dengan inti sel mengkerut terjadi *blebbing* dan ada yang telah terfragmentasi atau tidak utuh lagi menunjukkan terjadi kematian sel dengan mekanisme apoptosis.

Pada sel Myeloma kontrol tidak terjadi apoptosis karena regulator apoptosis pada sel

Myeloma, yaitu protein p53 akan diikat dan didegradasi oleh protein E6 dari HPV (*Human Papiloma Virus*). Pada kadar fraksi 15 µg/mL mengindikasikan terjadinya mekanisme *cell cycle arrest* dan diduga ada kematian sel. Data pengecatan DNA dapat mendukung dugaan adanya kematian sel dengan kemungkinan melalui mekanisme apoptosis.

KESIMPULAN

Fraksi *n*-heksana : kloroform dari ekstrak metanol kulit batang *Rhizopora mucronata* memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker myeloma dengan nilai IC_{50} sebesar 15 µg/mL serta kandungan kimia dalam fraksi tersebut adalah senyawa flavonoid dan terpenoid.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S. A., 2004, Kimia Bahan Alam, Suatu Pendekatan untuk Memahami Potensi Keanekaragaman Hayati dalam Bioindustri, *Prosiding Seminar Nasional*, Universitas Airlangga, Surabaya, 5 September 2004, 1-25.
- DepKes R.I., 2005, *Profil Kesehatan Indonesia*, Depkes R.I Jakarta, 21-25
- Diastuti, H., Warsinah, Purwati, 2008, Isolasi Senyawa Bioaktif pada Tanaman *Rhizopora mucronata* sebagai Bahan Antikanker, *Laporan Penelitian*, Lembaga Penelitian UNSOED, Purwokerto.
- Fehrman, F. dan Laimins, L.A., 2003, Human Papilloma Viruses; Targetting Differentiating Ephitel Cells for Malignant Tranformation, *Oncogen*, 22: 5201-5207.

- Gibbs J. B., 2000, Anticancer Drugs Targets, Growth Factors and Growth Factor Signaling, *J Clinvers*, 105 (1): 9- 13.
- Hadiyati, T., 2000, Zonasi Mangrove Pada Daerah Akresi dan Non Akresi di Segara Anakan Cilacap, *Biosfera, A Scientific Journal*. Vol 17
- Ma'at, S., 2004, Obat Tradisional untuk Pelayanan Kesehatan Formal. *Prosiding Seminar Nasional*, Universitas Airlangga, Surabaya, 5 September 2004, 45-49.
- Soetarno, S., 2000, Potensi dan Manfaat Tumbuhan Mangrove sebagai Sumber Bahan Bioaktif, *Acta Pharmaceutica Indonesia*, 12 (4): 84-103.
- Warsinah dan Yulia, 2007, Fraksinasi Ekstrak Metanol Kulit Batang *Rhizophora mucronata* dan Uji Daya Hambatnya terhadap Bakteri *Escherichia coli*, *Majalah Molekul*.