

Uji Sitotoksik Fraksi Ekstrak Etanol Daun Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter)Roxb.) Dengan Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*

Dwi Dinni Aulia Bakhtra^{1*}, Aried Eriadi¹, Rahimatul Uthia^{1,2}, Edri Rovi Mubaraq¹

¹Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM) Padang

²Poltekkes Kemenkes Riau

*E-mail: dwidinni89@gmail.com

Abstrak

Penelitian uji sitotoksik fraksi ekstrak etanol daun gambir (*Uncaria gambir* (Hunter)Roxb.) dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik berupa nilai LC₅₀. Dari berat simplisia daun gambir 200 gram diperoleh berat ekstrak kental 37,49 gram. Hasil fraksinasi dari ekstrak etanol dengan menggunakan berbagai pelarut didapatkan berat fraksi n-heksan 6,51 gram, fraksi diklormetana 3,24 gram dan fraksi air 5,72 gram. Hasil uji aktivitas sitotoksik dari beberapa fraksi diperoleh hasil nilai LC₅₀ adalah 51,202 µg/ml dari fraksi n-heksan (toksik), 8,29 µg/ml dari fraksi diklormetana (sangat toksik) dan 31,26 µg/ml dari fraksi air (toksik). Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa fraksi diklormetana bersifat sangat toksik dan berpotensi sebagai anti kanker.

Kata Kunci : Aktivitas sitotoksik; BSLT; Daun gambir; Fraksi

Abstract

The cytotoxic test from ethanol extract of gambier leaves (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) Using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method aims to determine the cytotoxic activity form LC₅₀ values. From the simplicia weight of 200 grams of gambier leaves, the weight of thick extract was 37.49 grams. The results of fractionation of ethanol extract using various solvents obtained weight of n-hexane fraction of 6.51 grams, dichormethane fraction of 3.24 grams and water fraction of 5.72 grams. The cytotoxic activity test results from several fractions obtained LC₅₀ values were 51.202 µg / ml from the n-hexane (toxic) fraction, 8.29 µg / ml from the dichormethane (very toxic) fraction and 31.26 µg / ml from the water (toxic) fraction). From the results of this study it can be concluded that the fraction of diclormethane is very potent and has the potential to be anti-cancer.

Keywords: Cytotoxic activity; BSLT; Gambir leaf; Fraction

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki sumber daya alam yang beraneka ragam, yaitu memiliki sekitar 30.000 jenis tumbuhan yang telah diidentifikasi dan 950 jenis diantaranya berpotensi digunakan untuk pengobatan. Salah satu tanaman obat yang banyak digunakan masyarakat untuk pengobatan adalah daun gambir (*Uncaria gambir* (Hunter)Roxb.).

Secara tradisional daun gambir digunakan untuk bahan campuran menyirih, obat luka, demam, sakit kepala, sakit perut dan infeksi jamur. Kandungan metabolit sekundernya adalah katekin seperti kateku tanat, pirokatekol, kateku merah, kuersetin, lilin, alkaloid gambirin, gambir flouresensi

(Badan Pengawas Obat & Makanan Republik Indonesia, 2006).

Ekstrak daun gambir memiliki aktivitas seperti antioksidan (Apea-Bah *et al.*, 2009; Anggraini *et al.*, 2011), antibakteri (Burkill, 1966; Apea-Bah *et al.*, 2009), pengobatan pasien hepatitis (Akbar, 2007), proteksi sel-sel antibodi dari sel makrofag peritoneal yang terinduksi dengan endometriosis lipopolisakarida (Voravuthikunchai *et al.*, 2004), proteksi terhadap kematian sel terinduksi glutamat pada kultur sel neuron (Mizoguchi *et al.*, 1986).

Senyawa sitotoksik adalah senyawa atau calon obat yang bekerja membunuh dan

menghambat pertumbuhan sel yang sedang berkembang (Mayer & Gustafson, 2004). Salah satu metode pengujian aktivitas sitotoksik adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Larva *Artemia salina* dianalogikan dengan kematian sebuah sel dalam organisme (Fenton & Longo, 2011).

METODE

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pinset, pipet mikro (Hamilton), rak tabung reaksi, pipet volumetrik, timbangan (Precisa), tisu, maserator, erlenmeyer (Pyrex), waterbath, hotplate (Cimarec), beaker glass (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), rotary evaporator (Hahnvapors model HS-2361N5), corong pisah (Pyrex), spatel, vial, wadah pembiakan larva, aerator, kamera. Sedangkan, bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb), etanol 70 % (Brataco), etil asetat (Brataco), n-heksan (Brataco), n-butanol (Brataco), air laut, (serbuk Magnesium), (Asam klorida), Mayer (Merkuri klorida dan Kalium iodida), Feri klorida (Merck), Asetat anhidrida (Merck) dan Dimethyl sulfoxide (Merck).

Prosedur kerja

Pengambilan sampel

Sampel berupa daun gambir diambil sebanyak 3 kg yang berasal dari perkebunan rakyat di daerah Ampalu, Desa Aur Duri, Kecamatan Sutura, Kabupaten Pesisir Selatan, Provinsi Sumatera Barat. Sampel daun segar kemudian dimasukkan dalam wadah plastik bersih dan dibawa ke laboratorium. Identifikasi tanaman dilakukan di Herbarium ANDA, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat.

Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak etanol dari simplisia daun gambir dibuat dengan cara maserasi dengan menggunakan etanol 70 %. Satu bagian serbuk simplisia daun gambir

dimasukkan ke dalam maserator, ditambah 10 bagian etanol 70 %, direndam selama 6 jam sambil sesekali diaduk, kemudian diamkan selama 6 jam sambil sesekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan filtrasi dan proses diulangi dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai didapatkan ekstrak kental (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000).

Pembuatan Fraksi

Sebanyak 20 g ekstrak kental dilarutkan dalam 100 mL air. Larutan selanjutnya difraksinasi dengan menambahkan 100 mL n-heksan. Dikocok dalam labu pemisah dan didiamkan selama 10-15 menit hingga terdapat dua lapisan (air pada lapisan bawah dan n-heksan pada lapisan atas). Kedua lapisan yang terbentuk kemudian dipisahkan. Proses penambahan n-heksan pada lapisan bawah (air) yang sudah dipisahkan diulangi dua kali. Lapisan atas (n-heksan) yang terbentuk selama tiga kali fraksinasi digabungkan dan disebut sebagai fraksi n-heksan. Bagian air sisa dari proses fraksinasi n-heksan kemudian difraksi lebih lanjut dengan diklorometana. Proses yang terjadi sama dengan proses fraksinasi dengan pelarut n-heksan. Lapisan diklorometana yang nantinya akan terbentuk selama tiga kali fraksinasi digabungkan dan disebut fraksi diklorometana, begitu pula dengan lapisan air yang disebut sebagai fraksi air (Wala, *et al.*, 2015).

Persiapan Hewan Percobaan

Penetasan telur dilakukan pada wadah bening dengan menggunakan media air laut. Telur *Artemia salina* ditimbang sebanyak 1 gram kemudian direndam dalam 75 mL air, biarkan selama 1-2 jam. Setelah itu telur yang telah direndam dipindahkan ke dalam air garam yang telah disediakan untuk siap ditetaskan. Telur *Artemia salina* dibiarkan terlebih dahulu di dalam wadah biak yang berisi air laut yang dilengkapi aerator dan cahaya lampu pijar 40-60 watt selama proses penetasan. Untuk penetasan sebaiknya pH

larutan berada dalam kisaran 7,5-8,5. Sedangkan temperatur untuk penetasan larva berkisar antara 25-30 °C. Kemudian dibiarkan selama 48 jam sehingga berbentuk larva *Artemia salina*.

Konsentrasi

Masing-masing fraksi dari ekstrak etanol daun gambir ditimbang sebanyak 30 mg, kemudian dilarutkan dalam 3 ml etanol dan ini merupakan larutan induk sampel. Pengujian dilakukan dengan cara 3 variasi konsentrasi yaitu 1000, 100 dan 10 ppm, dan setiap konsentasi dibuat rangkap 3. Larutan uji disiapkan dengan memipet masing-masing 500, 50 dan 5 µL dari larutan induk, setelah uji larutan induk dimasukkan dalam desikator sampai semua pelarutnya menguap.

Perlakuan Pada Hewan Percobaan

Masing-masing fraksi dari ekstrak etanol daun gambir ditimbang sebanyak 30 mg, kemudian dilarutkan dalam 3 ml etanol dan ini merupakan larutan induk sampel. Pengujian dilakukan dengan cara 3 variasi konsentrasi yaitu 1000, 100 dan 10 ppm, dan setiap konsentasi dibuat rangkap 3. Larutan uji disiapkan dengan memipet masing-masing 500, 50 dan 5 µL dari larutan induk, setelah uji larutan induk dimasukkan dalam desikator sampai semua pelarutnya menguap. Sebagai kontrol disiapkan 3 vial yang hanya diisi 50 µL larutan DMSO, kemudian ditambahkan air laut 2 mL. Sebanyak 10 ekor larva udang dimasukkan dalam vial tersebut, kemudian volume dicukupkan 5 mL dengan air laut. Jumlah larva yang hidup dihitung setelah 24 jam, maka dapat diketahui jumlah larva yang mati, nilai LC_{50} dihitung dengan menggunakan metode kurva (Kamu *et al.*, 2010).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil identifikasi sampel yang dilakukan di Herbarium Laboratorium Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas

menunjukkan sampel yang digunakan adaah tanaman daun gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb). Hasil uji organoleptis simplisia daun gambir didapatkan hasil warna coklat kekuningan, rasa kelat, bau khas, bentuk serbuk hablur. Proses penyiapan ekstrak simplisia daun gambir menggunakan metode maserasi karena sampel yang digunakan dalam jumlah yang banyak, pelaksanaan yang sederhana dan tidak memerlukan perlakuan khusus serta kemungkinan terjadinya penguraian zat aktif oleh pengaruh suhu dapat dihidari karena tidak menggunakan proses pemanasan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1985). Ekstrak kental daun gambir didapatkan 37,4896 gram dengan rendemen 18,7448%. Efektivitas proses ekstraksi dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan sebagai penyari, ukuran partikel simplisia dan lamanya proses ekstraksi. Uji organopeltis ekstrak daun gambir didapatkan hasil warna merah kecoklatan, rasa kelat, bau khas dan bentuk ekstrak kental. Kandungan kimia ekstrak adalah flavonoid, saponin, fenol, tanin, terpenoid dan alkaloid.

Selanjutnya dilakukan proses fraksinasi. Fraksinasi adalah proses pemisahan senyawa-senyawa berdasarkan pada tingkat kepolaran. Proses fraksinasi dilakukan dengan menggunakan variasi pelarut yaitu n-heksan, diklorometan dan air. Hasil fraksinasi didapatkan fraksi n-heksan 6,51 gram, berat fraksi diklorometana 3,24 gram dan fraksi air 5,72 gram. Pelarut larutan sampel uji digunakan dimetil sulfoksida (DMSO). DMSO merupakan pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa baik polar, semipolar dan non polar. Selain itu juga tidak memberikan pengaruh terhadap proliferasi sel dan tidak bersifat toksik (Yulia & Hindyana, 2017).

Pengujian sitotoksik dari beberapa fraksi daun gambir dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Uji Sitotoksik Fraksi Daun Gambir

Fraksi	Konsentrasi	Persentase kematian	Nilai probit	LC ₅₀ (µg/ml)
Heksan	1000	83	5,95	51,203
	100	70	5,52	
	10	23	4,26	
Diklorometana	1000	100	8,09	8,294
	100	86	6,08	
	10	63	5,33	
Air	1000	93	6,48	31,26
	100	66	5,41	
	10	33	4,56	

Dari Tabel 1, dapat dilihat bahwa nilai LC₅₀ fraksi n-heksan, diklorometan dan air bervariasi yaitu 51,203 µg/ml, 8,294 µg/ml dan 31,26 µg/ml. Menurut Mc Laughlin (1991) kategori sangat toksik apabila nilai LC₅₀ 0-30 µg/ml, 30-1000 µg/ml berada dalam kategori toksik dan lebih 1000 µg/ml berada dalam kategori tidak toksik. Metode perhitungan nilai LC₅₀ adalah metode kurva karena perhitungan dan cara memahaminya lebih mudah jika dibandingkan metode yang lainnya.

Kandungan senyawa kimia yang terkandung dalam daun gambir yang berpotensi sebagai anti kanker adalah flavonoid dan fenolik. Mekanisme senyawa flavonoid sebagai anti kanker adalah pengaktifan jalur apoptosis sel kanker. Mekanisme apoptosis sel terjadi akibat fragmentasi DNA. Fragmentasi diawali dengan dilepaskannya rantai proksimal DNA oleh senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksil. Selain itu flavonoid juga sebagai penghambat proliferasi tumor atau kanker yang salah satunya dengan menghambat aktivitas protein kinase sehingga menghambat jalur transduksi sinyal dari membran ke inti sel. Flavonoid menghambat aktivitas reseptor tirosin kinase karena aktivitas reseptor tirosin kinase meningkat berperan terhadap keganasan sel kanker (Ren *et al.*, 2003).

Senyawa fenolik banyak terdapat di alam di antaranya polifenol dan asam fenolat terutama turunan 4-hidroksi benzoat dan

asam 4-hidroksisinamat. Asam fenolat berperan dalam mencegah kanker (Meiyanto *et al.*, 2008). Beberapa senyawa polifenol katekin yang ditemukan dalam genus *Uncaria* menunjukkan potensi sebagai antioksidan dan antikanker (Gumbira *et al.*, 2009).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan :

1. Fraksi ekstrak etanol daun gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) menggunakan metode BSLT memiliki aktivitas sitotoksik
2. Fraksi n-heksan memiliki nilai LC₅₀ 51,203 µg/ml dan fraksi air dengan nilai LC₅₀ 31,260 µg/ml berada dalam kategori toksik. Sedangkan fraksi diklorometan diperoleh nilai LC₅₀ sebesar 8,294 µg/ml yang berada pada kategori sangat toksik.

SARAN

Disarankan pada penelitian selanjutnya untuk melakukan uji sitotoksik fraksi etanol daun gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) dengan menggunakan metode *Microculture Tetrazolium assay*.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, N. (2007). Diagnostik Hepatitis Akut dan Kronis. Jakarta: Bagian Ilmu Penyakit Dalam FKUI/RSCM.
- Anggraini, T., Tai, A., Yoshiro, T & Itani, T. (2011). Antioxidative activity and catechin content of four kinds of *Uncaria gambir* extract from West Sumatera, Indonesia. *African Journal of Biochemistry Research*, 5(1):33-38
- Apea-Bah, FB., Hanafi, M., Dwei, RT., Fajriah, S., Darwaman, A., Artianti, N., Lotulung, P., Ngadymang, P & Minarti, B. Assesment Of The DPPH & Glucosidase Inhibitory Potential Of Gambier And Qualitative Identification Of Major Bioactive Compound. *Journal of Medicine Plants Research*, 3(10):736-757.
- Badan Pengawas Obat & Makanan Republik Indonesia. (2006). *Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia Volume 2*. Jakarta: BPOM
- Burkill, H. (1966). *A Dictionary of the Economic Products of The Malay Peninsula* vol. II (I-Z), Ministry Agriculture and Cooperative, Kuala Lumpur, 2238
- Departemen kesehatan republik indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat Tradisional*. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat & Makanan.
- Fenton, R.G & Longo, D.L. (2011). *Cancer Cell Biology & Angiogenesis. Harrison's principles of internal medicine* (18th ed). New York: Mc Graw-Hill Medical Publishing Division.
- Gumbria, S., Syamsu, K., Mardiyati, E., Herryandie, A., Afni, N & Rahayu, D.L. (2009). *Agroindustri dan Bisnis Gambir Indonesia*. Bogor.
- Kamu, VS., Runtuwene, J., Lisa, R. (2010). *Analisis Toksisitas Ekstrak Buah Pinang Yaki (Areca vestiaria Giseke)*. Jurusan Kimia, Fakultas Matematika & Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi.
- Mayer, A.M.S & Gustafson, K.R. (2004). Marine Pharmacology In 2001-2002: Antitumor & Cytotoxic Compounds. *European Journal Of Cancer*, 40: 2676-2704.
- McLaughlin, J.L. (1991). Crown Gall Tumours On Potato Discs And Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassays For Higher Plant Screening And Fractination. *Methods in plant biochemistry*, 6:1-32.
- Meiyanto, E., Susidarti, R.A., Handayani, S., Rahmi, F. (2008). Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Areca catechu* L.) Mampu Menghambat Proliferasi Dan Memacu Apoptosis sel MCF-7. *Majalah Farmasi Indonesia*, 19(1):12-19.
- Mizoguchi, Y., Sakagami, Y., Kobayashi, K. (1986). Protection of liver cells from experimentally-induced liver cell injury by cianidanol, a constituent of *uncaria gambir*. *Wakan iyaku gakkaishi*, 3:148-152.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L. (2003). Flavonoids: Promising Anticancer Agent. *Medicinal Research Reviews*, 23(4):519-534.
- Voravuthikunchai, S.P., Mitchel, H. (2008). Inhibitory Killing Activities Of Medicinal Plants Againts Multiple Antibiotic Resistant *Helicobacter pylory*. *Journal of Health Science*, 54(1):81-88.
- Wala, M.E., Suryanto, E., Wewengkang, D.S. (2015). Aktivitas Antioksidan Dan Tabir Surya Fraksi Dari Ekstrak Lamun (*Syringodium isoetifolium*). *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 4(4):282-289.
- Yulia, M., & Hidayana. V. (2017). Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Selasih (*Ocimum basilicum* L.) Terhadap Larva Udang (*Artemia salina* L.). *Scientia: Jurnal Farmasi Dan Kesehatan*, 7(2):173-178.