

STUDI AWAL POTENSI ANTIKANKER FRAKSI DAUN SRIGADING (*NYCTANTHES ARBOR-TRISTIS* L.) MELALUI UJI SITOTOKSIK DENGAN METODE *BRINE-SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT)

¹Esti Rachmawati Sadiyah, ²Endah Rismawati Eka Sakti, ³Siti Hazar, ⁴Nelly Mandasari, ⁵Eva Nurlaela, ⁶Mugia Kurniawan

¹ Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Jl. Ranggamalela No. 1 Bandung 40116

e-mail: ¹ esti_sadiyah@ymail.com

Abstrak. Potensi antikanker senyawa fitokimia dari bahan alam dapat ditunjukkan salah satunya melalui aktivitas sitotoksik. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk menguji potensi aktivitas sitotoksik adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang (*Artemia salina* Leach). Srigading atau harsingar (*Nyctanthes arbor-tristis* L.) adalah tumbuhan yang memiliki potensi aktivitas sitotoksik. Metode penelitian yang dilakukan mencakup penyiapan bahan, penapisan fitokimia, ekstraksi dengan metode maserasi dan refluks, fraksinasi, serta pengujian aktivitas sitotoksik dengan metode BSLT. Hasil uji sitotoksik dengan metode BSLT pada ekstrak dan fraksi menunjukkan bahwa fraksi n-heksan hasil maserasi dengan etanol 96% memiliki aktivitas sitotoksik yang signifikan dengan nilai LC_{50} sebesar 30,516 ppm. Hal tersebut memperlihatkan bahwa senyawa yang terkandung dalam fraksi n-heksan berdasarkan penapisan fitokimia yang berupa alkaloid, flavonoid, fenolat, monoterpen-seskuiterpen, dan steroid-triterpen memiliki potensi sebagai antikanker.

Kata kunci: srigading, maserasi, refluks, ekstrak, fraksi, sitotoksik, BSLT.

1. Pendahuluan

Bahan alam terutama tumbuhan diketahui mengandung senyawa antikanker yang memiliki kemampuan untuk mencegah maupun mengobati penyakit kanker. Jika dikonsumsi secara rutin setiap hari senyawa antikanker yang berasal dari tumbuhan juga diketahui dapat mengurangi kejadian beberapa jenis kanker. Senyawa fitokimia tersebut dapat bersinergi dengan obat-obatan kemoterapi untuk mengatasi resistensi obat kanker dan penggunaan lebih jauhnya juga dapat memungkinkan penurunan konsentrasi obat terapi kanker yang disertai dengan peningkatan efisiensi (Rahman & Khan, 2013: 74).

Adapun potensi antikanker senyawa fitokimia dari bahan alam dapat ditunjukkan salah satunya melalui aktivitas sitotoksik. Senyawa yang bersifat sitotoksik adalah senyawa yang dapat menimbulkan kematian sel melalui gangguan fungsi metabolic atau pertumbuhan sel (proliferasi). Senyawa sitotoksik dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan dari sel tumor malignan. Senyawa sitotoksik tersebut dapat berupa senyawa yang larut dalam air (polar dan semipolar) maupun tidak larut dalam air (nonpolar), metabolit primer (protein) maupun sekunder (flavonoid, alkaloid, terpenoid) (Rahman & Khan, 2013: 76-79).

Potensi antikanker dapat diketahui melalui penelitian awal berupa uji aktivitas sitotoksik. Salah satu metode yang digunakan adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode tersebut menggunakan larva udang (*Artemia salina* Leach) sebagai

bioindikator tingkat toksisitas senyawa yang diuji ditunjukkan melalui nilai *Median Lethal Concentration* (LC₅₀) (Meyer, dkk., 1982: 32).

Srigading atau harsingar (*Nyctanthes arbor-tristis* L.) adalah tumbuhan yang memiliki potensi aktivitas sitotoksik. Senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak etanol batang dan daun tumbuhan ini di antaranya adalah alkaloid, senyawa fenol, tannin, terpenoid, saponin, dan flavonoid (Chidi dkk, 2015: 208). Senyawa-senyawa tersebut memiliki kepolaran yang beragam, baik yang dapat terlarut dalam pelarut non polar seperti n-heksan, maupun yang dapat terlarut dalam air yang bersifat polar. Sejauh yang dapat ditelusuri, belum ada publikasi ilmiah mengenai aktivitas sitotoksik fraksi n-heksan, fraksi kloroform, fraksi etil asetat, fraksi air, serta fraksi alkaloid daun srigading yang diuji dengan metode BSLT.

2. Metode Penelitian

Penelitian ini mencakup beberapa tahapan yaitu penyiapan bahan, penapisan fitokimia, ekstraksi dengan metode maserasi dan refluks, fraksinasi serta pengujian aktivitas sitotoksik dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan perhitungan LC₅₀ dengan metode probit.

Bahan yang digunakan adalah daun srigading (*Nyctanthes arbor-tristis* L.) yang telah dideterminasi di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Penapisan fitokimia pada simplisia dan ekstrak dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa golongan flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, steroid/triterpenoid, kuinon, monoterpen dan sesquiterpen.

Ekstraksi dilakukan dengan dua metode, yaitu maserasi (cara dingin) dan refluks (cara panas). Pada metode maserasi digunakan dua macam pelarut yaitu etanol 96% untuk mendapatkan kandungan flavonoid serta metanol untuk mendapatkan kandungan alkaloid. Pada metode refluks hanya menggunakan etanol 96%. Ekstrak hasil maserasi dengan etanol 96% yang diperoleh kemudian difraksinasi dengan n-heksana, kloroform, etil asetat, dan air. Sementara itu, ekstrak hasil maserasi dengan metanol difraksinasi untuk mendapatkan fraksi-fraksi alkaloid berdasarkan derajat keasamannya. Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair (ECC).

Seluruh ekstrak dan fraksi yang diperoleh kemudian diuji aktivitas sitotoksiknya dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), dengan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai hewan ujinya. Parameter LC₅₀ dihitung dengan metode probit (Chidi dkk, 2015: 207, Fatimatuzzahra, 2013: 32). Penyiapan larva udang dilakukan dengan merendam telur udang (*Artemia salina* Leach) di dalam wadah penetasan yang berisi air garam di bawah cahaya lampu pijar 60 watt (jarak sinar lampu dengan wadah penetasan ± 20 cm) pada suhu kamar, yang dilengkapi dengan pengatur suhu akuarium dan *aerator*. Telur dibiarkan selama 24 jam sampai menetas menjadi larva. Setelah berumur 48 jam, larva siap digunakan (Teng Wah Sam, 1993 dalam Steven & Russel, 1993: 445). Konsentrasi larutan sampel uji yang digunakan adalah 0; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 250; dan 300 ppm (Rija'i, 2013: 27-28). Larutan diaduk hingga homogen menggunakan vortex, kemudian larva udang (*Artemia salina* Leach) sebanyak 10 ekor dimasukkan ke dalam vial tersebut, dan vial ditutup dengan aluminium foil, serta diinkubasi selama 24 jam (Rija'i, 2013: 28). Pengujian dilakukan sebanyak tiga pengulangan (triplo) untuk masing-masing konsentrasi pada ekstrak dan fraksi. Kematian larva udang diamati setelah 24 jam kemudian persen kematian dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\%kematian = \frac{\Sigma \text{ larva mati}}{\Sigma \text{ larva uji}} \times 100\%$$

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Penapisan Fitokimia

Berdasarkan hasil penapisan fitokimia simplisia, ekstrak maupun fraksi daun srigading (*Nyctanthes arbor-tristis* L.) menunjukkan bahwa baik pada simplisia, ekstrak, maupun fraksi daun srigading mengandung alkaloid, flavonoid, serta senyawa fenolat. Namun, baik pada simplisia dan ekstrak daun srigading tidak terdeteksi adanya kandungan senyawa tannin. Kandungan saponin terdeteksi pada simplisia dan ekstrak metanol hasil maserasi, sedangkan pada ekstrak etanol baik hasil maserasi maupun refluks, serta pada fraksi tidak terdeteksi. Senyawa monoterpen dan seskuiterpen terdeteksi pada simplisia, seluruh ekstrak dan fraksi, kecuali fraksi air baik hasil maserasi maupun refluks. Steroid/triterpenoid terdeteksi juga pada simplisia, seluruh ekstrak dan fraksi kecuali pada fraksi etil asetat (semi polar) dan fraksi air (polar), baik hasil maserasi maupun refluks. Sebaliknya, kandungan kuinon terdeteksi pada simplisia, seluruh ekstrak dan fraksi kecuali pada fraksi n-heksan dan fraksi kloroform yang bersifat non polar, baik hasil maserasi maupun refluks (Tabel 1).

Tabel 1
Hasil penapisan fitokimia simplisia, ekstrak, dan fraksi

Golongan Senyawa	Simplisia	Maserasi						Refluks				
		E M	E E	FH M	FK M	FEt M	FA M	E R	FH R	FK R	FEt M	FA R
Alkaloid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tanin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenolat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Monoterpen seskuiterpen	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Steroid/ Triterpenoid	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Kuinon	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
Saponin	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: (+) Terdeteksi; (-) Tidak terdeteksi; (EM) ekstrak maserasi dengan metanol; (EE) ekstrak maserasi dengan etanol; (FHM) fraksi n-heksana hasil maserasi; (FKM) fraksi kloroform hasil maserasi; (FEtM) fraksi etil asetat hasil maserasi; (FAM) fraksi air hasil maserasi. (ER) ekstrak refluks; (FHR) fraksi n-heksana hasil refluks; (FKR) fraksi kloroform hasil refluks; (FEtM) fraksi etil asetat hasil refluks; (FAM) fraksi air hasil refluks.

3.2 Pengujian Aktivitas Sitotoksik Ekstrak dan Fraksi Ekstrak Etanol dan Fraksi

Tabel 2 menunjukkan rata-rata jumlah larva yang mati pada setiap kelompok uji yang diberi ekstrak atau fraksi hasil maserasi.

Tabel 2.
Hasil pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak etanol 96% dan fraksi flavonoid hasil maserasi

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata Jumlah Larva Mati pada Sampel Uji				
	Ekstrak Etanol 96%	Fraksi n-heksan	Fraksi kloroform	Fraksi etil asetat	Fraksi Air
0	0	0	0	0	0
5	0	1,67	0	0,33	0,33
10	0	2,67	1	1,33	1
25	1	3,67	1,67	2,33	2
50	3	4,33	3,67	3	2,67
75	5	5	4	3,67	3,33
100	5,33	5,67	5	4	5
125	6	7	5,67	5,67	5,67
150	7,33	7,67	7	10	8,33
175	8	10	8	10	8,67
200	10	10	9	10	9
250	10	10	9,33	10	10
300	10	10	10	10	10

Ekstrak dan fraksi hasil refluks menunjukkan aktivitas yang berbeda. Tabel 3 memperlihatkan bahwa pada konsentrasi 5 ppm yang telah menunjukkan kematian larva adalah kelompok yang diberi fraksi kloroform dan fraksi etil asetat, sedangkan fraksi n-heksan dan fraksi air baru menunjukkan kematian larva pada konsentrasi 10 ppm. Sama seperti hasil yang ditunjukkan pada aktivitas sampel hasil maserasi, kelompok yang diberi fraksi etil asetat hasil refluks juga menunjukkan kematian seluruh larva pada konsentrasi 150 ppm. Di samping itu, kelompok yang diberi fraksi n-heksan juga menunjukkan kematian seluruh larva pada 150 ppm, sedangkan pada kelompok yang diberi fraksi kloroform menunjukkan kematian seluruh larva pada 175 ppm. Pada kelompok yang diberi ekstrak etanol dan fraksi air tidak menunjukkan kematian seluruh larva walaupun pada konsentrasi tertinggi (300 ppm).

Tabel 3**Hasil pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak etanol 96% dan fraksi flavonoid hasil refluks**

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata Jumlah Larva Mati pada Sampel Uji				
	Ekstrak Etanol 96%	Fraksi n-heksan	Fraksi kloroform	Fraksi etil asetat	Fraksi Air
0	0	0	0	0	0
5	0	0	1,33	0,33	0
10	0	1,67	1,33	1	1
25	0	2	1,67	1,67	1
50	0,67	4,67	2,33	2	1,67
75	2	6	3	3,67	2,33
100	2,67	7	3,67	4,33	3,67
125	4	7,67	5,67	5,33	4
150	5	10	6	10	5
175	5,67	10	10	10	5,67
200	6	10	10	10	6,33
250	6,33	10	10	10	8
300	8,33	10	10	10	9

Hasil perhitungan jumlah kematian yang diperoleh selanjutnya dikonversi menjadi nilai probit dan digunakan untuk mendapatkan persamaan yang menunjukkan hubungan antara nilai probit dengan log konsentrasi ekstrak atau fraksi yang digunakan. Persamaan tersebut kemudian digunakan untuk menghitung nilai LC_{50} ekstrak, Dengan memasukkan angka 5 sebagai nilai probit dari 50% kematian ke dalam persamaan tersebut dan mencari antilog dari nilai X yang diperoleh, dihasilkan nilai LC_{50} dari ekstrak dan fraksi (Tabel 4).

Tabel 4**Nilai LC_{50} ekstrak etanol 96% dan fraksi flavonoid hasil maserasi dan refluks**

Sampel Uji	Nilai LC_{50} (ppm)	
	Maserasi	Refluks
Ekstrak etanol	62,619	191,587
Fraksi n-heksan	30,516	36,191
Fraksi kloroform	69,677	38,01
Fraksi etil asetat	32,746	34,139
Fraksi air	49,407	126,248

Berdasarkan nilai LC_{50} yang diperoleh secara keseluruhan, aktivitas sitotoksik yang paling tinggi ditunjukkan pada fraksi n-heksan hasil maserasi (30,516 ppm) dan aktivitas tersebut signifikan menurut Meyer *et al.* (1982: 32). Aktivitas terendah ditunjukkan pada ekstrak etanol hasil refluks (191,587 ppm). Adapun jika diperhatikan berdasarkan metode ekstraksi yang digunakan, pada hasil maserasi aktivitas terendah tidak ditunjukkan pada ekstrak etanol, melainkan pada fraksi kloroform. Di samping itu,

pada hasil refluks aktivitas tertinggi tidak ditunjukkan pada fraksi n-heksan, melainkan pada fraksi etil asetat.

Jika mengamati hasil penapisan fitokimia pada Tabel 1, setiap ekstrak atau fraksi sejenis menunjukkan kandungan senyawa yang sama, meskipun metode ekstraksinya berbeda. Fraksi n-heksan hasil maserasi dan hasil refluks sama-sama menunjukkan kandungan alkaloid, flavonoid, fenolat, monoterpen-seskuiterpen, dan steroid-triterpenoid. Berdasarkan LC_{50} yang diperoleh, kedua fraksi tersebut menunjukkan nilai yang berdekatan (Tabel 4). Di samping itu, fraksi etil asetat hasil maserasi dan refluks juga menunjukkan kesamaan kandungan senyawa satu sama lain, yaitu alkaloid, flavonoid, fenolat, monoterpen-seskuiterpen, dan kuinon. Nilai LC_{50} kedua fraksi tersebut juga berdekatan (Tabel 4).

Berdasarkan hasil yang diperoleh, aktivitas sitotoksik yang ditunjukkan pada ekstrak dan fraksi yang diperoleh melalui maserasi dan refluks menggunakan etanol 96% diduga melibatkan peranan senyawa alkaloid, flavonoid, fenolat, monoterpen-seskuiterpen, dan steroid-triterpenoid seperti yang terdapat pada fraksi n-heksan hasil maserasi.

Ekstrak Metanol dan Fraksi

Hasil pengujian ekstrak metanol daun srigading menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka persen kematian larva udang juga semakin tinggi (Tabel 5). Tabel 6 menunjukkan nilai LC_{50} ekstrak metanol dan fraksi alkaloid. Berdasarkan hasil yang diperoleh, aktivitas sitotoksik tertinggi ditunjukkan pada ekstrak metanol, yang diikuti fraksi alkaloid basa. Aktivitas sitotoksik terendah ditunjukkan pada fraksi alkaloid netral/basa lemah.

Tabel 5

Hasil pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak metanol dan fraksi alkaloid

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata Jumlah Larva Mati pada Sampel Uji			
	Ekstrak metanol	Fraksi alkaloid netral/basa lemah	Fraksi alkaloid basa	Fraksi alkaloid kuarternner
0	0	0	0	0
5	0,66	0	0,66	1,00
10	2,33	0	1,00	1,00
25	2,33	0	2,33	1,00
50	2,33	1,66	2,33	1,66
75	3,33	1,66	3,00	3,33
100	5,66	1,66	3,00	3,33
125	7,00	2,33	4,33	4,33
150	8,00	2,66	5,00	5,33
175	6,66	3,33	5,66	4,66
200	8,66	3,33	6,00	6,00
250	9,33	4,66	9,33	8,33
300	9,66	5,33	9,66	8,66

Tabel 6.

Nilai LC₅₀ Ekstrak metanol dan fraksi alkaloid

Sampel	Nilai LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak metanol	57,4815
Fraksi alkaloid netral/basa lemah	286,53
Fraksi alkaloid basa	93,64
Fraksi alkaloid kuarternar	115,75

Nilai LC₅₀ yang ditunjukkan ekstrak metanol berdekatan dengan nilai yang ditunjukkan ekstrak etanol hasil maserasi. Sebelumnya hasil penapisan fitokimia (Tabel 1) memperlihatkan bahwa kandungan senyawa dalam ekstrak metanol memiliki kesamaan dengan yang terkandung dalam ekstrak etanol, kecuali saponin. Hasil tersebut menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksik yang ditunjukkan pada ekstrak metanol dan etanol melibatkan peranan senyawa alkaloid, flavonoid, fenolat, monoterpen-seskuiterpen, steroid-triterpenoid, dan kuinon, namun tidak menunjukkan peranan saponin. Adapun jika dibandingkan dengan aktivitas sitotoksik ekstrak dan fraksi hasil maserasi dan refluks dengan menggunakan etanol 96%, nilai LC₅₀ ekstrak metanol dan fraksi alkaloid basa lebih tinggi dari nilai yang ditunjukkan fraksi n-heksan hasil maserasi.

4. Kesimpulan dan Saran

Hasil uji sitotoksik dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) ekstrak dan fraksi menunjukkan bahwa fraksi n-heksan hasil maserasi dengan etanol 96% memiliki aktivitas sitotoksik yang signifikan dengan nilai LC₅₀ sebesar 30,516 ppm. Hal tersebut memperlihatkan bahwa senyawa yang terkandung dalam fraksi n-heksan yaitu alkaloid, flavonoid, fenolat, monoterpen-seskuiterpen, dan steroid-triterpen memiliki potensi sebagai antikanker.

Berdasarkan kesimpulan di atas, peneliti mengusulkan beberapa rekomendasi untuk penelitian lebih lanjut sebagai berikut: (1) Diperlukan pengujian lanjutan aktivitas sitotoksik senyawa-senyawa yang terkandung dalam fraksi n-heksan hasil maserasi dengan etanol 96%, untuk mengetahui potensi masing-masing secara terpisah. (2) Diperlukan juga karakterisasi kimia lebih lanjut senyawa-senyawa dalam fraksi n-heksan tersebut yang menunjukkan aktivitas sitotoksik yang signifikan dengan metode BSLT.

Ucapan Terima Kasih

Kegiatan ini dilaksanakan atas Biaya Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Islam Bandung Tahun Anggaran 2015/2016.

Daftar pustaka

Fatimatuzzahra, F. (2013). *Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kemangi (Ocimum sanctum Sims.) terhadap Larva (Artemia salina) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. [Skripsi], Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta.

- Chidi, B. B., Pandeya, S., Gharti, K. P., Bharati, L. (1993), Phytochemical Screening and Cytotoxic Activity of *Nyctanthes arbor-tristis*, *Ind. Res. J. Pharm. & Sci.*, 2 (2): 205-217.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putman, J.E., Jacsben, L.B., Nicols, D.E., and McLaughlin, J.L. (1982). Brine shrimp : a convinient general bioassay for active plant constituent. *Journal Plant Medica* 45: 31-34.
- Rahman, M. M. and Khan, M. A., (2013), Anti-cancer Potential of South Asian Plants, *Nat. Prod. Bioprospect.*, 3: 74-88.
- Rijai, A. J., (2013), *Telaah Fitokimia Kandungan Metabolit Sekunder dalam Ekstrak Daun Sirih Hitam (Piper betle L.) dan Uji Bioaktivitasnya Terhadap Larva Udang (Artemia salina Leach)*, Skripsi, Program Studi Farmasi Universitas Islam Bandung.
- Steven & Russel. J, (1993). *Bioactive Natural Products; Detection, Isolation and Structural Determination*. Florida: CRC Press. Inc.