

Sitotoksisitas Ekstrak Etanol dan n-Heksana Daun *Rhizophora Apiculata* dengan Indikator Indeks Mitosis *Allium Cepa*

Sri Rejeki Rahayuningsih^{1*}, Annisa Anindyta¹, Tri Mayanti²

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran

²Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran
Jl. Ir. Soekarno km. 21 Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat 45363 Indonesia

*Corresponding author, e-mail: sri.rejeki@unpad.ac.id

ABSTRAK: *Rhizophora apiculata* merupakan salah satu mangrove yang biasa digunakan sebagai sumber obat tradisional oleh masyarakat pesisir pantai karena mengandung metabolit sekunder. Tumbuhan obat tradisional dapat memiliki efek genotoksik, mutagenik, dan sitotoksik. Oleh karena itu, perlu dilakukan evaluasi efek sitotoksik dengan *Allium assay*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui sitotoksisitas ekstrak etanol dan n-heksana *R. apiculata* terhadap pembelahan sel dengan melihat indeks mitosis *A. cepa*. Pada penelitian ini digunakan metode eksperimental, perlakuan tunggal ekstrak etanol *R. apiculata* konsentrasi 125, 250, 500, dan 1.000 ppm, kontrol negatif akuades penambahan CMC, serta kontrol positif etilmetanasulfat (EMS). Penelitian dengan protokol yang sama dilakukan untuk ekstrak n-heksana *R. apiculata*. Penurunan nilai indeks mitosis digunakan untuk acuan sitotoksisitas. Data hasil pengamatan menunjukkan nilai indeks mitosis perlakuan ekstrak etanol dan n-heksana mengalami penurunan sejalan dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Perlakuan ekstrak etanol dan n-heksana konsentrasi 500 ppm dan 1000 ppm bersifat letal terhadap sel akar *A. cepa*.

Kata Kunci: *Allium assay*; Indeks mitosis; *Rhizophora apiculata*; sitotoksisitas; *Allium cepa*

Cytotoxicity Ethanol And n-hexane Leaf Extract Of *Rhizophora apiculata* To Mitotic Index of *Allium cepa*

ABSTRACT: *Rhizophora apiculata* is mangrove that was used for traditional medicine due to their secondary metabolite. Traditional medicine plants have genotoxic, mutagenic, and cytotoxic effects. Therefore, evaluation cytotoxic effect with *Allium assay* is necessary. The aim in this study to know ethanol and n-hexane leaf extract of *R. apiculata* effects to *A. cepa* cell divisions. This study use experimental method, single factor treatment ethanol extract of *R. apiculata* with concentration 125, 250, 500, and 1000 ppm, aquades with CMC as negative control, and ethylmetanasulphat (EMS) as positive control. Research with same protocol is done for n-hexane extract of *R. apiculata*. Cytotoxicity is seen based on decreased of mitotic index. Based on observation, ethanol and n-hexane extract mitotic index was showing decrease value in line with increasing extract concentration. Ethanol dan n-hexane extract of *R. apiculata* concentration 500 ppm and 1000 ppm are lethal to cells.

Keywords: *Allium assay*; cytotoxicity; mitotix indeks; *Rhizophora apiculata*; *Allium cepa*

PENDAHULUAN

Rhizophoraceae merupakan famili mangrove yang memiliki kemampuan toleransi terhadap garam serta menghasilkan senyawa kimia pada akar dan daun yang dapat mencegah pertumbuhan tumbuhan invasif dan alga pada ekosistem (Baskaran & Mohan, 2012). *Rhizophora* merupakan tumbuhan obat karena manfaat produk metabolit sekunder secara medik, antara lain: alkaloid, glikosid, minyak esensial, dan molekul organik lainnya. Beberapa spesies yang sering dijumpai adalah *Rhizophora apiculata*, *R. mucronata*, dan *R. mangle* (Halim et al., 2013).

R. apiculata merupakan mangrove yang telah digunakan sebagai bahan untuk sterilisasi, pewangi, dan pertumbuhan (Gao & Xiao, 2012). Selain itu, kulit batang, akar, daun, dan bunganya

dapat digunakan sebagai obat beri-beri, *febrifige*, haematoma, hepatitis, serta borok (Darlian *et al.*, 2011). Daun *R. apiculata* mengandung senyawa bioaktif alkaloid, tanin, steroid, saponin, fenol, glikosida, flavonoid, dan terpenoid yang bersifat antiseptik, antivirus, antiinflamasi, dan antibakteri (Putri *et al.*, 2015).

Pada beberapa penelitian tumbuhan yang digunakan sebagai makanan dan obat tradisional terdapat efek mutagenik, sitotoksik, dan genotoksik pada *in vitro* dan *in vivo* assays. Pada penggunaan jangka panjang dapat meningkatkan potensi mutagenik atau genotoksik yang berhubungan dengan formasi tumor pada beberapa individu (Celik & Aslanturk, 2010). *Allium* assay memiliki sensitivitas untuk mendeterminasi efek sitotoksik atau genotoksik pada bermacam-macam zat. Metode ini telah digunakan untuk meneliti mutagenesis fisika dan kimia, agen polutan, ekstrak tumbuhan, dan efek sitogenetik beberapa bahan aktif melalui pembelahan sel mitosis. Hasil positif *allium* assay mengindikasikan zat uji berpotensi berbahaya bagi kesehatan (Sumitha & Thoppil, 2016).

Pada penelitian mengenai toksisitas tanaman obat, *Azadirachta indica* (Mimba) sebagai obat malaria diketahui menyebabkan aberasi kromosom pada *allium* assay (Akaneme & Amaefule, 2012). Selain itu, *Inula viscosa* sebagai obat tradisional antiinflamasi, antiseptik, dan antipiretik menyebabkan aberasi kromosom dan formasi mikronukleus pada *allium* assay (Celik & Aslanturk, 2010).

Penelitian mengenai efek genotoksitas *R. apiculata* belum pernah dilakukan baik di Indonesia maupun di negara lain. Oleh karena itu, penelitian ini penting dilakukan mengingat pengetahuan masyarakat mengenai efek genotoksik dan sitotoksik tumbuhan obat tradisional yang menyebabkan gangguan pada pembelahan sel masih kurang. Pembelahan sel dapat dihitung indeks mitosisnya, Nilai indeks mitosis akan turun dan lebih kecil dari normal 100% apabila terjadi gangguan oleh faktor lingkungan maupun zat asing yang masuk ke dalam sel seperti misalnya senyawa metabolit sekunder.

MATERI DAN METODE

Pada penelitian ini digunakan metode eksperimental. Pengambilan sampel dilakukan dengan mengambil 5 daun *R. apiculata* dari pucuk dan diekstraksi dengan maserasi etanol dan n-heksana. Penelitian menggunakan metode eksperimen pola Rancang Acak Lengkap dengan analisis Anava ($\alpha.05$) dengan perlakuan ekstrak etanol dan n-heksana *R. apiculata* empat konsentrasi ekstrak yaitu, 125, 250, 500, dan 1.000 $\mu\text{g/ml}$ (Ping *et al.*, 2012), kontrol negatif akuades penambahan Carboxymethyl cellulose (CMC), serta kontrol positif etilmetanasulfat (EMS). Pada setiap perlakuan dilakukan empat kali pengulangan. Perendaman dalam akuades dan ekstrak dilakukan selama 96 jam hingga muncul akar pada umbi bawang. Pembuatan preparat dilakukan berdasarkan Akinboro *et al.* (2011) dengan squashing akar bawang dan diamati 1000 sel pada setiap preparat untuk mengetahui nilai indeks mitosis. Untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder ekstrak etanol dan n-heksana daun *R. apiculata* dilakukan uji fitokimia.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun *R. apiculata* secara kualitatif diperoleh mengandung senyawa fenolik, flavonoid, steroid, triterpenoid, dan tanin Data lengkap dapat dilihat pada Tabel 1. Pengaruh ekstrak etanol daun *R. apiculata* terhadap sel akar bawang dapat dilihat melalui indeks mitosis, aberasi kromosom, dan panjang akar. Berdasarkan hasil pengamatan perlakuan ekstrak etanol diperoleh hasil bahwa nilai indeks mitosis tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol negatif sebesar 49,53%, sedangkan nilai indeks mitosis terendah terdapat pada perlakuan konsentrasi ekstrak etanol *R. apiculata*, yaitu sebesar 6%. Data lengkap dapat dilihat pada Tabel 2.

Menurut Antonsie-wiez (1990) dan Panda and Sahu (1985) dalam Paul *et al.* (2013), penurunan indeks mitosis di bawah 22% dari kontrol negatif dapat menyebabkan efek letal pada organisme uji, sedangkan penurunan indeks mitosis di bawah 50% menyebabkan efek subletal dan disebut nilai batas sitotoksik (*cytotoxic limit value*). Hal ini disebabkan adanya zat sitotoksik dalam media tumbuh yang menyebabkan terhambatnya aktivitas mitosis. Pada hasil nilai indeks mitosis penurunan perbandingan nilai indeks mitosis terhadap kontrol negatif diperoleh perlakuan

kontrol positif, ekstrak etanol 500 ppm, dan ekstrak etanol 1000 ppm menyebabkan efek letal, sedangkan perlakuan ekstrak etanol 125 ppm dan 250 ppm menyebabkan efek subletal.

Hasil perhitungan Anava menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi ekstrak etanol *R. apiculata*, kontrol negatif dan kontrol positif berpengaruh nyata terhadap indeks mitosis. Berdasarkan hasil Uji Jarak Berganda Duncan, pemberian keempat konsentrasi ekstrak etanol *R. apiculata* tidak memberikan hasil yang berbeda nyata dengan kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol *R. apiculata* 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm dapat memberikan pengaruh toksik yang sama dengan kontrol positif terhadap indeks mitosis sel akar bawang.

Penurunan indeks mitosis juga menunjukkan adanya *mitodepressive* akibat terhambatnya sel memasuki fase mitosis atau terhambatnya protein spesifik tertentu dalam siklus sel karena adanya molekul lain yang menghalangi DNA polimerase. Selain itu, terhalangnya sel memasuki fase G2 juga dapat menyebabkan terganggunya siklus sel (Boumaza *et al.*, 2016).

Menurut Dai & Mumper (2010), senyawa fenolik yang digunakan pada sel kanker dapat mengganggu fungsi dasar sel. Fenolik dapat menghambat fase I dalam metabolit enzim, seperti *cytochrome P450*. Selain itu, fenolik dapat menginduksi sel untuk terhambat dalam fase sel yang berbeda, G1, S,S-G2, dan G2 dengan secara langsung menurunkan regulasi siklin dan *cyclins-dependents kinases* (CDKs) atau menginduksi ekspresi gen p21, p27, dan p53 secara tidak langsung. Keberadaan senyawa fenolik dalam ekstrak etanol *R. apiculata* dapat memengaruhi siklus sel normal, sehingga pembelahan sel terhambat. Selain itu senyawa triterpenoid dapat memengaruhi pembelahan sel *A. cepa*. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Bhattacharya & Haldar (2012), senyawa triterpenoid *Trichosanthes dioica* dapat menghambat pertumbuhan akar dan mitosis sel. Selain itu, triterpenoid juga dapat bersifat sitotoksik pada *neoplastic lines* dengan menghambat aktivitas seluler dan menambah jumlah sel apoptosis (Chudzik *et al.*, 2015).

Tabel 1. Hasil Uji Kandungan Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol dan Ekstrak n-Heksana Daun *B. Gymnorrhiza*

Metabolit Sekunder	Jenis Pelarut	
	Etanol	Heksan
Fenolik	+	-
Flavonoid	+	-
Steroid	-	+
Triterpenoid	+	+
Saponin	-	-
Tanin	+	-
Alkaloid	+	-

Tabel 2. Pengaruh ekstrak etanol daun *R. apiculata* terhadap pembelahan sel akar bawang *Allium cepa*

Konsentrasi Ekstrak	Total Sel Diamati	Total Sel Membelah				Indeks Mitosis (IM) (%)	Penurunan IM terhadap kontrol (%)
		P	M	A	T		
Kontrol Negatif	4000	1716	89	66	110	49,53 ± 0,11	0
Kontrol Positif	4000	216	28	7	15	6,53 ± 0,01	13
125 ppm	4000	569	10	5	4	14,68 ± 0,02	30
250 ppm	4000	416	7	8	14	11,13 ± 0,007	22
500 ppm	4000	247	1	2	4	6,4 ± 0,01	13
1000 ppm	4000	222	6	5	3	6 ± 0,004	12

Tabel 3. Pengaruh ekstrak *n*-heksana daun *R. apiculata* terhadap pembelahan sel akar bawang *Allium cepa*

Konsentrasi Ekstrak	Total Sel Diamati	Total Sel Membelah				Indeks Mitosis (IM) (%)	Penurunan IM terhadap kontrol (%)
		P	M	A	T		
Kontrol Negatif	4000	1504	238	116	248	52,65 ± 0,02	0
Kontrol Positif	4000	216	28	7	15	6,53 ± 0,01	12
125 ppm	4000	654	23	14	22	17,83 ± 0,02	34
250 ppm	4000	555	18	11	17	15,1 ± 0,01	29
500 ppm	4000	406	11	3	8	10,7 ± 0,002	20
1000 ppm	4000	387	17	31	6	11,03 ± 0,007	21

Komponen fitokimia yang ditemukan dalam ekstrak *n*-heksana antara lain flavonoid, steroid, dan triterpenoid. Pada perlakuan ekstrak *n*-heksana diperoleh hasil indeks mitosis tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol negatif sebesar 52,65%, sedangkan nilai indeks mitosis terendah pada perlakuan kontrol positif, yaitu 6,53%. Data lengkap indeks mitosis ekstrak *n*-heksana dapat dilihat pada Tabel 3.

Penurunan perbandingan nilai indeks mitosis terkecil terjadi pada perlakuan kontrol positif sebesar 12%. Pada perlakuan kontrol positif, ekstrak *n*-heksana 500 ppm dan 1000 ppm penurunan perbandingan nilai indeks mitosis dibawah 22% sehingga dapat dikatakan menyebabkan efek letal. Pada perlakuan ekstrak *n*-heksana konsentrasi 125 ppm dan 250 ppm penurunan perbandingan indeks mitosis terhadap kontrol negatif di bawah 50% maka dapat dikatakan perlakuan tersebut menyebabkan efek subletal.

Penurunan nilai indeks mitosis dapat terjadi karena terhambatnya siklus sel, perkembangan sel dari fase S menuju fase M yang lambat, penghambatan dalam sintesis DNA sehingga menghambat sel memasuki mitosis atau menahan sel dalam keadaan metafase karena gangguan pada spindle dan menyebabkan kematian *antiproliferative* dan apoptosis sel yang ditafsirkan sebagai efek toksik langsung dari ekstrak (Kundu & Ray, 2016). Nilai indeks mitosis yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol negatif menunjukkan adanya perubahan dalam pertumbuhan dan perkembangan *A. cepa* (Atoyebi *et al.*, 2015).

Hasil perhitungan Anava dengan taraf nyata 95% menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi ekstrak *n*-heksana *R. apiculata*, kontrol negatif dan kontrol positif berpengaruh nyata terhadap indeks mitosis. Berdasarkan hasil Uji Jarak Berganda perlakuan ekstrak *n*-heksana 125 ppm dan 250 ppm memberikan hasil yang signifikan bila dibandingkan dengan perlakuan ekstrak *n*-heksana 500 ppm, 1000 ppm, dan kontrol positif.

Pengaruh perlakuan ekstrak *n*-heksana terhadap nilai indeks mitosis sel akar bawang menunjukkan adanya efek yang diberikan oleh ekstrak terhadap fase pembelahan sel akar bawang. Hal ini dapat dikarenakan adanya interaksi langsung antara komponen di dalam ekstrak dengan DNA bawang (Kahaliw *et al.* 2018). Flavonoid merupakan kelompok antioksidan (Carocho & Ferreira, 2013). Menurut Lu *et al.* (2013) kelompok antioksidan dapat menyebabkan kerusakan langsung pada DNA dan sel karena mempunyai banyak ikatan elektron yang lemah. Ikatan elektron lemah *dissociative electron transfer* (DET) pada basa guanin dapat menyebabkan lepasnya ikatan kimia dan terjadi *single strand break* dan *double strand breaks* pada DNA. *Double strand breaks* pada DNA sulit untuk diperbaiki dan dapat menyebabkan mutasi genetik serta apoptosis sel.

KESIMPULAN

Pada pengujian sitotoksitas ekstrak *R. apiculata*, ekstrak etanol *n*-heksana bersifat letal pada konsentrasi 500 ppm dan 1000 ppm. Kedua konsentrasi tersebut menunjukkan hasil menurunkan presentase indeks mitosis dibawah 22% yang tidak berbeda nyata dengan kontrol positif EMS, sedangkan konsentrasi 125 dan 250 ppm kedua ekstrak hanya menurunkan presentase indeks mitosis dibawah 50% dan termasuk katagori subletal. Penurunan nilai indeks

mitosis dapat disebabkan oleh fitokimia yang terkandung dalam ekstrak, sehingga memengaruhi pembelahan sel akar *A. cepa*. Pada penelitian ini kurang diketahui senyawa metabolit mana yang memberikan pengaruh signifikan, maka penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan uji sitotoksitas pada senyawa fitokimia yang telah dimurnikan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik dengan dana hibah RISTEK DIKTI DAN atas bantuan dari berbagai pihak dalam hal perizinan maupun teknis pengerjaan di lapangan dan laboratorium

DAFTAR PUSTAKA

- Akaneme, Ifeoma, F. & Amaefule, C.C., 2012. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of aqueous leaf extracts of *Azadirachta indica* A. Juss using the allium assay. *Journal of Medicinal Plant Research*. 6(22):3898-3907. DOI: 10.5897/JMPR12.427
- Akinboro, A., Mohammed, K., Rathnasamy, S. & Muniandy, V.R. 2011. Genotoxicity assessment of water samples from the Sungai Dua River in Pulau Pinang, Malaysia, using the *Allium cepa* test. *Tropical Life Science Research*, 22(2):23-25
- Atoyebi, S.M., Oyeyemi, I.T., Dauda, B.A. & Bakare, A.A. 2015. Genotoxicity and anti-genotoxicity of aqueous extract of herbal recipes containing *Luffa cylindrica* (L), *Nymphaea lotus* (L) and *Spondias mombin* (L) using the *Allium cepa* (L) assay. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 9(15):492-499.
- Baskaran, R. & Mohan, P.M. 2012. In vitro antibacterial activity of leaf extracts of *Rhizophora mucronata* L. against multi drug resistant *Vibrio* spp. Isolated from marine water Lobster's larvae hatcheries. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*. 41(3):218-222.
- Bhattacharya, S. & Haldar, P.K. 2012. Evaluation of antimutagenic and genotoxic effects of the triterpenoid enriched extract from *Trichosanthes dioica* root. *American Eurasian Journal of Toxicological Sciences*. 4(1):20-23. DOI: 10.3109/13880209.2013.795176
- Boumaza, A., Lalaoui, K., Khallef, M., Sbayou, H., Talbi, H. & Hilali, A., 2016. Assessment of cytotoxic and genotoxic effects of Clodinafop-propargyl commercial formulation on *Allium cepa* L. *Journal of Materials and Environmental Science*, 7(4):1245-1251
- Carocho, M. & Ferreira, I.C.F.R. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. (51):15-25 DOI: 10.1016/j.fct.2012.09.021
- Celik, T.A. & Aslanturk, O.S. 2010. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Inula viscosa* leaf extracts with allium test. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 189252: 8 pages. DOI: 10.1155/2010/189252
- Chudzik, M., Korzonek-Szlacheta, I. & Król, W., 2015. Triterpenes Potentially Cytotoxic Compounds. *Molecules*. 20(1):1610-1625. DOI: 10.3390/molecules20011610
- Dai, J. & Mumper, R.J. 2010. Plant phenolic: Extraction, analysis, and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15(1):7313-7352. DOI: 10.3390/molecules15107313
- Darlian, L., Imran, G. & Fachrudin. 2011. Skrining bioaktivitas ekstrak kulit akar bakau merah (*Rhizophora apiculata* bl.) terhadap daya hambat pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus* sp. *Jurnal Progres Kimia Sains*, 1(2):73-82
- Gao, M. & Xiao, H. 2012. Activity-guided isolation of antioxidant compounds from *Rhizophora apiculata*. *Molecules*, 17(9):10675-10682. DOI: 10.3390/molecules170910675
- Halim, N.H.A., Abidin, N.A.Z. & Me, R. 2013. A study of chemical compounds in *Rhizophora apiculata*. *The Open Conference Proceedings Journal*. 4(1):108-110. DOI: 10.2174/2210289201304020108
- Kundu, L.M. & Ray, S. 2016. Mitotic abnormalities and micronuclei inducing potentials of colchicine and leaf aqueous extracts of *Clerodendrum viscosum* Vent. in *Allium cepa* root apical meristem cells. *Caryologia*, 70(1):7-14 DOI: 10.1080/00087114.2016.1254452.

- Lu, L.Y., Ou, N. & Lu, Q. 2013. Antioxidant induces DNA damage, cell death, and mutagenicity in human lung and skin normal cells. *Scientific Reports*. 3(3169):1-11
- Paul, A., Nag, S. & Sinha, K. 2013. Cytological effects of blitox on root mitosis of *Ilum cepa* L. *Internationala Journal of Scientific and Research Publications*. 3(5):1-7.
- Putri, A.M., Prayitno, S.B. & Sarjito. 2015. Perendaman berbagai dosis ekstrak daun bakau (*Rhizophora apiculata*) untuk pengobatan kepiting bakau (*Scylla serrata*) yang diinfeksi bakteri *Vibrio harveyi*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 4(4):141-149