

Efek Sitotoksisitas dan Genotoksisitas dari Fraksi-Fraksi Ekstrak Etanol Daun *Rhizophora stylosa* Griff. terhadap Pembelahan Sel Dan Kromosom pada Akar *Allium cepa* L.

Sri Rejeki Rahayuningsih*, Tri Mayanti, Fathia Azzahra

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung Sumedang Km. 21 Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat, 45363 Indonesia

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

ABSTRAK: *Rhizophora stylosa*, yang dikenal sebagai bakau merah, merupakan salah satu jenis tanaman bakau yang dapat ditemukan melimpah di Indonesia. Masyarakat secara tradisional memanfaatkan tanaman ini sebagai sumber pewarna dan obat tradisional. *R. stylosa* juga terbukti mengandung zat bioaktif dan metabolit sekunder yang memiliki nilai penting bagi manusia dan organisme lain. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji tingkat sitotoksisitas dan genotoksisitas senyawa metabolit sekunder dalam fraksi-fraksi ekstrak etanol *R. stylosa* terhadap akar dan kromosom tanaman bawang *Allium cepa*. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), melibatkan sebelas fraksi dengan konsentrasi seragam (125 ppm), serta kontrol negatif berupa larutan akuades dan kontrol positif berupa larutan EMS, dengan dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Parameter yang diobservasi meliputi indeks mitosis, pertumbuhan akar bawang, dan aberasi kromosom. Hasil pengamatan dianalisis menggunakan ANOVA Ft(α .05) dan uji lanjutan Duncan Ft (α .05). Hasil pengujian sebelas fraksi dengan konsentrasi 125 ppm menunjukkan penurunan nilai indeks mitosis yang bervariasi, serta terdeteksi adanya aberasi kromosom dengan frekuensi yang beragam. Meskipun demikian, sebelas fraksi tidak menunjukkan sifat subletal maupun letal terhadap indeks mitosis. Jenis aberasi kromosom yang teramati meliputi *anaphase spindle break*, *ball metaphase*, *break*, *bridge*, *c-mitosis*, *delayed anaphase*, *diagonal anaphase*, *disorder of chromosome kinetic*, *double bridge*, *double lesion*, *fragment*, *giant cell showing polyploidy*, *laggard*, *micronucleus*, *nuclear erosion*, *nuclear extrusion*, *ring*, *star*, *stickiness*, dan *vagrant*.

Kata kunci: Fraksi; genotoksisitas; sitotoksisitas; *R. stylosa*

Cytotoxicity And Genotoxicity Effects of Fractions of Ethanol Extract from *Rhizophora stylosa* Griff. Leaves on Cell Division and Chromosomes in *Allium cepa* L. Roots

ABSTRACT: *Rhizophora stylosa* (red mangrove) is one species of mangrove that is easily found in large quantities in Indonesia. This plant is widely used traditionally by the community as dyes and herbal medicine. *R. stylosa* is also known to contain valuable bioactive substances and secondary metabolites for humans and other organisms. This study aims to examine the cytotoxicity and genotoxicity of secondary metabolite compounds from fractions of *R. stylosa* ethanolic leaf extract on the roots and chromosomes of *A. cepa* onions. The study was conducted using an experimental method with a Completely Randomized Design (CRD), the treatment of eleven fractions with one 125 ppm for all fractions, and negative control of distilled water solution and positive control of EMS solution, with 3 repetitions for each treatment. The parameters observed were mitotic index, onion root growth and chromosomal aberration. The observations were analyzed with ANOVA Ft (α .05) and followed by Duncan Ft test (α .05). The results of eleven fractions with a concentration of 125 ppm showed a decrease in the value of various mitotic indices and the discovery of chromosome aberrations with varying frequencies. However, eleven fractions did not show a sub-lethal or lethal effect on the mitotic index. Among the types of chromosomal aberrations observed were *anaphase spindle break*, *ball metaphase*, *break*, *bridge*, *c-mitosis*, *delayed anaphase*, *diagonal anaphase*, *disorder of chromosome kinetic*, *double bridge*, *double lesion*, *fragment*, *giant cell showing polyploidy*, *laggard*, *micronucleus*, *nuclear erosion*, *nuclear extrusion*, *ring*, *star*, *stickiness*, and *vagrant*.

Keywords: Fractions; genotoxicity; cytotoxicity; *R. stylosa*

PENDAHULUAN

Rhizopora stylosa, yang lebih dikenal sebagai bakau merah, merupakan salah satu jenis tanaman bakau yang dapat ditemukan secara melimpah di Indonesia. Penelitian fitokimia pada daun *R. stylosa* telah mengidentifikasi keberadaan senyawa bioaktif seperti fenolik, terpenoid, steroid, dan flavonoid (Rahayuningsih *et al.*, 2021). Meskipun *R. stylosa* sering dimanfaatkan dalam konteks pengobatan, informasi terkait potensi sitotoksik dan genotoksik dari tanaman ini masih terbatas hingga saat ini. Bawang bombay (*Allium cepa*) merupakan salah satu bioindikator yang digunakan dalam penelitian ini.

Tanaman bawang bombay (*Allium cepa* L.) memiliki potensi sebagai bioindikator dalam penelitian tentang sifat sitotoksik dan genotoksik berbagai jenis zat. *A. cepa* terbukti sangat responsif terhadap keberadaan senyawa kimia (Cabuga Jr. *et al.*, 2017). Sejumlah uji yang telah dilakukan menegaskan bahwa *A. cepa* lebih peka dalam mendeteksi tingkat toksisitas dan genotoksitas dibandingkan dengan metode uji lainnya. Dalam pengujian aktivitas antigenotoksik ekstrak tanaman, dapat diamati melalui evaluasi aberasi kromosom pada akar *A. cepa*. Pengukuran indeks mitosis menjadi penanda penting untuk mengamati peningkatan dan penurunan sel selama proses mitosis (Kumari *et al.*, 2012).

Hasil penelitian Rahayuningsih *et al.* (2021a) mengindikasikan bahwa ekstrak kasar etanol dari daun *R. stylosa* memiliki dampak pada peningkatan frekuensi aberasi kromosom dan penurunan nilai indeks mitosis. Efek ini sejalan dengan peningkatan konsentrasi ekstrak, dan pada konsentrasi 125 ppm, ekstrak tersebut menunjukkan sifat subletal terhadap sel akar bawang *A. cepa*. Hasil serupa juga diamati dalam penelitian yang melibatkan ekstrak etanol dari daun *Rhizophora apiculata* dan *Bruguiera gymnorrhiza*.

Namun, penggunaan ekstrak kasar suatu tumbuhan menimbulkan beberapa kendala dalam upaya pemanfaatannya. Tantangan utama yang muncul dalam pemanfaatan ekstrak kasar melibatkan tingginya kandungan padatan, aktivitas yang rendah, dan potensi sifat toksik (Windarwati, 2011). Oleh karena itu, diperlukan proses fraksinasi atau pemisahan dengan maksud untuk memperoleh fraksi ekstrak yang lebih murni dengan tingkat aktivitas yang lebih tinggi.

Hal tersebut menjadi dasar pentingnya dilakukan penelitian lanjutan mengenai kemungkinan jenis senyawa apa saja yang terkandung dalam ekstrak yang dapat berperan dalam aktivitas tersebut. Hingga saat ini, belum ada laporan mengenai penelitian terkait efek sitotoksik dan genotoksik dari kelompok metabolit sekunder yang berasal dari ekstrak etanol daun *R. stylosa*. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi sitotoksik dan genotoksik dari sebelas fraksi yang berasal dari ekstrak etanol daun *R. stylosa*. Hal ini dilakukan untuk mengevaluasi risiko potensial penggunaan tanaman obat *R. stylosa*, mengingat pengetahuan masyarakat tentang efek sitotoksik dan genotoksik dari tanaman obat masih terbatas.

METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini digunakan metode deksriptif eksploratif dan eksperimental. Proses fraksinasi dilakukan melalui metode kromatografi kolom cair vakum (KCV). Identifikasi senyawa dilakukan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Desain penelitian yang diadopsi adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang melibatkan sebelas perlakuan fraksi ekstrak etanol dengan konsentrasi seragam (125 ppm). Kontrol negatif menggunakan akuades dengan penambahan CMC sebanyak 1000 µg/ml, sementara kontrol positif melibatkan larutan akuades dan CMC yang ditambahkan dengan etil metana sulfat (EMS) sebanyak 1000 µg/ml. Setiap perlakuan dilakukan tiga kali pengulangan. Proses perendaman dilakukan dalam akuades dan ekstrak selama 96 jam.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah aluminium foil, botol kaca, botol reagen coklat, botol semprot, botol vial, *chamber counter*, gelas beaker 1000 mL dan 500 mL, gelas plastik, gelas ukur, gunting, kaca preparat, kaca penutup, kamera, kertas saring, labu evaporasi, lampu UV λ 254nm dan 365nm, *magnetic stirrer*, mikroskop cahaya, mortar, oven, penggaris,

pinset, pipet tetes, *rotary evaporator*, serangkaian alat destilasi, serangkaian alat kromatografi kolom cair vakum, silet, sonikator, dan *zip lock*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades, aseto karmin 2%, aseton, CMC (*sodium carboxymethyl cellulose*), daun bakau merah (*Rhizophora stylosa*), EMS, etanol teknis, etil asetat, kutek bening, larutan fiksatif *Carnoy*, larutan McClintock, larutan, metanol, *n*-heksana, pereaksi AlCl_3 , pereaksi Dragendorff, pereaksi H_2SO_4 10% dalam etanol, pereaksi Liebermann-Burchard, silika gel G_{60} , silika gel GF_{254} , silika impreg, dan umbi bawang bombay (*Allium cepa*). Sampel daun *R. stylosa* diambil di Arboretum Hutan Mangrove Pantai Lestari Karangsong, Indramayu, Jawa Barat. Sampel daun yang dipilih berasal dari daun muda dengan diameter 5-10 cm pada posisi 1 hingga 5 dari plumula, sebanyak 5 kg (Kasitowati *et al.*, 2017).

Sampel daun dikeringkan di udara terbuka selama 3-4 hari. Daun kemudian dikeringkan pada oven bersuhu 50°C . Daun yang telah kering selanjutnya dihaluskan dengan *blender*. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol. Daun *R. stylosa* kering yang telah dihaluskan menjadi bubuk dimasukkan ke dalam botol reagen cokelat dan direndam dengan etanol teknis selama 24 jam. Kemudian larutan disaring menggunakan kertas filter *Whatman* No. 1 dan hasil penyaringan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak pekat. Perendaman dengan etanol dilakukan sebanyak 3 kali (Dharmautama *et al.*, 2017 dengan modifikasi).

Ekstrak pekat etanol dipisahkan menggunakan metode kromatografi kolom cair vakum (KCV) dengan fasa diam berupa silika gel G_{60} , dan pelarut dengan elusi yang meningkatkan kepolaran secara bertahap, yaitu *n*-heksana, etil asetat, dan metanol. Fraksi yang dihasilkan dari proses KCV selanjutnya dianalisis menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Fraksi-fraksi yang menunjukkan pola noda yang serupa digabungkan, kemudian diuapkan dan ditimbang untuk dilakukan identifikasi senyawa yang terkandung di dalamnya.

Identifikasi kandungan senyawa dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) berdasarkan Wulandari (2011). Lempeng KLT yang digunakan sebagai fasa diam adalah silika gel GF_{254} . Eluen dimasukkan ke dalam chamber dan dibiarkan jatuh selama ± 15 menit. Visualisasi noda dilakukan dengan cara menyemprotkan pereaksi penampak noda seperti H_2SO_4 10% dalam etanol, AlCl_3 , Dragendorff, dan Liebermann-Burchard pada lempeng KLT. Deteksi noda dilakukan menggunakan cahaya normal dan sinar UV gelombang pendek 256nm atau gelombang panjang 365nm. Perhitungan nilai R_f , yang menggambarkan jarak yang ditempuh suatu komponen terhadap jarak keseluruhan, dapat dilakukan dengan rumus tertentu.

$$R_f = \frac{\text{jarak migrasi analit}}{\text{jarak migrasi eluen}} = \frac{Z_s}{Z_f}$$

Pembuatan berbagai konsentrasi larutan uji dari setiap fraksi etanol daun *R. stylosa*, digunakan akuades dan CMC sebagai pelarut. Konsentrasi yang digunakan adalah 125 ppm untuk semua fraksi. Pembuatan konsentrasi berdasarkan Lapham (2015) bahwa 125 ppm berarti melarutkan 125 mg sampel dalam 1000 mL pelarut.

$$125 \text{ ppm} = \frac{125 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}}$$

Umbi bawang Bombay (*Allium cepa*) berukuran ± 50 gram disiapkan. Bagian akar kering pada cakram bawah umbi dibersihkan dengan hati-hati tanpa merusak bagian primordial akar. Bagian cakram umbi kemudian direndam dalam akuades selama sekitar 48 jam di dalam gelas plastik untuk merangsang pertumbuhan akar dengan panjang sekitar 0,5-1 cm. Setelah itu, bawang ditanam sesuai dengan perlakuan yang sesuai dengan masing-masing fraksi ekstrak etanol, dengan konsentrasi seragam sebesar 125 ppm. Sebagai kontrol, digunakan akuades dengan penambahan CMC untuk kontrol negatif, dan kontrol positif menggunakan etil metana sulfat (EMS). Proses perendaman umbi *A. cepa* dalam akuades+CMC, fraksi ekstrak etanol *R. stylosa*, dan EMS dilakukan selama 96 jam (Priyanka *et al.*, 2019 dengan modifikasi).

Pembuatan preparat akar bawang dilakukan menggunakan metode *squash*. Akar yang muncul pada setiap umbi dipotong sepanjang 0,5 cm. Potongan ujung akar ditempatkan ke dalam botol vial. Potongan akar difiksasi dengan *McClintock* (campuran 3 etanol : 1 asam asetat glasial) selama 24 jam. Akar kemudian dipotong sebanyak 2 mm dan dihidrolisis menggunakan HCl 1 N selama 15 menit setelahnya dicuci dengan akuades. Selanjutnya akar direndam dalam larutan *Carnoy* selama 20 menit. Proses pewarnaan dilakukan menggunakan aseto karmin 2% dan dibiarkan selama \pm 2,5 jam agar warna menyerap. Potongan akar dipindahkan ke atas kaca preparat. Potongan akar ditetesi kembali dengan larutan aseto karmin 2% sebanyak 2 tetes. Kaca preparat selanjutnya ditutup dengan kaca penutup secara hati-hati, dan metode *squash* dilakukan menggunakan telapak tangan bagian bawah. Terakhir, kaca penutup dan kaca preparat disegel menggunakan kutek bening (Tedesco *and* Laughinghouse, 2012).

Akar yang telah tumbuh pada umbi bawang yang telah diberi perlakuan diukur panjangnya kemudian dihitung rata-ratanya. Pertumbuhan panjang akar dihitung menggunakan rumus (Timothy *et al.*, 2014):

$$\% \text{ Pertumbuhan Panjang Akar} = \frac{\text{jumlah rata-rata panjang akar perlakuan}}{\text{jumlah rata-rata panjang akar Kontrol}} \times 100\%$$

Masing-masing preparat akar bawang diamati di bawah mikroskop cahaya pada perbesaran 400x. Sel yang diamati berjumlah 1000 sel untuk setiap perlakuan. Sel-sel diamati pada tahap interfase dan tahap pembelahan sel, yaitu profase, metafase, anafase dan telofase. Perhitungan nilai indeks mitosis dilakukan berdasarkan rumus (Tedesco *and* Laughinghouse, 2012):

$$\% \text{ IM} = \frac{\text{jumlah sel pada tahap mitosis}}{\text{jumlah sel yang diamati}} \times 100\%$$

Frekuensi aberasi kromosom sel (%) dihitung berdasarkan jumlah sel yang mengalami aberasi pada sel yang mengalami mitosis dibagi dengan total sel yang diamati (100 sel) pada setiap perlakuan. Rumus frekuensi aberasi kromosom Timothy *et al.* (2014):

$$\% \text{ Sel Aberasi} = \frac{\text{jumlah sel aberasi}}{\text{jumlah sel yang diamati}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

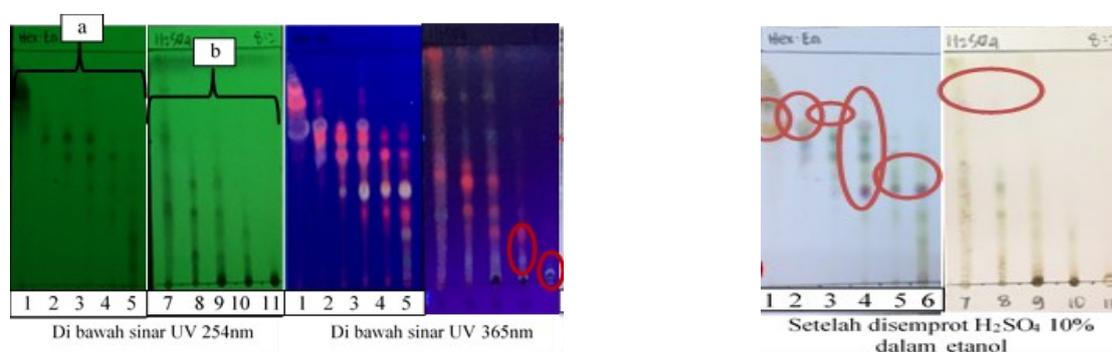
Hasil ekstraksi maserasi diperoleh ekstrak pekat etanol sebanyak 90,2 g. Ekstrak pekat tersebut kemudian difraksinasi dengan menggunakan metode kromatografi cair vakum (KCV). Sebelas fraksi yang dihasilkan dari proses KCV selanjutnya dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengidentifikasi jenis metabolit sekunder yang terkandung dalam masing-masing fraksi, berdasarkan pola nodanya. Analisis profil KLT fraksi dilakukan dengan menggunakan empat pereaksi semprot, yaitu H₂SO₄ 10% dalam etanol, AlCl₃, Dragendorff, dan Libermann-Burchard (LB). Dengan menggunakan metode ini, dapat dilakukan identifikasi dan karakterisasi lebih lanjut terhadap komponen-komponen kimia yang terdapat dalam fraksi-fraksi tersebut.

Pereaksi asam sulfat (H₂SO₄) digunakan dalam deteksi umum keberadaan metabolit sekunder. Pereaksi ini dapat mendeteksi keberadaan senyawa steroid, terpen, dan kelompok fenolik (Stahl, 1969).

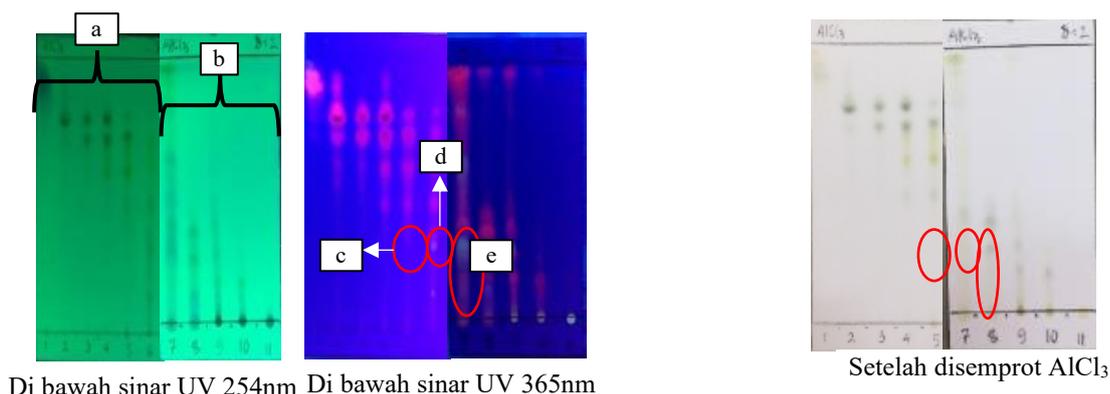
Berdasarkan hasil KLT (**Gambar 1**), fraksi 1 menunjukkan satu noda oranye dengan nilai R_f 0,67 dan tiga nodanya berwarna hijau dengan nilai R_f masing-masing 0,95, 0,87, dan 0,82. Fraksi 2 memiliki tiga nodanya, yaitu warna oranye dengan R_f 0,67, hijau dengan R_f 0,63, dan biru dengan R_f 0,50. Fraksi 3 menunjukkan satu noda oranye dengan R_f 0,70 dan dua nodanya berwarna hijau dengan nilai R_f berturut-turut 0,63 dan 0,55. Fraksi 4 menunjukkan pola noda yang lebih bervariasi, terdiri dari satu noda oranye (R_f 0,7), dua nodanya berwarna hijau (R_f 0,63 dan

0,55), dan satu noda merah (Rf 0,43). Fraksi 5 dan 6 menunjukkan satu noda berwarna merah muda (nilai Rf 0,43) dan satu noda hijau (Rf 0,23). Hasil noda berwarna merah muda juga ditemukan pada fraksi 7, 8, dan 9 dengan nilai Rf 0,78. Sementara itu, pada fraksi 10 dan 11 tidak terdeteksi warna noda setelah disemprot dengan reagen asam sulfat, namun pada sinar UV 365nm menunjukkan adanya nodanya berwarna oranye dan kuning.

Warna yang muncul pada masing-masing fraksi (Fraksi 1-10) menunjukkan bahwa fraksi-fraksi tersebut mengandung senyawa golongan fenolik (flavonoid, tannin), terpen, dan steroid. Jork *et al.* (1990) menyatakan bahwa penampak noda asam sulfat digunakan untuk deteksi kelompok fenolik, gula, steroid, dan terpen. Menurut Reich *and* Schibli (2006), noda berwarna biru dan oranye-cokelat menunjukkan golongan steroid atau terpenoid, merah-merah muda untuk golongan lignan atau diterpen, dan hijau untuk derivat monoterpen setelah dipanaskan. Pada penyinaran ultraviolet, kelompok furanokumarin akan menunjukkan warna kuning, hijau-kebiruan (Harborne, 1987).



Gambar 1. Kromatogram Fraksi 1-6 dengan eluen n-heksan:etil asetat (7:3) (a) dan Fraksi 7-11 dengan eluen MTC:aseton (8:2), fasa diam silika gel GF₂₅₄, pereaksi semprot asam sulfat 10% dalam etanol, dan jarak elusi 5 cm



Gambar 1 Kromatogram Fraksi 1-6 dengan eluen n-heksan:etil asetat (7:3) (a) dan Fraksi 7-11 dengan eluen MTC:aseton (8:2), fasa diam silika gel GF₂₅₄, pereaksi semprot AlCl₃, dan jarak elusi 5 cm. Keterangan: Noda berwarna kuning yang tampak setelah penyemprotan menggunakan AlCl₃ tidak ditemukan pada hasil penyemprotan dengan H₂SO₄ yang menandakan bahwa penampak noda AlCl₃ lebih spesifik dalam identifikasi flavonoid dibandingkan dengan H₂SO₄.

Senyawa fenolik merupakan senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan sebagai respon terhadap stres lingkungan. Komponen pada senyawa ini diketahui memiliki peranan penting sebagai agen pencegah dan pengobatan beberapa gangguan penyakit seperti arteriosklerosis, disfungsi otak, diabetes dan kanker (Garg *et al.*, 2016).

Penampak Noda $AlCl_3$

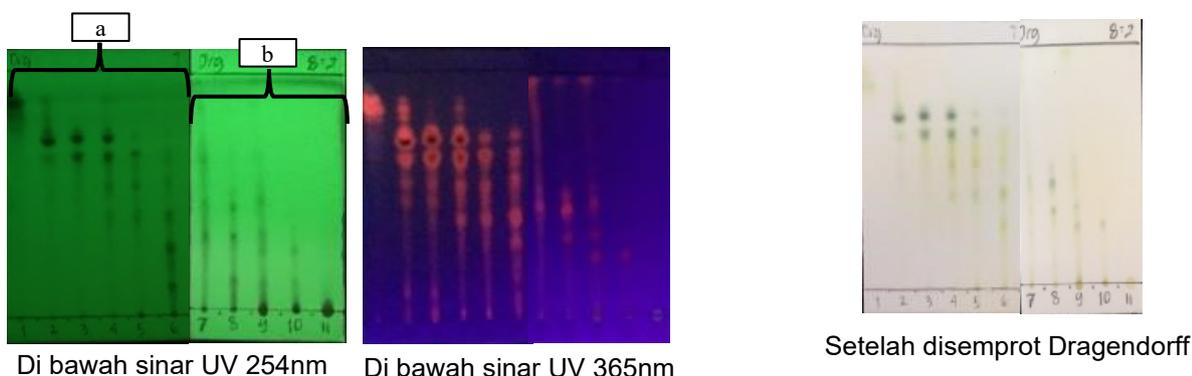
Pereaksi semprot $AlCl_3$ merupakan pereaksi yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan flavonoid. Pereaksi ini dibuat dengan melarutkan larutan aluminium klorida 1% dalam etanol. Hasil positif keberadaan flavonoid diamati di bawah sinar UV 365nm dan akan menghasilkan warna kuning (Stahl, 1969). Hasil positif keberadaan senyawa flavonoid menggunakan pereaksi semprot $AlCl_3$ ditandai dengan munculnya warna kuning pada gelombang panjang 360nm (Harborne, 2006). Berdasarkan hasil pengamatan (Gambar 2), noda berwarna kuning pada UV 365nm ditemukan pada fraksi 6 (c) dengan nilai R_f 0,33, 7 (d) dengan nilai R_f 0,33, dan pada fraksi 8 (e) ditemukan 2 noda kuning dengan nilai R_f 0,33 dan 0,15.

Flavonoid adalah jenis senyawa yang mengandung dua cincin aromatik dan memiliki lebih dari satu gugus hidroksil. Senyawa ini menonjol karena aktivitas antioksidan yang dimilikinya, yang mampu meningkatkan sistem pertahanan tubuh terhadap penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas. Selain itu, flavonoid juga terbukti memiliki potensi untuk mengurangi risiko penyakit jantung dan kanker (Hanin dan Pratiwi, 2017).

Penampak Noda Dragendorff

Pereaksi Dragendorff adalah suatu pereaksi penyemprot yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa alkaloid pada Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Setelah penyemprotan, plat KLT akan menunjukkan bercak berwarna cokelat-jingga/oranye-merah/cokelat dengan latar belakang berwarna kuning. Pereaksi ini disiapkan dengan mencampurkan bismut nitrat, asam tartarat, kalium iodida, dan air (Harborne, 1987).

Berdasarkan hasil pengamatan (Gambar 3), pada plat KLT setelah diberi pereaksi semprot Dragendorff tidak ditemukan kemunculan warna noda oranye-merah maupun cokelat. Hasil ini mengindikasikan bahwa fraksi-fraksi yang diperoleh tidak mengandung senyawa alkaloid di dalamnya. Hal ini sesuai dengan uji yang sebelumnya telah dilakukan oleh Rahayuningsih *et al.* (2021b) berdasarkan uji fitokimia ekstrak etanol daun *R. stylosa* tidak menunjukkan hasil positif pada uji alkaloid.



Gambar 2. Kromatogram Fraksi 1-6 dengan eluen n-heksan:etil asetat (7:3) (a) dan fraksi 7-11 dengan eluen MTC:aseton (8:2), fasa diam silika gel GF254, pereaksi semprot Dragendorff, dan jarak elusi 5 cm

Penampak Noda Liebermann-Burchard

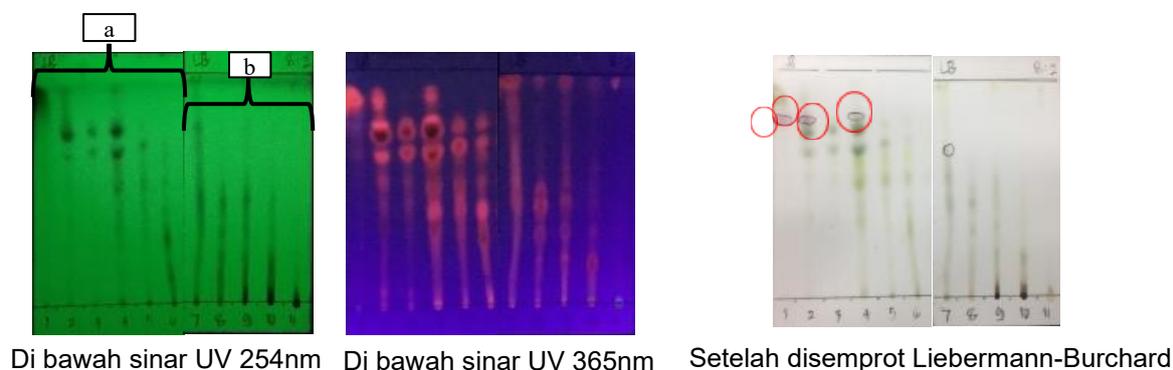
Pereaksi semprot Liebermann-Burchard digunakan untuk mendeteksi keberadaan sterol (seperti kolesterol dan ester) serta beberapa senyawa steroid dan triterpen. Pada proses deteksi senyawa steroid dan terpen, penampakan noda berwarna hijau menunjukkan keberadaan senyawa steroid, sementara warna merah muda-ungu mengindikasikan keberadaan senyawa terpen (Stahl, 1969). Profil noda yang tampak menggunakan pereaksi ini dapat dilihat pada Gambar 4.

Steroid adalah terpenoid lipid yang dikenal dengan empat cincin kerangka dasar karbon yang menyatu. Dalam bidang farmakologi, steroid memiliki peran yang signifikan, diharapkan dapat menjadi komponen kimia yang memberikan nilai terapeutik pada suatu tumbuhan (Nasrudin *et al.*, 2017). Steroid juga memiliki manfaat sebagai antibiotik, antikanker, dan antiinflamasi. Sebagai senyawa nonpolar, steroid bersifat lipofilik sehingga larut dalam pelarut n-heksana. Meskipun demikian, fitosterol yang merupakan subkelas steroid dapat larut dalam air dan alkohol karena adanya gugus hidroksil (OH) pada strukturnya (Sultan and Raza, 2015).

Pengaruh Fraksi-Fraksi dari Ekstrak Etanol Daun *Rhizophora stylosa* Terhadap Indeks Mitosis Akar Bawang Bombay (*Allium cepa*)

Data hasil pengamatan fase-fase pembelahan mitosis berupa profase, metafase, anafase, dan telofase digunakan untuk perhitungan indeks mitosis. Berdasarkan hasil, didapatkan nilai rata-rata indeks mitosis tertinggi sebesar 71,13% pada fraksi 10 dan 70,86% pada fraksi 7. Nilai rata-rata indeks mitosis terendah terdapat pada perlakuan fraksi 2 dengan nilai indeks mitosis 63,6% dan pada fraksi 4 dengan nilai rata-rata indeks mitosis 64,46%. Fraksi lainnya memberikan nilai rata-rata indeks mitosis yang beragam. Data lengkap nilai indeks mitosis setiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan hasil pengamatan, nilai indeks mitosis mengalami penurunan yang beragam seiring dengan pemberian perlakuan fraksi yang berbeda. Variabilitas ini mungkin disebabkan oleh perbedaan kandungan metabolit sekunder pada setiap fraksi. Fraksi-fraksi tersebut mengandung berbagai golongan senyawa yang sulit untuk dijelaskan terkait dengan bioaktivitas atau aplikasinya terhadap *A. cepa*. Menurut Mesi and Koplikua (2013), penurunan indeks mitosis di bawah 50% menandakan efek subletal, sementara penurunan di bawah 22% menunjukkan efek letal. Dalam konteks ini, hasil menunjukkan bahwa nilai indeks mitosis dari semua perlakuan fraksi tidak turun di bawah 50%, yang mengindikasikan bahwa fraksi dari ekstrak etanol *R. stylosa* tidak memberikan efek subletal terhadap nilai indeks mitosis *A. cepa*.



Gambar 3. Kromatogram Fraksi 1-6 dengan eluen n-heksan:etil asetat (7:3) (a) dan Fraksi 7-11 dengan eluen MTC:aseton (8:2), fasa diam silika gel GF₂₅₄, pereaksi semprot Liebermann- Burchard, dan jarak elusi 5 cm

Tabel 1. Pengaruh Fraksi-Fraksi dari Ekstrak Etanol Daun *Rhizophora stylosa* Terhadap Indeks Mitosis Akar Bawang Bombay (*Allium cepa*)

Perlakuan	Total Sel	Indeks Mitosis				Total Sel Membelah	Rata – Rata IM±SE (%)	Penurunan (%)
		P	M	A	T			
KN	3000	2222	41	23	43	2329	77,63±0,82	-
Fraksi 1	3000	1935	65	24	35	2059	68,63±0,83	88,4
Fraksi 2	3000	1805	35	31	37	1908	63,6±0,70	81,9
Fraksi 3	3000	1853	30	43	32	1958	64,46±0,62	84,0
Fraksi 4	3000	1834	27	35	38	1934	64,46±0,28	83,0
Fraksi 5	3000	1941	39	49	46	2075	69,16±1,29	89,0
Fraksi 6	3000	1915	41	30	19	2005	66,83±2,58	86,0
Fraksi 7	3000	2044	29	25	28	2126	70,86±0,06	91,2
Fraksi 8	3000	1835	30	33	45	1943	64,76±0,47	83,4
Fraksi 9	3000	1921	25	34	46	2026	67,53±0,48	87,0
Fraksi 10	3000	2028	29	29	48	2134	71,13±0,35	92,0
Fraksi 11	3000	1950	38	26	34	2048	68,27±0,78	88,0
KP	3000	548	10	8	13	579	19,30±0,12	24,8

Keterangan: P = Profase M = Metafase A= Anafase T=Telofase

Hasil perhitungan Anava menunjukkan bahwa perlakuan sebelas fraksi dengan konsentrasi 125 ppm berpengaruh nyata terhadap indeks mitosis. Hal ini dapat diketahui dengan nilai F hitung yang lebih besar dibanding F tabel ($214,556 > 2,15$). Untuk mengetahui perlakuan yang berpengaruh terhadap nilai indeks mitosis, maka dilakukan Uji Jarak Berganda Duncan. Hasil uji Duncan dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil Uji Jarak Berganda (Duncan), nilai indeks mitosis perlakuan sebelas fraksi uji dari ekstrak etanol daun *R. stylosa* dengan konsentrasi 125 ppm menunjukkan pengaruh pada level yang beragam, namun tidak ada fraksi yang menunjukkan pengaruh yang sama dengan kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa sebelas fraksi uji memiliki level sitotoksitas yang berbeda dan tidak ada yang sama dengan kontrol positif. Level sitotoksitas yang mendekati kontrol positif terdapat pada fraksi 2, 3, 4, dan 8. Fraksi dengan level sitotoksitas yang sama dengan kontrol negatif terdapat pada fraksi 1, 5, 7, 10, dan 11.

Berdasarkan Tabel 1, penurunan indeks mitosis pada fraksi 2, 3, dan 4 mencerminkan penurunan yang lebih mencolok jika dibandingkan dengan fraksi lainnya. Penurunan ini kemungkinan disebabkan oleh adanya metabolit sekunder, seperti terpenoid dan steroid, yang terdapat dalam fraksi tersebut. Triterpenoid yang berasal dari ekstrak akar *Trichosanthes dioica* telah terbukti memiliki efek penghambatan terhadap pertumbuhan akar dan mitosis sel (Bhattacharya and Haldar, 2011).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Liu *et al.* (2012), senyawa terpenoid yang terdapat dalam *Zingiber officinale* juga dapat memicu terjadinya apoptosis pada sel kanker endometrium Ishikawa dan ECC-1. Senyawa bioaktif lainnya, seperti steroid dan alkaloid, menunjukkan aktivitas sitotoksik dan antitumor (anti-kanker), serta memiliki sifat antimikroba (antibakteri dan antijamur). Selain itu, senyawa tersebut juga menunjukkan sifat antiplasmodial, menghambat in-vitro agregasi trombosit manusia, dan menyebabkan hemolisis eritrosit manusia (Mioso *et al.*, 2017).

Fraksi-fraksi yang mengandung flavonoid terdapat pada fraksi 6, 7, dan 8. Ketiga fraksi tersebut menunjukkan nilai indeks mitosis yang berbeda. Fraksi 6 dan 7 mengalami penurunan nilai indeks mitosis yang tidak terlalu tinggi terhadap kontrol apabila dibandingkan dengan fraksi 8. Hal ini menunjukkan adanya potensi sitotoksik dari flavonoid yang terkandung pada fraksi 8. Menurut Ismaryani *et al.* (2018), flavonoid dapat menstimulasi aktivitas enzim sehingga

menginduksi apoptosis, menghambat siklus sel, mengatur fungsi dari imun tubuh dan menghambat inflamasi, antiproliferasi, dan angiogenesis sel kanker. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Zhang *et al.* (2018), tiga jenis flavonoid yang berasal dari *Tephrosia kirilowii* mampu menghambat proliferasi sel pada sel kanker manusia. Flavonoid aktif tersebut menyebabkan *cell cycle arrest* pada fase M/G2 dan menginduksi apoptosis dan autofagi pada sel kanker payudara manusia.

Fraksi-fraksi yang mengandung metabolit kelompok fenolik, seperti fraksi 5, 9, 10, dan 11, menunjukkan penurunan nilai indeks mitosis yang tidak begitu signifikan dibandingkan dengan kontrol. Penurunan ini dapat diatribusikan kepada hambatan yang disebabkan oleh senyawa fenolik, yang mungkin memperlambat fase I dalam enzim metabolit. Selain itu, senyawa fenolik juga dapat menyebabkan sel mengalami hambatan pada berbagai fase sel, termasuk pada fase G1, S, S-G2, dan G2, dengan cara langsung menurunkan regulasi siklin dan *cyclin-dependent kinases* (CDKs), atau secara tidak langsung menginduksi ekspresi gen p21, p27, dan p53 (Dai and Mumper, 2010).

Belum ada publikasi yang melaporkan mengenai potensi sitotoksik dari fraksi-fraksi yang berasal dari ekstrak etanol daun *R. stylosa*. Namun, pada penelitian sebelumnya, berdasarkan perhitungan indeks mitosis, ekstrak kasar etanol daun *R. stylosa* pada konsentrasi 125 ppm bersifat subletal terhadap sel akar bawang *A. cepa* dan mengalami penurunan nilai indeks mitosis seiring dengan kenaikan konsentrasi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Haryoto dan Putri (2019) terhadap tiga fraksi (*n*-heksana, etil asetat, dan air) yang berasal dari tumbuhan sefamalia *Bruguiera gymnorrhiza* menunjukkan bahwa ketiga fraksi tersebut tidak memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D. Penelitian yang dilakukan oleh Diastuti *et al.* (2008) menunjukkan bahwa fraksi kloroform yang berasal dari *R. mucronata* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel Myeloma yang lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan fraksi metanol dengan nilai IC₅₀ 28,72µg/mL.

Pengaruh Fraksi-Fraksi dari Ekstrak Etanol Daun *Rhizophora stylosa* Terhadap Panjang Akar Bawang Bombay (*Allium cepa*)

Akar yang tumbuh setelah perendaman dalam masing-masing fraksi selama 96 jam diukur dan dihitung rata-rata pertumbuhan panjangnya. Hasil menunjukkan bahwa fraksi 1 dan fraksi 2 menghasilkan pertumbuhan akar tertinggi, dengan panjang rata-rata masing-masing sebesar 2,02

Tabel 2. Hasil Uji Jarak Berganda (Duncan) Indeks Mitosis Akar *A. cepa* dengan Pemberian Fraksi Uji (125ppm)

Perlakuan	N	(α 0.05)
Kontrol Negatif	3	77,63 ^a
Fraksi 1	3	68,63 ^{ab}
Fraksi 2	3	63,60 ^e
Fraksi 3	3	65,27 ^{cde}
Fraksi 4	3	64,47 ^{de}
Fraksi 5	3	69,17 ^{ab}
Fraksi 6	3	66,83 ^{bcd}
Fraksi 7	3	70,87 ^a
Fraksi 8	3	64,77 ^{de}
Fraksi 9	3	67,53 ^{bcd}
Fraksi 10	3	71,13 ^a
Fraksi 11	3	68,27 ^{abc}
Kontrol Positif	3	19,30 ^f

Keterangan: Rataan hasil yang diikuti huruf yang sama menunjukkan perlakuan tersebut memberikan pengaruh yang sama dengan taraf nyata $\alpha = 0,05$

Tabel 3 Rata-rata Pertumbuhan Panjang Akar *A. cepa* dengan Pemberian Fraksi Uji (125ppm)

	Rata-rata panjang akar \pm SE (cm)	Pertumbuhan akar terhadap kontrol	Penurunan/ penambahan pertumbuhan (%)
KN	2,22 \pm 0,33	100	0
F1	2,02 \pm 0,11	91	-9
F2	2,01 \pm 0,02	96,5	-3,5
F3	1,25 \pm 0,10	56,5	-43,5
F4	1,12 \pm 0,22	50,5	-49,5
F5	1,56 \pm 0,25	70,5	-29,5
F6	1,73 \pm 0,27	78	-22
F7	1,72 \pm 0,04	77,5	-22,5
F8	1,78 \pm 0,52	80,5	-19,5
F9	1,55 \pm 0,69	70	-30
F10	1,75 \pm 0,60	79	-21
F11	1,07 \pm 0,29	48,5	-51,5
K			
P	0,37 \pm 0,14	17	-83

Keterangan: P=perlakuan, KN=Kontrol negatif, KP=kontrol positif

cm dan 2,20 cm. Sementara itu, fraksi lainnya menunjukkan variasi nilai rata-rata pertumbuhan panjang akar, dan fraksi 11 dan 4 memiliki rata-rata panjang akar terendah, yakni 1,07 cm dan 1,12 cm. Data secara keseluruhan dapat dilihat pada Tabel 3.

Hasil analisis Anava dengan taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa perlakuan sebelas fraksi dari ekstrak etanol *R. stylosa*, kontrol positif, dan kontrol negatif tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap pertumbuhan panjang akar. Menurut Koul *et al.* (2005) dalam Nurulhaq (2018), pertumbuhan panjang akar yang tidak berbeda nyata disebabkan aktivitas senyawa kimia yang terkandung dapat bekerja secara sinergis sebagai efek terapeutik maupun antagonis sebagai toksikan sehingga efek yang ditimbulkan terhadap pertumbuhan akar tidak terlalu signifikan.

Penurunan dalam pertumbuhan akar dapat dianggap sebagai indikasi bahwa larutan uji mengandung senyawa yang menghambat pembelahan sel, khususnya pada bagian meristematik yang aktif dalam proses pembelahan. Menurut Konuk *et al.* (2007) menyatakan bahwa penurunan lebih dari 45% dalam panjang akar dapat diartikan sebagai adanya senyawa dalam larutan uji yang bersifat toksik, dan kemungkinan dapat menimbulkan efek subletal pada tanaman.

Berdasarkan hasil pada Tabel 3, penurunan pertumbuhan panjang akar di atas 45% diamati pada fraksi 11 dan 4, menandakan bahwa metabolit sekunder yang ada dalam fraksi tersebut bersifat toksik dan dapat berpotensi subletal terhadap *A. cepa*. Menurut Sajitha dan Thoppil (2018), senyawa fenolik, terpenoid, dan saponin dalam ekstrak *Ghomphostemma heyneanum* dapat menyebabkan efek sitotoksik dan apoptosis pada meristem akar *A. cepa*, yang pada akhirnya mengakibatkan penurunan panjang akar. Namun, meskipun terjadi penurunan panjang akar, nilai indeks mitosis pada fraksi tersebut tidak menunjukkan penurunan lebih dari 50%, sehingga efek yang terjadi masih bersifat subletal. Barbério *et al.* (2009) menjelaskan bahwa hal ini mungkin disebabkan oleh senyawa dalam sampel hanya mengganggu siklus sel, menyebabkan efek mitodepresif terhadap *A. cepa*, tetapi tidak mencapai tingkat subletal.

Pengaruh Fraksi-Fraksi dari Ekstrak Etanol Daun *Rhizophora stylosa* Terhadap Aberasi Kromosom Akar Bawang Bombay (*Allium cepa*)

Aberasi kromosom merupakan perubahan yang terjadi pada struktur kromosom sehingga menghasilkan kerusakan ataupun pertukaran materi kromosom (Oyeyemi *and* Bakare, 2013).

Berdasarkan hasil pengamatan, frekuensi aberasi kromosom tertinggi didapatkan pada fraksi 3 sebesar 16,3% diikuti dengan fraksi 11 dan fraksi 4 dengan frekuensi berturut-turut sebesar 13,67% dan 13,3%. Fraksi lainnya memberikan hasil frekuensi aberasi kromosom yang beragam. Data hasil perhitungan frekuensi aberasi kromosom *A. cepa* secara keseluruhan disajikan pada Tabel 4.

Berdasarkan hasil pengamatan, bahwa frekuensi aberasi kromosom tertinggi terdapat pada fraksi 3, 4, dan 11. Aberasi kromosom yang beragam tersebut mungkin disebabkan oleh keberadaan berbagai kelompok metabolit sekunder dalam fraksi tersebut. Menurut Silva et al. (2003), senyawa fenolik yang terkandung dalam fraksi tersebut dapat menimbulkan efek genotoksik, walaupun mekanisme prosesnya belum sepenuhnya dipahami.

Tabel 4. Pengaruh Pemberian Fraksi Uji (125 ppm) Terhadap Frekuensi Aberasi Kromosom Akar *A. cepa*

Jenis Aberasi	Jumlah Aberasi												
	KN	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	KP
<i>Anaphase Spindle Break</i>	1	3	3	3	3	1	1	2	2	4	3	3	1
<i>Ball Metaphase Break</i>				1								2	
<i>Bridge</i>	3		2			5	2	4	3	4	1		6
<i>Bridge</i>	1		1	2	1			1	2			4	5
<i>C- Mitosis</i>	6	5	7	14	13	8	7	3	5	11	7	6	21
<i>Delayed Anaphase</i>			1	5	2	3	3	1	3	6	3	8	2
<i>Diagonal Anaphase</i>	1			1				2					
<i>Disorder of Chromosome Kinetic</i>					1	1			2				
<i>Double Bridge</i>	1			1								1	
<i>Double Lesion</i>		9	1	2	2		4	7	3	5		2	11
<i>Fragmant</i>				2								2	3
<i>Giant cell showing polyploidy</i>				5	6								15
<i>Laggard</i>	2		1					1					2
<i>Lesson</i>		6	4	5	4		6	4	6	5	4	6	13
<i>Micronucleus</i>			2									1	2
<i>Multipolar</i>													
<i>Nuclear Erosion</i>													65
<i>Nuclear Extrusion</i>					3								
<i>Ring</i>				1							2	1	3
<i>Star</i>				5	2	1	2					3	1
<i>Stickiness</i>	3		2		2	4	1	2		1	1	2	2
<i>Vagrant</i>	1	1	1	2	1	2	1	1	2	2	1		1
Total	19	24	25	49	40	25	29	28	27	35	22	41	157
Frekuensi	6,33±1,2	8,0±1,0	8,33±0,3	16,3±1,7	13,3±0,8	8,33±1,2	9,67±0,8	9,33±0,3	9,33±0,6	11,67±1,4	7,33±0,6	13,67±1,3	52,33±0,6

Tabel 5. Hasil Uji Jarak Berganda (Duncan) Indeks Mitosis Akar *A. cepa* dengan Pemberian Fraksi Uji (125ppm)

Perlakuan	N	(α 0.05)
Kontrol Negatif	3	6,33a
Fraksi 1	3	8,00a
Fraksi 2	3	8,33ab
Fraksi 3	3	16,33d
Fraksi 4	3	13,33cd
Fraksi 5	3	8,33ab
Fraksi 6	3	9,67ab
Fraksi 7	3	9,33ab
Fraksi 8	3	9,33ab
Fraksi 9	3	11,67bc
Fraksi 10	3	7,33a
Fraksi 11	3	13,67cd
Kontrol Positif	3	52,33e

Keterangan: Rataan hasil yang diikuti huruf yang sama menunjukkan perlakuan tersebut memberikan pengaruh yang sama dengan taraf nyata $\alpha = 0,05$

Selain kelompok senyawa fenolik, metabolit sekunder seperti tannin dan flavonoid juga dapat menimbulkan efek genotoksik melalui komposisi kimia dan strukturnya. Metabolit sekunder tersebut memiliki potensi untuk menghasilkan radikal bebas karena mengurangi ketersediaan sistem antioksidan, yang dapat mengakibatkan peroksidasi lipid, kerusakan pada DNA, dan pada akhirnya, kematian sel (Iwalokun *et al.*, 2011).

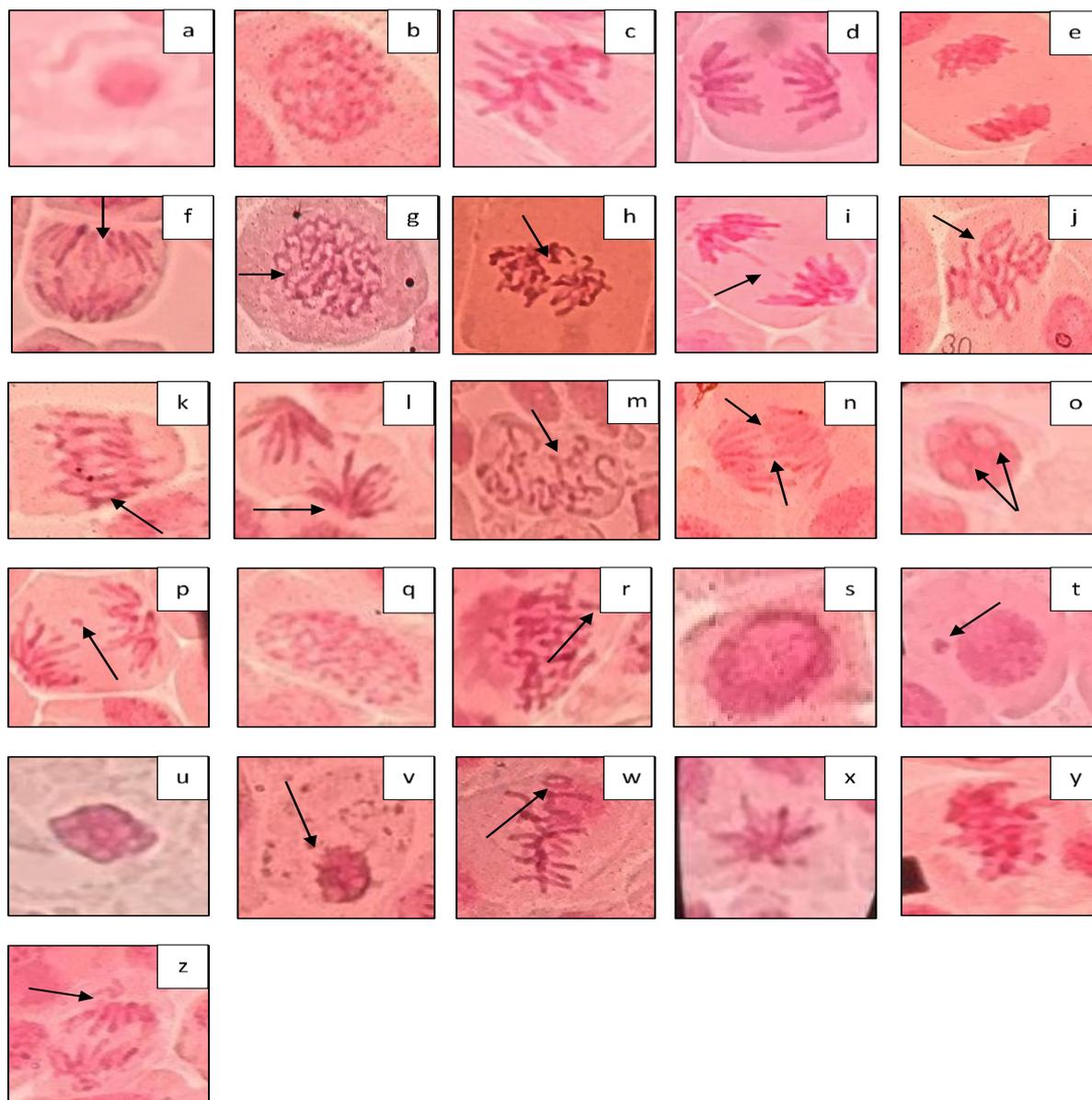
Hasil Anava frekuensi aberasi dengan taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa sebelas fraksi uji dengan konsentrasi 125 ppm memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aberasi kromosom akar *A. cepa*. Selanjutnya dilakukan uji jarak berganda (Duncan) untuk melihat hubungan antar perlakuan. Hasil uji Duncan dapat dilihat pada Tabel 5.

Berdasarkan hasil uji Duncan, dapat disimpulkan bahwa fraksi 1 dan 10 memiliki pengaruh pada tingkat yang setara dengan kontrol negatif. Sementara fraksi lainnya menunjukkan pengaruh pada tingkat yang bervariasi, tetapi tidak ada fraksi yang mencapai tingkat yang sama dengan kontrol positif. Fraksi 3, 4, dan 11 terlihat memiliki pengaruh pada tingkat yang relatif tidak jauh berbeda dengan kontrol positif.

Beberapa dari jenis aberasi yang teramati merupakan aberasi yang sebelumnya teramati pada akar bawang *A. cepa* dengan perlakuan ekstrak etanol kasar daun *R. stylosa* (Rahayuningsih *et al.*, 2021c). Namun beberapa diantara aberasi yang teramati belum pernah teramati pada penelitian sebelumnya. Gambar beberapa jenis aberasi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 5.

Seluruh fraksi uji mengalami aberasi kromosom jenis *anaphase spindle break*, *c-mitosis*, dan *vagrant*. Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar kelainan kromosom yang teramati disebabkan oleh kegagalan *spindle*. Hasil ini dapat berarti bahwa seluruh fraksi merupakan *spindle inhibitor*. Menurut Oyeyemi and Bakare (2013), senyawa yang mampu menghambat fungsi gelendong mitosis telah terbukti sangat berhasil di klinik sebagai obat anti-kanker kemoterapi. Tanaman-tanaman dengan kandungan senyawa ini digunakan dalam manajemen kanker tradisional, namun tanaman tersebut juga mungkin bersifat genotoksik pada sel-sel normal.

Hingga saat ini, belum ada laporan mengenai potensi genotoksik dari fraksi-fraksi ekstrak etanol daun *R. stylosa* terhadap sel akar *A. cepa*. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rahayuningsih *et al.* (2021a) terhadap ekstrak etanol kasar daun *R. stylosa* menunjukkan adanya aktivitas genotoksik ekstrak tersebut seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Efek genotoksik dari fraksi-fraksi dalam penelitian ini dapat disebabkan oleh komponen-komponen di dalam fraksi yang mungkin memiliki kemampuan untuk berinteraksi secara sinergis dan antagonis terhadap materi genetik *A. cepa*.



Gambar 4 Jenis-Jenis Aberasi Kromosom yang Teramati

Keterangan: a=*interphase*, b=*prophase*, c=*metaphase*, d=*anaphase*, e=*telophase*, f=*anaphase spindle break*, g=*ball metaphase*, h=*break*, i=*bridge*, j=*c-mitosis*, k=*delayed anaphase*, l=*diagonal anaphase*, m=*disorder of chromosome kinetic*, n=*double bridge*, o=*double lesion*, p=*fragment*, q=*giant cell showing polyploidy*, r=*laggard*, s=*lesion*, t=*micronucleus*, u=*nuclear erosion*, v=*nuclear extrusion*, w=*ring*, x=*star*, y=*stickiness*, z=*vagrant*

KESIMPULAN

Sebelas fraksi dari ekstrak etanol daun *R. stylosa* menunjukkan kemampuan untuk menurunkan nilai indeks mitosis pada konsentrasi 125 ppm. Efek ini bervariasi di antara fraksi-fraksi, tetapi secara keseluruhan tidak bersifat subletal atau letal terhadap akar bawang *A. cepa*. Selain itu, hasil juga menunjukkan terjadinya aberasi kromosom pada akar bawang *A. cepa*, dengan fraksi 3, 4, dan 11 memiliki pengaruh pada tingkat yang relatif tidak jauh berbeda dengan kontrol positif.

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

- Barbério, A., Barros, L., Voltolini, J.C., & Mello, M.L.S., 2009. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the River Paraíba do Sul, in Brazil, with the *Allium cepa* L. Test. *Brazilian Journal of Biology*, 69(3):837-842. DOI: 10.1590/S1519-69842009000400010
- Bhattacharya, S., & Haldar, P.K., 2011. 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.
- Cabuga Jr., C.C., Abelada, J.J.Z., Apostado, R.R.Q., Hernando, B.J.H., Lador, B.J.E., Obenza, O.L.P., Presilda, C.J.R., & Havana, H.C., 2017. *Allium cepa* test: an evaluation of genotoxicity. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 7(1): 12-19.
- Dai, J., & Mumper, R.J., 2010. Plant phenolic: extraction, analysis, and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15:7313-7352. DOI: 10.3390/molecules15107313
- Dharmautama, M., Telepta, R., Ikbali, M., & Warti, A.E.A., 2017. Effect of mangrove leaves extract (*Avicennia marina*) concentration on the growth of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Journal of Dentomaxillofacial Science*, 2(3):155-159. DOI: 10.15562/jdmfs.v2i3.648
- Garg, N., Abdel-Aziz, S.M., & Aeron, A., 2016. *Microbes in Food and Health*. Springer. Switzerland. DOI: 10.1007/978-3-319-25277-3
- Hanin, N.N.F., & Pratiwi, R., 2017. Kandungan fenolik, flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak daun paku laut (*Acrostichum aureum* L.) fertil dan steril. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 2:51-56. DOI: 10.22146/jtbb.29819
- Harborne, J.B., 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerbit ITB. Bandung.
- Harborne, J.B., 2006. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan* (alih bahasa: Kosasih Padmawinata & Iwang Soediro). Penerbit ITB. Bandung.
- Haryoto, & Putri, S.P., 2019. Aktivitas sitotoksik ekstrak etanol, fraksi heksan, etil asetat dan etanol-air dari daun mangrove tancang (*Bruguiera gymnorrhiza*) terhadap sel kanker payudara T47D. *The 10th University Research Colloquium 2019*. Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Muhammadiyah Gombong.
- Ismaryani, A., Salni, Setiawan, A., & Triwani., 2018. Aktivitas Sitotoksik, Antiproliferasi dan Penginduksi Apoptosis Daun Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. ex. Blume) terhadap Sel Kanker Serviks HeLa. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 16(2):206-213. DOI: 10.35814/jifi.v16i2.528
- Iwalokun, B.A., Oyenuga, A.O., Saibu, G.M., & Ayorinde, J., 2011. Analysis of cytotoxic and genotoxic potentials of *Loranthus micranthus* using the *Allium cepa* test. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3(5):459-467.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., & Wimmer, H. 1990. *Thin Layer Chromatography: Reagents and Detection Methods Vol 1a*. VCH Verlagsgesellschaft. Germany.
- Kasitowati, R.D., Yamindago, A., & Safitri, M., 2017. Potensi antioksidan dan sining fitokimia ekstrak daun mangrove *Rhizophora mucronate*, Pilang Probolinggo. *Journal of Fisheries and Marine Science*, 1(1):72-77. DOI: 10.21776/ub.jfmr.2017.001.02.4
- Konuk, M., Liman, R., & Cigerci, L.H., 2007. Determination of genotoxic effect of boron on *Allium cepa* root meristematic cells. *Pakistan Journal of Botany*, 39(1): 73-79.
- Kumari, A., Sharma, S., & Vig, A.P., 2012. Antigenotoxic effects of *Brassica oleracea* L. Var. Italica aqueous seed extract on *Allium cepa* root chromosomal aberration assay. *International Journal of Genetics*, 2(2):22-28.

- Lapham, R., 2015. Drug Calculations for Nurses: A Step-By-Step Approach, Fourth Ed. CRC Press. New York. DOI: 10.1201/b18504
- Liu, Y., Whelan, R.J., Pattnaik, B.R., Ludwig, K., Subudhi, E., Rowland, H., Claussen, N., Zucker, N., Uppal, S., Kushner, D.M., Felder, M., Patankar, M.S., & Kapur, A., 2012. Terpenoids from *Zingiber officinale* (Ginger) induce apoptosis in endometrial cancer cells through the activation of p53. *PLOS One*, 7(12):1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0053178
- Mesi, A., & Koplikua, D., 2013. Cytotoxic and genotoxic potency screening of two pes-ticides on *Allium cepa* L. *Procedia Technology*, 8:19–26. DOI: 10.1016/j.protcy.2013.11.005
- Mioso, R., Toledo Marante, F.J., Bezerra, R.D.S., Borges, F.V.P., Oliveira Santos, B.V.D., & Herrera Bravo de Laguna, I., 2017. Cytotoxic compounds derived from marine sponges. *Molecules*, 22(208):1-34. DOI: 10.3390/molecules22020208
- Nasrudin, Wahyono, Mustofa, & Susidarti R.A., 2017. Isolasi senyawa steroid dari kulit akar senggugu (*Clerodendrum serratum* L. Moon). *Pharmacon*, 6(3):332-340.
- Oyeyemi, I.T., & Bakare, A.A., 2013. Genotoxic and anti-genotoxic effect of aqueous extracts of *Spondias mombin* L., *Nymphaea lotus* L., and *Luffa cylindrica* L. on *Allium cepa* root tip cells. *Carcyologia*, 66(4):360-367. DOI: 10.1080/00087114.2013.857829
- Priyanka, Mohanka, R., Kumari, P., & Kumar, B., 2019. Cytotoxicity Evaluation of Aqueous Extracts of Medicinal Plants on *Allium Cepa* L. *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 5(2): 35-49
- Rahayuningsih, S.R., Anindyta, A., & Mayanti, T., 2021a. Sitotoksisitas Ekstrak Etanol dan n-Heksana Daun *Rhizopora Apiculata* dengan Indikator Indeks Mitosis *Allium Cepa*. *Journal of Marine Research*, 10(4): 545-550. DOI : 10.14710/jmr.v10i4.3177
- Rahayuningsih S.R., Mayanti T., & Nurulhaq Z., 2021c. Sitotoksisitas Dan Genotoksisitas Ekstrak Etanol Dan N-Heksana Daun *Rhizophora stylosa* Griff. Terhadap Pembelahan Sel Akar Bawang Bombay (*Allium cepa* L.). *Biotika*, 19(1):68-74, DOI : 10.24198/biotika.v19i1.33967
- Rahayuningsih, S.R., Mayanti, T., & Maudi N., 2021b. Sitotoksisitas Ekstrak Etanol Dan N-Heksana Daun *Bruguiera gymnorrhiza* L. Pada Akar *Allium cepa* L. *Biotika*, 19(2):68-74. DOI: 10.24198/biotika.v19i2.35587
- Reich, E., & Schibli, A., 2006. High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plant. Thieme. New York. DOI: 10.1055/b-002-66241
- Sajitha, M.K., & Thoppil, J.E., 2018. Screening of cytotoxicity, metabolic inhibition, and possible apoptotic cell death induced by *Gomphostemma heyneanum* Wall. Ex Benth. Var. *Heyneanum* using *Allium cepa* root tips. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 8(2):56-64. DOI: 10.22270/jddt.v8i6-s.2074
- Silva, D.S.B.S., Garcia, A.C.F.S., Mata, S.S., de Oliveira, B., Estevam, C.S., Scher, R., & Pantaleao, S.M., 2003. Genotoxicity and cytotoxicity of *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae, on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21(1): 92-97. DOI: 10.1590/S0102-695X2011005000024
- Stahl, E., 1969. Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook. Springer. New York. DOI: 10.1007/978-3-642-88488-7
- Sultan, A., & Raza, A.R., 2015. Steroids: a diverse class of secondary metabolites. *Medical Chemistry*. 5(7). DOI: 10.4172/2161-0444.1000279
- Tedesco, S.B. & Laughinghouse, H.D. 2012. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. *Environmental Contamination*. p.137-158.
- Timothy, O., Olorunfemi, D.I. & Ovuakporie-Uvo, O. 2014. Cytotoxic genotoxic properties of leaf extract of *Icacina trichantha* Oliv. *South African Journal of Botany*, 91:71-74. DOI: 10.1016/j.sajb.2013.11.008
- Windarwati, S. 2011. Pemanfaatan fraksi aktif ekstrak tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* Linn.) sebagai zat antimikroba dan antioksidan dalam sediaan kosmetik. *Tesis*. Program Studi Teknologi Industri Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Wulandari, L. 2011. Kromatografi Lapis Tipis. PT. Tanaman Kampus Presindo. Jember.
- Zhang, H.W., Hu, J.J., Fu, R.Q., Liu, X., Zhang, Y.H., Li, J., Liu, L., Li, Y.N., Deng, Q., Luo, Q.S., & Ouyang, Q., 2018. Flavonoids inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy through downregulation of PI3K γ mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K/ULK signaling pathway in human breast cancer cells. *Scientific Reports*, 8:1-13. DOI: 10.1038/s41598-018-29308-7