

Skrining antikanker menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) pada ekstrak metanol daun saga (*Abrus precatorius* L.) dengan partisi etanol

Kurnia Ritma Dhanti¹

¹ Program Studi Teknologi Laboratorium Medik Fakultas Ilmu Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Purwokerto
Email korespondensi : Kurniaritmadhanti@ump.ac.id

Abstrak

Latar belakang : Pengembangan senyawa antikanker dari bahan alami perlu dilakukan untuk meminimalisir efek samping dari penanganan penyakit kanker yang saat ini banyak dilakukan. Suatu senyawa dapat diketahui potensi antikankernya dengan pendekatan menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Ekstrak metanol daun saga (*Abrus precatorius* L.) bersifat toksik terhadap larva *A. salina* Leach. Tujuan penelitian adalah mengetahui bagian teraktif dari ekstrak metanol daun saga yang dipartisi (dipisahkan) menggunakan pelarut etanol.

Metode : Ekstrak metanol daun saga dipartisi dengan pelarut etanol hingga terbentuk bagian larut dan tidak larut. Kedua bagian tersebut diuji menggunakan metode BSLT dengan 5 kali ulangan dan 3 replikasi yang masing-masing menggunakan 10 ekor larva *A. salina*.

Hasil : Dari perhitungan didapatkan nilai LC₅₀ bagian larut etanol sebesar 144,544 ppm sedangkan nilai LC₅₀ bagian tidak larut etanol sebesar 151,356 ppm.

Kesimpulan : Bagian larut etanol menyebabkan persentase kematian yang lebih tinggi daripada bagian tidak larut. Nilai LC₅₀ bagian larut etanol lebih rendah dibanding bagian tidak larutnya. Semakin rendah nilai LC₅₀ senyawa, maka semakin berpotensi pula untuk dikembangkan sebagai agen antikanker.

Kata kunci : toksisitas, *Abrus precatorius* L., *Artemia salina* Leach., antikanker, partisi.

Abstract

Background: the development of anticancer compounds from natural ingredients need to be performed to minimize the side effects of the handling of the disease cancer that nowadays many do. A compound can be known to potential anti-cancer with the approach using the methods of the BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). The methanol extract of leaves of the saga (*Abrus precatorius* L) are toxic against larvae of *A. salina* Leach.

Objective: know the most active part of the methanol extract of leaves of the saga that is partitioned (separated) uses ethanol solvent.

Methods: Extract the methanol solvent is partitioned into the saga leaves ethanol until formed part of the soluble and insoluble. The second part is tested using the method of the BSLT with 5 times the replication and 3 replicates each using 10 tail larva of *A. salina*.

Results: From the calculation of the LC₅₀ value obtained by ethanol soluble part of 144.544 ppm while the LC₅₀ value ethanol insoluble part of 151.356 ppm.

Conclusion: ethanol soluble part caused the percentage of deaths higher than the insoluble. LC₅₀ values of a soluble part of ethanol are lower than the insoluble parts. The lower LC₅₀ value compounds, the potential to be developed as anticancer agents.

Keywords: *Abrus precatorius* toxicity, l., *Artemia salina* Leach, anticancer, partitions.

PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu penyakit penyebab kematian tertinggi di negara-negara berkembang (1), yang disebabkan adanya pertumbuhan sel tidak terkendali dan mampu menyerang jaringan biologis lainnya. Hingga saat ini, pengobatan kanker yang efektif dan efisien belum banyak ditemukan karena masih menimbulkan banyak efek samping (2). Salah satu pengobatan utama kanker yang banyak diterapkan adalah kemoterapi dengan efek samping seperti kerontokan rambut, mual, muntah, sariawan, gangguan pencernaan dan warna kulit yang menghitam.

Keberadaan senyawa aktif dari suatu ekstrak bahan alam dapat diketahui dengan uji aktivitas (*bioassay*) dan salah satu metode yang dapat digunakan adalah metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) [3]. Dalam metode ini digunakan larva *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji untuk menentukan ketoksikan suatu senyawa dalam ekstrak tumbuhan yang berupa racun.

Tanaman saga (*Abrus precatorius* L.) merupakan salah satu tanaman yang banyak digunakan secara tradisional di beberapa negara. Ekstrak metanol daun saga yang diuji toksisitas dengan metode BSLT lebih aktif dibandingkan ekstrak n-heksan dan etil asetat [4]. Nilai LC_{50} ekstrak metanol daun saga adalah 606,736 ppm dan dikatakan bersifat toksik (LC_{50} kurang dari 1000 ppm) (3).

Tanaman saga mengandung senyawa bersifat toksik yaitu senyawa abrin (5). Selain itu tanaman saga mengandung abruquinone G (2) yang aktif sebagai antiviral dan bersifat toksik [6,7]. Kandungan kimia tanaman saga diantaranya saponin, flavonoid, polefenol, alkaloid, protein, vitamin A, B1, B6, C, kalsium oksalat, gliserin, flisirizinat, *polygalacturomic acid* dan pentosan (8).

Berdasarkan hal tersebut dapat dikatakan bahwa tanaman saga berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat baru

kandidat antikanker. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui bagian mana dari ekstrak metanol daun saga tersebut yang lebih aktif untuk dikembangkan sebagai senyawa antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui lebih lanjut bagian komponen bioaktif dari ekstrak metanol daun saga yang lebih bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach.

METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah oven, blender, *rotary evaporator*, *water bath*, bejana maserasi, bejana pengembang, sentrifuse makro, lampu UV₂₅₄ dan UV₃₆₆, pipa kapiler, penyemprot spot, flakon, vortex, spatula, pipet tetes dan aerator.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun saga (*Abrus precatorius* L.) yang diambil dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah, plat silika gel 60 PF₂₅₄ (E.Merck), aquadest, kloroform, metanol, telur *Artemia salina* Leach., air laut 5%, suspensi ragi (Fermipan®), pereaksi semprot serum (IV) sulfat, reagen Dragendorf, FeCl₃, dan reagen Lieberman-Burchard.

Pemisahan Komponen Bioaktif

Serbuk daun saga dimaserasi dengan pelarut metanol kemudian dipartisi dengan pelarut etanol. Larutan dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit sehingga didapat bagian larut dan tidak larut etanol.

Penyiapan konsentrasi yang akan diujikan dengan uji BSLT

Sampel dibuat dengan 5 seri konsentrasi, yaitu 0 ppm (kontrol), 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm dan 750 ppm dengan pelarut CMC 0,1%. Telur *A. salina* ditetaskan pada air laut berkadar garam 38%. Larva yang digunakan untuk uji toksisitas adalah larva berumur 48 jam (9).

Penetasan larva udang

Telur *A. salina* ditetaskan dalam toples besar. Air laut dengan kadar garam 38% dimasukkan ke dalam wadah, serta diaerasi menggunakan aerator. Telur akan menetas setelah kira-kira 24 jam menjadi larva. Larva yang berumur 48 jam dapat digunakan untuk uji toksisitas (9).

Uji toksisitas

Pengujian dilakukan terhadap sepuluh ekor larva *A. salina* yang dipilih secara acak dan dimasukkan dalam flakon berisi sampel dan air laut 1 ml. Setelah larva dimasukkan ditambah air laut hingga volume 5 ml dan satu tetes suspensi ragi *Saccharomyces cerevisiae* (3 mg/10 ml air laut) sebagai makanan.

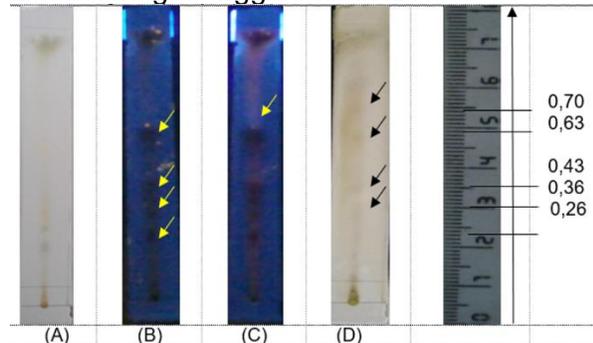
Perhitungan Nilai LC₅₀

Efek toksik ekstrak metanol daun saga terhadap larva *A. salina* dianalisis dengan cara menghitung persentase kematian larva uji setelah 24 jam perlakuan. Perhitungan nilai LC₅₀ kedua bagian hasil partisi tersebut dihitung dengan menggunakan persamaan yang didapat dari kurva regresi linear yang menunjukkan hubungan log konsentrasi hasil partisi ekstrak metanol dengan nilai probit kematian larva *A. salina*.

HASIL

Ekstraksi

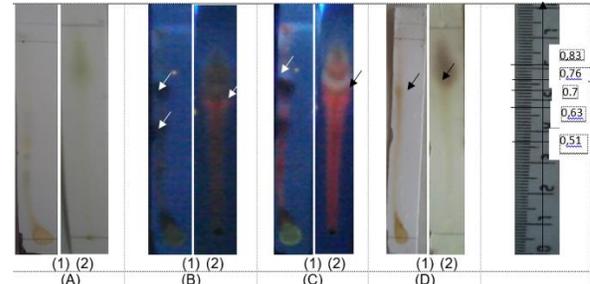
Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol, dan dimonitoring menggunakan KLT.



Gambar 1. Kromatogram hasil KLT ekstrak metanol daun saga deteksi dengan (A) sinar tampak, (B) sinar UV₂₅₄, (C) sinar UV₃₆₆ (D) deteksi semprot serum (IV) sulfat.

Partisi dengan pelarut etanol

Partisi dilakukan dengan pelarut etanol kemudian disentrifugasi hingga didapat bagian larut (1) dan tidak larut etanol (2).



Gambar 2. Kromatogram hasil KLT partisi ekstrak metanol daun saga deteksi dengan (A) sinar tampak, (B) sinar UV₂₅₄, (C) sinar UV₃₆₆ (D) deteksi semprot serum (IV) sulfat.

Uji Toksisitas Komponen Bioaktif

Kedua bagian hasil partisi pelarut etanol kemudian diujikan dengan metode BSLT. Konsentrasi yang digunakan adalah 0 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm dan 750 ppm. Penggunaan konsentrasi ini mengacu pada nilai LC₅₀ ekstrak metanol daun saga yaitu 606,703 ppm (4). Masing-masing konsentrasi diujikan dengan 5 ulangan dan 3 replikasi.

Tabel 1. Hasil uji BSLT bagian larut etanol ekstrak metanol daun saga terhadap *A. salina*

Replikasi I

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva <i>A. salina</i> yang mati tiap flakon					Rata-rata persentase kematian (%)
	A	B	C	D	E	
125	4	6	6	4	5	50
250	10	8	9	10	9	92
500	10	10	9	10	10	98
750	9	9	9	10	10	94
0 (Kntrol)	2	2	2	1	1	16

Replikasi II

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva <i>A. salina</i> yang mati tiap flakon					Rata-rata persentase kematian (%)
	A	B	C	D	E	
125	6	4	4	4	5	46
250	10	8	9	9	9	90

500	9	10	10	10	10	98
750	10	10	10	9	10	98
0 (Kontrol)	3	2	2	2	2	22

Replikasi III

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva <i>A. salina</i> yang mati tiap flakon					Rata-rata persentase kematian (%)
	A	B	C	D	E	
125	5	6	5	10	9	70
250	6	9	7	10	8	80
500	8	10	10	8	10	92
750	10	10	9	10	10	98
0 (Kontrol)	1	1	1	1	0	8

Catatan : huruf A-E menunjukkan nomor flakon, tiap flakon berisi 10 larva *A. salina*

Tabel 2. Hasil uji BSLT bagian tidak larut etanol ekstrak metanol daun saga terhadap *A. salina*

Replikasi I

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva <i>A. salina</i> yang mati tiap flakon					Rata-rata persentase kematian (%)
	A	B	C	D	E	
125	10	5	9	6	5	70
250	10	8	9	10	9	92
500	7	8	8	8	9	80
750	9	10	10	7	8	94
0 (Kontrol)	2	2	2	1	1	16

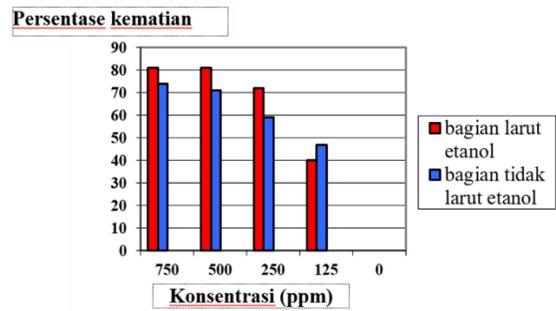
Replikasi II

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva <i>A. salina</i> yang mati tiap flakon					Rata-rata persentase kematian (%)
	A	B	C	D	E	
125	3	5	6	6	7	54
250	7	8	8	8	4	70
500	10	10	8	10	6	88
750	10	9	10	10	9	96
0 (Kontrol)	3	2	2	2	2	22

Replikasi III

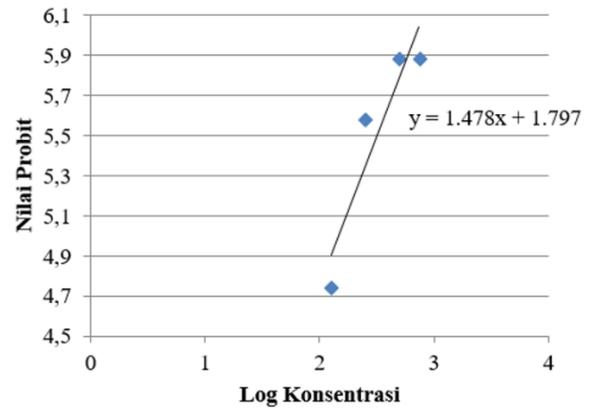
Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva <i>A. salina</i> yang mati tiap flakon					Rata-rata persentase kematian (%)
	A	B	C	D	E	
125	9	10	6	8	7	80
250	8	7	5	7	7	76
500	8	8	10	10	10	92
750	5	10	10	7	10	84
0 (Kontrol)	1	1	1	1	0	8

Catatan : huruf A-E menunjukkan nomor flakon, tiap flakon berisi 10 larva *A. salina*

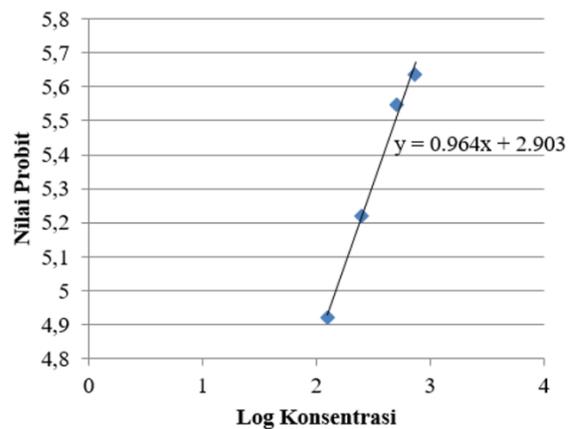


Gambar 3. Diagram hasil uji toksisitas bagian larut dan tidak larut etanol ekstrak metanol daun saga.

Perhitungan nilai LC₅₀



Gambar 4. Kurva regresi linier hasil uji toksisitas bagian larut etanol ekstrak metanol daun saga terhadap *A. Salina*



Gambar 5. Kurva regresi linier hasil uji toksisitas bagian tidak larut etanol ekstrak metanol daun saga terhadap *A. salina*

Tabel 3. Tabel nilai probit persentase kematian *A. salina* [10]

Tabel Probit										
%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		2,67	2,94	3,12	3,24	3,36	3,44	3,52	3,60	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,00	4,04	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,22	4,26	4,29	4,32	4,36	4,38	4,42	4,44
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,58	4,62	4,64	4,66	4,70	4,72
40	4,74	4,77	4,80	4,82	4,84	4,87	4,90	4,92	4,95	4,98
50	5,00	5,02	5,02	5,08	5,10	5,12	5,15	5,18	5,20	5,22
60	5,25	5,28	5,30	5,33	5,36	5,38	5,41	5,44	5,46	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,70	5,74	5,77	5,80
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,12	6,18	6,22
90	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
91	6,28	6,28	6,29	6,29	6,3	6,31	6,31	6,32	6,32	6,34
92	6,34	6,34	6,35	6,36	6,36	6,37	6,38	6,38	6,39	6,40
93	6,40	6,41	6,41	6,42	6,43	6,44	6,44	6,45	6,46	6,46
94	6,48	6,48	6,49	6,49	6,50	6,52	6,52	6,53	6,53	6,54
95	6,56	6,56	6,57	6,58	6,58	6,60	6,60	6,62	6,62	6,64
96	6,64	6,66	6,66	6,68	6,68	6,70	6,70	6,72	6,72	6,74
97	6,75	6,76	6,77	6,78	6,80	6,81	6,82	6,84	6,85	6,86
98	6,88	6,90	6,91	6,92	6,94	6,96	6,98	6,99	7,01	7,03
99	7,05	7,08	7,10	7,12	7,14	7,17	7,20	7,22	7,26	7,29
	7,32	7,36	7,40	7,46	7,51	7,58	7,65	7,74	7,88	8,09

PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi daun saga dengan pelarut metanol dimonitor dengan KLT. Hasil KLT ekstrak metanol daun saga dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan profil kromatogram hasil KLT ekstrak metanol tersebut terlihat bahwa dengan deteksi semprot serium (IV) sulfat (Gambar 1.D.) terbentuk spot berwarna kecoklatan dengan nilai Rf 0,36; 0,43; 0,63 dan 0,7. Yang menunjukkan adanya kandungan senyawa organik secara umum (11).

Ekstrak metanol kemudian dipartisi dengan menggunakan pelarut etanol. Setelah disentrifus, didapatkan dua bagian yang terpisah, yaitu bagian larut etanol dan bagian tidak larut etanol. Kedua bagian dimonitoring dengan KLT. Berdasarkan hasil KLT terlihat bahwa profil spot bagian larut dan tidak larut etanol tidak tumpang tindih (Gambar 2).

Pada tabel 1 dan 2, diketahui hasil perhitungan kematian larva *A. salina* pada masing-masing konsentrasi. Pada tabel tersebut terlihat bahwa semakin besar konsentrasi senyawa yang digunakan maka semakin besar pula tingkat kematian larva. Persentase kematian bagian larut maupun

tidak larut etanol dihitung dengan cara mengurangi persentase kematian larva tiap konsentrasi dengan persentase kematian larva pada botol kontrol. Hal ini bertujuan untuk mengurangi tingkat kesalahan karena seharusnya pada botol kontrol tidak terdapat larva mati. Hasil dari perhitungan ini dapat dilihat pada gambar 3.

Metode BSLT diterapkan dengan menentukan nilai LC₅₀ setelah perlakuan selama 24 jam. Melalui metode BSLT pelaksanaan skrining awal dapat dilakukan dengan biaya yang relatif mudah, sederhana, dan relatif cepat terhadap standarisasi bioaktivitas pada produksi tumbuhan heterogen (12). Suatu ekstrak dikatakan bersifat toksik jika memiliki nilai LC₅₀ (konsentrasi yang mampu membunuh 50% larva udang) kurang dari 1000 ppm setelah waktu kontak 24 jam (13).

Perhitungan nilai LC₅₀ kedua bagian hasil partisi tersebut dihitung dengan menggunakan persamaan yang didapat dari kurva regresi linear yang menunjukkan hubungan log konsentrasi hasil partisi ekstrak metanol dengan nilai probit kematian larva *A. salina* (Tabel 3).

Berdasarkan persamaan dari kurva regresi linier pada gambar 4 dan 5, dapat dilakukan perhitungan nilai LC₅₀ sebagai berikut :

a) Bagian larut etanol ekstrak metanol daun saga

Berdasarkan kurva regresi linear hubungan nilai probit (persentase kematian *A. salina*) dengan log konsentrasi bagian larut etanol ekstrak metanol daun saga didapat persamaan sebagai berikut :

$$y = 1.478x + 1.797, \text{ dimana } y = 5 \text{ (LC}_{50}\text{)}$$

$$5 = 1.478x + 1.797$$

$$x = \frac{5-1.797}{1.478}; x = 2.16$$

$$\text{LC}_{50} = \text{antilog } x = \text{antilog } 2.16 = 144.544 \text{ ppm}$$

b) Bagian tidak larut etanol ekstrak metanol daun saga

Berdasarkan kurva regresi linear hubungan nilai probit (persentase

kematian *A. salina*) dengan log konsentrasi bagian tidak larut etanol ekstrak metanol daun saga didapat persamaan sebagai berikut :

$$y = 0.964x + 2.903, \text{ dimana } y = 5 \text{ (LC}_{50}\text{)}$$

$$5 = 0.964x + 2.903$$

$$x = \frac{5 - 2.903}{0.964}; x = 2.18$$

$$\text{LC}_{50} = \text{antilog } x = \text{antilog } 2.18 = 151.356 \text{ ppm}$$

Dari perhitungan didapatkan nilai LC_{50} bagian larut etanol sebesar 144,544 ppm sedangkan nilai LC_{50} bagian tidak larut etanol sebesar 151,356 ppm. Nilai LC_{50} yang didapat menunjukkan tingkat ketoksikan suatu bagian senyawa terhadap *A. salina*. Semakin kecil nilai LC_{50} maka semakin besar tingkat ketoksikannya.

Terdapat hubungan antara letalitas larva *A. salina* dengan sifat toksik suatu senyawa dari ekstrak tanaman (14). Jika suatu ekstrak tanaman bersifat toksik menurut metode BSLT maka ekstrak tersebut berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker. Cara kerja senyawa toksik yang menyebabkan kematian larva *A. salina* adalah dengan bertindak sebagai stomach poisoning atau racun perut. Senyawa toksik ini dapat mengganggu alat pencernaan dan menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal inilah yang menyebabkan kegagalan larva mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya dan menyebabkan kematian larva (15).

KESIMPULAN

Bagian larut etanol ekstrak metanol daun saga memiliki nilai LC_{50} yang lebih rendah dari bagian tidak larutnya. Bagian larut etanol lebih berpotensi untuk dikembangkan sebagai senyawa antikanker.

DAFTAR PUSTAKA

1. Indrayani, L, H. Soetjipto, L. Sihasale. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia salina*
2. Leach. *Berkala Penelitian Hayati* 2006; **12**: 57-61.
3. Katzung, BG. *Basic and Clinical Pharmacology*. 8th edition. Philadelphia : Mc. Graw-Hill companies; 2001
4. Wahyuningsih, MSH, S. Wahyuono, D. Santoso, J. Septiadi, Soekotjo, Widiastuti, R. Rakhmawati, D. Sari. Eksplorasi Tumbuhan dari Hutan Kalimantan Tengah sebagai Sumber Senyawa Bioaktif. *Biodiversitas* 2008; **9** (3) : 169-172.
5. Juniarti, Delvi O, Yuhernita. Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Antioksidan (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) dari Ekstrak Daun Saga (*Abrus precatorius* L.). *Makara Sains* 2009; **13** (1) : 50-54.
6. Ohba, H, S. Moriwaki, R. Bakalova, S. Yasuda, N. Yamasaki. Plant-Derived Abrin-a Induces Apoptosis in Cultured Leukemic Cell Lines by Different Mechanisms. *Toxicology Appl Pharmacol* 2004; **195** (2) : 182-193.
7. Huang, RS, YX Yu, Y. Hu, XB Sheng, Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. Determination of total flavonoids in *Abrus cantoniensis* and its dynamic changes. *China Journal of Chinese Materia Medica* 2006; **31** (17) : 1428-1431.
8. Limmatvapirat, C, S. Sirisopanaporn, P. Kittakoop. Antitubercular and Antiplasmodial Constituents of *Abrus precatorius*. *Planta Media* 2004; **70** (3) : 276-278.
9. Syamsuhidayat, SS, Hutapea, JR. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Depkes RI. Jakarta; 1991
10. McLaughlin, JL. Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractination. *Methods in Plants Biochemistry* 1991; **6** (1): 1-30.
11. Mursyidi, A. *Statistik Farmasi Dan Biologi*. Ghalia Indonesia, Cetakan I, Jakarta; 1984.
12. Cannell, RJP. (Ed). *How to approach the isolation of a natural product*. In R.J.

- P. Cannell (Ed.). *Methods in Biotechnology*. Vol. 4: Natural Products Isolation, Humana, Totowa, NJ, pp. 1–51; 1998.
12. McLaughlin, JL, LL Rogers, JE Anderson. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. *Drug Information Journal* 1998; **32**: 513-524.
 13. Rakhmawati, R, E. Anggarwulan, E. Retnaningtyas. Potency of Lobak Leaves (*Raphanus sativus* L. var. hortensis Back) as Anticancer and Antimicrobial Candidates. *Biodiversitas* 2009; **10** (3) : 158-162.
 14. Carballo JL, Hernandez-Inda ZL, Perez P, Garcia-Gravaloz MD. Comparison Between Two Brine Shrimp Assays to Detect In Vitro Cytotoxicity in Marine Natural Products. *BMC Biotechnology* 2002; **2**:1472-6570.
 15. De Padua LSN, Bunyapraphatsana RH, Lemmens MJ. *Medicinal and Poisonous Plant Research of South-East Asia*. Pudoc Scientific Publisher. Wageningen, the Netherland; 1999