

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. HASIL PENELITIAN

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran sampel yang digunakan pada penelitian. Pada penelitian kali ini sampel yang digunakan adalah buah mengkudu dengan ciri-ciri buah berwarna kuning bening dan masih mengkal. Determinasi tanaman dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada. Untuk mendeterminasi tumbuhan, langkah awal yang harus dilakukan adalah mempelajari morfologi tumbuhan (posisi, bentuk, ukuran, jumlah bagian-bagian daun, buah dan bunga). Langkah selanjutnya adalah membandingkan dan menemukan persamaan ciri-ciri dari sampel yang digunakan dengan tumbuhan lain yang sudah dikenal identitasnya (Rifai, 1976).

Dari hasil determinasi yang dilakukan terhadap sampel yang digunakan, diketahui identitas sampel yang digunakan pada penelitian ini, yakni termasuk ke dalam suku *rubiaceae* dengan nama spesies *morinda citrifolia* L. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran I.

2. Ekstraksi dan Maserasi

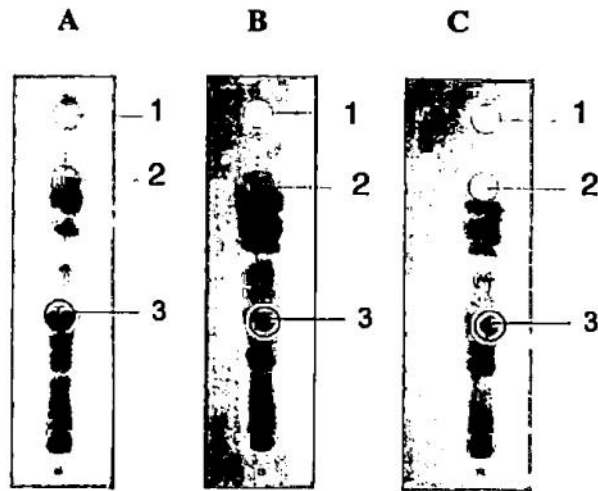
Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah mengkudu. Buah mengkudu dipanen dari daerah Kota Gede sebanyak 5 kg. Buah mengkudu yang dipilih adalah yang sudah berwarna kuning bening. Pelarut yang digunakan dalam maserasi adalah etanol teknis. Etanol teknis yakni etanol 70% merupakan senyawa

semi polar sehingga diharapkan dapat menarik baik senyawa polar maupun non polar yang terdapat dalam buah mengkudu. Serbuk yang didapat dari penyerbukan simpilisia kering buah mengkudu dibagi ke dalam 2 bejana agar penarikan senyawa dapat dilakukan secara maksimal dan kemudian dilakukan remaserasi agar semua senyawa dapat ditarik dari serbuk. Maserasi dilakukan selama 5 hari dan remaserasi dilakukan selama 2 hari. Setelah 2 hari, dilakukan penyaringan hasil remaserasi. Hasil dari seluruh penyaringan kemudian dievaporasi agar didapatkan ekstrak kental. Dari 300 gram serbuk buah mengkudu diperoleh ekstrak kental sebanyak 85 gram. Ekstrak kental ini yang kemudian digunakan untuk penelitian.

3. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Pemisahan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanolik buah mengkudu dalam penelitian ini menggunakan metode kromatografi lapis tipis. Teknik ini merupakan suatu cara pemisahan komponen senyawa kimia di antara dua fase, yaitu fase gerak dan fase diam (Kartasubrata, 1987). Teknik tersebut hingga saat ini masih digunakan untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa kimia, karena murah, sederhana, serta dapat menganalisis beberapa komponen secara serempak (Hernani, 1999).

Uji kromatografi lapis tipis yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan untuk mendeteksi senyawa yang terkandung di dalam sampel yang digunakan baik secara kuantitatif maupun kualitatif. Pemisahan senyawa yang terkandung dalam ekstrak Pada penelitian ini dilakukan uji kromatografi lapis tipis untuk mengetahui kandungan senyawa antrakuinon dalam ekstrak etanolik buah mengkudu secara kualitatif.



Gambar 4. Hasil KLT ekstrak etanolik buah mengkudu ; A. sinar tampak; B. UV 254 nm; C. UV 366 nm (setelah disemprot pereaksi KOH)

Profil kromatografi

1. Sampel : Ekstrak etanolik buah mengkudu
2. Fase diam : Silica gel 60 F₂₅₄
3. Fase gerak : Toluene – Ether
4. Spotting sampel : 5 μ l
5. Jarak rambat : 8,5 cm
6. Pereaksi semprot : KOH metanolik 3%

Tabel 1. Keterangan hasil KLT

No	Rf	Deteksi			keterangan
		Sinar tampak	UV 254 nm	UV 366 nm	
1	0,76	Biru muda	Biru muda	Biru muda	Kumarin
2	0,60	Hijau	Merah	merah	Antrakuinon
3	0,40	Hijau	Biru muda	Biru muda	Flavonoid

Dari profil kromatografi di atas (**Tabel 1**), dapat dilihat bahwa ekstrak etanolik buah mengkudu mengandung senyawa yang diduga kumarin pada Rf 0,76 dan senyawa yang diduga flavonoid pada Rf 0,40. Kumarin berwarna biru muda ketika diamati dengan sinar tampak dan berwarna biru muda berpendar ketika diamati dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm sedangkan flavonoid berwarna hijau pada sinar tampak dan berwarna biru muda berpendar ketika diamati dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Pada bercak yang lain ditemukan senyawa yang diduga antrakuinon yakni ditunjukkan pada Rf 0,60. Senyawa antrakuinon memiliki warna yang khas

yakni berwarna hijau ketika diamati dibawah sinar tampak dan berwarna merah setelah disemprot dengan basa. Basa yang digunakan sebagai pereaksi semprot adalah KOH. Warna merah dari antrakuinon tampak ketika diamati dibawah sinar UV 245 nm dan 366 nm. Senyawa antrakuinon yang diduga sebagai agen kemopreventif adalah alizarin. Mekanisme kerja dari senyawa ini adalah mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada dinding sel bakteri, sehingga lapisan dari dinding sel bakteri tidak dapat terbentuk sempurna dan mekanisme tersebut dapat menyebabkan kematian sel (Dwidjoseputro, 1994). Jika suatu zat dapat memberikan efek toksik terhadap bakteri, maka besar kemungkinan senyawa tersebut mampu digunakan sebagai agen kemopreventif karena beberapa antikanker kimiawi yang biasa digunakan pada pengobatan kanker merupakan antibakteri. Hal ini menunjukkan bahwa hipotesis mengenai adanya kandungan senyawa antrakuinon dalam buah mengkudu adalah benar. Perhitungan dapat dilihat pada lampiran 3.

4. Hasil Uji Toksisitas Metode BSLT

Uji toksisitas merupakan uji yang dilakukan untuk melihat toksisitas suatu ekstrak ataupun senyawa terhadap hewan uji. Uji toksisitas biasa dilakukan sebagai uji pendahuluan antikanker. Uji toksistas yang dilakukan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang laut *Artemia salina* L. Metode BSLT digunakan untuk meneliti toksisitas ekstrak fungi, tumbuhan, logam berat, pestisida, substansi toksin dari *Cyanobacteria* (Carballo *et al.*, 2002).

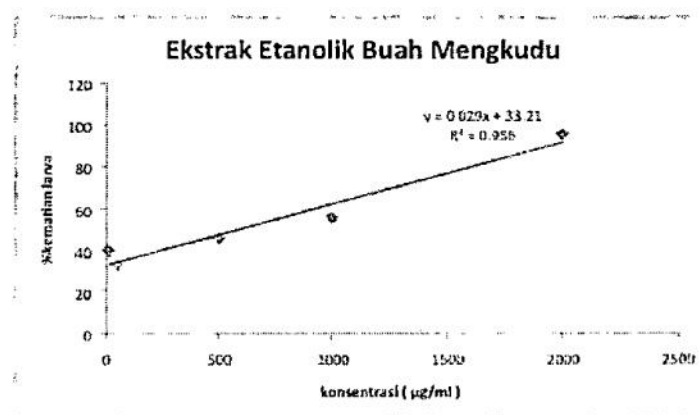
Sebanyak 100 mg kista udang ditumbuhkan dalam 2 L air laut yang telah dilengkapi dengan *aerator* oksigen dalam aquarium. Kista udang ditumbuhkan selama 24 jam hingga menetas, setelah telur terpisah dari dalam cangkangnya, telur yang berwarna putih ditunggu sampai 48 jam hingga berubah menjadi larva yang siap

untuk diujikan. Variasi dosis yang digunakan adalah 2000; 1000; 500; 50; 10 μg ekstrak etanolik buah mengkudu tiap 1 ml air laut. Dilakukan sebanyak 2 kali replikasi. Hasil dari uji toksisitas adalah nilai *lethal concentration* (LC_{50}) yaitu jumlah dosis atau konsentrasi ekstrak uji yang dapat menyebabkan kematian larva udang sebanyak 50% setelah masa inkubasi 24 jam. Hasil uji BSLT dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Tabel hasil uji toksisitas ekstrak etanolik buah mengkudu terhadap *Artemia salina* L.

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Replikasi			%kematian
	I	II	III	
2000	9	10	10	96
1000	6	5	6	56
500	5	5	4	46
50	4	2	4	33
10	4	4	4	40

Semakin tinggi konsentrasi suatu ekstrak maka kematian larva semakin tinggi pula. Kematian larva udang disebabkan oleh sifat toksik dari ekstrak yang terlarut dalam media hidup larva. Toksisitas suatu bahan dipengaruhi oleh jenis ekstrak dan komponen yang terdapat dalam ekstrak (Harborne, 1996).



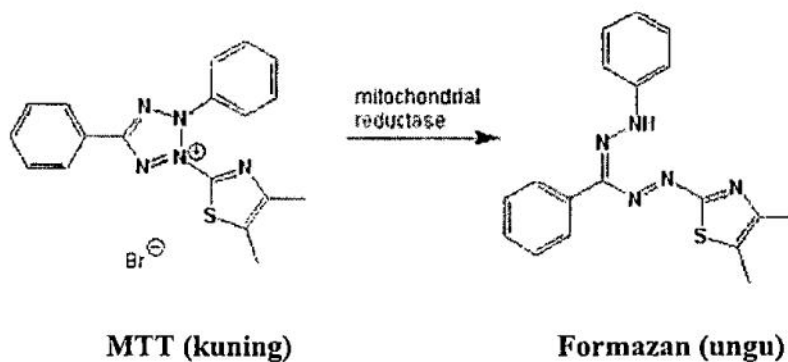
Gambar 5. Grafik hasil uji toksisitas ekstrak etanolik buah mengkudu

Data pengujian BSLT dianalisis dengan metode *Sam* yakni berdasarkan jumlah larva yang mati dan yang masih hidup (Russel *et al*, 1993). Tingkat kematian atau (%) mortalitas didapat dengan membandingkan antara jumlah larva yang mati dibagi jumlah total larva. Nilai LC_{50} kemudian diperoleh dengan cara menghitung rumus $y = bx + a$. Harga y menyatakan larva udang yang mati sebanyak 50% setelah masa inkubasi 24 jam. Nilai a dan b diperoleh melalui perhitungan dengan *regresi linear* berdasarkan data dari 5 konsentrasi yang digunakan. Harga x yang diperoleh merupakan jumlah konsentrasi ekstrak yang menyebabkan kematian larva sebanyak 50%. Dari hasil *regresi linear* pada (**Gambar 5**) diperoleh harga x sebesar 575 $\mu\text{g/ml}$. Hasil pengamatan dari uji ini adalah dari nilai LC_{50} (*Lethal Concentration 50 %*) dan hasil BSLT ini berkorelasi positif dengan sifat antikanker senyawa- senyawa kimia yang dikandung oleh bahan uji. Ada beberapa tingkat toksisitas yakni nilai $LC_{50} \leq 30$ $\mu\text{g/ml}$ adalah sangat toksik; $31 \mu\text{g/ml} \leq LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/ml}$ adalah toksik dan $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ adalah tidak toksik. Apabila $LC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$ maka ekstrak sangat toksik dan berpotensi mengandung senyawa bioaktif antikanker (Meyer *et al*.1982). Pada (**Gambar 5**), terlihat bahwa semakin tinggi tingkat konsentrasi ekstrak, maka semakin banyak pula larva udang yang mati. Nilai LC_{50} yang didapatkan dari uji BSLT menggunakan ekstrak etanolik buah mengkudu adalah sebesar 575 $\mu\text{g/ml}$. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak etanolik buah mengkudu bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* L. Perhitungan dapat dilihat pada lampiran 4.

5. Hasil Uji Sitotoksik Metode MTT

Uji sitotoksik merupakan uji yang dilakukan untuk melihat kemampuan suatu senyawa untuk dapat menghambat 50% pertumbuhan sel. Uji ini banyak dilakukan untuk mengetahui potensi antikanker suatu senyawa maupun ekstrak. Uji aktivitas sitotoksik pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui toksisitas bahan uji (ekstrak etanolik buah mengkudu) terhadap sel kanker. Sel kanker yang digunakan adalah sel kanker kolon WiDr.

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel (Meiyanto *et al*, 2003). Nilai IC_{50} dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Melanisa, 2004). Akhir dari uji sitotoksitas dapat memberikan informasi % sel yang mampu bertahan hidup.

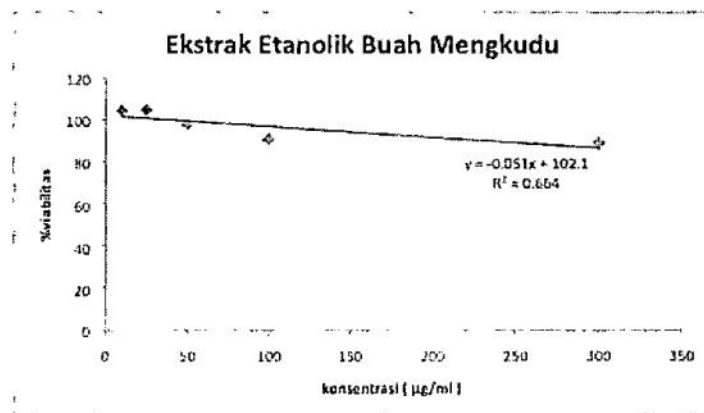


Gambar 6. Reaksi reduksi MTT menjadi formazan

Tabel 3. Hasil uji sitotoksik ekstrak etanolik buah mengkudu terhadap sel WiDr

Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi			Rata-rata	%Viabilitas
	1	2	3		
10	0.725	0.722	0.704	0.717	104.28
25	0.693	0.768	0.699	0.72	104.72
50	0.69	0.685	0.635	0.67	97.35
100	0.603	0.612	0.655	0.623	90.41
300	0.626	0.605	0.607	0.6123	88.83
Kontrol sel	0.683	0.684	0.697	0.688	100
Kontrol media	0.098	0.097	0.104	0.01	

Berdasarkan hasil yang didapat (Tabel 3), persentase kematian sel WiDr akibat pemberian ekstrak etanolik buah mengkudu semakin besar dengan bertambahnya konsentrasi bahan uji selama inkubasi 24 jam. Pada konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$ dan 25 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak etanolik buah mengkudu belum memberi efek toksik terhadap sel WiDr, pada konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$ daya hambat yang dihasilkan ekstrak etanolik buah mengkudu sangat lemah yakni 2,65%, pada konsentrasi yang lebih tinggi yakni pada variasi dosis 100 $\mu\text{g/ml}$ dan 300 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak etanolik masih menunjukkan aktivitas yang lemah dalam menghambat pertumbuhan sel kanker kolon WiDr.

**Gambar 7.** Grafik hasil uji sitotoksik ekstrak etanolik buah mengkudu

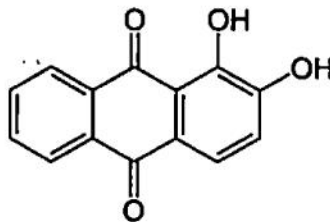
Uji sitotoksik dilakukan untuk melihat potensi dari suatu ekstrak dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Hasil yang didapat merupakan nilai IC_{50} untuk mengetahui konsentrasi yang dibutuhkan oleh suatu ekstrak agar mampu menghambat 50% pertumbuhan sel kanker. Nilai IC_{50} yang poten untuk ekstrak adalah $< 100 \mu\text{g/ml}$. Dari hasil penelitian yang dilakukan, nilai IC_{50} yang didapatkan untuk ekstrak etanolik buah mengkudu mampu menghambat 50% pertumbuhan sel kanker adalah sebesar $1.041 \mu\text{g/ml}$ sehingga ekstrak etanolik buah mengkudu memiliki potensi yang lemah dalam menghambat pertumbuhan sel kanker kolon WiDr. Perhitungan dapat dilihat pada lampiran 5.

6. Hasil *Molecular Docking*

Pada penelitian ini dilakukan uji *in silico* guna mengetahui kekuatan ikatan antara protein target dengan senyawa yang diduga memiliki aktifitas kemopreventif menggunakan metode *molecular docking*. Prosedur *docking* digunakan sebagai acuan untuk menentukan orientasi yang baik dari suatu senyawa terhadap senyawa lainnya yang bersifat relatif. Protein target dipilih berdasarkan ada atau tidaknya ligan asli. Ligan asli berguna untuk membandingkan kekuatan ikatan dengan kompetitor terhadap protein. Pemilihan protein diunduh dari RSCB PDB. Protein yang digunakan adalah protein Bcl-xl dengan PDB ID 1YSG. Protein Bcl-xl merupakan protein antiapoptosis yang dapat memicu proliferasi sel kanker. Ligan asli dari protein Bcl-xl adalah 4FC sedangkan kompetitor yang digunakan untuk menghambat ekspresi berlebihan dari protein Bcl-xl adalah senyawa alizarin.

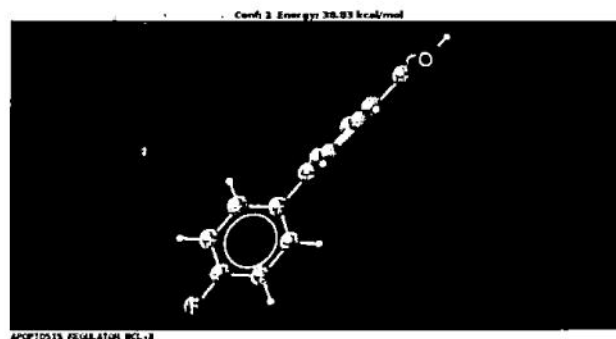
Persiapan protein dimulai dengan membersihkan protein Bcl-xl dari senyawa pengganggu, residu dan H_2O serta *native ligand*-nya untuk menyediakan ruang antara protein dengan alizarin. Selanjutnya, protein Bcl-xl di *docking*-kan dengan 4FC yang

telah diprotonasi pada pH darah 7,4 dan dilanjutkan dengan mencari konformasi dalam bentuk 3 dimensi untuk diketahui *score* ikatannya. Kemudian dilakukan persiapan senyawa alizarin dengan membuat struktur 2D menggunakan *marvinsketch* dan dilakukan protonasi pada pH 7,4 dan dilanjutkan dengan mencari konformasi 3 dimensi dalam 10 bentuk untuk selanjutnya di *docking*-kan dengan protein Bcl-xl dan dilihat *score* ikatannya. Perbandingan yang digunakan dalam penelitian ini adalah obat kimia yang sudah biasa digunakan dalam terapi kanker yakni daunorubicin. Senyawa daunorubicin dipersiapkan dalam bentuk 3 dimensi dan di *docking*-kan dengan protein Bcl-xl. Protonasi berguna untuk menambahkan atom dan hidrogen pada senyawa uji.



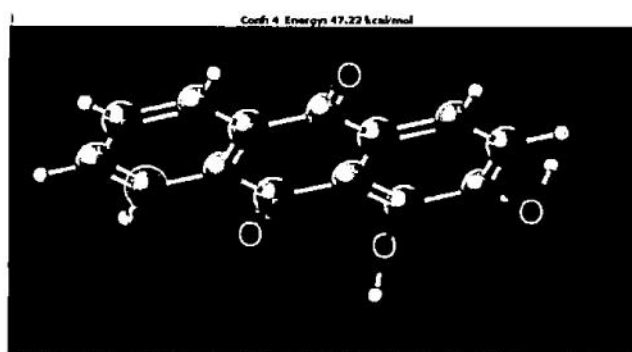
Gambar 8. Struktur 2D alizarin

Protein yang digunakan untuk uji *in silico* adalah protein Bcl-xl. PDB-ID dari Bcl-xl yang digunakan adalah 1Y5G karena protein ini memiliki nilai *root mean square deviation* (RMSD) yang paling kecil dan memiliki ligan asli yakni 4FC. RMSD yang dihasilkan sebesar 0,3°A. RMSD dikatakan baik jika nilainya kurang dari 2°A



Gambar 9. Konformasi terbaik *native ligand* 4FC

Dicobakan 10 konformasi dari *native ligand* 4FC untuk diketahui konformasi mana yang memiliki ikatan yang paling baik dengan protein Bcl-xl. *Native ligand* merupakan ligand asli atau ligand bawaan dari protein itu sendiri. Bentuk konformasi terbaik yang menghasilkan *docking score* terkecil terlihat pada (Gambar 10) dengan energi sebesar 38.83 kcal/mol dan *docking score* sebesar -83.6177. Semakin kecil *docking score* maka semakin kuat pula ikatannya.



Gambar 10. Konformasi terbaik alizarin

Senyawa yang di-*docking*-kan pada uji *in silico* adalah senyawa alizarin karena senyawa ini merupakan senyawa yang diduga kuat sebagai agen kemopreventif. Bentuk konformasi terbaik dari alizarin dapat dilihat pada (Gambar 10) dengan energi sebesar 47.22 kcal/mol dan *docking score* sebesar -71.905.



Gambar 11. Ikatan alizarin dengan protein Bcl-xl

Dari (Gambar 11) dapat dilihat bahwa alizarin berikatan dengan fenilalanin 148 pada protein Bcl-xl. *Docking skor* dapat dilihat pada lampiran 6.



Gambar 12. Ikatan daunorubicin dengan protein Bcl-x1

Daunorubicin merupakan obat antikanker yang biasa digunakan sebagai agen terapi. Pada uji ini digunakan daunorubicin sebagai pembanding. *Docking score* yang dihasilkan oleh daunorubicin terhadap protein Bcl-x1 sebesar -77.5686 kcal/mol.

Tabel 4. *Score molecular docking*

	Energi Ikatan (kcal/mol)
	Bcl-x1 (1YSG)
RMSD	0.3°A
Native ligand	-83.6177
Alizarin	-71.905
Daunorubicin	-72.5492

Dari hasil yang didapat (Tabel 4), disimpulkan bahwa protein Bcl-x1 berikatan kuat dengan ligand aslinya dan memiliki kekuatan ikatan yang lebih rendah dengan senyawa alizarin dan daunorubicin. *Docking skor* dapat dilihat pada lampiran 7.

B. PEMBAHASAN

Dalam uji aktivitas kemopreventif ekstrak etanolik buah mengkudu dilakukan uji secara bertahap. Pertama dilakukan analisis kandungan senyawa yang diduga berkhasiat sebagai agen kemopreventif pada ekstrak etanolik buah mengkudu dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT), kedua, dilakukan uji pendahuluan sebelum

dilakukan uji sitotoksik yakni uji toksisitas dengan metode *brine shrimp lethality test* (BSLT) menggunakan larva udang laut, ketiga, dilakukan uji sitotoksik untuk melihat potensi ekstrak etanolik buah mengkudu dalam menghambat pertumbuhan sel kanker kolon WiDr, keempat, dilakukan uji *in silico* menggunakan senyawa yang diduga berkhasiat terhadap protein target melalui metode *molecular docking*.

Kemoterapi merupakan pengobatan kanker dengan menggunakan suatu obat yang dapat merusak sel kanker. Obat antikanker dibedakan menjadi dua yaitu obat konvensional dan obat dengan target molekuler yang spesifik. Obat konvensional merupakan obat-obat sitostatika seperti taxol, bleomycin, 5-fluorourasil, klorambusil, tiotepa, alkaloid indol, dan doxorubicin. Obat sitostatika bekerja dengan mempengaruhi metabolisme asam nukleat terutama DNA atau biosintesis protein (Siswandono *et al.*, 2000). Salah satu ciri sel kanker adalah tidak sensitif terhadap sinyal antiproliferasi. Oleh karena itu, pengobatan penyakit kanker dengan obat-obat sitostatik konvensional umumnya menggunakan dosis besar. Peningkatan dosis obat sitostatik menimbulkan masalah karena semakin banyak sel normal yang terserang dan mati. Selain itu, peningkatan dosis dapat menyebabkan sel kanker cepat menjadi resisten terhadap obat (Hanahan dan Weinberg, 2000).

Pemahaman tentang proses karsinogenesis merupakan pengembangan strategi dalam pengobatan penyakit kanker. Agen kemopreventif didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menghambat dan menekan proses karsinogenesis pada manusia sehingga pertumbuhan kanker dapat dicegah (Kakizoe, 2003). Oleh karena itu, agen kemopreventif relatif aman dan tidak berpengaruh pada sel normal (Chang dan Kinghorn, 2001). Pada terapi kuratif kanker, pengembangan agen kemopreventif didasarkan pada regulasi daur sel termasuk reseptor-reseptor hormon pertumbuhan dan protein kinase, penghambatan angiogenesis, penghambatan enzim

siklooksigenase-2 (COX-2), dan induksi apoptosis.

Uji kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan tahap awal dalam penelitian agen kemopreventif. Uji ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya senyawa yang diduga memiliki khasiat dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Buah mengkudu memiliki beberapa kandungan senyawa, diantaranya senyawa golongan flavonoid, alkaloid triterpenoid, scopoletin dan antrakuinon. Senyawa yang diduga kuat memiliki aktifitas kemopreventif adalah alizarin yang termasuk dalam golongan antrakuinon. Hal ini diperkuat oleh penelitian-penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa alizarin memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Dari hasil KLT yang dilakukan, ditemukan adanya senyawa antrakuinon yang diidentifikasi berdasarkan warna yang terbentuk. Senyawa antrakuinon akan memunculkan warna hijau pada sinar tampak dan berubah menjadi merah ketika disemprot dengan basa (Harborne, 1987). Pada gambar 5 bagian A dapat dilihat terbentuknya warna hijau pada plat KLT dan pada gambar 5 bagian B, dapat terlihat spot berwarna merah yang sangat muda atau tipis pada plat setelah disemprot KOH, hal ini menunjukkan bahwa terdapat senyawa golongan antrakuinon yakni alizarin dalam ekstrak etanolik buah mengkudu.

Hasil positif dari uji KLT mengarahkan pada uji bioaktivitas zat ekstraktif dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) untuk melihat adanya kemungkinan efek suatu ekstrak melalui penelusuran farmakologis-biologis dengan menguji ekstrak tersebut berdasarkan suatu metode *bioassay* (Bruhn, 1991). Komponen yang bersifat antibakteri dalam buah mengkudu antara lain adalah *alizarin* (modifikasi atau hidrolisa glikosida fenol), *glikosida*, *scopoletin* (hidroksi-metoksi-kumarin), *acubin*, *L. Asperuloside*, dan *flavonoid* (Peter, 2005). Metode *bioassay* ini sering dikaitkan

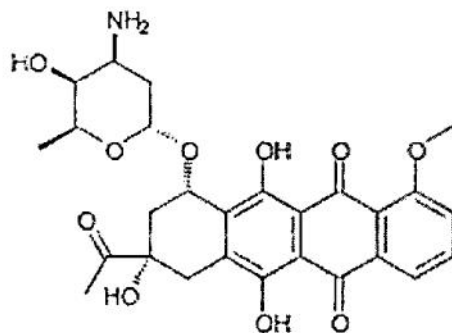
dengan metode identifikasi senyawa antikanker yang berasal dari tumbuhan (Donatus, 2002).

Metode BSLT digunakan untuk meneliti toksisitas ekstrak fungi, tumbuhan, logam berat, pestisida, substansi toksin dari *Cyanobacteria* (Carballo *et al*, 2002). Semakin besar konsentrasi suatu ekstrak maka kematian hewan uji akan semakin tinggi. Kematian hewan uji disebabkan oleh sifat toksik dari ekstrak yang terlarut dalam media hidup hewan uji tersebut. Toksisitas suatu bahan juga dipengaruhi jenis ekstraknya dan komponen yang terdapat dalam ekstrak (Harborne, 1996). Keunggulan penggunaan *Artemia salina* L. untuk uji BSLT adalah bersifat peka terhadap bahan uji, siklus hidup yang lebih cepat, mudah dibiakkan, dan harganya murah. Sifat peka *Artemia salina* L. kemungkinan disebabkan oleh keadaan membran kulitnya yang tipis sehingga memungkinkan terjadinya difusi zat dari lingkungan yang mempengaruhi metabolisme dalam tubuhnya. *Artemia salina* L. ditemukan hampir di seluruh permukaan perairan di bumi yang memiliki kisaran salinitas 10-20 g/l, hal ini yang menyebabkannya mudah dibiakkan (Meyer *et al.*, 1982). Larva udang *Artemia salina* L. mampu berkembang biak secara cepat dan terus menerus tanpa memperhatikan kondisi lingkungan sekitarnya.

Hasil uji BSLT ekstrak etanolik buah mengkudu menunjukkan bahwa ekstrak tersebut bersifat toksik terhadap *Artemia salina* L. dengan nilai LC_{50} sebesar 575 $\mu\text{g/ml}$. Akan tetapi, hasil ini tidak lebih baik apabila dibandingkan dengan penggunaan herba ceplukan yang telah diteliti sebelumnya. Herba ceplukan memiliki ketoksikan yang lebih tinggi dengan nilai LC_{50} sebesar 39 $\mu\text{g/ml}$ terhadap *Artemia salina* L. (Karwati, 2006).

Alizarin memiliki kemiripan struktur kimia dengan antikanker golongan antibiotik antrasiklin seperti daunorubicin, doxorubicin dan epirubicin. Golongan

antibiotik antrasiklin memiliki gugus kuinon pada strukturnya (**Gambar 14**). Hal ini dapat dijadikan acuan untuk mengetahui mekanisme toksisitas dari alizarin. Alizarin telah terbukti memiliki aktivitas antibiotik dan daunorubicin telah lama dikenal sebagai agen antikanker yang termasuk dalam golongan antibiotik. Antibiotik antrasiklin seperti daunorubicin memiliki mekanisme aksi sitotoksik melalui empat mekanisme yaitu penghambatan topoisomerase II, interkalasi DNA sehingga mengakibatkan penghambatan replikasi DNA dan RNA, pengikatan membran sel yang menyebabkan aliran dan transport ion, dan pembentukan radikal bebas semiquinon dan radikal bebas oksigen melalui proses yang tergantung besi dan proses reduktif yang diperantarai enzim (Bruton *et al.*, 2005).



Gambar 13. Struktur kimia daunorubicin

Daunorubicin dapat berinterkalasi dengan DNA, secara langsung akan mempengaruhi transkripsi dan replikasi. Daunorubicin mampu membentuk kompleks tripartit dengan topoisomerase II dan DNA. Topoisomerase II adalah suatu enzim yang bekerja mengikat DNA dan menyebabkan utas gandanya berpisah pada ujung 3'fosfat sehingga memungkinkan penukaran utas dan pelurusan DNA superkoil. Pelurusan utas ini diikuti dengan penyambungan utas DNA oleh topoisomerase II. Topoisomerase ini sangat penting fungsinya dalam replikasi dan perbaikan DNA. Pembentukan kompleks tripartit tersebut akan menghambat penyambungan kembali utas DNA, menyebabkan penghambatan daur sel terhenti di fase G1 dan G2 serta

memacu terjadinya apoptosis (Gewirtz, 1999). Adanya gangguan pada sistem perbaikan utas ganda DNA akan memicu kerusakan sel. Daunorubicin memiliki gugus quinon yang mampu menghasilkan radikal bebas baik pada sel normal maupun sel kanker. Pada penelitian yang dilakukan oleh Miu *et al* (2003) menyebutkan bahwa gugus quinon pada suatu senyawa merupakan salah satu gugus fungsi yang bertanggung jawab dalam proses ikatan antara reseptor dengan obat yang pada akhirnya dapat menyebabkan kematian pada sel dengan mekanisme apoptosis (Gewirtz, 1999).

Uji sitotoksik dilakukan untuk melihat potensi suatu ekstrak dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Ekstrak etanolik buah mengkudu diujikan kepada sel kanker kolon. Hasil yang diperoleh dari uji sitotoksik adalah nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration 50%*). Nilai IC_{50} yang poten untuk ekstrak adalah $< 100 \mu\text{g/ml}$. Hasil uji sitotoksik dari ekstrak etanolik buah mengkudu terhadap sel kanker kolon menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak berbanding terbalik dengan % viabilitas sel. Semakin besar konsentrasi ekstrak yang diberikan, semakin kecil % viabilitas sel, artinya semakin tinggi konsentrasi maka semakin kecil jumlah sel yang hidup (**Gambar 7**). Nilai IC_{50} ekstrak etanolik buah mengkudu terhadap sel kanker kolon WiDr yang didapatkan adalah sebesar $1.041 \mu\text{g/ml}$. Nilai tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanolik buah mengkudu membutuhkan sejumlah konsentrasi yang cukup besar untuk menghambat pertumbuhan sel kanker kolon. Hal ini dapat dikarenakan senyawa antrakuinon dalam buah mengkudu yang diduga memiliki aktivitas kemopreventif hanya terkandung dalam jumlah yang relatif kecil dalam ekstrak etanolik. Sifat dari senyawa antrakuinon adalah semi polar, sedikit larut dalam air dan mudah larut dalam lemak sehingga senyawa tersebut dapat ditarik dengan pelarut polar maupun non polar, akan tetapi penarikan menggunakan pelarut semi

polar-non polar akan mampu menarik senyawa antrakuinon dengan lebih maksimal (Harborne, 1987). Hasil ini jauh lebih rendah dibandingkan dengan penggunaan herba ceplukan sebagai agen kemopreventif. Herba ceplukan memiliki nilai IC_{50} sebesar 86 $\mu\text{g/ml}$ (Djajanegara, 2010).

Pada penelitian ini juga dilakukan uji *in silico* menggunakan metode *molecular docking*. *Docking* merupakan studi komputasi yang berfungsi untuk melihat aktivitas suatu senyawa terhadap target secara virtual. Metode ini dilakukan sebagai salah satu uji pendahuluan dalam berbagai uji, diantaranya uji sitotoksik. Uji ini dilakukan untuk menghemat waktu dan biaya karena studi komputasi dapat dilakukan dengan cepat, mudah dan murah. Hasil dari uji *in silico* dapat dilihat dari *docking score* yang diperoleh. Semakin kecil afinitas atau nilai ikatan antara senyawa dengan target, maka semakin kuat pula ikatannya. Protein target yang digunakan dalam uji *in silico* ini adalah protein Bcl-xl atau Bcl-2 L1.

Bcl- xl merupakan keluarga protein *B cell/lymphoma-2* (Bcl-2). Protein Bcl-2 meliputi antiapoptosis dan proapoptosis. Gen *bcl-2* pertama ditemukan karena lokasinya didaerah translokasi antara kromosom 14 dan 18 dan terdapat pada sebagian besar limfoma follikuler. Overekspresi *bcl-2* secara spesifik menghambat sel memulai apoptosis. Ekspresi *bcl-2* berkaitan dengan prognosis yang buruk pada kanker prostat, kanker kolon dan neuroblastoma (Thomson, 1995). Bcl-2 menunjukkan overekspresi pada berbagai keganasan dan sering dihubungkan dengan kegagalan terapi klinis. Bcl-2 merupakan salah satu anggota famili protein Bcl-2 yang dapat dibedakan menjadi 3 subkelompok. Subkelompok pertama (1) bersifat anti-apoptosis terdiri dari Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, Boo/Diva dan Nrf3. Protein subkelompok ini mencegah kematian sel dengan mengikat anggota famili Bcl-2 dari subkelompok yang lain. Subkelompok kedua (2) bersifat proapoptosis terdiri dari Bax, Bak dan Bok/Mtd.

Aktivitas dari anggota subkelompok ini dapat menstimulasi pelepasan sitokrom c dari membran mitokondria. Subkelompok ketiga (3) yang bersifat proapoptosis, terdiri dari Bid, Bad, Bim, Bik/Nbk Blk, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa, dan Puma. Protein subkelompok ini mendorong kematian sel sebagai protein adaptor yang terikat pada jalur *upstream* untuk memutuskan berlangsungnya program apoptosis (Hsu dan Hsueh, 2000; Kaufmann dan Hengartner, 2001).

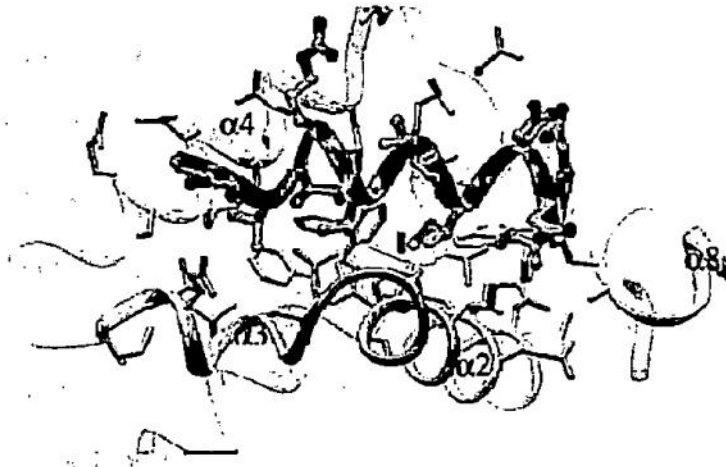
Resistensi akibat kemoterapi diantaranya diakibatkan oleh peningkatan ekspresi Bcl-2 dan Bcl-xl (Herr dan Debatin, 2001). Protein Bcl-2 dapat menghambat kerja Bax/Bak dengan membentuk heterodimer yang menginaktivasi mereka, dan juga dapat berikatan dengan *voltage-dependent anion channel* (VDAC) pada membran luar mitokondria dan menstabilkannya, sehingga mencegah permeabilitas membran luar mitokondria. Molekul-molekul antiapoptosis ini juga membentuk homodimer dan saluran-saluran ion kecil. Selain itu Bcl-2 memiliki fungsi terpisah dalam mengendalikan siklus sel. Protein Bcl-2 menghentikan sel pada G₀, mencegahnya memasuki siklus sel, dan menunda transisi dari fase M ke G₁ (Schimmer *et al.*, 2001). Regulasi apoptosis sangat tergantung dengan rasio antara Bcl-2 dan Bax untuk menentukan apakah sel akan bereaksi dengan menjadi apoptosis atau tetap bertahan hidup.

Protein Bcl-2 mencegah lepasnya sitokrom c dari mitokondria dengan membentuk homodimer dan heterodimer dengan protein proapoptosis Bax. Ketidakseimbangan rasio Bax/Bcl-2 sehingga Bax berhasil membentuk homodimer akan menyebabkan lepasnya sitokrom c dari mitokondria. Selanjutnya sitokrom c akan mengaktifkan Apaf-1. Untuk menjadi aktif Apaf-1 memerlukan dua ko-faktor yaitu : ATP dan sitokrom c. Sitokrom c yang telah keluar dari ruang intermembran mitokondria masuk ke dalam sitoplasma, akan terikat dengan Apaf-1 yang selanjutnya

akan menyebabkan kaskade caspase sampai terjadi apoptosis (Adams dan Cory, 1998).

Rangsangan ekstraseluler seperti sitokin (Fas ligand/FasL), *survival factor*, *stress* dan *genotoxicant* memerlukan sejumlah molekul sinyal transduksi (ceramid, spingosine-1 phosphate/S1P) dan protein kinase (phosphatidylinositol 3'kinase/PI3K, cAkt), untuk meneruskan informasi ke pusat pengaturan yang dilakukan oleh anggota famili Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-w, Bax, Bak, Bid). Jika rangsangan yang diterima menyebabkan kematian maka faktor apoptogenik seperti sitokrom c dan Smac (*second mitochondria- derived activator of caspases*) /Diablo akan dilepaskan ke dalam sitosol. Sitokrom penting untuk menghasilkan apoptosom yang mengandung Apaf-1 dan procaspase-9. Jika caspase sudah teraktivasi maka jalur ini tidak dapat kembali. Pada titik ini ada produk gen yang disebut *inhibitor apoptosis protein* (IAP) dapat mencegah apoptosis yang terlalu dini atau tidak diinginkan. Pada peristiwa apoptosis aktivitas IAP ini dihambat oleh Smac sehingga apoptosis tetap berlangsung (Pru dan Tilly, 2001).

Protein-protein Bcl-2 bertranslokasi ke membran mitokondria dan memodulasi apoptosis dengan menimbulkan permeabilitas membran-dalam dan membran-luar mitokondria sehingga berakibat lepasnya sitokrom c. Sebagian besar protein famili Bcl-2 mampu berinteraksi secara fisik, membentuk homodimer/heterodimer, dan berfungsi mengatur apoptosis. Selain itu Bcl-xl mengikat dan menginaktivasi Apaf-1, sementara anggota-anggota yang proapoptosis dapat menggeser Bcl-xl dari ikatannya dengan Apaf-1 yang memungkinkannya merupakan protein antiapoptosis yang menyebabkan sel kehilangan kemampuan untuk apoptosis. Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram yang apabila fasenya dilewatkan maka sel akan terus menerus membelah dan mengalami keganasan.



Gambar 14. Sisi ikatan protein Bak pada Bcl-2. Rantai samping ikatan pada fenilalanin 105 ditunjukkan dengan warna oranye (Andrew *et al*, 2000)

Senyawa yang di-*docking*-kan adalah alizarin yang diduga kuat memiliki aktivitas kemopreventif, sebagai pembanding digunakan obat kimia yang lazim dan banyak digunakan untuk terapi kanker yakni daunorubicin. Ikatan Bcl-xl dengan ligand aslinya yakni 4FC adalah sebesar -83.6177 \AA sedangkan dengan alizarin sebesar -71.905 \AA , senyawa alizarin terikat pada fenilalanin dengan protein Bcl-xl dan ikatan antara Bcl-xl dengan daunorubicin adalah sebesar -72.5492 \AA . Dari *docking score* tersebut dapat terlihat bahwa ikatan protein dengan ligand asli memiliki afinitas yang paling kecil sehingga ikatan protein dengan ligand asli merupakan ikatan yang paling kuat sedangkan alizarin dan daunorubicin memiliki afinitas yang tidak jauh berbeda.

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa alizarin memiliki afinitas yang baik terhadap COX-2 dan menempati urutan keempat setelah SC 58, androgafolide dan kurkumin dengan *docking score* sebesar $-80,93$ (Zakhrullah, 2008). Terjadinya tumor dan kanker ganas (malignan) akan memicu ekspresi COX-2 yang berlebih. Peningkatan ekspresi COX-2 diikuti produksi prostaglandin E2 (PGE2) yang

berperan dalam proliferasi, dan memacu proses angiogenesis sel kanker (King, 2000). Beberapa senyawa yang digunakan sebagai kemopreventif mempunyai aktivitas menghambat COX-2 sehingga dapat menurunkan tranformasi sel malignan (Surh *et al.*, 2003). Dari keempat hasil uji yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanolik buah mengkudu memiliki potensi yang sangat lemah sebagai agen kemopreventif.