

Aktivitas Antimutagenik dan Antioksidan Daun Puspa (*Schima wallichii* Kort.)

Didi Jauhari Purwadiwarsa*, Anas Subarnas*, Cucu Hadiansyah**, Supriyatna*

*Jurusan Farmasi, **Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Padjadjaran, Bandung.

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian mengenai aktivitas antimutagenik dan antioksidan fraksi butanol daun puspa (*Schima wallichii* Korth). Hasil pengujian aktivitas antimutagenik secara *in vivo* dengan metode uji mikronukleus menunjukkan bahwa pemberian fraksi butanol daun puspa secara oral mampu menurunkan frekuensi sel eritrosit polikromatik bermikronukleus (MNPCE) dari apusan sumsum tulang paha mencit jantan galur Swiss-Webster yang diinduksi dengan siklofosamid dosis 50 mg/kg secara intraperitoneal. Fraksi butanol dosis 300 mg/kg mampu menurunkan frekuensi MNPCE sebesar 10,51% sedangkan pada dosis 600 mg/kg memberikan penurunan sebesar 38,27%.

Pada pengujian aktivitas antioksidan secara *in vitro* dengan metode NBT, fraksi butanol daun puspa mempunyai penghambatan reduksi NBT oleh superoksida yang dihasilkan dari reaksi enzimatik xantin dengan bantuan xantin oksidase. Nilai penghambatan reduksi NBT oleh fraksi butanol daun puspa adalah 68,66% pada konsentrasi 200 µg/ml dan 94,37% pada konsentrasi 400 µg/ml.

Dari hasil pengujian tersebut diperoleh kesimpulan fraksi butanol daun puspa mempunyai aktivitas antimutagenik dan antioksidan.

PENDAHULUAN

Mutasi merupakan perubahan yang terjadi pada gen atau pada kromosom. Mutasi dapat dikaitkan dengan timbulnya beragam kelainan, termasuk penyakit kanker. Selain dapat terjadi secara spontan, mutasi juga dapat diinduksi oleh berbagai faktor seperti radiasi, senyawa kimia tertentu, dan virus. Faktor-faktor penginduksi mutasi dikenal sebagai mutagen^(1,2).

Salah satu indikator terjadinya mutasi adalah adanya mikronukleus. Mikronukleus merupakan hasil mutasi dari kromosom utuh yang patah dan kemudian tampak sebagai nukleus berukuran kecil di dalam suatu sel. Mikronukleus mudah diamati pada sel polikromatik eritrosit. Jumlah sel eritrosit polikromatik bermikronukleus menunjukkan tingkat kerusakan genetik dalam sistem eritropoetik suatu makhluk hidup⁽³⁾.

Banyaknya penggunaan bahan-bahan kimia untuk berbagai keperluan mengakibatkan peningkatan pencemaran bahan-bahan kimia berbahaya ke dalam lingkungan hidup. Penelitian toksikologi memberikan informasi bahwa sebagian besar bahan kimia yang ada bersifat mutagenik^(1,4). Meskipun tubuh kita sudah dilengkapi berbagai mekanisme pertahanan terhadap mutagen, peningkatan paparan terhadap bahan-bahan kimia tersebut dapat meningkatkan peluang terjadinya mutasi. Oleh karena itu diperlukan suatu zat yang dapat mengurangi risiko terjadinya mutasi oleh mutagen^(5,6).

Dugaan keterlibatan oksigen reaktif dalam terjadinya mutasi terutama dalam bentuk radikal bebas akhir-akhir ini makin mendapat perhatian para peneliti. Radikal bebas merupakan sebutan terhadap molekul yang mempunyai elektron yang

tidak berpasangan pada kulit terluarnya, sehingga bersifat sangat reaktif dan dapat merusak komponen-komponen sel, termasuk asam deoksiribonukleat (DNA) ⁽⁷⁾. Beberapa laporan menyebutkan bahwa suatu antioksidan, yaitu senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas juga mempunyai aktivitas antimutagenik ^(5,8,9).

Upaya pencarian zat antimutagenik banyak dilakukan terhadap bahan alam, juga dari tumbuhan. Puspa (*Schima wallichii* Korth) merupakan salah satu tumbuhan tropis Indonesia ⁽¹⁰⁾ dan termasuk tumbuhan pakan primata. Ekstrak metanol daun puspa dilaporkan mempunyai aktivitas anti-promosi tumor dan antimutagenik ⁽¹²⁾.

Sebagai kelanjutan dari hasil penelitian tersebut, dalam rangka usaha mengisolasi senyawa aktif antimutagenik serta untuk mengetahui kemungkinan adanya aktivitas antioksidan; maka dilakukan penelitian yang terfokus pada pengujian aktivitas antimutagenik dan antioksidan fraksi butanol daun puspa.

BAHAN DAN METODE

Hewan Percobaan

Mencit (*Mus musculus*) putih jantan galur Swiss-Webster didapat dari Laboratorium Struktur dan Perkembangan Hewan Jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjadjaran, usia 7-9 minggu, berat 22,5 - 27,5 gram, kandang plastik dengan alas sekam (4-6 ekor). Suhu ruang hewan percobaan 23-25 °C, kelembaban 70-85%, dan cahaya diatur dengan regulator 12 jam terang dan 12 jam gelap. Pakan mencit berupa pelet-789 dan minuman dari air ledeng yang masing-masing diberikan secara ad libitum.

Bahan Kimia

Bahan kimia yang dipakai dalam penelitian ini adalah fraksi butanol dari ekstrak metanol daun puspa (Hutan Pangandaran, Ciamis), Siklofosfamid (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Jepang).

Fraksi butanol pada pengujian aktivitas antimutagenik disuspensikan dengan PGA (1% b/v) dalam akuades, sedangkan pada pengujian aktivitas antioksidan dilarutkan dalam DMSO. Siklofosfamid dilarutkan dalam larutan NaCl fisiologis.

Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk daun puspa (650 gram) diekstraksi dengan metanol (3x24 jam), dan ekstrak metanol kemudian dipartisi dengan campuran etil asetat - air (3 : 1). Lapisan air diekstraksi dengan n-butanol sehingga diperoleh lapisan air dan lapisan n-butanol. Lapisan n-butanol kemudian diuapkan hingga diperoleh fraksi butanol kering yang akan dipakai dalam pengujian.

Uji Mikronukleus - dengan penginduksi siklofosfamid

Pengujian aktivitas antimutagenik menggunakan metode uji mikronukleus ⁽³⁾ dengan modifikasi. Perlakuan diberikan dua kali sesuai dengan cara Ghaskadbi dkk. ⁽⁵⁾

Mencit dipuasakan dahulu selama kurang lebih 18 jam. Setelah pemberian suspensi fraksi butanol secara oral (sebagai kontrol diberikan suspensi PGA tanpa fraksi butanol), siklofosfamid (50 mg/kg bb., i.p.) disuntikkan pada mencit 30 menit kemudian. Setelah 24 jam mencit diberi lagi suspensi fraksi

butanol dan siklofosfamid dengan dosis yang sama. Enam jam setelah pemberian siklofosfamid yang kedua, mencit dibunuh dengan cara dislokasi leher dan dibedah untuk diambil kedua tulang pahunya.

Sumsu tulang diaspirasi dengan semprit yang berisi NaCl fisiologis, selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama sepuluh menit. Sebagian supernatan yang dihasilkan dibuang dengan menggunakan pipet pasteur, sisanya dibuat preparat apusan pada kaca objek yang kemudian dikeringkan selama dua hari pada suhu kamar.

Preparat ini diwarnai dengan pewarna Giemsa menurut cara Gollapudi & Kamra (1979) ⁽¹³⁾. Dari preparat tersebut diamati jumlah sel eritrosit polikromatik bermikronukleus (MNPCE) di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali, untuk setiap 1000 sel eritrosit polikromatik (PCE). Penghitungan dilakukan oleh dua orang dan setiap kelompok perlakuan menggunakan lima ekor mencit.

Data dianalisis dengan analisis variansi, dan sebaran t-Student untuk menguji perbedaan antara dua rata-rata.

Uji NBT - sistim xantin/xantin oksidase

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode Nitroblue Tetrazolium (NBT) dengan *kit* pereaksi SOD seperti yang telah dilakukan oleh Murakami dkk. (1996). *Kit* tersebut mengandung lima pereaksi (R1-R5). R1 mengandung buffer fosfat 0,1 M dengan pH 8, xantin 0,40 mmol/l dan zat pembentuk warna nitroblue tetrazolium (NBT) dengan kadar 0,24 mmol/l. R2 mengandung enzim xantin oksidase 0,049 unit/ml. R3 mengandung buffer fosfat 0,1 M dengan pH 8 yang digunakan untuk melarutkan enzim. R4 merupakan pereaksi kontrol yang mengandung buffer fosfat 0,1 M pH 8. Sedangkan R5 adalah penghenti reaksi yang mengandung natrium dodesil sulfat 69 mmol/l.

Fraksi butanol dibuat sebagai larutan persediaan (LP) dengan konsentrasi 16 dan 32 mg/ml. Enzim dalam R2 diencerkan dengan R3 dengan perbandingan 1:100 (RE). Disediakan empat kelompok tabung Effendorf (T1 - T4) dan dilakukan prosedur pengujian sebagai berikut, pada suhu di bawah 10 °C. T1 (sampel) diisi 12,5 ml LP, 250 ml R1, dan 250 ml RE. T2 (blanko) diisi 12,5 ml DMSO, 250 ml R1, dan 250ml RE. T3 (sampel-blanko) diisi 12,5 ml LP, 250 ml R1, dan 250 ml R4. T4 (blanko-blanko) diisi 12,5 ml DMSO, 250 ml R1, dan 250 ml R4. Keempat tabung Effendorf tersebut serta R5 diinkubasi pada penangas air dengan suhu 37 °C selama 20 menit. Kemudian dilakukan pengukuran serapan cahaya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 560 nm. Pengujian tersebut dilakukan tiga kali.

Data dinilai dengan menggunakan rumus persen penghambatan reduksi NBT.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Efek fraksi butanol daun puspa terhadap frekuensi MNPCE

Seperti terlihat pada **Tabel 1** atau **Gambar 1**, rata-rata frekuensi MNPCE permil PCE pada kontrol, fraksi butanol dosis 300 dan 600 mg/kg masing-masing adalah $74,2 \pm 13,08$; $66,4 \pm 13,20$; dan $45,8 \pm 13,66$. Dengan demikian pemberian

fraksi butanol daun puspa dosis 300 dan 600 mg/kg masing-masing memberikan penurunan frekuensi MNPCE sebesar 10,51% dibandingkan terhadap kontrol. Dari hasil analisis statistik, dosis 600 mg/kg memberikan efek yang signifikan ($p < 0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa fraksi butanol daun puspa dapat menghambat efek mutagenik dari siklofosamid.

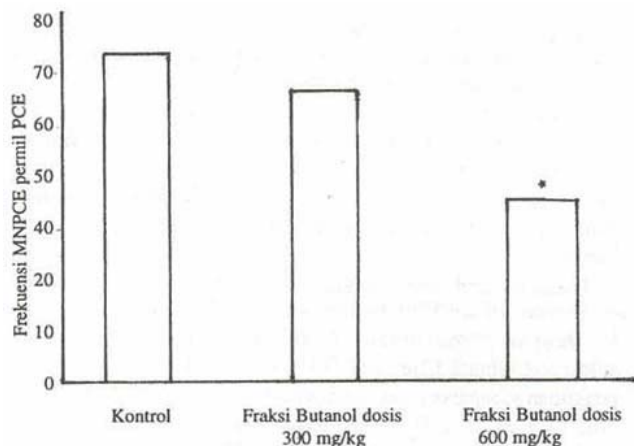
Tabel 1. Nilai rata-rata sel eritrosit polikromatik yang mengandung mikronukleus (MNPCE) untuk seluruh kelompok perlakuan.

Perlakuan	Dosis	PCE	MNPCE	MNPCE permil PCE Rata-rata \pm SD
Kontrol	-	000	371	74,2 \pm 13,08
Fraksi butanol	300	5000	332	66,4 \pm 13,20
Fraksi butanol	600	5000	229	45,8 \pm 13,66*

* Signifikan, dibandingkan terhadap kontrol ($p < 0,05$)

Tabel 2. Nilai penghambatan reduksi NBT pada pengujian aktivittis antioksidan berdasarkan serapan cahaya (A) rata-rata dari blanko (B1), blanko-blanko (B1-B1), sampel (S), dan sampel-blanko (S-B1) pada panjang gelombang (λ) 560 nm.

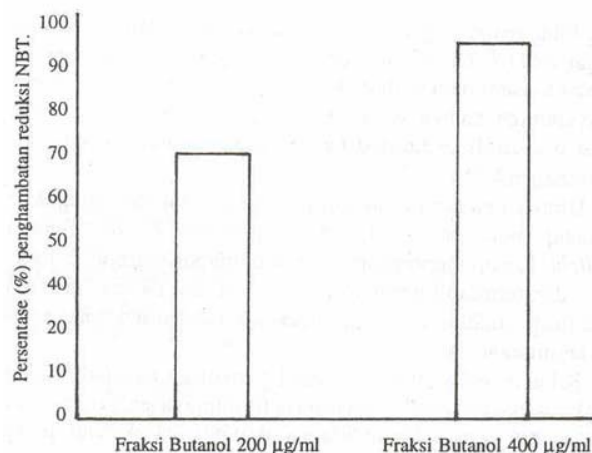
Konsentrasi fraksi butanol ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan cahaya rata-rata pada 1560 nm				Persentase penghambatan reduksi NBT
	A _{B1}	A _{B1-B1}	A _S	A _{S-B1}	
200	0,2840	0,1117	0,217	0,1630	68,66%
400	0,2840	0,1117	0,1647	0,1550	94,37%



Gambar 1. Grafik nilai rata-rata frekuensi sel eritrosit polikromatik bermikronukleus (MNPCE) untuk seluruh kelompok perlakuan pada pengujian aktivitas antimutagenik. (*Signifikan, dibandingkan terhadap kontrol ($P < 0,05$))

Menurut Czyzewska & Mazur (1995)⁽¹⁵⁾ siklofosamid menginduksi pembentukan mikronukleus melalui metabolit aktifnya yang bersifat pengalkilasi, yaitu mustard fosforamida, akrolein, dan 4-hidroksisiklofosamid. Senyawa pengalkilasi tersebut dapat berikatan dengan berbagai gugus fungsi komponen sel, termasuk terhadap basa-basa DNA. Selain itu dapat juga terjadi peristiwa pindah silang (*cross-linkung*) DNA.

Reaksi reaksi tersebut antara lain mengakibatkan patahan rantai DNA yang diduga menyebabkan terjadinya patahan kromosom dan dapat terlihat sebagai mikronukleus. Metabolisme siklofosamid juga dilaporkan menyebabkan peningkatan radikal anion superoksida dan hidroksil⁽¹⁶⁾ yang mungkin ikut berperan dalam menginduksi pembentukan mikronukleus. Senyawa aktif antimutagenik yang terdapat pada fraksi butanol daun puspa ini belum diketahui secara pasti, diduga termasuk ke dalam senyawa fenolik yang mekanisme aktivitas antimutageniknya mungkin berkaitan dengan aktivitas antioksidan⁽¹²⁾.



Gambar 2. Grafik nilai penghambatan reduksi NBT pada pengujian aktivitas antioksidan.

Efek fraksi butanol daun puspa terhadap reduksi NBT

Seperti terlihat pada **Tabel 2** atau **Gambar 2**, fraksi butanol daun puspa pada konsentrasi 200 dan 400 mg/ml mempunyai nilai persentase penghambatan reduksi NBT oleh superoksida dari reaksi enzimatis xantin dengan bantuan xantin oksidase masing-masing sebesar 68,66% dan 94,37%. Hasil ini menunjukkan bahwa fraksi butanol daun puspa mempunyai aktivitas antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD).

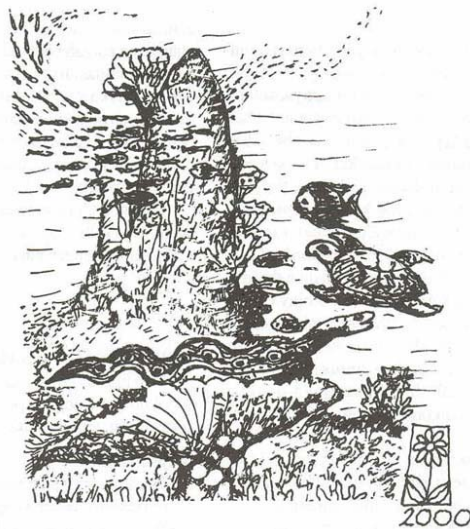
KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengujian mikronukleus secara *in vivo* dan pengujian NBT secara *in vitro*, diambil kesimpulan bahwa fraksi butanol daun puspa mempunyai aktivitas antimutagenik dan antioksidan.

KEPUSTAKAAN

- Moutschen, J. Introduction to Genetic Toxicology. New York : John Wiley & Son; 1985.
- Mulyadi. Kanker, Karsinogen, Karsinogenesis dan Antikanker. Edisi I. Yogyakarta: PT. Tiara Wacana; 1996.
- Schmid, W. The micronucleus test. Mutation Res. 1975; 31, 9-15.
- Wild, D. Cytogenetic effects in the mouse of 17 chemical mutagens and carcinogens evaluated by the micronucleus test 1978; 56 : 319-27.
- Ghaskadbi, S., Rajmachikar S, Agate C, Kapadi AH., Vaidya VG. Modulation of cyclophosphamide mutagenicity by vitamin C in the vivo rodent micronucleus assay. Teratogenesis, Carcinog. Mutagen 1992; 12, 11-3.
- Kong Z, Liu Z, Ding B. Study on the antimutagenic effect of pine needle extract. Mutation Res. 1995; 347, 101-4.7.
- Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease : curiosity,

- cause, or consequence? *Lancet*, 1994; 344 : 721-4
8. Shiraki M, Hara Y, Osawa T, Kumon H, Nakayama T, Kawakishi S. Antioxidative and antimutagenic effect of theaflavin from black tea. *Mutation Res.* 1994; 323 : 29-34.
 9. Rompelberg CJM, Stenhuis WH, de Vogel N, van Osenbruggen WA, Schouten A, Verhagen H. Antimutagenicity of eugenol in the rodent bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.* 1995; 346 : 69-75.
 10. Heyne K. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jilid III. Jakarta: Yayasan Sarana Wana Jaya. 1987; 1367.
 11. Koshimizu K, Murakami A, Hayashi H, Ohigashi H, Subarnas A, Gurmaya KJ, Ali AM. Biological activities of edible and medicinal plant from Indonesia and Malaysia 1998; submission, to publication.
 12. Pramana N. Aktivitas Antimutagenik Ekstrak Metanol Daun Pusp (Schima wallicii Korth.) dan Fraksi-fraksinya dengan uji Mikronukleus pada Tikus Wistar. Skripsi. Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Padjadjaran Bandung 1998.
 13. Gollapudi B, Kamra OP. Application of a simple Giemsa-staining method in the micronucleus test. *Mutation Res.* 1979; 64, 45-6.
 14. Murakami A, Ohura S, Nakamura Y, Koshimizu K, Ohigashi H. l'-acetoxychawicol acetate, a superoxide anion generation inhibitor, potently inhibits tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol - 13-acetate in ICR mouse skin. *Oncology* 1996; 53 : 389-91.
 15. Czyzewska A, Mazur L. Suppressing effect of WR-2721 on micronuclei induced by cyclophosphamide in mice. *Teratogenesis, Carcinog. Mutagen* 1995; 15 : 109-14.
 16. Ramu K, Perry CS, Ahmed T, Pakenham G, Kehrer JP. Studies on the basis for the toxicity of acrolein mercapturates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996; 140 : 487-98.
 17. Wagner H, Lacaille-Dubois MA. Recent pharmacological results on bioflavonoids. In S. Antus, M. Gabor & K. Vetschera (Eds) : *Flavonoids and bioflavonoids*. Vienna : 9th Hungarian Bioflavonoids Symposium 1995; 53-7.



*70% terumbu-karang di Indonesia rusak
40% rusak berat.
Tinggal sekitar 7% yang masih sangat bagus.
Semua karena :
- ketidak tahuan manusia dan
- kerakusan ulah manusia !*