

Efek Mutagenik Ekstrak Etanol Daun Kembang Sungsang (*Gloriosa superba* L.)

Dian Sundari¹, Pudjiastuti²

¹Pusat Penelitian dan Pengembangan Gizi dan Makanan

²Pusat Penelitian Biomedis dan Farmasi

email: dian@litbang.depkes.go.id

Abstract

*Efficacy of a plant can be caused by chemical compounds contain, on the other hand can cause toxic effects. Toxic effects of chemicals can be defined as the potential of chemicals to poison the bodies of people who are exposed. kembang sungsang (*Gloriosa superba* Linn.) including Colchicaceae families. Plants used empirically for treatment of Gout, diuretic, rheumatism, etc. Mutagenicity is a test to determine the possibility of compounds are mutagens. To see if these plants have the effect of mutagens, mutagenicity tests performed 70% ethanol extract of the leaves kembang sungsang. Mutagenicity studies conducted by the Ames method using five test bacterial strains that have been transferred are: *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 and *Escherichia coli* WP2uvrA with and without metabolic activator S-9. The dose tested was 125, 250, 500, 1000, and 2000 μ l / plate. As a negative control was DMSO solution of 100 μ l / plate. The results showed that the mutagenic test 70% ethanol extract of leaves Kembang sungsang. with the addition aktivator without the addition of S-9 did not have the effect of mutagens.*

Key Words: *Kembang sungsang (*Gloriosa superba* Linn.) Leaf extract, mutagenic activity*

Pendahuluan

Evaluasi keamanan suatu bahan kimia dilakukan melalui serangkaian uji toksisitas guna mendeteksi adanya efek toksik yang merugikan. Efek toksik atau toksisitas suatu bahan kimia dapat didefinisikan sebagai potensi bahan kimia untuk meracuni tubuh orang yang terpapar. Potensi bahan kimia untuk dapat menimbulkan efek negatif terhadap kesehatan terutama tergantung pada toksisitas bahan kimia itu sendiri dan besarnya paparan yang diperolehnya.¹

Jenis efek toksik yang ditimbulkan oleh suatu bahan alam/simplisia dipengaruhi oleh sifat toksisitas instrinsik

senyawa kimia yang terkandung di dalamnya. Untuk mengetahui suatu senyawa kimia berefek merugikan, perlu dilakukan serangkaian uji toksisitas yang salah satunya adalah uji mutagenisitas. Uji mutagenisitas merupakan uji untuk mengetahui kemungkinan adanya senyawa yang bersifat mutagen. Mutagen adalah faktor-faktor yang dapat menginduksi mutasi gen atau kromosom dan dapat mempengaruhi kesehatan bila intensitas pemaparannya cukup tinggi, sehingga akan dapat memberikan sifat genotoksik.^{1,2,3}

Tanaman Kembang Sungsang (*Gloriosa superba* L.) termasuk famili Colchicaceae. Penggunaan empiris tana-

man antara lain sebagai pengobatan gout, diuretik, reumatik dll. Seluruh bagian tanaman ini mengandung alkaloid yang disebut colchicin dan gloriosin dan paling banyak ditemukan pada bagian umbi.¹ Khasiat suatu tanaman dapat disebabkan karena senyawa kimia yang terkandung didalamnya, dan disisi lain dapat menyebabkan efek toksik.^{3,4,5} Penelitian uji toksisitas akut (LD₅₀) dari ekstrak etanol 70% daun Kembang Sungsang telah dilakukan. Hasil uji tersebut didapat nilai toksisitas akut (LD₅₀) adalah 4,579 (3,6375 – 5,5765) mg/10g bb. i.p mencit atau 32053 (25462,5 – 390355.5) mg/kg bb oral tikus, sehingga bahan termasuk golongan “*Practically Non Toxic*”.⁶ Sedangkan pengaruh terhadap organ sampai dengan pemberian selama 104 hari pada dosis 21,50 mg dan 14,35 mg/100g bb tidak berpengaruh terhadap semua organ yang diperiksa (tidak ditemukan kelainan pada organ). Untuk melihat apakah ekstrak etanol 70% daun Kembang sungsang ini mempunyai efek mutagen, maka dilakukan uji mutagenisitas dengan metode Ames. Pengujian menggunakan lima galur bakteri uji yang telah dimutasikan yaitu: *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 dan *Escherichia coli* WP2uvrA dengan dan tanpa aktivator metabolik S-9.²

Metode

Bahan Uji

Bahan uji adalah daun Kembang Sungsang yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan obat Tradisional, Tawangmangu, Jawa Tengah. Daun dicuci bersih kemudian dikeringkan dalam oven dengan panas tidak lebih dari 40^o C. Setelah kering kemudian diserbuk dan diayak dengan ayakan Mesh No.50. Pembuatan ekstrak etanol 70% dilakukan dengan cara perkolasi.⁷ Untuk uji mutagenik digunakan bakteri *Salmonella thyphimurium* TA

98, TA 100, TA 1535, TA 1537 dan *Escherichia coli* WP2 uvrA. Media bakteri yang digunakan adalah Media bakteri nutrient broth (Oxoid), agar Oxoid, bacto agar, glukosa, natrium klorida, dikalium hipofosfat, magnesium klorida, kalium klorida, histidin, triptofan, glukosa-6-fosfat, β-NADH, β-NADPH.

Cara Kerja

a) Penyiapan Bahan Uji

Ekstrak etanol 70% daun Kembang sungsang ditimbang secara aseptis dalam wadah steril, dilarutkan dalam dimetil-sulfoksida (DMSO) hingga didapatkan konsentrasi tertentu, kemudian disterilisasi dengan sinar UV selama 30 detik. Dosis ekstrak daun Kembang sungsang yang diuji adalah 125, 250, 500, 1000, dan 2000 µl/ lempeng. Sebagai kontrol negatif digunakan larutan DMSO 100 ul/lempeng. Uji mutagenik terdiri dari 2 tahap yaitu: tahap uji pendahuluan dan tahap uji utama.

b) Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan guna mendapatkan dosis yang memberikan jumlah koloni revertan terbesar dengan menggunakan satu galur bakteri uji yaitu *Salmonella typhimurium* TA 100 dengan dan tanpa penambahan campuran aktivator S-9.

c) Uji Utama

Uji utama menggunakan dosis ekstrak daun Kembang sungsang yang dapat memberikan jumlah koloni revertan terbesar yang diperoleh pada uji pendahuluan. Dosis yang diperoleh dilarutkan dalam larutan DMSO secara bertingkat, dan diujikan pada 5 galur bakteri uji yaitu *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 dan *Escherichia coli* WP2 uvrA.

Disiapkan sejumlah biakan agar semalam dengan kepekaan 1-2 x 10⁹

sel/ml dari masing-masing bakteri uji, campuran aktivator S-9 yang berisi glukosa 6-fosfat, β -NADPH, kalium klorida, magnesium klorida, dapar fosfat dan S-9, lempeng agar dalam cawan petri steril serta sejumlah agar cair yang ditambah histidin, biotin dan triptopan sesaat sebelum pengujian dilakukan. Kontrol positif adalah: 2-aminoantrasena, 2-(2-furil)-3-(5-nitro-2-furil) akrilamida dan activator metabolik S-9, yaitu ekstrak hati tikus galur Spraque-Dawley jantan yang sebelumnya telah diinduksi dengan natrium fenobarbital dan β -naftoflavon.

Ke dalam beberapa tabung reaksi, masing-masing dimasukkan ekstrak 70% daun Kembang sunngsang dari masing-masing dosis; 0,5 ml campuran S-9 (0,5 ml larutan dapar fosfat pH 7,4 untuk pengujian tanpa campuran S-9) dan 0,1 ml biakan semalam bakteri bakteri uji segar, kemudian diinkubasikan dalam penangas udara dan pengocok pada suhu 37^o C selama 20 menit. Setelah itu ke dalam setiap tabung ditambahkan 2 ml agar atas dengan suhu 45^o C dan dihomogenkan dengan alat Vortex, kemudian disebarakan secara merata pada lempeng agar, dibiarkan pada suhu kamar selama lebih kurang 1 jam dan diinkubasi pada suhu 37^o C selama 48 jam. Untuk kontrol negatif digunakan pelarut DMSO dan kontrol positif digunakan beberapa

senyawa mutagen pembanding yang sesuai untuk masing-masing bakteri uji. Dilakukan uji secara simultan dengan cara yang sama seperti pada kelompok sediaan uji. Jenis senyawa mutagen pembanding yang digunakan seperti tertera pada Tabel 1.

Setelah selesai masa inkubasi koloni revertan bakteri yang tumbuh pada setiap lempeng agar dihitung dicatat dan dibuat tabel. Potensi mutagenik ekstrak daun Kembang sunngsang ditetapkan dengan membandingkan jumlah koloni revertan pada lempeng uji dengan jumlah koloni revertan pada lempeng kontrol negatif. Hasil uji dinyatakan positif apabila diperoleh hubungan dosis-respon pada sekurang-kurangnya tiga dosis uji dan jumlah koloni revertan pada dosis uji paling tidak dua kali revertan kontrol negatif.

Hasil

Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan dosis ekstrak etanol 70% daun kembang sunngsang yang dapat memberikan jumlah koloni revertan terbesar. Pengujian menggunakan satu galur bakteri uji yaitu *Salmonella thypimurium* TA 100 tanpa penambahan campuran S-9. Jumlah koloni revertan tiap lempeng dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Senyawa Mutagen Pembanding Untuk Bakteri Uji

Bakteri uji (\pm)S-9	TA 100	TA 98	TA 1535	TA 1537	WP2 uvrA
Tanpa (-) S-9	AF - 2 (0,02 ug)	AF - 2 (0,05 ug)	ENNG (3 ug)	9AA (80 ug)	AF - 2 (0,022 ug)
Dengan (+) S-9	2 AA (2 ug)	2 AA (2 ug)	2 AA (2 ug)	2 AA (2 ug)	2 AA (2 ug)

Keterangan :

2 AA : 2 Aminoantrasena

9 AA : 9 Aminiakridina

ENNG : N-etil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin

AF - 2 : 2-(2-Furil)-3-(5nitro-2-furil)akrilamida.

Tabel 2. Jumlah Koloni Revertan Tiap Lempeng

Konsentrasi Zat Uji ($\mu\text{g}/\text{lempeng}$)	Jumlah Koloni Revertan Per Lempeng		
	X_1	X_2	X rata-rata
DMSO (kontrol -)	75	87	81
250	89	85	87
500	91	90	91
1000	65	78	72
2500	81	80	81
5000	68	68	68
10000	54	58	56
AF2 0,02 (kontrol +)	820	828	824

Keterangan : AF – 2 : 2-(2-Furil)-3-(5nitro-2-furil)akrilamida.

**Tabel 3. Hasil Uji Mutagen Ekstrak Etanol 70% Daun
Kembang Sungsang (*Gloriosa superba* L.)**

Aktivasi Metabolik	Konsentrasi Zat Uji ($\mu\text{g}/\text{lempeng}$)	Rata-Rata Jumlah Koloni Revertan Per Lempeng				
		Mutasi Substitusi Pasangan Basa			Mutasi Pergeseran Kerangka	
		TA 100	TA 1535	WP ₂ uvr	TA 98	TA 1537
S-9 (+)	Kontrol negatif	136	15	27	43	13
	125	140	17	46	52	10
	250	139	15	46	44	10
	500	131	16	43	44	9
	1000	154	14	50	43	12
	2000	117	12	47	35	9
S-9 (-)	Kontrol negatif	84	13	27	22	11
	125	101	16	31	27	13
	250	91	13	26	29	14
	500	100	13	31	29	10
	1000	105	14	33	37	13
	2000	86	18	28	39	11
Kontrol Positif (+) S9	Nama	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Konsentrasi ($\mu\text{g}/\text{lempeng}$)	2	2	20	2	2
	Jumlah koloni/lempeng	1372	173	290	826	193
Kontrol Negatif (-) S9	Nama	AF ₂	ENNG	AF ₂	AF ₂	9AA
	Konsentrasi ($\mu\text{g}/\text{lempeng}$)	0.02	3	0.02	0,05	80
	Jumlah koloni/lempeng	824	146	339	359	279

Penilaian hasil uji mutagenesitas dengan metode mutasi balik (Metode Ames) menggunakan bakteri dimana zat uji dipaparkan dalam beberapa tingkat dosis dengan dan tanpa penambahan system aktivasi metabolik, kemudian ditanamkan pada lempeng agar khusus dan diinkubasikan selama waktu tertentu. Setelah masa inkubasi selesai jumlah koloni revertan dihitung dan dibandingkan terhadap jumlah koloni revertan spontan pada lempeng kontrol.

Hasil uji utama terlihat jumlah koloni yang dihasilkan oleh bakteri TA 100, TA 98, TA 1535, TA 1537 dan WP2 uvr dalam lempeng kontrol negatif dan kontrol positif baik dengan penambahan S-9 dan tanpa S-9, masih dalam rentang data pengujian yang dihasilkan di beberapa laboratorium sehingga berdasarkan data tersebut semua galur bakteri dianggap masih valid digunakan untuk pengujian. Parameter adanya efek mutagenik ditunjukkan dengan adanya jumlah koloni revertan sediaan uji paling sedikit harus mencapai dua kali jumlah revertan kontrol negatif dan menunjukkan adanya dosis respon sekurang kurangnya pada tiga dosis. Dari hasil pengujian yang ditunjukkan pada Tabel 3. Terlihat bahwa jumlah revertan bakteri yang dihasilkan pada sediaan lempeng bahan uji dari semua dosis yang diberikan menunjukkan hasil yang lebih kecil dari jumlah revertan yang dihasilkan oleh kontrol negatif, walaupun ada yang lebih besar tidak melebihi 3 kali kontrol negatif. Dengan demikian pada hasil uji mutagenitas dari ekstrak daun Kembang sunsang dengan dan tanpa penambahan aktifator S-9 tidak mempunyai efek mutagen.

Pembahasan

Penilaian efek mutagen didasarkan pada sistim mutasi balik menggunakan 5 galur bakteri uji yang telah dimutasikan dengan cara pergeseran

kerangka dan perubahan pasangan basa DNA, untuk mendeteksi kemungkinan adanya efek mutagenik pada bahan uji. Bakteri *Salmonella thypimurium* TA98 dan TA1537 digunakan untuk mendeteksi kemungkinan adanya mutasi pergeseran kerangka, sedangkan bakteri TA 100, TA1535 dan *Escherichia coli* WP2 uvrA untuk mendeteksi kemungkinan adanya mutasi pasangan basa. Penambahan aktivator metabolik S-9 bertujuan untuk mengetahui apakah efek mutagenik disebabkan oleh metaboliknya.

Dari hasil uji mutagen ekstrak etanol 70% daun kembang sunsang terlihat bahwa koloni revertan yang dihasilkan tidak lebih besar dari jumlah koloni revertan kontrol negatif dan tidak terlihat adanya hubungan dosis dan efek. Dari hasil penelitian untuk toksisitas akut menunjukkan bahwa LD₅₀ infus daun kembang sunsang mempunyai harga 5,53(2,94 – 10,39) mg/10 g bb. mencit ip dan LD₅₀ ekstrak etanol 70 % adalah 4,579 (3,6375 - 5 5765) mg/10g bb. mencit ip. Kedua nilai ini berdasarkan batasan Gleason masuk dalam golongan bahan "*Practically Non Toxic*" artinya infus dan ekstrak daun kembang sunsang tidak bersifat toksik dan aman digunakan.⁶

Dengan demikian berdasarkan metode Ames masing-masing ekstrak menghasilkan efek mutagen negatif. Mengingat titik akhir efek mutagenik disamping adanya perubahan DNA juga adanya kerusakan kromosom maka perlu dilakukan pula uji abrasi kromosom secara in vitro dan uji mikronukleus secara in vivo sebagai skrining sekunder.

Kesimpulan

Hasil penelitian uji mutagenitas menggunakan metode Ames terhadap ekstrak etanol 70% daun kembang sunsang tidak menunjukkan adanya efek mutagenik.

Daftar Rujukan

1. Satmoko Wicaksono, Efek Toksik dan Cara Menentukan Toksisitas Bahan Kimia; Direktorat Pengawasan Nazaba, Ditjen POM, Departemen Kesehatan RI, Jakarta Cermin Dunia Kedokteran No. 135, 2002.
2. Maron, D.M.B.N., Ames Resived methods for Salmonella Mutagenity Test Mutation Res. 113, 1983.
3. Mutschler, Ernest., Arzneimittelwirkungen, 5 vollig neubearbeitete und erweiterte Auflage. (1991) Dinamika Obat. Buku ajar Farmakologi dan Toksikologi diterjemahkan oleh Mathilda B, Anna Setiadi Ranti. Penerbit ITB Edisi ke 5.
5. L.S. de Padua, N Bunyapraphatsura, R.H. J Lemmens. Resources of South East Asia No.12(1). Prosea Foundation Bogor. 289 – 292., 1999
6. DepKes RI., Materia Medika Indonesia Ditjen POM . Departemen Kesehatan RI., 1995.
7. Pudjiastuti dkk. : Penelitian pengembangan daun kembang sunsang (*Gloriosa superba* L.) kearah fitofarma gout (Hiperurisemia). Laporan Akhir Pulitbang Farmasi dan OT, Badan Litbang Kesehatan Departemen Kesehatan RI.,2003.
8. Anonim, Parameter Standart Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Ditjen POM Departemen Kesehatan RI, 2000
9. Murray. R.K. MD.Ph. D., Biokimia Herper Edisi 24. Penerbit buku Kedok teran. 1995.
10. WHO, Research Guidelines for Evaluation the Safety and Efficacy of Herbal Medicinal, Manila.,1993.
11. Hayes, A.W., Principles and Methods of Toxicology, Raven Press, Book Ltd. New York, 1984 dalam Prosedur Operasional Baku Toksisitas, Pusat Pemeriksaan Obat dan Makanan, 1991.