

UJI MUTAGENESIS DAN KARAKTERISASI BATANG BROTOWALI (*Tinospora tuberculata*)

D. Mutiatikum, Mariana Raini, Pudji Lastari*

Abstract

The safety evaluation of medicinal plant should be carried out by means of a series of toxicity assessment including mutagenic test. Mutagenic test is required to find out the existence of mutagenic compound in this plant. The research had been done, using 50% ethanol extract of Tinospora tuberculata, with Ames method based on reverse mutagen system. Five strain of mutated bacteria ie : Salmonella typhi TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 and E. coli WP2 uvr A with and without S-9 metabolic activator were tested. The characterized of simplisia and extract Tinospora tuberculata were previously determined including TLC, Densitomeri and GC.

The result showed that in this study condition there is no evidence of mutagenic effect.

Key words : Mutagen, characterization, Tinospora tuberculata

Pendahuluan

Evaluasi keamanan terhadap obat tradisional sangat diperlukan, khususnya untuk obat tradisional yang mengandung senyawa analog dengan senyawa mutagen yang banyak digunakan sebagai komponen jamu dan digunakan dalam jangka panjang. Senyawa mutagen dapat menyebabkan terjadinya mutasi gen, sehingga dapat terjadi kerusakan yang serius seperti kelainan fetus, teratogenik bahkan kanker setelah terjadi pemaparan dalam jangka waktu lama.^{1,2} Bahaya mutagenesis tidak diragukan lagi. Beberapa penyakit bawaan diduga berkaitan dengan aberasi kromosom serta mutagenesis dapat berguna pada penelitian etiologi penyakit biasa seperti misalnya diabetes melitus, epilepsi, skizofrenia, hipertensi essensial, katarak, penuaan, penyakit jantung dan kanker tertentu.¹

Uji mutagenesis pada tahun-tahun belakangan ini telah banyak dipergunakan karena nilainya sebagai suatu penyaring cepat untuk karsinogenisitas, terutama karena munculnya fakta bahwa 85% senyawa mutagen bersifat karsinogen.² Informasi adanya efek mutagen dari obat tradisional sangat diperlukan, khususnya untuk obat tradisional yang mengandung senyawa analog dengan senyawa mutagen yang banyak digunakan sebagai komponen jamu.

Batang brotowali (*Tinospora tuberculata* L. niers) dari famili Minispermeae, mengandung senyawa pikroretosid, alkaloid, palmatin, berberin, kolembin dan lain lain. banyak digunakan sebagai vermifuga, penyembuh luka, antipiretik dan mempunyai efek bakteriostatik terhadap *S. aureus* dan *E.coli*, sehingga diduga senyawa yang dikandung termasuk zat aktif biologis. Data uji toksisitas sub kronik belum ada, meskipun pada uji toksisitas akut oral tikus termasuk golongan *Practically non toxic* .

Uji mutagenesis dengan metode Ames merupakan uji skrining primer untuk mendeteksi adanya efek mutagenesis dengan menggunakan lima galur bakteri uji dan mengingat toksisitas suatu simplisia dipengaruhi oleh cemaran dan kandungan zat aktif dalam tanaman, maka dalam penelitian ini juga akan dilakukan standarisasi simplisia dan ekstrak secara fisik dan kimia termasuk penetapan *Finger Print* dengan menggunakan TLC dan Densitometer.

Bahan dan Cara

Bahan

Simplisia tanaman obat yang diteliti diperoleh dari Tawangmangu dengan spesifikasi sebagai berikut : Tanaman *Tinospora tuberculata* L, simplisia bagian batang, tempat kultivasi dengan jenis tanah Grumosol, pH netral, cuaca

* Puslitbang Pemberantasan Penyakit

rata-rata suhu maksimum 33°C, suhu minimum 24°C. curah hujan 2350 mm/th, kelembaban 87%, umur tanaman lebih kurang 6 tahun dengan ketinggian tempat 80 m dpl.

Bahan Uji

Alkohol 95%, alkohol 70%, alkohol 50%, air, asam asetat, kloroform, etil asetat, heksan, vanilin sulfat dari E Merk, larutan besi klorida (III) 1%, formaldehid, asam klorida, amonia 25%, asam sulfat pekat, asam dinitrobenzoat 2% dalam etanol, larutan NaOH 1 N, pereaksi Mayer dan pereaksi Dragendorf.

Bahan Uji Mutagen

Biakan murni *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 diperoleh dari DR Bruce N. Ames, University of California, Berkley USA dan *Escherichia coli* WP2 uvr A diperoleh dari National Institute of Hygienic Sciences, Tokyo, Japan.

Media bakteri nutrient broth (Oxoid), agar Oxoid, bacto agar, glukosa, natrium klorida, L-histidin HCl, L- triptofan, D- biotin, natrium hidroksida, magnesium sulfat, asam sitrat, dikalium hipofosfat, natrium amonium fosfat, dinatrium hipofosfat, magnesium klorida, kalium klorida, dimetilsulfoksida, glukosa- 6- fosfat, B-NADH, B-NADPH; kontrol positif : 2-aminoakridina, 9- aminoakridina, 2- aminoantrasena, N- etil- N- nitrosoguanidina, 2-(2- furil)-3- (5-nitro-2-furil) akrila-mida; dan aktivator metabolik S-9 yang diperoleh dari PPOM, yaitu ekstrak hati yang dibuat dari hati tikus galur Sprague-Dawley jantan yang sebelumnya telah diinduksi dengan natrium fenobarbital dan B- naftoflavon.

Alat

Perkolator, evaporator, tangas air, mikropipet, inkubator, alat penghitung koloni, cawan petri, pipet mikro, alat vortex, inkubator dan seperangkat alat kromatografi lapis tipis, seperangkat alat kromatografi gas, densitometer, lampu uv, seperangkat alat kromatografi cair kinerja tinggi

Cara Karakterisasi Simplisia (Menurut cara MMI)

Penetapan kadar air, kadar abu, kadar abu larut air, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut dalam air, kadar sari yang larut dalam etanol,

golongan senyawa kimia (tanin, flavonoid, turunan kinon, saponin, steroid, terpenoid, alkaloid)

Karakterisasi Ekstrak (Menurut Cara POM)

Penetapan kadar air ekstrak, susut pengeringan, kadar minyak atsiri ekstrak, kadar sisa etanol (dengan GC), pola kromatogram (*Finger print*) TLC densitometri, penetapan kadar senyawa aktif.

Uji Mutagenesis

Uji Pendahuluan

Untuk menentukan dosis uji yang akan digunakan pada uji utama dilakukan uji pendahuluan, menggunakan satu galur bakteri uji yaitu *Salmonella typhimurium* TA 100 dengan dan tanpa penambahan campuran S-9.

Uji Utama (Metode Ames)

Dosis uji ditentukan berdasarkan data hasil uji pendahuluan yaitu dosis yang memberikan jumlah koloni revertan terbesar. Sebagai kelompok kontrol negatif digunakan pelarut sediaan uji, dan kontrol positif digunakan beberapa senyawa mutagen pembanding yang sesuai untuk masing-masing bakteri uji, diuji secara simultan dengan cara yang sama seperti pada kelompok sediaan uji. Setelah selesai masa inkubasi, koloni revertan bakteri yang tumbuh pada setiap lempeng agar dihitung, dicatat dan dibuat tabel. Potensi mutagenik sediaan uji 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 dan Pembahasan

Determinasi simplisia secara makroskopis batang brotowali, potongan batang berwarna hijau kecoklatan, permukaan tidak rata, bertonjolan, beralur-alur membujur, lapisan luar mudah terkelupas.

Hasil penetapan kadar air 6,50% (syarat MMI $\leq 10\%$), kadar abu 8,51% (syarat MMI $\leq 7,2\%$), kadar abu larut air 4,27%, kadar abu tidak larut asam 0,37% (syarat MMI $\leq 0,9\%$), kadar sari larut air 14,0% (syarat MMI $\geq 15,4\%$), dan kadar

sari larut etanol 2,7% (syarat MMI \geq 4,4%). Kadar abu dan kadar sari larut etanol tidak memenuhi syarat MMI hal ini mungkin disebabkan penanganan pasca panen dengan tidak mencuci bagian tanaman diambil sehingga debu yang melekat pada bagian tanaman masih terbawa sampai pada proses pembuatan simplisia. Reaksi penggolongan senyawa kimia dari batang brotowali yang positif adalah golongan alkaloid. Hasil rendemen ekstrak kental brotowali dalam etanol 50% adalah 20,25%. Hasil standarisasi ekstrak batang brotowali meliputi; penetapan kadar sisa etanol dalam ekstrak 0,00%, penetapan kadar air ekstrak 23,18%, penetapan susut pengeringan 20,54%, penetapan bobot jenis 1,1418, penetapan senyawa terlarut dalam pelarut air 80,12% dan penetapan senyawa terlarut dalam pelarut etanol 11,34%, penetapan minyak atsiri minyak menguap ekstrak brotowali negatif, penetapan kadar total alkaloid dalam ekstrak brotowali tidak dilakukan karena tidak ada zat perbandingan, sedangkan penetapan profil komponen utama KLT, harga Rf, bercak noda dan kromatogram KLT-Densitometer dari 3 fraksi dapat dilihat pada tabel dan gambar dibawah ini. Standarisasi ekstrak diperlukan untuk menentukan keberulangan pada penggunaan selanjutnya supaya sama, terutama pada komponen utama dengan melihat "Finger print" zat tersebut. Pada penetapan kadar sisa etanol harus 0,00% karena untuk uji farmakologi dan uji mutagenisitas akan mempengaruhi pada waktu pengujian dan meningkatkan toksisitasnya.

Uji mutagenisitas dilakukan dengan sistem mutasi balik menggunakan lima galur bakteri uji yang telah dimutasikan berdasarkan pergeseran kerangka perubahan pasangan basa DNA, untuk mendeteksi kemungkinan adanya efek mutagenik. Data percobaan jumlah koloni revertan dari setiap bakteri uji pada masing-masing lempeng kontrol negatif, kontrol positif, dan sediaan uji dengan dan tanpa penambahan campuran aktivitas metabolik (S-9) seperti tertera pada tabel 3 dan gambar 3. Jumlah koloni revertan yang dihasilkan oleh masing-masing galur bakteri TA 100, TA 98, TA 1538, TA 1537 dan WP2 *uvrA* dalam lempeng kontrol negatif dan kontrol positif dengan dan tanpa S-9 masih dalam rentang data pengujian rutin yang dihasilkan dilaboratorium (tabel 3). Sehingga berdasarkan data tersebut semua galur bakteri uji dianggap masih valid digunakan untuk pengujian.

Dari data percobaan yang diperoleh, jumlah revertan yang dihasilkan oleh masing-masing galur bakteri pada lempeng sediaan uji dari setiap dosis, hampir semuanya memberikan jumlah revertan yang lebih kecil, bila dibandingkan terhadap jumlah koloni revertan yang dihasilkan oleh lempeng kontrol negatif. Untuk menetapkan adanya efek mutagenik koloni revertan sediaan uji paling sedikit harus mencapai dua kali revertan kontrol negatif dan menunjukkan adanya dosis respon sekurang-kurangnya pada tiga dosis. Berdasarkan data dari hasil penelitian tersebut efek mutagenik ekstrak batang brotowali adalah negatif, baik dengan maupun tanpa aktivator metabolik S-9.

Tabel 1. Harga Rf Profil Kromatografi KLT Fraksi Heksan, Etilasetat Dan Etanol

Urutan Bercak	H Rf fraksi heksan				H Rf fraksi etil asetat				H Rf fraksi etanol			
	254	warna	365	warna	254	warna	365	warna	254	warna	365	warna
1	0,71	UM	0,86	BFI	0,91	UM	0,90	BFI	0,96	UT	0,94	BHK
2	0,42	UM	0,57	HBFI	0,87	UT	0,83	KH	0,77	UT	0,89	BH
3	0,33	UT	0,38	HBFI	0,78	UM	0,79	K	0,70	UT	0,87	BFI
4	0,28	UT	0,20	HBFI	0,73	UT	0,50	BFI	0,52	UT		
5	0,21	UT			0,41	UM	0,33					
6	0,11	UT			0,37	UM						
7	0,06	UT			0,31	UT						
8					0,27	UT						
9					0,24	UT						

Keterangan : UM = ungu muda

UT = ungu tua

BFI = biru fluoresensi

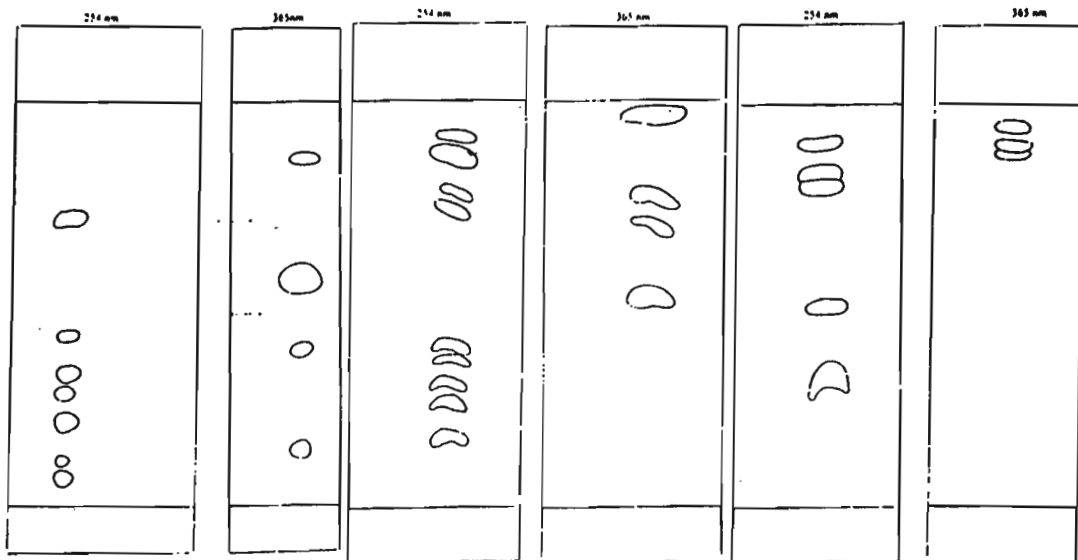
HBFI = hijau biru fluoresensi

K = kuning

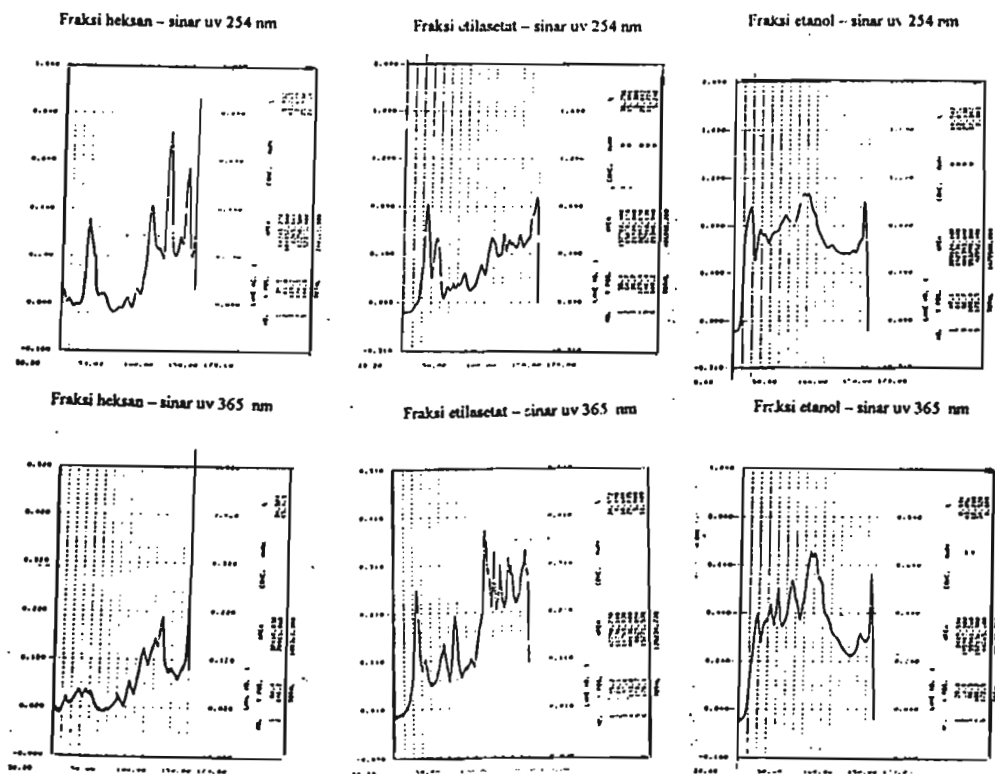
KH = kuning hijau

BH = biru hijau

Gambar 1. Profil Kromatogram KLT Fraksi Heksan, Etil Asetat dan Etanal Ekstrak Batang Brotowali



Gambar 1. Profil Densitometer KLT Fraksi Heksan, Etil Asetat dan Etanal Ekstrak Batang Brotowali



Tabel 2. Data Pengujian Rutin Kontrol Negatif dan Kontrol Positif pada Beberapa Bakteri uji di Laboratorium

Galur	Kontrol Negatif		Kontrol Positif	
	(-) S-9	(+) S-9	(-) S-9	(+) S-9
TA 98	11,0 ± 2,45	23,25 ± 8,54	135,25 ± 62,32	1532,50 ± 746,64
TA 100	156,58 ± 64,45	163,25 ± 28,9	1343,30 ± 1030,47	1813,00 ± 529,69
TA 1535	11,67 ± 5,12	12,71 ± 4,97	467,50 ± 383,46	200,75 ± 96,02
TA 1537	3,66 ± 0,58	17,75 ± 5,25	578,75 ± 153,62	108,30 ± 57,81
WP2 uvr A	16,50 ± 4,20	17,75 ± 5,25	335,75 ± 244,91	811,50 ± 400,9

Tabel 3. Jumlah Koloni Revertan Bakteri Uji Mutagenisitas Ekstrak Batang Brotowali

(±) S9	KONSENTRASI ZAT UJI (ug/lempeng)	JUMLAH KOLONI REVERTAN PER LEMPENG									
		MUTASI SUBSTITUSI PASANGAN BASA						MUTASI PERGESERAN KERANGKAN			
		TA 100		TA 1535		WP 2 uvr		TA 98		TA 1537	
		X rata2	deviasi	X rata2	deviasi	X rata2	deviasi	X rata2	deviasi	X rata2	deviasi
(+) S9	Kontrol negatif	151	7,071	19	2,828	18	1,414	38	5,657	14	2,828
	625	214,5	2,121	11	1,414	28,5	7,778	95,5	6,364	10,5	2,121
	1250	189,5	0,707	10,5	2,121	33,5	3,536	85	4,243	7,5	0,707
	2500	197	14,142	12,5	0,707	27,5	4,950	81	2,828	7	4,243
	5000	132,5	6,364	11,5	2,121	30	2,828	94	14,142	11	2,828
	10000	184	9,899	8,5	0,707	24	1,414	77,5	7,778	9	2,828
(-) S9	Kontrol negatif	150,5	4,950	7,5	2,121	16	1,414	19	4,243	9	1,414
	625	122,5	4,950	9,5	3,535	15	5,657	15	1,414	5	1,414
	1250	131,5	6,364	24	4,243	17,5	2,121	24	4,243	9	5,657
	2500	131	5,657	26,5	4,950	24	7,074	26,5	4,950	8,5	3,535
	5000	99,5	7,778	16,5	3,536	25,5	2,121	16,5	4,536	7,5	0,707
	10000	136	8,485	18,5	3,536	16	2,828	18,5	3,536	7,5	2,121
Kontrol positif (+) S9	Nama	2AA		2AA		2AA		2AA		2AA	
	Konsentrasi	2		2		2		2		2	
	Jumlah koloni/lempeng	2403	343,654	152	8,485	301,5	40,305	1738	104,651	279	74,953
Kontrol Negatif (-) S9	Nama	AF2		ENNG		AF2		AF2		9AA	
	Konsentrasi	0,02		3		0,02		0,05		80	
	Jumlah koloni/lempeng	1135	176,777	113,5	4950	270,5	41,720	379,5	3,536	694	104,65

Mengingat titik akhir dari efek mutagenik adalah perubahan DNA juga adanya kerusakan kromosom maka perlu dilakukan uji aberasi kromosom secara *in vitro* dan uji mikronukleus secara *in vivo* sebagai skrining sekunder. Perlu diperhatikan bahwa data yang diperoleh dari uji mutagenisitas dengan uji Ames merupakan uji skrining primer *in vitro*, tidak mencerminkan adanya toksisitas jangka lama secara *in vivo*.

Namun apabila hasil uji terhadap adanya kerusakan kromosom positif maka merupakan indikasi bahwa obat tradisional tersebut membahayakan bila digunakan untuk pengobatan.

Kesimpulan

Hasil uji mutagenik ekstrak batang brotowali dengan metode Ames **negatif**, hasil spesifikasi simplisia ada beberapa yang tidak

memenuhi syarat seperti kadar abu dan kadar sari larut etanol. Penetapan kadar sisa etanol dalam ekstrak 0,00%, penetapan kadar air ekstrak 23,18%, penetapan susut pengeringan 20,54%, penetapan bobot jenis 1,1418, penetapan senyawa terlarut dalam pelarut air 80,12% dan penetapan senyawa terlarut dalam pelarut etanol 11,34%, penetapan minyak atsiri minyak menguap ekstrak brotowali negatif.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kami sampaikan kepada Kepala Puslitbang Farmasi, Badan Litbangkes, Depkes RI atas segala fasilitas yang diberikan selama penelitian ini, Juga kepada PPOM dan Ibu Dra. Endreswari MSi yang telah memberi bantuan dan bimbingan sehingga penelitian ini dapat berjalan lancar.

Daftar Pustaka

1. Lu Hayes, A.W., (ED), *Principles and methods of Toxicology*. Raven Press, Book ltd, New York, 1984.;
2. WHO. *Research Guidelines for Evaluation the Safety and Efficacy of Herbal Medicinal*, Manila, 1993.
3. Maron, D.M.B.N, *Ames Revised methods for Salmonella Mutagenity Test*, *Mutation Res*, 1983, 113,
4. OECD. *The OECD Principles of Good Laboratory Practice Organisation, for Economic Cooperation and Development*, Paris, 1992.
5. Lily, M. Perry. *Medicinal Plants of East and Southeast Asia*, The Mitt Press, London, 1980.
6. Dep.Kes R.I, *Materia Medika Indonesia VI*, 1985.

*Orang yang baik adalah bebas, meskipun dia adalah seorang budak,
orang yang jahat adalah seorang budak, meskipun dia seorang raja.
(Santo Agustinus)*

*Kata-kata yang bijaksana sering tidak didengar, tetapi kata-kata
yang lembut selalu diingat (Sir Arthur Helps)*

*Hadiah terbesar yang bisa kita berikan kepada orang lain adalah
suatu contoh yang baik*