

UJI MUTAGENESITAS EKSTRAK DAUN *Guazuma ulmifolia* Var *Tometosum*. K. Schum

D. Mutiatikum, Pudji Lastari, Sri Endreswari

Abstrak

Evaluasi keamanan perlu dilakukan dengan cara melakukan serangkaian uji toksisitas yang mendeteksi adanya efek yang merugikan termasuk uji mutagenisitas untuk mengetahui kemungkinan adanya senyawa yang bersifat mutagen. Uji mutagenik terhadap ekstrak etanol 50% daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia*) ini dilakukan berdasarkan sistem mutasi balik dengan metode Ames. Pengujian menggunakan lima galur bakteri uji yang telah dimutasikan yaitu: *Salmonella typhi* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 dan *E. coli* WP₂ uvr A dengan dan tanpa aktivator metabolik S-9.

Hasil penelitian efek mutagenik menggunakan metode Ames pada kondisi penelitian yang telah dilakukan ini tidak menunjukkan adanya mutagenik. Sebagai titik akhir efek mutagenik adalah terjadinya mutasi DNA yang dapat dideteksi dengan uji mutasi balik pada bakteri (metode Ames), dan kerusakan kromosom yang dapat dideteksi dengan uji aberasi kromosom secara *in vivo* dan uji mikronukleus secara *in vitro*.

Kata Kunci : Mutagenik, (*Guazuma ulmifolia*)

Pendahuluan

Obat tradisional telah digunakan sejak bertahun-tahun, secara turun temurun. Khasiat obat tradisional disebabkan oleh adanya bermacam senyawa kimia yang di-kandung. Namun pada sisi lain dapat menyebabkan efek toksik tergantung sifat toksisitas instrinsik senyawa kimia yang dikandungnya. Sehingga evaluasi keamanannya perlu dilakukan menggunakan serangkaian uji toksisitas dengan mendeteksi adanya efek yang merugikan termasuk uji mutagenesis untuk mengetahui kemungkinan adanya senyawa yang bersifat mutagen^(1,2). Senyawa mutagen dapat menyebabkan terjadinya mutasi gen, sehingga dapat terjadi kerusakan sel secara serius, kelainan fetus, teratogenik, bahkan kanker setelah terjadi pemaparan dalam jangka waktu lama⁽²⁾. Informasi adanya efek mutagen dari obat tradisional sangat diperlukan, khususnya untuk obat tradisional yang mengandung senyawa yang analog dengan senyawa mutagen yang banyak digunakan sebagai komponen jamu dalam jangka lama dan digunakan pada wanita hamil.

Guazuma ulmifolia tomentosum K. Schum, dari familia Sterculiaceae mengandung senyawa sterol, alkaloid, karetenoid, flavonoid, tanin,

kuersetin, kaemferol, kaemferilin dll. *Guazuma ulmifolia* var *tometosum* K. Schum, sebagai komponen utama jamu pelangsing, dapat menyebabkan diare, sakit perut^(3,4) dan sering di-informasikan dapat menurunkan kesuburan pada wanita.

Uji mutagenesis dengan metode Ames merupakan uji skrining primer untuk mendeteksi adanya efek mutagenesis. Berdasarkan penelitian yang menggunakan metode Ames, ada korelasi yang cukup tinggi antara karsinogen dan mutagen yaitu $\pm 83\%$ ⁽⁸⁾. Sehingga uji Ames direkomendasikan untuk mendeteksi adanya efek mutagenesis⁽²⁾.

Bahan dan Cara

Bahan

Sample adalah simplisia daun jati belanda yang diperoleh dari BPTO Tawangmangu dengan spesifikasi asal tanaman sebagai berikut: tempat kultivasi dengan jenis tanah lantisol, warna kuning kehitaman, pH asam, bahan organik sedang dan tekstur tanah liat dengan cuaca suhu maksimal rata-rata 35°C, suhu minimal 19°C curah hujan 2500mm/th dan kelembaban 69%. Tanaman dipanen pada bulan Januari 2001 pada ketinggian 700 m dpl

* Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi, BPPK DepKes

Bakteri Uji

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 uvrA diperoleh dari National Institute of Hygienic Sciences, Tokyo, Japan.

Bahan Uji

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 S-9, yaitu ekstrak hati yang dibuat dari hati tikus galur Sprague-Dawley jantan yang sebelumnya telah diinduksi dengan natrium fenobarbital dan B-naftoflavin.

Alat yang Digunakan

Inkubator, alat penghitung koloni, cawan petri, tangas air pengocok, pipet mikro 10 sampai 100 ul, alat vortex, tangas udara pengocok, lemari bersih.

Uji Mutagenesis

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

Uji Utama.

Dosis uji ditentukan berdasarkan data hasil uji pendahuluan yaitu dosis yang memberikan jumlah koloni revertan terbesar. Zat uji dilarutkan dalam dimetilsulfoksida (DMSO), untuk ekstrak *G. ulmifolia* 625; 1250; 2500; 5000; 10.000 ug/lempeng. Untuk sediaan uji digunakan 5 galur bakteri uji yaitu *S. typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 dan *E.coli* WP2 uvrA.

Disiapkan sejumlah biakan semalam agar dengan kepekaan $1-2 \times 10^9$ sel/ ml dari masing-masing bakteri uji; campuran S-9 yang berisi glukosa 6-fosfat, B-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 triptofan sesaat sebelum pengujian dilakukan. Ke dalam beberapa tabung reaksi, secara berturut-turut di masukkan sediaan uji 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 uji segar, kemudian diinkubasi di dalam tangas udara pengocok pada suhu 37°C selama 20 menit. Setelah itu kedalam setiap tabung ditambahkan 2 ml agar atas dengan suhu 45°C dan dihomogenkan dengan alat Vortex, kemudian disebarkan secara merata pada lempeng agar, dibiarkan pada suhu kamar selama lebih kurang 1 jam, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Sebagai kelompok kontrol negatif digunakan pelarut sediaan uji, dan kontrol positif digunakan beberapa senyawa mutagen pem-banding yang sesuai untuk bakteri uji, diuji secara simultan dengan cara yang sama seperti pada kelompok sediaan uji. Jenis mutagen pembanding yang digunakan seperti tertera pada Tabel 1.

Tabel 1
Senyawa Mutagen Pembanding untuk Bakteri Uji

Bakteri Uji	TA 100	TA 98	TA 1535	TA 1537	WP2 uvrA
(-) S-9	AF-2 (0,02 ug)	AF-2 (0,05 ug)	ENNG (3 ug)	9AA (80 ug)	AF-2 (0,02 ug)
(+) 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 Aminoakridina, ENNG: N- etil- N'- nitro-N-nitrosoguanidin
AF-2: 2-(2-Furil)-3-(5nitro-2-furil) akrilamida

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 kontrol negatif.

Hasil dan Pembahasan

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 aktivasi metabolik (S-9) seperti tertera pada Tabel 3 dan Gambar 1. Jumlah koloni revertan yang dihasilkan oleh masing-masing galur bakteri TA 100, TA 98, TA 1538, TA1537 dan WP2 uvrA dalam lempeng kontrol negatif dan kontrol positif dengan dan tanpa S-9 masih dalam rentang data pengujian rutin yang dihasilkan di laboratorium (Tabel 2). 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 jati belanda adalah negatif, baik dengan dan tanpa aktivator metabolik S-9. 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 mutagenitas dengan uji Ames merupakan uji skring primer *in vitro*, tidak mencerminkan adanya toksisitas jangka lama secara *in vivo*. Namum apabila hasil uji terhadap adanya kerusakan kromosom positif maka merupakan indikasi bahwa obat tradisional tersebut membahayakan bila digunakan untuk pengobatan.

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

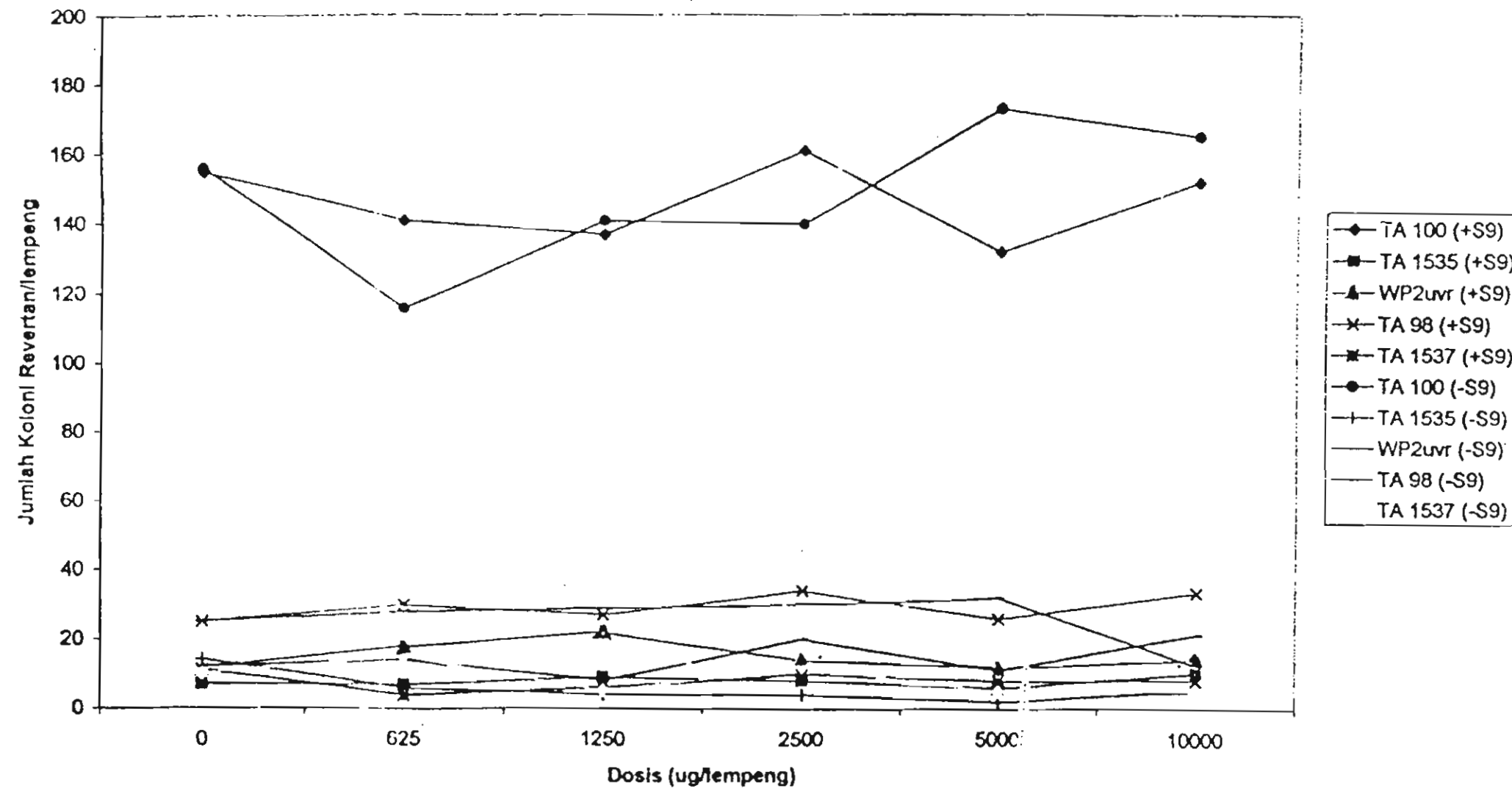
Galur	Kontrol Negatif		Kontrol Positif	
	(-) S-9	(+)S-9	(-)S-9	(+)S-9
TA 98	11,0 ± 2,45	23,25 ± 8,54	135,25 ± 62,32	1532,5 ± 746,64
TA 100	156,58 ± 64,45	163,25 ± 28,9	1343,30 ± 1030,47	1813,00 ± 529,69
TA 1535	11,67 ± 5,12	12,71 ± 4,97	467,50 ± 383,46	200,75 ± 96,02
TA 1537	3,66 ± 0,58	17,75 ± 5,25	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 Mutagenesis Ekstrak Daun Jatiblanda

(±) S9	Konsentrasi Zat Uji (ug/lempeng)	Jumlah Koloni Revertan Perlempeng														
		Mutasi Substitusi Pasangan Basa									Mutasi Pergeseran Kerangka					
		TA 100			TA 1535			WP 2 uvr			TA 98			TA 1537		
		X1	X2	X Rata2	X1	X2	X Rata2	X1	X2	X Rata2	X1	X2	X Rata2	X1	X2	X Rata2
(+)	Kontrol negatif	170	139	155	12	1	7	13	11	12	28	22	25	13	9	11
	625	138	144	141	9	5	7	19	17	18	32	28	30	6	2	4
	1250	126	148	137	9	8	9	19	24	22	33	21	27	8	4	6
	2500	172	149	161	6	10	8	16	12	14	32	35	34	11	9	10
	5000	129	135	132	6	5	6	13	10	12	18	34	26	11	5	8
	10000	144	159	152	5	14	10	11	17	14	30	35	33	8	7	8
(-)	Kontrol Positif	181	131	156	7	21	14	12	11	12	27	22	25	11	8	10
	625	107	124	116	5	7	6	14	13	14	28	27	28	11	19	15
	1250	118	164	141	2	5	4	8	7	8	31	27	29	4	6	5
	2500	142	137	140	4	3	4	17	23	20	35	25	30	10	13	12
	5000	180	166	173	2	1	2	12	9	11	29	35	32	6	3	5
	10000	176	154	165	1	9	5	17	24	21	9	14	12	4	6	5
Kontrol Positif (+) S9	Nama	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Konsentrasi	2			2			2			2			2		
	Jumlah koloni/lempeng	2628	2524	2576	70	61	66	81	88	85	127 6	1596	1436	145	134	140
Kontrol Negatif (-) S9	Nama	AF2			ENNG			AF2			AF2			9AA		
	Konsentrasi	0,02			3			0,02			0,05			80		
	Jumlah koloni/lempeng	794	918	856	22	34	28	798	761	780	271	226	249	167	456	312

Keterangan : 2AA : 2 Aminoantrasena
 9AA : 9 Aminoakridina
 ENNG : N – etil-N-nitro-N-nitroguanidin
 AF-2 : 2-(2-Furil)-3-(5 nitro-2-furil) akrilamida

Gambar 1
Hubungan Dosis dengan Jumlah Koloni Revertan dari Masing-masing
Bakteri Uji pada Uji Ames Ekstrak Daun Jatiblanda dengan dan tanpa S-9



Daftar Pustaka

1. Hayes, A.W, 1984, (ED), *Principles and methods of Toxicology*, Raven Press, Book ltd, New York.
 2. WHO, 1993, *Research Guidelines for evaluation the Safety and Efficacy of Herbal Medicinal*, Manila.
 3. Bakar, S, et al, 1980, Pengaruh Beberapa Komponen Jamu Pengatur Haid Terhadap Uterus Terisolasi, *Risalah Simposium Penelitian Tumbuhan Obat III*.
 4. Lily, M. Perry, 1980, *Medicinal Plants of East and Southeast Asia*, The Mitt Press, London.
-

Bila anda mempersoalkan tentang kegagalan sama dengan anda mengundang kegagalan. Dan bila anda mempersoalkan kesuksesan berarti anda mengundang kesuksesan pula. (Napoleon Hill)

*Untuk memahami diri sendiri lihatlah bagaimana orang lain berbuat.
Untuk memahami orang lain periksalah diri sendiri. (Rabindranath Tagore)*