

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN, TOKSISITAS, DAN SITOTOKSISITAS EKSTRAK ALGA MERAH *Rhodymenia palmata*

Thamrin Wikanta, Hedi Indra Januar, dan Muhammad Nursid¹⁾

ABSTRAK

Riset tentang aktivitas antioksidan, toksisitas dan sitotoksitas ekstrak *Rhodymenia palmata* telah dilaksanakan. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (1,1- difenil-2-pikrilhidrazil). Uji toksisitas terhadap *Artemia salina* dilakukan dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Uji sitotoksitas terhadap sel lestari tumor HeLa ditentukan dengan metode MTT [3-(4,5-dimetilthiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium bromida). Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak kasar metanol memiliki aktivitas antioksidan rendah ($IC_{50}=464,89$ ppm). Fraksi etil asetat memiliki toksisitas paling tinggi ($LC_{50}=5,36$ ppm), dan fraksi n-heksana memiliki toksisitas rendah ($LC_{50}=55,20$ ppm), sedangkan fraksi metanol termasuk kelompok tidak toksik ($LC_{50}=39012,95$ ppm). Uji sitotoksitas terhadap sel lestari tumor HeLa menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki sitotoksitas rendah ($LC_{50}=432,43$ ppm), sedangkan fraksi n-heksana memiliki sitotoksitas tinggi ($LC_{50}=29,68$ ppm).

ABSTRACT: *The assays of the antioxidative activity, toxicity, and cytotoxicity of the red algae Rhodymenia palmata extract. By: Thamrin Wikanta, Hedi Indra Januar, and Muhammad Nursid*

Research on the antioxidative activity, toxicity and cytotoxicity assays of Rhodymenia palmata extract has been carried out. Antioxidative activity assay was conducted using DPPH (1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method. Toxicity assay against Artemia salina was performed using the BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) method. Cytotoxicity assay against HeLa tumor cell line was determined using MTT [3-(4.5-dimethylthiazol-2yl)-2.5-diphenyl tetrazolium bromide] method. The results showed that methanol crude extract had low antioxidative activity ($IC_{50}=464.89$ ppm). Ethyl acetate fraction had the highest toxicity ($LC_{50}=5.36$ ppm), and n-hexane fraction had low toxicity ($LC_{50}=55.20$ ppm). While, methanol fraction belonged to the nontoxic group ($LC_{50}=39012.95$ ppm). Cytotoxicity assay against HeLa tumor cell line showed that the ethyl acetate fraction had low cytotoxicity ($LC_{50}=432.43$ ppm), but n-hexane fraction had high cytotoxicity ($LC_{50}=29.68$ ppm).

KEYWORDS: *Rhodymenia palmata, antioxidative activity, cytotoxicity*

PENDAHULUAN

Penyakit tumor menduduki peringkat pertama sebagai penyebab kematian di dunia. Berbagai usaha telah dilakukan para ilmuwan untuk menemukan obat antitumor, baik sebagai penghambat berkembangnya sel tumor maupun pemusnah sel tumor. Salah satu sumber obat yang banyak dieksplorasi adalah berasal dari bahan alam laut, baik dari tumbuhan, hewan, maupun mikroba. Banyak literatur yang menyatakan bahwa biota laut mengandung berbagai jenis senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai antitumor (Kamiya *et al.*, 1987; Schmitz *et al.*, 1993) dan antiviral (Rinehart *et al.*, 1993; Jha & Zi-rong, 2004). Salah satu penyebab tumor adalah terjadinya akumulasi radikal bebas yang berlebihan sehingga tubuh tidak mampu menetralkannya (Panichayupakaranant & Kaesuwat, 2004). Studi-studi tersebut memperlihatkan bahwa lingkungan laut merupakan sumber yang kaya akan bahan metabolit sekunder, banyak

di antaranya memiliki struktur kimiawi yang tidak ditemukan pada senyawa dari biota yang hidup di lingkungan terestrial (Jadulco, 2002).

Indonesia sebagai salah satu negara yang memiliki diversitas sumberdaya hayati laut tertinggi di dunia menyimpan potensi yang sangat besar sebagai penghasil bahan obat untuk menghambat berkembangnya tumor dan membunuh tumor. Potensi rumput laut atau alga yang dimiliki Indonesia sangat besar untuk dikembangkan sebagai bahan baku obat. Selama ini pemanfaatan dalam bidang farmasi masih sangat terbatas. Pemanfaatan secara massal adalah sebagai sumber agar, karaginan dan alginat yang merupakan metabolit primer. Untuk pemanfaatan metabolit sekundernya masih sangat terbatas bahkan belum berkembang.

Dalam pengobatan tradisional, rumput laut atau alga telah lama digunakan untuk keperluan pengobatan berbagai jenis penyakit, seperti anti-

¹⁾ Peneliti pada Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan

curare, penurunan panas, eksim, batu empedu, gondok, gangguan menstruasi, gangguan ginjal, *scabies*, dan *scrofula*. Tampaknya manfaat yang bervariasi ini telah mendorong para ahli untuk mencari kemungkinan obat antitumor dari tanaman laut tersebut (Angka & Suhartono, 2000).

Menurut Shoeib *et al.* (2004), telah ditemukan senyawa dari ekstrak alga yang memiliki aktivitas antitumor yaitu senyawa lanosol dan derivatnya, senyawa tersebut termasuk golongan fenol terhalogenasi. Namun mekanisme kerja senyawa tersebut terhadap sel lestari tumor belum diketahui. Dikemukakan oleh Meyer (1999) bahwa hasil uji farmakologi senyawa antitumor dari ekstrak alga yang telah diketahui mekanisme kerjanya, di antaranya adalah: Curacin D (poliketida), Dehydrothysiferol (terpenoid), Spirulan (polisakarida), Stypodiol (terpenoid), dan Tolyporphin (pyrrol), dan yang belum diketahui mekanisme kerjanya adalah Cryptoxanthin (terpenoid).

Alga merah jenis *Rhodomenia palmata* (Linnaeus) Greville tumbuh di rata-rata terumbu karang, umumnya pada substrat batu di bagian sisi luar rata-rata terumbu yang biasa terkena ombak langsung. Kebanyakan terdapat di pantai Samudra Hindia seperti di pantai Selatan Jawa dan Selatan Bali. Alga merah ini mengandung pigmen fotosintetik berupa karoten, xantofil, fikobilin terutama r-fikoeiretrin penyebab warna merah, dan klorofil a dan b. Dalam dinding selnya terdapat selulosa dan produk fotosintetik berupa karaginan, agar dan furselaran. Alga merah ini akan mengalami perubahan warna dari warna aslinya menjadi warna ungu apabila alga tersebut terkena panas sinar matahari secara langsung (Atmadja *et al.*, 1996).

Riset ini bertujuan untuk mengetahui tingkat bioaktivitas metabolit sekunder hasil ekstraksi dari alga merah jenis *Rhodomenia palmata* yang banyak tersebar di perairan laut Indonesia dan belum dimanfaatkan secara ekonomi, sebagai upaya mencari kemungkinan didapatkannya senyawa yang potensial sebagai bahan obat antitumor.

BAHAN DAN METODE

Preparasi Ekstrak *Rhodomenia palmata*

Rumput laut *R. palmata* dipanen dari Pantai Krakal Yogyakarta pada bulan Juni 2004. Sampel segar diambil sebanyak 500 gram kemudian dimasukkan ke dalam plastik polietilen tahan pelarut organik dan langsung dimaserasi di lapangan dengan menggunakan pelarut metanol sebanyak 800 ml. Sampel dimaserasi selama 72 jam, lalu disaring, kemudian dimaserasi kembali selama 24 jam dengan

pelarut metanol. Setelah disaring dimaserasi lagi selama 24 jam, kemudian pada hari berikutnya semua ekstrak kasar metanol digabung (2400 ml) dan dievaporasi hingga menjadi 100 ml. Ekstrak metanol hasil evaporasi difraksinasi masing-masing dengan pelarut n-heksana dan etil asetat sehingga didapatkan 3 fraksi besar : fraksi nonpolar (n-heksana), fraksi semipolar (etil asetat), dan fraksi polar (metanol). Ketiga fraksi ini masing-masing kemudian dievaporasi kembali hingga semua pelarut menguap, lalu dibekukan dan dikeringkan pada suhu rendah menggunakan *freeze dryer* (untuk fraksi metanol) dan menggunakan nitrogen evaporator (untuk fraksi etil asetat dan n-heksana).

Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode Uji DPPH

Metode uji kualitatif

Uji aktivitas antioksidan secara kualitatif dilakukan menggunakan metode yang digunakan Oke & Hamburger (2002). Satu mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml metanol. Ekstrak metanol tersebut ditotolkan pada plat kromatografi lapis tipis (KLT) silika gel dengan jarak 10 mm dari batas bawah. Noda (spot) tersebut dikeringkan. Fase gerak KLT dibuat dengan campuran metanol dan etil asetat dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya dilakukan pengembangan dalam *chamber* kromatografi dan noda yang terbentuk diperiksa menggunakan semprotan pereaksi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (konsentrasi 10 mg dalam 10 ml metanol). Setelah kering noda yang terbentuk diperiksa menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 366 nm dan 254 nm. Noda hasil berwarna kuning, atau biru, atau ungu-muda, menunjukkan positif adanya antioksidan. Perbedaan warna yang tampak adalah berdasarkan konsentrasi kompleks yang terbentuk antara antioksidan dengan pereaksi DPPH.

Metode uji kuantitatif

Uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif dilakukan menggunakan metode Chow *et al.* (2003). Satu ml DPPH ditambah metanol hingga menjadi 5 ml (blanko). Sampel ekstrak dibuat dengan 4 seri konsentrasi yaitu 0, 5, 10, dan 25 ppm. Tiap sampel ditakar dengan volume yang sama, ditambahkan 1 ml DPPH lalu diencerkan dengan metanol hingga volumenya menjadi 5 ml dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Uji serapan dilakukan pada panjang gelombang 515 nm. Hambatan (dalam persen) dihitung berdasarkan: $\frac{(\text{serapan blanko} - \text{serapan sampel})}{\text{serapan blanko}} \times 100\%$. Nilai hambatan dan konsentrasi ekstrak diplot masing-masing pada

sumbu x dan y, persamaan garis yang diperoleh digunakan untuk mencari *Inhibition Concentration* 50% (IC_{50}).

Uji Toksisitas Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji toksisitas dilakukan menurut metode Meyer *et al.* (1982), McLaughlin & Rogers (1998) dan Carballo *et al.* (2002). Metode BSLT dilakukan untuk memprediksi toksisitas suatu bahan dan digunakan untuk mendeteksi toksin *funga*l, logam berat, toksin sianobakteria, dan aktivitas pestisida. Metode ini biasa dilakukan dalam uji pendahuluan untuk skrining atau penapisan aktivitas farmakologis pada produk alam (Carballo *et al.*, 2002; Guerrero *et al.*, 2004). Metode BSLT ini juga biasa dilakukan sebagai tahap pendahuluan dalam penapisan bahan-bahan yang diperkirakan memiliki sifat antitumor atau antikanker sebelum melangkah kepada uji *in vitro* menggunakan sel lestari kanker (Widjhati *et al.*, 2004). Metode BSLT digunakan sebagai *bioassay-guided fractionation* bahan alam, metode pra skrining penelitian sel tumor di *Cell Culture Laboratory of the Purdue Cancer Center, Purdue University* (Alam, 2002). Hal ini dilakukan berdasarkan pertimbangan bahwa uji BSLT bersifat mudah dilakukan, cepat, biayanya murah, dapat dilakukan di laboratorium, dan memiliki tingkat kepercayaan tinggi dibandingkan dengan uji *in vitro* menggunakan sel lestari yang memerlukan biaya sangat mahal dan media serta keterampilan yang khusus (Meyer *et al.*, 1982).

Dalam uji ini digunakan larva *Artemia salina* sebagai hewan uji. Mula-mula telur *A. salina* ditetaskan di dalam air laut buatan (38 g garam dapur dalam 1000 ml air biasa) di bawah lampu TL 20 watt. Setelah 48 jam telur menetas menjadi nauplii instar III/IV dan siap digunakan sebagai hewan uji. Larva *A. salina* dimasukkan ke dalam vial yang telah berisi larutan ekstrak sampel dengan seri dosis 5, 50, 250, dan 1000 ppm dengan 3 kali ulangan. Semua vial diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam di bawah penerangan lampu TL 20 watt. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan melihat jumlah *Artemia salina* yang mati pada tiap konsentrasi. Penentuan harga LC_{50} dalam $\mu\text{g/ml}$ atau ppm dilakukan menggunakan analisis probit dengan program MINITAB versi 13.2 dengan selang kepercayaan 95%.

Uji Sitotoksik Terhadap Sel Lestari Tumor HeLa

Uji sitotoksitas dilakukan dengan metode MTT [3-(4,5-dimetilthiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium bromida] menurut Hughes & Mehmet (2003). Sel tumor HeLa diperoleh dari koleksi Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM. Sel

HeLa dikultur dalam medium RPMI 1640 lengkap, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, fungison 0,5%, dan penisilin-streptomisin 2%.

Ekstrak *R. palmata* yang aktif menurut hasil BSLT, dibuat seri dosis 6,25; 12,5; 25; 50; dan 100 ppm dengan 3 kali ulangan. Larutan ekstrak dimasukkan ke dalam *microplate* 96 sumuran sebanyak 100 μL . Sel HeLa dimasukkan ke dalam tiap sumuran masing-masing sebanyak 100 μL . Kontrol perlakuan ada 3 terdiri dari kontrol sel (100 μL sel + 100 μL media), kontrol sampel (100 μL ekstrak + 100 μL media) dan kontrol media (200 μL media). Sediaan dalam *microplate* diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C dengan aliran CO_2 5 ml/menit. Setelah 24 jam ke dalam tiap-tiap sumuran ditambahkan MTT sebanyak 10 μL , diinkubasi kembali pada inkubator CO_2 selama 4 jam, kemudian reaksi MTT dihentikan dengan cara menambahkan 100 μL sodium dedosil sulfat (SDS) 10%. *Microplate* diinkubasi kembali selama 12 jam pada suhu kamar. Setelah 12 jam, absorbansi tiap sumuran dibaca dengan spektrofotometer *ELISA plate reader* pada panjang gelombang 560 nm. Persentase kematian sel HeLa dihitung dengan rumus $(A-B)/A \times 100\%$, dimana A adalah jumlah sel yang hidup pada sumuran kontrol, dan B adalah jumlah sel yang hidup pada sumuran yang diberi ekstrak uji. Nilai LC_{50} ($\mu\text{g/ml}$ atau ppm) dihitung dengan analisis probit menggunakan program MINITAB versi 13.2 dengan selang kepercayaan 95%.

HASIL DAN BAHASAN

Aktivitas Antioksidan

Hasil uji penapisan fitokimia untuk mengetahui jenis golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak kasar metanol dari *Rhodymenia palmata* segar memperlihatkan bahwa ekstrak metanol bersifat positif mengandung golongan senyawa saponin, flavonoid, dan triterpenoid. Uji aktivitas antioksidan dilakukan untuk mengetahui apakah senyawa yang terdapat dalam ekstrak kasar metanol yang diuji memiliki aktivitas antioksidan. Reaksi antara antioksidan dengan radikal bebas didasarkan pada prinsip reaksi penangkapan hidrogen dari antioksidan oleh radikal bebas DPPH. Antioksidan akan mendonorkan proton atau hidrogen kepada DPPH dan selanjutnya akan terbentuk radikal bebas baru yang bersifat stabil atau tidak reaktif. Hal ini dapat dilukiskan dalam persamaan berikut:

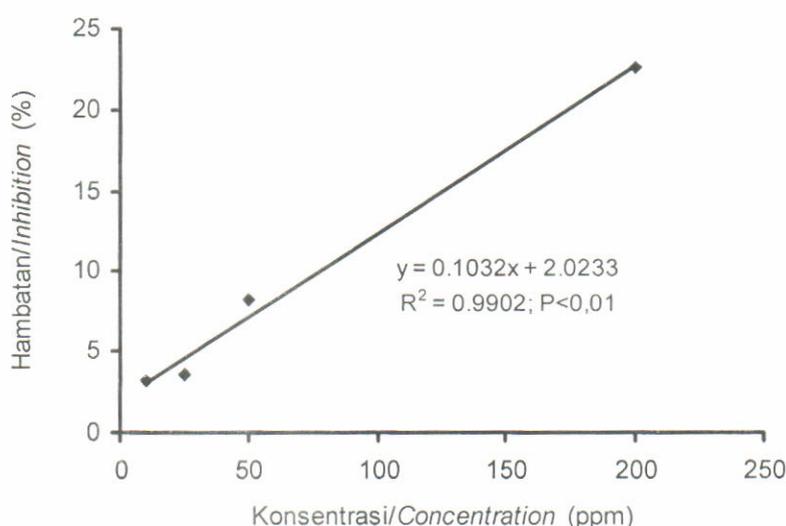


Reaksi netralisasi radikal bebas DPPH yang menghasilkan perubahan warna seperti dilukiskan dalam persamaan reaksi di atas menjadi dasar melaksanakan uji daya antioksidan metode DPPH secara kualitatif dan kuantitatif.

Hasil analisis dengan kromatografi lapis tipis terhadap ekstrak kasar metanol yang memiliki aktivitas antioksidan, secara kualitatif memperlihatkan bahwa pelarut pengelusi yang baik untuk mengembangkan ekstrak sampel adalah campuran metanol dan etil asetat dengan perbandingan 1:1. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang terkandung di dalam ekstrak metanol *R. palmata* merupakan senyawa dengan tingkat kepolaran menengah ke atas. Noda yang terbentuk dari kromatografi lapis tipis yang diamati di bawah lampu UV (panjang gelombang 366 dan 254 nm) berwarna kuning agak terang. Hal ini secara kualitatif menunjukkan bahwa ekstrak metanol mengandung kromofor atau ikatan rangkap terkonjugasi yang dapat bersifat sebagai antioksidan. Penyemprotan dengan larutan DPPH menunjukkan bahwa secara kualitatif ekstrak metanol tersebut bersifat positif mengandung senyawa antioksidan. Hasil uji secara kualitatif menunjukkan bahwa ekstrak metanol *R. palmata* memiliki senyawa dengan gugus yang mampu melakukan reaksi netralisasi radikal bebas DPPH. Menurut Oke & Hamburger (2002), suatu senyawa yang mengandung gugus hidroksil, polihidroksil, atau karbonil memiliki aktivitas antioksidan karena senyawa tersebut akan bereaksi dengan radikal bebas melalui mekanisme donor proton dari gugus hidroksil

yang terdapat pada senyawa aktif atau senyawa antioksidan tersebut. Untuk mengetahui besarnya daya hambat dari senyawa antioksidan yang terkandung dalam ekstrak metanol tersebut dilakukan uji secara kuantitatif dengan mencari harga IC_{50} . Hubungan antara persentase hambatan ekstrak metanol *R. palmata* terhadap radikal bebas DPPH ditunjukkan oleh persamaan garis seperti disajikan pada Gambar 1.

Berdasarkan persentase hambatan dari tiap konsentrasi ekstrak metanol, selanjutnya dihitung dengan analisis probit dan dihasilkan harga IC_{50} sebesar 464,89 ppm. Hal ini berarti bahwa 50 % radikal bebas DPPH berhasil dihambat oleh ekstrak metanol *R. palmata* pada konsentrasi ekstrak sebesar 464,89 ppm. Sebagai pembanding digunakan vitamin C yang memiliki IC_{50} sebesar 21,09 ppm (Windono *et al.*, 2001; Maryati, 2004). Berdasarkan hasil tersebut berarti aktivitas antioksidan ekstrak metanol *R. palmata* sangat rendah, berada jauh di bawah aktivitas antioksidan vitamin C. Rendahnya aktivitas antioksidan dari ekstrak kasar tersebut kemungkinan karena aktivitas antioksidan dari senyawa dalam ekstrak tersebut memang benar rendah, atau kadar senyawa antioksidan dalam ekstrak sangat rendah akibat banyaknya komponen lain yang merupakan pengotor atau komponen pengotor yang terdapat di dalam ekstrak masih sangat tinggi. Produk alam dari laut secara umum mengandung kadar garam yang tinggi. Apabila komponen pengotor paling utama yang terdapat dalam ekstrak uji tersebut adalah garam (NaCl), maka perlu upaya *desalting* terlebih dahulu



Gambar 1. Aktivitas antioksidan ekstrak metanol dari *R. palmata* terhadap radikal bebas DPPH.
Figure 1. Antioxidative activity of *R. palmata* methanol extract against DPPH free radical.

agar didapatkan bahan aktif yang lebih murni dengan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi.

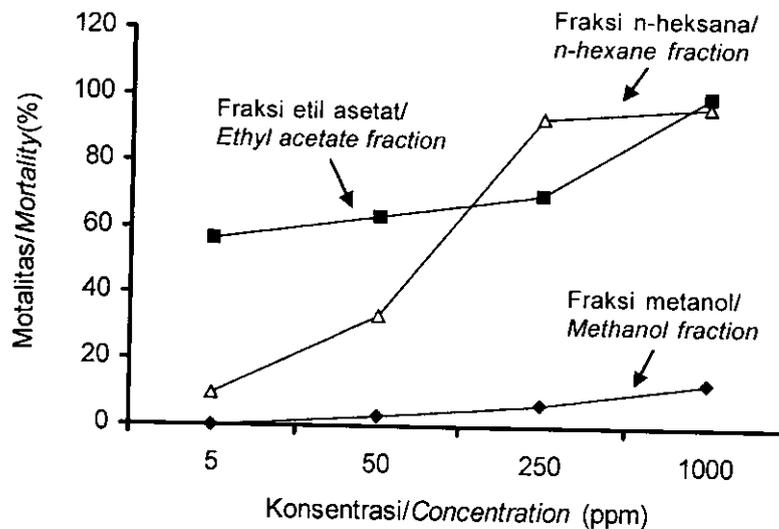
Biota laut memiliki berbagai mekanisme untuk memproteksi dirinya dari sinar UV, di antaranya dengan memiliki UVAS (*UV-absorbing substance*) yang menghambat penetrasi sinar UV ke dalam jaringan atau sel, sehingga memproteksi DNA. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa UVAS dalam alga adalah asam amino serupa *mycosporin* yang memiliki $\lambda_{\text{maksimum}}$ 300–350 nm, dan terutama mengabsorpsi UV-B dan UV-A. Alga laut yang terkena sinar UV kuat, seperti yang hidup di laut dangkal akan memiliki kandungan UVAS lebih tinggi dibandingkan dengan yang hidup di laut dalam (Misonou *et al.*, 2003).

Toksistas Terhadap *Artemia salina*

Uji toksistas ekstrak *R. palmata* fraksi metanol, etil asetat, dan n-heksana dilakukan terhadap *Artemia*

salina (BSLT). Suatu ekstrak dianggap sangat toksik apabila memiliki nilai LC_{50} (*Lethal Concentration 50%*) di bawah 30 ppm, dianggap toksik bila memiliki nilai LC_{50} antara 30–1000 ppm, dan dianggap tidak toksik bila memiliki nilai LC_{50} di atas 1000 ppm (Meyer *et al.*, 1982). Hasil uji toksistas dari ekstrak *R. palmata* fraksi metanol, etil asetat, dan n-heksana terlihat pada Gambar 2 dan Tabel 1.

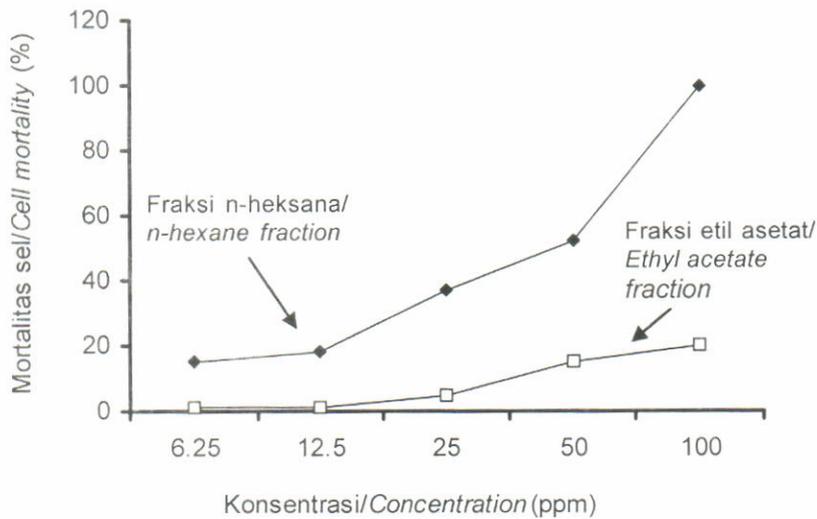
Fraksi etil asetat memiliki toksistas yang paling tinggi dengan nilai LC_{50} sebesar 5,36 ppm, diikuti oleh fraksi n-heksana dengan nilai LC_{50} sebesar 55,20 ppm, kemudian fraksi metanol yang bersifat tidak toksik dengan nilai LC_{50} sebesar 39012,95 ppm. Berdasarkan nilai toksistas dari tiap fraksi tersebut selanjutnya dilakukan uji sitotoksistas fraksi etil asetat dan n-heksana terhadap sel lestari tumor HeLa, untuk melihat kemungkinan adanya korelasi antara hasil uji toksistas terhadap *Artemia salina* dengan uji sitotoksistas terhadap sel lestari tumor HeLa. Uji



Gambar 2. Mortalitas *A. salina* (%) oleh fraksi metanol, etil asetat, dan n-heksana dari ekstrak *R. palmata*.
Figure 2. The mortality of *A. salina* (%) against the methanol, ethyl acetate, and n-hexane fraction of *R. palmata* extract.

Tabel 1. Hasil BSLT (nilai LC_{50}) fraksi metanol, etil asetat, dan n-heksana dari ekstrak *R. palmata*.
Table 1. BSLT result (LC_{50} value) of methanol, ethyl acetate, and n-hexane fraction of *R. palmata* extract.

Fraksi/Fraction	LC_{50} (ppm)
Metanol/Methanol	39012.95
Etil asetat/Ethyl acetate	5.36
n-heksana/n-hexane	55.2



Gambar 3. Mortalitas sel lestari tumor HeLa oleh fraksi etil asetat dan n-heksana dari ekstrak *R. palmata*.
 Figure 3. The mortality of HeLa tumor cell line against the ethyl acetate and n-hexane fraction of *R. palmata* extract.

aktivitas fraksi metanol terhadap sel lestari HeLa tidak dilakukan karena dianggap tidak prospektif.

Sitotoksitas Terhadap Sel Lestari Tumor HeLa

Sitotoksitas ditentukan dengan menggunakan sel lestari tumor HeLa. Sel HeLa berasal dari sel kanker leher rahim manusia (*human cervix epitheloid carcinoma*). Sel ini diisolasi pada tahun 1951 dari seorang wanita penderita kanker leher rahim bernama Henriatta Lacks yang berusia 30 tahun (Dai, 2004).

Uji sitotoksitas dengan metode MTT merupakan uji kolorimetri kuantitatif berdasarkan pada absorpsi warna larutan hasil pemecahan garam tetrazolium berwarna kuning yang larut dalam air menjadi tidak larut dalam air (dalam bentuk kristal formazan) berwarna biru gelap. Kristal formazan dilarutkan dalam pelarut organik isopropanol. Absorbansi yang

dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi larutan biru formazan yang menggambarkan aktivitas metabolisme sel (Hughes & Mehmet, 2003).

Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh dari uji dengan metode MTT, maka ditentukan persentase sel yang mati akibat pengaruh pemberian suatu ekstrak. Persentase kematian sel HeLa setelah perlakuan ekstrak etil asetat dan n-heksana dengan berbagai konsentrasi disajikan pada Gambar 3 dan Tabel 2. Terlihat bahwa pada konsentrasi 100 ppm ekstrak *R. palmata* fraksi etil asetat hanya mampu membunuh sel HeLa sekitar 20 % sedangkan fraksi n-heksana dapat membunuh hampir 100 % sel HeLa. Efek sitotoksik suatu bahan alam dapat dilihat dari nilai LC_{50} .

Hasil analisis probit memperlihatkan bahwa fraksi etil asetat memiliki nilai LC_{50} sebesar 432,43 ppm, sedangkan fraksi n-heksana memiliki nilai LC_{50}

Tabel 2. Mortalitas sel lestari tumor HeLa terhadap (LC_{50}) fraksi etil asetat, dan n-heksana dari ekstrak *R. palmata*.

Table 2. The mortality of HeLa cell line (LC_{50} value) against ethyl acetate, and n-hexane fraction of *R. palmata* extract.

Fraksi/Fraction	LC_{50} (ppm)
Etil asetat/Ethyl acetate	432.43
n-heksana/n-hexane	29.68

sebesar 29,68 ppm. Berdasarkan nilai LC₅₀ tersebut, maka ekstrak *R. palmata* fraksi n-heksana memiliki prospek yang baik untuk diteliti lebih lanjut efek sitotoksiknya terhadap proliferasi sel lestari tumor HeLa. Dalam hal ini tidak terlihat korelasi yang positif antara hasil uji toksisitas dengan hasil uji sitotoksitas. McLaughlin & Rogers (1998) mengemukakan bahwa ada korelasi positif antara hasil uji toksisitas metode BSLT dengan uji sitotoksitas terhadap sel lestari tumor *human nasopharyngeal carcinoma*. Sedangkan Carballo *et al.* (2002) yang membandingkan hasil uji sitotoksitas dengan sel lestari *human lung carcinoma* dan *human colon carcinoma* dengan hasil uji BSLT, mengemukakan bahwa kedua uji memiliki korelasi yang rendah untuk dosis di bawah 100 ppm tetapi untuk dosis 1000 ppm uji toksisitas konsisten dengan uji sitotoksitas.

Analisis GC-MS Fraksi n-heksana

Berdasarkan hasil penapisan fitokimia, kemungkinan senyawa yang terdapat dalam fraksi n-heksana adalah golongan terpenoid, sedangkan

golongan flavonoid dan polifenol kemungkinan terdapat pada fraksi etil asetat. Hasil analisis kromatografi terhadap fraksi n-heksana menggunakan GC-MS menunjukkan bahwa dalam fraksi tersebut terdapat 20 komponen, seperti terlihat pada Tabel 3. Berdasarkan data spektra fragmentasi komponen-komponen yang ada serta berdasarkan data pustaka yang tersedia dalam instrumen GC-MS, terlihat ada 6 komponen (4, 5, 7, 8, 9, dan 20) atau senyawa yang bersifat sebagai khromofor atau memiliki ikatan rangkap terkonjugasi (memiliki inti benzena dan adanya gugus karbonil atau hidroksil yang terikat pada inti benzena), yang diduga memiliki sifat sebagai antioksidan dan berperan sebagai antitumor. Namun di antaranya terdapat 3 komponen yang sama (7, 8, dan 9), hanya sedikit berbeda dalam waktu retensi, jadi diduga hanya ada 4 senyawa yang aktif. Di antara 4 senyawa yang diduga aktif, 3 senyawa merupakan homolog senyawa benzen dikarboksilat (senyawa lemak yang memiliki inti benzen), kecuali senyawa 5 yang merupakan derivat senyawa fenol. Ketidaksesuaian hasil uji fitokimia dengan hasil analisis GC-MS diduga karena daftar senyawa yang terdapat

Tabel 3. Kemungkinan senyawa pada fraksi heksana dari hasil analisis GC-MS
 Table 3. The estimated compounds in the hexane fraction of the GC-MS analysis

Puncak/ Peak	Waktu retensi/ Retention time (Menit/Minute)	Luas puncak/ Peak area (%)	Berat molekul/ Molecular weight	Kemungkinan nama senyawa/ Estimated compound name
1	5.134	5.96	243	[(2-fluorophenyl)methyl]-1-purin-6-amine
2	20.487	1.01	444	Dodecamethyl-cyclohexasiloxane
3	22.261	1.14	198	n-Tetradecane
4	22.716	1.92	194	Dimethyl ester-1,2-benzenedicarboxylic acid,
5	24.814	1.21	220	4-Methyl-2,6-di-tert-butylphenol
6	24.94	0.79	268	2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane
7	25.725	3.08	222	Diethyl ester-1,2-benzenedicarboxylic acid
8	26.182	29.44	222	Diethyl ester-1,2-benzenedicarboxylic acid
9	28.436	13.53	222	Diethyl ester-1,2-benzenedicarboxylic acid
10	29.425	1.52	268	n-Nonadecane
11	29.606	1.29	242	Methyl ester tetradecanoic acid,
12	34.967	13.21	270	Hexadecanoic acid, methyl ester
13	35.684	2.37	256	Hexadecanoic acid
14	38.689	2	296	Methyl ester-9-octadecanoic acid
15	39.059	2.36	296	Phytol
16	41.358	9.41	318	Methyl arachidonate
17	44.175	1.24	280	tert-Buthyl (E)-3-(trifluoromethyl)-2-decanoate
18	44.358	1.47	296	Octamethyl-cyclotetrasiloxane
19	44.417	1.46	296	Octamethyl-cyclotetrasiloxane
20	44.898	5.6	390	Diisooctyl ester-1,2-benzenedicarboxylic acid
Total		100		

dalam pustaka GC-MS sangat terbatas, tidak memiliki daftar senyawa terpenoid. Ditinjau dari sudut aktivitas, fraksi heksan memiliki toksisitas yang relatif rendah tetapi memiliki sitotoksitas yang relatif tinggi. Suatu kemungkinan adalah senyawa-senyawa tersebut bekerja sinergis sebagai antiproliferasi dan apoptotik terhadap sel tumor HeLa. Untuk mengetahui secara pasti, komponen atau senyawa yang dapat bekerja sebagai antiproliferasi dan apoptotik terhadap sel lestari tumor HeLa maka sedang dilakukan penelitian lanjutan untuk pemurnian atau isolasi masing-masing komponen menggunakan kromatografi kolom gravitasi dan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC), dan dilanjutkan dengan pengujian masing-masing komponen terhadap sel lestari HeLa, yang hasilnya akan disampaikan pada laporan berikutnya. Untuk mengetahui mekanisme kerja dari senyawa tersebut, pada fase mana bekerjanya dalam siklus sel (S, G0, G1, M, G2) maka perlu pengujian lanjutan menggunakan metode sitometri.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak kasar metanol dari alga merah *R. palmata* tidak potensial sebagai bahan baku antioksidan.
2. Hasil uji toksisitas terhadap *Artemia salina* menunjukkan bahwa ekstrak alga merah *R. palmata* fraksi etil asetat memiliki toksisitas yang paling tinggi, diikuti oleh fraksi n-heksana dan fraksi metanol.
3. Hasil uji sitotoksitas terhadap sel lestari tumor HeLa menunjukkan bahwa ekstrak alga merah *R. palmata*, fraksi n-heksana memiliki sitotoksitas yang paling tinggi, diikuti oleh fraksi etil asetat.
4. Hasil analisis kromatografi dengan GC-MS terhadap fraksi n-heksana menunjukkan bahwa dalam fraksi tersebut terdapat 4 komponen senyawa yang bersifat sebagai kromofor atau memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, yang dapat berperan sebagai antioksidan dan diduga bersifat sebagai antiproliferasi terhadap sel lestari tumor HeLa.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, G. 2002. Brine Shrimp Lethality Test (BST) sebagai biossay dalam isolasi senyawa bioaktif dari bahan alam. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. 6(2): 432-436
- Angka, S.L. dan Suhartono, M.T. 2000. *Bioteknologi Hasil Laut*. Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir dan Lautan Institut Pertanian Bogor, Bogor. 149 pp.
- Atmadja, W.S., Kadi, A., Sulistijo dan Rachmaniar. 1996. *Pengenalan Jenis-jenis Rumput Laut Indonesia*. Puslitbang Oseanologi – LIPI, Jakarta. 191pp.
- Carballo, J.L., Hernandez-Inda, Z.L., P. Perez, and Garcia-Gravalos, M.D. 2002. A comparison between two brine shrimp assay to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural product (methodology article). *BMC Biotechnology*. 2: 1-5.
- Chow, S.T., Chaw, W.W. and Chung, Y.C. 2003. Antioxidant activity and safety of 50% ethanolic red bean extract (*Phaseolus raditus* L, Var Aurea). *J. Food Sci.* 68(1): 21-25.
- Dai, M. 2004. *Uji Aktivitas Antiproliferasi Pentagama-vunon-O Terhadap Sel Raji, Sel HeLa, dan Myeloma*. Tesis Program Pascasarjana, UGM, Yogyakarta.
- Guerrero, R.O., Khan, M.T.H., Casanas, B. and Morales, M. 2004. Specific bioassay with selected plants of Bangladesh. *Rev. Cubana Plant Med.* 9(2): 5-13.
- Hughes, D. and Mehmet, H. 2003. *Cell proliferation and apoptosis. Advanced Method*. BIOS Scientific Publisher Ltd, Oxford. 373 pp.
- Jadulco, R.C. 2002. *Isolation and Structure Elucidation of Bioactive Secondary Metabolites from Marine Sponges and Sponges-derived Fungi*. Dissertation. Der Bayerischen Julius-Maximilians, Universitat Wurzburg, Wurzburg. 174 pp.
- Jha, R.K. and Zi-rong, X. 2004. Biomedical compounds from marine organisme. *Marine Drugs*. 2: 123-146.
- Kamiya, H., Endo, Y., Muramoto, K., Uchida, H., Sasaki, T., Uchida, N.A. and Raj, U. 1987. Antitumor activity of the macromolecular fraction from a Fijian Tunicate *Didemnum varians*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 53(3): 493-496.
- Maryati, M.S. 2004. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Dalam Rumput Laut Spesies Caulerpa sertularioides (Vahl) C. Agardh serta uji Antioksidan Terhadap DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dan Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test)*. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta. 59 pp.
- McLaughlin, J.L. and Rogers, L.L. 1998. The use of biological assay to evaluate botanicals. *Drug Information J.* 32: 513-524.
- Meyer, A.M.S. 1999. Marine pharmacology In 1998 : Antitumor and cytotoxic compounds. *The Pharmacologist*. 11(4): 159-164.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putman, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 45: 35-34.
- Misonou, T., Saitoh, J., Oshiba, S., Tokitomo, Y., Maegawa, M., Inoue, Y., Hori, H. and Sakurai, T. 2003. UV-absorbing substance in red alga *Porphyra yezoensis* (Bangialeh, Rhodophyta) block thymine photodimer production. *Mar. Biotechnol.* 5: 194-200.
- Oke, J.M. and Hamburger, M.O. 2002. Screening of some Nigerian medical plants for antioxidant activity using DPPH radical. *African Journal of Biomedical Research*. 5: 77-79.
- Panichayupakaranant, P. and Kaesuwan, S. 2004. Bioassay-guided isolation of antioxidant constituent from

- Cassia alata* L. Leaves. *Songklanakarín J. Sci. Tech.* 26(1): 103-107.
- Rinehart, K.L., Shield, L.S. and Parsons, M.C. 1993. Antiviral substances. In Attaway, D.H. and Zaborsky, O.R. (eds.). *Marine Biotechnology. Vol I. Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*. Plenum Press, New York. p. 309-342.
- Schmitz, F.J., Bowden, B.F. and Toth, S.I. 1993. Antitumor and cytotoxic compounds from marine organisms. In Attaway, D.H. and Zaborsky, O.R. (eds.). *Marine Biotechnology. Vol I. Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*. Plenum Press, New York. p. 197-308.
- Shoeib, N.A., Bibby, M.C., Blunden, G., Linley, P.A., Swaine, D.J., Wheelhouse, R.T. and Wright, C.W. 2004. In-vitro cytotoxic activities of the mayor bromophenols of the red alga *Polysiphonia lanosa* and novel synthetic isomers. *J. Nat. Prod.* Page Est: 4.7. 5 pp.
- Widjhati, R., Supriyono, A. dan Subintoro. 2004. Pengembangan Senyawa Bioaktif dari Biota Laut. Makalah pada Forum Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan, Departemen Kelautan dan Perikanan, Tanggal 25 Maret 2004. 13 pp.
- Windono, T., Soedirman, S., Yudawati, U., Ermawati, E., Srielita, A. dan Erawati, T.I. 2001. Uji peredaman radikal bebas terhadap 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) dari ekstrak kulit buah dan biji anggur (*Vitis vinifera*, L). *Artocarpus*. 1(1): 34-43.