

Aktivitas Pro-Apoptosis Fraksi Air Daun Jawer Kotok (*Plectranthus Scutellaroides*) pada Ekor Larva Katak *Rana Catesbeiana* Stadium Metamorfosis Klimaks

Moelyono Moektiwardoyo, Putu Dian C.D, dan Ajeng Diantini

Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran

Email : moelyono110150@gmail.com

ABSTRAK

Daun Jawer kotok (*Plectranthus scutellaroides*), diketahui banyak mempunyai manfaat dalam pengobatan tradisional, salah satunya sebagai antiinflamasi yang menjadi langkah awal pencarian anti kanker dari tumbuhan. Kanker adalah suatu penyakit yang diakibatkan terjadinya mutasi gen yang mengakibatkan kelainan pada kromosom. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas pro-apoptosis fraksi polar daun jawer kotok (*Plectranthus scutellaroides*) terhadap ekor larva katak *Rana catesbeiana* saat stadium metamorfosis klimaks. Fraksi polar daun jawer kotok diperoleh melalui fraksinasi ekstrak etanol yang diperoleh dengan cara maserasi dalam pelarut non polar, semi polar, dan pelarut polar. Metode pengujian aktivitas pro-apoptosis adalah dengan menghitung frekuensi sel apoptosis diantara sel nekrosis dan sel normal per seribu sel per ekor larva katak di bawah mikroskop. Jenis kematian sel ditentukan dengan pewarnaan Giemsa. Hasil pengujian menunjukkan bahwa fraksi polar daun jawer kotok dengan beberapa variasi dosis mempengaruhi frekuensi sel apoptosis jika dibandingkan dengan kontrol ($\alpha = 0,05$). Frekuensi sel apoptosis tertinggi ditunjukkan oleh dosis 500 mg/kg BB yaitu sebesar 79,51%. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa fraksi polar daun jawer kotok menunjukkan aktivitas pro-apoptosis pada ekor larva katak *Rana catesbeiana* stadium metamorfosis klimaks.

Kata kunci : *Plectratus scutellaroides*, apoptosis, *Rana catesbeiana*

ABSTRACT

Leaves of jawer kotok (Plectranthus scutellaroides) has many benefits in tusing of traditional medicine, one among them is antiinflammation which can be starting point of seeking and discovering of anticancer from plants. Cancer is one of disease due to gen mutation that effect anomaly of chromosom. The purpose of this experiment was to identify the pro-apoptotic activity of polar fraction of jawer kotok leaves on Rana

*catesbeiana tadpole tail in climax metamorphosis phase. Polar fraction was obtained through fractination of ethanolic extract which are made by maceration method in non polar, semi polar, and polar solvents. The method use in this experiment was calculating the apoptotic cell frequency between necrotic cells and normal cells which were counted per one thousand of tadpole tails cells under microscope. The modes of cell death determined by Giemsa staining. The experiment showed that variation of dose of polar fraction of jawer kotok leaves is affecting the frequency of apoptotic cell death compared with control ($\alpha = 0.05$). Dose of 500 mg/kg body weight of water fraction of jawer kotok leaves gave the highest apoptotic cell frequency (79.51 %) between normal and necrotic cell. It can be concluded that polar fraction of jawer kotok leaves has pro-apoptotic activity on *Rana catesbeiana tadpole tail in climax metamorphosis phase*.*

Keywords: *Plectranthus scutellaroides, apoptosis, Rana catesbeiana*

I. LATAR BELAKANG

Jawer kotok (*Plectranthus scutellaroides*) umumnya tumbuh di dataran rendah hingga tempat dengan ketinggian 1300 m di atas permukaan laut. Tumbuhan berbatang basah ini tingginya dapat 1,5 m. Daunnya yang berwarna merah coklat sangat berkhasiat. Bentuk daunnya bulat melancip, berbulu dan bergerigi pada bagian ujung dan tepinya. Batangnya berbentuk segi empat dan mudah patah karena lunak. Bunganya berwarna merah atau putih (de Padua, 1999).

Daun jawer kotok secara tradisional digunakan untuk pengobatan wasir, terlambat haid, keputihan, demam nifas, demam, dan kencing manis. Penelitian Moelyono (2010) menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi polar daun jawer kotok mempunyai aktivitas antiinflamasi pada tikus percobaan. Dalam daun jawer kotok,

diketahui bahwa aktivitas antiinflamasi fraksi polar disebabkan oleh kandungan flavonoidnya (Moelyono, 2010) Aktivitas anti inflamasi umumnya merupakan cikal bakal aktivitas anti kanker. Untuk mengetahui adanya aktivitas antikanker pada daun jawer kotok, dilakukan uji aktivitas pro-apoptosis fraksi pilar daun jawer kotok (*Plectranthus scutellaroides*) pada larva katak

Kanker merupakan suatu penyakit yang menyerang proses dasar kehidupan sel, dan mengubah genom sel yang mengakibatkan pertumbuhan liar sel dan penyebaran sel kanker. Penyebab perubahan genom ini adalah mutasi salah satu gen atau lebih; atau mutasi sebagian besar DNA yang mengandung banyak gen; atau pada beberapa keadaan, penambahan atau pengurangan sebagian besar kromosom (A. Guyton, 1996).

Proses kematian sel dapat berjalan melalui dua mekanisme, yaitu mekanisme nekrosis dan apoptosis. Nekrosis adalah kematian sel dan autolisis dari suatu jaringan yang terjadi dalam tubuh yang hidup. Pelepasan isi sel ini selanjutnya menginduksi respon inflamasi pada jaringan (A. Amin and Susanne, 1997), sedangkan apoptosis adalah kematian sel terprogram, merupakan mekanisme normal kematian sel yang dibutuhkan untuk homeostasis jaringan yang berbeda dengan nekrosis (DiPiro *et al.*, 1997). Proses kematian sel karena apoptosis pada makhluk hidup dapat ditemukan pada pemendekan ekor larva katak (*Rana catesbeiana*) yang terjadi selama proses metamorfosis (Zug, 1993).

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan Penelitian

Bahan penelitian berupa daun jawer kotok yang dikumpulkan dari Kebun Tanaman Obat Manoko, Lembang, yang kepadanya dilakukan proses pendahuluan berupa pengeringan hingga diperoleh bahan kering.

B. Ekstraksi

Serbuk kering ditimbang sekitar 400 g dan diekstraksi dengan etanol tiga kali dua puluh empat jam sebanyak 9 L. Ekstraksi dilakukan pada suhu kamar. Ekstrak etanol yang diperoleh diuapkan pelarutnya

dengan menggunakan *rotary evaporator* di bawah tekanan vakum pada suhu sekitar 60°C hingga diperoleh ekstrak kental, etanol dengan berat 80,95 g. Rendemen hasil ekstraksinya sebesar 20,24 %.

C. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan tiga jenis pelarut yaitu *n*-heksan, etil asetat, dan air. Partisi dilakukan pada ekstrak kental hasil maserasi dengan perbandingan *n*-heksan : air = 1:1. Fraksi *n*-heksan ditampung kemudian ditambahkan kembali *n*-heksan ke dalam fraksi air sejumlah yang sama, dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan untuk mendapatkan fraksi *n*-heksan. Selanjutnya partisi dilanjutkan dengan etil asetat, sehingga diperoleh tiga fraksi yaitu fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air. Fraksi air sebagai fraksi polar digunakan untuk pengujian aktivitas. Dari 30 g ekstrak diperoleh 19,29 g fraksi air. Rendemen hasil fraksinasi sebesar 4,82 %.

D. Uji aktivitas pro-apoptosis fraksi polar

Dua puluh empat ekor larva katak, dikelompokkan menjadi empat kelompok, masing-masing kelompok terdiri atas enam ekor larva katak, yaitu :

1. Kelompok kontrol negatif : diberi suspensi tween 2%
2. Kelompok uji I : diberi suspensi fraksi uji dosis 125 mg/kgBB.
3. Kelompok uji II: diberi suspensi fraksi uji dosis 250 mg/kgBB.
4. Kelompok uji III : diberi suspensi fraksi uji dosis 500 mg/kg BB.

Pengujian aktivitas pro-apoptosis menggunakan larva katak *Rana catesbeiana* stadium metamorfosis klimaks. Perlakuan dilakukan secara peroral dengan dosis yang telah ditentukan. Setelah 24 jam ekor larva katak siap untuk dipotong. Ekor larva katak dipotong sepertiga bagian dari posterior, dicuci dalam larutan MSS (*Modified Steinberg Solution*), lalu dipotong-potong menjadi bagian yang lebih kecil, direndam selama kurang lebih 10 menit dalam larutan tripsin 0,2 %. Kemudian dilakukan pemanasan dalam inkubator pada suhu 31-33 °C selama 15 menit untuk mengaktifkan kerja tripsin hingga diperoleh suspensi. Suspensi dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi dan ditambahkan larutan MSS sebanyak 1 mL, dilakukan agitasi sekira 15 menit, kemudian dilanjutkan dengan sentrifugasi kecepatan 1000 rpm hingga diperoleh supernatant dan dekantat yang merupakan suspensi sel pekat. Ke dalam dekantat ditambahkan 1 mL kalium klorida hipotonik, didiamkan selama lima menit,

lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm. Supernatant dibuang dan dekantat difiksasi menggunakan asam asetat dan metanol (1:3) selama 24 jam. Suspensi sel siap untuk dibuat preparat.

Untuk membuat preparat, suspensi sel diteteskan di atas kaca objek dengan menggunakan pipet tetes dan dikeringkan di atas *heating plate*, kemudian preparat diwarnai dengan Giemsa selama 1-3 menit lalu dibilas di bawah air mengalir. Preparat ditutup dengan kaca penutup dan siap untuk diamati di bawah mikroskop.

Jumlah sel apoptosis dihitung per seribu sel per ekor larva katak. Dengan cara yang sama, dihitung juga jumlah sel normal dan sel nekrosis untuk mengetahui frekuensi sel apoptosis diantara sel normal dan sel nekrosis. Sel apoptosis dikenali melalui adanya *blebbing* membran, kondensasi dan marginalisasi kromatin, kondensasi sitoplasma, volume sel yang menyusut, membran inti hancur, fragmentasi inti, dan adanya badan apoptosis. Sel nekrosis dikenali melalui ukuran sel yang bertambah besar, sel dan organel-organelnya hancur, serta sel mengalami lisis (Ziori et al, 2003; Chen, 2004)

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah perlakuan dengan pemberian fraksi polar daun jawer kotok dalam variasi dosis yang digunakan terhadap larva katak *Rana catesbeiana*, dan

perlakuan untuk mengamati sel apoptosis, seperti tercantum pada tabel berikut : sel normal, dan sel nekrosis, diperoleh data

Tabel 1. Frekuensi Sel Apoptosis di antara Sel Normal dan Sel Nekrosis

No	Dosis mg/kg BB	Larva ke	JmL Sel Yang Diamati	Sel Apoptosis		Sel Nekrosis		Sel Normal	
				JmL.	%	JmL.	%	JmL.	%
1	0	(1)	1000	515	51,5	183	18,3	302	30,2
		(2)	1000	538	53,3	230	23,0	232	23,2
		(3)	1000	509	50,9	291	29,1	200	20,0
		(4)	1000	542	54,2	203	20,3	255	25,5
		(5)	1000	528	52,8	247	24,7	225	22,5
		(6)	1000	511	51,1	223	22,3	266	26,6
		Rata-rata ± SD				523,83 14,22	52,38 1,42	229,50 37,40	22,95 3,74
2	125	(1)	1000	696	69,6	233	23,3	71	7,1
		(2)	1000	722	72,2	173	17,3	105	10,5
		(3)	1000	715	71,5	188	18,8	97	9,7
		(4)	1000	682	68,2	239	23,9	79	7,9
		(5)	1000	702	70,2	183	18,3	115	11,5
		(6)	1000	725	72,5	137	13,7	138	13,8
		Rata-rata ± SD				707,00 16,64	70,70 1,66	192,17 38,40	19,21 3,84
3	250	(1)	1000	757	75,7	160	16,0	83	8,3
		(2)	1000	724	72,4	192	19,2	84	8,4
		(3)	1000	765	76,5	158	15,8	77	7,7
		(4)	1000	761	76,1	167	16,7	72	7,2
		(5)	1000	728	72,8	163	16,3	109	10,9
		(6)	1000	743	74,3	182	18,2	75	7,5
		Rata-rata ± SD				746,33 17,45	74,63 1,74	170,33 13,63	17,03 1,36
4	500	(1)	1000	784	78,4	143	14,3	73	7,3
		(2)	1000	792	79,2	139	13,9	69	6,9
		(3)	1000	779	77,9	143	14,3	78	7,8
		(4)	1000	812	81,2	125	12,5	63	6,3
		(5)	1000	821	82,1	114	11,4	65	6,5
		(6)	1000	783	78,3	126	12,6	91	9,1
		Rata-rata ± SD				795,17 17,29	79,51 1,72	131,67 11,83	13,16 1,18

Sel apoptosis pada kelompok perlakuan pemberian fraksi polar daun jawer kotok menunjukkan peningkatan frekuensi sesuai dengan peningkatan dosis dibandingkan kontrol. Frekuensi sel nekrosis pada kelompok perlakuan

pemberian fraksi polar daun jawer kotok menunjukkan penurunan frekuensi yang lebih rendah bila dibandingkan dengan kontrol sebanding dengan dosis yang digunakan. Hal itu menunjukkan bahwa fraksi polar daun jawer kotok mempunyai

aktivitas proapoptosis meningkat sesuai dengan dosis yang diberikan. Aktivitas

pro-apoptosis tertinggi diberikan oleh fraksi dosis 500 mg/kg BB, yaitu 79,51 %.

Tabel 2. Persentase Frekuensi Sel Apoptosis Diantara Frekuensi Sel Normal dan Sel Nekrosis

No	Dosis mg/kg bb	Sel Apoptosis Rata-rata ± SD	Sel Nekrosis Rata-rata ± SD	Sel Normal Rata-rata ± SD
1.	0	52,38 ± 1,42	22,95 ± 3,74	24,67 ± 3,57
2.	125	70,70 ± 1,66	19,21 ± 3,84	10,08 ± 2,44
3.	250	74,63 ± 1,74	17,03 ± 1,36	8,33 ± 1,33
4.	500	79,51 ± 1,72	13,17 ± 1,18	7,31 ± 1,02

Melalui Analisis variansi pada taraf kepercayaan 95 % diperoleh hasil bahwa setiap kelompok perlakuan menunjukkan frekuensi sel apoptosis, nekrosis, dan sel normal berbeda nyata untuk setiap dosis yang diberikan.

Uji Newman-Keuls menunjukkan bahwa ketiga kelompok perlakuan dosis 125 mg/kg BB, 250mg/kg BB, dan 500 mg/kg BB memberikan efek yang berbeda terhadap peningkatan frekuensi apoptosis dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Fraksi polar daun jawer kotok dengan dosis 500 mg/kg BB, memberikan pengaruh signifikan terhadap jumlah sel nekrosis, bila dibandingkan dengan perlakuan dosis lain maupun kontrol negatif.

Ditemukannya sel apoptosis pada kelompok kontrol dikarenakan apoptosis itu sendiri merupakan sebuah proses normal yaitu kematian sel yang terprogram, sel dapat menjalankan program kematian selnya sendiri tanpa

adanya rangsangan dari luar atau lewat jalur intrinsik (Harja & Liu, 2004). Terdapatnya sel apoptosis pada kelompok kontrol juga dikarenakan larva katak yang digunakan dalam percobaan adalah yang telah mencapai stadium metamorfosis klimaks, pada tahap ini kematian sel pada ekor larva katak akan mencapai jumlah yang maksimal (W. Duellman and L. Trueb, 1986).

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas pro-apoptosis fraksi polar daun jawer kotok (*Plectranthus scutellaroides*) pada ekor larva katak *Rana catesbeiana* saat metamorfosis klimaks dapat diambil simpulan bahwa fraksi polar daun jawer kotok mempunyai aktivitas pro-apoptosis Dosis 500mg/kg BB mempunyai aktivitas pro-apoptosis paling optimal sebesar 79,51 %.

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, A., Susanne. 1997. Apoptosis And Necrosis. *Alcohol Health & Research World*. 21(4):325-329.
- Bar, P.R. 1996. Apoptosis: The Cell's Silent Exit. *Life Science*. 59(5):369-378.
- Bold R.J., P.M. Termuhlen and D.J. McConkey. 1997. Apoptosis, Cancer and Cancer Therapy. *Surgical Oncology*. 6(3):133-142.
- Chen, Z. 2004. *Neuron Cell Death*. USA : Washington University School of Medicine
- de Padua, L.S. 1999. *Plant Resources of South-East Asia I. Medicinal and Poisonous Plants* 1. Leiden: Backhuys Publishers. P. 408-409.
- DiPiro, J.T., R.L. Talbert and G.C. Yee, G.R. 1997. *Pharmacotherapy. A Pathophysiologic Approach*, 6th Ed. Connecticut: Appleton and Lange. 2405
- Duellman, W.E., L. Trueb. 1986. *Biology of Amphibians*. New York : Alan P. Liss. 99-118.
- Freshney, R.I. 1983. *Culture of Animal Cells*. New York : Alan P. Liss. 99-118.
- Guyton, A.C. 1996. *Fisiologi Manusia dan Mekanisme Penyakit*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. 31
- Harja, K.M., J.R. Liu, 2004. Apoptosome Dysfunction in Human Cancer. *Apoptosis*. 9: 691-704.
- Moelyono MW, 2010, *Etnofarmasi Daun Jawer Kotok (Plectranthus scutellaroides (L.)R.Br. Sebagai Anti Radang Komunitas Tatar Sunda*, Disertasi, Universitas Padjadjaran
- Ziori, C. Ch., Th. Z. Charilaos dan K. K. Michael. 2003. Apoptosis in Heart Failure. *Hellenic Journal of Cardiology*. 44: 56 – 70.
- Zug, G.R. 1993. *Herpetology. An introductory Biology Of Amphibians And Reptiles*. London: Academic Press. P. 38