

BIOAKTIVITAS EKSTRAK KASAR ASETON, FRAKSI, DAN SUBFRAKSINYA DARI *Ulva fasciata* TERHADAP SEL LESTARI TUMOR HeLa

Thamrin Wikanta^{*)}, Andika Prabukusuma^{**)}, Dian Ratih^{**)}, dan Hedi Indra Januar^{*)}

ABSTRAK

Telah dilakukan pengujian bioaktivitas ekstrak kasar aseton, fraksi, dan subfraksinya dari *Ulva fasciata* terhadap sel lestari tumor HeLa. *U. fasciata* dimaserasi dalam aseton lalu ekstrak disaring dan pelarut dievaporasi. Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak kasar aseton *U. fasciata* mengandung golongan senyawa flavonoid, steroid, dan saponin. Ekstrak kasar tersebut memiliki aktivitas antioksidan ($IC_{50} = 411,81 \mu\text{g/mL}$) lebih rendah dibandingkan vitamin C sebagai kontrol ($IC_{50} = 5,01 \mu\text{g/mL}$). Ekstrak kasar aseton dipartisi menggunakan heksan, etil asetat, dan metanol-air. Hasil uji toksisitas terhadap *Artemia salina* menunjukkan nilai LC_{50} dari ekstrak kasar aseton, fraksi heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi metanol-air masing-masing sebesar 103,86; 128,03; 63,07; dan 406,05 $\mu\text{g/mL}$. Hasil uji sitotoksitas terhadap sel lestari tumor HeLa menunjukkan nilai IC_{50} dari ekstrak kasar aseton, fraksi heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi metanol-air masing-masing sebesar 62,86; 43,56; 18,85; dan 37,56 $\mu\text{g/mL}$. Fraksi etil asetat yang memiliki sitotoksitas tertinggi kemudian difraksinasi melalui kolom khromatografi Septra C-18 dengan elusi gradien polaritas menghasilkan 6 subfraksi. Hasil uji sitotoksitas masing-masing subfraksi terhadap sel lestari tumor HeLa pada konsentrasi 19 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan nilai inhibisi: subfraksi-1 negatif (non-aktif); subfraksi-2 > 100% (sitotoksik); subfraksi-3 > 100% (sitotoksik); subfraksi-4 > 100% (sitotoksik); subfraksi-5 < 50% (non-aktif); dan subfraksi-6 = 100% (sitostatik).

ABSTRACT: *Bioactivity of acetone crude extract, fraction and subfraction of Ulva fasciata against HeLa tumor cell line. By: Thamrin Wikanta, Andika Prabukusuma, Dian Ratih and Hedi Indra Januar*

Bioactivity assay on acetone crude extract, fraction and subfraction of Ulva fasciata against HeLa tumor cell line has been conducted. U. fasciata was macerated in acetone and the extract was then filtered and the solvent evaporated. Result of phytochemistry test showed that the U. fasciata acetone crude extract contained flavonoid, steroid and saponin group compounds. The crude extract had lower antioxidative activity ($IC_{50} = 411.81 \mu\text{g/mL}$) compared to vitamin C as a control ($IC_{50} = 5.01 \mu\text{g/mL}$). The acetone crude extract was partitioned using hexane, ethyl acetate, and methanol-water. The toxicity assay against Artemia salina showed that the LC_{50} value of the acetone crude extract, hexane fraction, ethyl acetate fraction, and methanol-water fraction were 103.86; 128.03; 63.07 and 406.05 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The cytotoxicity assay against HeLa tumor cell line showed that the IC_{50} value of the acetone crude extract, hexane fraction, ethyl acetate fraction and methanol-water fraction were 62.86; 43.56; 18.85 and 37.56 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The ethyl acetate fraction having the highest cytotoxicity; was then fractionated through Septra C-18 column chromatography and eluted by gradient polarity resulting in 6 subfractions. Cytotoxicity assay of each subfraction against HeLa tumor cell line at concentration of 19 $\mu\text{g/mL}$ showed the inhibition value of subfraction-1 negative (non-active); subfraction-2 > 100% (cytotoxic); subfraction-3 > 100% (cytotoxic); subfraction-4 > 100% (cytotoxic); subfraction-5 < 50% (non-active) and subfraction-6 = 100% (cytostatic).

KEYWORDS: *antitumor activity, acetone extract, Ulva fasciata, HeLa tumor cell line*

PENDAHULUAN

Sumber daya biota laut merupakan aset potensial yang dapat didayagunakan menjadi aneka produk termasuk di antaranya produk farmasi karena merupakan bahan alam yang sangat kaya senyawa

aktif biologi dengan struktur yang unik. Beberapa di antaranya mempunyai aktivitas antihipertensi dan antitumor, dan ada juga yang mempunyai aktivitas sebagai stimulan kekebalan dan penghambat enzim tertentu. Selama 30 tahun terakhir, lebih dari 7000 senyawa aktif berhasil diisolasi dari biota laut dan

^{*)} Peneliti pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan; E-mail: thamrin_wikanta@yahoo.com

^{**)} Staf Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta

digunakan sebagai rujukan dalam pengembangan obat baru (Widjhati *et al.*, 2004; Sumaryono & Eruwibowo, 2005; Fajarningsih *et al.*, 2006).

Rumput laut atau alga laut di Indonesia potensinya sangat besar untuk dikembangkan sebagai bahan baku obat. Selama ini pemanfaatan rumput laut dalam bidang farmasi masih sangat terbatas. Pemanfaatan secara massal adalah sebagai sumber agar, karaginan, dan alginat yang merupakan metabolit primer, sedangkan pemanfaatan metabolit sekundernya masih sangat terbatas bahkan belum berkembang (Wikanta *et al.*, 2005; Fajarningsih *et al.*, 2008; Marraskuranto *et al.*, 2008).

Dalam pengobatan tradisional, rumput laut telah lama digunakan untuk pengobatan berbagai jenis penyakit, seperti *anticurare*, penurunan panas, eksim, batu empedu, gondok, gangguan menstruasi, dan gangguan ginjal (Wikanta *et al.*, 2005; Wikanta *et al.*, 2008). Rumput laut menghasilkan substansi senyawa bioaktif dalam bentuk turunan steroid, yaitu steroid bebas, ester steroid, dan glikosida steroid. Selain itu rumput laut juga menghasilkan senyawa yang memiliki aktivitas antitumor yaitu senyawa lanosol dan derivatnya, yang termasuk golongan fenol terhalogenasi (Atmadja *et al.*, 1996). Beragamnya manfaat rumput laut tersebut mendorong para ahli untuk mencari kemungkinan obat antitumor baru dari rumput laut.

Saat ini, kanker atau tumor ganas masih merupakan penyebab kematian yang tinggi di dunia. Berbagai usaha dilakukan para ilmuwan untuk menemukan obat antitumor, baik yang bekerja sebagai penghambat berkembangnya sel tumor maupun sebagai pemusnah sel tumor. Salah satu penyebab tumor adalah terjadinya akumulasi radikal bebas yang berlebihan sehingga tubuh tidak mampu menetralkannya. Terapi kanker yang ada saat ini masih belum efektif, banyak obat antikanker dengan indikasi terapeutik yang rendah, tidak semua pasien dan atau jenis kanker responsif terhadap obat-obat antikanker. Di samping itu, banyak obat-obat antikanker yang menimbulkan efek resisten dan efek samping seperti gangguan sumsum tulang, hati, dan ginjal dalam pengobatan jangka pendek, sedangkan dalam pengobatan jangka panjang mengakibatkan gangguan fungsi hati, fibrosis, dan sirosis. Oleh karena itu pencarian senyawa obat antitumor baru dengan struktur kimia dan mekanisme reaksi yang berbeda sangat diperlukan (Fajarningsih *et al.*, 2006).

Kanker serviks (leher rahim) adalah tumor ganas yang tumbuh pada leher rahim, dan biasanya menyerang wanita berusia 35-55 tahun. Sekitar 90% dari kanker serviks berasal dari sel skuamosa yang melapisi serviks dan 10% sisanya berasal dari sel kelenjar penghasil lendir pada saluran servikal yang

menuju ke dalam rahim. Penyebab terjadinya kelainan pada sel-sel serviks tidak diketahui secara pasti, tetapi ada beberapa faktor resiko yang berpengaruh terhadap terjadinya kanker serviks (Dalimartha, 2003), di antaranya : (1) *Human Papilloma Virus* (HPV) yaitu virus penyebab kutil genitalis yang ditularkan melalui hubungan seksual; (2) Merokok sehingga dapat merusak sistem kekebalan dan mempengaruhi kemampuan tubuh untuk melawan infeksi HPV pada serviks; (3) Hubungan seksual pada usia dini; (4) Berganti-ganti pasangan seksual; (5) Pemakaian *Diethylbestrol* (DES) pada wanita hamil untuk mencegah keguguran; (6) Gangguan sistem kekebalan; (7) Pemakaian pil KB; dan (8) Infeksi herpes menahun.

Salah satu biota laut yang berpotensi sebagai antitumor adalah rumput laut *Ulva fasciata* (Marraskuranto *et al.*, 2008) yang memiliki kandungan klorofil-a, karoten, xantofil, *lutein*, protein, asam folat dan berbagai jenis mineral, seperti : Ca, K, Mg, Na, Cu, Fe, dan Zn. *U. fasciata* banyak dikenal sebagai *sea vegetable* yang bermanfaat sebagai obat antijamur, antibakteri dan antihipertensi (Atmadja, 1992). Dalam industri makanan digunakan sebagai pembungkus makanan yang langsung dapat dimakan. Dalam bidang peternakan digunakan sebagai bahan campuran industri pakan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi bioaktivitas ekstrak kasar aseton, masing-masing fraksi dan subfraksinya dari *U. fasciata* terhadap proliferasi sel lestari tumor HeLa (sel kanker serviks atau leher rahim).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Sampel

Sebanyak ± 4 kg rumput laut *U. fasciata* segar yang diperoleh dari pantai Binuangen Banten Selatan di maserasi di dalam wadah yang mengandung pelarut 10 L aseton, ditutup dan dibiarkan selama 3 x 24 jam. Filtrat disaring menggunakan kertas saring *Whatman* no. 1. Maserasi dilakukan sebanyak satu kali. Filtrat yang diperoleh dipekatkan pada suhu 30°C dan tekanan 50 mbar menggunakan rotavapor *Buchi V-805* hingga didapatkan ekstrak kental, lalu pengeringan disempurnakan menggunakan *freeze dryer Freezon* 4,5 pada tekanan 0,20 mbar dan suhu -40°C sehingga diperoleh ekstrak padat kering.

Ekstraksi *U. fasciata* dilakukan dengan cara maserasi pada suhu kamar, diharapkan dengan cara tersebut tidak merusak senyawa organik yang terkandung dalam ekstrak tersebut. Evaporasi dilakukan pada suhu kamar dan tekanan rendah agar

aseton dapat menguap dengan cepat dan sempurna. Ekstrak kental hasil evaporasi dikeringkan pada suhu dan tekanan rendah agar sisa air yang terdapat dalam ekstrak tertarik.

Sel lestari tumor HeLa (HeLa tumor cell line)

Sel lestari tumor HeLa diperoleh dari hasil kultur di Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Jakarta.

Metode

Penapisan fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui jenis golongan senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak kasar aseton *U. fasciata*, di antaranya terhadap senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid, dan triterpenoid (Harborne, 1996).

Uji antioksidan dengan DPPH

Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat menetralkan atau meredam aktivitas radikal bebas dan menghambat terjadinya oksidasi pada sel tubuh, sehingga mengurangi terjadinya kerusakan. Radikal bebas dapat merusak molekul makro pembentuk sel yaitu protein, karbohidrat, lemak, dan asam deoksiribonukleat (DNA). Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metoda Chow *et al.* (2003), yang bertujuan untuk mengetahui potensi aktivitas antioksidan senyawa dalam ekstrak, berdasarkan prinsip adanya reaksi penangkapan hidrogen dari antioksidan oleh radikal bebas difenil pikril hidrazil (DPPH). Uji aktivitas antioksidan terhadap DPPH dilakukan karena teknik pengerjaannya sederhana dan jumlah sampel yang digunakan sedikit (Hernani, 2005; Wikanta *et al.*, 2005).

Sebanyak 5 mg sampel ekstrak kasar aseton *U. fasciata* dilarutkan dalam 5 mL metanol sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm (larutan induk). Larutan induk dipipet sebanyak 62,5 μ L, 125 μ L, 250 μ L, 500 μ L, dan 1000 μ L kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi untuk mendapatkan konsentrasi sampel 12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, dan 200 ppm. Ke dalam masing-masing tabung ditambahkan 1 mL larutan DPPH 1 mM kemudian ditambahkan metanol hingga menjadi 5 mL. Setelah homogen, diinkubasikan dalam penangas air 37°C selama 30 menit. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 515 nm (Wikanta *et al.*, 2005).

Pembuatan larutan Vitamin C (kontrol positif)

Sebanyak 5 mg Vitamin C dilarutkan dalam 5 mL metanol hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi

1000 ppm (larutan induk). Larutan induk dipipet sebanyak 15 μ L, 30 μ L, 45 μ L, 60 μ L, dan 75 μ L dimasukkan ke dalam tabung reaksi untuk mendapatkan konsentrasi 3 ppm, 6 ppm, 9 ppm, 12 ppm, dan 15 ppm. Ke dalam masing-masing tabung ditambahkan metanol sampai 5 mL. Setelah homogen diinkubasikan selama 30 menit pada suhu 37°C. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 515 nm (Wikanta *et al.*, 2005; Wikanta *et al.*, 2007).

Uji toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach

Uji bioaktivitas menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach yang dikenal dengan istilah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) memiliki spektrum aktivitas farmakologi yang luas, mudah dilakukan, sederhana, cepat dan tidak memerlukan biaya besar, dengan tingkat kepercayaan 95%. Dalam BSLT, tingkat toksisitas dinyatakan dengan nilai LC_{50} , yaitu konsentrasi senyawa yang menghasilkan tingkat mortalitas sebesar 50%. Senyawa aktif akan menghasilkan mortalitas yang tinggi. Semakin kecil nilai LC_{50} semakin besar toksisitasnya. Suatu sampel terhadap udang *Artemia salina* Leach dinyatakan sangat toksik bila nilai $LC_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$, dinyatakan toksik bila nilai $LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$, dan dinyatakan tidak toksik bila nilai $LC_{50} \geq 1000 \mu\text{g/mL}$ (Meyer *et al.*, 1982; Carballo *et al.*, 2002).

Uji sitotoksitas secara *in vitro*

Pengujian sitotoksitas secara *in vitro* lebih cepat dan hemat karena membutuhkan sedikit bahan uji, dan dapat digunakan secara luas jika dibandingkan dengan pengujian secara *in vivo* (Wilson, 2002). Pada penelitian ini pengujian dilakukan menggunakan pereaksi 3-(4,5-dimetilthiazolil-2)-2,5-difenil tetrazolium bromida (MTT) menurut metode Zachary (2003). Senyawa MTT yang berwarna kuning dan larut air, di dalam sel hidup akan dipecah oleh enzim membentuk formazan berwarna biru yang tidak larut air, selanjutnya dilarutkan dalam pelarut organik, dan dideteksi secara spektrofotometri. Absorbansi yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi larutan biru formazan yang menggambarkan aktivitas metabolisme sel (Torres *et al.*, 2005; Wikanta *et al.*, 2005).

Stok larutan sampel dibuat dengan melarutkan 5 mg sampel dalam 1 mL DMSO 4%, kemudian larutan sampel dibuat dengan seri dosis 25, 50, 100, dan 200 ppm. Tiap dosis larutan sampel dimasukkan ke dalam *microplate* 96 well sebanyak 100 μ L dengan 2 replikasi. Sel HeLa dimasukkan ke dalam tiap *well* sebanyak 100 μ L. Dibuat 3 buah kontrol yang terdiri dari kontrol sel (100 μ L sel + 100 μ L media), kontrol sampel (100 μ L ekstrak + 100 μ L media) dan kontrol

media (200 µL media) dalam well. Plate diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan aliran CO₂ 5 mL/menit. Setelah 24 jam, ke dalam tiap well ditambahkan larutan MTT sebanyak 10 µL, lalu plate diinkubasi kembali dalam CO₂ inkubator selama 4 jam. Reaksi MTT dihentikan dengan cara menambahkan 100 µL sodium dodesil sulfat (SDS) 10%. Plate diinkubasi selama 12 jam pada suhu kamar, lalu absorbansi tiap well dibaca dengan spectrophotometric plate reader pada panjang gelombang 560 nm. Nilai inhibisi dinyatakan dalam persen yang dihitung dengan rumus :

$$\text{Inhibisi pertumbuhan (I)} = [(A - B) / A] \times 100\%$$

Keterangan:

A = Absorbansi pada kontrol (kontrol sel–kontrol media)

B = Absorbansi pada sampel (perlakuan sampel–kontrol sampel)

Data persen kematian sel digunakan untuk menghitung IC₅₀. Persen kematian dikonversi menjadi harga probit versus log konsentrasi. Persamaan garis linier yang diperoleh digunakan untuk menghitung harga IC₅₀ (Wikanta *et al.*, 2005; Wikanta *et al.*, 2007).

Fraksinasi (partisi cair-cair)

- Sebanyak 13,61 g ekstrak kasar aseton *U. fasciata* dipartisi dalam corong pisah dengan pelarut air/etil asetat (3:1). Setelah dikocok dan dibiarkan memisah, fraksi etil asetat dipisahkan dan dievaporasi hingga kering yang siap untuk pengujian.
- Sebagian dari ekstrak fraksi etil asetat *U. fasciata* dipartisi dalam corong pisah dengan pelarut 10%

metanol-air/heksan (1:1). Setelah dikocok dan dibiarkan memisah, fraksi metanol-air dan fraksi heksan dipisahkan dan masing-masing dievaporasi hingga kering dan siap untuk pengujian.

Fraksinasi (kromatografi kolom)

- Sebagian dari ekstrak fraksi etil asetat *U. fasciata* dilarutkan dalam 10 mL metanol sampai larut sempurna, kemudian dimasukkan ke dalam kromatografi kolom berisi sepra C-18 yang telah dibilas dengan metanol.
- Sampel dielusi dengan pelarut sesuai fraksi berikut berdasarkan penurunan polaritas:
 - 1) Sebanyak 200 mL metanol-air (75% : 25%)
 - 2) Sebanyak 50 mL metanol (100%)
 - 3) Sebanyak 50 mL metanol : diklormetan (75% : 25%)
 - 4) Sebanyak 50 mL metanol : diklormetan (50% : 50%)
 - 5) Sebanyak 50 mL metanol : diklormetan (25% : 75 %)
 - 6) Sebanyak 100 mL diklormetan (100%)
- Masing-masing fraksi yang diperoleh dievaporasi hingga kering dan siap untuk pengujian.

HASIL DAN BAHASAN

Penapisan Fitokimia

Pada identifikasi golongan senyawa kimia yang ada di dalam ekstrak kasar aseton tersebut didapatkan bahwa ekstrak kasar aseton mengandung senyawa flavonoid, steroid, dan saponin. Ini terbukti dengan reaksi positif terhadap masing-masing identifikasi yang dilakukan, tetapi terhadap identifikasi

Tabel 1. Hasil penapisan fitokimia ekstrak kasar aseton dari *U. fasciata*
Table 1. Phytochemistry test result of *U. fasciata* acetone crude extract

Golongan Senyawa/ Group of Compound	Hasil/ Result	Keterangan/Remark
Alkaloid/Alkaloid	(-)	Tidak terbentuk warna jingga/No orange colour was formed Tidak terbentuk endapan putih/No white precipitation was formed
Flavonoid/Flavonoid	(+)	Terbentuk warna hijau pada lapisan amil alkohol/ Green colour on the amyl alcohol layer was formed
Saponin/Saponin	(+)	Terbentuk busa stabil/A stabil foam was formed
Tanin/Tanin	(-)	Tidak terbentuk warna hitam-biru-hitam/No black-blue-black colour was formed
Steroid/Steroid	(+)	Terbentuk warna hijau steroid/Green colour of steroid was formed
Triterpenoid/Triterpenoid	(-)	Tidak terbentuk warna merah/No red colour was formed

Keterangan/Note: (-) reaksi negatif/negative reaction; (+) reaksi positif/positive reaction

lainnya menunjukkan reaksi negatif seperti disajikan pada Tabel 1.

Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan senyawa-senyawa pada ekstrak kasar aseton berdasarkan tingkat kepolarannya menggunakan pelarut *n*-heksan (non-polar), etil asetat (semi-polar), dan metanol-air (polar). Pada fraksi heksan didapatkan rendemen 0,20%; etil asetat 0,37%; dan metanol-air 0,15%. Sebagian besar dari ekstrak adalah zat pengotor yang diperkirakan berupa garam-garam yang tertarik karena larut dalam air, sedangkan air yang bersifat polar, sedikit larut di dalam pelarut aseton yang bersifat sedikit polar.

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Aseton *U. fasciata* terhadap DPPH

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan maksud untuk mengetahui adanya aktivitas antioksidan. Hasil uji aktivitas antioksidan terhadap DPPH menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak kasar aseton *U. fasciata* jauh lebih kecil dibandingkan Vitamin C yang dijadikan kontrol. Hal ini membuktikan bahwa *U. fasciata* tidak potensial sebagai antioksidan karena nilai IC₅₀ dari ekstrak kasar aseton 411,81 µg/mL jauh lebih besar dibandingkan nilai IC₅₀ dari Vitamin C yaitu 5,01 µg/mL.

Apabila asupan radikal bebas ke dalam tubuh berlebihan dan sistem antioksidan dalam tubuh tidak dapat meredamnya maka dapat terjadi berbagai reaksi yang menyimpang, di antaranya terjadi peroksidasi pada sistem membran sel, yang pada gilirannya sel akan mengalami mutasi, yang selanjutnya dapat menimbulkan gejala tumor (Boik, 1996). Apabila ekstrak dari *U. fasciata* dapat meredam radikal bebas yang terbentuk dan dapat mematikan sel yang mengalami mutasi, maka ekstrak tersebut kemungkinan dapat bermanfaat untuk bidang kesehatan sebagai antioksidan. Hasil uji aktivitas antioksidan terhadap DPPH dari Vitamin C yang digunakan sebagai kontrol positif dan dari ekstrak kasar aseton *U. fasciata* dapat dilihat pada Tabel 2. Nilai IC₅₀ dihitung berdasarkan persamaan garis regresi yang diperoleh antara konsentrasi dan inhibisi

(%). Diperoleh persamaan garis regresi untuk Vitamin C yaitu : $Y = 5,43 X + 22,84$ dengan nilai $r = 0,94$ dan untuk ekstrak kasar aseton yaitu : $Y = 0,12 X - 1,11$ dengan nilai $r = 0,99$.

Hasil uji aktivitas antioksidan terhadap DPPH untuk Vitamin C diperoleh nilai IC₅₀ sebesar 5,01 µg/mL, artinya konsentrasi Vitamin C yang diperlukan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH adalah 5,01 µg/mL. Semakin rendah nilai IC₅₀, semakin tinggi aktivitasnya sebagai penangkap radikal bebas DPPH. Nilai IC₅₀ dari ekstrak kasar aseton *U. fasciata* adalah 411,81 µg/mL yang berarti potensi aktivitas antioksidannya sekitar 1,22% dari Vitamin C. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kasar aseton *U. fasciata* memiliki potensi antioksidan sangat rendah dibandingkan dengan Vitamin C yang menjadi kontrol positif.

Uji Toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach

Metode ini digunakan sebagai uji tahap awal senyawa sitotoksik dari ekstrak bahan alam terhadap larva udang *Artemia salina* Leach, yang dikenal dengan istilah BSLT (Meyer *et al.*, 1982; Carballo *et al.*, 2002).

Hasil uji toksisitas ekstrak kasar aseton, fraksi heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi metanol-air dari *U. fasciata* terhadap *A. salina* disajikan pada Tabel 3. Hasil uji untuk ekstrak kasar aseton menghasilkan persamaan garis regresi linier $Y = -0,32 + 2,64 X$ dengan nilai $r = 0,92$ dan diperoleh nilai LC₅₀ ekstrak kasar aseton *U. fasciata* sebesar 103,86 µg/mL < 1000 µg/mL. Hasil uji untuk fraksi heksan menghasilkan persamaan garis regresi linier $Y = -1,54 + 3,11 X$ dengan nilai $r = 0,97$ dan diperoleh nilai LC₅₀ fraksi heksan *U. fasciata* sebesar 128,03 µg/mL < 1000 µg/mL. Hasil uji untuk fraksi etil asetat menghasilkan persamaan garis regresi linier $Y = -5,31 + 5,73 X$ dengan nilai $r = 0,98$ dan diperoleh nilai LC₅₀ fraksi etil asetat *U. fasciata* sebesar 63,07 µg/mL < 1000 µg/mL. Hasil uji untuk fraksi metanol-air menghasilkan persamaan garis regresi linier $Y = -1,14 + 6,91 X$ dengan nilai $r = 0,96$ sehingga diperoleh

Tabel 2. Aktivitas antioksidan Vitamin C dan ekstrak kasar aseton *U. fasciata* terhadap DPPH
 Table 2. Antioxidative activity of Vitamin C and *U. fasciata* acetone crude extract against DPPH

Sampel/Sample	IC ₅₀ / (µg/mL)
Vitamin C	5.01
Ekstrak kasar aseton <i>U. fasciata</i> / <i>U. fasciata</i> acetone crude extract	411.81

nilai LC_{50} fraksi metanol-air *U. fasciata* sebesar 406,05 $\mu\text{g/mL}$ < 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Ekstrak kasar aseton, fraksi heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi metanol-air dari *U. fasciata* terhadap *Artemia salina* semua memiliki toksisitas dengan nilai LC_{50} < 1000 $\mu\text{g/mL}$ sehingga semua termasuk kategori toksik, di mana fraksi etil asetat adalah yang paling toksik. Berdasarkan hasil tersebut observasi dapat dilanjutkan pada pengujian bioaktivitas terhadap sel lestari tumor.

Uji Sitotoksitas Ekstrak Kasar Aseton, Fraksi Heksan, Fraksi Etil Asetat, dan Fraksi Metanol-air dari *U. fasciata* terhadap Sel Lestari Tumor HeLa

Hasil uji sitotoksitas ekstrak kasar aseton, fraksi heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi metanol-air dari *U. fasciata* terhadap sel lestari tumor HeLa disajikan pada Tabel 3. Terlihat bahwa ekstrak kasar aseton *U. fasciata* memiliki toksisitas cukup baik dengan nilai IC_{50} sebesar 62,86 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan fraksi heksan memiliki nilai IC_{50} sebesar 43,56 $\mu\text{g/mL}$, fraksi etil asetat memiliki nilai IC_{50} sebesar 18,85 $\mu\text{g/mL}$, dan fraksi metanol-air memiliki nilai IC_{50} sebesar 37,56 $\mu\text{g/mL}$.

Menurut kriteria dari American National Cancer institute, nilai IC_{50} dari ekstrak kasar ≤ 30 $\mu\text{g/mL}$ dianggap sebagai ekstrak yang memiliki peluang untuk dapat diteliti lebih lanjut (Scheuer, 1987; Torres *et al.*, 2005). Berdasarkan hasil yang diperoleh maka zat yang potensial sitotoksik terhadap sel lestari tumor HeLa adalah fraksi etil asetat karena mempunyai nilai IC_{50} < 30 $\mu\text{g/mL}$ sehingga memiliki prospek untuk diteliti lebih lanjut. Langkah selanjutnya adalah melakukan pemisahan senyawa dari fraksi etil asetat berdasarkan tingkat kepolarannya dengan menggunakan kolom kromatografi dengan fasa gerak metanol, air, dan diklormetan, dan fasa diam Septra C-18, selanjutnya terhadap masing-masing subfraksi yang diperoleh dilakukan pengujian bioaktivitas.

Uji Sitotoksitas Subfraksi dari Fraksi Etil Asetat *U. fasciata* terhadap Sel HeLa

Carballo *et al.* (2002) telah melakukan pengujian bioaktivitas terhadap ekstrak bahan alam pada dosis antara 5–50 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan hasil uji yang dihasilkannya kemudian dibuat klasifikasi potensi bioaktivitas suatu ekstrak berdasarkan tingkat kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan sel lestari tumor, sebagaimana disajikan pada Tabel 5.

Tabel 3. Hasil uji toksisitas ekstrak kasar aseton, fraksi heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi metanol-air dari *U. fasciata* terhadap *Artemia salina* Leach

Table 3. Toxicity test result of *U. fasciata* acetone crude extract, hexane, ethyl acetate, and methanol-water fractions against *Artemia salina* Leach

Sampel/Sample	LC_{50} / ($\mu\text{g/mL}$)
Ekstrak kasar aseton <i>U. fasciata</i> / <i>U. fasciata</i> acetone crude extract	103.86
Fraksi heksan/Hexane fraction	128.03
Fraksi etil asetat/Ethyl acetate fraction	63.07
Fraksi metanol-air/Methanol-water fraction	406.05

Tabel 4. Hasil uji sitotoksitas ekstrak kasar aseton, fraksi heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi metanol-air dari *U. fasciata* terhadap sel lestari tumor HeLa

Table 4. Cytotoxicity test result of *U. fasciata* acetone crude extract, hexane, ethyl acetate, and methanol-water fractions against HeLa tumor cell line

Sampel/Sample	IC_{50} / ($\mu\text{g/mL}$)
Ekstrak kasar aseton <i>U. fasciata</i> / <i>U. fasciata</i> acetone crude extract	62.86
Fraksi heksan/Hexane fraction	43.56
Fraksi etil asetat/Ethyl acetate fraction	18.85
Fraksi metanol-air/Methanol-water fraction	37.56

Tabel 5. Klasifikasi bioaktivitas ekstrak terhadap pertumbuhan sel lestari tumor
 Tabel 5. *Bioactivity clasification of extract against growth of tumor cell line*

No	Inhibisi Pertumbuhan/ <i>Growth Inhibition</i>	Keterangan/Remark	Katagori/Category
1	Negatif/Negative	Tidak ada inhibisi pertumbuhan/ <i>No growth inhibition</i>	Tidak aktif/Not active
2	< 50%	Inhibisi pertumbuhan lemah/ <i>Weak growth inhibition</i>	Tidak aktif/Not active
3	50–100%	Inhibisi pertumbuhan sedang sampai kuat/ <i>Moderate to high growth inhibition</i>	Aktif, efek inhibisi pertumbuhan/ <i>Active, growth inhibition effect</i>
4	100%	Inhibisi pertumbuhan total/ <i>Total growth inhibition</i>	Aktif, efek sitostatik/ <i>Active, cytostatic effect</i>
5	> 100%	Membunuh sel/ <i>Cell killing</i>	Aktif, efek sitotoksik/ <i>Active, cytotoxic effect</i>

Hasil subfraksinasi yang diperoleh dari fraksi etil asetat *U. fasciata* melalui kromatografi kolom dengan menggunakan fasa gerak metanol, air, dan diklormetan, serta fasa diam Septra C-18, diperoleh 6 subfraksi. Pemisahan subfraksi berdasarkan tingkat kepolaran fasa gerak. Hasil uji sitotoksitas subfraksi dari fraksi etil asetat *U. fasciata* terhadap sel lestari tumor HeLa disajikan pada Tabel 6.

Hasil uji sitotoksik dari masing-masing subfraksi pada konsentrasi 19 µg/mL menunjukkan potensi inhibisinya yaitu; subfraksi 1 < 0% (negatif); subfraksi 2 > 100%; subfraksi 3 > 100%; subfraksi 4 > 100%; subfraksi 5 < 50%; dan subfraksi 6 = 100%. Berdasarkan nilai persen inhibisi yang diperoleh tersebut maka subfraksi 2, 3, dan 4 termasuk kategori aktif, bersifat sitotoksik, dapat membunuh sel lestari tumor HeLa, sedangkan subfraksi 6 termasuk katagori aktif, bersifat sitostatik, secara total dapat menghambat pertumbuhan sel lestari tumor HeLa, tetapi subfraksi 1 dan 5 termasuk kategori tidak aktif

sebagai antitumor terhadap sel lestari tumor HeLa. Berdasarkan hal tersebut di atas maka subfraksi 2, 3, 4, dan 6 berpotensi menghasilkan senyawa antitumor karena pada konsentrasi < 30 µg/mL dapat membunuh sel tumor > 50%, sehingga dapat diteliti lebih lanjut untuk mengetahui nilai IC₅₀ dan struktur kimia senyawa aktif yang merupakan komponen masing-masing subfraksi tersebut.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Uji fitokimia menunjukkan bahwa golongan senyawa yang terdapat dalam *U. fasciata* adalah flavonoid, steroid, dan saponin.
2. Uji antioksidan terhadap DPPH menunjukkan bahwa ekstrak kasar aseton *U. fasciata* memiliki potensi antioksidan yang sangat kecil (1,22%) dengan nilai IC₅₀ 411,81 µg/mL dibandingkan dengan Vitamin C dengan nilai IC₅₀ 5,01 µg/mL.

Tabel 6. Hasil uji sitotoksitas subfraksi dari fraksi etil asetat *U. fasciata* terhadap sel lestari tumor HeLa pada konsentrasi 19 µg/mL

Table 6. *Cytotoxicity test result of subfraction of U. fasciata ethyl acetate fraction against HeLa tumor cell line at the concentration of 19 µg/mL*

No	Sampel/Sample	Potensi Inhibisi (%)/ <i>Inhibition Potency (%)</i>	Katagori/Category
1	Subfraksi 1/Subfraction 1	negative	Tidak aktif/Not active
2	Subfraksi 2/Subfraction 2	> 100	Aktif, sitotoksik/Active, cytotoxic
3	Subfraksi 3/Subfraction 3	> 100	Aktif, sitotoksik/Active, cytotoxic
4	Subfraksi 4/Subfraction 4	> 100	Aktif, sitotoksik/Active, cytotoxic
5	Subfraksi 5/Subfraction 5	< 50%	Tidak aktif/Not active
6	Subfraksi 6/Subfraction 6	100	Aktif, sitostatik/Active, cytostatic

3. Uji toksisitas ekstrak *U. fasciata* terhadap *Artemia salina* Leach menghasilkan nilai LC₅₀ ekstrak kasar aseton 103,86 µg/mL, fraksi heksan 128,03 µg/mL, fraksi etil asetat 63,07 µg/mL, dan fraksi metanol-air 406,05 µg/mL.
4. Uji sitotoksitas ekstrak *U. fasciata* terhadap sel lestari tumor HeLa menghasilkan nilai IC₅₀ ekstrak kasar aseton 62,86 µg/mL, fraksi heksan 43,56 µg/mL, fraksi etil asetat 18,85 µg/mL, dan fraksi metanol-air 37,56 µg/mL.
5. Uji sitotoksitas subfraksi etil asetat *U. fasciata* pada konsentrasi 19 µg/mL terhadap sel lestari tumor HeLa menunjukkan potensi inhibisi : subfraksi 1 < 0%; subfraksi 2 > 100%; subfraksi 3 > 100%; subfraksi 4 > 100%; subfraksi 5 < 50%; dan subfraksi 6 = 100%.

Saran

1. Terdapat 4 subfraksi ekstrak etil asetat *U. fasciata* pada konsentrasi 19 µg/mL yang bersifat aktif yang memiliki aktivitas antitumor sangat tinggi dengan nilai inhibisi > 50%, maka perlu diteliti lebih lanjut hingga dapat diketahui struktur kimia dari senyawa aktif dalam subfraksi tersebut.
2. Terhadap 4 subfraksi ekstrak etil asetat *U. fasciata* tersebut perlu dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap berbagai jenis sel lestari tumor lain dan terhadap sel normal agar didapatkan informasi yang lebih lengkap, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Atmadja, W.S. 1992. Rumput laut sebagai obat. *Oseana: Majalah Ilmiah Semi Populer*. Lembaga Oseanologi Nasional, LIPI, Jakarta. 17(7): 1–8.
- Atmadja, W.S., Kadi, A., Sulistijo, dan Rachmaniar, S. 1996. *Pengenalan Jenis-jenis Rumput Laut Indonesia*. Puslitbang Oseanologi–LIPI, Jakarta. 120 pp.
- Boik, J. 1996. *Cancer and Natural Medicine: A Textbook of Basic Science and Clinical Research*. Oregon Medical Press. 315 pp.
- Carballo, J.L., Hernandez-Inda, Z.L., Perez, P., and Garcia-Gravalos, M.D. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*. 2(17): 5 pp.
- Chow, S.T., Chao, W.W., and Chung, Y.C. 2003. Antioxidative activity and safety of 50% ethanolic red bean extract (*Phaseolus raditus* L. Var *Aurea*). *J. Food Sci.* 68(1): 21–25.
- Dalimartha, S. 2003. *Ramuan Tradisional untuk Pengobatan Kanker*. Penebar Swadaya, Jakarta. 96 pp.
- Fajarningsih, N.D., Januar, H.I., Nursid, M., dan Wikanta T. 2006. Potensi antitumor ekstrak spons *Crella papilata* asal Taman Nasional Laut Kepulauan Seribu. *Jurnal Pascapenen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 1(1): 35–42.
- Fajarningsih, N.D., Nursid, M., Wikanta, T., dan Maraskuranto, E. 2008. Bioaktivitas ekstrak *Turbinaria decurrens* sebagai antitumor (HeLa dan T47D) serta efeknya terhadap proliferasi limfosit. *Jurnal Pascapenen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 3(1): 21–28.
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. 2nd ed. Diterjemahkan oleh : Padmawinata K., Penerbit ITB, Bandung. 379 pp.
- Harborne, J.B. and Dey, P.M. 1999. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol 6. Academic Press University of Lausanne, Switzerland. p. 120–127.
- Hernani, 2005. *Tanaman Obat Berkhasiat Antioksidan*. Penerbit Swadaya, Jakarta. p. 3–20.
- Marraskuranto, E., Fajarningsih, N.D., Januar, H.I., dan Wikanta, T. 2008. Aktivitas antitumor (HeLa dan T47D) dan antioksidan ekstrak makroalga hijau *Ulva fasciata*. *Jurnal Pascapenen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 3(2): 107–112.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R.M., Putman, J.E., Jacobsen, L.B., Nicholas, D.E., dan McLaughlin, J.L. 1982. Brine shrimp : A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 45: 34–35.
- Scheuer, P.J. 1987. *Bioorganic Marine Chemistry*. Vol. I. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. p. 105–106.
- Sumaryono, W. dan Eruwibowo, A. 2005. Isolasi dan elusidasi struktur senyawa utama dari rumput laut. *Majalah Farmasi Indonesia*. April 16: 186–191.
- Torres, M.R., Sousa, A.P.A., Filho, E.A.T.S., Pessoa, C., Amaral de Moraes, M.E., Odorico de Moraes, M., and Costa-Lotufo, L.V. 2005. Biological activity of aqueous and organic extracts of seaweeds from Ceara State, Brazil. *Arq. Cien. Mar. Fortaleza*. 38: 55–63.
- Widjhati, R., Supriyono, A., dan Subiantoro. 2004. Pengembangan senyawa bioaktif dari biota laut (review kegiatan penelitian biota laut di BPPT). *Makalah dalam Forum Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Indonesia*. Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan. Jakarta, 25 Maret 2004. p. 89–95.
- Wikanta, T., Januar, H.I., dan Nursid, M. 2005. Uji aktivitas antioksidan, toksisitas dan sitotoksitas ekstrak alga merah (*Rhodomyenia palmate*). *J. Penel. Perik. Indonesia. Edisi Pasca Panen*. 11(4): 41–49.
- Wikanta, T., Zakaria, Y.A., Ratih, D., dan Nursid, M., 2007. Uji aktivitas sitotoksik ekstrak karang lunak *Sarcophyton glaucum* (Quoy & Gaimard) terhadap sel lestari tumor HeLa. *Jurnal Pascapenen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 2(1): 69–80.
- Wikanta, T., Damayanti, R., dan Rahayu, L. 2008. Pengaruh pemberian κ -karagenan dan ι -karagenan terhadap penurunan kadar glukosa darah tikus hiperglikemia. *Jurnal Pascapenen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 3(2): 131–138.

Wilson, A.P., 2002. Cytotoxicity and viability assay. In Master, J.R.W. (ed.). *Animal Cell Culture: A Practical Approach*. 3rd ed. New York. Oxford University Press. p. 263–264, 272.

Zachary, I., 2003. Determination of cell number. In Hughes, D. and Mehmet, H. (eds.). *Cell Proliferation and Apoptosis*. BIOS Scientific Publisher Limited. 373 pp.