

Pengujian Aktivitas Antikanker Ekstrak dan Fraksi *Usnea Baileyi* dengan Metode *Potato Disc Assay*

Anticancer Activities Testing Of Extract and Fraction *Usnea baileyi* with Potato disc assay Method

¹Aldi Egiawan, ²Kiki Mulkiya Yuliawati, ³Reza Abdul Kodir

^{1,2,3}*Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Jl. Tamansari No.1 Bandung 40116*

email: ¹egiawanaldi06@gmail.com, ²qqmulkiya@gmail.com ³reza.abdul.kodir@gmail.com

Abstract. Cancer is a condition when cells experience growth abnormalities caused by changes in gene expression that trigger imbalances in cell division and death. The development of cancer drugs continues to be conducted, one of which is tracing compounds derived from natural substance, especially plants. Lichen is a symbiotic organism composed of green algae or cyanobacterium and fungi, the combination of these two components plays a role in the process of biosynthesis of secondary metabolites that occur in lichens. The secondary metabolite compounds produced from lichens are typical and are rarely found in other plants, by glancing at and researching typical compounds in lichen both in extracts and fractions, the potential of new anticancer compounds from lichen in overcoming various problems of anticancer compounds that could previously be revealed. This study used the potato disc assay method by looking at the number of tumors formed in potato disc by treatment (extracts and fractions) and were compared with the number of tumors formed in potato disc without treatment (negative control). The results of this study showed that all tumor disc were not formed so that they could not show how the activity of the *Usnea baileyi* extract and fraction against the inhibition of tumor cells in potato disc.

Keywords: Cancer, Lichen, *Usnea baileyi*, Potato disc assay.

Abstrak. Kanker adalah kondisi ketika sel mengalami abnormalitas pertumbuhan yang disebabkan oleh adanya perubahan pada ekspresi gen sehingga memicu ketidakseimbangan pembelahan dan kematian sel. Pengembangan obat kanker terus dilakukan salah satunya penelusuran senyawa yang berasal dari bahan alam khususnya tumbuhan. Lichen merupakan suatu organisme simbiosis yang tersusun oleh alga hijau atau *cyanobacterium* dan jamur, kombinasi kedua komponen tersebut turut berperan dalam proses biosintesis metabolit sekunder yang terjadi pada lichen. Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan dari lichen bersifat khas dan jarang ditemukan pada tumbuhan lain, dengan melihat dan melakukan penelitian senyawa khas pada lichen baik pada ekstrak dan fraksi maka potensi senyawa antikanker baru dari lichen dalam mengatasi berbagai permasalahan senyawa antikanker yang sebelumnya dapat terungkap. Penelitian ini menggunakan metode *potato disc assay* dengan melihat jumlah tumor yang terbentuk pada kepingan kentang dengan perlakuan (ekstrak dan fraksi) dan dibandingkan dengan jumlah tumor yang terbentuk pada kepingan kentang tanpa perlakuan (kontrol negatif). Hasil dari penelitian ini menunjukkan pada seluruh kepingan kentang tidak terbentuk adanya tumor sehingga tidak bisa menunjukkan bagaimana aktivitas dari ekstrak dan fraksi *Usnea baileyi* terhadap penghambatan sel tumor pada kepingan kentang.

Kata Kunci: Kanker, Lichen, *Usnea baileyi*, *Potato disc assay*.

A. Pendahuluan

Kanker merupakan suatu penyakit yang masih menjadi permasalahan kesehatan yang melanda dunia, penyakit ini dapat menyerang siapa saja baik anak-anak maupun orang dewasa. Berdasarkan data statistik yang diambil dari info DATIN 2015 penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian di seluruh

dunia. Di Indonesia secara nasional prevalensi penyakit kanker pada penduduk semua umur pada tahun 2013 sebesar 1,4% atau diperkirakan sekitar 347.792 orang (Riskesdas 2013).

Bahkan menurut data statistik yang dikeluarkan oleh GLOBOCAN (IARC) tentang penyakit kanker, jumlah kematian akibat kanker di Indonesia

pada tahun 2018 sebesar 207.210 jiwa dan jumlah kasus baru penderita kanker sebesar 348 809 jiwa. Masih banyaknya kasus kematian akibat kanker di Indonesia serta ditambah banyaknya kasus baru mengenai kanker tak luput dari masih kurangnya penanganan penyakit kanker di Indonesia ditambah obat antikanker yang dirasa masih kurang efektif dalam melawan sel kanker.

Oleh karena itu penelusuran alternatif pengobatan kanker terus dilakukan, salah satunya berasal dari bahan alam, akan tetapi ada satu jenis tumbuhan yang jarang sekali dilirik dan kurang mendapat perhatian, yaitu lichen. Lichen didefinisikan sebagai organisme simbiosis yang tersusun atas komponen jamur dan komponen organisme fotosintesis yaitu alga hijau atau *cyanobacterium* (Thomas H. 2008:1). Simbiosis tersebut membuat lichen menghasilkan suatu metabolit yang khas dan berbeda dari masing masing komponen penyusunnya serta memiliki potensi yang harus ditelusuri.

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka perumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut: “Bagaimanakah aktivitas antikanker yang terdapat dalam ekstrak dan fraksi?”, “Bagaimanakah efektivitas ekstrak dan fraksi *Usnea baileyi* dalam menghambat pertumbuhan sel kanker dengan menggunakan model *crown gall* pada tumbuhan?”, “Berapa dosis efektif ekstrak dan fraksi *Usnea baileyi* yang dapat digunakan untuk mencegah pertumbuhan sel kanker yang lebih parah?”. Selanjutnya, tujuan dalam penelitian ini diuraikan dalam pokok-pokok sbb.

1. Untuk mengetahui serta menentukan aktivitas antikanker yang terdapat pada ekstrak atau fraksi *Usnea baileyi*.
2. Untuk dapat mengetahui

efektifitas dari *Usnea baileyi* dalam menghambat pertumbuhan sel kanker.

3. Untuk mengetahui dosis efektif ekstrak dan fraksi *Usnea baileyi* dalam mencegah pertumbuhan sel kanker yang lebih parah.

B. Landasan Teori

Lichen merupakan kombinasi antara alga hijau atau *cyanobacterium* dan jamur. Lichen sendiri termasuk kedalam kelompok jamur dan diklasifikasi berdasarkan komponen jamur yang terdapat pada lichen, yang umumnya adalah *ascomycetes*. Kedua organisme tersebut membentuk hubungan mutualisme, sehingga memberikan keuntungan satu sama lain. Diperkirakan sebanyak 13.500 spesies dari lichen ditemukan diberbagai habitat yang berbeda. (Gerard J. Tortora et al 2013:342)

Terdapat tiga jenis morfologi dari talus lichen : krustose, foliose, dan fruticose. Bentuk krustose merupakan bentuk talus primitif dari lichen, kebanyakan sering kali menempel dengan kuat pada substrat. Squamulosa merupakan bentuk spesialisasi dari krustose dan tidak seperti krustose bentuk talus ini tidak terlalu menempel dengan kuat pada substrat. Bentuk foliose seringkali kurang menempel pada substrat dan mudah dipisahkan dari substrat, penempelan lichen pada substrat terjadi lewat struktur seperti rambut yang dinamakan rhizines. Dan jenis fruticose merupakan talus yang memiliki bentuk pipih atau bulat dengan menggantung di batang pohon yang tinggi. (Branislav 2015:3)

Usnea merupakan salah satu spesies lichen yang memiliki bentuk talus fruticose, spesies lichen ini tumbuh menempel pada kulit pohon tegak atau berjubai, panjang sampai 30 cm atau lebih. Talus berbentuk benang, pada umumnya bulat memanjang, cabang cabang bervariasi, sering kali

kasar, berwarna hijau kelabu atau hijau kekuningan (Depkes RI,1978:96). Spesies dari lichen genus *Usnea* diketahui digunakan di berbagai wilayah untuk pengobatan berbagai penyakit seperti diare, ulcer, infeksi kandung kemih, tuberkulosis, pneumonia, antifungi dan penyakit infeksi jamur lainnya (Prateeksha et al 2016).

Kanker adalah pertumbuhan abnormal dari sel yang disebabkan oleh adanya perubahan pada ekspresi gen sehingga memicu ketidakseimbangan perkembangan sel dan kematian sel yang dapat meningkatkan populasi sel dan dapat menginvasi jaringan serta bermetastasis menuju jaringan lain serta dapat memicu terjadinya kematian. Perkembangan kanker tersebut terjadi melalui serangkaian proses karsinogenesis. Proses tersebut merupakan sekumpulan dari perubahan pada sejumlah gen yang memiliki peranan penting dan keterlibatan dalam transformasi sel normal ke sel kanker yang terkait dengan pertumbuhan sel, sistem sinyal sel, siklus sel, diferensiasi, angiogenesis, dan perbaikan pada kerusakan DNA. (Lewis, 2001 Price dan Wilson 2006 dalam Dicky Firmana 2017:4)

C. Metodologi Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian mengenai pengujian aktivitas antikanker ekstrak dan fraksi *Usnea baileyi* dengan metode *potato disc assay* adalah talus *Usnea* yang didapatkan secara liar dikawasan hutan Jayagiri, Lembang, Kabupaten Bandung Barat. Penelitian ini dilakukan melalui tiga tahapan pengerjaan yaitu tahapan penyiapan bahan yang meliputi pengumpulan bahan, determinasi tanaman, dan pengolahan bahan menjadi simplisia kering dengan metode dikering anginkan. Tahapan standarisasi yang meliputi penapisan lichenokimia,

karakteristik simplisia serta karakteristik ekstrak melalui pengujian parameter standarisasi, proses ekstraksi simplisia yang dilakukan dengan menggunakan metode maserasi, dan fraksinasi dengan menggunakan metode Ekstraksi Cair Cair.

Tahapan yang terakhir adalah pengujian antikanker yang dilakukan dengan metode *potato disc assay* terhadap ekstrak dan fraksi. Model analisis penelitian ini adalah analisis deskriptif untuk mengetahui aktivitas antikanker dari ekstrak dan fraksi *Usnea* sehingga hasil pengujian antara ekstrak dan fraksi *Usnea* dibandingkan dan ditarik kesimpulan manakah aktivitas yang lebih baik antara ekstrak atau fraksi.

D. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Penapisan Lichenokimia

Berikut adalah proses penapisan yang dilakukan terhadap lichen *Usnea* untuk mengetahui kandungan golongan senyawa yang terdapat pada *Usnea baileyi*. Hasil pengujian dijelaskan pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Penapisan Lichenokimia pada *Usnea baileyi*

Golongan Senyawa	Identifikasi	
	(+)	(-)
Alkaloid	-	✓
Polifenolat	✓	-
Flavanoid	-	✓
Saponin	-	✓
Antrakuinon	✓	-
Tanin	-	✓
Monoterpen & Seskuiterpen	✓	-
Triterpenoid & Steroid	✓	-

Keterangan : (+) Terdeteksi (-) Tidak Terdeteksi

Dari tabel di atas, dapat diketahui ada beberapa golongan senyawa yang tidak terkandung dalam lichen seperti alkaloid, flavanoid,

saponin, dan juga tannin. Dilihat dari jalur pembentukan atau proses biosintesis yang terjadi kandungan dari golongan senyawa tersebut tidak terbentuk oleh lichen. Berdasarkan jalur proses pembentukan metabolit sekunder yang terjadi, terdapat tiga jalur utama yang berperan dalam pembentukan senyawa metabolit sekunder pada lichen yaitu jalur asam shikimate, jalur mevalonate, dan jalur asetat polimalonat. Apabila dilihat terdapat jalur pembentukan yang juga dapat ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi seperti asam mevalonate dan shikimate. Walaupun begitu dikarenakan lichen bukan merupakan tumbuhan tingkat tinggi, maka ada beberapa golongan senyawa yang tidak terbentuk oleh jalur yang umum ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi, seperti Alkaloid dan flavanoid yang seharusnya terbentuk pada jalur asam shikimate. Hal ini terjadi karena sebagian besar proses biosintesis senyawa metabolit sekunder yang terjadi pada lichen dilakukan oleh komponen fungi, sehingga terdapat proses proses tertentu yang berbeda dengan tumbuhan pada umumnya. Selain itu sumber karbon yang digunakan sebagai senyawa awal dari proses pembentukan metabolit sekunder berasal dari komponen alga yang menghasilkan berbagai senyawa karbon bukan hanya glukosa. Adanya senyawa karbon lain yang digunakan sebagai bahan dasar dalam proses pembentukan metabolit sekunder juga mempengaruhi golongan senyawa yang dihasilkan.

Walaupun begitu terdapat golongan senyawa pada lichen yang juga ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi lain seperti Terpenoid, Antraquinon dan Polifenolat, untuk golongan senyawa Terpenoid proses pembentukannya berasal dari jalur yang sama pada tumbuhan tingkat tinggi pada

umumnya yaitu asam mevalonate hanya saja tidak dapat membentuk senyawa Saponin. Antraquinon dan Polifenolat dibentuk dari jalur asetat polimalonat suatu jalur yang khas pada lichen, pada jalur ini senyawa polifenolat yang dihasilkan bersifat khas dan hanya ditemukan pada lichen seperti asam usnat, asam lecanorat, dan asam gyrophorat.

E. Tes viabilitas strain *Agrobacterium tumefaciens*

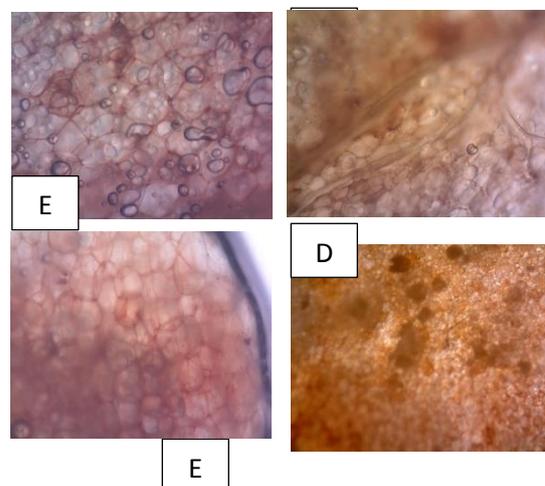
Pengujian viabilitas sangat penting untuk dilakukan didalam memastikan bahwa tidak terjadinya interaksi antara ekstrak dan fraksi *Usnea* dengan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* berupa kematian pada bakteri tersebut. Hal ini akan menjamin bahwa bakteri *Agrobacterium tumefaciens* nantinya akan berinteraksi dengan sel parenkim yang terdapat pada kentang dengan membawa suatu plasmid yang dinamakan Ti plasmid, tersisipinya Ti plasmid pada inti sel tumbuhan menyebabkan abnormalitas pertumbuhan sel tumbuhan dimana kecepatan proliferasi sel sangat cepat. Dari hasil pengujian viabilitas tersebut pada media masih terlihat adanya pertumbuhan bakteri yang dapat diamati lewat perubahan warna media yang digunakan dan adanya koloni bakteri berwarna putih pada pengujian 10, 20, 30, dan 60 menit, hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi *Usnea* tidak menyebabkan kematian pada bakteri sehingga nantinya ketika proses induksi tumor berlangsung terjadi proses pembentukan tumor pada kentang, dan apabila terjadi penghambatan sel tumor maka serta merta disebabkan oleh mekanisme kerja dari sampel yang bukan terhadap bakteri melainkan mempengaruhi proses pertumbuhan sel yang terjadi.

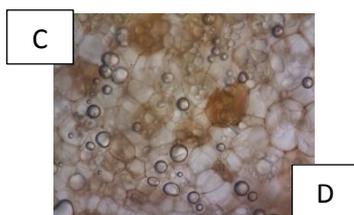
Pengujian aktivitas antikanker dengan metode *potato disc assay*

Berdasarkan hasil pengujian yang telah dilakukan terhadap ekstrak dan fraksi *Usnea*, sel tumor yang diharapkan tumbuh pada kentang tidak terbentuk hal ini terjadi baik pada kentang yang diberi sampel uji maupun pada kontrol negatif yang hanya diberikan suspensi bakteri. Tidak terbentuknya sel tumor pada kepingan kentang bukan disebabkan oleh bakteri *Agrobacterium tumefaciens* yang mengalami kematian akibat dicampurkan dengan ekstrak dan fraksi *Usnea*, melainkan karena faktor lain. Faktor yang sangat mungkin berpengaruh adalah strain bakteri *Agrobacterium tumefaciens* yang digunakan, pengaruh strain bakteri terhadap terbentuknya tumor disebabkan karena tiap strain memiliki daya infeksi yang berbeda, faktor lain yang berpengaruh adalah waktu rentang antara proses penyiapan kepingan kentang dengan inokulasi, penelitian yang dilakukan oleh V.K. Anand dan G.T. Heberlein (1977) menunjukkan bahwa jika kepingan kentang tidak diinokulasi dalam jangka waktu 2 jam maka ukuran dari tumor yang terbentuk akan berkurang. Mengingat ketika proses pengujian proses penyiapan kepingan dan inokulasi bakteri termasuk inkubasi menghabiskan rentang waktu yang lama, maka kemungkinan hal tersebut juga mempengaruhi tumor yang terbentuk.

Perubahan yang nampak pada kepingan kentang kontrol negatif dan uji hanyalah perubahan warna, pada dasarnya perubahan warna pada kepingan kentang dapat juga dijadikan indikator dan membantu dalam proses pengamatan sel tumor, kentang yang ditumbuhi tumor akan menghasilkan warna oranye sampai putih kekuningan sedangkan kentang yang tidak

ditumbuhi tumor akan menghasilkan warna biru. Tetapi walaupun begitu proses perubahan warna belum cukup untuk menandakan adanya tumor yang tumbuh pada kepingan kentang, serta akan sulit untuk melihat aktivitas dari ekstrak dan fraksi *Usnea* sebagai antikanker, karena aktivitasnya sendiri dilihat dari jumlah tumor yang terbentuk. Berdasarkan hal tersebut maka untuk melihat hasil dari pengujian aktivitas ekstrak dan fraksi *Usnea* bukan dilakukan dengan mengamati pertumbuhan sel tumor, melainkan cara lain yang dapat digunakan yaitu dengan melakukan pengamatan secara mikroskopik untuk melihat sel parenkim dari kepingan kentang. Hasil dari pengamatan mikroskopik menunjukkan suatu perbedaan, pada sel parenkim kepingan kentang kontrol negatif terdapat semacam bulatan berwarna cokelat yang berada disekitar sel parenkim kentang dengan jumlah yang tidak terlalu banyak, sedangkan pada kepingan kentang yang diberikan ekstrak, fraksi etil asetat, dan air tidak menunjukkan adanya bulatan berwarna cokelat yang sama persis ditemukan pada kontrol negatif, kecuali pada fraksi n heksan, sel parenkim kepingan kentang yang diberikan fraksi n heksan ditemukan adanya bulatan berwarna cokelat yang sama pada kontrol negatif.





Gambar 1. Perbandingan sel parenkim pada kepingan kentang fraksi etil asetat (A) ekstrak (B) fraksi air (C) fraksi n heksan (D) dan kontrol negatif (E)

Diduga bulatan yang ditemukan pada kepingan kentang kontrol negatif dan n heksan yang ditunjukkan pada gambar (E) serta (D) merupakan benjolan tumor yang terbentuk, pada sel tumbuhan yang mengalami *crown gall* atau istilah kondisi yang menggambarkan tumor pada tumbuhan apabila diamati secara mikroskopik sel tersebut tidak terorganisir atau *disorganized* (H. Babich & K.D.Fox,1998)

Berdasarkan hal tersebut diduga aktivitas ekstrak, fraksi etil asetat, dan fraksi air memiliki kandungan senyawa yang memiliki aktivitas antikanker atau antitumor salah satunya adalah asam usnat. Selain asam usnat senyawa lain yang memiliki potensi antikanker dan antitumor adalah depsides dan depsidones khususnya antranorin, dilaporkan bahwa efek antiproliferatif dan sitotoksik antranorin efisien menginduksi apoptosis dan menghambat proliferasi sel dalam berbagai pengujian kanker sel line. Fraksi n heksan sendiri bukan berarti tidak memiliki aktivitas antikanker, hanya saja kemampuan aktivitas antikanker yang ditunjukkan pada pengujian ini tidak terlalu kuat yang diindikasikan dengan adanya suatu bulatan sel abnormal yang diduga adalah tumor atau kanker, akan tetapi apabila dibandingkan dengan kontrol

negatif memiliki jumlah yang jauh lebih sedikit akan tetapi harus dilakukan proses pengujian selanjutnya mengingat tidak terbentuknya tumor pada kepingan kentang yang menjadi dasar utama penentuan aktivitas dari sampel uji.

F. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan terhadap ekstrak dan fraksi Usnea, baik pada kepingan kentang kontrol negatif dan kepingan kentang yang diberi sampel uji, tidak ditemukan adanya tumor pada masing masing pengujian oleh karena itu belum bisa dipastikan aktivitas antikanker dari ekstrak dan fraksi Usnea serta dosis efektif yang digunakan dalam menghambat pertumbuhan sel kanker, perlu dilakukan proses pengujian lain dalam memastikan aktivitas antikanker dari ekstrak dan fraksi Usnea. Terdapat faktor yang menyebabkan tidak terbentuknya tumor pada seluruh kepingan kentang yaitu kemampuan strain bakteri *Agrobacterium tumefaciens* yang berbeda beda dimana kemungkinan strain bakteri yang digunakan dalam percobaan kali ini kurang menimbulkan tumor.

G. Saran

Untuk proses penelitian selanjutnya agar proses terbentuknya tumor pada kepingan kentang dapat terjadi maka harus diperhatikan strain bakteri *Agrobacterium tumefaciens* yang digunakan. Serta dilakukan terlebih dahulu optimasi pendahuluan dalam menumbuhkan tumor pada kepingan kentang sehingga dapat diketahui kondisi optimum tumor tersebut dapat tumbuh.

Daftar Pustaka

Babich H. & K.D.Fox.,1998.,”*Induction of Crown Gall on Carrot Slices*” Vol.60, No. 6 pp. 445-447 University of California Press on behalf of the National Association of Biology

- Departemen Kesehatan RI,
1978., "Materia Medika
Indonesia Jilid II",
Jakarta: Direktorat Jenderal
Pengawasan Obat dan Makanan
- Firmana Dicky., 2017., "Keperawatan
Kemoterapi", Jakarta: Salemba
Medika
- H. Thomas Nash., 2008., "Lichen
Biology 2nd
Edition", Cambridge: Cambridge
University Press
- J. Gerard Tortora et al., 2013.,
Microbiology An Introduction
11th Edition., Boston: Pearson.
- Kementrian Kesehatan RI., 2015.,
"Pusat Data dan Informasi
Kementrian Kesehatan RI",
Jakarta: Kemenkes RI
- Prateeksha et al., 2016., "The Genus
Usnea: A Potent Phytomedicine
With Multifarious Ethnobotany
Phytochemistry and
Pharmacology"
- Rankovic Branislav., 2015., "Lichen
Secondary Metabolite Bioactive
Properties and Pharmaceutical
Potential", New York: Springer.
- V.K. Anand & G.T. Heberlein., 1977.,
Crown Gall Tumorigenesis In
Potato Tuber Tissue, American
Journal of Botany, Vol. 64, No.
2 (Feb., 1977), pp. 153-158.
- WHO., 2018., "The Global Cancer
Observatory"