

DESCRIPTION OF THE MALE OF *Pseudomacrochiron Parvum* (A. SCOTT, 1909) (COPEPODA, POECILOSTOMATOIDA) WITH REMARKS ON THE FEMALE

Mulyadi

Div. of Zoology, Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences
Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia
E-mail: mulyadi_08@yahoo.com

ABSTRACT

The male of *Pseudomacrochiron parvum* (A. Scott, 1909), which is unknown so far, is described and figured on specimens collected off Labuan, Sunda Strait (06°10'S 105°45'E), westward of the type locality in Indonesian waters, and expand the description of the female.

Key words: taxonomy, *Pseudomacrochiron*, Sunda Strait, Indonesia

INTRODUCTION

Pseudomacrochiron parvum is known from only two female specimens taken by Siboga Expedition (1899) in off Lawui, Obi Major Island, Indonesia (Scott, 1909).

Stock (1957) the first suggested that *Pseudanthessius parvus* Scott (1909), and *Macrochiron malayense* Sewell, 1949 belonged in a new genus near *Paramacrochiron* Sewell, 1949, but Stock (1957) did not propose a name of this genus. Subsequently, Humes (1966) suggested that a third species *Macrochiron ornatum* Krishnaswamy, 1952, also belonged in this unnamed genus. Reddiah (1969) established the name *Pseudomacrochiron* for these species, provided a diagnosis for the genus, and described a fourth species, *Pseudomacrochiron stocki*. *Pseudanthessius foliculus* Scott, 1912 transferred to this genus by Morris (1973).

At present, about five species of the genus *Pseudomacrochiron* Reddiah, 1969 have been documented from the Indo-Pacific region and the Northwest Atlantic (Morris, 1973; Humes and Stock, 1973). These are *Pseudomacrochiron parvum* (Scott, 1909), *P. fuciculum* (Scott, 1912), *P. malayense* (Sewell, 1949), *P. ornatum* (Krishnaswamy, 1952), and *P. stocki* Reddiah, 1969.

The genus *Pseudomacrochiron* is characterized by the following: (1) the urosome consists of 5 somites in female, 6 somites in male; (2) the A1 consists of 7 segmented; (3) the A2 consists of 4 segmented, terminal segment armed with setae and 2 simple claws; (4) the Ri of P5 uniramous, relatively short and wide, with 2 terminal spines; (5) the P5 uniramous, with 2 terminal spines or setae.

MATERIALS AND METHODS

All material was collected from off Labuan, Sunda Strait, Indonesia. Sampling was done by surface tow of plankton net (0.33 mm mesh size, 0.45 m mouth diameter). The samples were fixed and preserved in 5% buffered formaldehyde/sea water solution. The specimens were identified by dissection and examination with a camera lucida. The material is deposited in the Museum Zoologicum Bogoriense, Indonesian Institute of Sciences (LIPI), Cibinong, Indonesia.

Abbreviations used in the text to described morphological features are: A1, antennule; A2, antenna; Ms1-Ms5, metasomal somites 1-5; Ur1-Ur6, urosomal somites 1-6; CR, caudal rami; P1-P6, swimming legs 1-6; B1, coxa, B2, basis; Re1-Re3, exopodal segments 1-3; Ri1-Ri3, endopodal segments 1-3.

DESCRIPTION

Pseudomacrochiron parvum (Scott, 1909)

Pseudanthessius parvus Scott, 1909: 269–270, pl. 69, figs. 1-7 (Type locality:

Lawui, coast of Obi Major, Indonesia 0°24'S 127°36'E).

Lichomolgus (Macrochiron) parvum, Monod & Dollfus, 1932: 139.

Macrochiron (Paramacrochiron) parvum, Sewell, 1949: 109; Ganapati & Shantakumari, 1962: 10, 12, 16.

Macrochiron parvum, Stock, 1957: 381.

Pseudomacrochiron parvum, Reddiah, 1969: 44; Morris, 1973: 65–70, figs. 33–47;

Humes & Stock, 1973: 282, fig. 158a-d.



Figure 1. *Pseudomacrochiron parvum* (Scott, 1909). Female, a, whole animal, dorsal view; b, antennule; c, antenna; d, mandible; e, maxillule; f, maxilla; g-j, 1st-4th legs.

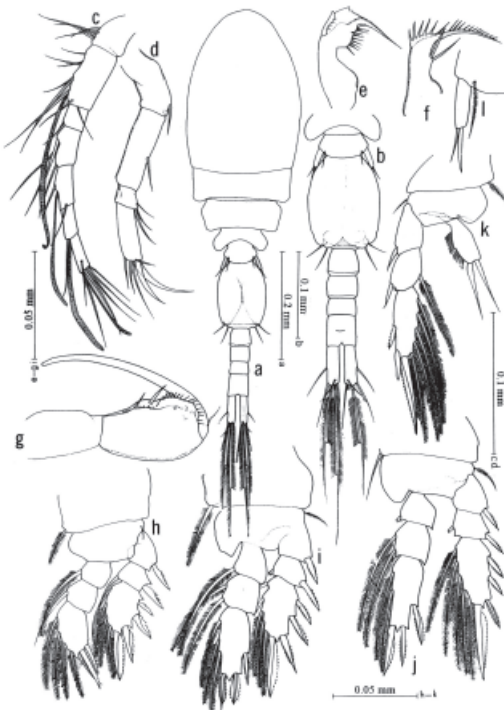


Figure 2. *Pseudomacrochiron parvum* (Scott, 1909). Male, a, whole animal, dorsal view; b, the last metasomal somite and urosome, dorsal view; c, antennule; d, antenna; e, mandible; f, maxillule; g, maxilla; h-k, 1st-4th legs.

Material examined. Three adult females (0.78–0.86 mm), 3 adult males (1.10–1.14 mm) collected off Labuan, Sunda Strait (06°00'S 105°45'E) by surface tow of 0.33 mm mesh plankton net at night on 18 June 1994.

Male. Prosome more slender than in female. Proportional lengths of prosome and urosome 7.3 : 5 (measured excluding caudal setae). Prosome maximum width to length 3.2 : 5.1. Urosome consists of 6 somites, with proportional lengths 13 : 9 : 9 : 7 : 11 : 16. Cephalon rounded anteriorly, fused with Ms1. Posterolateral ends of Ms1–Ms4 bluntly rounded, those of Ms5 produced behind P5. Genital somite longer than wide, in dorsal view, lateral margins slightly convex, posterior margin abruptly truncate, posterolateral ends squared or slightly pointed. All urosomal somites without posteroventral spinules. CR longer than wide, terminal 2nd and 3rd caudal setae blade-like on proximal half, abruptly narrowed and slender distally, other setae normal in shape. Maxilliped consists of 2 segments and a long claw, B1 unornamented; B2 long and with undulating margin bearing 2 thick spines, one on about its middle and another rather proximal part. In addition, there is a row of spinules arranged in form of question mark laid lengthwise. Claw strong and bent inwards, as long as B1 and B2 combined.

P1–P4 with following armature (spines in Roman and setae in Arabic numerals):

P1 coxa 0-1 basis 1-0 Re I-0 I-1 III-I-4 Ri 0-1 0-1 I-I-5

P2 coxa 0-1 basis 1-0 Re I-0 I-1 III-I-5 Ri 0-1 0-2 I-II-3

P3 coxa 0-1 basis 1-0 Re I-0 I-1 III-I-5 Ri 0-1 0-2 I-II-2

P4 coxa 0-1 basis 1-0 Re I-0 I-1 II-I-5 Ri 0-II-0

P4 relative short and wide (3 : 1), with outer marginal notch at midlength, pair of terminal spines naked. Ri reaching about middle of Re2; Re 3 times as long as Ri. P5 uniramous, moderately elongated, as long as Ri of P4, more than 3 times as long as wide. P6 represent by 2 subequal long setae arising from inner space of 2 spinose projections on posterolateral corner of genital somite either side.

Female. Body rather slender and elongated. Proportional lengths of prosome and urosome 2.2 : 1. Prosome greatest width to length 1 : 2.1. Urosome consists of 5 somites and with CR proportional lengths 51 : 11 : 8 : 14 : 16. Ms1 faintly separated from cephalon. Cephalon broadly rounded anteriorly. Posterolateral ends of Ms1–Ms4 bluntly rounded, those of Ms5 produced behind P5.

Urosome 5 somites, genital complex longer than wide 1.4 : 1 with obvious anterior and posterior regions. Area of egg attachment lateral and slightly dorsal. All urosomal somites without posteroventral spinules. CR moderately length, terminal caudal setae blade-like over proximal half, abruptly narrowed and slender distally. Other caudal

setae normal in shape. Rostrum distinctive, produced subconically, chitinous, projects ventrally.

A1 7 segmented, setal formula 4, 13, 6, 4, 4 + 1 aesthete, 2, and 7. A2 4 segmented, terminal segment with 5 terminal naked setae and 2 weak claw-like spines notched at midlength. Claws appears weakly striated distally, but without denticles. Mandible with proximal spines of lash coarse. Maxillule unimerous, with 1 naked and 3 plumose setae. Maxilla short, straight, teeth strong and widely spaced proximally. A single tooth-like sclerotization on inner edge of lash. Maxilliped short, trimerous, segments of lengths 20 : 16 : 10. Basal segment unadorned, 2nd segment with 2 spines on inner margin. Terminal segment claw-like, with 3 proximal spinules and distal hairs.

P1-P4 similar to male. P5 unimerous, moderately elongated 4.9 : 1. Edges parallel. Pair of naked terminal setae, outer seta the longest, equal to length of segment. One small seta on somite near base of P5. P6 represented by 1 seta and 2 stout spines within genital depression.

Remarks. A. Scott (1909) established *Pseudanthessius parvus* based on two female specimens at the night plankton samples from Obi Major coast, eastern Indonesia. Sewell (1949) reports the female of this species from weed washing, while Ganapati & Shantakumari (1961) collected it in surface plankton from Lawson's Bay, India. The other record of this species is Morris (1973) from the *Sargassum natans* washing and neuston net from the Northwest Atlantic.

Perhaps a widespread but rare species, the present female specimens differ from previous description by (1) the sizes (1.12 mm) (A. Scott's female specimens 0.9 mm, Sewell 0.86 mm, Morris 1.10 mm); (2) the setae on the maxillule are of different corresponding lengths; (3) the

mandible shape; (4) the terminal spine of P5. However, the good agreement in other characters, particularly the shape of the genital complex, proportional lengths of body, the armature of P1-P4 indicate that they are the same species.

REFERENCES

- Humes AG, 1966. New species of *Macrochiron* (Copepoda, Cyclopoida) associated with hydroids in Madagascar. *Beaufortia*, 14: 5–27.
- Humes AG and Stock JH, 1973. A revision of the family Lichomogidae Kossman, 1877, Cyclopoid copepods mainly associated with marine Invertebrates. *Smithsonian Contr. Zool.*, 127: 1–368.
- Krishnaswamy S, 1952. Some new species of copepods from Madras coast. *Rec. Indian Mus.*, 49: 321–336.
- Morris B, 1973. The new species of *Macrochiron* Brady, 1872, and a new record for *Pseudomacrochiron parvum* (A. Scott, 1909) in the northwest Atlantic (Copepoda, Cyclopoida). *Contribution no. 533 Bermuda Biol. St. Res.*
- Reddiah K, 1969. *Pseudomacrochiron stocki* n. g., n. sp.; a cyclopoid copepod associated with a medusa. *Crustaceana*, 16: 43–50.
- Scott A, 1909. The Copepoda of the Siboga Expedition, 1. Free-swimming, littoral, and semi-parasite Copepoda. *Siboga Exped. Monogr.*, 29: 1–323.
- Scott T, 1912. The entomostraca of the Scottish National Antarctic Expedition, 1902–1904. *Trans. Roy. Soc. Edinburg*, 48: 521–599.
- Sewell RBS, 1949. The littoral and semi-parasitic Cyclopoida, the Monstrilloida and Notodelphyoida. *Sci. Rept. John Murray Exped.*, 1933–1934, 9(2): 17–199.
- Stock J, 1957. Some notes on the genus *Macrochiron* Brady, 1872 (Copepoda, Cyclopoida). *Ann. Mag. nat. Hist.*, 12(10): 378–382.

Reviewer: **Dr. Bambang Irawan, M.Sc.**

PEMAKAIAN SEL RAJI DALAM UJI SITOTOKSISITAS FRAKSI ETHANOL BIJI MIMBA (*Azadirachta indica*)

Priyo Wahyudi * dan Ira Djajanegara *

* P3T Bioindustri BPPT

ABSTRACT

Traditionally, the neem (*Azadirachta indica*) seeds have been used as an organic insecticide. The seeds of this plant was also used and known for long time as a fungicide and anti bacterial agents. Previous toxicity experiment using brine shrimp lethality test (BSLT) method indicated that the ethanol fraction of the neem (*Azadirachta indica*) seeds was toxic to the shrimp larvae with LC_{50} value at 38.79 $\mu\text{g/ml}$. This experiment was done to investigate further the possible role of ethanol fraction from neem seeds as an anti cancer agent using Burkitt lymphoma cell line. Experiment was initiated by extracting the seeds using *n*-hexane by maceration. The macerate was then macerated further using 70% ethanol as solvent. The ethanol fraction was used in cytotoxicity assay using (lymphoma cancer) Burkitt lymphoma cell lines. Cytotoxicity assay was done using direct counting method. The amount of living cells were observed and counted, death percentage was then determined and probit analysis was done to determine the LC_{50} value. LC_{50} value for ethanol fraction from the seeds of neem (*Azadirachta indica*) was 10.37 $\mu\text{g/ml}$ for 24 hours; 9.05 $\mu\text{g/ml}$ for 48 hours and 4.30 $\mu\text{g/ml}$ for 72 hours based on cytotoxicity analysis using Burkitt lymphoma cells. This experiment concluded that the neem (*Azadirachta indica*) seeds have cytotoxicity toward Burkitt lymphoma cell lines which confirmed the previous toxicity experiment using brine shrimp lethality test (BSLT) method. Overall, this experiment indicated that neem (*Azadirachta indica*) seeds have anticancer activity.

Key words: seed, neem (*Azadirachta indica*), citotoxicity, Burkitt lymphoma cell lines

PENGANTAR

Hanya beberapa jenis kanker yang dapat diobati secara memuaskan, terutama apabila diobati pada stadium dini. Keberhasilan pengobatan sangat dipengaruhi oleh jenis kanker, stadium kanker, keadaan umum penderita serta kepekaan terhadap pengobatan (Sudjarwo, 2001). Salah satu faktor yang mempersulit upaya pengobatan kanker adalah kondisi ekonomi sebagian besar masyarakat Indonesia yang masih rendah, disertai tingkat pendidikan dan faktor lingkungan masyarakat yang kurang mendukung.

Pemanfaatan obat tradisional oleh masyarakat Indonesia pada pengobatan kanker sebagai alternatif disebabkan belum terjangkaunya obat antikanker sintetik. Pengobatan alternatif untuk kanker harus memenuhi beberapa persyaratan antara lain aman, logis dalam kedokteran, mudah dalam pelaksanaan dan didasari penelitian ilmiah (Munir *et al.*, 2000).

Melihat potensi sumber daya hayati Indonesia yang besar maka perhatian terhadap tanaman yang berkhasiat obat akan semakin meningkat, apalagi jika bahan-bahannya mudah didapat atau ditanam sendiri di pekarangan rumah. Walaupun secara empiris pengetahuan tentang tanaman obat sudah diketahui secara turun-temurun namun pembuktian secara ilmiah yang bertujuan untuk mengembangkan dan

memanfaatkan tanaman tersebut serta menguji efektivitas dan keamanan untuk dikonsumsi masih sangat diperlukan masyarakat (Munir *et al.*, 2000).

Salah satu tanaman yang telah lama digunakan sebagai obat tradisional tersebut adalah mimba (*Azadirachta indica*), yang nama lainnya adalah *Antelaea azadirachta* (Hyne, 1987). Di Jawa tumbuhan ini dikenal dengan nama mimba (Hyne, 1987). Adapun sebutan tumbuhan ini dalam bahasa Inggris antara lain adalah *neem*, *nim*, *margosa*, *Indian lilac*, *bead tree*, *pride of china*, *holy tree* dan *persian lilac* (Gruenwald *et al.*, 2002).

Mimba (*Azadirachta indica*) mengandung senyawa triterpen dan tetraterpen (limonoid, protolimonoid dan kelompok genudin). Dalam minyak biji terdapat nimbolin A dan B, nimbin, dan gedunin. Tanin dan minyak atsiri terdapat pada kulit kayu dan daun (Gruenwald *et al.*, 2002). Metabolit yang ditemukan dari *Azadirachta indica* antara lain disetil vilasinin, nimbandiol, 3-desasetil salanin, salanol dan *azadirachtin* (Sudarsono *et al.*, 2002). Daun mimba (*Azadirachta indica*) digunakan untuk penambah nafsu makan, untuk menanggulangi disentri, borok, dan malaria serta sebagai antibakteri. Selain itu masyarakat banyak menggunakan minyak mimba (*Azadirachta indica*) untuk eksema, kepal kotor, kudis dan kulitnya untuk mengatasi gangguan lambung (Subiyakto, 2002).



Gambar 1. Biji-biji mimba (*Azadirachta indica*)

Berdasarkan uji toksisitas ekstrak etanol 70% biji mimba (*Azadirachta indica*) (Gambar 1) terhadap *Artemia salina* (larva udang) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) diketahui bahwa biji mimba (*Azadirachta indica*) memiliki sifat toksik terhadap *Artemia salina* dengan nilai LC_{50} sebesar $38.79 \mu\text{g/ml}$ (Sari, 2006). Berdasarkan hasil penelitian ini maka dilakukan penelitian lanjutan yaitu uji sitotoksitas ekstrak etanol 70% biji mimba (*Azadirachta indica*) terhadap sel raji secara *in-vitro*.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah biji mimba (*Azadirachta indica*) dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BPTO) yang telah dideterminasi di Herbarium Bogoriensis, Bogor. Beberapa bahan kimia juga dipakai untuk mengidentifikasi golongan kimianya (uji kandungan alkaloid, tanin, flavonoid, triterpenoid dan sterol) antara lain HCl, larutan Bouchardat, Dragendoroff dan Mayer, NaCl, FeCl_3 , gelatin-NaCl, petroleum benzene P, serbuk Mg, pereaksi Lieberman Bouchard, etanol 96%, metanol, etil asetat P, petroleum benzene P, H_2SO_4 dan CH_3COOH anhidrat. Bahan-bahan lain adalah media RPMI 1640, larutan PBS (*phosphate buffer saline*), larutan tripan biru, DMSO, penicillin-streptomisin 1%, fungizon, natrium bikarbonat, dinatrium hidrogen fosfat, kalium dihidrogen fosfat, natrium klorida, *doxorubicin* dan *cisplatin* sebagai kontrol positif karena merupakan obat antikanker golongan kompleks platinum.

Penelitian dimulai dengan mengidentifikasi golongan kimia dari biji mimba (*Azadirachta indica*) (Depkes, 1995, Harborne, 1996). Hal ini dilakukan untuk memastikan adanya kandungan alkaloid, triterpenoid, sterol, flavonoid

dan tanin dalam biji mimba (*Azadirachta indica*) yang akan dipakai pada penelitian ini.

Langkah selanjutnya adalah mengekstrak bahan aktif dari biji mimba (*Azadirachta indica*) dengan maserasi bertingkat menggunakan n-heksan dan 70% etanol. Sebanyak 1 kg simplisia kering direndam dalam toples kaca yang bermulut lebar dengan n-heksan sebanyak 1 liter, dibiarkan selama 3 hari dan selama perendaman dilakukan pengadukan beberapa kali, kemudian disaring dengan kertas saring. Perendaman n-heksan dilakukan sebanyak 2 kali. Maka diperoleh maserat heksan dan ampas. Maserat heksan diabaikan. Ampas kembali direndam dengan 70% etanol sebanyak 2 liter, dibiarkan selama 3 hari dan selama perendaman dilakukan pengadukan beberapa kali, kemudian disaring dengan kertas saring. Perendaman dengan etanol dilakukan sebanyak 2 kali. Maserat etanol yang diperoleh dipekatkan dengan penguap putar vakum pada suhu 55°C dan putaran 57 rpm sehingga diperoleh ekstrak etanol yang kemudian disimpan pada suhu ruang. Fraksi ini lalu dikeringkan di oven pada suhu 50°C hingga diperoleh bobot tetap (Depkes, 1995). Fraksi etanol 70% ini kemudian dihitung rendemen dan bobot jenisnya. Fraksi tersebut di atas juga dihitung susut pengeringannya sesuai cara yang dilakukan Departemen Kesehatan (1995).

Pembuatan larutan uji ekstrak etanol 70% dari biji mimba (*Azadirachta indica*) dilakukan dengan mengambil masing-masing ekstrak sebanyak 50 mg untuk dilarutkan dalam labu ukur 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi induk $5000 \mu\text{g/ml}$ dengan 0,25% DMSO. Dari larutan induk tersebut dibuat pengenceran sehingga diperoleh konsentrasi $1000 \mu\text{g/ml}$ dan kemudian dilakukan pengenceran bertingkat sehingga didapat larutan uji dengan konsentrasi 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62 dan $7,81 \mu\text{g/ml}$. Cisplatin, yang dipakai sebagai kontrol positif, dibuat konsentrasi 15, 12,5, 10, 6,2, 5, 4, dan $3 \mu\text{g/ml}$. Sedangkan kontrol positif lain, yaitu *doxorubicin* dibuat konsentrasi 15, 12,5, 10, 6,2, 5, 2,5 dan $1,2 \mu\text{g/ml}$.

Pembuatan media RPMI 1640, larutan *phosphate saline buffer* (PBS) dan larutan tripan biru dilakukan sesuai metode yang dilakukan oleh Freshney (1987). Pengaktifan, pembiakan dan pengembangan sel *Burkitt's lymphoma* (sel raji) dilakukan sesuai metode yang dipakai oleh Freshney (1987). Adapun kepadatan sel raji dihitung dengan menggunakan *haemocytometer* dengan mencampurkan $20 \mu\text{l}$ suspensi sel dengan $180 \mu\text{l}$ biru tripan pada perbesaran $100\times$. Penghitungan sel dilakukan pada 4 bilik hitung yang masing-masing terdiri atas 16 kotak dan diambil rata-ratanya, kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran dan faktor koreksi untuk setiap bidang besar (volumenya 10^{-4} ml). Jumlah sel dihitung dengan rumus:

$$\frac{n}{4} \times P \times 10^4 \text{ sel/ml}$$

Keterangan:

- n = jumlah sel dalam 4 bilik
 4 = jumlah bilik *haemocytometer* yang dihitung
 10^4 = 1 ml per kapasitas *haemocytometer*
 P = faktor pengenceran

Uji sitotoksitas dengan metode penghitungan langsung (*viable cell count*) dilakukan dengan membagi 5 kelompok pengujian yaitu media ditambah sel sebagai kontrol negatif, sel ditambah pelarut (yaitu DMSO) sebagai kontrol pelarut, sel ditambah cisplatin sebagai kontrol positif yang dibuat sebanyak 7 konsentrasi, yaitu 15, 12,5, 10, 6,2, 5, 4 dan 3 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan kontrol positif lainnya, yaitu *doxorubicin* dibuat sebanyak 7 konsentrasi, yaitu 15, 12,5, 10, 6,2, 5, 2,5 dan 1,2 $\mu\text{g/ml}$. Pengujian ekstrak etanol 70% dilakukan dengan 8 konsentrasi, yaitu 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62 dan 7,81 $\mu\text{g/ml}$. Sel diinkubasi selama 24, 48, dan 72 jam untuk mendapatkan nilai LC_{50} pada berbagai konsentrasi. Masing-masing konsentrasi tersebut dimasukkan ke dalam plate 96 sumuran sebanyak 100 μl dan ditambahkan suspensi sel sebanyak 100 μl . Seri kadar diulang tiga kali (triplo) agar lebih valid. Kultur kemudian diinkubasi selama waktu-waktu inkubasi yang telah ditentukan pada 37° C. Untuk menghitung jumlah sel yang hidup (berwarna kuning) maupun mati (berwarna biru) maka diambil 50 μl dan direaksikan dengan tripan biru sebanyak 50 μl selama 3 menit. Hasil reaksi tersebut disuspensi dan diambil 10 μl untuk dihitung jumlahnya. Presentase kematian sel dengan metode penghitungan langsung (*viable cell count*) dihitung menggunakan rumus yang dipakai oleh Doyle dan Griffith (2000), yaitu:

$$\% \text{ viabilitas} = \frac{\text{jumlah sel yang hidup}}{\text{Jumlah sel hidup} + \text{mati}} \times 100\%$$

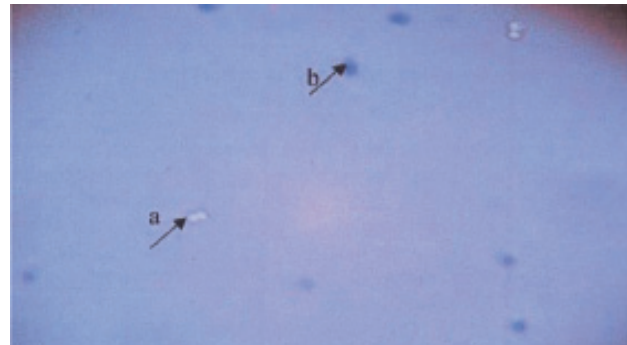
$$\% \text{ kematian} = 100\% - \% \text{ viabilitas}$$

Angka persen kematian yang diperoleh dari masing-masing konsentrasi diubah ke dalam angka probit dengan menggunakan tabel probit. Selanjutnya, dibuat persamaan regresi linier untuk melihat hubungan antarperlakuan dengan kematian sel raji. Perhitungan dengan cara probit ini diulangi dengan memasukkan angka 5 sebagai probit ke dalam persamaan regresi linier, hasilnya kemudian

disubsitusi dan dianti-logaritma untuk mendapatkan nilai LC_{50} .

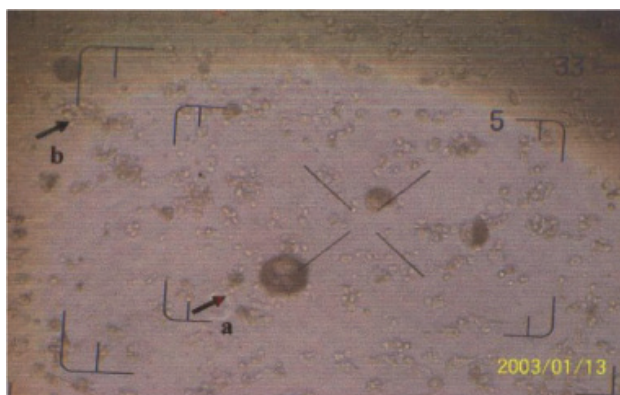
HASIL

Pengujian sitotoksitas pada penelitian ini menggunakan metode perhitungan langsung dengan *doubling time* pada inkubasi 24, 48 dan 72 jam. Perhitungan sel dilakukan dengan *haemocytometer* setelah pemberian tripan biru. Sebanyak 10 μl tripan biru ditambahkan ke dalam tiap masing-masing sumuran sel. Prinsip pewarnaan dengan tripan biru, yaitu pewarna akan masuk ke sel yang telah mati karena rusaknya membran sel, sedangkan sel yang hidup tidak menyerap pewarna karena membran sel yang masih utuh. Seluruh sel yang mati dan yang hidup dihitung. Sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri dan garis atas dihitung sedangkan sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan atau garis bawah tidak dihitung. Sebagian sel akan mengalami lisis dan nekrosis. Sel yang mati akan terlihat lebih berwarna gelap, dan bentuknya berubah (Gambar 2).



Gambar 2. a) Sel raji yang masih hidup terlihat jernih; b) Sel raji yang mati bereaksi dengan biru tripan

Pemberian fraksi etanol 70% biji mimba (*Azadirachta indica*) menyebabkan kematian pada sel raji, semakin lama masa inkubasi maka akan semakin banyak jumlah sel yang mengalami nekrosis (Gambar 3). Menurut Meyer *et al.* (1982), apabila nilai $LC_{50} \leq 30 \mu\text{g/ml}$ maka zat tersebut bersifat sitotoksik atau berpotensi sebagai antikanker. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ekstrak larutan uji, yaitu ekstrak etanol 70% biji *Azadirachta indica* memiliki sifat sitotoksik terhadap sel raji. Hal ini dapat dilihat dari nilai LC_{50} ekstrak etanol 70% biji mimba pada inkubasi 24, 48, serta 72 jam yaitu 10,37; 9,05 dan 4,30 $\mu\text{g/ml}$.



Gambar 3. a. sel berwarna lebih jernih, b. sel berwarna lebih gelap dan bentuk sel berubah karena mengalami nekrosis setelah pemberian ekstrak biji *A. Indica* selama 24 jam

Berdasarkan nilai LC_{50} yang diperoleh dari penelitian ini, yaitu pada inkubasi 24 jam sebesar $10,37 \mu\text{g/ml}$, inkubasi 48 jam, yaitu $9,05 \mu\text{g/ml}$, dan pada inkubasi 72 jam, yaitu $4,30 \mu\text{g/ml}$ diketahui bahwa biji mimba (*Azadirachta indica*) memiliki sifat sitotoksitas. Jika dibandingkan dengan nilai LC_{50} dari cisplatin dan *doxorubicin* sebagai antikanker yang telah banyak digunakan, biji mimba memiliki LC_{50} yang tidak jauh selisihnya dari kedua antikanker tersebut.

PEMBAHASAN

Pada pengujian sitotoksitas ini dilakukan ekstraksi bahan uji dengan menggunakan maserasi untuk memisahkan zat-zat aktif yang terdapat pada simplisia. Pemilihan metode ekstraksi dengan maserasi agar kerusakan ekstrak yang diakibatkan pemanasan dapat dihindari. Selain itu metode maserasi ini lebih mudah, dan tidak memerlukan alat khusus dalam pelaksanaannya.

Pemilihan etanol 70% sebagai pelarut diharapkan dapat menarik zat-zat berkhasiat yang terdapat dalam simplisia. Dari hasil uji identifikasi golongan kimia terbukti bahwa ekstrak etanol 70% yang akan diujikan mengandung beberapa senyawa yang berkhasiat seperti alkaloid, triterpenoid, sterol, flavonoid, dan tanin. Biji mimba (*Azadirachta indica*) mengandung 20–50% minyak (Sutamo dan Atmowidjojo, 2000). Kandungan yang paling banyak ditemukan dalam biji mimba adalah tetranortriterpenoid yang salah satunya adalah *azadirachtin* dan senyawa ini yang diduga berpotensi sebagai antikanker (Subiyakto, 2002).

Maserasi pertama dilakukan dengan pelarut n-heksan agar zat-zat yang bersifat nonpolar ditarik terlebih dahulu oleh n-heksan sehingga diperoleh zat yang bersifat polar yang akan digunakan untuk uji sitotoksitas. Hal ini berdasarkan nilai LC_{50} dari uji pendahuluan dengan *Brine*

Shrimp Lethality Test sebesar $38,79 \mu\text{g/ml}$ bahwa zat yang bersifat polar memiliki sifat lebih toksik dibandingkan zat-zat nonpolar (Sari, 2006). Penggunaan etanol 70% dengan pertimbangan etanol mudah menguap sehingga waktu yang dibutuhkan untuk memekatkan dan mengeringkan ekstrak menjadi lebih singkat dibandingkan pelarut air. Selain itu pada umumnya alkohol memberikan perlindungan pada ekstrak terhadap kontaminasi mikroba (Harborne, 1996).

Pemilihan sel raji pada penelitian ini disebabkan karena sel raji adalah termasuk salah satu *cell line* yang aman digunakan pada uji sitotoksitas, mudah dalam pengkulturan dan perlakuan. Sel raji termasuk derivat *cell line Burkitt's lymphoma* pada penderita kanker getah bening yang banyak ditemukan pada penderita kanker sebagai penyebab kematian. Sel ini melayang-layang pada medium sehingga tidak membutuhkan tripsin pada saat pengkulturan. Medium RPMI 1640 digunakan sebagai medium kultur yang banyak mengandung nutrisi yang baik untuk pertumbuhan sel.

Berdasarkan hasil pengujian cisplatin sebagai kontrol positif diperoleh LC_{50} sebesar $11,95 \mu\text{g/ml}$. Nilai LC_{50} *doxorubicin* lebih rendah yaitu $9,36 \mu\text{g/ml}$. Pemilihan kontrol positif ini karena cisplatin dan *doxorubicin* merupakan obat terpilih kanker yang telah banyak digunakan pada pengobatan. *Doxorubicin* memiliki sifat lebih toksik terhadap sel raji daripada cisplatin. Cisplatin dan *doxorubicin* merupakan antibiotik antikanker yang dapat mengganggu sintesis DNA dan RNA dari sel kanker pada saat siklus sel, sitotoksitas pemberian cisplatin dapat terjadi pada tahap pengembangan siklus sel, khususnya ketika sel berada pada fase G_1 dan S. *Doxorubicin* bekerja menghambat proses replikasi transkripsi DNA pada sel. Selain itu pemberian *doxorubicin* pada sel raji dapat mengganggu fungsi transportasi pada membran sel.

Biji mimba (*Azadirachta indica*) mengandung minyak terdiri atas triterpenoid seperti limonoid, melicarpin, nimbin, nimbolimin dan sallanin dan *azadirachtin*. *Azadirachtin* merupakan kandungan terbanyak dari biji mimba (*Azadirachta indica*) (Sutamo dan Atmowidjojo, 2000). Dalam 1 gram biji mimba (*Azadirachta indica*) mengandung 2–4 mg *azadirachtin* bahkan ada yang mencapai 9 mg (Subiyakto, 2002). Identifikasi yang dilakukan terhadap simplisia biji mimba (*Azadirachta indica*), diperkirakan bahwa kandungan terpenoid yaitu *azadirachtin* memiliki sifat sitotoksik terhadap sel raji. Antikanker produk tanaman seperti alkaloid *Vinca* sp. umumnya bekerja menghambat pembentukan komponen mikrotubuli pada kumparan mitosis sehingga metafase terhenti. Pada golongan diterpenoid sebagai antikanker

bekerja meningkatkan polimerisasi tubulin, kestabilan polimer mikrotubuli menyebabkan hambatan mitosis pada G₂ dan M (Siswandono dan Sukardjo, 2000).

Golongan triterpenoid pada ekstrak etanol 70% biji mimba (*Azadirachta indica*) bekerja pada saat siklus sel sehingga menyebabkan sitotoksitas. Selain dari persentase kematian sel, sebagai bukti sitotoksitas dari ekstrak etanol 70% biji mimba (*Azadirachta indica*) dapat dilihat dari morfologi sel pada saat sebelum dan sesudah perlakuan. Sel yang sebelum perlakuan terlihat lebih bening dan bentuknya masih utuh, sedangkan sel sesudah perlakuan akan mengecil dan bentuknya tidak beraturan serta warna sel yang gelap.

Uji sitotoksitas ini dilakukan dengan *doubling time* sehingga dapat diketahui efek sitotoksitas biji mimba (*Azadirachta indica*) apabila diberikan dalam waktu yang semakin lama. Dari nilai LC₅₀ yang diperoleh dapat diketahui bahwa waktu pemberian yang semakin lama menyebabkan menurunnya nilai LC₅₀. dan ini berarti daya mematikan sel ekstrak etanol 70% biji mimba (*Azadirachta indica*) akan meningkat dengan pemberian yang semakin lama. Berdasarkan penelitian ini dapat dilakukan isolasi dan identifikasi selanjutnya terhadap zat aktif sehingga dapat diketahui secara pasti zat yang bersifat sitotoksitas terhadap sel raji.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 70% biji mimba (*Azadirachta indica*) memiliki sifat sitotoksik terhadap sel raji terbukti dengan nilai LC₅₀ pada inkubasi 24 jam sebesar 10,37 µg/ml, pada inkubasi 48 dan 72 jam masing-masing 9,05 µg/ml dan 4,30 µg/ml, sehingga biji mimba memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi obat kanker. Semakin lama masa inkubasi maka semakin meningkat daya sitotoksitas dari ekstrak 70% etanol yang diujikan.

KEPUSTAKAAN

Departemen Kesehatan RI, 1995. *Materia Medika Indonesia*, jilid II. Departemen Kesehatan RI. Jakarta, 68–69.

- Doyle A dan Griffiths JB, 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. John Wiley & Sons, LTD. New York, 12–16, 48–49, 409.
- Freshney RI, 1987. *Animal Cell Culture, A practical Approach*. 1st Edition. IRL Press. Washington DC, 3, 38, 183–188, 309–312, 329–330, 336–337.
- Gruenwald J, Brendler T and Jeanicke C, 1998. *Physician's Desk Reference For Herbal Medicine*, 1st edition. Medical Economic Company, Montvale, NJ, 134–136.
- Harborne, 1996. *Metode Fitokimia*. Terbitan kedua. Terjemahan dari: *Phytochemical methods*. Oleh: Padamawinata, Kosasih, Iwan S. ITB. Bandung, 6, 147.
- Hyne A, 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*, jilid III. Badan Litbang Kehutanan, Jakarta, 88–90.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobson LB, Nicholas DE, McLaughlin JL, 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituent, *Planta Medica* 2: 12, 31–34, 45.
- Munir SR, Lazuardi M dan Indarwati R, 2000. *Studi Antiproliferasi Infus Benalu Duku Terhadap Sel Kanker Secara In Vitro*. *Laporan Penelitian*. Lemabga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya, 2.
- Sari A, 2006. Uji toksisitas ekstrak ethanol 70% biji mimba (*Azadirachta indica*) fraksi n-heksan, fraksi etil-asetat dan fraksi air terhadap *Artemia salina*. *Skripsi*. UHAMKA, Jakarta.
- Siswandono dan Sukardjo B, 2000. *Kimia Medisinal*. Edisi III. Airlangga University Press. Surabaya, 163–165, 166–170.
- Subiyakto, 2002. Pemanfaatan Serbuk Biji Mimba (*Azadirachta indica*) untuk pengendalian hama kapas. *Jurnal Balai Penelitian Tanaman dan Serat, Malang*, 14–17.
- Sudjarwo SA, 2001. Daya Hambat Ekstrak *Ganoderma lucidum* Terhadap Pertumbuhan Sel Kanker secara In Vitro. *Laporan Penelitian*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga, Surabaya, 1–2, 8–9.
- Sudarsono, Gunawan D dan Wahyono S, 2002. *Tumbuhan Obat II, Hasil Penelitian, Sifat-sifat dan Penggunaan*. Pusat Studi Obat Tradisional Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 36–39.
- Sutamo H dan Atmowidjojo S, 2000. *Pengenalan dan Pemanfaatan Tumbuhan Penunjang*, seri 2 *Prosea* Bogor, Indonesia, 56–57.

Reviewer: **Prof. Earsito, Ph.D.**