

PENGARUH EKSTRAK DAUN TAPAK DARA (*Catharanthus roseus*) TERHADAP KEGAGALAN SITOKINESIS SEL SPERMATOSIT PRIMER BELALANG

Kamalia Fikri

Dosen Pendidikan Biologi FKIP Universitas Jember
Kamalia.fikri@gmail.com

Abstract

Catharanthus roseus known as tapak dara generates specific bisindole alkaloids namely vinblastine and vincristine, which are potent as anticancer agents. This study is aimed to find out the effect of *Catharanthus roseus* leaves extract on cytokinesis failure. The treatment of concentration of *Catharanthus roseus* leaves extract in Carlson's solution consisted of five concentration levels: 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7% dan 0.9%. Carlson's solution was utilized as the control. The result of this study revealed that *Catharanthus roseus* leaves extract has significantly effect on cytokinesis failure. Moreover, there was a failure of division.

Key words: *Catharanthus roseus* leaves, extract, cytokinesis failure

1. PENDAHULUAN

Catharanthus roseus yang lebih dikenal dengan tanaman tapak dara, merupakan salah satu tanaman yang banyak digunakan sebagai obat selama berabad-abad. Di Eropa tanaman ini digunakan sebagai obat diabetes, di Cina sebagai obat cuci darah dan obat batuk, dan di seluruh Karibia digunakan sebagai obat iritasi dan infeksi mata. Akar, batang, hingga daun tanaman tapak dara mengandung unsur-unsur zat kimiawi yang bermanfaat bagi pengobatan (Sutomo, 2010). Tanaman tapak dara menghasilkan 130 terpenoid indole alkaloid (TIAs) yang lazim disebut vinkaalkaloid (Van der Heijden, 2009). Keberadaan alkaloid tersebut tersebar pada seluruh bagian tanaman. Akar tanaman tapak dara mengandung ajmalicine dan serpentin yang berperan penting dalam mengontrol tekanan darah (Shukla, 2011). Kandungan alkaloid dalam daun dapat digunakan sebagai zat antidiabetik (Mostofa, 2010.). Daun tapak dara mengandung alkaloid bisindole spesifik yakni vinkristin dan vinblastin yang berpotensi sebagai antikanker (Shukla,

2011). Kemampuannya dalam merusak benang spindel dan menghambat segregasi kromosom pada pembelahan sel memunculkan istilah vinkristin dan vinblastin sebagai agen antimotik (Hadfield, 2014).

Vinkristin dan vinblastin merupakan dua anggota dari kelompok besar agen antimotik yang menghambat penyusunan mikrotubul (Hari, 2010). Target selular senyawa ini adalah subunit β -tubulin dari α/β tubulin heterodimer. Kedua senyawa tersebut menghambat penambahan heterodimer dalam pembentukan mikrotubul (Verrills, 2012). Senyawa vinkaalkaloid mengikatkan diri pada ujung positif mikrotubul sehingga memicu terjadinya depolimerisasi mikrotubul dan mengganggu proses segregasi kromosom menuju kutub sel (Hadfield, 2014).

Mikrotubul sangat dinamis muncul dan lenyap ketika sel sedang mengalami pembelahan (Becker, 2003). Pada mitosis, mikrotubul ini berfungsi mengatur letak dan arah kromosom terhadap sumbu gelendong, mengatur dan menggerakkan kromosom di bidang ekuator selama metaphase (Lodish, 2004).

Pada tahap telofase, mikrotubul polar terus memanjang memisahkan dua kutub. Mikrotubul juga berperan dalam pembentukan membran baru pada proses ingresi membran membentuk dua sel anak (Straight, 2012). Telofase diikuti oleh tahap sitokinesis ketika sitoplasma dibagi oleh struktur aktin miosin yang dinamakan *contractil ring* yang menjepit dua sel menjadi dua (Schmidt, 2013).

2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian korelasional kausatif dengan pendekatan eksperimen. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan ulangan dilakukan sebanyak 15 kali. Dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) sumber keragaman yang diamati hanya perlakuan dan galat (Hanafiah, 2002). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kasar daun tapak dara, variabel terikatnya adalah kegagalan sitokinesis pada proses pembelahan sel spermatosit primer, sedangkan variabel kontrol adalah jenis belalang dan suhu pengamatan. Sampel dalam penelitian ini adalah seluruh sel spermatosit dalam testikel belalang *Cantatops angustifrans*.

Proses ekstraksi daun tapak dara (*Catharanthus roseus*) dilakukan dengan cara ekstraksi Soxhlet menggunakan pelarut etanol 96%. Sampel daun tapak dara ditimbang sebanyak 60 g, dibungkus kertas saring dimasukkan dalam tabung Soxhlet kemudian labu Soxhlet diisi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 300 mL. Unit Soxhlet dipasang dilengkapi pendingin balik, dan dilakukan pemanasan pada suhu titik didih pelarut, dibiarkan terjadi sirkulasi sampai pelarut menjadi jernih (Pambayun, 2007). Selanjutnya, ekstrak yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan dengan menggunakan Buchi Vacuum Rotavapor pada suhu 40-45°C, sehingga diperoleh ekstrak pekat daun tapak dara (*Catharanthus roseus*) (Islam, 2013). Selanjutnya ekstrak dilarutkan ke dalam medium sel sesuai dengan konsentrasi yang dibutuhkan untuk pengujian terhadap proses pembelahan sel spermatosit primer belalang *Cantatops angustifrans*.

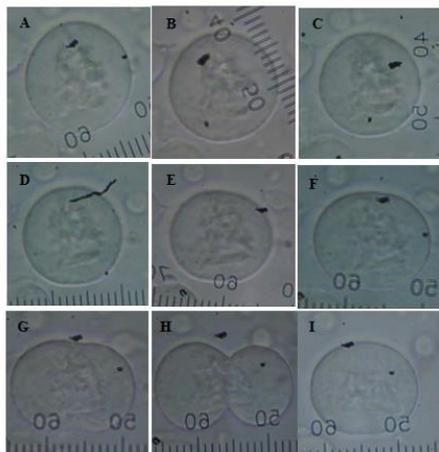
Isolasi sel spermatosit dilakukan dengan cara memotong bagian abdomen belalang secara diagonal, ± 4 ruas dari ujung distal dengan menggunakan gunting bedah. Testikular belalang yang telah dikeluarkan, dimasukkan ke dalam larutan *Carlson* 0,9x dan diamati dibawah *dissecting mikroskop* untuk dibersihkan dari bagian selaput peritonialnya (bagian berwarna kuning) dan dipisah-pisahkan menggunakan scalpel sehingga antara tubulus sperma (*sperm tube*) satu dengan yang lain terpisah. Selanjutnya testikular belalang yang sudah bersih dipindahkan ke dalam cawan yang berisi larutan *Carlson* 0,9x sebagai pengamatan kontrol, sedangkan untuk perlakuan, testikular dimasukkan ke dalam larutan *Carlson* 0,9x yang mengandung ekstrak tapak dara dalam berbagai konsentrasi yang telah ditentukan. Larutan *Carlson* 0,9x membuat kondisi fisiologis sel yang dipreparasi serupa dengan dengan kondisi in vivo. Lebih lanjut dengan metode ini, sebuah sel yang dipreparasi dalam keadaan profase akan menyelesaikan mitosisnya namun tidak mampu membelah lagi untuk kedua kalinya (Carlson, 1964).

Setelah tubulus-tubulus tersebut berada di dalam larutan selama ± 7 menit, selanjutnya satu tubulus sperma dipindahkan di atas kaca benda yang telah ditetesi larutan *Carlson* 0,9x atau sesuai perlakuan. Bagian apikal tubulus sperma dipotong menggunakan scalpel sehingga sel-sel spermatosit keluar. Sediaan ditutup dengan menggunakan kaca penutup yang telah dilapisi vaselin pada bagian tepinya untuk menghindari terjadinya evaporasi. Preparat diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

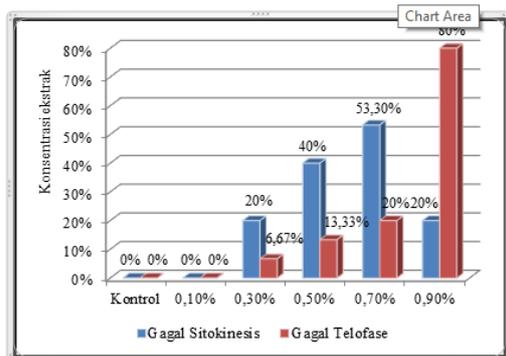
Berdasarkan hasil pengamatan dalam sampel, proses pembelahan sel pada sel-sel yang terpapar di dalam ekstrak kasar daun tapak dara dengan berbagai konsentrasi menunjukkan bahwa terdapat beberapa sel yang mengalami kegagalan sitokinesis, artinya bahwa pembentukan lekukan membran sel spermatosit primer pada alur pembelahan di bidang ekuator, gagal membagi sitoplasma menjadi dua

bagian guna menyempurnakan proses pembelahan sel membentuk dua sel anak.



Gambar 1. Seri pembelahan sel spermatosit primer yang mengalami gagal sitokinesis. (A) metafase, (B-F) anafase, (G) telofase, (H) awal sitokinesis, (I) proses sitokinesis gagal

Selain itu beberapa sel juga tidak dapat mencapai tahap telofase, artinya pergerakan kromosom tidak dapat mencapai kutub.



Gambar 2. Grafik Histogram Prosentase Sel-Sel yang Mengalami Gagal Sitokinesis Maupun Sel-Sel yang Tidak Mencapai Telofase pada Pembelahan Sel Spermatosit Primer Belalang

Gambar 2. menunjukkan visualisasi prosentase sel-sel yang mengalami gagal sitokinesis maupun sel-sel yang tidak mencapai telofase. Berdasarkan hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada

perlakuan kontrol dan perlakuan ekstrak kasar daun tapak dara dengan level konsentrasi 0,1% tidak menunjukkan adanya kegagalan sitokinesis maupun peristiwa gagal telofase. Awal munculnya peristiwa gagal sitokinesis serta gagal telofase ditemukan pada pengamatan level konsentrasi 0,3% dan terus meningkat hingga konsentrasi 0,9%. Pada konsentrasi 0,9% kegagalan sel untuk mencapai telofase lebih mendominasi, artinya bahwa pada konsentrasi ini sebagian besar sel tidak mengalami pergerakan kromosom, sehingga kromosom tidak dapat mencapai pada daerah kutub.

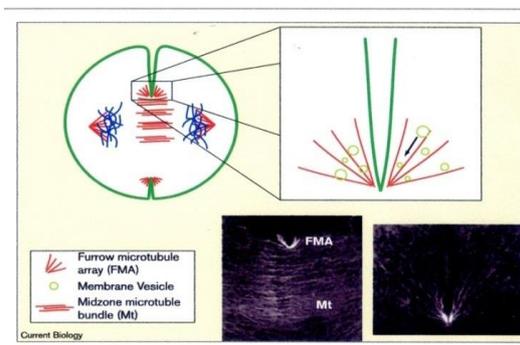
Berdasarkan Gambar 2, persentase kegagalan pembelahan bertambah dengan meningkatnya level konsentrasi ekstrak kasar daun tapak dara yang diberikan. Adapun kegagalan pembelahan pada perlakuan kontrol, perlakuan dengan konsentrasi ekstrak 0,1%, 0,3%, 0,5%, 0,7% dan 0,9%, dapat ditunjukkan berturut-turut sebagai berikut 0%; 26,67%; 53,33%; 73,33% dan 100%. Dengan demikian kemungkinan terjadinya pembelahan normal berturut-turut adalah sebagai berikut: 100%; 73,33%; 46,67%; 26,67% dan 0%.

Adanya gangguan dalam proses pembelahan akibat perlakuan ekstrak kasar daun tapak dara diduga dikarenakan adanya kandungan vinblastin dan vinkristin di dalam ekstrak.

Penyusunan mikrotubul selama pembelahan sel mengontrol segregasi kromosom, penempatan kontraktil ring dan penyelesaian pembelahan sel (Gonzalez, 2010). Susunan mikrotubul antiparalel yang terletak diantara segregasi kromosom disebut juga dengan sentral spindle atau "spindel midzone", menginisiasi ingresi membran pada alur pembelahan dalam awal proses sitokinesis (Murthy, 2010). Adanya gangguan penyusunan mikrotubul pada sentral spindle atau "spindel midzone" oleh adanya zat vinkristin dan vinblastin, diduga akan mengganggu proses sitokinesis. Banyak bukti menunjukkan adanya hubungan saling tergantung antara "spindel midzone" dengan jaringan aktin dan miosin pada membran korteks (Gatti,

2008). Ketika salah satu dari kedua struktur ini diganggu, maka penyusunan salah satu struktur yang lain akan terganggu pula (D'Avino, 2014.). Oleh karenanya adanya vinblastin dan vinkristin yang mengganggu penyusunan mikrotubul juga ikut mengacaukan penyusunan aktin dan miosin pada proses sitokinesis.

Membran yang terbentuk pada alur pembelahan, tidak tumbuh dari membran sel induk, namun merupakan membran yang baru terbentuk. Membran baru tersebut berasal dari fusi membran vesikel yang berasal dari badan golgi pada alur pembelahan. Pembentukan membran baru terjadi karena peran penting dari *Furrow Microtubule Array* (FMA) yang memberi sinyal insersi membran pada alur pembelahan (Danilchik, 2008; Dyer, 2012).



Gambar 3. Peran FMA dalam Insersi Membran pada Alur Pembelahan (Straight, 2012)

Berdasarkan penjelasan di atas, mikrotubul sangat berperan dalam pembentukan membran sel baru untuk membagi sitoplasma pada akhir sitokinesis. Pada penelitian ini, kandungan vinblastin dan vinkristin sebagai agen anti miktotubul dapat menyebabkan depolimerisasi mikrotubul yang mengganggu dinamika mikrotubul. Oleh karenanya dengan semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka jumlah kegagalan sitokinesis semakin meningkat akibat tidak terbentuknya membran baru yang membagi sitoplasma menjadi dua sel anak. Hal ini sebuah penelitian bahwa depolimerisasi mikrotubul dapat menghambat proses sitokinesis (Bicknell, 2011).

Sedangkan kegagalan sel dalam mencapai tahap telofase seiring dengan meningkatnya ekstrak kasar daun tapak dara, dikarenakan semakin meningkatnya kandungan vinblastin dan vinkristin. Hal ini meningkatkan terjadinya depolimerisasi mikrotubul sehingga pergerakan kromosom tidak dapat mencapai kutub sebagai ciri tahap telofase. Pada konsentrasi 0,9%, sebagian besar sel gagal mencapai telofase, dikarenakan konsentrasi vinblastin dan vinkristin memicu terbentuknya parakristal oleh tubulin sehingga polimerisasi mikrotubul polar terganggu dan kromosom tidak mencapai kutub.

4. KESIMPULAN

Ada pengaruh ekstrak kasar daun tapak dara (*Catharantus roseus*) terhadap kegagalan pembelahan pada proses pembelahan sel spermatosit primer belalang. Awal munculnya peristiwa gagal sitokinesis serta gagal telofase ditemukan pada pengamatan level konsentrasi 0,3%. Kegagalan telofase terus meningkat hingga konsentrasi 0,9%.

5. REFERENSI

- Becker, Kleinsmith, & Hardin. 2003. *The World of The Cell International Edition*. United states of America: Parson Education, Inc.
- Bicknell, A., Babour, A., Federovitch, C., & Nilwa, M. 2011. A Novel Role In Cytokinesis Reveals A Housekeeping Function For The Unfolded Protein Response. *Journal of Cell Biology*, **177** (6): 1017-1927
- Carlson, J.G & Gaulden, M. E. 1964. *Grasshoppers Neuroblast Technique In Methode In Cell Pshycology*. New York: Acad Press.
- D'Avino, P. P., Savoian , M., & Glover, D. 2014. Cleavage Furrow Formation And Ingression During Animal Cytokinesis: A Microtubule Legacy. *Journal of Cell Science*, **118**: 1594-1558

- Danilchik, M., Funk, W., Brown, E., & Larkin, K. 2008. Requirement for Microtubules In New Membrane Formation During Cytokinesis Of *Xenopus* Embryos. *Dev Biol*, **194**: 47-60
- Dyer, N., Rebollo, E., Domínguez, P., Elkhatib, N., Chavrier, P., Daviet, L., González, C., & Gaitán, M. 2012. Spermatocyte Cytokinesis Requires Rapid Membrane Addition Mediated By ARF6 On Central Spindle Recycling Endosomes. *Development*, **134**: 4437-4447
- Gatti, Giansat, & Bonaccorsi. 2008. Relationships Between The Central Spindle And The Contractile Ring During Cytokinesis In Animal Cells. *Microsc Res Tech*, **49** (2): 202-208
- Gonzalez, C. 2010. Cell Division: The Place and Time Dispatch of Cytokinesis. *Current Biology*, **13**: R363-R365
- Hadfield, J., Ducki, S., Hirst, N., & McGown, A. 2014. Tubulin and Microtubules as Target for Anticancer Drugs. *Progress in Cell Cycle Research*, **5**: 309-325
- Hanafiah, K. I. 2002. *Rancangan Percobaan, Teori dan Aplikasi*. Palembang: PT. Raja Grafindo Persada.
- Hari, M., Wang, Y., Veeraraghavan, S., & Cabral, F. 2010. Mutations in α and β Tubulin That Stabilize Microtubules and Confer Resistance to Colcemid and Vinblastine1. *Molecular Cancer Therapeutics*, **2**: 597-605
- Islam, M. A., Akhtar, A., Khan, M. R. I., Hossain, M. S., Alam, M. K., Wahed, M. I. I., Rahman, B. M., Anisuzzaman, A. S. M., Shaheen, S. M & Ahmed, M. 2013. Antidiabetic and Hypolipidemic Effects of Different Fractions of *Catharanthus Roseus* (Linn.) on Normal and Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Journal of Scientific Research*, **1** (2): 334-344.
- Lodish, Berk, Matsudaira, Keiser, Kreiger, Scott, Zipursky, & Darnell. 2004. *Molecular Cell Biology*. United States of America: W. H. Freeman and Company.
- Mostofa, M., Choudhury, M. E., Hossain, M. A., Islam, M. Z., & Sumon, M. H. 2010. Antidiabetic Effects of *Catharanthus roseus*, *Azadirachta indica*, *Allium sativum* and *Glimepride* in Experimentally Diabetic Induced Rat. *Bangladesh. Journal for Veterinary Medicine*, **5** (1): 99-102
- Murthy, K. & Wadsworth, P. 2010. Dual Role For Microtubules In Regulating Cortical Contractility During Cytokinesis. *Journal of Cell Science*, **121**: 2350-2359
- Pambayun, R., Gardjito, M., Sudarmadji, S., & Kuswanto, K. R. 2007. Kandungan Fenol dan Sifat Antibakteri dari Berbagai Jenis Ekstrak Produk Gambir (*Uncaria gambir* Roxb. *Majalah Farmasi Indonesia*, Vol. **18** (3): 141-146
- Schmidt, M. & Bastians, H. 2013. Mitotic Drug Targets and The Development of Novel Anti-Mitotic Anticancer Drugs. *Drug Resistance Updates*, **10**: 162-181
- Shukla, A. K., Shasany, A. K., A. Gupta, M. M., & Khanuja, S. 2011. Transcriptome analysis in *Catharanthus roseus* Leaves and Roots for Comparative Terpenoid Indole Alkaloid profiles. *Journal of Experimental Botany*, **57** (14): 3921-3932.
- Straight, A. F & Field, C. M. 2012. Microtubules, Membran and Cytokinesis. *Current Biology*, **10**: R760-R770.
- Sutomo, B. 2010. *Tapak Dara Bunga Cantik Pencegah Kanker*, (Online), (<http://keyword.netscape.com/ns/b>

- [oomframe.html](#), diakses 2 April 2016).
- Van der Heijden, R., Jacobs, D. I., Snoeijer, W., Hallard, D., & Verpoorte, R. 2009. The Catharantine Alkaloids: Pharmacognosy and Biotechnology. *Current Medicinal Chemistry*, **11(5)**: 607-628.
- Verrills, N.M., Walsh, B. J., Cobon, G. S., Hains, P. G., & Kavallaris, M. 2012. Proteome Analysis of Vinca Alkaloid Response and Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia Reveals Novel Cytoskeletal Alterations. *The Journal Of Biological Chemistry*, **278**: 45082–45093.