

CYTOTOXICITY OF *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. FRUIT MEAT AND SEED ETHANOL EXTRACT TO MONONUCLEAR PERIFER NORMAL CELL OF HUMAN BODY

Uji Sitotoksitas Ekstrak Daging Dan Biji Buah Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl Terhadap Sel Mononuklir Normal Perifer Manusia

Endang Astuti*, Deni Pranowo and Santi Dwi Puspitasari

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences,
Gadjah Mada University, Sekip Utara, Yogyakarta Indonesia 55281

Received 18 April 2006; Accepted 19 May 2006

ABSTRACT

There were many research on *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. fruit for its activity as possible anticancer. However, there wasn't investigation that *P. macrocarpa* seed and fruit meat ethanol extract effect to normal cell. The research was conducted to identify the ethanol extract of *P. macrocarpa* for cytotoxic activity against mononuclear perifer normal cell of human blood. The research comprised several sections including *P. macrocarpa* seed and fruit meat maceration with ethanol, and the cytotoxic activity test against mononuclear normal cell. The results showed that the ethanol extract of *P. macrocarpa* fruit meat and seed was slightly toxic against mononuclear normal cell with the LC_{50} of 3817.54 $\mu\text{g/mL}$ and 1349.29 $\mu\text{g/mL}$ respectively. Tamoxifen and 5-fluorourasil, anticancer drugs were extremely toxic against mononuclear normal cell giving LC_{50} of 3.52 $\mu\text{g/mL}$ and 4.05 $\mu\text{g/mL}$. The ANOVA *f*-test ($P < 0,05$) showed that seed of ethanol has higher cytotoxic activity than fruit meat extract. Extract no cytotoxic activity difference between tamoxifen and 5-fluorourasil.

Keywords: *Phaleria macrocarpa*, mononuclear normal cell, cytotoxic.

PENDAHULUAN

Mahkota dewa dikenal dengan nama ilmiah *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) adalah salah satu tanaman obat asli Indonesia. Baik biji maupun daging buah *P. macrocarpa* biasa dicampurkan pada obat tradisional (jamu) karena dipercaya dapat menyembuhkan berbagai penyakit ringan seperti alergi, gatal-gatal, pusing sampai penyakit berat seperti kanker, lever, diabetes, asam urat dan penyakit lain. Bagian biji sangat beracun namun jika diolah secara benar akan banyak manfaatnya [1]. Oleh karenanya wajar apabila pemanfaatan biji buah saat ini masih sebatas sebagai obat luar. Khasiat suatu bahan erat kaitannya dengan senyawa yang terkandung di dalam bahan tersebut. Pada bagian daging buah *P. macrocarpa* terkandung senyawa alkaloid, saponin, dan flavonoid, sedangkan bagian daun mengandung alkaloid, saponin, serta polifenol [2]. Ekstrak kloroform *P. macrocarpa* bagian daun mengandung senyawa terpenoid [3], bagian buah mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan turunan fenil propanoid, bagian biji mengandung senyawa alkaloid dan terpenoid [4]. Di antara senyawa-senyawa tersebut, flavonoid mempunyai bermacam-macam efek, salah satunya adalah efek antitumor [5,6]. De Padua dkk mengemukakan bahwa triterpenoid dan steroid saponin mempunyai efek anti inflamasi, analgesik dan sitotoksik sedangkan fenol ataupun polifenol mempunyai efek

antikanker [5]. Tanin selain mempunyai efek antikanker juga dapat sebagai antivirus (HIV).

Kanker merupakan penyakit yang sangat ditakuti akhir-akhir ini. Pada dasarnya kanker merupakan kelainan sel yang ditandai oleh pergeseran mekanisme kontrol proliferasi dan diferensiasi sel. Menurut Sydney dkk sel kanker akan berproliferasi berlebihan dan membentuk tumor lokal yang dapat menekan atau menginvasi struktur normal yang berdekatan [7]. Kanker sering dikenal oleh sebagian masyarakat sebagai tumor, padahal tidak semua tumor adalah kanker karena tumor adalah segala benjolan tidak normal atau abnormal yang bukan radang. Penderita kanker akan merasakan penderitaan yang dapat berakibat pada kematian.

Kanker merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit kardiovaskular di negara maju yang telah berhasil membasmi penyakit infeksi sedangkan di Indonesia menduduki peringkat keenam. Dengan metode terapi saat ini, sepertiga jumlah penderita tertolong melalui operasi, radiasi dan kemoterapi. Kesembuhan hampir seluruhnya dicapai pada penderita kanker stadium awal. Kemoterapi bertujuan merusak secara selektif sel kanker tanpa mengganggu sel normal [8]. Namun pengobatan dengan metode ini sering mengalami kegagalan. Sampai sekarang masih belum ditemukan antikanker yang bekerja secara selektif. Pengobatan secara kemoterapi sangat mahal dan belum menjamin kesembuhan. Antikanker ideal

* Corresponding author. Phone/Fax : 0062-274-545188
Email address : eastuti@yahoo.com

akan membasmi sel kanker tanpa merusak jaringan normal [7]. Berdasarkan hal tersebut, saat ini digalakkan penelitian untuk menemukan antikanker yang aman dan spesifik membunuh sel kanker. Selain itu dikembangkan pula pengobatan secara tradisional dengan memanfaatkan ekstrak tanaman.

Daun dan buah *P. macrocarpa* digunakan untuk obat disentri dan anti tumor sedangkan biji buah *P. macrocarpa* sebatas obat kulit karena sangat toksik [9]. Seduhan buah *P. macrocarpa* menyembuhkan kanker hati [10]. Ekstrak daun dan buah *P. macrocarpa* mempunyai efek antihistamin. Bagian batang digunakan untuk mengobati kanker tulang [11]. Cangkang buah yaitu batok pada biji digunakan untuk pengobatan penyakit kanker payudara, kanker rahim, sakit paru-paru dan sirosis hati. Cangkang lebih poten dibandingkan dengan kulit dan daging buah [1].

Hertiani, dkk dan Bakhriansyah membuktikan bahwa ekstrak etanol biji *P. macrocarpa* bersifat toksik terhadap sel kanker payudara T47D [12,13]. Penelitian Sumastuti dkk serta Wardhani telah membuktikan bahwa ekstrak etanol daging *P. macrocarpa* juga bersifat toksik terhadap sel HeLa [14,15]. Selain itu, ekstrak etil asetat, ekstrak heksana, ekstrak etanol dan minyak atsiri biji dan daging buah *P. macrocarpa* bersifat toksik terhadap sel HeLa dan sel *myeloma* [16,17,18,19]. Penelitian yang dilakukan Danial menguji toksisitas minyak atsiri dan ekstrak heksana daging dan biji buah *P. macrocarpa* terhadap sel mononuklir normal [20]. Belum banyak dilakukan penelitian mengenai toksisitas buah *P. macrocarpa* terhadap sel normal. Oleh karena itu, penelitian menguji apakah ekstrak daging dan biji buah *P. macrocarpa* bersifat toksik atau tidak terhadap sel normal. Untuk itu dilakukan uji sitotoksitas ekstrak daging dan biji buah *P. macrocarpa* terhadap sel mononuklir normal perifer manusia. Dari penelitian ini diperoleh informasi mengenai keamanan penggunaan buah *P. macrocarpa* terhadap sel mononuklir normal.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan adalah daging dan biji buah *P. macrocarpa* yang diperoleh dari daerah Bantul, Yogyakarta. Sel uji yang digunakan adalah sel mononuklir normal darah perifer manusia yang diambil dari donor. Bahan uji yang digunakan adalah ekstrak etanol p.a (Merck) daging dan biji buah *P. macrocarpa*. Bahan isolasi sel mononuklir normal adalah *ficoll histopaque* (Merck), venoject heparin, RPMI 1640 (Sigma). Bahan uji sitotoksitas yang digunakan adalah HEPES (Sigma), natrium bikarbonat (Merck), RPMI 1640 (Sigma), akuades (Laboratorium Ilmu Hayati UGM), kertas Nitroselulose 0,220 μm (Whatman), akuabides (Laboratorium Ilmu Hayati UGM), *Fetal Bovine Serum*/ FBS 10% (Sigma), penisilin-streptomisin 3% (Gibco), fungison 1% (Gibco), *Phosphate Buffer*

Saline/ PBS (Gibco), natrium klorida (Merck), kalium klorida (Merck), kalium fosfat (Merck), natrium bifosfat (Merck), tamoxifen (Tamofen $\text{\textcircled{R}}$), 5-fluorourasil (Ebewe), *triphphan blue* (Merck).

Alat

Maserasi menggunakan alat-alat gelas, timbangan analitik, alat shaker (Mitamura Riken), Buchii Mad. Rotavapor R-124. Kultur sel menggunakan alat-alat gelas, timbangan elektrik (Sartorius), *microplate* 96 sumuran (Nuncclone), *conical* (Nuncclone) mikropipet (Socorex), vorteks (Genie 2), pH meter (TOA), *laminar air flow* (Nuair), sentrifus *PLC series*, inkubator CO_2 5% (Nuair), hemositometer (Neubauer), mikroskop fase kontras (Olympus). Isolasi DNA menggunakan alat *ependorf* sentrifus Servall MC12V (Dupont), inkubator *waterbath* (Memert), alat shaker platform (VariMix), *refrigerator* (National), inkubator oven (Sakura).

Prosedur Kerja

Penyiapan bahan dan pembuatan ekstrak

Bahan uji *P. macrocarpa* yang diperoleh dibersihkan, dipisahkan antara daging dan biji dan dikeringkan dengan oven kemudian dibuat serbuk dengan blender dan diayak untuk memperoleh serbuk. Dilanjutkan dengan pembuatan ekstrak tanaman dengan cara maserasi. Maserasi masing-masing bahan uji dilakukan dengan cara sebagai berikut: 200 g serbuk bahan uji dan pelarut etanol 70% dimasukkan dalam botol, ditutup dan dikocok dengan *shaker* selama 4 jam pada suhu kamar hingga diperoleh filtrat. Pelarut diuapkan dengan evaporator Buchii hingga diperoleh ekstrak kental. Selanjutnya, ekstrak etanol disimpan di lemari es suhu 4°C.

Kultur sel

Media RPMI 1640. Media RPMI 1640 dilarutkan dalam 800 mL akuades, ditambah dengan 2,000 g natrium bikarbonat dan 2,000 g HEPES kemudian ditambah lagi dengan akuades sampai 1 L. Larutan dibuat pH 7,2 lalu disterilkan penyaringan menggunakan kertas filter nitroselulose 0,220 μm dalam aliran udara laminar dan disimpan pada temperatur 4°C.

Media kultur. Media kultur dibuat dengan mencampurkan 100 mL media RPMI 1640 dengan FBS 10%, penisilin-streptomisin 1% dan fungison 0,5%.

Isolasi sel mononuklir normal. Sel mononuklir normal diisolasi dari darah perifer menggunakan metode *Isopaque Ficoll* (*Ficoll isopaque method*). Darah orang sehat diambil sebanyak 10 mL menggunakan venoject berheparin dan didiamkan sejenak sampai terlihat ada pemisahan serum. Selanjutnya, diencerkan dengan media RPMI dengan

perbandingan 1:3 (volume) dan dikocok biasa. Penambahan *ficoll* dengan perbandingan 2:3 (volume) dilakukan dengan cara melewati campuran darah dan media RPMI ke dinding tabung yang berisi *ficoll* hingga terlihat pemisahan serum. Pemisahan serum dari sel-sel darah secara sempurna dilakukan dengan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Selanjutnya akan terjadi pemisahan 3 lapisan yaitu lapisan paling atas RPMI berwarna merah muda, lapisan tengah *ficoll* tak berwarna dan lapisan paling bawah adalah sel-sel darah merah. Di antara lapisan RPMI dan *ficoll* terdapat lapisan tipis *buffy coat* yang berisi sel mononuklear. Lapisan *buffy coat* diambil dan dicuci dengan 10 mL media RPMI kemudian disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Endapan yang berisi sel mononuklear diambil, disuspensikan dalam media kultur. Suspensi larutan sel diambil 1 mL, dimasukkan ke dalam *conical* steril diencerkan dengan media kultur hingga 5 mL, kemudian diambil 10 μ L suspensi sel, dihitung kepadatannya dengan hemositometer, dilihat dan dihitung dengan mikroskop kontras. Untuk mendapatkan jumlah sel total dalam media, maka angka hasil perhitungan di atas dikalikan dengan faktor pengenceran dan bilangan 10^4 /mL. Untuk keperluan uji sitotoksitas tiap sumuran dari plat 96 sumuran, dibutuhkan 10^5 sel dalam 100 μ L media. Total sel yang diperlukan untuk plat 96 sumuran adalah 96×10^5 sel. Suspensi sel dalam *conical* tadi ditambahkan media kultur hingga 10 mL, diresuspensi dan siap ditambahkan ke dalam sumuran dengan kerapatan yang diinginkan.

Pembuatan larutan uji

Larutan uji dibuat dengan melarutkan ekstrak etanol daging dan biji buah *P. macrocarpa* dalam RPMI dan dibuat variasi konsentrasi 900; 700; 500; 300; 100; 50; 25 μ g/mL tiap-tiap ekstrak bahan uji. Untuk kontrol positif digunakan obat tamoxifen dan 5-fluorourasil dibuat variasi konsentrasi 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0,7813; 0,3906; 0,1953 μ g/mL yang dilarutkan dalam media RPMI [13].

Uji sitotoksitas terhadap sel mononuklir normal

Uji sitotoksitas dilakukan pada plat 96 sumuran. Jumlah sumuran terdiri atas 8 baris dan 12 kolom. Tiap sumuran dimasukkan 100 μ L suspensi sel dan 100 μ L bahan uji dari masing-masing konsentrasi dan tiap bahan uji dilakukan tiga kali ulangan. Sumuran yang tersisa digunakan untuk kontrol sehat yang berisi 100 μ L suspensi sel dan 100 μ L media kultur. Selanjutnya plat diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam dalam aliran CO₂ 5%. Selanjutnya sel hidup dapat dihitung dengan menambahkan 50 μ L *tryphan blue* ke dalam tiap sumuran, diresuspensi dan diambil 10 μ L suspensi tersebut kemudian dihitung sel hidup dengan bantuan hemositometer dan mikroskop kontras.

Analisis Hasil

Perhitungan nilai LC₅₀. Hasil perhitungan sel hidup pada uji sitotoksitas ditampilkan dalam bentuk persentase kematian sel. Persentase kematian sel dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kematian sel} = \frac{\text{Pertumbuhan sel kontrol} - \text{Pertumbuhan sel Uji}}{\text{Pertumbuhan sel kontrol}} \times 100\%$$

Berdasarkan persentase kematian sel, ditentukan nilai LC₅₀ (*Lethal Concentration 50*) yaitu konsentrasi yang menyebabkan kematian sebanyak 50% dalam suatu populasi dengan menggunakan analisis probit.

Uji statistik ANOVA. Uji statistik ANOVA, dilakukan untuk mengetahui : perbedaan toksisitas antara ekstrak etanol daging dan biji buah *P. Macrocarpa*, perbedaan toksisitas antara obat antikanker maka masing-masing nilai LC₅₀ yang diperoleh dilakukan uji statistik Anova *single factor*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Fraksi Etanol *P. Macrocarpa*

Daging dan biji buah *P. macrocarpa* segar dipisahkan, diiris tipis ditimbang sebagai berat basah, setelah dikeringkan dan dibuat serbuk dengan blender untuk memperoleh serbuk kemudian ditimbang sebagai berat kering. Pengeringan bahan uji dilakukan selain bertujuan untuk mengawetkan juga untuk mengurangi kadar air sehingga dapat meningkatkan efektivitas ekstraksi bahan aktif yang terkandung dalam bahan uji. Pembuatan serbuk bahan uji dilakukan agar sampel berukuran kecil sehingga permukaan kontak dengan pelarut lebih luas sehingga pada saat ekstraksi lebih efektif dan efisien.

Preparasi fraksi etanol *P. macrocarpa* dilakukan dengan cara maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi yang merupakan peristiwa perpindahan massa zat aktif yang semula berada di dalam sel tumbuhan, ditarik oleh pelarut sehingga zat aktif larut dalam pelarut. Serbuk sampel direndam dalam pelarut yang sesuai kemudian dilakukan penggojokan dan penyaringan dengan corong *Buchner*. Pelarut pada maserasi ini menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan sampel dengan pelarut 1:3. Dengan perbandingan tersebut bahan uji dapat terendam dalam pelarut sehingga pelarut dapat meresap. Pada saat penggojokan bahan uji harus dapat bergerak sehingga memungkinkan pelarut masuk ke seluruh permukaan serbuk. Penggojokan juga bertujuan melemahkan susunan membran dan dinding sel sehingga zat-zat yang terkandung di dalam bahan uji tersebut akan terlarut. Kerusakan membran dan dinding sel saat pengeringan mempermudah pelarut masuk ke lumen dan menembus kompartemen seluler sel tumbuhan sehingga proses maserasi semakin

Tabel 1. Hasil ekstraksi sampel dengan pelarut etanol

Kriteria	Biji buah	Daging buah
Berat basah (g)	1000,00	1000,00
Berat kering (g)	630,50	146,70
Berat ekstrak (g)	25,35	6,14
Volume ekstrak (mL)	25,22	4,99
Rendemen (%)	4,02	4,19
Bentuk	Cair	Cair
Warna	Coklat	Coklat

efektif. Pelarut akan melunakkan susunan sel tanaman uji, sehingga zat-zat yang terkandung didalam tanaman akan segera terlarut. Penggojokan memungkinkan pelarut akan mengalir berulang-ulang masuk ke seluruh permukaan sampel. Residu hasil penyaringan direndam kembali dengan pelarut baru yang sama. Selama maserasi, etanol sebagai pelarut polar akan memisahkan senyawa polar maupun non polar yang terkandung dalam bahan uji. Selanjutnya, pelarut diuapkan dengan evaporator Buchii hingga diperoleh ekstrak kental.

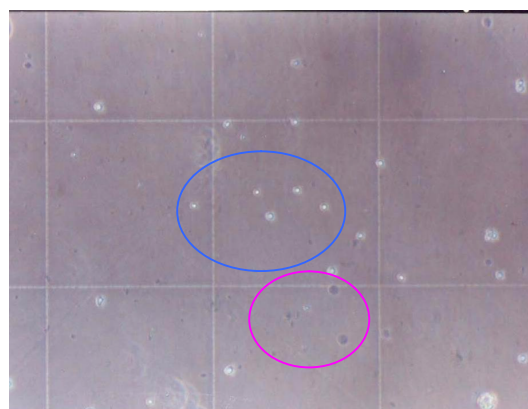
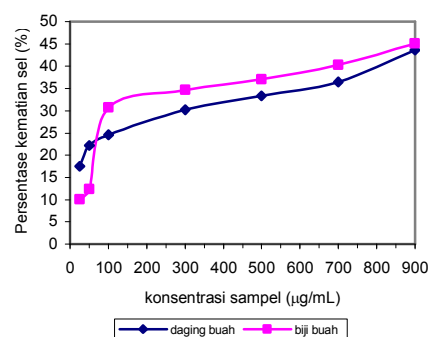
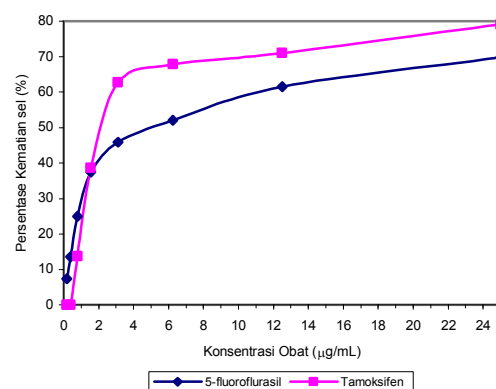
Fraksi etanol daging dan biji buah *P. macrocarpa* selanjutnya akan diuji aktivitasnya terhadap sel mononuklir normal darah perifer manusia. Hasil preparasi bahan uji seperti pada Tabel 1.

Dari Tabel 1 terlihat bahwa ekstrak etanol daging buah *P. macrocarpa* mempunyai rendemen yang lebih tinggi dibandingkan fraksi etanol biji buah *P. macrocarpa*. Hal ini disebabkan karena kandungan yang lebih banyak terdapat pada biji adalah senyawa metabolit primer yaitu minyak. Jeffri menyatakan bahwa kandungan minyak di dalam biji sebesar 0,48% sedangkan pada daging sebesar 0,013% [21]. Berdasarkan hal tersebut maka senyawa metabolit sekunder yang dapat diekstrak dengan etanol pada bagian biji lebih kecil daripada bagian daging.

Uji Sitotoksitas *P. macrocarpa* terhadap Sel Mononuklir normal

Uji sitotoksitas fraksi etanol daging dan biji buah *P. macrocarpa* terhadap sel mononuklir normal dilakukan untuk mengetahui selektivitas dan potensi toksisitas relatifnya terhadap sel mononuklir normal. Uji sitotoksitas dilakukan dengan menggunakan pewarna biru tripan (*tryphan blue*) yang ditambahkan pada kultur sel setelah diinkubasi selama 24 jam yang berfungsi membedakan antara sel hidup dengan yang sudah mati.

Metode *tryphan blue* didasarkan pada prinsip bahwa sel yang mati akan mengikat zat warna biru tripan. *Tryphan blue* adalah senyawa yang berikatan dengan protein yang keluar dari sel pada saat sel mengalami lisis sehingga sel yang mati akan tampak berwarna gelap. Hal ini disebabkan karena membran sel mati mengalami disintegritas (penurunan integritas) sehingga *tryphan blue* dapat masuk ke dalam sel dan

**Gambar 1.** Fotomikroskopis morfologi sel mononukler normal hidup (lingkaran biru) dan mati (lingkaran merah)**Gambar 2.** Grafik persentase kematian sel mononuklir normal dengan perlakuan ekstrak etanol daging dan biji buah *P. Macrocarpa*.**Gambar 3.** Grafik persentase kematian sel mononuklir normal akibat perlakuan obat tamoxifen dan 5-fluorourasil.

mewarnai inti sel sedangkan sel yang hidup memiliki membran plasma yang masih utuh sehingga *tryphan blue* tidak dapat masuk ke dalam sel dan akan terlihat lebih terang. Gambaran perbedaan sel mononuklir normal yang hidup dan yang mati dapat dilihat pada Gambar 1.

Penilaian aktivitas sitotoksik dilakukan dengan menghitung sel yang hidup secara visual

menggunakan hemositometer dengan penambahan *tryphan blue*, kemudian dibandingkan dengan sel yang hidup pada kelompok negatif (tanpa perlakuan) untuk mendapatkan persentase penghambatan pertumbuhan. Adapun hasil uji sitotoksitas ekstrak etanol daging dan biji buah *P. macrocarpa* dan obat tamoxifen dan 5-fluorourasil sebagai kontrol positif terhadap sel mononuklir normal dapat dilihat pada Gambar 2 dan Gambar 3.

Peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daging dan biji buah *P. macrocarpa* serta obat antikanker secara umum akan menyebabkan peningkatan persentase penghambatan pertumbuhan sel mononuklir normal. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya penekanan proliferasi sel yang ditunjukkan dengan pengurangan jumlah sel yang membelah atau hidup. Selain itu, kemungkinan adanya peningkatan kematian sel (apoptosis).

Aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daging dan biji buah *P. macrocarpa* serta obat antikanker dinyatakan dengan nilai LC_{50} berdasarkan data hubungan antara konsentrasi sampel dengan persentase kematian. Nilai rerata LC_{50} dapat diamati pada Tabel 2.

Nilai LC_{50} ekstrak etanol daging dan biji buah *P. macrocarpa* masing-masing sebesar 3.817,54 $\mu\text{g/mL}$ dan 1.349,29 $\mu\text{g/mL}$ lebih tinggi dibandingkan obat antikanker tamoxifen dan 5-fluorourasil yang masing-masing memiliki nilai LC_{50} 3,52 $\mu\text{g/mL}$ dan 4,05 $\mu\text{g/mL}$. Data tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol daging dan biji buah *P. macrocarpa* terhadap sel mononuklir normal secara kualitatif relatif kurang toksik dibandingkan dengan obat antikanker. Berdasar *Canadian Centre Occupational Health & Safety* (CCOHS) yang mengeluarkan kriteria aktivitas toksisitas suatu obat anti kanker, ekstrak etanol daging dan biji buah *P. macrocarpa* tergolong sedikit toksik sedangkan obat antikanker bersifat amat sangat toksik terhadap sel mononuklir normal. Berdasarkan hal tersebut, ekstrak etanol daging dan biji buah bersifat lebih selektif dibandingkan dengan obat antikanker.

Toksitas ekstrak etanol biji buah *P. macrocarpa* terhadap sel mononuklir normal masih lebih rendah dibandingkan terhadap sel kanker antara lain terhadap T47D *cell line* (IC_{50} = 0,016 $\mu\text{g/mL}$ [12] dan IC_{50} = 15,12 $\mu\text{g/mL}$ [13]) dan Raji *cell* (LC_{50} = 16,01 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan bagian daging bersifat toksik terhadap Raji *cell* (LC_{50} = 27,88 $\mu\text{g/mL}$ [22]).

Toksitas yang lebih kecil terhadap sel normal ini dimungkinkan karena terdapat tiga perbedaan antara sel kanker dan sel normal, yaitu:

1. Antigen spesifik tumor sebagai target imunoterapi.
2. Onkogen spesifik tumor adalah target potensial untuk agen terapi.
3. Hilangnya fungsi gen tumor-supresor, yang mempermudah tahapan dalam onkogenesis, sebagai target dari agen terapi [23].

Selain itu, sel mononuklir normal merupakan pertahanan tubuh (sistem imun) yang berfungsi

Tabel 2. harga LC_{50} ekstrak etanol sampel dan obat antikanker

	Daging	Biji	Tamoxifen	5-FU
LC_{50}	3817,54	1349,29	3,52	4,05

melawan agen asing yang masuk seperti bakteri, virus, dan antigen lainnya. Oleh karena itu, dengan adanya perbedaan toksitas ekstrak etanol daging dan biji buah *P. macrocarpa* terhadap sel normal dan sel kanker maka diharapkan ekstrak etanol daging dan biji buah *P. macrocarpa* dapat digunakan sebagai antikanker yang bersifat selektif terhadap sel kanker. Dalam kaitannya dengan pengobatan kanker, tantangan utama dalam terapi kanker adalah mengidentifikasi perbedaan spesifik antara sel kanker dan sel normal yang menjadi target dari obat-obat kemoterapi sehingga berakibat kematian pada sel kanker dan memiliki toksitas sekecil mungkin terhadap sel normal.

Nilai LC_{50} untuk tamoxifen pada penelitian ini masih lebih tinggi (LC_{50} = 3,52 $\mu\text{g/mL}$) jika dibandingkan dengan penelitian yang pernah dilakukan pada sel kanker payudara T47D (IC_{50} = 1,37 $\mu\text{g/mL}$ dan Raji *cell line* (LC_{50} = 0,796 $\mu\text{g/mL}$ [23]) tetapi lebih rendah dibandingkan dengan sel kanker kandung kemih TSGH-8301 dan HTB9 masing-masing sebesar 53,2 $\mu\text{g/mL}$ dan 71,0 $\mu\text{g/mL}$ [12,13]. Hal ini menunjukkan bahwa tamoxifen bersifat tidak selektif terhadap sel kanker. Tamoxifen digunakan sebagai kontrol positif pada penelitian ini karena tamoxifen merupakan *gold standard* pada pengobatan kanker payudara, sebagai bahan kemopreventif pertama yang dianjurkan oleh *Food and Drugs Association* (FDA) karena hasil memuaskan pada percobaan pencegahan kanker payudara yang dilakukan oleh *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project* (NSABP) [24,25].

Uji Statistik ANOVA

Uji statistik ANOVA faktor tunggal (*single factor*) digunakan untuk rencana acak secara lengkap (*completely randomized design*) dimana design diacak penuh untuk membandingkan aktivitas sitotoksik (LC_{50}) antara ekstrak etanol daging dan biji buah *P. macrocarpa* serta tamoxifen dan 5-fluorourasil terhadap sel mononuklir normal.

Uji ANOVA Faktor Tunggal (*single factor*) untuk Ekstrak Etanol Daging dan Biji Buah *P. macrocarpa* terhadap Sel Mononuklir Normal

Ada atau tidaknya perbedaan aktivitas sitotoksik antara ekstrak etanol daging dengan biji buah ditunjukkan dengan merumuskan *Null Hypothesis* (H_0) sebagai berikut:

Tabel 3. Hasil ANOVA pengaruh ekstrak etanol buah *P. macrocarpa* terhadap sel mononuklir normal

Jenis sampel	Nilai F-uji	Keterangan
Ekstrak etanol daging dan biji	53,87	berbeda sangat nyata

Keterangan : Nilai f-tabel : $F_{0,05;1,2} = 7,71$ dan $F_{0,01;1,2} = 21,20$

H_0 : tidak ada perbedaan nyata aktivitas sitotoksik antara ekstrak etanol daging dengan biji buah *P. macrocarpa* terhadap sel mononuklir normal dengan daerah penolakan $H_0 : F_{uji} > F_{tabel}$

Nilai $F_{uji} > F_{tabel}$ maka H_0 ditolak. Hasil uji ANOVA tersebut untuk ekstrak etanol daging dan biji buah *P. macrocarpa* masing-masing menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daging sangat berbeda dengan aktivitas sitotoksik biji buah *P. macrocarpa* terhadap sel mononuklir normal dan bagian biji buah bersifat lebih toksik (Tabel 3).

Penyebab perbedaan aktivitas sitotoksik antara ekstrak etanol daging dan biji buah *P. macrocarpa* diperkirakan karena adanya perbedaan kandungan senyawa dari kedua ekstrak etanol tersebut. Telah diketahui bahwa senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak etanol daging dan biji buah *P. macrocarpa* adalah alkaloid dan flavonoid [18]. Ekstrak etanol daging dan fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom mengandung alkaloid, triterpenoid dan flavonoid sedangkan bagian biji hanya mengandung senyawa alkaloid yaitu nalorfin (N-alilnormorfin). Alkaloid bersifat racun pada manusia tetapi sebagian besar mempunyai aktivitas fisiologis yang menonjol dan dapat digunakan secara luas dalam pengobatan [26]. Oleh karena itu, dapat dimungkinkan alkaloid yang terkandung dalam biji buah mempunyai pengaruh yang lebih besar daripada flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol daging buah terhadap kematian sel mononuklir normal.

Uji ANOVA Faktor Tunggal (*single factor*) untuk Obat Antikanker terhadap Sel Mononuklir Normal

Ada atau tidaknya perbedaan aktivitas sitotoksik antara tamoxifen dengan 5-fluorourasil ditunjukkan dengan merumuskan *Null Hypothesis* (H_0) sebagai berikut:

H_0 : tidak ada perbedaan nyata aktivitas sitotoksik antara tamoxifen dan 5-fluorourasil terhadap sel mononuklir normal dengan daerah penolakan $H_0 : F_{uji} > F_{tabel}$

Nilai $F_{uji} < F_{tabel}$ maka H_0 diterima. Hasil uji ANOVA tersebut untuk obat tamoxifen dan 5-fluorourasil menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksik obat tamoxifen tidak mempunyai perbedaan nyata dengan aktivitas sitotoksik 5-fluorourasil terhadap sel mononuklir normal dan tamoxifen bersifat lebih toksik (Tabel 4).

Tabel 4. Hasil ANOVA pengaruh obat antikanker terhadap sel mononuklir normal

Jenis sampel	Nilai F-uji	Keterangan
Antikanker	0,94231	Tidak berbeda

Keterangan : Nilai f-tabel : $F_{0,05;1,2} = 7,71$ dan $F_{0,01;1,2} = 21,20$

KESIMPULAN

Hasil analisis menunjukkan bahwa ekstrak etanol daging dan biji buah *P. macrocarpa* bersifat tidak toksik terhadap sel mononuklir normal. Ekstrak etanol biji buah *P. macrocarpa* bersifat lebih toksik dibandingkan dengan daging buah terhadap sel mononuklir normal ($P < 0,05$). Obat antikanker tamoxifen dengan 5-fluorourasil tidak menunjukkan perbedaan aktivitas sitotoksik terhadap sel mononuklir normal ($P < 0,05$).

DAFTAR PUSTAKA

- Harmanto, N., 2003, *Mahkota Dewa Obat Pusaka Para Dewa*, Agro Media Pustaka, Jakarta, 4-11.
- Gotama, I.B.I., Sugiarto, S., Nurhadi, M., Widiyastuti, Y. Wahyono, S., and Prapti, I., 1999, *J. Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Jilid V, Jakarta, Departemen Kes. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 147-148.
- Pratiwi, R. W., 2002, *Uji Toksisitas Daun Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Terhadap *Artemia Salina* Leach serta Profil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Aktif, Skripsi Farmasi UGM, Yogyakarta, 49.
- Sumarningsih, P., 2002, *Uji Toksisitas Biji Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Terhadap *Artemia Salina* Leach serta Profil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Aktif, Skripsi Farmasi UGM, Yogyakarta.
- de Padua, L. S., Bunyapraphatsara, N., and Lemmens, R.H.M.S., 1999, *Plant Resources of South East Asia No 12(1). Medical and Poisonous Plants 1*. Printed in Bogor Indonesia (PROSEA). Leiden, the Netherlands, Backhuys Publishers, 36-48.
- Willaman, J.J., 1995, *J. Am. Pharmaceut. Assoc. Sei*, 44th Ed., 404-409.
- Katzung, B.G., 1992, *Farmakologi Dasar Klinik*, (diterjemahkan oleh Petrus Andrianto), edisi ke-3, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Siswandono, and Soekardjo, B., 1995, *Kimia Medisinal*, Airlangga University Press, Surabaya, 407, 409, 425.
- Djumidi, Sutjipto, Gotama, Sugiarto, S., Nurhadi, M., Widiyastuti, Y., Wahyono, S., and Prapti, I. Y., 1999, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Edisi V, Departemen Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta, 147, 148.

- 10 Syariefa, E., 2001, Seduhan Mahkota Dewa Atasi Kanker Hati, *Trubus*, Edisi Oktober, 52-53.
- 11 Winarto, W.P., 2003, *Mahkota Dewa Budidaya & Pemanfaatan untuk Obat*, Penebar Swadana, Jakarta, 11.
- 12 Hertiani, P., Purwantini, I., and Setyowati, E.P., 2002, *Maj Farmasi Ina*, 13(2), 101-6.
- 13 Bakhriansyah, H. M., 2004, *Pengaruh Ekstrak Etanol Biji Mahkota Dewa (P. macrocarpa (Scheff) Boerl.) pada Sel Kanker Payudara T47D: Kajian Aktivitas Sitotoksik dan Penghambatan Ekspresi Siklooksigenase-2*, Prosiding Seminar PBBMI, Yogyakarta.
- 14 Sumastuti, R., 2001, *Efek Sitotoksik Daun dan Buah Mahkota Dewa terhadap Sel HeLa*, Skripsi, Farmakologi F. Kedokteran UGM, Yogyakarta.
- 15 Wardhani, L., 2005, *Pengaruh Ekstrak Etanol Biji dan Daging Buah Mahkota Dewa terhadap Ekspresi Gen p-53 dan bcl-2 pada HeLa Cell Line*, Skripsi, FMIPA UGM, Yogyakarta.
- 16 Hartanti, S.M., 2005, *Sitotoksitas Fraksi Etil Asetat Biji dan Daging Buah Mahkota Dewa {Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl} terhadap HeLa Cell Line dan Myeloma Cell Line*, Skripsi, FMIPA UGM, Yogyakarta.
- 17 Susanthi, E., 2005, *Sitotoksitas Ekstrak n-Heksana Biji dan Daging Buah Mahkota Dewa terhadap HeLa dan Myeloma Cell Line*, Skripsi, FMIPA UGM, Yogyakarta.
- 18 Rossi, J., 2005, *Sitotoksitas Ekstrak Etanol Daging dan Biji Buah Mahkota Dewa terhadap HeLa dan Myeloma Cell Line*, Skripsi, FMIPA UGM, Yogyakarta.
- 19 Wijayani, W., 2005, *Sitotoksitas Minyak Atsiri Biji dan Daging Buah Mahkota Dewa terhadap HeLa dan Myeloma Cell Line serta Identifikasi Senyawa Minyak Atsiri dengan GC-MS*, Skripsi, FMIPA UGM, Yogyakarta.
- 20 Danial, M., 2005, *Sitotoksitas Minyak Atsiri dan Ekstrak n-heksana Biji dan Daging Buah Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl. terhadap Sel Mononuklir Perifer Normal Manusia*, Skripsi, FMIPA UGM, Yogyakarta.
- 21 Jeffri, 2005, *Analisis Kandungan Lipida dalam Buah Mahkota Dewa dengan GC-MS*, Skripsi, IST Akprind, Yogyakarta.
- 22 Suniyah, 2005, *Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol dan Fraksi-fraksi Hasil Kromatografi Kolom Daging Buah Mahkota Dewa terhadap Raji Cell Line dan Identifikasi Senyawa Aktif dengan Kromatografi GC-MS*, STA, Yogyakarta, 13 Oktober 2005.
- 23 Bassilion, J.P., Scievella, A.R., and Burns, E., 1999, *Molec. Pharmacol.*, 56, 359-369.
- 24 Fabian, C.J., 2001, *Breast Cancer Res.*, 3, 99-103.
- 25 Herbert, R.B., 1995, *Biosintesis Metabolit Sekunder*, diterjemahkan oleh Bambang Srigandono, Edisi II, IKIP Semarang Press, Semarang.
- 26 Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, diterjemahkan oleh Padmawinata, K., dan Soediro, I., Penerbit ITB, Bandung.