

## UJI MUTAGENITAS EKSTRAK ETANOL MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheef.) Boerl.)

Lucie Widowati\*, Yun Astuti Nugroho\*, Sri Murhandini\*\*

### Abstrak

Makin meluasnya penggunaan tanaman mahkota dewa oleh masyarakat pada berbagai penyakit degeneratif perlu didukung dengan data keamanan penggunaannya. Salah satu uji keamanan adalah dengan memeriksa sifat mutagenitas ekstrak etanol 70% buah mahkota dewa, berdasarkan metode mutasi balik "AMES" menggunakan lima galur bakteri mutan yaitu: *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 dan *Escherechia coli* WP2 urvA dengan dan tanpa activator metabolit S-9. Hasil uji memperlihatkan ekstrak mahkota dewa tidak mengindikasikan efek mutagenik.

Kata kunci: mahkota dewa, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.

### Pendahuluan

Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.), keluarga Thymelaceae adalah tanaman yang berasal dari daratan Papua,<sup>1</sup> yang saat ini banyak digunakan masyarakat untuk mengobati penyakit degeneratif. Seorang pengobat tradisional yang aktif mengembangkan ramuan mahkota dewa memberikan peringatan agar menggunakan produknya seminimal mungkin untuk tiga hari pertama dan banyak minum bila mengkonsumsi ramuan mahkota dewa.<sup>2</sup> Hal ini mungkin berkaitan dengan dugaan adanya efek yang tidak diinginkan. Uji keamanan penggunaan tanaman obat yang banyak digunakan masyarakat, perlu dilakukan dengan pemeriksaan antara lain tentang adanya efek kumulatif, toksisitas sub kronik, efek karsinogenik, teratogenik dan mutagenik.

Efek mutagenik ialah efek yang menyebabkan terjadinya perubahan sifat genetika sel tubuh makhluk hidup dan dikelompokkan menjadi 3 jenis, yaitu: mutasi gen; aberasi kromosom dan kerusakan DNA. Penelitian ini bertujuan menguji ekstrak etanol 70% buah mahkota dewa dengan metode mutasi balik AMES menggunakan bakteri

*Salmonella typhimurium* dan *Escherechia coli* khusus untuk mendeteksi sifat mutagen.<sup>3</sup>

### Bahan dan Cara

#### Bahan uji

Buah Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) dari BPTO Tawangmangu. Buah yang dimaksud dalam penelitian adalah daging buah dan cangkang biji yang telah dikeluarkan bijinya, dijemur sampai kering dengan pemanasan sinar matahari tidak terlalu terik ( $\pm 40^{\circ}\text{C}$ ). Setelah dibebaskan dari kotoran dan benda asing, buah kemudian dipotong halus.

#### Ekstrak etanol 70 b% buah mahkota dewa

Pembuatan ekstrak etanol 70% dilakukan dengan cara perkolasi menggunakan pelarut etanol 70%, menurut Farmakope Indonesia edisi 4, 1985.

#### Bakteri uji

*Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 dan *Escherechia coli* WP2 urvA

\* Pusat Penelitian Biomedis dan Farmasi, Badan Litbangkes

\*\* Pusat Pemeriksaan Obat dan Makanan, Badan POM

## Lempeng agar

Bahan yang digunakan adalah media bakteri nutrient broth (Oxoid), agar Oxoid, bacto agar, glukosa, natrium klorida, dikalium hipofosfat, natrium ammonium fosfat, dinatrium hipofosfat, magnesium klorida, kalium klorida, histidin, triptofan, glukosa-6-fosfat,  $\beta$ -NADH,  $\beta$ -NADPH.

Disiapkan sejumlah biakan semalam agar dari masing-masing bakteri uji yang berisi  $1-2 \times 10^9$  sel/ml; campuran S9 yang berisi glukosa 6-fosfat,  $\beta$ -NADPH, kalium klorida, magnesium klorida, dapar fosfat dan S<sub>9</sub>; lempeng agar dalam cawan Petri steril; serta sejumlah agar cair yang ditambah histidin, biotin dan triptofan sesaat sebelum pengujian dilakukan.

Kontrol positif: 2-aminoantrasena, 2-(2-furil)-3-(5-nitro-2 furil) akrilamida, dan activator metabolic S-9, yaitu ekstrak hati yang dibuat dari tikus galur Sprague-Dawley jantan yang sebelumnya telah diinduksi dengan natrium fenobarbital dan  $\beta$ -naftoflavon.

Pelarut : dimetilsulfoksida (DMSO)

Dosis ekstrak optimum

Ekstrak etanol 70% mahkota dewa ditimbang secara aseptis dalam wadah steril, dilarutkan dalam dimetilsulfoksida (DMSO) hingga konsentrasi tertentu kemudian disterilisasi dengan sinar UV selama 30 detik.

Dosis ekstrak mahkota dewa yang digunakan adalah 250; 500; 1000; 2500; 5000; dan 10.000  $\mu$ g/lempeng. Sebagai kontrol negatif adalah larutan DMSO 100  $\mu$ g /lempeng. Kemudian dicari dosis yang memberikan jumlah koloni revertan terbesar, menggunakan satu galur bakteri uji yaitu *Salmonella typhimurium* TA 100 dengan dan tanpa penambahan campuran S-9.

Uji mutagenitas

Ekstrak mahkota dewa dengan dosis yang memberikan jumlah koloni revertan terbesar dilarutkan dalam dimetilsulfoksida (DMSO) secara dosis bertingkat, 5 galur bakteri uji yang terdiri dari *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 dan *Escherichia coli* WP2 uvrA.

Ke dalam beberapa tabung reaksi, masing-masing dimasukkan ekstrak 70% mahkota dewa dari masing-masing dosis, 0,5 ml campuran S9 atau 0,5 ml dapar fosfat pH 7,4 untuk pengujian tanpa campuran S-9 serta 0,1 ml biakan semalam bakteri uji segar, kemudian diinkubasi di dalam

tangas udara pengocok pada suhu 37°C selama 20 menit. Setelah itu ke dalam setiap tabung ditambahkan 2 ml agar dengan suhu 45°C dan dihomogenkan dengan alat Vortex, kemudian disebar secara merata pada lempeng agar, dibiarkan pada suhu kamar selama lebih kurang 1 jam, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Untuk kontrol negatif digunakan pelarut DMSO, dan untuk kontrol positif digunakan beberapa senyawa mutagen pembanding yang sesuai untuk masing-masing bakteri uji, secara simultan dengan cara yang sama seperti pada kelompok sediaan uji (Tabel 1).

Potensi mutagenik ekstrak buah mahkota dewa ditetapkan dengan membandingkan jumlah koloni revertan pada lempeng uji dengan jumlah koloni revertan pada kontrol negatif.

Hasil uji dinyatakan positif apabila diperoleh hubungan dosis-respon pada sekurang-kurangnya tiga dosis uji dan jumlah koloni revertan pada dosis uji paling tidak dua kali revertan kontrol negatif. Pemeriksaan mutagenitas dilakukan di Laboratorium Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional, Jakarta pada bulan September tahun 2004.

## Hasil

Untuk menentukan dosis mahkota dewa yang memberikan jumlah koloni revertan terbesar, digunakan satu galur bakteri uji yaitu *Salmonella typhimurium* TA 100 tanpa penambahan campuran S-9. Jumlah koloni revertan tiap lempeng dapat dilihat pada Tabel 1.

Dosis ekstrak optimum mahkota dewa adalah 1000  $\mu$ g /lempeng, dengan jumlah koloni revertan 134/lempeng, sedangkan AF2 mempunyai jumlah koloni revertan 824/ lempeng.

Menggunakan dasar dosis optimum, dilakukan uji mutagenitas dengan dosis bertingkat, mulai 625 sampai 10.000  $\mu$ g/lempeng. Jumlah koloni revertan per lempeng dapat dilihat pada Tabel 2.

Menurut ketentuan, suatu zat disebut bersifat mutagenik apabila pada galur uji *S. typhimurium* TA 1535, TA 1537, dan *E. coli* WP2 uvrA, ada hubungan dosis-respon pada sekurang-kurangnya tiga dosis uji dan jumlah koloni revertan pada dosis tertinggi harus sekurang-kurangnya tiga kali jumlah koloni revertan pada lempeng kontrol. Untuk galur *S. typhimurium* TA 98 dan TA 100 ada hubungan dosis-respon pada sekurang-kurangnya tiga dosis uji dan jumlah koloni

revertan pada dosis tertinggi harus sekurang-kurangnya dua kali jumlah koloni revertan pada lempeng kontrol.

Dari hasil pengujian terlihat jelas bahwa terlihat perbedaan yang sangat berarti antara

**Tabel 1. Jumlah Koloni Revertan Tiap Lempeng**

Konsentrasi zat uji ( $\mu\text{g}/\text{lempeng}$ )	Jumlah koloni revertan per lempeng		
	$X_1$	$X_2$	$X \text{ rata}^2$
DMSO (Kontrol -)	75	87	81
250	132	118	125
500	142	121	131
1000	147	121	134
2500	128	109	119
5000	113	90	102
10000	105	106	106
AF2 0,02 (Kontrol +)	820	828	824

Keterangan : AF<sub>2</sub> : 2-(2-Furil)-3-(5nitro-2-furil) akrilamida

**Tabel 2. Hasil Uji Mutagenesis Ekstrak Mahkota Dewa**

Aktivasi Metabolik	Konsentrasi Zat Uji ( $\mu\text{g}/\text{lempeng}$ )	Jumlah Koloni Revertan Per Lempeng				
		Mutasi Substitusi Pasangan Basa			Mutasi Pergeseran Kerangka	
		TA 100	TA 1535	WP2 uvrA	TA 98	TA 1537
		$X \text{ rata}^2$	$X \text{ rata}^2$	$X \text{ rata}^2$	$X \text{ rata}^2$	$X \text{ rata}^2$
S-9 (+)	Kontrol negatif (DMSO)	136	15	27	43	13
	625	130	14	50	47	17
	1250	131	11	54	43	7
	2500	143	14	57	46	14
	5000	159	11	53	42	10
	10000	142	12	25	38	5
S-9 (-)	Kontrol negatif (DMSO)	84	13	27	22	11
	625	97	12	27	29	6
	1250	101	11	30	33	7
	2500	90	19	26	35	5
	5000	101	13	23	33	13
	10000	106	16	22	34	6
Kontrol positif (+) S-9	2AA, 2 ( $\mu\text{g}/\text{lempeng}$ )	1372	173	124	826	305
Kontrol positif (-) S-9	AF2 0,02 ( $\mu\text{g}/\text{lempeng}$ )	824		339		
	AF2 3 ( $\mu\text{g}/\text{lempeng}$ )		146			
	AF2 0,05 ( $\mu\text{g}/\text{lempeng}$ )				359	
	AF2 80 ( $\mu\text{g}/\text{lempeng}$ )					79

Keterangan: 2 AA : 2 Aminoantrasena;

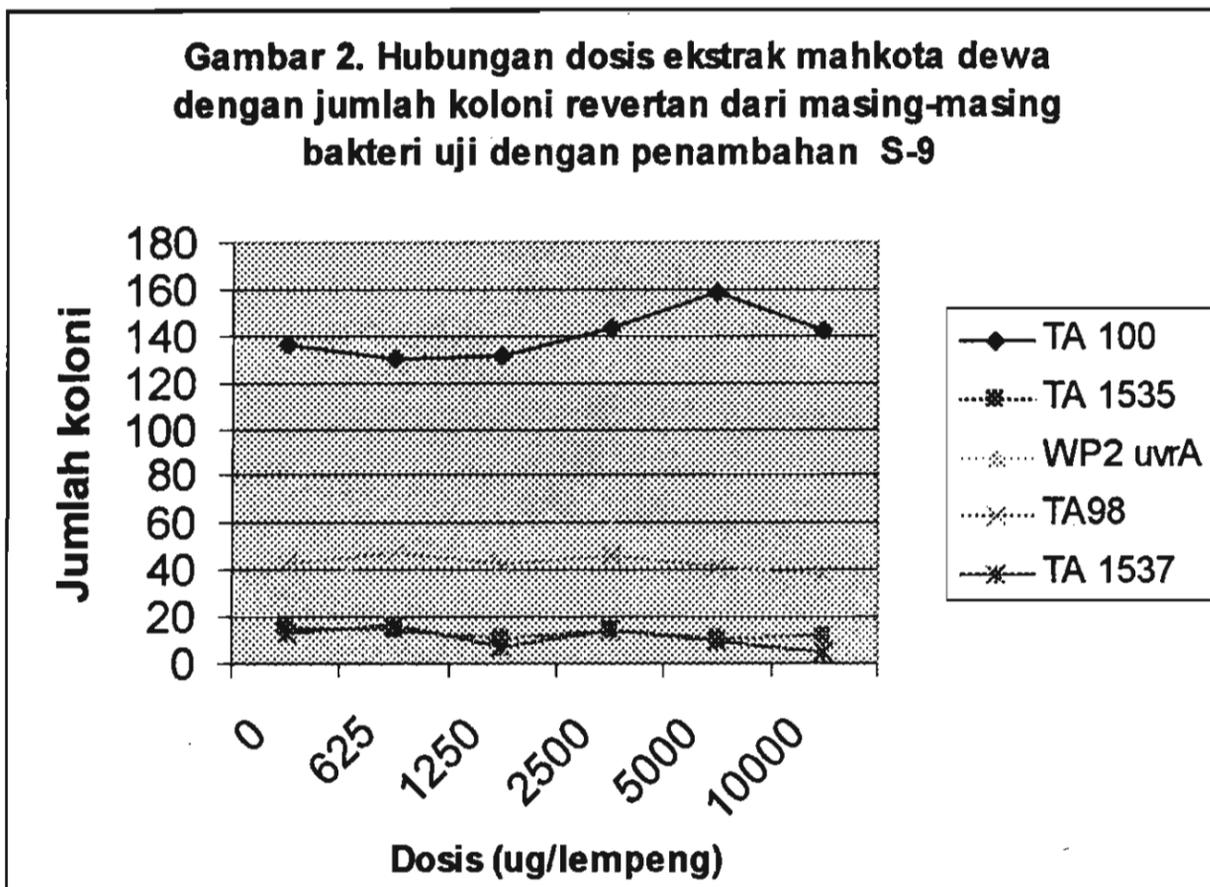
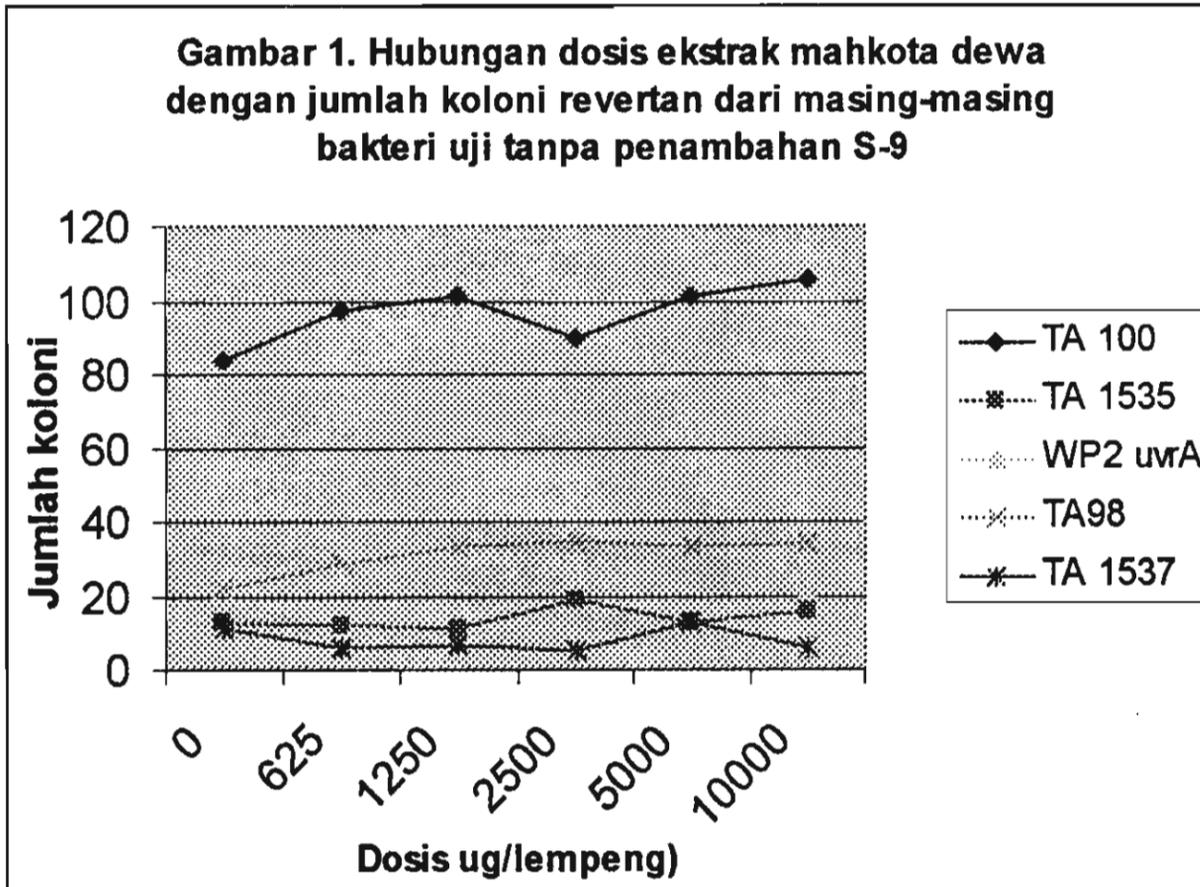
AF<sub>2</sub> : 2-(2-Furil)-3-(5nitro-2-furil) akrilamida

jumlah koloni lempeng ekstrak mahkota dewa dengan lempeng mutagen 2 AA maupun AF<sub>2</sub>. Hubungan dosis – respon dapat dilihat pada kurva dibawah ini (Gambar 1 dan 2).

Tanpa penambahan aktivasi S-9, sampai dengan dosis tertinggi (10.000 µg/lempeng), jumlah koloni lempeng mahkota dewa tidak menunjukkan perbedaan yang berarti dengan lempeng kontrol negatif. Demikian pula dengan hubungan dosis respon, tidak terlihat adanya

hubungan yang linier mengenai peningkatan jumlah koloni dengan kenaikan dosis.

Hal ini menunjukkan tidak adanya sifat mutagen dari buah mahkota dewa. Dengan penambahan aktivasi S-9, sampai dengan dosis tertinggi (10.000 µg/lempeng), jumlah koloni lempeng mahkota dewa tidak menunjukkan perbedaan yang berarti dengan lempeng kontrol negatif. Hubungan dosis respon terlihat pada tiga dosis uji



1250; 2500 dan 5000 µg/lempeng, dengan bakteri TA 100, namun pada dosis yang lebih besar 10000 µg/lempeng, jumlah koloni menurun kembali. Tidak terdapat hubungan dosis-respon pada bakteri uji yang lain. Hal ini menunjukkan tidak adanya sifat mutagen dari metabolit buah mahkota dewa.

### Pembahasan

Banyak zat kimia yang dapat menyebabkan terjadinya efek toksik yang spesifik apabila terjadi pemaparan pada manusia. Salah satu yang spesifik adalah mutasi gen, sehingga disamping uji toksisitas umum, perlu dilakukan uji toksisitas spesifik tergantung dari sifat zat, cara penggunaan dan kemungkinan terjadinya pemaparan pada manusia.

Hasil penelitian Lucie Widowati<sup>4</sup> untuk toksisitas akut, menunjukkan bahwa buah mahkota dewa mempunyai harga LD<sub>50</sub> infus buah 67,32 mg/10g bb. mencit ip dan LD<sub>50</sub> ekstrak etanol 70% adalah 38, 14 mg/10 gram bb mencit ip. Kedua nilai ini, berdasarkan batasan Gleason masih dalam kategori *Practically Non Toxic*. LD<sub>50</sub> infus biji buah mahkota dewa 3,835 mg/10 gram bb ip mencit dan menurut batasan Gleason termasuk kategori *Moderately toxic* yang artinya bersifat toksik dan tidak aman digunakan. Penelitian Ipang Djunarko<sup>5</sup> menunjukkan bahwa pemberian perasan dan infus daging buah mahkota dewa pada masa organogenesis menyebabkan efek teratogenik, namun tidak berbanding lurus dengan peningkatan dosis. Disarankan oleh peneliti tersebut, agar buah mahkota dewa tidak dikonsumsi oleh wanita hamil, dan disarankan agar dilakukan penelitian lebih lanjut pada spesies yang mempunyai kekerabatan dengan manusia, misalnya hewan bukan pengerat (kelinci dan monyet).

Hasil penelitian Ipang<sup>5</sup> Perasan dan infus daging segar mahkota dewa berpotensi mempunyai efek teratogenik pada tikus selama masa organogenesis. Efek teratogenik berupa kecacatan kongesti (cacat makroskopis pada kepala, punggung, kaki), kelainan sistem skeletal (tulang janin), cacat mikroskopis pada hati dan ginjal janin. Kelainan terjadi pada pemberian perasan buah mahkota dewa segar dosis 8,820 gram/kg bb (1,764 gram/200 gram bb) maupun infus buah mahkota dewa dosis 29,556 gram/kg bb (5,911 gram/200 gram bb). Jika diekstrapolasikan ke dosis lazim manusia cara Paget dan Barnes<sup>3</sup> dosis tersebut adalah  $1,764 \text{ gram/200 gram bb} \times 56 = 98,784 \text{ gram/orang}$  untuk perasaan segar dan

$5,911 \text{ gram/200 gram bb} \times 56 = 331,016 \text{ gram/orang}$  untuk infus. Dosis ini berada jauh diatas dosis lazim yang digunakan manusia yaitu 7 iris yang diminum menjadi 2 kali sehari, atau sekitar 2 gram sehari. Jadi dosis yang digunakan pada penelitian Ipang<sup>5</sup> sangat besar, sehingga kemungkinan inilah yang menyebabkan efek teratogenik. Untuk menyimpulkan bahwa buah mahkota dewa menimbulkan efek teratogenik, masih diperlukan beberapa uji. Uji mutagenitas buah mahkota dewa merupakan salah satunya.

Metoda AMES menggunakan sistem aktivasi metabolik S-9, merupakan homogenat hati tikus yang telah diberi penginduksi natrium fenobarbital dan β-naftoflavin. Penggunaan aktivasi metabolik S-9 dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui apakah efek mutagenik disebabkan oleh hasil metaboliknya. Hasil uji mutagenitas tanpa penambahan S-9 bila positif berarti zat uji bersifat mutagen. Bila hasil positif baru didapatkan dengan penambahan S-9 berarti metabolit zat uji yang bersifat mutagen. Dari pengujian diatas, tidak terdapat perbedaan yang berarti antara jumlah koloni revertan pada lempeng uji dengan jumlah koloni revertan pada lempeng control negatif. Dengan demikian disimpulkan bahwa tidak menunjukkan adanya sifat mutagen. Pada ekstrak buah mahkota dewa maupun metabolitnya.

### Daftar Pustaka

1. Bakresnan, N.P, Krauvasudewa N.K.. The Dwindling plant species of Andaman and Microbar Island and Assesment of Cretend Plant of India; Nabamudrand private Limited, Calcuta, 1993.
2. Harmanto N., Mahkota dewa, Obat Pusaka Para Dewa. Agro Media Pustaka, Oktober 2001.
3. Hayes A.W., Principles and methods of Toxicology, Raven Press, Book Ltd. New York, 1984. Pusat Pemeriksaan Obat dan Makanan, Prosedur Operasional Baku Toksisitas, 1991.
4. Lucie Widowati dkk., Uji toksisitas akut ekstrak mahkota dewa pada hewan coba. Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2005; (15)1.
5. Ipang Djunarko dkk. Teratogenitas Perasan dan Infusa Daging Buah Segar Makuto Dewo (*Phaleria macrocarpa*(Scheff.) Boerl.) Pada Tikus Putih. Fak Farmasi Universitas Sanata Dharma). Jogjakarta, 2003.