

MAHKOTA DEWA (*PHALERIA MACROCARPA*) SEBAGAI ANTINEFROTOKSISITAS “DEWA PENYELAMAT” DALAM PENURUNAN EFEK SAMPING CISPLATIN

Meirizky Zulharini S. , Annishfia L.R, Siti Nurul Hidayah, Naisbitt Iman

Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada
Email: meirizkyz@hotmail.com

Abstract

Cisplatin is one of the most widely used chemotherapeutic agent in cancer treatment, however it possess series of harmful adverse effects, most notably, nephrotoxicity. Due to that reason, a natural chemopreventive agent is needed to minimize cisplatin's toxicity, namely, Mahkota Dewa fruit (Phaleria macrocarpa) extract. This research aim to determine anti nephrotoxic effect of mahkota dewa fruit on Vero cells, model of renal cells. Cytotoxic assay of mahkota dewa's extract and cisplatin both single and combination was determined using MTT assay on HeLa cells and Vero cells. The cytotoxic assay resulted that IC₅₀ value of cisplatin and Mahkota Dewa to HeLa cells were 18 μM (5,4 μg/mL) and 845 μg/mL, respectively, whereas the IC₅₀ value of cisplatin and Mahkota Dewa to Vero were 80 μM (24 μg/mL) and 730 μg/mL, respectively. The results indicated that cisplatin was more cytotoxic to HeLa cell in comparison to Vero cell. Combination treatment of mahkota dewa's extract at 183 μg/mL and cisplatin 284 μM showed increased viability of Vero cells. Therefore, combination treatment of cisplatin and mahkota dewa are able to decrease nephrotoxicity of cisplatin to renal cells.

Keyword: Mahkota dewa, cisplatin, flavonoid, nephrotoxicity, HeLa cell, Vero cell

1. PENDAHULUAN

Kemoterapi adalah terapi menggunakan obat secara oral maupun intravena untuk membunuh sel kanker. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum-II) merupakan salah satu obat anti kanker yang digunakan secara luas (Attesahin *et al.*, 2006). Cisplatin mempunyai aktivitas antitumor untuk kanker genitourinaria, khususnya kanker testis, ovarium, dan kandung kemih (Katzung, 2004). Namun, penggunaan cisplatin dapat menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan, beberapa diantaranya ialah ototoksitas, nefrotoksitas, neurotoksitas serta depresi sumsum tulang belakang (myelosupresi).

Oleh karena itu, perlu adanya suatu solusi yang dapat mengurangi efek samping cisplatin. Salah satunya adalah dengan penggunaan suatu agen kokemoterapi yang diharapkan dapat menurunkan dosis dari penggunaan cisplatin dan dapat pula

meningkatkan aktivitas dari cisplatin itu sendiri. Penurunan dosis cisplatin ini, diharapkan dapat menurunkan efek samping yang timbul. Bahan alam, merupakan salah satu agen kokemoterapi yang potensial.

Salah satu bahan alam yang berpotensi dalam meningkatkan aktivitas agen kemoterapi adalah mahkota dewa. Ekstrak buah mahkota dewa (EMD) dilaporkan mengandung glikosida fenolik, seperti mahkotasida, mangiferin, dan kaempferol-3-O-β-d-glukosida juga asam dodekanoat, asam palmitat, etil stearat dan sukrosa (Zhang *et al.*, 2006; Osimi *et al.*, 2008), dan ligan pinosin, lariciresinol, dan matairesinol (Saufi *et al.*, 2008). Kadungan kaempferol-3-O-β-D-glukosida pada buah mahkota dewa ditemukan dapat melindungi H4IIE hepatoma tikus melawan stress oksidatif. Penelitian tentang EMD dalam mengurangi nefrotoksitas yang ditimbulkan cisplatin sampai saat ini belum ada. Oleh karena itu, diperlukan suatu

penelitian yang mempelajari efek EMD terhadap peningkatan aktivitas cisplatin pada sel normal vero secara *in vitro* serta sebagai agen kemopreventif terhadap sel kanker.

2. METODE

Tempat dan waktu pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Cancer Chemoprevention Research Center, dan Laboratorium Bagian Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada pada bulan Februari hingga Juni 2013.

Alat Penelitian

Ekstraksi

Seperangkat alat gelas, seperangkat alat maserasi, *rotary evaporator*, dan oven.

Uji Kromatografi lapis tipis

Plat KLT silika gel, bejana kromatografi, lampu UV

Uji In Vitro

96-well plate, conical tube, tabung reaksi kecil, ELISA reader.

Bahan Penelitian

Bahan Utama

Bahan uji berupa buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Subjek Uji

Subjek uji yang digunakan pada penelitian ini yaitu sel Vero sebagai perwakilan sel normal dari ginjal dan sel HeLa sebagai perwakilan dari sel kanker yaitu kanker servik.

Bahan Ekstraksi

Etanol 70% (Merck).

Uji Kromatografi Lapis Tipis

Fase diam plat silika gel F 254, sebagai fase gerak digunakan campuran etil asetat, asam format, asam asetat glasial dan aquadest (100:11:11:27).

Uji In Vitro

Blue tips, yellow tips, conical tube, 96-well plate, masker, sarung tangan, tissue, kertas saring, Effendorf tube, cisplatin, media DMEM, media M199, PBS, DMSO, MTT, Fetal Bovine Serum, SDS, Tripsin-EDTA.

Prosedur Penelitian

1. Koleksi dan Determinasi Tanaman
Koleksi bahan buah mahkota dewa dilakukan di Bantul, Yogyakarta. Tanaman dideterminasi di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada .
2. Pembuatan Ekstrak Kental
Sebanyak 300 gram serbuk kering buah mahkota dewa diekstraksi dengan menggunakan 3 L etanol 70%. Serbuk dimaserasi selama 6 hari sambil digojog 2 kali sehari selama proses maserasi. Kemudian dilakukan lagi remaserasi selama 6 hari. Hasil maserat kemudian dikumpulkan dan dipetakan dengan menggunakan Rotary Evaporator selama 7 jam. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.
3. Uji Kromatografi Lapis Tipis
Ekstrak kental dilarutkan secukupnya ke dalam etanol 70% lalu ditotolkan pada plat silika gel 254F. Plat KLT yang telah ditotol sampel dielusi dengan fase gerak kloroform: etanol: asam asetat glasial (8: 2: 1). Hasil elusi dilihat di bawah sinar tampak, UV 254 dan UV 366 sebelum dan sesudah disemprot dengan $AlCl_3$.
2. Uji Kelarutan Ekstrak
Sebanyak 5 mg ekstrak dilarutkan dalam pelarut DMSO sebanyak 50 mL, kemudian disentrifugasi hingga ekstrak kental larut.
3. Uji Sitotoksik Tunggal
Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT. Sel dipanen dari tangki nitrogen cair, kemudian ditumbuhkan dalam media yang sesuai. Sel diinkubasi semalam hingga sel kembali dalam keadaan normal. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi sampel uji dan dilakukan treatment terhadap sel yang kondisinya telah normal. Sel diinkubasi kembali selama 24 - 48 jam kemudian diberi reagen MTT, diinkubasi selama 2 – 4 jam lalu diamati di bawah mikroskop *inverted*. Jika terbentuk kristal formazon, sel diberi reagen *stopper* kemudian viabilitas sel dibaca dengan menggunakan ELISA reader.
4. Uji Sitotoksik Kombinasi

Sel dipanen dari tangki nitrogen cair, kemudian ditumbuhkan dalam media yang sesuai. Sel diinkubasi semalam hingga sel kembali dalam keadaan normal. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi sampel uji sesuai dengan ketentuan penentuan seri konsentrasi untuk uji kombinasi dan dilakukan treatment terhadap sel yang kondisinya telah normal. Sel diinkubasi kembali selama 24 - 48 jam kemudian diberi reagen MTT, diinkubasi selama 2 - 4 jam lalu diamati di bawah mikroskop *inverted*. Jika terbentuk kristal formazon, sel diberi reagen *stopper* kemudian viabilitas sel dibaca dengan menggunakan *ELISA reader*.

5. Analisis Data

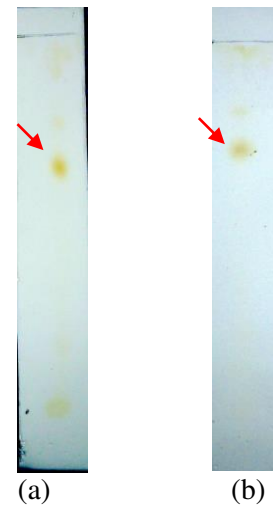
Analisis data hasil uji sitotoksik tunggal cisplatin dan ekstrak mahkota dewa ke sel Vero serta ekstrak mahkota dewa ke sel HeLa menggunakan analisis regresi linier. Sedangkan untuk uji sitotoksik cisplatin ke sel HeLa menggunakan analisis probit.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Flavonoid menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi flavonoid dengan KLT dilakukan dengan mengamati keberadaan bercak yang berwarna kuning pada silica gel yang diamati di bawah sinar tampak. Hasil uji Kromatografi Lapis Tipis dari EMD menunjukkan terdapat bercak berwarna kuning kecoklatan pada silica gel yang telah ditotolkan EMD yang diamati di bawah sinar tampak.

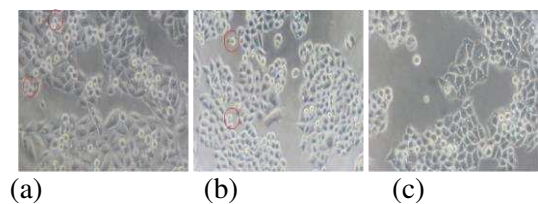
Hasil ini mengindikasikan adanya senyawa flavonoid yang terkandung dalam EMD.



Gambar 1. Hasil uji kandungan flavonoid metode KLT di bawah sinar tampak dengan pereaksi semprot yang berbeda; (a) AlCl_3 (b) Sitroborat

Uji Sitotoksik Tunggal Cisplatin dan EMD pada Sel HeLa

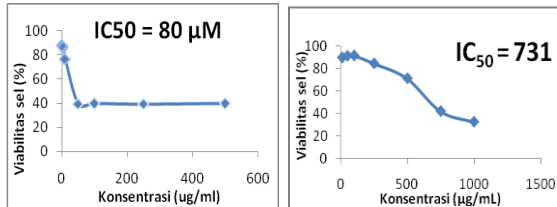
Uji sitotoksik tunggal cisplatin dan EMD pada sel HeLa dilakukan dengan MTT assay untuk menentukan nilai IC_{50} . Hasil uji dilihat dari foto sel perlakuan serta kurva efek sitotoksik. Uji sitotoksik pada sel HeLa dilakukan dengan metode MTT, dan diperoleh nilai IC_{50} cisplatin $18 \mu\text{M}$ IC_{50} dan nilai IC_{50} EMD $845 \mu\text{g/mL}$ terhadap sel HeLa. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa cisplatin memberikan efek sitotoksik yang lebih tinggi terhadap sel HeLa dibandingkan dengan EMD.



Gambar 2. (a) Sel HeLa setelah diberi perlakuan dengan cisplatin (b) Sel HeLa setelah diberi perlakuan dengan ekstrak buah mahkota dewa (c) kontrol sel; lingkaran merah pada foto sel menunjukkan sel yang telah mengalami perubahan morfologi akibat perlakuan.

Sehingga dari nilai IC_{50} yang diperoleh, diketahui bahwa cisplatin

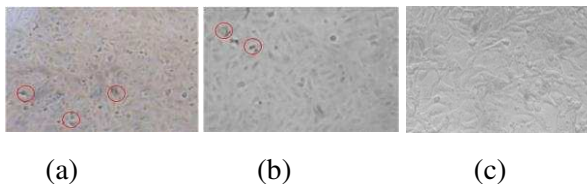
merupakan agen kemoterapi yang poten terhadap kanker serviks. Sedangkan EMD masih memberikan nilai IC_{50} yang cukup besar sehingga dapat dikatakan bahwa EMD memiliki aktivitas kemopreventif yang rendah terhadap sel kanker serviks (sel HeLa).



Gambar 3. Kurva efek sitotoksik cisplatin dan ekstrak mahkota dewa pada sel HeLa; (a) cisplatin (b) ekstrak mahkota dewa

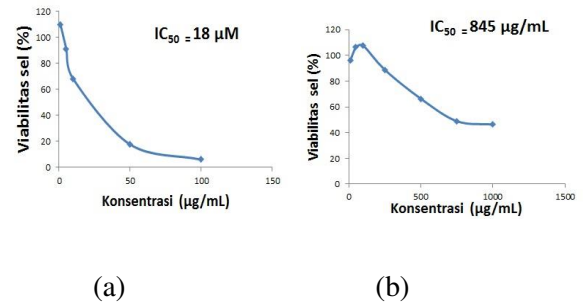
Uji Sitotoksik Tunggal Cisplatin dan EMD pada Sel Vero

Uji sitotoksik tunggal cisplatin dan EMD pada sel Vero dilakukan dengan MTT assay untuk menentukan nilai IC_{50} . Hasil uji dilihat dari foto sel perlakuan serta kurva efek sitotoksik. Berdasarkan uji sitotoksik diperoleh nilai IC_{50} cisplatin $80 \mu\text{M}$ ($24 \mu\text{g/mL}$) dan nilai IC_{50} EMD $730 \mu\text{g/mL}$. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa cisplatin memberikan efek sitotoksik yang lebih tinggi terhadap sel Vero dibandingkan dengan EMD. Sehingga penelitian ini menunjukkan adanya kesesuaian dengan pustaka yang mengatakan bahwa cisplatin memiliki aktivitas nefrotoksik yang tinggi terhadap sel ginjal (sel Vero). Nilai IC_{50} EMD terhadap sel Vero yang cukup tinggi menunjukkan bahwa EMD cukup aman terhadap sel ginjal (sel Vero).



Gambar 4. (a) Sel Vero setelah diberi perlakuan dengan cisplatin (b) Sel Vero setelah di beri perlakuan dengan ekstrak buah mahkota dewa (c) kontrol sel; lingkaran merah pada foto sel menunjukkan sel yang

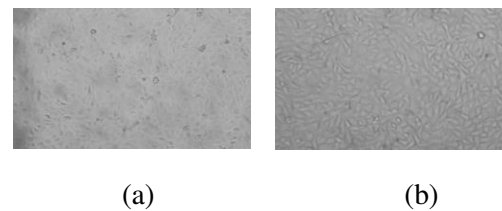
telah mengalami perubahan morfologi akibat perlakuan.



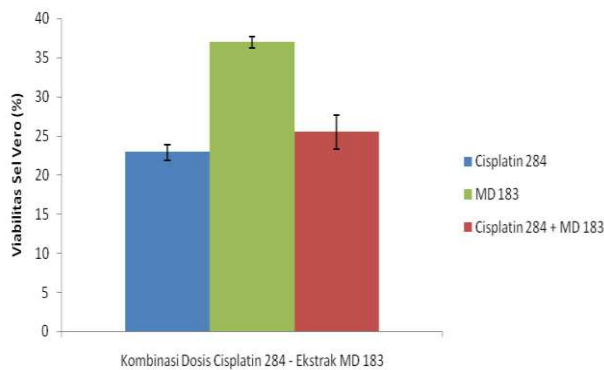
Gambar 5. Efek sitotoksik cisplatin dan ekstrak mahkota dewa pada sel vero (a) cisplatin (b) ekstrak mahkota dewa

Uji Sitotoksik Kombinasi Cisplatin dan EMD pada Sel Vero

Uji sitotoksik kombinasi cisplatin dan EMD pada sel Vero dilakukan dengan MTT assay untuk menentukan viabilitas sel setelah perlakuan. Hasil uji dilihat dari foto sel perlakuan serta kurva viabilitas sel. Dilihat dari foto sel perlakuan pada Gambar 6, sel yang diberi perlakuan tunggal cisplatin menunjukkan kerapatan sel yang lebih kecil serta perubahan morfologi sel yang lebih signifikan dibandingkan dengan sel yang diberi perlakuan kombinasi cisplatin-ekstrak buah mahkota dewa. Berdasarkan uji sitotoksik kombinasi, pada Gambar 7, dosis yang dapat meningkatkan viabilitas sel Vero adalah pada kombinasi dosis IC_{50} cisplatin ($284 \mu\text{M}$) dengan dosis $\frac{1}{4}$ IC_{50} ekstrak buah mahkota dewa terhadap sel Vero ($183 \mu\text{g/mL}$).



Gambar 6. (a) Sel Vero setelah diberi perlakuan dengan cisplatin dosis IC_{50} HeLa (b) Sel Vero setelah diberi perlakuan dengan kombinasi cisplatin dosis IC_{50} HeLa dan ekstrak buah mahkota dewa dosis $\frac{1}{4}$ IC_{50} Vero



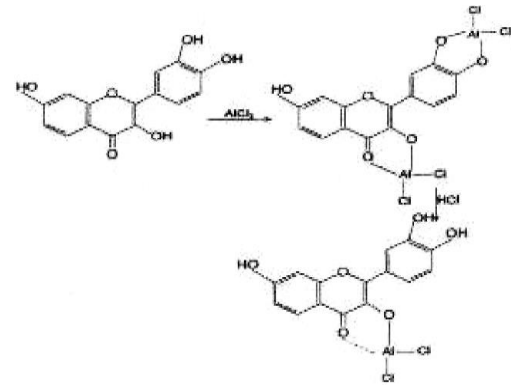
Gambar 7. Kurva viabilitas sel Vero pada perlakuan tunggal dan kombinasi

Pada dosis tersebut, viabilitas sel mengalami kenaikan dari 22,73% menjadi 25,50%. Sedangkan pada kombinasi dosis lain, viabilitas sel mengalami kenaikan yang kurang signifikan. Sehingga hasil penelitian ini menunjukkan bahwa EMD dapat meningkatkan viabilitas sel Vero pada dosis tertentu.

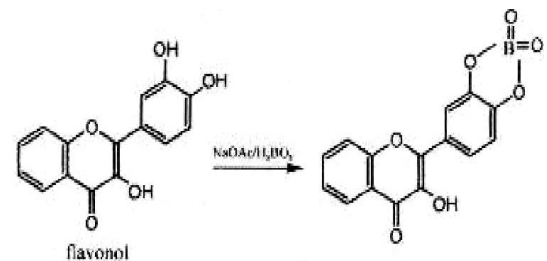
PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan potensi buah mahkota dewa sebagai antinefrotoksitas dalam upaya mereduksi efek samping dari penggunaan agen terapi kanker, yaitu cisplatin. Penelitian diawali dengan melakukan uji KLT untuk mengidentifikasi kandungan flavonoid dalam ekstrak yang dipercaya berefek antioksidan kemudian dilanjutkan dengan uji invitro menggunakan MTT assay dimana dilakukan pengamatan viabilitas sel akibat pemberian ekstrak mahkota dewa, cisplatin, juga kombinasinya.

Pada uji KLT, terlihat bahwa EMD diduga mengandung flavonoid yang ditandai dengan bercak berwarna kuning setelah penyemprotan AlCl_3 dan sitroborat. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut: (Gambar 8 dan 9).



Gambar 8. Reaksi Flavonoid dengan AlCl_3 (Mabry, *dkk.*, 1970)



Gambar 9. Reaksi Flavonoid dengan sitroborat (Mabry, *dkk.*, 1970)

Pada uji in vitro, pertama dilakukan uji sitotoksik cisplatin dan EMD pada sel HeLa yang merupakan sel kanker serviks. Uji sitotoksik pada sel HeLa dilakukan untuk mengetahui apakah cisplatin dan EMD yang digunakan pada penelitian ini dapat berefek sitotoksik pada sel kanker. dari hasil penelitian diperoleh bahwa cisplatin yang digunakan berefek lebih tinggi daripada EMD.

Efektivitas kemoterapi cisplatin didasarkan berdasarkan induksi apoptosis melalui inhibisi translasi dan transversi DNA melalui ikatan kuat dari hasil metabolitnya, yaitu $\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}(\text{NH}_3)_2^+$ dan $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ hal ini terjadi sebagai akibat dari elektrotivitas logam platinum terhadap DNA yang bermuatan negatif. Perubahan bentuk molekuler cisplatin diakibatkan oleh perbedaan konsentrasi ion klorida intrasel dan ekstrasel, di mana konsentrasi ion klorida ekstrasel adalah 100

mM, sedangkan konsentrasi ion klorida intrasel hanya berkisar pada 2-30 mM, perbedaan konsentrasi yang drastis ini menyebabkan ligan klorida pada cisplatin tersubstitusi oleh molekul air, hal ini dikarenakan air merupakan gugus pergi yang lebih baik daripada cisplatin.

Selain efeknya yang bersifat kemoterapis, cisplatin memiliki berbagai macam efek samping, di mana salah satu yang umum diketahui adalah nefrotoksisitas dengan prevalensi kejadian 28 - 36% pada administrasi cisplatin. Nefrotoksisitas cisplatin merupakan akibat dari dua mekanisme pembentukan metabolit cisplatin.

GGT (Gamma Glutamyl Transpeptidase) merupakan enzim pada permukaan sel. Pada sel kanker keberadaan GGT ini meningkatkan resistensi terhadap cisplatin, sementara pada sel ginjal keberadaan GGT ini akan meningkatkan sensitivitas sel ginjal terhadap cisplatin.

GSH (Glutation) ekstra sel akan dikonversi oleh GGT menjadi cysteine-glisine, yang di mana cysteine-glycine dengan bantuan enzim diaminopeptidase N akan dipisah menjadi cysteine dan glisin. Peningkatan cysteine intrasel akan menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel pada sel yang cepat membelah, dan menghambat sintesis GSH.

Mekanisme kedua, ialah dengan terbentuknya metabolit alkena terhalogenasi dari cisplatin, dimana terbentuknya metabolit-metabolit toksik seperti heksaklorobutadiene, dikloroasetilene, dan trikloroetilen yang di mana apabila metabolit toksik tersebut terkonjugasi dengan GSH pada hepar di mana sel-sel pada empedu mengekspresikan keberadaan GGT dan diaminopeptidase N yang tinggi sehingga terjadi konversi menjadi sistein-S-konjugat-B-lyase. Kemudian senyawa tersebut akan mengalami transportasi menuju sel tubular proksimal menjadi senyawa tiol reaktif. Senyawa tiol reaktif tersebut akan segera mengikat protein sel ginjal terdekat, sehingga akan menginduksi baik apoptosis maupun nekrosis sel ginjal.

Selanjutnya dilakukan uji sitotoksik cisplatin dan EMD pada sel Vero yang merupakan prototype sel ginjal normal. Pada uji ini, diketahui bahwa cisplatin memiliki efek sitotoksik pada sel vero lebih tinggi daripada

EMD. Hal ini menunjukkan cisplatin dapat berefek nefrotoksik pada sel ginjal normal, hal ini sesuai dengan Yao (2007) yang menyebutkan bahwa cisplatin dapat berefek nefrotoksik. Cisplatin yang terakumulasi pada ginjal akan menginduksi aktivitas glukosa 6-phosphat dehidrogenase yang kemudian meningkatkan radikal bebas dan menurunkan produksi enzim antioksidan. Hal tersebut terjadi akibat aktivasi NADPH oksidase dan stimulasi produksi ROS. Radikal bebas yang terbentuk di ginjal akan merusak lipid dan menginaktivasi enzim sehingga merusak sel (Yao, 2007). Enzim antioksidan yang juga menurun tidak mampu mencegah kerusakan sel (nefrotoksisitas) akibat radikal bebas. Sedangkan EMD memiliki IC_{50} yang jauh lebih tinggi daripada cisplatin terhadap sel vero, sehingga EMD diduga tidak memiliki efek samping apabila diberikan pada sel normal Vero.

Pada uji kombinasi cisplatin dengan EMD, didapat hasil bahwa dosis yang dapat meningkatkan viabilitas sel Vero adalah pada kombinasi dosis cisplatin 284 μ M dengan dosis ekstrak buah mahkota dewa 183 μ g/mL walaupun kurang signifikan. Hal ini kemungkinan karena dosis cisplatin yang diberikan terlalu besar sehingga flavonoid yang terkandung dalam EMD tidak cukup mampu melawan kerusakan sel yang terjadi akibat paparan cisplatin. Namun, dari jumlah viabilitas sel pada uji kombinasi ini, terlihat adanya kecenderungan peningkatan viabilitas sel jika dibandingkan dengan pemberian cisplatin tunggal. Maka dari itu, EMD mempunyai potensi sebagai antinefrotoksik akibat cisplatin pada dosis tertentu. Kemampuan EMD ini kemungkinan disebabkan oleh kandungan kaempferol-3-O- β -d-glukosida pada EMD yang merupakan antioksidan. Flavonoid ini akan menangkap radikal bebas yang timbul akibat pemberian cisplatin sehingga dapat mencegah kerusakan sel ginjal.

EMD memiliki potensi sebagai agen antinefrotoksik pada dosis tertentu. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi landasan untuk pengembangan sediaan farmasi yang ditujukan untuk menurunkan efek

samping dari suatu agen kemoterapi seperti cisplatin.

4. KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak buah mahkota dewa (EMD) dengan cisplatin dapat meningkatkan viabilitas sel Vero pada dosis tertentu.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efektivitas ekstrak buah mahkota dewa sebagai agen nefroprotektif secara *in vivo* serta mekanisme aksi dari kombinasi cisplatin dengan ekstrak buah mahkota dewa pada aras molekuler.

5. REFERENSI

- Anonim. 2007. Vero Cell. <http://www.scienceimage.au/index.cfm> [21November 2007]
- Attesahin A., Karahan I., Turk G., Gur S., Yilmaz S., Ceribasi A.O. 2006. Protective. Role of Lycopene on *Cisplatin*-Induced Changes in Sperm Characteristics,. Testicular Damage, and Oxidative Stress in Rats.
- Backer, C.; van den Brink, R. 1965. *Flora of Java (Spermatophytes Only)*; Noordhoff: Groningen, The Netherlands, Volume II.
- Katzung, B.G. 2004. *Farmakologi Dasar dan Klinik* Buku 3 Edisi 8. Penerjemah dan editor: Bagian Farmakologi FK UNAIR. Penerbit Salemba Medika, Surabaya.
- Oshimi, S.; Zaima, K.; Matsuno, Y.; Hirasawa, Y.; Iizuka, T.; Studiawan, H.; Indrayanto, G.; Zaini, N.C.; Morita, H.2008. Studies on the constituents from the fruits of *Phaleria macrocarpa*. *J. Nat. Med.* 62, 207–210.
- Saufi A, von Heimendahl CB, Alfermann AW, Fuss E. 2008. Stereochemistry of lignans in *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstrasse 1, Gebäude 26.13, D-40225 Düsseldorf, Germany.
- Zhang, Y.; Xu, X.; Liu, H. 2006. Chemical constituents from *Mahkota dewa*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 8, 119–123.