

**DOSIS IRADIASI OPTIMUM PADA PENGAWETAN SIMPLISIA
KULIT BATANG MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff)
Boerl.) SEBAGAI ANTIKANKER**

Hendig Winarno*, Wisnurahadi**, Swasono R. Tamat**
dan Ermin Katrin W.*

*Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi – BATAN, Jakarta
e-mail : hendig@batan.go.id

**Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta

Diterima 9 Juli 2009; disetujui 8 Januari 2010

ABSTRAK

**DOSIS IRADIASI OPTIMUM PADA PENGAWETAN SIMPLISIA
KULIT BATANG MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.)
SEBAGAI ANTIKANKER.** Percobaan ini bertujuan untuk mendapatkan dosis radiasi yang optimum untuk pengawetan dan sekaligus tidak menyebabkan kerusakan pada senyawa anti kanker dalam simplisia kulit batang mahkota dewa. Simplisia kulit batang mahkota dewa diiradiasi dengan ⁶⁰Co pada beberapa variasi dosis 0; 5; 7,5 ; 10; 15; dan 20 kGy dengan laju dosis 10 kGy/jam. Simplisia yang telah diiradiasi dan kontrol masing-masing dimaserasi secara bertingkat menggunakan *n*-heksan dan etil asetat, kemudian ekstrak etil asetat difraksinasi baik yang diiradiasi maupun kontrol, dilanjutkan dengan fraksinasi terhadap ekstrak etil asetat menggunakan kolom kromatografi sehingga diperoleh masing-masing 8 fraksi. Uji cemaran mikroba terhadap simplisia kulit batang mahkota dewa yang telah diiradiasi dan kontrol menunjukkan bahwa iradiasi dosis ≥ 5 kGy pada simplisia dapat menghambat pertumbuhan serta membunuh semua bakteri, kapang dan khamir yang ada. Uji aktivitas sitotoksik terhadap ekstrak etil asetat dari simplisia yang telah diiradiasi menunjukkan bahwa iradiasi sampai dengan 20 kGy dapat menurunkan aktivitas sitotoksik, meskipun nilai IC₅₀ masih di bawah 50 µg/ml, yang merupakan nilai batas aktivitas sitotoksik suatu ekstrak. Demikian juga halnya pada uji aktivitas sitotoksik terhadap fraksi 6 yang merupakan fraksi paling aktif dalam simplisia kulit batang mahkota dewa menunjukkan bahwa iradiasi terhadap simplisia sampai dengan dosis 20 kGy menurunkan aktivitas sitotoksik fraksi 6, namun nilai IC₅₀ tersebut masih di bawah 20 µg/ml, yang merupakan batas aktivitas sitotoksik suatu fraksi. Analisis senyawa 2,4'-dihidroksi-4 metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dalam fraksi 6 dari sampel yang diiradiasi menunjukkan bahwa semua konsentrasi senyawa tersebut dalam sampel yang diiradiasi menurun secara signifikan dibandingkan kontrol. Penurunan konsentrasi senyawa 2,4'-dihidroksi-4 metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida tidak sebanding dengan penurunan nilai aktivitas sitotoksik dalam ekstrak etil asetat maupun dalam fraksi 6, karena itu senyawa tersebut tidak dapat digunakan sebagai marka efek iradiasi terhadap penurunan aktivitas sitotoksik simplisia kulit batang mahkota dewa. Iradiasi pada dosis 5 sampai dengan 7,5 kGy merupakan pilihan terbaik untuk menurunkan angka cemaran bakteri dan kapang/khamir pada simplisia kulit batang mahkota dewa tanpa menurunkan aktivitas sitotoksik. Dosis iradiasi sampai dengan 20 kGy masih dapat digunakan,

karena sampai dengan dosis tersebut penurunan aktivitas sitotoksik belum melampaui batas suatu ekstrak dan fraksi dinyatakan tidak aktif.

Kata kunci : aktivitas sitotoksik, iradiasi gamma, kulit batang mahkota dewa, *Phaleria macrocarpa*

ABSTRACT

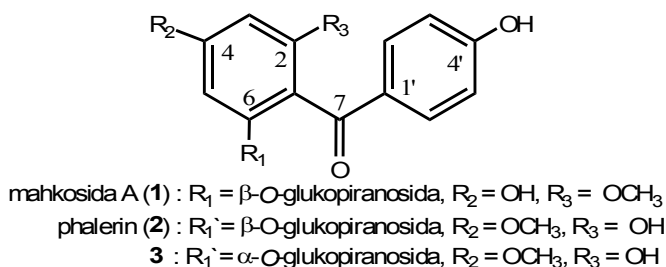
THE OPTIMUM IRRADITATION DOSE IN PRESERVATION OF MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.) AS ANTICANCER AGENT. The purpose of this experiment was to obtain the optimum irradiation dose, in order to preserve and protect the damage of anticancer compounds in *mahkota dewa* bark. The specimens of *mahkota dewa* bark were irradiated using ^{60}Co at the variation doses of 0; 5; 7,5 ; 10; 15; and 20 kGy, respectively at the dose rate of 10 kGy/h. The irradiated and control samples were macerated in *n*-hexane and ethyl acetate, respectively, then the ethyl acetate extract was then fractionated using chromatography column to obtain 8 fractions. The examination of irradiated and control samples of *mahkota dewa* bark against microbe contaminants showed that irradiation at doses ≥ 5 kGy could inhibit the growth of bacteria, mold and yeast and destroyed them. The cytotoxicity test of irradiated ethyl acetate extract of *mahkota dewa* bark against leukemia L1210 cell showed that irradiation at the dose up to 20 kGy can decreased cytotoxic activities performance, however these IC_{50} values lower than 50 $\mu\text{g/ml}$, which is the cytotoxic activity threshold for extract. The cytotoxic activity test of fraction 6, the most active fraction in *mahkota dewa* bark, showed that irradiation at the dose up to 20 kGy can also decreased the cytotoxic activities performance, however these IC_{50} values was lower than 20 $\mu\text{g/ml}$, which is the cytotoxic activity threshold for fraction. Analysis of 2,4'-dihydroxy-4 methoxy benzophenon-2-O- β -D-glucopyranoside by high performance liquid chromatography (HPLC) in fraction 6 of irradiated samples showed that the concentration of this compound in irradiated samples significantly decreased, compared to the control sample. Decreasing the concentration of 2,4'-dihydroxy-4 methoxy benzophenon-2-O- β -D-glucopyranoside was not comparable to the cytotoxic activity of ethyl acetate extract or fraction 6, therefore this compound can not be used as marker of irradiation effect on decreasing the cytotoxic activity of the *mahkota dewa* bark. Irradiation at doses of 5 up to 20 kGy is the best option to reduce bacterial contamination and fungus/yeast in the *mahkota dewa* bark without reduced the cytotoxic activity. Irradiation dose up to 20 kGy can still be used, because the reduction of cytotoxic activity has not exceeded the limit of an extract and the fraction declared inactive.

Key words : cytotoxic activity, gamma irradiation, *mahkota dewa* bark, *Phaleria macrocarpa*

PENDAHULUAN

Tumbuhan obat merupakan salah satu sumber daya alam yang potensial untuk kesehatan dan seringkali digunakan oleh industri obat herbal dan bahan kosmetik. Salah satu tanaman yang telah lama dikenal sebagai tumbuhan obat yaitu mahkota

dewa [1]. Berdasarkan pengalaman empiris, mahkota dewa berkhasiat untuk pengobatan penyakit kanker, diabetes, hati, jantung, ginjal, rematik, hipertensi, asam urat, dan kolesterol. Selain itu mahkota dewa juga digunakan sebagai obat luar untuk penyakit kulit dan ramuan kecantikan [1,2]. Pada tahun 2004 LISDAWATI melaporkan bahwa ekstrak daging buah dan kulit biji *Phaleria macrocarpa* mengandung alkaloid, terpenoid, saponin dan senyawa polifenol. Ekstrak daging buah dan kulit biji mahkota dewa dapat pula menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210 secara *in vitro* dengan nilai IC_{50} antara 4,00 - 7,71 $\mu\text{g/ml}$, sehingga dinyatakan berpotensi sebagai antikanker [2]. ZHANG [3] telah mengisolasi beberapa senyawa dalam buah mahkota dewa, yaitu 4,4'-dihidroksi-2-metoksibenzofenon-6-O- β -D-glukopiranosida (**1**) yang diberi nama mahkosida A (Gambar 1), mangiferin, kaemferol-3-O- β -D-glukosida, asam dodekanoat, asam palmitat, etil stearat, dan sukrosa. Selanjutnya pada tahun 2005, WAHYUNINGSIH *et al.* [4] telah berhasil mengisolasi phalerin (4,5-dihidroksi,4'-metoksibenzofenon-3-O- β -D-glukosida dari ekstrak metanol daun mahkota dewa. Phalerin bersifat sitotoksik terhadap sel myeloma (NS-1) *in vitro* dengan LC_{50} $1,9 \times 10^{-4}$ M. Namun pada tahun 2008 OSHIMI *et al.* [5] merevisi struktur senyawa phalerin sebagai 2,4'-dihidroksi-4-metoksibenzofenon-6-O- β -D-glukosida (**2**).



Gambar 1. Senyawa benzofenon glukopiranosida yang telah diisolasi dari mahkota dewa

TAMBUNAN, *et al.* [6] telah mengisolasi senyawa yang sama namun dalam bentuk α -D-glukopiranosida (**3**) dari ekstrak *n*-butanol buah mahkota dewa. FARIED, *et al.* [7] melaporkan bahwa asam galat dari buah mahkota dewa aktif menghambat proliferasi sel kanker dan menginduksi apoptosis sel kanker esophageal (TE-2).

KURNIA, *et al.* [8] telah mengisolasi senyawa desacetylfevicordin, fevicordin A, fevicordin A-glukosida, dan fevicordin D-glukosida dari biji mahkota dewa, yang seluruhnya menunjukkan efek toksisitas terhadap *Artemia salina*. Pada penelitian sebelumnya [9] senyawa phalerin (2) juga diisolasi dari ekstrak etil asetat kulit batang mahkota dewa. Senyawa tersebut dapat menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210 dengan nilai IC_{50} 7,14 $\mu\text{g/ml}$ dan pada penelitian ini phalerin digunakan sebagai penanda (marka) untuk simplisia kulit batang mahkota dewa.

Mahkota dewa sebagai bahan obat perlu ditangani secara higienis dengan memanfaatkan teknologi pengawetan, salah satunya adalah teknologi radiasi pengion. Iradiasi pada obat herbal bertujuan untuk menekan cemaran mikroba dan mempertahankan kualitas simplisia dalam kemasan agar khasiatnya tidak menurun selama penyimpanan jangka panjang. Teknik iradiasi gamma ini telah dimanfaatkan oleh beberapa perusahaan obat tradisional. Radiasi yang dihasilkan oleh sinar gamma pada dosis tertentu memiliki keunggulan, karena sinar tersebut mempunyai daya tembus besar, tidak menaikkan suhu bahan yang diproses sehingga tidak mempengaruhi penampilan. Iradiasi bahan dapat dilakukan dalam kemasan akhir dan tidak meninggalkan residu apapun di dalam produk yang diproses, serta ramah lingkungan [10,11].

Meskipun iradiasi pengion telah lama digunakan, namun kajian teknis pengaruh iradiasi terhadap zat aktif di dalam simplisia belum banyak dipelajari. Dosis iradiasi gamma < 10 kGy telah direkomendasikan untuk sterilisasi obat herbal di Cina [12,13]. NEMTANU *et al.* [14] melaporkan bahwa efek radiasi berkas elektron elektron (6 MeV) telah menurunkan aktivitas anti oksidan dan anti mikroba dari *sea buckthorn oil*, sedang CHAROEN dan AEMSIRI [15] telah melaporkan bahwa dosis iradiasi 6 kGy dapat mengeliminasi *Clostridium perfringens*, kapang dan khamir, serta tidak menyebabkan perubahan pada kadar polifenol dalam teh herbal. Dekontaminasi mikroba obat herbal Korea dengan dosis iradiasi 5-10 kGy dan dosis 10 kGy meningkatkan berat ekstrak yang dihasilkan dari herbal tersebut [16]. Efek iradiasi gamma sampai dosis 20 kGy terhadap bubuk kunyit (*Curcuma longa* L.) dan *creat*

(*Androphasis paniculata* Burn. F. Nees.), dilaporkan bahwa tidak ada perubahan yang bermakna pada kadar kurkuminoid dalam kunyit dan *creat* [17].

Pada penelitian ini dipelajari dosis iradiasi optimum untuk tujuan pengawetan tanpa merusak aktivitas sitotoksik simplisia kulit batang mahkota dewa *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Pada dosis optimum diharapkan senyawa benzofenon glukosida yang digunakan sebagai senyawa marka dalam fraksi 6 ekstrak etil asetat kulit batang mahkota dewa tidak mengalami kerusakan. Selain uji sitotoksik fraksi aktif terhadap sel leukemia L1210, dilakukan pula identifikasi profil KLT dan analisis KCKT senyawa aktif dalam simplisia sebelum maupun sesudah diiradiasi.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan. Simplisia kering yang digunakan pada penelitian ini adalah rajangan (kira-kira 0,5 cm) kulit batang mahkota dewa [*Phaleria Macrocarpa* (Scheff) Boerl.] yang diperoleh dari kebun petani mahkota dewa di Desa Cibeuteung, Parung, Bogor, Jawa Barat, sel leukemia L1210. Bahan kimia dan bahan penunjang yang digunakan yaitu *n*-heksan, etil asetat, etanol 96 %, kloroform p.a., metanol p.a., HCl p.a., akuabides, *RPMI Medium-1640*, *Fetal Bovine Serum* (FBS), 0,4 % biru tripan, DMSO p.a., CeSO_4 G.R., H_2SO_4 pekat p.a., dan lempeng silika gel 60 F₂₅₄.

Alat. Alat-alat yang digunakan ialah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) Shimadzu SPD-6A, detektor uv, kolom Varian microsorb MV 100-5 C-18 (250 x 4,6 mm), spektrofotometer UV-VIS Shimadzu-8345, penguap putar, desikator vakum, neraca analitik, lampu UV kabinet (254 nm), inkubator CO₂, *Multiwell plate tissue's culture* 24 sumuran, mikroskop, *haemocytometer Neubauer improved*, dan alat-alat gelas.

Metode

Iradiasi dan Maserasi. Rajangan simplisia kering kulit batang mahkota dewa [*Phaleria Macrocarpa* (Scheff) Boerl.] disiapkan dalam 12 kemasan yang masing-masing beratnya 100 g dan 12 kemasan kecil masing-masing seberat 10 g untuk uji cemarkan mikroba. Masing-masing sampel dimasukkan ke dalam kantong polietilen lalu ditutup

rapat menggunakan *sealer machine*. Sampel diiradiasi dengan 2 ulangan menggunakan sumber radiasi ^{60}Co dengan dosis masing-masing 5; 7,5; 10; 15; 20 kGy pada laju dosis 10 kGy/jam.

Uji cemaran mikroba. Uji cemaran mikroba dilakukan dengan metode yang mengacu pada Standar Nasional Indonesia [18] yaitu dengan menetapkan angka lempeng total (koloni/g) dan total kapang dan khamir (koloni/g).

Pembuatan ekstrak. Sejumlah 100 g rajangan simplisia kulit batang mahkota dewa dimaserasi 3 kali dengan pelarut *n*-heksan masing-masing 700 ml, kemudian residunya dimaserasi kembali dengan pelarut etil asetat sebanyak 3 x masing-masing 700 ml. Masing-masing filtrat *n*-heksan dan etil asetat selanjutnya dipekatkan menggunakan rotavapor pada suhu 32 °C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak selanjutnya dikeringkan menggunakan desikator vakum hingga semua pelarut menguap, lalu ditimbang.

Fraksinasi Ekstrak Etil Asetat dengan Kromatografi Kolom. Ekstrak etil asetat difraksinasi menggunakan kromatografi kolom dengan adsorben silika gel 60 ukuran 70-230 *mesh*. Ekstrak etil asetat sebanyak 1,1 g yang telah dihomogenkan dengan *celite* 545 (6,5 g) dimasukkan ke dalam kolom. Eluen yang sesuai dituang sedikit demi sedikit ke dalam kolom. Pemisahan dilakukan dengan pengelusi sistem landaian (*gradient*) *n*-heksan-etil asetat-metanol dari perbandingan 3:1:0 hingga 0:0:1. Hasil pemisahan setiap fraksi kurang lebih 150 ml, diperoleh 8 fraksi, kemudian setiap fraksi dipekatkan, dikeringkan dan ditimbang.

Uji aktivitas sitotoksik terhadap Sel Leukemia L1210. Pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat dan fraksi-fraksi hasil fraksinasi terhadap sel leukemia L1210 dilakukan dengan metode seperti pada penelitian sebelumnya [9]. Pengujian terhadap ekstrak dilakukan dengan variasi konsentrasi ekstrak 5, 10, 20, 40, dan 80 µg/ml medium yang mengandung 1 ml suspensi sel leukemia L1210 dalam *multi well plate tissue's culture*, sedang pengujian aktivitas terhadap fraksi dilakukan dengan variasi konsentrasi fraksi masing-masing adalah 2, 4, 8, 16, dan 32 µg/ml. Sebagai kontrol digunakan 10 µl metanol yang telah ditambahkan 1 ml suspensi sel. Percobaan

dilakukan secara duplo, selanjutnya suspensi sel yang telah diisi zat uji diinkubasi pada suhu 37 °C dalam inkubator 5 % CO₂ selama 48 jam.

Perhitungan sel dilakukan menggunakan *haemocytometer Neubauer improved* (tebal 0,100 mm, luas 0,0025 mm²). Untuk membedakan antara sel hidup dengan sel mati dapat diamati di bawah mikroskop dengan pewarnaan biru tripan dimana sel-sel yang hidup tidak terwarnai dan tampak transparan, sedangkan sel yang mati berwarna biru. Aktivitas sitotoksik yang dinyatakan dalam persentase inhibisi dihitung terhadap total jumlah sel leukemia L1210.

Persentase penghambatan zat uji terhadap pertumbuhan sel leukemia L1210 dihitung sebagai berikut:

$$\frac{[\text{rerata sel dalam kontrol}] - [\text{rerata sel dalam sampel uji}]}{[\text{rerata sel dalam kontrol}]}$$

Data persentase inhibisi selanjutnya diplotkan ke tabel probit untuk memperoleh nilai probit, kemudian dibuat grafik antara log konsentrasi (x) dan probit (y) sehingga diperoleh persamaan regresi linier $y = a + b x$. Dengan memasukkan nilai $y = 5$ (probit dari 50%), maka nilai IC₅₀ dapat ditentukan dengan mengkonversikan nilai log konsentrasi ke bentuk anti log. IC₅₀ yaitu konsentrasi zat uji yang dapat menghambat pertumbuhan sel sebesar 50 %. Ekstrak dengan nilai IC₅₀ ≤ 50 µg/ml dinyatakan aktif menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210 [19].

Pemeriksaan Profil Kromatogram dengan KLT dan KCKT. Pemeriksaan profil kromatogram fraksi 6 ekstrak etil asetat kulit batang mahkota dewa dari berbagai dosis iradiasi dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Kromatografi lapis tipis fraksi 6 dari berbagai dosis iradiasi menggunakan fase gerak kloroform - metanol - air (6 : 4 : 1) pada plat silika gel GF₂₅₄, deteksi dengan sinar UV 254 nm dan penampak bercak 1% serium sulfat dalam 10 % H₂SO₄. Analisis senyawa 2,4'-dihidroksi-4 metoksi benzofenon-2-O-β-D-glukopiranosida dengan KCKT menggunakan campuran fase gerak metanol - akuabides (40 : 60), detektor UV 254 nm dan kecepatan alir 0,4 mL/menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji cemaran mikroba. Hasil uji cemaran mikroba terhadap simplisia kulit batang mahkota dewa *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) ulangan 1 dan ulangan 2 setelah diiradiasi dengan dosis 5; 7,5; 10; 15; dan 20 kGy disajikan pada Tabel 1. Hasil pemeriksaan cemaran mikroba menunjukkan bahwa pada rajangan simplisia kulit batang mahkota dewa ulangan 1 maupun ulangan 2 setelah iradiasi dengan dosis 5; 7,5; 10; 15 dan 20 kGy tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dan kapang khamir, sedangkan pada simplisia yang tidak diiradiasi (kontrol) mengalami pertumbuhan bakteri sebanyak $2,05 \times 10^8$ koloni/g dan $2,22 \times 10^8$ koloni/g, dan pertumbuhan kapang khamir sebanyak $5,59 \times 10^6$ koloni/g dan 6×10^6 koloni/g. Hal ini sesuai dengan prinsip pengawetan dengan proses iradiasi dimana sel hidup akan terbunuh dengan cara menghambat sintesis DNA sehingga mikroba tidak dapat membelah diri. Iradiasi hingga dosis 10 kGy yang setara dengan proses pasteurisasi, yaitu untuk mengurangi jumlah mikroba, sedangkan iradiasi pada dosis >10 kGy merupakan proses sterilisasi digunakan untuk membunuh semua mikroba yang ada [11,18].

Tabel 1. Hasil uji cemaran bakteri dan kapang-khamir terhadap simplisia kulit batang mahkota dewa dari berbagai dosis iradiasi

Dosis iradiasi (kGy)	Uji mikrobiologi			
	Bakteri (koloni/g)		Kapang dan khamir (koloni/g)	
	Ulangan 1 ^{*)}	Ulangan 2 ^{*)}	Ulangan 1 ^{*)}	Ulangan 2 ^{*)}
Kontrol	$2,05 \times 10^8$	$2,22 \times 10^8$	$5,59 \times 10^6$	6×10^6
5	0	0	0	0
7,5	0	0	0	0
10	0	0	0	0
15	0	0	0	0
20	0	0	0	0

^{*)} Rerata dari simplo dan duplo

Pembuatan ekstrak etil asetat. Ekstrak hasil maserasi 100 g simplisia kulit batang mahkota dewa dengan etil asetat rerata dari 2 ulangan sebelum dan setelah iradiasi disajikan pada Tabel 2. Hasil ekstraksi etil asetat kulit batang mahkota dewa

diperoleh ekstrak secara visual berwarna hijau tua dan memiliki bobot ekstrak yang hampir sama. Hasil analisis data bobot ekstrak etil asetat dengan uji anova satu arah menggunakan SPSS 16 pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bobot yang bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan iradiasi tidak mempengaruhi bobot ekstrak etil asetat yang dihasilkan.

Tabel 2. Hasil ekstraksi rajangan simplisia kulit batang mahkota dewa sebelum dan setelah iradiasi

Dosis Iradiasi (kGy)	Warna*	Bobot ekstrak etil asetat rerata (%)
Kontrol	Hijau tua	1,9 ^a
5	Hijau tua	1,4 ^a
7,5	Hijau tua	1,4 ^a
10	Hijau tua	1,3 ^a
15	Hijau tua	1,3 ^a
20	Hijau tua	1,3 ^a

* dilihat secara visual

Angka dengan notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata

Uji aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat. Hasil uji aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat terhadap pertumbuhan sel leukemia L1210 disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat kulit batang mahkota dewa setelah iradiasi terhadap sel leukemia L1210

Dosis iradiasi (kGy)	Persamaan regresi linier		IC ₅₀ (µg/ml)		IC ₅₀ rerata (µg/ml)
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 1	Ulangan 2	
Kontrol	$y = 1,92x + 2,95$	$y = 1,94x + 2,90$	11,7	12,1	11,9 ^a
5	$y = 2,33x + 2,14$	$y = 2,33x + 2,14$	16,9	15,9	16,4 ^b
7,5	$y = 2,08x + 2,26$	$y = 2,08x + 2,26$	20,7	20,7	20,7 ^c
10	$y = 1,70x + 2,65$	$y = 1,70x + 2,65$	24,4	25,5	24,9 ^d
15	$y = 1,54x + 2,72$	$y = 1,54x + 2,72$	30,3	30,3	30,3 ^e
20	$y = 1,22x + 3,12$	$y = 1,40x + 1,83$	34,7	35,9	35,3 ^f

Angka dengan notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata

Pada Tabel 3 terlihat bahwa ekstrak etil asetat kulit batang mahkota dewa yang telah diiradiasi memperlihatkan penurunan nilai IC₅₀ secara linier. Hasil analisis

statistik ekstrak etil asetat pada ulangan 1 dan ulangan 2 dari berbagai dosis iradiasi dengan uji anova satu arah menggunakan SPSS 16.0 pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,5$) menunjukkan bahwa ada perbedaan IC_{50} yang nyata antara ekstrak kontrol dan iradiasi dengan dosis 5 kGy, serta antara ekstrak yang diiradiasi dengan dosis masing-masing 7,5; 10; 15 dan 20 kGy. Menurut SWANSON [20], ekstrak dinyatakan memiliki aktivitas sitotoksik apabila nilai $IC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$. Dengan demikian perlakuan iradiasi pada dosis 5 kGy masih dapat mempertahankan aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat kulit batang mahkota dewa namun perlakuan iradiasi dosis 7,5; 10; 15; dan 20 kGy dapat menurunkan aktivitas sitotoksik ($IC_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$) ekstrak etil asetat kulit batang mahkota dewa. Akan tetapi menurut MANS, *et al.* [20], ekstrak dinyatakan aktif menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210 jika memiliki nilai $IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$. Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa iradiasi hingga dosis 20 kGy masih dapat mempertahankan aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat kulit batang mahkota dewa.

Tabel 4. Hasil uji aktivitas sitotoksik fraksi 6 mahkota dewa iradiasi terhadap sel leukemia L1210

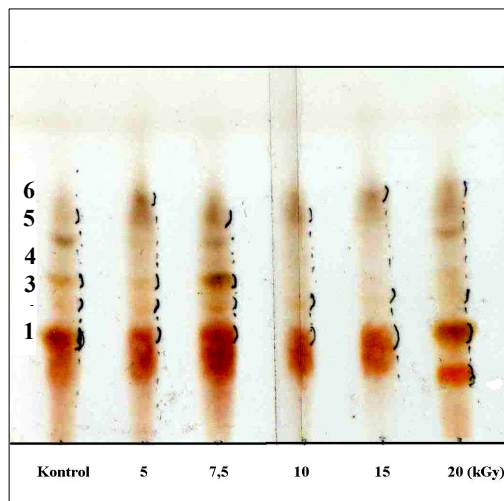
Dosis iradiasi (kGy)	Persamaan regresi linier		IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		IC_{50} rerata ($\mu\text{g/ml}$)
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 1	Ulangan 2	
Kontrol	$y = 1,94x + 3,24$	$y = 1,78x + 3,44$	8,1	7,5	7,8 ^a
5	$y = 1,89x + 3,15$	$y = 1,71x + 3,40$	9,6	8,6	9,1 ^a
7,5	$y = 1,32x + 3,33$	$y = 1,44x + 3,29$	18,6	15,3	16,9 ^b
10	$y = 1,40x + 3,22$	$y = 1,33x + 3,33$	18,7	18,1	18,4 ^b
15	$y = 1,35x + 3,45$	$y = 1,25x + 3,48$	14,3	16,5	15,4 ^b
20	$y = 1,41x + 3,30$	$y = 1,24x + 3,48$	16,0	16,9	16,5 ^b

Angka dengan notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata

Uji aktivitas sitotoksik fraksi aktif (fraksi 6). Hasil uji aktivitas sitotoksik fraksi 6 terhadap pertumbuhan sel leukemia L1210 diperlihatkan pada Tabel 4. Nilai IC_{50} dari rerata 2 ulangan fraksi 6 dari kulit batang mahkota dewa yang telah diiradiasi memperlihatkan nilai IC_{50} makin besar, artinya iradiasi menyebabkan penurunan aktivitas sitotoksik fraksi 6.

Hasil analisis statistik fraksi 6 ulangan 1 dan ulangan 2 dari berbagai dosis iradiasi dengan uji anova satu arah menggunakan SPSS 16.0 pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,5$) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan IC_{50} yang nyata antara fraksi 6 kontrol dan fraksi dari simplisia yang diiradiasi dengan dosis 5, 7,5, 10, 15 dan 20 kGy. Setelah perlakuan iradiasi, terjadi penurunan aktivitas sitotoksik terhadap sel leukemia L1210, tetapi nilai IC_{50} tersebut masih kurang dari 20 $\mu\text{g/ml}$. Walaupun tidak diperoleh acuan yang menyebutkan batas aktif untuk fraksi (nilai IC_{50}) sebagai inhibitor terhadap pertumbuhan sel leukemia L1210, namun bila mengacu pada MANS *et al.* [20], fraksi 6 dari simplisia yang diiradiasi sampai 20 kGy ($IC_{50} = 16,5 \mu\text{g/ml}$) masih dapat dikategorikan aktif sebagai inhibitor terhadap pertumbuhan sel leukemia L1210, karena nilai IC_{50} masih kurang dari 20 $\mu\text{g/ml}$.

Identifikasi dengan KLT. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya [9] fraksi 6 merupakan fraksi paling aktif dari fraksi-fraksi lain hasil kromatografi kolom ekstrak etil asetat kulit batang mahkota dewa. Kromatogram lapis tipis fraksi 6 disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Kromatografi lapis tipis fraksi 6 dari berbagai dosis iradiasi (Fase gerak : kloroform - metanol - air (6 : 4 : 1); Fase Diam : silika gel GF₂₅₄; Deteksi : sinar UV 254 nm; Penampak bercak : 1% serum sulfat dalam 10% H₂SO₄)

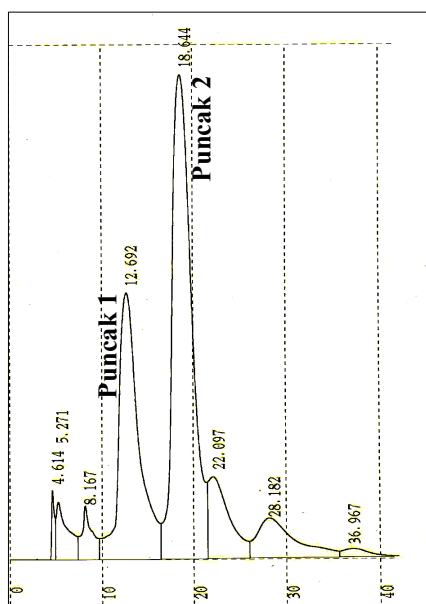
Profil kromatogram KLT menunjukkan bahwa fraksi 6 mengandung minimal 6 bercak senyawa. Di antara beberapa bercak yang terdapat di dalam fraksi 6, bercak 1 dan 2 merupakan komponen utama yang stabil sampai perlakuan dosis 20 kGy. Komponen 4 dan 5 paling labil dan ditandai dengan warna bercak yang makin melemah mulai dosis 10 kGy. Bercak 2 merupakan senyawa phalerin [9].

Pemeriksaan profil kromatogram dengan KCKT. Hasil identifikasi fraksi 6 dari ekstrak etil asetat kulit batang mahkota dewa pada berbagai dosis iradiasi menggunakan KCKT menunjukkan adanya 2 puncak utama kromatogram dengan waktu retensi masing-masing 12,69 dan 18,64 menit. Contoh kromatogram KCKT fraksi 6 dari simplisia yang tidak diiradiasi (kontrol) diperlihatkan pada Gambar 3. Puncak 1 dengan waktu retensi 12,692 menit merupakan senyawa 2,4'-dihidroksi-4 metoksi benzofenon-2-O- β -D-glukopiranosida (phalerin) [9] yang digunakan sebagai senyawa marka pada penelitian ini. Pada fraksi 6 hasil ekstrak etil asetat kulit batang mahkota dewa setelah perlakuan iradiasi cenderung memperlihatkan penurunan kadar senyawa 2,4'-dihidroksi-4 metoksi benzofenon-2-O- β -D-glukopiranosida, diduga karena efek langsung dan tidak langsung akibat radiasi pada materi, dan hasil reaksi antara radikal bebas dengan materi tersebut yang membentuk senyawa lain [11]. Hasil analisis statistik persentase senyawa marka dalam fraksi 6 (ulangan 1 dan ulangan 2) pada berbagai dosis iradiasi dengan uji anova satu arah menggunakan SPSS 16.0 disajikan pada Tabel 5.

Pada fraksi 6 dari simplisia yang diiradiasi dengan dosis 5 kGy, kadar senyawa phalerin mengalami penurunan sampai 40 %. Hal ini menunjukkan perubahan yang bermakna terhadap kontrol, namun aktivitas sitotoksiknya tidak berbeda nyata dengan kontrol. Iradiasi sampai dosis 20 kGy masih dalam batas < 20 kGy, hal ini menunjukkan bahwa senyawa marka tidak berperan kuat sebagai anti kanker, tetapi ada senyawa-senyawa lain dalam simplisia yang saling bersinergi memberikan aktivitas yang berpotensi sebagai anti kanker.

Dari hasil yang telah diperoleh, dapat ditetapkan bahwa iradiasi pada dosis 5 sampai 20 kGy dapat digunakan untuk tujuan menghambat pertumbuhan mikroba (bakteri, kapang dan khamir) pada simplisia kulit batang mahkota dewa. Pada dosis

tersebut, aktivitas sitotoksik fraksi 6 yang merupakan fraksi aktif dan phalerin yang digunakan sebagai senyawa marka mengalami penurunan sebanding dengan besarnya dosis, meskipun penurunannya masih dalam batas aktif [21]. Berdasarkan kenyataan bahwa untuk menurunkan angka cemaran bakteri dan kapang/khamir diperlukan dosis ≤ 5 kGy, sedang iradiasi pada dosis 7,5 sampai 20 kGy sudah menurunkan aktivitas sititoksik secara bermakna, maka iradiasi pada dosis antara 5 kGy sampai dengan 7,5 kGy merupakan pilihan terbaik.



(Sistem KCKT: Shimadzu LC-6A; Detektor: Ultraviolet pada λ 254 nm; Kolom: Varian microsorb MV 100-5, C-18 (250 x 4,6 mm); Fase gerak: Metanol-air (40:60); Kecepatan alir: 0,4 ml/menit; Volume injeksi : 10 μ l)

Gambar 3. Kromatogram KCKT fraksi 6 kontrol

Tabel 5. Persentase kadar phalerin dalam simplisia kulit batang mahkota dewa kering berdasarkan analisis menggunakan KCKT

Dosis (kGy)	Senyawa phalerin (%)
0	0,025 ^a
5	0,015 ^{ab}
7,5	0,013 ^b
10	0,012 ^b
15	0,011 ^b
20	0,012 ^b

Angka dengan notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa iradiasi pada dosis 5 sampai 20 kGy dapat digunakan untuk tujuan menghambat pertumbuhan mikroba (bakteri, kapang dan khamir) pada simplisia kulit batang mahkota dewa untuk antikanker berdasarkan uji aktivitas sitotoksik menggunakan sel leukemia L1210. Pada dosis tersebut, aktivitas sitotoksik fraksi 6 yang merupakan fraksi aktif dan phalerin yang digunakan sebagai senyawa marka mengalami penurunan sebanding dengan besarnya dosis, meskipun penurunan tersebut tidak menghilangkan aktivitas sitotoksiknya.

Iradiasi pada dosis 7,5 sampai 20 kGy sudah menurunkan aktivitas sitotoksik secara bermakna meskipun penurunan tersebut tidak menghilangkan aktivitas sitotoksiknya, karena itu iradiasi pada dosis 5 sampai dengan 7,5 kGy merupakan pilihan terbaik untuk menurunkan angka cemaran bakteri dan kapang/khamir pada simplisia kulit batang mahkota dewa tanpa menurunkan aktivitas sitotoksik.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Tjahyono, S.P. dan seluruh staf Kelompok Iradiator - PATIR-BATAN yang telah membantu melakukan iradiasi sampel sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. KARDINAN, AGUS, dan TARYONO, Tanaman Obat Penggempur Kanker, Cetakan ke-4, *Agro Media Pustaka*, Jakarta, 2-3 (2003).
2. LISDAWATI, V., Buah mahkota dewa: Toksisitas, efek antioksidan dan efek antikanker berdasarkan uji penapisan farmakologi. Diambil dari: <http://www.mahkotadewa.com/indi/info/makalah/vivi201002.htm>. Diakses 30 Juli 2007, (2007).
3. ZHANG, Y.B, XU, X.J., and LIU, H.M., Chemical constituents from mahkota dewa, *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **8** (1-2), 119-123 (2006).

4. WAHYUNINGSIH, M.S.H., MUBARIKA, S., GANDJAR, I.G., HAMANN, M.T., RAO, K.V., WAHYUONO, S., Phalerin a new benzophenoic glukoside isolated from the methanol extract of mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) leaves, *Majalah Farmasi Indonesia*, **16** (1), 51-57 (2005).
5. OSHIMI, S., ZAIMA, K., MATSUNO, Y., HIRASAWA, Y., IIZUKA, T., STUDIAWAN, H., INDRAYANTO, G., ZAINI N.C., and MORITA, H., Studies on the constituents from the fruits of *Phaleria macrocarpa*, *J. Nat. Med.*, **62** (2), 207-210 (2008).
6. TAMBUNAN, R.M. dan SIMANJUNTAK, P., Penentuan struktur kimia antioksidan benzofenon glikosida dari ekstrak *n*-butanol buah mahkota dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.], *Majalah Farmasi Indonesia*, **17** (4), 184-189 (2006).
7. FARIED, A., KURNIA, D., FARIED, L.S., USMAN, N., MIYAZAKI, T., KATO, H. and KUWANO, H., Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesia herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl on human cancer cell lines, *Int. J. Oncology*, **30**, 605-613 (2007).
8. KURNIA, D., AKIYAMA, K. and HAYASHI, H., 29-Norcucurbitacin Derivates Isolated from the Indonesian Medicinal Plant, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72** (2), 618-620 (2008).
9. WINARNO, H. and WINARNO, E.K., Benzophenone glucoside isolated from the ethyl acetate extract of the bark of mahkota dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl], *Indo. J. Chem.*, **9** (1), 142-145 (2009).
10. AKHADI, M., Pengantar Teknologi Nuklir, PT. Rineka Cipta, Jakarta, 173-178 (1997).
11. LESWARA, N.D., "Radiofarmasi", Ari Cipta, Universitas Indonesia, Depok, 43-120 (2005).
12. FANG, X. and WU, J., Feasibility of sterilizing traditional chinese medicines by gamma-irradiation, *Rad. Phys. Chem.*, **52**, 53-58 (1998).
13. CHU, P.L., CHENG, B.S., HO, Y.L., CHOU, F.I., TSENG, Y.Y., LEE, T.T., CHANG, Y.S., Gamma irradiation on microbial decontamination training for Chinese herbs paractioners, Committee on Chinese Medicine and Pharmacy, Department of Health, Taipei City, Taiwan, 27 November 2009, www.ccmp.gov.tw/en/research/result_detail.asp?

14. NEMTANU, M.R., MINEA, R., MAZILU, E., SETNIC, S., MITRU, E., BALOTESCU, C., BUCUR, M., OPROIU, C., MIHAESCU, G., DITU, L.M., Effects of ionizing radiation on the antioxidant and antimicrobial activities of sea buckthorn oil, *Acta Horticulturae*, **826** (1), International Medicinal and Aromatic Plants Conference on Culinary Herbs, Antalya, Turkey, 30 April 2009.
15. CHAROEN, S. and AEMSIRI, J., Effects of gamma irradiation on microbiological and chemical quality of herbal teas, Proc. Int'l. Symp. "New Frontier of Irradiated Food and Non-Food Products, KMUTT, Bangkok, 22-23 September 2005.
16. KIM, M.J., YOON, H.S. and BYUN, M.W., Effects of gamma irradiation on microbial contamination and extraction yields of Korean medicinal herbs, *Rad. Phys. Chem.*, **57** (1), 55-58 (2000).
17. TIMPRASERT, S., BOONRUAD, T., NOUCHPRAMOOL, K., SETAKANNA, P., RATANASIRI, J., PANNANUSUSORN, A., KAEWCHOUNG, P., ORANKANOK, W., Effects of irradiation on chemical changes and contaminated microorganisms in turmeric and creat powder, Proc. Int'l Symp. on "New Frontier of Irradiated Food and Non-Food Products", KMUTT, Bangkok, 22-23 September 2005.
18. ANONIM, "Cara Uji Cemar Mikroba". Badan Standarisasi Nasional, Jakarta, SNI 01-2897 (1992).
19. MANS, D.R.A., ROCHA, A.B., and SCHWARTSMANN, G., Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: Targeted plant collection as a national strategy to acquire candidate anti-cancer compounds, *The Oncologist*, **5** (3), 185-198 (2000).
20. SWANSON, S.M., and PREZZUTO, Bioscreening Technique for Cytotoxic Potential and Ability to Inhibit Macromolecule Biosynthesis. In: "Drug Bioscreening: Drug evaluation techniques in pharmacology". Thompson, E.B. ed., VCH Publisher Inc. New York, 273-295 (1990).