

Teratogenic effects of Hexan Fraction Of Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.] Fruits on Mice (*Mus musculus* L).

Aprilita Rina Yanti Eff and Sri Teguh Rahayu
Faculty of Health Sciences Esa Unggul University

Correspondence: aprilita.rinayanti@esaunggul.ac.id

Abstract

Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl] is one of the medicinal plants that have been used empirically to treat various types of diseases such as cancer, heart disease, diabetes, gout, rheumatism, kidney, high blood pressure, eczema, acne, insect bites and wounds. Mahkota Dewa contain alkaloids, saponins and flavonoids. Extract of fruits and leaves have the cytotoxic effect against HeLa cells and MCF 7 Cells. Material which has cytotoxic effects and have anti-cancer activity potentially teratogenic which can cause abnormalities or defects in embryos. This study aims to assess the teratogenic effect of hexan fraction of *P. macrocarpa* in mice. 24 Female mice were divided into 4 groups, ie normal group given distilled water and 3 treatment groups of hexan fraction, dose 0.5 g / kg BW; 1 g / kg BW and 2 g / kg BW. Mice were acclimatized for 2 weeks and during the estrous mice were mated. Hexan fraction is given on day 1 to day 17 of gestation. On the 18th day of gestation mice were dissected. Observations were carried out quantitative including parent body weight, the amount of implantation, number of fetus, fetal weight and fetal body length and resorption. Data was analyzed using one way ANOVA. Hexan fraction of *P. macrocarpa* reduce body weight parent, the number of fetus, fetal length and weight of fetus significantly different compared to normal controls ($p < 0.05$). The number of fetuses who undergo resorption increased with increasing doses. Hexan Fraction of Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.] fruits Teratogenic effect on mice

Keywords: Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl], Teratogenic effects, Hexan Fraction

Efek Teratogenik Fraksi Heksan Buah Mahkota Dewa *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Pada Mencit (*Mus musculus* L).

Abstrak

Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl] adalah salah satu tanaman obat yang telah digunakan secara empiris untuk mengobati berbagai jenis penyakit seperti kanker, penyakit jantung, diabetes, asam urat, rematik, ginjal, tekanan darah tinggi, eksim, jerawat, gigitan serangga dan luka. Mahkota Dewa mengandung senyawa alkaloid, saponin dan flavonoid. Ekstrak buah dan daun mahkota dewa memiliki berefek sitotoksik terhadap sel HeLa dan sel MCF7. Bahan yang memiliki efek sitotoksik dan memiliki aktivitas anti-kanker berpotensi teratogenik yang dapat menyebabkan kelainan atau cacat pada embrio. Penelitian ini bertujuan untuk menilai efek teratogenik fraksi heksan dari *P. macrocarpa* pada tikus. 24 Tikus betina dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok normal, diberi air suling dan 3 kelompok perlakuan fraksi heksan pada dosis 0,5 g / kg BB; 1 g / kg BB dan 2 g / kg BB. Mencit diaklimatisasi selama 2 minggu dan pada fase estrus tikus dikawinkan. Treatment diberikan pada hari 1 sampai hari ke 17 kehamilan. Pada hari ke-18 kebuntingan tikus dibedah. Pengamatan dilakukan secara kuantitatif meliputi berat tubuh induk, jumlah implantasi,

jumlah fetus, berat janin, panjang tubuh janin dan resorpsi. Data dianalisis menggunakan *one way* ANOVA. Fraksi heksan dari *P. macrocarpa* mengurangi berat badan tubuh induk, jumlah janin, panjang janin dan berat janin yang berbeda secara signifikan dibandingkan dengan kontrol normal ($p < 0,05$). Jumlah janin yang menialani resorpsi meningkat dengan meningkatnya dosis. Fraksi heksan buah Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.] berefek teratogenik pada mencit.

Kata Kunci : Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl], efek teratogenik, Fraksi heksan

Pendahuluan

Mahkota dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. merupakan salah satu tanaman asli Indonesia yang berkhasiat sebagai obat dan sedang marak digunakan oleh sebagian masyarakat . Daun dan buah mahkota dewa secara empiris telah digunakan untuk mengobati berbagai jenis penyakit seperti kanker, gangguan hepar, jantung, diabetes, rematik, gangguan ginjal, stroke dan tekanan darah tinggi.¹ Penggunaan mahkota dewa sebagai obat tradisional sangat mungkin karena daun mahkota dewa mengandung senyawa kimia alkaloida, saponin, polifenol dan buahnya selain alkaloida dan saponin juga mengandung flavanoid.² Mahkota dewa mengandung mahkotasida, mangiferin, kaempferol-3-O-d glukosida, asam dodekanoat, asam palmitat, etil stearat dan sukrosa.³ Kandungan lignan pada mahkota dewa berupa pinoresinol, lariciresinol dan matairesinol.⁴ Hasil penelitian menunjukkan bahwa mahkota dewa memiliki efek antidiabetes yang bekerja menghambat enzim alfa glukosidase dan memiliki efek anti diabetes pada tikus yang diinduksi sterptozotosin.^{5,6}

Buah mahkota dewa memiliki aktivitas sebagai penghambat Enzim Pengkonversi Angiotensin dengan nilai IC_{50} berturut-turut adalah 161,7 ppm pada ekstrak petroleum eter, 139,11 ppm pada ekstrak etil asetat dan 122,38 ppm pada ekstrak methanol.⁷ Studi *in-vivo* pada tikus yang diinduksi fruktosa 10% dalam minuman selama 8 minggu menunjukkan bahwa ekstrak metanol buah mahkota dewa menurunkan tekanan darah tikus dan menurunkan kadar Enzim Pengkonversi Angiotensin (ACE).⁸

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa mahkota dewa berefek sitotoksik secara *in-vitro* pada sel kanker, seperti sel mieloma, *cell line* Ca colon WiDr,⁹ sel kanker payudara T47-D dan sel MCF-7 serta sel HeLa.^{10,11} Penelitian secara *in-vivo* juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol buah mahkota dewa berefek antikarsinogenesis pada mencit yang diinduksi 7,12-Dimetilbenz(a)antrasena.¹²

Sebagian besar obat-obat antikanker berefek teratogenik karena target kerja obat ini pada fungsi seluler yang vital yang dapat menyebabkan kelainan atau cacat pada embrio yang dikandung.¹³ Pada tahap embrio sel secara intensif menjalani diferensiasi, mobilisasi, dan organisasi. Selama periode inilah sebagian besar organogenesis terjadi. Pada tahap ini embrio sangat rentan terhadap efek teratogen. Periode ini biasanya berakhir setelah beberapa waktu, yaitu pada hari ke-10 sampai hari ke-14 pada hewan pengerat dan pada minggu ke-14 pada manusia. Sedangkan pada tahap janin ditandai dengan perkembangan dan pematangan fungsi dan selama tahapan ini teratogenik tidak mungkin menyebabkan cacat morfologik, tetapi dapat mengakibatkan kelainan fungsi.¹⁴

Efek toksik suatu bahan terhadap janin secara eksperimental dapat diperoleh dengan cara memberikan suatu zat kepada induknya. Janin mengandalkan induknya untuk pertumbuhan dan pemeliharannya. Sifat teratogenik suatu zat tergantung pada beberapa faktor antara lain kepekaan spesies, dosis obat/zat kimia dan waktu pemaparan yang terjadi pada periode kritis perkembangan yaitu ketika janin dalam fase organogenesis.¹³

Uji keteratogenikan merupakan salah satu jenis uji ketoksikan khas pada hewan bunting. Uji ini digunakan untuk menentukan apakah suatu obat atau bahan kimia dapat menyebabkan kelainan atau cacat bawaan pada janin yang dikandung, dan apakah cacat tersebut berhubungan dengan dosis obat yang diberikan. Uji keteratogenikan bermanfaat sebagai landasan evaluasi batas aman dan resiko penggunaan suatu obat oleh wanita hamil.¹⁵

Mengingat penggunaan buah mahkota dewa sebagai antihipertensi dan antikanker dan tidak tertutup kemungkinan penggunaan antihipertensi pada ibu hamil oleh karena itu perlu dilakukan uji teratogenik fraksi heksan buah mahkota dewa pada fetus.

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh fraksi heksan buah mahkota dewa pada mencit dengan mengamati jumlah fetus, berat dan panjang fetus dan adanya cacat fisik pada janin.

Metoda

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: kertas saring, timbangan analitik, pisau bedah, corong, oven, gelas ukur, pipet tetes, aluminium foil, spatula, beaker glass, kandang untuk pemeliharaan mencit beserta tempat minum, spuit 1 ml, dan sonde oral. skapel, pinset, gunting bedah, gelas ukur, pot plastik berlubang, koran, sarung tangan, papan parafin, gelas arloji, mikroskop, cotton bud, jarum pentul, tabung reaksi dan kamera digital.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini: Buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa L*), aquadest, CMC 0,5%, kloroform, NaCl 0,9%, alkohol 70%, etil asetat, metanol, heksan, Na₄OH 25%, CHCl₃, HCl 2N, H₂SO₄ pekat, FeCl₃, pereaksi Meyer, pereaksi Dragendroff, pereaksi Bouchardat, anhidrida asam asetat, logam Mg, FeCl₃, KMnO₄, HCl pekat.

Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih (*Mus musculus*) dengan berat badan 20-30 gr dengan umur 10-12 minggu yang diperoleh dari Balai Penelitian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan (BPMSOH), Jl. Pembangunan, Gunung Sindur, Bogor, Jawa Barat.

Cara Penelitian

Pembuatan Ekstrak

Simplisia kering buah mahkota dewa yang telah dihaluskan, diekstraksi dengan metode maserasi mula-mula menggunakan metanol 80%. Ekstrak metanol yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental. Selanjutnya dilakukan fraksinasi terhadap ekstrak methanol menggunakan pelarut heksan. Kemudian fraksi heksan yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C.

Pemeriksaan Kandungan Kimia

Pemeriksaan dilakukan untuk mengetahui senyawa kimia golongan alkaloid, flavonoid, fenoi, saponin, tanin, dan sterol – triterpenoid serta lemak dan glikosida.¹⁶

Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji diadaptasi selama 2 minggu. Sebanyak 24 ekor mencit dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol normal (KN) diberikan CMC 1% dan kelompok eksperimen 1 (KE1), kelompok eksperimen 2 (KE2) dan kelompok eksperimen 3 (KE3), masing-masing diberikan

fraksi heksan dosis 0,5 g/kg BB/hari, 1 g/kg BB/hari dan 2 g/kg BB/hari. Pada tikus betina, dilakukan pemeriksaan apusan vagina. Tikus betina yang berada pada masa subur yang ditandai dengan adanya sel tanduk pada apusan vagina, dikawinkan dengan tikus jantan selama satu malam. Hari ke-0 ditentukan saat terjadi sumbat vagina atau adanya sperma pada pemeriksaan apusan vagina keesokan harinya. Treatment diberikan pada mencityang telah hamil secara oral pada hari ke-1 sampai hari ke-17 kehamilan. Pada hari ke-18 kebuntingan dilakukan pembedahan

Pengamatan Efek Teratogen

Pada hari ke-18 kehamilan, induk tikus dianestesi dengan kloroform lalu dilakukan laparaktomi untuk mengeluarkan janinnya. Jumlah janin yang hidup, resorpsi, dan kelainan morfologi dicatat.

Hasil dan Pembahasan

Hasil Pemeriksaan Kandungan Kimia

Hasil pemeriksaan kandungan kimia Fraksi Heksan Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* [Scheff.] Boerl.) memiliki kandungan kimia tannin, alkaloid dan terpenoid. Daging buah mahkota dewa yang digunakan dalam penelitian dipilih dari buah yang telah masak dan berwarna merah marun. Pemilihan jenis buah yang telah masak mengacu pada penggunaan secara empiris oleh masyarakat. Buah yang masak secara umum menunjukkan kadar kandungan metabolit sekunder yang paling tinggi, sehingga pengujian aktivitas biologi terhadap senyawa metabolit sekunder tanaman dapat terwakili dengan sempurna.¹⁷ Hasil uji farmakologi terdahulu melaporkan bahwa efek teratogenik mencapai puncaknya dalam ekstrak yang berasal dari buah yang masak dibandingkan dengan ekstrak buah yang masih muda.²

Berat Badan Induk

Rerata berat badan induk dapat dilihat pada tabel 1. Dari tabel 1 terlihat bahwa terjadi peningkatan berat badan pada hari ke-0, hari ke-4, hari ke-9, hari ke-13 hingga hari ke-17.

Tabel 1. Berat badan induk pada tiap kelompok perlakuan (gram)

| Kelompok | Hari Pengamatan | | | | |
|----------|-----------------|-----------|-----------|------------|------------|
| | Hari ke-0 | Hari ke-4 | Hari ke-9 | Hari ke-13 | Hari ke-17 |
| KN | 25,47 | 38,30 | 34,40 | 42,23 | 48,27 |
| KE 1 | 25,59 | 27,84 | 34,84 | 36,53 | 44,74 |
| KE 2 | 26,01 | 27,49 | 33,67 | 38,56 | 44,86 |
| KE 3 | 25,63 | 26,80 | 28,91 | 30,14 | 34,66 |

Jumlah Fetus

Nilai rerata jumlah fetus dapat dilihat pada tabel 2. Dari tabel 2 terlihat bahwa peningkatan dosis pada kelompok eksperimen (KE) menurunkan jumlah fetus. Terdapat perbedaan yang bermakna pada jumlah fetus antara KE2 dan KE3 dengan KN ($p < 0.05$).

Tabel 2. Nilai Rerata Jumlah Fetus Pada Tiap Kelompok perlakuan (ekor)

| Kelompok | Rerata |
|----------|--------|
| KN | 11 |
| KE 1 | 9 |
| KE 2 | 8 |
| KE 3 | 5 |

Jumlah Fetus Hidup, Fetus Mati dan Resorpsi

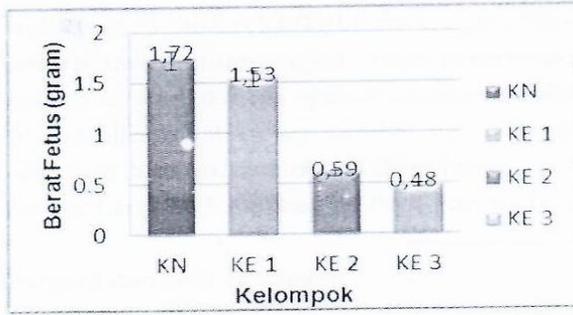
Jumlah fetus hidup, fetus mati dan resorpsi dapat dilihat pada tabel 3. Dari tabel 3 terlihat bahwa terjadi penurunan jumlah fetus hidup pada semua kelompok eksperimen (KE) yang berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol normal (KN) ($p < 0.05$). Peningkatan dosis menurunkan jumlah fetus hidup. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada jumlah fetus mati antara KE dengan KN. Resorpsi yaitu manifestasi kematian hasil konsepsi yang dihitung dari jumlah korpora lutea dikurangi jumlah fetus dari toksisitas janin yang dapat dilihat dari berat badan janin yang bertahan hidup. Tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada jumlah resorpsi antara KE1, KE2 dan KE3 ($p > 0.05$). Resorpsi adalah manifestasi kematian hasil konsepsi yang dihitung dari jumlah korpora lutea dikurangi jumlah fetus dari toksisitas janin yang dapat dilihat dari berat badan janin yang bertahan hidup. Resorpsi fetus merupakan salah satu indikasi agen teratogenik. Semakin tinggi tingkat dosis pada kisaran dosis embriotoksik, akan mengakibatkan terjadinya respon mulai dari hambatan pertumbuhan, malformasi, sampai kematian intrauterin dan resorpsi.¹⁵

Tabel 3. Jumlah Fetus Hidup, Fetus Mati dan Resorpsi (ekor)

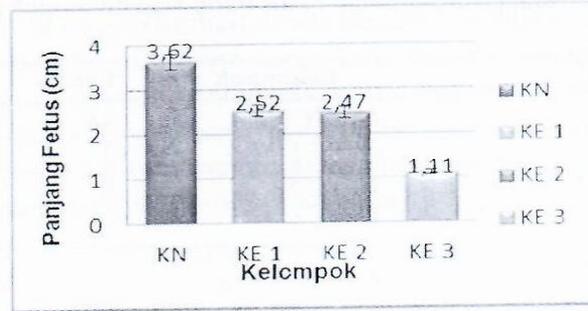
| Kelompok | Fetus Hidup | Fetus Mati | Resorpsi |
|----------|-------------|------------|----------|
| KN | 68 | 0 | 0 |
| KE 1 | 48 | 0 | 3 |
| KE 2 | 46 | 0 | 3 |
| KE 3 | 25 | 0 | 2 |

Berat dan Panjang Fetus

Berat dan panjang rata-rata fetus dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2. Dari gambar 1 dan 2 terlihat bahwa terjadi penurunan berat dan panjang fetus pada KE1, KE2 dan KE3, berat dan panjang fetus cenderung menurun dengan meningkatnya dosis. Terdapat perbedaan yang bermakna pada berat fetus antara KE 2 dan KE3 dengan KN ($p < 0.05$) dan terdapat perbedaan yang bermakna pada panjang fetus antara KE1, KE2 dan KE3 dengan KN ($p < 0.05$)



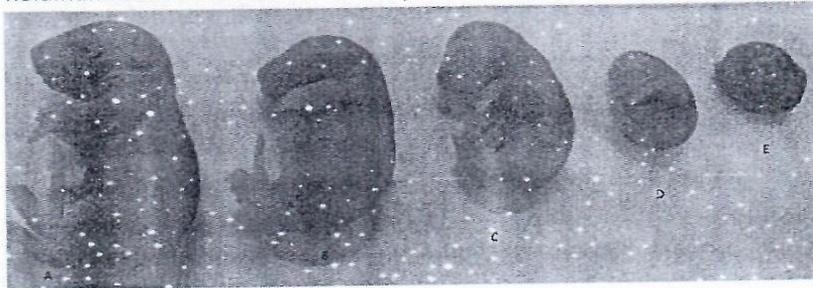
Gambar 1. Berat rata-rata fetus (Gram)



Gambar 2. Panjang rata-rata fetus (cm)

Pemberian sediaan uji diberikan pada saat mencit betina dinyatakan positif bunting yaitu pada hari ke-1 sampai hari ke-17 kebuntingan atau dimana terjadi pada tahap embriogenesis, karena dalam periode ini sel secara intensif menjalani diferensiasi, mobilisasi, dan organisasi. Selama periode ini sebagian besar organogenesis terjadi. Akibatnya, embrio sangat rentan terhadap efek teratogen. Periode ini biasanya berakhir setelah beberapa waktu, yaitu pada hari ke-10 sampai hari ke-14 pada hewan pengerat dan pada minggu ke-14 pada manusia. Selain itu, tidak semua organ rentan pada saat yang sama dalam suatu kehamilan.¹⁴

Individu yang mengalami malformasi (kecacatan) umumnya lebih kecil dibandingkan individu normal, sehingga hambatan pertumbuhan suatu organ merefleksikan hambatan pertumbuhan secara umum.¹⁵ Berat badan merupakan parameter penting untuk mengetahui pengaruh senyawa asing terhadap janin, ditunjukkan dengan penurunan berat badan pada indukan. Berat badan juga merupakan parameter penting untuk mengetahui pengaruh senyawa asing terhadap fetus. Laju pertumbuhan dan perkembangan fetus menunjukkan variasi ukuran anakan. Penurunan bobot badan fetus merupakan bentuk yang paling minimal dari ekspresi teratogenik dan merupakan parameter yang lebih sensitif untuk uji teratogenik.¹⁴ Pengamatan terhadap fetus juga menunjukkan adanya kelainan fetus kerdil dan resorpsi pada KE seperti terlihat pada gambar 3.



Gambar 3. Fetus Normal (A), Fetus Kerdil (B,C,D), Fetus yang mengalami resorpsi (E)

Efek teratogenik dapat disebabkan akibat oleh obat, bahan kimia, agen biologi (infeksi), dan senyawa kimia seperti alkaloid. Obat-obat yang berefek teratogenik antara lain obat golongan ACE inhibitor, obat golongan Antiinflamasi Non-Steroid, obat antiepilepsi, thalidomit, hormone estrogen dan androgen dan obat sitostatika.¹⁵ Buah mankota dewa secara empirik digunakan sebagai obat

antihipertensi dan antikanker. Studi secara *in-vitro* dan *in-vivo* pada tikus menunjukkan bahwa buah mahkota dewa berefek antihipertensi dan memiliki aktivitas dalam menghambat enzim Pengkonversi Angiotensin (ACE).^{7,8}

Obat golongan *ACE inhibitor* berefek teratogenik dan dapat menimbulkan kecatatan pada janin berupa retardasi pertumbuhan intrauterine, kematian janin, *neonatal anuria*, dan *hypoplastic calvaria*.¹⁸ *ACE inhibitor* bekerja dengan menghambat pembentukan angiotensin II yang berperan penting dalam perkembangan fetus dan fungsi ginjal.¹⁹ Obat golongan *ACE inhibitor* merupakan inhibitor kompetitif terhadap kininase II yang mempengaruhi sistem Renin-Angiotensin-Aldosteron dan sistem Bradikinin-Prostaglandin. Pemberian ACE inhibitor selama fase kehamilan menyebabkan terjadinya *fetal wastage*. Efek fetotoksik *ACE inhibitor* berupa hipotensi pada fetus, displasia tubuli ginjal, anuria, oligohidroamnion, pembatasan pertumbuhan fetus, hipocalvaria dan kematian.¹⁸ Pemberian obat ini pada trisemester kedua dan ketiga kehamilan menyebabkan kematian pada fetus yang terjadi karena penurunan tekanan darah sistemik dan penurunan aliran darah ke uterus. Terjadi efek vasodilatasi akibat menurunnya produksi angiotensin II dan penurunan degradasi bradikinin dan prostaglandin. Penurunan cairan amnion teramati pada minggu ke 30-32 gestasi yang terjadi akibat menurunnya fungsi ginjal fetus dan aliran urin pada fetus.²⁰

Dari hasil penapisan fitokimia diketahui bahwa fraksi heksan buah mahkota dewa mengandung tannin, alkaloid dan terpenoid. Alkaloid yang terkandung pada tanaman memiliki efek teratogenik. Beberapa spesies tanaman seperti *Conium maculatum* L., *Nicotiana glauca*, *Nicotiana tabacum*, dan *Lupinus spp.* diketahui mengandung alkaloid yang berefek teratogenik. Alkaloid dapat menyebabkan terjadinya defek muskulokletal pada fetus berupa arthrogyroposis, scoliosis, torticollis, kyphosis dan lordosis.²¹ Hormon pertumbuhan sangat penting untuk pertumbuhan embrio yang akan mempengaruhi metabolisme protein, elektrolit karbohidrat dan lemak. Sekresi hormon pertumbuhan dikontrol melalui hipotalamus dengan mensekresi *Growth Hormone-Releasing Hormone* (GHRH) dan *Growth Hormone-Inhibiting Hormone* (GHIH) ke dalam darah yang akan mempengaruhi sel somatotrof dalam memproduksi hormon pertumbuhan. Adanya kandungan alkaloid dan terpenoid dalam fraksi heksan buah mahkota dewa akan mengganggu sekresi GHRH dan GHIH sehingga mempengaruhi berat badan dan panjang fetus.²²

Fraksi Heksan buah Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.] pada dosis 0,5 g/kg BB, 1 g/kg BB dan 2 g/kg BB berefek teratogenik pada mencit putih (*Mus Musculus*) berupa kelainan morfologi (kerdil) dan resorpsi.

Daftar Pustaka

- Harmanto N. Potensi Mahkota Dewa Sebagai Obat Tradisional, dalam: *Seminar Sehari Mahkota Dewa*, 6 Agustus 2003, Puslitbang Farmasi dan Obat Tradisional Balitbang Kes, Dep Kes R.I., Jakarta.
- Sumastuti R. Penelitian-penelitian Terhadap Daun dan Buah Mahkota Dewa, dalam : *Seminar Sehari Mahkota Dewa*, 6 Agustus 2003, Puslitbang Farmasi dan Obat Tradisional Balitbang Kes, Dep Kes R.I., Jakarta.
- Oshimi S, Zaima K, Matsuno Y, Hirasawa Y, Iizuka T, Studiawan H, Indrayanto G et al. Studies on the constituents from the fruits of *Phaleria macrocarpa*. *J of nat med.* 2008; 62(2): 207–10.
- Saufi A, Heimendahl CBV, Alfermann AW, Fuss. Stereochemistry of lignans in *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. *Naturforsch.* 2008; 63(1-2): 13–6.