

# EFEK PROTEKSI EKSTRAK AIR PANAS BUAH MAHKOTA DEWA *Phaleria macrocarpa* (SCHEFF.) BOERL. TERHADAP STRES OKSIDASI AKIBAT FERRI SITRAT PADA KHAMIR *Candida tropicalis*

Heddy Julistiono

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI, Cibinong Science Center, Indonesia  
E-mail: heddy\_j@yahoo.com

## ABSTRACT

*Yeast Candida tropicalis* had been used as a cell model to investigate effects of drugs in cell level. *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl., is traditionally used in Indonesia as medicinal plant. This study was to evaluate the antioxidant property of *P. macrocarpa* in cell level by using yeast *C. tropicalis* induced with ferric citrate. Ferric citrate of 1 mM or 5 mM induced oxidative stress in the yeast, marked with increasing of an oxidative damage marker, malon dialdehyde (MDA). Concentration of 5 mM of Ferric citrate caused cell mortality but concentration of 1 mM did not affect cell viability. Hot water extract of *P. macrocarpa* of 1 mg/ml attenuated MDA level in yeast cell induced with 1 mM ferric citrate. Whereas, 1 mg/ml of *P. macrocarpa* decreased cell mortality of the yeast induced with 5 mM ferric citrate with out decreasing level of MDA. However, 4 mg/ml of *P. macrocarpa* induced oxidative damage in yeast cell. The data may indicate the potential use of Indonesian traditional plant *P. macrocarpa* as herbal medicine for protecting human cell from oxidation damage.

**Key words:** Antioxidant, *Candida tropicalis*, Oxidative Stress, *Phaleria macrocarpa*,

## PENGANTAR

Potensi senyawa sebagai antioksidan merupakan salah satu target dalam penelitian biomedik. Evaluasi antioksidan dari suatu senyawa yang berdasarkan pada kemampuannya menjerap elektron pada sistem reaksi tanpa melibatkan sel adalah salah satu cara yang cepat dan mudah. Namun, mengingat berbagai faktor kompleks yang ada pada sistem sel tidak ada pada cara tersebut, data yang diperoleh kurang menggambarkan keadaan yang sesungguhnya misalnya potensi sifat prooksidan senyawa terhadap sel (Cotelle, 2001). Khamir *S. cerevisiae* merupakan sel model yang sangat berguna untuk mempelajari proses di tingkat molekular yang melatar-belakangi terjadinya bermacam kematian sel dari organisme tingkat tinggi seperti hewan dan manusia (Manon, 2004). *Saccharomyces cerevisiae* untuk dapat digunakan untuk mempelajari mekanisme senyawa agensia farmakologi yang secara unik berguna untuk antineoplastik dan resistensi serta toksisitas antifungal pada sel mamalia (Cardenas *et al.*, 1999). Beberapa biak khamir yang diisolasi dari berbagai sumber di Indonesia mempunyai potensi sebagai sel model untuk mempelajari proses pertahanan diri sel terhadap radikal bebas yakni khamir yang sensitive terhadap etanol diharapkan sebagai biosensor aktivitas antioksidan produk pertanian (Yulineri dan Julistiono, 2003). Salah satu khamir yang sensitif terhadap etanol dan diduga akibat stres oksidasi

adalah *Candida* sp. Y390 atau *C. tropicalis* LIPIMC 0065 (Julistiono, 2006A). Berdasarkan data tersebut, sifat antioksidan vitamin C pada tingkat sel dapat diamati pada khamir tersebut yang mengalami stres oksidasi akibat metabolisme etanol (Julistiono, 2006B). Sistem sel tersebut diperkirakan dapat untuk mempelajari khasiat senyawa antioksidan di tingkat sel secara lebih cepat dan murah dibanding penggunaan sel hewan.

Zat besi Fe merupakan senyawa pentrasfer elektron yang diketahui dapat menyebabkan terjadinya oksidasi pada komponen penyusun sel terutama asam lemak tidak jenuh sehingga mengakibatkan rusaknya sel (Schafer *et al.*, 2000).

Buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) merupakan salah satu tanaman obat yang sering dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia, yang diduga sebagai antikanker (Faried *et al.*, 2007). Salah satu senyawa yang larut dalam air dari tanaman obat ini adalah asam galat yang juga bersifat antioksidan (Faried *et al.*, 2007; Crispo *et al.*, 2010). Penggunaan tanaman obat ini biasanya dalam bentuk seduhan dalam air hangat. Oleh karena itu, senyawa buah mahkota dewa yang larut dalam air diduga sebagai senyawa yang bertanggung jawab sebagai obat.

Dalam penelitian ini, digunakan zat besi (ferri sitrat) untuk penginduksi stres oksidasi pada khamir *C. tropicalis* LIPIMC 0065. Khasiat senyawa buah mahkota dewa yang

larut dalam air diteliti pada sel khamir yang mengalami stres oksidasi. Penelitian ini diharapkan dapat memprediksi khasiat tanaman obat *P. macrocarpa* sebagai antioksidan di tingkat sel.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Khamir *Candida tropicalis*

Biakan khamir yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Candida tropicalis* LIPIMC 0065 yang merupakan koleksi Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi, LIPI, diisolasi dari tanah di Cepu, Jawa Tengah yang terkontaminasi dengan limbah bahan bakar minyak (Saono and Gandjar, 1974).

### Media pertumbuhan khamir

Media pertumbuhan khamir adalah media mengandung gliserol sebagai sumber karbon dan energi (Julistiono, 2006). Gliserol digunakan sebagai sumber C dan energi karena gliserol tidak terfermentasi oleh khamir menghasilkan etanol (de Winde *et al.*, 1997). Dengan demikian, selama pertumbuhan tidak terdapat etanol yang bersifat prooksidan. Dalam 1 l media cair gliserol mengandung 2.4 ml gliserol, 1.3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.15 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3.0 g ekstrak khamir, 4.0 g bakto pepton, dan 1 ml larutan X (5.0 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3.0 g  $\text{MnSO}_4$ , 2.8 g  $\text{CuSO}_4$ , dan 250 ml akuades). Semua bahan dilarutkan, kemudian media dipindahkan sebanyak 100 ml ke dalam labu erlenmeyer dan disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada  $121^\circ\text{C}$ , 150 atm.

### Media agar untuk menghitung viabilitas khamir

Media agar yang digunakan untuk pertumbuhan khamir adalah sebagai berikut (Julistiono, 2006). Dalam 1 l media mengandung 3.0 g ekstrak khamir, 5.0 g bakto pepton, 20 g bakto agar, 10 g glukosa, 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  dan akuades sampai volumenya 1 l.

### Penumbuhan khamir

Khamir ditumbuhkan pada media cair gliserol pada suhu kamar dan dikocok dengan kecepatan 100 rpm. Khamir yang akan diuji diperoleh dari biak berumur 2 hari, pada saat fase stasioner. Kepadatan sel khamir yang hidup dihitung dengan metoda *pour plate* pada media padat. Satuan jumlah sel yang hidup adalah CFU (*colony forming unit*) per ml.

### Penyiapan ekstrak buah *P. macrocarpa*

Ekstrak air panas tanaman obat *P. macrocarpa* disiapkan menurut metoda Emeje *et al.* (2005) yang dimodifikasi. Sebanyak 3 g buah *P. macrocarpa* kering direndam dalam akuades 100 ml suhu  $90^\circ\text{C}$  selama 30 menit sambil dikocok. Setelah 30 menit, larutan disaring dengan filter steril Whatman 0,2  $\mu\text{m}$ .

### Eksperimen

Sebanyak 200 ml biakan khamir umur 2 hari, disentrifugasi; pelet diambil ditambah air suling steril sampai 25 ml. Suspensi diambil sebanyak 2 ml. Sebagai kontrol, 2ml suspensi ditambah 1.2 ml aquades. Untuk perlakuan ferri sitrat ( $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , Sigma), 2 ml suspensi ditambah 1.2 ml larutan tersebut sehingga 3.2 ml suspensi total mengandung 0.5, 1, dan 5 mM. Untuk perlakuan buah *P. macrocarpa*, 2 ml suspensi ditambah 1.2 ml ekstrak sehingga suspensi 3.2 ml total mengandung 1, 2, dan 4 mg/ml. Demikian juga untuk perlakuan campuran ferri sitrat dan ekstrak buah mahkota dewa. Suspensi kemudian diinkubasi selama 1 jam dengan penggojogan 100 rpm. Perlakuan dibuat sebanyak 3 kali.

### Pengukuran Peroksidasi lipida.

Peroksidasi lipida diukur dengan mengukur malon dialdehid (MDA) yang terbentuk, mengacu pada metoda (Ray *et al.*, 2002) yang dimodifikasi. Setelah 1 jam inkubasi, suspensi ditambah 0.8 ml TCA 75%, digojog merata lalu ditambah 1.5 ml TBA 0.67% dan dihomogenkan dengan vortex, kemudian dipanaskan pada suhu  $95^\circ\text{C}$ . Suspensi didinginkan dan disentrifugasi kecepatan tinggi 2000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibaca dengan spektrofotometer pada 532 nm. Konsentrasi MDA ditentukan dengan membandingkannya dengan kurva MDA (1,1, 3,3-Tetraethoxypropane, Sigma) standar.

## HASIL

Pengaruh konsentrasi ekstrak air panas *P. macrocarpa* terhadap lipida terperoksidasi disajikan pada Tabel 1, pengaruh ferri sitrat terhadap lipida terperoksidasi pada Tabel 2, pengaruh proteksi ekstrak *P. macrocarpa* pada sel khamir yang mengalami stres oksidasi akibat induksi ferri sitrat disajikan pada Tabel 3, sedang pengaruh ekstrak *P. macrocarpa* pada viabilitas sel khamir yang diinduksi oleh ferri sitrat disajikan pada Tabel 4.

**Tabel 1.** Pengaruh ekstrak air panas buah *P. macrocarpa* terhadap lipida terperoksidasi

Ekstrak Mahkota buah <i>P. macrocarpa</i> (mg/ml)	Lipida terperoksidasi (pmol MDA/10 <sup>6</sup> CFU)
0	4.20 ± 0.03 <sup>a</sup>
1	4.30 ± 0.14 <sup>a</sup>
2	4.9 ± 0.9 <sup>b</sup>
4	5.07 ± 0.13 <sup>b</sup>

Keterangan: angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbedanya pada uji Duncan taraf 5%

**Tabel 2.** Pengaruh Ferri sitrat terhadap peroksidasi lipida

Ferri sitrat (mM)	Lipida terperoksidasi (pM MDA/10 <sup>6</sup> CFU)
0	1.7 ± 0.05 <sup>a</sup>
0.5	5.32 ± 0.725 <sup>b</sup>
1	5.81 ± 0.03 <sup>b</sup>
5	8.44 ± 0.20 <sup>c</sup>

Keterangan: angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbedanya pada uji Duncan taraf 5%

**Tabel 3.** Pengaruh ekstrak air panas buah mahkota dewa terhadap peroksidasi lipida

Perlakuan	Lipida terperoksidasi (pMMDA/10 <sup>6</sup> CFU)
Kontrol	4.79 ± 3.56 <sup>a</sup>
1 mM Ferri sitrat	5.82 ± 2.70 <sup>c</sup>
5mM Ferri Sitrat	8.46 ± 0.20 <sup>d</sup>
1 mg/ml mahkota dewa	4.30 ± 0.14 <sup>a</sup>
1mM Ferri Sitrat + 1 mg/ml mahkota dewa	4.99 ± 0.05 <sup>b</sup>
5mM Ferri Sitrat + 1 mg/ml mahkota dewa	8.44 ± 0.16 <sup>d</sup>

Keterangan: angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbedanya pada uji Duncan taraf 5%

**Tabel 4.** Pengaruh ekstrak air panas buah mahkota dewa terhadap viabilitas khamir

Perlakuan	Viabilitas sel (10 <sup>6</sup> CFU/ml)
Kontrol	210.11 ± 6,40 <sup>a</sup>
1 mM Ferri sitrat	208.01 ± 5,45 <sup>a</sup>
5mM Ferri Sitrat	154.44 ± 6,20 <sup>d</sup>
1 mg/ml mahkota dewa	202.11 ± 5,45 <sup>a</sup>
1mM Ferri Sitrat + 1 mg/ml mahkota dewa	210.55 ± 11,36 <sup>a</sup>
5mM Ferri Sitrat + 1 mg/ml mahkota dewa	195.33 ± 1,88 <sup>c</sup>

Keterangan: angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbedanya pada uji Duncan taraf 5%

## PEMBAHASAN

Salah satu kandungan buah mahkota dewa *P. macrocarpa* yang larut dalam air dan memiliki khasiat antioksidan dan antikanker adalah asam galat (Faried *et al.*, 2010; Crispo *et al.*, 2010). Seperti yang disajikan pada tabel 1, ekstrak buah mahkota dewa dapat bersifat prooksidan (mengakibatkan oksidasi). Hal ini terjadi jika konsentrasi ekstrak tersebut paling tidak 2 mg/ml, tetapi pada konsentrasi 1 mg/ml ekstrak tidak bersifat prooksidan. Beberapa senyawa polifenol tumbuhan yang bersifat antioksidan, pada dasarnya dapat bersifat sebaliknya yakni prooksidan (Cotelle, 2001; Maeta *et al.*, 2007). Diperkirakan, sifat ini tergantung dari jenis sel serta kondisinya. Sel khamir dan sel kanker lebih sensitif terhadap kerusakan oksidatif akibat senyawa polifenol (Maeta *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2003). Walaupun jenis senyawa pada ekstrak buah mahkota dewa dalam penelitian ini tidak ditunjukkan, namun asam galat yang dilaporkan oleh Faried *et al.* (2010) mungkin bertanggung jawab pada sifat antioksidan atau prooksidan dalam sel khamir yang diuji. Konsentrasi senyawa antioksidan seperti vitamin C juga dilaporkan dapat mengakibatkan oksidasi pada lipida sel khamir (Julistiono, 2006 B). Karena pada konsentrasi 1 mg/ml ekstrak buah mahkota dewa tidak menunjukkan sifat prooksidan, maka untuk uji antioksidan dipilih konsentrasi 1 mg/ml. Kandungan zat besi yang tinggi dapat mengakibatkan munculnya oksigen radikal bebas sehingga menyebabkan teroksidasinya komponen sel termasuk lipida (Freya *et al.*, 2000). Sifat ini juga terjadi pada sel khamir (Tabel 2). Sebelumnya Julistiono (2006A) juga melaporkan efek yang sama pada sel yang diberi logam berat Pb. Kerusakan pada lipida akibat 5 mM ferri sitrat dapat menyebabkan kematian pada sel yang ditandai dengan turunnya viabilitas sel yang diperlakukan dengan 5 mM ferri sitrat (Tabel 4). Pada Tabel 3 terlihat bahwa kandungan ekstrak buah mahkota dewa 1 mg/ml dapat menurunkan tingkat lipida yang terperoksidasi pada sel yang diinduksi dengan 1mM ferri sitrat. Tingkat kematian sel akibat 5 mM ferri sitrat juga dapat dihambat dengan adanya 1 mg/ml ekstrak buah mahkota dewa (Tabel 4) walau tidak terlihat adanya penurunan lipida yang teroksidasi (Tabel 3). Hal ini mengindikasikan bahwa pada kondisi itu, ekstrak buah mahkota dewa mampu sebagai antioksidan yang melindungi sel dari oksidasi akibat unsur logam besi. Mekanisme perlindungan ini dapat melalui sifat penjerap elektron dari ekstrak (Cotell, 2000), dapat juga sifat kandungan ekstrak sebagai chelator dari logam besi seperti yang dilaporkan oleh Mandel *et al.*, (2006).

Ketahanan sel khamir terhadap radikal bebas juga dimungkinkan dengan naiknya aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) (Julistiono, 2006A) namun pada penelitian ini tidak diketahui kemampuan ekstrak untuk menginduksi enzim SOD.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah Sel khamir *C. tropicalis* dapat digunakan untuk mengevaluasi sifat antioksidan tanaman obat *P. macrocarpa* pada tingkat sel. Ferri sitrat dapat mengakibatkan kerusakan sel akibat oksidasi. Ekstrak air panas *P. macrocarpa* dapat menurunkan tingkat kerusakan lipida yang teroksidasi oleh kandungan ferri sitrat.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Fitrianti dan Nandang Suharna yang telah membantu baik secara teknis maupun dalam pembuatan artikel ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Cardenas ME, MC Cruz, MD Poeta, N Chung, JR Perfect, and J Heitman, 1999. Antifungal Activities of Antineoplastic Agents: *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System to Study Drug Action. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 583–611.
- Cotelle N, 2001. Role of Flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Med Chem* 1: 569–590.
- Crispo JA, Ansell DR, Piche M, Eibl JK, Khaper N, Ross GM, Tai TC, 2010. Protective effects of polyphenolic compounds on oxidative stress-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Can J Physiol Pharmacol*. 88: 429–38.
- Emeje M Isimi CY, Oqua DA, Kunle OO, 2005. Some compaction characteristics of the hot water leaf extract of *Nauclea latifolia*: –30.
- Faried A, Kurnia D, Faried LS, Usman N, Miyazaki T, Kato H, Kuwano H, 2007. Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *Int J Oncol*. 30: 605–13.
- Freya Q. Schafer, Steven Yue Qian and Garry R. Buettner. 2000. Iron and Free Radical Oxidations in Cell Membranes. *Cellular and Molecular Biology* 46(3): 657–662.
- Jamieson DJ, 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1511–1527.
- Julistiono H, 2006A. Superoxide Dismutase and Ethanol Resistance by Sodium Chloride and Lead in Yeast *Candida* sp. Y390. *J. Biol. Indonesia*. 4: 1–7.
- Julistiono H, 2006B. Respons Oksidatif Khamir *Candida* sp. Y390 Terhadap Antioksidan Vitamin C (Oxidative Response of Yeast *Candida* sp. Y390 to an Antioxidant Vitamin C). *Gakuryoku*. XII: 166–169.
- Manon S, 2004. Utilization of Yeast to investigate the role of lipid oxidation in cell death. *Antioxidants & Redox Signaling*. 6: 259–267.
- Mandel S, Weinreb O, Reznichenko L, Kalfon L, Amit T, 2006. Green Tea catechin as brain permeable. *J Neural Transm Suppl*. 71: 249–257.
- Maeta K, Wataru N, Yoshifumi T, Shingo I, and Yoshiharu I, 2007. Green Tea Polyphenols Function as Prooxidants To Activate Oxidative-Stress-Responsive Transcription Factors in Yeasts. *Applied And Environmental Microbiology* 73: 572–580.
- Ray A, SR Chaudhuri, B Majumdar, SK Bandyopadhyay, 2002. Antioxidant activity of ethanol extract of rhizome of *Picrorhiza Kurroa* on indomethacin induced gastric ulcer during healing. *Indian J Clin Biochem* 17: 44–51.
- Saono SI and Gandjar, 1974. Hydrocarbon-utilizing soil yeasts from oil fields in Tjepu region (Central Java), Indonesia. *Annales Bogorienses* V: 123–129.
- Yamamoto, T Hsu, S Lewis, J Wataha, J Dickinson, D Singh, B Bollag, WB Lockwood P, Ueta E, Osaki T and Schuster G, 2003. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 307: 230–236.
- Yin P, J Zhao, S Cheng, Q Zhu, Z Liu, and L Zhengguo, 1994. Experimental studies of the inhibitory effects of green tea catechin on mice large intestinal cancers induced by 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett* 79: 33–38.
- Yulineri T dan H Julistiono, 2003. Penggunaan Keragaman Khamir berdasarkan Keberadaan enzim superoksida dismutasinya untuk bioesai stres oksidatif. *Berkala Penelitian Hayati*. 8: 49–51.