

SKRIPSI

DINAR CARISMA WAHYUNI

**UJI AKTIVITAS ANTIKANKER SENYAWA PINOSTROBIN
DARI RIMPANG TEMU KUNCI (*Kaempferia pandurata* Roxb)
TERHADAP KANKER FIBROSARKOMA MENCIT SECARA
INVIVO**

TF 135.66

Wah
u



**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN ILMU BAHAN ALAM
SURABAYA
2005**

Lembar Pengesahan

**UJI AKTIVITAS ANTIKANKER SENYAWA PINOSTROBIN
DARI RIMPANG TEMU KUNCI (*Kaempferia pandurata* Roxb)
TERHADAP KANKER FIBROSARKOMA MENCIT SECARA
INVIVO**

SKRIPSI

**Dibuat untuk memenuhi syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas
Farmasi Universitas Airlangga**

2005

Oleh:

DINAR CARISMA WAHYUNI
050112352

Disetujui oleh:

Pembimbing Utama



Drs. Sukardiman, Apt., MS
NIP.131801629

Pembimbing Serta



Drh. Hani Plumeriastuti, M. Kes
NIP. 131653458

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb

Segala puji dan syukur saya panjatkan kehadirat Allah SWT, karena hanya atas rahmat serta hidayahnya-Nya maka skripsi dengan judul **“Uji Aktivitas Antikanker Senyawa Pinostrobin Dari Rimpang Temu Kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) Terhadap Kanker Fibrosarkoma Mencit Secara Invivo”** ini dapat saya selesaikan dengan sebaik-baiknya.

Saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Drs. Sukardiman, Apt., Ms. Selaku dosen pembimbing skripsi yang dengan tulus ikhlas dan penuh kesabaran memberikan bimbingan dan dorongan sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.
2. Drh. Hani Plumeriastuti, M. Kes, selaku dosen pembimbing skripsi yang dengan tulus ikhlas dan penuh kesabaran memberikan bimbingan dan dorongan kepada saya dalam banyak hal, baik dalam skripsi ini maupun dalam kehidupan pribadi saya.
3. Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas selama mengikuti kuliah dan melakukan penelitian ini.
4. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas selama mengikuti kuliah dan melakukan penelitian ini.
5. Bagian Ilmu Bahan Alam yang telah membantu dan menyediakan tempat untuk penyelesaian skripsi ini.
6. Dosen penguji yaitu Drs. Herra Studiawan, Apt., MS yang telah meluangkan waktu dan tenaganya untuk menguji skripsi ini.
7. Dosen penguji yaitu Drs. Abdul Rahman, Msi yang telah meluangkan waktu dan tenaganya untuk menguji skripsi ini.
8. Laboran di Bagian Ilmu Bahan Alam yang telah membantu dan menyediakan tempat untuk penyelesaian skripsi ini.
9. Prof. Dr. Gde. Nyoman Astika, selaku dosen wali yang telah dengan sabar membimbing selama masa perkuliahan, selalu memberikan perhatian, dukungan dan dorongannya selama masa pengerjaan skripsi.

10. Mama-papa, Mbak Indah, Mas Yudi, Mbak Sari, Me Me yang selalu memberi semangat, dukungan, dan selalu mengingatkan untuk penyelesaian skripsi ini, saya dedikasikan skripsi ini untuk kalian.
11. Candrasa, Cicilia, Pritha, Komang, dan Graha, Linda, Selly atas semangat dan antusiasnya untuk selalu mendukung dalam kesendirian saya dan kesediaannya untuk membantu dalam pembuatan skripsi ini.
12. Teman-teman angkatan 2001 yang telah banyak membantu dan memberi dorongan selama belajar serta semua pihak yang telah membantu menyelesaikan skripsi ini.

Saya menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan, untuk itu saya mengharapkan kritik dan saran dari semua pihak. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan pembaca pada umumnya demi kemajuan farmasi.

Wassalamu'alaikum Wr.Wb.

Surabaya, Juli 2005

Penyusun

RINGKASAN

Uji Aktivitas Antikanker Senyawa Pinostrobin Dari Rimpang Temu Kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) Terhadap Kanker Fibrosarkoma Mencit Secara Invivo

Kanker masih menjadi salah satu penyebab kematian terbanyak di dunia. WHO melaporkan terjadi peningkatan jumlah penderita kanker setiap tahunnya hingga mencapai 6,25 juta orang. Sedangkan duapertiga dari penderita kanker tersebut berasal dari negara berkembang, termasuk Indonesia. Penemuan dan pemakaian kemoterapi sebagai obat kanker menunjukkan hasil yang bagus tetapi toksisitas dan efek sampingnya sangat besar, sehingga hal ini mendorong banyak orang melakukan pengobatan dengan menggunakan bahan alam.

Penelitian yang dilakukan dalam upaya pencarian senyawa bioaktif dari tanaman adalah seperti yang telah dilakukan oleh Maulida Ermawati, 1997, hasil penelitian tersebut diketahui bahwa isolat flavonoid pinostrobin dari rimpang tanaman temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) secara invitro memiliki sifat sitotoksik terhadap kultur sel payudara manusia. Penelitian selanjutnya terhadap tanaman temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) telah dilakukan oleh Sukardiman dkk., 2000, secara invitro. Dari penelitian tersebut disimpulkan bahwa senyawa pinostrobin memiliki aktivitas inhibitor terhadap enzim DNA topoisomerase.

Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan uji aktivitas antikanker senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) secara invivo menggunakan mencit yang menderita fibrosarkoma oleh induksi dengan benzo(a)pirena. Maka dilakukan penelitian tentang efek antikanker senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) secara invivo menggunakan hewan coba yaitu mencit jantan yang diinduksi dengan larutan benzo(a)pirena 0,3 % (b/v) dalam oleum olivarum secara subkutan untuk menghasilkan sel kanker. Selanjutnya diinjeksikan isolat senyawa pinostrobin secara intraperitoneal dengan dosis 0,2 mg/g BB pada dosis I dan 0,4 mg/g BB pada dosis II. Pengamatan efek antikanker ditentukan dengan dibuat kurva prosentase hambatan kanker berdasarkan perubahan berat jaringan, serta irisan anatomi-histologi dari sel/jaringan kanker tersebut.

Preparasi jaringan kanker dilakukan setelah mencit dikorbankan, kemudian dilakukan pembedahan untuk memisahkan jaringan kanker dengan jaringan lain. Jaringan fibrosarkoma yang didapat, diproses lebih lanjut untuk mendapatkan sediaan mikroskopik yang diwarnai dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE). Evaluasi hasil pengamatan mikroskopik dilakukan dengan cara membandingkan dengan control negative. Data yang diperoleh kemudian diolah dengan analisis statistika Uji Kruskal-Wallis dan uji perbandingan berganda (uji Z). Hasil perhitungan uji Kruskal-Wallis menunjukkan bahwa senyawa pinostrobin dari tanaman *Kaempferia pandurata* Roxb memiliki aktivitas antikanker pada mencit jantan yang menderita kanker hasil induksi benzo(a)pirena secara intraperitoneal. Perbedaan yang sangat nyata diantara kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (uji Z 5%). Pada uji Z diperoleh hasil bahwa dosis I dan dosis II mempunyai perbedaan

yang signifikan terhadap kontrol negatif dimana hasil pada dosis I adalah 0,0455, sedangkan pada dosis II adalah 0,0069 yang lebih kecil dari α (0,05).

Berdasarkan penelitian di atas dapat disimpulkan bahwa senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) dengan dosis I (0,2 mg/g BB) dan dosis II adalah 0,4 mg/g BB mempunyai aktivitas antikanker pada fibrosarkoma mencit yang diinduksi oleh benzo(a)pirena.

Sedangkan saran yang dapat diberikan adalah hasil penelitian ini disarankan agar penelitian dilanjutkan penelitian tentang uji toksisitas senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) pada hewan coba dengan tingkat yang lebih tinggi, uji toksisitas senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) pada hewan coba yang merupakan prasyarat formal keamanan untuk pemakaian pada manusia. Selain itu perlu juga dilakukan penelitian tentang usaha peningkatan kelarutan pinostrobin dalam pelarut air untuk mencapai aktivitas antikanker secara maksimum.

ABSTRACT

Anticancer Activity of Pinostrobin Compound from Temu Kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) Againts Benzo(a)pyrene-Induced Fibrosarcoma Cancer On Mice In Vivo

The aim of the present study was to examined anticancer activity of pinostrobin from Temu Kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) againts benzo(a)pyrene-induced fibrosarcoma cancer on mice in vivo.

Pinostrobin was isolated from Temu Kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) was tested for its in vitro anticancer, pinostrobin have cytotoxic activity on human breast cancer culture. Mice which suffer from fibrosarcoma cancer, were injected with pinostrobin at a concentration of 0,2 mg/g body weight (20 g each) and 0,4 mg/g body weight (20 g each). The growth reduced of fibrosarcoma cancer cells was verified with Hematoxilin Eosin (HE) staining and the incidences of inhibition of fibrosarcoma cancer increased compared to that of the control. The results showed that in the pinostrobin treatment group, according to the Kruskal-Wallis test and Z test, the in vivo data were significant ($p < 0.05$). Conclusion: pinostrobin from Temu Kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) have anticancer activity againts benzo(a)pyrene-induced fibrosarcoma cancer on mice in vivo.

Keywords : *Kaempferia pandurata* Roxb, pinostrobin, anticancer

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	v
RINGKASAN	vii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Hipotesis Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan tentang <i>Kaempferia pandurata</i> Roxb	5
2.1.1 Klasifikasi	5
2.1.2 Nama daerah	5
2.1.3 Deskripsi tanaman	5
2.1.4 Kandungan tanaman	6
2.1.5 Kegunaan / khasiat tanaman	7
2.2 Tinjauan tentang Senyawa Flavonoid	7
2.2.1 Penggolongan Flavonoid	7
2.3 Tinjauan Tentang Kanker	10
2.3.1 Hubungan Kerja Antikanker dengan Siklus Sel Kanker	11
2.3.2 Penyebab kanker	12
2.3.3 Mekanisme Terjadinya Kanker	19
2.4 Tinjauan Tentang Antikanker	21
2.5 Induksi Kanker Dengan Benzo(a)pirena	23

2.6 Tinjauan tentang fibrosarkoma	24
2.7 Tinjauan tentang Hematoksin Eosin	24
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	26
BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1 Bahan Penelitian	29
4.1.1 Bahan Uji	29
4.1.2 Bahan Kimia dan Bahan Lain	29
4.2 Alat Penelitian	30
4.3 Prosedur Penelitian	30
4.3.1 Penyiapan Hewan Coba	30
4.3.2 Perhitungan Jumlah Benzo(a)pirena	30
4.3.3 Cara Pembuatan Larutan Benzo(a)pirena 0,3% (b/v)	31
4.4 Penyiapan Bahan Uji	31
4.4.1 Pembuatan Bahan Uji	31
4.4.2 Penyediaan Sediaan Bahan Uji Dalam Berbagai Kosentrasi	31
4.4.3 Pembuatan larutan CMC-Na 0,5 % (b/v)	31
4.5 Rancangan Penelitian	32
4.6 Cara Pengumpulan data	32
4.7 Pemeriksaan Histopatologis	32
4.8 Analisa Data	33
4.8.1 Uji Statistik	33
BAB V HASIL PENELITIAN	
5.1 Pembuatan Larutan Benzo(a)pirena 0,3% (b/v)	35
5.2 Pembuatan Larutan uji Dalam Berbagai Kosentrasi	35
5.3 Pembuatan larutan CMC-Na 0,5 % (b/v)	35
5.4 Hasil aktivitas antikanker dari Senyawa Pinostrobin terhadap fibrosarkoma mencit hasil induksi benzo(a)pirena	35
5.4.1 Aktivitas antikanker berdasarkan parameter berat kanker	35

5.4.2 Aktivitas antikanker berdasarkan pengamatan perubahan histopatologis fibrosarkoma	37
5.4.3 Analisis Statistika	41
5.4.3.1 Uji Kruskal-Wallis	41
5.4.3.2 Uji Perbandingan Berganda (Uji Z)	44
BAB VI PEMBAHASAN	46
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan	52
7.2 Saran	52
DAFTAR PUSTAKA	53

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel II.1 Bioaktivitas beberapa senyawa flavonoid	8
Tabel V.1 Berat fibrosarkoma setelah pemberian senyawa pinostrobin dari tanaman <i>Kaempferia pandurata</i> Roxb yang diberikan pada mencit jantan yang menderita kanker hasil induksi benzo(a)pirena secara intraperitoneal	36
Tabel V.2 Hasil uji aktivitas antikanker terhadap mencit jantan Setelah pemberian senyawa pinostrobin dari tanaman <i>Kaempferia pandurata</i> Roxb yang diberikan pada mencit jantan yang menderita kanker hasil induksi benzo(a)pirena secara intraperitoneal	39
Tabel V.3 Rank dan nilai rata-rata skor histopatologi fibrosarkoma hasil penelitian pada lima lapang pandang	42
Tabel V.4 Perhitungan Z_{hitung} dengan selisih rata-rata rank	44

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Kanker masih menjadi salah satu penyebab kematian terbanyak di dunia. WHO melaporkan terjadi peningkatan jumlah penderita kanker setiap tahunnya hingga mencapai 6,25 juta orang. Dan duapertiga dari penderita kanker tersebut berasal dari negara berkembang, termasuk Indonesia (Anonim, 2003). Kanker adalah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostasis lainnya pada organisme multiseluler (Ganiswarna, 1995). Usaha pengobatan penyakit kanker telah banyak dilakukan, namun hingga saat ini belum ditemukan obat yang dapat mengatasi penyakit secara memuaskan.

Pada umumnya, kerja antikanker berdasarkan atas gangguan pada salah satu proses sel yang esensial. Karena terjadi perbedaan kualitatif antara sel kanker dengan sel normal maka semua antikanker bersifat mengganggu sel normal sehingga bersifat sitotoksik (Ganiswarna, 1995).

Sifat umum dari kanker adalah pertumbuhannya berlebihan umumnya berbentuk tumor (autonomi), gangguan differensiensi dari sel dan jaringan sehingga mirip jaringan mudigah, bersifat invasif yaitu mampu tumbuh di jaringan sekitarnya (perbedaan pokok dengan jaringan normal), bersifat metastatis yaitu menyebar ke tempat lain dan menyebabkan pertumbuhan baru, memiliki hereditas bawaan (acquired heredity) yaitu turunan sel kanker juga dapat menyebabkan kanker, serta pergeseran metabolisme kearah pembentukan makromolekul dari nukleosida dan asam amino serta peningkatan katabolisme karbohidrat untuk energi sel (Ganiswarna, 1995).

Sel kanker mengganggu tuan rumah karena dapat menyebabkan desakan akibat pertumbuhan tumor, penghancuran jaringan tempat tumor berkembang atau bermetastasis, serta gangguan sistemik lain sebagai akibat sekunder dari pertumbuhan sel kanker (Ganiswarna, 1995).



Di negara yang telah maju yang telah berhasil membasmi penyakit infeksi, kanker merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit kardiovaskular. Di A.S. kanker merupakan penyebab utama kematian pada wanita antara 30-54 tahun dan anak-anak antara 3-14 tahun. Dengan metode pengobatan pada saat ini, sepertiga jumlah pasien tertolong melalui pembedahan dan terapi radiasi. Kesembuhan hampir seluruhnya terjadi pada pasien yang penyakitnya belum menyebar pada saat pembedahan. Diagnosis lebih dini makin meningkatkan penyembuhan (Ganiswarna, 1995).

Antikanker diharapkan memiliki toksisitas selektif artinya menghancurkan sel kanker tanpa merusak sel jaringan normal. Pada umumnya antikanker menekan pertumbuhan atau proliferasi sel dan menimbulkan toksisitas, karena menghambat pertumbuhan sel normal yang proliferasinya cepat misalnya sumsum tulang, epitel germinativum, mukosa saluran cerna, folikel rambut, dan jaringan limfosit. Tetapi hanya dapat dikatakan berhasil baik, bila dosis yang digunakan dapat mematikan sel tumor yang ganas dan tidak terlalu mengganggu sel normal yang berproliferasi (Ganiswarna, 1995).

Penemuan dan pemakaian kemoterapi menunjukkan hasil yang bagus tetapi toksisitas dan efek sampingnya sangat besar (Siswandono, 1983), sehingga hal ini mendorong banyak orang melakukan pengobatan dengan menggunakan bahan alam (Sahu dkk., 1984).

Penelitian yang dilakukan dalam upaya pencarian senyawa bioaktif dari tanaman adalah seperti yang telah dilakukan oleh Maulida Ermawati, 1997, hasil penelitian tersebut diketahui bahwa isolat flavonoid pinostrobin dari rimpang tanaman temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) secara invitro memiliki sifat sitotoksik terhadap kultur sel payudara manusia. Penelitian selanjutnya terhadap tanaman temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) telah dilakukan oleh Sukardiman dkk., 2000, secara invitro untuk menentukan mekanisme antikanker. Dari penelitian tersebut disimpulkan bahwa senyawa pinostrobin memiliki aktivitas inhibitor terhadap enzim DNA topoisomerase. Fungsi enzim DNA topoisomerase sangat penting dalam proses intraseluler, yaitu berperan dalam proses replikasi, transkripsi, rekombinasi DNA dan proses proliferasi dari sel kanker. Dengan dihambatnya aktivitas DNA topoisomerase, maka proses

intraseluler terhambat yang diakhiri dengan kematian sel kanker. Pada tahun 2003, Sukardiman melakukan penelitian lanjutan secara invitro. Dari penelitian tersebut disimpulkan bahwa senyawa pinostrobin dari rimpang tanaman temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) memiliki aktivitas antikanker terhadap kultur kanker mieloma mencit secara bermakna.

Pada kenyataannya penelitian secara invitro tidak dapat memberikan informasi yang akurat (Woerdenbag, 1987), karena pada percobaan secara invitro, maka media (baik kultur maupun organ terisolasi) selalu berada pada lingkungan dan kondisi tertentu yang terkontrol. Sedangkan pada invivo, terjadi proses absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi pada tubuh subyek. Sehingga kemungkinan timbulnya senyawa baru hasil metabolisme sangat besar. Hal ini menyebabkan hasil yang berbeda pada kedua metode tersebut.

Oleh karena itu maka perlu dilakukan penelitian tentang efek antikanker senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) secara invivo menggunakan hewan coba. Untuk itu diperlukan hewan percobaan yaitu mencit jantan yang diinduksi dengan larutan benzo(a)pirena dalam oleum olivarum secara subkutan untuk menghasilkan sel kanker. Dan selanjutnya diinjeksikan isolat senyawa pinostrobin secara intraperitoneal pada jumlah atau dosis tertentu. Setelah pemberian injeksi tersebut diharapkan volume jaringan kanker pada hewan coba akan berkurang dalam beberapa hari. Pengamatan efek antikanker ditentukan dengan dibuat kurva prosentase hambatan kanker berdasarkan perubahan berat jaringan kanker, serta irisan anatomi-histologi dari sel/jaringan kanker tersebut.

1.2 Rumusan masalah

Apakah senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) mempunyai aktivitas antikanker pada fibrosarkoma mencit yang diinduksi dengan benzo(a)pirena?

1.3 Tujuan Penelitian

Melakukan uji aktivitas antikanker senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) secara *invivo* menggunakan mencit yang menderita fibrosarkoma oleh induksi dengan benzo(a)pirena.

1.4 Hipotesis Penelitian

Senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) mempunyai aktivitas antikanker pada fibrosarkoma mencit yang diinduksi oleh benzo(a)pirena.

1.5 Manfaat Penelitian

Diperolehnya suatu senyawa bioaktif dari tanaman obat Indonesia yang memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi bahan obat antikanker yang potensial dan selektif, yaitu senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang *Kaempferia pandurata* Roxb

2.1.1 Klasifikasi

Dalam taksonomi tumbuhan, tanaman temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Klas	: Monocotyledonae
Bangsa	: Zingiberales
Suku	: Zingiberaceae
Marga	: <i>Kaempferia</i>
Jenis	: <i>Kaempferia pandurata</i> Roxb
Sinonim	: <i>Gastrochilus panduratum</i> (Roxb) Rild <i>Boesenbergia pandurata</i> (Heyne, 1987)

2.1.2 Nama daerah

Tanaman temu kunci tersebar di seluruh Indonesia dan dikenal dengan berbagai nama daerah, antara lain : temu kunci (Melayu), tamu kunci (Minangkabau), temu kunci (Sunda), kunci (Jawa), temmu konce (Madura), temu konci (Nusa Tenggara, Bali, Maluku, Sulawesi) (Heyne, 1987).

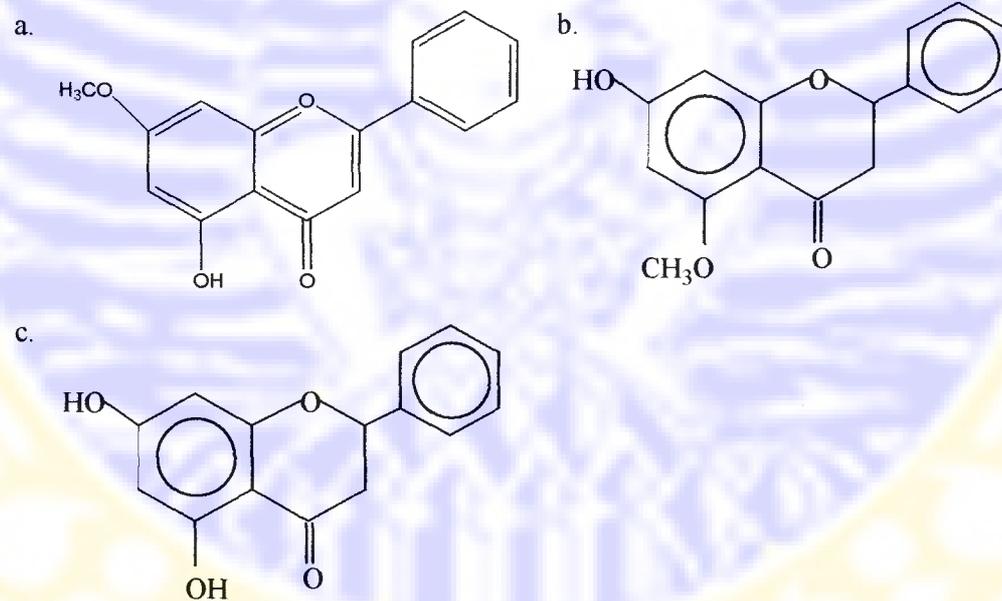
2.1.3 Deskripsi tanaman

Tumbuhan semak, kecil, tingginya \pm 30 cm, berbatang semu terdiri dari kelopak-kelopak daun yang berpadu. Rimpangnya tumbuh mendatar berjumpang-jumpang dan beruas, warnanya kuning. Akarnya tebal, berair, gemuk, bentuknya seperti cacing. Daunnya tidak banyak 4-5 lembar pada batang, panjang 23-30 cm dan lebar 4,5-10 cm, berpasangan, agak tegak, bentuk bundar, menjorok ke ujung dan ke pangkal. Telapak dan punggung daun licin, tidak berbulu dan berwarna hijau. Tulang daun ditengah, agak besar, mempunyai lapis tipis seakan-akan

tembus cahaya, dipermukaannya bersisik pendek meruncing. Bunga banyak pada tandannya, muncul disela-sela pelindung daun bunga yang bentuknya lonjong, bundar seperti berpita-pita, panjang bunganya 5 cm. Kelopak bunga terbelah 2 panjangnya 2,5 cm, bentuk tabung kecil, lembarannya tipis seakan-akan tembus cahaya. Mahkota bunga panjangnya \pm 5 cm, warnanya putih atau merah jambu dan berbentuk tabung. Lembaran mahkota bunga berwarna merah jambu, bentuknya lonjong, panjangnya \pm 2 cm dan ujungnya runcing (Heyne, 1987).

2.1.4 Kandungan tanaman

Kandungan kimia dari *Kaempferia pandurata* Roxb adalah 5,7-dimetoksi flavanon; 5-hidroksi-7-metoksi flavon; 5-hidroksi-7,4'-dimetoksi flavon; 5-7-dimetoksi flavon; 5,7,4'-trimetoksi flavon; 5,7,3',4' tetrametoksi flavon; 5-hidroksi-3,7-dimetoksi flavon; 5-hidroksi-3,7,4'-trimetoksi flavon; 3,5,7-trimetoksi flavon; 5-hidroksi-3,7,3',4'-tetrametoksi flavon; pinostrobin; pinocembrin; 2',6'-dihidroksi-4-metoksi kalkon; boesenbergin-A; rubranin; panduratin; kaempferol-3,7,4'-trimetil eter; quersetin-3,7,3',4'- tetrametil eter; kamfer; kamfen; sineol; geraniol; metilsinamat (Heyne, 1987).



Gambar 2.1 Pinostrobin (a); Alpinetin (b); Pinocembrin (c)

Pinostrobin dengan nama kimia 7-metoksi 5 hidroksi flavanon memiliki BM 270. Pinostrobin berwujud kristal putih muda dengan titik leleh $99,5^{\circ}\text{C}$ - 101°C (Melting Point Apparatus Fisher-Johns) (Oka, 1998; Law, 1992). Menurut literatur lain yaitu 99 - 100°C (Dean dan Mongkolsuk, 1964).

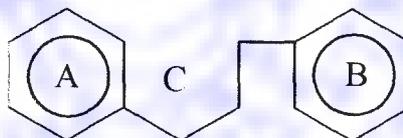
2.1.5 Kegunaan / khasiat tanaman

Tanaman ini digunakan selain untuk bumbu sayur-sayuran, sebagai obat tradisional digunakan untuk obat batuk kering, sariawan, gangguan pada usus besar, popok perut membengkak, susah kencing pada anak-anak, radang selaput lendir pada mulut rahim dan disentri (Heyne, 1987). Berdasarkan penelitian terbaru pinostrobin dapat dipergunakan sebagai senyawa antioksidan (Rapta dkk., 1995) dan relaksasi otot polos (Mata, 1997).

2.2 Tinjauan tentang Senyawa Flavonoid

Salah satu golongan fenol alam yang terbesar dan tersusun oleh 15 atom karbon pada inti dasarnya. Tersusun dari konfigurasi C6-C3-C6, yaitu cincin aromatik dan dihubungkan oleh 3 atom karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga (Markam, 1988).

Struktur dasar



Gambar 2.2 Flavonoid

2.2.1 Penggolongan Flavonoid

Penggolongan senyawa flavonoid berdasarkan atas pergeseran 2 pita pada gelombang maksimum dari senyawa flavonoid menggunakan spektro ultraviolet, dengan menambahkan suatu pereaksi pada larutan ekstrak metanolnya yaitu aluminium klorida (AlCl_3), aluminium klorida (AlCl_3)+HCl, NaOH, Na asetat (NaOAc), NaOAc + asam borat (H_3BO_3) (Sudiro, 1988).

Dari hasil beberapa penelitian tentang bioaktivitas senyawa flavonoid memperlihatkan kecenderungan-kecenderungan atau pola tertentu diantaranya tentang korelasi antara struktur molekul dan bioaktivitas dari senyawa flavonoid (Dey, 1991).

Keaktifan dari flavanon, flavon, dan flavanol sebagai anti oksidan ditentukan oleh adanya gugus - OH ganda, terutama sekali adanya keterikatan antara gugus C=O pada posisi C-4 dengan gugus - OH pada C-3 dan C-5. Sistem gugus fungsi demikian memungkinkan terbentuk kompleks dengan tembaga. Senyawa flavonoid juga menunjukkan adanya aktivitas antiinflamasi, dengan adanya gugus C=O pada posisi C-4 dan gugus -OH pada C-5 yang diperlukan untuk membentuk kompleks dengan besi (Achmad, 1990).

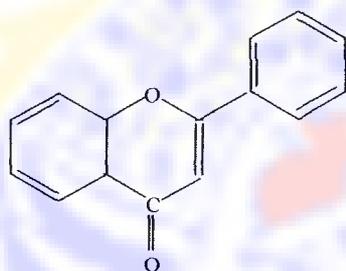
Beberapa jenis flavonoid telah ditemukan mempunyai bioaktivitas tertentu seperti disajikan dalam tabel di bawah ini (Achmad, 1990) :

Tabel II.1 Bioaktivitas beberapa senyawa flavonoid

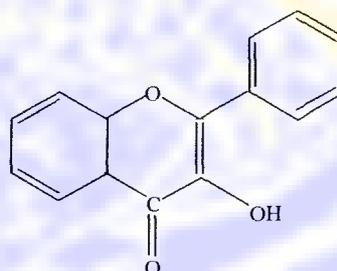
Flavonoid	Bioaktivitas
Baikalen	Anti alergi
Nobiletin	Anti alergi
Kuersetin	Anti tumor dan anti hepatotoksik
Silikristin	Anti hepatotoksik
Narigenin	Fitohormon
Daidzein	Anti oksidan
xanthomicrol	Anti platelet
kumatokenin	Anti platelet
jaceidin	Anti platelet
3, 3'-di-O-methylquercetin	Anti platelet
quercetin-3-O-alpha-(6"-caffeoylglucosyl-beta-1,2-rhamnoside)	Angiotensin Converting Enzyme(ACE) Inhibitor
quercetin 3-O-alpha-(6"-p-coumaroylglucosyl-beta-1,2-rhamnoside)	Angiotensin Converting Enzyme(ACE) Inhibitor
isorhamnetin-3-beta-glucopyranoside	Angiotensin Converting Enzyme(ACE) Inhibitor

quercetin-3-beta-glucopyranoside	Angiotensin Converting Enzyme(ACE) Inhibitor
kaempferol-3-alpha-arabinopyranoside	Angiotensin Converting Enzyme(ACE) Inhibitor
pinostrobin	antioksidan

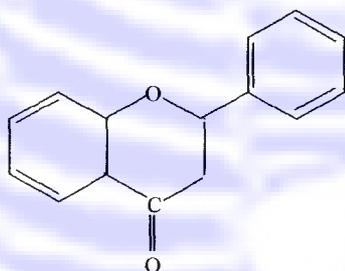
Senyawa flavonoid dibagi dalam beberapa golongan yaitu : flavon, flavonol, isoflavon, katekin, flavanon, leukoantosianidin, auron, dan kalkon. Adapun rumus bangunnya adalah : (Farnsworth, 1996 ; Sudiro, 1998)



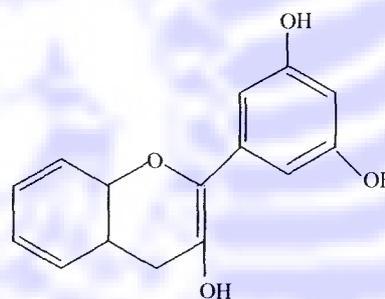
Flavon



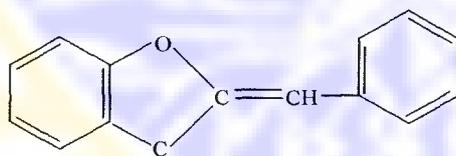
Flavonol



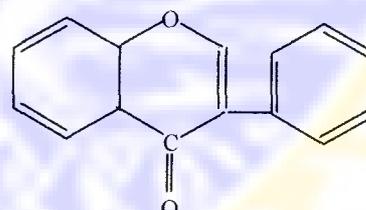
Flavanon



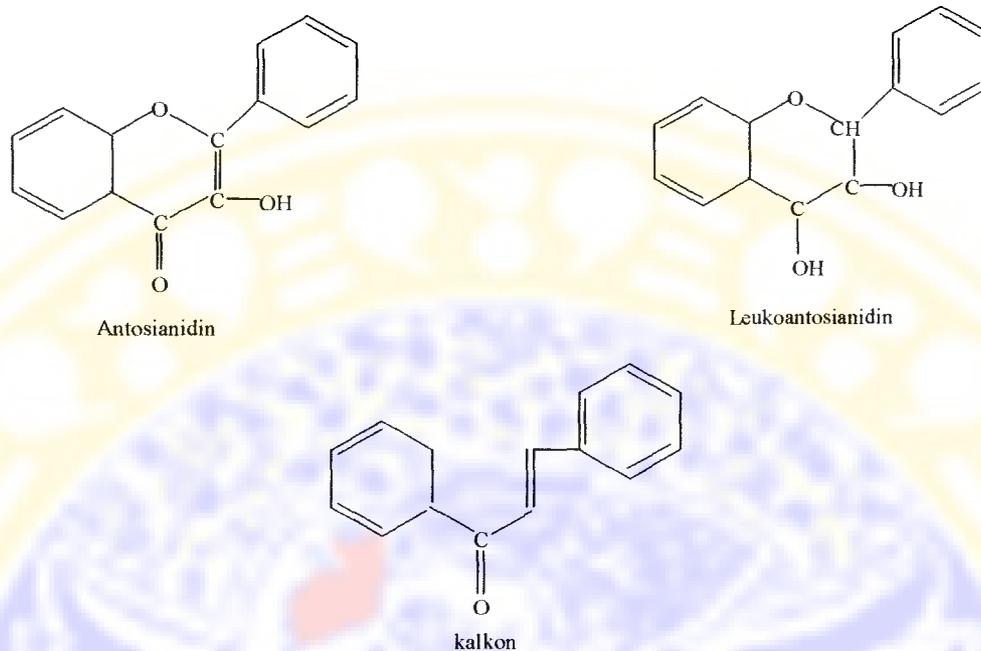
Catechin



Auron



Isoflavon



Gambar 2.3 Struktur dasar golongan senyawa flavonoid

2.3 Tinjauan Tentang Kanker

Kanker adalah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostasis lainnya pada organisme multiseluler. Adanya gangguan tersebut menghasilkan pertumbuhan baru dan massa jaringan yang abnormal yang disebut dengan tumor.

Berdasarkan kecepatan pertumbuhannya tumor dibedakan dua jenis, yaitu tumor ganas (malignant) dan jinak (benign). Tumor jinak disebut tumor sedangkan tumor ganas disebut dengan kanker. Sifat-sifat yang dimiliki oleh sel kanker adalah pertumbuhannya berlebihan umumnya berbentuk tumor (autonomi), gangguan differensiensi dari sel dan jaringan sehingga mirip jaringan mudigah, bersifat invasif yaitu mampu tumbuh di jaringan sekitarnya (perbedaan pokok dengan jaringan normal), bersifat metastatis yaitu menyebar ke tempat lain dan menyebabkan pertumbuhan baru, memiliki hereditas bawaan (acquired heredity) yaitu turunan sel kanker juga dapat menyebabkan kanker, pergeseran metabolisme ke arah pembentukan makromolekul dari nukleosida dan asam amino serta peningkatan katabolisme karbohidrat untuk energi sel (Ganiswarna, 1995).

Secara mikroskopis, sel kanker memiliki diferensiasi sel yang rendah (dediferensiasi), susunan sel yang tidak teratur, selularitas yang padat, terdapat banyak sel dan ukuran sel yang berbeda (polimorf), inti sel membesar, kromatin menebal, kasar, tidak rata, terjadi hiperkromasi, dan basofilik. Anak inti tampak tajam dan sering menonjol dengan ukuran yang bervariasi serta terjadi banyak mitosis. Bentuk inti bermacam-macam (ankariositosis) dan kromosomnya aneuploid (menyimpang). Pada sitoplasma terdapat vakuola, bentuk sitoplasma bermacam-macam (anisositosis) dan bila dilakukan pewarnaan terhadap sitoplasma terjadi peningkatan pengikatan warna. Dapat pula ditemukan basofil, susunan sel yang tidak teratur dan kadang-kadang tidak dapat dikenali, bentuk selnya bermacam-macam (pleumorfik), sel atipik lazim terjadi, dan kadar enzim selnya sering mengalami kekurangan (Ganiswarna, 1995).

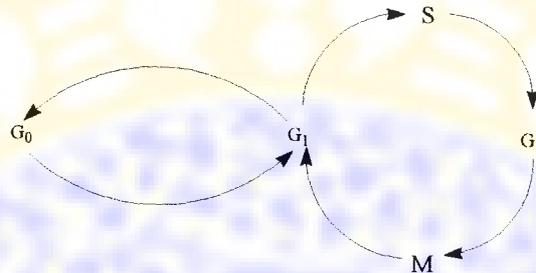
Gejala – gejala klinik pertumbuhan tumor terjadi secara lokal dan sistemik. Gejala klinik lokal menunjukkan adanya pembengkakan (tumor), terjadi penekanan pada organ sekitar (obstruksi pembuluh darah, organ yang berongga), adanya ulserasi (pada mukosa atau pada kulit) dan kekurangan darah (anemis). Sedangkan gejala klinik sistemik ditandai dengan turunnya berat badan dan terjadi gejala-gejala paraneoplastik (Martoprawiro, 2000).

2.3.1 Hubungan Kerja Antikanker dengan Siklus Sel Kanker

Sel tumor dapat berada dalam 3 keadaan yaitu pertama keadaan yang sedang membelah (siklus proliferaatif), kedua dalam keadaan istirahat (tidak membelah, G_0) dan yang terakhir adalah keadaan yang secara permanen tidak membelah (Ganiswarna, 1995).

Sel tumor yang sedang membelah terdapat dalam beberapa fase yaitu fase mitosis (M), fase pascamitosis (G_1), fase sintesis DNA (fase S), fase pramitosis (G_2). Pada akhir fase G_1 terjadi peningkatan RNA disusul dengan fase S yang merupakan saat terjadinya replikasi DNA. Setelah fase S berakhir sel masuk dalam fase pramitosis (G_2) dengan ciri: sel berbentuk tetraploid, mengandung DNA dua kali lebih banyak daripada sel fase lain dan masih berlangsungnya sintesis RNA dan protein. Sewaktu mitosis berlangsung (fase M) sintesis protein dan RNA berkurang secara tiba-tiba, dan terjadi pembelahan

menjadi dua sel. Setelah itu sel dapat memasuki fase G_1 , saat sel berproliferasi atau memasuki fase istirahat (G_0). Sel dalam fase G_0 yang masih potensial untuk berproliferasi disebut sel klonogenik atau sel induk (stem cell). Jadi yang menambah jumlah sel kanker ialah sel yang dalam siklus proliferasi dan dalam fase G_0 .



Gambar 2.4 Fase sel kanker

2.3.2 Penyebab kanker

Tumor terjadi akibat kegagalan pengendalian sel, sehingga sel dapat melepaskan diri dari mekanisme pengaturan pertumbuhan yang normal. Terdapat tiga golongan gen pengatur pertumbuhan normal yang menjadi sasaran perubahan genetik ialah : gen pencetus pertumbuhan abnormal seperti proto-onkogen, onkogen. Gen penghambat pertumbuhan abnormal yaitu *cancer supresor gene* disebut juga sebagai anti-onkogen seperti gen yang mengatur kematian sel terprogram disebut *gene apoptosis*, disamping gen tersebut masih ada yang keempat yang memperbaiki kerusakan sel yang disebut gen perbaikan DNA yang memegang peranan ada tidaknya karsinogenesis (Martoprawiro, 2000).

Karsinogenesis merupakan suatu proses yang bertingkat dan kompleks pembentukan neoplasma atau tumor. Sel tumor yang oleh penyebab berubah menjadi sel neoplastik yang membentuk kumpulan sel yang mempunyai sifat tumbuh abnormal disebut juga sel yang mengalami transformasi. Pada umumnya tumor adalah monoklonal artinya sel – sel yang mengisi tumor semuanya berasal dari satu sel yang mengalami transformasi(Martoprawiro, 2000).

Terjadinya kanker yang melibatkan banyak faktor maka dikenal dengan sebutan multifaktorial multigenesis, karena karsinogenesis merupakan proses yang bertahap disebut pula *multistep carcinogenesis* pada tingkat fenotip dan

genotip dengan beberapa fase yaitu fase inisiasi, fase laten, fase promosi dan fase progresif keganasan. Neeoplasma ganas yang dikenal dengan sebutan kanker mempunyai ciri – ciri fenotip dengan pertumbuhan yang berlebih, invasi lokal dan mempunyai kemampuan penyebaran yang jauh. Sifat-sifat ini dijumpai waktu tahap-tahap penampilan suatu fenomena yang disebut progresif tumor (Martoprawiro, 2000).

Pada tingkat molekuler progresif tumor merupakan akibat dari akumulasi lesi genetik yang diakibatkan oleh defek pada perbaikan DNA (Martoprawiro, 2000). Kanker terjadi karena adanya senyawa karsinogenik. Terjadinya perubahan sel normal menjadi sel kanker disebut karsinogenesis. Senyawa karsinogenesis tersebut berasal dari (Dipalma, 1977) :

a. Karsinogen Fisik.

Karsinogenesis yang disebabkan oleh karsinogen fisik belum dapat diperoleh secara pasti mekanisme yang terjadi pada sel sehingga terjadi sel kanker. Berbagai peneliti telah berhasil membuktikan bahwa dengan dosis tertentu sinar X dan sinar UV dapat menginduksi terjadinya ketidakseimbangan hormonal serta perubahan sifat yang irreversibel pada jaringan yang dikenai sinar tersebut (Dipalma, 1977).

Ada dua kemungkinan yang dapat terjadi saat sel terkena radiasi yaitu sinar radiasi langsung mengenai asam nukleat (DNA) dan menyebabkan mutasi pada susunan asam nukleat (DNA), atau sinar radiasi tersebut menyebabkan terbentuknya peroksida atau radikal bebas yang akan bereaksi dengan asam nukleat (DNA) atau sinar radiasi, menyebabkan terbentuknya purin, pirimidin yang abnormal, sebagai mana diketahui kedua basa ini merupakan senyawa yang bersama-sama dengan folat dan pentosa menyusun asam nukleat. Kelainan tersebut menyebabkan terbentuknya susunan DNA dan RNA baru yang menyimpang dari DNA dan RNA yang terdapat pada sel normal (Dipalma, 1977).

Pada sel-sel yang mengalami kelainan tersebut ada tiga alternatif yang mungkin terjadi, pertama adalah sel berhasil memperbaiki kerusakan yang terjadi sehingga terbentuk sel normal, kedua sel tidak berhasil memperbaiki kerusakan yang terjadi sehingga sel mati, dan yang ketiga adalah sel berhasil memperbaiki kerusakan-kerusakan dan terjadi penyimpangan pada saat mekanisme perbaikan

sehingga terjadi perubahan struktur pada DNA dan RNA. Jika perubahan struktur ini cukup besar dan irreversible maka sel ini akan menjadi sel kanker (Zainuddin, 1981).

b. Karsinogen Virus

Virus yang sifatnya karsinogen disebut virus onkogen. Dari beberapa penelitian diketahui bahwa virus DNA maupun RNA dapat menimbulkan transformasi sel (Martoprawiro, 2000).

Golongan virus DNA (Martoprawiro, 2000) :

(1) Human papilloma virus (HPV)

HPV tipe 1,2,4 dan 7 sering menyebabkan terjadinya papilloma skwamus. HPV tipe 16,18 dan 31 dihubungkan dengan terjadinya karsinoma servik uteri

(2) Epstein-Barr virus (EBV)

Golongan virus herpes ini dihubungkan dengan terjadinya karsinoma nasofaring, limfoma Burkitt atau beberapa subtype penyakit Hodgkin.

(3) Virus hepatitis B (HBV)

Pada daerah endemik tinggi infeksi HBV terdapat angka kejadian yang tinggi karsinoma sel hati.

(4) Cytomegalovirus (CMV)

CMV juga vitrus herpes yang dihubungkan dengan sarkoma Kaposi pada penderita AIDS. Virus DNA mengandung DS-DNA yang dapat berintegrasi sebagai atau seluruhnya dengan kromosom sel penjamu. Mereka dapat bergabung untuk waktu yang lama. Pada perpaduan yang lama ini menimbulkan mutasi sehingga terjadi neoplasma.

Pada binatang virus RNA banyak menimbulkan neoplasma, misalnya Rous Sarcoma Virus dan Bittner Milk Faktor. Pada manusia HLTVI menimbulkan leukemia sel T, limfoma sel B pada penderita AIDS berkaitan dengan HIV. Mekanisme transformasi sel oleh virus RNA. Setelah virus RNA provirus oleh enzim reverse transkriptase yang kemudian bergabung dengan DNA penjamu. Setelah terinfeksi sel, materi genetik virus RNA dapat membawa bagian materi genetik sel yang terinfeksi yang disebut V-onkogen, kemudian dipindahkan ke materi genetik sel yang lain (transduksi) (Martoprawiro, 2000).

Setelah virus masuk kedalam tuan rumah (host) kemungkinan akan terjadi tiga kejadian yaitu pertama virus berintegrasi dengan asam nukleat yang terdapat dalam sel tuan rumah, kedua virus tidak mengadakan integrasi dengan asam nukleat, tetapi hidup sebagai parasit didalam sel dan bertindak sebagai ekstrak genetik faktor yang menekan fungsi asam nukleat termasuk fungsi pengontrolan pertumbuhan dan yang ketiga adalah virus akan merusak atau merubah asam nukleat dengan cara mengadakan persaingan dalam pengambilan energi dan bahan-bahan lainnya yang dibutuhkan oleh asam nukleat. Kelainan pada asam nukleat pada DNA dan RNA akan menghasilkan DNA dan RNA baru yang menyimpang dari DNA dan RNA sel normal (Miller, 1962).

c. Karsinogen Kimia

Pertama kali yang mengemukakan bahwa bahan kimia sebagai penyebab kanker ialah Percival Pott pada tahun 1775, yang mendapatkan kanker kulit skrotum yang sering didapatkan pada orang-orang yang bekerja sebagai pembersih cerobong asap (Martoprawiro, 2000).

Kebanyakan karsinogen kimia sebagai pro-karsinogen yaitu karsinogen yang memerlukan perubahan metabolis agar menjadi karsinogen yang aktif (ultimate karsinogen), sehingga bisa menimbulkan perubahan pada DNA, RNA atau protein sel tubuh. Dengan demikian terjadinya neoplasma pada tempat bahan kimia terbentuk sebagai hasil metabolisme dan bekerja sebagai karsinogen aktif. Terdapat juga karsinogen yang dapat langsung menimbulkan neoplasma pada tempat karsinogen mengenai jaringan tubuh tanpa perlu melalui perubahan metabolisme (Martoprawiro, 2000).

Kebanyakan karsinogen kimia melalui perubahan metabolisme membentuk gugus elektrofilik (kurang muatan elektron), sebagai hasil antara yang kemudian dapat berikatan dengan pusat-pusat nukleofilik (banyak muatan elektron) pada protein, RNA, DNA sel (Martoprawiro, 2000).

Beberapa karsinogen kimia dapat bekerja bersama-sama atau dengan jenis karsinogen lain seperti virus atau radiasi mempengaruhi terbentuknya neoplasma. Beberapa contoh karsinogen kimia (Martoprawiro, 2000) :

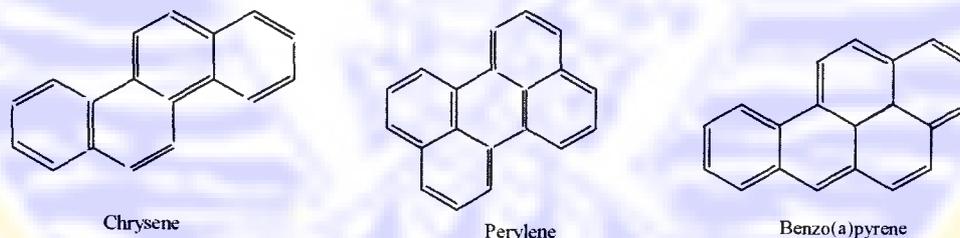
- (1) Karsinogen yang bereaksi langsung, seperti golongan alkylating agent, contoh: dimetil sulfat, obat antikanker seperti cyclophosphamide, dll dan golongan *Acylating agent*, contoh : dimetil cardarmil klorida. Pada umumnya merupakan karsinogen yang lemah tetapi penting karena di beberapa diantaranya zat tersebut merupakan obat kemoterapi kanker misalnya *Acylating Agent* yang telah berhasil menyembuhkan, mengendalikan atau memperlambat kekambuhan jenis kanker tertentu misalnya leukemia, limfoma, penyakit Hodkins, dan karsinoma ovarium. Baru kemudian diketahui menimbulkan kanker kedua biasanya leukemia. Resiko rangsangan untuk terjadinya kanker adalah rendah, tetapi suatu kenyataan bahwa timbulnya kanker yang kedua disebabkan oleh agen tersebut diatas (Martoprawiro, 2000).
- (2) Pro-karsinogen yang memerlukan perubahan metabolisme. Contohnya adalah hidrokarbon polisiklik aromatik (HPA), asam aromatik dan pewarna azo (amino azo dyes). Hidrokarbon polisiklik aromatik (HPA) mengandung gugus benzo(a) pirena, yang merupakan hasil antara pada proses pembakaran yang tidak sempurna. HPA dimetabolisme oleh p 450 *dependent* oksidasi menjadi gugus elektrofilik yang bereaksi dengan asam nukleat menimbulkan mutasi. Asap rokok mengandung HPA, sehingga orang perokok aktif atau orang yang menghisap asap rokok meskipun tidak merokok aktif bisa terkena kanker paru. Tembakau juga mengandung HPA, sehingga orang yang mempunyai kebiasaan mengunyah tembakau dapat terkena kanker mulut. HPA juga dapat dihasilkan dari lemak binatang dalam proses pemanggangan daging dan juga terdapat pada pengasapan daging atau ikan. Dasar produk aktif pada kebanyakan hidrokarbon ialah epoksida yang membentuk ikatan dengan molekul DNA, RNA dan protein didalam sel (Martoprawiro, 2000).

Asam aromatik dan pewarna azo (amino azo dyes) ialah pro-karsinogen, masuk kedalam tubuh melalui kulit, paru atau saluran cerna. Banyak digunakan untuk pewarna dalam kalangan industri. Setelah masuk kedalam tubuh diubah dengan cara hidroksilasi didalam hati menjadi 1-hydroxy-2-anafthylamin yang bersifat karsinogenik, tetapi segera dikonjugasi oleh asam glukoronik didalam hati. Hidrolisis didalam saluran air kemih akan

membentuk gugus hidroksilamin, yang bersifat karsinogenik aktif menimbulkan kanker pada kandung kemih (Martoprawiro, 2000).

- (3) Nitrosamin yang terbentuk didalam saluran cerna dari gugus nitrat dan nitrit yang sering dipakai sebagai bahan aditif pada makanan. Didalam saluran cerna dimetabolisme oleh bakteri komensial dan berikatan dengan amin atau amida. Nitrosamin yang terbentuk bertindak sebagai karsinogen dapat menimbulkan kanker pada saluran atau di hati (Martoprawiro, 2000).
- (4) Unsur logam, antara lain nikel dan plumbum bersifat elektrofilik, dapat bereaksi dengan pusat nukleofilik pada DNA, menimbulkan kanker pada orang yang sering terpapar bahan tersebut yaitu orang yang bekerja banyak berhubungan dengan unsur logam tersebut (Martoprawiro, 2000).

Senyawa karsinogen kimia yang termasuk dalam katagori *activating independent* sering disebut *direct acting* atau **primary carcinogen** adalah suatu senyawa yang tidak perlu tahapan aktivasi terlebih dahulu untuk berinteraksi dengan senyawa makromolekul seperti DNA. Contoh : ethylene imine, 1,2,3,4-Butadiene epoxide, Cyclopospamide (Cytosan). Senyawa kimia yang termasuk dalam katagori *activating dependent* sering disebut **procarcinogen** adalah suatu senyawa yang perlu tahapan aktivasi dahulu untuk berinteraksi dengan senyawa makromolekul seperti DNA, contoh struktur kimia senyawa hidrokarbon aromatik polisiklik adalah seperti pada gambar tersebut di bawah ini (Martoprawiro, 2000).



Gambar 2.5 Struktur kimia dari senyawa hidrokarbon aromatik trisiklik

Pada organ – organ tertentu seperti kulit dan hati, proses karsinogenesis dapat dibagi menjadi sedikitnya dua tahapan, contohnya yang klasik adalah kulit. Secara khas, daerah-daerah kulit yang identik pada sekelompok menciit diwarnai satu kali dengan benzo(a)pirena. Jika tidak dilakukan pemrosesan lebih lanjut, maka tidak akan tumbuh tumor pada kulit. Namun demikian, bila pemakaian

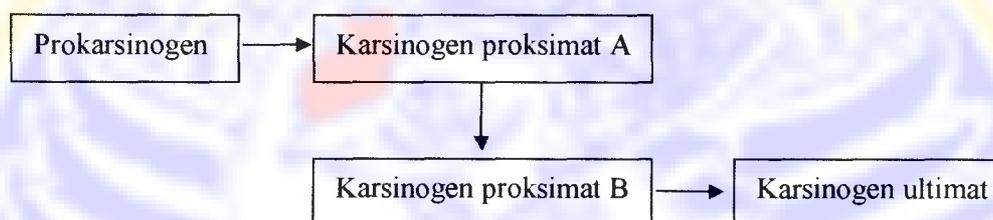
benzo(a)pirena tersebut diikuti oleh penggunaan minyak kroton, banyak tumor kemudian akan tumbuh. Pemakaian minyak kroton saja, yaitu tanpa terlebih dahulu memakai senyawa benzo(a)pirena tidak mengakibatkan timbulnya tumor kulit. Banyak varian lainnya dari tatacara pemeriksaan ini sudah dilaksanakan sehingga menghasilkan kesimpulan yaitu pertama stadium karsinogenesis yang disebabkan oleh pemakaian benzo(a)pirena dinamakan stadium inisiasi (stadium tampaknya berlangsung cepat dan ireversibel). Stadium karsinogenesis ini tampaknya melibatkan modifikasi ireversibel DNA yang mungkin terjadi karena satu atau lebih mutasi. Dengan demikian benzo(a)pirena dinamakan zat inisiasi (inisiator). Stadium karsinogenesis kedua yang berlangsung jauh lebih lambat yaitu, beberapa bulan atau beberapa tahun terjadi akibat pemberian minyak kroton, yang dinamakan proses penggalakan (promosi). Karena itu, minyak kroton disebut sebagai promoter. Zat promoter tidak mampu menghasilkan inisiasi (mengawali atau mencetuskan proses tumbuhnya kanker). Sebagian besar karsinogen mampu bekerja baik sebagai zat inisiasi maupun promoter (Murray, 1995).

d. Karsinogen radiasi

Radiasi UV dengan panjang gelombang 280-320 nm berkaitan dengan terjadinya kanker kulit (karsinoma sel basal, karsinoma sel skuam, melanoma maligna) terutama pada orang kulit putih yang sering mendapat sinar matahari berlebihan. Radiasi UV menimbulkan pyrimidine dimer yang merusak rangka phosphodiester DNA. Pada penderita Xeroderma Pigmentosum (XP) yang mempunyai kelainan bawaan defisiensi enzim untuk memperbaiki kerusakan DNA, mudah sekali terjadi kanker kulit jika sering terkena UV. Radiasi pengion dapat langsung menimbulkan kerusakan makromolekul atau berinteraksi dengan cairan sel menimbulkan radikal bebas yang kemudian menimbulkan kerusakan atau perubahan ikatan kimia. Dapat menimbulkan enzim yang tidak aktif, perubahan protein, kromosom pecah, translokasi dan mutasi titik (Martoprawiro, 2000). Dapat pula menghambat imunitas kanker seluler. Radiasi yang menimbulkan mutasi bertindak sebagai inisiator dan hambatan imunitas bertindak sebagai promoter.

2.3.3 Mekanisme Terjadinya Kanker

Senyawa karsinogen kimia (prokarsinogen) masuk kedalam tubuh hewan atau manusia akan terjadi metabolisme yang dimulai dari tahap aktivasi. Proses dimana satu atau lebih reaksi yang dikatalisis oleh enzim tertentu akan mengubah prokarsinogen menjadi karsinogen aktif yang disebut dengan aktivasi metabolik. Setiap senyawa antara yang terbentuk disebut *Proximate-carcinogen* (Pt) atau karsinogen proksimat, dan senyawa akhir yang bereaksi dengan DNA adalah *Ultimate carcinogen* (Ut) atau karsinogen ultimat. Dengan demikian rangkaian perubahannya adalah sebagai berikut: (Jamal, 1989; Pitot dan Yvone, 1991; Lu, 1995).



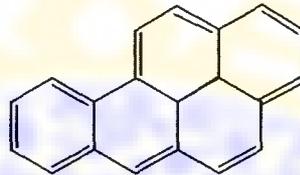
Gambar 2.6 Tahap aktivasi senyawa karsinogen

Enzim-enzim yang bertanggung jawab terhadap aktivasi metabolik untuk zat-zat prokarsinogen pada prinsipnya merupakan aktivasi enzim sitokrom P-450 yang terdapat dalam retikulum endoplasma. Contoh reaksi aktivasi dari prokarsinogen menjadi karsinogen ultimat adalah :



Gambar 2.7 Proses aktivasi metabolik senyawa benzo(a)pirena

Pada umumnya jika karsinogen kimia telah masuk kedalam sel jaringan akan terjadi proses metabolisme yang dimulai dari tahap inisiasi, diikuti tahap promosi, selanjutnya mengalami akselerasi. Pada tahap inisiasi, inisiator yang dimaksud adalah senyawa pencetus atau yang memiliki aktivitas baik langsung atau tidak langsung terhadap terbentuknya kanker, contohnya seperti benzo(a)pirena.



Gambar 2.8 benzo(a)pirena

Tahap promosi merupakan tahap interaksi antara bentuk karsinogen aktif atau karsinogen ultimat yang memiliki sifat elektrofilik dan dapat membentuk ikatan kovalen dengan bagian nukleofilik dari senyawa makromolekul yang terdapat didalam sel seperti DNA, RNA atau protein. Jika terjadi ikatan dengan DNA maka terjadi mutasi DNA yang irreversibel pada DNA sel dan akhirnya akan terbentuk kanker. Interaksi antara senyawa karsinogen kimia dengan DNA adalah pada gugus purin, pirimidin atau gugus fosfodiester yang disebut dengan reaksi alkilasi. Tahap akselerasi atau progresi merupakan tahap dimana sel kanker akan membelah dengan kecepatan tinggi dan tidak terkontrol (James, 1989; Pitot dan Yvone, 1991; Lu, 1995).

2.4 Tinjauan Tentang Antikanker

Antikanker diharapkan memiliki toksisitas selektif, artinya menghancurkan sel kanker tanpa merusak jaringan normal. Pada umumnya antineoplastik menekan pertumbuhan atau proliferasi sel dan menimbulkan toksisitas karena menghambat sel normal yang proliferasinya cepat. Tetapi dikatakan berhasil jika dosis yang digunakan dapat mematikan sel kanker dan tidak mengganggu pertumbuhan sel normal yang berproliferasi (Ganiswarna, 1995).

Mekanisme kerja antikanker berdasarkan atas gangguan pada salah satu proses sel yang esensial adalah sebagai berikut (Martoprawiro, 2000):

(1) Alkilator

Cara kerjanya melalui pembentukan ion karbonium atau kompleks lain yang sangat reaktif. Ikatan kovalen akan terjalin dengan berbagai nukleofilik penting dalam tubuh, misalnya : fosfat, amino, sulfidril, hidroksil, karboksil atau gugus imidazol. Efek sitostatik maupun efek sampingnya berhubungan langsung dengan terjadinya alkilasi DNA. Contoh : mustar nitrogen (meklorethanin, siklofosfamid, klorambusil), derivat etilenamin (trietilamin, tiotepe), golongan alkyl sulfonat (busulfan), golongan nitrosourea (karmustin, lomustin, semustin) (Martoprawiro, 2000).

(2) Anti metabolit

Senyawa yang menghambat jalur metabolik yang penting untuk kehidupan dan reproduksi sel kanker, melalui penghambatan folat, purin, pirimidin dan asam amino serta jalur nukleosida pirimidin yang diperlukan untuk sintesis DNA. Penghambatan replikasi DNA terjadi secara langsung maupun tidak langsung sehingga menyebabkan sel tidak berkembang biak dan mengalami kematian. Golongan anti metabolit adalah 5-fluoroasil (analog pirimidin), metotreksat (antagonis folat) (Martoprawiro, 2000).

(3) Produk alamiah

Antikanker produk alam dibagi menjadi tiga kelompok yaitu antibiotika antikanker, antikanker produk tanaman, dan antikanker produk hewan.

Antibiotika antikanker

Beberapa antibiotika yang mula-mula dikembangkan sebagai senyawa antibakteri ternyata didapatkan mempunyai efek sitotoksik tinggi. Efek samping tersebut dievaluasi dan kemudian dikembangkan menjadi obat-obat kanker. Contoh : mitomisin, daktiomisin, daunarubisin, doksorubisin, dan bleomisin (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Antikanker produk tanaman

Senyawa antitumor yang berhasil diisolasi dari tanaman memiliki struktur kimia berbeda dan dikelompokkan berdasarkan struktur kimianya, sebagai berikut (Dewick, 1983):

- a. Monoterpen, contoh : allamadin diisolasi dari *Allamanda cathartica* (Apocynaceae)
- b. Sesquiterpen, contoh : baccharin diisolasi dari *Baccharis megapotamica* (Compositae), elephantoin dari *Elephantopus elatus* (Compositae), helenalin dari *Helenium autumnale* (Compositae).
- c. Diterpen, contoh : taxol diisolasi dari *Taxus brevifolia* (Taxaceae)
- d. Quanosinoid / Simarubaid, contoh : bruceatin diisolasi dari *Brucea antidysentrica* (Simarubaeae)
- e. Triterpenoid, steroid dan lain – lain, contoh : cucurbitacin diisolasi dari *Maraah oreganuus* (Aslepidaceae)
- f. Lignan, contoh : phodophyllatoxin diisolasi dari *Phodophylum peltatum* (Phodophyllaceae)
- g. Quinon, contoh : jacaranone diisolasi *Jacaranda caucana* (Bignoniaceae)
- h. Alkaloid, contoh : emetin diisolasi dari *Cephaleis acuminata* (Rubiaceae)
- i. Peptida, contoh : Vinkristin dan vinblastin diisolasi dari *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), bouvaridan dari *Bouvardia emifolia* (Rubiaceae).

Mekanisme kerja sebagai antikanker dari vinblastin dan vinkristin adalah dengan mengikat tubuli dan menghambat pembentukan komponen mikrotubuli dan menghambat pembentukan komponen mikrotubuli pada kumpulan mitosis sehingga metafase berhenti. Alkaloida vinca bekerja secara khas pada fase M. Vinkristin mempunyai aktivitas lebih besar dibanding vinblastin karena mempunyai kemampuan penetrasi ke sel kanker lebih baik (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

Antikanker produk rekayasa genetika

Contoh : antineoplaston, interferon dan avaron (Siswandono dan Soekardjo, 2000).

(4) Hormon

Golongan hormon : hormon adrenokortikosteroid (Prednison).

(5) Isotop radioaktif

Golongan isotop radioaktif : Iodium / Natrium Iodida (I^{131})

(6) Lain-lain

Golongan : substitusi urea (Hidroksiurea)

2.5 Induksi Kanker Dengan Benzo(a)pirena

Untuk memperoleh hewan percobaan yang menderita kanker, mencit diinduksi dengan larutan benzo(a)pirena dalam oleum olivarium. Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan, konsentrasi larutan yang dibutuhkan adalah 0,3% b/v (Braun, 1969). Benzo(a)pirena adalah karsinogen kimia yang menyebabkan peristiwa perubahan dari sel normal menjadi sel kanker. Benzo(a)pirena sebagai karsinogen hidrokarbon aromatik poli inti, diduga akan dimetabolisir menjadi senyawa antar bentuk epoksidanya, yaitu 4,5-oksida benzo(a)pirena. Bentuk epoksida tersebut, dapat dideteksi dan diidentifikasi sebagai metabolit dalam preparat mikrosoma hati tikus yang diinkubasi bersama-sama dengan benzo(a)pirena dengan NADPH₂. Disini terjadi epoksida pada ikatan rangkap yang disebut sebagai daerah K, yang merupakan daerah dengan kerapatan elektron paling tinggi dan merupakan ikatan rangkap yang paling reaktif, sehingga mudah dioksidasi menjadi epoksida. Senyawa 4,5-oksida benzo(a)pirena tersebut, diduga akan berubah menjadi aril karbonium yang reaktif, yang dapat membentuk ikatan kovalen dengan basa dari DNA. Pendapat lain menduga, bahwa benzo(a)pirena dimetabolisir menjadi bentuk epoksidanya, tetapi di luar daerah K, yaitu bentuk 7,8-dihidroksi, 9,10-epoksi, 7,8,9,10-tetra hidro benzo(a)pirena. Sama halnya dengan epoksida di atas, metabolit ini dapat membentuk ikatan kovalen dengan basa dari DNA (Braun, 1969).

2.6 Tinjauan Tentang fibrosarkoma

Fibrosarkoma adalah tumor ganas yang bersifat invasif setempat, menyebar secara hematogen, berasal dari fibroblast pembentuk kolagen yang tidak berdiferensiasi (Anonim^a, 1998). Umumnya ditemukan pada lutut, memproduksi jaringan kolagen tetapi tidak menghasilkan osteoid dan kondroid. Terjadi pada orang-orang dewasa berumur 30 sampai 60 tahun dan secara seimbang antara pria dan wanita. Pada pemeriksaannya, jaringan berwarna putih keabu-abuan dengan konsistensi seperti karet (Anonim^b, 1998).



2.7 Tinjauan Tentang Hematoksilin Eosin

Hematoksilin yang merupakan zat warna dari tumbuhan *Hematoxylin camphenium* L merupakan zat warna basa yaitu garam-garam dari basa-basa pembawa warna dengan radikal asam yang tidak berwarna.

Sedangkan eosin merupakan zat warna asam yaitu garam-garam dari asam-asam pembawa warna dengan radikal basa yang tidak berwarna. Zat warna ini banyak digunakan untuk sebagai *background stain*, yaitu zat warna yang berfungsi untuk memberikan warna yang kontras dengan zat warna yang terdahulu.

Hematoksilin Eosin (HE) yang merupakan pewarnaan rangkap dua yang merupakan referensi standar untuk pewarnaan rutin jaringan. Spesimen yang digunakan dapat berupa jaringan yang dibekukan secara cepat (*snap frozen tissue*) ataupun juga jaringan segar. Hasil pewarnaan pada sel inti (nukleus) dan struktur basofilik adalah biru sedangkan sitoplasma dan struktur asidofilik akan berwarna merah terang sampai dengan gelap (Anonim, 2002).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

Kanker masih menjadi salah satu penyebab kematian terbanyak di dunia. WHO melaporkan terjadi peningkatan jumlah penderita kanker setiap tahunnya hingga mencapai 6,25 juta orang. Dan duapertiga dari penderita kanker tersebut berasal dari negara berkembang, termasuk Indonesia (Anonim, 2003).

Penemuan dan pemakaian kemoterapi menunjukkan hasil yang bagus tetapi toksisitas dan efek sampingnya sangat besar (Siswandono, 1983), sehingga hal ini mendorong banyak orang melakukan pengobatan dengan menggunakan bahan alam (Sahu dkk., 1984).

Pada umumnya, kerja antikanker berdasarkan atas gangguan pada salah satu proses sel yang esensial. Karena terjadi perbedaan kualitatif antara sel kanker dengan sel normal maka semua antikanker bersifat mengganggu sel normal sehingga bersifat sitotoksik (Ganiswarna, 1995).

Penelitian yang dilakukan dalam upaya pencarian senyawa bioaktif dari tanaman adalah seperti yang telah dilakukan oleh Maulida Ermawati, 1997, hasil penelitian tersebut diketahui bahwa isolat flavonoid pinostrobin dari rimpang tanaman temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) secara invitro memiliki sifat sitotoksik terhadap kultur sel payudara manusia.

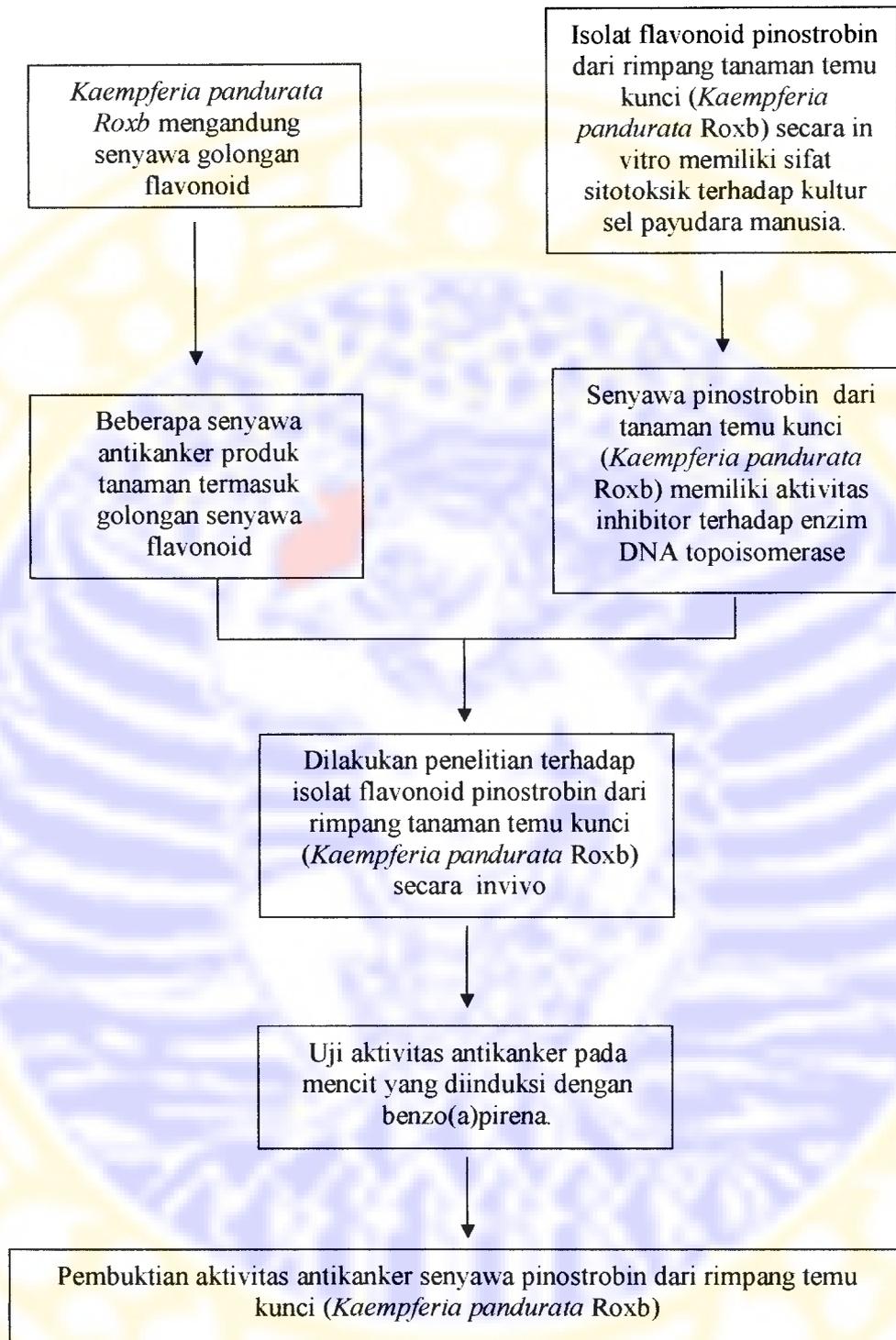
Penelitian selanjutnya terhadap tanaman temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) telah dilakukan oleh Sukardiman dkk., 2000, secara invitro untuk menentukan mekanisme antikanker. Dari penelitian tersebut disimpulkan bahwa senyawa pinostrobin memiliki aktivitas inhibitor terhadap enzim DNA topoisomerase.

Pada kenyataannya penelitian secara invitro tidak dapat memberikan informasi yang akurat (Woerdenbag, 1987), karena pada percobaan secara invitro, maka media (baik kultur maupun organ terisolasi) selalu berada pada lingkungan dan kondisi tertentu yang terkontrol. Sedangkan pada invivo, terjadi proses absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi pada tubuh subyek. Sehingga

kemungkinan timbulnya senyawa baru hasil metabolisme sangat besar. Hal ini menyebabkan hasil yang berbeda pada kedua metode tersebut.

Oleh karena itu maka perlu dilakukan penelitian tentang efek antikanker senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) secara *invivo* menggunakan hewan coba.

Dari penelitian ini diharapkan diperoleh suatu senyawa bioaktif dari tanaman obat Indonesia yang memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi bahan obat antikanker yang potensial dan selektif, yaitu senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb).



Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

4.1.1 Bahan Uji

Bahan uji merupakan isolat senyawa pinostrobin dari tanaman *Kaempferia pandurata* Roxb yang diperoleh dari Bagian Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

4.1.2 Bahan Kimia dan Bahan Lain

Pada penelitian ini bahan-bahan yang digunakan adalah :

- Oleum Olivarum
- Aquadest
- Salin
- CMC-Na 0,5%
- Benzo(a)pirena

4.2 Alat Penelitian

Pada penelitian ini alat-alat yang digunakan adalah :

- Timbangan analitik
- Gelas ukur
- Mortir dan stamper
- Labu ukur
- Beker glass
- Spuit injeksi 1,0 ml (Terumo Syringe Disposable / Steril Non Pyrogenic)
- Vial 10 ml
- Pengaduk
- Pipet
- Autoklaf
- Laminar Air Flow Cabinet

4.3 Prosedur Penelitian

4.3.1 Penyiapan Hewan Coba

Pada penelitian digunakan mencit jantan. Mencit dalam keadaan sehat berdasarkan pengamatan visual. Semua mencit dipelihara dengan cara yang sama dan mendapat diet yang sama.

- Ukuran kandang kawat mencit 50 cm x 25 cm x 20 cm dalam ruangan berukuran 5 m x 3,5 m
- Mencit dibuat kanker dengan cara menyuntikkan benzo(a)pirena secara subkutan di daerah interscapular, tiap 2 hari sekali sebanyak 10 kali
- Larutan benzo(a)pirena dibuat dengan cara melarutkan sejumlah benzo(a)pirena dalam oleum olivarum sehingga menghasilkan larutan benzo(a)pirena dengan konsentrasi 0,3% (b/v) (Miller, 1962).

Volume penyuntikan untuk mencit yang dibuat kanker adalah 0,1 ml tiap suntikan (Anonim, 1979).

4.3.2 Perhitungan Jumlah Benzo(a)pirena

Dalam penelitian ini digunakan 12 ekor mencit yang dikelompokkan yang kemudian disuntik dengan benzo(a)pirena :

- Volume penyuntikan 0,1 ml tiap sekali suntik
- Kadar akhir larutan benzo(a)pirena yang dikehendaki 0,3 % (b/v)
- Jumlah mencit yang dibuat kanker 12 ekor
- Penyuntikan dilakukan setiap 2 hari sekali sebanyak 10 kali

Jadi volume benzo(a)pirena yang dibuat seluruhnya adalah $0,1 \text{ ml} \times 10 \times 12 = 12 \text{ ml}$ (perhitungan ditingkatkan 2 dari 12 menjadi 14 ekor mencit). Jumlah benzo(a)pirena yang dibutuhkan untuk membuat 14 ml larutan benzo(a)pirena sehingga menghasilkan kadar akhir larutan 0,3 % (b/v) adalah $:14/100 \times 0,3 \text{ gram} = 0,042 \text{ gram} = 42 \text{ mg}$

4.3.3 Cara Pembuatan Larutan Benzo(a)pirena 0,3% (b/v)

Untuk penyuntikan 14 ekor mencit yang akan dibuat kanker

1. Olium Olivarum disterilkan dalam autoklaf bersuhu 115°C , selama 30 menit
2. Ditimbang 42 mg benzo(a)pirena, dilarutkan dalam oleum olivarum

3. Larutan benzo(a)pirena disterilkan dengan menggunakan alat autoklaf
4. Larutan benzo(a)pirena yang telah disterilkan, dipindahkan ke Laminar Air Flow Cabinet
5. Disimpan dalam lemari pendingin
6. Setiap akan dipakai larutan harus disterilkan kembali

4.4 Penyiapan Bahan Uji

4.4.1 Pembuatan Bahan Uji

Isolat senyawa pinostrobin disuspensikan dengan CMC-Na 0,5 % (b/v) dalam aquadest.

4.4.2 Penyediaan Sediaan Bahan Uji Dalam Berbagai Kosentrasi

Sediaan bahan uji berupa suspensi, dibuat secara aseptik. Sebagai pembawa digunakan CMC-Na 0,5 % (b/v) dalam aquadest. Sediaan bahan uji dibuat dengan cara mensuspensikan isolat pinostrobin dalam CMC-Na 0,5 % dalam aquadest. Kosentrasi yang diberikan terdiri dari 2 kosentrasi yaitu 0,2 mg/g BB dan 0,4 mg/g BB (Woerdenbag, 1987). Sebagai kontrol digunakan CMC-Na 0,5% dalam aquadest tanpa isolat pinostrobin. Sediaan yang disuntikkan baik uji maupun kontrol adalah 0,2 ml. Pembuatan sediaan bahan uji dan kontrol dilakukan pada saat akan digunakan.

4.4.3 Pembuatan larutan CMC-Na 0,5 % (b/v)

Ditimbang 0,5 gram CMC-Na, kemudian ditaburkan di atas aquadest panas \pm 5 ml, dibiarkan 15 menit sampai CMC-Na mengembang kemudian gerus sampai homogen dan ditambahkan aquadest dingin sedikit demi sedikit sambil diaduk sampai 100,00 ml

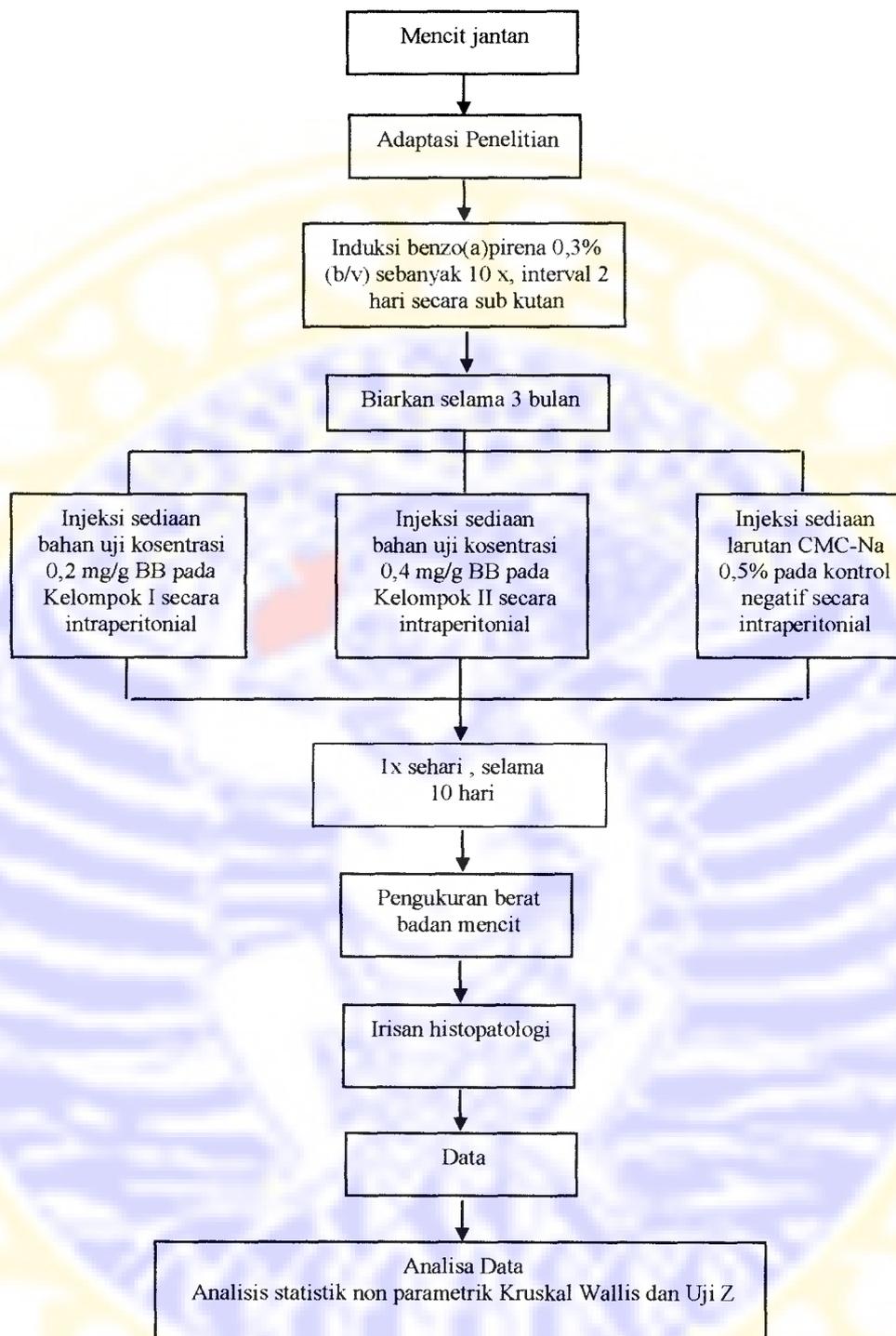
4.5 Rancangan Penelitian

Sebelum perlakuan, dilakukan pengelompokan mencit yang menderita kanker dengan metode randomisasi menjadi 3 kelompok. Tujuan randomisasi adalah untuk mengurangi perbedaan berat badan mencit pada saat perlakuan. Terhadap masing-masing kelompok perlakuan dilakukan penyuntikan secara

intraperitoneal. Penyuntikan dilakukan setiap hari selama 10 hari mulai hari ke-1 (penyuntikan pertama) sampai hari ke-10.

Kelompok-kelompok mencit tersebut adalah :

- Kelompok kontrol negatif : 3 ekor mencit masing-masing disuntik 0,2 ml CMC-Na 0,5%
- Kelompok I : 3 ekor mencit masing-masing disuntik sediaan bahan uji konsentrasi 0,2 mg/g BB
- Kelompok II : 3 ekor mencit masing-masing disuntik sediaan bahan uji konsentrasi 0,4 mg/g BB



Gambar 4.1 Skema Penelitian

4.6 Cara Pengumpulan data

Data dikumpulkan dengan cara mengukur berat badan mencit setiap hari, dimulai saat akan dilakukan penyuntikan 1 (hari ke-1) hingga hari ke-10 dan memeriksa pertumbuhan sel kanker kelompok kontrol dan perlakuan secara histopatologi (prosedur terlampir).

4.7 Pemeriksaan Histopatologis

Pemeriksaan histopatologis untuk melihat pertumbuhan sel kanker dilakukan berdasarkan perubahan morfologi sel pada jaringan. Adapun ciri-ciri sel atau jaringan kanker adalah sebagai berikut :

1. susunan sel yang tidak teratur
2. selularitas yang padat
3. terdapat banyak sel dan ukuran sel yang berbeda (polimorf)
4. inti sel membesar
5. kromatin menebal, kasar, tidak rata, terjadi hiperkromasi, dan basofilik.
6. Anak inti tampak tajam dan sering menonjol dengan ukuran yang bervariasi serta terjadi banyak mitosis.
7. Bentuk sitoplasma bermacam-macam (anisositosis) dan bila dilakukan pewarnaan terhadap sitoplasma terjadi peningkatan pengikatan warna.
8. Dapat pula ditemukan basofil, susunan sel yang tidak teratur dan kadang-kadang tidak dapat dikenali
9. bentuk selnya bermacam-macam (pleumorfik)

Pemeriksaan pertumbuhan sel kanker secara histopatologis dengan menentukan kriteria pemeriksaan dari masing-masing preparat adalah sebagai berikut (Herlinawati, 1998):

1. Nilai 0 pada 0% sel kanker dalam satu lapang pandang
2. Nilai 1 pada 25% sel kanker dalam satu lapang pandang
3. Nilai 2 pada 50% sel kanker dalam satu lapang pandang
4. Nilai 3 pada 75% sel kanker dalam satu lapang pandang
5. Nilai 4 pada 100% sel kanker dalam satu lapang pandang

4.8 Analisa Data

4.8.1 Uji Statistik

Hasil pengukuran volume pertumbuhan volume kanker secara histopatologi dianalisis dengan analisis varian ranking satu arah Kruskal-Wallis.

Hipotesis statistik yang diajukan adalah :

H_0 : tidak ada perbedaan hambatan pertumbuhan sel fibrosarkoma antar minimal 1 pasang kelompok perlakuan

H_a : ada perbedaan hambatan pertumbuhan sel fibrosarkoma antar minimal 1 pasang kelompok perlakuan

Untuk menilai hipotesis statistik, terlebih dahulu ditentukan harga H_{hitung} yang akan dibandingkan dengan harga H_{tabel} dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Untuk hambatan pertumbuhan sel fibrosarkoma, bila harga $H_{hitung} > H_{tabel}$ maka H_0 ditolak dan H_a diterima. Hal ini berarti ada perbedaan hambatan pertumbuhan sel fibrosarkoma antar minimal 1 pasang kelompok perlakuan. Untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang berbeda, dilakukan uji Perbandingan Berganda (uji Z 5%).

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Pembuatan Larutan Benzo(a)pirena 0,3% (b/v)

Sebanyak 42 mg benzo(a)pirena ditimbang, kemudian dilarutkan dalam oleum olivarum, kemudian disterilkan dengan menggunakan alat autoklaf. Larutan benzo(a)pirena yang telah disterilkan, dipindahkan ke *Laminar Air Flow Cabinet*. Larutan disimpan dalam lemari pendingin dan setiap akan dipakai larutan harus disterilkan kembali.

5.2 Pembuatan Larutan uji Dalam Berbagai Kosentrasi

Isolat senyawa pinostrobin ditimbang sebanyak 0,00970 gram untuk dosis I dan 0.01924 gram untuk dosis II yang masing – masing disuspensikan dengan 25 ml CMC-Na 0,5 % (b/v) dalam aquadest. Sebagai kontrol negatif digunakan CMC-Na 0,5% dalam aquadest tanpa isolat pinostrobin.

5.3 Pembuatan larutan CMC-Na 0,5 % (b/v)

Sebanyak 0,30020 gram CMC-Na ditimbang, kemudian ditaburkan di atas aquadest panas ± 5 ml, biarkan 15 menit sampai CMC-Na mengembang kemudian gerus sampai homogen dan tambahkan aquadest dingin sedikit demi sedikit sambil diaduk sampai 60,0 ml

5.4 Hasil aktivitas antikanker dari Senyawa Pinostrobin terhadap fibrosarkoma mencit hasil induksi benzo(a)pirena

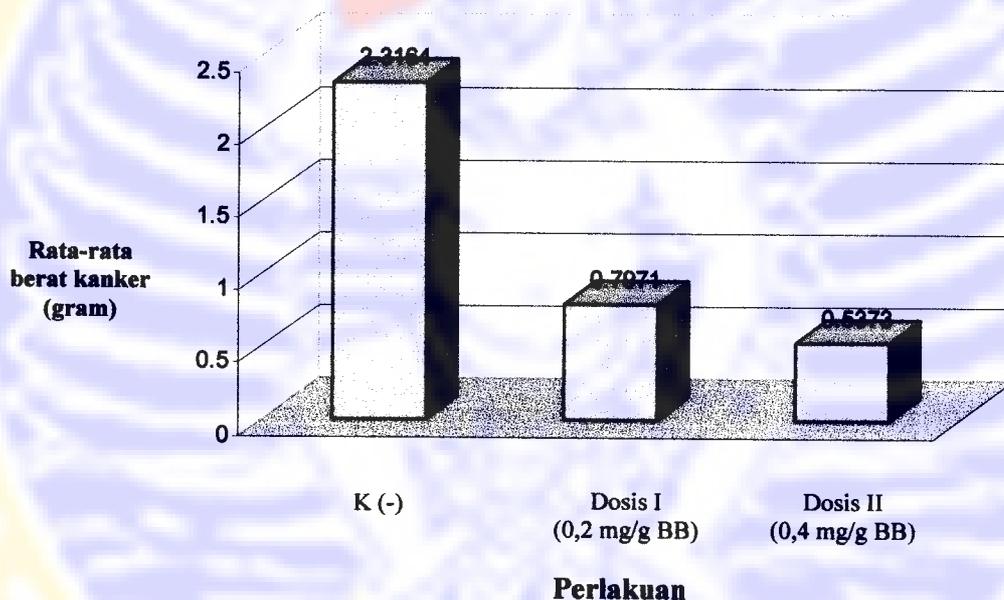
5.4.1 Aktivitas hambatan pertumbuhan kanker berdasarkan parameter berat kanker

Pada akhir penelitian, mencit dikorbankan kemudian dilakukan pembedahan untuk memisahkan jaringan kanker dengan jaringan lain. Jaringan kanker yang telah terpisah ditimbang. Hasil penimbangan jaringan kanker tersebut dihitung prosentase hambatan pertumbuhan kankernya (Yang, 2003). Hasil perhitungan seperti tercantum pada tabel V.1

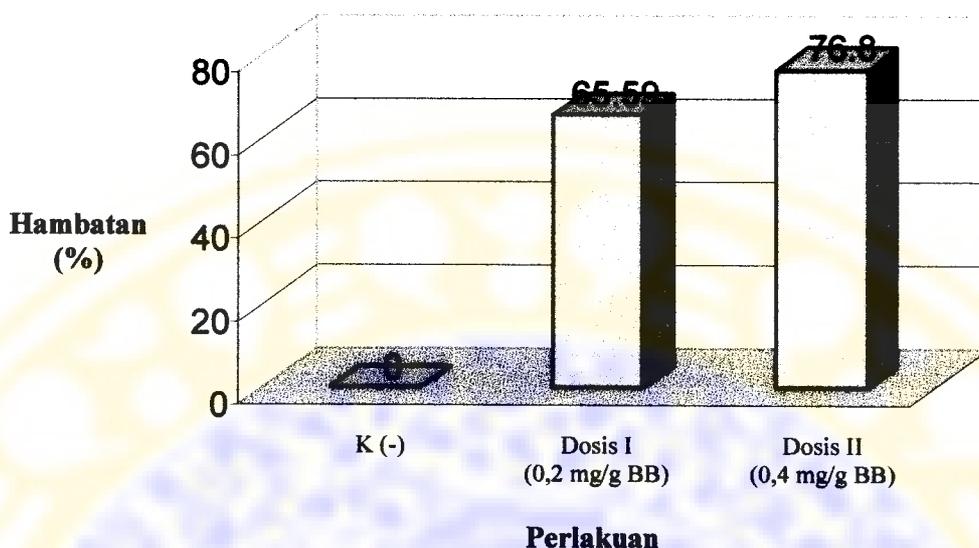
$$\% \text{ hambatan} = \left[1 - \left(\frac{\text{rata-rata berat tumor}}{\text{rata-rata kanker kontrol negatif}} \right) \right] \times 100\%$$

TabeV.1 Berat rata-rata fibrosarkoma dan prosentase hambatan pertumbuhan kanker setelah pemberian senyawa pinostrobin dari tanaman *Kaempferia pandurata* Roxb yang diberikan pada mencit jantan yang menderita kanker hasil induksi benzo(a)pirena secara intraperitoneal

Perlakuan	Berat kanker rata – rata (gram)	% hambatan
Kontrol negatif	2,3164 ± 1,6126	0
Dosis I (0,2 mg/g BB)	0,7971 ± 0,4912	65,59
Dosis II (0,4 mg/g BB)	0,5373 ± 0,4893	76,80



Gambar 5.1 Histogram berat fibrosarkoma setelah pemberian senyawa pinostrobin dari tanaman *Kaempferia pandurata* Roxb yang diberikan pada mencit jantan yang menderita kanker hasil induksi benzo(a)pirena secara intraperitoneal



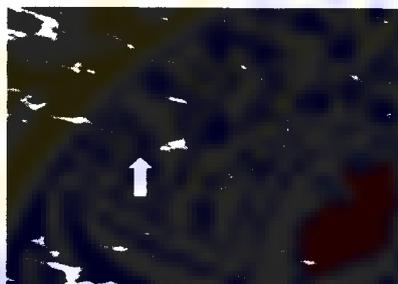
Gambar 5.2 Histogram prosentase hambatan pertumbuhan kanker setelah pemberian senyawa pinostrobin dari tanaman *Kaempferia pandurata* Roxb yang diberikan pada mencit jantan yang menderita kanker hasil induksi benzo(a)pirena secara intraperitoneal

5.4.2 Aktivitas antikanker berdasarkan pengamatan perubahan histopatologis fibrosarkoma

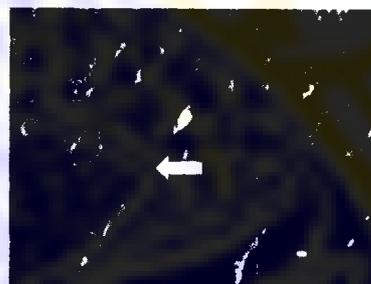
Jaringan fibrosarkoma yang didapat diproses untuk pembuatan sediaan mikroskopis kemudian diwarnai dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE). Sel kanker dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) memiliki ciri-ciri seperti susunan sel yang tidak teratur, selularitas yang padat, terdapat banyak sel dan ukuran sel yang berbeda (polimorf), inti sel membesar, kromatin menebal, kasar, tidak rata, terjadi hiperkromasi, dan basofilik., anak inti tampak tajam dan sering menonjol dengan ukuran yang bervariasi serta terjadi banyak mitosis, bentuk sitoplasma bermacam-macam (anisositosis) dan bila dilakukan pewarnaan terhadap sitoplasma terjadi pengikatan warna, dapat pula ditemukan basofil, susunan sel yang tidak teratur dan kadang-kadang tidak dapat dikenali, bentuk selnya bermacam-macam (pleumorfik), yang dapat dilihat pada gambar 5.3.



a. Kontrol negatif



b. Dosis I



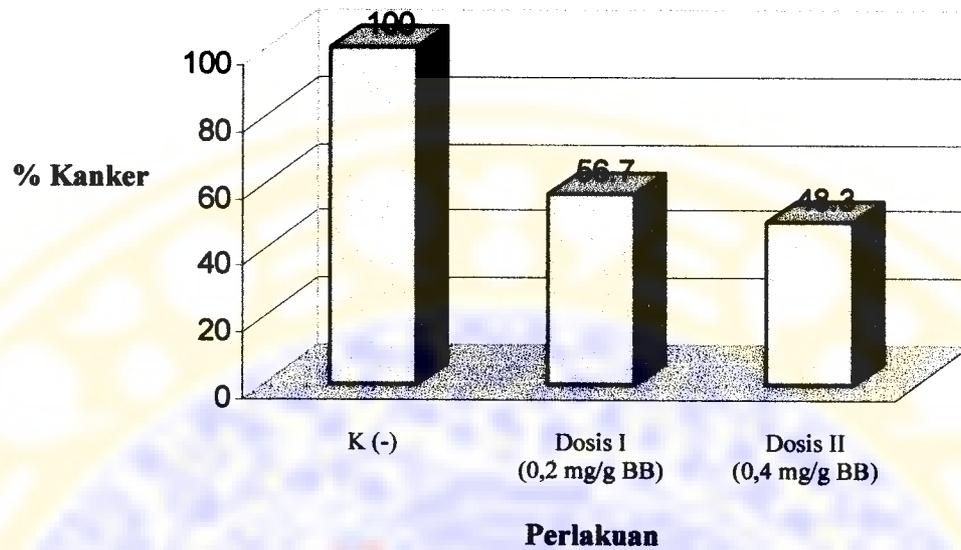
c. Dosis II

Gambar 5.3 Irisan histopatologi jaringan fibrosarkoma mencit hasil induksi benzo(a)pirena dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE). a. Panah kuning menunjukkan inti sel yang membesar karena kanker (100% kanker) b. Panah kuning menunjukkan inti sel yang mengalami perbaikan dan mulai berukuran normal (75% kanker) c. Panah kuning menunjukkan inti sel hampir seragam dengan inti sel disekitarnya (50% kanker).

Pengamatan tersebut dilakukan melalui lima lapang pandang yang berbeda, kemudian hasil penilaian dicatat. Selanjutnya diberikan skor terhadap derajat perubahan gambaran histopatologis fibrosarkoma mencit jantan tersebut untuk setiap lapangan pandang atau ulangan pada setiap kelompok perlakuan terhadap setiap perubahan gambaran histopatologis fibrosarkoma tersebut, seperti tercantum pada Tabel V.2

Tabel V.2 Hasil uji aktivitas antikanker terhadap mencit jantan setelah pemberian senyawa pinostrobin dari tanaman *Kaempferia pandurata* Roxb yang diberikan pada mencit jantan yang menderita kanker hasil induksi benzo(a)pirena secara intraperitoneal

Dosis pinostrobin	Replikasi	Pengamatan % kanker		Skor	Rata-rata
		Ulangan ke	Hasil (%)		
Kontrol negatif	1	1	100	4	4
		2	100	4	
		3	100	4	
		4	100	4	
		5	100	4	
	2	1	100	4	4
		2	100	4	
		3	100	4	
		4	100	4	
		5	100	4	
	3	1	100	4	4
		2	100	4	
		3	100	4	
		4	100	4	
		5	100	4	
Dosis I (0,2 mg/g BB)	1	1	75	3	2,4
		2	75	3	
		3	50	2	
		4	75	3	
		5	25	1	
	2	1	50	2	2
		2	50	2	
		3	50	2	
		4	50	2	
		5	50	2	
	3	1	50	2	2,4
		2	50	2	
		3	75	3	
		4	50	2	
		5	75	3	
Dosis II (0,4 mg/g BB)	1	1	75	3	2,4
		2	50	2	
		3	50	2	
		4	75	3	
		5	50	2	
	2	1	25	1	1,8
		2	50	2	
		3	50	2	
		4	50	2	
		5	50	2	
	3	1	50	2	1,6
		2	50	2	
		3	25	1	
		4	50	2	
		5	25	1	



Gambar 5.4 Histogram aktivitas antikanker setelah pemberian senyawa pinostrobin dari tanaman *Kaempferia pandurata* Roxb yang diberikan pada mencit jantan yang menderita kanker hasil induksi benzo(a)pirena secara intraperitoneal

5.4.3 Analisis Statistika

5.4.3.1 Uji Kruskal-Wallis

Untuk pengolahan hasil histopatologis uji aktivitas antikanker akan digunakan ranking. Perubahan peringkat (rank) ditentukan dan diperoleh dari menjumlahkan nilai skor histopatologis terkecil, dibagi banyaknya jumlah sampel yang menunjukkan derajat kerusakan histopatologis tersebut, sehingga diperoleh hasil sebagai berikut :

Nilai rata-rata skor histopatologis fibroblast 1,6 mempunyai rank :

$$\frac{1}{1} = 1$$

Nilai rata-rata skor histopatologis fibroblast 1,8 mempunyai rank :

$$\frac{2}{1} = 2$$

Nilai rata-rata skor histopatologis fibroblast 2 mempunyai rank :

$$\frac{3}{1} = 3$$

Nilai rata-rata skor histopatologis fibroblast 2,4 mempunyai rank :

$$\frac{4 + 5 + 6}{3} = 5$$

Nilai rata-rata skor histopatologis fibroblast 4 mempunyai rank :

$$\frac{7 + 8 + 9}{3} = 8$$

Tabel V.3 Rank dan nilai rata-rata skor histopatologi fibrosarkoma hasil penelitian pada lima lapang pandang

Ulangan	Perlakuan					
	Kontrol negatif		Dosis I		Dosis II	
	NS	R1	NS	R2	NS	R3
1	4	8	2	3	1,6	1
2	4	8	2,4	5	1,8	2
3	4	8	2,4	5	2,4	5
ΣR	24		13		8	
\bar{x}	8		4,3		2,67	
$(\Sigma R)^2$	576		169		64	
SD	0		1,15		2,08	

Keterangan : R1 = Rank kontrol negatif
 R2 = Rank Dosis I
 R3 = Rank Dosis II
 NS = Rata-rata nilai skor histopatologi
 ΣR = Jumlah Rank
 \bar{X} = Rata-rata rank

Statistik uji yang digunakan adalah uji Kruskal Wallis dan dilakukan pencarian nilai H_{hitung} :

Rumus :

$$H_{hitung} = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1)$$

Keterangan : N = Jumlah seluruh sampel fibrosarkoma
 N_j = Jumlah ulangan pada sample ke j dari setiap perlakuan
 R_j = Jumlah rank pada sampel ke j dari setiap perlakuan
 K = jumlah perlakuan

$$\begin{aligned}
 H_{\text{hitung}} &= \frac{12}{9(9+1)} \times \frac{24^2 + 13^2 + 8^2}{3} - 3(9+1) \\
 &= 35,9556 - 30 \\
 &= 5,9556
 \end{aligned}$$

Karena dalam data terdapat angka kembar, maka H_{hitung} diatas dimasukkan dalam H_{hitung} terkoreksi. Rumus :

$$H_{\text{hitung terkoreksi}} = \frac{H_{\text{hitung}}}{1 - \frac{\sum T}{N^3 - N}}$$

Keterangan : $T = t^3 - t$

= Total seluruh nilai pengamatan dari seluruh kelompok skor yang berangka sama

t = Banyaknya nilai pengamatan yang sama dalam kelompok skor yang berangka sama

N = Jumlah seluruh sampel fibrosarkoma

$$\begin{aligned}
 \text{Nilai T diperoleh dari : } \quad T_{2,4} &= 3^3 - 3 = 24 \\
 \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad T_4 &= 3^3 - 3 = 24 \\
 \text{Jumlah T } (\sum T) &= 48
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 H_{\text{hitung terkoreksi}} &= \frac{5,9556}{1 - \frac{48}{9^3 - 9}} \\
 &= 6,38095
 \end{aligned}$$

Rumus : derajat bebas (db) = $k - 1$

Keterangan : k = banyaknya perlakuan

$$\begin{aligned}
 \text{Derajat bebas (db)} &= 3 - 1 \\
 &= 2
 \end{aligned}$$

Dengan menggunakan tabel chi-kuadrat pada $\alpha = 0,05$ dengan $db = 2$, maka dapat ditentukan nilai $H_{\text{tabel}(0,05)} = 5,991$. Karena $H_{\text{tabel}(0,05)} < H_{\text{hitung}}$ yaitu $5,991 < 6,38095$ maka dapat disimpulkan H_0 ditolak dan H_a diterima. Hal ini berarti ada perbedaan hambatan pertumbuhan sel fibrosarkoma diantara kelompok perlakuan.

5.4.3.2 Uji Perbandingan Berganda (Uji Z)

Hasil perhitungan uji Kruskal-Wallis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata diantara kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji Perbandingan Berganda (uji Z 5%). Dari hasil analisis data dengan uji Perbandingan Berganda (uji Z 5%), akan dapat diketahui urutan tingkat perubahan gambaran histopatologi fibrosarkoma diantara kelompok-kelompok perlakuan (Daniel, 1989)

Rumus :

$$Z = \frac{|R_{i1} - R_{i2}|}{\sqrt{k [N(N^2 - 1) - (\sum t^3 - \sum t)]}} \\ 6 N (N - 1)$$

$$Z = \frac{|R_{i1} - R_{i2}|}{\sqrt{3 [9(9^2 - 1) - (48)]}} \\ 6 \cdot 9 (9 - 1)$$

$$Z = \frac{|R_{i1} - R_{i2}|}{\sqrt{4,66667}}$$

$$Z = \frac{|R_{i1} - R_{i2}|}{2,16025}$$

Tabel V.4 Perhitungan Z_{hitung} dengan selisih rata-rata rank

Kelompok perlakuan	$R_{i1} - R_{i2}$	Z_{hitung}	p
Kontrol (-) – Dosis I	3,66667	1,69733	0,0455*
Kontrol (-) – Dosis II	5,33333	2,46885	0,0069*
Dosis I – Dosis II	1,66667	0,7715	0,2206

* : signifikan berdasarkan Tabel Z (Siegel, 1990)

Data diatas telah diskor lalu diolah dengan penilaian peringkat (rank). Kemudian dianalisis dengan uji statistik non parametrik dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis sehingga diperoleh hasil sebagai berikut $H_{tabel(0,05)} < H_{hitung}$ yaitu $5,991 < 6,38095$. Hasil analisis statistik menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata diantara kelompok perlakuan. Karena terdapat perbedaan yang sangat nyata diantara kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (uji Z 5%) untuk mengetahui tingkat perubahan gambaran histopatologi fibroblast diantara kelompok perlakuan. Pada uji Z diperoleh hasil bahwa dosis I dan dosis II mempunyai perbedaan yang signifikan terhadap kontrol negatif dimana hasil pada dosis I adalah 0,0455, sedangkan pada dosis II adalah 0,0069 yang lebih kecil dari α (0,05) .

BAB VI

PEMBAHASAN

Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Maulida Ermawati, 1997, menunjukkan bahwa isolat flavonoid pinostrobin dari rimpang tanaman temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) secara invitro memiliki sifat sitotoksik terhadap kultur sel payudara manusia. Penelitian selanjutnya telah dilakukan oleh Sukardiman dkk., 2000, secara invitro untuk menentukan mekanisme antikanker. Dari penelitian tersebut disimpulkan bahwa senyawa pinostrobin memiliki aktivitas inhibitor terhadap enzim DNA *topoisomerase*. Pada tahun 2003, Sukardiman melakukan penelitian lanjutan secara invitro. Yang hasilnya menunjukkan bahwa senyawa pinostrobin dari rimpang tanaman temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) memiliki aktivitas antikanker terhadap kultur kanker mieloma mencit secara bermakna.

Pada kenyataannya penelitian secara invitro tidak dapat memberikan informasi yang akurat (Woerdenbag, 1987), maka dilakukan uji aktivitas antikanker senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) secara invivo menggunakan mencit yang menderita kanker oleh induksi dengan benzo(a)pirena. Oleh karena itu maka perlu dilakukan penelitian tentang efek antikanker senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) secara invivo menggunakan hewan coba. Untuk itu diperlukan hewan percobaan yaitu mencit jantan yang diinduksi dengan benzo(a)pirena. Dan selanjutnya diinjeksikan isolat senyawa pinostrobin secara intraperitoneal pada jumlah atau dosis tertentu.

Untuk memperoleh hewan percobaan yang menderita kanker, mencit diinduksi dengan larutan benzo(a)pirena dalam oleum olivarum. Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan, konsentrasi larutan yang dibutuhkan adalah 0,3% b/v (Braun, 1969). Benzo(a)pirena adalah karsinogen kimia yang menyebabkan peristiwa perubahan dari sel normal menjadi sel kanker. Benzo(a)pirena sebagai karsinogen hidrokarbon aromatik poli inti, diduga akan dimetabolisir menjadi senyawa antar bentuk epoksidanya, yaitu 4,5-oksida benzo(a)pirena. Bentuk epoksida tersebut, dapat dideteksi dan diidentifikasi sebagai metabolit dalam

preparat mikrosoma hati tikus yang diinkubasi bersama-sama dengan benzo(a)pirena dengan NADPH₂. Disini terjadi epoksida pada ikatan rangkap yang disebut sebagai daerah K, yang merupakan daerah dengan kerapatan elektron paling tinggi dan merupakan ikatan rangkap yang paling reaktif, sehingga mudah dioksidasi menjadi epoksida. Senyawa 4,5-oksida benzo(a)pirena tersebut, diduga akan berubah menjadi aril karbonium yang reaktif, yang dapat membentuk ikatan kovalen dengan basa dari DNA. Pendapat lain menduga, bahwa benzo(a)pirena dimetabolisir menjadi bentuk epoksidanya, tetapi di luar daerah K, yaitu bentuk 7,8-dihidroksi, 9,10-epoksi, 7,8,9,10-tetra hidro benzo(a)pirena. Sama halnya dengan epoksida di atas, metabolit ini dapat membentuk ikatan kovalen dengan basa dari DNA (Braun, 1969).

Pengamatan efek antikanker ditentukan dengan dibuat kurva rata-rata berat jaringan kanker, serta irisan anatomi-histologi dari sel/jaringan kanker tersebut. Berdasarkan hasil pengamatan berat jaringan kanker, didapat berat rata-rata jaringan kanker pada dosis I yaitu $0,7971 \pm 0,4912$ gram; dan pada dosis II adalah $0,5373 \pm 0,4893$ gram. Bila dibandingkan dengan berat rata-rata jaringan kanker pada kontrol negatif ($2,3164 \pm 1,6126$ gram), maka dapat disimpulkan adanya perbedaan antara kelompok kontrol negatif, dosis I, dan dosis II. Dengan peningkatan dosis, yaitu dosis I adalah 0,2 mg/g BB dan dosis II adalah 0,4 mg/g BB, didapatkan penurunan berat kanker yang signifikan sehingga menunjukkan adanya peningkatan aktivitas antikanker atau penurunan jumlah sel kanker.

Penentuan efek antikanker berdasarkan irisan anatomi-histopatologi dari sel/jaringan kanker maka pada akhir penelitian, mencit dikorbankan dengan cara dibedah untuk memisahkan jaringan kanker dengan jaringan lain, kemudian jaringan fibrosarkoma yang didapat, diwarnai dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE). Hematoksin Eosin (HE) merupakan pewarnaan rangkap dua yang merupakan referensi standar untuk pewarnaan rutin jaringan dan untuk memudahkan melihat perubahan pada jaringan. Pembuatan preparat histopatologi dilakukan dengan cara fiksasi dan pencucian dengan reagen formalin 10 % sekurang-kurangnya 24 jam yang bertujuan untuk mencegah degenerasi post mortem, mematikan kuman atau bakteri, dan menjadikan jaringan lebih keras, sehingga mengawetkan bentuk yang sebenarnya dan mudah dipotong. Kemudian

dilakukan pula dehidrasi dan *clearing* yang bertujuan untuk menarik air dari jaringan dan menjernihkan jaringan dengan menggunakan reagen alkohol 70%, 80%, 90%, alkohol absolut I, II, III, xilol I, II. Selanjutnya adalah infiltrasi reagen parafin I dan II, dimana bertujuan agar jaringan lebih tahan terhadap pemotongan. Pembuatan blok paraffin juga dilakukan supaya jaringan mudah dipotong. Pewarnaan dilanjutkan dengan pengirisan dengan mikrotom untuk didapatkan jaringan setipis mungkin sehingga mudah dilihat dengan mikroskop. Sedangkan untuk pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) dilakukan dengan metode Harris yaitu dengan cara jaringan yang telah dikeringkan dimasukkan dalam xilol I selama tiga menit, dengan tempat khusus dan selama satu menit pada xilol II, lalu pada alkohol I, II, alkohol 90%, 80%, 70% dan air kran selama satu menit. Selanjutnya jaringan dimasukkan dalam zat warna Harris selama 5-10 menit, air kran selama 2-5 menit, alkohol asam 3-10 celupan, air kran 4-7 celupan, amoniak 6 celupan, aquadest secukupnya, zat warna eosin selama seperempat menit, lalu dimasukkan lagi kedalam aquadest secukupnya dan yang terakhir alkohol 70%, 80%, masing-masing selama setengah menit dan terakhir dimasukkan ke dalam xilol I dan II masing-masing selama 1-2 menit, dan selanjutnya dibersihkan dengan sisa-sisa pewarnaan dan ditutup dengan cover glass (mounting) yang sebelumnya setelah ditetesi dengan Canada Balsem (Suntoro, 1983). Hasil pewarnaan pada sel inti (nukleus) dan struktur basofilik adalah biru sedangkan sitoplasma dan struktur asidofilik akan berwarna merah terang sampai dengan gelap (Anonim, 2002).

Pemeriksaan preparat histopatologi dilakukan melalui pengamatan mikroskopik preparat histopatologis fibrosarkoma mencit jantan menggunakan mikroskop cahaya, dengan pembesaran 100x kemudian dilanjutkan dengan 400x. Pengamatan tersebut dilakukan melalui lima lapang pandang yang berbeda. Selanjutnya diberikan skor terhadap data perubahan gambaran histopatologi fibrosarkoma mencit jantan tersebut untuk setiap ulangan pada setiap kelompok perlakuan terhadap setiap perubahan gambaran histopatologi fibrosarkoma tersebut. Untuk pengamatan efek antikanker berdasarkan irisan anatomi-histopatologi dari sel/jaringan kanker juga telah dilakukan yaitu pada dosis I (0,2 mg/g BB) prosentase kanker tinggal 56,67 %, sedangkan pada dosis II (0,4 mg/g BB) adalah 48,33%. Hal tersebut menunjukkan adanya penurunan

prosentase sel kanker setelah dibandingkan kontrol negatif yaitu 100% kanker. Data ini menunjukkan bahwa secara histopatologi dari sel/jaringan kanker, aktivitas antikanker senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) terjadi peningkatan perbaikan sel kanker menjadi sel normal kembali atau terjadi penurunan jumlah sel kanker. Skor yang diberikan untuk masing-masing tingkat perubahan gambaran histopatologi fibrosarkoma mencit jantan menunjukkan bahwa dosis I (0,2 mg/g BB) memiliki skor rata-rata 2,27; pada dosis II (0,4 mg/g BB) adalah 1,93 dan pada kontrol negatif adalah 4. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan terjadi penurunan signifikan pada prosentase sel kanker yang ditunjukkan dengan penurunan skor pada dosis I dan dosis II.

Untuk membandingkannya dengan kontrol negatifnya, digunakan analisis statistika Uji Kruskal-Wallis dan uji perbandingan berganda (uji Z). Hasil perhitungan uji Kruskal-Wallis menunjukkan bahwa $H_{\text{tabel}(0,05)} < H_{\text{hitung}}$ yaitu $5,991 < 6,38095$, maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan yang sangat nyata diantara kelompok perlakuan. Jadi, senyawa pinostrobin dari tanaman *Kaempferia pandurata* Roxb memiliki aktivitas antikanker pada mencit jantan yang menderita kanker hasil induksi benzo(a)pirena secara intraperitoneal. Perbedaan yang sangat nyata diantara kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda (uji Z 5%). Pada uji Z diperoleh hasil bahwa dosis I dan dosis II mempunyai perbedaan yang signifikan terhadap kontrol negatif dimana hasil pada dosis I adalah 0,0455, sedangkan pada dosis II adalah 0,0069 yang lebih kecil dari α (0,05). Hal ini menunjukkan bahwa *Kaempferia pandurata* Roxb memiliki aktivitas antikanker pada dosis I (0,2 mg/g BB) dan dosis II 0,4 mg/g BB mencit jantan.

Karena sifatnya yang sangat berbahaya, penggunaan benzo(a)pirena sebagai pemicu kanker pada uji *invivo* perlu diperhatikan. Pemberian benzo(a)pirena pada tubuh mencit secara intraperitoneal, penyuntikan harus dilakukan pada titik yang sama pada tiap penyuntikannya, pemberian dosis yang sesuai untuk induksi kanker dan diberikan secara berulang pada jangka waktu tertentu, sehingga didapatkan hasil penelitian sesuai yang diinginkan.

Penelitian lain mengenai aktivitas kanker secara *invivo* yaitu penelitian pada propolis yang mengandung *caffeic acid*, kuersetin, krisin, dan naringenin oleh Orsolich dkk, 2005, diketahui bahwa efektif untuk menghambat pertumbuhan dari tumor ascites Ehrlich (EAT). Dengan pemberian secara oral atau interperitoneal pada mencit, propolis terbukti dapat meningkatkan kemampuan makrofag sebagai tumorsidal. Efek dari propolis mengindikasikan adanya kerja yang sinergis antara komponen – komponen dalam propolis, dimana memiliki mekanisme yang berbeda dari flavonoid tunggal.

Pada penelitian Halder dkk, 1989, benzo(a)pirena digunakan sebagai karsinogen. Pada penelitian tersebut teh hitam yang mengandung teaflavin (TF) dan tearubigin (TR) diketahui memiliki aktivitas sebagai antimutagenik dan antiklastogenik. Secara *invivo*, benzo(a)pirena diberikan pada sumsum tulang belakang mencit kemudian diukur ketidaknormalan kromosom dan perubahan kromatid. Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa teh hitam dapat meningkatkan kemampuan anti mutagenik dan antiklastogenik dari kromosom dan kromatid.

Penggunaan karsinogen lain selain benzo(a)pirena dilakukan oleh Verma dkk, 1989, pada penelitiannya tentang efek antikanker dari suplemen kuersetin terhadap kanker pada tikus Sprague-Dawley'. Pada penelitian ini digunakan dimetilbenz(a)antrasen (DMBA)- secara intragastrik dan N-nitrosometilurea yang diberikan secara injeksi intravena. Hasil penelitian menunjukkan suplemen kuersetin dapat menghambat terjadinya kanker pada mencit yang diberi kedua karsinogen tersebut. Selanjutnya adalah penelitian yang dilakukan oleh Yang, dkk, 2005, diketahui bahwa epigallocatekin-3-galat (EGCG) yang merupakan kandungan dari teh hijau dan teaflavin yang merupakan kandungan dari teh hitam, memiliki aktivitas antikanker *invivo* secara kemopreventif terhadap tumor paru – paru yang diinduksi oleh 4-(metilnitrosamino)-1-(3piridil)-1-butanon (NNK), N-nitrosodietilamin, benzo(a)pirena, N-nitrosometilurea atau cisplatin pada mencit. Diketahui bahwa terjadi penurunan dan ukuran tumor maupun insiden terjadinya.

Untuk kesinambungan penelitian tentang aktivitas antikanker senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb), maka dapat dilakukan penelitian lanjutan untuk uji toksisitas senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) pada hewan coba yang

merupakan prasyarat formal keamanan untuk pemakaian pada manusia. Selain itu perlu juga dilakukan penelitian tentang usaha peningkatan kelarutan pinostrobin dalam pelarut air untuk mencapai aktivitas antikanker secara maksimum. Dasar pemikiran perlunya dilakukan penelitian tersebut adalah adanya fenomena terjadinya kristalisasi kembali senyawa pinostrobin beberapa selang waktu setelah pembuatan suspensi senyawa pinostrobin dengan CMC-Na.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian di atas dapat disimpulkan bahwa senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) dengan dosis I (0,2 mg/g BB) dan dosis II adalah 0,4 mg/g BB mempunyai aktivitas antikanker pada fibrosarkoma mencit yang diinduksi oleh benzo(a)pirena.

7.2 Saran

Untuk kesinambungan penelitian tentang aktivitas antikanker senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb), maka dapat dilakukan penelitian lanjutan pada hewan coba dengan tingkat yang lebih tinggi, uji toksisitas senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) pada hewan coba yang merupakan prasyarat formal keamanan untuk pemakaian pada manusia. Selain itu perlu juga dilakukan penelitian tentang usaha peningkatan kelarutan pinostrobin dalam pelarut air untuk mencapai aktivitas antikanker secara maksimum.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim, , 1979. **Farmakope Indonesia**. Edisi ke-3, Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Anonim^a. 1998, **Kamus Saku Kedokteran Dorland**. Edisi ke-25, Jakarta: EGC, hal. 429.

Anonim^b, 1998, <http://www.bonetumor.org/tumors/pages/page56.html>, 28 Januari 2005

Anonim, 2002. <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/pathol/histol/h&e.htm>, 28 Januari 2005

Anonim, 2003. http://www.swara.net/id/view_headline.php?ID=2160, 10 Desember 2004

Anonim^a, 2004. <http://www.tevaeuoncology.com/products/index.cfm?FuseAction=ShowFaq&pid=8>, 11 Desember 2004

Anonim^b, 2004. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/uspdi/202234.html>, 28 Januari 2005

Achmad, S.A, 1990. Flavonoid dan Phyto Medika, Kegunaan dan Prospek. **Journal Phyto Medika**, I(3), p. 120-127.

Braun A.C., 1969. **The Cancer Problem**. New York: Columbia University Press, p. 24-30.

Butenko, Z. A., 2000. Different Etoposida-Induced Apoptotic Response Of Human Malignant Lymphoid Cell Lines. **Experimental Oncology 22**, Ukraine: p. 26-31.

Daniel, Wayne W., **Statistika Nonparametrik Terapan**. Jakarta: PT Gramedia, hal. 275

Dean F.M and Mongkolsuk S., 1964. **Pinostrobin and Alpinetin from *Kaempferia pandurata***, Faculty of Medical Science, University of Medical Science, Sri Ayuthya Road, Bangkok

Dipalma, J.R, Drill's, 1977. **Pharmacology in Medicine**. 4th ed, New York: Mc. Graw Hill Book Company, p. 15-16.

Ermawati, M., 1997. **Percobaan Pendahuluan Kultur Sel Kanker Payudara Manusia Untuk Uji Sitotoksitas Isolat Herba *Vernonia Cinerea* Less. dan Rimpang *Kaempferia pandurata* Roxb**, Skripsi Sarjana Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

Farnsworth N.R., 1996. Biological and Phytochemical Screening of Plant. **Journals of Pharmaceutical Science**, Vol. 55 No.3, p. 262 – 264.

Ganiswarna, Sulistia G., 1995. **Farmakologi dan Terapi**. Edisi ke-4, Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal. 686-689.

Halder B, Pramanick S, Mukhopadhyay S, Giri AK, 1989
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=15721207, 12 Mei 2005

Herlinawati, 1998. **Pengaruh Pemberian Isometamidium dan Kombinasinya Dengan Potasium Tartrat Terhadap Histopatologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinfeksi *Trypanosoma evansi* Isolat Banyuwangi**, Skripsi Sarjana Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.

Heyne, K., 1987. **Tumbuhan Berguna Indonesia**. Jilid III, Jakarta: Yayasan Satya Warna Jaya

Woerdenbag, H.J., 1987. Investigation of The Antitumor Action of Euopatoripicrin Aaints The Lewis Lung Tumour. **A Fundamental Study On The Sytostatic Action of Sesquiterpene Lactone from *Eupatorium cannabinum* L.** Planta Med, 53. p. 49.

James, R.C, Christopher, M.T., 1989. *In*: Philip L. William & James L. Burton, Van Nostrad Reinhold. **Carcinogenesis In Industrial Toxicology, Safety and Health Application in the Workplace**, New York.

Law, L-Y, 1992. Isolation of Potential Cancer Chemopreventive Agents from Eriodictyon Californicum. **Journal of Natural Product**, 55(3), p. 357-363.

Lu,F.C, 1995. **Toksikologi dasar: Asas, Organ sasaran, dan Penilaian Resiko**, Edisi ke-2, Jakarta: UI-Press.

Markam, K.R., 1988. **Cara Mengidentifikasi Flavonoid**, terjemahan Kosasih Padmawinata, Bandung: Penerbit ITB, hal 1-63.

Martoprawiro, S.S, 2000. **Neoplasma dan Deteksi Dini Kanker**, Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, hal. 1-14.

Miller, J.A., Muller, E.C., 1962. Biochemical Concept of Carcinogenesis, **Proceeding of The Fourth Canadian Research Conference**, Vol .4, Academic Press New York, p. 296.

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayer, P.A., Rodwell, V.W., 1995. **Biokimia Harper**, Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, hal. 795.

Orsolio N, Kosalec I, Basic I., 2005.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Display&DB=pubmed>, 12 Mei 2005

Pharmacia,2002. **Etoposide-DataSheet**,

<http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/DSForm.asp>, 16 Januari 2005

Pitot,H. and Yvone P. Dragan.1991. Chemical Carcinogenesis. In Toxicology. **The Basic Sciences of Poison**, Edit by Cassaret and Doull's, Fith Edition, New York: Mc Graw Hill.

Rapta-P, Misik-V, Stasko-A, Vrabel-I, 1995. Redox Intermediates of Flavonoids and Caffeic Acid Esters from Propolis. **an EPR spectroscopy and Cyclic Voltammetry study**, Free – Radic – Biol - Med, 18(5), p. 901-908.

Siegel. S, 1990. **Statistik Non Parametrik Untuk Ilmu Sosial**, PT. Gramedia Jakarta, hal. 230-241, 299.

Sahu, M., RKS, Palmar and G.C, Prasad, 1984. Indigenous Drug The Management of Cancer. in: Zaman Joenoes, et, al., **Proceeding. Ictam II**, Airlangga University, Surabaya, p. 112-113.

Siswandono. 1983. Mekanisme Kerja Obat-obat Antikanker. **Buletin ISFI Jatim**, Tahun ke XV no 1-2, hal. 3.

Siswandono dan Bambang Soekardjo, 2000. **Kimia Medisinal**. Surabaya: Airlangga University Press, hal. 178.

Sudiro I., Padmawinata K., 1988. **Flavonoid**. Bandung: Penerbit ITB, hal. 7-36.

Sukardiman dkk., 2000. Clinical Hemorheology and Microcirculation. **IOS press**, Vol 23 2000, p. 185-190.

Sukardiman, 2003. Uji Aktivitas Antikanker Senyawa Pinostrobin dari Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*) Terhadap Kultur Sel Kanker Mieloma. **Media Kedokteran Hewan**, Vol 19, No. 2.

Suntoro, S.Handari, 1983. **Metode Pewarnaan**, Jakarta: Penerbit Bhratara Karya Aksara, hal. 48-52,69-71,78-88.

Verma AK, Johnson JA, Gould MN, Tanner MA, 1989.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=15721207, 12 Mei 2005

Yang CS, Liao J, Yang GY, Lu G, 2005. **Inhibition of lung tumorigenesis by tea**, Susan Lehman Cullman Laboratory for Cancer Research, Ernest Mario School of Pharmacy, Rutgers, the State University of New Jersey, NJ 08854, USA, 31(1):135-44.

Zainuddin, M. , 1981. **Pengaruh Asam Bongkrek Terhadap Beberapa Sifat Jaringan Normal & Jaringan Kanker**, Disertasi, ITB, Bandung, hal 10,12-14, 45-51.

LAMPIRAN 1

Cara Pembuatan Irisan Histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi dengan cara sebagai berikut :

1. Fiksasi dan pencucian dengan reagen formalin 10 %

Tujuan :

- untuk mencegah degenerasi post mortem.
- Mematikan kuman atau bakteri.
- Meningkatkan afinitas jaringan terhadap bermacam-macam zat warna.
- Menjadikan jaringan lebih keras, sehingga mengawetkan bentuk yang sebenarnya dan mudah dipotong.
- Meningkatkan indeks refraksi berbagai komponen jaringan

Reagen : formalin 10%

Cara Kerja :

- segera setelah hewan percobaan mati dilakukan seksi.
- masing-masing kanker diambil dan dimasukkan dalam formalin 10% sekurang-kurangnya 24 jam.
- dilakukan pencucian dengan menggunakan air kran.

2. Dehidrasi dan *clearing*

Tujuan :

- menarik air dari jaringan
- membersihkan dan menjernihkan jaringan

Reagen : alkohol 70%, 80%, 90%, alkohol absolut I, II, III, xilol I, II

Cara kerja : kanker yang telah dicuci dengan air kran selama 30 menit dimasukkan ke dalam reagen selama 30 menit

3. Infiltrasi, reagen parafin I dan II

Tujuan :

Untuk menginfiltrasi jaringan dengan parafin. Parafin akan menembus ruang antar sel dan dalam sel sehingga jaringan lebih tahan terhadap pematangan.

Reagen : parafin I dan II

Cara kerja :

Jaringan dimasukkan dalam parafin I yang mencair, kemudian dimasukkan ke dalam oven selama 30 menit, lalu dimasukkan dalam parafin II dan dimasukkan ke dalam oven selama 30 menit pada suhu 60°C

4. Pembuatan blok parafin, reagen parafin cair.

Tujuan : supaya jaringan mudah dipotong.

Reagen : parafin cair

Disediakan beberapa cetakan besi yang telah diolesi gliserin dengan tujuan untuk mencegah lekatnya parafin dan cetakan, kemudian kanker yang dipotong-potong tadi dimasukkan ke dalam dengan pinset dan ditunggu sampai parafin membeku.

5. Pengirisan dengan mikrotom

Tujuan : agar jaringan setipis mungkin sehingga mudah dilihat dengan mikroskop.

Alat : mikrotom

Cara kerja :

Pemotongan dilakukan secara random yaitu tiap 15 kali pemotongan dilakukan seri, diambil satu dengan ketebalan empat sampai tujuh mikron. Kemudian dicelupkan air dengan suhu 20°C, sampai jaringan mengembang dengan baik kemudian diletakkan pada obyek glass sebelum diolesi dengan albumin telur, lalu dikeringkan dengan *hot plate*.

6. Pewarnaan, menggunakan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE)

Tujuan : untuk memudahkan melihat perubahan pada jaringan, di sini digunakan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE).

Cara kerja :

- Pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) dilakukan dengan metode Harris yaitu dengan cara jaringan yang telah dikeringkan dimasukkan dalam xylol I selama tiga menit, dengan tempat khusus dan selama satu menit pada xylol II, lalu pada alkohol I, II, alkohol 90%, 80%, 70% dan air kran selama satu menit.
- Selanjutnya jaringan dimasukkan dalam zat warna Harris selama 5-10 menit, air kran selama 2-5 menit, alkohol asam 3-10 celupan, air

kran 4-7 celupan, amoniak 6 celupan, aquadest secukupnya, zat warna eosin selama seperempat menit, lalu dimasukkan lagi kedalam aquadest secukupnya.

- Kemudian alkohol 70%, 80%, masing-masing selama setengah menit dan terakhir dimasukkan ke dalam xilol I dan II masing-masing selama 1-2 menit, dan selanjutnya dibersihkan dengan sisa-sisa pewarnaan.

7. Penutupan dengan cover glass (mounting)

Penutupan dengan cover glass sebelumnya setelah ditetesi dengan Canada Balsem (Suntoro, 1983).

Pemeriksaan Preparat Histopatologi

Pengamatan secara mikroskopik preparat histopatologis fibrosarkoma mencit jantan pada penelitian ini menggunakan mikroskop cahaya, dengan pembesaran 100x kemudian dilanjutkan dengan 400x. Pengamatan tersebut dilakukan melalui lima lapang pandang yang berbeda, kemudian hasil penilaian dicatat. Selanjutnya diberikan skor terhadap data perubahan gambaran histopatologi fibrosarkoma mencit jantan tersebut untuk setiap ulangan pada setiap kelompok perlakuan terhadap setiap perubahan gambaran histopatologi fibrosarkoma tersebut. Skor yang diberikan untuk masing-masing tingkat perubahan gambaran histopatologi fibrosarkoma mencit jantan adalah sebagai berikut :

Tingkat perubahan gambaran histopatologi fibrosarkoma	Skor
0% sel kanker	0
25% sel kanker	1
50% sel kanker	2
75% sel kanker	3
100% sel kanker	4

Setelah itu dilakukan penjumlahan skor dalam data perubahan gambaran histopatologi fibrosarkoma mencit jantan untuk setiap ulangan pada setiap kelompok perlakuan.



LAMPIRAN 2**Tabel Kemungkinan yang berkaitan Dengan Harga-harga Z Observasi Dalam Distribusi Normal**

z	.00	.01	.02	.03	.04	.05			.08	
.0	.5000	.4960	.4920	.4880	.4840	.4801	.4761	.4721	.4681	.4641
.1	.4602	.4562	.4522	.4483	.4443	.4404	.4364	.4325	.4286	.4247
.2	.4207	.4168	.4129	.4090	.4052	.4013	.3974	.3936	.3897	.3859
.3	.3821	.3783	.3745	.3707	.3669	.3632	.3594	.3557	.3520	.3483
.4	.3446	.3409	.3372	.3336	.3300	.3264	.3228	.3192	.3156	.3121
.5	.3085	.3050	.3015	.2981	.2946	.2912	.2877	.2843	.2810	.2776
.6	.2743	.2709	.2676	.2643	.2611	.2578	.2546	.2514	.2483	.2451
.7	.2420	.2389	.2358	.2327	.2296	.2266	.2236		.2177	.2148
.8	.2119	.2090	.2061	.2033	.2005	.1977	.1949	.1922	.1894	.1867
.9	.1841	.1814	.1788	.1762	.1736	.1711	.1685	.1660	.1635	.1611
1.0	.1587	.1562	.1539	.1515	.1492	.1469	.1446	.1423	.1401	.1379
1.1	.1357	.1335	.1314	.1292	.1271	.1251	.1230	.1210	.1190	.1170
1.2	.1151	.1131	.1112	.1093	.1075	.1056	.1038	.1020	.1003	.0985
1.3	.0968	.0951	.0934	.0918	.0901	.0885	.0869	.0853	.0838	.0823
1.4	.0808	.0793	.0778	.0764	.0749	.0735	.0721	.0708	.0694	.0681
1.5	.0668	.0655	.0643	.0630	.0618	.0606	.0594	.0582	.0571	.0559
1.6	.0548	.0537	.0526	.0516	.0505	.0495	.0485	.0475	.0465	
1.7	.0446	.0436	.0427	.0418	.0409	.0401	.0392	.0384	.0375	.0367
1.8	.0359	.0351	.0344	.0336	.0349	.0322	.0341	.0307	.0301	.0294
1.9	.0287	.0281	.0274	.0268	.0262	.0256	.0250	.0244	.0239	.0233
2.0	.0228	.0222	.0217	.0212	.0207	.0202	.0197	.0192	.0188	.0183
2.1	.0179	.0174	.0170	.0166	.0162	.0158	.0154	.0150	.0146	.0143
2.2	.0139	.0136	.0132	.0129	.0125	.0122	.0119	.0116	.0113	.0110
2.3	.0107	.0104	.0102	.0099	.0096	.0094	.0091	.0089	.0087	.0084
2.4	.0082	.0080	.0078	.0075	.0073	.0071		.0068	.0066	.0064
2.5	.0062	.0060	.0059	.0057	.0055	.0054	.0032	.0051	.0049	.0048
2.6	.0047	.0045	.0044	.0043	.0041	.0040	.0039	.0038	.0037	.0036
2.7	.0035	.0034	.0033	.0032	.0031	.0030	.0029	.0028	.0027	.0026
2.8	.0026	.0025	.0024	.0023	.0023	.0022	.0021	.0021	.0020	.0019
2.9	.0019	.0018	.0018	.0017	.0016	.0016	.0015	.0015	.0014	.0014
3.0	.0013	.0013	.0013	.0012	.0012	.0011	.0011	.0011	.0010	.0010
3.1	.0010	.0009	.0009	.0009	.0008	.0008	.0008	.0008	.0007	.0007
3.2	.0007									
3.3	.0005									
3.4	.0003									
3.5	.00023									
3.6	.00016									
3.7	.00011									
3.8	.00007									
3.9	.00005									
4.0	.00003									