



**LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING
TAHUN ANGGARAN 2007**

JUDUL KEGIATAN

**INDUKSI APOPTOSIS DAN PENINGKATAN EKSPRESI p53, Bax
SERTA AKTIVASI ENZIM CASPASE SEL KANKER PAYUDARA
MANUSIA OLEH PINOSTROBIN DARI *KAEMPFERIA
PANDURATA* ROXB**

Oleh :

Dr.Sukardiman,Apt,MS
Prof.Dr.Noor Cholies Zaini,Apt
Prof.Dra.Sismindari,Apt,SU,PhD

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian dan
Pengabdian kepada Masyarakat Nomor : 316/SP3/PP/DP2M/II/2006
Tanggal 1 Februari 2006

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN 2008**

10-132

1000



klc-2
KKB
LP. 36/10
SUK
i

**LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING
TAHUN ANGGARAN 2007**

JUDUL KEGIATAN

**INDUKSI APOPTOSIS DAN PENINGKATAN EKSPRESI p53, Bax
SERTA AKTIVASI ENZIM CASPASE SEL KANKER PAYUDARA
MANUSIA OLEH PINOSTROBIN DARI *KAEMPFERIA
PANDURATA* ROXB**

Oleh :

Dr.Sukardiman,Apt,MS
Prof.Dr.Noor Cholies Zaini,Apt
Prof.Dra.Sismindari,Apt,SU,PhD



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian dan
Pengabdian kepada Masyarakat Nomor : 316/SP3/PP/DP2M/II/2006
Tanggal 1 Februari 2006

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN 2008**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul :	
Induksi Apoptosis dan Peningkatan Ekspresi p53, Bax serta Aktivasi Enzim Caspase Sel Kanker Payudara Manusia oleh Pinostrobin dari <i>Kaempferia pandurata</i> Roxb	
Ketua Peneliti	
Nama	: Dr.Sukardiman, Apt , MS
Jenis Kelamin	: Laki-laki
Pangkat/Golongan / NIP	: Pembina Tk I / IVb / 131 801 629
Jabatan Sekarang	: Lektor Kepala
Fakultas / Jurusan	: Farmasi Universitas Airlangga Surabaya : Jurusan Ilmu Bahan Alam
Perguruan Tinggi	: Universitas Airlangga Surabaya

Tim Peneliti

No	Nama dan gelar akademik	Bidang Keahlian	Fakultas	Perguruan Tinggi
1	Prof.Dr.Noor Cholies Z,Apt	Fitokimia	Fakultas Farmasi	UNAIR
2.	Dra.Sismindari,Apt,SU ,PhD	Biologi Molekuler	Fakultas Farmasi	UGM

Pendanaan dan jangka waktu penelitian : 2 tahun
 Jangka waktu yang diusulkan : 3 tahun
 Biaya yang diusulkan : Rp.50.000.000 ,- / tahun
 Biaya yang disetujui pertahun : Rp.35.000.000,-

Surabaya, 11 Desember 2007
Ketua Peneliti

Mengetahui
Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Airlangga

Prof.Dr.H.Achmad Svahrani,Apt,MS
NIP. 130809077


Dr.Sukardiman,Apt,MS
NIP. 131 801 629

Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat
Universitas Airlangga


Prof.Dr.H. Sarmanu,MS.
NIP : 130 701 125



RINGKASAN

INDUKSI APOPTOSIS DAN PENINGKATAN EKSPRESI p53, Bax SERTA AKTIVASI ENZIM CASPASE SEL KANKER PAYUDARA MANUSIA OLEH PINOSTROBIN DARI *KAEMPFERIA PANDURATA* ROXB.

(Sukardiman, Noor Cholies Zaini, Sismindari, 2007, 67 halaman)

Penyakit kanker masih merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit kardiovaskular, serta masih adanya obat-obat kemoterapi untuk antikanker yang menyebabkan efek samping dimana selain membunuh sel kanker maupun sel normal. Sehingga dewasa ini banyak dikembangkan pencarian dan penelitian bahan bioaktif dari tanaman obat Indonesia yang mempunyai khasiat sitotoksik atau antikanker yang potensial dan selektif.

Tujuan penelitian ini adalah menentukan aktivitas induksi apoptosis dari pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kempferia pandurata* Roxb) terhadap sel kanker payudara manusia TD-47 secara *in vitro*, serta menentukan level protein p53, bax, bcl-2 dan caspase-3.

Metode penelitian dilakukan dengan tahapan tahun pertama melakukan isolasi senyawa senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) dengan metode maserasi dengan heksana dan dilanjutkan pemurnian dengan kolom kromatografi. Identifikasi isolat dengan menggunakan analisis KLT dan spektroskopi UV, FTIR, ¹H NMR, ¹³C NMR dan MS. Tahapan berikutnya dilakukan uji induksi apoptosis terhadap sel kanker mieloma. Sel kanker payudara manusia TD-47 dibiakkan pada medium RPMI yang ditambahkan 10% Fetal Bovin Serum. Konsentrasi pinostrobin dibuat 10 ; 50 ; 100 µg/ml yang dilarutkan dahulu dengan *Dimethyl Sulfoxida* (DMSO), digunakan kontrol negatif DMSO dan kontrol positif etoposida. Selanjutnya ditambahkan kedalam biakan sel mieloma dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator 5% CO₂ selama 24, 48 dan 72 jam. Penentuan aktivitas induksi apoptosis dilakukan dengan pewarnaan *acridine orange* – etidium bromida dan analisis fragmentasi DNA dengan ekstraksi phenol. Tahapan kedua adalah menentukan pengaruh pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kempferia pandurata* Roxb) terhadap sel kanker payudara manusia TD-47, khususnya terhadap

peningkatan aktivasi p53, Bax , caspase-3 dan penurunan Bcl-2 . Metode yang digunakan untuk penentuan level protein p53 , Bax, Bcl-2 dan caspase 7 adalah imunohistokimia.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kempferia pandurata* Roxb) dengan konsentrasi 10, 50 dan 100 µg/ml yang dinkubasi selama 24, 48 dan 72 jam memiliki aktivitas induksi apoptosis terhadap sel kanker payudara manusia TD-47 secara *in vitro*. Mekanisme apoptosis pinostrobin melalui peningkatan aktivasi p53, Bax , caspase-7 dan penurunan Bcl-2 .

(LP. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga,)

SUMMARY

APOPTOSIS INDUCTION ACTIVITY AND INCREASED OF p53 , Bax AND ACTIVATION OF CASPASE FROM CANCER CELL OF HUMAN BREAST BY PINOSTROBIN FROM *KAEMPFERIA PANDURATA* ROXB (Sukardiman, Noor Cholies Zaini, Sismindari , 2007, pages 67)

The cancer diseases are the second causing of human death after the cardiovascular diseases, and the many of anticancer chemotherapy causing side effect, which their killing cancer and normal cells. Now, many development and research to discovery of the bioactive compounds from Indonesian medicinal plants which have potential and selective anticancer activity.

The objective of this research was evaluated apoptosis induction of pinostrobin from temu kunci (*Kempferia pandurata* Roxb) against human breast TD-47 cells in vitro, and evaluated protein level of p53, bax , bcl-2 and caspase-3.

These research has been carried out by the first step is isolation of pinostrobin from rim pang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) with n-hexane by extraction with step method and to identification compound by Thin Layer Chromatography (TLC), spectroscopy UV, FTIR, ¹H NMR , ¹³C NMR and MS . The human breast cancer TD-47 cells were incubated in RPMI media, Fetal Bovine Serum 10%. The concentration of pinostrobin compound were made many concentrations 10 , 50 , 100 µg/ml, with initially dissolved in DMSO, negative control were used DMSO and positive control were used etoposide. Their solution to addition into human breast cancer TD-47 cells culture and then to incubated for 24 , 48 and 72 hours, at 37°C in CO₂ incubator. Determination of apoptosis induction activity are calculated by ethidium bromide and acridine orange exclusion and analysis by fluorescent microscope. Research plan on second years will be evaluated effect of pinostrobin from temu kunci (*Kempferia pandurata* Roxb) against human breast cancer TD-47 cells , especially increase activation of p53, Bax , caspase-3 , and decrease of Bcl-2 . The method were used to evaluate protein level of protein p53 , Bax, Bcl-2 and caspase 3 by immunohistochemistry .

The result of these research showed that pinostrobin from temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) with concentration 10, 50 and 100 µg/ml and incubation at 24, 48 and 72 hours have apoptosis induction activity against human breast cancer TD-47 cells culture in vitro. Mechanism of apoptosis by activation of p53, Bax , caspase-3 , and decrease of Bcl-2.

(LP. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga)

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian tahun I ini dengan judul :

INDUKSI APOPTOSIS DAN PENINGKATAN EKSPRESI p53, Bax SERTA AKTIVASI ENZIM CASPASE SEL KANKER PAYUDARA MANUSIA OLEH PINOSTROBIN DARI *KAEMPFERIA PANDURATA* ROXB.

Pada kesempatan ini Tim Peneliti menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga.
2. Kepala Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan, Ditjen Dikti, Depdiknas.
3. Kepala Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat , Universitas Airlangga.
4. Kepala Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM
5. Dekan Fakultas Farmasi Unair.
6. Ketua Departemen Farmakognosi – Fitokimia , Fakultas Farmasi Unair.
7. Semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan laporan ini kurang sempurna, oleh sebab itu tim peneliti mengharapkan kritik dan saran agar karya ilmiah ini menjadi lebih sempurna.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pembaca, khususnya peminat bidang aktivitas antikanker dari natural product atau bahan alam hayati Indonesia.

Surabaya, Januari 2008
Tim Peneliti



LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN ii

RINGKASAN iii

SUMMARY v

KATA PENGANTAR vi

DAFTAR ISI vii

DAFTAR GAMBAR viii

BAB I PENDAHULUAN 1

BAB II TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN 6

BAB III TINJAUAN PUSTAKA 7

BAB IV METODE PENELITIAN 26

BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN 29

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN 67

DAFTAR PUSTAKA 68

DAFTAR ISI

BAB I

PENDAHULUAN

Di samping penyakit jantung , kanker adalah penyebab kematian utama di Amerika Serikat yang menyebabkan lebih dari 500.000 kematian pertahun. Sedangkan insiden kanker di Indonesia diperkirakan 100 per 100.000 pertahun atau sekitar 200.000 penduduk pertahun. Pada survey kesehatan rumah tangga yang diselenggarakan Badan Litbangkes , Departemen Kesehatan ditemukan bahwa 1,4 % dari seluruh kematian disebabkan oleh kanker. Angka ini meningkat menjadi 3,4% pada tahun 1980 dan menjadi 4,3% pada tahun 1986 (Katzung, 1995 ; Dalimartha, 2002).

Kanker adalah adalah suatu penyakit di mana terjadi pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal , cepat dan tidak terkendali. Sel-sel kanker akan terus membelah diri terlepas dari pengendalian pertumbuhan . Bila pertumbuhan ini tidak cepat dihentikan dan diobati maka sel kanker akan tumbuh menyusup ke jaringan lain sekitarnya (invasif) dan menyebar (metastatis) ke tempat yang lebih jauh melalui pembuluh darah atau pembuluh getah bening , selanjutnya akan tumbuh kanker baru ditempat lain dan akhirnya menyebabkan kematian penderita (Katzung, 1995 ; Dalimartha, 2002).

Dewasa ini WHO menyatakan bahwa sepertiga dari seluruh kejadian kanker dapat dicegah , seperti tiga dapat dibebaskan rasa nyerinya dan sepertiga lainnya dapat disembuhkan dengan cara pembedahan , radiasi atau dengan pemberian obat kemoterapi. Dan pada waktu sekarang kira-kira 50% penderita kanker dapat disembuhkan dengan kontribusi kemoterapi atau sebesar 17 % dari total kejadian kanker (Katzung, 1995).

Obat kemoterapi atau obat antikanker yang ideal seharusnya dapat selektif membunuh sel kanker saja tanpa mempengaruhi atau membahayakan jaringan normal, sehingga tidak menyebabkan efek samping terhadap pemakainya. Sampai sekarang belum dapat ditemukan obat antikanker yang memenuhi kriteria tersebut diatas, disamping itu dilaporkan adanya beberapa jenis kanker yang resisten terhadap

obat-obat kemoterapi. Sehingga dewasa ini telah dilakukan usaha – usaha penelitian terhadap pencarian bahan obat antikanker yang lebih selektif yaitu melalui penapisan ataupun isolasi bahan obat dari tanaman, desain rasional senyawa obat baru ataupun penggunaan terapi gen (Katzung, 1995).

Program nasional dalam usaha mencari penemuan obat baru dari sumber atau bahan alam sekarang ini adalah dengan menggunakan paradigma baru. Paradigma baru dalam riset penemuan obat tersebut adalah dengan menggabungkan dua kekuatan sumber daya raksasa yang ada yaitu sumber alam hayati Indonesia dengan hasil-hasil riset dunia mengenai genom manusia dan genom lainnya . Dan akhirnya akan diperoleh lead compound (senyawa penuntun) untuk dikembangkan menjadi obat baru (Sudoyo,1997).

Dalam teknologi *High Throughput Screening* (HTS) dimulai dari skrining terhadap ekstrak-ekstrak tanaman Indonesia sebagai *chemical library* dengan menggunakan berbagai metode penapisan. Dalam proses penemuan obat melalui HTS dilakukan penapisan tahap kedua dalam bentuk penapisan tingkat fraksi dari ekstrak, dan dilanjutkan dengan isolasi dan identifikasi dari senyawa bioaktif dan uji farmakologi (Sudoyo,1997).

Aplikasi program HTS untuk pencarian bahan-bahan bioaktif antikanker dari tanaman Indonesia dapat digunakan molekul target : enzim DNA Topoisomerase. Alasan enzim tersebut digunakan sebagai molekul target, antara lain : enzim DNA Topoisomerase adalah enzim yang mempunyai fungsi cukup penting dalam proses intraseluler dari sel kanker, antara lain berperan dalam proses replikasi, transkripsi , rekombinasi DNA dan proses proliferasi dari sel kanker (Hsiang,1995; Pommier 1993). Dengan dihambatnya aktivitas enzim DNA Topoisomerase oleh senyawa inhibitor, maka proses terjadinya ikatan antara enzim dengan DNA sel kanker semakin lama. Sehingga akan terbentuk *Protein Linked DNA Breaks* (PLDB) , akibatnya terjadi kerusakan DNA sel kanker dan selanjutnya berpengaruh terhadap proses dalam sel khususnya proses replikasi, serta diakhiri dengan kematian sel kanker (Hsiang,1989 ; Joseph, 1989). Sehingga mulai tahun 1980-an enzim DNA Topoisomerase digunakan sebagai molekul target untuk pencarian dan penemuan

obat antikanker yang rasional dan lebih selektif, cara ini sangat baik untuk mengevaluasi senyawa bioaktif antikanker yang positif dengan metode ini , menunjukkan aktivitas antikanker pada pengujian in-vivo (Cumming, 1991; Pommier, 1993 ; Yoshinari,1995).

Senyawa dari bahan tanaman yang bersifat antikanker dan memiliki molekul target enzim DNA Topoisomerase adalah camptothecin dari tanaman *Camptotheca acuminata* (Famili Nyssaceae), andriamycin, doxorubicin, mitoxantrone dan etoposida (VP-16), teniposide (Intisar,1994 ; Ate, 1994).

Upaya pencarian dan penemuan senyawa bioaktif dari tanaman obat Indonesia yang memiliki aktivitas antikanker terhadap kultur sel kanker payudara manusia yaitu senyawa flavonoid pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) telah dilakukan oleh Sukardiman, 1999. Dalam penelitian tersebut telah diketahui bahwa senyawa pinostrobin dapat menghambat enzim DNA Topoisomerase, dimana enzim DNA Topoisomerase mempunyai fungsi yang penting dalam proses intraseluler, yaitu berperan dalam proses replikasi, transkripsi , rekombinasi DNA dan proses proliferasi dari sel kanker. Dengan dihambatnya aktivitas enzim DNA Topoisomerase oleh senyawa inhibitor, maka proses terjadinya ikatan antara enzim dengan DNA sel kanker semakin lama. Sehingga akan terbentuk *Protein Linked DNA Breaks* (PLDB), akibatnya terjadi fragmentasi atau kerusakan DNA sel kanker dan selanjutnya berpengaruh terhadap proses didalam sel khususnya proses replikasi sel yang diakhiri dengan kematian sel kanker . Untuk mengembangkan *lead compound* yaitu pinostrobin dari temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) menjadi obat antikanker yang selektif maka dapat digunakan metode *Selective Apoptosis Antineoplastic Drug* (SAAND) .

Apoptosis merupakan program bunuh diri dari sebuah sel. Program ini memiliki peran yang penting untuk menjaga homeostatis perkembang – biakan sel dan dengan adanya disregulasinya bisa berakibat timbulnya macam-macam penyakit (Evan dan Littlewood, 1998). Salah satu peran pentingnya adalah untuk membatasi proliferasi sel yang tidak diperlukan yang sekiranya akan dapat menyebabkan kanker.

Pada sel-sel kanker program apoptosis ini telah mengalami gangguan sehingga sel akan mengalami metastasis (Peter *et al*, 1997).

Metode atau teknologi *Selective Apoptosis Antineoplastic Drug* (SAAND) , yaitu suatu teknologi untuk melakukan skrining aktivitas terhadap senyawa sintesis atau senyawa hasil isolasi bahan alam yang diharapkan memiliki aktivitas antikanker yang selektif dimana diharapkan hanya membunuh sel kanker saja. Salah satu persyaratan utama yang harus dipenuhi yaitu mekanisme antikanker dari senyawa yang diuji tersebut melalui jalur apoptosis, bukan jalur nekrosis. Salah satu indikator terjadinya apoptosis pada sel kanker adalah dengan terbentuknya fragmentasi DNA sel kanker (Cotran, 1999 ; Nagata , 1997) . Sehingga diduga senyawa pinostrobin dari temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) memiliki aktivitas antikanker terhadap kanker payudara manusia dengan mekanisme apoptosis. Maka penelitian ini akan menentukan potensi senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) terhadap induksi apoptosis dan ekspresi p53 , Bax , Bcl-2 dan aktivasi enzim caspase dari sel kanker payudara manusia secara *in vitro*.

Mekanisme kematian sel kanker secara apoptosis diregulasi oleh adanya fragmentasi DNA , tumor supressor gen p53 , gen antiapoptosis Bcl-2 dan aktivitas enzim proteolitik caspase 3 . Gen p53 akan merangsang mitokondria mengeluarkan sitokrom c ke sitosol dan juga mengaktivasi gen proapoptosis bax. Gen Bcl-2 adalah merupakan gen antiapoptosis yang bertanggung jawab dalam proses pelepasan sitokrom dari mitokondria, dengan penurunan ekspresi Bcl-2 maka sitokrom dapat dilepaskan dan akan membentuk kompleks dengan caspase 9 dan Apaf-1 untuk mengaktifkan enzim proteolitik yaitu caspase 3, serta akhirnya akan terjadi apoptosis (Nagata , 1997 ; Cotran , 1999).

Metode penelitian dilakukan dengan tahapan tahun pertama melakukan isolasi senyawa senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) dengan metode maserasi dengan heksana dan dilanjutkan pemurnian dengan kolom kromatografi. Identifikasi isolat dengan menggunakan analisis spektroskopi UV, FTIR, ¹H NMR , ¹³C NMR dan MS. Tahapan berikutnya dilakukan uji induksi

apoptosis terhadap sel kanker mieloma. Sel kanker payudara manusia TD-47 dibiakkan pada medium RPMI yang ditambahkan 10% Fetal Bovin Serum . Konsentrasi pinostrobin dibuat 10 ; 50 ; 100 $\mu\text{g/ml}$ yang dilarutkan dahulu dengan *Dimethyl Sulfoxida* (DMSO) , digunakan kontrol negatif DMSO dan kontrol positif etoposida. Selanjutnya ditambahkan kedalam biakan sel mieloma dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator 5% CO_2 selama 24, 48 dan 72 jam. Penentuan aktivitas induksi apoptosis dilakukan dengan pewarnaan *acridine orange* – etidium bromida dan analisis fragmentasi DNA dengan ekstraksi phenol. Tahapan tahun kedua adalah menentukan pengaruh pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kempferia pandurata* Roxb) terhadap sel kanker payudara manusia TD-47 , khususnya terhadap peningkatan aktivasi p53, Bax , caspase-3 dan penurunan Bcl-2 . Metode yang digunakan untuk penentuan level protein p53 , Bax, Bcl-2 dan caspase 3 adalah imunohistokimia.

BAB II TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. TUJUAN PENELITIAN

1. Melakukan isolasi dan identifikasi senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) dengan menggunakan spektroskopi IR, ¹H-NMR, ¹³C- NMR dan MS.
2. Menentukan induksi apoptosis senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) terhadap sel kanker payudara T47-D manusia dengan metode pewarnaan etidium bromida – akridina orange .
3. Menentukan pengaruh pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) ekspresi p53 , bax , bcl-2 dan caspase sel kanker payudara manusia T47-D dengan metode imunohistokimia.

2.2. MANFAAT PENELITIAN

Diperolehnya data ilmiah tentang mekanisme antikanker senyawa bioaktif tanaman obat Indonesia yang memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi bahan obat antikanker yang poten dan selektif. Sehingga dapat ditingkatkan pada uji preklinik dengan hewan coba dan akhirnya dapat dilanjutkan dengan uji klinik jika diketahui senyawa pinostrobin memiliki aktivitas antikanker secara *in vitro* dan *in vivo* serta tidak menunjukkan efek toksik pada hewan coba.

Gambar 1. Rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb)

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), temu konce (Madura), temu kunci (Nusa Tenggara, Bali, Maluku, Sulawesi) (Heyne, 1987)

3.1.2 Nama daerah

Gastrochilus pandurata (Roxb) Rild (Heyne, 1987)

Jenis	: <i>Kaempferia pandurata</i> Roxb
Marga	: <i>Kaempferia</i>
Suku	: Zingiberaceae
Bangsa	: Zingiberales
Klas	: Monocotyledonae
Sub divisi	: Angiospermae
Divisi	: Spermatophyta

3.1. Tinjauan tentang tanaman temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb).
3.1.1 Klasifikasi tanaman temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb)

TINJAUAN PUSTAKA

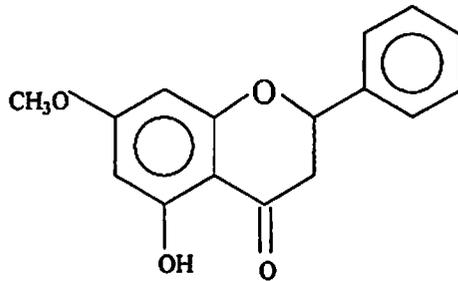
BAB III

3.1.3 Deskripsi tanaman temu kunci

Tumbuhan semak, kecil, tingginya ± 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 ± 5 cm, warnanya putih atau merah jambu dan berbentuk tabung. Lembaran mahkota bunga berwarna merah jambu, bentuknya lonjong, panjangnya ± 2 cm dan ujungnya runcing (Heyne, 1987).

3.1.4 Kandungan tanaman temu kunci

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. Struktur kimia senyawa pinostrobin

3.1.5 Kegunaan atau khasiat tanaman temu kunci

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 *et al.*, 1995) dan relaksasi otot polos (Mata *et al.*, 1997).

3.2. Kontrol Pertumbuhan pada Sel Normal

Pertumbuhan dan maturasi sel adalah suatu proses yang normal walaupun dalam fase pertumbuhan organ selama embriogenesis, pertumbuhan, dan perbaikan jaringan dan perbaikan setelah terjadi luka. Gangguan regulasi dari proses tersebut dapat menyebabkan hilangnya kontrol atas pertumbuhan sel, differensiasi, dan batas antar ruang atau membran sel (Mc Phee *et al.*, 1995).

Sel-sel tertentu tumbuh dan bereproduksi setiap waktu, seperti sel-sel pembentuk darah dari sumsum tulang, lapisan germinativum kulit dan epitel usus. Akan tetapi, banyak sel lain, seperti sel otot polos, mungkin tidak memproduksi selama bertahun-tahun. Beberapa sel, seperti neuron dan sebagian besar sel otot lurik, tidak memproduksi disepanjang kehidupan seseorang, kecuali selama kehidupan fetus.

Pada beberapa jaringan, insufisiensi dari beberapa sel menyebabkan sel-sel ini tumbuh dan memproduksi dengan cepat sampai jumlah sel yang sesuai tersedia kembali. Contoh pada sel-sel hati, sel kelenjar, sel sumsum tulang, jaringan subkutan, epitel intestinal dan hampir jaringan apapun kecuali sel yang berdiferensiasi baik, seperti sel saraf dan sel otot.

3.2.1 Cara pengendalian pertumbuhan :

Pertama pertumbuhan dikendalikan oleh faktor-faktor pertumbuhan yang berasal dari bagian tubuh lain, bisa melalui sirkulasi darah maupun dari jaringan yang berdekatan. Kedua yaitu sebagian besar sel akan berhenti tumbuh bila sel kehabisan ruangan untuk tumbuh. Ketiga sel yang tumbuh dalam kultur jaringan sering berhenti tumbuh bila sejumlah kecil sekret sel sendiri terkumpul dalam media kultur (Guyton&Hall, 1997).

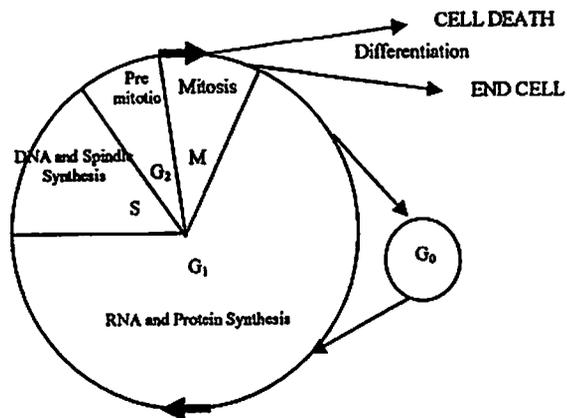
3.2.2. Tahapan siklus sel secara umum.

Fase M dimana pada fase ini terjadi aktivitas sintesis protein spindel, termasuk didalamnya proses mitosis yang terdiri dari profase, metafase, anafase dan telofase dengan durasi waktu kurang lebih 1 jam untuk sel basal membran kulit. Terjadi pula mekanisme *cell death* dan *end cell*. *Cell death* atau kematian sel merupakan proses yang terorganisir untuk mengatasi proses yang tidak perlu dalam fungsi metabolisme, misalnya pada keadaan luka karakteristik sel berubah menuju kematian atau bahkan fagositosis. Apoptosis merupakan komponen normal dan penting dengan mekanisme sama untuk mengatur kelangsungan hidup sel atau populasi jaringan.

Fase G_0 dimana pada fase ini merupakan fase istirahat dari semua aktivitas mitotik, meskipun masih melakukan metabolisme normal. Begitu juga dengan mekanisme perbaikan DNA, bila perlu akan diaktifkan selama fase ini berlangsung. Durasi waktu fase ini sangat bervariasi untuk masing-masing sel.

Fase G_1 dimana pada fase ini terjadi aktivitas sintesis RNA dan protein dengan durasi waktu 480 jam untuk sel basal membran kulit. Biasanya waktu fase ini memanjang pada keadaan tumor. Jadi ada konsep yang salah neoplasma adalah pembelahan sel yang cepat karena tidak ada hubungan yang konsisten antara waktu siklus sel dan malignansi.

Fase S dimana pada fase ini terjadi aktivitas sintesis DNA untuk persiapan replikasi berikutnya. Durasi waktu sekitar 16 jam untuk sel basal membran kulit. Fase G₂ dimana pada fase ini terjadi aktivitas sintesis nukleoprotein. Durasi waktunya kurang lebih 8 jam untuk sel basal membran kulit (Greens., 2000).



Gambar 3. Siklus sel

3.3 Tinjauan tentang enzim DNA topoisomerase.

Enzim DNA topoisomerase adalah enzim yang mempunyai fungsi cukup penting dalam proses intraseluler dari sel kanker, antara lain berperan dalam proses replikasi, transkripsi, rekombinasi DNA dan proses proliferasi dari sel (Hsiang, 1995; Pommier 1993).

Enzim topoisomerase berperan dalam mengontrol bentuk topologi dari DNA dari bentuk DNA supercoil menjadi bentuk relaksasinya, dengan membentuk ikatan antara enzim dengan DNA dengan cara memutus dan menyambungkan kembali ikatan fosfodiester dari DNA, aktivitas ini terjadi pada proses replikasi. Enzim yang bekerja pada untai tunggal DNA adalah enzim DNA topoisomerase I, sedangkan enzim yang bekerja pada untai ganda DNA adalah enzim DNA topoisomerase II. Enzim DNA topoisomerase I memiliki sisi aktif tirosin (Albert *et al.*, 1994).

Dengan dihambatnya aktivitas enzim DNA topoisomerase oleh senyawa inhibitor, maka proses terjadinya ikatan antara enzim dengan DNA sel kanker semakin lama. Sehingga akan terbentuk *Protein Linked DNA Breaks* (PLDB), akibatnya terjadi kerusakan DNA sel kanker dan selanjutnya berpengaruh terhadap proses dalam sel khususnya proses replikasi, serta diakhiri dengan kematian sel (Hsiang, 1989; Joseph, 1989).

Sehingga mulai tahun 1980-an enzim DNA topoisomerase digunakan sebagai molekul target untuk pencarian dan penemuan obat antikanker yang rasional dan lebih selektif, cara ini sangat baik untuk mengevaluasi senyawa bioaktif antikanker yang positif dengan metode ini, menunjukkan aktivitas antikanker pada pengujian *in-vivo* (Cumming, 1991; Pommier, 1993; Yoshinari, 1995).

3.4 Tinjauan tentang kanker

Kanker merupakan penyakit sel yang dicirikan dengan perubahan mekanisme kontrol yang mengatur proliferasi dan differensiasi sel. Sel-sel yang mengalami transformasi neoplastis umumnya mengekspresikan antigen-antigen permukaan sel yang tampak seperti tipe janin (*fetal*) normal, memiliki tanda-tanda nyata lainnya seperti tidak terjadi maturitas, dan mungkin memperlihatkan abnormalitas-abnormalitas kromosom baik kualitas maupun kuantitasnya, termasuk sebagai translokasi dan penampilan sekuens-sekuens gen teramplifikasi. Sel-sel ini mengalami proliferasi secara berlebihan dan membentuk tumor lokal yang dapat menekan atau menginvasi struktur-struktur normal disekitarnya. Suatu subpopulasi kecil sel di dalam tumor dapat digambarkan sebagai *tumor stem cells* (sel-sel induk tumor). Sel-sel ini mempunyai kemampuan untuk mengalami siklus proliferasi ulang serta melakukan proses migrasi ke lokasi-lokasi yang jauh di dalam tubuh untuk mengkolonisasi berbagai organ dalam proses yang disebut metastasis. Sel-sel induk tumor ini sering mengalami abnormalitas kromosom yang mencerminkan instabilitas genetiknya. Yang menyebabkan seleksi subklon-subklon secara progresif yang dapat bertahan hidup di lingkungan multisel inang. Abnormalitas kuantitatif dalam dalam berbagai bentuk jalur metabolisme dan komponen-komponen sel menyertai perkembangan neoplasma. Proses-proses invasif dan metastasis serta rangkaian abnormalitas metabolisme yang ditimbulkan kanker menyebabkan penyakit dan pada akhirnya menyebabkan kematian

pasien kecuali jika neoplasma tersebut dapat diberantas dengan pengobatan (Katzung, 2004).

3.4.1 Gejala-Gejala Klinik Pertumbuhan Kanker

Menurut sifatnya, neoplasma dibagi menjadi empat golongan besar yaitu tumor jinak, tumor *borderline*, tumor *insitu* dan tumor ganas (yang disebut kanker). Terjadinya tumor ganas atau kanker dapat diketahui dengan memperhatikan gejala klinik yang terjadi, yaitu :

Tanda-tanda pemeriksaan makroskopis : jarang terbentuk kapsul/pseudokapsul, batas dengan jaringan sekitarnya tidak tajam dan tidak teratur , konsistensinya rapuh dan lunak, irisan permukaannya beragam, sering terjadi nekrosis dan perdarahan, jaringannya heterolog dan tidak matur.

Tanda-tanda pemeriksaan mikroskopis differensiasi sel rendah (dedifferensiasi), susunan sel tidak teratur, selularitasnya padat dan terdapat banyak sel , ukurannya bermacam-macam (*polimorf*) , inti selnya membesar , kromatin menebal, kasar, tidak rata, terjadi hiperkromasi dan basofil, anak inti tampak tajam dan sering menonjol dengan ukuran yang bervariasi, mitosis banyak, bentuk inti bermacam-macam (*anarkariositis*), kromosomnya *aneuploid* (menyimpang), pada sitoplasma terdapat vakuola dan bentuk sitoplasmanya bermacam-macam (*anisositosis*), bila dilakukan pewarnaan terhadap sitoplasma terjadi peningkatan pengikatan warna dan ada basofil, susunan sel tidak teratur dan kadang-kadang tidak dapat dikenali, bentuk selnya bermacam-macam (*pleomorfik*), sel atipik lazim terjadi kadar enzim selnya sering terjadi kekurangan.

3.4.2 Faktor-Faktor Penyebab Kanker

Terdapat empat faktor yang mendorong peningkatan frekuensi terjadinya kanker, yaitu umur dengan makin meningkatnya umur makin besar bahan karsinogen kontak dengan tubuh dan memberikan banyak efek pada tubuh dan jumlahnya secara kumulatif akan bertambah. Makin tua, daya tahan tubuh dan kapasitas imunologik seseorang akan semakin berkurang. 11 % neoplasma bawaan menimbulkan kematian pada umur 1-14 tahun.

Diet dapat menyebabkan terjadinya kanker dipengaruhi oleh kebiasaan seseorang, seperti merokok, diet makanan, konsumsi minuman beralkohol, dll.

Lingkungan dapat mempengaruhi tingginya insiden kanker diantaranya radiasi, bahan kimia dari industrialisasi serta infeksi yang lama dan malnutrisi, contohnya polutan udara (asap, logam). Aktivitas seksual juga berhubungan dengan kanker karena dapat menularkan virus karsinogen dan smegma dari laki-laki yang tidak disunat dapat memacu terjadinya kanker pada pasangannya.

Faktor keturunan dengan genetik yang abnormal menunjukkan insiden yang tinggi terhadap kanker dibandingkan dengan yang normal, misalnya pada multipel poliposis koli, penderita dengan down's sindrom dan penderita retinoblastoma.

3.4.2.1 Jenis-Jenis Karsinogen

3.4.2.1.1 Karsinogen Kimia

Karsinogen kimia adalah bahan kimia yang dapat menyebabkan kanker pada binatang dan manusia. Kebanyakan karsinogen kimia berada dalam bentuk *procarcinogen* atau *activating dependent* yaitu karsinogen yang memerlukan perubahan metabolis atau tahapan aktivasi agar menjadi karsinogen yang aktif (*ultimate karsinogen*), sehingga dapat berinteraksi dan menimbulkan perubahan pada DNA, RNA atau protein sel tubuh. Neoplasma terbentuk pada tempat bahan kimia terbentuk sebagai hasil metabolisme. Terdapat juga karsinogen *activating independent* atau *direct acting* yang secara langsung dapat menyebabkan terjadinya neoplasma tanpa tahapan aktivasi terlebih dahulu untuk bereaksi dengan senyawa makromolekul seperti DNA.

Karsinogen yang beraksi langsung yaitu golongan agen-agen pengalkilasi yaitu dimetil sulfat, obat antikanker seperti siklofosfamid, dan lain-lain. Golongan agen-agen pengasilasi yaitu dimetil karbamil klorida.

Pro-karsinogen yang memerlukan perubahan metabolis antara lain hidrokarbon polisiklik aromatic (HPA) yang mengandung gugus benzo(a)pyrena merupakan hasil antara pada proses pembakaran yang tidak sempurna. Misal pada asap rokok, tembakau, lemak binatang yang dipanggang atau diasapkan. Dasar dari produk aktif pada kebanyakan hidrokarbon adalah epoksida yang membentuk ikatan dengan molekul DNA, RNA dan protein didalam sel.

Asam aromatik dan pewarna azo (*amino azo dyes*), masuk ke dalam tubuh melalui kulit, paru atau saluran cerna. Banyak digunakan dalam pewarna industri.

Nitrosamin terbentuk dalam saluran cerna dari gugus nitrat dan nitrit yang sering dipakai sebagai bahan aditif pada makanan.

Unsur logam adalah nikel dan plumbum bersifat elektrofilik, dapat berikatan dengan pusat nukleofilik pada DNA.

3.4.2.1.2 Karsinogen Virus

Virus yang bersifat karsinogen disebut virus onkogen. Virus DNA maupun RNA dapat menyebabkan transformasi sel.

Golongan virus DNA terdiri dari *human papilloma virus* (HPV), *Epstein-Barr Virus* (EBV), *virus hepatitis* (HBV), *cytomegalovirus* (CMV)

Golongan virus RNA, pada binatang sering menimbulkan neoplasma seperti virus *rous sarcoma* dan faktor *bittner milk*. Pada manusia HLTVI menimbulkan leukemia sel T, limfoma sel B pada penderita AIDS berkaitan dengan HIV. Mekanisme kerjanya adalah dengan masuknya virus RNA provirus yang kemudian akan bergabung dengan DNA *host* melalui bantuan enzim reverse transkriptase. Materi genetik virus RNA dapat membawa materi genetik sel yang terinfeksi yang disebut V-onkogen yang kemudian dipindahkan ke materi genetik sel yang lain (transduksi)

3.4.2.1.3 Karsinogen Radiasi

Radiasi UV dengan panjang gelombang 280-320 nm berkaitan dengan terjadinya kanker kulit. Radiasi UV menimbulkan dimer pirimidin yang merusak rangka fosfodiester DNA. Radiasi pengion dapat secara langsung menimbulkan radikal bebas yang kemudian menimbulkan kerusakan atau perubahan ikatan kimia. Dapat menimbulkan enzim yang tidak aktif, perubahan protein, kromosom pecah, translokasi, mutasi titik dan menghambat imunitas seluler. Radiasi yang menimbulkan mutasi bertindak sebagai inisiator dan hambatan bertindak sebagai promotor.

3.4.2.1.4 Agen Biologik

Beberapa jenis hormon bekerja sebagai kofaktor karsinogenesis, misal *Human Growth Hormon* (hGH), *Transforming GH* (TGF), *Insulin Like Hormon Faktor* (IGF-II), estrogen, estradiol dan testosteron.

Mikotoksin yang merupakan toksin yang dibuat oleh jamur *Aspergillus flavus*, jamur yang hidup pada kacang-kacangan yang kurang baik pengolahan dan penyimpanannya. Jamur tersebut memproduksi aflatoksin terutama aflatoksin B1 yang bersifat karsinogenik kuat. Bila aflatoksin tercerna, aflatoksin akan dioksidasi oleh sel-sel hati menimbulkan hasil antara yang akan berikatan dengan guanin pada DNA.

Parasit yang berhubungan dengan terjadinya kanker adalah *Schistosoma* (kanker kandung kemih) dan *Clonorchis sinensis* (adenikarsinoma kandung empedu).

3.4.3 Proses Terjadinya Kanker

Proses terjadinya kanker sampai sekarang belum dapat diketahui dengan pasti. Menurut Forbus, terjadinya kanker disebabkan oleh faktor dari dalam (perubahan genetik dalam kromosom) dan faktor dari luar (bahan kimia, radiasi, virus, dan agen biologis lainnya).

Terdapat tiga golongan gen pengatur pertumbuhan normal yang menjadi sasaran perubahan genetik, yaitu gen pencetus pertumbuhan abnormal seperti proto-onkogen dan onkogen, gen penghambat pertumbuhan abnormal yaitu "*cancer supresor gene*" disebut juga sebagai anti-onkogen dan gen yang mengatur kematian sel terprogram disebut "*gene apoptosis*". Disamping gen tersebut masih ada yang gen lain yang berfungsi memperbaiki kerusakan sel, yaitu "gen perbaikan DNA" yang memegang peranan ada atau tidaknya karsinogenesis (Martoprawiro, 2000).

Hanya sejumlah kecil dari sel yang bermutasi di dalam tubuh pernah mengarah pada kanker. Ada beberapa alasan untuk keadaan tersebut, yaitu sebagian besar sel yang bermutasi memiliki kemampuan hidup yang kurang dibandingkan sel normal dan oleh karena itu akan mati

Hanya sebagian dari sel yang bermutasi dan bertahan hidup menjadi kanker karena sebagian besar sel yang bermutasi pun masih memiliki kontrol umpan balik yang mencegah pertumbuhan yang berlebihan

Sel-sel yang berpotensi menjadi kanker seringkali menghancurkan sistem imunitas tubuh sebelum sel tersebut tumbuh menjadi kanker sehingga menstimulasi sistem imunitas tubuh dan terbentuk antibodi atau mensentisisasi limfosit melawan sel kanker

Biasanya dibutuhkan beberapa onkogen aktif yang berbeda pada saat yang sama untuk menimbulkan kanker (Guyton & Hall, 1997).

Karsinogenesis merupakan suatu proses yang bertingkat dan kompleks dari pembentukan neoplasma atau tumor. Sel tumor yang terjadi membentuk kumpulan sel yang mempunyai sifat tumbuh abnormal disebut juga sel yang mengalami transformasi. Pada umumnya tumor adalah monoklonal, yaitu sel-sel yang mengisi tumor semuanya berasal dari satu sel yang mengalami transformasi

Terjadinya kanker melibatkan banyak faktor maka disebut multifaktor karsinogenesis karena merupakan proses yang bertahap yang disebut multistep karsinogenesis pada tingkat fenotip dan genotip dengan melalui beberapa fase yaitu fase inisiasi, fase laten, fase promosi dan fase progresif keganasan. Gejala-gejala yang cepatnya pertumbuhan kanker disebut progresif tumor, dimana pada tingkat molekular progresif tumor merupakan akibat dari akumulasi lesi genetik yang diakibatkan oleh defek pada perbaikan DNA.

3.4.4. Peran dan Fungsi Gen Dalam Pengaturan Pertumbuhan

Proto-onkogen , dimana pada sel normal keadaan fisiologis pertumbuhan, pembelahan, proliferasi sel dan differensiasi sel diatur oleh proto-onkogen, melalui polipeptida protein faktor pertumbuhan yang berada didalam serum atau produk lokal yang bekerja secara parakrin. Proto-onkogen mempunyai potensi berubah menjadi onkogen dengan cara transduksi oleh virus RNA (retro virus) disebut onkogen virus atau mengalami perubahan setempat yang mempengaruhi penampilan atau fungsinya.

Onkogen adalah suatu gen yang produknya berkaitan dengan terjadinya transformasi neoplastik. Proto-onkogen dapat menjadi onkogen melalui salah satu mekanisme seperti mutasi titik, translokasi, amplifikasi, insersi atau delesi. Proto-onkogen terdiri dari daerah regulator dan daerah struktur. Perubahan dari bagian-bagian

Apoptosis merupakan program bunuh diri dari sebuah sel. Program ini memiliki peran yang penting untuk menjaga homeostatis perkembangan – biakan sel dan dengan adanya disregulasinya bisa berakibat timbulnya macam-macam penyakit (Evan dan Littlewood, 1998). Salah satu peran pentingnya adalah untuk membatasi proliferasi sel yang tidak diperlukan yang sekiranya akan dapat menyebabkan kanker. Pada sel-sel kanker program apoptosis ini telah mengalami gangguan sehingga sel akan mengalami metastasis (Peter et al, 1997).

4.5. Tinjauan Tentang Apoptosis

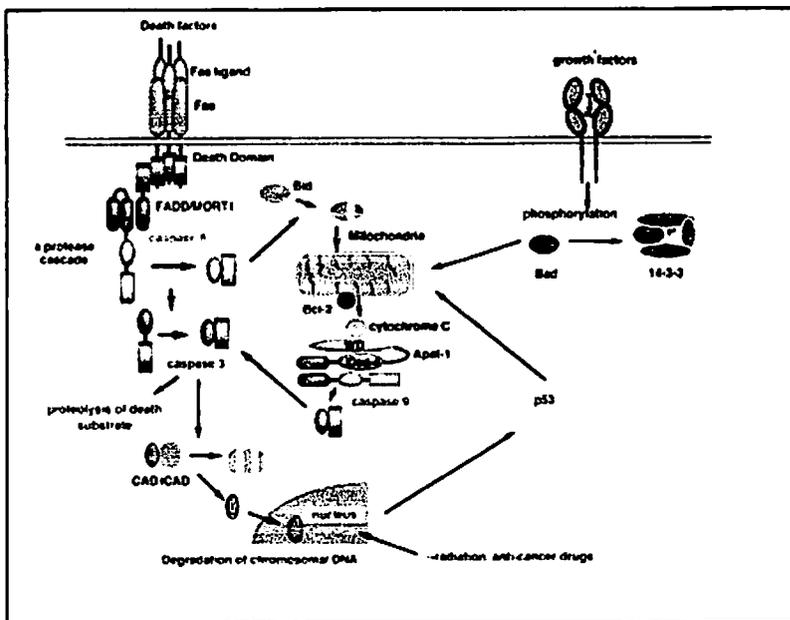
Gen perbaikan DNA , dimana paparan penyebab alami yang menyebabkan kerusakan DNA banyak ditemukan di lingkungan dan pembelahan sel normal yang peka terhadap perubahan akibat kesalahan spontan pada proses replikasi DNA juga sering terjadi. Tetapi insiden terjadinya kanker jarang terjadi. Keadaan ini merupakan kemampuan untuk memperbaiki kerusakan DNA dan mencegah mutasi pada gen yang mengatur pertumbuhan dan apoptosis.

akhirnya sel memutuskan berhenti membelah. dimana telomerase telah memendek sehingga sudah tidak bisa membelah lagi dan apoptosis. Apoptosis terjadi bila sel telah membelah kurang lebih enam puluh kali, pertumbuhan atau tidak aktifnya anti-onkogen tetapi juga karena mutasi gen pengatur. Penumpukan sel neoplasma terjadi sebagai akibat dari aktivasi gen perangsang terjadi pada beberapa proses fisiologik maupun patologik seperti pada neoplasma. Gen pengatur apoptosis, dimana apoptosis adalah kematian sel terprogram yang menghambat pertumbuhan dan merangsang diferensiasi sel.

Anti onkogen , tumor tidak saja terbentuk oleh aktivasi onkogen yang bekerja dominan tetapi juga akibat hilang atau tidak aktifnya gen yang bekerja menghambat pertumbuhan sel yang disebut sebagai anti onkogen yang bekerja resesif dengan cara bertebih. ini mengakibatkan onkogen menjadi aktif, mutasi pada bagian struktur akan mengakibatkan sintesis protein yang struktur dan fungsinya menyimpang, sementara perubahan regulator mengakibatkan produksi protein yang jumlahnya berkurang atau

Apoptosis dapat diamati pada penampakan fisiologis , antara lain berupa pengerutan sel, kerusakan pada plasma membrane dan adanya kondensasi kromatin . Tidak seperti pada nekrosis sel, sel-sel yang mengalami apoptosis tidak kehilangan kandungan internal sel dan tidak menyebabkan respon inflamasi. Bila program apoptosis telah selesai pada sebuah sel maka akan meninggalkan kepingan sel mati yang disebut badan apoptosis yang akan dikenali oleh sel makrofag dan dimakan (*engulfed*) (Peter et al, 1997).

Apoptosis merupakan mekanisme alamiah yang dialami oleh sel. Ada dua alasan utama mengapa sel melakukan mekanisme itu. Pertama apoptosis memang diperlukan untuk proses pertumbuhan atau perkembangan sel, jaringan atau organ lebih lanjut. Hal ini dapat dilihat pada peristiwa pemutusan ekor kecebong sebelum menjadi katak atau penghilangan selaput diantara jari-jari tangan pada janin di dalam rahim. Alasan kedua adalah untuk menghancurkan sel-sel yang dianggap membahayakan bagi integritas organisme itu sendiri, seperti sel yang terinfeksi oleh virus , sel dengan kerusakan DNA maupun sel kanker.



Gambar 4
Skema sinyal transduksi dari apoptosis (Nagata, 1997)

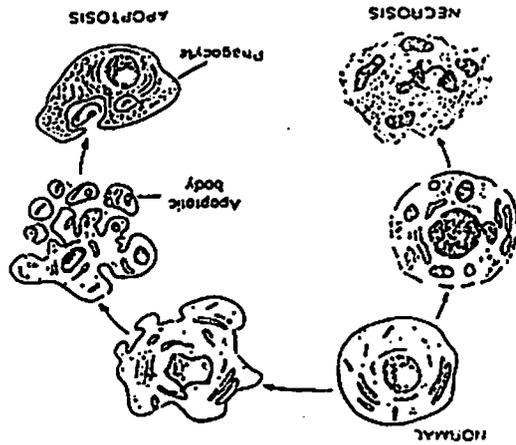
Beberapa faktor yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis dapat diklasifikasi menjadi dua kelompok besar, yaitu rangsangan instrinsik dan ekstrinsik. Kerusakan DNA, stress oksidatif dan hipoksia dapat merangsang terjadinya apoptosis dari dalam sel itu sendiri sehingga mengaktifkan apoptosis melalui jalur mitokondria (jalur instrinsik). Sedangkan dari luar sel adalah *death factor*, seperti TNF- α (*Tumor Necrosis Factor -alpha*), limfotoksin dan *Fas ligand* (FasL) serta kurang atau tidak adanya survival factor, seperti interleukin-2 dan interleukin -3, dapat mengaktifkan apoptosis melalui jalur *death factor* (jalur ekstrinsik). Obat kemoterapi antikanker yang bersifat *genotoxic* seperti etoposid dan radiasi sinar gamma dapat menyebabkan kerusakan pada DNA sel kanker maka gen p53 sebagai gen supresor tumor akan terakumulasi, menghentikan replikasi DNA pada *check point* dan memberi kesempatan kepada DNA untuk memperbaiki diri. Bila proses perbaikan gagal, p53 akan merangsang mitokondria mengeluarkan sitokrom c ke sitosol, dan dalam hal ini akan dihalangi oleh *anti-apoptosis member* yaitu gen Bcl-2. Di dalam sitosol sitokrom c bersama dengan *Apoptosis Protease Activating Factor-1* (Apaf-1) dan pro-caspase 9 membentuk caspase 9, kompleks ini disebut *apoptosome*. Terbentuk caspase 9 sebagai caspase awal akan mengaktifkan caspase eksekusioner, yaitu caspase 3, 6 dan 7 sehingga dapat menyebabkan kematian sel secara apoptosis (Nagata, 1998; Cotran, 1999).

Hubungan antara p53 dengan apoptosis diatas memang memiliki peran besar dalam timbulnya apoptosis, dimana p53 sendiri dikenal sebagai *tumor suppressor gene* dimana telah dibuktikan bahwa p53 mengalami mutasi pada lebih 50% tumor dan mengalami hambatan fungsi pada sebagian tumor yang lain. Hal itu terjadi karena p53 berperan besar dalam mengatur siklus sel, perbaikan DNA dan aktivasi bax. Struktur p53 terdiri dari gugus N-terminal transaktivasi, gugus kaya prolin, gugus *DNA-binding* spesifik, gugus tetramerisasi, dan ekor *basic C-terminal*. Gugus N-terminal transaktivasi berguna untuk pengaturan stabilitas p53 di dalam sel, gugus kaya prolin berguna untuk menekan pertumbuhan sel, gugus *DNA-binding* spesifik berguna untuk menempelnya p53 pada DNA di mana penempel ini berefek menghambat proses transkripsi, dan gugus ekor *basic C-terminal* berfungsi untuk menempelnya p53 pada

Deteksi sel apoptosis terhadap sel yang mengalami apoptosis dapat diamati dengan mikroskop cahaya dan elektron karena sel-sel tersebut memiliki penampakan morfologi yang spesifik yaitu sel mengkerut, timbul tonjolan di membran sitoplasma, mitokondria pecah dan mengeluarkan sitokrom c, terbentuk badan apoptosis yang mengandung sitoplasma, organel dan fragmen inti sel yang diliputi oleh membran,

4.5.1. Deteksi sel apoptosis

Gambar 5
Gambaran morfologis apoptosis dan nekrosis (Cotran, 1999)



(Burn & El-Deiry, 1999).

rantai tunggal DNA di mana hal ini menyebabkan p53 dapat berfungsi lebih lanjut pada proses berhentunya siklus sel, aktivasi GADD45 pada proses perbaikan DNA, dan aktivasi bax pada apoptosis. Serangkaian fungsi inilah yang membuat p53 dinobatkan sebagai *tumor suppressor gene* (Burn & El-Deiry, 1999 ; Cotran, 1999). Dalam sel yang tenang kadar p53 akan dijaga untuk tetap stabil rendah dan tidak aktif. Pada dasarnya jenis p53 ini (*wildtype p53*) memiliki waktu paruh yang sangat singkat , sekitar 20-30 sehingga jarang terdeteksi pada sel yang tidak mengalami stress. Bila sel mengalami stress akibat bahan-bahan – bahan perusak DNA seperti radiasi, hipoksia, hipoglikemia, obat-obat kemoterapi maka p53 akan mengalami stabilisasi sehingga masa hidup lebih lama guna mengatur berhentunya siklus sel, perbaikan DNA dan apoptosis

fosfolipid fosfatidilserin yang biasanya tersembunyi dalam membran plasma akan tampak di permukaan sel, sel berikatan dengan reseptor di sel fagosit, fagositosis oleh sel-sel di sekitarnya atau makrofag dan sel fagosit mengeluarkan sitokin (Spector , 1998 ; Cotran , 1999).

Teknik lain untuk mendeteksi apoptosis dengan pewarnaan untuk DNA , maka sel apoptosis akan tampak fragmentasi DNA inti dan memberikan warna khusus . Teknik ini dapat digunakan pewarnaan kimia, digunakan antara lain hoechst 33258 , akridine orange & etidium bromida dan propidium iodida dan teknik pewarnaan secara imunohistokimia dengan menggunakan teknologi TUNEL *assay* dan dengan menggunakan mikroskop fluoresens (Spector , 1998 ; Cotran , 1999).

TUNEL *assay* adalah salah satu metode pemeriksaan sel apoptosis yang spesifik di mana teknik ini mampu mendeteksi putusnya rantai tunggal dan rantai ganda DNA yang berhubungan dengan apoptosis. Rantai DNA yang putus dideteksi secara enzimatik melalui *labelling* terhadap gugus 3'-OH . fragmen DNA dilabel dengan digoxigenin-nucleotide yang kemudian diikat oleh anti-digoxigenin antibody. Ikatan konjugat peroxidase antibody secara enzimatik akan membentuk warna dari substrat kromogenik yang permanent , jelas dan terlokalisir sehingga menjadi deteksi apoptosis yang sensitive pada sel . Sehingga dapat dibedakan antara sel nekrosis dengan apoptosis melalui deteksi pemutusan rantai DNA dan kondensasi kromatin yang berhubungan dengan apoptosis. Pada nekrosis juga terjadi putusnya rantai DNA dan tidak menutup kemungkinan terbentuknya gugus 3'-OH., tetapi gugus ini tidak terbentuk sebanyak pada sel apoptosis sehingga andaikata tercat sekalipun akan membentuk warna yang sangat terang atau sangat muda, sehingga untuk membedakan adalah dengan terdapatnya perwarnaan fokal in situ di dalam *apoptotic nuclei* dan *apoptotic bodies*, demikian pula dengan sel yang sedang membelah juga tidak menghasilkan gugus 3'-OH dalam jumlah besar sehingga tidak tercat . Reagen ini dapat menyambung ujung 3'-OH secara in situ dengan nukleotida yang dilabel dan tidak dilabel secara kimiawi. Nukleotida yang terkandung dalam reaction buffer disambung dengan ujung 3'-OH dari DNA secara enzimatik dengan bantuan enzim Tdt (*Terminal deoxynucleotidyl transferase*) yang berfungsi sebagai katalisator reaksi penyambungan trifosfat nukleotida ke ujung 3'-OH. Pelabelan nukleotida dengan digoxigenin secara acak bertujuan untuk memicu ikatan antibody anti

digoxigenin dengan digoxigenin. Fragmen DNA yang telah disambung dengan nukleotida yang dilabel digoxigenin diikat *anti digoxigenin peroxidase conjugate* sehingga dengan penambahan substrat kromogenin pada sel yang mengandung ujung 3'-OH akan berwarna hijau flouresens dengan pengamatan mikroskop flouresens (Spector , 1998).

Tehnik deteksi yang lain adalah dengan analisis *flow cytometri*, dengan metode ini akan diketahui perbedaan profil DNA sel apoptosis dengan DNA sel normal (Spector , 1998).

4.6. Penanganan Kanker

Metode pengobatan secara luas menentukan dugaan yang realistik dari hasil terapi (Greens., 2000), dimana sering kali dilakukan kombinasi cara-cara penanganan kanker (Tjay., 2002). Cara-cara tersebut antara lain pembedahan (operasi penghilangan tumor primer), transplantasi sumsum tulang (untuk beberapa kasus leukemia), radiasi (radioterapi), kemoterapi (obat-obat antikanker), terapi hormon dan anti hormon (hormon steroid, obat kortikosteroid, zat anti estrogen, zat anti androgen, agonis hormon perilisgonadotropin, penghambat aromaterase), imunoterapi (interferon, interleukin-2 atau LAK-cells), hipertermi (kalor sebagai terapi tambahan untuk memperkuat efek radiasi), genterapi (inaktivasi dari gen, misal gen supresor tumor p53), terapi tambahan (terapi alternatif atau *Non Toxic Tumor Therapy*). Dilakukan juga terapi ortomolekuler, terapi enzim dan fitoterapi serta pemberian suplemen diet dan pelaksanaan diet.

4.6.1. Obat-Obat Antikanker

Obat yang ideal untuk kemoterapi antikanker adalah obat yang mempunyai toksisitas yang selektif untuk sel kanker. Tetapi, aman dengan satu pengecualian kecil yaitu kanker pada sel manusia tidak berbeda secara biokimia kualitatif dari sel normal. Hal tersebut menyebabkan intervensi secara farmakologis terhadap sel normal sehingga obat-obat kanker yang paling ideal tidak bisa memberantas sel-sel kanker tanpa merusak jaringan-jaringan normal. Oleh karena saat ini sedang dikembangkan golongan-golongan obat baru yang dapat secara selektif membunuh maupun menghambat pertumbuhan sel-sel kanker.

Obat-obat antikanker yang ada saat ini yaitu : Agen-agen alkilasi polifungsional Menghasilkan efek sitotoksik melalui transfer kelompok alkilnya ke berbagai konstituen seluler. Alkilasi DNA di dalam nukleus kemungkinan akan mempresentasikan interaksi penting yang menyebabkan kematian sel. Namun, obat-obat ini bereaksi secara kimia dengan sulfhidril, amino, hidroksil, karboksil, dan kelompok fosfat dari nukleofil seluler lain. Secara farmakologis, agen ini mempunyai efek *vesicant* langsung dan dapat merusak jaringan di tempat suntikan serta menimbulkan toksisitas sistemik yang umumnya terkait dengan dosis dan terjadi khususnya pada jaringan-jaringan yang tumbuh dengan cepat seperti sumsum tulang belakang, saluran cerna dan gonad. Contoh obat mekloretamin (nitrogen mustard; HN_2 ; mustargen), klorambusil (leukeran), melfalan (alkeran), thiotepa (trietilene-thiofosforamid), busulfan (myleran), siklofosfamid, nitrosourea (karmustin, lomustin, semustin), prokarbazin, dakarbazepin, altretamine (heksametilmelamin), cisplastin dan karboplatin.

Antimetabolit (analog struktural) , bekerja pada metabolisme menengah sel-sel yang berproliferasi mempunyai arti penting klinis dan konseptual. Meskipun sifat-sifat biokimia yang unik masih dicari, tetapi secara kuantitatif mempunyai metabolisme yang berbeda dari sel-sel normal yang menyebabkan sel kanker rentan pada antimetabolit atau analog struktural. Contoh obat metotreksat, antagonis purin [6-thiopurin (merkaptopurin, thioguanin), fludarabin fosfat, kladribin], antagonis pirimidin (fluourasil, capecitabin, sitarabin, gemcitabin)

Antimitotika (alkaloid tanaman), vinblastin, vincristin, vinorelbin . Merupakan alkaloid dari *Vinca rosea*. Mekanisme kerjanya melibatkan depolimerisasi mikrotubulus yang merupakan bagian penting dari sitoskeleton dan spindle mitosis menyebabkan penghentian mitosis saat metafase terputusnya spindle mitosis, dan gangguan segregasi kromosom

Podophylotoxin (etoposida dan teniposida) . Merupakan derivat semisintetik dari *podophyllotoxin*, yang diekstraksi dari akar *mayapple* (*Podophyllum peltatum*). Mempunyai struktur kimia dan secara klinis hampir sama, menghambat sel-sel pada fase S-G₂ akhir dari siklus sel. Keduanya menghambat topoisomerase II yang menyebabkan kerusakan DNA melalui pemecahan rantai akibat terbentuknya kompleks tersier obat, DNA dan enzim.

Camptothecins (topotecan dan irinotecan), merupakan produk alami yang mengganggu aktivitas topoisomerase I, yang bertanggung jawab atas pemotongan dan religasi rantai DNA. Penghambatan enzim akan menyebabkan kerusakan DNA.

Taxanes (paclitaxel dan docetaxel), merupakan ester alkaloid yang diperoleh dari *Western yew (Taxus brevifolia)* dan *European yew (Taxus baccata)*. Berfungsi sebagai racun gelendong mitosis melalui peningkatan polimerisasi tubulin.

Antibiotik, sebagian besar antibiotik mengikat DNA secara klinis melalui interkalasi di antara basa khusus dan menyekat sintesis RNA atau DNA baru (atau keduanya), menyebabkan pengguntingan rantai DNA, dan mengganggu replikasi sel. Contoh antibiotika antrasiklin (doksorubisin, daunorubisin, epirubisin, idarubisin, mitoxantron), daktinomisin, plikamisin, mitomisin, dan bleomisin.

Imunomodulator (*Biological Response Modifiers / BRM*), termasuk imunostimulator (sitokin, levamisol, preparat thymus dan antioksidan tertentu) dan immunosupresiva (MTX, merkaptopurin, azatiopurin, siklosporin, talidomida, dan sulfasalazin).

Hormon dan antihormon, yaitu hormon steroid dan obat kortikosteroid (hidrokortison, prednison), anti estrogen (tamoksifen, aminoglutetimida dan anastrozol), anti androgen (flumatida, cyproteron, dan nilutamida), agonis hormon perilisgonadotropin (leuprolide, goserelin, buserelin dan triptorelin), penghambat aromaterase (aminoglutethimide dan anastrozole)

Berbagai macam obat antikanker lain, asparaginase, hidroksiurea, mitoxantron, mitotan, derivat asam retinoat, faktor pertumbuhan sumsum tulang, amifostin, bifosfat (klordronat dan etodrinat), obat-obat alternative antioksidan (vitamin A, C, E, dan lycopen), Senyawa flavon (genistein, kuersetin), Ekstrak teh hijau dari daun *Camelia sinensis*, Turahiu (tulang rawan hiu, cartilage), Ekstrak thymus, Ekstrak viscum album pada famili Loranthaceae, misal benalu, Preparat enzim (protease tripsin, kimotripsin, papain dan bromelain), Ubikinon (ubiquinon, koenzim Q10).

Agen-agen investigasional, adalah obat-obat yang saat ini sedang diteliti di Amerika Serikat sehingga kemanjuran (efikasi) dan keselamatan obat ini untuk kemoterapi kanker dapat ditentukan. Status ini berlaku pada amonafida dan azaticidin, suramin dan banyak lainnya. (Katzung, 2004; Tjay, 2002).

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Bahan Penelitian

Bahan tanamantemu kunci diperoleh dari daerah Mojokerto, Jatim. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini berderajat pro analisa. Bahan kimia yang digunakan heksana, methanol , RPMI , Fetal Bovine Serum (FBS) , DMSO, akridine orange , etidium bromida.

1.2. Alat

Maserator, rotavapour , inkubator CO₂, elektroforesa , water bath inkubator, sentrifuse , mikroskop flouresen , spektrofotometer : UV, FTIR, NMR, MS .

1.3. Tahapan Penelitian

4.3. 1. Isolasi dan identifikasi pinostrobin dari rimpang temu kunci.

Sebanyak 300 gram serbuk rimpang temukunci diektraksi dengan 1 liter heksan dengan cara maserari, dan maserasi diulang 5 kali. Kemudian ekstrak heksan diuapkan dengan rotavapour, dan dilanjutkan pemurnian senyawa pinostrobin dengan cara kolom kromatografi dengan fase diam silica gel dan fase gerak n-hekan : atil asetat (3 :1) . Kristal yang terbentuk direkristalisasi dengan metanol panas dan dilanjutkan dengan penyaringan. Kristal pinostrobin yang diperoleh dilakukan identifikasi dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan spektroskopi UV, FTIR, ¹H - ¹³C NMR , MS. .

4.4. Induksi apoptosis senyawa pinsotrobin terhadap sel kanker payudara.

Kultur sel kanker yang digunakan adalah kultur sel kanker payudara manusia. Pertama sel ditambah RPMI 1640 disentrifus pada temperatur 4°C, 800 rpm selama 5 menit. Medium tersebut kemudian dibuang, dan selanjutnya ditambah medium penumbuh kira-kira 2 ml, dan diinkubasi dalam botol kultur pada temperatur 37° C dengan 5% CO₂. Pada tahap permulaan, sel diencerkan dengan medium tanpa serum sampai volume tertentu, untuk mendapatkan jumlah sel 2×10^5 setiap sumuran. Sel

dimasukan dalam tissue culture cluster 24, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 37°C. Medium diganti dengan medium baru sebelum mencapai perkembangan 100%, kemudian jumlah sel dihitung dan selanjutnya larutan senyawa pinostrobin (yang dilarutkan dalam media dengan bantuan DMSO) dengan konsentrasi : 10 , 50 , 100 µg/ml ditambahkan kedalamnya. Kontrol negatif dan kontrol positif juga disiapkan, kontrol positif digunakan senyawa etiposida. Untuk uji induksi apoptosis diamati setelah 24, 48 dan 72 jam setelah inkubasi.

Penentuan sel yang mengalami apoptosis dilakukan pewarnaan dengan cridine Orange / Etidium Bromida (AO/EB) dengan perbandingan volume kultur 25 µl dan pereaksi sebanyak 1 µl. Kemudian hasil analisis induksi apoptosis digunakan pengamatan dengan mikroskop flouresensi. Sel hidup akan berwarna hijau sedangkan sel kanker yang mengalami apoptosis akan berwarna kuning orange dengan bintik-bintik putih yang berpendar. Jumlah sel yang mengalami apoptosis dihitung dari sampel sel kanker minimal 300 sel.

$$\text{Perhitungan sel apoptosis} = \frac{\text{Jumlah sel apoptosis}}{\text{Jumlah Total Sel yang diamatai}} \times 100\%$$

4.5 Uji ekspresi p53, bax, bcl-2, caspase-7, COX-2 sel kanker payudara manusia T-47D dengan metode imunohistokima

Pemeriksaan ekspresi p53, bax, bcl-2 dan caspase-7 digunakan sel kanker hasil perlakuan dan kemudian sel ditambah RPMI 1640 disentrifuse pada suhu 4°C, 800 rpm selama 5 menit. Medium tersebut kemudian dibuang, sebagian sel kemudian dipindahkkan ke dalam gelas objek dan kemudian ditambah dengan H₂O₂ 0,5% selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air dan dicuci lagi dengan PBS selama 5 menit. Tambahkan bufffer sitrat dalam microwave dan dinginkan. Cuci dengan PBS dua kali selama 5 menit, tambah normal serum 10 menit , tambah

primer antibodi 1 jam atau semalam. Selanjutnya cuci dengan PBA dua kali selama 5 menit. Tambahkan antibodi sekunder selama 10 menit , cuci dengan PBS dua kali selama 5 menit. Selanjutnya tambahkan streptavidin selama 10 menit, cuci PBS dua kali 5 menit dan tambahkan pereaksi DAB selama 8 menit, cuci air. Dan kemudian ditambah hematoxylin. Sel yang mengekspresikan p53, bax, bcl-2 , caspase-7 dan COX-2 kan terwarnai coklat dengan menggunakan mikroskop cahaya. Penentuan ekspresi ditentukan dengan menggunakan persentasi sel yang mengekspresikan p53, bax, bcl-2 , caspase-7 dan COX-2.

4.6 Analisis Data

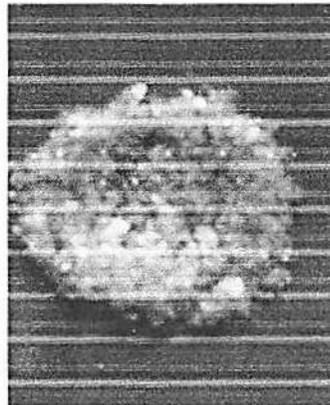
Analisis data pada penelitian secara *in vitro* menggunakan uji multivariat dengan Anova Faktorial untuk mengetahui perbedaan jumlah sel apoptotik dan ekspresi p53, bax, bcl-2 , caspase-3 dan *cyclooxygenase-2* pada pada sel kanker payudara manusia T-47D antara kelompok kontrol dan perlakuan secara bersama sama. Serta analisis regresi untuk mengetahui mekanisme induksi apoptosis dari pinostrobin dan andrografolida melalui jalur p53, bax, bcl-2, caspase-7 dan *cyclooxygenase-2* .

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

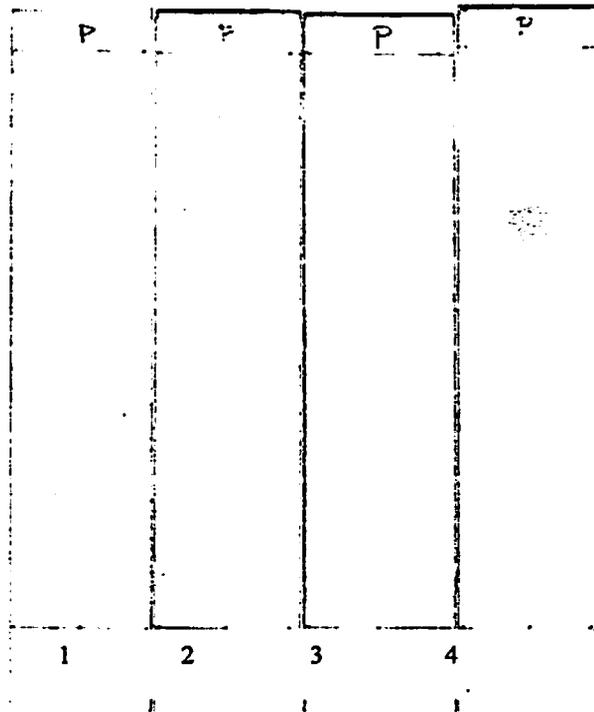
5.1. Hasil Isolasi Pinostrobin dari Rimpang Temu Kunci

Isolasi pinostrobin dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut n-heksan. Hasil ekstrak heksan diuapkan dengan rotavapour, sehingga diperoleh ekstrak heksan kental dengan kristal pinostrobin yang berwarna jingga. Untuk menghilangkan kandungan minyak lemak yang ada dilakukan partisi atau penarikan dengan petroleum eter, sehingga minyak lemak akan tertarik di dalam petroleum eter dan kristal pinostrobin akan lebih murni. Pemurnian pinostrobin dilakukan dengan rekristalisasi dengan metanol panas, dan akhirnya diperoleh kristal pinostrobin bentuk segi empat, pipih dan tidak berwarna dan tidak berasa. Dari 300 gram serbuk rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) diperoleh 8 gram pinostrobin.



Gambar 5.1 Kristal pinostrobin hasil isolasi

Identifikasi pinostrobin dengan KLT digunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan digunakan beberapa fase gerak , seperti yang tersaji pada Gambar 5.2 dan tabel 5.1.



Gambar 5.2 Kromatografi Lapis Tipis dari pinostrobin hasil isolasi dari (*Kaempferia pandurata* Roxb) , Fase diam: silika gel GF₂₅₄ Fase gerak : (1) n-heksana – etilasetat (3:2) ; (2) kloroform – etilasetat (4:1) ; (3) kloroform-etilasetat (15 :1) ; (4) n-heksana – etilasetat (4:1) dengan penampak noda serisulfat.

Hasil KLT pinostrobin hasil isolasi dari temu kunci *Kaempferia pandurata* Roxb) pada fase gerak n-heksana – etilasetat (3:2) menunjukkan satu noda dengan warna noda kuning dan memiliki harga Rf sebesar 0,89. Pada fase gerak kloroform – etil asetat (4:1) menunjukkan satu noda dengan warna noda kuning dan memiliki harga Rf sebesar 0,87 , dengan fase gerak kloroform-etilasetat (15 :1) menunjukkan

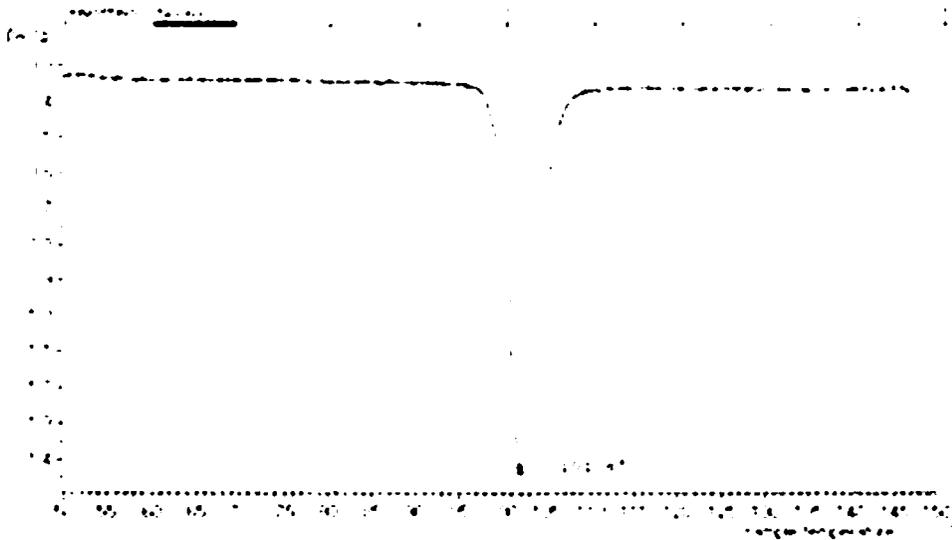
satu noda dengan warna noda kuning dan memiliki harga Rf sebesar 0,87 ; dengan fase gerak n-heksana – etilasetat (4:1) menunjukkan satu noda dengan warna noda kuning dan memiliki harga Rf sebesar 0,75 .

Tabel 5.1 Hasil identifikasi KLT senyawa pinostrobin hasil isolasi dari *Kaempferia pandurata* Roxb

Fase gerak	Warna noda	Harga Rf
n-heksana – etil asetat (3:2)	Kuning	0,89
kloroform – etil asetat (4:1)	Kuning	0,87
kloroform-etil asetat (15 :1)	Kuning	0,81
n-heksana – etil asetat (4:1)	Kuning	0,75

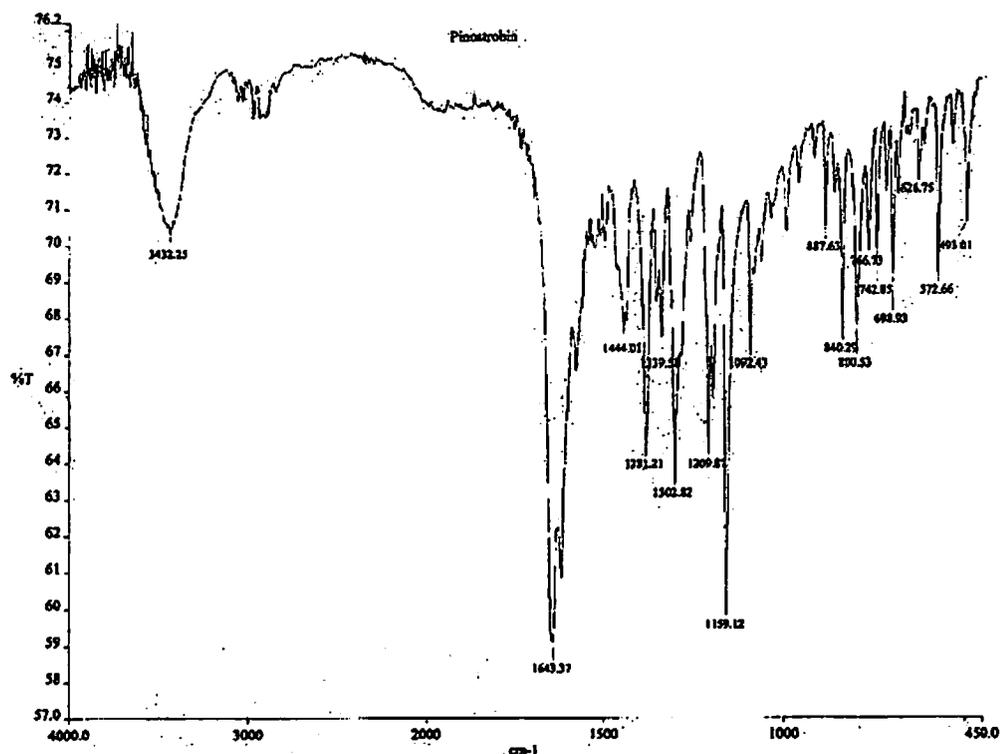
Hasil ini menunjukkan bahwa pinostrobin hasil isolasi adalah murni, hal ini ditunjukkan adanya satu noda kromatogram KLT pada penggunaan berbagai fase gerak yang digunakan, di mana dengan digunakannya berbagai fase gerak dalam KLT dapat digunakan untuk menguji kemurnian secara sederhana.

Hasil analisis titik leleh pinostrobin dengan DTA (*Differential Thermal Analysis*) seperti terlihat pada Gambar 5.3. Spektrum DTA dari pinostrobin hasil isolasi menunjukkan titik leleh pinostrobin sebesar 101°C. Hasil spektrum ini terlihat puncak yang sangat tajam , hal ini menunjukkan jika senyawa yang dianalisis adalah senyawa tunggal atau senyawa murni.



Gambar 5.3 Spektrum DTA dari pinostrobin hasil isolasi

Hasil analisis spektroskopi isolat pinostrobin dengan spektroskopi IR dapat dilihat dalam Gambar 5.4 . Analisis ini memberikan pita-pita serapan pada bilangan gelombang sebagai berikut : 3432,25 ; 1643,37 ; 1444,01 ; 1381,21 ; 1339,58 ; 1302,82 ; 1209,87 ; 1159,1 ; 1092,43 ; 887,63 ; 840,29 ; 800,53 ; 766,73 ; 742,85 ; 698,93 ; 626,73 ; 572,66 ; 493,01 cm^{-1} .

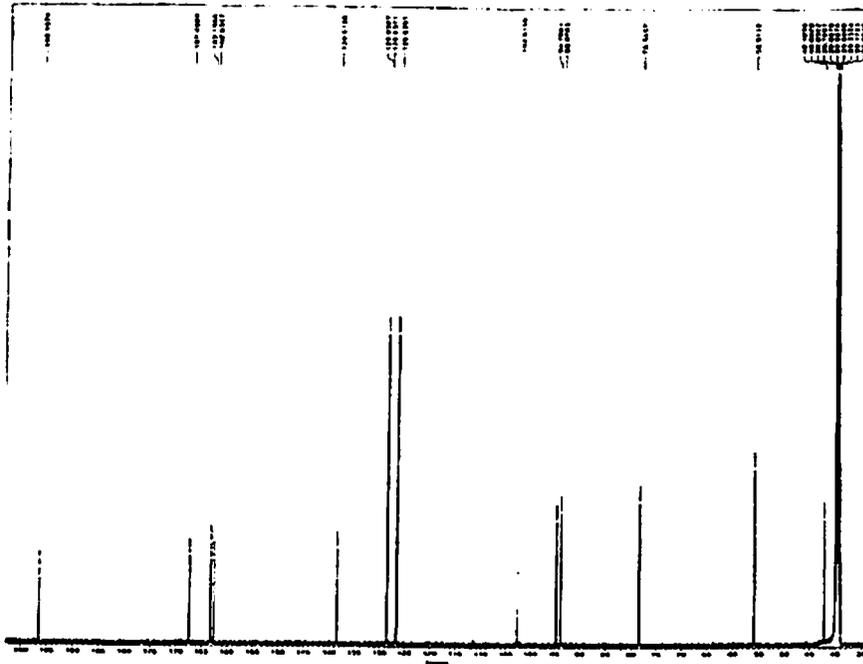


Gambar 5.4 Spektrum IR dari pinostrobin hasil isolasi

Hasil analisis spektroskopi RMI ^1H dengan standar TMS dan pelarut DMSO dapat dilihat pada Gambar 5.5.

Tabel 5.2. Komparasi Spektrum RMI ^1H Isolat Pinostrobin dengan Spektrum RMI ^1H Senyawa Pinostrobin Pada Pustaka (Parwata, 1998)

Posisi Proton	δH Isolat Pinostrobin (DMSO)	δH Pinostrobin (Piridin) Pustaka Parwata
H-2	5,60 (d)	5,24 (d)
H-3	2,80 – 3,0 (s)	2,81 – 3,02 (s)
ArOCH ₃	3,78 (s)	3,76 (s)
ArH (H-6 dan H-8)	6,10 (s) 6,20 (s)	6,01 (s)
ArH (H-2' dan H-6')	7,40 -7,60 (m)	7,37-7,56 (m)
OH	12,10 (s)	11,94 (s)



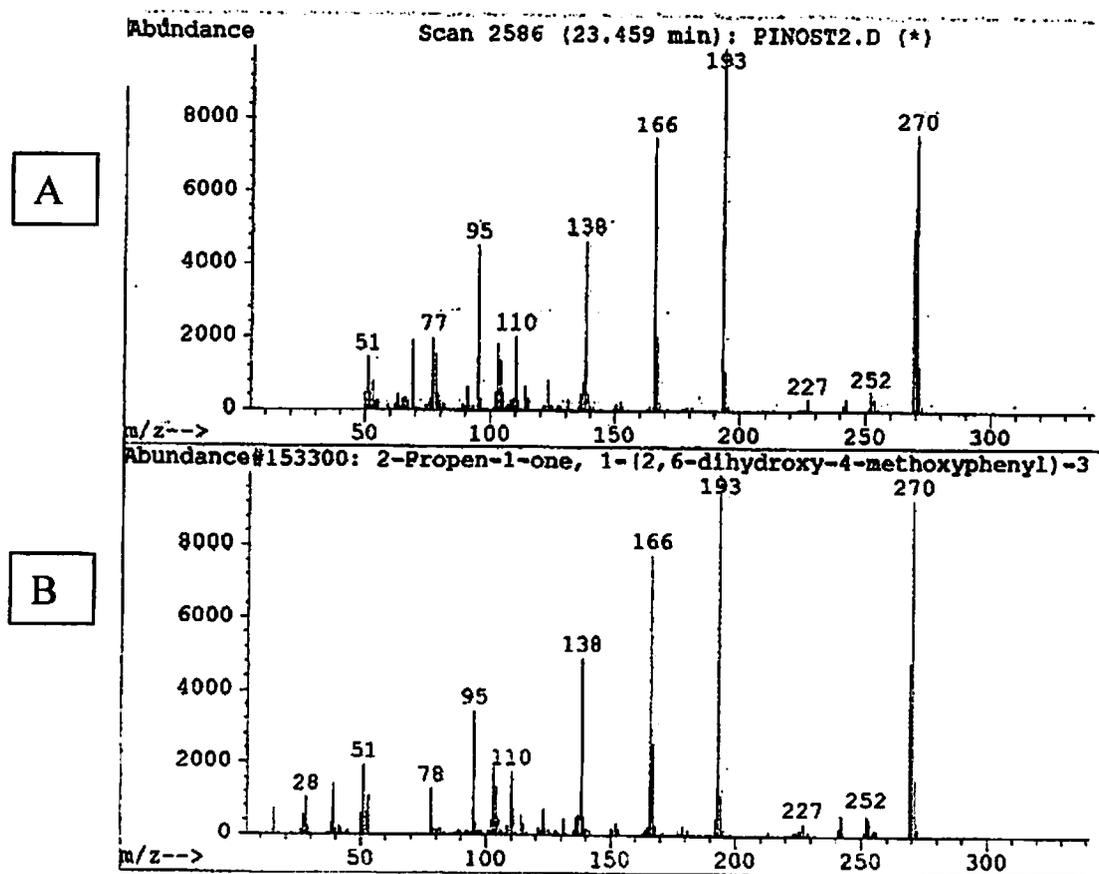
Gambar 5.6 Spektrum RMI ^{13}C dari pinostrobin hasil isolasi

Tabel 5.3. Komparasi Spektrum RMI ^{13}C Isolat Pinostrobin dengan Spektrum RMI ^{13}C Senyawa Pinostrobin Pada Pustaka (Parwata, 1998)

Posisi Proton	δC Isolat Pinostrobin (DMSO)	δC Pinostrobin (Piridin) Pustaka Parwata
O-CH ₃	55,91	55,58
C-2	78,98	79,12
C-3	42,12	43,32
C-4	195,56	195,44
C-5	163,19	163,94
C-6	94,76	95,04
C-7	167,46	167,76
C-8	93,87	94,15
C-9	162,63	162,57
C-10	102,16	103,03
C-1'	138,51	138,24
C-2'	126,63	125,95

C-3'	128,53	128,67
C-4'	128,60	128,67
C-5'	128,53	128,67
C-6'	126,63	125,95

Hasil analisis spektroskopi MS dengan standar library dapat dilihat pada Gambar 5.7. Analisis spektroskopi massa diperoleh ion molekul dengan $m/e = 270$ sebagai massa molekul relatifnya (M_r) dari senyawa hasil isolasi.



Gambar 5.7 Spektrum massa pinostrobin hasil isolasi

Keterangan Gambar

A. Spektrum massa isolat

B. Spektrum massa pinostrobin (*internal library*)

Uji kemurnian dipergunakan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen dengan kepolaran yang berbeda yaitu n-heksana – etilasetat (3:2 v/v) ; kloroform – etil asetat (4:1 v/v) ; kloroform-etilasetat (15 :1 v/v) dan n-heksana – etilasetat (4:1 v/v) dengan fase diam silika gel dan penampak noda serisulfat , menunjukkan noda tunggal berwarna kuning intensif, seperti terlihat pada. Gambar 5.2 Bab 5. Hal ini menunjukkan isolat yang diperoleh termasuk senyawa golongan flavonoid (Widyawaruyanti,2007). Untuk memastikan struktur kimia dari isolat yang didapat maka dilanjutkan dengan identifikasi menggunakan spektroskopi infra merah, RMI ^1H , RMI ^{13}C dan spektrometri massa.

Hasil identifikasi dengan spektroskopi infra merah (KBr) terhadap isolat menunjukkan adanya pita-pita serapan pada bilangan gelombang sebagai berikut : 3432,25 ; 1643,37 ;1444,01 ; 1381,21 ; 1339,58 ; 1302,82 ; 1209,87 ; 1159,1 ; 1092,43 ; 887,63 ; 840,29 ; 800,53 ; 766,73 ; 742,85 ; 698,93 ; 626,73 ; 572,66 ; 493,01 cm^{-1} . Serapan pada bilangan gelombang 3432 cm^{-1} merupakan ciri khas vibrasi ulur gugus hidroksil, bilangan gelombang 1643,37 cm^{-1} menunjukkan vibrasi ulur dari gugus $\text{C}=\text{O}$; bilangan gelombang 1444,01 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi ulur dari $\text{C}=\text{C}$; bilangan gelombang 1381,21 cm^{-1} menunjukkan adanya geminal dimetil $-\text{CH}_3(\text{CH}_3)_2$; bilangan gelombang 1302 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus $\text{C}-\text{O}$, serta bilangan gelombang 887,63 ; 840,29 ; 800,53 cm^{-1} menunjukkan adanya inti aromatik. Spektrum infra merah (KBr) dari isolat yang diperoleh adalah identik dengan spektrum infra merah (KBr) dari pinostrobin hasil isolasi dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) oleh Parwata (1998). Menurut

pustaka (Parwata, 1998) spektrum infra merah dari pinostrobil menunjukkan serapan pada bilangan gelombang $3437,40$; 1645 ; $1579,84$; 1290 cm^{-1} .

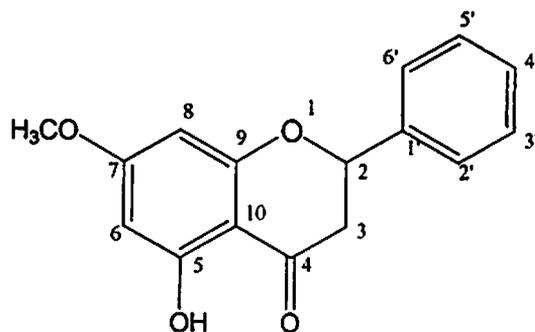
Spektrum isolat yang diperoleh dengan spektroskop ^1H (500 MHz, DMSO) dikomparasikan dengan spektrum ^1H senyawa pinostrobil pada pustaka (90 MHz, Piridin - d5), Parwata 1998, seperti disajikan pada tabel 5.1. Dimana hasil spektrum ^1H dari isolat menunjukkan sinyal proton pada $2,8$ - $3,3$ ppm yang menunjukkan dua proton pada H-3, tumpang tindih dengan tetapan gandengnya menunjukkan multiplet, dengan integrasi 2H. Resonansi proton δ 3,78 ppm menunjukkan satu puncak resonansi atau singlet, setelah dilakukan integrasi diperoleh 3 proton (3H), merupakan proton pada posisi ArOCH₃. Hasil ini juga sesuai dengan pustaka yang menyebutkan jika gugus ArOCH₃ (aril metoksi) suatu senyawa akan menunjukkan pergeseran kimia sekitar 3,70 ppm dengan tetapan gandengnya menghasilkan suatu singlet (Silverstein *et al.*, 1981). Sedangkan pada resonansi proton δ 5,6 ppm menunjukkan dua puncak resonansi atau dublet dari proton pada posisi H-2 (1H), hal ini menunjukkan adanya tumpang tindih antara H-2 dengan proton H-3a. Proton H-6 menunjukkan sinyal proton δ 10 ppm dengan satu puncak resonansi atau singlet dengan integrasi 1H, untuk proton H-8 memiliki sinyal proton δ 20 ppm dengan satu puncak resonansi (singlet). Hasil ini berbeda dengan spektrum pinostrobil dari pustaka (Parwata, 1998), dimana sinyal proton H-6 dan H-8 menunjukkan satu puncak resonansi (singlet) gabung, hal ini dapat disebabkan perbedaan daya resolusi alat RMI yang digunakan, dimana analisis isolat digunakan RMI ^1H 500 MHz, sementara pinostrobil pustaka ditentukan RMI ^1H 90 MHz.

Sehingga hasil analisis isolat menunjukkan dua puncak resonansi yang terpisah dengan sinyal proton H-8 sedikit lebih *deshielded* dibanding H-6, yang disebabkan posisi H-8 berdekatan dengan gugus metoksi (-OCH₃) yang memiliki sifat elektronegativitas tinggi. Sinyal proton 7,40-7,60 ppm menunjukkan proton aromatis dengan nilai integrasi 5H, dengan puncak resonansi multiplet (m) yang merupakan posisi proton H-2'- H-6' dari cincin aromatis. Sedangkan sinyal proton 12,10 ppm menunjukkan proton pada gugus OH, dengan tetapan gandeng menunjukkan suatu singlet dengan integrasi 1H. Dari hasil komparasi RMI ¹H (500 MHz, DMSO) dengan spektrum RMI ¹H senyawa pinostrobin pada pustaka (90 MHz, Piridin - d₅) menunjukkan kesamaan puncak - puncak geseran kimia, hasil tersebut menunjukkan jika isolat yang diperoleh adalah identik dengan pinostrobin pustaka (Parwata, 1998).

Identifikasi dengan spektroskopi RMI ¹³C menunjukkan spektrum dengan 16 puncak serapan karbon seperti pada gambar 5.5. Hal ini sesuai dengan jumlah atom karbon dari senyawa pinostrobin. Untuk memastikan apakah isolat yang diperoleh identik dengan senyawa pinostrobin, maka spektrum RMI ¹³C isolat yang diperoleh dikomparasikan dengan spektrum RMI ¹³C pinostrobin pada pustaka (Parwata, 1998), seperti terlihat pada tabel 5.2. Hasil komparasi menunjukkan bahwa puncak-puncak spektrum RMI ¹³C isolat mempunyai kesamaan dengan dengan puncak-puncak spektrum RMI ¹³C senyawa pinostrobin pustaka (Parwata,1998). Sinyal resonansi karbon 42,12 ppm menunjukkan atom karbon C-3 dengan jumlah karbon 1. Sedangkan sinyal resonansi karbon 55,91 ppm menunjukkan atom karbon O-CH₃, sinyal resonansi karbon 78,98 ppm menunjukkan atom karbon C-2. Sinyal resonansi karbon

195,56 ppm menunjukkan atom karbon C-4, sinyal resonansi yang ditunjukkan masuk dalam daerah medan rendah (*down field*), hal ini disebabkan posisi atom C-4 dipengaruhi oleh gugus karbonil dan ikatan rangkap terkonjugasi. Sinyal resonansi karbon 163,19 ppm menunjukkan atom karbon C-5, sedangkan resonansi karbon 94,76 menunjukkan atom karbon C-6. Atom C-7 menunjukkan sinyal resonansi karbon 167,46 ppm, sedangkan sinyal resonansi karbon 93,87 ppm menunjukkan atom C-8, sinyal resonansi karbon 162,63 ppm menunjukkan atom karbon C-9, sinyal resonansi karbon 102,16 ppm menunjukkan atom karbon C-10. Atom karbon C-1' menunjukkan sinyal resonansi pada 138,51 ppm. Sinyal resonansi karbon 126,63 ppm menunjukkan atom karbon C-2' dan C-6'. Atom karbon C-3' dan C-5' menunjukkan sinyal resonansi karbon 128,53 ppm, sedangkan atom karbon C-4' menunjukkan sinyal karbon 128,60 ppm.

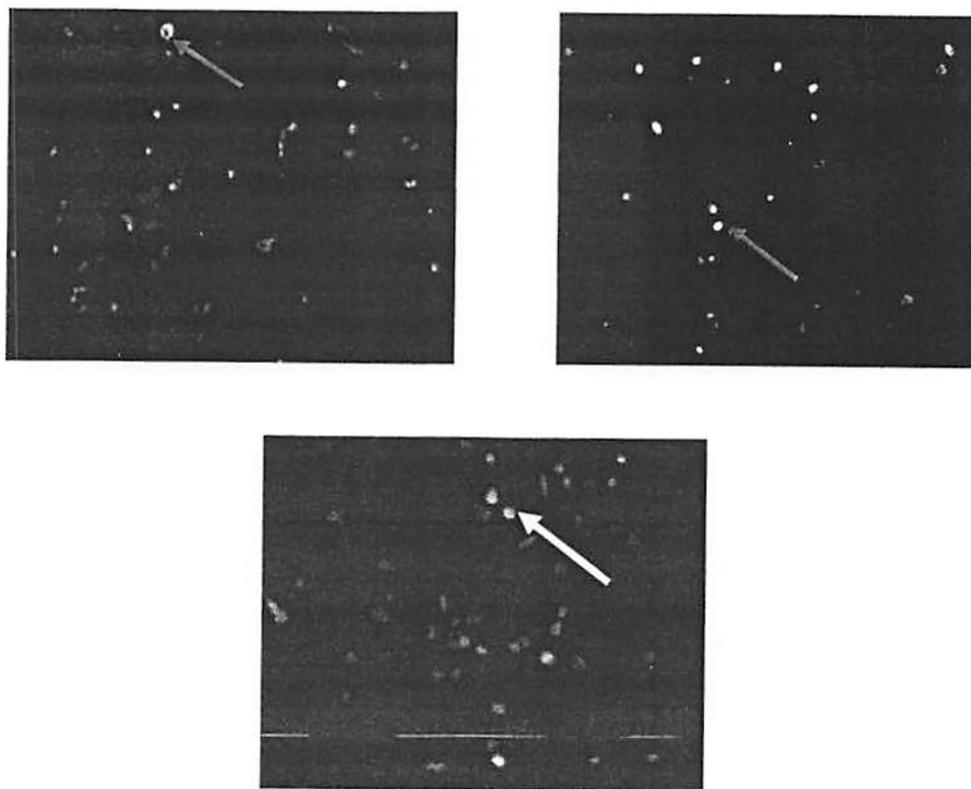
Dengan demikian dari hasil analisis RMI isolat baik proton dan karbon diperoleh atom karbon sebanyak 16 dan hidrogen sebanyak 14 yang diperoleh dari 1 CH_3 , 1 CH_2 , 8 CH , 1 OH dan 6 C . Hal ini sesuai dengan rumus molekul pinostrobin yaitu $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}$.



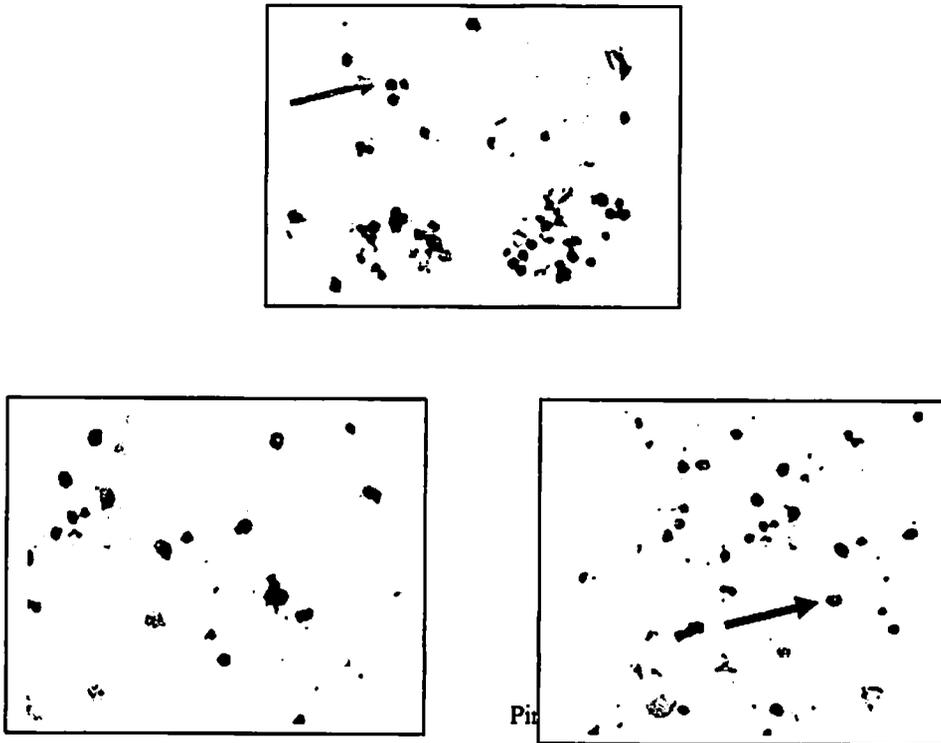
Gambar 5.8
Struktur kimia pinostrobin

Hasil analisis spektroskopi massa dari isolat dengan metode ionisasi EI diperoleh puncak ion molekul dengan $m/z = 270$ sebagai massa molekul relatif (Mr). Hasil ini identik dengan spektrum massa dari senyawa pinostrobin pustaka Parwata (1998) yang menunjukkan puncak ion molekul $m/z = 270$, demikian juga identik dengan *standard library*. Hasil fragmentasi m/e 193 menunjukkan adanya kehilangan cincin B (fenil) dari cincin A dan C, hal ini ditunjukkan oleh fragmentasi pada $m/e = 77$, $m/e=166$ merupakan fragmentasi dari cincin A dan fragmentasi yang lain sangat memperkuat dugaan jika senyawa hasil isolasi merupakan senyawa flavanon pinostrobin seperti yang ditunjukkan oleh skema dibawah ini.

Gambar 5.10. Hasil induksi apoptosis pinostrobin dari rimpang *Kaempferia pandurata* Roxb terhadap sel kanker payudara manusia T-47D yang diinkubasi selama 24 jam dan diamati dengan peraksi akridina orange – etidium bromida dengan mikroskop flowesent, sel hidup ditandai dengan anak panah warna putih, dan sel apoptotik diwarnai dengan anak panah warna merah.



5.2 Hasil Induksi Apoptosis Sel Kanker Payudara Manusia T-47D dan Ekspresi p53, bax, bcl-2, caspase-7 dan COX-2 setelah ditambah Pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb



Gambar 5.11. Hasil analisis ekspresi p53 sel kanker payudara manusia T-47D dengan penambahan pinostrobin dari rimpang *Kaempferia pandurata* Roxb yang diinkubasi selama 72 jam dengan metode imunohistokimia. Sel kanker yang tidak mengekspresikan p53 ditandai dengan anak panah warna hijau , dan sel yang mengekspresikan p53 diwarnai dengan anak panah warna merah.

Pemeriksaan secara kuantitatif induksi apoptosis sel kanker payudara manusia T-47D dengan perlakuan pinostrobin dilakukan dengan menggunakan pewarnaan akridina orange - etidium bromida dan digunakan mikroskop flouresent, terlihat pada Gambar 5.16. Sedangkan pemeriksaan ekspresi p53, bax, bcl-2, caspase-7, COX-2 pada sel kanker payudara T-47D dilakukan dengan teknik pengecatan imunohistokimia. Pada inkubasi sel kanker selama 24 , 48 dan 72 jam , apabila dibandingkan dengan kontrol maka dengan penambahan kosentrasi pinostrobin yang

meningkat dari 10 μ g/ml, 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml menunjukkan peningkatan jumlah sel apoptotik, ekspresi p53, bax, caspase-7 dan terjadi penurunan ekspresi bcl-2 dan COX-2. Hal ini diketahui dari hasil penghitungan persentase jumlah sel kanker yang mengalami apoptotik dan sel kanker yang mengekspresikan p53, bax, bcl-2, caspase-7, COX-2. Hasil analisis statistik dengan uji beda dengan FAKTORIAL ANOVA diperoleh nilai F Corrected Model 374,427 dengan signifikansi p = 0,00 dan diperoleh nilai F interaksi perlakuan vs sel apoptosis dan ekspresi sebesar 59,245 dengan signifikansi p = 0,00, untuk inkubasi 24 jam. Sedangkan untuk inkubasi 48jam diperoleh nilai F Corrected Model 468,225 dengan signifikansi p = 0,00 dan diperoleh nilai F interaksi perlakuan vs sel apoptosis dan ekspresi sebesar 162,108 dengan signifikansi p = 0,00. Pada inkubasi 72 jam diperoleh nilai F Corrected Model 331,294 dengan signifikansi p = 0,00 dan diperoleh nilai F interaksi perlakuan vs sel apoptosis dan ekspresi sebesar 135,154 dengan signifikansi p = 0,00 (lihat Lampiran 1). Peningkatan dan penurunan setiap variabel pengamatan sebagaimana ditampilkan pada Tabel 5.4 ; Tabel 5.5 dan Tabel 5.6 dan Gambar 5.12.

Tabel 5.4. Rerata dan Simpangan Baku Persentase Jumlah Sel Apoptotik dan Sel yang Mengekspresikan p53, bax, bcl-2, caspase-7 , COX-2 dari Sel Kanker Payudara Manusia T-47D setelah ditambah pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb dengan waktu inkubasi 24 jam serta analisis faktorial

Variabel	Perlakuan				F	Signifkansi
	Kontrol DMSO	Pinostrobin 10µg/ml	Pinostrobin 50µg/ml	Pinostrobin 100µg/ml		
Sel Apoptotik	1,10 ± 0,17	7,52 ± 0,20	10,47 ± 0,42	13,36 ± 0,67	374,427	0,000
p53	6,08 ± 0,38	14,55 ± 0,97	20,79 ± 1,31	20,79 ± 1,31		
bax	13,75 ± 1,39	16,18 ± 2,21	18,81 ± 0,50	23,27 ± 1,19		
bcl-2	75,83 ± 2,12	71,0 ± 0,95	60,97 ± 1,58	47,87 ± 1,75		
Caspase-7	13,91 ± 1,28	16,06 ± 1,20	19,92 ± 1,36	25,53 ± 1,48		
COX-2	24,66 ± 2,10	20,99 ± 0,44	16,69 ± 0,80	12,73 ± 1,60		

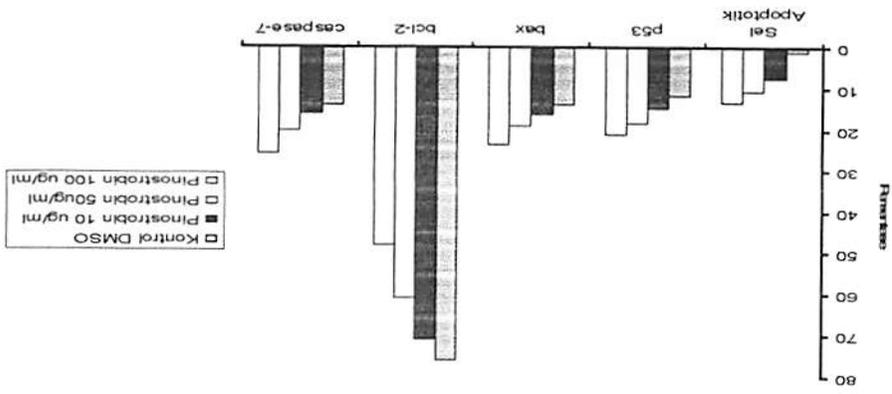
Tabel 5.5. Rerata dan Simpangan Baku Persentase Jumlah Sel Apoptotik dan Sel yang Mengekspresikan p53, bax, bcl-2, caspase-7 , COX-2 dari Sel Kanker Payudara Manusia T-47D setelah ditambah Pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb dengan waktu inkubasi 48 jam dan analisis faktorial

Variabel	Perlakuan				F	Signifkansi
	Kontrol DMSO	Pinostrobin 10µg/ml	Pinostrobin 50µg/ml	Pinostrobin 100µg/ml		
Sel Apoptotik	1,67 ± 0,33	9,76 ± 0,44	15,84 ± 0,51	20,17 ± 0,38	468,225	0,00
p53	5,66 ± 0,64	17,54 ± 0,93	24,06 ± 1,31	27,35 ± 0,99		
bax	13,17 ± 1,46	22,75 ± 1,39	24,57 ± 0,84	27,86 ± 1,14		
bcl-2	77,25 ± 1,88	63,54 ± 1,80	49,08 ± 3,05	41,08 ± 1,41		
Caspase-7	13,17 ± 3,12	19,86 ± 1,13	24,35 ± 0,73	30,75 ± 1,59		
COX-2	25,20 ± 1,43	17,44 ± 1,23	13,54 ± 0,86	9,40 ± 0,86		

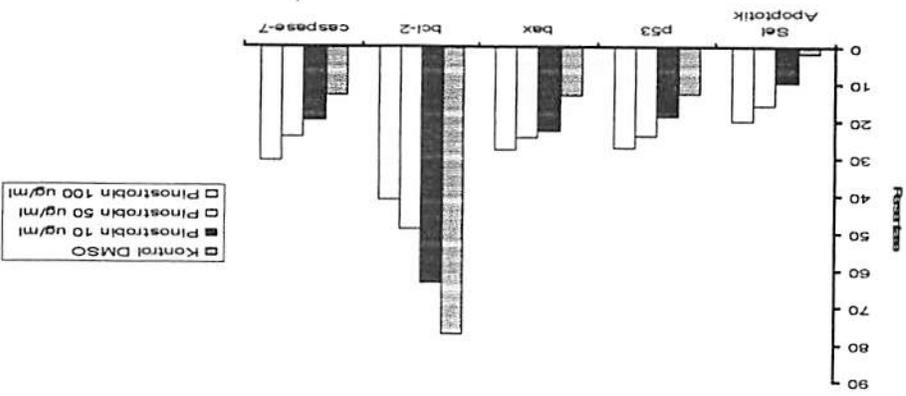
Tabel 5.6. Rerata dan Simpangan Baku Persentase Jumlah Sel Apoptotik dan Sel yang Mengekspresikan p53, bax, bcl-2, caspase-7 , COX-2 dari Sel Kanker Payudara Manusia T-47D setelah ditambah Pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb dengan waktu inkubasi 72 jam dan analisis faktorial

Variabel	Perlakuan				F	Signifi kansi
	Kontrol DMSO	Pinostrobin 10µg/ml	Pinostrobin 50µg/ml	Pinostrobin 100µg/ml		
Sel Apoptotik	2,67. ± 0,33	12,78 ± 1,0	16,13 ± 1,94	25,65 ± 0,73	331,294	0,00
p53	6,71 ± 0,89	19,91 ± 1,23	26,24 ± 1,51	36,17 ± 1,46		
bax	12,5 ± 1,88	21,07 ± 1,67	32,84 ± 1,30	32,84 ± 1,30		
bcl-2	74,58 ± 3,41	50,88 ± 2,48	38,68 ± 1,82	29,61 ± 1,17		
Caspase-7	13,15 ± 2,99	21,94 ± 1,06	30,31 ± 1,94	33,49 ± 1,90		
COX-2	24,80 ± 1,50	15,63 ± 0,68	12,24 ± 0,76	8,19 ± 0,94		

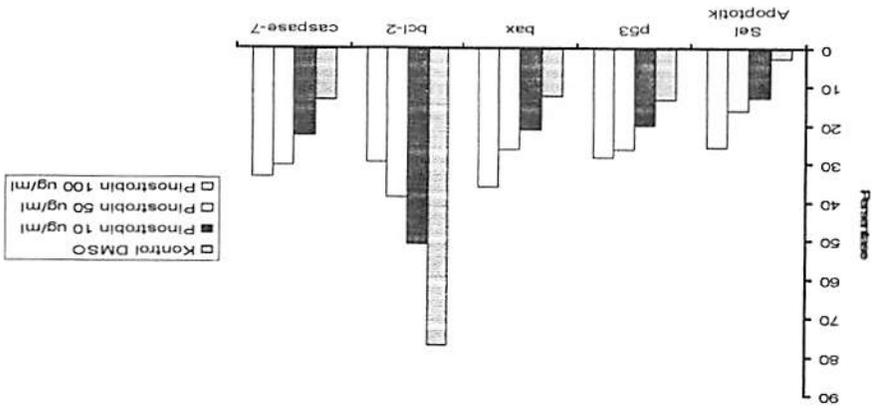
A.



B.



C.



Gambar 5.12. Aktivitas pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) terhadap persentase jumlah sel apoptotik dan sel yang mengekspresikan p53, bax, bcl-2, caspase-7 sel kanker payudara manusia T-47D dengan waktu inkubasi 24 jam (A), 48jam (B) dan 72 jam (C).

5. 2.1 Sel Apoptotik

Pada inkubasi 24 , 48 dan 72 jam jumlah sel apoptotik sel kanker payudara manusia T-47D kelompok kontrol berbeda sangat nyata dengan kelompok perlakuan dengan penambahan pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb. Pada kelompok perlakuan dengan pinostrobin konsentrasi 10 μ g/ml, 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml jumlah sel yang mengalami apoptosis meningkat sangat signifikan, secara berturut-turut yaitu 7,52% ; 10,47% dan 13,36% dibanding pada kelompok kontrol (1,10%). Sel yang mengalami apoptosis, tampak bewarna orange dengan pengamatan mikroskop flouresent . Warna orange flouresent tersebut adalah fragmen-fragmen DNA sel yang terwarnai oleh etidium bromida pada pewarnaan menggunakan pereaksi akridina orange – etidium bromida. Apabila dibandingkan dengan sel hidup, maka sel hidup akan terwarnai hijau. Sedangkan pada inkubasi 48 jam seiring dengan peningkatan konsentrasi pinostrobin 10 μ g/ml, 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml jumlah sel yang mengalami apoptosis meningkat sangat signifikan, secara berturut-turut yaitu 9,76 % ;15,84 % dan 20,17 % jika dibandingkan kelompok kontrol (1,67 %). Demikian juga pada inkubasi 72 jam , seiring dengan peningkatan konsentrasi pinostrobin dari 10 μ g/ml, 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml jumlah sel yang mengalami apoptosis meningkat sangat signifikan, secara berturut-turut yaitu 12,78 % ; 16,13% dan 25,65% dibandingkan kelompok kontrol (2,67%).

5.2.2 Ekspresi p53

Ekspresi p53 sel kanker payudara manusia T-47D kelompok kontrol berbeda sangat nyata dengan kelompok perlakuan dengan pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb baik pada inkubasi 24 , 48 maupun 72 jam . Inkubasi selama 24 jam dengan pinostrobin konsentrasi 10 μ g/ml, 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml terjadi peningkatan ekspresi p53 yang sangat signifikan, secara berturut-turut yaitu 14,55% ; 20,79 % dan 20,79% dibanding pada kelompok kontrol (6,08%). Ekspresi p53 sel kanker payudara manusia T-47D dengan pengecatan imunohistokimia menunjukkan warna merah kecoklatan . Sedangkan inkubasi 48 jam juga terjadi peningkatan ekspresi p53 yang sangat signifikan, secara berturut-turut yaitu 17,54 % ; 24,06% dan 27,35% dibanding pada kelompok kontrol (5,66%). Pada inkubasi 72 jam ekspresi p53 sel kanker payudara manusia T-47D dengan pinostrobin konsentrasi 10 μ g/ml, 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml juga terjadi peningkatan ekspresi p53 yang sangat signifikan, secara berturut-turut yaitu 19,91 % ; 26,24% dan 36,17% dibanding pada kelompok kontrol (6,71%).

5.2.3 Ekspresi bax

Ekspresi bax sel kanker payudara manusia T-47D kelompok kontrol berbeda sangat nyata dengan kelompok perlakuan dengan pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb, pada inkubasi 24, 48 , 72 jam. Pada inkubasi 24 jam dengan pinostrobin dari 10 μ g/ml, 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml terjadi peningkatan ekspresi bax

yang sangat signifikan, secara berturut-turut yaitu 16,18% ; 18,81% dan 23,27% dibanding pada kelompok kontrol (13,75 %). Inkubasi 48 jam seiring dengan peningkatan konsentrasi pinostrobin dari 10 μ g/ml, 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml juga terjadi peningkatan ekspresi bax yang sangat signifikan, secara berturut-turut yaitu 22,75% ; 24,57% dan 27,86% dibanding pada kelompok kontrol (13,17 %). Demikian juga pada inkubasi 72 jam dengan peningkatan konsentrasi pinostrobin dari 10 μ g/ml, 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml juga terjadi peningkatan ekspresi bax yang sangat signifikan, secara berturut-turut yaitu 21,07% ; 32,84% dan 32,84% dibanding pada kelompok kontrol (12,5%).

5.2.4 Ekspresi bcl-2

Inkubasi 24 , 48 dan 72 jam ekspresi bcl-2 sel kanker payudara manusia T-47D kelompok kontrol berbeda sangat nyata dengan kelompok perlakuan dengan pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb. Perlakuan dengan pinostrobin selama 24 jam inkubasi dengan pinostrobin 10 μ g/ml, 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml terjadi penurunan ekspresi bcl-2 yang sangat signifikan, secara berturut-turut yaitu 71,0 2% ; 60,97% dan 47,87% dibanding pada kelompok kontrol (75,83%). Sedangkan inkubasi 48 jam ekspresi bcl-2 sel kanker payudara manusia T-47D dengan pinostrobin konsentrasi 10 μ g/ml, 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml juga terjadi penurunan ekspresi bcl-2 yang sangat signifikan, secara berturut-turut yaitu 63,542% ; 49,08% dan 41,08% dibanding pada kelompok kontrol (77,25%). Inkubasi 72 jam ekspresi bcl-2 sel kanker payudara manusia T-47D dengan perlakuan pinostrobin konsentrasi 10 μ g/ml, 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml terjadi penurunan ekspresi bcl-2 yang sangat

signifikan, secara berturut-turut yaitu 50,88% ; 38,68% dan 29,61% dibanding pada kelompok kontrol (74,58%).

5.2.5 Ekspresi Caspase-7

Ekspresi caspase-7 sel kanker payudara manusia T-47D kelompok kontrol berbeda sangat nyata dengan kelompok perlakuan dengan pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb, pada inkubasi 24 , 48 maupun 72 jam . Pada kelompok perlakuan seiring dengan peningkatan konsentrasi pinostrobin dari 10 μ g/ml, 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml juga terjadi peningkatan ekspresi caspase-7 yang sangat signifikan, secara berturut-turut yaitu 16,06%; 19,92 % dan 25,53 % dibanding pada kelompok kontrol (13,91%). Inkubasi 48 jam seiring dengan peningkatan konsentrasi pinostrobin dari 10 μ g/ml, 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml juga terjadi peningkatan ekspresi caspase-7 yang sangat signifikan, secara berturut-turut yaitu 19,86% ; 24,35 % dan 30,75 % dibanding pada kelompok kontrol (13,17%). Sedangkan inkubasi 72 jam dengan peningkatan konsentrasi pinostrobin dari 10 μ g/ml, 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml terjadi juga peningkatan ekspresi caspase-7 yang sangat signifikan, secara berturut-turut yaitu 19,86% ; 24,35 % dan 30,75 % dibanding pada kelompok kontrol (13,17%).

5.3 Hasil Regresi antara Ekspresi p53, bax, bcl-2, Caspase-7 dan COX-2 dengan Jumlah Sel Apoptotik Kanker Payudara Manusia T-47D setelah ditambah dengan Pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb

Hasil penghitungan regresi diperlukan untuk menentukan mekanisme apoptosis sel kanker payudara manusia T-47D setelah ditambah dengan pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb pada inkubasi 24, 48 dan 72 jam. Sebagai prediktor adalah ekspresi p53, bax, bcl-2, caspase-7 dan COX-2. Hasil regresi dapat dilihat pada Tabel 5.10.

Hasil regresi antara ekspresi p53, bax, bcl-2, caspase-7 dan COX-2 dengan jumlah sel apoptotik kanker payudara manusia T-47D setelah ditreatment dengan pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb pada inkubasi 24 jam, secara berturut-

Tabel 5.6. Hasil Regresi antara Ekspresi p53, bax, bcl-2, Caspase-7 dan COX-2 dengan Jumlah Sel Apoptotik Kanker Payudara Manusia T-47D setelah ditreatment dengan Pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb pada inkubasi 24, 48 dan 72 jam

Prediktor	Inkubasi 24 Jam		Inkubasi 48 jam		Inkubasi 72 jam	
	Nilai R	Nilai p	Nilai R	Nilai p	Nilai R	Nilai p
Ekspresi p53	0,961	0,019	0,988	0,002	0,985	0,031
Ekspresi bax	0,897	0,004	0,985	0,000	0,978	0,000
Ekspresi bcl-2	0,881	0,000	0,993	0,000	0,963	0,000
Ekspresi Caspase-7	0,885	0,013	0,963	0,000	0,924	0,016

turut menunjukkan adanya hubungan linear yang sangat signifikan dengan harga R 0,961 (signifikansi =0,019) ; R 0,897 (signifikansi 0,004) ; R 0,881 (signifikansi 0,000)

;R 0,885 (signifikansi 0,013) dan R 0,947 dengan signifikansi 0,000. Sedangkan pada inkubasi 48 jam, secara berturut-turut menunjukkan adanya hubungan linear yang sangat signifikan dengan harga R 0,988 (signifikansi =0,002) ; R 0,985 (signifikansi 0,000) ; R 0,993 (signifikansi 0,000) ; R 0,963 (signifikansi 0,000) dan R 0,988 dengan signifikansi 0,000. Demikian juga pada inkubasi 72 jam, secara berturut-turut menunjukkan adanya hubungan linear yang sangat signifikan dengan harga R 0,985 (signifikansi =0,031) ; R 0,978 (signifikansi 0,000) ; R 0,963 (signifikansi 0,000) ; R 0,924 (signifikansi 0,016) dan R 0,965 dengan signifikansi 0,000 ; analisis regresi dapat dilihat dalam lampiran 1.

Pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker primer payudara manusia (Ermawati, 1998), *human breast cancer cell line* MCF-7 (Bail , 2000) dan sel mieloma mencit (Sukardiman^o, 2003). Untuk itu pada penelitian ini akan dikaji kemungkinan mekanisme kematian sel kanker dari kedua senyawa tersebut. Apoptosis merupakan program bunuh diri dari sebuah sel. Program ini memiliki peran yang penting untuk menjaga homeostatis perkembang – biakan sel dan dengan adanya disregulasinya bisa berakibat timbulnya macam-macam penyakit (Evan dan Litlewood, 1998). Salah satu peran pentingnya adalah untuk membatasi proliferasi sel yang tidak diperlukan yang sekiranya akan dapat menyebabkan kanker.

Deteksi secara kualitatif terhadap gambaran sel-sel yang mengalami apoptosis dapat digunakan perubahan morfologi sel , yang dapat diamati dengan mikroskop cahaya kontras. Hal ini sesuai dengan ciri-ciri sel mengalami apoptosis,

menurut Cotran (1998) ; Nagata (1997) sel akan menjadi mengkerut, terjadi kondensasi kromatin, terbentuk badan apoptosis yang nantinya akan dikenali dan ditelan oleh sel makrofag, sehingga tidak akan menimbulkan respon inflamasi pada sel-sel atau jaringan sekitar. Metode ini digunakan juga oleh beberapa peneliti antara lain dalam uji induksi apoptosis doxorubin dan etoposida terhadap sel kanker payudara manusia MCF-7 yang dilakukan Yang *et al*, 2001. Penelitian lain adalah induksi apoptosis tamoxifen terhadap sel kanker payudara manusia MCF-7 yang dilakukan oleh Zhang *et al*, 1999 , demikian juga Refaei *et al*, 2002 penelitian mengenai induksi paclitaxel terhadap sel kanker payudara manusia MCF-7.

Hasil penelitian menunjukkan adanya perubahan morfologi sel kanker payudara manusia T-47D yang mengarah pada ciri-ciri sel apoptosis pada sel yang ditambahkan dengan pinostrobin, yaitu sel kanker menjadi mengkerut dan terjadi kondensasi kromatin. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa semakin tinggi konsentrasi pinostrobin dan andrografolida serta penambahan waktu inkubasi, maka semakin banyak sel yang mati dengan cara apoptosis. Aktivitas induksi apoptosis andrografolida lebih aktif dibanding dengan pinostrobin , hal ini terlihat dari jumlah sel yang mengalami apoptosis lebih banyak dan lebih nyata adanya sel yang mengkerut , adanya badan apoptotik pada pengamatan dengan mikroskop cahaya kontras. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Saraste, 200 yang mengemukakan bahwa sel yang mengalami apoptosis dapat dikenali dari perubahan stereotipikal morfologinya , selain sel mengkerut terlihat adanya perubahan bentuk dan terjadi *looses contact to its neighbouring cells* atau kehilangan kontak antar sel tetangga. Hasil perubahan morfologi sel kanker payudara T-47D dengan penambahan

pinostrobin , perubahan morfologi sel sangat nyata , yang mengarah pada ciri-ciri spesifik untuk sel yang mengalami apoptosis , dibandingkan pada penelitian dari Yang *et al*, 2001, Zhang *et al*, 1999 dan Refaei *et al*, 2002. Aktivitas apoptosis dari kontrol positif etoposida terhadap perubahan morfologi sel kanker payudara T-47D menunjukkan hasil yang konsisten dan mirip dengan hasil yang dilaporkan oleh Yang *et al*, 2001 di mana sel kanker payudara manusia MCF-7 yang diberikan etoposida dengan konsentrasi 10 sampai 400 μ M selama inkubasi 18 jam teramati sel kanker menjadi mengerut , bentuk sel menjadi *rounding* (membulat), *detachment* , *membrane blebbing* (blebing pada membran sel) , *segregation* atau pemisahan dari struktur selular.

Secara kualitatif apoptosis dapat dideteksi dengan melihat gambaran fragmentasi DNA sel menggunakan gel elektroforesis yang telah dilakukan oleh Chopin *et al*, 2002. Terjadinya fragmentasi DNA dapat mengindikasikan sel mengalami apoptosis (Boersma *et al*, 1996 ; Goerzcyca *et al*, 1993). Hasil uji secara kualitatif dengan gel agrosa dapat menginformasikan secara kualitatif mapun semi kuantitatif bahwa pinostrobin dari *Kampferia pandurata* Roxb pada konsentrasi 10, 50 dan 100 μ g/ml baik pada inkubasi 24, 48 maupun 72 jam nampak adanya semir band yang menandakan telah terjadi fragmentasi DNA dan mengarah ke apoptosis. Dengan meningkatnya konsentrasi pinostrobin dan waktu inkubasi semakin jelas terjadi fragmentasi DNA, terutama pada konsentrasi pinostrobin 100 μ g/ml dengan waktu inkubasi jam ke 72 , teramati semir DNA yang lebih jelas dari sel kanker payudara manusia T-47D.

Pada kontrol positif etoposida baik pada inkubasi 24, 48 dan 72 jam tidak menunjukkan adanya fragmentasi DNA yang sangat jelas, hal ini dimungkinkan dengan kemampuan etoposida yang sangat kuat dalam mendegradasi sel kanker, sehingga pada pengamatan hasil fragmentasi DNA dengan elektrofotresensi karena jumlah DNA yang terisolasi jumlahnya relatif kecil.

Kemampuan senyawa pinostrobin dapat menyebabkan fragmentasi DNA sel kanker payudara manusia TD-47 dengan aktivitas cukup kuat kemungkinan ada korelasi langsung dengan aktivitas pinostrobin dan andrografolida sebagai inhibitor DNA Topoisomerase (Sukardiman, dkk, 2005). DNA Topoisomerase adalah enzim yang mempunyai fungsi cukup penting dalam proses intraseluler dari sel kanker, antara lain berperan dalam proses replikasi, transkripsi, rekombinasi DNA dan proses proliferasi dari sel kanker (Hsiang, 1995; Pommier 1993). Dengan dihambatnya aktivitas enzim DNA Topoisomerase oleh senyawa inhibitor, maka proses terjadinya ikatan tertier antara enzim dengan DNA sel kanker dan senyawa andrografolida semakin lama. Sehingga akan terbentuk *Protein Linked DNA Breaks* (PLDB), akibatnya terjadi kerusakan DNA sel kanker dan selanjutnya proses replikasi akan terhenti dan diakhiri dengan kematian sel kanker (Hsiang, 1989; Joseph, 1989).

Adanya fragmentasi DNA maka identifikasi sel sel apoptosis dapat dianalisis secara kuantitatif dengan metode pewarnaan akridin orange – etidium bromida (AO/EB). Metode ini telah banyak digunakan dalam penelitian, seperti yang dilaporkan oleh Diaz *et al.*, 2000 dalam penelitian induksi apoptosis dari Vitamin D-3 dan analognya EB 1089 dalam sel kanker *Colorectal Adenoma and Carcinoma* dan juga penelitian Daniel *et al.*, 2001 dalam penelitian tentang inhibisi siklus sel dan

induksi apoptosis dari glomerular mesangial cells . Menurut Spector *et al.*, 1998 penggunaan pewarnaan akridin orange – etidium bromida (AO/EB) memiliki beberapa keuntungan yaitu proses analisis sederhana dan dapat untuk menentukan kuantifikasi dari sel yang mengalami apoptosis. Dengan penggunaan mikroskop flourescent maka akan teramati warna hijau flourescent adalah menunjukkan sel hidup, sedangkan warna orange flourescent menunjukkan sel yang mengalami apoptosis. Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan sel yang mengalami apoptosis, seiring dengan meningkatnya kosentrasi pinostrobin, juga seiring dengan meningkatnya waktu inkubasi . Namun terlihat bahwa pada inkubasi 72 jam sudah menunjukkan aktivitas induksi apoptosis yang hampir sama dengan waktu inkubasi 48 jam . Hal ini sangat mirip dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Wahyuningsih dkk, 2005 yaitu penelitian tentang induksi apoptosis senyawa oleandrin dari daun *Nerium indicum* Mill , terhadap sel kanker payudara manusia MCF-7 , bahwa respon apoptosis bertambah seiring dengan waktu inkubasi oleandrin pada sel kanker payudara manusia MCF-7 dan mencapai optimum pada inkubasi sampel pada jam ke 48.

Untuk mengetahui mekanisme apoptosis dari pinostrobin terhadap sel kanker payudara manusia T-47D , maka dilakukan penentuan jumlah sel apoptotik dan ekspresi p53, bax , bcl-2 , caspase-7 dan COX-2 sel kanker payudara manusia T-47D secara simultan. Untuk penentuan jumlah sel apoptotik dianalisis dengan pewarnaan akridin orange – etidium bromida (AO/EB). Sedangkan untuk penentuan ekspresi p53, bax , bcl-2 , caspase-7 dengan metode imunohistokimia (Megha *et al.*, 2002 ; Katja *et al.*, 1999 ; Santini *et al.*, 1993).

Pada inkubasi sel kanker payudara manusia T-47D selama 24 , 48, 72 jam apabila dibandingkan dengan kontrol maka dengan penambahan konsentrasi pinostrobin yang meningkat dari 10 μ g/ml, 50 μ g/ml dan 100 μ g/ml menunjukkan peningkatan jumlah sel apoptotik, terjadi peningkatan ekspresi p53, bax , caspase-7 dan terjadi penurunan ekspresi bcl-2 yang signifikan, seperti terlihat pada tabel 5.5 ; 5.6; 5.7 dan Gambar 5.10.

Hasil penentuan jumlah sel apoptotik dan ekspresi p53, bax , bcl-2 , caspase-7 dan COX-2 sel kanker payudara manusia T-47D setelah ditreatment dengan pinostrobin dan andrografolida, selanjutnya dilakukan analisis regresi dengan prediktor ekspresi p53, bax , bcl-2, caspase-7 dan COX-2 untuk menentukan mekanisme apoptosis , apakah mekanismenya melalui jalur p53- bax .

Hasil penghitungan regresi terhadap jumlah sel apoptotik sel kanker payudara manusia T-47D dan ekspresi p53, bax , bcl-2 , caspase-7 dan COX-2 setelah ditreatment dengan pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb pada inkubasi 24, 48 dan 72 jam seperti tersaji pada tabel 5.4 ; 5.6 ; 5.7. Diperoleh hubungan linear yang sangat signifikan antara ekspresi p53, bax, bcl-2 , caspase-7 dengan jumlah sel apoptotik kanker payudara manusia T-47D setelah ditreatment dengan 10, 50 dan 100 μ g/ml pinostrobin dan inkubasi 24 jam, secara berturut-turut menunjukkan harga R 0,961 (signifikansi =0,019) ; R 0,897 (signifikansi 0,004) ; R 0,881 (signifikansi 0,000) ; R 0,885 (signifikansi 0,013) dan R 0,947 dengan signifikansi 0,000. Sedangkan untuk inkubasi 48 jam menunjukkan hubungan linier yang signifikan , secara berturut-turut menunjukkan harga R 0,988 (signifikansi =0,002) ; R 0,985 (signifikansi 0,000) ; R 0,993 (signifikansi 0,000) ; R 0,963 (signifikansi 0,000) dan R 0,988 dengan signifikansi

0,000. Demikian juga untuk inkubasi 72 jam menunjukkan hubungan linier yang signifikan, secara berturut-turut menunjukkan harga R 0,985 (signifikansi =0,031); R 0,978 (signifikansi 0,000); R 0,963 (signifikansi 0,000); R 0,924 (signifikansi 0,016) dan R 0,965 dengan signifikansi 0,000. Dengan demikian dapat disimpulkan jika mekanisme apoptosis senyawa pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb terhadap sel kanker payudara manusia T-47D yaitu melalui jalur aktivasi p53, yaitu melalui aktivasi bax, menurunkan aktivasi bcl-2, aktivasi caspase-7 serta melalui hambatan ekspresi COX-2.

Mekanisme apoptosis dari pinostrobin melalui jalur instrinsik atau p53 – bax, hal ini didasarkan pada aktivitas pinostrobin sebagai inhibitor DNA topoisomerase. Menurut Hsiang (1989) dan Joseph (1989) dengan dihambatnya aktivitas enzim DNA topoisomerase oleh senyawa inhibitor, maka proses terjadinya ikatan tertier antara enzim dengan DNA sel kanker dan senyawa pinostrobin semakin lama. Sehingga akan terbentuk *Protein Linked DNA Breaks* (PLDB), akibatnya terjadi kerusakan DNA sel kanker. Kerusakan DNA sel kanker payudara manusia T-47D dengan penambahan pinostrobin ditunjukkan adanya fragmentasi DNA sel kanker. Dengan adanya kerusakan DNA dapat merangsang terjadinya apoptosis melalui aktivasi *tumor suppressor gen p53* (Nagata, 1998; Cotran, 1999; Burn & El-Deirey, 1999).

Sinyal transduksi apoptosis dalam sel kanker adalah kompleks, dipengaruhi oleh beberapa faktor baik faktor internal maupun faktor eksternal, sehingga mekanisme suatu senyawa bioaktif dalam proses memacu apoptosis juga bisa secara simultan melalui berbagai jalur. Seperti yang dilaporkan oleh Kuo (1996) dimana melaporkan senyawa kurkumin selain memiliki aktivitas induksi apoptosis sel kanker melalui

jalur p53 – bax , juga melalui mekanisme sebagai inhibitor enzim COX-2 dan sekaligus sebagai supresor atau menghambat transkripsi gen COX-2 (Zang *et al.*, 1999) . Demikian juga menurut Avis (1996) beberapa jenis sel kanker manusia seperti kanker paru, kanker kolon, kanker prostat, kanker payudara terjadi *up regulation* atau regulasi naik dari ekspresi gen *Cyclooxygenase-2* (COX-2), dan 5-Lypooxygenase (5-LO). COX-2 adalah enzim penting bagi sintesis *proinflammatory prostaglandins*. Dengan over ekspresi COX-2 dan 5-LOX pada sel kanker payudara manusia maka akan dapat menyebabkan beberapa manifestasi yaitu meningkatkan proliferasi sel kanker , apoptosis dihambat, angiogenesis dihambat dan menghambat p53 yang menginduksi kematian sel. Karena senyawa pinostrobin memiliki aktivitas antiinflamasi (Heyne,1997; Mirzoeva and Calder,1996) sehingga hipotesa penelitian dapat dibuktikan apabila aktivitas pinostrobin dalam memicu apoptosis sel kanker payudara manusia T-47D melalui jalur inhibisi ekspresi COX-2.

Hubungan antara p53 dengan apoptosis diatas memang memiliki peran besar dalam timbulnya apoptosis , dimana p53 sendiri dikenal sebagai *tumor suppressor gene* dimana telah dibuktikan bahwa p53 mengalami mutasi pada lebih 50% tumor dan mengalami hambatan fungsi pada sebagian tumor yang lain. Hal itu terjadi karena p53 berperan besar dalam mengatur siklus sel, perbaikan DNA dan aktivasi bax. Struktur p53 terdiri dari gugus N-terminal transaktivasi, gugus kaya prolin, gugus *DNA-binding* spesifik, gugus tetramerisasi, dan ekor *basic C-terminal*. Gugus N-terminal transaktivasi berguna untuk pengaturan stabilitas p53 di dalam sel, gugus kaya prolin berguna untuk menekan pertumbuhan sel, gugus *DNA-binding* spesifik berguna untuk menempelnya p53 pada DNA di mana penempel ini berefek

menghambat proses transkripsi, dan gugus ekor *basic C-terminal* berfungsi untuk menempelnya p53 pada rantai tunggal DNA di mana hal ini menyebabkan p53 dapat berfungsi lebih lanjut pada proses berhentinya siklus sel, aktivasi GADD45 pada proses perbaikan DNA, dan aktivasi bax pada apoptosis. (Burn & El-Deirey, 1999 ; Cotran, 1999).

Apoptosis dikontrol oleh rasio dari beberapa anggota famili bcl-2 . Jika level dari promotor apoptosis seperti bax meningkat, apoptosis dapat terjadi dan dipercepat, namun jika inhibitor dari apoptosis seperti bcl-2 dan bcl-XL meningkat maka sel dipengaruhi untuk resisten terhadap respon apoptosis dari stimulus eksternal. Laporan sebelumnya menunjukkan bahwa perubahan hasil rasio protein pro apoptosis dan anti apoptosis diduga akan menyebabkan apoptosis, dan dengan perbandingan bax : bcl-2 yang cukup tinggi (Reed *et al.*, 1996) .

Caspases pro apoptotik dibagi menjadi dua kelompok, yaitu *initiator caspases* atau caspase inisiator mencakup procaspase -2, - 8, - 9 dan - 10, dan ke dalam kelompok *executioner caspases* atau caspase eksekutor mencakup procaspases-3, - 6, dan - 7. Sedangkan caspase eksekutor hanya memiliki prodomains pendek, caspase inisiator memiliki prodomain yang panjang , berisi *death effector domains* (DED) di dalam kasus procaspase -8 dan - 10 atau *caspase recruitment domains* (CARD) seperti di kasus procaspase-9 dan procaspase-2. Melalui prodomain ini, caspase inisiator direkrut untuk mengaktifkan *death inducing signalling complexes* (DISC) , dan akan memberikan respon terhadap ligasi dari *cell surface death receptors* (jalur

ekstrinsik) atau sebagai jawaban atas sinyal yang berasal dari di dalam sel atau jalur instrinsik (Nagata , 1998).

Hasil penelitian menunjukkan senyawa pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb mampu menginduksi apoptosis sel kanker payudara manusia T-47D, hal ini sejalan dengan laporan Choi (2001) yang menyebutkan senyawa quersetin dapat menginduksi apoptosis dan induksi *cell cycle arrest* terhadap sel kanker payudara manusia MCF-7. Pinostrobin dan quersetin adalah termasuk senyawa golongan flavonoid , sehingga dimungkinkan adanya kemiripan struktur dan gugus-gugus fungsi tertentu yang bertindak sebagai gugus reaktif, yang bertanggung jawab terhadap mekanisme ikatan obat dengan molekul target baik enzim DNA Topoisomerase maupun enzim COX-2.

Kemampuan pinostrobin yang mampu mengaktivasi p53 dari sel kanker payudara manusia TD-47 maka diduga senyawa pinostrobin mampu menghambat proses angiogenesis atau proses penyebaran kanker ke dalam jaringan lain , sebab dengan aktivasi p53 maka akan terjadi penurunan aktivitas faktor penyebab terjadinya angiogenesis seperti VEGF (*Vascular Endothel Growth Factor*).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) konsentrasi 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ memiliki aktivitas induksi apoptosis terhadap sel kanker payudara manusia TD-47.
2. Mekanisme aktivitas induksi apoptosis dari senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) terhadap sel kanker payudara manusia TD-47 melalui aktivasi p53, bax, caspase-7 dan penurunan aktivitas bcl-2.

6.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap pengaruh pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) terhadap proses angiogenesis sel kanker kanker secara *in vitro* atau *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ate, G.J., et al. 1991. P-Glycoprotein Expression and DNA Topoisomerase I and II Activity in Benign Tumors of the Ovary, Before and After Platinum Cyclophosphamide Chemotherapy, **Cancer Research**, 51, 11, 5915-5920.
- Bail,L., Aubourg L., Habrioux G., 2000. Effect of pinostrobin on estrogen metabolism and estrogen reseptor transactivation, **Cancer Lett**, Aug, 1;156910;37-44.
- Cumming,J., Smyth,J.F.,1993. DNA Topoisomerase I and II as target of Rational Design of New Anticancer Drugs, **Ann Oncology**, Aug, 3(7), 533-534.
- Cotran RS, Kumar V, Collin T. 1999. **Neoplasia in Robbins Pathologic Basic of Disease**, Sixth Edition, Philadelphia : W.B. Saunders Company, pp 260-325.
- Constantinu,A. et al.1995.,Flavonoids as DNA Topoisomerase Antagonists and Poison : Structure-Activity Relationship, **J. Natural Product**, Vol:58,No.2, 217-225.
- Dalimartha S., 2002. **Ramuan Tradisional untuk Pengobatan Kanker**, PT Penebar Swadaya.
- Ermawati,M,1996. Uji antikanker senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci pada kultur sel kanker payudara manusia, **Skripsi**, Fakultas Farmasi ,UNAIR.
- Evan. G and Littlewood. T.D. 1998. A Matter of Life and Cell Death, **Science**. 281 : 1317-1322.
- Hsiang, Y.H., et al. 1989. Arrest of Replication Fork by Drug-stabilized Topoisomerase I-DNA Cleavable Complexes as a Mechanism of Cell Killing by Camptothecin, **Cancer Research**, 49, 5077-5082
- Husain, I. et al. 1994. Elevation of Topoisomerase I Mesenger RNA, Protein and Catalytic activity in Human Tumors : Demonstration of Tumor-type Specificity and Implication for Cancer Chemotherapy, **Cancer Research**, 54, 1, 539-546.
- Joseph,M.C. et al.1989. Protein-linked DNA strand Breaks Induced in Mammalian Cells by Camptothecan Inhibitor of Topoisomerase I, **Cancer Research**, 49, 10, 5016-5022.

- Kawada,S., et al. 1991. Induction of Heat-stable Topoisomerase II-DNA Cleavable Complex by Nonintercalative Terpenoides, Terpentecin and Clerocidin, **Cancer Research**, 51, 2922-2925, June 1.
- Knut,R.M. and James J.C. 1992. Overexpression of Human Topoisomerase I in Baby Hamster Kidney Cells : Hypersensitivity of Clonal Isolates to Camptothecin, **Cancer Research**, 52, 2, 525-532.
- Kobayasi,Y. et al.1995.Inhibitor of DNA Topoisomerase I and II Isolated from the Coptis Rhizomes, **Planta Medica**,61,414-418.
- Markam, K.R., 1988. **Cara Identifikasi Flavonoid**, Penerbit ITB Bandung.
- Matsumoto, Y., 1993. Quantitative analysis of DNA topoisomerase I activity in human and rat glioma : characterization and mechanism of resistance to antitopoisomerase chemical, camptothecin-11, **Journal Surgical Oncology**, Juny 53(2), 97-103.
- Mardiswoyo,S dan Harsono,R.,1968, **Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang**, Cetakan II.
- Murray.,R, 1994. Kanker Onkogen dan Faktor-faktor Pertumbuhan, Harper (Ed) dalam **Biokimia**.
- Nagata ,S. 1997. Apoptosis by Death Factor, **Cell**. 88 : 355 – 365.
- Parwata, 1998, Isolasi Senyawa Pinostrobin dan Standarisasi Ekstrak Etanol Rimpang temu Kunci (*Kempferia pandurata* Roxb) Berdasarkan Parameter Kadar Senyawa Pinostrobin, **Tesis**, Pasaca Sarjana , Universita Airlangga, Surabaya.
- Peter.M.E., Houfelder.A.E., and Heugartner,M.O., 1997. Advance in Apoptosis Research, **Proc. Acad. Sci, USA**, 94 : 12736-12737.
- Pommier,Y. 1993. DNA Topoisomerase I and II in Cancer Chemotherapy : Update and Prospective : **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, 32 (2) , 103-108.
- Salmon, S. 1995. Kemoterapi Kanker dalam buku : Katzung ,B.G. 1995; **Farmakologi Dasar dan Klinik**, Edisi VI.
- Spector,D. 1998. **Cells, A Laboratory Manual, Subcellular Localization of Genes and Their Product**, Volume 3.

- Sukardiman, Hadi P., Sofia M., Sismindari . 2000. Penapisan Senyawa Antikanker dari Tanaman Obat Indonesia dengan Molekul Target Enzim DNA Topoisomerase, **Laporan Penelitian Domestic Collaborative Research Grant (DCRG)**.
- Sukardiman, 1999-2000. Mekanisme sitotoksik senyawa flavonoid dari temu kunci (*Kaempferia pandurata*) terhadap kultur sel kanker payudara manusia, **Penelitian Risbin IPTEKDOK**.
- Sudoyo,H., 1997. Pendekatan Biomolekuler untuk Penemuan Obat Baru dari Sumber Daya Alam dalam Perspektif Indonesia, **Cermin Dunia Farmasi**, No 31, hal 9-11.
- Tjay, T. H., Rahardja, K., 2002. **Obat-Obat Penting. Khasiat, Penggunaan, Efek-Efek Sampingnya**. Jakarta: PT Elex Media Komputindo. Hal. 197-227.
- Wittmann S, Bali P, Donapaty S, Nimmanapalli R, Guo F, Yamaguchi H, Huang M, Jove R, Wang HG & Bhalla K. (2003). Flavopiridol down-regulates antiapoptotic proteins and sensitizes human breast cancer cells to epothilone B-induced apoptosis. **Cancer Res** 63: 93–99.
- Zahir,A .,1996.,DNA Topoisomerase I Inhibitors : Cytotoxic Flavones from *Lethedon tannaensis*, **J.Natural Product**, 59, 701-703.

