



LAPORAN PENELITIAN
PROGRAM PENELITIAN DASAR
TAHUN ANGGARAN 1998/1999

KKB
KK
015-324 39
Rak
u

**UJI AKTIVITAS ANTI MUTAGENIK SENYAWA PINOCEMBRIN
DARI RIMPANG *Kaempferia pandurata* Roxb.
DENGAN METODA *UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS*
PADA KULTUR HEPATOSIT TIKUS**

3000179 023141

Peneliti :

**Rakhmawati,
Mulja Hadi Santosa
I Made Oka Adi Parwata**

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**Dibiayai oleh Proyek Penelitian Ilmu Pengetahuan Dan Teknologi Dasar
DIP Nomor : 185/XXXIII/3/1998 Tanggal 31 Maret 1998
Kontrak Nomor : 17.E/PPID/DPPM/V/1998
Ditbinlftabmas, Ditjen Dikti, Depdikbud**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
Juni 2001**



DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

LEMBAGA PENELITIAN

Jl. Muljorejo – Surabaya, Telp. (031) 5995246

IDENTITAS DAN LEMBAR PENGESAHAN LAPORAN HASIL AKHIR PENELITIAN

1.	UJI AKTIVITAS ANTI MUTAGENIK SENYAWA
a. Judul Penelitian	PINOCEMBRIN DARI RIMPANG <i>Kaempferia</i> <i>pandurata</i> Roxb. DENGAN METODA UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS PADA KULTUR HEPATOSIT TIKUS
b. Macam Penelitian	() Fundamental () Terapan () Pengembangan
c. Kategori Penelitian	() I () II () III
2. Kepala Proyek Penelitian	
a. Nama lengkap	Dra.Rakhmawati,Apt.
b. Jenis Kelamin	Wanita
c. Pangkat/Golongan/NIP	Penata Muda; III/B NIP 131570351
d. Jabatan	Asisten Ahli
e. Fakultas/Jurusan	Farmasi / Biologi Farmasi
f. Perguruan Tinggi	Universitas Airlangga - Surabaya
3. Jumlah Tim Peneliti	3 orang
4. Lokasi penelitian	Laboratorium Bioteknologi Farmasi
5. Kerjasama dengan inst.lain	—
6. Jangka waktu penelitian	6 (enam) bulan
7. Total Biaya	Rp. 13.610.000,00
8. Seminar hasil penelitian Diselenggarakan Tanggal	
9. Hasil penelitian	() Amat baik () Baik () Sedang () Kurang

Surabaya, 25 Juni 2001

Peneliti Utama

Dra.Rakhmawati,Apt.
NIP 131570351



Mengetahui :
Dekan Fakultas Farmasi

Prof. Dr. Fasich
NIP 130517155



Mengetahui :
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Airlangga

Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S.
NIP 130701125



- CANCER

- DNA

- MUTAGENIS

RINGKASAN

UJI AKTIVITAS ANTI MUTAGENIK SENYAWA PINOCEMBRIN DARI RIMPANG *Kaempheria pandurata* Roxb. DENGAN METODA UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS PADA KULTUR HEPATOSIT TIKUS (Rakhmawati *, Mulja Hadi Santosa *, I Made Oka Adi Parwata ** 2001 65 halaman).

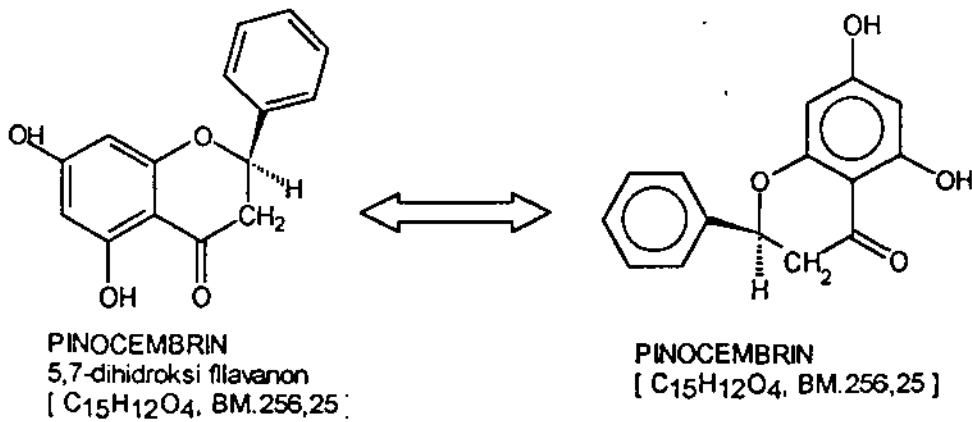
Penanganan masalah kanker pada saat ini lebih banyak ditujukan pada tindakan pengobatan. Padahal peran perkembangan pengobatan kanker masih jauh dari apa yang diharapkan oleh seluruh umat manusia. Hal ini disebabkan penderita kanker banyak diketemukan dalam keadaan fase lanjut, sehingga pengobatan hampir tidak bermanfaat. Oleh karena itu tindakan pencegahan merupakan pilihan yang terbaik untuk peningkatan kasus baru penderita kanker, sesuai dengan paradigma kesehatan di Indonesia yang didengungkan oleh pemerintah, yaitu paradigma preventip.

Secara umum tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh senyawa yang dapat mencegah terjadinya kanker. Untuk tujuan tersebut dipilih pinocembrin dari rimpang temu kunci sebagai bahan uji penelitian. Dengan mengukur kemampuan pinocembrin mencegah terjadinya mutasi pada kultur sel hepatosit.

Dari studi yang telah dilakukan, diperoleh beberapa konsep yang telah dicapai hingga saat ini yang akan digunakan untuk memecahkan masalah penelitian. Pinocembrin memiliki aktivitas sitotoksik dengan uji brine shrimp lethality test (Mulyadi, 1995). Pinocembrin juga menghambat EROD (Ethoxy Resorufin O-Diethylase), suatu enzim yang digunakan untuk menyatakan aktivasi karsinogenesis isoenzim P450 (M.H. Seuess, 1995). Hal ini menunjukkan bahwa pinocembrin memiliki kemungkinan sebagai anti mutagenik. Pinocembrin terbukti menghambat karsinogenesis benzo(a)pyrene pada sel embrio hamster (Y.L., Liu, 1992). Hal ini juga menunjukkan bahwa pinocembrin memiliki kemungkinan sebagai anti mutagenik.

082 - 101

12/6 '02



Gambar-1 : Struktur pinocebrin (flavonoida ubiquiter) terkandung dalam rimpang Temu Kunci.

Isolasi, penentuan struktur molekul dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) yang telah dilakukan didapatkan struktur dari pinocebrin sebagai berikut (Mulyadi Tanjung 1995). adanya dua gugus hidroksil pada pinocebrin dapat diperkirakan pinocebrin memiliki sifat sebagai reduktor (anti oksidan), sehingga bisa menghambat terjadinya mutasi dengan mekanisme mencegah terjadinya alkilasi atau asilasi DNA.

Penelitian terdiri dari 3 (tiga) tahapan yaitu : 1. Mengisolasi pinocebrin dari rimpang Temu Kunci. 2. Menentukan aktivitas anti radikal bebas DPPH pinocebrin. 3. Menentukan aktivitas mutagenik Hidrazin HCl dengan mengukur jumlah [3H] timidin beberapa waktu tertentu setelah pemberian hidrazin sebagai kontrol bahan mutagenik.

Hasil penelitian : 1. Dari rimpang Temu Kunci dapat diisolasi pinocebrin dengan kemurnian tidak kurang dari 93% berdasarkan data luas puncak kromatogram HPLC. 2. Pinocebrin hasil isolasi dalam konsentrasi 100 ppm tidak mempunyai aktivitas (2,50%) penangkap radikal bebas DPPH (difenil pikril hidrazil). Aktivitas pada konsentrasi 500 ppm hanya sebesar 16,25%. Sedangkan pada konsentrasi 1000 ppm selama reaksi 1 jam sebesar 21,67%. 3. Hidrazin HCl dalam konsentrasi 100 ppm mempunyai bioaktivitas mutagenik terhadap sel hepatosit.

Bioaktivitas antimutagenik tidak perlu dilakukan karena alasan efisiensi penelitian, disarankan diganti metoda lain yang dapat mengukur langsung pengaruhnya terhadap parameter system repair mutasi DNA.

(* Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, ** Fakultas MIPA Universitas Udayana, Kontrak Nomor 513/JO3.12/PL/1998)

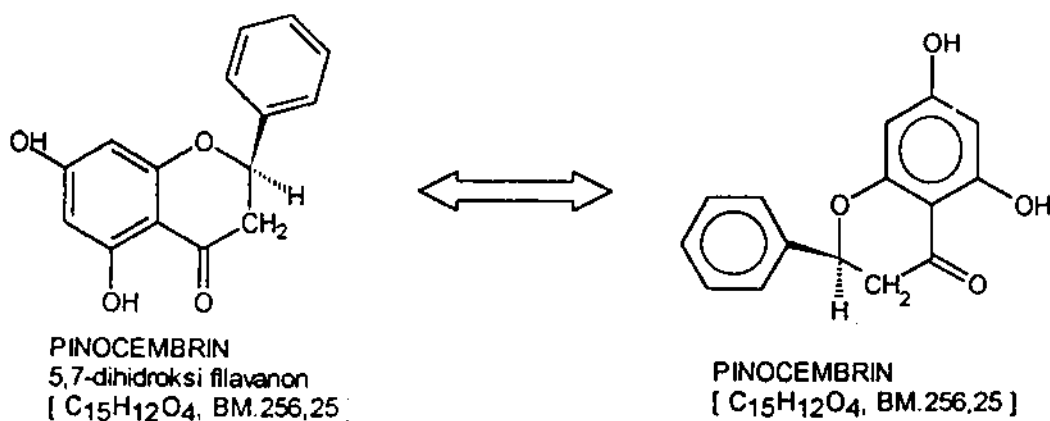
STUDIES ON PINOCEMBRIN ANTIMUTAGENIC ACTIVITY BY UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS METHODE ON RAT HEPATOCYTOCULTURE

Rakhmawati, Mulja Hadi Santosa, I Made Oka Adi Parwata.

Advances in prevention and treatment of cancer will require development not only chemotherapeutic but also chemopreventive agents, because in cancer drug development a little drug has achieved cure the diseases. This situation suggests that new direction must be taken in the approach to discovery cancer drug. Screen drug design made not only for cytotoxic agents but also non cytotoxic agents which might prevent the development of cancer.

The aim of this research is result compound which prevent the development of cancer. For this needed pinocembrin from *Kaempferia galanga* Roxb was chosen.

Mulyadi, 1995, has been working on isolation and structure determination of pinocembrin, analysis of UV, IR, NMR and MS was established. The structure of pinocembrin is shown below :



The invitro effects of pinocembrin on monooxygenase activities from human and rat liver has investigated. Investigation resulted pinocembrin inhibit activity of Ethoxy resorufin O-deethylas (EROD) as marker activities of P450 isoenzym involved in

carcinogen activities (M.H. Seiss, 1995). Pinocebrin also inhibit the metabolism of the carcinogen benzo(a)pyrene by hamster embryo cells in tissue culture (Y.L. Liu, 1992). From those researchs were assumed, pinocebrin which has two hydroxyl groups can inhibit mutagenic activity or has antimutagenic properties.

In present research determination as follow : 1. Isolation and structure determination of pinocebrin. 2. Free radical scavenging action of pinocebrin. 3. Mutagenic activity of hidrazine HCl by unscheduled DNA synthesis method.

The result are : 1. Based on peak area by HPLC method, pinocebrin has purity ± 93 %. 2. Pinocebrine hasnot ability to scavenge free radical at concentration 100 ppm (2,50%). Pinocebrine has ability to scavenge free radical at concentration 500 ppm (16,25%). Pinocebrin has ability to scanvenge free radical at concentration 1000 ppm (21,67%). 3. Hidrazin HCl has mutagenic activity on rat hepatocyt culture at concentration 100 ppm.

For efficiency reason, antimutagenic activity of pinocebrin by unscheduled DNA synthesis method didn't observe. Suggested unscheduled DNA synthesis method was replaced with method that measure DNA repair enzym parameter.

(*Faculty of Pharmacy, Airlangga University, ** Faculty of MIPA, Udayana University

KATA PENGANTAR

Kami tim peneliti mengucapkan syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena telah berhasil menyelesaikan proyek penelitian ini walaupun melebihi waktu yang direncanakan. Tanpa ijin-Nya kami tidak mungkin dapat memperoleh sedikit ilmu yang bermanfaat dari penelitian ini.

Terima kasih yang sebesar-besarnya kami sampaikan kepada pihak yang telah memberikan, menyalurkan dan ikut mengurus dana keuangan penelitian, sehingga uang dapat sampai kepada kami semuanya. Dengan dana ini kami berhasil satu langkah lagi dalam rangkaian usaha pengembangan metoda alternatif untuk percobaan hewan, yang kali ini untuk aplikasi uji bioaktivitas anti mutagenik zat kandungan hasil isolasi dari tanaman obat Indonesia, yaitu Temu Kunci.

Terima kasih pula kami sampaikan kepada sejawat di Laboratorium Hewan Universitas Airlangga di gedung Fakultas Farmasi, yang menyediakan hewan percobaan. Kepada teman sejawat staf pengajar di fakultas farmasi Unair terutama Dr.Djoko Agus purwanto dan sejawat mahasiswa tingkat skripsi yang membantu kami, kami mengucapkan banyak terima kasih yang tulus,

Penelitian ini masih akan berlanjut, kami senantiasa bersedia berkomunikasi dengan para sejawat yang sebidang ilmu ataupun kami bersedia menerima kritik dan saran demi berlanjutnya program penelitian bioteknologi farmasi umumnya dan kultur sel mamalia khususnya di Laboratorium Bioteknologi Farmasi - Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Peneliti

DAFTAR ISI

BAB	I S I	HALAMAN
RINGKASAN		i
SUMMARY		iii
KATA PENGANTAR		v
DAFTAR ISI		vi
DAFTAR TABEL		viii
DAFTAR GAMBAR		ix
DAFTAR LAMPIRAN		xi
I	PENDAHULUAN	
	1.1 Latar belakang masalah	1
	1.2 Rumusan masalah	3
	1. Tujuan dan manfaat penelitian	4
II	TINJAUAN PUSTAKA	
	2.1. Perubahan struktur DNA dan Mekanisme Perbaikan	6
	2.2 Tinjauan Tentang Mutasi Gen	7
	2.3 Hubungan antara Mutagenik dan Karsinogenik	10
	2.4 Tinjauan Tentang Liquid Scintillation Counter	12
	2.5 Rimpang Temu Kunci dan pinocembrin	15
III	TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	17
IV	METODE PENELITIAN	
	4.1. Bahan penelitian	19
	4.2. Peralatan penelitian	20
	4.3 Metode Penelitian Anti mutagenik	21
	4.4. Prosedur kerja	
	1 Penyiapan Sampel atau Bahan Penelitian	22
	2 Isolasi dan penentuan struktur pinocembrin	23
	3 Analisis HPLC pinocembrin hasil isolasi	24
	4 Uji antiradikal bebas DPPD	27
	5 Preparasi sel hepatosit tikus	32
	6 Melapisi petri dish dengan collagen	40
	7 Percobaan kultur hepatosit	41
	8 Pengukuran UDS	41
	9 Pengukuran jumlah relatip DNA	44
	10 Analisis data	45

LANJUTAN

DAFTAR ISI

BAB	ISI	HALAMAN
V	HASIL DAN PEMBAHASAN	
	5.1. Hasil isolasi pinocembrin	
	1 Isolasi pinocembrin	46
	2 Analisis fitokimia	46
	5.2 Hasil uji aktivitas penangkap radikal bebas DPPH	52
	5.3 Penentuan kecermatan Metode Unscheduled DNA Synthesis	53
	5.4 Pemeriksaan kondisi percobaan	55
	5.5 Penentuan efek mutagenik	58
VI	KESIMPULAN DAN SARAN	
	6.1 Kesimpulan	61
	6.2 Saran	62
VII	DAFTAR PUSTAKA	63
	LAMPIRAN	
1.	KOMPOSISI MEDIA PERFUSI DAN DISINTEGRASI	66
2.	KOMPOSISI LARUTAN DAPAR SEGLEN-SB	67

DAFTAR TABEL

NO	TABEL	Hal
1.	Hasil pengujian aktivitas penangkap radikal bebas DPPH pinocembrin.	53
2.	Aktifitas radioaktif kelompok kontrol untuk menentukan kecermatan metode <i>unscheduled DNA synthesis</i> .	55
3.	Aktifitas radioaktif timidin sebelum ditambahkan pada kultur hepatosit	56
4.	Aktifitas radioaktif filtrat cucian sebelum pemecahan sel.	57
5.	Aktifitas radioaktif hasil digesti pada endapan akhir.	58
6.	<i>Unscheduled DNA synthesis</i> karena pengaruh hidrazin HCl	60

DAFTAR GAMBAR

NO	GAMBAR	Hal
1.	Struktur pinocembrin (flavonoida ubiquiter) yang juga terkandung dalam rimpang Temu Kunci	4
2.	Zat kandungan terbesar dalam rimpang Temu Kunci adalah pinostrobin dan yang diteliti adalah pinocembrin	15
3.	Skema ekstraksi dan isolasi pinocembrin dari rimpang Temu Kunci	26
4.	Reaksi peredaman radikal bebas difenilpicrilhidrazil (DPPH) oleh zat antiradikal bebas (RH), menjadi difenilpicrilhidrazin.	28
5.	Contoh teoritik spektra standar DPPH (SS) dan spektra pengujian suatu ekstrak (SU). Dengan data absorban pada 497, 507 dan 537 nm, dihitung peredaman puncak 517 nm sebagai kapasitas antiradikal bebas dengan rumus $[1 - U/S] 100\%$	29
6.	Skema peralatan untuk perfusi-resirkulasi hepar tikus : Media perfusi (atau disintegrasi) dalam botol media [A] di dalam "water bath " 37° C, dipompa oleh pompa peristaltik [B] keluar dan masuk ke hepar tikus [C] lewat vena porta. Media keluar dari hepar dialirkan kembali ke botol media dengan pompa peristaltik.	31
7.	Tahap-I : Tikus dianestesi , diletakkan pada papan operasi, difiksir kuat, kemudian rongga peritoneal dibuka dengan sayatan bentuk huruf U	32
8.	Tahap-II : Rongga peritoneal terbuka disisihkan viseral sehingga nampak vena porta dan hepar kemudian disiapkan ligatur pada vena porta dan vena cava inferior	33
9.	Tahap-III : Kanula perfusi dimasukkan ke vena porta dengan memotong vena dan mengikat erat ligaturnya dalam hal ini bersamaan cairan perfusi dialirkan masuk hepar dan keluar vena cava inferior yang terpotong sehingga nampak hepar memucat	34

Lanjutan

DAFTAR GAMBAR

NO	GAMBAR	Hal
10.	Tahap-IV : Kondisi perfusi hepar, cairan masuk vena porta, sementara cairan perfusi keluar melalui vena cava inferior yang masih terbuka ligaturnya	36
11.	Tahap-V : Rongga torak dibuka, nampak jantung dan vena hepatica, kemudian disiapkan ligaturnya untuk nantinya dilakukan pemasangan kanula ke-2 melalui bilik jantung	37
12.	Tahap-VI : Tahap akhir, ligatur pada vena inferior ditutup rapat, terjadilah perfusi sirkulasi, cairan perfusi dari pompa peristaltik masuk vena porta keluar melalui vena hepatica kembali ke sistem pompa peristaltik	38
13.	Skema percobaan uji anti mutagenik pinocembrin terhadap mutagen hidrazin-HCl dengan metoda "UDS" pada kultur hepatosit tikus dengan data " ³ H]Timidin uptake" pada Beta Liquid scintillation Counter	42
14.	Spektra ultraviolet (UV) pinocembrin hasil isolasi dan pinostrobin	48
15.	Hasil analisis HPLC pinocembrin [A] dan pinostrobin [B] hasil isolasi pada kolom " Nucleosil 120-5 C ₈ " dengan eluasi gradien mulai 10% metanol + 90% air, sampai 100% metanol selama 25 menit dengan kecepatan 1 ml/menit, dilanjutkan eluasi metanol 100% selama 5 menit kecepatan 1,5 ml/min, total waktu 30 menit. Deteksi pada λ 280nm	49
16.	Spektra infra merah (FT-IR) pinocembrin hasil isolasi	50
17.	Spektra ¹ HNMR pinocembrin hasil isolasi dengan instrumen Hitachi 5000 NMR Spektrometer 2,14 Tesla	51
18.	Spektra masa pinocembrin dengan alat Jeol DX-303 GC-MS dengan kondisi <i>direct inlet</i> , EI 100 mA, 70 eV, suhu \rightarrow 300 °C	52
19	Skema reaksi kemampuan pelepasan radikal hidrogen dalam aktivitas penangkap radikal bebas DPPH turunan dihidroksi flavanon (pinocembrin dan isomernya)	55
20	Spektra pengukuran aktivitas antiradikal-DPPH pinocembrin pada konsentrasi 1000 ppm. Puncak DPPH teredam 21,67%	55

DAFTAR LAMPIRAN

NO	LAMPIRAN	Hal
1	KOMPOSISI MEDIA PERFUSI DAN DISINTEGRASI	66
2	KOMPOSISI LARUTAN DAPAR SEGLEN-SB	67

BAB I

PENDAHULUAN

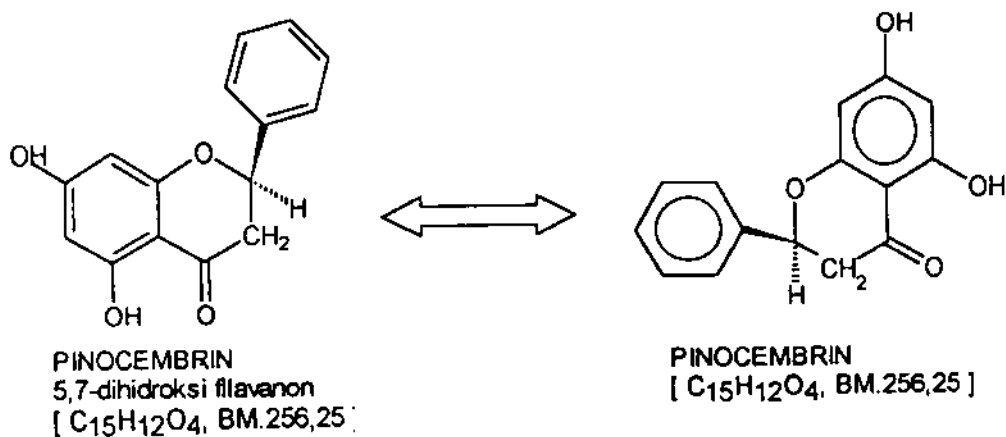
1.1. Latar Belakang Masalah

Ditinjau dari konsep biologi molekuler, mutasi adalah suatu perubahan urutan dan jenis nukleotida-nukleotida yang menyusun DNA. Jika mutasi yang terjadi pada suatu gen dan dapat terekspresikan, akan menyebabkan perubahan pada fenotip dan genotip dari sel. Penyebab mutasi dapat bermacam-macam. Mutasi spontan terjadi karena kesalahan metabolisme atau kesalahan selama replikasi DNA diakibatkan oleh lingkungan indogen yang tidak diketahui, sedangkan mutasi induksi disebabkan unsur mutagenik seperti radiasi sinar pengion atau bahan kimia yang menyebabkan terganggunya struktur DNA. Mutasi dapat berbeda atau sama dengan karsinogenesis. Dari kenyataan terbukti karsinogenesis dimulai dari mutasi yang menghasilkan kelainan genetik. Interaksi karsinogen kimiawi atau pengaruh fisika seperti radiasi sinar ultra violet dengan material genetik sel somatik menyebabkan mutasi yang menimbulkan *the heritable nature* dari tumor serta evolusi sel malignan *in vivo*. Bishop (1989) membuktikan hampir semua sel kanker terdapat kelainan/perubahan genetik tertentu (onkogen). Demikian berbahayanya mutasi pada gen, sehingga perlu dicegah mutasi pada gen sehingga tidak berlanjut terjadinya kanker.

Berdasar pemikiran diatas untuk pencegahan mutasi perlu dicari senyawa (bahan obat) yang dapat menghambat / mencegah terjadinya. Pada penelitian ini dicoba pinocembrin dari rimpang Temu Kunci yang di Indonesia sebagai bumbu masak dan telah lama diketemukan dalam

tanaman, sedangkan keterkaitan dengan prevensi kanker (antimutagenik) digunakan paramater UDS (*unschedule DNA synthesis*).

Perhatian terhadap pinocembrin sebagai anti mutagenik didasarkan pada penelitian yang menyatakan bahwa pinocembrin menghambat EROD (Ethoxy resorufin O-deethylase), suatu enzim yang digunakan untuk menyatakan aktivasi karsinogenesis isoenzim P450 (M.H. Seless, 1995). Hal ini menunjukkan bahwa pinocembrin memiliki kemungkinan sebagai anti mutagenik, Pinocembrin terbukti menghambat karsinogenesis benzo(a)pyrene pada sel embrio hamster (Y.L., Liu,1992). Hal ini juga menunjukkan bahwa pinocembrin memiliki kemungkinan sebagai anti mutagenik. Pinocembrin memiliki aktivitas sitotoksik dengan uji brine shrimp lethality test (Mulyadi, 1995). Uji ini merupakan uji antikanker menggunakan larva brine shrimp dan dilaporkan memiliki korelasi yang bagus dengan uji antikanker menggunakan sel 9 KB ($p=0,036$, $kappa=0,56$) (Laughlin, Mc, 1989), sel P-388 ($p=0,033$ dan $kappa=0,78$), sel A-549 dan HT-29 (Anderson, 1991).



Gambar-1 : Struktur pinocembrin (flavonoida ubiquiter) yang juga terkandung dalam rimpang Temu Kunci.

Isolasi, penentuan struktur molekul dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) yang telah dilakukan didapatkan struktur dari pinocembrin sebagai berikut (Mulyadi Tanjung 1995). adanya dua gugus hidroksil pada pinocembrin dapat diperkirakan pinocembrin memiliki sifat sebagai reduktor (anti oksidan), sehingga bisa menghambat terjadinya mutasi dengan mekanisme mencegah terjadinya alkilasi atau asilasi DNA. Dari beberapa konsep yang telah dikemukakan para peneliti diatas, maka secara teoritis pinocembrin dapat mencegah terjadinya mutasi, dan hal ini perlu pembuktian secara empiris agar dapat digunakan sebagai landasan ilmiah penggunaan pinocembrin dikembangkan sebagai bahan anti mutagenik melalui pendekatan seluler dengan uji *Unschedule DNA Synthesis* pada kultur sel mamalia, yaitu hepatosit tikus. Uji UDS memiliki satu keuntungan jika digunakan pada kultur sel mamalia (hepatosit) yang secara fisiologis umum dapat korelatif dengan sel manusia, demikian juga kepekaan deteksi dan hubungannya dengan efek karsinogenik lebih baik dibandingkan dengan uji yang lain pada sel bukan mamalia . Uji ini mendeteksi besarnya perbaikan oleh DNA menggunakan indikator banyaknya $[3H]$ timidin yang diperlukan (Waters, R., 1984).

1.2. Rumusan Masalah

Penanganan masalah kanker pada saat ini lebih banyak ditujukan pada tindakan pengobatan. Padahal peran perkembangan pengobatan kanker masih jauh dari apa yang diharapkan oleh seluruh umat manusia. Hal ini disebabkan penderita kanker banyak diketemukan dalam keadaan fase lanjut, sehingga pengobatan hampir tidak bermanfaat. Oleh karena itu

tindakan pencegahan merupakan pilihan yang terbaik untuk peningkatan kasus baru penderita kanker, sesuai dengan paradigma kesehatan di Indonesia yang didengungkan oleh pemerintah, yaitu paradigma preventip.

Untuk memecahkan masalah tersebut dipilih pinocembrin dari rimpang temu kunci sebagai bahan uji penelitian. Pengujian aktivitas anti mutagenik dilakukan tingkat seluler dengan parameter molekuler.

Dari pembahasan latar belakang diatas disusun masalah penelitian sebagai berikut :

Apakah senyawa pinocembrin dapat bersifat sebagai anti mutagenik pada kultur sel hepatosit tikus dengan parameter "uncheduled DNA synthesis"?

1.3. Tujuan Dan Manfaat Penelitian

Tujuan umum dari penelitian ini adalah menguji kemampuan pinocembrin hasil isolasi dari rimpang Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*) apakah dapat menghambat atau mencegah terjadinya mutasi yang disebabkan oleh hidrazin-HCl pada kultur hepatosit tikus, menggunakan indikator banyaknya [3H] timidin (uptake) yang diperlukan untuk perbaikan DNA (uncheduled DNA synthesis = DNA repair).

Untuk keperluan diatas dilaksanakan beberapa tujuan khusus bertahap sebagai berikut :

1. Mengisolasi pinocembrin dari rimpang Temu Kunci
2. Menentukan aktivitas anti radikal bebas DPPH pinocembrin
3. Menentukan aktivitas mutagenik Hidrazin HCl dengan mengukur jumlah [3H] timidin beberapa waktu tertentu setelah pemberian hidrazin sebagai kontrol bahan mutagenik.

4. Menentukan aktivitas antimutagenik pinocembrin dengan mengukur jumlah [3H] timidin beberapa waktu tertentu setelah pemberian hidrazin dan pinocembrin dalam tiga macam konsentrasi.

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah mendapatkan informasi iptek baru bahwa pinocembrin adalah bahan bioaktif yang secara seluler dapat menghambat atau mencegah terjadinya mutasi pada kultur hepatosit tikus. Kalau pinocembrin terkandung dalam rimpang Temu Kunci, maka hasil penelitian merupakan nilai tambah dalam pengembangan produk ekstrak yang lebih bermanfaat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Perubahan struktur DNA dan Mekanisme Perbaikan

Dari penelitian yang dilakukan oleh Oswald T. Avery, Colin MacLeod dan Maclyn McCarty (Maggy, 1994), ditemukan DNA yang diekstrak dari galur ganas bakteri *Streptococcus pneumoniae* secara permanen mengubah galur nonvirulen menjadi bentuk ganasnya. Avery dan koleganya menyimpulkan bahwa DNA yang diekstraksi dari galur ganas tersebut membawa pesan genetik sifat ganas dan sifat tersebut terikat secara permanen pada DNA sel penerima yang tidak ganas.

Alfred D. Hershey dan Marta Chase (Maggy, 1994) melakukan pengamatan dengan pelacakan isotop terhadap bakteriofag T₂ menginfeksi sel inangnya, *E. coli*, maka yang menginfeksi adalah DNA partikel virus T₂, dan bukan bagian proteinnya yang sebenarnya masuk ke dalam sel inang dan memberikan informasi genetik bagi proses replikasi virus.

Dari percobaan awal yang penting ini terbukti DNA adalah material kromosom yang membawa informasi genetik sel. DNA merupakan suatu makromolekul yang terdiri atas nukleotida-nukleotida (Brown, T.A., 1989; Koesmiadji, 1986). Jadi DNA adalah polinukleotida. Antar nukleotida dihubungkan dengan ikatan fosfodiester. Tiap-tiap nukleotida terdiri dari 3 komponen yaitu gula 2-deoksiribose, fosfat, dan basa nitrogen.

Basa nitrogen dari DNA terdiri dari timin, sitosin, adenin dan guanin. Timin dan sitosin memiliki cincin ganda purin, sedangkan adenin dan guanin memiliki cincin tunggal pirimidin. Dalam double heliks DNA, timin

selalu berpasangan dengan adenin sedangkan sitosin selalu berpasangan dengan guanin dengan ikatan hidrogen membentuk suatu anak tangga. Pasangan-pasangan basa ini disangga oleh penunjang yang terdiri dari gabungan gula dan fosfat (Singer, M. 1991) membentuk heliks putar kanan. Untuk mempertahankan strukturnya ini, DNA dilindungi oleh protein-protein yang disebut histon. Meskipun demikian DNA masih dapat mengalami perubahan pada strukturnya karena pengaruh dari senyawa-senyawa tertentu.

Perubahan struktur DNA akibat pengaruh dari luar dapat terjadi pada basa DNA maupun gula pospat sebagai penyangga. Perubahan tersebut dapat terjadi karena (Schirrmacher, V. 1986) :

- a. Alkilasi pada basa DNA.
- b. Eliminasi satu basa.
- c. Putusnya dua rantai DNA
- d. Terjadinya hidrasi
- e. Terikatnya molekul lain
- f. Putusnya satu rantai DNA

2.2. Tinjauan Tentang Mutasi Gen

Mutasi merupakan sumber penting dari semua sumber variasi genetik (Sarma, D.S.R., 1975). Pada proses evolusi diperlukan mutasi. Pada tumbuh-tumbuhan, mutasi induksi diperlukan untuk persilangan sehingga diperoleh mutan yang memiliki kualitas unggul. Akan tetapi seleksi buatan ini tidak mungkin dilakukan terhadap manusia, sehingga keuntungan yang diperoleh bagi hewan dan tumbuhan tidak diperoleh oleh manusia (Koesmiadji, 1986).

Secara molekuler, mutasi adalah perubahan urutan nukleotida yang menyusun rantai DNA (Venitt,S., 1984). Mutasi dapat terjadi pada gen, atau dapat pula terjadi pada daerah intergen. Mutasi yang terjadi pada daerah intergen tidak berpengaruh apapun pada sel, sedangkan mutasi pada gen akan menyebabkan perubahan pada fenotip dan genotip pada sel. Suatu organisme yang mengalami perubahan dalam urutan nukleotidanya sehingga terjadi perubahan fenotip atau genotipnya disebut *mutan*, sedangkan proses terjadinya mutasi disebut *mutagenesis*.

Penyebab mutasi dapat bermacam-macam, tetapi secara garis besar dapat dibagi dua yaitu mutasi spontan dan mutasi induksi (Koesmiadji, 1986). Mutasi spontan terjadi karena kesalahan metabolisme atau kesalahan selama replikasi DNA yang diakibatkan oleh unsur-unsur penyebab mutasi dari endogen yang tidak diketahui penyebabnya. Sedangkan mutasi induksi dihasilkan karena perlakuan unsur mutagenik seperti radiasi pengion atau bahan-bahan kimia yang menyebabkan terganggunya struktur DNA. Perbedaan ini tidak dapat dilihat pada tingkat individu, tetapi harus pada suatu populasi dengan menggunakan kelompok kontrol.

Mutasi yang terjadi pada suatu organisme dapat ditinjau dari 3 aspek (Brown,T.A.,1989) yaitu :

1. Mutasi pada tingkat DNA :

Mutasi ini merupakan hasil dari :

- a. Point mutation, yaitu penggantian satu nukleotida dengan nukleotida yang lain pada rantai DNA. Penggantian ini dapat dalam bentuk transisi atau transversi.

- transisi : jika basa purin diganti dengan basa purin (A \leftrightarrow G) atau basa pirimidin diganti dengan basa pirimidin (T \leftrightarrow C).

- transversi : jika basa purin diganti dengan pirimidin atau sebaliknya (A/G \leftrightarrow T/C).

b. Inseri atau delesi

Yaitu penambahan atau penghilangan satu pasang basa DNA. Penambahan satu pasang DNA disebut inseri, sedangkan penghilangan satu pasang basa DNA disebut delesi.

c. Inversi

Yaitu penghilangan bagian dari dobel heliks DNA yang diikuti dengan inseri pada posisi yang sama tetapi orientasinya terbalik.

2. Mutasi pada tingkat gen

Jika ditinjau dari tingkat gen, maka mutasi dapat dibedakan menjadi :

a. Silent mutation

Yaitu point mutation yang terjadi pada nukleotida ke-3 dari suatu kodon, merubah kodon, tetapi tidak merubah kode asam amino. Mutasi ini tidak merubah fenotip organisme.

b. Missense mutation

Yaitu point mutation yang terjadi pada nukleotida ke-1 atau ke-2, kadang-kadang ke-3 dari suatu kodon, sehingga merubah kode asam amino. Mutasi ini dapat membentuk fenotip mutan dan dapat pula tidak tergantung peran dari asam amino yang termutasi serta toleransi protein terhadap asam amino penyusunnya.

c. Nonsense mutation

Yaitu point mutation yang merubah kodon yang mengkode suatu asam amino menjadi kodon terminasi. Dengan demikian sintesa protein menjadi terputus. Mutasi ini hampir selalu menghasilkan fenotip mutan.

d. **Frameshift mutation**

Yitu mutasi yang disebabkan karena insersi atau defesi. Mutasi ini hampir selalu menghasilkan fenotip mutan.

3. **Mutasi pada tingkat organisme**

Perubahan urutan nukleotida pada DNA menyebabkan perubahan pada gen. Hal ini menyebabkan sel tidak dapat berfungsi karena produk dari gen juga berubah. Apabila sel tidak dapat menyesuaikan diri karena fungsinya tidak sempurna, maka sel akan mati. Mutasi ini disebut *lethal mutation*.

Akan tetapi tidak semua mutasi memberikan pengaruh yang drastis. Masih ada beberapa kemungkinan yang menyebabkan sel dapat hidup yaitu:

a. **Auxotrophic mutant**, Yaitu mutan yang tidak dapat mensintesis sendiri suatu asam amino sehingga harus dipenuhi dari luar sedangkan tipe liarnya dapat. Kebalikannya adalah prototroph, yaitu mutan yang dapat mensintesis suatu asam amino sendiri, sedangkan tipe liarnya tidak dapat.

b. **Conditional-lethal mutant**, Yaitu mutan yang dapat hidup hanya pada keadaan tertentu saja, misalnya suhu tidak lebih dari 30 °C.

2.3. **Hubungan antara Mutagenik dan Karsinogenik**

Hubungan antara perubahan kromosom terhadap terjadinya kanker telah lama dilaporkan oleh Hansemann & Boveri (Nowel, P.C., 1975). Hal ini merupakan awal didaptkannya hubungan antara mutagenik dan karsinogenik.

Mutagenik adalah suatu sifat dimana suatu senyawa dapat menyebabkan mutasi pada DNA sel, sedangkan karsinogenik adalah suatu sifat dimana suatu senyawa dapat menimbulkan kanker. Mutagenik berbeda dengan karsinogenik, tetapi hubungan keduanya amat erat. Hal ini tercermin dari kenyataan yang ada, bahwa kebanyakan karsinogen adalah mutagen (Ames, B.N., 1976).

Bruce Ames dan koleganya (1979), mengembangkan uji bakteri sederhana berdasarkan asumsi bahwa senyawa karsinogen juga merupakan mutagen. Uji ini menggunakan mutan bakteri yang umum dijumpai, yaitu *Salmonella typhirium* yang memerlukan histidin untuk tumbuh, karena tidak dapat membuat histidin sendiri. Bakteri ini mengalami gangguan genetik pada enzim-enzim lintas biosintesis histidinya. Kadang-kadang mutan yang memerlukan histidin ini mengalami mutasi spontan kearah asalnya, sehingga bakteri memperoleh kembali kapasitasnya untuk membuat histidin dari prekursor normalnya. Mutasi kembali ini mudah dideteksi karena bakteri tersebut akan tumbuh pada medium yang mengandung amonia sebagai sumber nitrogen, tetapi yang tidak mengandung histidin. Kecepatan mutasi kembali meningkat dengan pesat oleh mutagen, maka dapat dibandingkan mutagenesis relatif berbagai senyawa, yaitu senyawa yang diindikasikan sebagai karsinogen.

Lebih dari 3000 senyawa kimia dipastikan sebagai karsinogenik melalui uji hewan percobaan (Metode Ames) ternyata bersifat mutagenik pada tingkat 90% pada uji bakteri. Tingginya korelasi antara karsinogenesis dan mutagenesis menunjukkan bahwa uji ini merupakan alat peramal karsinogenesis yang dapat dipercaya.

Interaksi karsinogen kimiawi atau pengaruh fisika seperti radiasi sinar ultra violet dengan material genetik pada sel somatik dapat menyebabkan terjadinya mutasi. Mutasi ini dianggap yang menimbulkan *the heritable nature* dari tumor serta evolusi sel-sel malignan in vivo.

Telah dibuktikan oleh Bishop (1989) bahwa pada hampir semua kanker terdapat kelainan genetik, dapat berupa kelainan dominan pada target proto-onkogen atau kelainan resesif dengan target gen supresor tumor (anti-onkogen, resesif onkogen). Kerusakan yang terjadi pada gen dominan biasanya menyebabkan peningkatan fungsi, sedangkan lesi gen resesif akan menyebabkan kehilangan fungsi. Terjadinya kelainan genetik merubah proto-onkogen menjadi onkogen yang aktif yang akan mendorong terjadinya tumor dan kanker (Sippel, A.E., 1985).

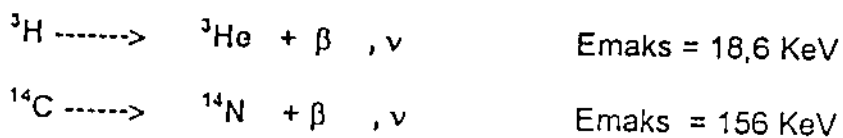
Akan tetapi, selain faktor genetik, faktor epigenetik juga menyebabkan timbulnya kanker. Hal ini merupakan jawaban pada senyawa ethionina dan thioasetamida. Kedua senyawa ini merupakan karsinogen tetapi bukan mutagen. Interaksi antara karsinogen atau metabolit aktifnya dengan DNA tidak harus bersifat mutational. Perubahan yang heritable pada ekspresi fenotipnya, akan menyebabkan sel menyesuaikan diri dan merubah fungsi serta alat genetiknya sehingga karakter sel berubah. Oleh sebab itu, mekanisme epigenetik dapat digunakan untuk menerangkan terjadinya perkecualian pada keterkaitan antar mutagenik dan karsinogenik.

2.4. Tinjauan Tentang Liquid Scintillation Counter

Jika suatu unsur memiliki intin yang tidak stabil, maka unsur tersebut akan memancarkan sinar radioaktif agar intinya menjadi stabil. Unsur yang memiliki nomor atom (Z) dibawah 20 akan berada dalam

keadaan stabil jika jumlah neutron (N) sama dengan jumlah proton, sehingga $N/Z = 1$. Untuk nomor atom yang lebih besar, inti yang stabil didapat bila N/Z antara 1-1,6, sedangkan unsur yang bernomor atom lebih besar dari 83 tidak ada yang memiliki inti stabil (bersifat radioaktif).

Untuk mendeteksi adanya unsur-unsur radioaktif ini dibutuhkan detektor, antara lain : Pencacah Geiger, Kamar Kabut Wilson, Emulsi Film, dan Detektor Sintilasi (Willard,H.,1981). Detektor Sintilasi ini lebih sensitif dari pada Pencacah Geiger terutama untuk pemancar β - yang bertenaga rendah misalnya pada tritium dan C14.



Aktifitas radioaktif senyawa tersebut biasanya dinyatakan dalam satuan Currie (Ci), sedangkan satuan sistim SI nya dinyatakan dalam Becquerel (Bq).

$$1 \text{ Bq} = 1 \text{ partikel per detik}$$

$$1 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^{10} \text{ Bq}$$

Prinsip dari pengukuran aktifitas radioaktif dengan menggunakan liquid scintillation counting adalah merubah pancaran β dengan melewati pada suatu medium organik tertentu (cocktail) sehingga akan dihasilkan suatu kelipan cahaya. Kelipan cahaya ini diterima oleh foto katode dan foto katode akan melepaskan elektron. Elektron yang lepas akan masuk pada tabung pelipat ganda foton untuk kemudian dirubah menjadi signal listrik (Rossiter,B.W.,1987).

Cocktail yang digunakan untuk merubah tenaga β menjadi kelipan cahaya terdiri dari :

- [1] pelarut
 - [2] pengelip primer : untuk menimbulkan kelip
 - [3] pengelip sekunder : untuk mencocokkan panjang gelombang
- Syarat yang diperlukan dalam memilih suatu cocktail adalah :

- (1) Dapat melarutkan cuplikan dengan baik
- (2) Dapat menangkap tenaga β
- (3) Angka hasil kuantum pendarnya tinggi, yaitu dapat merubah tenaga β menjadi kelipan cahaya secara efisien.
- (4) Mempunyai kelipan cahaya dengan panjang gelombang yang terdeteksi oleh tabung pelipat ganda foton (photon multiplier).

Data hasil pengukuran dapat dinyatakan dalam counter per-menit (dpm). Untuk menghitung dpm maka terlebih dahulu harus diketahui efisiensi pengukuran (E).

$$E = \text{cpm/dpm} \times 100 \%$$

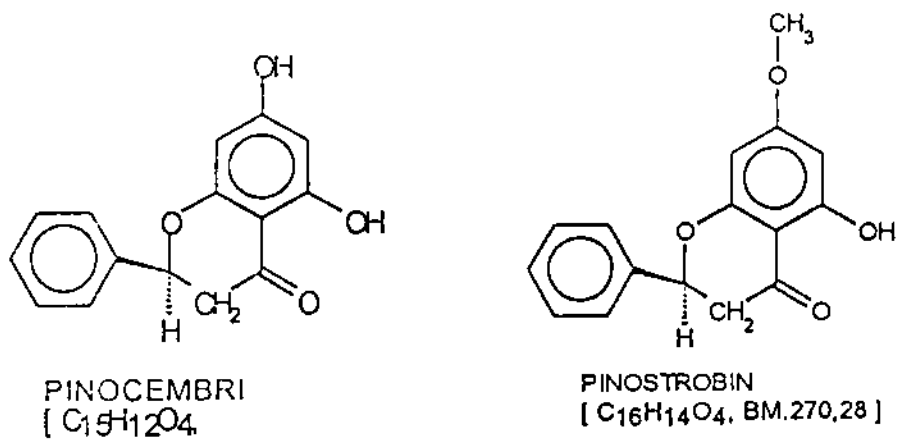
Harga dpm tetap, tidak tergantung pada media yang terdapat pada sampel, sedangkan harga cpm berubah-ubah tergantung besarnya *quenching* (pemadaman) yang disebabkan oleh senyawa yang ada dalam sampel.

2.5. Rimpang Temu Kunci dan pinocembrin

Rimpang Temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb.)

Selain dimanfaatkan masyarakat untuk bumbu dapur, rimpang Temu Kunci secara etnomedisin dapat dimanfaatkan untuk obat batuk kering, sariawan, gangguan pada usus besar, perut membengkak, susah kencing pada anak-anak, radang selaput lendir pada mulut rahim dan disentri (Hoyno, 1987)

Penelitian fitokimia terhadap rimpang Temu Kunci memberikan informasi tentang kandungan berbagai turunan flavon, flavanon dan khalkon, yaitu pinostrobin, pinocembrin, rubratin, panduratin. Minyak atsirinya mengandung turunan monoterpen, yaitu kamfer, kamfen, sineol, geraniol dan metilsinat (Wollenweber, 1981). Pinostrobin dapat diisolasi dengan mudah dalam jumlah besar (2,3%) dari ekstrak heksana rimpang Temu Kunci (Oka Adi Prawata IM, 1998), sedangkan pinocembrin dapat terisolasi dari fraksi metanol residunya (Mulyadi Tanjung, 1995). Perbedaan struktur keduanya hanya terletak pada gugus metil pada 7-hidroksi namun menentukan kelarutan dan titik leburnya.



Gambar-2 Zat kandungan terbesar dalam rimpang Temu Kunci adalah pinostrobin dan yang diteliti adalah pinocembrin

Pinocembrin

Pinocembrin adalah 5,7-dihidroksi flavanon, dilaporkan terdapat dalam bahan alam pertama dalam *Populus nigra* (Villanueva VR, 1970), kemudian dilaporkan pada berbagai publikasi riset, yaitu terkandung dalam *Teloxys graviolens* (Del Rayo Camacho M., 1991), terkandung dalam

Pinus sylvestris (Fliegmann J, 1992), terkandung dalam *Eriodictyon californicum* (Liu JL. 1992), sebagai antimutagenik pada *Eglena gracilis* (Krizkova L, 1998) dan terkandung dalam *Helichrysum trilineatum* (Bremner PD, 1998) sebagai antibakteri. Pinocebrin mempunyai aktivitas hambatan peroksidasi lipid (parameter TBARS) dan transisi permeabilitas membran mitokondria (Santos AC, 1998). Pinocebrin sudah dapat disintesis dari asam sinamat dan trihidroksi benzena dalam kondensasi dengan asam polifosfat (Bani T, 1986). Pinocebrin mempunyai titik lebur 195 – 197 °C (pinostrobin \pm 97°C), rotasi optik -52° dalam metanol.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan penelitian :

Tujuan umum dari penelitian ini adalah menguji kemampuan pinocembrin dari rimpang Temu Kunci apakah dapat menghambat atau mencegah terjadinya mutasi pada kultur hepatosit tikus.

Untuk maksud diatas dalam penelitian ini ditetapkan beberapa tujuan khusus yang dicapai secara bertahap sebagai berikut :

1. Mengisolasi pinocembrin dari rimpang Temu Kunci dengan derajat kemurnian terukur secara HPLC.
2. Menentukan aktivitas (IC_{50}) penangkap radikal bebas DPPH (difenil pikril hidrazil) secara spektrofotometri (free radical scavenger)
3. Mengkonfirmasi kembali sifat mutagen Hidrazin-HCl dengan mengukur jumlah [3H] timidin "uptake" beberapa waktu tertentu setelah pemberian hidrazin (= unscheduled DNA synthesis).
4. Menentukan apakah pinocembrin bersifat antimutagenik terhadap hidrazin-HCl dengan mengukur jumlah [3H] timidin "uptake" beberapa waktu tertentu setelah pemberian hidrazin dan pinocembrin bersamaan dalam tiga macam konsentrasi.

3.2. Manfaat penelitian

Adapun manfaat dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mendapatkan bahan bioaktif terkait antimutagenik yaitu pinocembrin dari rimpang Temu Kunci, yang telah dibuktikan secara seluler dapat menghambat atau mencegah terjadinya mutasi oleh Hidrazin-HCl pada kultur hepatosit tikus.
2. Mendapatkan informasi ilmiah bioaktivitas seluler komponen terkandung dalam ekstrak Temu Kunci yang akan menjadi pertimbangan untuk penelitian pengembangan produk fitofarmasi ekstrak total.
3. Menambah bukti kemampuan iptek di Indonesia pada umumnya dalam rangka menggali potensi bahan alam nabati di Indonesia untuk sumber baku menemukan dan mengembangkan bahan obat baru, khususnya obat anti tumor dan kanker.
4. Mendorong dilakukan penelitian lebih lanjut dengan obyek pinocembrin dalam aspek farmakologi dan aspek fitofarmasi.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Bahan Penelitian

Bahan untuk ekstraksi

Rimpang Temu Kunci diperoleh dari bahan segar yang dibeli dari pasar Wonokromo - Surabaya (petani penghasil tidak jelas), dipastikan jenisnya (determinasi) di laboratorium secara organoleptik, kemudian dilakukan preparasi simplisia.

Bahan untuk mendapatkan hepatosit

- (1) Hewan percobaan
- (2) Tikus dewasa galur Wistar berat \pm 200 gram, diadaptasikan selama 1 minggu.
- (3) Media perfusi hepar (tanpa EDTA) yang disetimbangkan terlebih dahulu dengan gas O₂/CO₂ (95/5 vol %). Komposisi tertera pada lampiran –1.
- (4) Media disintregasi hepar (dengan EDTA) yang disetimbangkan terlebih dahulu dengan gas O₂/CO₂ (95/5 vol %). Komposisi tertera pada lampiran –2.
- (5) O₂ : CO₂ = 19 : 1 (vol/vol).
- (6) Eter untuk pembiusan.

Bahan untuk uji viabilitas

Larutan tripan biru (0,4 % tripan biru dalam larutan NaCl 0,9 %)

Bahan untuk pembuatan kultur jaringan

- (1) media WME (medium William E) (Sigma)
- (2) HEPES (Sigma)
- (3) FBS (Sigma)
- (4) NaHCO₃ (E.Merck)
- (5) Kanamycin (Sigma)
- (6) Penisilin-Streptomycin (Sigma)

Bahan untuk pembuatan lapisan Collagen

- (1) Collagen type I (Sigma)
- (2) Asam Asetat glasial p.a. (E.Merck)

Bahan untuk senyawa pembanding dan senyawa uji

- (1) Monosodium glutamat (E.Merck)
- (2) Hidrazin HCl (Fluka)

Bahan untuk pengukuran UDS

- (1) Hidroksiurea (BDH)
- (2) WME (medium William E) lampiran -1
- (3) [³H] timidin (Amersham)
- (4) NaCl p.a. (E.Merck)
- (5) EDTA p.a.(E.Merck)
- (6) KCl p.a.
- (7) Na₂HPO₄ p.a. (E.Merck)
- (8) KH₂PO₄ p.a. (E.Merck)
- (9) Glisin p.a. (E.Merck)
- (10) Sodium sitrat p.a. (E.Merck)
- (11) NaHCO₃ p.a. (E.Merck)
- (12) TCA (Trichlor acetic acid) p.a. (E.Merck)
- (13) KOH p.a. (E.Merck)
- (14) HCl (E.Merck)
- (15) Scintillation fluid (lampiran -1)

Peralatan penelitian

Alat untuk isolasi hepatosit

- (1) Seperangkat alat untuk operasi hewan
- (2) Seperangkat alat untuk perfusi hepar
- (3) PHmeter
- (4) Kasa nilon 100 µm dan 50 µm
- (5) Sentrifus

Alat untuk uji viabilitas

- (1) Tabung reaksi
- (2) Haemositometer "Neubauer Chamber"
- (3) Mikroskop "invert".

Alat untuk pembuatan kultur jaringan

- (1) petri dish 25 cm²
- (2) Inkubator kultur jaringan (CO₂ 5%)
- (3) Filter 0,2 µm
- (4) Pipet eppendorf
- (5) Laminar Flow Clean Bench.

Alat untuk pengukuran UDS

- (1) Mikropipet
- (2) Sentrifus
- (3) Seperangkat alat Liquid Scintillation Counter (LKB-Wallac. RACKBETA, 1209-006)

Alat untuk analisis fitokimia

- (1) Shimadzu 365 UV-Vis-NIR spektrophotometer
- (2) Hitachi 5000 NMR spectrometer
- (3) Jeol DX 303 GC-MS
- (4) Jasco FTIR
- (5) Perkin Elmer 2000 Series HPLC

1.3. Metode Penelitian Anti mutagenik

4.3.1. Rancangan penelitian

Pada penelitian ini, kultur hepatosit tikus dibagi dalam 3 kelompok perlakuan seperti tabel dibawah ini :

Kelompok	Perlakuan
Kelompok I	Pinozembrin
Kelompok II	Hidrazin HCl/ kontrol positif
Kelompok III	Kontrol/ blanko

Sebagai kontrol (kelompok III) digunakan media WME saja untuk memastikan bahwa apabila terdapat efek mutagenik, maka efek ini tidak disebabkan oleh mediana.

Hidrazin digunakan sebagai kontrol positif (kelompok II), hal ini dilakukan untuk membuktikan bahwa bahan yang dipakai tidak menghambat terjadinya unscheduled DNA synthesis.

Kelompok I, diberi Pinocembrin dengan berbagai kadar, tiap kadar dilakukan 3 replikasi.

Secara keseluruhan rancangan percobaan sebagai berikut :

Perlakuan	Perlakuan	Replikasi
Kelompok I	Pinocembrin kadar 1	3 kali
	Pinocembrin kadar 2	3 kali
	Pinocembrin kadar 3	3 kali
	Pinocembrin kadar 4	3 kali
Kelompok II	Hidrazin 75 ppm	3 kali
	Hidrazin 100 ppm	3kali
	Hidrazin 150 ppm	3 kali
Kelompok III	Media WME	3 kali

4.3.2. Tahapan Percobaan

- (1) Penyiapan sampel atau bahan penelitian
- (2) Isolasi dan penentuan struktur senyawa pinocembrin
- (3) Analisis HPLC pinocembrin hasil isolasi
- (4) Pengujian antiradikal bebas DPPH
- (5) Preparasi sel hepatosit tikus
- (6) Percobaan kultur sel hepatosit
- (7) Pengukuran UDS
- (8) Pengukuran jumlah relatif DNA

4.4. Prosedur kerja

4.4.1. Penyiapan Sampel atau Bahan Penelitian

Pengambilan sampel rimpang temu kunci dilakukan di Kebun Raya Purwodadi, Kabupaten Malang. Sampel dicuci, dipotong kecil-kecil kemudian dibuat serbuk agar pelarut lebih mudah kontak dengan bahan aktif tanaman sehingga ekstraksi lebih sempurna.

4.4.2. Isolasi dan penentuan struktur pinocembrin

Ekstraksi

Serbuk rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb) sebanyak 5 kg dimasukkan kedalam perkolator, selanjutnya direndam pada suhu kamar dengan n-heksana untuk memperoleh fraksi heksana. Perkolasi diulangi beberapa kali sampai perkolat yang keluar negatif terhadap pereaksi

Libermann- Bouchardat.

Bahan tanaman yang telah diekstraksi dengan n-heksana dikeringkan di udara terbuka, selanjutnya direndam dengan metanol. Proses perkolasi diulangi beberapa kali sampai perkolat yang keluar jernih. Perkolat n-heksana dan metanol yang diperoleh diuapkan pelarutnya menggunakan alat penguap tekanan rendah (rotavapor) sampai dihasilkan ekstrak kental.

Ekstrak kental metanol yang diperoleh dipartisi dengan campuran kloroform : air (9:1), Ekstrak kloroform dan air dipisahkan dengan corong pisah.

Ekstrak kloroform dicuci dengan air dan selanjutnya dikeringkan dengan Natrium Sulfat eksikatus selama 24 jam. Ekstrak kloroform diuapkan pelarutnya dengan rotavapor untuk memperoleh ekstrak kental berwarna coklat kemerahan

Masing-masing ekstrak kental n-heksana, kloroform dan air dilakukan uji pendahuluan (uji warna) dengan pereaksi Wilstatter, pereaksi Bate Smith-Metcalf dan NaOH 10%, lihat perubahan warna yang terjadi.

Pemisahan dan pemurnian pinocembrin

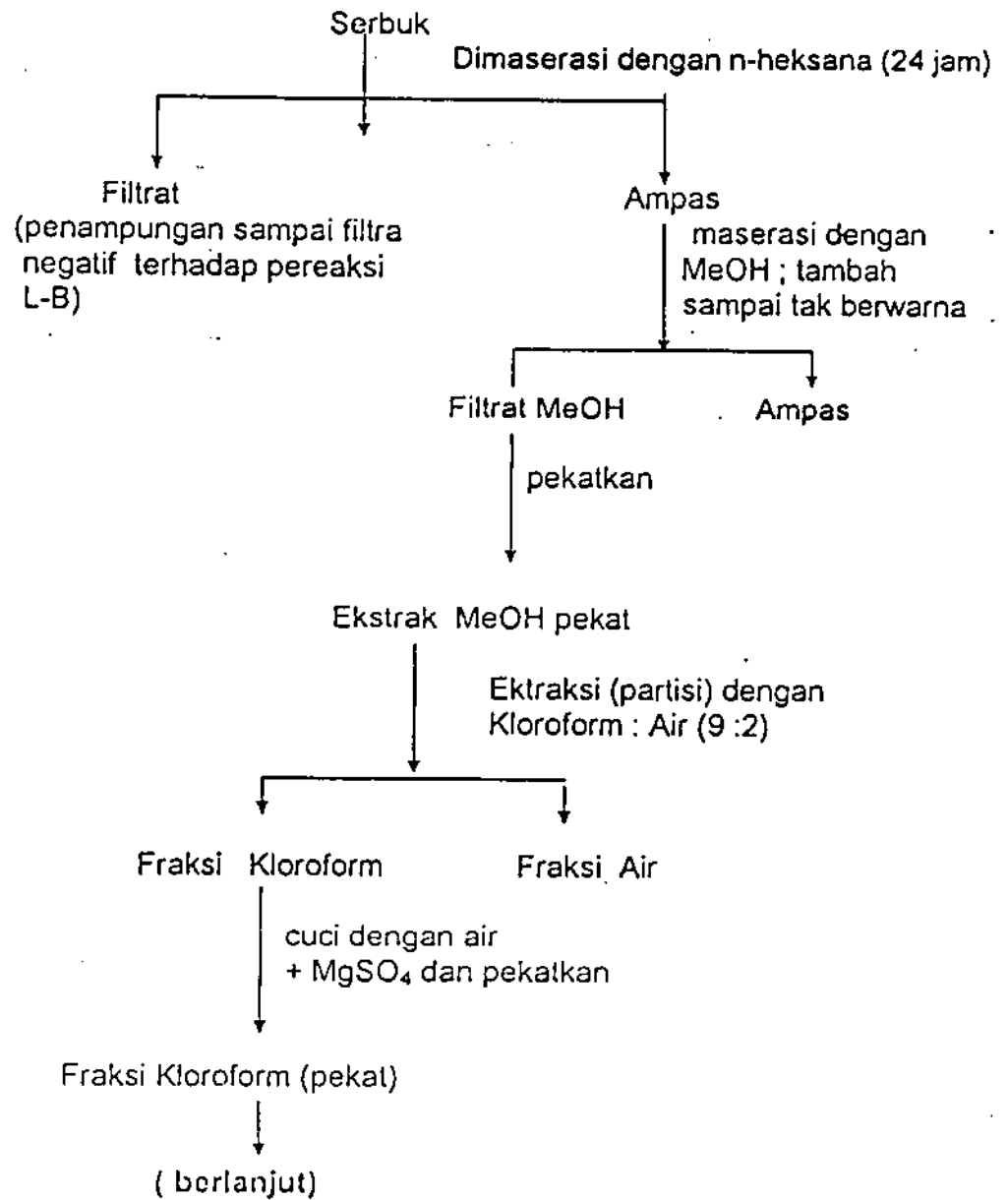
Ekstrak kental kloroform sebanyak 5 gram dilarutkan dalam kloroform, ditambah silika G₄₀ digerus sampai ekstrak kloroform teradsorpsi pada silika gel. Silika yang mengandung ekstrak kloroform dimasukkan ke dalam

kolom kromatografi yang telah disiapkan. Kemudian dilakukan eluasi dengan fase gerak n-heksana : etil asetat dengan perbandingan secara gradien. Masing-masing fraksi yang ditampung diuji dengan KLT, yang mempunyai Rf yang sama digabung. Selanjutnya pelarut diuapkan dengan rotavapor dan diuji kandungan flavonoidnya (test warna).

Fraksi yang positif mengandung flavonoid dimurnikan lagi dengan kolom cepat sebelum diidentifikasi lebih lanjut dengan eluen campuran n-heksana : kloroform dengan perbandingan gradien. Fraksi yang diperoleh diuji dengan KLT sampai diperoleh ekstrak kental berwarna kuning. Padatan ini direkristalisasi dengan menggunakan kloroform dan n-heksana dengan cara melarutkan ekstrak kental dengan kloroform sampai jernih kemudian ditetesi n-heksana sampai berwarna keruh kemudian ditambah lagi dengan kloroform sampai jernih kembali. Larutan dibiarkan 24 jam maka akan diperoleh padatan berwarna kuning muda. Selanjutnya padatan ini diuji kemurniannya dengan KLT, Titik Leleh dan KCKT untuk uji kemurnian.

4.4.3. Analisis HPLC pinocembrin hasil isolasi

Analisis HPLC dimaksudkan untuk mengkonfirmasi kemurnian isolat pinocembrin secara kromatografi instrumental dengan resolusi yang maksimal. Untuk itu digunakan kolom " Nucleosil 120-5 C₈ " dengan eluasi gradien mulai 10% metanol (90% air ~ H₃PO₄ 0,1 N), sampai 100% metanol selama 25 menit dengan kecepatan 1 ml/menit, dilanjutkan eluasi isokratik metanol 100% selama 5 menit kecepatan 1,5 ml/min, total waktu 30 menit. Deteksi pada λ maksimal pinostrobin dan pinocembrin (285 nm) sesuai dengan hasil analisis spektra UV. Resolusi diuji juga dengan ekstrak/fraksi metanol rimpang Temu Kunci.

Skema isolasi Pinocebrin (Mulyadi Tanjung, 1995)

Gambar-3 Skema ekstraksi dan isolasi pinocebrin dari rimpang Temu Kunci

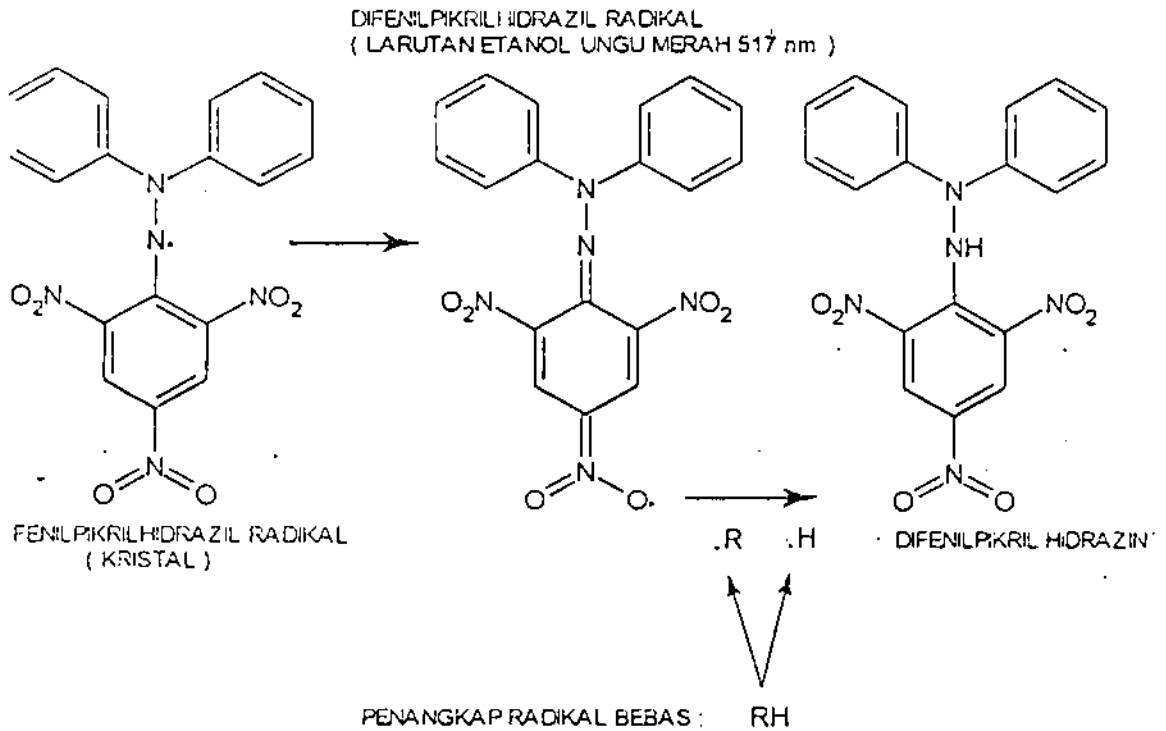
4.4.4. Uji antiradikal bebas DPPH

Larutan DPPH

Ditimbang DPPH kristal (ex.Sigma) untuk dilarutkan dalam etanol tepat pada konsentrasi 0,004 %, untuk segera digunakan dan dijaga temperatur rendah terlindung cahaya.

Penujian anti radikal bebas DPPH

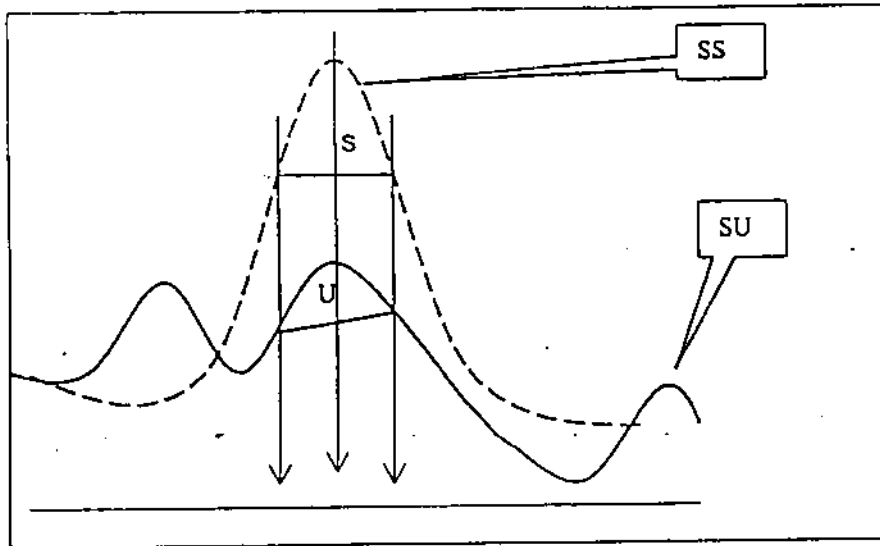
- (1) Siapkan larutan radikal bebas DPPH. dibuat 0,004% dalam Etanol. Buat spektra absorpsi sinar tampak (360–720 nm) DPPH, dimana larutan blanko adalah pelarut etanol (abs). Dicatat adsorban pada 497 – 517 – 537 nm untuk DPPH, gunakan kuvet gelas (quartz) 10 mm. Lakukan hal yang sama untuk larutan pinocembrin 3 mg/1ml, untuk konfirmasi apakah bahan uji ini juga mempunyai puncak didaerah 497 – 537 nm.
- (2) Pengukuran antiradikal bebas untuk bahan uji: Pipet 100 ul larutan pinocembrin ke dalam kuvet, tambahkan (reaksikan) larutan DPPH ad 3ml (+ 2,900 ml), aduk rata dengan pipet, segera dibuat spektra sinar visible (360 – 720 nm) dikertas spektra yang sama untuk dianalisa (dideteksi) apakah masih ada jelas kurva puncak normal (sigmoid) antara 497nm sampai 537nm. Jika demikian maka pada menit ke-3 setelah pelarutan (reaksi) dilakukan pembacaan absorban pada 497 – 517 – 537 nm. Bahan uji dalam hal ini terukur pada 100 ppm. Untuk mencari IC-50 (konsentrasi aktif 50%), dilakukan pengujian pada berbagai konsentrasi.



Sambar-4 Reaksi peredaman radikal bebas difenilpikrilhidrazil (DPPH) oleh zat antiradikal bebas (RH), menjadi difenilpikrilhidrazin. Reaksi tersebut nampak dari peredaman warna ungu merah (517 nm) yaitu berkurangnya radikal difenilpikrilhidrazil menjadi difenilpikrilhidrazin atau difenilpikrilhidrazil-R

Perhitungan kapasitas antiradikal bebas DPPH diukur dari peredaman warna ungu merah dari DPPH, yaitu puncak 517 nm. Untuk itu digunakan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Absorban Hitung 517 nm} = A_{517} - \frac{A_{497} + A_{537}}{2}$$



Gambar-5 Contoh teoritik spektra standar DPPH (SS) dan spektra pengujian suatu ekstrak (SU). Dengan data absorban pada 497, 507 dan 537 nm, dihitung peredaman puncak 517 nm sebagai kapasitas antiradikal bebas dengan rumus $[1 - U/S] 100\%$

Perhitungan kapasitas antiradikal bebas sebagai prosen peredaman absorban pada puncak 517 nm menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ PEREDAMAN DPPH} = \left[1 - \frac{\text{Absorban hitung bahan uji}}{\text{Absorban hitung DPPH}} \right] 100\%$$

Nilai 0% berarti tidak mempunyai aktivitas antiradikal bebas, sedangkan, nilai 100% berarti peredaman total dan pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran bahan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya.

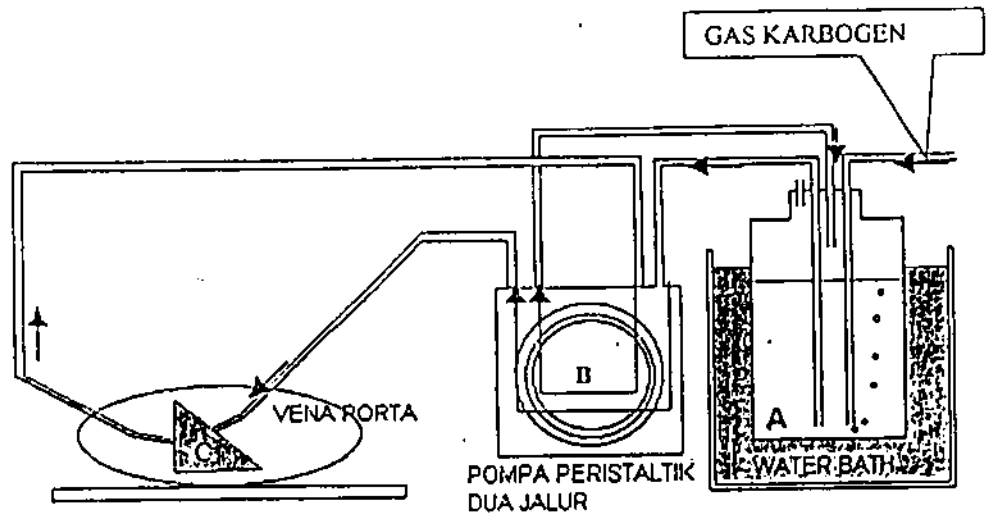
4.4.5 Preparasi sel hepatosit

Hewan Percobaan :

Tikus putih (*Ratus Novergicus*) betina galur Wistar, yang diperoleh dari Laboratorium Perhewan, FMIPA - ITB. Hewan dipesan berumur 3 bulan lalu diadaptasikan di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Farmasi Universitas Airlangga selama paling sedikit 2 minggu. Tikus digunakan yang telah beratnya lebih dari 150 gram.

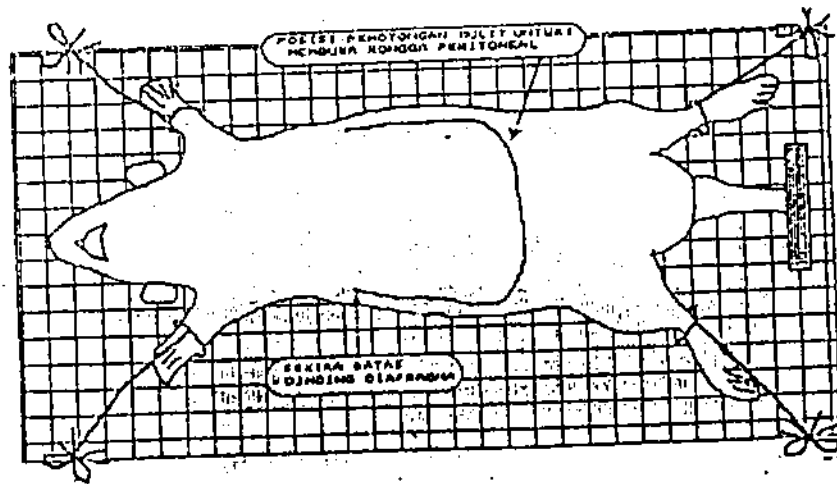
Pelaksanaan perfusi hepar

Pelaksanaan perfusi hepar diawali dengan persiapan sistem pompa peristaltik yang dapat mengalirkan media perfusi (komposisi lihat Lampiran-1) serta menghisap kembali ke botol cadangan media yang terjaga temperaturnya ajeg 37°C (Gambar-2). Pompa peristaltik mempunyai 2 jalur, satu jalur kearah tikus dan yang satu arah dari tikus kembali ke botol media. Selama perfusi berjalan temperatur media dijaga tetap 37°C. Sebelum pipa (saluran) media masuk ke hepar tikus, dipasang penangkap udara (air reservoir). Cairan perfusi masuk ke hepar lewat vena porta (1) dan keluar melalui vena cava kearah kardial (2). Sistem perfusi yang baik dapat ditunjukkan oleh warna hepar yang coklat muda merata (3). Selanjut-nya adalah tahap pelaksanaan yang dapat dibagi dalam beberapa tahap kerja dengan tujuan dan target tertentu.



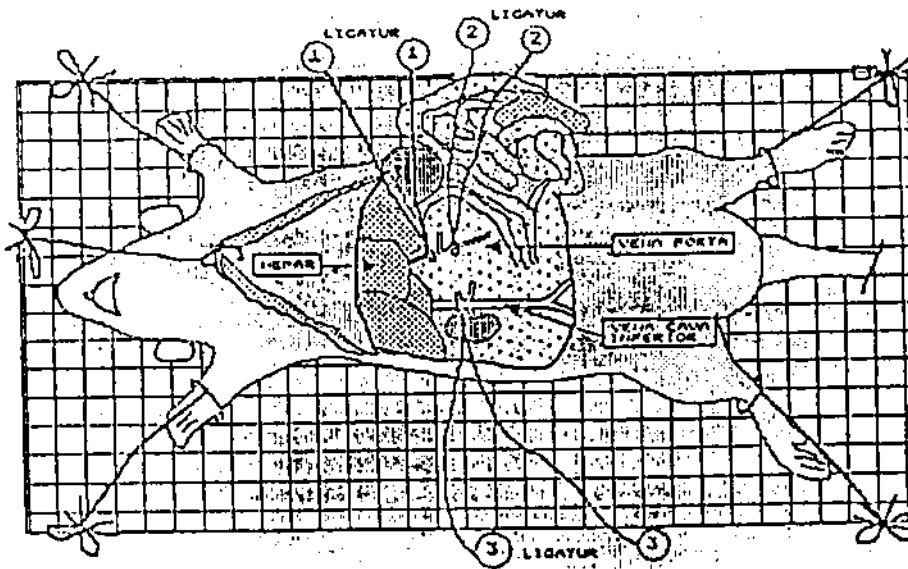
Gambar-6 Skema peralatan untuk perfusi-resirkulasi hepar tikus : Media perfusi (atau disintegrasi) dalam botol media [A] di dalam "water bath " 37° C, dipompa oleh pompa peristaltik [B] keluar dan masuk ke hepar tikus [C] lewat vena porta. Media keluar dari hepar dialirkan kembali ke botol media dengan pompa peristaltik.

Tahap 1 : Hewan yang telah teranestesi (eter) diletakkan berbaring pada punggungnya, difiksir pada keempat ekstremitasnya (keempat kakinya muka-belakang) dengan menggunakan benang besar atau alat penjepit logam. Pada posisi seperti itu akan dilakukan pembedahan hewan untuk mendapatkan sistem perfusi masuk melalui vena porta dan keluar dari vena hepatica. Tahap awal adalah sterilisasi daerah ventral dengan alkohol 70% secukupnya yang dapat pula terlebih dahulu dihilangkan bulunya (dicukur cepat dengan pencukur elektrik). Sterilisasi ini menjadi penting kalau kita melakukan isolasi hepatosit untuk kultur steril. Tahap berikutnya adalah pembukaan rongga peritoneal melalui irisan berbentuk huruf-U.



Gambar-7 Tahap-I : TIKUS DIANESTESI, DILETAKKAN PADA PAPAN OPERASI, DIFIKSIR KUAT, KEMUDIAN RONGGA PERITONEAL DIBUKA DENGAN SAYATAN BENTUK HURUF U

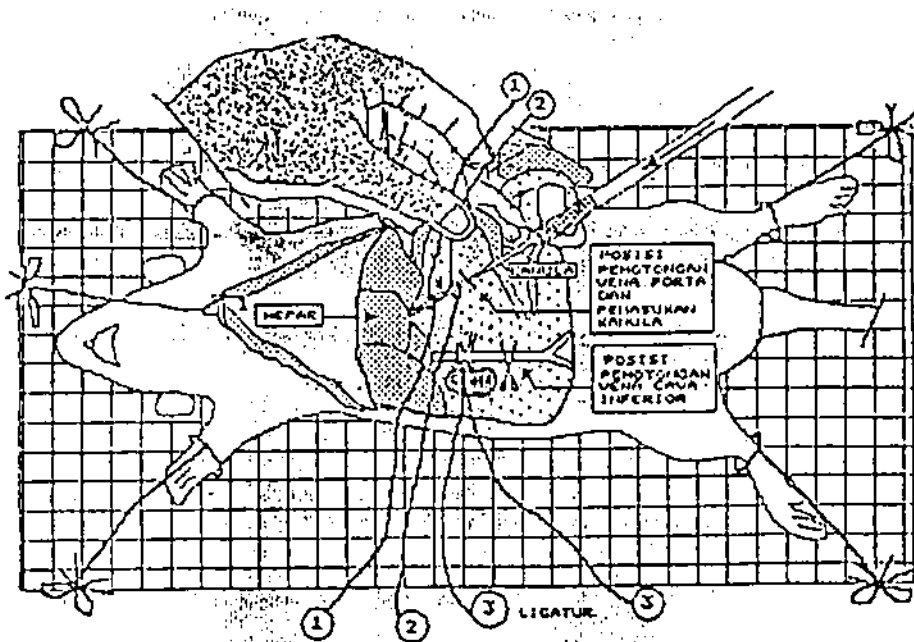
Mula-mula digunting terlebih dahulu lapisan kulit sepanjang garis huruf-U, setelah itu baru dilakukan pengguntingan dinding peritoneal. Perdarahan dari dinding peritoneal yang sering terjadi tidak perlu diabaikan, cukup dikeringkan dengan kapas, bahkan yang penting adalah melakukan secepatnya tahap pembukaan rongga peritoneal ini. Kulit dan dinding peritoneal hasil pemotongan ditarik kearah kranial dan difikir, sehingga nampak jelas segera organ di dalam rongga perut. Organ visceral disisihkan keluar dengan spatula hati-hati sehingga nampak jelas vena porta dan vena cava inferior serta beberapa lobus dari hepar.



Gambar-8 Tahap-II : RONGGA PERITONEAL TERBUKA, DISISIHKAN VISERAL SEHINGGA NAMPAK VENA PORTA DAN HEPAR, KEMUDIAN DISIAPKAN LIGATUR PADA VENA PORTA DAN VENA, CAVA INFERIOR

Tahap-2 : Pada tahap ini dipersiapkan pemasangan benang-benang untuk 3 ligatur (ikatan), yaitu 2 ligatur pada vena porta yang diperlukan untuk pemasangan kanula-masuk pada vena porta (sekira 1 - 2 cm dari percabangan vena porta ke dalam lobus hepar) dan 1 ligatur pada vena cava inferior untuk nanti pada saatnya dapat dilakukan penutupan. Alat yang diperlukan adalah pinset berujung runcing dan bengkok ($1/3$ lingkaran). Dengan pinset khusus ini kita dapat menembus jaringan dibalik pembuluh darah, melingkari pembuluh darah tersebut, sehingga benang akan dapat dengan mudah terkait dan melingkari pembuluh darah yang dimaksud. Pemasangan ligatur ini adalah ketrampilan yang memerlukan banyak latihan sebelumnya sehingga dapat dikerjakan dengan cepat memakai 2 pinset, tidak diperlukan tangan kosong atau bantuan orang lain. Bahan benang yang digunakan sebaiknya yang tahan air tetapi tidak tajam, berwarna gelap.

Untuk ini dapat digunakan benang jahit besar dengan sedikit komponen kapasnya dan berwarna hijau atau hitam. Sebelum pelaksanaan tahap-2 ini, dapat kita berikan pada tikus 0,1 ml larutan Heparin 5000 U/ml intra vena dengan tujuan agar nanti selama awal perfusi tidak terganggu oleh kemungkinan pembekuan darah yang dapat terjadi karena kelambatan kerja.



GAMBAR-9 : Posisi tangan kiri memfiksir vena porta dan bagian usus

Gambar-9 Tahap-III : KANULA PERFUSI DIMASUKKAN KE VENA PORTA DENGAN MEMOTONG VENA DAN MENGIKAT ERAT LIGATURNYA, DALAM HAL INI BERSAMAAN CAIRAN PERFUSI DIALIRKAN MASUK HEPAR DAN KELUAR VENA CAVA INFERIOR YANG TERPOTONG SEHINGGA NAMPAK HEPAR MEMUCAT.

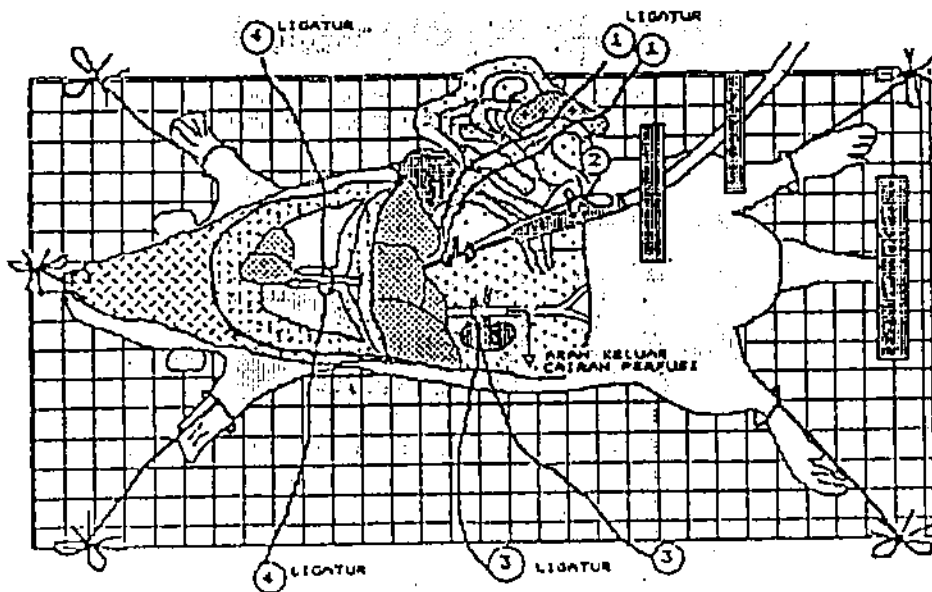
Tahap-3 : Setelah benang-benang ligatur-1 s.d 3 telah disiapkan, maka kerja berikutnya adalah pemasangan/pemasukan kanula (dari mana keluar media perfusi dari pompa peristaltik) pada vena porta kearah hepar. Sebagai persiapan, tangan kiri kita berfungsi memegang bagian usus yang terletak terdekat dengan vena porta. Jari tengah, jari manis dan kelingking terletak

dibalik vena porta, sedangkan ibu jari menekan di atasnya, terikat juga salah satu bagian (ujung) benang dari ligatur-1 dan ligatur-2, sehingga bila kita menarik bagian (ujung) yang lain, maka ligatur tersebut akan mengikat erat.

Setelah tangan kiri siap pada posisi sehingga nampak jelas vena porta beserta kedua ligaturnya, tangan kanan mengambil gunting (atau pisau scissor), dibuat sedikit pemotongan pada vena cava, dilanjutkan dengan pemotongan vena porta di dekat ligatur-2, kemudian gunting dilepaskan, tangan kanan mengambil kanula (aliran media perfusi saat ini dipelankan sekira lima tetes tiap detik), segera dimasukkan ke vena porta. Setelah kanula (G-18) nampak jelas masuk (terjadi perfusi, hepar memucat dan cairan keluar dari vena cava), ikatan ligatur dikencangkan, didkatkan pada pipa kanula agar tidak lepas. Kanula dimasukkan sampai sekira sedikit melampaui ligatur-1 tetapi masih sekira maksimal 0,5 cm dari percabangan vena porta pada

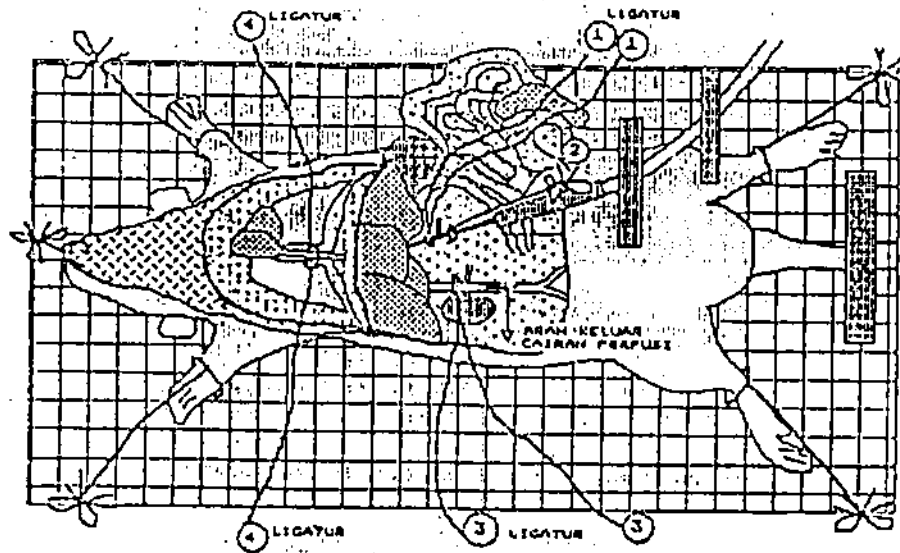
Tahap-4 : Tahap ini adalah tahap pemasangan kanula yang berikutnya, yaitu pada vena cava inferior (juga dari arah vena hepatica) masuk melalui atrium kanan. Awalnya dilakukan dahulu pembukaan rongga dada, Penggungtingan dilakukan dikiri-kanan tulang dada kemudian kulit (dan tulang dada) ditarik kecranial, difikir. Selanjutnya digunting juga jaringan ikat dll. sehingga nampak pula atrium kanan. Untuk pemasangan kanula, disiapkan ligatur-4 pada vena cava sekira 1 cm dari diafragma. Dengan pinset tangan kanan memegang sebagian dinding atrium kanan; tangan kiri dengan gunting merobek sebagian dinding atrium kanan, gunting dilepas-kan, mengambil kanula-2 (G-16), kanula dimasukkan dari tempat robekan dinding atrium kanan, terus

masuk sampai menembus vena cava sekira sejauh 0,5 cm dari diafragma. Dengan posisi seperti ini kita mempererat ikatan ligatur-4 dua kali, dan sisa benang diikatkan selanjutnya pada kanula. Dengan ligatur-4 dan ikatannya pada kanula tersebut sehingga posisi kanula tidak mudah berubah. Sekarang kalau kita menutup vena cava inferior pada ligatur-3 (menarik benang ligatur yang tadinya kendur), maka media perfusi terpaksa akan keluar dari kanula-2 sebagai jalan keluar perfusi (jalan masuk adalah kanula-1 pada vena porta), inilah bukti telah berhasilnya pelaksanaan perfusi hepar.



Gambar- 10 Tahap-IV : KONDISI PERFUSI HEPAR, CAIRAN MASUK VENA PORTA, SEMENTARA CAIRAN PERFUSI KELUAR MELALUI VENA CAVA INFERIOR YANG MASIH TERBUKA LIGATURNYA

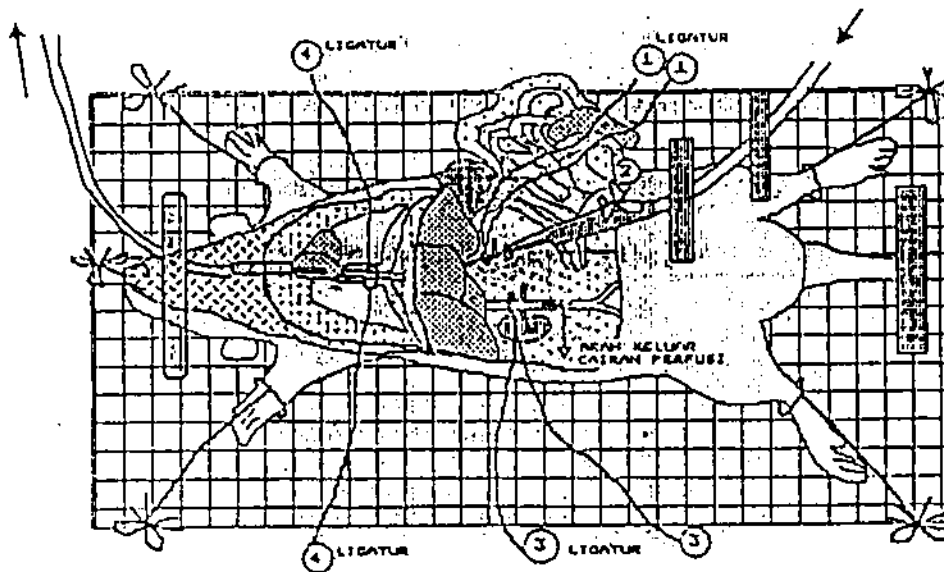
Tahap-5 : Tahap terakhir adalah menyelesaikan saluran pipa plastik yang berhubungan dengan pompa peristaltik dan botol cadangan media perfusi, sehingga kita mendapatkan sistem resir-kulasi perfusi hepar. Saluran kanula-2 diteruskan kedalam suatu tabung reaksi besar dimana telah terpasang pH-meter untuk meman-tau pH media perfusi yang keluar dari



Gambar- 11 Tahap-V : RONGGA TORAK DIBUKA, NAMPAK JANTUNG DAN VENA HEPATIKA, KEMUDIAN DISIAPKAN LIGATURNYA UNTUK NANTINYA DILAKUKAN PEMASUKAN KANULA KE-2 MELALUI BILIK JANTUNG

hepar. Tabung pemantau pH ini sebaiknya diletakkan lebih rendah dari hewan percobaan, agar keluaranya cairan dari hepar likus tidak melawan tekanan, secara pasip. Media perfusi keluar dari hepar secara pasip kedalam tabung pemantau pH, dan dikembalikan ke botol cadangan dengan pompa peristaltik (resirkulasi).

Tahap-6 : Setelah tahap pembuatan sistem perfusi resirkulasi selesai, segera dilakukan perfusi resirkulasi dengan media disin-tegrasi (lihat Lampiran-1), yaitu media pengikat ion kalsium dengan menggunakan komponen EDTA + sitrat + glisin, dilakukan selama 30-40 menit. Caranya hanya mengganti media perfusi dalam botol cadangan dengan media disintegrasi.



Gambar-12 Tahap-VI : TAHAP AKHIR, LIGATUR PADA VENA CAVA INFERIOR DITUTUP RAPAT, TERJADILAH PERFUSI SIRKULASI, CAIRAN PERFUSI DARI POMPA PERISTALTIK MASUK VENA PORTA KELUAR MELALUI VENA HEPATIKA EKEMBALI KE SISTEM POMPA PERISTALTIK.

Catatan :

Selama terjadinya perfusi hepar secara resirkulasi sampai nampak telah terdisintegrasinya hepar, perlu diperhatikan hal-hal sbb. :

- (1) Terputusnya aliran listrik untuk waktu yang lama akan mengga-galkan seluruh pelaksanaan perfusi hepar.
- (2) Jika terjadi gelembung udara masuk pada saluran pipa perfusi dari C motol media dll, maka hal ini dapat tercegah dengan unit penangkap udara. Unit hanya berupa cadangan ruang yang lebih besar dari diameter pipa plastik saluran dan diletakkan tegak lurus, aliran media ke arah bawah. Jika ada udara terikut kedalam pipa saluran, maka

sampai pada unit alat tersebut udara akan tertahan, tidak terikut mengalir ke arah bawah.

Pensuspension sel hepatosit

Hepar yang telah didesintegrasi secara pengikatan ion kalsium dengan EDTA-sitrat-glisin diisolasi dari tikus secepat mungkin. Dengan pinset ditangan kiri hepar dipegang pada bagian vena porta (bekas kanula-1), direndam dalam media-WME sambil dirobek-robek selaut (kapsul) heparnya memakai pisau (atau ujung gunting). Hepar digerak-gerakkan naik-turun dengan pinset didalam media untuk mencoba secara mekanis mensuspensikan hepatosit. Selama pelaksanaan pensuspension hepatosit ini temperatur media-WME harus dijaga 0-4°C, yang dapat dipersiapkan sebelumnya dengan membuat campuran es dan air.

Setelah dirasa cukup mensuspensikan semua hepatosit, artinya hanya tersisa sedikit saja jaringan ikat yang terpegang pada pinset, maka suspensi hepatosit kita lewatkan kasa Nilon 100 um. Penyaringan ini diulang lagi dengan kasa Nilon 50 um, sehingga diperoleh suspensi sel hepatosit fragmen sel.

Pemisahan sel hepatosit yang vital.

Pemisahan sel dilakukan dengan cara terpilih diantara tiga, yaitu :

- (1) cara dekantasi
- (2) cara sentrifugasi biasa
- (3) cara sentrifugasi isopiknik

Dalam penelitian ini dipilih cara dekantasi. Cara dekantasi adalah cara yang sederhana. Sspensi sel didiamkan selama sekira 10 menit, hepatosit vital akan lebih cepat ter-enap-kan didasar labu sehingga dengan

penghisapan supernatan akan diperoleh fraksi hepatosit vital didasar labu. Prosedur ini dikerjakan 2-3 kali dalam suasana temperatur rendah (air es).

Uji viabilitas suspensi sel hepatosit

Tahap akhir dari preparasi sel hepatosit tikus terisolasi adalah diperolehnya suspensi sel. Selanjutnya masih diperlukan suatu uji vitalitas sel yang sekaligus berfungsi juga sebagai penghitungan ke[ekatan suspensi sel.

Untuk maksud tersebut digunakan "Meubauer's Chamber" dengan prosedur sebagai berikut :

- a. 200 μ l suspensi sel hepatosit dimasukkan dalam tabung reaksi.
- b. Ditambahkan larutan tripan biru 0,4 % dalam NaCl 0,9 % sebanyak 500 μ l kedalam tabung reaksi.
- c. Campuran dipipet dan diletakkan pada Nebauer Chamber yang dilengkapi dengan kamar penghitung.
- d. Sel yang mati (menyerap warna tripan biru) serta sel yang hidup (jernih) dihitung. Penghitungan sel ini dilakukan secara mikroskopik dan paling sedikit dihitung 200 sel.

4.4.6. Melapisi petri dish dengan collagen

- a. siapkan larutan collagen 0,01% dalam 0,1 M asam asetat glasial dengan pengadukan selama 2-3 jam.
- b. Petri dilapisi 6 μ g/ cm^2 dan dibiarkan dalam inkubator 37 °C selama beberapa jam.
- c. Sisa collagen dibuang, kemudian disterilkan dengan lampu UV semalam.
- d. Sebelum digunakan, dicuci dengan aquadest steril.

4.4.7 Percobaan kultur sel hepatosit

Disiapkan petri dish yang telah dilapisi collagen dan dicuci dengan aquadest steril.

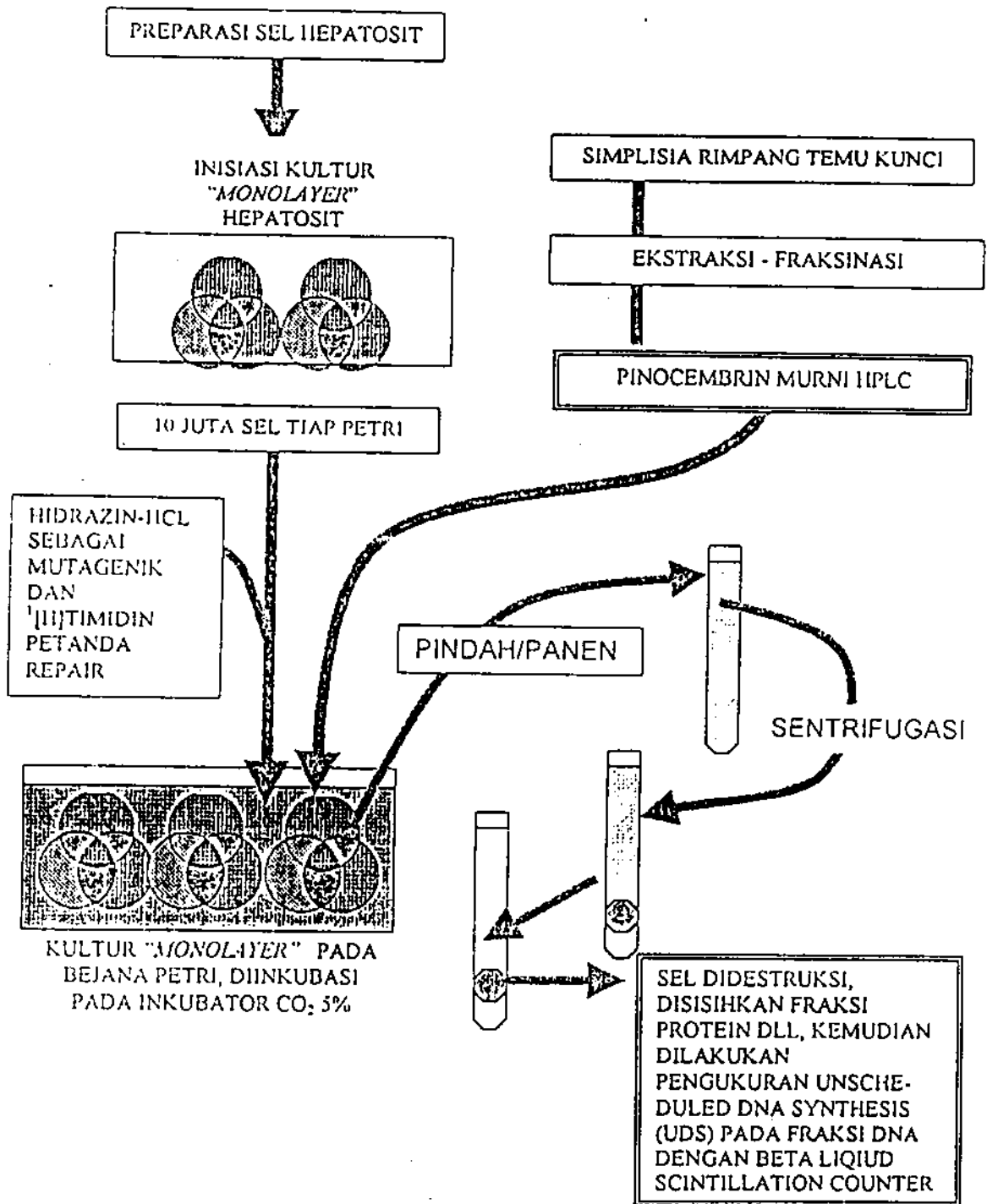
- a. Dibuat suspensi hepatosit yang terdiri atas : FBS 5%+ Pen-Strep 10 ml/l + Gentamysin (40 mg/ml) 1,25 ml/l + HEPES 20 mM + 3 juta /25 cm² hepatosit hidup + media WME ad volume yang dikehendaki.
- b. Suspensi hepatosit dituang 2 ml ke dalam masing-masing petri dish steril 25 cm² yang terlapisi collagen, kemudian diinkubasi dalam inkubator yang berisi Oksigen / Karbondioksida (95/5 vol. %) suhu 37°C selama 2 jam untuk inisiasi kultur monolayer (melekatkan sel pada permukaan petri).

Pembuatan larutan uji dan kontrol

Masing-masing senyawa uji dan kontrol positif dibuat kadar 2 mg/ml dengan bantuan media WME.

4.4.8 Pengukuran UDS

- a. Dibuat stok hidroksi urea 1 M dalam WME. Kemudian 20 µl stok hidroksi urea ini ditambahkan ke dalam setiap kultur hingga konsentrasi akhir 10⁻² M dan inkubasi dilanjutkan selama 1 jam.
- b. Dibuat larutan Thimidin 120 ml yang terdiri atas : 13 ml FBS + Pen-Strep 1,3 ml + Gentamysin (40 mg/ml) 150 µl/l + HEPES 0,7744 g, (³H) Thimidin 13 µCi + WME sampai volume 104 ml.
- c. Setelah diinkubasi, kultur sel dikeluarkan dari inkubator, pada masing-masing petri dish media kultur di ambil 1,0 ml, kemudian ditambah dengan 0,6 ml larutan Thimidin.



Gambar-13 Skema percobaan uji anti mutagenik pinocebrin terhadap mutagen hidrazin-HCl dengan metoda "UDS" pada kultur hepatosit tikus dengan data "³[H]Timidin uptake" pada Beta Liquid scintillation Counter

- d. Ke dalam medium kemudian ditambahkan :
- pada blanko media : 400 μ l media WME
 - pada kontrol :
kadar 100 ppm : 100 μ l hidrazin + 300 μ l media WME
 - pada bahan uji :
kadar 100 ppm : 20 μ l ekstrak + 100 μ l SDMH + 280 μ l WME
kadar 200 ppm : 40 μ l ekstrak + 100 μ l SDMH + 260 μ l WME
kadar 500 ppm : 100 μ l ekstrak + 100 μ l SDMH + 200 μ l WME
kadar 1000 ppm : 200 μ l ekstrak + 100 μ l SDMH + 100 μ l WME
kadar 1000 ppm : 200 μ l ekstrak + 280 μ l WME
- e. Semua kultur diinkubasi selama 18 jam suhu 37^o C dengan aliran gas Oksigen dan Karbondioksida ; 19 : 1.
- f. Setelah 18 jam petri dish dikeluarkan dari inkubator dan sel dicuci dengan 0,86 % larutan dingin NaCl kemudian disuspensikan dengan 10 ml larutan hangat EDTA (8 g NaCl , 0.2 g KCl, 1.15 g Na₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄ , 0.2 g glukosa dan 0.2 g EDTA) dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifuse.
- g. Sel diendapkan dengan sentrifuse 1000 rpm dan supernatannya dibuang. Hasil endapan yang diperoleh dicuci kembali dengan larutan NaCl dingin.
- h. Sel kemudian dilisis dengan 0,5 ml larutan lisis buffer (2 g SDS + 4,4 g Na-sitrat + aqua ad 100 ml) dan didiamkan selama 2 jam pada suhu 37 °C.
- i. di tambahkan 2 ml TCA 10 % b/v, divortex dan disentrifuse 4000 rpm .Supernatannya ditampung.

- j. Endapan ditambah 1 ml TCA 5%, diinkubasikan dalam penangas air pada suhu 90° C selama 20 menit kemudian disentrifuse dan diambil supernatannya.
- k. Campuran supernatan pada langkah i dan j diambil 2,5 ml dan dimasukkan dalam scintillation vial kemudian ditambahkan 3 ml cairan scintillation untuk dihitung aktivitas radioaktifnya.
- l. Analisis data hasil pengamatan liquid scintillation counter dinyatakan dalam counter per menit atau jumlah relatif DNA.

4.4.9 Pengukuran Jumlah relatif DNA

- a. Diambil 1 ml supernatan dari 4.4.8.j. ditambah 2 ml reagen difenilamin (1,5 g difenilamin dalam 100 ml asam asetat glasial, ditambah 1,5 ml H₂SO₄ pekat. Pada saat akan dipakai ditambah 0,10 larutan asetaldehid dalam air yang kadarnya 16 mg/ml).
- b. Diinkubasi pada 30°C selama 18 jam.
- c. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm.

4.4.10 Analisis Data

- a. Data hasil pengamatan liquid scintillation counter dinyatakan dalam counter per menit/ jumlah relatif DNA.
- b. Data diolah menggunakan *analysis of varians* (anova) (31)

Sampel	Counter per menit/ jumlah relatif DNA							
	A	B			C	D	E	F
		a	b	c				
1								
2								
3								
X								
SD								

- A = Kontrol
- B_{a,b,c} = Hidrazin HCl 67 ppm(a), 100 ppm (b), 150 ppm (c)
- C = Pinocembrin kadar 1 + Hidrazin-HCl 100 ppm
- D = Pinocembrin kadar 2 + Hidrazin-HCl 100 ppm
- E = Pinocembrin kadar 3 + Hidrazin-HCl 100 ppm
- F = Pinocembrin kadar 4 + Hidrazin-HCl 100 ppm

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil isolasi pinocembrin

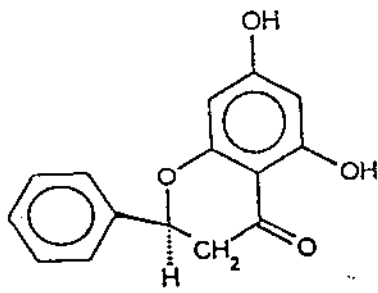
5.1.1. Isolasi pinocembrin

Dari bahan simplisia diperoleh hasil akhir 85 mg pinocembrin. Jumlah yang relatif kecil ini ($\pm 0,85\%$) diperhitungkan dari jumlah simplisia 100 gram, sedangkan bahan ekstrak antara (fraksi-fraksi) masih tersisa banyak yang tidak diselesaikan yaitu dari proses ekstraksi bahan sejumlah 1 kg simplisia. Jumlah isolat yang kecil dirasa cukup untuk bahan uji bioaktivitas seluler antimutagenik pada kultur hepatosit tikus, karena konsentrasi yang diperlukan hanya 100 ppm kebawah dan untuk itu cukup ditimbang 1 – 5 mg. Selama proses juga ikut terisolasi pinostrobin dalam jumlah yang jauh lebih besar (2%)

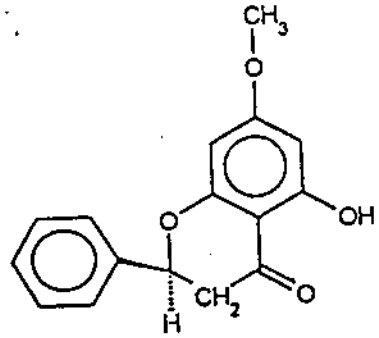
5.1.2. Analisis fitokimia

Hasil isolasi pinocembrin murni terakhir (spektra UV pada Gambar-1) dari pemisahan kolom dianalisis HPLC untuk mengkonfirmasi derajat kemurniannya. Kromatogram HPLC dapat dilihat pada Gambar-2. Dari kromatogram ternyata dapat diperhitungkan kemurnian hasil isolasi adalah tidak kurang dari 93% (sesuai prosen relatif luas puncak pada 280 nm).

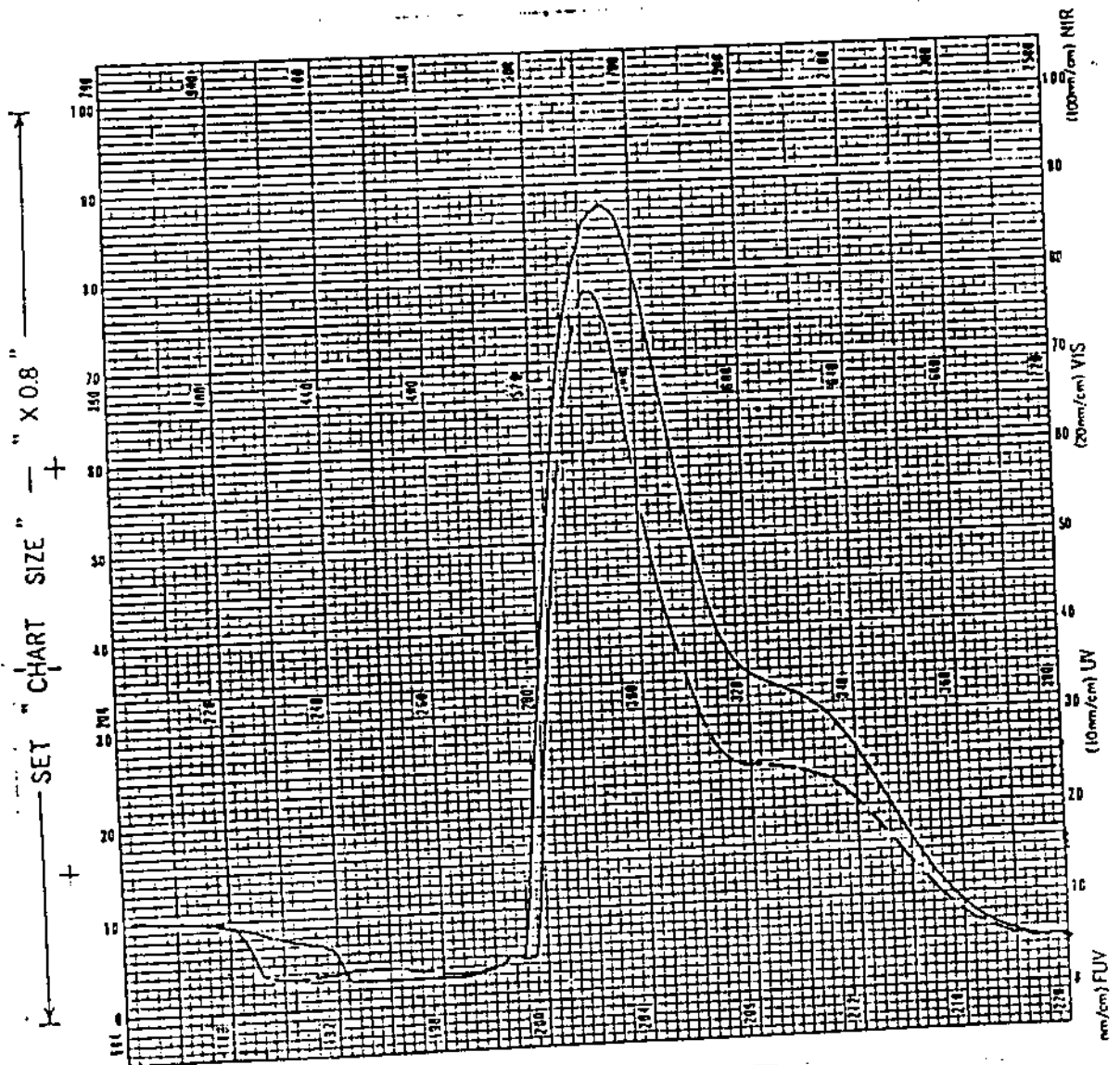
Konfirmasi struktur selanjutnya dilakukan dengan spektra FT-IR, NMR (proton dan karbon). Spektra – spektra tersebut dapat dilihat pada Gambar-3, -4, -5.



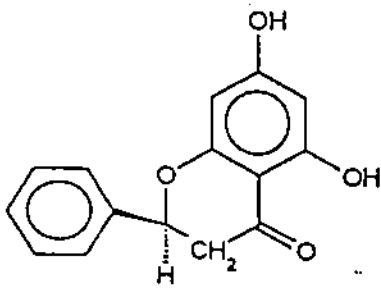
PINOCEBRIN
[C₁₅H₁₂O₄, BM.256,25]



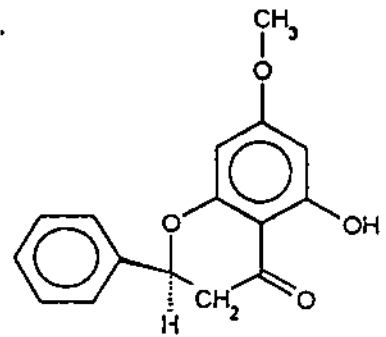
PINOSTROBIN
[C₁₆H₁₄O₄, BM.270,28]



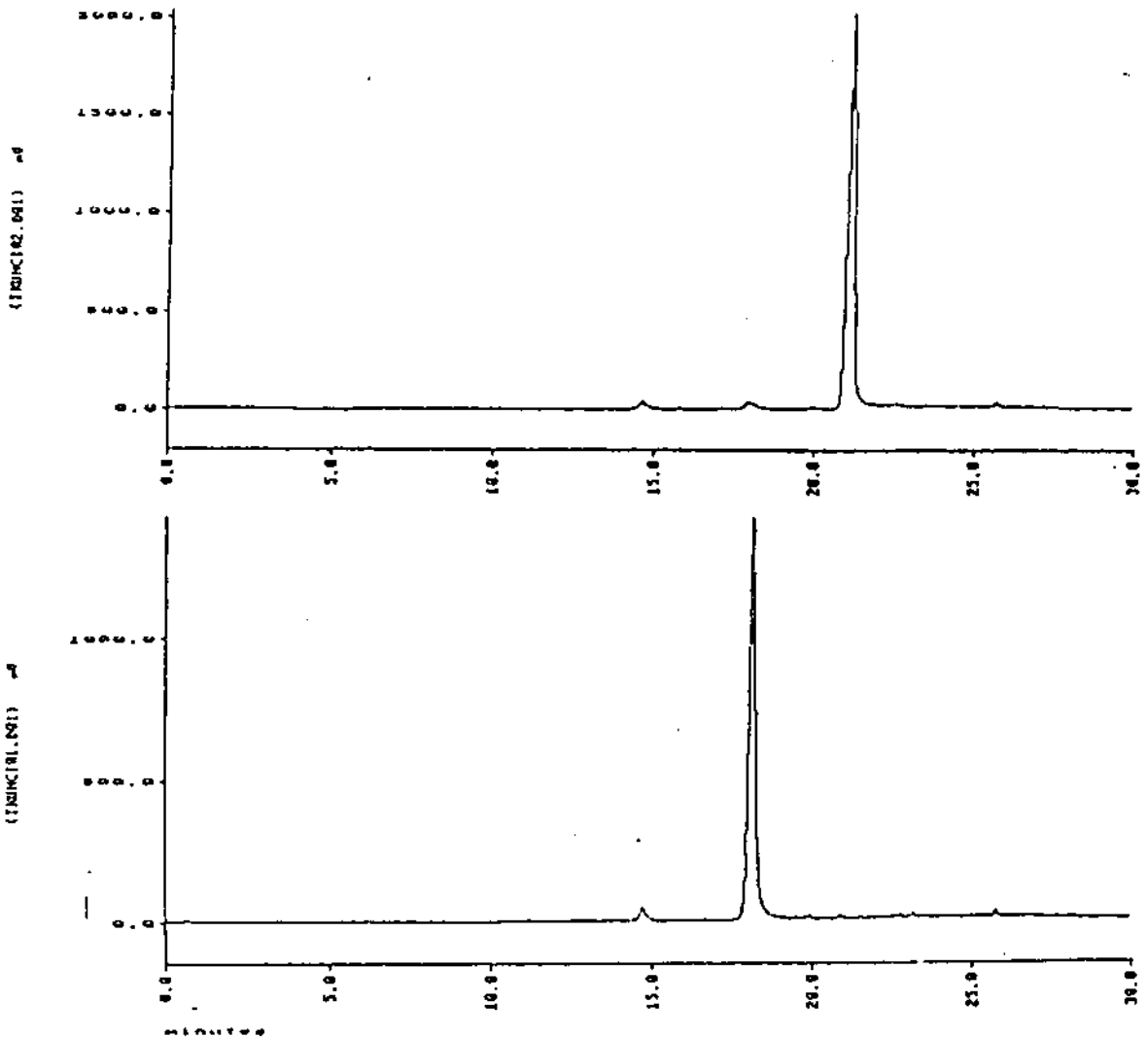
Gambar-14 Spektra ultraviolet (UV) pinocebrin hasil isolasi dan pinostrobin



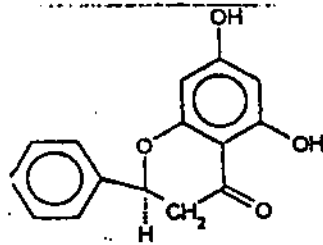
PINOCEBRIN
[C₁₅H₁₂O₄, BM.256,25]



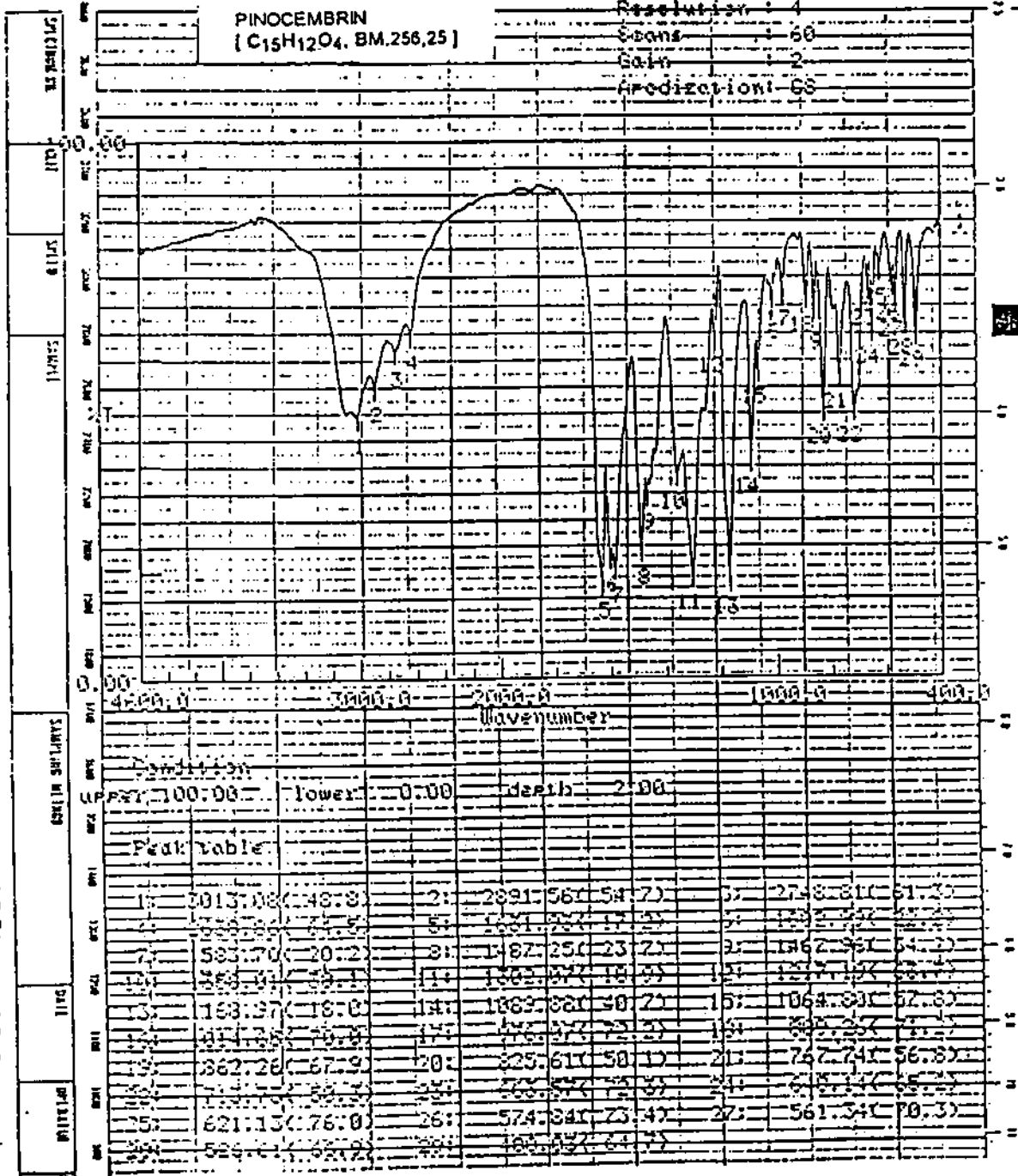
PINOSTROBIN
[C₁₆H₁₄O₄, BM.270,28]



Gambar-15 Hasil analisis HPLC pinocebrin [A] dan pinostrobin [B] hasil isolasi pada kolom * Nucleosil 120-5 C₈ * dengan eluasi gradien mulai 10% metanol + 90% air, sampai 100% metanol selama 25 menit dengan kecepatan 1 ml/menit, dilanjutkan eluasi metanol 100% selama 5 menit kecepatan 1,5 ml/menit, total waktu 30 menit. Deteksi pada λ 280nm

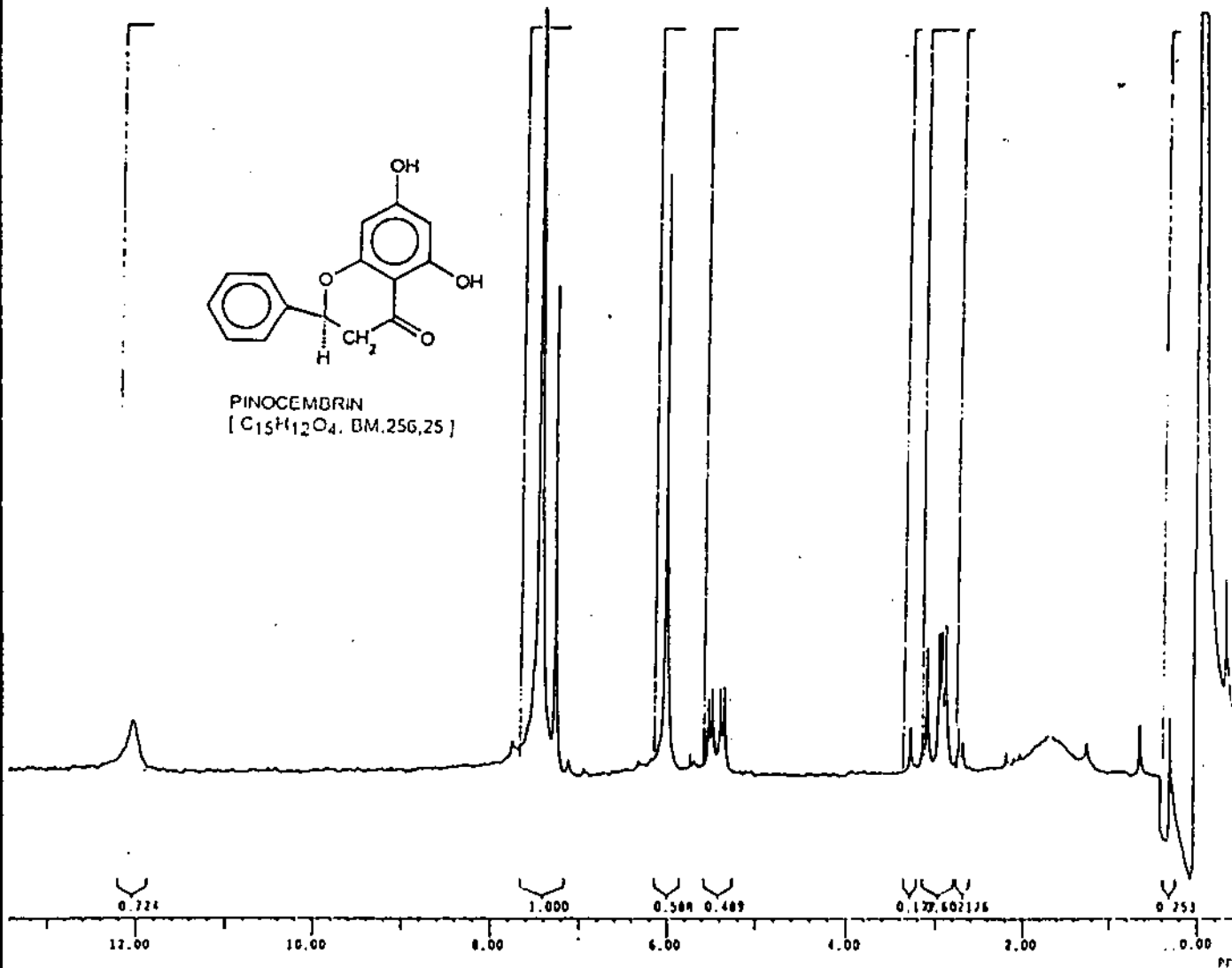


JASCO FT/IR-5300
 Date : 99/07/14 15:23
 File Name :
 Sample Name: PINOCEMBRIN
 Resolution : 4
 Scans : 50
 Gain : 2
 Apodization: GS

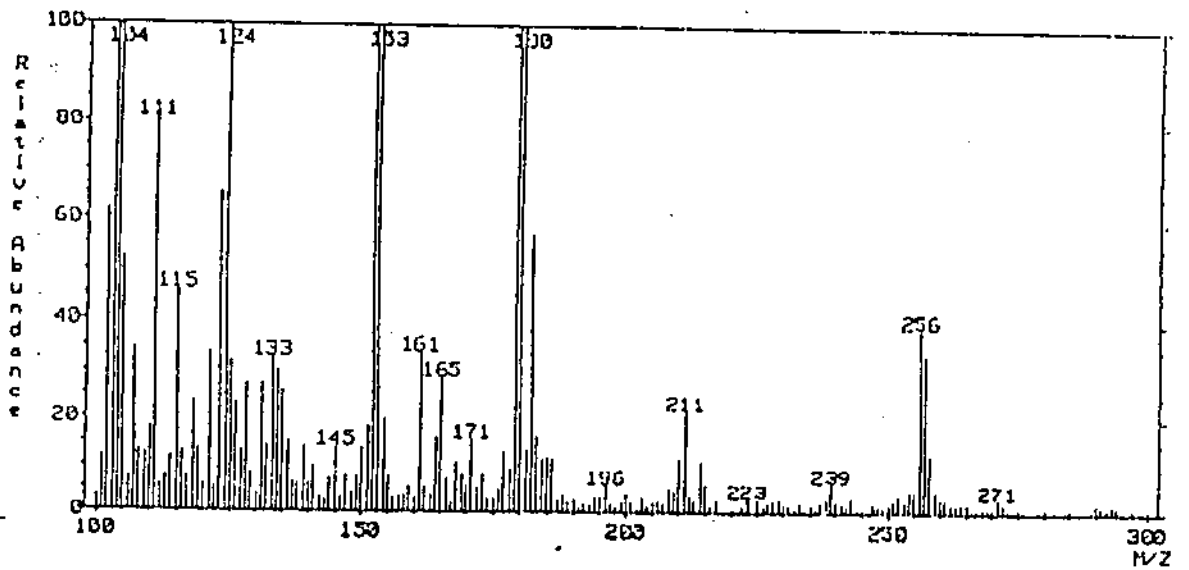
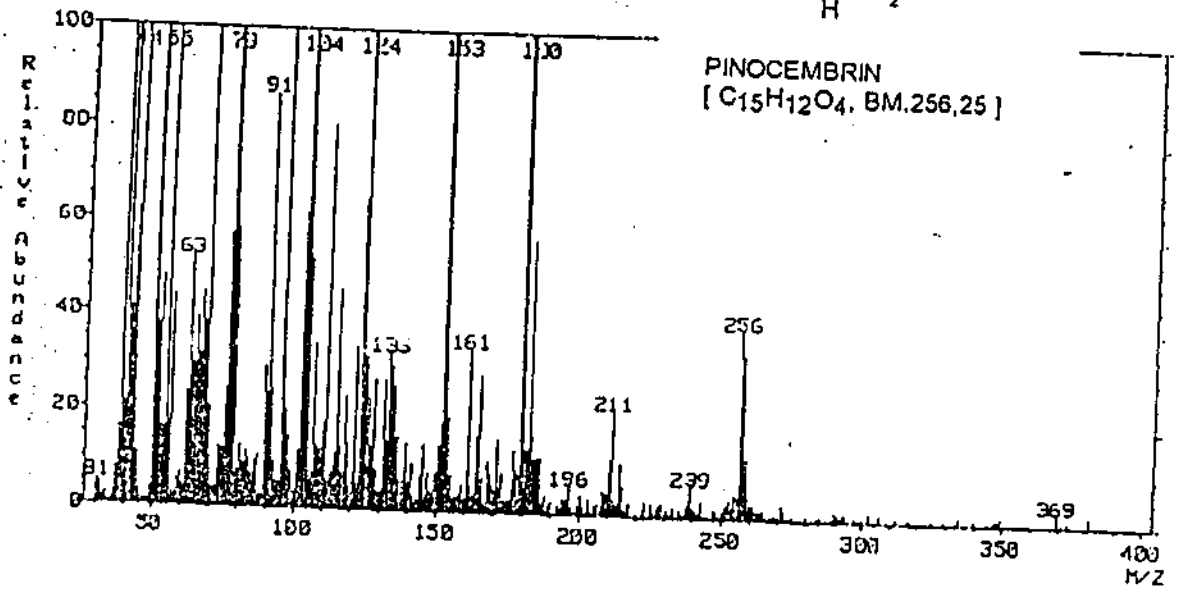
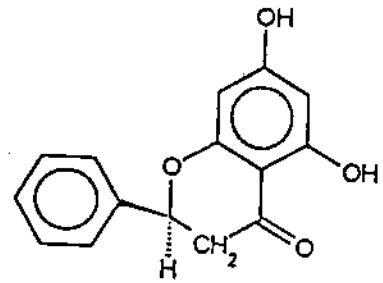


JASCO Corporation

Gambar-16 Spektra infra merah (FT-IR) pinocembrin hasil isolasi



Gambar-17 Spektra ¹H NMR pinoembrin hasil isolasi dengan instrumen Hitachi 5000 NMR Spektrometer 2,14 Tesla



Gambar-18 Spektra masa pinocebrin dengan alat Jool DX-303 GC-MS dengan kondisi *direct inlet*, EI 100 mA, 70 eV, suhu → 300 °C

5.2. Hasil pengujian aktivitas penangkap radikal bebas DPPH

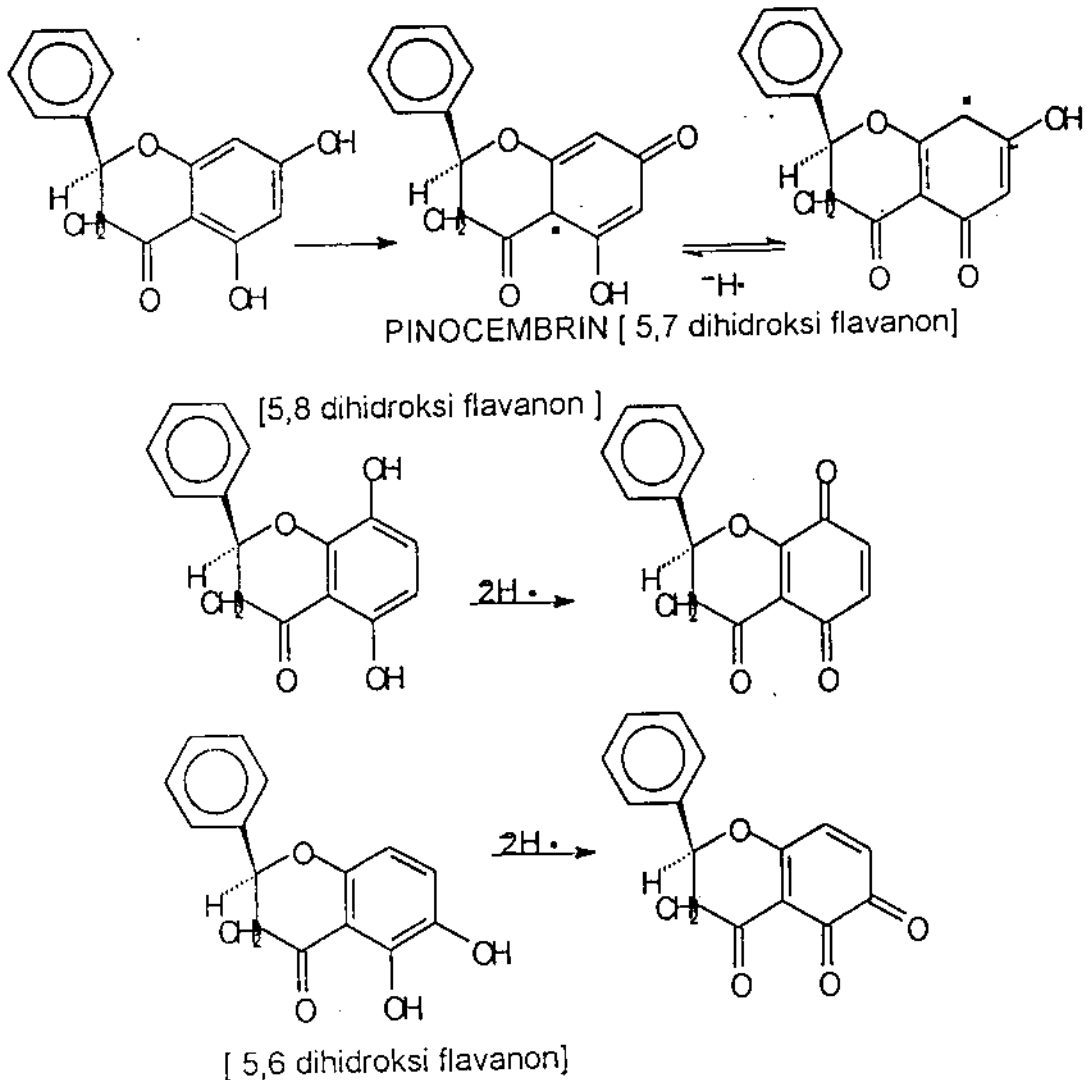
Untuk pengujian semula disiapkan larutan pinostrobin untuk teruji pada konsentrasi maksimal zat tunggal, yaitu 100 ppm dan konsentrasi lebih rendah mulai 90 ppm dst sampai 50 ppm, kemudian ternyata hasil perhitungan pinostrobin relatif tidak mempunyai aktivitas (60 menit) yang berarti (lihat Tabel-3). Selanjutnya dicoba konsentrasi lebih tinggi LAGI SAMPAI 1000 ppm seperti pada tabel tersebut baris ke-6 dst.nya.

Tabel-1 ; Hasil pengujian aktivitas penangkap radikal bebas DPPH pinocembrin.

	Pinocembrin ppm	Absorban x 1000				% Redaman DPPH
		497 nm	517 nm	537 nm	Puncak	
	0	782	930	838	120	
1.	50	789	935	843	119	0,83 %
2.	70	781	927	835	119	0,83 %
3.	80	762	910	820	119	0,83 %
4.	90	770	915	826	118	1,67 %
5.	100	758	903	814	117	2,50 %
6.	150	779	919	831	114	5,00 %
7.	240	755	891	804	111.5	7,08 %
8.	500	673	794	714	100.5	16,25 %
9.	1000	650	737	636	94,0	21,67 %

Dengan memperhatikan 2 gugus hidroksi pada struktur pinocembrin yang terletak pada posisi meta, yaitu [5,7 dihidroksi flavanon], maka dapat dikonfirmasi mengapa aktivitas penangkap radikal bebasnya lemah, sesuai dengan kemampuannya melepas radikal hidrogen. Struktur meta di hidroksi hanya dapat melepaskan 1 radikal proton, sedangkan struktur orto dan para yaitu [5,6 dihidroksi flavanon] atau [5,8 dihidroksi flavanon] mempunyai aktivitas yang lebih besar karena dapat melepas 2 radikal hidrogen (lihat **Gambar-19**) serta meredam radikal bebas DPPH dengan membentuk struktur konjugasi rangkai yang lebih stabil dari pada posisi meta

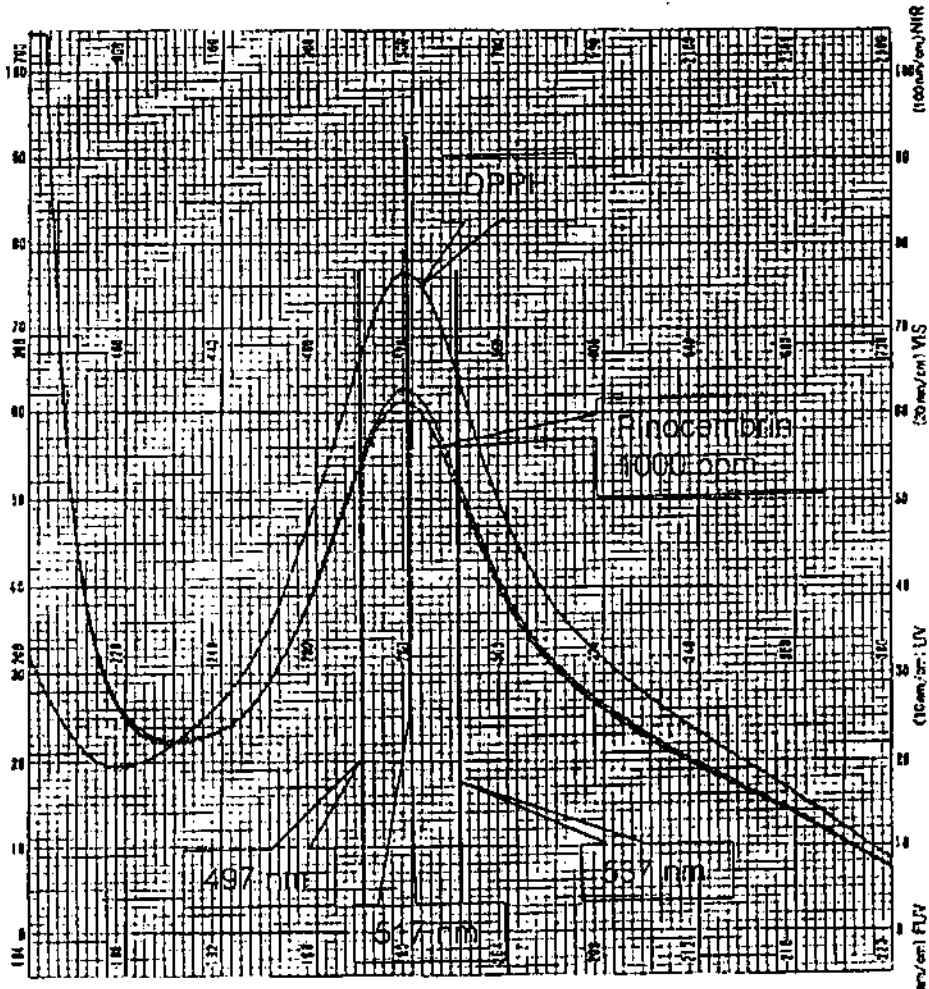
dihidroksi pada Pinocebrin (5,7 dihidroksi flavanon). Dengan demikian, maka bioaktivitas proteksi seluler pinocebrin tidak dapat dihubungkan dengan kapasitas penangkap radikal bebas, namun mungkin dengan mekanisme lain seperti hambatan enzim, reaktif terhadap titik tangkap respon tertentu dsb.



Gambar-19 Skema reaksi kemampuan pelepasan radikal hidrogen dalam aktivitas penangkap radikal bebas DPPH turunan dihidroksi flavanon (pinocembrin dan isomernya)

Bioaktivitas antimutagenik berarti mempunyai tiga kemungkinan mekanisme, yaitu (1) hambatan enzim pemetabolisme sehingga tidak timbul radikal bebas (2) menangkap radikal bebas yang timbul (3)

menghambat atau mencegah alkilasi DNA melalui meningkatkan enzim sistem repair DNA sehingga mutasi dapat diperbaiki (antimutagenik). Terhadap zat yang tidak potensial antiradikal bebas berarti sarasannya pengujian harus lebih khusus, metoda yang direncanakan tidak efisien.



Gambar-20 Spektra pengukuran aktivitas antiradikal-DPPH pinosembrin pada konsentrasi 1000 ppm. Puncak DPPH teredam oleh pinocembrin 21,67 %

Berdasarkan pertimbangan efisiensi biaya, maka pengujian dengan metoda "unscheduled DNA-synthesis" tidak dilakukan, namun penelitian akan dilanjutkan dengan metoda pengujian hambatan alkilasi DNA secara invitro kultur sel juga, namun dengan sasaran apakah meningkatkan enzim sistem repair-DNA, seperti AGT (alkilguanin-transferase).

5.3. Penentuan kecermatan Metode *Unscheduled DNA Synthesis*

Hasil pengamatan aktifitas radioaktif dari kelompok kontrol yang dilakukan replikasi sebanyak 10 kali digunakan untuk menentukan kecermatan metode ini terdapat pada tabel-1.

Tabel 2. Aktifitas radioaktif kelompok kontrol untuk menentukan kecermatan metode *unscheduled DNA synthesis*.

Replikasi	Aktifitas radioaktif (cpm)
1	90
2	66
3	54
4	96
5	69
6	78
7	101
8	50
9	61
10	96
x	76 ± 19

X = harga rata-rata ± standard deviasi

$$RSD = 19/76 \times 100 \% = 25 \%$$

Dari data diatas diperoleh harga rata-rata 76 cpm dengan relative standard deviation (RSD) 25%. Jika dibandingkan dengan harga lazim untuk suatu penelitian biologis memang harga RSD ini relatif besar. Namun William G.M. 1977, sendiri pada penelitiannya dengan menggunakan metode yang sama memperoleh hasil dengan harga RSD = 59%, bahkan ada yang lebih besar dari 59%. Hal ini menunjukkan bahwa kecermatan yang diperoleh cukup baik dibandingkan dengan penelitian terdahulu yang menggunakan

uji UDS. Artinya penelitian ini masih dapat dipercaya seperti penelitian-penelitian sejenis yang telah dilakukan.

5.4. Pemeriksaan kondisi percobaan

5.4.1. Pemeriksaan aktifitas radioaktif yang ditambahkan pada tiap-tiap kultur

Telah dilakukan pemeriksaan aktivitas radioaktif timidin sebelum ditambahkan pada kultur hepatosit. Hasil yang diperoleh ditunjukkan pada tabel -2 dibawah ini.

Tabel-3. Aktifitas radioaktif timidin sebelum ditambahkan pada kultur hepatosit.

Replikasi	Aktifitas radioaktif (cpm)
1	11.410
2	14,819
3	7,593
4	14,659
Rata-rata	12,120

Dengan hasil pemeriksaan diatas, maka dapat diterangkan bahwa [H^3] timidin yang ditambahkan pada tiap-tiap kultur berada dalam jumlah yang cukup. Terlihat pada tabel-2 bahwa aktifitas radioaktif yang ditambahkan pada tiap-tiap kultur jaringan rata-rata 12,120 cpm sedangkan pembacaan tertinggi 719 cpm. Hal ini berarti bahwa pemakaian [H^3]timidin oleh sel tidak lebih dari 5,9%. Jadi dengan pemeriksaan ini menjadi lebih jelas bahwa jika tidak terjadi kenaikan UDS pada peningkatan kadar senyawa uji bukan disebabkan kurangnya [H^3] timidin didalam larutan, tetapi karena senyawa uji tersebut memang tidak memiliki sifat mutagenik.

5.4.2. Pemeriksaan filtrat cucian sebelum pemecahan sel

Sebelum dilakukan pemecahan sel, maka pada larutan pencuci dilakukan pemeriksaan radioaktifnya untuk mengetahui seberapa banyak sisa radioaktif yang masih terdapat diluar sel. Untuk maksud ini dalam satu seri percobaan diambil 12 sampel secara acak yang hasilnya terdapat pada tabel-3 dibawah ini.

Tabel-4 Aktifitas radioaktif filtrat cucian sebelum pemecahan sel.

Sampel	Aktifitas radioaktif (cpm)
1	27
2	30
3	17
4	39
5	30
6	64
7	35
8	35
9	29
10	32
11	35
12	15
Rata-rata \pm SD	32 \pm 12

Harga rata-rata filtrat cucian sebelum pemecahan sel diperoleh rata-rata 32 cpm. Hal ini berarti bahwa, setelah filtrat cucian diambil, dan didalam tabung masih tersisa 200 μ l, sedangkan volume semula 1000 μ l. Maka besarnya $[H^3]$ timidin yang ikut terbaca adalah $200/1000 \times 32 \text{ cpm} = 8 \text{ cpm}$. Besarnya aktifitas radioaktif dari larutan yang tersisa tersebut dapat diabaikan. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa sebelum dilakukan lisis, diluar sel telah bersih dari sisa $[H^3]$ timidin. Jadi aktifitas radioaktif yang terbaca hanya berasal dari $[H^3]$ timidin yang ada didalam sel.

5.4.3. Pemeriksaan hasil digesti pada endapan akhir

Setelah dilakukan hidrolisis DNA pada suhu 90 °C selama 20 menit, maka sisa endapan akhir didigesti dan diukur aktifitasnya radioaktifnya. Pemeriksaan ini dilakukan untuk mengetahui seberapa banyak DNA yang belum terhidrolisis sehingga akan ikut terbuang bersama dengan endapan akhir. Hal ini akan berpengaruh pada sensitifitas pembacaan aktifitas radioaktif maupun kecermatan dari metode ini. Hasil pemeriksaan yang diperoleh, terdapat pada tabel-4 dibawah ini.

Tabel-5. Aktifitas radioaktif hasil digesti pada endapan akhir.

Sampel	Aktifitas radioaktif (cpm)
1	6
2	10
3	12
4	8
Rata-rata \pm SD	9 \pm 3

Dari tabel diatas terlihat bahwa aktivitas radioaktif hasil digesti endapan akhir menunjukkan harga rata-rata 9 cpm. Hal ini menunjukkan bahwa semua DNA yang terdapat didalam kultur sel telah terhidrolisis sempurna. Dengan demikian, aktivitas radioaktif [H^3]timidin yang berada didalam sel telah terbaca semuanya pada scintillation counter.

5.3.4. Penentuan korelasi antara jumlah sel dan absorbansi

Didalam pencucian sel atau pemisahan filtrat dari endapannya, maka besar kemungkinan sel terikut pada larutan pencuci atau masih ada DNA yang tertinggal bersama endapannya. Keadaan ini akan menimbulkan kesalahan oleh karena itu jumlah DNA pada larutan akhir akan lebih

aktifitas radioaktifnya harus dikoreksi dengan jumlah relatif DNANYa. Dengan menggunakan pemahaman bahwa didalam jumlah sel yang sama terdapat jumlah DNA yang sama, maka dibuatlah kurva hubungan antara jumlah sel dan absorbansi spektrofotometer. Sehingga dengan demikian, variasi jumlah DNA yang terdapat pada larutan akhir yang siap dibaca aktifitas radioaktifnya dapat dikoreksi. Jadi aktifitas radioaktif yang terbaca menggambarkan seberapa jauh kerusakan yang terjadi pada DNA, sebab aktifitas radioaktif yang tinggi juga dapat dihasilkan dari kerusakan DNA yang kecil tetapi jumlah DNANYa banyak. Dari penentuan korelasi linier antara jumlah sel dan absorbansi pada lampiran-2. Diperoleh hubungan yang linier dengan koefisien korelasi $r = 0,9829$ pada panjang gelombang 587,6 nm. Dengan demikian, untuk menghitung kembali jumlah sel yang aktifitas radioaktifnya terbaca dapat digunakan absorbansinya.

5.5. Penentuan efek mutagenik

5.5.1. Penentuan efek mutagenik hidrazin monochloride sebagai kontrol positif

Untuk mengetahui kemampuan metode ini dalam mendeteksi sifat mutagenik dari suatu senyawa, maka dilakukan pemeriksaan pada senyawa yang telah jelas memiliki sifat mutagenik berdasarkan penelitian terdahulu yang pernah dilakukan. Dari beberapa senyawa yang telah diketahui bersifat mutagenik maka dipilih hidrazin HCL sebagai kontrol positif. Hasil pembacaan aktifitas radioaktif UDS karena pengaruh pemberian hidrasin HCl terdapat pada tabel-5.

Dari perhitungan anava pada lampiran-3 diperoleh harga $F_{hitung} = 42,5$ yang berarti jauh lebih besar dari $F_{tabel} = 6,99$ pada taraf kemaknaan 1%. Dengan

demikian ada perbedaan yang bermakna antar kelompok data diatas. Oleh karena itu perhitungan dilanjutkan dengan mencari harga HSD (Honestly Significant Difference). Pada taraf kemaknaan 1% diperoleh HSD = 279. Hal ini berarti ada perbedaan yang bermakna pada kenaikan UDS dari kadar hidrazin HCl 67 ppm ke 100 ppm dan UDS yang terjadi pada kadar hidrazin HCl 100 ppm lebih tinggi dari blanko. Perbedaan tersebut akan tampak lebih jelas jika ditinjau dari grafik pada gambar dibawah ini.

Dengan mengacu pada persyaratan untuk senyawa mutagenik yaitu pada kenaikan kadar terjadi peningkatan UDS dan pada salah satu kadar harga UDSnya lebih besar dari blanko, maka dapat disimpulkan bahwa hidrazin HCl telah memenuhi syarat sebagai senyawa yang memiliki sifat mutagenik.

Tabel-6. Unscheduled DNA synthesis karena pengaruh hidrazin HCl.

Perlakuan	Replikasi	Aktifitas (cpm)	Rata-rata \pm SD (cpm)
Blanko	1	111	76 \pm 32
	2	70	
	3	48	
Hidrazin 67 ppm	1	67	69 \pm 4
	2	66	
	3	73	
Hidrazin 100 ppm	1	672	502 \pm 131
	2	516	
	3	356	
	4	467	
Hidrazin 150 ppm	1	626	658 \pm 53
	2	630	
	3	719	

Dengan positifnya efek mutagenik hidrazin HCl ini sebagai kontrol positif, maka metode uji unscheduled DNA synthesis yang dilakukan pada penelitian ini memiliki kemampuan untuk menguji apakah suatu senyawa memiliki sifat mutagenik atau tidak.

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan :

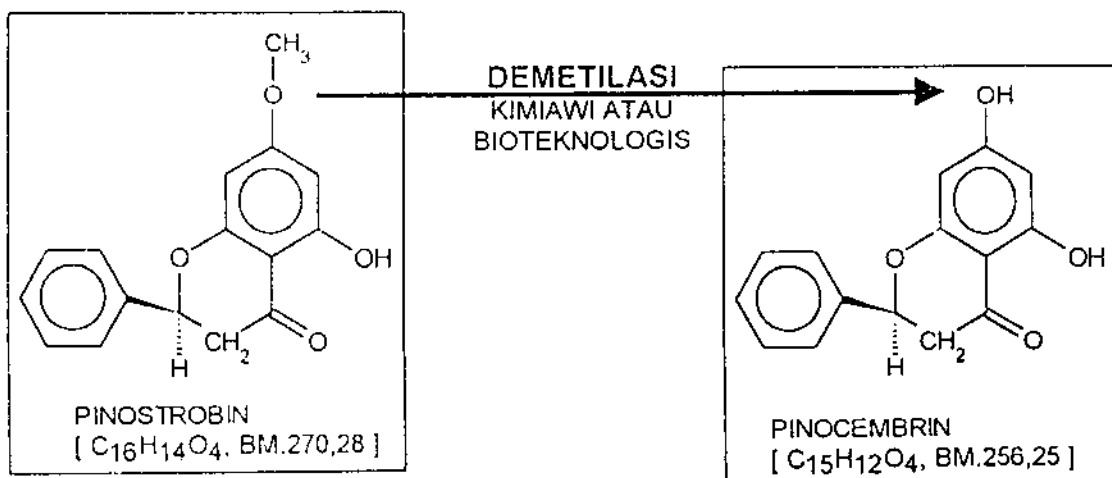
Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan untuk mengisolasi pincembrin dari rimpang Temu Kunci dan menguji bioaktivitasnya sebagai antimutagenik terhadap Hidrazin-HCl pada sistem kultur hepatosit tikus terisolasi dengan parameter "unscheduled DNA synthesis", dapat ditetapkan beberapa kesimpulan sebagai berikut :

- (1) Dari rimpang Temu Kunci dapat diisolasi pincembrin dengan kemurnian tidak kurang dari 93% berdasarkan data luas puncak kromatogram HPLC.
- (2) Pincembrin hasil isolasi dalam konsentrasi 100 ppm tidak mempunyai aktivitas (2,50%) penangkap radikal bebas DPPH (difenil pikril hidrazil). Aktivitas pada konsentrasi 500 ppm hanya sebesar 16,25%. Sedangkan pada konsentrasi 1000 ppm selama reaksi 1 jam hanya 21,67 %.
- (3) Bioaktivitas antimutagenik terhadap Hidrazin_HCl tidak perlu dilakukan karena alasan efisiensi penelitian, namun akan diganti metoda yang dapat mengukur langsung pengaruhnya pada parameter system enzim repair mutasi DNA.

6.2. Saran-saran

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasannya dapat disarankan sebagai berikut :

- (1) Metoda analisis HPLC pada kolom " Nucleosil 120-5 C₁₈ " dengan eluasi gradien mulai 10% metanol + 90% air, sampai 100% metanol selama 25 menit dengan kecepatan 1 ml/menit, dilanjutkan eluasi metanol 100% selama 5 menit kecepatan 1,5 ml/min, dan total waktu 30 menit, dapat diaplikasikan pada bahan/produk ekstrak Rimpang Temu Kunci untuk analisis standarisasinya.
- (2) Perlu dilakukan cara pemisahan pinocembrin yang lebih praktis dan efisien, namun dengan kemurnian yang lebih tinggi, misalnya dengan penggunaan kolom pemisahan dengan media Sephadex LH20 yang bersifat "reuseable".
- (3) Penelitian bioaktivitas antimutagenik dapat dilanjutkan dengan penelitian in vitro atau seluler dengan hepatosit dengan tujuan mengetahui mekanisme proteksinya dengan meningkatkan enzim sistem repair-DNA. Demikian pula apakah bioaktivitas proteksi tersebut juga sampai pada hambatan inisiasi onkogenik.
- (4) Mengingat prospek pinocembrin dalam fitofarmasi, namun kadar kecil sedangkan pinostrobin kadar besar, maka perlu dicari /dicoba metoda untuk merubah pinostrobin menjadi pinocembrin secara reaksi kimia atau bioteknologis seperti ilustrasi berikut :



DAFTAR PUSTAKA

1. Achmad, S.A., et.al., 1990, Flavonoid dan Phyto Medica, Kegunaan dan Prospek, **Journal Phyto Medica**, 1(3), hal. 120-127.
2. Anonim, 1987, **Materia Medika Indonesia**, Vol. 1, Depkes R.I., Jakarta.
3. Ames, B.N. and Mc Cann, J., 1976, **Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System, Screening Testin Chemical Carcinogenesis**, Editor by R. Martesano, H. Bartsch, L. Tomatis, IARC, Lyon, pp. 493-501.
4. Althaus, F.R., et.al., 1982, Chemical Quantification of Unschedule DNA Synthesis in Cultured Hepatocytes as An Assay For The Rapid Screening of Potential Chemical Carsinogenesis , **Cancer Research**, 42, pp. 3010-3015.
5. Bishop, J.M., 1989, **Oncogens and Clinical Cancer**, In **Oncogen and The Moleculer Origins of Cancer**, R.A., Weinberg, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p.327-358.
6. Bremner PD et al, 1998, Pinocembrin chlacone : An Antibacterial Compound from *Helichrysum trilineatum*, **Planta Medica**, Dec : 64 (8), 777.
7. Brown, T.A., 1989, **Genetics, A.Moleculer Approach**, Van Nostrand reinhold (International) Co.Ltd., London.
8. Del Rayo Camacho M., et al, 1991, Pinocembrin : A Bioactive Flavanone from *Teloxys Graveolens*, **J. Ethnopharmacoll.**, Mar : 31 (3), 383-389.
9. Dey, P.M. and Mabry, T.J., 1991, **Methods in Plants Biochemistry**, Academic Press, London
10. Harbone, J.B. and Mabry, T.J., 1992, **Flavonoids, Advances and Research**, Chapman and Hall, London.
11. Fliegmann J, et al, 1992, Molecular Analysis of Chalcone and Dihydropinosylvin Synthase from Scots Pine (*Pinus sylvestris*), and Differential Regulation of These and Related Enzyme Activities in Stressed Plants, **Plant Mol Biol**, Feb : 18 (3), 483-503.
12. Harbone, J.B. , 1987, **Metode Fitokimia, Penuntun cara Modern Menganalisis Tumbuhan**, terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, edisi kedua, Penerbit ITB Bandung.
13. Heyne, K., 1987, **Tumbuhan Berguna Indonesia**, Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta.

14. Herkowitz, I.H., 1977, **Principles Genetics**, Macmillan Publishing Co., Inc, New York, pp. 3-10.
15. Koesmadji, Yusuf H.A., 1986, **Buku Materi Pokok Genetika Lanjutan**, Jilid 3-6, ed. 1, Univ. Terbuka, Depdikbud.
16. Krizkova L. et al, 1998, The Effect of Flavonoids Ofloxacin-Induced Mutagenicity in *Euglena gracilis*, *Mutat Res*, Aug 7:416 (1-2), 85-92.
17. Liu-YL., et.al., 1992, Isolation of Potensial Cancer Chemopreventive Agents from *Eriodictyon californicum*, *Journal Natural Product*, 55 (3).
18. Maggy Thenawidjaja, 1994, **Dasar-dasar Biokimia**, Jilid 3, Penerbit Erlangga, hal.132-134, 252-253
19. Mulyadi T.,1995, **Isolasi dan Bioaktivitas Senyawa Flavonoid dari Rimpang *Kaempferia pandurata* Roxb**, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya.
20. Nowel,S.,and P.C.,1975, **Cytogenetics, Cancer : Chemical and Phisical Carcinogenesis**, editor by Becker F.F., Plenum, Press, New York, p.3-4.
21. Rossiter, B.W., and Hamilton, J.F., 1987, **Physical Methods of Chemistry, Determination of Chemical Composition and Molecular Structur - Part A**, 2nd.ed., vol. III A, John Wiley&Sons Inc., New York, p.517-566.
22. Sarma DSR, Rajalaksmi and Farber,1975, **Interction of Carcinogens with Nucleic Acids, Cancer : Chemical and Physical Carcinogenesis**, edit, Becker FF, Plenum Press, New York, 235-271.
23. Santos AC, et al, 1998, Effect of Naturally Occuring Flavonoids on Lipid Peroxidation and Membrane Permeability Transition in Mitochondria, *Free Radic Biol Med*, Jun : 24(9), 1455-1461.
24. Schirrmacher,V.,1986, **Krebs-Tumoren, Zellen, Gene**, Verlagsgesellschaft mbH &Co.,seiten 34.
25. Siess, MH, et al, 1995, Heterogenous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes, *Toxicol Appl Pharmacol* 130 (1), p. 73-78.
26. Singer, M and Berg, P.,1991, **Genes and Genomes**, University Science Books, California, p.40,53.
27. Sippel,A.E., und Nordhein, A.,1985, **Erbsubstanz DNA, Spektrum der Wissenschaft : Verstandliche Forschung**, Verlagsgesellschaft mbH &Co Heidelberg, 166-168.

28. Villanueva VR, 1970, The Flavonoids of Propolis, Isolation of A New Bacteristatic Substance : Pinocembrin (Dihydroxy-5,7 Flavanone), *Ann Inst Pasteur (Paris)*, Jan : 118 (I), 84-7.
29. Venitt S. and Parry J.M. 1984, **Background to Mutagenicity Testing, Mutagenicity Testing :A Practical Approach, IRL Press, Washington**, pp. 1-23.
30. Waters, R., 1984, **DNA Repair Test in Culture Mammalian Cells, Mutagenicity Testing : a Practical Approach** edited by Venitt, S., and Perry, J.M. IRL Press Limited, England, p. 99-117.
31. Willard, H., et al, 1981, **Instrumental Methods Of Analysis, 6th ed.**, D.van Nostrand Company, New York, p.249-255.
32. Williams GM, 1977, Detection of Chemical Carcinogens by Unscheduled DNA Synthesis in Rat Liver Primary Cell Cultures, *Cancer Research*, 37, 1845-1851.
33. Wollenweber E and Dietz N.H., 1981, Occurrence and Distribution of Free Flavonoids Aglycones in Plants, *Phytochemistry*, 20, hal. 869-932.

LAMPIRAN-2 :

KOMPOSISI LARUTAN DAPAR SEGLEN-SB [16]

MEDIA SEGLEN-SB

Media ini digunakan untuk sementara untuk menjaga vitalitas hepatosit terisolasi setelah diperoleh dari preparasi dan menunggu aplikasi selanjutnya (kultur) karena memiliki kapasitas dapar yang kuat.

KOMPONEN	KONSENTRASI (G/L)
1. NaCl	4,300
2. KCl	0,400
3. CaCl ₂ .2H ₂ O	0,180
4. MgCl ₂ .6H ₂ O	0,130
5. KH ₂ PO ₄	0,150
6. Na ₂ SO ₄	0,100
7. HEPES	7,200
8. TES	6,900
9. TRICINE	6,500
10. NaOH 1 N	52,5 ml

CATATAN :

pH larutan dibuat 7,40 dan digunakan setelah sterilisasi cara filtrasi.

PAMERAN

7-1 SEP 2004