

1. SPICES

2. ANTINEOPLASTIC

IR - Perpustakaan Universitas Airlangga

AGENTS

KRB

KK-2B

615.324 39

Suk

P



LAPORAN PENELITIAN  
ILMU PENGETAHUAN DASAR  
TAHUN ANGGARAN 2001

**PENGARUH PENOSTROBIN DARI RIMPANG TEMU KUNCI  
(KAEMPFERIA PANDURATA) TERHADAP AKTIVITAS PERUSAKAN  
DNA SEL KANKER MEILOMA SECARA INVITRO**



\*016503141\*

**Peneliti :**

**Drs. SUKARDIMAN, M.S.  
Drs. ABDUL RAHMAN, M.Si.  
Dra. ATY WIDYAWARUYANTI**

**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

3000165033141

**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh : Proyek Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Dasar  
DIP Nomor : 059 /XXIII/1--/2001 Tanggal 1 Januari 2001  
Kontrak Nomor : 21/P2IPTD/DPPM/III/2001  
Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdiknas  
Nomor Urut : 06

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA**


NOPEMBER , 2001

**IDENTITAS DAN PENGESAHAN  
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN  
PENGEMBANGAN ILMU PENGETAHUAN DAN TEKNOLOGI  
DASAR**

3000165033141

1. a. Judul Penelitian :  
**Pengaruh Pinostrobin dari Rimpang Temu Kunci ( *Kaempferia pandurata*) terhadap Aktivitas Perusakan DNA Sel Kanker Mieloma Mencit Secara Invitro**
- b. Macam Penelitian : I / ~~II~~ / III
2. Kepala Proyek Penelitian :
- a. Nama Lengkap dan Gelar : Drs.Sukadiman,Apt,MS
  - b. Jenis Kelamin : Laki-laki
  - c. Pangkat/Golongan/NIP : Penata / III-D/ 131801629
  - d. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
  - e. Fakultas : Farmasi
  - f. Universitas : Airlangga
  - g. Bidang Ilmu yang diteliti : Farmakognosi
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 orang
4. Lokasi Penelitian : Fakultas Farmasi Unair
5. Bila Penelitian ini merupakan peningkatan kerjasama kelembagaan sebutkan:
- a. Nama Instansi :-
  - b. Alamat :-
6. Jangka Waktu Penelitian : 5 bulan
- 7 Biaya yang diperlukan : Rp.10.000.000,-  
(Lima juta rupiah)

Surabaya, 19 November 2001  
Ketua Peneliti

  
Drs.Sukardiman,Apt,MS

NIP : 131 801 629

Menyetujui  
Ketua Lembaga Penelitian Unair,

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

NIP 130 701 125

**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

## RINGKASAN

### PENGARUH PINOSTROBIN DARI RIMPANG TEMU KUNCI (*KAEMPFERIA PANDURATA*) TERHADAP AKTIVITAS KERUSAKAN DNA SEL KANKER MIELOMA MENCIT SECARA INVITRO

(Sukardiman, Abdul Rahman, Aty Widyawaruyanti, 2001, 22 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 dari penelitian ini adalah menentukan aktivitas pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata*) terhadap aktivitas perusakan DNA sel kanker mieloma mencit secara invitro.

Penelitian dilakukan dengan tahapan pertama : melakukan isolasi senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci dan kemudian dilakukan identifikasi dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis), UV dan FTIR. Sel mieloma dibiakkan pada medium RPMI yang ditambahkan 10% Fetal Bovin Serum. Senyawa andrografolid dibuat dalam 1 konsentrasi yaitu : 1, 10, 100, 500 dan 1000 ug/ml dengan penambahan DMSO, dan ditambahkan kedalam biakan kultur sel leukimia dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 24 jam. Pengamatan efek perusakan DNA sel kanker ditentukan dengan metode ekstraksi DNA total dengan phenol dan dilakukan analisis dengan gel elektroforesis.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata*) tidak memiliki aktivitas perusakan DNA sel kanker mieloma mencit.

Disarankan untuk penelitian aktivitas perusakan DNA sel kanker lebih lanjut dari senyawa pinostrobin dengan metode analisis kerusakan DNA yang lain, seperti pelabelan DNA dengan 3H-Timidin dan pelabelan dengan TUNEL.

---

(LP. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, )

## SUMMARY

### EFFECT OF PINOSTROBIN FROM TEMU KUNCI (*KAEMPFERIA PANDURATA*) AGAINST DNA FRAGMENTATION OF MICE MIELOMA CELLS IN VITRO

(Sukardiman, Abdul Rahman, Aty Widyawaruyanti, 2001,22pages)

The cancer deases are the second conducted caused of human death after the cardiovascular deases, and many of anticancer chemotheraphy caused side effect, which were they kill both same cancer and normal cells. So now, some research and development were to find of the bioactive compounds from Indonesian medicinal plants which have potential and selective antivancer activity is conducted.

The objective of this research was to evaluate the activity of pinostrobin isolated from temu kunci (*Kaempferia pandurata*) against DNA fragmentation of mice meiloma cell in vitro.

This research has been carried out firstly by isolation of the rhizome to produce pinostrobin from temu kunci (*Kaempferia pandurata*), and to identify the compound by Thin Layer Chromatography (TLC), spectrophotometry of UV and FTIR . The mileoma cell were incubated in RPMI media, Fetal Bovine Serum 10%. The concentration of pinostrobin were : 1, 10, 100, 500 and 1000 ug/ml, that was initially dissolve in DMSO. Their solution were added into mieloma cell culture and then incubated for 24 hours, at 37°C in CO<sub>2</sub> incubator. Determination of DNA fragmentation activity by extraction of total DNA by phenol extraction methode and analyse by gel electrophoresis.

The result of these research has showed that the pinostrobin from temu kunci (*Kaempferia pandurata*) do not have DNA fragmentation activity of mice meiloma cell culture in vitro.

Researchers is suggested to used the other methode to analyse DNA fragmentation activity , such as : DNA labeling by <sup>3</sup>H-Timidin or labeling by TUNEL .

---

(LP. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga)

## KATA PENGANTAR

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

**Pengaruh Pinostrobin dari Rimpang Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*) terhadap Aktivitas Perusakan DNA Sel Kanker Mieloma Mencit Secara *Invitro*.**

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 Universitas Airlangga.
4. Direktur RSUD Dr. Soetomo Surabaya.
5. Dekan Fakultas Farmasi Unair.
6. Kepala Laboratorium Farmakognosi, 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 / bahan alam hayati Indonesia.

Surabaya, Desember 2001

Tim Peneliti

## DAFTAR ISI

LEMBAR IDEBTITAS DAN PENGESAHAN .....	i
RINGKASAN .....	ii
SUMMARY .....	iv
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI .....	vii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	4
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	11
BAB IV METODE PENELITIAN .....	12
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....	14
DAFTAR PUSTAKA .....	21
LAMPIRAN	

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang Masalah

Dewasa ini penyakit kanker masih menduduki penyebab kematian yang kedua setelah penyakit kardiovaskular, serta masih adanya obat-obat antikanker yang memiliki efek farmakologi yang kurang selektif, efek samping yang merugikan dan dilaporkan adanya resistensi beberapa jenis kanker dengan pemberian kemoterapi. Untuk mengatasi hal tersebut diatas maka sekarang dikembangkan pencarian dan penelitian bahan boaktif dari tanaman yang memiliki khasiat antikanker yang potensial dan selektif.

Salah satu penelitian untuk pencarian bahan bioaktif antikanker dari tanaman seperti yang dilakukan oleh Ermawati (1996) yang telah dapat melakukan isolasi dan identifikasi senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata*) yang memiliki aktifitas sitotoksik terhadap kultur sel primer kanker payudara manusia. Efek sitotoksik secara invitro dari senyawa pinostrobin terhadap kultur sel line MCF-7 atau *human breast cancer* juga telah dilakukan penelitiannya oleh Bail.,2000. Dari hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa senyawa pinostrobin tidak menunjukkan efek antikanker terhadap kultur sel kanker payudara yang memiliki reseptor estrogen, tetapi memiliki aktivitas terhadap kultur sel kanker payudara yang yang tidak memiliki reseptor estrogen.



Sukardiman (1999) telah dapat menentukan mekanisme kerja sitotoksik dari senyawa pinostrobin, yaitu dengan cara menghambat aktivitas 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 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 / kerusakan DNA sel kanker dan selanjutnya berpengaruh terhadap proses dalam sel khususnya proses replikasi, serta diakhiri dengan kematian sel kanker ( Hsiang, 1989 ; Joseph, 1989 ; Pommier 1993).

Pada penelitian ini akan ditentukan aktivitas perusakan DNA sel kanker mieloma mencit dengan penambahan pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata*) secara in vitro. Aktivitas perusakan DNA ditentukan dengan metode isolasi DNA total sel kanker mieloma setelah perlakuan pinostrobin, sehingga dapat ditentukan ada tidak fragmentasi / kerusakan DNA setelah dilakukan elektroforesa.



Penelitian dilakukan dengan tahapan pertama melakukan isolasi senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata*) dengan cara maserasi menggunakan pelarut heksan, kemudian dilanjutkan dengan analisis KLT dan spektroskopi: UV, FTIR, MS. Kemudian sel mieloma mencit dibiakkan pada medium RPMI yang ditambahkan 10% Fetal Bovin Serum. Senyawa pinostrobin dibuat dalam 5 konsentrasi yaitu: 1, 10, 100, 500 dan 1000 ug/ml dengan penambahan DMSO, dan ditambahkan kedalam biakan kultur sel leukemia dan kemudian dinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 24 jam. Pengamatan efek kerusakan DNA dilakukan dengan isolasi DNA total dengan metode ekstraksi phenol, dan dilanjutkan dengan gel elektroforesis untuk menentukan ada tidaknya fragmentasi / kerusakan dari DNA sel kanker mieloma.

## 1.2. Rumusan Masalah

Apakah senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata*) memiliki aktivitas perusakan DNA sel kanker mieloma mencit secara in vitro?

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 1. Tinjauan tentang tanaman (*Kaempferia pandurata*)

Tanaman *Kaempferia pandurata* termasuk dalam famili Zingiberaceae, dan memiliki nama daerah temu kunci. Rimpang dari temu kunci tumbuh mendatar berjimpang-jimpang dan beruas warna kuning.

Kegunaan dari rimpang temu kunci disamping sebagai bumbu sayur, juga digunakan sebagai obat tradisional : obat batuk kering, sariawan, gangguan pada usus besar, radang selaput lendir (Heyne,1987). Dan berdasarkan penelitian Rapta,et.al. 1995. pinostrobin memiliki aktivitas antioksidan dan memiliki aktivitas relaksasi otot polos (Mata,R.1997)

Kandungan kimia dari tanaman temu kunci adalah : alpinetin ,pinostrobin, pinocembrin, bosengergin-A, rubrain, panduratin, kaempferol, campher, camphen, cineol, geraniol dan metil sinamat (Wollenweber,1981 ; Rahayu,1994 ; Tanjung ,1995). Kandungan kimia yang paling dominan dari rimpang temu kunci adalah senyawa pinostrobin dengan kadar kandungannya sebesar 2,5% (Dean, 1964).

Pinostrobin termasuk senyawa flavonoid golongan flavanon yang berbentuk aglikon, sehingga dalam proses ekstraksinya dapat digunakan pelarut non polar seperti : eter, heksan atau kloroform. (Markam,1988)..

## 2. Tinjauan Tentang Kanker

Tumor adalah istilah umum untuk menunjukkan adanya pertumbuhan tidak normal dari masa atau jaringan yang tidak membahayakan kehidupan. Tumor terbentuk disebabkan mutasi atau biosintesis sel, yaitu kekeliruan urutan DNA karena terpotong, tersubstitusi atau adanya pengaturan kembali, adanya adisi dan integrasi bahan genetik virus ke dalam gen sel dan adanya perubahan ekspresi gen juga dapat menyebabkan hal tersebut terjadi. Tumor yang membahayakan disebut kanker(Siswandono,1995).

Sel kanker merupakan *Outlaw cell* karena tumbuh secara tidak teratur, melanggar semua kaidah normal, tidak peduli akan kontrol dalam perbanyakan dan menggunakan agendanya sendiri(Sofyan,2000).

Sifat umum dari kanker ialah sebagai berikut:

1. Pertumbuhan berlebihan umumnya berbentuk tumor
2. Gangguan differensiasi dari sel dan jaringan.
3. Bersifat invasif, mampu tumbuh di jaringan sekitarnya.
4. Bersifat metastatik menyebar ke tempat lain dan menyebabkan pertumbuhan baru.
5. Memiliki hereditas bawaan (*Acquired heredity*) yaitu turunan sel kanker juga dapat menimbulkan kanker.
6. Pergeseran metabolisme ke arah pembentukan makro molekul dari nukleosida dan asam amino serta peningkatan katabolisme karbohidrat untuk energi sel.(Nafrialdi, 1995)

Sel kanker mengganggu tuan rumah karena menyebabkan desakan akibat pertumbuhan tumor, penghancuran cairan jaringan tempat tumor berkembang atau bermetastasis dan gangguan sistemik lain adalah sebagai akibat sekunder dari pertumbuhan sel kanker (Nafrialdi,1995). Kanker dapat disebabkan oleh faktor fisis : radiasi sinar x, sinar ; faktor kimiawi : senyawa hidrokarbon aromatis, zat warna azo, nitrozo dan anilin, amin aromatis dan karena virus-virus tertentu.

Dalam terapi kanker pada tingkat molekuler dikenal tiga kategori gen sebagai target yaitu onkogen, gen suppresor tumor dan gen yang mengatur replikasi dan repair DNA. Kebanyakan kanker disebabkan oleh mutasi pada satu atau lebih dari ketiga kategori gen tersebut (Sofyan,2000).

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

## 2.1 Tinjauan Tentang Antikanker

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

Mekanisme kerja anti kanker yang berdasarkan atas gangguan pada salah satu proses sel yang essensial adalah sebagai berikut: (Ganiswara, 1995; Siswandono, 1995)

### 1. Alkilator

Cara kerjanya melalui pembentukan ion karbonium atau kompleks lain yang sangat reaktif. Efek sitostatik maupun efek sampingnya berhubungan langsung dengan terjadinya alkilasi DNA.

Golongan alkilator : Mustar nitrogen, alkil sulfonat, nitrosurea.

### 2. Anti metabolit

Senyawa yang menghambat jalur metabolik yang penting untuk kehidupan dan reproduksi sel kanker, melalui penghambatan folat, purin, pirimidin, dan asam amino serta jalur nukleosida pirimidin yang diperlukan untuk sintesis DNA. Penghambatan replikasi DNA terjadi

secara langsung maupun tidak langsung sehingga menyebabkan sel tidak berkembang biak dan mengalami kematian.

Golongan anti metabolit : 5-fluorourasil, antagonis pirimidin, metotreksat(antagonis folat).

### 3. Produk alamiah

Golongan produk alamiah : alkaloid vinka, zat ini berikatan secara spesifik dengan tubulin, komponen protein mikrotubus, spindle mitotik dan mengblok proliferasinya. Akibatnya terjadi disolusi mikrotubulus sehingga sel terhenti dalam metafase.

### 4. Hormon

Golongan hormon : hormon adrenokortikosteroid ( prednison)

### 5. Isotop radioaktif

Golongan isotop radioaktif : Iodium (natrium iodida)

### 6. Lain-lain

Termasuk didalamnya adalah substitusi urea (Hidroksiurea)

## 2.2. Tinjauan Tentang Kultur Sel

Kultur sel merupakan kultur yang diperoleh dari hasil dispersi sel jaringan hidup. Jaringan yang akan digunakan dipecah – pecah melalui proses enzimatik, kimiawi, ataupun secara mekanis untuk menghasilkan suspensi sel yang kemudian ditanam kedalam media yang sesuai. Kultur sel semacam ini disebut

sebagai kultur sel primer. Hasil pembiakan secara berulang – ulang ataupun hasil transformasi dari kultur sel primer disebut *cell lines*(Freshney,1987)

Keuntungan dari penggunaan sistem kultur antara lain adalah dari segi kontrol lingkungan fisiko kimia yang lebih tepat serta kondisi biologis yang relatif konstan. Selain itu karakterisasi dan homogenitas sampel dari sistem kultur lebih baik dibandingkan dengan jaringan hidup dari sel hewan. Replikasi sel selama percobaan identik (Freshney,1987)

Secara ekonomi penggunaan sistem kultur sel juga lebih menguntungkan karena pereaksi yang digunakan juga lebih sedikit sehingga lebih menghemat bahan. Komponen – komponen penting dalam kultur juga telah diidentifikasi sehingga membuat penggantian media kultur dengan bahan lain lebih praktis (Freshney,1987).

Sampai saat ini, baik kultur sel primer maupun kultur *cell lines* mamalia telah banyak dikembangkan untuk keperluan berbagai penelitian secara invitro, termasuk penelitian tentang antikanker menggunakan kultur sel mieloma, untuk menghindari penggunaan hewan coba serta untuk memberikan informasi tentang toksisitas dari bahan-bahan kimia dan obat-obatan (Jaime,19990).

### 2.3. Tinjauan Tentang Sel Mieloma

Sel mieloma adalah salah satu jenis sel tumor hasil transformasi sel-sel pembentuk antibodi yang akhirnya menjadi malignan. Pemunculan sel mieloma pada hewan coba seperti mencit, dapat dilakukan dengan pemberian senyawa

karsinogen golongan hidrokarbon aromatis seperti minyak mineral melalui rute intraperitoneal secara berturut-turut selama tiga hari dengan harapan akan muncul tumor atau kanker satu tahun kemudian.

Jenis sel mieloma yang sering digunakan untuk uji in vitro adalah galur mineral oil plasmacytoma-21 (MPOC-21), sedangkan turunannya yang banyak dimanfaatkan adalah galur X 63 yang merupakan hasil seleksi kultur *cell line* mieloma. Sel mieloma tersebut banyak di kembangbiakan untuk keperluan uji in vitro (Indrawati, 1999)



## BAB III

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### 3.1. Tujuan Penelitian

Menentukan pengaruh senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata*) terhadap aktivitas perusakan DNA sel kanker mieloma mencit secara *invivo*

#### 3.2. Manfaat Penelitian

Diperoleh landasan ilmiah tentang mekanisme sitotoksik senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata*) lebih lanjut, khususnya tentang efeknya terhadap kerusakan DNA sel kanker. Sehingga dapat digunakan menjadi yang dapat digunakan sebagai data ilmiah, apabila senyawa tersebut akan dikembangkan menjadi bahan obat antikanker.

## BAB IV

### METODA PENELITIAN

#### 1. Bahan Penelitian

##### 1.1. Bahan untuk isolasi

Rimpang temu kunci diperoleh dari pasar Wonokromo Surabaya.

##### 1.2. Bahan Kimia yang digunakan

Media RPMI, HEPES, penisilin, streptomisin, gentamisin, Fetal Bovin Serum (FBS), tripan biru, metanol, heksan, petroleum eter, phenol, etilasetat, SDS, agarosa.

#### 2. Alat-alat yang digunakan

Inkubator CO<sub>2</sub>, Sentrifuga, petridish, hemositometer, micropipet, mikroskop, elektroforosa, setrifuse.

#### 3. Tahapan Penelitian

##### 3.1. Isolasi dan identifikasi pinostrobin dari rimpang temu kunci

Sebanyak 500 gram serbuk rimpang temukunci diekstraksi dengan 1 liter heksan dengan cara maserari, dan maserasi diulang 5 kali. Kemudian ekstrak heksan diuapkan dengan vakum rotavapour, dan dilanjutkan pemurnian senyawa pinostrobin dengan cara melarutkan minyak lemak dengan petroleum eter. Kristal yang terbentuk direkristalisasi dengan metanol panas dan dilanjutkan dengan penyaringan. Kristal pinostrobin yang diperoleh dilakukan identifikasi dengan KLT dan spektroskopi : Ultra Violet dan IR.



### **3.2. Proses Thawing Sel Mieloma**

Sel mieloma yang akan dithawing di pindahkan kedalam tabung sentrifus yang berisi media RPMI , dan kemudfian disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Hasil sentrifuge berupa endapan sel dan supernatan, kemudian supernatan dipisahkan dari endapan sel . Sel ditanam dalam media yang sudah disiapkan dengan FBS 10% pada botol kultur . Kultur sel diinkubasi dalam inkubator 95% O<sub>2</sub> dan 5% CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C .

### **3.3. Uji Aktivitas Perusakan DNA Sel Kanker Mieloma dengan penambahan senyawa pinostrobin**

Senyawa pinostrobin dibuat dalam 5 konsentrasi yaitu : 1, 10, 100, 500 dan 1000 ug/ml dengan penambahan DMSO, dan ditambahkan kedalam biakan kultur sel mieloma dan kemudian diinkubasi pada shu 37°C dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 24 jam. Pengamatan efek kerusakan DNA ditentukan dengan metode ekstraksi phenol, dan dilanjutkan dengan gel elektroforesa yang mengandung etidium bromida. Aktivitas perusakan DNA ditentukan menggunakan parameter kualitatif yaitu ada atau tidaknya fragmentasi DNA pada pengamatan elektroforesa.

## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

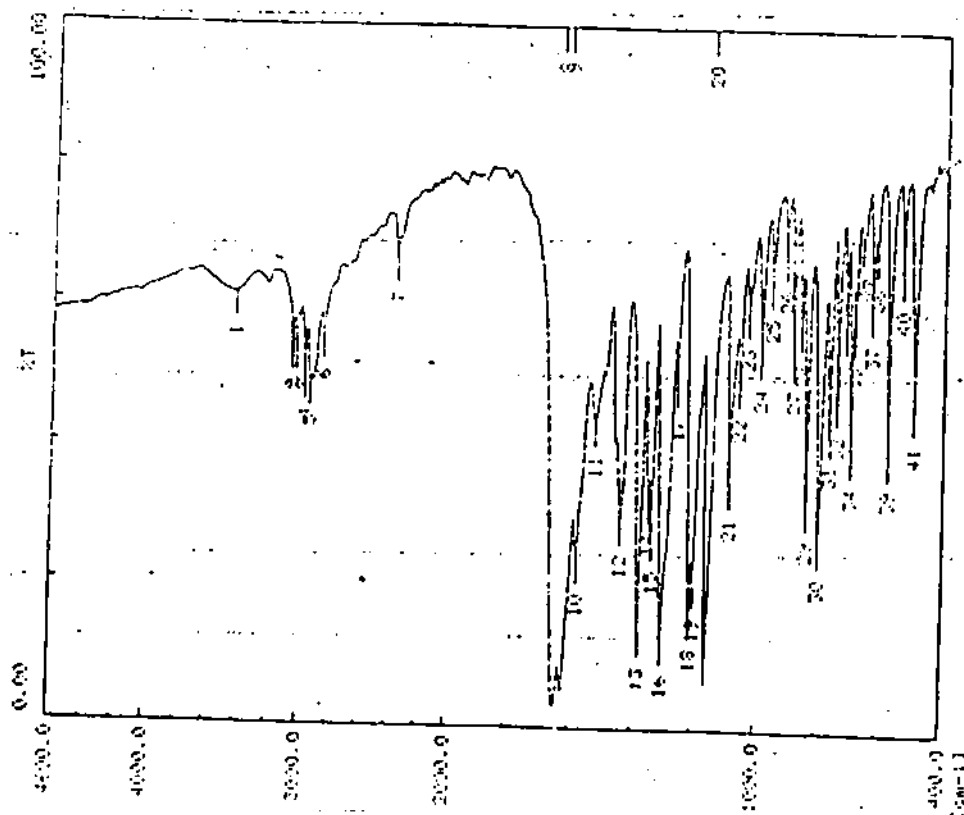
#### 1. Hasil Isolasi Pinostrobin dari Rimpang Temu Kunci

Senyawa pinostrobin hasil isolasi dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata*) adalah berupa kristal bentuk persegi empat kecil, tidak berwarna dan memiliki titik leleh sebesar 99-101°C. Hasil senyawa pinostrobin yang diperoleh dari 500 gram serbuk kering temu kunci adalah sebanyak 10,2 gram.

Hasil penentuan uji kualitatif senyawa pinostrobin dengan KLT yang menggunakan eluen heksan : etil asetat = 4 : 1 memiliki harga  $R_f = 0,52$  dan warna noda kuning intensif dengan penampakan noda uap amoniak. Dan digunakan pembandingan pinostrobin hasil isolasi dari Parwata (1999), dan ternyata memiliki harga  $R_f$  dan warna noda yang sama.

Hasil spektroskopi ultraviolet dari kristal pinostrobin yang diperoleh panjang gelombang maksimum 278 nm.

Hasil analisis spektrofotometer IR dari senyawa pinostrobin diperoleh spektrum FTIR seperti pada gambar 2. Dimana terlihat adanya pergeseran panjang gelombang pada  $3400\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya gugus OH bebas, serta pergeseran panjang gelombang  $1600\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan gugus C=O dan  $1450\text{ cm}^{-1}$  adalah adanya ikatan rangkap C=C. Dan hasil spektrofotometer IR dibandingkan juga dengan isolat pinostrobin hasil isolasi Parwata (1999), dan ternyata hasilnya juga identik.



Gambar 1. Spektrum FTIR dari senyawa pinostrobin hasil isolasi

**2. Uji viabilitas kultur sel mieloma hasil inisiasi.**

Media kultur yang digunakan adalah RPMI dengan HEPES, dan 10 Fetal Bovin Serum 10% serta digunakan antibiotik streptomisin dan gentamisin, dan digunakan petridish volume 2 ml serta diinkubasi dengan inkubator CO<sub>2</sub>.

Viabilitas sel mieloma dari hasil inisiasi kultur mieloma adalah seperti terlihat pada tabel 1.

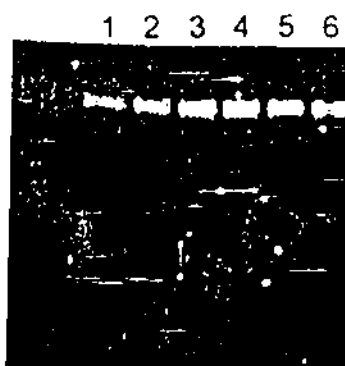
**Tabel 1. Viabilitas sel mieloma dari hasil inisiasi**

Replikasi	Persen Viabilitas Sel	Rata-rata persen viabilitas sel
1	92	91,6
2	90	
3	93	

Persen viabilitas sel leukemia yang diperoleh dari percobaan ini adalah sebesar 91,6 %, hal ini menunjukkan bahwa metode kerja ataupun cara pembuatan kultur sel mieloma dapat digunakan untuk uji kerusakan DNA .

### 3. Hasil Uji Aktivitas Kerusakan DNA Sel Kanker dengan Penambahan Senyawa Pinostrobin.

Pengamatan efek kerusakan DNA ditentukan dengan metode ekstraksi phenol, dan dilanjutkan dengan gel elektroforesis yang mengandung etidium bromida. Aktivitas kerusakan DNA ditentukan menggunakan parameter kualitatif yaitu ada atau tidak fragmentasi DNA pada pengamatan elektroforesis. Dan dari hasil perlakuan dengan berbagai konsentrasi pinostrobin, hasil elektroforesisnya dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3.  
Hasil elektroforesa uji kerusakan DNA sel kanker mieloma terhadap pengaruh pinsotrobin dari temu kunci (*Kaempferia pandurata*)

Keterangan

- 1 = kontrol negatif
- 2 = konsentrasi pinostrobin 1 ug/ml
- 3 = konsentrasi pinostrobin 10 ug/ml
- 4 = konsentrasi pinostrobin 100 ug/ml
- 5 = konsentrasi pinostrobin 500 ug/ml
- 6 = konsentrasi pinostrobin 1000 ug/ml

Hasil elektroforesa terhadap uji uji kerusakan DNA sel kanker mieloma terhadap pengaruh pinsotrobin dari temu kunci (*Kaempferia pandurata*), baik dari konsentrasi pinostrobin 1, 10, 100, 500 ug/ml maupun konsentrasi 1000 ug/ml tidak menunjukkan adanya fragmentasi dari DNA sel kanker. Hal ini terlihat bahwa DNA hasil isolasi tetap dalam satu band, dibagian atas. Apabila terjadi fragmentasi DNA sel kanker maka akan terlihat potongan-potongan DNA sel kanker dibawah band paling atas, dengan warna ungu pada pengamatan lampu UV dan berwarna putih pada foto polaroidnya.

Berdasarkan hipotesa dan pendekatan penelitian yang telah dilakukan , dimana senyawa yang bersifat inhibitor terhadap enzim DNA Topoisomerase seperti senyawa pinostrobin . dalam proses mekanisme kematian sel kanker biasanya dengan terbentuknya Protein Linked DNA Breaks (PLDB) , akibatnya terjadi fragmentasi / kerusakan DNA sel kanker dan selanjutnya berpengaruh terhadap proses dalam sel khususnya proses replikasi, serta diakhiri dengan kematian sel kanker

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

Terjadinya hasil negatif dari senyawa pinostrobin terhadap kerusakan DNA sel kanker mieloma kemungkinannya adalah jumlah DNA fragmentasi yang diperoleh cukup kecil, sehingga tidak mampu dideteksi dengan metode isolasi DNA total dengan metode ekstraksi phenol. Hal ini juga pernah dialami oleh peneliti Takahashi, 1998 yang pernah meneliti tentang efek kerusakan DNA dari sel kanker Hela terhadap pengaruh penambahan senyawa turunan asam retinoat. Tetapi setelah dilakukan analisis kerusakan DNA dengan metode yang lebih peka , seperti dengan metode pelabelan DNA dengan  $^3\text{H}$ -Timidin , akhirnya kerusakan tersebut dapat diamati.

Dan sekarang juga dikembangkan analisis perusakan DNA sel dengan pelabelan DNA yang tidak menggunakan senyawa radioaktif, yaitu dengan



metode pelabelan TUNEL. Dimana hasilnya lebih sensitif , dibanding metode ekstraksi DNA total , serta tidak berbahaya dibanding senyawa radioaktif. Namun demikian kedua metode yang disebutkan diatas yaitu pelabelan  $^3\text{H}$ -Timidin dan pelabelan TUNEL harganya cukup tinggi, sehingga dan penelitian untuk kategori IPD saat ini tidak mencukupi.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 4.1. Kesimpulan

Senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata*) tidak berpengaruh terhadap kerusakan DNA sel kanker mieloma mencit secara in vitro dengan menggunakan metode ekstraksi DNA sel.

#### 4.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dari senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata*) terhadap pengaruh kerusakan DNA sel kanker mieloma mencit secara in vitro dengan metode lain, seperti dengan metode pelabelan  $^3\text{H}$ -Timidin dan pelabelan TUNEL.

## DAFTAR PUSTAKA

- Freshney, I.R., 1987., **Animal of Cell Culture, A manual of Basic Technicque**, Alan R. Liss Inc, Second Edition , Reeven Ltd, New York, pp 57-84, 115-117.
- Gawron, A., Glowniak, K., 1987, Cytostatic Activity of Coumarins in vitro, **Planta Medica**, pp 526-529.
- Hayes, A.W. 1987., **Principle and Methode of Toxicology**, 2<sup>nd</sup>, Raveen, Press New York.
- Matsuda, T., 1994. Cell Differentiation-Inducting Diterpen from *Andrographis paniculata* Nees , **Chem.Pharm. Bull**, 42(6), pp 1216-1225.
- Murray.R., 1994. Kanker Onkogen dan Faktor-faktor Pertumbuhan, Harper (Ed) dalam **Biokimia**.
- Nafrialdi, Ganiswara, 1995, **Farmakologi dan Terapi** edisi IV Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Qiang Zheng ,G., 1994. Cytotoxic Terpenoid and Flavonoid from *Artemia annua*, **Planta Medica**, Vol.60.
- Steenis, V. C.G.I., 1987. **Flora**, PT Pradnya Paramita, Jakarta.
- Sukardiman, 1999, **Mekaniseme Sitotoksik Senyawa Flavonoid dari Rimpang temu kunci (*Kempferia pandurata*) terhadap kultur sel kanker payudara manusia**. Penelitian Risbin IPTEKDOK.
- Sulistio Gan, 1991, **Farmakologi dan Terapi**, Ed.2. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran , UI, Jakarta, 1991.
- Swanson, S.M., John M. Pezzuto, 1997. Bioscreening Technique for Cytotoxic Potential and Ability to Inhibit Macromolecule Biosynthesis, in **Biodrug Screening**.
- Bail,L., Aubourg L., Habrioux G., 2000. Effect of pinostrobin on estrogen metabolism and estrogen reseptor transactivivation, **Cancer Lett**, Aug, 1:156910;37-44.

Itikowa,H., et.al., 1987. Antitumor Principles from *Alpinia galanga*, *Planta Medica*, Vol, 53.

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.

Murray.,R. 1994. Kanker Onkogen dan Faktor-faktor Pertumbuhan, Harper (Ed) dalam *Biokimia*.

Ermawati,M,1996. Uji antikanker senyawa pinostrobin dari rimpang temu kunci pada kultur sel kanker payudara manusia, skripsi, Fakkultas Farmasi ,UNAIR.

Trakoontivakorn,G. et.al.1999. Remakable antimutagenic effect of Thai Ginger, Fingerroot, Institute of Food Research, Kasetsart University, Thailand.

01 JUL 2005

PAMERAN