

2. PHARMACOLOGY

KKB

KK-2

C15.324 92

Suk -
e



LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2001

**EFEK SITOTOKSIK SENYAWA ANDROGRAFOLID DARI HERBA
SAMBILOTO (ANDROGRA[PHIS PANICULATA) TERHADAP KULTUR
SEL KANKER LEUKIMIA**

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Peneliti :

Drs. SUKARDIMAN, Apt., M.S.
Drs. ABDUL RAHMAN, Apt., M.Si.
Dra. WIWIED EKASARI, Apt., M.Si.

3000329023141

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh : Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumberdaya Manusia

DIP Nomor : 059/XXIII/1/--/2001 Tanggal 1 Januari 2001

Kontrak Nomor : 021/LIT/BPPK-SDM/III/2001

Ditjen Dikti, Depdiknas

Nomor Urut : 16

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2001



- | | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|---|
| 1. Pusat Pembangunan Regional | 5. Pusat Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Pusat Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Pusat Obat Tradisional | 6. Pusat/Studi Wanita (5995722) | 10. Pusat Kesehatan Reproduksi |
| 3. Pusat Pengembangan Hukum (5923584) | 7. Pusat Olah Raga | |
| 4. Pusat Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Pusat Bioenergi | |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5962066
E-mail : lpunair@rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA

3000329023141

1. a. Judul Penelitian :
EFEK SITOTOKSIK SENYAWA ANDROGRAFOLID DARI ANDROGRAPHIS PANICULATA TERHADAP KULTUR SEL KANKER LEUKIMIA
- b. Macam Penelitian : *I / M / M*
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 : 4 bulan
- 7 Biaya yang diperlukan : Rp.5.000.000,-
(Lima juta rupiah)



Surabaya, 19 November 2001
Ketua Peneliti

[Signature]
Drs.Sukardiman,Apt,MS

NIP : 131 801 629



Menyetujui
Ketua Lembaga Penelitian Unair,

[Signature]
Prof.Dr.H.Sarmanu,M.S.

NIP 130 701 125



RINGKASAN

EFEK SITOTOKSIK SENYAWA ANDROGRAFOLID DARI ANDROGRAPHIS PANICULATA NEES TERHADAP KULTUR SEL KANKER LEUKIMIA

(Sukardiman, Abdul Rahman, Wiwied Ekasari, 2001, 26 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 antikanker senyawa andrografolid dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) pada kultur sel leukimia manusia.

Penelitian dilakukan dengan tahapan pertama : melakukan isolasi senyawa andrografolid dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan kemudian dilakukan identifikasi dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis), FTIR dan MS. Preparasi kultur sel leukimia dilakukan dengan pemisahan limfoblast dengan cara sentrifugasi dengan media larutan Ficoll-Hypaque. Sel leukimia dibiakkan pada medium RPMI yang ditambahkan 10% Fetal Bovin Serum. Senyawa andrografolid dibuat dalam 4 konsentrasi yaitu : 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 CO₂ selama 24 jam. Pengamatan efek antikanker ditentukan dengan metode pewarnaan tripan biru, dengan menggunakan parameter viabilitas sel kanker.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa andrografolid dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata*) memiliki aktivitas antikanker terhadap kultur sel kanker leukimia manusia secara bermakna, dimana harga LD₅₀ yang diperoleh sebesar 791 ug/ml.

Disarankan untuk penelitian aktivitas biologi lebih lanjut dari senyawa andrografolid perlu dilakukan modifikasi struktur kimianya sehingga dapat meningkatkan kelarutannya, karena senyawa tersebut sangat sulit larut dalam air.

(LP. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga,)

SUMMARY

CYTOTOXIC ACTIVITY OF ANDROGRAPHOLIDA FROM ANDROGRAPHIS PANICULATA NEES AGAINST LEUKIMIA CELL CULTURE

(Sukardiman, Abdul Rahman, Wiwied Ekasari, 2001, 26 page)

The cancer deases are the second conducted cause of human death after the cardiovascular deases, and many of anticancer chemotheraphy caused side effect, which were the kill both same cancer and normal cells. So now, some research and development 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 anticancer activity of andrographolida isolated compound from sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) against human leukimia cell culture.

This research has been carried out by the firstly by isolation to produce andrographolida compound from sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees), and to identify the compound by Thin Layer Chromatography (TLC), spectrophotometry of FTIR and MS. The preparation of the leukima cell are used by separation lymfoblast cell in the Ficoll-Hypague solution with centrifugation methode. The leukima cell were incubated in RPMI media, Fetal Bovine Serum 10%. The concentration of andrographolida were : 10, 100, 500 and 1000 ug/ml, that was initially dissolve in DMSO. Their solution were added into leukimia cell culture and then to incubate for 24 hours, at 37°C in CO₂ incubator. Determination of anticancer activity by trypan blue exclusion methode, with parameter value is viability of leukimia cell.

The result of these research showed that the andrographolida compound from sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) have been anticancer activity against human leukimia cell with LD₅₀ 791 ug/ml.

Researcher was suggested to make structure modification of andrographolida compound from sambiloto, so their compound can to will increasing solubility in water, because these compound were difficulty dissolved in water.

(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 :

Efek Sitotoksik Senyawa Andrografolid dari Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap Kultur Sel Kanker Leukimia.

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	3
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	12
BAB IV METODE PENELITIAN	13
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	16
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Penyakit kanker masih merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit kardiovaskular, maka dewasa ini banyak dikembangkan pencarian dan penelitian bahan bioaktif dari tanaman yang mempunyai khasiat antikanker yang potensial dan selektif.

Salah satu penelitian dalam upaya pencarian bahan biokatif dari tanaman adalah seperti yang dilakukan oleh Sukardiman (1997) , yaitu penelitian mengenai efek antikanker dari senyawa andrografolid hasil isolasi dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) pada kultur sel kanker fibrosarcoma hasil induksi benzopirena . Hasil penelitian tersebut diketahui bahwa senyawa andrografolid tersebut dapat menghambat pertumbuhan sel kanker fibrosarcoma mencit secara bermakna. Sehingga pada penelitian akan dilanjutkan penelitian terhadap potensi aktivitas antikanker dari senyawa andrografolid pada kultur primer sel leukimia manusia dari penderita leukimia akut limfoblastik.

Menurut penelitian Kawada (1991) senyawa diterpen seperti terpentecin yang berhasil diisolasi dari *Streptomyces* sps-464 dan senyawa clerocidine yang berhasil diisolasi dari *Oidiodendron truncatum*, memiliki efek antikanker terhadap kultur sel leukimia P-388.

Senyawa andrografolid adalah senyawa golongan diterpen yang memiliki struktur kimia dan gugus fungsi yang hampir sama dengan senyawa terpentecin dan clerocidine , sehingga diduga senyawa andrografolid dari tanaman



sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) mempunyai aktivitas antikanker terhadap kultur sel leukimia .

Penelitian dilakukan dengan tahapan pertama : melakukan isolasi senyawa andrografolid dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan kemudian dilakukan identifikasi dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis), FTIR dan MS. Preparasi kultur sel leukimia dilakukan dengan pemisahan limfoblast dengan cara sentrifugasi dengan media larutan Ficoll-Hypaque. Kemudian sel leukimia dibiakkan pada medium RPMI yang ditambahkan 10% Fetal Bovin Serum. Senyawa andrografolid dibuat dalam 4 konsentrasi yaitu : 10, 100, 500 dan 1000 ug/ml dengan penambahan DMSO, dan ditambahkan kedalam biakan kultur sel leukimia dan kemudian dinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂ selama 24 jam. Pengamatan efek antikanker ditentukan dengan metode pewarnaan tripan biru, dengan menggunakan parameter viabilitas sel kanker.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah senyawa andrografolid dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) mempunyai aktivitas antikanker terhadap kultur sel leukimia ?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

1. Tinjauan Tentang Tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)

1.1. Klasifikasi dan Sistematika (Tjitrosoepomo, G, 1987).

Divisi	: Spermatophyta
Anak Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Tubiflorae
Suku	: Acanthaceae
Marga	: <i>Andrographis</i>
Jenis	: <i>Andrographis paniculata</i> Nees

Tanaman ini dikenal dengan nama daerah sambiloto, sandilata, takila, ki oray, ki peuret (Jawa) dan pepaitan (Sumatera).

1.2. Penyebaran dan Tempat Tumbuh

Tumbuh tegak dengan tinggi 40-90 cm, percabangan banyak dengan letak yang berlawanan, cabang bentuk segi empat dan tidak berambut. Bentuk daun lanseet, ujung daun dan pangkal daun tajam atau agak tajam, tepi daun rata, panjang daun 3-12 cm dan lebar 1-3 cm. Panjang tangkai daun 5-25mm dan bagian atas bentuknya seperti daun pelindung. Perbungaan tegak bercabang-cabang, tangkai bunga 3-7 mm, panjang kelopak 3-4mm. Bunga bibir seperti tabung, panjang 6 mm, bibir bunga bagian atas berwarna putih dengan kuning

dibagian atasnya, ukurannya 7-8 mm. Bibir bungabawah melebar berbentuk biji, berwarna ungu dan panjang 6 mm. Tangkai sari sempit dan melebar pada bagian pangkal, panjang 6 mm. Bentuk buah jorong dengan ujung yang tajam, panjang 2 cm, bila tua akan pecah menjadi empat keping.

Penyebaran, tumbuh di India, semenanjung Malaysia dan hampir diseluruh Indonesia pada ketinggian 1-700 m diatas permukaan air laut (Steenis, 1987).

1.3. Kandungan kimia tanaman

Asam kersik, damar, flavonoid, diterpen lakton yang terdiri dari andrografolida, andrografisida, 14-epi-andrografolida, isoandrografolida, 14-deoksiandrografolida, deoksiandrografisida, 14-deoksi-12 - metoksi-andrografolida, 12-epi-14-deoksi-12-metoksiandrografolida, 14-deoksi-11-hidroksiandrografolida, 14-deoksi-11-12-dihidroksiandrografolida, neoandrografolida, asetoandrografolida (Matsuda, 1994).

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 perbanyakannya 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 supresor 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 essential 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)

2.4. Tinjauan Tentang Kultur Sel Kanker

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 karakteristik 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, 1999).

2.5 Tinjauan Tentang Viabilitas Kultur Sel Kanker

Adanya pemaparan bahan – bahan toksik terhadap sel dapat menyebabkan kerusakan atau kematian sel. Kemampuan sel untuk bertahan hidup terhadap bahan – bahan yang bersifat toksik inilah yang digunakan sebagai dasar dilakukannya uji sitotoksitas dan salah satunya dengan menggunakan metode *cell viability test* (Freshney, 1987). Secara garis besar metode penentuan viabilitas sel digolongkan menjadi dua, yaitu berdasarkan:

1. Penentuan respon singkat atau respon jangka pendek, dan
2. Penentuan respon jangka panjang atau respon yang bersifat permanen.

Penentuan viabilitas sel berdasarkan adanya respon jangka pendek atau respon singkat digunakan untuk menentukan sel yang hidup setelah dilakukannya prosedur penelitian yang berpotensi menyebabkan terjadinya kerusakan sel, seperti disegregasi jaringan, pemisahan sel serta pembekuan dan pengaktifan kembali kultur sel yang telah dibekukan. Sedangkan penentuan viabilitas sel berdasarkan adanya respon yang bersifat permanen digunakan jika

efek yang dihasilkan oleh sebuah perlakuan pada tahapan penelitian hanya akan ditunjukkan setelah beberapa jam atau beberapa hari setelah perlakuan.

Kerusakan atau kematian sel diikuti dengan adanya perubahan integritas membran dan ini dapat diketahui dengan menggunakan pewarnaan. Sel yang mati bersifat permeabel terhadap zat warna tertentu sehingga dapat menyerap warna, sedangkan sel yang hidup bersifat impermeabel dan tidak dapat menyerap warna (Freshney,1987; Suntoro,1983). Viabilitas sel dinyatakan sebagai prosentase sel yang hidup atau yang tidak terwarnai. Zat warna yang dapat digunakan antara lain adalah nigrosin,tripan biru dan eritrosin. Untuk penghitungan jumlah sel dapat digunakan metode atau alat antara lain (Freshney,1987; Jaime,1999) :

1. *Cell Counting*

Metode *cell counting* ada 3 macam :

- 1. Hemositometer
- 2. Electronic Particle Counting
- 3. Coulter Cell Counter

Yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *Cell Counting* dengan Hemositometer karena cara ini lebih mudah dilaksanakan dan tidak membutuhkan banyak biaya dibandingkan dengan metode *Cell Counting* yang lain(Elektronik Particle Counting dan Coulter Cell Counter).

2. *Cell Weight*

3. *DNA Content*

Penghitungan jumlah sel dengan metode DNA Content berdasarkan pada kandungan total asam nukleat. Sel yang akan dihitung jumlahnya dibilas dua kali dengan Phosphat Buffered Saline (PBS) dingin. Nukleosida yang larut kemudian diekstraksi dengan etanol dingin. Monolayer sel dilarutkan dalam 0,5 M NaOH selama semalam pada suhu kamar. Fraksi NaOH diukur serapannya pada 260 nm dan disebut sebagai indeks jumlah sel. Hasil pengukuran dibandingkan dengan % absorban pada perlakuan terhadap kontrol.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

1. Tujuan Penelitian

1. Melakukan uji aktivitas antikanker senyawa andrografolid dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap kultur sel kanker leukimia.
2. Menentukan harga LD₅₀ senyawa andrografolid dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap kultur sel kanker leukimia.

2. Manfaat Penelitian

Diperoleh data ilmiah tentang potensi antikanker bahan bioaktif dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) yaitu senyawa andrografolid pada kultur sel leukimia manusia, sehingga diharapkan dapat dikembangkan menjadi obat antikanker yang potensial dan selektif



BAB IV

METODE PENELITIAN

I. Bahan Penelitian

1.1. Sampel Penelitian

Sampel darah diperoleh dari RSUD Dr.Sutomo Surabaya dari penderita leukimia limfoblastik.

Herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) diperoleh dari Kediri Jawa Timur.

1.2. Bahan Kimia yang digunakan

Media RPMI, Ficoll-Hypaque, HEPES, penisilin, streptomisin, gentamisin, Fetal Bovin Serum (FBS), tripan biru, metanol, klorofom, etilasetat.

2. Alat-alat yang digunakan

Inkubator CO₂, Sentrifuga, petridish, hemositometer, micropipet, mikroskop.

3. Tahapan Penelitian

3.1. Isolasi dan identifikasi senyawa andrografolid

Serbuk herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) diekstraksi dengan menggunakan metanol dengan cara maserasi. Ekstrak metanol diuapkan dengan menggunakan rotavapour, kemudian ekstrak kental dari metanol diekstraksi dengan etilasetat. Fraksi etilasetat diuapkan, sehingga akan diperoleh kristal andrografolid. Kristal andrografolid yang diperoleh kemudian direkristalisasi dengan menggunakan metanol panas dan disaring. Terhadap

kristal andrografolid yang diperoleh dilakukan analisis dengan menggunakan KLT, FTIR, MS serta penentuan titik lelehnya.

3.2. Preparasi Kultur Sel Leukimia

Sampel darah penderita leukimia akut limfoblastik sebanyak 20 ml dipisahkan limfoblastiknya dengan cara sentrifugasi dengan media larutan Ficoll-Hypaque. Sel yang terdapat pada permukaan dikumpulkan dan diencerkan hingga 1×10^6 sel/ml dalam media kultur, serta sel monositnya dihilangkan dengan cara diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C untuk melekatkan monosit pada dasar dari petridish.

3.3. Inisiasi Kultur Sel Leukimia

Sel limfoblast yang berada dalam keadaan bebas diambil dan dicuci dua kali dengan PBS dan diresuspensikan hingga 5×10^5 sel/ml dalam media RPMI yang ditambahkan 10% Fetal Bovine Serum, 25 mM HEPES, 100 unit/ml penisilin, 100 ug/ml streptomisin dan 50 ug/ml gentamisin kemudian dinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO_2 selama 24 jam.

Kemudian kultur sel hasil inkubasi dikeluarkan, dilakukan pentuan viabilitas sel leukimia dengan metode pewarnaan dengan tripan biru, menggunakan hemositometer. Sel yang mati akan terwarnai biru, sedangkan sel yang hidup tetap jernih. Apabila hasil perhitungan viabilitas sel leukimia diatas 80% maka kultur sel tersebut dapat digunakan untuk pengujian antikanker.

3. 4. Uji Antikanker dari senyawa andrografolid

Senyawa andrografolid dibuat dalam 4 konsentrasi yaitu : 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 CO₂ selama 24 jam. Pengamatan efek antikanker ditentukan dengan metode pewarnaan tripan biru, dengan menggunakan parameter viabilitas sel .

3.5. Analisis Data

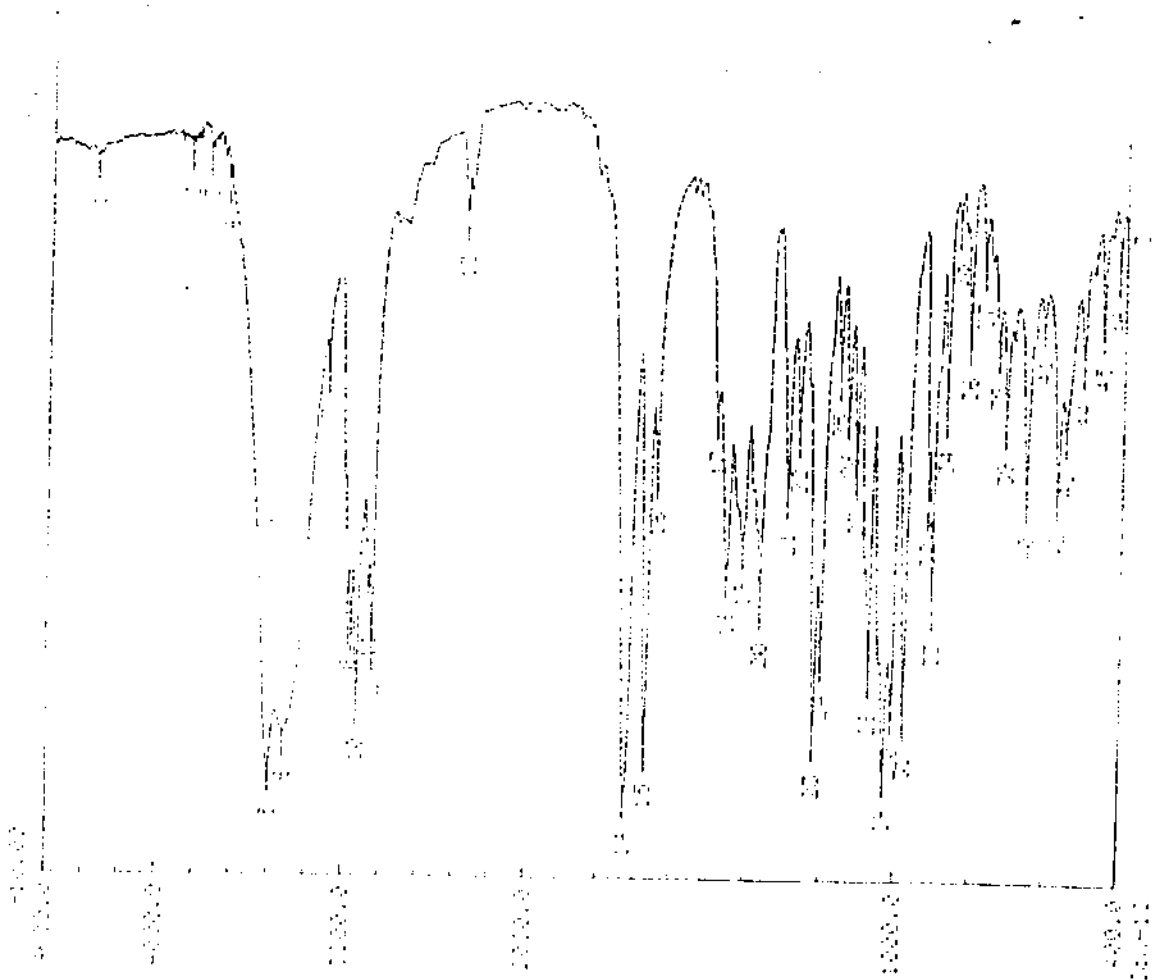
Analisis statistik dari hasil uji antikanker dengan parameter viabilitas sel dari tiap-tiap perlakuan diolah program SPSS. Untuk penentuan harga LD₅₀ ditentukan dengan metode prosen probit.

BAB V

HASIL PEMBAHASAN

1. Hasil Isolasi Senyawa Andrografolida

Andrografolida hasil isolasi dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) adalah berupa kristal bentuk jarum, tidak berwarna dan berasa pahit. Dan memiliki titik leleh sebesar 220 – 230°C.

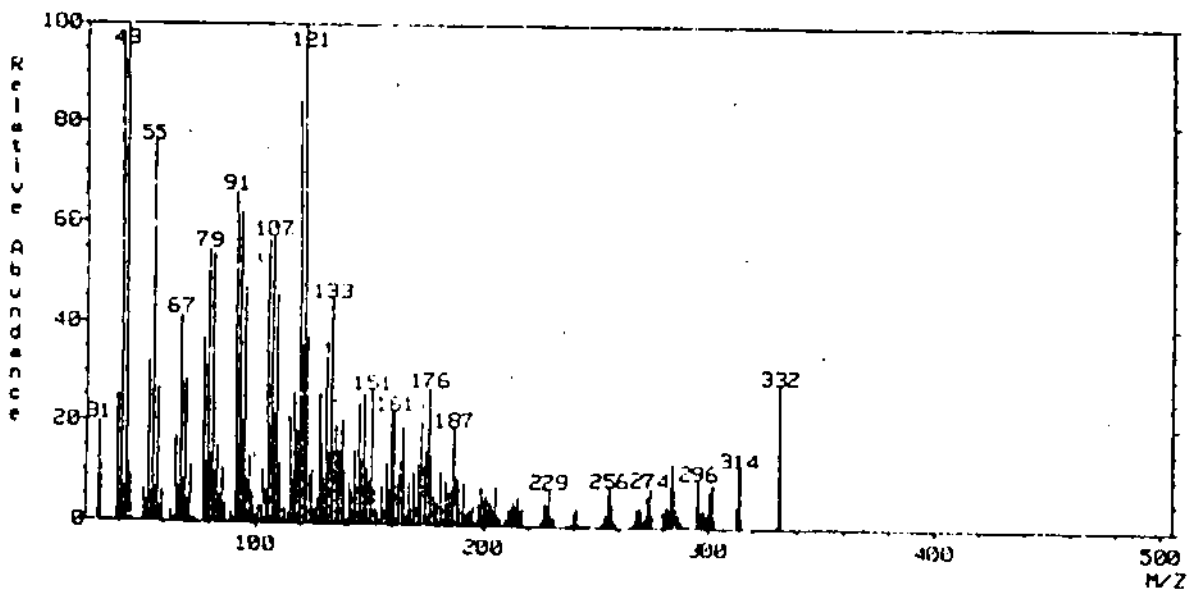


Gambar 1.

Spektrum FTIR dari Senyawa Andrografolida hasil isolasi

Hasil penentuan uji kualitatif senyawa andrografolida dengan KLT yang menggunakan eluen kloroform : metanol = 9 : 1 memiliki harga $R_f = 0,26$ dan warna noda ungu dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat.

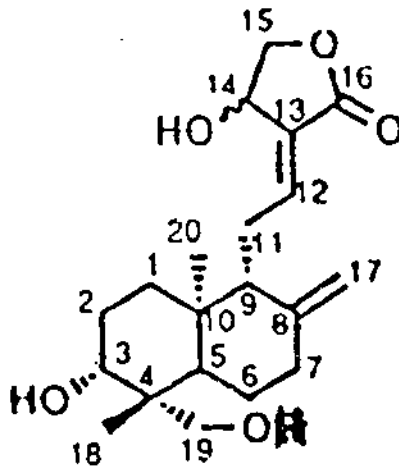
Hasil analisis spektrofotometer IR dari senyawa andrografolida diperoleh spektrum FTIR seperti pada gambar 2. Dimana terlihat adanya pergeseran panjang gelombang pada : 3400 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus OH bebas, serta pergeseran panjang gelombang 2600 cm^{-1} yang menunjukkan gugus C=O dari gugus lakton.



Gambar 2. Spektrum MS dari senyawa andrografolida

Gambar 2. Spektrum MS dari senyawa andrografolida hasil isolasi

Sedangkan untuk analisis MS dari senyawa andrografolida diperoleh $M/Z = 332$, hal ini menunjukkan adanya pelepasan ion molekul H_2O . Dan spektrum MS yang diperoleh dapat dilihat pada gambar 2. Sedangkan struktur senyawa andrografolid adalah seperti terlihat pada gambar 3.



Gambar 3. Struktur senyawa andrografolida hasil isolasi

2. Hasil inisiasi kultur sel leukimia

Pemisahan sel limfoblast dari sel darah merah dari penderita kanker leukimia limfoblastik dilakukan dengan menggunakan metode sentrifugasi. Dengan penambahan pelarut Ficoll-Hypaque dengan tujuan untuk membantu pemisahan sel limfoblastik dengan sel yang lainnya, sehingga akan terjadi pemisahan secara gradien dari sel-sel penyusun darah merah.

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 CO₂.

Hasil inisiasi kultur leukimia pada percobaan pembuatan kultur primer dari sel leukimia adalah seperti terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Viabilitas sel leukimia dari hasil inisiasi

Replikasi	Persen Viabilitas Sel	Rata-rata persen viabilitas sel
1	90	89,3
2	91	
3	87	

Persen viabilitas sel leukimia yang diperoleh dari percobaan ini adalah sebesar 89,3%, hal ini menunjukkan bahwa metode kerja ataupun cara pembuatan kultur sel leukimia primer dari sampel darah merah dapat digunakan untuk uji antikanker, karena viabilitasnya lebih besar dari 80%.

3. Hasil Uji Sitotoksik dari Senyawa Andrografolida

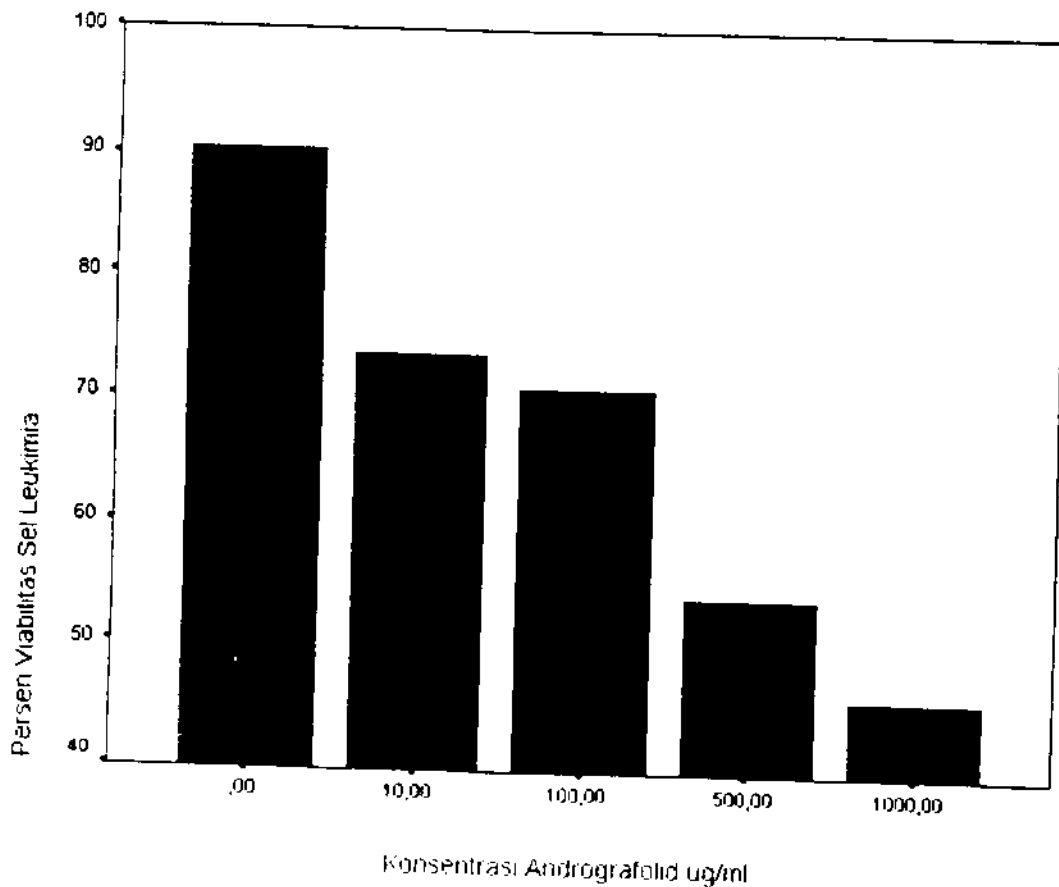
Uji sitotoksik dari senyawa andrografolida pada kultur sel leukimia, dengan menggunakan parameter viabilitas sel dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji sitotoksik dari senyawa andrografolida pada kultur sel leukimia

Konsentrasi Andrografolida (ug/ml)	Replikasi	Persen Viabilitas sel	Rata-rata viabilitas sel
Kontrol negatif	1	90,5	90,67
	2	91	
	3	90,5	
10	1	75	74,1
	2	72,4	
	3	74,9	
100	1	72,5	71,63
	2	71,9	
	3	70,5	
500	1	55	54
	2	54	
	3	53	
1000	1	48	46
	2	50	
	3	40	

Hasil uji sitotoksik dari senyawa andrografolida pada kultur sel leukimia , terlihat bahwa dengan kenaikan konsentrasi andrografolida terjadi penurunan persen viabilitas sel leukimia. Persen viabilitas sel adalah jumlah sel hidup pada perlakuan dibagi dengan jumlah total sel, yaitu sel mati ditambah dengan sel hidup. Penambahan konsentrasi andrografolid 10 ug/ml terjadi penurunan

viabilitas sel dari 90,67% menjadi 74,1%. Secara berturut-turut penambahan konsentrasi 100 ug/ml andrografolid menyebabkan viabilitas sel menjadi 71,63 % , konsentrasi 500ug/ml menyebabkan viabilitas sel menjadi 54 % ,dan pengaruh penambahan 1000 ug/ml andrografolid menyebabkan viabilitas selnya menjadi 46%. Untuk lebih memperjelas pengaruh penambahan senyawa andrografolida pada kultur sel leukimia dapat dilihat pada gambar grafik no 4 dibawah ini.



Gambar 4.
Grafik Efek Sitotoksik Senyawa Andrografolid dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap Kultur Sel Kanker Leukimia

4. Analisis Data

Terhadap hasil uji antikanker dari senyawa andrografolida pada kultur sel leukimia kemudian dilakukan analisis statistik dengan menggunakan analisis ANAVA dengan menggunakan program SPSS. Hasil analisis anavanya dapat dilihat pada tabel 3 dibawah ini.

Tabel 3

Hasil analisis anava terhadap efek sitotoksik senyawa andrografolid terhadap kultur sel leukimia

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Group	32724,791	4	931.198	144.118	,000
Within Group	64,613	10	6,461		
Total	3789,404	14			

Hasil analisis statistik terhadap efek sitotoksik senyawa andrografolid terhadap kultur sel leukimia , dengan analisis anava satu arah dan menggunakan derajat kepercayaan 95% terlihat harga signifikasi dari tabel adalah 0,000. Hal ini menunjukkan bahwa harga signifikasi lebih kecil dari signifikasi yang ditentukan yaitu $\alpha = 0,05$; dengan demikian ada perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan terhadap efek sitotoksik kultur sel leukimia . Untuk mengetahui perbedaan bermakna dari kelompok perlakuan yang mana, maka dilanjutkan dengan analisis LSD. Hasil analisis LSD dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4
Hasil analisis LSD

(I) KONSENTRASI	(J) KONSENTRASI	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1,00	2,00	16,5667*	2,0755	,000	11,9422	21,1911
	3,00	19,0333*	2,0755	,000	14,4089	23,6578
	4,00	36,6667*	2,0755	,000	32,0422	41,2911
	5,00	44,6667*	2,0755	,000	40,0422	49,2911
2,00	1,00	-16,5667*	2,0755	,000	-21,1911	-11,9422
	3,00	2,4667	2,0755	,262	-2,1578	7,0911
	4,00	20,1000*	2,0755	,000	15,4756	24,7244
	5,00	28,1000*	2,0755	,000	23,4756	32,7244
3,00	1,00	-19,0333*	2,0755	,000	-23,6578	-14,4089
	2,00	-2,4667	2,0755	,262	-7,0911	2,1578
	4,00	17,6333*	2,0755	,000	13,0089	22,2578
	5,00	25,6333*	2,0755	,000	21,0089	30,2578
4,00	1,00	-36,6667*	2,0755	,000	-41,2911	-32,0422
	2,00	-20,1000*	2,0755	,000	-24,7244	-15,4756
	3,00	-17,6333*	2,0755	,000	-22,2578	-13,0089
	5,00	8,0000*	2,0755	,003	3,3756	12,6244
5,00	1,00	-44,6667*	2,0755	,000	-49,2911	-40,0422
	2,00	-28,1000*	2,0755	,000	-32,7244	-23,4756
	3,00	-25,6333*	2,0755	,000	-30,2578	-21,0089
	4,00	-8,0000*	2,0755	,003	-12,6244	-3,3756

* The mean difference is significant at the .05 level.

Hasil analisis LSD terlihat bahwa terjadi perbedaan bermakna dari aktivitas sitotoksik senyawa andrografolid antara kontrol negatif dengan seluruh konsentrasi andrografolid 10, 100, 500, 1000 ug/ml. Untuk konsentrasi andrografolid 10 ug/ml menunjukkan perbedaan bermakna dengan kontrol negatif dan andrografolid konsentrasi 500 dan 1000 ug/ml. Sedangkan konsentrasi andrografolid 100 ug/ml menunjukkan perbedaan bermakna dengan kontrol negatif dan konsentrasi andrografolid 500 dan 1000 ug/ml. Untuk



konsentrasi andrografolid 1000 ug/ml menunjukkan perbedaan bermakna dengan kontrol negatif dan andrografolid konsentrasi : 10, 100 dan 500 ug/ml.

Untuk mengetahui aktivitas sitotoksik senyawa andrografolida terhadap kultur sel leukimia lebih lanjut maka ditentukan juga harga LD₅₀ dengan menggunakan probit analisis dari SPSS, sedangkan hasil perhitungan probit analisis diperoleh harga LD₅₀ senyawa andrografolid adalah sebesar 791 ug/ml. Menurut Swanson, 1989 harga LD₅₀ untuk senyawa murni dikatakan prospektif untuk digunakan sebagai obat antikanker apabila harga LD₅₀ kurang dari 4 ug/ml, hal ini menunjukkan dengan jumlah yang sangat kecil telah mampu mematikan sel kanker tanpa membunuh sel normal. Sehingga senyawa andrografolid tidak prospektif untuk dikembangkan sebagai obat antikanker untuk kanker leukimia karena harga LD₅₀ nya lebih besar dari 4 ug/ml. Kemungkinan terjadinya efek sitotoksik senyawa andrografolid pada sel kanker leukimia yang tidak terlalu poten adalah kelarutan senyawa andrografolid yang sangat kecil pada kultur, walaupun sudah dibantu dilarutkan dengan menggunakan DMSO (dimetil sulfoksid) , tetapi jika ditambahkan kedalam kultur sel kanker maka senyawa andrografolid tidak larut dan justru mengapung pada permukaan media dengan ukuran partikel yang relatif besar.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan pada hasil penelitian dan pembahasan diatas maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Senyawa andrografolid hasil isolasi dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) pada kosentrasi 10, 100, 500 dan 1000 ug/ml memiliki efek sitotoksik terhadap kultur sel primer kanker leukimia manusia secara bermakna.
2. Senyawa andrografolid hasil isolasi dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) memiliki harga LD₅₀ sebesar 791 ug/ml pada kultur sel primer kanker leukimia manusia

Saran- saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap efek sitotoksik senyawa andrografolid hasil isolasi dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap kultur sel kanker yang lain.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap peningkatan kelarutan senyawa andrografolid hasil isolasi dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dengan metode modifikasi struktur kimia atau metode lainnya

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**, 2nd, 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, 1997., **Studi Pemiakan Kultur Sel Kanker untuk Uji Sitotoksisitas Isolat Sambiloto (Andrographis paniculata Nees)**, Laporan Penelitian Dosen Muda.
- 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**.
- Tjitrosoepomo, G., **Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)**. Gajah Mada University press, Yogyakarta, 1988. p.236.
- Woerdenbag,H.J., 1987. Investigation of Antitumor Action of Eupatorium Against the Lewis Lung Tumor, **Journal of Medicinal Plant Research**, 53, 4, pp 311-394.

Lampiran 1.

***** PROBIT ANALYSIS *****

DATA Information

15 unweighted cases accepted.
 1 cases rejected because of missing data.
 3 cases are in the control group.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Parameter estimates converged after 10 iterations.
 Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: $PROBIT(p) = Intercept + BX$):
 Regression Coeff. Standard Error Coeff./S.E.

KADAR	-.00100	.00009	-11,39764
	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	.79225	.04682	16,92088

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 45,272 DF = 13 P = ,000

Since Goodness-of-Fit Chi square is significant, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

***** PROBIT ANALYSIS *****

Observed and Expected Frequencies

KADAR	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
.00	100,0	90,5	78,589	11,911	,78589
.00	100,0	91,0	78,589	12,411	,78589
.00	100,0	90,5	78,589	11,911	,78589
10,00	100,0	75,0	78,296	-3,296	,78296
10,00	100,0	72,0	78,296	-6,296	,78296
10,00	100,0	74,0	78,296	-4,296	,78296
100,00	100,0	72,0	75,556	-3,556	,75556
100,00	100,0	71,0	75,556	-4,556	,75556
100,00	100,0	70,0	75,556	-5,556	,75556
500,00	100,0	55,0	61,467	-6,467	,61467
500,00	100,0	54,0	61,467	-7,467	,61467
500,00	100,0	53,0	61,467	-8,467	,61467
1000,00	100,0	48,0	41,713	6,287	,41713
1000,00	100,0	50,0	41,713	8,287	,41713
1000,00	100,0	40,0	41,713	-1,713	,41713

***** PROBIT ANALYSIS *****

Confidence Limits for Effective KADAR

Prob	KADAR	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	3113.98665	2384.39069	4631.38703
.02	2841.79052	2182.24444	4211.28903
.03	2669.09081	2053.86024	3944.87920
.04	2539.17554	1957.19891	3744.55236
.05	2433.49949	1878.50983	3581.66447
.06	2343.55258	1811.48183	3443.07253
.07	2264.68673	1752.66723	3321.59867
.08	2194.07177	1699.96636	3212.87272
.09	2129.85028	1652.00094	3114.02691
.10	2070.73431	1607.81502	3023.07286
.15	1825.97836	1424.44815	2646.92411
.20	1631.45409	1278.04626	2348.64072
.25	1464.56959	1151.73809	2093.44852
.30	1314.70214	1037.48563	1865.10186
.35	1175.82763	930.58402	1654.53433
.40	1044.04929	827.77081	1456.10036
.45	916.55222	726.34139	1266.06965
.50	791.07657	623.54269	1082.02922
.55	665.60092	515.91015	902.82263
.60	538.10386	398.32896	728.94369
.65	406.32552	263.10117	562.92431
.70	267.45100	100.97138	407.58496
.75	117.58356	-95.03063	260.98784
.80	-49.30094	-330.12597	114.58281
.85	-243.82521	-615.81986	-44.40857
.90	-488.58116	-983.63639	-236.10765
.91	-547.69714	-1073.24788	-281.63614
.92	-611.91862	-1170.82913	-330.86613
.93	-682.53358	-1278.35675	-384.76533
.94	-761.39943	-1398.68642	-444.72412
.95	-851.34634	-1536.17484	-512.85564
.96	-957.02239	-1697.98317	-592.62428
.97	-1086.93766	-1897.23027	-690.36534
.98	-1259.63738	-2162.51670	-819.87294
.99	-1531.83350	-2581.33498	-1023.29892