

AKTIVITAS FORMULA EKSTRAK SAMBILOTO DAN TEMUPUTIH TERHADAP SEL KANKER K-562 dan CV-1 SECARA *IN VITRO*

Susi Kusumaningrum dan Firdayani

Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Farmasi dan Medika, TAB- BPPT

PENDAHULUAN

Insiden kanker di Indonesia diperkirakan mencapai 100 dari 100.000 penduduk per tahun atau sekitar 200.000 orang per tahun. Pada survei kesehatan rumah tangga yang diselenggarakan Badan Litbangkes pada tahun 1980, ditemukan bahwa 3,4% dari seluruh kematian disebabkan oleh kanker, dan angka ini meningkat menjadi 4,3% pada tahun 1986⁽¹⁾.

Kanker adalah suatu penyakit dimana terjadi pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal, cepat dan tidak terkendali. Bila pertumbuhan ini tidak segera dicegah atau dihentikan maka sel kanker akan berkembang terus, menyusup ke jaringan di sekitarnya (invasive), membuat anak sebar (metastasis) sehingga tumbuh kanker baru di tempat lain sehingga dapat berakibat fatal^(1,2).

Sampai saat ini penyebab kanker belum diketahui secara pasti. Berbagai faktor dapat menjadi penyebab timbulnya kanker pada hewan coba, walaupun belum sepenuhnya dapat dibuktikan pada manusia. Penyebab yang dapat merangsang pembentukan kanker (karsinogen), diantaranya ialah senyawa kimia, faktor fisika, virus dan hormon tertentu⁽²⁾.

Pengobatan terhadap kanker dilakukan dengan berbagai cara antara lain pembedahan (operasi, penyinaran / radiasi radioterapi), obat-obat pembunuh sel kanker / sitostatika (khemoterapi), obat yang meningkatkan daya tahan tubuh (imunoterapi). Pengobatan dengan hormon dan tumbuhan obat masih terus dikembangkan dalam usaha untuk mencari cara penyembuhan dan obat yang tepat⁽²⁾.

Berbagai jenis tumbuhan yang berkhasiat obat banyak tumbuh di Indonesia, termasuk untuk pengobatan kanker. Berbagai jenis tumbuhan yang berkhasiat dalam pengobatan kanker maupun yang dapat menghambat pertumbuhan kanker telah diujicobakan, penelitian yang dilakukan ini merupakan pembuktian khasiat antikanker yang secara empiris telah diketahui.

Sambiloto (*Andrographis paniculata*) merupakan tumbuhan obat yang biasa dimanfaatkan untuk mengobati berbagai penyakit. Tumbuhan ini banyak ditemukan dan dibudidayakan di daerah tropik dan subtropik Asia. Dalam pengobatan tradisional, tumbuhan ini digunakan untuk mengobati penyakit disentri, bronkhitis, batuk, hepatitis, malaria, tuberkulosa dan gigitan ular berbisa. Tumbuhan ini juga telah diteliti aktivitasnya sebagai antibakteri, anti-HIV, immunostimulator, antipiretik, antiinflamasi, antimalaria dan antihepatotoksik. Uji klinis terhadap tumbuhan ini antara lain dilakukan untuk pengobatan flu, sinusitis, pharyngotonsillitis, pneumonia dan bronchitis⁽³⁾.

Temu putih (*Curcuma zedoaria*) merupakan tumbuhan obat yang banyak ditemukan tumbuh liar di hutan-hutan jati. Saat ini temu putih mulai banyak dibudidayakan di halaman rumah sebagai tumbuhan bumbu dan juga karena khasiatnya dalam bidang kesehatan. Dalam pengobatan tradisional, tumbuhan ini digunakan untuk mengobati penyakit disentri dan diare, dalam bentuk jamu rebusan atau dalam bentuk instan karena secara empiris terbukti sebagai antibakteri dan antikanker, selain itu juga digunakan untuk menjaga kulit wajah tetap halus^(3,4).

Uji aktifitas formula antikanker terhadap sel kanker K-562 dan CV-1 secara *in vitro* dimaksudkan untuk mendukung usaha pengembangan industri obat asli Indonesia dalam hal pengembangan produk dan peningkatan nilai tambah tumbuhan obat baik dalam bentuk ekstrak maupun produk olahan lainnya.

BAHAN DAN METODE

Bahan :

Bahan tumbuhan yang digunakan ialah temu putih (*Curcuma zedoaria*) dan sambiloto (*Andrographis paniculata*) yang diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol.

Untuk pengujian awal formula antikanker digunakan uji BSLT (Brine Shrimp Lethal Test) dengan bahan uji udang renik *Artemia salina* yang dibiakkan dalam air bergaram laut, sedangkan pengujian terhadap sel kanker secara *in vitro* menggunakan sel kanker K-562 dan sel CV-1.

Berbagai bahan kimia yang digunakan dalam pengujian terhadap sel kanker secara *in vitro* antara lain ialah Nitrogen cair, Dulbelcoo's Modified Eagle Medium (DMEM/F12), FBS (Fosfat Buffer Salina), Serum, Antibiotik (Streptomycin-Penicilin), DMSO, Aquadest, Doxorubicin dan Trypan Blue.

Alat :

Peralatan yang digunakan antara lain peralatan gelas, peralatan ekstraksi, peralatan uji lethalitas terhadap *Artemia salina* (BSLT) dan peralatan uji aktivitas terhadap sel kanker.

METODE PERCOBAAN

Ekstraksi bahan tanaman

Bahan tumbuhan temu putih dan sambiloto dihaluskan dan direndam dalam pelarut etanol. Ekstrak cair yang dihasilkan dihilangkan pelarut etanolnya dengan alat pengering berputar sampai diperoleh ekstrak kental temu putih dan ekstrak kental sambiloto⁽⁵⁾.

Formulasi ekstrak

Ekstrak kental temu putih dicampur secara homogen dengan ekstrak kental sambiloto dalam perbandingan yang sama dalam mortal yang sebelumnya telah dipanaskan. Selanjutnya formula siap untuk diuji ke *Artemia salina* dan sel kanker K-562 dan CV-1

Uji lethalitas terhadap *Artemia salina* (BSLT)

Artemia salina ditetaskan dari telur dalam larutan garam dengan salinitas sekitar 33%. Media penetasan telur tersebut diberi aerasi udara dan disinari dengan cahaya lampu. Proses penetasan tersebut dilakukan selama 48 jam⁽⁶⁾.

Ke dalam botol uji yang berisi formula sampel dengan konsentrasi antara 100 sampai 1000 ppm dimasukkan 1 ml larutan garam dan 20 L DMSO untuk membantu kelarutan formula sampel. Setelah formula sampel larut, dimasukkan 20 ekor *Artemia salina* dan ditambahkan larutan garam hingga volume 5 mL. Pengamatan terhadap *Artemia salina* yang mati dilakukan setelah 24 jam. Perbandingan negatif (blanko negatif) dibuat dalam botol uji hanya dengan penambahan 20ppm DMSO, sedangkan kontrol positif dibuat dengan penambahan 20ppm DMSO. Uji BSLT dilakukan dengan 3 ulangan⁽⁶⁾.

Uji aktivitas terhadap sel kanker K-562 dan CV-1

Preparasi medium pertumbuhan

Media tumbuh digunakan 1 kemasan DMEM/F12 (1,2 gram) dalam 1 L aquadest steril dan ditambah 1,2 gram/Liter NaHCO₃. Ke dalam 100 mL medium pertumbuhan ditambahkan 10 mL serum dan 1 mL antibiotik streptomycin penicilin. Selanjutnya medium disterilisasi dan siap digunakan untuk pengujian.

Preparasi sel kanker K-562 dan CV-1

Sel kanker K-562 dan CV-1 diambil dari tabung nitrogen cair dan dihangatkan dengan tangan sampai mencair. Isi tabung dipindahkan ke dalam tabung eppendorf dan disentrifuse dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Endapannya diambil dan ditambah 10 mL medium, dihomogenkan dengan vortex, lalu dimasukkan dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C dengan konsentrasi CO₂ 5% selama 72 jam. Sel siap digunakan untuk uji aktivitas.

Pengujian aktivitas formula terhadap sel kanker.

Pekerjaan dilakukan dalam Laminar Air Flow. Sampel dilarutkan dalam medium dengan volume tertentu dan ditambahkan 40 µL DMSO untuk membantu kelarutan. Ke dalam lubang uji *Disposable Plate* ditambahkan 0,8 mL medium, 0,1 mL formula ekstrak yang diuji dan 0,1 mL sel kanker yang telah dihomogenkan. Cawan uji diinkubasi selama 72 jam dalam inkubator CO₂. Pengujian aktivitas formula terhadap sel kanker dilakukan dengan 3 kali ulangan.

Pengamatan Sel Kanker

Setelah 72 jam, cawan uji dikeluarkan dari inkubator dan dihomogenkan. Ke dalam cawan uji yang lebih kecil dipipet 100 µL larutan uji dan ditambah 10 µL trypan blue, lalu dihomogenkan kembali. Sebanyak 10 µL larutan dialirkan ke dalam *haemocytometer* dan dilakukan perhitungan jumlah sel di bawah mikroskop. Sebagai kontrol positif digunakan Doxorubicin 5 µg/mL.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam pengembangan formula ekstrak untuk indikasi tertentu dapat terdiri dari satu atau campuran ekstrak. Hal ini dimaksudkan untuk memperoleh suatu formula yang mempunyai kemampuan untuk mengatasi gejala klinik terhadap indikasi penyakit yang dimaksud, dosis penggunaan yang efektif yang mempunyai efek pengobatan seperti yang dikehendaki dan mengurangi efek samping. Di samping itu, dalam pengembangan formula obat dari ekstrak tumbuhan obat harus juga diperhatikan pula ketersediaan dan kontinuitas pengadaan bahan baku simplisia yang memenuhi persyaratan^(7,8)

Pemilihan tumbuhan obat yang akan digunakan dalam pengembangan formula anti kanker didasarkan pada hasil kajian dan penelusuran literatur ilmiah dan bukti empiris khasiat dan keamanan tumbuhan yang akan digunakan. Untuk itu terhadap tumbuhan obat yang dipilih harus dilakukan skrining aktivitas sebagai pembuktian awal bahwa tumbuhan obat tersebut sesuai dengan yang dikehendaki. Salah satu pengujian aktivitas awal dari tumbuhan yang berkhasiat sebagai antikanker ialah dilakukan secara BSLT dengan menggunakan *Artemia salina*

Pengujian secara BSLT terhadap masing-masing ekstrak sambiloto dan temu putih memperlihatkan bahwa kedua ekstrak tersebut mempunyai nilai LC₅₀ pada konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi campuran ekstrak sambiloto dan temu putih dengan perbandingan yang sama. Nilai LC₅₀ berbagai ekstrak tersebut terhadap *Artemia salina* tertulis dalam Tabel 1.

Tabel 1. Nilai LC₅₀ berbagai ekstrak terhadap *Artemia salina*

No	Ekstrak	Nilai LC ₅₀ (ppm)
1	Temu putih	15
2	Sambiloto	230

Dari Tabel 1 terlihat bahwa hasil uji lethalitas dengan metode BSLT untuk ekstrak temu putih adalah yang tertinggi dimana dalam konsentrasi 15 ppm telah tercapai nilai LC50. Konsentrasi ekstrak sambiloto untuk mencapai nilai LC50 tinggi, karena sambiloto bukan sebagai antikanker utama tetapi berperan sebagai immunomodulator, yaitu untuk meningkatkan ketahanan tubuh terhadap penyakit. Campuran kedua ekstrak tersebut dalam perbandingan yang sama ternyata menghasilkan nilai LC50 pada konsentrasi 260 ppm.

Berdasarkan hasil uji lethalitas campuran ekstrak temu putih dan ekstrak sambiloto tersebut selanjutnya digunakan sebagai dasar penentuan konsentrasi untuk pengujian terhadap sel kanker K-562. Persen pertumbuhan sel atau jumlah sel yang ada baik yang hidup maupun yang mati dibandingkan dengan perlakuan kontrol negatif (pertumbuhan sel 100%) tertulis dalam Tabel 2.

Tabel 2 Pengaruh formula ekstrak sambiloto terhadap persen pertumbuhan sel K-562 secara *in vitro*

Konsentrasi formula	Persen Pertumbuhan sel K-562 (%)
100 ppm	91,00
200 ppm	81,25
300 ppm	68,50
400 ppm	58,75
500 ppm	62,75
600 ppm	76,25
700 ppm	134,50
Kontrol (- ppm)	100
Kontrol (- ppm)	122,5

Dalam percobaan yang telah dilakukan, perlakuan pemberian ekstrak campuran temu putih dan sambiloto dari 100 ppm sampai dengan 400 ppm mampu menurunkan persentase pertumbuhan sel kanker K-562, tetapi perlakuan pemberian ekstrak tersebut dengan konsentrasi di atas 400 ppm meningkatkan persentase pertumbuhan sel, bahkan pada perlakuan konsentrasi ekstrak 700 ppm pertumbuhan selnya mencapai 134,50% dan nilai ini jauh di atas persentase pertumbuhan sel pada perlakuan kontrol negatif (100%).

Dari tabel 2 terlihat persentase pertumbuhan sel kanker K-562 setelah 72 jam pada perlakuan

pemberian ekstrak 100 ppm sampai dengan 400 ppm menurun. Perlakuan pemberian ekstrak di atas 400 ppm terlihat adanya terjadi peningkatan persentase pertumbuhan.

Dalam percobaan yang telah dilakukan pemberian ekstrak sebanyak 700 ppm persentase pertumbuhan selnya mencapai 134,5%. Hal yang sama juga terlihat pada perlakuan kontrol positif Doxorubicin 5 ppm persentase pertumbuhan selnya mencapai 122,5%

Fenomena yang mirip juga ditemukan oleh Babu dkk (1995) pada penelitiannya yang mengamati efek sitotoksitas dan anti-tumor tumbuhan *Centella asiatica* (L.) Urban. Menjelang kematiannya, sel kanker mengalami akselerasi transkripsi dan translasi sehingga sel membesar, membengkak dan mengalami percepatan pembelahan, tetapi akhirnya mati. Fenomena ini umum terjadi pada pengujian aktivitas sel kanker terhadap ekstrak tumbuhan obat⁽⁹⁾.

Tabel 3. Pengaruh formula ekstrak sambiloto terhadap persen pertumbuhan sel CV-1 secara *in vitro* setelah 72 jam

Konsentrasi formula	Persen Pertumbuhan sel CV-1 (%)
200	18.77
400	18.77
600	21.84
800	15.32
1000	26.05
Kontrol (-) ppm	100
Kontrol (+) ppm	122,5

Secara umum dapat dinyatakan bahwa formula ekstrak sambiloto dan temuputih mampu menghambat pertumbuhan sel CV-1, dimana pertumbuhan sel ini berbeda bermakna dibandingkan pertumbuhan sel tanpa pemberian formula ekstrak (kontrol negatif). Namun demikian terlihat gejala adanya kenaikan persentase pertumbuhan setelah konsentrasi ekstrak 1000 ppm.

Sel kanker secara umum mempunyai daya pertumbuhan yang sangat cepat. Pemberian obat anti kanker yang tidak tepat baik jenis maupun konsentrasinya dapat menyebabkan sel menjadi tahan terhadap jenis obat tersebut, terjadi modifikasi, bahkan sel kanker yang mutan (jinak) dapat kembali ke sifat asalnya menjadi liar atau ganas. Dengan demikian untuk mendapatkan suatu formula atau sediaan alami antikanker masih diperlukan penelitian lanjutan, salah satu diantaranya ialah penelitian atau percobaan secara *in vivo* dengan menggunakan hewan coba atau uji preklinis. Setelah lolos uji preklinis selanjutnya dapat diteruskan dengan uji klinis pada manusia.

DAFTAR PUSTAKA

Anderson, J.F., Mc Laughlin. **A Blind comparison of simple benzch-top bioassay and human tumor cell. Cytotoxicities studies as anti tumor prescreens, phytochemical analysis.** Volume 2; 1991

Babu, T.D, G. Kuttan & J. Padikkala. **Cytotoxic and anti-tumour properties of certain taxa of Umbelliferae with special reference to *Centella asiatica* (L.) Urban.** Journal of Ethnopharmacology 48 (1995) 53-57,

Mooryati Soediby, **Alam Sumber Kesehatan Manfaat dan kegunaan**", Balai Pustaka, Jakarta, 1998

Buku Panduan Teknologi Ekstrak, Dirjen POM, Depkes RI, 2000

Farmakope Indonesia Edisi IV, Dirjen POM, Depkes RI, 1995

Gilman, A.G, J.G Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Rudon, **Goodman and Gillman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics**, 9th edition, McGraw-Hill, Co.Inc., New York, 1996, 875-894.

Meyer, B.N. et al. **Brime Shrimp : A convinient general bioassay for active plant constituent.** Planta Medica. Volume 45. 1982. hal. 31-4.

Pedoman Pelaksanaan Uji Klinik Obat Tradisional, Departemen Kesehatan RI, Dirjen Pengawasan Obat dan Makanan, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, 2000.

Peraturan Perundang-undangan di Bidang Obat Tradisional, Dirjen Pengawasan Obat dan Makanan, Departemen Kesehatan RI, 1999

Setiawan Dalimartha, **Ramuan Tradisional untuk Pengobatan Kanker**, Penebar Swadaya, 1999.

Suharmiati, Lestari H, Betty R, **Pengobatan Kanker dan Tumor dengan menggunakan Ramuan Tradisional yang Mengandung Kunir Putih (*Curcuma Mangga* Val. Et Zyp)**, Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXI, Surabaya, 2002.