

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak pinostrobin terhadap pertumbuhan sel kanker payudara (MCF-7) in vitro. Penelitian ini menggunakan metode kultur sel dengan media DMEM yang diperkaya dengan serum fetal bovine serum (FBS) dan insulin-like growth factor-1 (IGF-1). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak pinostrobin dapat menghambat pertumbuhan sel kanker payudara (MCF-7) in vitro.

Kata kunci : ekstrak pinostrobin, kultur sel, MCF-7, antiangiogenik, CAM.

PENDAHULUAN

Penyakit kanker saat ini masih menjadi masalah serius bagi kesehatan di dunia. Dari tahun ke tahun epidemiologi penyakit ini terus meningkat seiring perkembangan zaman. Kejadian kanker secara keseluruhan di antara anak usia 0-14 tahun meningkat 0,5% per tahun dan di antara anak-anak usia 0-19 tahun kejadian meningkat 0,6% per tahun 1999-2008⁽¹⁾.

Anti angiogenesis merupakan strategi yang menjanjikan untuk terapi kanker⁽²⁾. Terapi anti angiogenesis bertujuan untuk menghentikan pembentukan pembuluh darah baru sehingga sel tumor atau sel kanker akan mati. Angiogenesis normal terjadi di dalam tubuh, misal saat penyembuhan luka dan perbaikan jaringan tubuh yang rusak. Tetapi pada penderita kanker, proses pembentukan pembuluh darah baru ini akan membuat tumor memiliki jaringan pembuluh darah sendiri yang akan membuatnya tumbuh dengan cepat dan ganas⁽³⁾.

Rimpang temu kunci (*B. Pandurata*, (Roxb) Schlecht)

secara empiris digunakan untuk mengobati beberapa penyakit seperti pembengkakan kandung kemih serta obat infeksi alat reproduksi pada wanita. Pengujian lain secara *in vitro* menunjukkan bahwa temu kunci dapat meningkatkan jumlah limfosit, antibodi O^{H} dan sel darah putih⁽⁴⁾. Dalam beberapa penelitian menyatakan bahwa kandungan senyawa pinostrobin sebagai senyawa penanda temu kunci mempunyai potensi besar sebagai senyawa anti kanker⁽⁴⁾. Dalam beberapa penelitian menyatakan bahwa kandungan senyawa pinostrobin sebagai senyawa penanda temu kunci mempunyai potensi besar sebagai senyawa anti kanker^(4,5).

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: alat-alat gelas (π₁ Δ₁), lemari pengering, mesin penyerbuk (00 Δ₁), alat maserasi, *waterbath* (*Memert*), timbangan analitik, *chamber*, plat kaca, *micro haematocrit tubes*, cawan porselen, rotari evaporator (*Heidolph*), autoklaf, alat *candling*, pinset, *dental drill*, adaptor, karet penyedot

udara, lampu spiritus, inkubator (*Memert*), mikropipet, gunting, TLC densitometer (*Lamag*), dan kamera digital.

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: simplisia rimpang temu kunci (*B. Pandurata*, (Roxb) Schlecht), n-heksan, etil asetat, etanol 70% (*Bratachem*), etanol pa. (*Merck*[®]), DMSO (メチルセロソルブ), 0,8% (*Merck*[®]), recombinant human bFGF 1ng/μl (*Sigma*), membran korio alantoid dari embrio ayam (*Rhode Island Red*) yang diperoleh dari UPPT Bantul Yogyakarta, *paper disc* steril yang berisi ampisilin, plat aluminium silika GF 60 (Merck[®]), bubuk silika GF 60 (Merck[®]), larutan buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,5, akuades, formalin 10%, NaCl 0,9%, *emersi oil* antibodi VEGF dan standar pinostrobilin (*Sigma*).

Metode Kerja

A. Ekstraksi Temu Kunci

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi selama 2 hari menggunakan n-heksan : etil asetat sebagai pelarut dengan perbandingan jumlah pelarut 3 kali tinggi ekstrak. Serbuk simplisia dimasukkan kedalam larutan n-heksan selama 1 hari sambil diaduk-aduk. Maserasi menggunakan 400 g serbuk simplisia yang dilarutkan dengan n-heksan sebanyak 950 mL selama 1 hari. Residu dikeringkan kemudian dimaserasi kembali dengan pelarut etil asetat selama 1 hari dengan

remaserasi sebanyak 1 kali. Maserasi etil asetat awal menggunakan pelarut sebanyak 750 mL dan remaserasi menggunakan pelarut sebanyak 600 mL. Hasil ekstraksi kemudian disaring terlebih dahulu dengan menggunakan penyaring *Buchner* kemudian disaring kembali menggunakan kertas saring. Ekstrak etil asetat dan n-heksan yang didapat berupa ekstrak semipadat.

B. Isolasi Pinostrobilin

Temu kunci yang telah diserbuk di maserasi menggunakan n-heksan sebagai pelarut. Residu kemudian diekstraksi kembali dengan menggunakan pelarut etil asetat. Ekstrak etil asetat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental.

Ekstrak kental yang didapat dikromatografi kolom menggunakan pelarut n-heksan-etilasetat 50 ml dengan gradien konsentrasi (50:0, 45:5, 40:10, 35:15, 30:20, 25:25, 20:30, 15:35, 10:40, 5:45, dan 0:50). Hasil KLT dengan perbandingan standar pinostrobilin. Fraksi terbaik diambil untuk kemudian diisolasi dengan metode KLT preparatif, eluen yang digunakan adalah n-heksan:etil asetat (4,5:1). Spot yang sama dengan standar kemudian dikerok dan dilarutkan dengan etanol pa dan disaring. Larutan yang didapat uapkan pelarutnya hingga didapat serbuk kering. Serbuk kering yang didapat

KLT densitometri dengan pembanding standar pinostrobin untuk memastikan bahwa isolat yang didapat adalah benar pinostrobin.

C. Uji Efek Anti Angiogenesis

Preparasi bFGF sebagai induktor angiogenesis digunakan sebanyak 10µg yang dilarutkan dengan Tris-HCl 10 mM pH 7,5 sehingga didapat kadar 1 ng/µl. Preparasi bFGF dilakukan secara aseptis di dalam LAF. Dosis bFGF yang diberikan untuk setiap telur perlakuan adalah 10 ng⁽⁶⁾.

Bahan uji dilarutkan dengan DMSO-aquadest 0,8 % steril untuk kemudian dibuat seri kadar. Preparasi dilakukan secara aseptis dalam LAF.

Telur ayam berembrio yang telah dibeli sehari sebelumnya (umur 7-8 hari (inkubasi) segera diinkubasi pada suhu 38,5°C agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan baru. Tahap awal yaitu pemberian tanda pada kerabang telur yang meliputi batas ruang udara dan lokasi embrio. Lokasi embrio diketahui melalui *candling* pada telur. Kerabang telur pada bagian kutub mengandung ruang udara dan kerabang di atas embrio disterilkan dengan alkohol. Kedua daerah tersebut kemudian dibuat lubang kecil menggunakan sebuah *mini drill*.

Udara dari ruang udara diaspirasi dengan bola karet sampai membran korio alantois yang melekat pada telur lepas. Perlakuan ini dilakukan di ruang gelap dengan posisi telur horizontal,

dan melalui *candling*, sehingga membran korio alantois dan ruang udara buatan yang terbentuk diatas embrio dapat terlihat. Kerabang telur diatas embrio dipotong dengan gergaji (*mini drill*) membuat lubang segi empat dengan luas 1x1 cm. Melalui lubang ini bFGF dan isolat diimplantasi ke dalam membran embrio alantois, setelah sebelumnya telur disterilkan lagi dan masukkan dalam LAF dengan posisi horizontal dengan ruang udara buatan terletak dibagian atas. Subjek uji berupa telur dibagi menjadi 12 kelompok (masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 5 telur), sebagai berikut:

- a. Kelompok I sebagai kontrol *paper disc*, untuk memastikan bahwa *paper disc* yang digunakan sebagai pembawa tidak berpengaruh pada membran korio alantois telur ayam.
- b. Kelompok II adalah telur dengan implantasi *paper disc* yang telah ditambahkan 10µl bFGF 1ng/µl, sebagai kelompok kontrol bFGF untuk melihat pengaruh induksi bFGF terhadap angiogenesis.
- c. Kelompok III adalah kelompok telur dengan implantasi *paper disc* yang berisi 10µl bFGF 1ng/µl + 10µl pelarut DMSO 0,8% sebagai kontrol bFGF + pelarut untuk mengetahui pengaruh pelarut terhadap angiogenesis pada membran korio alantois.
- d. Kelompok IV, V, dan VI merupakan

kelompok telur yang digunakan untuk melihat efek penghambatan ekstrak n-heksan terhadap angiogenesis membran korio alantois. Telur pada kelompok ini diberi implantasi dengan variasi konsentrasi 15 µg/ml, 30 µg/ml, dan 60 µg/ml.

- e. Kelompok VII, VIII, dan IX merupakan kelompok telur yang digunakan untuk melihat efek penghambatan ekstrak etil asetat terhadap angiogenesis membran korio alantois. Telur pada kelompok ini diberi implantasi dengan variasi konsentrasi 15 µg/ml, 30 µg/ml, dan 60 µg/ml.
- f. Kelompok X, XI, dan XII merupakan kelompok telur yang digunakan untuk melihat efek penghambatan pinostrobin terhadap angiogenesis membran korio alantois. Telur pada kelompok ini diberi implantasi dengan variasi konsentrasi 10 nM, 100 nM, dan 1000 nM.

Setelah diberi perlakuan, telur diinkubasi dengan kelembaban relatif 60% selama 3 hari pada suhu 38,5°C. Telur kemudian dimatikan dengan cara disimpan kedalam lemasi es 1 hari dengan suhu 4-5°C dan dibuka (umur 12 hari) kemudian isi telur dikeluarkan. Telur dibuka dengan cara menggunting cangkang telur menjadi 2 bagian dimulai dari cangkang yang terdekat dengan rongga udara, setelah itu membran korio alantois yang melekat pada cangkang dicuci dengan

larutan isotonis NaCl 0,9%. Langkah terakhir, membran korio alantois yang didapatkan diamati secara makroskopis. Hasil pengamatan makroskopik difoto dengan kamera. Data yang diperoleh berupa banyaknya pembuluh darah baru pada membran korio alantois setelah pemberian pinostrobin. Pembuluh darah yang dihitung adalah pembuluh darah baru yang tumbuh dari percabangan pembuluh darah utama. Evaluasi uji angiogenik secara makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan makroskopik dilakukan dengan mengamati respon angiogenesis secara deskriptif dan West *et al*⁽⁷⁾ yaitu dengan menghitung jumlah pembuluh darah baru pada *paper disc* maupun disekeliling *paper disc* tersebut (setiap pembuluh darah baru yang terlihat di sekitar *paper disc* diberi nilai 1). Pengamatan mikroskopis pada kelompok perlakuan dilakukan dengan menambahkan antibodi VEGF pada CAM untuk melihat kemungkinan penghambatan angiogenesis dari pinostrobin melalui jalur pro angiogenik lain yaitu VEGF.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstrak Temu Kunci

Pemekatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator* selama ± 30 menit dengan kecepatan 60 rpm pada suhu 50°C. Bobot ekstrak kental etil asetat yang didapatkan 27,25 g. Nilai rendemen

yang diperoleh adalah 6,81 %, sedangkan bobot ekstrak n-heksan yang didapat adalah 6,79 g dengan nilai rendemen sebesar 1,69 %.

B. Isolasi Pinostrobin

Hasil fraksi yang diperoleh dielusi dan dipilih fraksi yang terbaik. Fraksi

dielusi, yaitu fraksi yang memiliki spot yang terpisah dan tidak melebar atau menumpuk serta yang paling mendekati standar pinostrobin. Setelah diisolasi, serbuk isolat yang KLT densitometri dengan pembanding standar pinostrobin (Sigma) (Gambar 1).

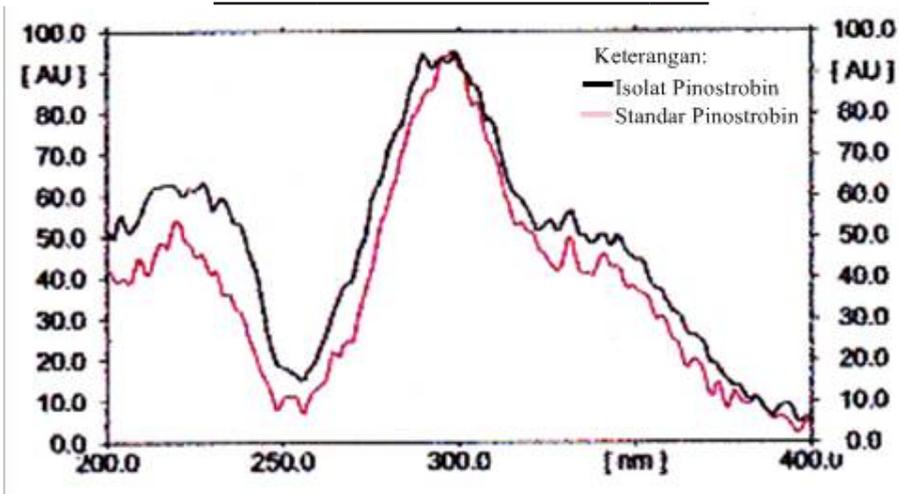
Tabel I. Hasil KLT Densitometri isolat vs standar punostrobin

Peak	R _f	Intensitas
1	0,76	298
2	0,74	299

Keterangan:

1 = isolat

2 = standar pinostrobin

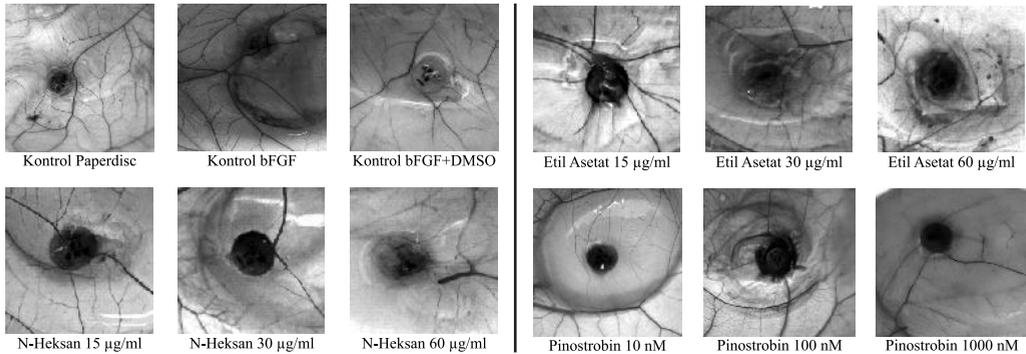


isolat pinostrobin menggunakan KLT Densitometri

C. Uji Efek Anti Angiogenesis

Hasil uji anti angiogenesis pinostrobin menunjukkan semakin tinggi kadar, semakin tinggi daya hambat angiogenesis yang terjadi

pada CAM embrio ayam yang diinduksi bFGF. Hasil ini ditandai dengan terjadinya penurunan jumlah pembuluh darah baru yang tumbuh pada kelompok perlakuan.



Gambar 2. Pengamatan makroskopis CAM pada masing-masing kelompok

Tabel 2. Jumlah pembuluh darah baru kelompok kontrol dan perlakuan

Kelompok Perlakuan	Jumlah telur	Jumlah Pembuluh Darah Baru X ± SD	Persen Penghambatan Angiogenesis X ± SD
Kontrol paper disc	5	28,50 ± 2,35	-
Kontrol bFGF	5	40,70 ± 2,56	-
Kontrol bFGF + DMSO	5	41,70 ± 5,53	0
N-Heksan 15 µg/ml	5	29,20 ± 1,15	29,98 ± 2,76*
N-Heksan 30 µg/ml	5	17,30 ± 1,35	58,51 ± 3,23*
N-Heksan 60 µg/ml	5	9,80 ± 1,04	76,50 ± 2,49*
Etil asetat 15 µg/ml	5	31,8 ± 1,92	23,74 ± 4,61*
Etil asetat 30 µg/ml	5	19,1 ± 1,52	54,20 ± 3,64*
Etil asetat 60 µg/ml	5	10,7 ± 0,91	74,34 ± 2,18*
Pinostrobin 10 nM	5	33,10 ± 2,61	20,62 ± 6,25*
Pinostrobin 100 nM	5	28,70 ± 1,48	31,18 ± 3,56*
Pinostrobin 1000 nM	5	17,00 ± 1,27	59,23 ± 3,06*

Data terdistribusi normal

*)Hasil berbeda signifikan dengan kelompok kontrol bFGF + DMSO 0,8%

Gambaran makroskopis kelompok kontrol dan uji dapat dilihat pada Gambar 2. Pengamatan makroskopis pada kelompok *paper disc* memperlihatkan hasil bahwa angiogenesis tetap terjadi baik disekitar *paper disc* maupun yang jauh dari letak *paper disc*. Hal ini menunjukkan bahwa *paper disc* yang digunakan tidak mempengaruhi

proses angiogenesis CAM. Pada kelompok kontrol bFGF dapat terlihat pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh darah utama disekitar *paper disc* lebih banyak. Pemberian bFGF pada penelitian ini bertujuan untuk menginduksi terjadinya angiogenesis sebagaimana yang terjadi pada kanker, sehingga akan lebih

mudah diketahui jalur penghambatan angiogenesis dari pinostrobin. Pada kelompok kontrol bFGF + DMSO 0,8 % menunjukkan hasil yang tidak jauh berbeda dengan kelompok kontrol bFGF. Analisis menggunakan Tukey control bFGF dan kontrol bFGF + DMSO 0,8 % adalah 0,999 ($p < 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa antara dua kelompok tersebut.

Gambaran makroskopis kelompok uji sudah terlihat pada konsentrasi terkecil dari masing-masing kelompok uji. Pembuluh darah yang dihitung adalah pembuluh darah baru yang muncul disekitar pembuluh darah utama (ditunjukkan pada tanda panah () pada gambar 2). Perhitungan prosentase penghambatan angiogenesis terdapat pada tabel II Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi penghambatan angiogenesis tertinggi kelompok ekstrak n-heksan dan etil asetat adalah pada konsentrasi 60 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan pada kelompok pinostrobin penghambatan angiogenesis tertinggi pada kelompok konsentrasi 1000 nM. Penggunaan bFGF sebagai penginduksi angiogenesis memberikan gambaran kemungkinan mekanisme anti angiogenesis dari pinostrobin adalah dengan menghambat bFGF sebagai faktor pro angiogenik.

Angiogenesis dapat membuat sel kanker menjadi lebih besar dengan

cara membentuk pembuluh darah baru yang menyebabkan sel kanker mendapatkan suplai nutrisi dan makanan sehingga sel kanker akan terus berkembang dan parah⁽¹⁰⁾. Mekanisme angiogenesis ini diatur oleh faktor pro angiogenik dan anti angiogenik^(8,10)

merupakan salah satu faktor pro angiogenik. bFGF berinteraksi dengan sel endotelial melalui reseptor tirosin kinase dan reseptor *heparan sulfate proteoglycan* dipermukaan sel. Kejadian tersebut dapat menyebabkan terjadinya pelepasan matriks pendegradasi membran basal (selama perkembangan embrio, cedera jaringan dan setelah transformasi sel ke fenotipe kanker) sehingga FGFs biologis akan menjadi aktif⁽¹¹⁾. Peran bFGF pada keadaan patologi kanker adalah untuk perkembangan sel kanker itu sendiri dan juga sebagai penginduksi pembuluh darah baru untuk mensuplai makanan dan nutrisi. Selain bFGF, masih banyak terdapat faktor pro angiogenik lain seperti *endotel vaskular-derived growth factor* (VEGF), *angiopoetins*, *epidermal growth factor* (EGF), interleukin 8 (IL-8), dan *transforming growth factor*. Semua faktor-faktor pro angiogenik ini akan menjadi berbahaya pada kondisi patologi kanker⁽¹²⁾. Apabila terjadi penghambatan pembentukan pembuluh darah baru, maka pertumbuhan sel tumor maupun

Saran

Perlu dilakukan penelitian anti angiogenesis dari pinostrobin dengan menggunakan induksi faktor pro angiogenik lain untuk mengetahui jalur penghambatan angiogenesis yang lain dari pinostrobin.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim, 2012, Report to the nation cancer death rates since the early 1990s; Feature highlights cancers associated with excess physical activity, *National Cancer Institute* available at www.cancer.gov (diakses 5 Desember 2012)

Eichhorn, M.E., Kleespies A., Angele M.K., Jauch K.W., dan Bruns C.J., 2007, Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms clinical impact, *Langenbecks Arch Surg* (2007) 392:371–379.

De Jong, W., 2001, *Kanker, Apa itu? Pengobatan, Harapan Hidup dan Dukungan Keluarga*, diterjemahkan oleh Astoeti Suharto H., Penerbit Arcan, Jakarta, 159-174.

Fahey, J.W., dan Stephenson, K.K., 2005, Pinostrobin from Honey and Thai Ginger (*Boesenbergia pandurata*): A Potent Flavonoid Inducer of Mammalian Phase 2 Chemoprotective and Antioxidant Enzymes, *Department of Pharmacology and Molecular*

Sciences, School of Medicine and Center for Human Nutrition, Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland 21205.

Smolarz, E., Mendyk, A., Bogucka dan J., Kocki, 2006, Pinostrobin from *Polygonum lapathifolium* L. ssp. *nodosum* (Pers.) Dans., *Journal of Bioscience, Department of Pharmaceutical Botany, Medical University of Lublin*, Lublin, 60(1-2):64-8.

Salamah, N., Sugiyanto, Hartati, M.S., Hayati, F., dan J. Pinus, 2008, *Eurycoma longifolia* akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia*, Jack) serta uji anti-angiogenik, *Indonesian Journal of Pharmacology*, 20(3), 118 – 126.

West, D.C., Thompson W.D., Sells P.G., and Burbridge M.F., 2001, *Angiogenesis Protocols: Chorioallantoic Membrane*, Editor by J.C. Murray, Humana Press Inc., New Jersey, 107-129.

Medina, Patrick J., and Fausel, C., 2008, *Pharmacotherapy, a Pathophysiologic Approach seventh edition: Cancer*, Edited by DiPiro J.P, Talbert R.L., Yee G.C., Matzke G.R., Wells B.G., and Posey L.M., McGraw-Hill. London, 2085-2119.

- Balmer, C. Mc Manus, Valley A.W., and Iannucci, A., 2005, *Pharmacotherapy, a Pathophysiologic Approach and Chemoterapy*, Edited by DiPiro J.P, Talbert R.L., Yee G.C., Matzke G.R., Wells B.G., and Posey L.M., McGraw-Hill, London, 2279-2328.
- Frisca, Sardjono, C.T., Sandra, F., 2009, ANGIOGENESIS: *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, (8): 174-187.
- Baird, Andrew, 2000, *Angiogenesis in Receptor*, Editor by Rubanyi G.M., Marcel Dekker Inc., USA, 75-88.
- Auerbach, Robert, 2008, *Angiogenesis Science to Medicine: Models for Angiogenesis*, Edited by Figg W.D., Folkman, J., Springer Science+Business Media LLC, New York, 299-312.