

AKTIVITAS EKSTRAK BIJI BUAH MERAH (*Pandanus conoideus* Lam.) TERHADAP PROLIFERASI LIMFOSIT DAN SEL TUMOR KELENJAR SUSU MENCIT C3H SECARA *IN VITRO*

ACTIVITIES OF RED POWER FRUIT (*PANDANUS CONOIDEUS LAM.*) EXTRACT ON POLIFERATION OF LYMPHOCYTES AND MAMMARY GLAND TUMOR CELLS *IN VITRO*

Dimas Danang Indriatmoko^{1*}, Shirly Kumala², Kusmardi³

^{1,2,3}Universitas Pancasila

*Corresponding Author Email: dimasdanangindriatmoko@gmail.com

ABSTRAK

Pandanus conoideus Lam. dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan tumor. Penghambatan terhadap sel tumor dapat dilakukan secara langsung dan tidak langsung yaitu dilakukan melalui stimulasi terhadap sel yang berperan dalam menimbulkan respons imun terhadap tumor seperti sel limfosit. Telah dilakukan pengujian aktivitas buah merah terhadap proliferasi sel limfosit dan sel tumor kelenjar susu secara *in vitro*. Pengujian dilakukan dengan menggunakan buah merah yang diekstraksi dengan tiga macam pelarut yang berbeda polaritasnya yaitu *n*-heksan, etil asetat, dan etanol. Sel limfosit diisolasi dari limpa mencit bertumor kelenjar susu yang diperoleh dengan cara transplantasi. Pengujian terhadap sel tumor dilakukan terhadap sel tumor kelenjar susu yang diperoleh dari mencit yang sama dengan mencit untuk isolasi sel limfosit. Setelah itu diberi perlakuan dengan ekstrak buah merah sesuai tingkat konsentrasi masing-masing ekstrak. Kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% 37°C. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi selama 24, 48, dan 72 jam untuk sel limfosit serta 24 dan 48 jam untuk sel tumor kelenjar susu. Dari hasil penelitian diperoleh kesimpulan bahwa ekstrak yang paling baik dalam meningkatkan respons imun adalah ekstrak *n*-heksan dengan konsentrasi 0,0875 mg/mL dan ekstrak yang paling baik untuk menghambat pertumbuhan sel tumor kelenjar susu adalah ekstrak *n*-heksan dengan konsentrasi 0,14 mg/mL.

Kata kunci : *Pandanus conoideus* Lam., limfosit, limpa mencit, tumor kelenjar susu, proliferasi

ABSTRACT

Pandanus conoideus Lam. reported to have inhibitory activity against tumor growth. Inhibition of tumor cells can be done directly and indirectly is done through stimulation of cells that play a role in causing immune responses to tumors such as lymphocyte cells. It has been tested the activity of red fruit on the proliferation of lymphocyte cells and mammary tumor cells *in vitro*. The test was performed by using red berries extracted with three different solvents of polarity ie *n*-hexane, ethyl acetate, and ethanol. The lymphocyte cells were isolated from the mammary-finned mice spleen obtained by transplantation. Tests of tumor cells were performed on mammary tumor cells obtained from mice similar to mice for lymphocyte cell isolation. After that was treated with red fruit extract according to the concentration level of each extract. Then incubated in incubator CO₂ 5% 37°C. The observation was performed after incubation for 24, 48, and 72 hours for lymphocyte cells as well as 24 and 48 hours for mammary tumor cells. The conclusion that the best extract in improving immune response is *n*-hexan extract with concentration of 0,0875 mg / mL and the best extract to inhibit the growth of mammary gland tumor cell is *n*-heksan extract with concentration 0,14 mg / mL.

Keyword : *Pandanus conoideus* Lam., Lymphocytes, spleen mice, mammary glands tumors, proliferation

PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu jenis penyakit yang banyak menyebabkan kematian dan dapat terjadi pada manusia tanpa mengenal kelompok usia, jenis kelamin maupun ras. Di Indonesia penderita kanker menunjukkan peningkatan yang cukup signifikan dari tahun ke tahun. Data tahun 1995 menunjukkan kematian akibat neoplasma/kanker menduduki peringkat ke delapan dan laporan pada tahun 2002 sudah meningkat menjadi penyebab kematian nomor empat. Sepuluh jenis kanker yang banyak diderita adalah kanker rahim, payudara, kulit, tumor sekunder, nasofaring, ovarium, rektum, limfa, jaringan ikat dan tiroid.

Terapi kanker adalah teknik pengobatan kanker dengan tujuan mengontrol pertumbuhan atau mematikan sel kanker tanpa merusak/mengganggu kelangsungan hidup sarta fungsi sel tubuh normal. Beberapa metode terapi kanker yang berkembang sampai saat ini antara lain : pembedahan/operasi, penyinaran (radioterapi), penggunaan obat/senyawa kimia pembunuh sel kanker (kemoterapi), penggunaan senyawa kimia yang meningkatkan daya tahan tubuh (imunoterapi), terapi dengan menggunakan hormon serta tumbuhan obat, simplisia hewan dan mineral.

Tumor dapat membangkitkan respons imun selular spesifik, dan antigen tumor yang dapat dikenal oleh sel T-*cytotoxic* diidentifikasi sebagai protein seluler yang diekspresikan secara abnormal atau protein mutan. Bukti ini mendukung dugaan bahwa fungsi sel T-*cytotoxic* adalah pengawasan dan menghancurkan sel yang mengandung gen mutan yang dapat menyebabkan atau yang diasosiasikan dengan tumor ganas.

Dengan adanya perkembangan zaman dan pola pikir masyarakat yang lebih maju, akhir-akhir ini masyarakat mulai mengenal dan mengembangkan trend "*back to nature*" didasari dengan keyakinan bahwa produk-

produk alami selain lebih mudah untuk didapatkan juga memiliki efek samping yang relatif lebih rendah terhadap kesehatan. Buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) dapat dijadikan alternatif sebagai tanaman obat untuk terapi terhadap tumor, karena mengandung senyawa yang diduga berkhasiat sebagai antikanker. Selain itu telah diketahui bahwa buah merah juga memiliki kandungan antioksidan yang tinggi. Di dalam tubuh antioksidan mampu menangkal dan memutus radikal bebas senyawa karsinogen penyebab kanker. Buah merah juga diduga memiliki aktivitas sebagai imunomodulator. Imunomodulator merupakan senyawa yang mampu mempengaruhi secara positif reaksi biologis dari tubuh terhadap tumor. Dengan senyawa ini dapat menstimulasi berbagai sel-sel yang berperan dalam respons imun, antara lain limfosit T, sel NK, dan makrofag.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan adalah gunting bedah, pinset bedah, cawan petri 60 mm, *nylon net*, Inkubator karbon dioksida (Sakura), mikroskop fase kontras (Nikon Sogios), *Laminar Air Flow* (LAF) cabinet (Nuair Class II typeA/B3), Autoklaf (Sakura), oven (Sakura), kamar hitung *Improve Neubauer* (Assistent), sentrifus (Mse), *tray culture 24 well* (Linbro), filter membran 0,2 μm (Acrodisc)

Bahan

Bahan yang digunakan adalah: mencit galur C3H bertumor kelenjar susu, medium RPMI 1640 (GIBCO), *Foetal Bovine Serum* (FBS) (Sigma), Gentamisin, L-Glutamin, fungizone, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), Buah merah, *Trypan blue*, Etanol 70%, Eter, Amonium klorida 144 mM (Emerck), Asam klorida 2 M (Emerck), Natrium bikarbonat (Emerck), gas karbon dioksida dalam tabung, *n*-heksan (Brataco), etil asetat (Brataco),

Prosedur Penelitian

1. Pembuatan, perluasan tingkat konsentrasi, dan sterilisasi ekstrak buah merah

Sebanyak 150 g simplisia yang sudah dikeringkan dan dihaluskan diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan *n*-heksan sebanyak 1500 mL (1 : 10), maserasi selama 24 jam pada suhu kamar, filtrat diperoleh dengan penyaringan. Filtrat disatukan kemudian dipekatkan dengan *rotary vacum evaporator* pada suhu 50°C sampai diperoleh filtrat yang kental. Filtrat kental yang diperoleh selanjutnya dikeringkan dengan proses *freeze drier* untuk menghilangkan sisa pelarut yang masih ada.

Ekstraksi dengan pelarut etil asetat dan etanol dilakukan dengan perlakuan yang sama dengan ekstraksi menggunakan pelarut *n*-heksan.

Ekstrak buah merah ditimbang sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan kemudian diemulsikan kedalam *deionized distilled water* dengan bantuan gom arab sebagai emulgator. Konsentrasi gom arab diperhitungkan sebesar 0,280% pada volume akhir kultur.

Masing-masing ekstrak buah merah yang telah dibuat kedalam beberapa konsentrasi disterilisasikan dengan menggunakan oven pada suhu 80°C, 1 jam selama 3 hari berturut-turut.

2. Konsentrasi Ekstrak

a. Ekstrak etanol

- Konsentrasi 1 (C1) = 0,06875 mg/mL
- Konsentrasi 2 (C2) = 0,1375 mg/mL
- Konsentrasi 3 (C3) = 0,275 mg/mL
- Konsentrasi 4 (C4) = 0,550 mg/mL
- Konsentrasi 5 (C5) = 11,00 mg/mL

b. Ekstrak etil asetat

- Konsentrasi 1 (C1) = 0,075 mg/mL
- Konsentrasi 2 (C2) = 0,150 mg/mL
- Konsentrasi 3 (C3) = 0,300 mg/mL
- Konsentrasi 4 (C4) = 0,600 mg/mL

- Konsentrasi 5 (C5) = 12,00 mg/mL

c. Ekstrak *n*-heksan

- Konsentrasi 1 (C1) = 0,0875 mg/mL
- Konsentrasi 2 (C2) = 0,175 mg/mL
- Konsentrasi 3 (C3) = 0,350 mg/mL
- Konsentrasi 4 (C4) = 0,700 mg/mL
- Konsentrasi 5 (C5) = 14,00 mg/mL

3. Prosedur transplantasi tumor kelenjar susu mencit C3H

Untuk transplantasi digunakan seekor mencit C3H bertumor kelenjar susu sebagai donor. Mencit donor dieutanashia dengan eter. Jaringan tumor yang akan ditransplantasikan, diambil dengan cara aseptik menggunakan gunting dan pinset steril, kemudian dibersihkan dari pembuluh darah dan sel-sel yang sudah mengalami nekrosis. Tumor kemudian dicacah, sehingga menjadi bubur dan ditambahkan larutan garam fisiologis (PBS pH 7,2) dengan perbandingan 1 : 1. Bubur tumor sebanyak 0,2 mL disuntikkan secara subkutan aksila kanan kesetiap mencit resipien. Sebagai resipien digunakan 3 ekor mencit betina galur C3H umur 3-4 bulan, berat 20-25 g, belum pernah mempunyai anak.

4. Isolasi limfosit dari limpa

Mencit dan limpa yang diperoleh ditimbang terlebih dahulu. Limfosit diisolasi dari limpa mencit dua minggu pasca tranplantasi. Limpa diletakkan pada cawan 60 mm steril yang berisi 5 mL medium RPMI 1640. Limpa dipegang pada salah satu ujungnya dengan pinset steril, kemudian dilakukan penekanan sepanjang limpa. Suspensi sel yang diperoleh dipipet sedikit demi sedikit dengan pipet pasteur dan dilewatkan pada *nylon net* steril, dimasukkan ke dalam tabung steril. Kemudian ditambah dengan medium RPMI 1640 sampai 2/3 volume tabung. Suspensi sel tersebut disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 2000-3000 rpm. Filtrat dibuang, endapan ditambah kembali dengan medium RPMI

1640 dan disentrifugasi. Pencucian dilakukan 2 kali. Setelah itu endapan ditambah dengan 10 mL dapar amonium klorida untuk melisis eritrosit dan disentrifugasi. Kemudian endapan dicuci kembali dengan medium RPMI 1640 sebanyak 2 kali pencucian. Setelah dicuci, endapan ditambah dengan 3 mL medium RPMI 1640 yang mengandung 5% FBS, gentamisin, fungizone (untuk mencegah kontaminasi bakteri dan jamur) dan L-glutamin (untuk pertumbuhan sel).

5. Pemeliharaan dan pengujian proliferasi limfosit secara *in vitro*

Limfosit dengan konsentrasi 1×10^6 sel/mL dipelihara pada medium RPMI 1640 yang mengandung 5% FBS, fungizone, gentamisin, L-glutamin, dan asam amino non esensial.

6. Penentuan jumlah limfosit

Penentuan jumlah limfosit dilakukan dengan cara memanen limfosit 24, 38, 72 jam setelah perlakuan. Sebanyak 0,1 mL suspensi sel diambil dengan mikropipet dan ditetesi dengan *trypan blue* dan diletakkan pada kamar hitung. Limfosit yang hidup dihitung menggunakan mikroskop fase kontras.

7. Uji ekstrak buah merah terhadap proliferasi sel tumor kelenjar susu

a. Preparasi sel tumor kelenjar susu secara *in vitro*

Siapkan 5 mL RPMI, masukkan dalam tabung reaksi steril. Ambil tumor secara aseptis dengan menggunakan pinset dan gunting steril, masukkan dalam tabung reaksi yang telah berisi RPMI. Ambil cairan RPMI dalam tabung, pindahkan tumor dalam tabung ke dalam petri steril. Cacah sampai halus hingga menjadi sel-sel tunggal. Tambah PBS 3 – 5 mL. Ambil Supernatan. Tambah PBS 3 mL, sentrifuse 10 menit, buang supernatan. Pelet ditambah PBS 3 mL sentrifuse (3

kali). Pelet ditambah RPMI komplet 1 mL, hitung jumlah sel. Buat menjadi 1×10^6 sel/mL, jika pekat encerkan. Masukkan dalam tabung 5 tabung flask, kemudian inkubasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam.

b. Pemeliharaan sel tumor secara *in vitro*

Sel tumor dengan konsentrasi 1×10^6 sel/mL dipelihara pada medium RPMI 1640 yang mengandung 5% FBS, fungizone, gentamisin, L-glutamin, dan asam amino non esensial setelah diinkubasi selama 24 jam diganti media pertumbuhannya. Untuk mengganti media kultur, suspensi sel tumor diambil dari tabung flask dengan menggunakan pipet pasteur steril dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifuse. Sentrifuse dilakukan selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Media lama dibuang dan sel yang mengendap ditambah dengan medium RPMI 1640 untuk menghilangkan sel-sel yang telah mati, kemudian disentrifuse kembali dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Setelah itu suspensi sel diuji aktivitas proliferasinya dengan perlakuan ekstrak buah merah.

c. Pengujian aktivitas proliferasi sel tumor kelenjar susu

Ekstrak etanol

Pada kelompok kontrol, ditambahkan 100 μ L medium RPMI dan 100 μ L gom arab yang telah dilarutkan dalam medium RPMI, masing-masing pada 900 μ L suspensi sel. Pada kelompok I, ditambahkan 100 μ L ekstrak dengan kadar 0,06875 mg/mL. Pada kelompok II, ditambahkan 100 μ L ekstrak dengan kadar 0,1375 mg/mL. Pada kelompok III, ditambahkan 100 μ L ekstrak dengan kadar 0,275 mg/mL. Pada kelompok IV, ditambahkan 100 μ L ekstrak dengan kadar 0,55 mg/mL. Pada kelompok V, ditambahkan 100 μ L ekstrak dengan

kadar 1,10 mg/mL. Masing-masing dimasukkan kedalam sumur (*well*) dan diinkubasi dalam inkubator karbon dioksida. Pengamatan dilakukan selama 3 hari yaitu 24, 48 jam setelah perlakuan.

Ekstrak etil asetat dan *n*-heksan

Ekstrak etil asetat dan *n*-heksan dilakukan dengan perlakuan yang sama seperti ekstrak etanol disesuaikan dengan tingkat konsentrasi masing-masing ekstrak.

d. Penentuan jumlah sel

Penentuan jumlah sel tumor dilakukan dengan cara memanen sel tumor 24, 48 jam setelah perlakuan. Sebanyak 0,1 mL suspensi sel diambil dengan mikropipet dan ditetesi dengan *trypan blue* dan diletakkan pada kamar hitung. Limfosit yang hidup dihitung menggunakan mikroskop fase kontras.

Analisa Data

Untuk mengetahui pengaruh berbagai ekstrak buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) terhadap proliferasi limfosit digunakan uji analisa varian satu arah (ANOVA) dengan bantuan SPSS 13.0 *for windows*. Syarat untuk analisa varian dua arah adalah data harus berdistribusi normal dan homogen. Selanjutnya apabila pada uji analisa varian satu arah (ANOVA) ada perbedaan antar kelompok perlakuan, maka analisa dilanjutkan dengan Uji BNT.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi terhadap buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) karena buah merah diduga memiliki komponen bioaktif yang berpengaruh terhadap imunitas, diantaranya *4-hidroxy-4-methylglutamic acid* dan *1-methoxy-2-phenyl ethan* serta komponen flavonoid. Buah merah juga mengandung antioksidan dengan

konsentrasi yang sangat tinggi, seperti total karotenoid yang mencapai 12000 ppm.

Hasil ekstraksi buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) berupa minyak sehingga tidak larut dalam medium RPMI 1640 yang berpelarut aquadest deionisasi, untuk mencampurkan ekstrak buah merah dengan medium RPMI 1640 maka digunakan gom arab sebagai emulgator. Konsentrasi gom arab diperhitungkan sebesar 0,280 % pada volume akhir kultur sel.

Secara umum ketiga ekstrak tersebut memiliki pengaruh yang cenderung sama dimana jumlah sel limfosit semakin menurun seiring dengan meningkatnya tingkat konsentrasi. Ketiga ekstrak memberikan efek yang positif terhadap proliferasi sel limfosit pada konsentrasi yang rendah (tingkat konsentrasi C1, C2, C3), setelah ekstrak dinaikkan konsentrasinya terjadi penurunan jumlah sel limfosit dibandingkan dengan kontrol gom arab. Hal ini mungkin disebabkan karena pada konsentrasi rendah sel limfosit mampu untuk menggunakan semua kandungan ekstrak buah merah secara optimal untuk berproliferasi mungkin juga disebabkan pada konsentrasi rendah ekstrak yang diuji tersebut bersifat seperti lektin pada sel limfosit sehingga mampu menginduksi terjadinya proliferasi, sedangkan pada konsentrasi tinggi sel-sel limfosit tidak mampu menggunakan kandungan ekstrak buah merah secara optimal, menyebabkan terjadinya peristiwa toksik karena dosis yang berlebihan sehingga terjadi kematian sel limfosit.

Berikut merupakan hasil pengujian yang diperoleh:

1. **Pengaruh pemberian ekstrak buah merah terhadap proliferasi sel limfosit**

a. Inkubasi selama 24 jam

Data perubahan jumlah sel limfosit tiap perlakuan setelah inkubasi selama 24 jam dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah sel limfosit setelah inkubasi 24 jam ($\times 10^4$ sel/mL)*

Konsentrasi	Ekstrak		
	Etanol	Etil asetat	<i>n</i> -Heksan
C1	83,000 \pm 30,000	87,667 \pm 11,676	109,333 \pm 6,658
C2	69,667 \pm 9,452	69,333 \pm 9,019	83,667 \pm 6,110
C3	70,333 \pm 18,502	65,333 \pm 9,238	67,667 \pm 10,970
C4	42,667 \pm 12,342	52,667 \pm 6,506	31,000 \pm 10,149
C5	43,333 \pm 13,576	33,667 \pm 20,745	18,667 \pm 8,145

Jumlah rata-rata sel limfosit tertinggi terdapat pada ekstrak *n*-heksan diikuti oleh ekstrak etil asetat dan etanol pada konsentrasi C1, sedangkan jumlah rata-rata sel limfosit terendah terdapat pada ekstrak *n*-heksan pada konsentrasi C5. Terlihat bahwa tiap kelompok perlakuan mengalami penurunan jumlah sel yang hidup seiring dengan semakin

meningkatnya konsentrasi ekstrak buah merah yang diberikan ke dalam kultur. Hal ini diduga disebabkan karena pada konsentrasi rendah ekstrak buah merah mampu menstimulasi sel limfosit untuk berproliferasi tetapi pada konsentrasi tinggi ekstrak buah merah bersifat toksik pada sel limfosit sehingga menyebabkan kematian sel.

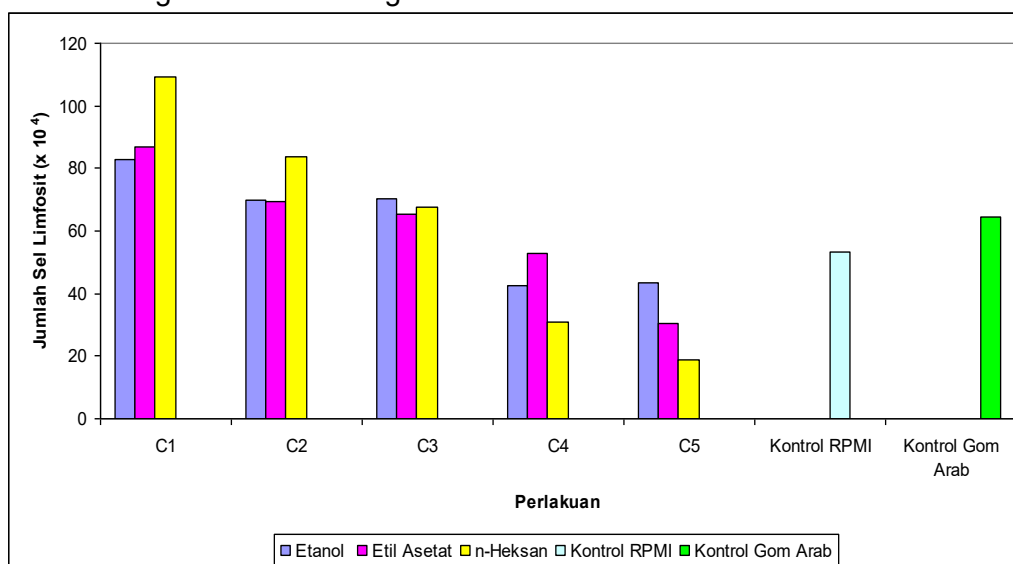
Tabel 2. Jumlah sel limfosit setelah inkubasi 24 jam ($\times 10^4$ sel/mL) pada Kontrol*

Kontrol	
RPMI 1640	Gom arab
53,333 \pm 5,860	64,333 \pm 5,132

* Rata-rata dari tiga kali ulangan \pm SD

Kontrol yang digunakan pada penelitian ini adalah kontrol RPMI sebagai kontrol standar dimana sumur (*well*) tidak diberi perlakuan baik ekstrak buah merah maupun gom arab tetapi sumur hanya berisi media dan sel dan kontrol gom arab sebagai

kontrol khusus dengan asumsi bahwa pada perlakuan ekstrak buah merah terdapat gom arab sebagai kandungan lain yang dapat memberikan efek stimulasi terhadap proliferasi sel limfosit.

**Gambar 1. Diagram rata-rata jumlah sel limfosit setelah inkubasi 24 jam ($\times 10^4$ sel/mL)**

Tabel 3. Ringkasan ANOVA jumlah sel limfosit setelah inkubasi 24 jam

Perlakuan	JK	db	KT	F	Signifikasi
Kelompok perlakuan	25686,745	16	1605,422	9,490	0,000
Galat percobaan	5752,000	34	169,176		
Total	31438,745	50			

Dari hasil uji statistik ANOVA satu arah diperoleh nilai signifikansi 0,000 $p < 0,05$, hal ini menunjukkan ada perbedaan nyata dari jumlah sel limfosit tiap kelompok perlakuan. Maka analisis dilanjutkan dengan uji BNT.

b. Inkubasi selama 48 jam

Data perubahan jumlah sel limfosit tiap perlakuan setelah inkubasi selama 48 jam dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Jumlah sel limfosit setelah inkubasi 48 jam ($\times 10^4$ sel/mL)*

Konsentrasi	Ekstrak		
	Etanol	Etil asetat	<i>n</i> -Heksan
C1	83 \pm 6,928	80 \pm 24,269	111 \pm 7,937
C2	69,333 \pm 7,228	78,333 \pm 1,527	85,333 \pm 6,083
C3	71 \pm 8,544	78,333 \pm 4,726	76,333 \pm 10,214
C4	54,333 \pm 5,132	48,667 \pm 9,292	36,667 \pm 9,291
C5	92 \pm 27,538	95 \pm 12,583	12,333 \pm 7,094

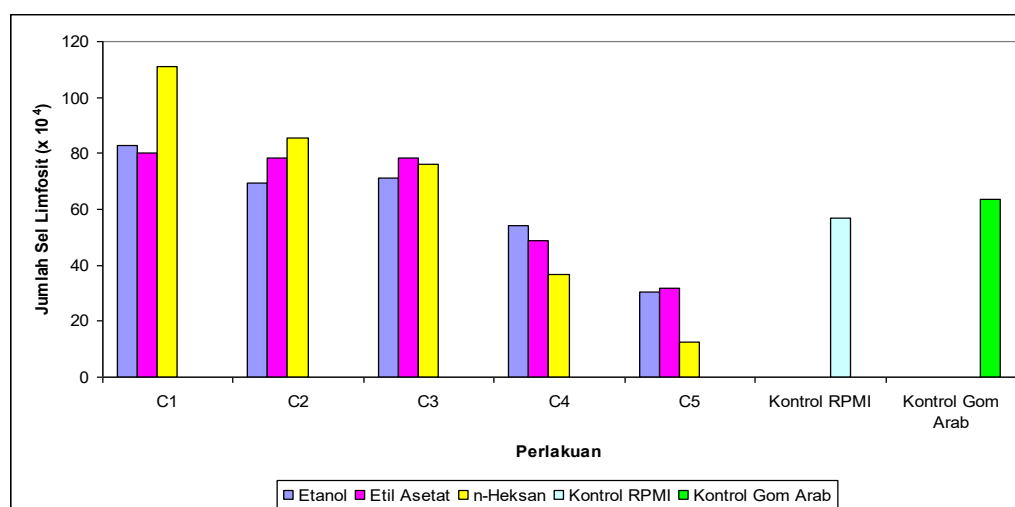
Rata-rata sel limfosit tertinggi terdapat pada ekstrak *n*-heksan diikuti oleh ekstrak etanol dan etil asetat pada konsentrasi C1, sedangkan jumlah rata-rata sel limfosit terendah terdapat pada ekstrak *n*-heksan pada

konsentrasi C5. Terlihat bahwa tiap kelompok perlakuan mengalami penurunan jumlah sel yang hidup seiring dengan semakin meningkatnya konsentrasi ekstrak buah merah yang diberikan ke dalam kultur.

Tabel 5. Jumlah sel limfosit setelah inkubasi 24 jam ($\times 10^4$ sel/mL) pada Kontrol*

Kontrol	
RPMI 1640	Gom arab
57 \pm 5,291	63,667 \pm 6,807

* Rata-rata dari tiga kali ulangan \pm SD

**Gambar 2. Diag rata-rata jumlah sel limfosit setelah inkubasi 48 jam ($\times 10^4$ sel/mL)**

Tabel 6. Ringkasan ANOVA jumlah sel limfosit setelah inkubasi 48 jam

Perlakuan	JK	db	KT	F	Signifikasi
Kelompok perlakuan	31320,510	16	1957,532	13,706	0,000
Galat percobaan	4856,000	34	142,824		
Total	36176,510	50			

Dari hasil uji statistik ANOVA satu arah diperoleh nilai signifikansi 0,000 $p < 0,05$, hal ini menunjukkan ada perbedaan nyata dari jumlah sel limfosit tiap kelompok perlakuan. Maka analisis

dilanjutkan dengan uji BNT. Ringkasan hasil uji BNT

c. Inkubasi selama 72 jam

Data perubahan jumlah sel limfosit tiap perlakuan setelah inkubasi selama 72 jam dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Jumlah sel limfosit setelah inkubasi 72 jam ($\times 10^4$ sel/mL)*

Konsentrasi	Ekstrak		
	Etanol	Etil asetat	n-Heksan
C1	77 \pm 10,440	81,333 \pm 17,559	107,667 \pm 15,695
C2	75 \pm 23,895	83,333 \pm 3,512	92,333 \pm 6,110
C3	79 \pm 3	69,333 \pm 10,598	83 \pm 5,196
C4	52,667 \pm 13,650	45 \pm 22,605	44 \pm 13,115
C5	53 \pm 2,646	20,333 \pm 14,468	9,333 \pm 3,512

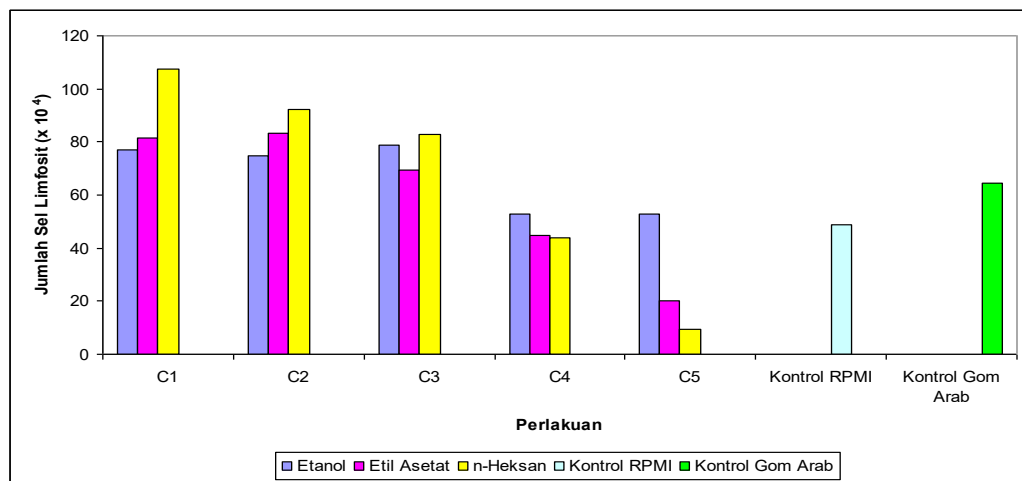
Rata-rata sel limfosit tertinggi terdapat pada ekstrak n-heksan diikuti oleh ekstrak etil asetat dan etanol pada konsentrasi C1, sedangkan jumlah rata-rata sel limfosit terendah terdapat pada ekstrak n-heksan pada

konsentrasi C5. Terlihat bahwa tiap kelompok perlakuan mengalami penurunan jumlah sel yang hidup seiring dengan semakin meningkatnya konsentrasi ekstrak buah merah yang diberikan ke dalam kultur.

Tabel 8. Jumlah sel limfosit setelah inkubasi 24 jam ($\times 10^4$ sel/mL) pada Kontrol*

Kontrol	
RPMI 1640	Gom arab
49 \pm 9,539	64,333 \pm 5,859

* Rata-rata dari tiga kali ulangan \pm SD



Gambar 3. Diag rata-rata jumlah sel limfosit setelah inkubasi 72 jam ($\times 10^4$ sel/mL)

Tabel 9. Ringkasan ANOVA jumlah sel limfosit setelah inkubasi 72 jam

Perlakuan	JK	db	KT	F	Signifikasi
Kelompok perlakuan	33311,490	16	2081,968	14,351	0,000
Galat percobaan	4932,667	34	145,078		
Total	38244,157	50			

Dari hasil uji statistik ANOVA satu arah diperoleh nilai signifikansi 0,000 $p < 0,05$, hal ini menunjukkan ada perbedaan nyata dari jumlah sel limfosit tiap kelompok perlakuan. Maka analisis dilanjutkan dengan uji BNT.

2. Pengaruh pemberian ekstrak buah merah terhadap proliferasi sel tumor kelenjar susu

a. Inkubasi selama 24 jam

Data perubahan jumlah sel tumor kelenjar susu tiap perlakuan setelah inkubasi selama 24 jam dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Jumlah sel tumor kelenjar susu setelah inkubasi 24 jam ($\times 10^4$ sel/mL)*

Konsentrasi	Ekstrak		
	Etanol	Etil asetat	<i>n</i> -Heksan
C1	126,333 \pm 5,508	127,000 \pm 3,605	124,000 \pm 6,000
C2	125,333 \pm 1,527	118,667 \pm 3,214	119,331 \pm 8,662
C3	120,000 \pm 13,229	116,667 \pm 4,933	115,000 \pm 4,000
C4	116,000 \pm 2,646	110,000 \pm 11,000	101,667 \pm 22,546
C5	106,333 \pm 5,508	116,333 \pm 4,042	81,667 \pm 7,638

Jumlah rata-rata sel tumor kelenjar susu terendah terdapat pada ekstrak *n*-heksan diikuti oleh ekstrak etanol dan etil asetat pada konsentrasi C5, sedangkan jumlah rata-rata sel tumor kelenjar susu tertinggi terdapat pada ekstrak etil asetat pada konsentrasi C1. Terlihat bahwa tiap kelompok perlakuan mengalami penurunan jumlah sel yang hidup seiring dengan semakin meningkatnya konsentrasi ekstrak buah merah yang diberikan ke dalam kultur.

Hal ini diduga disebabkan karena pada konsentrasi tinggi ekstrak

buah merah mampu menghambat sel tumor kelenjar susu untuk berproliferasi karena ekstrak buah merah mengandung zat aktif yang dapat menghentikan sel tumor kelenjar susu untuk memperbanyak diri dan bersifat toksik pada sel tumor kelenjar susu, tetapi pada konsentrasi rendah ekstrak buah merah belum mampu untuk menghambat sel tumor kelenjar susu untuk berproliferasi karena tidak bersifat toksik pada sel tumor kelenjar susu.

Tabel 11. Jumlah sel tumor kelenjar susu setelah inkubasi 24 jam ($\times 10^4$ sel/mL)* pada Kontrol

Kontrol	
RPMI 1640	Gom arab
111,000 \pm 7,211	116,000 \pm 3,606

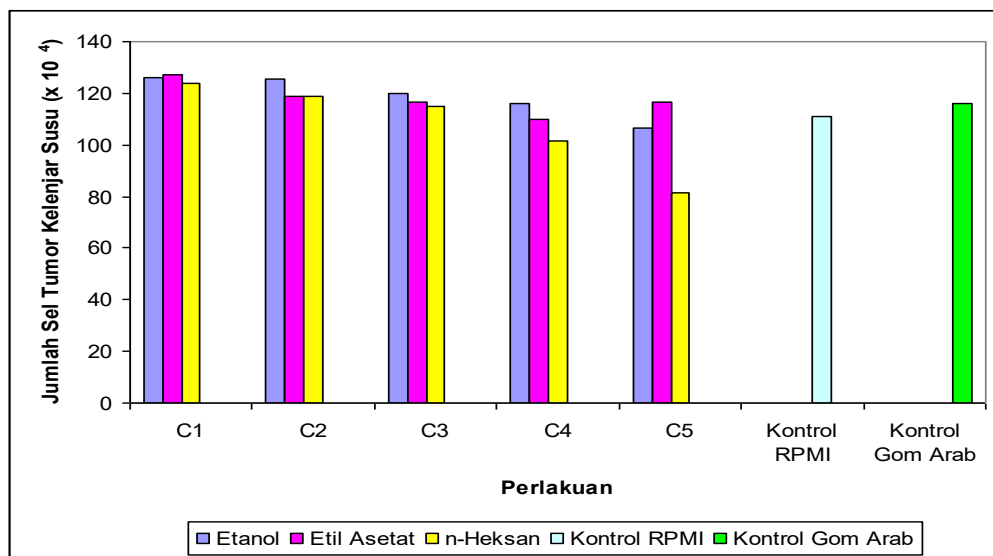
* Rata-rata dari tiga kali ulangan \pm SD

Kontrol yang digunakan pada penelitian ini adalah kontrol RPMI sebagai kontrol standar dimana sumur (*well*) tidak diberi perlakuan baik

ekstrak buah merah maupun gom arab tetapi sumur hanya berisi media dan sel dan kontrol gom arab sebagai kontrol khusus dengan asumsi bahwa

pada perlakuan ekstrak buah merah terdapat gom arab sebagai kandungan lain yang dapat memberikan efek

menghambat terhadap proliferasi sel tumor kelenjar susu.



Gambar 4. Diagram rata-rata jumlah sel tumor kelenjar susu setelah inkubasi 24 jam ($\times 10^4$ sel/mL)

Tabel 12. Ringkasan ANOVA jumlah sel tumor kelenjar susu setelah inkubasi 24 jam

Perlakuan	JK	db	KT	F	Signifikasi
Kelompok perlakuan	5784,627	16			
Galat percobaan	2376,000	34	361,539	5,174	0,000
Total	8160,627	50	69,882		

Dari hasil uji statistik ANOVA satu arah diperoleh nilai signifikansi 0,000 $p < 0,05$, hal ini menunjukkan ada perbedaan nyata dari jumlah sel limfosit tiap kelompok perlakuan. Maka analisis dilanjutkan dengan uji BNT.

b. Inkubasi selama 48 jam

Data perubahan jumlah sel limfosit tiap perlakuan setelah inkubasi selama 48 jam dapat dilihat pada Tabel 13.

Tabel 13. Jumlah sel tumor kelenjar susu setelah inkubasi 48 jam ($\times 10^4$ sel/mL)*

Konsentrasi	Ekstrak		
	Etanol	Etil asetat	n-Heksan
C1	98,000 \pm 5,000	92,333 \pm 3,214	89,333 \pm 3,214
C2	102,333 \pm 5,507	93,667 \pm 8,505	93,667 \pm 1,732
C3	104,000 \pm 3,605	100,333 \pm 4,041	96,667 \pm 2,516
C4	86,333 \pm 1,527	83,333 \pm 4,726	80,667 \pm 5,132
C5	81,667 \pm 2,886	76,667 \pm 5,773	74,000 \pm 5,922

Jumlah rata-rata sel tumor kelenjar susu terendah terdapat pada ekstrak *n*-heksan diikuti oleh ekstrak etil asetat dan etanol pada konsentrasi C5, sedangkan jumlah

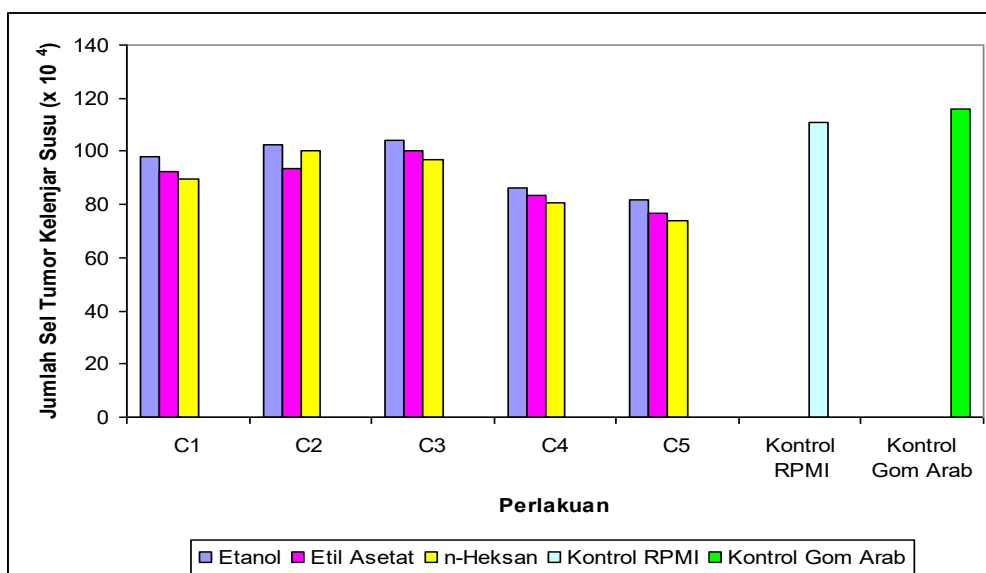
rata-rata sel tumor kelenjar susu tertinggi terdapat pada ekstrak etanol pada konsentrasi C1. Terlihat bahwa tiap kelompok perlakuan mengalami penurunan

jumlah sel yang hidup seiring dengan buah merah yang diberikan ke dalam semakin meningkatnya konsentrasi ekstrak kultur.

Tabel 14. Jumlah sel tumor kelenjar susu setelah inkubasi 24 jam ($\times 10^4$ sel/mL)* pada Kontrol

Kontrol	
RPMI 1640	Gom arab
111,000 \pm 7,211	116,000 \pm 3,605

* Rata-rata dari tiga kali ulangan \pm SD



Gambar 5. Diagram rata-rata jumlah sel tumor kelenjar susu setelah inkubasi 48 jam ($\times 10^4$ sel/mL)

Tabel 15. Ringkasan ANOVA jumlah sel tumor kelenjar susu setelah inkubasi 72 jam

Perlakuan	JK	db	KT	F	Signifikasi
Kelompok perlakuan	10118,824	16	632,426		
Galat percobaan	715,333	34	21,039	30,059	0,000
Total	10834,157	50			

Dari hasil uji statistik ANOVA satu arah diperoleh nilai signifikansi $0,000 p < 0,05$, hal ini menunjukkan ada perbedaan nyata dari jumlah sel limfosit tiap kelompok perlakuan. Maka analisis dilanjutkan dengan uji BNT

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil beberapa kesimpulan yaitu:

1. Respons proliferasi sel limfosit umumnya sangat bergantung pada kondisi kultur. Konsentrasi ekstrak buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) pada setiap tingkat dapat menimbulkan respons proliferasi sel limfosit yang berbeda, hingga bila konsentrasi diperbesar akan menimbulkan efek sitotoksik. Respons tersebut tidak selalu bersifat linier karena sifat imunostimulan maupun immunosupresif suatu zat sangat bergantung pada jumlahnya dan kondisi biologis sel.
2. Ekstrak *n*-heksan lebih menunjukkan efek imunostimulan dan efek toksik dibandingkan dengan ekstrak etanol dan etil asetat.
3. Ekstrak buah memiliki efek imunostimulan terhadap sel limfosit pada konsentrasi yang rendah (0,000875 g/mL), dan dapat memberikan efek toksik pada konsentrasi yang lebih tinggi (0,0140 g/mL).
4. Ekstrak buah merah memberikan efek sitotoksik terhadap sel tumor kelenjar susu, pada semua tingkat konsentrasi, dan paling efektif pada konsentrasi 0,0140 g/mL.

DAFTAR PUSTAKA

Albertus SP. Pengaruh aktivitas ekstrak tanaman cincau hijau (*Cyclea barbata* L. Miers) terhadap proliferasi sel limfosit darah tepi manusia secara *in vitro* [skripsi]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor; 2000. hal: 26-7, 29-30.

- Baratawidjaja KG. Imunologi dasar. Edisi ke-6. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2004. hal: 3-6, 56-66, 366-368
- Bellanti JA. Immunology II. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1978. hal :14-15.
- Benjamini E, Rennick DM, Sell S. Tumor immunology. In: Stites DP, Stobo JD, Fundenberg HH, editor. Basic & clinical immunology. California: Lange Medical Publications; 1982. hal: 236-242.
- Bradley LM. Cell proliferation. In: Mishell BB, Shiigi SM, editor. Selected methods in cellular immunology. San Francisco: W. H. Freeman and Company; 1980. hal: 153, 156-159.
- Budi IM, Paimin FR. Buah merah. Depok: Penebar Swadaya; 2005. hal. 3, 21-29, 49, 51.
- Calder PC, Field CJ. Fatty acids, inflammation and immunity. In: Calder PC, Field CJ, Gill HS, editor. Nutrition and immune function. New Zealand: CABI Publishing. 2002. hal: 61-9.
- Echinacea tingkatkan kekebalan tubuh. Diambil dari: <http://www.pikiran-rakyat.co.id/cetak/2006/012006/26/ca-krawala/lainnya03.htm>. Diakses 12 Maret 2006.
- Greenberg PD. Mechanisms of tumor immunology. In: Stites DP, Abba IT, Tristram GP, editor. Medical immunology. London: Prentice-Hall International Inc.; 1997. hal: 634-635.
- Henry C. Cell separation, adherence. In: Mishell BB, Shiigi SM, editor. Selected methods in cellular immunology. San Francisco: W. H. Freeman and Company; 1980. hal: 182-5.
- Herberman RB et al. Cytotoxicity against tumors by NK and K cells. In: Spreafico F, Arnon R, editor. Tumor-associated antigens and their specific immune response. London: Academic press; 1979. hal. 129-149.
- Indarti W. Pengaruh pemberian ekstrak daun benalu mangga (*Viscum album*) terhadap pertumbuhan kultur limfosit T yang diisolasi dari limpa mencit C3H bertumor kelenjar susu [skripsi].

- Jakarta. Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, 2000. hal:37-40.
- Indriani YH, Hartono R, Setyanove I, Dalimarta S, Khomsan A, Pranadji DK et al. Buah merah penyembuh segala penyakit?. *Plus+* 2005;01(1):7.
- Katzung BG. Farmakologi dasar dan klinik. Edisi 3. Diterjemahkan oleh Kotualubun BH etal. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 1993. hal: 797.
- Kresno SB. Imunologi: Diagnosis dan prosedur laboratorium. Edisi keempat. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2001. hal: 4-6, 18, 23, 209-210, 219-224.
- Kusmardi, Wuyung PE, Hartati M. Potensi β -karoten sebagai *biological response modifier* terhadap ekspresi reseptor α interleukin-2 kultur *in vitro* limfosit T mencit bertumor mammae. *Majalah Patologi Indonesia*. Jul 2002;72-7.
- Morgan SJ, Darling DC. *Animal cell culture*. United Kingdom: BIOS Scientific Publishers Limited; 1993. hal: 1-2, 27-36.
- Puspaningrum. Pengaruh ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* Linn.) terhadap proliferasi sel limfosit limpa tikus dan sel kanker K-562 (*Chronic Myelogenous Leukimia*) secara *in vitro* [skripsi]. Bogor. Fakultas Teknologi Institut Pertanian Bogor, 2003. hal:41-53.
- Redaksi Agromedia. Pro & kontra buah merah pendapat pakar & praktisi. Depok: PT AgroMedia Pustaka; 2005. hal.
- Redaksi Trubus. Panduan praktis buah merah bukti empiris & ilmiah. Depok: Penebar Swadaya; 2005. hal. 29-30, 45-46, 61, 63-94.
- Rismana E. Beberapa metode analisis *adduct* DNA untuk deteksi dini dan uji efektivitas kemoterapi kanker. *Artocarpus Media Pharmaceutica Indonesiana*. Mar 2002;20-25.
- Robinson, T. 1991. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung. ITB. hal 152-196.
- Roitt IM. *Essential immunology*. Seventh Edition. London: Blackwell Scientific Publication; 1991. hal: 1-3, 173-200.
- Spector WG. Pengantar Patologi Umum. Edisi ketiga. Diterjemahkan oleh Soetjipto NS etal. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press, 1993. hal: 330-331.
- Subroto Ahkam. PCO (Pandanus cocos oil). Jakarta: Penebar Swadaya; 2005. hal. 29, 54.
- Sutrisno RB. Taksonomi spermatophyta untuk farmasi. Edisi I. Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila; 1998. hal. 319-320.
- Sutrisno RB. Taksonomi tumbuhan untuk farmasi. Edisi I. Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila; 1998. hal. 19.
- Tjay TH, Rahardja K. Obat-obat penting khasiat, penggunaan dan efek-efek sampingnya. Edisi kelima. Jakarta: Penerbit PT Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia; 1996. hal: 197, 212.
- Wibisono LK. Pengaruh derivat kumarin dari kulit batang *Calophyllum biflorum* terhadap pertumbuhan *in vivo* tumor kelenjar susu mencit C3H. *Makara Seri Kesehatan*. Jun 2002;12-6.
- Wiryanta BTW. Keajaiban buah merah. Depok: PT AgroMedia Pustaka; 2005. hal. 13, 20-29.
- Wuyung PE, Kusmardi, Pringgoutomo S. Pengaruh β -karoten dalam ekstrak minyak kelapa sawit dosis 1000 $\mu\text{g}/0,1$ ml dan 2000 $\mu\text{g}/0,1$ ml terhadap laju proliferasi sel tumor kelenjar susu mencit C3H. *Makara Jurnal Penelitian Universitas Indonesia*. Des 1997;21-8
- Yahya M, Wiryanta BTW. Khasiat & manfaat buah merah si emas merah dari papua. Depok: PT AgroMedia Pustaka; 2005. hal. 13-22, 28-34.
- Yusron UN. Buah merah si buah bibir. *Kontan* 2005 Mei 23;3 (kol. 1).