

**LAPORAN PENELITIAN
KERJASAMA INTERNASIONAL
TAHUN ANGGARAN 2012**



**DEVELOPMENT OF ACTIVE COMPOUNDS FROM *KAEMPFERIA
ROTUNDA* AGAINST HUMAN CANCER CELL LINES**

Peneliti :

Prof. Dr. Nurfina Aznam, Apt, SU (Universitas Negeri Yogyakarta)
Prof. Dr. Sri Atun (Universitas Negeri Yogyakarta)
Prof. Dr. Sri Nurestri (University of Malaya)

Nomor kontrak LPPM UNY: 019 /Subkontrak- Kerjasama Internasional /UN34.21/2012

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA**

8 November 2012

**HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN
PENELITIAN KERJASAMA INTERNASIONAL**

1. Judul Penelitian : **DEVELOPMENT OF ACTIVE COMPOUNDS FROM
KAEMPFERIA ROTUNDA AGAINST HUMAN CANCER CELL
LINES**
2. Ketua Peneliti
 - a. Nama Lengkap : Prof. Dr. Nurfina Aznam, Apt, SU
 - b. Jenis Kelamin : L / P
 - c. NIP : 19561206 198103 2 002
 - d. Jabatan Struktural : PR I
 - e. Jabatan fungsional : Guru Besar
 - f. Fakultas/Jurusan : FMIPA/ Pend. Kimia
 - g. Pusat Penelitian : -
 - h. Alamat : Karangmalang, Depok, Sleman, Yogyakarta
 - i. Telpon/Faks : (0274) 586168 psw 217; 218/(0274)540713
 - j. Alamat Rumah : Gowongan III/410, Jetis, Yogyakarta
 - k. Telpon/Faks/E-mail : Hp. 081578601981
3. Skim Penelitian : Kerjasama Internasional
4. Bidang Ilmu : MIPA
5. Mitra Kerjasama Internasional
6. Nama : Prof. Dr. Sri Nurestri
7. Institusi : Institute of Biological Sciences, Faculty of Science,
University of Malaya
8. Jangka Waktu Penelitian: 1 tahun
9. Pembiayaan Tahun 2012

Jumlah biaya yang dibutuhkan	: Rp 200.000.000
Jumlah biaya yang disediakan oleh mitra	: Rp 100.000.000-
Jumlah biaya yang diajukan ke DIPA UNY	: Rp 100.000.000

Mengetahui
Dekan FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta

Yogyakarta, 8 November 2012
Ketua Peneliti

Dr. Hartono
NIP. 19620329 198702 1 002

Prof. Dr. Nurfina Aznam, Apt, SU
NIP. 19561206 198103 2 002

Menyetujui
Ketua LPPM Universitas Negeri Yogyakarta

(Prof. Dr. Anik Ghufron)
NIP. 19621111 198803 1001

PRAKATA

Dengan mengucapkan syukur Alhamdulillah hirobbil ‘alamin, penulis panjatkan segala puji kehadiran Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmad dan karuniaNya, yang karena izin-Nya jualah, penulis sampai pada tahap penyelesaian laporan penelitian Kerjasama Internasional dana DIPA UNY Tahun 2012.

Secara khusus penulis ingin menyampaikan penghargaan dan rasa terimakasih kepada berbagai pihak yang telah berperan dalam penyelesaian program ini, kepada :

1. Rektor Universitas Negeri Yogyakarta, yang telah memberi kesempatan dan fasilitas yang diperlukan.
2. Ketua LPPM Universitas Negeri Yogyakarta yang telah memberi kesempatan dan dana yang diperlukan.
3. Dekan FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta yang telah memberi ijin untuk penelitian.
4. Semua pihak yang telah membantu jalannya penelitian ini hingga selesai.

Mudah-mudahan segala bentuk bantuan yang telah diberikan merupakan amal saleh disisi ALLah SWT, dan semoga laporan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	
A. LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASAN DAN SUMMARY	ii
PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
I. PENDAHULUAN	1
II .TINJAUAN PUSTAKA	3
III. METODE PENELITIAN	8
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	13
V. KESIMPULAN DAN SARAN	24
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
1	Tahapan Penelitian dan Hasil yang ditargetkan	13
2	Hasil uji aktivitas sitotoksik masing-masing ekstrak	16
3	Hasil uji sitotoksik senyawa hasil isolasi terhadap beberapa sel kanker	17

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
1	Senyawa yang telah ditemukan dari rimpang temu ireng	5
2	Beberapa senyawa fenolik yang ditemukan dari rimpang tumbuhan famili Zingiberaceae	7
3	Beberapa senyawa sesquiterpen dari rimpang tumbuhan famili Zingiberaceae	7
4	Beberapa senyawa flavanon hasil isolasi ekstrak metanol kunci pepet (<i>Kaempferia rotunda</i>)	8
5	Pembuatan ekstrak kunci pepet	14
6	Isolasi dan uji aktivitas sitotoksik	15
7	Pengamatan Sel kanker HCT 116 kontrol (tanpa perlakuan) setelah 48 jam di bawah mikroskop face kontras (A); Pengamatan dengan mikroskop fluorecent (perbesaran 40x) (B) dan perbesaran 100x (C)	18
8	Pengamatan Sel kanker HCT 116 dengan penambahan pinostrombin 50 µg/ml setelah 48 jam di bawah mikroskop <i>phace contras</i> (A) dan Pengamatan dengan mikroskop fluorecent (perbesaran 40x) (B) dan perbesaran 100x (C)	19
9	Pengamatan Sel kanker HCT 116 dengan penambahan 4', 7-dihidroksi-flavanon 40 µg/ml setelah 48 jam di bawah mikroskop face kontras (A) dan Pengamatan dengan mikroskop fluorecent (perbesaran 50x) (B) dan perbesaran 100x (C) (a=sel normal; b= <i>erlay apoptotic</i> ; c= <i>late apoptotic</i>)	19
10	Data <i>flow cytometry</i> sel kanker HCT 116 kontrol (A); setelah perlakuan pinostrombin 50 µg/ml (B); dan setelah perlakuan 4', 7-dihidroksi- flavanon 20 µg/ml (C) pada inkubasi selama 72 jam	20
11	Terbentuknya ikatan hidrogen pada pinostrombin	21
12	Perbedaan <i>erlay apoptotic</i> , <i>late apoptotic</i> , serta sel mati	22

ABSTRAK/ RINGKASAN PENELITIAN

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengeksplorasi senyawa bioaktif dari rimpang tumbuhan *Kaempferia rotunda* (kunci pepet) yang berpotensi sebagai antikanker. Target khusus yang ingin dicapai adalah untuk mendapatkan senyawa murni, struktur molekul berdasarkan data spektroskopi yang lengkap, data aktivitas sitotoksik terhadap beberapa *cell line* kanker, seperti sel *cell line* kanker seperti *Breast carcinoma (MCF-7)*; *Cervical carcinoma (Ca Ski)*; *T47-D*; *HCT 116*; *A549*; *WiDr*; *Hela S3* atau yang lainnya. Selanjutnya senyawa yang menunjukkan sifat toksis perlu dilanjutkan untuk mengetahui mekanisme aktivitas antiproliferasi, apoptosis, dan siklus penghambatan terhadap *cell lines* kanker. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Kimia Organik Universitas Negeri Yogyakarta untuk isolasi senyawa bioaktifnya serta di Faculty of Science, University of Malaya dan Laboratorium Parasitologi fakultas Kedokteran UGM untuk uji aktivitas sitotoksiknya terhadap beberapa *cell lines* kanker. Metode penelitian yang telah dilakukan adalah dengan melakukan eksperimen di laboratorium yang meliputi isolasi dan pemurnian senyawa, uji sitotoksitas, mekanisme molekuler aktivitas senyawa tersebut sebagai antiproliferasi, apoptosis, dan siklus penghambatan terhadap beberapa *cell lines* kanker. Aktivitas antiproliferasi dilakukan dengan MTT *Cell Proliferation Kit* menggunakan metode kolorimetri yang diukur berdasarkan pembentukan warna pada λ 570 nm dari cell kontrol dan akibat perlakuan penambahan sampel pada berbagai variasi konsentrasi. Pengamatan apoptosis dilakukan dengan menggunakan *double stain apoptotic Kit* (Hoeschst 33342/PI) dan *flow cytometric*, serta pengamatan sel setelah perlakuan menggunakan *fluorescent microscop*. Beberapa ekstrak rimpang kunci pepet menunjukkan aktivitas sitotoksik yang relatif lebih tinggi terhadap beberapa sel kanker yaitu MCF-7, Ca Ski, T47D, HeLa, dan WiDr (aktivitas sitotoksik $<100 \mu\text{g/ml}$). Dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kloroform memiliki aktivitas sitotoksik yang relatif paling tinggi dibanding yang lainnya. Dari ekstrak etil asetat diperoleh tiga senyawa yaitu 4'-hidroksi-7-metoksiflavanon, 5-hidroksi-7-metoksiflavanon, dan 4',7-dihidroksiflavanon. Sedangkan dalam ekstrak kloroform ditemukan dua senyawa yaitu 5-hidroksi-7-metoksiflavanon dan 4', 7-dihidroksiflavanon. Uji aktivitas senyawa flavanon menunjukkan 4',7-dihidroksiflavanon memiliki aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap sel kanker HCT 116 ($19,7 \pm 0,9 \mu\text{g/ml}$) dan Ca ski ($22,4 \pm 2,0 \mu\text{g/ml}$). Sedangkan 5-hidroksi-7-metoksiflavanon menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap sel kanker HCT 116 ($22,3 \pm 2,5 \mu\text{g/ml}$). Pengamatan secara kualitatif dan kuantitatif terjadinya apoptosis menunjukkan bahwa 4'-7-dihidroksiflavanon relatif lebih reaktif mempercepat terjadinya *late apoptotic* sel kanker HCT 116.

Kata Kunci: Kaempferia rotunda; mekanisme molekuler; antikanker;

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang (permasalahan, urgensi, serta rasional, dan potensi tim peneliti)

Kanker adalah proses pertumbuhan sel yang tidak terkontrol yang diikuti oleh invasi sel ke jaringan disekitarnya serta penyebaran (metastasis) ke bagian tubuh lain. Sifat utama sel kanker adalah proliferasi terus menerus sehingga menyebabkan ketidakseimbangan antara sel hidup dengan sel mati (Parton *et al*, 2001). Menurut catatan WHO (Anonim, 2007) pada tahun 2000 hingga tahun 2010 kanker menempati urutan kedua sebagai penyebab kematian di dunia setelah penyakit jantung dan mengalami peningkatan hingga pada tahun 2030, diperkirakan akan menempati urutan pertama. Tahun 2005 kanker membunuh sekitar 206.000 penderita di Indonesia, 135.000 diantaranya berusia dibawah 70 tahun. Oleh karena itu, diperlukan pengobatan yang tepat untuk meningkatkan kualitas hidup penderita kanker.

Pengobatan kanker pada umumnya didasarkan pada upaya pengambilan jaringan kanker atau dengan mematikan sel kanker dan meminimalkan efek pengobatan terhadap sel normal disekitarnya. Saat ini pengambilan kanker yang paling utama adalah operasi, radioterapi dan kemoterapi, namun ketiga jenis pengobatan tersebut memiliki kekurangan. Operasi akan berhasil pada beberapa tumor yang telah berkembang, tetapi sulit mengobati pada stadium awal metastasis. Pengobatan dengan radiasi mampu membunuh tumor lokal namun radiasi juga akan membunuh sel normal disekitarnya. Sebagian besar obat kemoterapi seperti taxol, 5-fluorourasil (5-FU) dan adriamisin memiliki target pada pembelahan sel (Boyer, 2005), tetapi kemoterapi ini bisa menyebabkan diare dan kerontokan rambut. Agen kemoterapi ini juga tidak efektif untuk sel yang mengalami mutasi p53. Sehingga perlu dikembangkan agen-agen baru untuk pengobatan kanker yang aman (Mathivadani, 2007; Hantz, H.L ,2005; Lindley C , 2005; Lin-Hao , 2003; Hondermarck Hubert, 2003; Parton, 2001; Vladusic (2000)).

Dewasa ini penggunaan bahan alami sebagai obat untuk mengendalikan kanker banyak dikembangkan, karena bahan alami dianggap tidak memiliki efek samping yang membahayakan apabila dibandingkan dengan kemoterapi yang memiliki toksisitas dan efek samping tinggi. Penelitian dan penemuan senyawa alami sebagai obat antikanker telah banyak dilakukan. Demikian pula penelitian tentang penggunaan senyawa bahan alami sebagai terapi kombinasi yang bersifat kemopreventif juga telah berkembang, namun

sampai saat ini belum ditemukan obat yang benar-benar efektif terhadap kanker (Mathivadani, 2007; Hantz, H.L, 2005).

Famili tumbuhan Zingiberaceae tersebar di Asia Selatan dan Asia Tenggara, terdiri dari 47 genus dan sekitar 1000 spesies. Beberapa spesies tumbuhan dari famili ini banyak digunakan dan terdapat dalam semua ramuan obat tradisional, seperti jamu. Tumbuhan ini selain sebagai rempah-rempah juga digunakan untuk mengobati berbagai macam penyakit, seperti demam, diare, menstruasi tidak teratur, tuberkulosis, radang gusi, penyakit kulit, radang hati, tumor, malaria, maupun gatal-gatal (Dalimarta, 2003).

Kunci pepet (*Kaempferia rotunda*), termasuk famili tumbuhan Zingiberaceae yang banyak digunakan sebagai rempah-rempah. Beberapa khasiat yang dilaporkan antara lain sebagai peluruh dahak, obat cacing, dan penambah nafsu makan. Pengujian secara *in vitro* menunjukkan kunci pepet dapat meningkatkan jumlah limfosit, antibodi spesifik, dan dapat membunuh sel kanker (Dalimarta, 2003).

Penelitian yang dilakukan oleh Leardkamolkarn V. (2009) terhadap ekstrak metanol *Kaempferia parviflora* menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap human cholangiocarcinoma (HuCCA-1 and RMCCA-1). Dari hasil penelitian tersebut juga berhasil diisolasi senyawa 5,7,4-trimethoxyflavone yang juga menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi (LC_{50} 46,1 μ g/ml). Demikian juga penelitian yang dilakukan oleh Yanti (2009) menunjukkan beberapa senyawa seperti panduratin A yang ditemukan pada *Kaempferia pandurata* menunjukkan aktivitas sitotoksik tinggi terhadap sel kanker human epidermoid KB.

Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Sri Atun (2011) menunjukkan bahwa ekstrak metanol dari temu giring, temu ireng, kunci pepet dan laos menunjukkan aktivitas antimutagenik. Prosentase aktivitas antimutagenik ekstrak metanol berturut-turut dari yang paling tinggi pada dosis 300 mg/kg bb adalah temu giring, kunci pepet, temu ireng, dan laos, dengan aktivitas adalah 95,6; 81,9; 80; dan 50 %. Isolasi dan identifikasi struktur senyawa yang ditemukan dalam ekstrak metanol kunci pepet diperoleh tiga jenis senyawa flavanon, yaitu 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon, 5- hidroksi-7-metoksi-flavanon, dan 4', 7-dihidroksi-flavanon. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan adanya beberapa senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker juga menunjukkan sifat antimutagenik (Adam, 2004). Oleh karena itu penelitian tersebut perlu dilanjutkan untuk menguji aktivitas sitotoksik ekstrak *Kaempferia rotunda* (kunci pepet) maupun senyawa murni yang ditemukan terhadap beberapa *cell lines* kanker.

B. Tujuan Penelitian

Target khusus yang ingin dicapai adalah untuk mendapatkan senyawa murni, struktur molekul berdasarkan data spektroskopi yang lengkap, data aktivitas sitotoksik terhadap beberapa *cell line* kanker, seperti sel *Breast carcinoma (MCF-7)*; *Cervical carcinoma (Ca Ski)*; *T47-D*; *HCT116*; *A549*; *WiDr*; *Hela S3*, atau yang lainnya yang tersedia di Laboratorium Faculty of Science, University of Malaya dan laboratorium Parasitologi, Kedokteran UGM. Dalam penelitian ini juga diungkapkan mekanisme aktivitas antiproliferasi, apoptosis, dan siklus penghambatan terhadap *cell lines* kanker dari beberapa senyawa yang ditemukan.

C. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

- a. Mendapatkan data keanekaragaman struktur senyawa bioaktif dari tumbuhan dari rimpang tumbuhan *Kaempferia rotunda* (kunci pepet) yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap *cell lines* kanker.
- b. Mendapatkan informasi dalam mengembangkan obat berdasarkan *lead compound* yang telah ditemukan dalam dari rimpang tumbuhan *Kaempferia rotunda* (kunci pepet).
- c. Memanfaatkan senyawa bioaktif sebagai standar kualitas pengembangan produk obat herbal terstandar.

Hasil yang diharapkan dalam penelitian ini adalah data keanekaragaman struktur senyawa kimia yang dapat diisolasi dari rimpang tumbuhan *Kaempferia rotunda* (kunci pepet), data aktivitas sitotoksik terhadap beberapa *cell line* kanker, seperti sel *Breast carcinoma (MCF-7)*; *Cervical carcinoma (Ca Ski)*; *T47-D*; *HCT116*; *A549*; *WiDr*; *Hela S3* atau yang lainnya, mekanisme aktivitas antiproliferasi, apoptosis, dan siklus penghambatan terhadap sel kanker dari beberapa senyawa yang ditemukan. Dari penelitian ini juga akan diuji aktivitas sitotoksitasnya terhadap sel Vero (sel normal), sehingga dapat diketahui selektivitasnya apabila digunakan sebagai obat kanker.

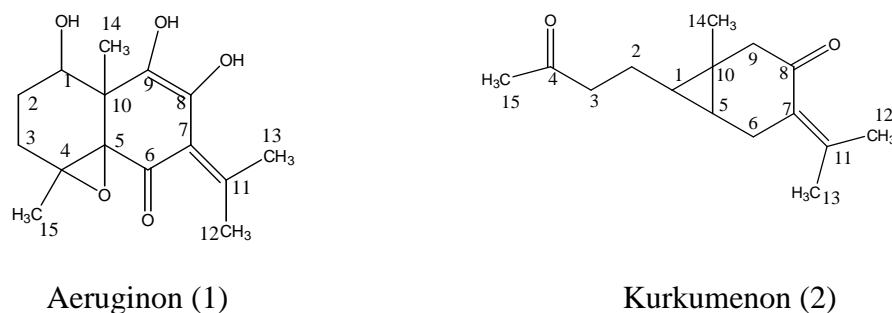
Kerjasama penelitian antara lab kimia organik bahan alam dan farmasi Universitas Negeri Yogyakarta dengan lab Faculty of Science, University of Malaya sudah lama dilakukan antara Prof. Dr. Nurfina Az (UNY) dengan Prof Dr. Sri Nurestri (UM) untuk menguji ekstrak berbagai tumbuhan herbal seperti kunyit putih terhadap berbagai jenis sel lines kanker yang tersedia di laboratorium Faculty of Science, University of Malaya, dari penelitian yang dilakukan telah dipublikasikan dalam prosiding seminar Internasional

maupun jurnal Internasional. Beberapa penelitian yang telah dipublikasikan bersama-sama antara lain :

1. Cytotoxic Studies of Some Zingiberacea Species". Program and Abstracts of the Twelfth Symposium on Medicinal Plants, Spices and Other Natural Products (ASOMPS XII) 13-18 November 2006, Padang, West Sumatera, Indonesia
2. Phytochemical study on some Curcuma from Indonesia (Prosiding seminar Internasional ISNPC 27/ICOB Brisbane Australia 10-15 Juli 2011)
3. Phytochemical study on some Zingiberaceae species from Indonesia and the evaluation of its function as antiviral (Prosiding seminar Internasional ISNPC 27/ICOB Brisbane Australia 10-15 Juli 2011).

BAB II STUDI PUSTAKA

Penelitian tentang eksplorasi senyawa bioaktif antikanker dari famili Zingiberaceae, seperti dari rimpang tumbuhan temu giring (*Curcuma heyneana*) dan temu ireng (*C. aeruginosa*), telah dilakukan sejak tahun 2009 dengan bekerjasama dengan Prof. Sri Nurestri dari University of Malaya, Malaysia. Uji aktivitas terhadap ekstrak maupun fraksi-fraksi dari rimpang temu giring dan temu ireng terhadap *Breast carcinoma* (MCF-7); *Cervical carcinoma* (Ca Ski) menunjukkan aktivitas yang cukup baik (di bawah 100 µg/ml), kecuali ekstrak metanol temu ireng yang menunjukkan harga IC₅₀ di atas 100 µg/ml. Uji aktivitas terhadap sel Hela S3 menunjukkan ekstrak dan fraksi-fraksi dari temu ireng tidak aktif, sedangkan dari temu giring beberapa diantaranya menunjukkan aktivitas yang sedang (IC₅₀) di atas 100 µg/ml, demikian juga aktivitasnya terhadap sel payudara T47-D. *Breast carcinoma* (MCF-7) merupakan sel kanker sejenis dengan kanker payudara T47-D, namun memiliki beberapa perbedaan daya selektivitasnya, demikian juga *Cervical carcinoma* (Ca Ski) memiliki kemiripan dengan sel Hela S3. Hasil isolasi terhadap fraksi kloroform rimpang temu ireng diperoleh dua senyawa sudah dapat ditentukan strukturnya yaitu aeruginon (1) dan kurkumenon (2) yang merupakan senyawa seskuiterpen lakton (Sri Atun, 2010; 2011). Kurkumenon pernah dilaporkan ditemukan dalam *Curcuma zedoria* (Morikawa, 2002). Dua senyawa hasil isolasi dari temu giring terdapa pada gambar 1.



Gambar 1. Senyawa yang telah ditemukan dari rimpang temu ireng

Penelitian terhadap tumbuhan famili Zingiberaceae sangat menarik untuk dilakukan, mengingat banyak spesies lokal seperti temu lawak, maupun kunir mangga yang sangat prospektif untuk dikembangkan sebagai obat herbal. Selain itu tumbuhan

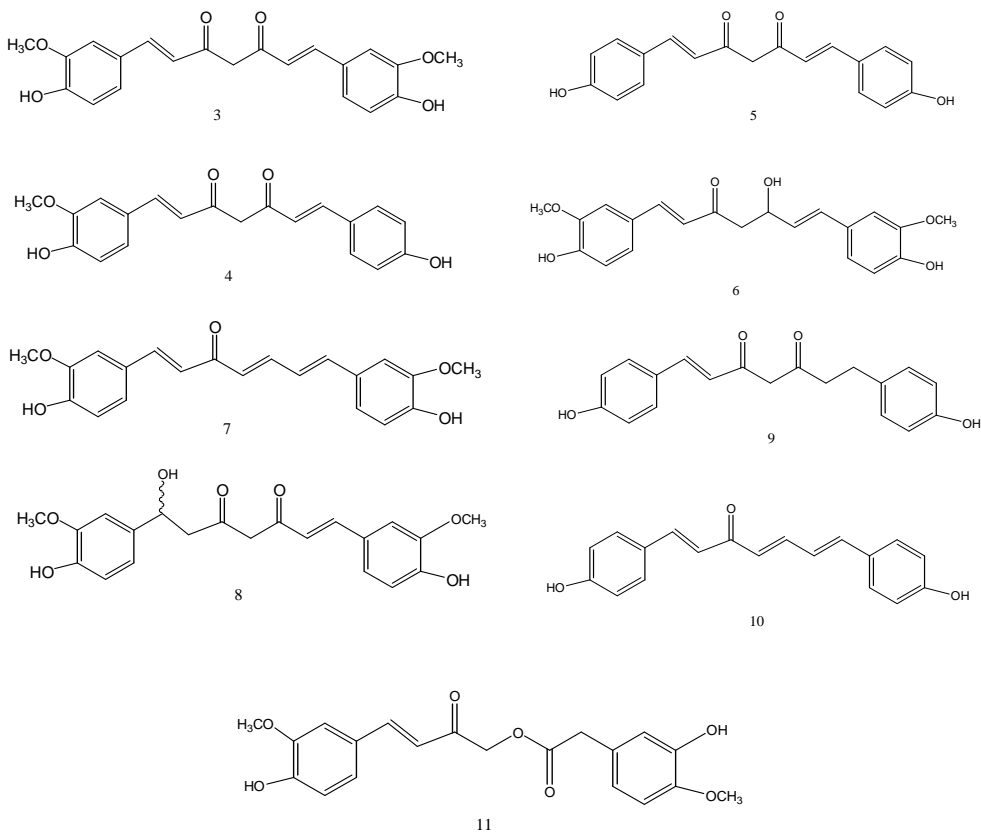
famili Zingiberaceae juga mudah dibudidayakan, sehingga apabila akan dikembangkan menjadi produk obat bahan bakunya mudah diperoleh. Famili Zingiberaceae terdiri dari 47 genus dan sekitar 1000 spesies, tersebar di Asia Selatan dan Asia Tenggara. Tumbuhan ini dilaporkan banyak digunakan dan terdapat dalam ramuan obat tradisional jamu. Selain sebagai rempah-rempah, juga digunakan untuk obat-obatan, seperti untuk pengobatan penyakit kulit, penyakit yang berhubungan dengan saluran pernafasan, sinusitis, asma, peluruh dahak, nyeri perut, sembelit, bengkak, rematik, hepatitis, sakit mata, dan pengobatan wanita sesudah melahirkan (Dalimarta, 2003). Penelitian kandungan senyawa metabolit sekunder tumbuhan famili Zingiberaceae yang banyak dilaporkan adalah dari tumbuhan *C. domestica*; *C. longa*; *C. anthorrhiza*; *C. zedoaria*, *C. hyenana* (temu giring), dan *C. aeruginosa* (temu ireng), sedangkan senyawa kimia dari rimpang tumbuhan genus *Kaempferia* belum banyak dilaporkan karena belum diteliti secara tuntas (Morikawa, 2002; Wu, 2002; Park, 2002; Syamsul A.A, 2007).

Beberapa tumbuhan *Curcuma* yang telah diteliti mengandung senyawa fenol turunan diarilheptanoid dan kurkuminoid dan senyawa seskiterpen. Beberapa senyawa kurkuminoid yang telah ditemukan pada *C. domestica* dan *C. longa* antara lain kurkumin (3), demetoksikurkumin (4), bis(4-hidroksisinamoil)-metan (5), dihidrokurkumin (6), 1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,4,6-heptatrien-3-on(7), 1-hidroksi-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksi-fenil)-6-hepten-3,5-dion (8), 1,7-bis(4-hidroksi-fenil)-1-hepten,3,5 -dion (9), 1,7-bis(4-hidroksifenil)-1,4,6-heptatrien-3-on (10), dan calebin A (11) (Morikawa, 2002; Wu, 2002; Park, 2002). Beberapa senyawa kurkuminoid yang telah ditemukan dari rimpang tumbuhan famili Zingiberaceae terdapat pada gambar 2.

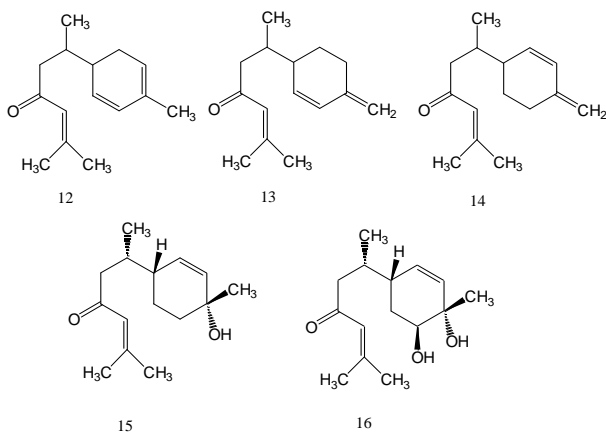
Selain senyawa kurkuminoid, dari *C. domestica* juga ditemukan senyawa seskiterpen keton jenis bisabolen, seperti α -tumeron (12), β -tumeron (13), kurlon (14), 4-hidroksibisabola-2,10-dien-4-on (15), dan bisakuron (16) (Morikawa, 2002; Wu, 2002; Matsuo, 2002). Beberapa senyawa sesquiterpen yang telah dilaporkan tersebut terdapat pada gambar 3.

Penelitian terhadap genus *Kaempferia* belum banyak dilaporkan. Beberapa spesies dari genus *Kaempferia* yang sudah diteliti antara lain *Kaempferia parviflora* dan *Kaempferia pandurata*. Penelitian yang dilakukan oleh Leardkamolkarnn V. (2009) terhadap ekstrak metanol *Kaempferia parviflora* menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap human cholangiocarcinoma (HuCCA-1 and RMCCA-1). Dari hasil penelitian tersebut juga berhasil diisolasi senyawa 5,7,4-trimethoxyflavone yang juga menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi (LC₅₀ 46,1 μ g/ml). Demikian juga penelitian

yang dilakukan oleh Yanti (2009) menunjukkan beberapa senyawa seperti panduratin A yang ditemukan pada *Kaempferia pandurata* menunjukkan aktivitas sitotoksik tinggi terhadap sel kanker human epidermoid KB.

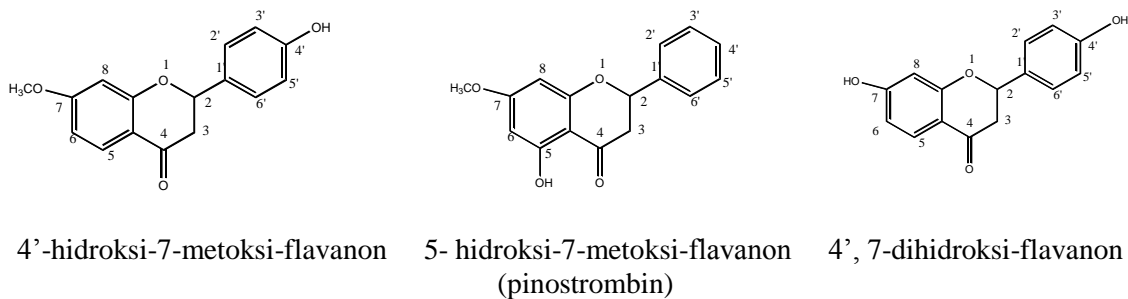


Gambar 2. Beberapa senyawa fenolik yang ditemukan dari rimpang tumbuhan famili Zingiberaceae



Gambar 3. Beberapa senyawa sesquiterpen dari rimpang tumbuhan famili Zingiberaceae

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Sri Atun (2011) menunjukkan bahwa ekstrak metanol kunci pepet, temu giring, temu ireng, dan laos menunjukkan aktivitas antimutagenik. Persentase aktivitas antimutagenik ekstrak metanol berturut-turut dari yang paling tinggi pada dosis 300 mg/kg bb adalah temu giring, kunci pepet, temu ireng, dan laos, dengan aktivitas adalah 95,6; 81,9; 80; dan 50 %. Dari data tersebut menunjukkan bahwa ekstrak metanol mengandung senyawa aktif yang bersifat antimutagenik. Isolasi dan identifikasi struktur senyawa yang ditemukan dalam ekstrak metanol kunci pepet diperoleh tiga jenis senyawa flavanon, yaitu 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon, 5- hidroksi-7-metoksi-flavanon, dan 4', 7-dihidroksi-flavanon (Gambar 4).



Gambar 4. Beberapa senyawa flavanon hasil isolasi ekstrak metanol kunci pepet (*Kaempferia rotunda*)

Diduga dalam ekstrak metanol kunci pepet masih banyak senyawa sejenis yang belum teridentifikasi, sehingga masih perlu dilanjutkan untuk mengeksplorasi senyawa yang lainnya. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan adanya beberapa senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker juga menunjukkan sifat antimutagenik (Adam,2004). Namun sebaliknya, ada juga senyawa yang dapat membunuh sel kanker tetapi pada dosis tinggi bersifat mutagenik atau menyebabkan terjadinya mutasi sel, sebagai contohnya adalah siklofosamid. Oleh karena itu sangat menarik untuk menguji aktivitas sitotoksik ekstrak maupun senyawa hasil isolasi rimpang tumbuhan *Kaempferia rotunda* terhadap beberapa *cell line* kanker.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif, yaitu untuk menguji aktivitas sitotoksik ekstrak maupun senyawa murni dari rimpang tumbuhan *Kaempferia rotunda* (kunci pepet) terhadap *cell line* kanker seperti *Breast carcinoma (MCF-7)*; *Cervical carcinoma (Ca Ski)*; *T47-D*; *HCT 116*; *A549*; *WiDr*; *Hela S3* atau yang lainnya yang tersedia di Laboratorium Faculty of Science, University of Malaya dan laboratorium Parasitologi, Kedokteran UGM serta mengetahui mekanisme molekuler aktivitasnya sebagai antiproliferasi, apoptosis, dan siklus penghambatan terhadap *cell line* kanker tersebut.

B. Subyek dan Obyek Penelitian

Subyek penelitian ini rimpang tumbuhan *Kaempferia rotunda* (kunci pepet). Objek penelitian ini adalah senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas sitotoksik dan mekanisme aktivitas antiproliferasi, apoptosis, dan siklus penghambatan terhadap *cell lines* kanker.

C. Alat dan bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Alat :

- Evaporator Buchi Rotavapor R-114
- Kromatografi cair vakum (kcv) untuk fraksinasi dilakukan dengan silika gel Merck 60 GF₂₅₄,
- Kromatografi gravitasi (kkg) dilakukan dengan silika gel 60 (35–70 mesh)
- Kromatografi kolom tekan (kkt) menggunakan silika gel 60 (230–400 mesh), dan sepadex LH-20
- Kromatografi sentrifugal sistem radial (kromatotron) dilakukan dengan silika gel Merck PF₂₅₄ (0,5; 1; dan 2 mm),
- Analisis kromatografi lapis tipis (klt) menggunakan plat Si-gel Merck 60 F₂₅₄ 0,25 mm.
- Lampu UV pada λ 256 dan 366 nm
- Spektrofotometer IR

- Spektrofotometer UV-VIS
- CO₂ inkubator
- ELISA reader
- Fluorecent plate reader

Bahan :

- Pelarut yang digunakan untuk isolasi dan pemurnian senyawa oligoresveratrol antara lain metanol, aseton, *n*-heksan, etil asetat, metilen klorida, kloroform dengan kualitas teknis dan p.a.
- Sampel rimpang tumbuhan *Kaempferia rotunda* (kunci pepet)
- Pereaksi penampak noda pada analisis kromatografi lapis tipis digunakan larutan 2% serium sulfat (CeSO₄) dalam asam sulfat.
- Pereaksi geser untuk analisis spektrofotometer UV digunakan larutan natrium hidroksida (NaOH) 2 %.
- Sel kanker seperti : *Breast carcinoma (MCF-7)*; *Cervical carcinoma (Ca Ski)*; *T47-D*; *HCT 116*; *A549*; *WiDr*; *Hela S3* atau yang lainnya
- Sel Vero (sel normal)
- Tissue culture flask, 10 cm²
- 96 well microtiter plates
- Bahan yang diperlukan untuk kultur *cell lines* antara lain beberapa reagent seperti larutan pencuci (99% RPMI (Gibco), 1% pensrep, (Gibco); media penyimpanan -70 °C (20% FBS (Gibco), 70% RPMI yang mengandung 1% pensrep dan 1% fungizon, 10% DMSO); Media kultur (89% RPMI, 1% pensrep, 10% FBS); kertas filter nitroselulosa 0,22 µm (Whatman)); bahan pewarna biru tripan (Sigma)); larutan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (Sigma) dilarutkan dalam PBS dengan konsentrasi 5 mg/ml; pelarut formazan (10% SDS dalam 0,01 N asam klorida).
- Reagent uji aktivitas seperti medium RPMI 1640, propidium iodida, andriamicin, cis plantin, 5-fluouracil, mitomicin C, deionized water, MTT cell proliferation kit, bovine serum, actin.
- Nitrogen cair

D. Prosedur Kerja

Prosedur kerja yang akan dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Isolasi dan identifikasi struktur senyawa bioaktif

Isolasi senyawa kimia dari bahan tumbuhan dilakukan dengan cara maserasi secara tuntas dengan pelarut metanol rimpang tumbuhan *Kaempferia rotunda* (kunci pepet). Ekstrak yang diperoleh dipekatkan pada tekanan rendah dan selanjutnya dipartisi berturut-turut menggunakan pelarut *n*-heksan, metilen klorida, dan etil asetat. Pemisahan dan pemurnian senyawa kimia dilakukan dengan teknik kromatografi, seperti kromatografi vakum cair (kvc), kromatografi kolom gravitasi (kkg), kromatografi kolom tekan (kkt), dan kromatografi sentrifugal (kromatotron), serta kristalisasi untuk senyawa-senyawa yang dapat membentuk kristal. Identifikasi dan elusidasi struktur dilakukan menggunakan analisis data spektrum UV-VIS, IR, dan NMR.

2. Uji aktivitas sitotoksisitas serta mekanisme antiproliferasi, apoptosis, dan siklus penghambatan sel kanker

a). Menumbuhkan beberapa *cell lines*: *Breast carcinoma (MCF-7)*; *Cervical carcinoma (Ca Ski)*; *T47-D*; *HCT 116*; *A549*; *WiDr*; *Hela S3* atau yang lainnya dari penyimpanan dalam nitrogen cair

Sel beku dari nitrogen cair dibiarkan pada suhu kamar sampai mencair sebagian, kemudian dimasukkan dalam tabung konikal 50 ml dan ditambah 50 ml media RPMI lalu dikocok. Setelah itu disentrifus 275 g selama 10 menit. Sel kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C dengan aliran CO₂ 5%. Perkembangan sel diamati tiap hari dan jika media mulai menguning diganti dengan media baru, jumlah sel dihitung dengan *Nebauer Hemocytometer* dengan pewarna biru tripan.

b). Uji sitotoksisitas dilakukan dalam plate 96 sumuran.

Sampel dilarutkan dalam buffer fosfat atau pelarut yang sesuai. Setiap sumuran dimasukkan 100 µl media RPMI yang mengandung penstrep 4 %, 100 µl sampel pada variasi konsentrasi 25 µg sampai 0,05 µg, kemudian ditambah 100 µl control sel dalam media kultur dengan jumlah sel 5 x 10⁴ setiap sumuran. Sebagai blanko digunakan dilusi seri buffer kalium fosfat 5 mM pH 7,2 sebanyak 100 µl pada sumuran pertama, dan setiap sampel dilakukan dua ulangan. Pada akhir inkubasi ditambahkan MTT (50 µg/ml) sebanyak 10 µl pada masing-masing sumuran, kemudian diinkubasi kembali selama 4 jam. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang memberikan warna ungu. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 µl SDS 10% dalam HCl 0.01 N, kemudian diinkubasi pada suhu kamar semalam kemudian dibaca dengan *Benchmark microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Viabilitas sel dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ sel hidup} = (\text{abs P} - \text{abs M}) / (\text{abs K} - \text{abs M}) \times 100\%$$

abs P = absorbansi sel dengan perlakuan

abs M = absorbansi media

abs K = absorbansi kontrol sel

Nilai IC₅₀ ditentukan dengan analisis probit pada program SPSS 11.5.

c). Uji aktivitas antiproliferasi

Aktivitas antiproliferasi dilakukan dengan menggunakan MTT cell proliferation Kit, secara kolorimetri berdasarkan terbentuknya perubahan warna sel kontrol dan perlakuan. Secara kuantitatif perubahan produk yang dihasilkan diukur menggunakan spektrofotometer microtiter plate reader pada 570 nm. Prosentase pertumbuhan dihitung berdasarkan hasil perbandingan dengan sel control yang hanya ditambahkan DMSO tanpa sampel.

d). Uji apoptosis

Pengamatan apoptosis dilakukan dengan menggunakan analisis kualitatif menggunakan Double stain *Apoptotic detection Kit* (Hoechst 33342/PI) dan pengamatan kuantitatif menggunakan *flow cytometer*.

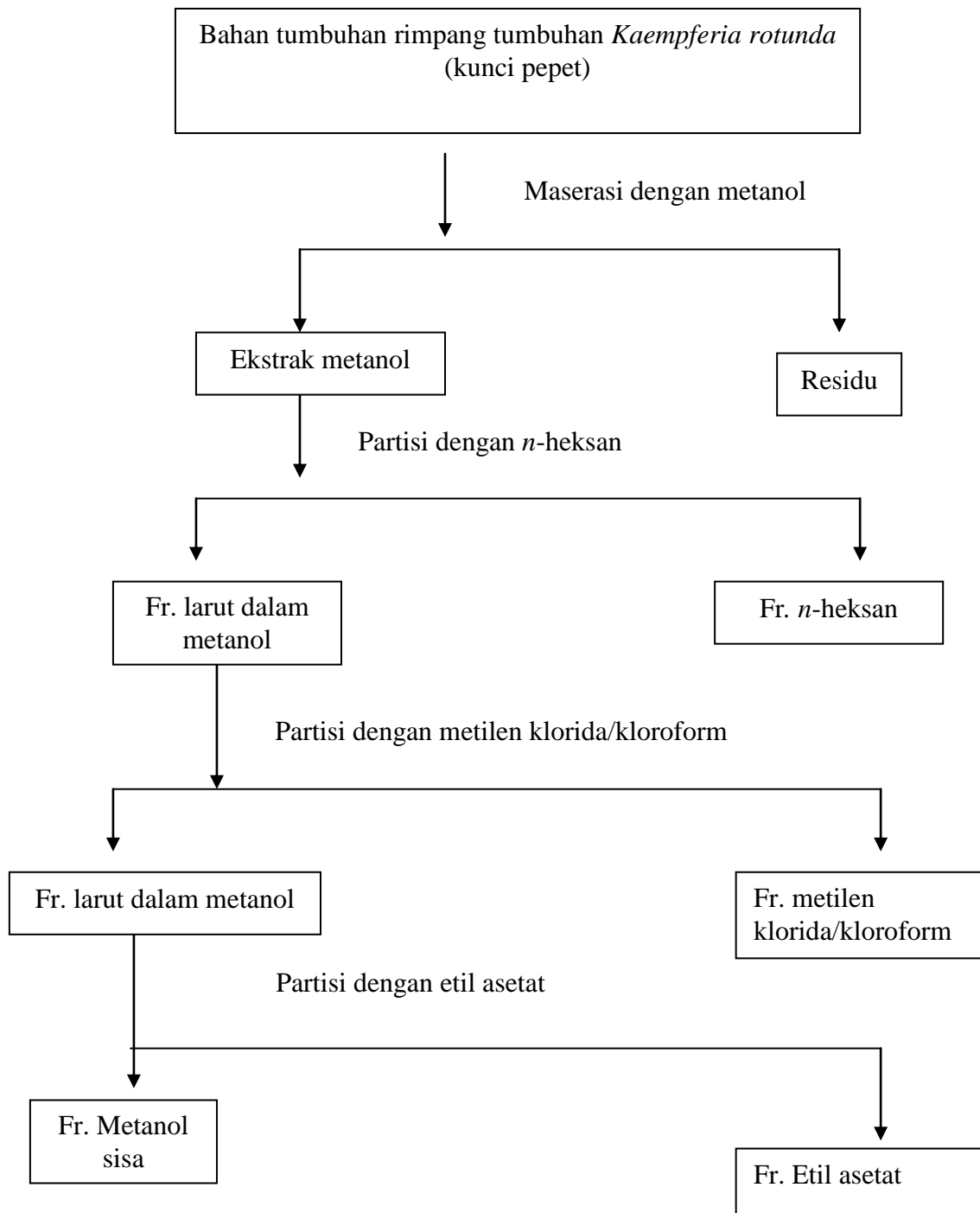
e). Uji aktivitas siklus penghambatan sel

Uji aktivitas siklus penghambatan sel dilakukan dengan uji *doubling time*. Perbedaan waktu penggandaan sel (*doubling time*) dihitung dari *slope* pada kurva dari persamaan grafik log jumlah sel vs waktu pengamatan.

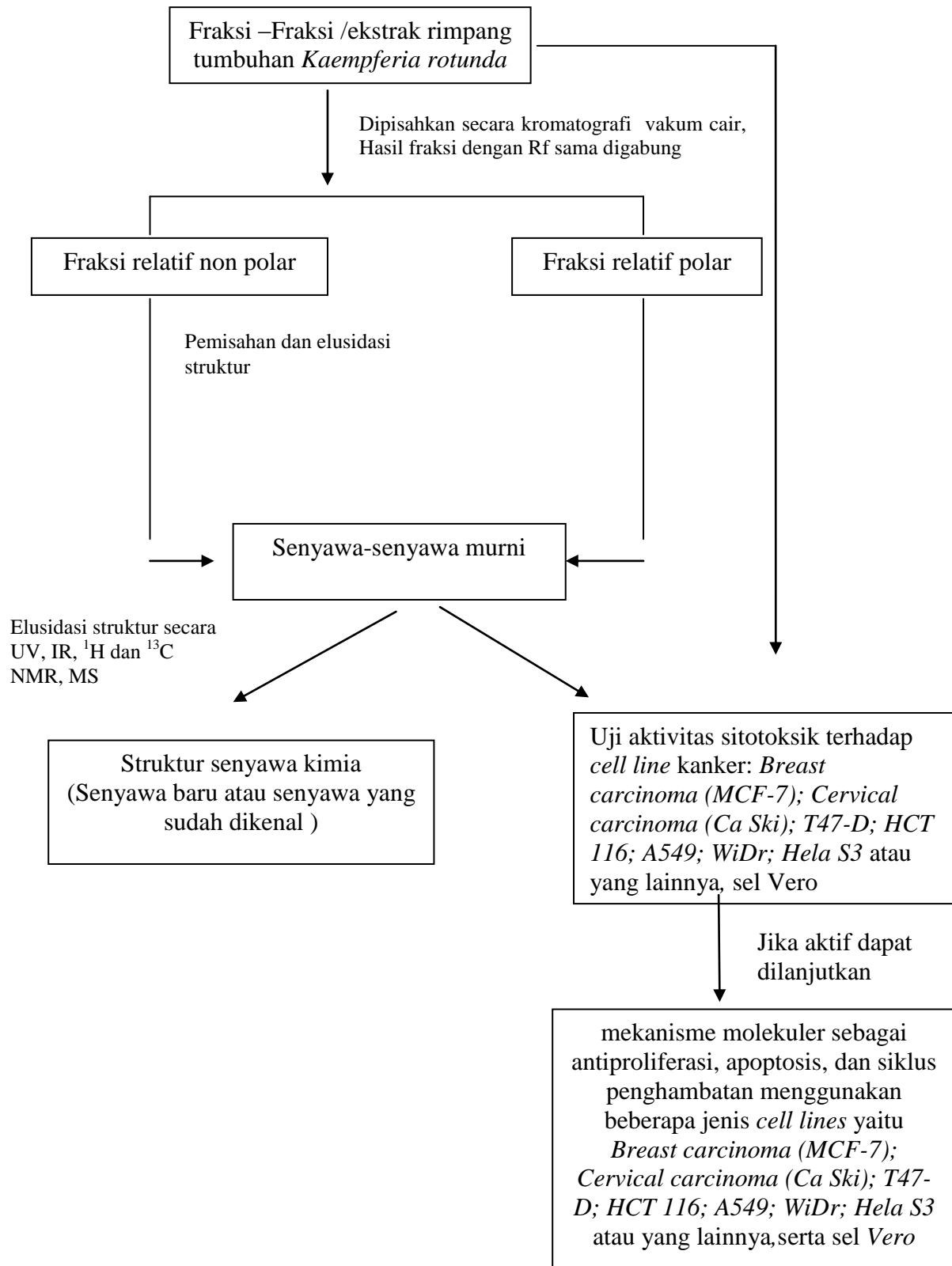
Tahap penelitian yang akan dilakukan serta hasil yang dijanjikan seperti tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Tahapan Penelitian dan Hasil yang ditargetkan

Tahap	Metode/Kegiatan	Lokasi	Penanggungjawab	Hasil/Target
I (Bulan ke 1-4)	<ul style="list-style-type: none"> Isolasi , dan pemurnian , senyawa bioaktif ekstrak metanol rimpang tumbuhan <i>Kaempferia rotunda</i> (kunci pepet) Identifikasi Struktur 	Lab Kimia UNY	Prof. Dr. Sri Atun Prof. Dr. Nurfina Az	<ul style="list-style-type: none"> Beberapa senyawa bioaktif dalam jumlah cukup Struktur Senyawa Bioaktif
	<ul style="list-style-type: none"> Uji aktivitas sitotoksik dari ekstrak maupun senyawa murni terhadap sel lines kanker : <i>Breast carcinoma (MCF-7); Cervical carcinoma (Ca Ski); T47-D; HCT 116; A549; WiDr; Hela S3</i> atau yang lainnya; sel Vero Pengukuran/ Analisis Struktur senyawa secara spektroskopi NMR, MS 	Lab. Biosain Univ. Of Malaya	Prof. Dr. Sri Nurestri	<ul style="list-style-type: none"> Data sitoksitas dari ekstrak dan senyawa murni terhadap sel lines kanker : <i>Breast carcinoma (MCF-7); Cervical carcinoma (Ca Ski); T47-D; HCT 116; A549; WiDr; Hela S3</i> atau yang lainnya Data spektroskopi
	<ul style="list-style-type: none"> Analisis data Pembuatan laporan 	Lab Kimia UNY	Prof. Dr. Sri Atun	Hasil analisis Laporan
II (Bulan ke 5-7)	<ul style="list-style-type: none"> Uji aktivitas antiproliferasi, apoptosis, dan siklus penghambatan terhadap sel lines <i>Breast carcinoma (MCF-7); Cervical carcinoma (Ca Ski); T47-D; HCT 116; A549; WiDr; Hela S3</i> atau yang lainnya Pengukuran/ Analisis Struktur senyawa secara spektroskopi NMR, MS 	Lab. Biosain Univ. Of Malaya Lab. Kimia UNY	Prof. Dr. Sri Nurestri Prof. Dr. Sri Atun	<ul style="list-style-type: none"> Data Mekanisme Molekuler Data Spektroskopi Hasil analisis Laporan Artikel jurnal

Bagan Kerja

Gambar 5. Pembuatan ekstrak kunci pepet



Gambar 6. Isolasi dan uji aktivitas sitotoksik

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Ekstraksi dan fraksinasi sampel tumbuhan

Bahan tumbuhan yang berupa serbuk kering rimpang kunci pepet sebanyak 3 Kg, dimasukkan ke dalam jerigen plastik ukuran 20 L, dan ditambahkan pelarut metanol sebanyak 10 L, selanjutnya direndam selama 24 jam. Ekstrak selanjutnya disaring dan dikumpulkan filtratnya. Residu selanjutnya di maserasi kembali menggunakan metanol, dan diulang seperti prosedur sebelumnya sebanyak 2 kali. Filtrat yang diperoleh dari masing-masing sampel tumbuhan selanjutnya dipekatkan menggunakan evaporator vakum, sehingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 230 gram. Ekstrak kental dari masing-masing tumbuhan selanjutnya di partisi berturut-turut menggunakan pelarut n-heksan, kloroform, dan etil asetat. Ekstrak hasil partisi selanjutnya dipekatkan dengan evaporator vakum, sehingga diperoleh ekstrak kental, masing-masing sebanyak 43,2; 135,8; dan 31,9 gram.

2. Uji aktivitas sitotoksik terhadap beberapa sel kanker dari masing-masing ekstrak

Hasil uji aktivitas sitotoksik terhadap beberapa sel kanker dari masing-masing ekstrak kunci pepet dilakukan di laboratorium Biosain University of Malaya dan laboratorium Parasitologi Kedokteran UGM dengan hasil seperti dalam Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas sitotoksik masing-masing ekstrak

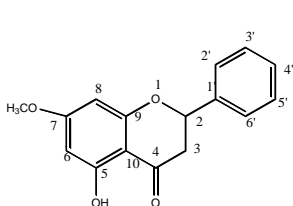
No	Ekstrak	Dilakukan di Lab. Biosain UM		Dilakukan di Lab. Parasitologi Kedokteran UGM			
		IC ₅₀ (µg/ml) terhadap sel kanker		IC ₅₀ (µg/ml) terhadap sel kanker			
		MCF-7	Ca Ski	HeLa	T47D	WiDr	Vero
1	MeOH	29,43 ± 0,97	31,62 ± 1,02	109, 130	71,600	163,628	161,054
2	Hexane	39,22 ± 0,63	36,13 ± 2,34	203,065	175,872	61,8858	Tidak aktif
3	EtOAc	38,80 ± 0,40	42,13 ± 1,02	-	-	-	-
4	CHCl ₃	34,03 ± 0,59	24,27 ± 0,47	62,358	41,720	65,801	88,093

Keterangan :

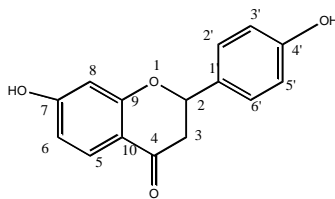
MCF-7 : sel kanker payudara; Ca Ski : sel kanker rahim; HeLa : sel kanker rahim; T47D : sel kanker payudara; WiDr : Sel kanker kolon; Vero : sel normal

3. Isolasi, pemurnian, dan identifikasi senyawa dalam ekstrak kunci pepet

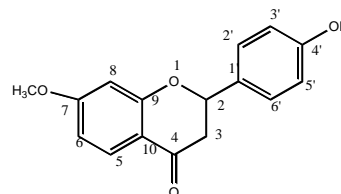
Isolasi terhadap senyawa kimia dalam kunci pepet telah dilakukan dalam penelitian sebelumnya dan diperbanyak dalam penelitian ini sehingga cukup untuk penelitian lebih lanjut. Dari ekstrak etil asetat diperoleh tiga senyawa yaitu 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon, 5-hidroksi-7-metoksi-flavanon, dan 4', 7-dihidroksiflavanon. Sedangkan dalam ekstrak kloroform ditemukan dua senyawa yaitu 5-hidroksi-7-metoksi-flavanon dan 4', 7-dihidroksi-flavanon.



5- hidroksi-7-metoksi-flavanon
(Pinostrombin)



4', 7-dihidroksi-flavanon



4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon

4. Hasil Uji aktivitas sitotoksik dari senyawa murni

Tabel 3. Hasil uji sitotoksik senyawa hasil isolasi terhadap beberapa sel kanker

No	Senyawa Uji	Dilakukan di Lab. Biosain UM				Dilakukan di Lab. Parasitologi Kedokteran UGM				
		IC ₅₀ (µg/ml) terhadap sel kanker				IC ₅₀ (µg/ml) terhadap sel kanker				
		MCF-7	HCT 116	Ca ski	A549	HeLa	T47D	MCF-7	WiDr	Vero
1	5-hidroksi-7-metoksi-flavanon	100	22,3 ± 2,5	>100	>100	Tidak aktif	Tidak aktif	Tidak aktif	Tidak aktif	Tidak aktif
2	4', 7-dihidroksi-flavanon	97,1± 3,9	19,7 ± 0,9	22,4 ± 2,0	76,7 ± 11,3	138,62	122,70	140,51	76,83	Tidak aktif
3	4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon	-	-	-	-	Tidak aktif	Tidak aktif	Tidak aktif	Tidak aktif	Tidak aktif

Keterangan :

A549 : Human lung adenocarcinoma epithelial cell line;

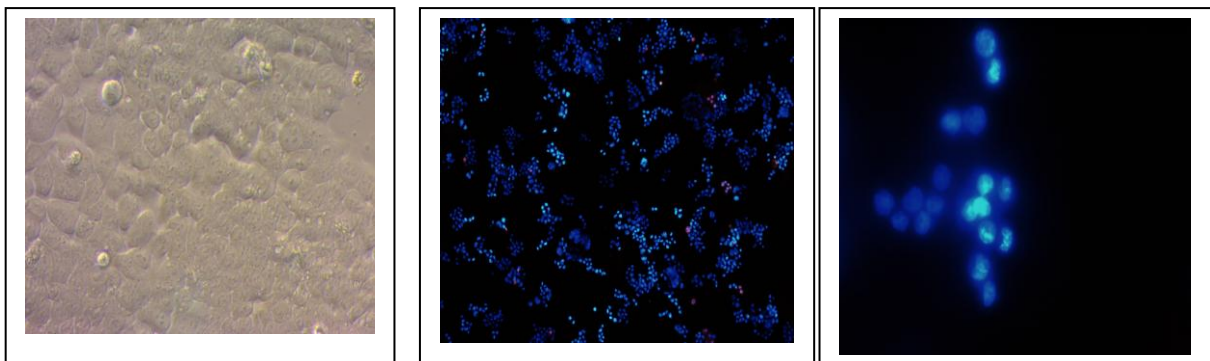
WiDr : Human colon adenocarcinoma Cell Line

HCT 116 : sel kanker kolon

5. Hasil pengamatan apoptosis

a. Pengamatan apoptosis secara kualitatif

Pengamatan apoptosis pada perlakuan sel kanker HCT 116 dilakukan menggunakan *double Stain Apoptosis detection Kit (Hoeschst 33342/PI)*. Pengamatan dilakukan setelah perlakuan inkubasi dengan senyawa flavanon selama 48 jam. Sel kanker HCT 116 diinkubasi dengan senyawa flavanon pada konsentrasi sesuai dengan IC_{50} dan dua kali IC_{50} . Dengan menggunakan Kit tersebut dapat dideteksi sel-sel yang normal, apoptosis, dan sel mati. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop *phase kontras* dan mikroskop *fluorecent*. Dengan menggunakan mikroskop *fluorecent* dapat diketahui adanya sel yang normal berwarna biru gelap, sel yang mengalami *erlay* apoptosis akan berwarna biru cerah, sedangkan sel yang mengalami *late* apoptosis berwarna merah. Sedangkan dengan menggunakan mikroskop *phase kontras* hanya dapat membedakan sel yang masih hidup dan mati. Sel yang hidup bentuk masih utuh, sedangkan yang mati kelihatan pecah, dan mengapung. Pengamatan dengan mikroskop *phase kontras* dilakukan sebelum penambahan *double Stain Apoptosis detection Kit (Hoeschst 33342/PI)* (Gambar 7-9).

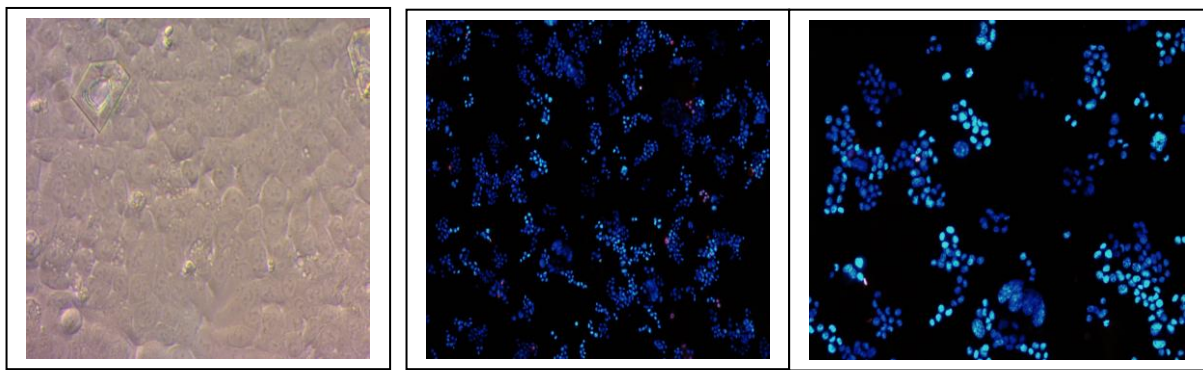


A

B

C

Gambar 7. Pengamatan Sel kanker HCT 116 kontrol (tanpa perlakuan) setelah 48 jam di bawah mikroskop face kontras (A); Pengamatan dengan mikroskop *fluorecent* (perbesaran 40x) (B) dan perbesaran 100x (C)

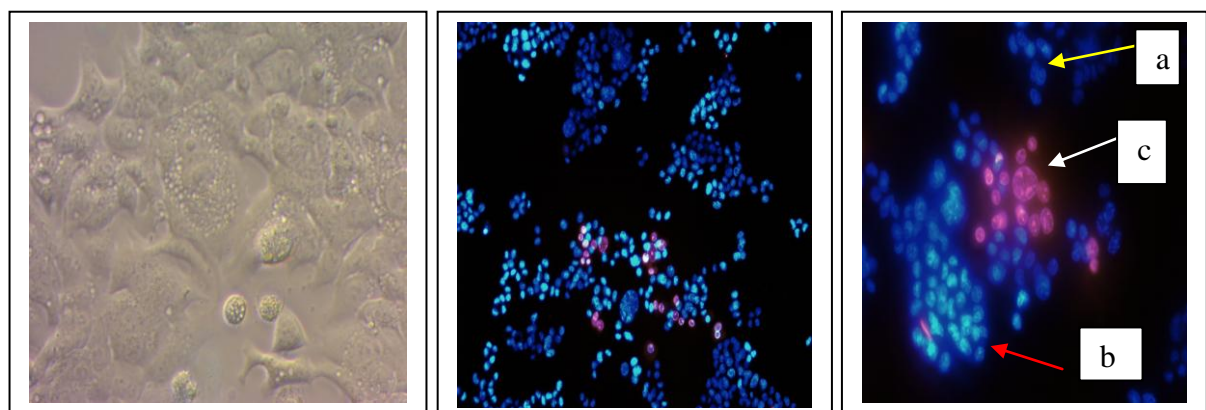


A

B

C

Gambar 8. Pengamatan Sel kanker HCT 116 dengan penambahan pinostrombin 50 $\mu\text{g/ml}$ setelah 48 jam di bawah mikroskop *phase kontras* (A) dan Pengamatan dengan mikroskop fluorecent (perbesaran 40x) (B) dan perbesaran 100x (C)



A

B

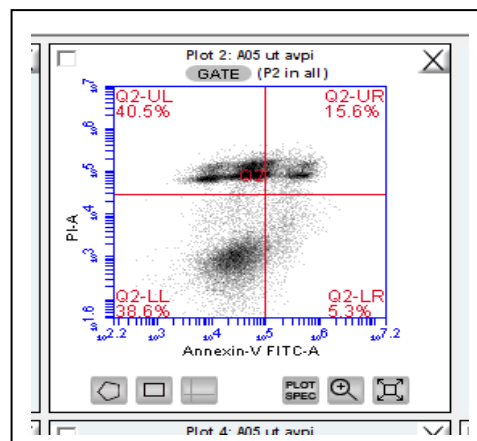
C

Gambar 9. Pengamatan Sel kanker HCT 116 dengan penambahan 4', 7-dihidroksi-flavanon 40 $\mu\text{g/ml}$ setelah 48 jam di bawah mikroskop *face kontras* (A) dan Pengamatan dengan mikroskop fluorecent (perbesaran 50x) (B) dan perbesaran 100x (C) (a=sel normal; b= *erlay apoptotic*; c= *late apoptotic*)

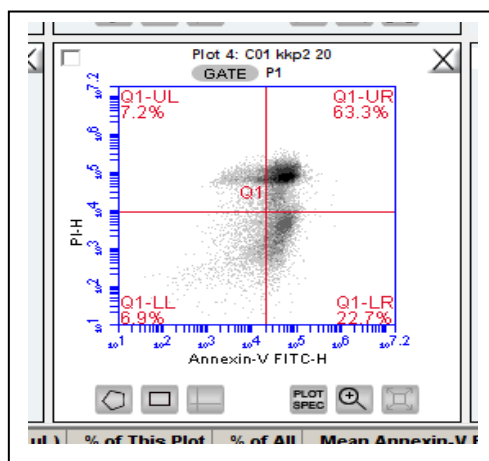
b. Pengamatan apoptosis secara kuantitatif

Pengamatan apoptosis secara kuantitatif menggunakan metode *flow cytometry*. Dalam metode ini dapat dianalisis secara kuantitatif jumlah sel kanker yang masih hidup, jumlah sel kanker mengalami *erlay apoptosis*, serta sel kanker yang mengalami *late apoptosis* atau nekrosis. Hasil pengamatan apoptosis menggunakan metode *flow cytometry* dilakukan menggunakan metode *apoptosis detection Kit staining protocol* (Cat No. 556570). Sel kanker HCT 116 diinkubasi selama 72 jam menggunakan senyawa

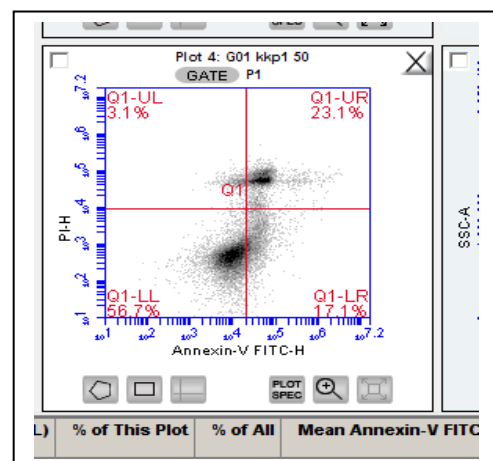
flavanoid konsentrasi sesuai dengan IC_{50} a dua kali IC_{50} . Data yang diperoleh dari metode ini seperti tercantum dalam Gambar 10. Namun data yang diperoleh dalam penelitian ini belum lengkap dan kontrol selnya tidak begitu bagus. Pengamatan terjadinya apoptosis sangat dipengaruhi oleh waktu inkubasi dan konsentrasi sampel, sehingga perlu divariansi waktu inkubasi dan konsentrasinya. Pengamatan data *flow cytometer* dapat diketahui dari jumlah sel yang terdapat pada masing-masing quadrant. Quadran satu (Q-LL) (FITC-/PI-) menunjukkan sel normal, quadran ke dua (Q-LR) (FITC-/PI+), menunjukkan sel debris (rusak) akibat faktor mekanik proses pengerjaan, quadran ke tiga (Q-UR) (FITC+/PI+), menunjukkan sel yang mengalami *late* apoptosis, quadran ke empat (Q-UL) (FITC+ /PI-), menunjukkan sel yang mengalami *erlay* apoptosis.



A



B



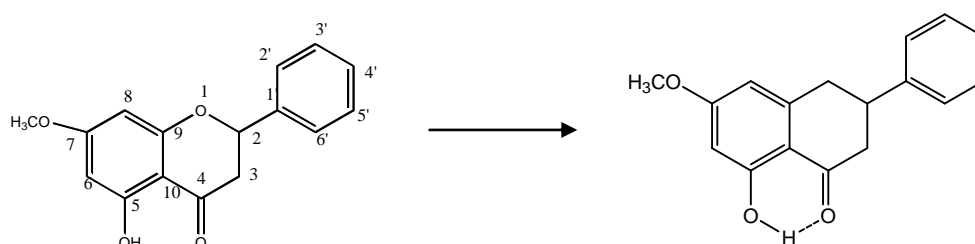
C

Gambar 10. Data *flow cytometry* sel kanker HCT 116 kontrol (A); setelah perlakuan pinostrombin 50 μ g/ml (B); dan setelah perlakuan perlakuan 4', 7-dihidroksi- flavanon 20 μ g/ml (C) pada inkubasi selama 72 jam

B. Pembahasan

Uji sitotoksik masing-masing ekstrak terhadap beberapa sel kanker menunjukkan bahwa ekstrak kloroform memiliki IC_{50} sebesar 24,27 $\mu\text{g/ml}$ terhadap sel kanker Ca-ski, dan juga terhadap sel kanker yang lainnya menunjukkan harga IC_{50} yang relatif rendah dibanding yang lainnya. Hasil isolasi dan identifikasi struktur diperoleh dua senyawa dalam ekstrak kloroform, yaitu 5-hidroksi-7-metoksiflavanon dan 4', 7-dihidroksi-flavanon.

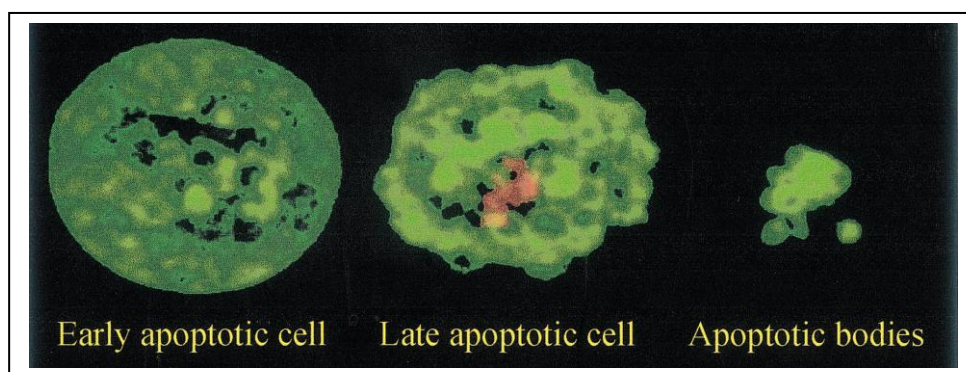
Uji sitotoksik terhadap dua senyawa 5-hidroksi-7-metoksiflavanon dan 4', 7-dihidroksi-flavanon terhadap sel kanker MCF-7; HCT 116; Ca ski; dan A549 menunjukkan bahwa senyawa 4',7-dihidroksiflavanon memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi. Ditinjau dari struktur molekulnya dapat diketahui bahwa adanya gugus hidroksil pada posisi 4' dapat meningkatkan aktivitas sitotoksiknya. Senyawa 5- hidroksi-7-metoksi-flavanon atau pinostrombin tidak memiliki gugus hidroksil pada posisi 4', namun memiliki gugus hidroksil pada posisi 5. Gugus hidroksil pada posisi 5 tersebut tidak bebas, oleh karena dapat membentuk ikatan hidrogen dengan gugus karbonil, seperti ditunjukkan dalam Gambar 11. Pinostrombin juga memiliki kelarutan yang relatif lebih kecil, hal ini nampak pada pengamatan menggunakan mikroskop *phace contras* menunjukkan adanya butiran kristal dari senyawa ini (Gambar 8 A). Hasil penelitian Hui wang (2012) juga menunjukkan bahwa adanya 4-hidroksi fenil bersifat sebagai inhibitor non kompetitif terhadap transportasi glukosa sehingga mengurangi energi yang dibutuhkan sel, dan menyebabkan terjadinya apoptosis.



Gambar 11. Terbentuknya ikatan hidrogen pada pinostrombin

Mekanisme molekuler terjadinya apoptosis karena pengaruh senyawa flavanon selanjutnya diamati secara kualitatif dan kuantitatif. Pengamatan apoptosis secara kualitatif pada perlakuan sel kanker HCT 116 dilakukan menggunakan *double Stain Apoptosis*

detection Kit (Hoeschst 33342/PI). Kit tersebut berisi pewarna yang dapat berikatan dengan DNA. Hoeschst 33342 merupakan pewarna yang berpendar biru ketika berikatan dengan DNA pada sel normal dan akan berpendar biru terang jika berikatan dengan benang-benang kromatin pada sel yang mulai mengalami apoptosis (*erlay apoptotic*). Sedangkan PI (Propidium Iodida) merupakan pewarna merah yang akan menembus masuk ke dalam sel dan berikatan dengan DNA pada sel mati atau *late apoptotic*. Perbedaan *erlay apoptotic*, *late apoptotic*, serta sel mati dapat dilihat pada Gambar 12 berikut.



Gambar 12. Perbedaan *erlay apoptotic*, *late apoptotic*, serta sel mati

Pengamatan secara kualitatif terjadinya apoptosis menunjukkan bahwa 4'-7-dihidroksi-flavanon relatif lebih reaktif mempercepat terjadinya *late apoptotic* sel kanker HCT 116, yaitu dengan pengamatan mikroskop fluorecent warna biru terang dan warna merah jauh lebih banyak dibanding kontrol maupun perlakuan inkubasi dengan pinostrombin. Data ini juga sesuai dengan pengamatan apoptosis secara kuantitatif perlakuan inkubasi senyawa 4'-7-dihidroksiflavanon 20 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan sel yang mengalami *late apoptotic* (quadran ke tiga) pada juga relatif lebih banyak (63,3%), dibanding kontrol (15,5%), dan pinostrombin 50 $\mu\text{g/ml}$ (23,1%).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Beberapa ekstrak rimpang kunci pepet menunjukkan aktivitas sitotoksik yang relatif lebih tinggi terhadap beberapa sel kanker yaitu MCF-7, Ca Ski, T47D, HeLa, dan WiDr (aktivitas sitotoksik $<100 \mu\text{g/ml}$). Dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kloroform memiliki aktivitas sitotoksik yang relatif paling tinggi dibanding yang lainnya.
2. Dari ekstrak etil asetat diperoleh tiga senyawa yaitu 4'-hidroksi-7-metoksiflavanon, 5-hidroksi-7-metoksiflavanon, dan 4', 7-dihidroksiflavanon. Sedangkan dalam ekstrak kloroform ditemukan dua senyawa yaitu 5-hidroksi-7-metoksiflavanon dan 4', 7-dihidroksiflavanon.
3. Uji aktivitas senyawa flavanon menunjukkan senyawa 4',7-dihidroksiflavanon menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap sel kanker HCT 116 ($19,7 \pm 0,9 \mu\text{g/ml}$) dan Ca ski ($22,4 \pm 2,0 \mu\text{g/ml}$). Sedangkan hidroksi-7-metoksiflavanon menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap sel kanker HCT 116 ($22,3 \pm 2,5 \mu\text{g/ml}$).
4. Pengamatan secara kualitatif dan kuantitatif terjadinya apoptosis menunjukkan bahwa 4'-7-dihidroksiflavanon relatif lebih reaktif mempercepat terjadinya *late apoptotic* sel kanker HCT 116.

B. Saran

Penelitian perlu dilanjutkan untuk mengetahui *cell cycle progression* maupun ekspresi protein yang dihasilkan dari sel kanker HCT 116 yang terinduksi dengan senyawa flavanon, sehingga mekanisme molekulernya dapat diketahui secara lengkap.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams BK, Ferstl EM, Davis MC, Herold M, Kurtkaya S, Camalier RF, Hollingshead MG, Kaur G, Sausville EA, Rickles FR, (2004). Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents. *Bioorg Med Chem.* 12 (14):3871–3883.
- Anonim (2007), The impact of cancer in Indonesia, *www. Who infobase/report*, 10 Agustus 2007
- Boyer, M.J., and Tannock, I.F., (2005), *The Basic Science of Oncology: Cellular and Molecular Basis of Drug Treatment for Cancer*, Mc Graw Hill Compay, forth edition, New York.
- Bouker, K.B., Skaar, T.C., Hamburger, D.S., Riggins, R.B., Fernandez, D.R., Zwart, A., Wang, A. & Clarke, R., (2005), Tumor suppressor activities of interferon regulatory factor-1 in human breast cancer associated with caspase activation and induction of apoptosis, *Carcinogenesis* 26 1527-1535.
- Dalimarta, S. (2003), *Atlas tumbuhan obat Indonesia*, jilid 2, Trubus Agriwidya
- Hui Wang, Dianjun Wang, Yabin Pu, Dengkui Pan, Weijun Guan and Yuehui Ma, (2012), Phloretin induced apoptosis of human hepatoma cells SMMC-7721 and its correlative biological mechanisms, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 6(9), pp. 648-659
- Hondermark Hubert, (2003), Breast cancer: when proteomics challenges biological complexity. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 2003;2(5):281-91.
- Khattak S., Rehman S. , Shah U.H, Ahmad W. W., and Ahmad M., (2005), Biological effects of indigenouse medicinal plants *Curcuma longa* and *Alpinia galanga*. *Fitoterapia* 76: 254-257.
- Kubatka, P., Ahlersova E., Ahlers I., Bojkova B., Kalicka K., Adamekova E., Markova M., Chamilova, M., and Cermakova, M., (2002), Variability of Mammary Carsinogenesis Induction in Female Sprague-Dawley and Wistar : Han Rats : the Effect of Season and Age, *Physiol. Res.* , 51, 633 - 640.
- Leardkamolkarn V., Tiamyuyen S., Sripanidkulchai B.O., (2009), Pharmacological Activity of *Kaempferia parviflora* against Human Bile Duct Cancer Cell Lines, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 10, 2009 697
- Lindley C, Boehnke Michaud L. Breast Cancer. In: Dipro JT, Talbert RL, Yee G, Matzke G, eds. (2005), *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*: The McGraw-Hill Companies, Inc.; p.2329-2364.
- Lin-Hao L., Li-Jun Wu, Bei Zhou, Zhen-Wu, Shin-ichi T, S. Onodera, F. Uchiumi, T. Ikejima, (2004), Silymarin prevents UV pradiation induced A375-S2 cell apoptosis, *Biol. Pharm. Bull.* 67 27 (7), 1031-1036
- Mathivadani, P., Shanthi, P., and Sachdanandam, P., (2007), Apoptotic Effect of *Semecarpus anacardium* nut Extract on T47D Cancer Cell Line., *Cell.Biol. Int.*, 31, 1198-1206
- Matsuo, T., Toyota, A., Kanamori, H., Nakamura, K., Katsuki, S., Sekita, S., Sakate, M., (2002), Constituens of representative *Curcuma* and estimation of *Curcuma* species in health foods, *Hiroshima-ken Hoken Kakyō Senta Kenkyū Hokoku*, 10, 7-13
CAN 139:36749

- Nurfina, Sri Atun, Retno A, Sri Nurestri, (2011), Phytochemical studies of the some Indonesian plants Zingiberaceae as antiviral Proceeding International seminar on natural products, Brisbane, Australia, 10-15 Juli 2011.
- Park, S.Y., Kim, D.S.H.L., (2002), Discovery of natural products from *Curcuma longa* that protect cell from β -amyloid insult: A drug discovery effort against Alzheimer's disease, *J. Nat.Prod.*, 65(9), 1227-1231.
- Parton, Martina., Dowsett, Mitchel., and Smith, I., (2001), Studies of Apoptosis in Breast Cancer, *BMJ*, 322: 1528-1532
- Schafer., J.M., Lee, E.S., O'Regan, R.M., Yao, K., and Jordan, V.C.,(2000), Rapid Development of Tamoxifen-stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice, *Clin. Cancer Res.*, 6, 4373-4380
- Sri Atun, Nurfina, Retno A (2010), Development of active compounds from temu giring (*Curcuma Heyneana*) and Temu ireng (*Curcuma aeruginosa*) against human cancer cell lines. Laporan Penelitian, FMIPA, UNY
- Sri Atun, Nurfina, Retno A, Sri Nurestri, (2011), Phytochemical study on some *Curcuma* species from Indonesia Proceeding International seminar on natural products, Brisbane, Australia, 10-15 Juli 2011
- Sjamsul A.A; Hakim, E.H, Makmur L., Syah Y.M., Juliawaty L.D., Mujahidin D., (2007), Ilmu Kimia dan Kegunaan Tumbuh-tumbuhan obat Indonesia, Jilid I, Penerbit ITB.
- Vladusic E. A., Hornby A. E., Guerra-Vladusic F. K., Lakins J., and Lupu R., (2000), Expression and regulation of estrogen receptor β in human breast tumors and cell lines. *Oncol. Rep.*, 7: 157-167
- Yanti, Lee M, Kim D, and Hwang J-K. (2009), Inhibitory Effect of Panduratin A on c-Jun N-Terminal Kinase and Activator Protein-1 Signaling Involved in *Porphyromonas gingivalis* Supernatant-Stimulated Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Human Oral Epidermoid Cells, *Biol. Pharm. Bull.* 32(10) 1770—1775
- Wu, Y., Chen, Y., Xu,J., and Lu L.(2002). Anticancer activities of curcumin on human Burkitt's lymphoma, *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 24(4), 348-352.

LAMPIRAN

ARTIKEL PENELITIAN KERJASAMA INTERNASIONAL**POTENSI RIMPANG TUMBUHAN KUNCI PEPET (*KAEMPFERIA ROTUNDA*)
SEBAGAI ANTIKANKER**Nurfina Aznam¹, Retno Arianingrum¹, Sri atun¹, dan Sri Nurestri²¹Jurusan Pendidikan Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Yogyakarta,
Jl. Colombo No. 1 Sleman, Yogyakarta, Indonesia²Faculty Biosain, University of Malaya, Kualalumpur, Malaysia**ABSTRAK**

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengeksplorasi senyawa bioaktif dari rimpang tumbuhan *Kaempferia rotunda* (kunci pepet) yang berpotensi sebagai antikanker. Target khusus yang ingin dicapai adalah untuk mendapatkan senyawa murni, struktur molekul berdasarkan data spektroskopi yang lengkap, data aktivitas sitotoksik terhadap beberapa *cell line* kanker, seperti sel *cell line* kanker seperti *Breast carcinoma (MCF-7)*; *Cervical carcinoma (Ca Ski)*; *T47-D*; *HCT 116*; *A549*; *WiDr*; *Hela S3* atau yang lainnya. Selanjutnya senyawa yang menunjukkan sifat toksis perlu dilanjutkan untuk mengetahui mekanisme aktivitas antiproliferasi, apoptosis, dan siklus penghambatan terhadap *cell lines* kanker. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Kimia Organik Universitas Negeri Yogyakarta untuk isolasi senyawa bioaktifnya serta di Faculty of Science, University of Malaya dan Laboratorium Parasitologi fakultas Kedokteran UGM untuk uji aktivitas sitotoksiknya terhadap beberapa *cell lines* kanker. Metode penelitian yang telah dilakukan adalah dengan melakukan eksperimen di laboratorium yang meliputi isolasi dan pemurnian senyawa, uji sitotoksitas, mekanisme molekuler aktivitas senyawa tersebut sebagai antiproliferasi, apoptosis, dan siklus penghambatan terhadap beberapa *cell lines* kanker. Aktivitas antiproliferasi dilakukan dengan MTT *Cell Proliferation Kit* menggunakan metode kolorimetri yang diukur berdasarkan pembentukan warna pada λ 570 nm dari cell kontrol dan akibat perlakuan penambahan sampel pada berbagai variasi konsentrasi. Pengamatan apoptosis dilakukan dengan menggunakan *double stain apoptotic Kit* (Hoeschst 33342/PI) dan *flow cytometric*, serta pengamatan sel setelah perlakuan menggunakan *fluorescent microscop*. Beberapa ekstrak rimpang kunci pepet menunjukkan aktivitas sitotoksik yang relatif lebih tinggi terhadap beberapa sel kanker yaitu MCF-7, Ca Ski, T47D, HeLa, dan WiDr (aktivitas sitotoksik <100 $\mu\text{g/ml}$). Dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kloroform memiliki aktivitas sitotoksik yang relatif paling tinggi dibanding yang lainnya. Dari ekstrak etil asetat diperoleh tiga senyawa yaitu 4'-hidroksi-7-metoksiflavanon, 5-hidroksi-7-metoksiflavanon, dan 4',7-dihidroksiflavanon. Sedangkan dalam ekstrak kloroform ditemukan dua senyawa yaitu 5-hidroksi-7-metoksiflavanon dan 4', 7-dihidroksiflavanon. Uji aktivitas senyawa flavanon menunjukkan 4',7-dihidroksiflavanon memiliki aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap sel kanker HCT 116 ($19,7 \pm 0,9 \mu\text{g/ml}$) dan Ca ski ($22,4 \pm 2,0 \mu\text{g/ml}$). Sedangkan 5-hidroksi-7-metoksiflavanon menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap sel kanker HCT 116 ($22,3 \pm 2,5 \mu\text{g/ml}$). Pengamatan secara kualitatif dan kuantitatif

terjadinya apoptosis menunjukkan bahwa 4'-7-dihidroksiflavanon relatif lebih reaktif mempercepat terjadinya *late apoptotic* sel kanker HCT 116.

Kata Kunci: Kaempferia rotunda; mekanisme molekuler; antikanker;

PENDAHULUAN

Kanker adalah proses pertumbuhan sel yang tidak terkontrol yang diikuti oleh invasi sel ke jaringan disekitarnya serta penyebaran (metastasis) ke bagian tubuh lain. Sifat utama sel kanker adalah proliferasi terus menerus sehingga menyebabkan ketidakseimbangan antara sel hidup dengan sel mati (Parton *et al*, 2001). Menurut catatan WHO (Anonim, 2007) pada tahun 2000 hingga tahun 2010 kanker menempati urutan kedua sebagai penyebab kematian di dunia setelah penyakit jantung dan mengalami peningkatan hingga pada tahun 2030, diperkirakan akan menempati urutan pertama. Tahun 2005 kanker membunuh sekitar 206.000 penderita di Indonesia, 135.000 diantaranya berusia dibawah 70 tahun. Oleh karena itu, diperlukan pengobatan yang tepat untuk meningkatkan kualitas hidup penderita kanker.

Pengobatan kanker pada umumnya didasarkan pada upaya pengambilan jaringan kanker atau dengan mematikan sel kanker dan meminimalkan efek pengobatan terhadap sel normal disekitarnya. Saat ini pengambilan kanker yang paling utama adalah operasi, radioterapi dan kemoterapi, namun ketiga jenis pengobatan tersebut memiliki kekurangan. Operasi akan berhasil pada beberapa tumor yang telah berkembang, tetapi sulit mengobati pada stadium awal metastasis. Pengobatan dengan radiasi mampu membunuh tumor lokal namun radiasi juga akan membunuh sel normal disekitarnya. Sebagian besar obat kemoterapi seperti taxol, 5-fluorourasil (5-FU) dan adriamisin memiliki target pada pembelahan sel (Boyer, 2005), tetapi kemoterapi ini bisa menyebabkan diare dan kerontokan rambut. Agen kemoterapi ini juga tidak efektif untuk sel yang mengalami mutasi p53. Sehingga perlu dikembangkan agen-agen baru untuk pengobatan kanker yang aman (Mathivadani, 2007; Hantz, H.L ,2005; Lindley C , 2005; Lin-Hao , 2003; Hondermarck Hubert, 2003; Parton, 2001; Vladusic (2000)).

Dewasa ini penggunaan bahan alami sebagai obat untuk mengendalikan kanker banyak dikembangkan, karena bahan alami dianggap tidak memiliki efek samping yang membahayakan apabila dibandingkan dengan kemoterapi yang memiliki toksisitas dan efek samping tinggi. Penelitian dan penemuan senyawa alami sebagai obat antikanker telah banyak dilakukan. Demikian pula penelitian tentang penggunaan senyawa bahan alami sebagai terapi kombinasi yang bersifat kemopreventif juga telah berkembang, namun

sampai saat ini belum ditemukan obat yang benar-benar efektif terhadap kanker (Mathivadani, 2007; Hantz, H.L, 2005).

Famili tumbuhan Zingiberaceae tersebar di Asia Selatan dan Asia Tenggara, terdiri dari 47 genus dan sekitar 1000 spesies. Beberapa spesies tumbuhan dari famili ini banyak digunakan dan terdapat dalam semua ramuan obat tradisional, seperti jamu. Tumbuhan ini selain sebagai rempah-rempah juga digunakan untuk mengobati berbagai macam penyakit, seperti demam, diare, menstruasi tidak teratur, tuberkulosis, radang gusi, penyakit kulit, radang hati, tumor, malaria, maupun gatal-gatal (Dalimarta, 2003).

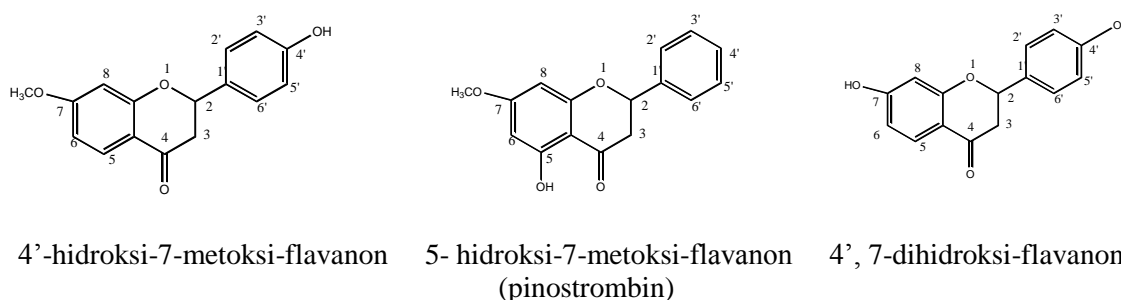
Kunci pepet (*Kaempferia rotunda*), termasuk famili tumbuhan Zingiberaceae yang banyak digunakan sebagai rempah-rempah. Beberapa khasiat yang dilaporkan antara lain sebagai peluruh dahak, obat cacing, dan penambah nafsu makan. Pengujian secara *in vitro* menunjukkan kunci pepet dapat meningkatkan jumlah limfosit, antibodi spesifik, dan dapat membunuh sel kanker (Dalimarta, 2003).

Penelitian yang dilakukan oleh Leardkamolkarn V. (2009) terhadap ekstrak metanol *Kaempferia parviflora* menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap human cholangiocarcinoma (HuCCA-1 and RMCCA-1). Dari hasil penelitian tersebut juga berhasil diisolasi senyawa 5,7,4-trimethoxyflavone yang juga menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi (LC_{50} 46,1 μ g/ml). Demikian juga penelitian yang dilakukan oleh Yanti (2009) menunjukkan beberapa senyawa seperti panduratin A yang ditemukan pada *Kaempferia pandurata* menunjukkan aktivitas sitotoksik tinggi terhadap sel kanker human epidermoid KB.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Sri Atun (2011) menunjukkan bahwa ekstrak metanol kunci pepet, temu giring, temu ireng, dan laos menunjukkan aktivitas antimutagenik. Persentase aktivitas antimutagenik ekstrak metanol berturut-turut dari yang paling tinggi pada dosis 300 mg/kg bb adalah temu giring, kunci pepet, temu ireng, dan laos, dengan aktivitas adalah 95,6; 81,9; 80; dan 50 %. Dari data tersebut menunjukkan bahwa ekstrak metanol mengandung senyawa aktif yang bersifat antimutagenik. Isolasi dan identifikasi struktur senyawa yang ditemukan dalam ekstrak metanol kunci pepet diperoleh tiga jenis senyawa flavanon, yaitu 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon, 5-hidroksi-7-metoksi-flavanon, dan 4', 7-dihidroksi-flavanon (Gambar 1).

Diduga dalam ekstrak metanol kunci pepet masih banyak senyawa sejenis yang belum teridentifikasi, sehingga masih perlu dilanjutkan untuk mengeksplorasi senyawa yang lainnya. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan adanya beberapa senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker juga menunjukkan sifat antimutagenik

(Adam,2004). Namun sebaliknya, ada juga senyawa yang dapat membunuh sel kanker tetapi pada dosis tinggi bersifat mutagenik atau menyebabkan terjadinya mutasi sel, sebagai contohnya adalah siklofosamid. Oleh karena itu sangat menarik untuk menguji aktivitas sitotoksik ekstrak maupun senyawa hasil isolasi rimpang tumbuhan *Kaempferia rotunda* terhadap beberapa *cell line* kanker.



Gambar 1. Beberapa senyawa flavanon hasil isolasi ekstrak metanol kunci pepet (*Kaempferia rotunda*)

METODE PENELITIAN

a. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif, yaitu untuk menguji aktivitas sitotoksik ekstrak maupun senyawa murni dari rimpang tumbuhan *Kaempferia rotunda* (kunci pepet) terhadap *cell line* kanker seperti *Breast carcinoma (MCF-7)*; *Cervical carcinoma (Ca Ski)*; *T47-D*; *HCT 116*; *A549*; *WiDr*; *Hela S3* atau yang lainnya yang tersedia di Laboratorium Faculty of Science, University of Malaya dan laboratorium Parasitologi, Kedokteran UGM serta mengetahui mekanisme molekuler aktivitasnya sebagai antiproliferasi, apoptosis, dan siklus penghambatan terhadap *cell line* kanker tersebut.

b. Subyek dan Obyek Penelitian

Subyek penelitian ini rimpang tumbuhan *Kaempferia rotunda* (kunci pepet). Objek penelitian ini adalah senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas sitotoksik dan mekanisme aktivitas antiproliferasi, apoptosis, dan siklus penghambatan terhadap *cell lines* kanker.

c. Alat dan bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Alat :

- Evaporator Buchi Rotavapor R-114

- Kromatografi cair vakum (kcv) untuk fraksinasi dilakukan dengan silika gel Merck 60 GF₂₅₄,
- Kromatografi gravitasi (kkg) dilakukan dengan silika gel 60 (35–70 mesh)
- Kromatografi kolom tekan (kkt) menggunakan silika gel 60 (230–400 mesh), dan sepandex LH-20
- Kromatografi sentrifugal sistem radial (kromatotron) dilakukan dengan silika gel Merck PF₂₅₄ (0,5; 1; dan 2 mm),
- Analisis kromatografi lapis tipis (klt) menggunakan plat Si-gel Merck 60 F₂₅₄ 0,25 mm.
- Lampu UV pada λ 256 dan 366 nm
- Spektrofotometer IR
- Spektrofotometer UV-VIS
- CO₂ inkubator
- ELISA reader
- Fluorecent plate reader

Bahan :

- Pelarut yang digunakan untuk isolasi dan pemurnian senyawa oligoresveratrol antara lain metanol, aseton, *n*-heksan, etil asetat, metilen klorida, kloroform dengan kualitas teknis dan p.a.
- Sampel rimpang tumbuhan *Kaempferia rotunda* (kunci pepet)
- Pereaksi penampak noda pada analisis kromatografi lapis tipis digunakan larutan 2% serium sulfat (CeSO₄) dalam asam sulfat.
- Pereaksi geser untuk analisis spektrofotometer UV digunakan larutan natrium hidroksida (NaOH) 2 %.
- Sel kanker seperti : *Breast carcinoma (MCF-7)*; *Cervical carcinoma (Ca Ski)*; *T47-D*; *HCT 116*; *A549*; *WiDr*; *Hela S3* atau yang lainnya
- Sel Vero (sel normal)
- Tissue culture flask, 10 cm²
- 96 well microtiter plates
- Bahan yang diperlukan untuk kultur *cell lines* antara lain beberapa reagent seperti larutan pencuci (99% RPMI (Gibco), 1% pensrep, (Gibco); media penyimpanan -70 °C (20% FBS (Gibco), 70% RPMI yang mengandung 1% pensrep dan 1% fungizon, 10% DMSO); Media kultur (89% RPMI, 1% pensrep, 10% FBS); kertas filter nitroselulosa 0,22 μ m (Whatman)); bahan pewarna biru tripan (Sigma));

larutan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (Sigma) dilarutkan dalam PBS dengan konsentrasi 5 mg/ml; pelarut formazan (10% SDS dalam 0,01 N asam klorida).

- Reagent uji aktivitas seperti medium RPMI 1640, propidium iodida, andriamicin, cis plantin, 5-fluouracil, mitomicin C, deionized water, MTT cell proliferation kit, bovine serum, actin.
- Nitrogen cair

d. Prosedur Kerja

Prosedur kerja yang akan dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Isolasi dan identifikasi struktur senyawa bioaktif

Isolasi senyawa kimia dari bahan tumbuhan dilakukan dengan cara maserasi secara tuntas dengan pelarut metanol rimpang tumbuhan *Kaempferia rotunda* (kunci pepet). Ekstrak yang diperoleh dipekatkan pada tekanan rendah dan selanjutnya dipartisi berturut-turut menggunakan pelarut *n*-heksan, metilen klorida, dan etil asetat. Pemisahan dan pemurnian senyawa kimia dilakukan dengan teknik kromatografi, seperti kromatografi vakum cair (kvc), kromatografi kolom gravitasi (kkg), kromatografi kolom tekan (kkt), dan kromatografi sentrifugal (kromatotron), serta kristalisasi untuk senyawa-senyawa yang dapat membentuk kristal. Identifikasi dan elusidasi struktur dilakukan menggunakan analisis data spektrum UV-VIS, IR, dan NMR.

2. Uji aktivitas sitotoksitas serta mekanisme antiproliferasi, apoptosis, dan siklus penghambatan sel kanker

a). Menumbuhkan beberapa *cell lines*: *Breast carcinoma (MCF-7)*; *Cervical carcinoma (Ca Ski)*; *T47-D*; *HCT 116*; *A549*; *WiDr*; *Hela S3* atau yang lainnya dari penyimpanan dalam nitrogen cair

Sel beku dari nitrogen cair dibiarkan pada suhu kamar sampai mencair sebagian, kemudian dimasukkan dalam tabung konikal 50 ml dan ditambah 50 ml media RPMI lalu dikocok. Setelah itu disentrifus 275 g selama 10 menit. Sel kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C dengan aliran CO₂ 5%. Perkembangan sel diamati tiap hari dan jika media mulai menguning diganti dengan media baru, jumlah sel dihitung dengan *Nebauer Hemocytometer* dengan pewarna biru tripan.

b). Uji sitotoksitas dilakukan dalam plate 96 sumuran.

Sampel dilarutkan dalam buffer fosfat atau pelarut yang sesuai. Setiap sumuran dimasukkan 100 µl media RPMI yang mengandung penstrep 4 %, 100 µl sampel pada variasi konsentrasi 25 µg sampai 0,05 µg, kemudian ditambah 100 µl control sel dalam

media kultur dengan jumlah sel 5×10^4 setiap sumuran. Sebagai blanko digunakan dilusi seri buffer kalium fosfat 5 mM pH 7,2 sebanyak 100 μ l pada sumuran pertama, dan setiap sampel dilakukan dua ulangan. Pada akhir inkubasi ditambahkan MTT (50 μ g/ml) sebanyak 10 μ l pada masing-masing sumuran, kemudian diinkubasi kembali selama 4 jam. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang memberikan warna ungu. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 100 μ l SDS 10% dalam HCl 0.01 N, kemudian diinkubasi pada suhu kamar semalam kemudian dibaca dengan Benchmark *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Viabilitas sel dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ sel hidup} = (\text{abs P} - \text{abs M}) / (\text{abs K} - \text{abs M}) \times 100\%$$

abs P = absorbansi sel dengan perlakuan

abs M = absorbansi media

abs K = absorbansi kontrol sel

Nilai IC₅₀ ditentukan dengan analisis probit pada program SPSS 11.5.

c). Uji apoptosis

Pengamatan apoptosis dilakukan dengan menggunakan analisis kualitatif menggunakan Double stain *Apoptotic detection Kit* (Hoechst 33342/PI) dan pengamatan kuantitatif menggunakan *flow cytometer*.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Hasil Penelitian

1. Ekstraksi dan fraksinasi sampel tumbuhan

Bahan tumbuhan yang berupa serbuk kering rimpang kunci pepet sebanyak 3 Kg, dimasukkan ke dalam jerigen plastik ukuran 20 L, dan ditambahkan pelarut metanol sebanyak 10 L, selanjutnya direndam selama 24 jam. Ekstrak selanjutnya disaring dan dikumpulkan filtratnya. Residu selanjutnya di maserasi kembali menggunakan metanol, dan diulang seperti prosedur sebelumnya sebanyak 2 kali. Filtrat yang diperoleh dari masing-masing sampel tumbuhan selanjutnya dipekatkan menggunakan evaporator vakum, sehingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 230 gram. Ekstrak kental dari masing-masing tumbuhan selanjutnya di partisi berturut-turut menggunakan pelarut n-heksan, kloroform, dan etil asetat. Ekstrak hasil partisi selanjutnya dipekatkan dengan evaporator vakum, sehingga diperoleh ekstrak kental, masing-masing sebanyak 43,2; 135,8; dan 31,9 gram.

2. Uji aktivitas sitotoksik terhadap beberapa sel kanker dari masing-masing ekstrak

Hasil uji aktivitas sitotoksik terhadap beberapa sel kanker dari masing-masing ekstrak kunci pepet dilakukan di laboratorium Biosain University of Malaya dan laboratorium Parasitologi Kedokteran UGM dengan hasil seperti dalam Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas sitotoksik masing-masing ekstrak

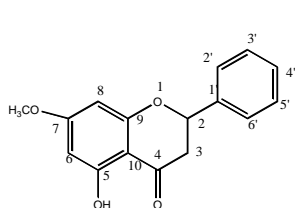
No	Ekstrak	Dilakukan di Lab. Biosain UM		Dilakukan di Lab. Parasitologi Kedokteran UGM			
		IC ₅₀ (µg/ml) terhadap sel kanker		IC ₅₀ (µg/ml) terhadap sel kanker			
		MCF-7	Ca Ski	HeLa	T47D	WiDr	Vero
1	MeOH	29,43 ± 0,97	31,62 ± 1,02	109,130	71,600	163,628	161,054
2	Hexane	39,22 ± 0,63	36,13 ± 2,34	203,065	175,872	61,8858	Tidak aktif
3	EtOAc	38,80 ± 0,40	42,13 ± 1,02	-	-	-	-
4	CHCl ₃	34,03 ± 0,59	24,27 ± 0,47	62,358	41,720	65,801	88,093

Keterangan :

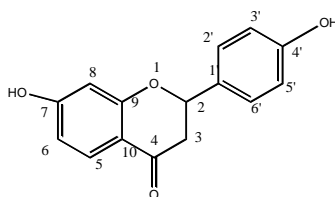
MCF-7 : sel kanker payudara; Ca Ski : sel kanker rahim; HeLa : sel kanker rahim; T47D : sel kanker payudara; WiDr : Sel kanker kolon; Vero : sel normal

3. Isolasi, pemurnian, dan identifikasi senyawa dalam ekstrak kunci pepet

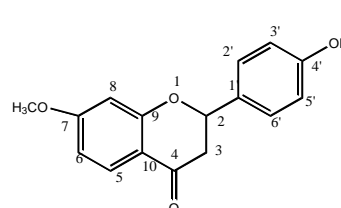
Isolasi terhadap senyawa kimia dalam kunci pepet telah dilakukan dalam penelitian sebelumnya dan diperbanyak dalam penelitian ini sehingga cukup untuk penelitian lebih lanjut. Dari ekstrak etil asetat diperoleh tiga senyawa yaitu 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon, 5-hidroksi-7-metoksi-flavanon, dan 4', 7-dihidroksiflavanon. Sedangkan dalam ekstrak kloroform ditemukan dua senyawa yaitu 5-hidroksi-7-metoksi-flavanon dan 4', 7-dihidroksi-flavanon.



5- hidroksi-7-metoksi-flavanon
(Pinostrombin)



4', 7-dihidroksi-flavanon



4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon

4. Hasil Uji aktivitas sitotoksik dari senyawa murni

Tabel 2. Hasil uji sitotoksik senyawa hasil isolasi terhadap beberapa sel kanker

No	Senyawa Uji	Dilakukan di Lab. Biosain UM IC ₅₀ (µg/ml) terhadap sel kanker				Dilakukan di Lab. Parasitologi Kedokteran UGM IC ₅₀ (µg/ml) terhadap sel kanker				
		MCF-7	HCT 116	Ca ski	A549	HeLa	T47D	MCF-7	WiDr	Vero
1	5-hidroksi-7-metoksi-flavanon	100	22,3 ± 2,5	>100	>100	Tidak aktif	Tidak aktif	Tidak aktif	Tidak aktif	Tidak aktif
2	4', 7-dihidroksi-flavanon	97,1± 3,9	19,7 ± 0,9	22,4 ± 2,0	76,7 ± 11,3	138,62	122,70	140,51	76,83	Tidak aktif
3	4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon	-	-	-	-	Tidak aktif	Tidak aktif	Tidak aktif	Tidak aktif	Tidak aktif

Keterangan :

A549 : Human lung adenocarcinoma epithelial cell line;

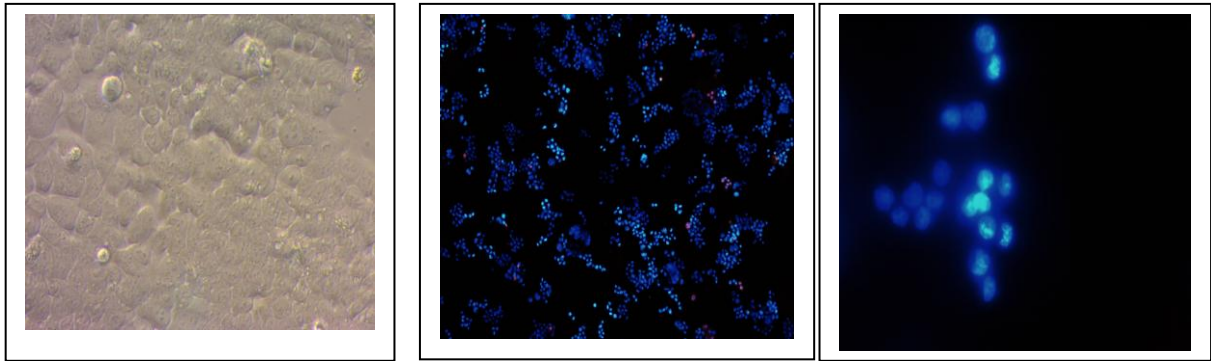
WiDr : Human colon adenocarcinoma Cell Line

HCT 116 : sel kanker kolon

5. Hasil pengamatan apoptosis

a. Pengamatan apoptosis secara kualitatif

Pengamatan apoptosis pada perlakuan sel kanker HCT 116 dilakukan menggunakan *double Stain Apoptosis detection Kit (Hoeschst 33342/PI)*. Pengamatan dilakukan setelah perlakuan inkubasi dengan senyawa flavanon selama 48 jam. Sel kanker HCT 116 diinkubasi dengan senyawa flavanon pada konsentrasi sesuai dengan IC₅₀ dan dua kali IC₅₀. Dengan menggunakan Kit tersebut dapat dideteksi sel-sel yang normal, apoptosis, dan sel mati. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop *phace contras* dan mikroskop flourecent. Dengan menggunakan mikroskop flourecent dapat diketahui adanya sel yang normal berwarna biru gelap, sel yang mengalami *erlay* apotosis akan berwarna biru cerah, sedangkan sel yang mengalami *late* apoptosis berwarna merah. Sedangkan dengan menggunakan mikroskop *phace contras* hanya dapat membedakan sel yang masih hidup dan mati. Sel yang hidup bentuk masih utuh, sedangkan yang mati kelihatan pecah, dan mengapung. Pengamatan dengan mikroskop *phace contras* dilakukan sebelum penambahan *double Stain Apoptosis detection Kit (Hoeschst 33342/PI)* (Gambar 3-4).

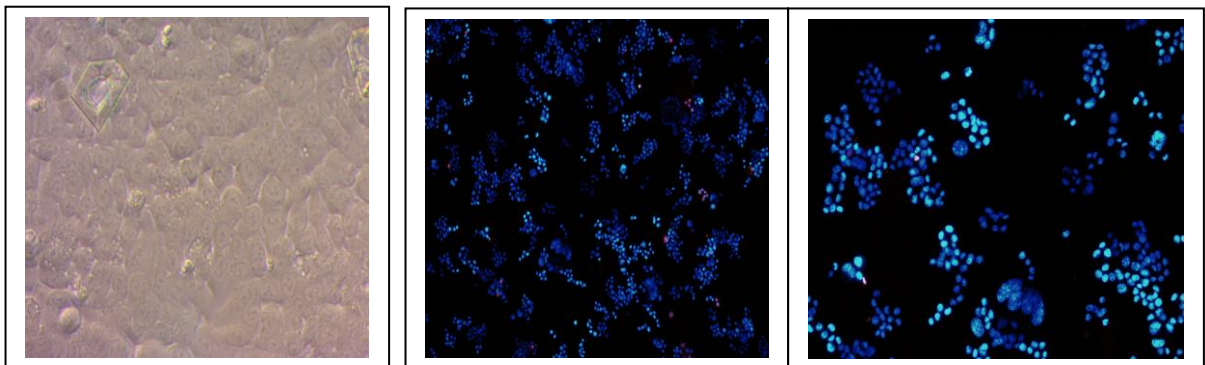


A

B

C

Gambar 2. Pengamatan Sel kanker HCT 116 kontrol (tanpa perlakuan) setelah 48 jam di bawah mikroskop face kontras (A); Pengamatan dengan mikroskop fluorecent (perbesaran 40x) (B) dan perbesaran 100x (C)

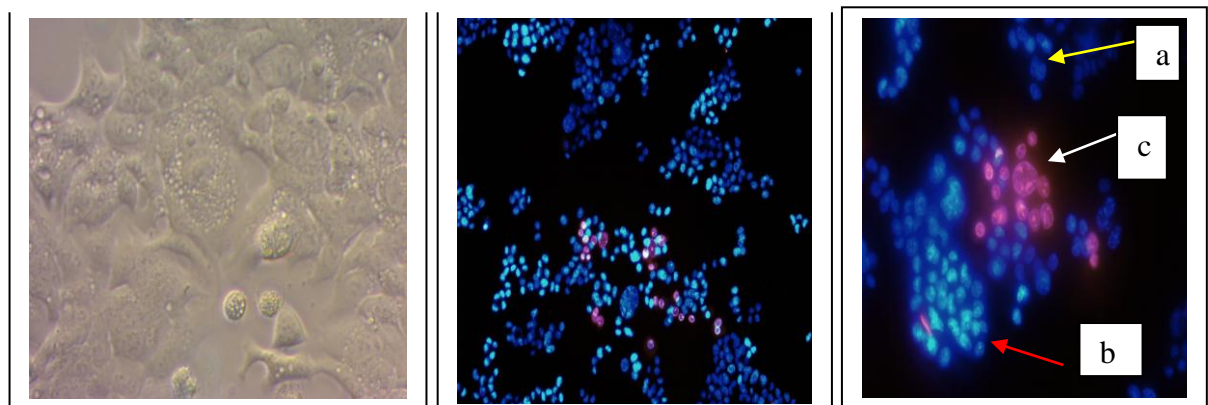


A

B

C

Gambar 3. Pengamatan Sel kanker HCT 116 dengan penambahan pinostrombin 50 $\mu\text{g/ml}$ setelah 48 jam di bawah mikroskop *phase kontras* (A) dan Pengamatan dengan mikroskop fluorecent (perbesaran 40x) (B) dan perbesaran 100x (C)



A

B

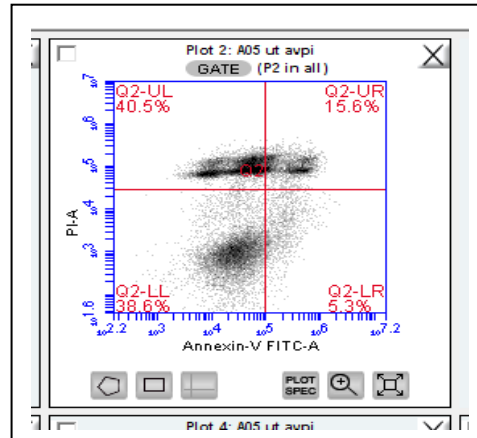
C

Gambar 4. Pengamatan Sel kanker HCT 116 dengan penambahan 4', 7-dihidroksi-flavanon 40 $\mu\text{g/ml}$ setelah 48 jam di bawah mikroskop face kontras (A) dan Pengamatan dengan mikroskop fluorecent (perbesaran 50x) (B) dan perbesaran 100x (C) (a=sel normal; b= *erlay apoptotic*; c= *late apoptotic*)

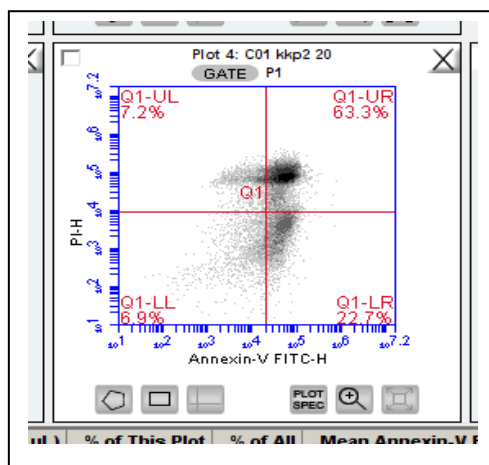
b. Pengamatan apoptosis secara kuantitatif

Pengamatan apoptosis secara kuantitatif menggunakan metode *flow cytometry*. Dalam metode ini dapat dianalisis secara kuantitatif jumlah sel kanker yang masih hidup, jumlah sel kanker mengalami *erlay apoptosis*, serta sel kanker yang mengalami *late apoptosis* atau nekrosis. Hasil pengamatan apoptosis menggunakan metode *flow cytometry* dilakukan menggunakan metode apoptosis *detection Kit staining protocol* (Cat No. 556570). Sel kanker HCT 116 diinkubasi selama 72 jam menggunakan senyawa flavanoid konsentrasi sesuai dengan IC_{50} a dua kali IC_{50} . Data yang diperoleh dari metode ini seperti tercantum dalam Gambar 5. Namun data yang diperoleh dalam penelitian ini belum lengkap dan kontrol selnya tidak begitu bagus. Pengamatan terjadinya apoptosis sangat dipengaruhi oleh waktu inkubasi dan konsentrasi sampel, sehingga perlu divariasikan waktu inkubasi dan konsentrasinya. Pengamatan data *flow cytometer* dapat diketahui dari jumlah sel yang terdapat pada masing-masing quadrant. Quadran satu (Q-LL) (FITC-/PI-) menunjukkan sel normal, quadran ke dua (Q-LR) (FITC-/PI+), menunjukkan sel debris (rusak) akibat faktor mekanik proses pengerjaan, quadran ke tiga (Q-UR) (FITC+/PI+), menunjukkan sel yang mengalami *late apoptosis*, quadran ke empat (Q-UL) (FITC+ /PI-), menunjukkan sel yang mengalami *erlay apoptosis*.

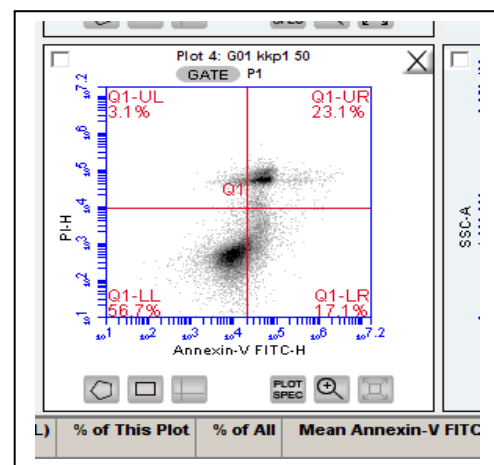
Uji sitotoksik masing-masing ekstrak terhadap beberapa sel kanker menunjukkan bahwa ekstrak kloroform memiliki IC_{50} sebesar 24,27 $\mu\text{g/ml}$ terhadap sel kanker Ca-ski, dan juga terhadap sel kanker yang lainnya menunjukkan harga IC_{50} yang relatif rendah dibanding yang lainnya. Hasil isolasi dan identifikasi struktur diperoleh dua senyawa dalam ekstrak kloroform, yaitu 5-hidroksi-7-metoksiflavanon dan 4', 7-dihidroksi-flavanon.



A



B



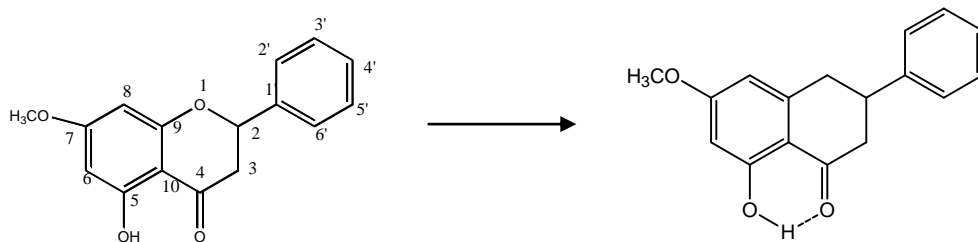
C

Gambar 5. Data *flow cytometry* sel kanker HCT 116 kontrol (A); setelah perlakuan pinostrombin 50 µg/ml (B); dan setelah perlakuan perlakuan 4', 7-dihidroksi- flavanon 20 µg/ml (C) pada inkubasi selama 72 jam

Pembahasan

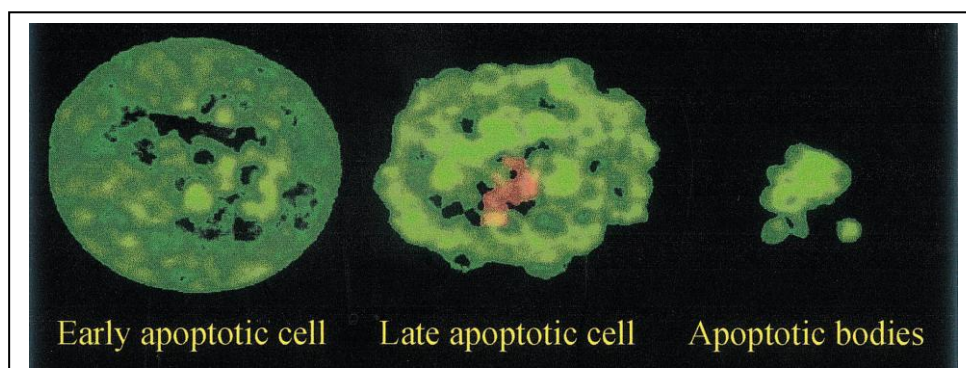
Uji sitotoksik terhadap dua senyawa 5-hidroksi-7-metoksiflavanon dan 4', 7-dihidroksi-flavanon terhadap sel kanker MCF-7; HCT 116; Ca ski; dan A549 menunjukkan bahwa senyawa 4',7-dihidroksiflavanon memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi. Ditinjau dari strukturnya dapat diketahui bahwa adanya gugus hidroksil pada posisi 4' dapat meningkatkan aktivitas sitotoksiknya. Senyawa 5- hidroksi-7-metoksi-flavanon atau pinostrombin tidak memiliki gugus hidroksil pada posisi 4', namun memiliki gugus hidroksil pada posisi 5. Gugus hidroksil pada posisi 5 tersebut tidak bebas, oleh karena dapat membentuk ikatan hidrogen dengan gugus karbonil, seperti ditunjukkan dalam Gambar 6. Pinostrombin juga memiliki kelarutan yang relatif lebih kecil, hal ini

nampak pada pengamatan menggunakan mikroskop *phase contras* menunjukkan adanya butiran kristal dari senyawa ini (Gambar 8 A). Hasil penelitian Hui wang (2012) juga menunjukkan bahwa adanya 4-hidroksi fenil bersifat sebagai inhibitor non kompetitif terhadap transportasi glukosa sehingga mengurangi energi yang dibutuhkan sel, dan menyebabkan terjadinya apoptosis.



Gambar 6. Terbentuknya ikatan hidrogen pada pinostrobilin

Mekanisme molekuler terjadinya apoptosis karena pengaruh senyawa flavanon selanjutnya diamati secara kualitatif dan kuantitatif. Pengamatan apoptosis secara kualitatif pada perlakuan sel kanker HCT 116 dilakukan menggunakan *double Stain Apoptosis detection Kit (Hoeschst 33342/PI)*. Kit tersebut berisi pewarna yang dapat berikatan dengan DNA. Hoeschst 33342 merupakan pewarna yang berpendar biru ketika berikatan dengan DNA pada sel normal dan akan berpendar biru terang jika berikatan dengan benang-benang kromatin pada sel yang mulai mengalami apoptosis (*erlay apoptotic*). Sedangkan PI (Propidium Iodida) merupakan pewarna merah yang akan menembus masuk ke dalam sel dan berikatan dengan DNA pada sel mati atau *late apoptotic*. Perbedaan *erlay apoptotic*, *late apoptotic*, serta sel mati dapat dilihat pada Gambar 7 berikut.



Gambar 7. Perbedaan *erlay apoptotic*, *late apoptotic*, serta sel mati

Pengamatan secara kualitatif terjadinya apoptosis menunjukkan bahwa 4'-7-dihidroksi-flavanon relatif lebih reaktif mempercepat terjadinya *late apoptotic* sel kanker HCT 116, yaitu dengan pengamatan mikroskop fluorecent warna biru terang dan warna merah jauh lebih banyak dibanding kontrol maupun perlakuan inkubasi dengan pinostrombin. Data ini juga sesuai dengan pengamatan apoptosis secara kuantitatif perlakuan inkubasi senyawa 4'-7-dihidroksiflavanon 20 µg/ml menunjukkan sel yang mengalami *late apoptotic* (quadran ke tiga) pada juga relatif lebih banyak (63,3%), dibanding kontrol (15,5%), dan pinostrombin 50 µg/ml (23,1%).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Beberapa ekstrak rimpang kunci pepet menunjukkan aktivitas sitotoksik yang relatif lebih tinggi terhadap beberapa sel kanker yaitu MCF-7, Ca Ski, T47D, HeLa, dan WiDr (aktivitas sitotoksik <100 µg/ml). Dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kloroform memiliki aktivitas sitotoksik yang relatif paling tinggi dibanding yang lainnya.
2. Dari ekstrak etil asetat diperoleh tiga senyawa yaitu 4'-hidroksi-7-metoksi-flavanon, 5-hidroksi-7-metoksi-flavanon, dan 4', 7-dihidroksiflavanon. Sedangkan dalam ekstrak kloroform ditemukan dua senyawa yaitu 5-hidroksi-7-metoksiflavanon dan 4', 7-dihidroksiflavanon.
3. Uji aktivitas senyawa flavanon menunjukkan senyawa 4',7-dihidroksiflavanon menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap sel kanker HCT 116 ($19,7 \pm 0,9$ µg/ml) dan Ca ski ($22,4 \pm 2,0$ µg/ml). Sedangkan hidroksi-7-metoksiflavanon menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap sel kanker HCT 116 ($22,3 \pm 2,5$ µg/ml).
4. Pengamatan secara kualitatif dan kuantitatif terjadinya apoptosis menunjukkan bahwa 4'-7-dihidroksiflavanon relatif lebih reaktif mempercepat terjadinya *late apoptotic* sel kanker HCT 116.

Saran

Penelitian perlu dilanjutkan untuk mengetahui *cell cycle progression* maupun ekspresi protein yang dihasilkan dari sel kanker HCT 116 yang terinduksi dengan senyawa flavanon, sehingga mekanisme molekulernya dapat diketahui secara lengkap.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams BK, Ferstl EM, Davis MC, Herold M, Kurtkaya S, Camalier RF, Hollingshead MG, Kaur G, Sausville EA, Rickles FR, (2004). Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents. *Bioorg Med Chem.* 12 (14):3871–3883.
- Anonim (2007), The impact of cancer in Indonesia, *www. Who infobase/report*, 10 Agustus 2007
- Boyer, M.J., and Tannock, I.F., (2005), *The Basic Science of Oncology: Cellular and Molecular Basis of Drug Treatment for Cancer*, Mc Graw Hill Compay, forth edition, New York.
- Bouker, K.B., Skaar, T.C., Hamburger, D.S., Riggins, R.B., Fernandez, D.R., Zwart, A., Wang, A. & Clarke, R., (2005), Tumor suppressor activities of interferon regulatory factor-1 in human breast cancer associated with caspase activation and induction of apoptosis, *Carcinogenesis* 26 1527-1535.
- Dalimarta, S. (2003), *Atlas tumbuhan obat Indonesia*, jilid 2, Trubus Agriwidya
- Hui Wang, Dianjun Wang, Yabin Pu, Dengkui Pan, Weijun Guan and Yuehui Ma, (2012), Phloretin induced apoptosis of human hepatoma cells SMMC-7721 and its correlative biological mechanisms, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 6(9), pp. 648-659
- Hondermark Hubert, (2003), Breast cancer: when proteomics challenges biological complexity. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 2003;2(5):281-91.
- Khattak S., Rehman S. , Shah U.H, Ahmad W. W., and Ahmad M., (2005), Biological effects of indigenouse medicinal plants *Curcuma longa* and *Alpinia galanga*. *Fitoterapia* 76: 254-257.
- Kubatka, P., Ahlersova E., Ahlers I., Bojkova B., Kalicka K., Adamekova E., Markova M., Chamilova, M., and Cermakova, M., (2002), Variability of Mammary Carsinogenesis Induction in Female Sprague-Dawley and Wistar : Han Rats : the Effect of Season and Age, *Physiol. Res.* , 51, 633 - 640.
- Leardkamolkarn V., Tiamyuyen S., Sripanidkulchai B.O., (2009), Pharmacological Activity of *Kaempferia parviflora* against Human Bile Duct Cancer Cell Lines, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 10, 2009 697
- Lindley C, Boehnke Michaud L. Breast Cancer. In: Dipro JT, Talbert RL, Yee G, Matzke G, eds. (2005), *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach: The McGraw-Hill Companies, Inc.*; p.2329-2364.
- Lin-Hao L., Li-Jun Wu, Bei Zhou, Zhen-Wu, Shin-ichi T, S. Onodera, F. Uchiumi, T. Ikejima, (2004), Silymarin prevents UV pradiation induced A375-S2 cell apoptosis, *Biol. Pharm. Bull.* 67 27 (7), 1031-1036
- Mathivadani, P., Shanthi, P., and Sachdanandam, P., (2007), Apoptotic Effect of *Semecarpus anacardium* nut Extract on T47D Cancer Cell Line., *Cell.Biol. Int.*, 31, 1198-1206
- Matsuo, T., Toyota, A., Kanamori, H., Nakamura, K., Katsuki, S., Sekita, S., Sakate, M., (2002), Constituents of representative *Curcuma* and estimation of *Curcuma* species in health foods, *Hiroshima-ken Hoken Kakyō Senta Kenkyū Hokoku*, 10, 7-13
CAN 139:36749

- Nurfina, Sri Atun, Retno A, Sri Nurestri, (2011), Phytochemical studies of the some Indonesian plants Zingiberaceae as antiviral Proceeding International seminar on natural products, Brisbane, Australia, 10-15 Juli 2011.
- Park, S.Y., Kim, D.S.H.L., (2002), Discovery of natural products from *Curcuma longa* that protect cell from β -amyloid insult: A drug discovery effort against Alzheimer's disease, *J. Nat.Prod.*, 65(9), 1227-1231.
- Parton, Martina., Dowsett, Mitchel., and Smith, I., (2001), Studies of Apoptosis in Breast Cancer, *BMJ*, 322: 1528-1532
- Schafer., J.M., Lee, E.S., O'Regan, R.M., Yao, K., and Jordan, V.C.,(2000), Rapid Development of Tamoxifen-stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice, *Clin. Cancer Res.*, 6, 4373-4380
- Sri Atun, Nurfina, Retno A (2010), Development of active compounds from temu giring (*Curcuma Heyneana*) and Temu ireng (*Curcuma aeruginosa*) against human cancer cell lines. Laporan Penelitian, FMIPA, UNY
- Sri Atun, Nurfina, Retno A, Sri Nurestri, (2011), Phytochemical study on some *Curcuma* species from Indonesia Proceeding International seminar on natural products, Brisbane, Australia, 10-15 Juli 2011
- Sjamsul A.A; Hakim, E.H, Makmur L., Syah Y.M., Juliawaty L.D., Mujahidin D., (2007), Ilmu Kimia dan Kegunaan Tumbuh-tumbuhan obat Indonesia, Jilid I, Penerbit ITB.
- Vladusic E. A., Hornby A. E., Guerra-Vladusic F. K., Lakins J., and Lupu R., (2000), Expression and regulation of estrogen receptor β in human breast tumors and cell lines. *Oncol. Rep.*, 7: 157-167
- Yanti, Lee M, Kim D, and Hwang J-K. (2009), Inhibitory Effect of Panduratin A on c-Jun N-Terminal Kinase and Activator Protein-1 Signaling Involved in *Porphyromonas gingivalis* Supernatant-Stimulated Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Human Oral Epidermoid Cells, *Biol. Pharm. Bull.* 32(10) 1770—1775
- Wu, Y., Chen, Y., Xu,J., and Lu L.(2002). Anticancer activities of curcumin on human Burkitt's lymphoma, *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 24(4), 348-352.