

**AKTIVITAS ANTIPROLIFERATIF EKSTRAK ETANOL KASAR *Dendrophthoe Pentandra L. Miq.* TERHADAP KULTUR SEL MIELOMA
(Antiproliferation Activity of the Crude Ethanol Extracts of *Dendrophthoe pentandra L. Miq* Against Myeloma Culture Cell)**

Mochamad Lazuardi
Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR,

Abstract

Dendrophthoe pentandra L. Miq., was used commonly in Surabaya by traditionally herbalists to control breast cancer cases. The antiproliferation effect of the crude ethanol extract was evaluated in myeloma culture cell (in vitro) by 2-sample-t test at 0.05 significance. Fifteen well of micro titer plate consist of myeloma cell line at minimum $2 \cdot 10^4$ cell.ml⁻¹ were each five well added with 100 µl of analite at series 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm and 30 ppm. Antiproliferation activity was assessed by comparing the control well. The extract at 20 ppm produced deproliferatization of myeloma culture cell were significant ($p < 0.05$) when compared to control well.

Keywords: Antiproliferation, Anticancer, *Dendrophthoe pentandra L. Miq*, Myeloma cell

Naskah diterima tanggal 14 Februari 2007, disetujui untuk dimuat tanggal 12 Juni 2007

Alamat koresponden:

Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR, Jl Mulyorejo (Kampus C) UNAIR, Surabaya, 60115

e-mai: ardiunair@yahoo.co.uk

PENDAHULUAN

Dendrophthoe pentandra L. Miq (benalu duku) merupakan salah satu tanaman parasit yang banyak dimanfaatkan oleh beberapa kalangan di wilayah Jawa Timur untuk menekan perkembangan sel kanker payu dara. Fenomena tersebut pada akhirnya mendorong beberapa peneliti Indonesia untuk melakukan kajian mendalam mengenai benalu duku sebagai antikanker.

Secara *in vitro* diketahui bahwa infus daun Benalu duku yang tumbuh pada pohon induk (pohon duku) usia tiga tahun asal Palembang (Sumatera Selatan), ternyata mampu menekan perkembangan sel mieloma (1). Kajian lanjutan secara *in vivo* diperoleh temuan fakta bahwa infus daun benalu duku 20 hingga 30% mampu mengeliminasi kanker Mieloma hasil pemeriksaan ulas darah (*whole blood film*) pada tikus penderita mieloma (2). Lebih lanjut Nuraini menyatakan bahwa tingkat kepulihan tikus penderita mieloma pasca pemberian infus daun benalu duku mencapai 100% dalam waktu 2 hari pasca pemberian (3). Hasil maserasi ekstrak kloroform daun benalu duku ternyata menghasilkan fenomena antiproliferatif terhadap sel mieloma secara *in vitro* antara 20 hingga 30% (4). Sementara diketahui bahwa penggunaan pada dosis 18,27 mg.kg⁻¹ berat badan infus daun benalu duku terhadap tikus (*Rattus Norvegicus strain Wistar*) cukup aman (tidak merusak fisiologis kerja hati dan ginjal) (5). Temuan tersebut di atas pada akhirnya mendorong untuk dilakukan eksplorasi lanjutan mengenai potensi substansi antiproliferatif daun benalu duku melalui berbagai macam pelarut ekstraksi. Penggunaan aneka macam pelarut ekstraksi yang bakal dipilih tidak mustahil akan menghasilkan fenomena nyata tentang kemungkinan bioaktif terlarut pada pelarut tertentu.

Etanol sebagai salahsatu pelarut polar simplisia herba medisina diharapkan mampu menarik substansi

bioaktif daun benalu duku secara maksimal. Beberapa substansi dari simplisia yang dimaksudkan kemungkinan terdapat unsur-unsur bioaktif dengan sifat antiproliferatif. Sementara ini diketahui bahwa hingga saat ini belum ada data mengenai unsur-unsur bioaktif larut etanol hasil maserasi daun benalu duku. Persoalan tersebut pada akhirnya melandasi upaya penarikan substansi aktif larut etanol yang berpotensi sebagai antiproliferatif.

Penelitian ini bertujuan memperoleh data primer mengenai kemungkinan substansi aktif terlarut etanol dari daun benalu duku dengan potensi antiproliferatif seperti analogi laporan Roostantia, dkk (1).

METODE

Penelitian ini menggunakan rancangan pascaperlakuan dengan grup kontrol, variabel tergangungnya adalah penetapan kadar analit antiproliferatif dan variabel bebas adalah daun benalu duku.

Bahan dan Alat

Daun Benalu duku diambil dari pohon induk usia 3 tahun dari kabupaten Muara Enim, Sumatera Selatan. Daun benalu duku segera dilakukan identifikasi oleh Tim peneliti antikanker benalu duku (*Scientie et Medicina*) di Departemen Ilmu Farmasi-Kedokteran FK UNAIR. Selanjutnya dilakukan pembersihan dengan air mengalir dan diangin-anginkan serta disimpan dalam desikator untuk persiapan penghalusan. Bahan lain adalah etanol 96% diperoleh dari PT Brataco, Jakarta. Mikrotiter plate 24 sumuran dari Linbro, England, Media sel RPMI dan *Foetal Bovine Serum* (FBS). Media tambahan adalah tioglikolat dan biru metilen. Kultur sel kanker yang digunakan adalah sel mieloma (*cell line*) diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma, Surabaya. Alat penelitian diantaranya adalah peralatan gelas, corong Buchner,

Thoma, CO₂ inkubator, mikroskop inverted dan cahaya, lemari penyimpanan Revco, mikrofilter dan mikropipet.

Jumlah sumuran mikroplat tiap analit uji

Perwakilan setiap analit uji ditetapkan sesuai Persamaan 1 (6), dimana simpangan baku (S) = 0,9 mengacu kriteria Roostantia, dkk (1) dengan toleransi kesalahan (E) = 1 dan Z_{1-α/2} pada tingkat kepercayaan Z_{0,95} = 1,96. Dengan demikian setiap kadar analit diwakili oleh tiga sumuran mikroplat.

Persamaan 1.

$$N = \frac{(Z_{1-\alpha/2})^2 \cdot S^2}{E^2} \dots\dots\dots(1)$$

Pembuatan ekstrak

Daun benalu duku dilakukan penggilingan hingga halus dan diayak, selanjutnya ditimbang 400g dan dimaserasi dalam etanol 2,5 L selama 24 jam sambil diaduk-aduk. Dilakukan penyaringan dengan corong Buchner dan filtrat ditampung namun residu yang tertinggal dilakukan maserasi ulang dengan menambahkan 2,5 L etanol demikian seterusnya hingga 4 kali. Ekstrak yang diperoleh dilakukan pengeringan dengan *Rotavapour* hingga kental.

Sampel

Ekstrak kental hitam kehijauan dicuci dengan penambahan media sel RPMI sebanyak dua kali dari jumlah bobot ekstrak dan dikocok serta dilakukan sentrifugasi. Selanjutnya ekstrak kental ditimbang 10 mg dalam cawan arloji, segera dilakukan pembuatan stok sampel 100 ppm dalam media RPMI (tanpa FBS), selanjutnya dilakukan pembuatan seri konsentrasi 1, 3, 5, 10, 20 and 30 ppm. Larutan seri analit segera dilakukan sterilisasi dengan cara filtrasi (0,20 µm) dan sebagian (1 ml dimasukkan dalam media uji sterilitas Tioglikolat yang tersedia pada *test tube* 100ml).

Persiapan sel

Kultur sel dari lemari pendingin Revco (-80 °C), segera dilakukan *thawing* dan pencucian serta pasase pada Media RPMI + 10% FBS dalam botol Roux 500 ml hingga menghasilkan cukup banyak sel. Selanjutnya dilakukan pemanenan dan dilakukan penanaman 2 ml pada sumuran mikrotiterplat 24 sumuran serta diinkubasikan 24 jam. Khusus untuk uji sterilitas dilakukan penanaman 1 ml media sel pada Tioglikolat dalam *test tube* 100 ml. Pasca inkubasi dilakukan penghitungan sel dalam sumuran mikroplat secara aseptik, diawali dengan menggoncangkan mikroplate agar sel tak melekat ke dasar dan diambil 5 µl secara hati-hati. Selanjutnya dicampur dengan larutan metilen biru (1:1), segera diteteskan di

permukaan haemositometer Thoma dan dilakukan penghitungan dengan mikroskop cahaya (200x). Persyaratan jumlah sel pada sumuran mikroplat untuk siap dilakukan uji analit adalah mengandung minimum 2x10⁴ sel.ml⁻¹ (7). Bila telah memenuhi jumlah sel minimum, dilakukan pembagian pertigaan sumuran mikroplat untuk tiap kadar analit uji dan segera ditambahkan analit uji 100 µl serta diinkubasikan 48 jam (1,4). Khusus sumuran kontrol hanya ditambahkan 100 µl larutan RPMI. Pasca inkubasi dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya setiap sumuran dengan terlebih dahulu melakukan pengerokan setiap sumuran mikroplat dan dilakukan pengambilan 5 µl serta ditambahkan larutan metilen biru (1:1) dan dihitung dalam kamar penghitung Thoma (200x). Sel yang dihitung adalah sel Mieloma yang tak menyerap warna biru dan tidak keluar batas ruang penghitung Thoma. Selanjutnya dilakukan analisis penghambatan sel kultur dengan kriteria seperti tabel I, mengacu kriteria modifikasi Paul (7). Penetapan jumlah sel keseluruhan dalam satu sumuran mikroplat pasca 48 inkubasi pada media sel dan analit 2,1 ml = jumlah sel hidup hasil penghitungan dalam ruang penghitung Thoma x 42.

Analisis data

Hasil pengamatan akan dilakukan analisis komparasi antara jumlah sel pada sumuran mikroplat kelompok analit vs., kelompok kontrol pada signifikansi 0.05 dengan perangkat Minitab 13.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan 48 jam masa inkubasi tampak bahwa media sel maupun analit uji ternyata tetap steril (tampak pada media tioglikolat tidak menimbulkan warna keruh). Dengan demikian dapat dilakukan pengamatan lanjutan berupa penghitungan sel pada dua kelompok sumuran analit vs., kontrol seperti tampak pada Tabel 2. Pada Gambar 1, tampak jelas bahwa salah satu sumuran pemberian analit ekstrak etanol 30 ppm menghasilkan daya antiproliferatif dibandingkan terhadap Gambar 2 dimana merupakan salah satu sumuran sel kontrol.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun benalu duku 22 ppm menghasilkan daya penghambat pertumbuhan sel Mieloma (respon 100%, p<0.05). Temuan tersebut didasarkan hasil perbandingan dengan jumlah sel kontrol. Kemampuan antiproliferatif ekstrak etanol daun Benalu duku (20 ppm) jauh lebih rendah dibandingkan ekstrak kloroform daun Benalu duku dimana pada kadar 10 ppm telah memperlihatkan daya antiproliferatif(4).

Secara laboratoris terdapat substansi dari daun benalu duku pemberi kontribusi fenomena antiproliferatif

Tabel I. Kriteria pengamatan daya hambat sel

Mikroplat 24 sumuran pada 2 ml media		
Jumlah sel hidup tiap ml media	Kriteria	Tanda
> 1,00 • 10 ⁵	Tak terjadi hambatan	-
0,95-1,00 • 10 ⁵	Terjadi hambatan ringan	+/-
< 0,95 • 10 ⁵	Terjadi hambatan	+

Tabel II. Hasil pengamatan analit 1 ppm hingga 30 ppm terhadap pertumbuhan kultur sel mieloma

Analisis sel Mieloma (tiap 2,1 ml media dan analit) pengamatan 48 jam pascaperlakuan					
Analit Kadar (µg/ml)	Etanol	Kontrol	Hasil	P*	Respon (%)
1,100	1,76.10 ⁵	1,77.10 ⁵	-	p>0,05	0
	1,84.10 ⁵	1,88.10 ⁵	-		
	1,82.10 ⁵	1,84.10 ⁵	-		
3.300	1,79.10 ⁵	1,80.10 ⁵	-	p>0,05	0
	1,77.10 ⁵	1,78.10 ⁵	-		
	1,81.10 ⁵	1,83.10 ⁵	-		
5,500	1,80.10 ⁵	1,81.10 ⁵	-	p>0,05	0
	1,81.10 ⁵	1,79.10 ⁵	-		
	1,78.10 ⁵	1,80.10 ⁵	-		
11,000	1,71.10 ⁵	1,83.10 ⁵	-	p>0,05	0
	1,74.10 ⁵	1,98.10 ⁵	-		
	1,76.10 ⁵	1,86.10 ⁵	-		
22,000	5,8.10 ⁴	2,10.10 ⁵	+	p<0,05	100
	4,5.10 ⁴	2,20.10 ⁵	+		
	3,8.10 ⁴	2,30.10 ⁵	+		
33,000	2,76.10 ⁴	1,90.10 ⁵	+	p<0,05	100
	2,64.10 ⁴	2,10.10 ⁵	+		
	2,12.10 ⁴	1,80.10 ⁵	+		

* Uji t dua sampel bebas pada signifikansi 0,05

diantaranya adalah asam amino. Asam amino di maksudkan adalah L-asparagin, L-treonin, L-serin, L-glutamin, glisin, L-alanin, L-sistein, L-valin, L-metionin, L-isoleusin, L-leusin, L-tirosin, L-fenilalanin, L-lisin, L-histidin, L-arginin, L-prolin, L-hidroksiprolin, L-hidroksilisilisin (8). Bila menganalogikan kandungan umumnya tumbuhan parasit seperti halnya daun benalu duku, maka diperkirakan terdapat dua unsur dengan potensi antiproliferatif yaitu misteletin (glikoprotein dengan ciri khusus pada hidrat arang) dan viskotoksin (suatu polipeptida dengan berat molekul rendah) (9). Keberadaan substansi tersebut dalam kajian menggunakan perangkat FT-IR pita serapan diperkirakan dapat diidentifikasi pada bilangan gelombang u rentang 2926,28-2854,9 cm⁻¹ (merupakan vibrasi ulur gugus C-H alkana). Demikian pula u pada 1736,09 cm⁻¹ yang merupakan vibrasi ulur gugus C= aldehida dan u rentang 1602,99-1658,93 cm⁻¹ yang merupakan gugus C= alkena, N-H (intensitas tajam). Pita serapan diperkirakan juga bakal ditemui pada bilangan gelombang 1496,9 cm⁻¹ (merupakan vibrasi ulur gugus aromatik). Pita serapan akhir dapat pula ditemui pada bilangan gelombang 1060,94 hingga 1359,94 cm⁻¹ dan merupakan vibrasi ulur gugus C-H amina, C-O, asam, karboksilat dan ester (10).

Substansi terlarut dalam etanol diperkirakan melakukan aktivitas antiproliferatif melalui gangguan asam inti di bagian mitokondria sel Mieloma yang akhirnya mendorong terjadinya gangguan aktivitas respirasi sel

(11). Unsur tersebut hingga saat ini masih belum diketahui, namun diperkirakan merupakan unsur yang dikenal sebagai substansi mistelektin dan viskotoksin *like effect* (4).

KESIMPULAN

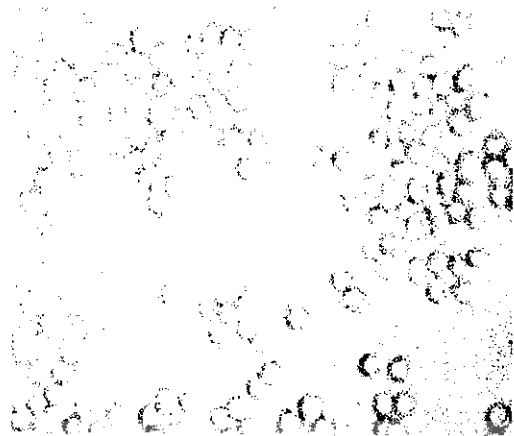
Ekstrak etanol dari daun Benalu duku ternyata (a) mampu menghambat proliferasi kultur sel Mieloma (p<0.05), dan (b) kemampuan hambat ditemukan pada kadar 22 ppm terhadap sel mieloma dalam RPMI pasca 48 jam inkubasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

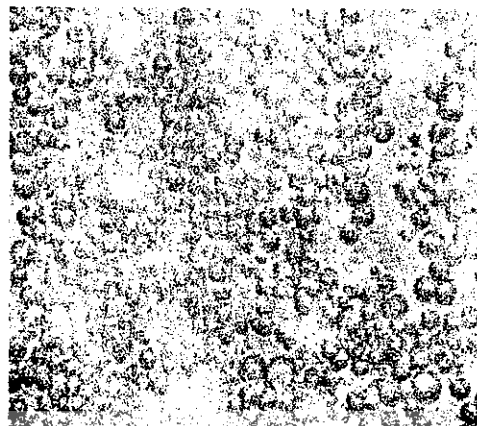
Penulis menyampaikan terima kasih kepada : 1. Hari Besar, Drh., MS sebagai Kepala Pusat Veterina Farma, DitJenNak, DEPTAN RI, dan 2. Drh. Nurul Komariah sebagai Kepala Lab. Produksi Vaksin rabies, serta 3. Drh. Panca sebagai staf produksi vaksin rabies yang mempersilahkan penulis untuk melakukan riset di tempat tersebut.

DAFTAR RUJUKAN

- Roostantia I. Lazuardi M. Ratna SM. 2000. Perbandingan daya hambat pertumbuhan sel mieloma antara maserasi benalu duku dan benalu teh dengan metotreksat. *Ebers papyrus* 6(1), 13-21.
- Nuraini F. Lazuardi M. Farida S. 2000. The study of anti cancer effect of Benalu duku (*Loranthaceae*



Gambar 1. Kultur sel mieloma yang diberi Ekstrak etanol daun benalu duku (perbesaran 200 X)



Gambar 2. Kultur sel mieloma (perbesaran 200 X)

- dendrophthoe species*) infusion to the myeloma induced rat. *Jurnal Kedokteran YARSI* 8(1), 59-81.
- Nuraini F. 2006. Studi kepulihan tikus (*Rattus Norvegicus strain wistar*) penderita kanker pasca pemberian Benalu duku (*Loranthaceae dendrophthoe species*). Dalam : *Seminar Nasional Kontribusi Herbal Medicina dan Akupuntur dalam dunia kedokteran Yogyakarta* 5 Agustus 2006, Yogyakarta: Bagian Farmasi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dan Badan Pengurus Pusat Perhimpunan Farmasi-Kedokteran Indonesia (BPP PEFARDI).
 - Lazuardi M. 2007. Aktifitas antiproliferatif ekstrak kloroform Benalu duku (*Loranthaceae dendrophthoe species*) terhadap sel kanker. *Jurnal Oftalmologi Indonesia* 5 (1), 65-69.
 - Arifa M., Ratna SM. Roostantia I. 2005. Pengaruh Pemberian Infusum Benalu Duku (*Loranthaceae Dendrophthoe spec*) terhadap kadar Transaminase Serum dan Nekrosis Jaringan hati Tikus. *Laporan Penelitian Medical Research unit*. Fakultas Kedokteran Universitas. Airlangga.
 - World Health Organization. 1999. *Health Research Methodology: A Guide for Training in Research Methods*. Basel, Switzerland: World Health Organization.
 - Paul J. 2005. *Cell and Tissue Culture*. 10th ed. UK: Aberdeen University Press.
 - Ratna SM., Lazuardi M., Roostantia I. RM Teguh Wahyudi. 2006. The Amino Acid Surveillance of Benalu duku leaf extract (*Loranthaceae dendrophthoe spec.*). *Laporan Penelitian PNPB 2006/2007 Universitas Airlangga*. Surabaya : Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Airlangga.
 - Hahn P. 2000 Apoptoseinduzierende und Antimutagene Wirkung von *Viscum album L.* auf Humane Zellkulturen. *Dissertation*. Denmark: Universität Kaiserslautern.
 - Arifa M., Roostantia I., Ratna SM. 2007. Identifikasi gugus fungsional ekstrak Benalu duku (*Loranthaceae dendrophthoe spec.*). *Laporan Penelitian Medical Research Unit FK UNAIR 2006/2007*. Surabaya: Medical research Unit, Fakultas Kedokteran Univ. Airlangga.
 - Giuliani NS., Bonomini PR., Lazzareti M. Colla SF. Morandi Taqliaferri SF. Ammunziato M. Crugnola. Rizoli V. 2006. CXCR3 and its binding chemokines in Myeloma cell: expression of isoforms and potensial relationships with Myeloma cell proliferation cell and survival. *Haematologica*; 91(11), 1490-1497.