

# LAPORAN PENELITIAN

**PENGEMBANGAN FORMULA HERBAL ANTI-KANKER**  
**DARI OBAT TRADISIONAL KAYU TUJUH LAPIS (*Loranthus* Sp.),**  
**CAKAR AYAM (*Selaginella tamariscina*) DAN**  
**TEMU LAWAK (*Curcuma xanthorrhiza*).**  
**(FASE 1)**

**PROGRAM INSENTIF RISET TERAPAN**

**Fokus Bidang Prioritas: 6. Teknologi Kesehatan dan Obat**

**Kode Produk Target: 2.04**

**Kode Kegiatan: 2.04.10**

**Peneliti Utama: Ir. Yuli Widiyastuti, MP**

**DEPARTEMEN KESEHATAN RI**  
**BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN**  
**BALAI BESAR LITBANG TANAMAN OBAT DAN OBAT TRADISIONAL**

# LAPORAN PENELITIAN

**PENGEMBANGAN FORMULA HERBAL ANTI-KANKER  
DARI OBAT TRADISIONAL KAYU TUJUH LAPIS (*Loranthus Sp.*),  
CAKAR AYAM (*Selaginella tamariscina*) DAN  
TEMU LAWAK (*Curcuma xanthorrhiza*).  
(FASE 1)**

**PROGRAM INSENTIF RISET TERAPAN**

**Fokus Bidang Prioritas: 6. Teknologi Kesehatan dan Obat**

**Kode Produk Target: 2.04**

**Kode Kegiatan: 2.04.10**

**Peneliti Utama: Ir. Yuli Widiyastuti, MP**

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan	
PERPUSTAKAAN A	
Tanggal :	15 - 3 - 2013
No. Induk :	
No. Klasifikasi :	139 Lit

**DEPARTEMEN KESEHATAN RI  
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN  
BALAI BESAR LITBANG TANAMAN OBAT DAN OBAT TRADISIONAL**

## Lembar pengesahan

Judul Penelitian : Pengembangan Formula Herbal Anti-Kanker Dari Obat Tradisional Kayu Tujuh Lapis (*Loranthus* Sp.), Cakar Ayam (*Selaginella tamariscina*) Dan Temu Lawak (*Curcuma xanthorrhiza*) (Fase I).

Fokus Bidang Prioritas (pengusul wajib melingkari satu bidang yang sesuai):

1. Ketahanan pangan
2. Sumber energi baru dan terbarukan
3. Teknologi dan manajemen transportasi
4. Teknologi informasi dan komunikasi
5. Teknologi pertahanan dan keamanan
6. Teknologi kesehatan dan obat

Kode Produk Target : 2.04  
Kode Kegiatan : 2.04.10  
Lokasi Penelitian : Tawangmangu, Yogyakarta  
Penelitian tahun ke : 1

Keterangan Lembaga Pelaksana/Pengelola Penelitian	
<b>A. Lembaga Pelaksana Penelitian</b>	
Nama Koordinator /Peneliti Utama	Ir. Yuli Widiyastuti, MP
Nama Lembaga/Institusi	Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Badan Litbangkes, Depkes
Unit Organisasi	KPP Tanaman Obat
Alamat	Jl. Lawu no 11 Tawangmangu
Telepon/Faksimile/e-mail	y_widi@gmail.com

Jangka Waktu Kegiatan : 1 tahun  
Biaya Tahun-1 : Rp 250.000.000,-  
Biaya Tahun-2 : .....  
Total Biaya : Rp 250.000.000,-  
Kegiatan (baru/lanjutan) : Baru

Rekapitulasi Biaya Tahun yang diusulkan:

No	Uraian	Jumlah Rp
1	Gaji dan Upah	69.600.000
2	Bahan Habis Pakai	147.850.000
3	Perjalanan (tidak untuk perjalanan luar negeri)	20.800.000
4	Lain-lain	16.750.000
	<b>Jumlah biaya tahun yang diusulkan</b>	<b>250.000.000</b>

Kepala  
Lembaga/Institusi,

Mengetahui/menyetujui:  
Pimpinan  
Mitra Pemda/Lembaga Lain,

Koordinator/  
Peneliti Utama,



Indah Yuning Prapti, SKM., M.Kes

Ir. Yuli Widiyastuti, MP

## RINGKASAN

Kanker berada pada urutan ke dua penyebab kematian di dunia setelah penyakit jantung; menurut American Cancer Society, 25% kematian di Amerika disebabkan kanker, pada tahun 2007 diperkirakan 559.650 atau sekitar 1500 per hari warga Amerika meninggal karena kanker. Jenis kanker yang paling banyak diderita wanita adalah kanker payudara (26% dari seluruh kasus kanker), dan 15% dari kasus tersebut berakhir dengan kematian (Jemal *et al.*, 2007) Pengembangan terapi yang komprehensif untuk mengatasi kanker payudara sangat diperlukan untuk menekan jumlah kematian penderita. Pengembangan terapi ini diharapkan juga mampu mengatasi resistensi terhadap agen kemoterapi konvensional yang telah ada saat ini.

Resistensi terhadap agen kemoterapi merupakan suatu peristiwa yang sering terjadi pada sel kanker. MCF-7 adalah salah satu model sel kanker payudara yang telah mengalami resistensi terhadap beberapa agen kemoterapi termasuk doxorubicin (Simstein *et al.*, 2003). Terapi kombinasi (kokemoterapi) doxorubicin dengan suatu agen kemopreventif merupakan suatu alternatif untuk mengatasi resistensi, meningkatkan efikasi dan mengurangi efek toksik. Berdasarkan hal tersebut maka akan dilakukan penelitian pengembangan herbal anti kanker dari ramuan obat tradisional. Dari hasil penelitian etnofarmakologi di daerah Taman Nasional Kerinci Seblat Bengkulu, ditemukan ramuan anti-kanker yang telah digunakan oleh seorang batra selama berpuluh tahun dan dinyatakan secara empiris memiliki manfaat dalam pengobatan kanker. Ramuan tradisional tersebut memiliki potensi yang sangat besar untuk dikembangkan sebagai formula herbal antikanker baru.

Sehubungan dengan itu dilakukan penelitian pengembangan herbal anti kanker payudara dari obat tradisional Kayu tujuh lapis (*Loranthus* Sp.), cakar ayam (*Selaginella tamariscina*) dan temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental dan observasi, yang dilaksanakan di laboratorium B2P2TO2T. Tahap pertama adalah uji sitotoksik formula herbal pada cell line MCF-7 baik tunggal maupun kombinasi dengan doxorubicin. Spektrum toksisitas ramuan herbal tersebut ditegakkan dengan uji toksisitas akut dan subkronis terhadap tikus putih galur SD. Jika formula ini potensial untuk dikembangkan maka dilanjutkan penelitian tahap selanjutnya yaitu uji antikanker pada binatang dilanjutkan observasi klinik. Hasil yang diharapkan adalah ditemukan alternatif pengobatan kanker dari obat herbal tradisional yang terbukti aman, bermutu dan berkhasiat.

Dari hasil penelitian diketahui bahwa dari berbagai golongan kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak dimungkinkan memiliki potensi sebagai antikanker, namun hal itu perlu dikaji lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa yang bertanggungjawab sebagai antikanker, penelitian tentang keamanan terhadap sel normal juga perlu dilakukan untuk menjamin keamanan formula sebagai obat.

Hasil uji toksisitas kronik dan sub-kronik formula anti-kanker dari tanaman kayu tujuh lapis, cakar ayam dan temu lawak tidak menunjukkan adanya efek toksis pada hewan coba. Dan dari uji ke cell-line memiliki efek penghambatan terhadap pertumbuhan sel kanker. Sehingga dapat disimpulkan bahwa formula kayu tujuh lapis, cakar ayam dan temu lawak, memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen antikanker. Untuk mengetahui senyawa-senyawa yang berperan dalam aktifitas tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

## DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman judul .....	i
Halaman pengesahan .....	ii
Ringkasan .....	iii
Daftar Isi .....	v
Daftar Tabel .....	vi
Daftar Gambar .....	vii
BAB I Pendahuluan .....	1
BAB II Tinjauan Pustaka .....	3
BAB III Tujuan dan Manfaat .....	6
BAB IV Metodologi .....	7
BAB V Hasil dan Pembahasan .....	13
BAB VI Kesimpulan dan Saran .....	22
Daftar Pustaka .....	23

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Rasio kadar kombinasi yang digunakan dalam penelitian .....	9
Tabel 2. Interpretasi nilai CI .....	12
Tabel 3. Hasil uji kandungan golongan kimia tanaman temulawak, cakar ayam dan kayu tujuh lapis .....	13
Tabel 4. Purata kadar SGPT dan SGOT serum pada tikus uji subkronis Formula 3 .....	17
Tabel 5. Purata kadar ureum dan kreatinin serum pada tikus uji subkronik formula 3 .....	18

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Profil kromatogram ekstrak temu lawak tunggal (i) dan formula (ii) .....	14
Gambar 2. Profil kromatogram ekstrak cakar ayam tunggal (i) dan formula (ii) .....	14
Gambar 3. Profil kromatogram ekstrak kayu tujuh lapis tunggal (i) dan formula (ii) .....	15
Gambar 4. Organ hati tikus tanpa perlakuan dan dengan perlakuan .....	16
Gambar 5. Organ ginjal tikus tanpa perlakuan dan dengan perlakuan .....	18
Gambar 6. Morfologi sel kanker payudara T47D dan MCF-7 .....	20
Gambar 7. Grafik hubungan presentase kehidupan sel kanker payudara MCF7 versus konsentrasi formula ekstrak etanolik anti-kanker.....	20
Gambar 8. Grafik hubungan presentase kehidupan sel kanker payudara T47D versus konsentrasi formula ekstrak etanolik anti-kanker.....	21

## **BAB I PENDAHULUAN**

Saat ini pola hidup manusia telah berubah sejalan dengan kemajuan teknologi dan tingginya ambang polusi yang terjadi di udara, tanah dan air menyebabkan paparan zat-zat oksidatif terhadap manusia semakin besar. Hal tersebut ternyata diketahui sebagai salah satu pencetus terjadinya penyakit kanker, yaitu suatu penyakit yang ditandai dengan terjadinya pertumbuhan sel-sel yang abnormal yang mampu menyusup ke jaringan normal sehingga mempengaruhi fungsi tubuh.

Kanker merupakan penyakit yang menjadi pembunuh nomor 2 di Amerika dan di Indonesia prevalensinya semakin meningkat dari waktu ke waktu. Meskipun bukan penyebab kematian yang utama kanker menjadi penyakit yang sangat ditakuti karena diketahui sulit ditangani dengan tingkat keberhasilan pengobatan yang rendah, apalagi jika diketahui sudah dalam stadium lanjut. Kegagalan pengobatan penyakit kanker selain karena diketahui setelah stadium lanjut juga karena belum ditemukannya teknik pengobatan dan obat yang tepat untuk setiap jenis kanker. Sampai saat ini, pengobatan kanker yang efektif dan efisien belum juga ditemukan (Sugiyanto *et al.*, 2003), sehingga para peneliti memberikan perhatian besar pada penelitian obat antikanker. Tren masyarakat untuk *back to nature* banyak memotivasi para peneliti dalam usaha pencarian obat kanker dari senyawa-senyawa alam, karena kenyataannya memang belum ada obat kanker yang benar-benar selektif sebagai antikanker (Sugiyanto *et al.*, 2003). Negara Indonesia adalah negara yang mempunyai kekayaan alam melimpah, termasuk diantaranya adalah keanekaragaman hayati. Kekayaan ini bila mampu dikembangkan secara maksimal akan memiliki potensi tinggi untuk menunjang ilmu pengetahuan. Beberapa penelitian melaporkan bahwa bahan-bahan dari tanaman ternyata memiliki potensi sebagai regulator negatif onkogen dan regulator positif gen tumor suppressor, sehingga berpotensi sebagai antikanker (Cardenas, *et al.*, 1998). Potensi tanaman ini diharapkan juga bisa dikembangkan lebih lanjut dalam mengatasi resistensi terhadap senyawa kemoterapi konvensional.

Resistensi terhadap agen kemoterapi merupakan suatu peristiwa yang sering terjadi pada sel kanker. MCF-7 adalah salah satu model sel kanker payudara yang telah mengalami resistensi terhadap beberapa agen kemoterapi termasuk doxorubicin (Simstein *et al.*, 2003). Terapi kombinasi (kokemoterapi) doxorubicin dengan suatu agen kemopreventif merupakan suatu alternatif untuk mengatasi resistensi, meningkatkan efikasi dan mengurangi efek toksik. Salah satu agen kemoterapi yang digunakan dalam pengobatan kanker payudara

adalah doxorubicin; suatu antibiotik golongan anthrasiklin generasi pertama dengan spektrum aksi kemoterapi yang cukup luas (Bapsy *and* Sahoo, 2004). Doxorubicin dapat berinterkalasi dengan DNA sehingga menghambat replikasi dan transkripsi DNA menjadi RNA (Siu *and* Moore, 2005). Doxorubicin memiliki beberapa efek samping yang tidak diinginkan, terutama terkait dengan toksisitas jantung (*cardiotoxic*). Kardiotoksitas doxorubicin berkorelasi positif dengan dosis kumulatif yang diberikan sehingga efektivitas pemanfaatan doxorubicin terbatas oleh dosis dan lama pemberian (Singal *et al.*, 2001; Schlattner *et al.*, 2006).

Di masyarakat Indonesia, terutama yang tinggal di daerah terpencil, telah berkembang suatu teknik pengobatan tradisional untuk menyembuhkan kanker yang sudah diketahui secara empiris banyak memberikan manfaat untuk pengobatan kanker. Teknik pengobatan tradisional tersebut umumnya berupa pemberian ramuan yang berasal dari tumbuhan obat yang tumbuh liar di hutan. Berdasarkan hasil penelitian etnofarmakologi yang telah dilakukan di sekitar daerah Taman Nasional Kerinci Seblat, diketahui ada ramuan obat tradisional yang digunakan oleh seorang Battrra untuk mengobati kanker. Praktek pengobatan kanker dengan ramuan tersebut telah berlangsung puluhan tahun, dan berdasarkan informasi empiris ramuan tersebut benar-benar bermanfaat dalam upaya pengobatan kanker. Ramuan obat tradisional terdiri dari campuran tanaman obat Kayu tujuh lapis (*Loranthus* Sp.), cakar ayam (*Selaginella tamariscina*) dan temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*). Namun sejauh ini ramuan tersebut belum pernah dilakukan uji praklinik apalagi uji klinik untuk membuktikan tentang efektivitasnya sebagai herbal anti-kanker ataupun sebagai suplemen pengobatan kanker. Untuk mengembangkan ramuan tersebut sebagai obat anti kanker akan dilakukan penelitian melalui pendekatan etnomedisin dan observasi klinik dengan intervensi di laboratorium litbang obat tradisional B2P2T02T.

## **BAB II TINJAUAN PUSTAKA**

### **A. Kanker**

Penyakit Kanker (*neoplasma*) merupakan salah satu penyakit penyebab kematian utama di dunia. Pada tahun 2005 jumlah kematian akibat penyakit kanker mencapai 58 juta jiwa. Menurut data WHO (2005), jenis kanker yang menjadi penyebab kematian terbanyak adalah kanker paru (mencapai 1,3 juta kematian pertahun), disusul kanker lambung (mencapai lebih dari 1 juta jiwa pertahun), kanker hati (sekitar 662.000 kematian pertahun), kanker usus besar (655.000 kematian pertahun), dan yang terakhir yaitu kanker payudara (502.000 kematian pertahun).

Sedikitnya 1,2 juta jiwa di Amerika Serikat didiagnosa menderita kanker setiap tahunnya. Akan tetapi incidence rate lebih banyak terjadi di negara berkembang (Smeltzer & Bare, 2001). Indonesia sebagai salah satu negara berkembang dengan prevalensi rate penyakit kanker yang cukup tinggi. Di wilayah ASEAN, Indonesia menempati urutan kedua setelah Vietnam dengan kasus penyakit kanker mencapai 135.000 kasus pertahun (WHO, 2005). Data tersebut hampir sama dengan yang disampaikan oleh Pusat Data dan Informasi (Pusdatin) Departemen Kesehatan RI (2004) yang menyebutkan prevalensi penyakit kanker mencapai 100 ribu pertahun. Di Indonesia penyakit ini menjadi penyebab kematian kedua setelah penyakit jantung.

Menurut Persatuan Ahli Bedah Onkologi Indonesia (PABOI) (2005), penatalaksanaan/pengobatan utama penyakit kanker meliputi empat macam yaitu pembedahan, radioterapi, kemoterapi dan hormoterapi. Pembedahan dilakukan untuk mengambil "massa kanker" dan memperbaiki komplikasi yang mungkin terjadi. Sementara tindakan radioterapi dilakukan dengan sinar ionisasi untuk menghancurkan kanker. Kemoterapi dilakukan untuk membunuh sel kanker dengan obat anti-kanker (sitostatika). Sedangkan hormonerapi dilakukan untuk mengubah lingkungan hidup kanker sehingga pertumbuhan sel-selnya terganggu dan akhirnya mati sendiri (Rama, D., 2007).

Kanker bisa terus menjadi penyakit yang mematikan, karena derasnya arus industrialisasi dan adopsi gaya hidup tidak sehat. Untuk itu dalam proses penanggulangan kanker harus memperhatikan faktor resiko sebagai pencetusnya. Dalam banyak kasus, deteksi dini dan upaya preventif lebih efektif dalam pencegahan dan penanggulangan penyakit kanker secara dini, karena pada tahap awal kanker lebih mudah disembuhkan dari pada setelah mencapai stadium lanjut.

## B. Herbal untuk anti-kanker

Kanker merupakan penyakit yang sulit disembuhkan apalagi jika kanker sudah mencapai tahap metastase. Sehingga banyak pengobatan meskipun sudah diberikan secara komprehensif mengalami kegagalan. Di banyak wilayah di Indonesia berkembang klinik-klinik ataupun praktek pengobatan tradisional yang menyatakan mampu memberikan pengobatan kanker pada tahap ini. Sistem pengobatan di klinik pengobatan tradisional umumnya menggabungkan beberapa macam teknik antara lain pijat, akupunture dan herbal.

Sebenarnya banyak informasi yang telah disebarkan mengenai khasiat atau kegunaan suatu tanaman sebagai anti-kanker. Namun sangat sedikit dari tanaman-tanaman tersebut yang sudah dilakukan uji khasiat dan keamanannya sebagai obat kanker. Salah satunya adalah temu lawak, kunyit, taxus, rumput mutiara dan cakar ayam. Dari penelitian etnofarmakologi ke Taman Nasional Bukit Barisan Selatan yang dilakukan pada tahun 2007 (Fauzi, 2008), diketahui beberapa tanaman obat yang digunakan oleh masyarakat lokal untuk pengobatan kanker, antara lain kayu tujuh lapis, pinang fuji, simbar otak, mamayu duduk dan lain sebagainya.

Tanaman temu lawak secara empirik banyak digunakan sebagai obat dalam bentuk tunggal maupun campuran untuk mengatasi gangguan-gangguan saluran cerna, gangguan aliran getah empedu, sembelit, radang rahim, kencing nanah, mencret, kurang nafsu makan, kelebihan berat badan, radang lambung, cacar iar, eksema, jerawat dan sebagainya. Beberapa penelitian lanjut mengenai kandungan senyawa aktif temulawak dan uji bioaktivitasnya menunjukkan efek sebagai anti-kanker. Senyawa yang diduga bertanggung jawab pada aktivitas anti-kanker adalah curcuminoid. Namun pada penelitian lain, *Xanthorrhizol*, sebagai senyawa identitas dari temu lawak, memiliki aktivitas antioksidan dan antimutagenik lebih baik dari pada kurkumin (Park, et al., 2003). Dengan *Ames test*, pada kadar 10 nM/plate menghambat mutagenesis 64% sel *Salmonella thypimurium* yang diinduksi oleh hidrogen peroksida. Uji *in vivo* pada tumor yang diinduksi DMBA dilaporkan bahwa sekitar 50% mencit tidak terbentuk tumornya dengan pemberian 6  $\mu$ mol pertopikal selama 19 minggu (Hideji, I., 1985).

Senyawa aktif tanaman obat yang juga banyak diteliti bioaktivitasnya dan memiliki indikasi sebagai anti-tumor adalah flavonoid. *Sellaginella* (cakar ayam) adalah tanaman obat dari kelas Pteridophyta yang banyak diteliti kandungan senyawa aktifnya dan diuji bioaktivitasnya. Secara tradisional herba cakar ayam telah lama digunakan dalam mengatasi berbagai gangguan kesehatan antara lain dalam bentuk dekok digunakan untuk mengatasi

gejala hepatitis, tuberkulosis, tumor dan diabetes. Amentoflavone dan ginkgetin, merupakan flavonoid yang ditemukan dalam herba cakar ayam yang diketahui mampu menghambat aktivitas neuroprotektif dalam melawan efek samping senyawa sitotoksik. Temuan ini mengindikasikan bahwa herba cakar ayam dapat digunakan dalam pengobatan penyakit degeneratif syarat seperti stroke dan Alzheimer's (Kang, et.al., 2005). Senyawa flavonoid lainnya adalah mangiferine yang menunjukkan aktivitas sebagai anti-virus dan anti-tumor secara in vivo. Mangiferin meningkatkan kemampuan alamiah sistem imun untuk membunuh sel kanker dan juga menunjukkan efek menghambat pada HIV (Guha, et al., 1996).

Nalawade *et al* (2003) melaporkan bahwa camptothecin suatu monoterpen indole alkaloid memiliki aktifitas antitumor, bahkan dua senyawa turunannya yaitu Irinotecan and topotecan telah disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) untuk terapi kanker kolorektal dan ovarium. OSW-1 yang termasuk dalam golongan saponin juga dilaporkan memiliki aktifitas sitotoksik terhadap berbagai sel tumor seperti leukemia HL-60, mouse mastocarcinoma, human pulmonary adenocarcinoma, berbagai sel carcinoma dan squamous cell carcinoma termasuk adriamycin-resistant dan camptothecin-resistant cell lines ( Morzycki *et al*, 2004)

Senyawa flavonoid dan terpenoid diketahui memiliki aktivitas antitumor (Mathivadhani *et al.*, 2007, Kampa *et al.*, 2004). Ren *et al* (2003), melaporkan bahwa flavonoid dapat menghambat kinerja dari semua Cdk yang merupakan regulator daur sel. titik kerja dari flavonoid diperkirakan terletak pada penghambatan kerja enzim *Cdk-Activating Kinase* (CAK) sehingga menghambat terbentuknya kompleks Cdk-Cyclin yang aktif. Flavonoid dapat berikatan dengan protein-protein kinase *ATP-binding* sitenya (Pan, 2002).

Pada penelitian inventarisasi tanaman obat di Taman Nasional Bukit Barisan Selatan, diketahui berdasarkan survei etnobotani-medis, ada tanaman obat yang digunakan sebagai ramuan anti-kanker. Menurut keterangan Battrra yang disurvei tanaman tersebut disebut kayu tujuh lapis dan atas hasil determinasi berdasarkan ciri-ciri morfologi yang diamati tanaman tersebut masuk ke famili Loranthaceae. Tanaman tersebut tumbuh soliter di tebing-tebing di pinggir hutan atau di perkebunan. Dengan berdasarkan pada hasil data etnobotani medis maka dilakukan penelitian lanjutan untuk memastikan aktivitasnya secara in-vitro sebagai herba anti-kanker.

### **BAB III**

#### **TUJUAN DAN MANFAAT**

##### **Tujuan**

Tujuan penelitian ini adalah mengeksplorasi potensi formula herbal yang terdiri dari kayu tujuh lapis, temulawak dan cakar ayam sebagai alternatif pengobatan kanker payudara.

##### **Manfaat**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menciptakan formula herbal antikanker yang aman dan berkhasiat sehingga dapat berkontribusi dalam pengobatan anti kanker terutama kanker payudara

## BAB IV METODOLOGI

### a. Tempat

Penelitian akan dilakukan di laboratorium sistematika, fitokimia dan galenika serta laboratorium eksperimental Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional.

### b. Waktu Penelitian

Maret – Desember 2010

### c. Pengambilan sampel

Sel line kanker payudara MCF7 dari Lab. Parasitologi Fak. Kedokteran UGM

Tikus putih jantan galur SD umur 2 bulan berat 200 – 300 gram dari UPHP Fak. KH UGM.

**Uji toksisitas akut:** dilakukan pada formula herbal, tikus dibagi menjadi 3 kelompok; masing-masing terdiri dari 10 ekor tikus putih galur SD umur sekitar dua bulan BB 150-200 gram.

**Uji toksisitas subkronis:** dilakukan pada formula paling poten, dibagi menjadi 3 kelompok; masing-masing terdiri dari 10 ekor tikus putih galur SD umur sekitar satu bulan BB 100 gram.

### d. Penentuan Unit Analisis

### e. Cara dan instrumen Pengumpulan Data

#### **Bahan:**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Kayu tujuh lapis (*Loranthus Sp.*), cakar ayam (*Selaginella tamariscina*) dan temulawak (*Curcuma xanthoriza*), heksan, etilasetat, asam asetat, toluol, butanol, lempeng silica gel GF 254.

**Untuk uji sitotoksik** digunakan cell line T47D dan MCF7; DMEM, aquabides, media penumbuh mengandung growth factor 10% *fetal bovine serum* (FBS), 2% antibiotik penicillin-streptomisin, DMSO, Natrium karbonat, kertas saring 0,2 $\mu$ m, tripsin, Phospat Buffer saline (PBS), larutan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromida (MTT), larutan 10% sodium dodecyl sulphate (SDS), isopropanol, asam asetat, doxorubicin

**Alat** yang digunakan adalah oven, seperangkat alat maserasi, dan alat-alat gelas pada umumnya. Alat uji antikanker adalah elektroforesis, Spektrofotometer UV, mikroskop fluoresens, mikroskop inverted, ELISA reader, vorteks.

Prosedur kerja rinci dari tiap kegiatan adalah sebagai berikut:

- **Determinasi tanaman, pengumpulan dan pengeringan bahan**

Determinasi dan penyimpanan *voucher specimen* dilakukan di Balai Besar Litbang Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu.

Bahan tanaman yang digunakan adalah Kayu tujuh lapis (*Loranthus Sp.*), cakar ayam (*Seaginella tamariscina*) dan temulawak (*Curcuma xanthoriza*). Bahan dicuci dengan air yang mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, kemudian diangin-anginkan dilanjutkan pengeringan di dalam oven suhu 50°C. Simplisia kemudian diserbuk menggunakan grinder.

- **Pembuatan ekstrak dan identifikasi kandungan kimia**

Rimpang temu lawak kebun budidaya di Karangpandan, herba cakar ayam diperoleh dari lereng Gunung Lawu, sedangkan akar kayu tujuh lapis diperoleh dari yang diperoleh dari Bengkulu, dikeringkan dengan oven kemudian diserbuk dan diayak untuk memperoleh ukuran yang homogen. Serbuk yang diperoleh kemudian dimaserasi dengan penyari etanol 70% selama 3 x 24 jam. Ekstrak yang diperoleh kemudian dikeringkan dengan *spray dryer* di Laboratorium PT. Java Plant Naturindo. Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya golongan kandungan kimia dalam daun dewandaru. Deteksi adanya alkaloid dilakukan dengan uji Mayer, Wagner dan Dragendorff. Uji tannin dan polifenol dilakukan dengan penambahan reagen FeCl<sub>3</sub> dan garam gelatin, adanya saponin dideteksi dengan uji buih dan ditegaskan dengan penambahan asam asetat anhidrat dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Uji Kardenolin dan Bufadienol menggunakan 3 metode yaitu metode Keller Killiani, metode Lieberman-Burchard dan metode Kedde. Uji flavonoid dilakukan dengan metode Bate Smith-Metchalf. dan metode Wilstater. Uji antrakuinon dilakukan dengan uji Brontrager dan uji Brontrager termodifikasi (Harborne, 1996).

Formula herbal dibuat dengan mencampur ekstrak dengan perbandingan 1:1:1 hingga homogen. Larutan untuk uji sitotoksik selalu dibuat baru dengan melarutkan 10,0 mg formula dalam 150µl DMSO. Selanjutnya untuk uji sitotoksik tunggal dibuat seri konsentrasi ekstrak: 200, 175, 150, dan 125, 100, 75, dan 50 µg/mL menggunakan media kultur. Larutan uji doxorubicin dibuat dari pengenceran sediaan 2mg/ml sehingga diperoleh seri konsentrasi 115-1150 nM dalam media kultur. Pembuatan larutan uji

dilakukan di dalam LAF. Uji kombinasi antara formula dengan doxorubicin menggunakan acuan konsentrasi  $IC_{50}$  yang diperoleh dari uji sitotoksik tunggal.

▪ **Uji Sitotoksik tunggal dan kombinasi dengan doxorubicin terhadap sel MCF7**

Uji ini dilakukan terhadap formula herbal dengan berbagai tingkat konsentrasi dengan menggunakan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromida seperti dikemukakan pertama kali oleh Mosmann (1983). Sel dengan kepadatan  $3 \times 10^5$  sel/sumuran didistribusikan ke dalam plate 96 sumuran dan diinkubasi bersama media kultur (DMEM yang mengandung 10% FBS dan 1% penstrep) dan formula herbal tunggal maupun kombinasi dengan doxorubicin dengan berbagai kadar selama 48 jam suhu  $37^{\circ}C$  pada inkubator  $CO_2$ . Sebagai kontrol sel diinkubasi dengan DMSO saja. Kombinasi doxorubicin-formula herbal yang dilakukan pada penelitian ini tersaji pada Tabel 1.

Pada akhir inkubasi, ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100  $\mu L$  media kultur yang mengandung MTT 5mg/ml, inkubasi lagi selama 4 jam pada  $37^{\circ}C$ . Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Reaksi dengan MTT dihentikan dengan reagen stoper (isopropanol + 0.1% asam asetat atau SDS) lalu di *shaker*. Serapan dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 550 nm.

**Tabel 1. Rasio kadar kombinasi yang digunakan dalam penelitian**

Doxorubicin ( $IC_{50}$ )	Formula herbal ( $IC_{50}$ )			
	$1/10$	$1/4$	$1/3$	$1/2$
$1/10$	$1/10 : 1/10$	$1/10 : 1/4$	$1/10 : 1/3$	$1/10 : 1/2$
$1/4$	$1/4 : 1/10$	$1/4 : 1/4$	$1/4 : 1/3$	$1/4 : 1/2$
$1/3$	$1/10 : 1/3$	$1/3 : 1/4$	$1/3 : 1/3$	$1/3 : 1/2$
$1/2$	$1/10 : 1/2$	$1/2 : 1/4$	$1/2 : 1/3$	$1/2 : 1/2$

▪ **Uji toksisitas akut**

Uji ini dilakukan pada formula paling poten dalam menurunkan kadar gula darah. Prinsipnya pemberian dosis tunggal suatu bahan uji secara oral dengan berbagai dosis pada hewan coba kemudian diobservasi adanya gejala toksik/keracunan dan kematian hewan coba. Uji toksisitas akut bertujuan untuk menetapkan nilai  $LD_{50}$  dan menentukan organ sasaran yang mungkin rusak, efek toksik spesifik dan petunjuk dosis terapi.

Bahan uji diberikan secara oral untuk sekali pemberian, bila dosis terlalu besar dapat diberikan beberapa kali namun tetap dalam satu hari. Dosis paling besar adalah jumlah maksimal bahan uji yang secara teknis dapat diterima oleh hewan coba. Kemudian dosis diturunkan dengan menggunakan kelipatan dosis secara logaritmik. Bila pada dosis 5000 mg/kg BB tidak dihasilkan efek toksik, dosis tidak perlu dinaikkan lagi.

Pengamatan meliputi kesehatan hewan/gejala klinis, berat badan, jumlah kematian dan *gross pathology* (patologi makro) untuk hewan coba yang mati pada waktu pengamatan. Pengamatan dilakukan selama 7 hari, setiap hari bobot badan ditimbang, dicatat terjadinya gejala klinik/toksik. Pada akhir penelitian atau saat hewan coba ada yang mati dilakukan otopsi: pengamatan terhadap organ paru, hepar, pankreas, ginjal, usus dan jantung. Apabila ada kecurigaan dilakukan pemeriksaan histopatologi

#### ▪ **Uji Toksisitas Subkronis**

Uji dilakukan pada formula antidiabetes yang paling poten dan satu kelompok kontrol tanpa perlakuan. Tujuan dari uji ini adalah melihat efek toksik bahan uji yang diberikan sekali setiap hari selama 3 bulan, untuk melihat perubahan karena akumulasi, toleransi, metabolisme dan kelainan khusus pada organ tertentu. Parameter yang diukur adalah gambaran darah normal, biokimia darah dan patologi anatomi organ penting. Pengukuran jumlah sel darah merah, sel darah putih, kadar Hb, hematokrit, kadar SGOT, SGPT, ureum, kreatinin dilakukan pada hari ke-45 dan ke-90 pemberian bahan uji. Penimbangan bobot badan dilakukan sebelum pemberian bahan uji, kemudian setiap minggu selama masa pemberian bahan uji. Setelah masa observasi berakhir, hewan dikorbankan, semua organ diamati secara makroskopis dan mikroskopis. Sebagian hewan coba dibiarkan hidup selama 2 minggu untuk mengetahui apakah sifat toksik bahan uji bersifat reversibel. Hewan uji yang dibiarkan hidup tersebut adalah yang diberi dosis terbesar dan kontrol.

Semua hewan uji yang telah dikorbankan; dibakar dalam lubang galian, setelah dibakar ditimbun dengan tanah

#### ▪ **Pembuatan preparat histopatologi**

Hati tikus dipotong dengan mikrotom setebal 3 mm, kemudian difiksasi. Preparat dimasukkan ke dalam larutan etanol secara bertingkat berturut-turut etanol 50% selama 30 menit, etanol 90% selama 30 menit, etanol mutlak selama 30 menit, masing-masing 2 kali perlakuan.

Preparat kemudian dimasukkan ke dalam xilol parafin, masukan ke dalam oven selama satu jam dalam suhu 60°C. Pindahkan preparat ke dalam parafin cair selama satu setengah jam dalam blok preparat. Setelah dicetak, preparat dipotong setebal 5 mikron, kemudian ditempelkan pada obyek gelas yang sudah diberi gliserin albumin dan panaskan 50°C sampai kering. Setelah kering masukan dalam xilol murni selama 5-10 menit. Ambil preparat dan masukan ke dalam larutan etanol berturut-turut etanol 96%, 90%, 70%, dan 50% selama 5-10 menit. Cuci preparat dengan air, kemudian dimasukkan ke dalam larutan zat warna Erlich selama 5 menit. Cuci dengan air kemudian larutan etanol berturut-turut etanol 50%, 70%, 90%, 96%, etanol mutlak. Masukan eosin-alkohol selama 1-2 menit. Bilas dengan air, masukan etanol 50%, 70%, 90%, 96%, dan etanol mutlak, kemudian xilol. Selanjutnya preparat dikeringkan pada suhu kamar dan ditutup dengan kanada balsem serta obyek gelas (Handari, 1983).

Pemeriksaan preparat sel hasil pengecatan hematoksilin-eosin dilakukan dengan mikroskop menggunakan perbesaran 100 kali. Hasil pemeriksaan dibuat fotomikroskopis sebagai data kualitatif. Pemeriksaan histologi sel hati dibimbing oleh Kepala Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan UGM Yogyakarta.

#### • **Perlakuan setelah uji aktivitas dan toksisitas**

Setelah selesai masa percobaan, tikus dikorbankan dengan cara inhalasi menggunakan eter, setelah itu tikus dibakar dalam galian dan ditimbun dengan tanah.

#### **f. Pengolahan dan Analisis Data dan Kendali Mutu Data**

a) Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup dan dianalisis dengan uji anova dilanjutkan uji Tukey menggunakan SPSS 11.0 untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{viable cell} = (\text{abs p} - \text{abs m}) / (\text{abs k} - \text{abs m}) \times 100\%$$

abs p : absorbansi perlakuan

abs k : absorbansi kontrol

abs m: absorbansi medium

Kemudian dihitung konsentrasi IC50 yaitu konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel sehingga dapat diketahui potensi sitotoksitasnya (Doyle and Griffiths, 1998)

- b) Sitotoksitas kombinasi ditetapkan dengan menghitung indeks interaksi antara ekstrak etanolik rumput mutiara dengan agen kemoterapi (*Combination Index=CI*), menggunakan persamaan:

$$CI = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2$$

dimana  $Dx$  adalah konsentrasi dari satu senyawa tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek tertentu dan  $(D)_1$ ,  $(D)_2$  adalah besarnya konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama. Angka CI atau indeks kombinasi yang diperoleh diinterpretasikan seperti pada Tabel 2 (Reynolds *and* Maurer, 2005).

**Tabel 2. Interpretasi nilai CI**

<b>CI</b>	<b>Interpretasi</b>	<b>CI</b>	<b>Interpretasi</b>
<0,1	sinergis sangat kuat	0,9–1,1	mendekati additif
0,1–0,3	sinergis kuat	1,1–1,45	antagonis ringan-sedang
0,3–0,7	sinergis	1,45–3,3	antagonis
0,7–0,9	sinergis ringan-sedang	>3,3	antagonis kuat-sangat kuat

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Uji Kandungan Kimia

Uji kandungan golongan kimia dari ke-tiga tanaman obat adalah sebagai berikut:

Tabel 3. Hasil Uji kandungan golongan kimia tanaman temu lawak, cakar ayam dan Kayu tujuh lapis

Kandungan Golongan Kimia	Rimpang Temu Lawak	Herba Cakar Ayam	Akar Kayu tujuh lapis
<b>Alkaloida</b>			
- Test Meyer	+	+	+
- Test Wagner	+	+	+
- Test Dragendorf	+	+	+
<b>Saponin</b>			
- Tes busa	+	+	+
- Tes Lieberman burchard	+	+	+
<b>Cardenolin &amp; bufadienol</b>			
- Tes Keller-Killiani	+	-	+
- Tes Lieberman burchard	+	-	+
- Tesr Kedde	+	-	+
<b>Flavonoida</b>			
- Tes Bate Smith&Metcalf	+	+	-
- Wilstater cyanidin	+	+	-
<b>Polifenol dan Tanin</b>			
- Tes Gelatin	+	+	-
- Tes FeCl <sub>3</sub>	+	+	-
<b>Antraquinon</b>			
- Tes Brontagers	+	-	-
- Tes Modifikasi Brontagers	+	-	-

Keterangan: + (positif), - (negatif)

Dari hasil analisis kandungan golongan kimia maka diketahui bahwa ketiga tanaman uji yaitu temu lawak, cakar ayam dan kayu tujuh lapis sama-sama mengandung golongan kimia dari jenis alkaloida dan saponin. Alkaloid maupun flavonoid merupakan senyawa aktif tanaman obat yang umumnya memiliki aktifitas sebagai anti-tumor.

## B. Profil Kromatografi

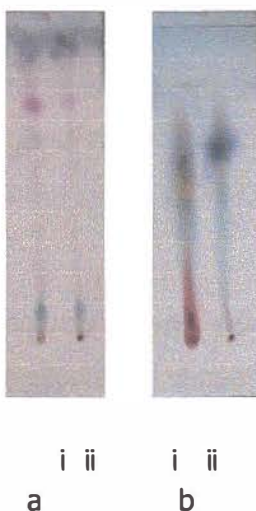
Profil kromatografi lapis tipis berikut Eluen yang digunakan butanol : asam acetat : air (4 : 1 : 1); penampak bercak yang digunakan adalah dragendorf kemudian dipanaskan pada 100°C selama 15 menit. Sistem eluen ini umumnya digunakan untuk identifikasi golongan alkaloid. Gambar berikut ini adalah profil kromatogram ekstrak temulawak tunggal dan formula 3.



Gambar 1. Profil kromatogram ekstrak temulawak tunggal (i) dan formula 3 (ii)

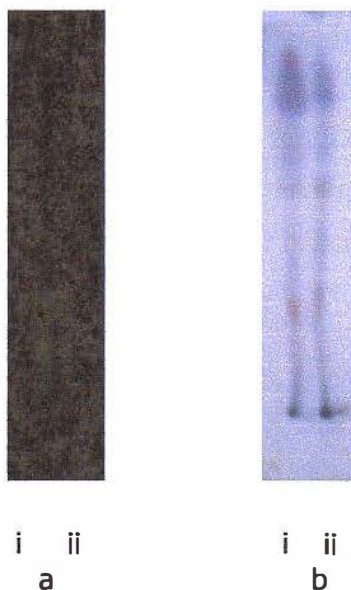
Keterangan: a. visible sebelum disemprot; b. uv 254 nm sebelum disemprot;

Profil kromatogram ekstrak cakar ayam tunggal serta dalam formula 3 adalah sebagai berikut:



Gambar 2. Profil kromatogram ekstrak cakar ayam (i) dan formula (ii)  
Keterangan: a. visible sebelum disemprot; b. uv 254 nm sebelum disemprot;

Profil kromatogram ekstrak kayu tujuh lapis tunggal serta dalam formula 3 adalah sebagai berikut:



Gambar 3. Profil kromatogram ekstrak kayu tujuh lapis tunggal (i) dan formula 3 (ii)

Keterangan: a. visible sebelum disemprot; b. uv 254 nm sebelum disemprot;

### C. TOKSISITAS AKUT

Hasil toksisitas akut formula 3 (hingga 10 kali lipat dosis yang digunakan untuk uji hipoglikemik = 600 mg/200 g tikus) tidak menimbulkan kematian hewan uji dan tidak memperlihatkan adanya gejala toksik. Namun demikian, konfirmasi keamanan formula harus mempertimbangkan hasil histopatologi serta spektrum ketoksikan pada toksisitas subkronis.

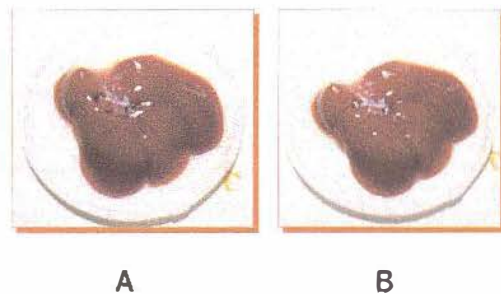
### D. TOKSISITAS SUBKRONIS

Uji ketoksikan subkronis pada penelitian ini menggunakan rentang waktu 30 hari. Pengamatan yang dilakukan pada akhir penelitian adalah pengambilan seluruh organ dalam, pengamatan makroskopis, mikroskopis dengan preparat histopatologi serta penghitungan parameter biokimiawi darah yaitu kadar SGPT, SGOT, ureum dan kreatinin dalam darah sebelum dan sesudah perlakuan.

Salah satu organ dalam yang memegang peranan sangat penting dalam fungsi fisiologis tubuh adalah hati. Hati merupakan tempat pembentukan lipid, albumin, dan beberapa protein plasma. Selain itu juga merupakan organ penting dalam proses biotransformasi senyawa endogen maupun senyawa eksogen, misalnya amonia, hormon steroid, dan obat. Metabolisme karbohidrat, protein, dan lipid juga terjadi di hati. Demikian pula proses detoksifikasi atau inaktivasi obat atau senyawa beracun lainnya dilakukan oleh

hati, sehingga dapat dikatakan hati mempunyai fungsi pertahanan dan pelindung bagi tubuh.

Hasil pemeriksaan makroskopis organ hati kelompok tikus yang diberi formula 3 sekali sehari selama 30 hari memperlihatkan tidak adanya perbedaan dengan kelompok tanpa perlakuan maupun kontrol pelarut (CMC Na 1%). Berat, warna, bentuk maupun tekstur organ hati antar kelompok relatif sama tidak menunjukkan kelainan. Contoh foto organ hati tikus uji ketoksikan subkronis formula 3 dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 4.** Organ hati tikus tanpa perlakuan (A) dan dengan perlakuan formula anti-kanker selama 30 hari dosis 120 mg/200 g tikus (B)

Parameter yang menggambarkan fungsi hati secara umum adalah kadar dua enzim yaitu AST (*aspartate transaminase*), yang di Indonesia lebih sering disebut sebagai SGOT (*serum glutamic-oxaloacetic transaminase*), dan ALT (*alanine transaminase*) yang biasanya disebut sebagai SGPT (*serum glutamic-pyruvic transaminase*). SGOT dan SGPT akan menunjukkan kenaikan bermakna jika terjadi kerusakan atau radang pada jaringan hati. Peningkatan kadar SGOT dan SGPT hingga nilainya lebih dari dua kali angka normal, umumnya dianggap bermakna dan membutuhkan pemeriksaan lebih jauh. SGPT memiliki aktivitas dan jumlah yang relatif lebih besar dalam organ hati dibandingkan dalam organ lainnya sehingga lebih spesifik terhadap kerusakan hati dibanding SGOT.

Hasil pemeriksaan kadar SGPT dan SGOT sebelum maupun sesudah perlakuan uji ketoksikan subkronis dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil pemeriksaan sebelum maupun sesudah perlakuan memperlihatkan adanya variasi nilai yang cukup besar, dengan rentang kadar SGOT 110-367 U/l dan SGPT 46-208 U/l. Hal ini mengakibatkan standar deviasinya menjadi besar pula, sehingga digunakan persentase selisih nilai sebelum dan sesudah perlakuan untuk mempermudah analisa. Perlakuan formula 3 dosis 1 (30 mg/200g tikus) memberikan penurunan kadar SGOT dan SGPT yang lebih besar dibandingkan kelompok kontrol; sedangkan pada dosis 2 (60 mg/200 g tikus) penurunan hanya pada kadar SGOT, kadar SGPT mengalami peningkatan namun lebih kecil dibandingkan kelompok kontrol

pelarut. Kelompok dosis 3 (120 mg/200 g tikus) menunjukkan adanya peningkatan kadar baik SGOT maupun SGPT yang lebih tinggi dari kedua kelompok kontrol.

Penurunan kadar SGPT dan SGOT pada dosis terkecil yang digunakan disebabkan adanya kurkumin dalam temulawak yang memiliki aktivitas sebagai hepatoprotektor atau mencegah kerusakan hati.

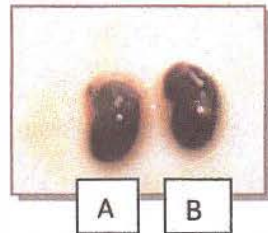
Tabel 4. Purata kadar SGPT dan SGOT serum pada tikus uji subkronis Formula 3

Kelompok uji	Sebelum perlakuan		30 hari sesudah perlakuan		% perbedaan sbmlm-ssdh	
	SGOT	SGPT	SGOT	SGPT	SGOT	SGPT
Tanpa perlakuan						
purata (n=9)	159.44	76.11	156.11	72.78	(-)2.09	(-)4.38
sd (+)	32.58	9.99	27.37	19.18		
Kontrol pelarut						
purata (n=8)	196.38	77.63	211.38	121.00	(+)7.64	(+)55.88
sd (+)	92.59	13.15	63.10	14.09		
F3: 30 mg/200g tikus						
purata (n=9)	204.22	86.33	167.22	75.33	(-)18.12	(-)12.74
sd (+)	62.57	16.95	53.15	15.40		
F3: 60 mg/200g tikus						
purata (n=9)	170.44	76.89	138.33	87.00	(-)18.84	(+)13.15
sd (+)	28.54	11.17	28.46	18.43		
F3: 120 mg/200g tikus						
purata (n=9)	145.78	69.22	163.33	115.33	(+)12.04	(+)66.62
sd (+)	24.57	14.15	cc58.28	24.20		

Keterangan: (-) mengalami penurunan; (+) mengalami peningkatan

Kadar kreatinin dalam darah merupakan salah satu parameter yang dapat digunakan untuk mendiagnosis adanya kegagalan ginjal yaitu dengan mengukur laju filtrasi glomerulus (Glomerular filtration rate=GFR). Kreatinin diproduksi dalam jumlah yang sama dan diekresi melalui urin setiap hari. Dengan nilai normal kreatinin <1,5 mg/dL dan ureum 10-50 mg/dL. Laju pengeluaran kreatinin dalam tubuh hewan percobaan seperti tikus dapat dihitung dengan perkalian kadar kreatinin urin dengan volume urin dibagi dengan kadar kreatinin serum (Nissl *et al*, 2004). Tetapi pada manusia GFR atau kliren kreatinin dihitung berdasarkan umur dan berat badan dari pasien yaitu dengan formula sebagai berikut: kliren kreatinin=  $1,2 \times (140 - \text{umur pasien dalam tahun}) \times \text{berat badan (Kg)} / \text{kreatinin plasma}$  (Levey *et al*, 1999). Manusia normal memiliki nilai kliren kreatinin antara 90-140 ml/mn,

sedangkan kandungan kreatinin darahnya 0,7-1,2 mg/dl (Cockroft and Gault, 1976). Hasil penelitian ini menunjukkan kadar kreatinin darah pada tikus hanya 0,4-0,6 mg/dl. Nilai kreatinin darah dan kliren kreatinin pada tikus normal tidak ditemukan dalam pustaka yang tersedia. Ureum merupakan produk nitrogen yang dikeluarkan ginjal berasal dari diet dan protein. Pada penderita gagal ginjal, kadar ureum memberikan gambaran tanda paling baik untuk timbulnya ureum toksik dan merupakan gejala yang dapat dideteksi dibandingkan kreatinin (Nissl *et al.*, 2004).



Gambar 5. Organ ginjal tikus tanpa perlakuan (A) dan dengan perlakuan formula anti-kanker selama 30 hari dosis 120 mg/200 g tikus (B)

Hasil pengamatan kadar ureum dan kreatinin serum pada tikus uji sub-kronis atas pemberian formula 3 tanaman anti-kanker dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Purata kadar ureum dan kreatinin serum pada tikus uji subkronis Formula 3

Kelompok uji	Sebelum perlakuan		30 hari sesudah perlakuan		% perbedaan sbml-ssdh	
	Ureum	Creatinin	Ureum	Creatinin	Ureum	Creatinin
Tanpa perlakuan						
purata (n=9)	23.06	0.43	37.46	0.49	(+)62.46	(+)12.82
sd ( $\pm$ )	1.43	0.05	13.51	0.06		
Kontrol pelarut						
purata (n=8)	22.25	0.43	28.51	0.50	(+)28.15	(+)17.65
sd ( $\pm$ )	1.06	0.05	4.72	0.08		
Formula 3 dosis 1						
purata (n=9)	24.56	0.48	32.01	0.48	(+)30.36	(+)0.00
sd ( $\pm$ )	1.83	0.04	8.90	0.07		
Formula 3 dosis 3						
purata (n=9)	23.39	0.46	29.92	0.48	(+)27.93	(+)4.88
sd ( $\pm$ )	2.20	0.05	5.22	0.08		
Formula 3 dosis 2						
purata (n=9)	23.24	0.43	27.20	0.49	(+)17.02	(+)12.82
sd ( $\pm$ )	1.46	0.05	4.15	0.08		

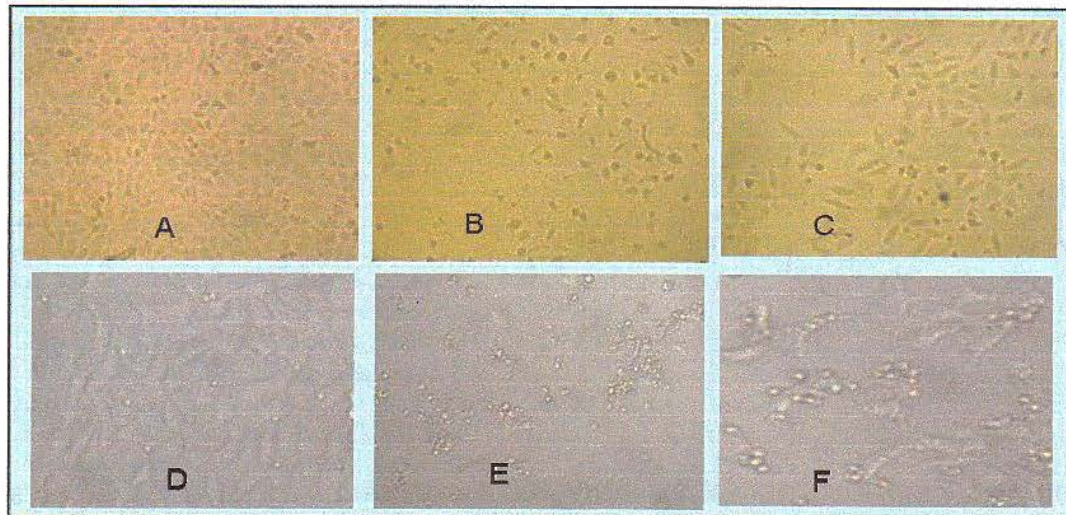
Hasil pemeriksaan kadar ureum dan kreatinin sebelum dan sesudah perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2. Kadar ureum dan kreatinin tidak menunjukkan adanya variasi yang cukup besar pada tiap tikus uji. Pemberian formula 3 terhadap tikus tidak menunjukkan adanya peningkatan kadar ureum dan kreatinin yang bermakna dibandingkan kelompok kontrol tanpa perlakuan maupun kontrol pelarut.

Hasil pengamatan makroskopis organ yang lain (limpa, jantung, paru dan lambung) tidak menunjukkan adanya perbedaan nyata dengan kelompok kontrol tanpa perlakuan.

Pengamatan terhadap morfologi sel kanker payudara T47D memperlihatkan sel berbentuk seperti daun yang melekat pada dasar sumuran *plate* kultur (Gambar 6). Setelah diberi perlakuan ekstrak formula kayu tujuh lapis, cakar ayam dan temu lawak, sel menjadi rusak berbentuk bulat dan tampak berkerut. Hal sama juga terjadi pada sel MCF-7, dimana ekstrak yang diberikan berpengaruh terhadap morfologi sel (Gambar 6). Pada konsentrasi ekstrak 125 µg/ml tampak perubahan morfologi yang lebih jelas yaitu sel tampak bulat.

Dari hasil pengamatan diketahui bahwa pemberian seri konsentrasi ekstrak berpengaruh pada viabilitas sel baik pada MCF-7 maupun T47D. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan, persentase sel yang hidup semakin menurun (Gambar 7 dan 8). Dari hasil perhitungan berdasarkan nilai probit diketahui bahwa nilai IC<sub>50</sub> ekstrak formula anti-kanker terhadap sel T47D sebesar 117 µg/ml dan nilai IC<sub>50</sub> ekstrak formula anti-kanker terhadap sel MCF-7 sebesar 155 µg/ml. Hasil ini menunjukkan bahwa formula anti-kanker kayu tujuh lapis, cakar ayam dan temu lawak potensial untuk digunakan sebagai terapi kanker mengingat bahan uji yang dipakai masih belum murni.

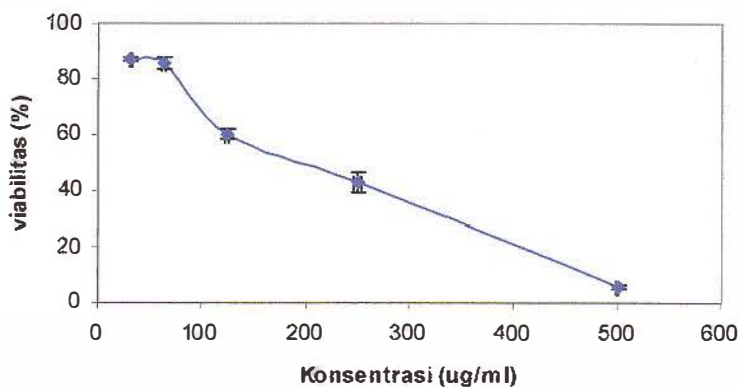
Hasil uji skrining fitokimia formula ekstrak etanolik 3 tanaman obat menunjukkan bahwa terdapat adanya alkaloid, saponin, flavonoid, tanin dan polifenol (Tabel 3). Nalawade *et al* (2003) melaporkan bahwa camptothecin suatu monoterpen indole alkaloid memiliki aktifitas antitumor, bahkan dua senyawa turunannya yaitu Irinotecan and topotecan telah disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) untuk terapi kanker kolorektal dan ovarium.



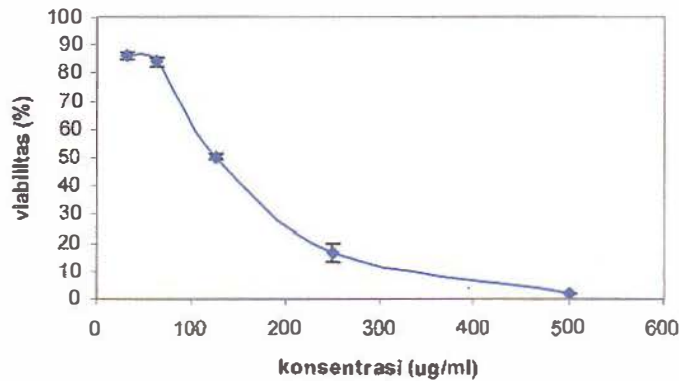
Gambar 6. morfologi sel kanker payudara T47D dan MCF-7

Keterangan:

(A) sel MCF-7 tanpa perlakuan (B) sel MCF-7 dengan perlakuan ekstrak 125 µg/ml (C) sel MCF-7 dengan perlakuan ekstrak 250 µg/ml (D) sel T47D tanpa perlakuan (E) sel T47D dengan perlakuan ekstrak 125 µg/ml (F) sel T47D dengan perlakuan ekstrak 125 µg/ml.



Gambar 7. Grafik hubungan presentase kehidupan sel kanker payudara MCF-7 versus konsentrasi formula ekstrak etanolik anti-kanker, terdapat korelasi negative antara peningkatan konsentrasi ekstrak dengan persentase sel yang hidup.



Gambar 8. Grafik hubungan presentase kehidupan sel kanker payudara T47D versus konsentrasi formula ekstrak etanolik anti-kanker, terdapat korelasi negative antara peningkatan konsentrasi ekstrak dengan persentase sel yang hidup.

OSW-1 yang termasuk dalam golongan saponin juga dilaporkan memiliki aktifitas sitotoksik terhadap berbagai sel tumor seperti leukemia HL-60, mouse mastocarcinoma, human pulmonary adenocarcinoma, berbagai sel carcinoma dan squamous cell carcinoma termasuk adriamycin-resistant dan camptothecin-resistant cell lines ( Morzycki *et al*, 2004)

Senyawa flavonoid dan terpenoid diketahui memiliki aktivitas antitumor (Mathivadhani *et al.*, 2007, Kampa *et al.*, 2004). Ren *et al* (2003), melaporkan bahwa flavonoid dapat menghambat kinerja dari semua Cdk yang merupakan regulator daur sel. ttik kerja dari flavonoid diperkirakan terletak pada penghambatan kerja enzim Cdk-*Activating Kinase* (CAK) sehingga menghambat terbentuknya kompleks Cdk-Cyclin yang aktif. Flavonoid dapat berikatan dengan protein-protein kinase ATP-*binding sitanya* (Pan, 2002).

Dari berbagai golongan kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak dimungkinkan memiliki potensi sebagai antikanker, namun hal itu perlu dikaji lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa yang bertanggungjawab sebagai antikanker, penelitian tentang keamanan terhadap sel normal juga perlu dilakukan untuk menjamin keamanan formula sebagai obat.

## BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

1. Masing-masing ekstrak tanaman obat yang diuji yaitu *Curcuma xanthorrhiza*, *Sellaginella tamarischina* dan *Loranthus Sp.* mengandung senyawa alkaloid yang umumnya merupakan senyawa aktif bersifat sitotoksik.
2. Dari hasil uji toksisitas akut, formula 3 hingga dosis 600mg/200g tikus tidak menunjukkan adanya kematian.
3. Hasil pengukuran parameter ketoksikan subkronis menunjukkan bahwa formula 3 tanaman tersebut aman dikonsumsi
4. Dari penelitian di atas dapat disimpulkan bahwa formula kayu tujuh lapis, cakar ayam dan temu lawak, memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen antikanker. Untuk mengetahui senyawa-senyawa yang berperan dalam aktifitas tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

## DAFTAR PUSTAKA

*Acuan Sediaan Herbal*. 1 ed. Vol. 2. 2006, Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.

Bandoni, A.L., Mendiando, M.E., Rondina, R.V.D., Coussio, J.D., 1972. Survey of argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. *Lloydia* 35, 69-80

Bapsy, P.P and Sahoo, T.P. 2004. Recent Advances in the Management of Metastatic Breast Cancer. *Indian Journal Of Medical & Paediatric Oncology*. 25 (2): 19-27

Cardenas, ME., Sanfridson, A., Cutler, NS., and Heitman, J., 1998, Signal transduction cascade as targets for therapeutic intervention by natural products, *TIBTECH*, Vol. 16, October: 427-433

Harborne, J., 1996. Metode *Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, diterjemahkan oleh Padmawinata, K. dan I. Soediro Cetakan kedua, Penerbit ITB, Bandung, 297-303.

Hideji, I., Fusayoshi, H., Kazuko, F., Koichi, T., *Studies on The Antitumor Bisabolane Sesquiterpenoids Isolated from Curcuma xanthorrhiza*. J Chem. Pharm. Bull., 1985. 33(8): p. 3488-92.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Jiaquan Xu and Michael J.T. 2007. Cancer Statistic 2007, *CA Cancer J Clin.*, 57: 43-66

Levey, AS., Bosch, JP., Lewis, JB., Greene, T., Rogers, N., and Roth, D., 1999, A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation modification of diet in renal diseases study group. *Ann Intern Med.*, 130(6):461-470.

Morzycki JW, Agnieszka Wojtkielewicz dan Sławomir Wołczynski, 2004. Synthesis of analogues of a potent antitumor saponin OSW-1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 3323-3326

Nissl, J.R.N., Van houten, S., Landaner, T., Burgess, P., and Mendelsohn, D.J, 2004, Creatinine and clearance. *Nephrology* 20(2004)

Pan M, Chen W, Lin-Shiau S, Ho C, Lin J., 2002. Tangeretin Induces Cell Cycle G1 Arrest Through Inhibiting Cyclin Dependent Kinase 2 and 4 Activities as well as Elevating Cdk Inhibitors p21 and p27 in Human Colorectal Carcinoma Cells, *Carcinogenesis* 23 (10):1677-84

Park, J.H., Kiim,M.J., Park,K.Y., Kim, H.O., Hwan, J.K., and Chung, W.Y., *Chemopreventive Effect of Xanthorrhizol from Curcuma xanthorrhiza*. Journal of Korean Association of Cancer Prevention, 2003. 8(2): p. 91-7.

Rama Diananda, 2007. *Mengenal Seluk beluk Kanker. Kata Hati*, Yogyakarta.

Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L., 2003. Flavonoids : Promising Anticancer Agents, *Medicinal Research Review* 23 (4);519-34

- Schlattner, M.T., Zaugg, M., Zuppinger, C., Wallimann, T. and Schlattner, U. 2006. New Insights into Doxorubicin-induced Cardiotoxicity: The Critical Role of Cellular Energetics. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 41: 389-405.
- Simstein, R., Burow, M., Parker A., Weldon, C. and Beckman, B. 2003. Apoptosis, Chemoresistance, and Breast Cancer: Insights From the MCF-7 Cell Model System. *Exp Biol Med.* 228:995-1003.
- Singal, P.K., Iliskovic, N., Li, T. and Kaur, K. 2001. Heart Failure Due to Doxorubicin. *Kuwait Medical Journal* 33 (2): 111-115
- Siu, L.L. and Moore, M.J. 2005. *Pharmacology of Anticancer Drugs in The Basic Science of Oncology* 4<sup>th</sup> edition. Editor Tannock, IF., Hill, RP., Bristow, RG., Harrington, L. McGraw-Hill Medical Publishing Division.
- Sugiyanto, Sudarto, B., Meiyanto, E., Nugroho, A.E., Jenie, U.A., 2003, Aktivitas Antikarsinogenik Senyawa yang Berasal dari Tumbuhan, *Majalah Farmasi Indonesia*, Vol: 14, 216-225.
- Suryanarayana, P., Saraswat, M., Mrudula T., Krishna TP., Krisnaswamy, K., and Reddy BG. 2005. Curcumin and turmeric delay streptozotocin-induced diabetic cataract in rats. *Invest ophthalmol Vis Sci.* 46: p.2092-2099