

## Uji Sitotoksik Sediaan Tablet Salut Enterik Mengandung Ekstrak Cacing Tanah dan Kombinasinya dengan Doksorubisin terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach Menggunakan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethaly Test*)

Cytotoxic Test of Salute Enteric Tablet Contains the Earthworm Extracts and Its Combines with Doxorubicin on the Shrimp Larva *Artemia salina* Leach Using BSLT Method (*Brine Shrimp Lethaly Test*)

<sup>1</sup>Ibnu Dharsono Faizal, <sup>2</sup>Ratu Choerina, <sup>3</sup>Fetri Lestari

<sup>1,2,3</sup>Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Jl. Tamansari No.1 Bandung 40116

email: <sup>1</sup>ibnudharsonofaizal@gmail.com, <sup>2</sup>choes\_rina@yahoo.com, <sup>3</sup>fetrestari@gmail.com

**Abstrak.** The purpose of this study was to investigate the cytotoxic effects of the salute enteric tablets containing the bioactive protein fraction derived from earthworm extract (*Lumbricus rubellus*) and the effectiveness of the combination of co-chemotherapy of earthworm extract with doxorubicin. Cytotoxic testing of the tablet containing earthworm extract was performed by *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) method. The number of shrimp larval mortality was calculated and analyzed using the probit method to determine the LC<sub>50</sub> value. Afterward, the effectivity of the co-chemotherapy tablet containing combined earthworm extract with doxorubicin against shrimp larvae *Artemia salina* Leach were conducted. The observed parameters are the number of shrimp larvae mortality at various concentrations of these combination compared to the controls which containing single doxorubicin dose. The result of the cytotoxic test showed that the tablet containing earthworm extract had a strong cytotoxic effect which was approximately 27,54 ppm. In addition, the results of the co-chemotherapy effectiveness test showed that each test group had a synergistic effect in combination with doxorubicin.

**Keywords:** earthworm extract, doxorubicin, cytotoxic test, *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), co-chemotherapy.

**Abstrak.** Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek sitotoksik dari tablet salut enterik yang mengandung fraksi bioaktif protein dari ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dan efektifitas kombinasi ko-kemoterapi ekstrak cacing tanah dengan doksorubisin. Pengujian sitotoksik tablet tersebut dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethaly Test* (BSLT). Jumlah kematian larva udang dihitung dan dianalisis menggunakan metode probit untuk menentukan nilai LC<sub>50</sub>. Setelah itu, dilakukan pengujian efektifitas kombinasi ko-kemoterapi tablet tersebut dengan doksorubisin terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Parameter yang diamati adalah jumlah kematian larva udang pada berbagai konsentrasi uji dibandingkan dengan kontrol yang terdiri dari doksorubisin tunggal. Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa tablet mengandung ekstrak cacing tanah memiliki efek sitotoksik yang cukup kuat yaitu sebesar 27,54 ppm. Selain itu, hasil uji efektifitas kombinasi ko-kemoterapi menunjukkan bahwa setiap kelompok uji memberikan efek sinergis terhadap kombinasi dengan doksorubisin.

**Kata Kunci:** ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*), doksorubisin, uji sitotoksik, BSLT (*Brine Shrimp Lethaly Test*), ko-kemoterapi.

### A. Pendahuluan

Secara nasional prevalensi penyakit kanker pada penduduk semua umur di Indonesia tahun 2013 sebesar 1,4% atau diperkirakan sekitar 347.792 orang. Penyakit kanker serviks dan payudara merupakan penyakit kanker dengan prevalensi tertinggi di Indonesia pada tahun 2013, yaitu kanker serviks sebesar 0,8% dan kanker payudara sebesar 0,5% (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2015 : 4).

Salah satu obat yang digunakan pada penderita kanker payudara adalah doksorubisin. Penggunaan doksorubisin sebagai agen kemoterapi dibatasi oleh efek toksik terhadap jaringan normal terutama jantung. Selain itu, timbulnya resistensi pada beberapa obat terapi kanker termasuk doksorubisin menjadi kendala utama dalam

kemoterapi. Pengurangan dosis mampu mengurangi efek samping doksorubisin. Oleh karenanya menjadi tantangan untuk dapat memperbaiki aplikasi klinik agen kemoterapi (Riris, 2007 : 2).

Salah satu pendekatan yang kini sedang mendapatkan perhatian adalah penggunaan kombinasi senyawa kemoprevensi yang bersifat non-toksik atau lebih tidak toksik dikombinasikan dengan agen kemoterapi untuk meningkatkan efikasinya dengan menurunkan toksisitasnya terhadap jaringan yang normal. Dengan perspektif ini dilakukan penelitian terhadap agen-agen kemoprevensi untuk mencari kandidat yang memiliki efek sinergis dalam kombinasi dengan obat antikanker (Riris, 2007 : 2).

Kandidat bahan alam yang berpotensi sebagai ko-kemoterapi (kemoprevensi) adalah ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*). Pada penelitian ini menggunakan produk tablet salut enterik hasil penelitian DLBS yang mengandung fraksi bioaktif protein DLBS1033 dari 490 mg ekstrak *Lumbricus rubellus* yang diproses secara bioteknologi. Enzim fibrinolitik *Lumbricus rubellus* (Lumbrokinase) merupakan kelompok protease serin dengan aktivitas fibrinolitik dan trombolitik yang kuat. Enzim tersebut dapat melarutkan fibrin di sekitar sel-sel kanker ketika diterapkan dengan obat antitumor. Hal ini membantu obat antitumor untuk tiba di sel kanker, sehingga dapat meningkatkan efek obat kemoterapi pada sel. Berdasarkan mekanisme tersebut, maka enzim tersebut dapat digunakan sebagai kandidat untuk penelitian efektifitas kemopreventif obat kanker (Popovic, 2001 : 197-202).

Berdasarkan pemaparan diatas, dapat diambil suatu permasalahan mengenai bagaimana kemampuan sitotoksik tablet mengandung fraksi bioaktif protein dari ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dan bagaimana efektifitas kemopreventif dari tablet tersebut yang dikombinasikan dengan doksorubisin.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi tablet mengandung fraksi bioaktif protein dari ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) sebagai kandidat obat kanker dan ko-kemoterapi yang dapat dikombinasikan dengan doksorubisin.

## **B. Landasan Teori**

Kanker merupakan penyakit degeneratif yang diakibatkan oleh adanya kontrol genetik yang rusak atau hilang dalam sel. Sel kanker akan memproduksi lebih banyak sel abnormal yang terus membagi dan meningkatkan jumlahnya disuatu bagian fisiologis tubuh dan organ. Sel yang pertumbuhan dan perkembangannya abnormal akan menyebabkan kerusakan sel dan jaringan lain dalam tubuh. Mereka tidak lagi dikontrol oleh gen normal yang menghentikan pembelahan setelah kebutuhan tubuh normal telah dipenuhi. Semua penyebab kanker kini diketahui langsung atau tidak langsung, salah satu penyebab utamanya adalah kerusakan gen normal yang mengatur pembelahan sel (Stephens, 2001 : 6).

Karsinogenesis bermula dari kerusakan genetik. Kerusakan ini dapat disebabkan oleh agen yang terdapat di lingkungan, seperti zat kimia, radiasi, atau virus. Selain itu, Agen ini bisa juga diturunkan melalui *germ line*. Terdapat empat kelas gen regulator normal yang menjadi target kerusakan : proto-onkogen yang menginisiasi pertumbuhan sel, gen supresor tumor yang menghambat pertumbuhan, gen pengatur apoptosis, dan gen yang terlibat dalam reparasi DNA (Stricker, 2008 ; 284-292).

Sel yang normal mula-mula terpapar agen yang dapat merusak DNA. Apabila reparasi DNA gagal karena gen-gen pengatur pertumbuhan sel rusak, maka sel akan mengalami pertumbuhan yang tak terkontrol. Selanjutnya, akan terjadi progresi tumor yang dapat berujung pada neoplasma yang malignan. Neoplasma malignan memiliki karakteristik berupa invasi dan metastasis (Stricker, 2008 ; 284-292).

Metastasis, melibatkan molekul yang mengatur invasi (enzim), adhesi dan

pertumbuhan (parakrin, autokrin, endokrin) . Potensial aksi metastasis bersama dengan molekul pendukung ini akan bertanggung jawab terhadap perkembangan sel tumor untuk melakukan invasi ke organ serta jaringan tubuh yang lain (Stricker, 2008 ; 284-292). Pada metastasis, sel tumor terlepas dari massa primer, memasuki aliran darah atau sistem limfatik, lalu tumbuh di tempat yang jauh dari situs awalnya. Proses metastasis terdiri dari invasi sel tumor ke matriks ekstraseluler, diseminasi vaskular, penempatan sel tumor, dan kolonisasi (Stricker, 2008 ; 284-292).

Cacing tanah mengandung gizi yang cukup tinggi terutama protein (64-76% berat kering). Kandungan gizi lainnya yang terdapat pada cacing antara lain adalah lemak 7-10%, kalsium 0,55%, fosfor 1% dan serat kasar 1,08%. Protein yang terdapat pada cacing tanah terdiri dari 9 macam asam amino esensial dan 4 macam asam amino non-esensial. Asam amino esensial ini antara lain arginin, histidin, leusin, isoleusin, valin, metionin, fenilalanin, lisin, dan treonin. Sedangkan asam amino non-esensial ialah sistin, glisin, serin, dan tirosin (Palungkun, 2010:20).

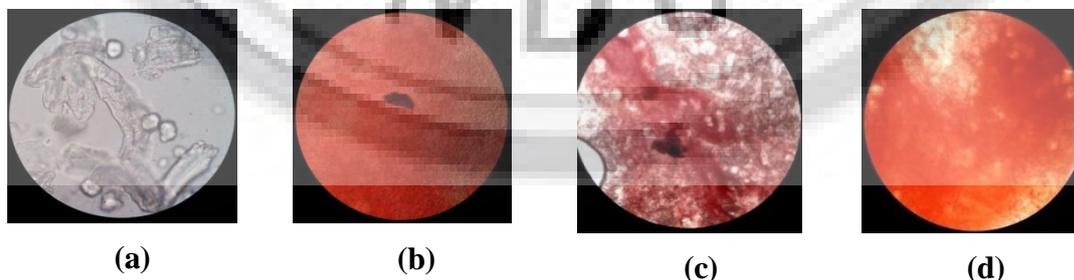
Cacing tanah dimanfaatkan sebagai bahan obat tradisional misalnya untuk mengobati demam, darah tinggi, bronkitis, reumatik dan penyakit tifus. Selain bermanfaat untuk pengobatan cacing juga bermanfaat untuk kehidupan manusia seperti untuk daur ulang limbah, penghasil pupuk organik, bahan baku pakan ternak dan ikan, bahan baku makanan dan minuman untuk manusia, bahan baku kosmetik (Palungkun, 2010:14-19).

Salah satu kandungan protein pada cacing tanah adalah Lumbrokinase yang terdiri atas enam protease yaitu LrPI-0, LrPI-1, LrP-I-2, LrP-II, LrP-III-1, dan LrP-III-2. Lumbrokinase merupakan rantai peptida tunggal yang sebagian besar terdiri dari residu asam aspartat dan sedikit lisin. Isozim ini memiliki kisaran pH 1.0-11.0 dan strukturnya dapat bertahan sampai suhu 60°C (Nakajima N, 1993 : 57).

Berdasarkan mekanisme kerja yang telah diketahui, Lumbrokinase berpotensi untuk digunakan sebagai fibrinolitik dan antitrombotik pada kejadian trombosis, seperti pada kejadian infark miokard dan *stroke* yang dapat menyebabkan kecacatan dan berakibat fatal pada manusia. Penemuan obat baru yang efektif, aman, dan lebih mudah digunakan sangat bermanfaat menurunkan morbiditas dan mortalitas penyakit akibat kejadian trombosis. Lumbrokinase telah terbukti pada beberapa studi pada hewan uji coba dapat bermanfaat sebagai fibrinolitik dan antitrombotik (Kim YS ,1998 : 21).

### C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

#### Hasil Uji Skrining Tablet Mengandung Ekstrak Cacing Tanah



**Gambar 1.** Keterangan Hasil Uji Mikroskopik Perbesaran 40 ×, (A) Kontrol Negatif Penampang Mikroskopik Tablet Mengandung Ekstrak Cacing Tanah, (B) Kontrol Negatif Bekuan Darah Babi, (C) Kontrol Positif ; Terdapat Pecahan Bekuan Darah Setelah Inkubasi 15 Menit Dengan Suhu 50°C, (D) Kontrol Positif ; Bekuan Darah Melarut Setelah Inkubasi 30 Menit Dengan Suhu 50°C

Hasil uji fibrinolitik yang dilakukan secara in vitro terhadap bekuan darah babi memperlihatkan bahwa tablet salut enterik mengandung 450 mg ekstrak cacing tanah mampu mendegradasi substrat fibrin dan fibrinogen yang terdapat pada bekuan darah tersebut pada pH 7,4 dan suhu 50°C. Proses pecahnya bekuan darah dapat teramati setelah masa inkubasi 15 menit dengan suhu 50°C, Proses yang terjadi selama hidrolisis fibrin adalah enzim akan mendegradasi semua rantai fibrin Aα, Bβ, dan γ secara serentak menghasilkan fibrinopeptida yang dapat larut. Sementara dalam hidrolisis fibrinogen, pertama kali enzim akan memotong rantai fibrinogen Aα dan Bβ (Setiawan eko, 2008 : 12). Pada masa inkubasi 30 menit dengan suhu 50°C, dilanjutkan dengan degradasi rantai γ yang menghasilkan fibrinopeptida-fibrinopeptida yang berbobot molekul kecil. Hal ini dapat diamati pada **gambar 1d**, gambar tersebut memperlihatkan bekuan darah yang telah larut sehingga tampak seperti cairan darah.

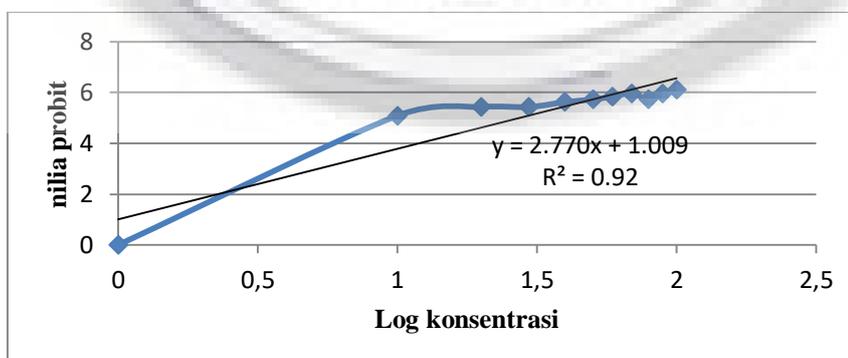
Dari hasil pengujian ini dapat dipastikan terdapat enzim Lumbrokinase pada tablet tersebut. Enzim ini akan digunakan oleh peneliti untuk melihat aktivitas sitotoksik terhadap larva udang *artemia salina* Leach.

**Uji Sitotoksik Tablet Mengandung Ekstrak Cacing Tanah Menggunakan Metode BSLT**

**Tabel 1.** Pengaruh Berbagai Konsentrasi Larutan Tablet Mengandung Ekstrak Cacing Tanah terhadap Larva *Artemia salina* Leach

Konsentrasi	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Tabung I	0	5	6	7	8	8	9	9	8	8	8
Tabung II	0	6	6	7	7	8	8	8	8	8	9
Tabung III	0	5	8	6	7	7	7	8	7	9	9
Σ	0	16	20	20	22	23	24	25	23	25	26
Rata-rata	0	5.3	6.6	6.6	7.3	7.6	8	8.3	7.6	8.3	8.6
SD	0	0.57	1.15	0.57	0.57	0.57	1	0.57	0.57	0.57	0.57

Pada **tabel 1** di atas, dapat dilihat kematian larva tertinggi pada konsentrasi 100 ppm dan terendah 10 ppm. Selain itu, terdapat peningkatan kematian larva *Artemia salina* Leach yang seimbang dengan peningkatan konsentrasi larutan tablet ekstrak cacing tanah. Namun, pada konsentrasi 80 ppm tampak terjadi penurunan nilai % kematian. Hal ini dapat terjadi dikarenakan larva udang *Artemia salina* Leach memiliki respon stress yang sama dengan manusia. Respon terhadap situasi penuh tekanan memberikan keuntungan dalam kemampuan bertahan, reproduksi, dan perilaku pada hewan. Sehingga factor tersebut dapat mempengaruhi kondisi stabil larva udang sehingga tidak memberikan hasil yang kurang signifikan (Zaki Nur, 2015 : 22)



**Gambar 2.** Pengaruh Berbagai Konsentrasi Larutan Tablet Mengandung Ekstrak Cacing Tanah terhadap Kematian Larva Udang (*Artemia salina* Leach)

Dari grafik diatas, didapatkan persamaan  $Y = 2.770X + 1.009$ . Sehingga nilai LC50 sebesar 27.54 ppm. Suatu ekstrak dinyatakan bersifat toksik menurut metode BSLT ini jika memiliki LC50 kurang dari 1000 ppm. Pengujian terhadap tablet mengandung fraksi bioaktif dari ekstrak cacing tanah menunjukkan harga LC<sub>50</sub> sebesar 27,54 ppm. Sehingga dapat dikatakan fraksi bioaktif yang berasal dari cacing tanah memiliki potensi memberikan efek sitotoksik.

Senyawa sitotoksik yang berperan dalam tablet yang mengandung fraksi bioaktif protein dari ekstrak cacing tanah adalah komponen glikosilasi yang homolog terhadap enzim serin protease (Zhao, 2003 : 841). Pada tahun 1983, Mihara melakukan isolasi terhadap enzim serin protease pada ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dan diketahui terdapat 6 isoform protease yang disebut sebagai Lumbrokinase (Kumar, 2013 : 897). Hipotesa yang dapat dikembangkan dalam penelitian ini adalah Lumbrokinase merupakan salah satu enzim yang termasuk golongan serine protease yang merupakan jenis caspase yang terdapat didalam tubuh. Caspase merupakan molekul protein yang dapat mengaktifkan DNase yang menyebabkan kerusakan DNA selama terjadinya proses apoptosis.

#### Uji Efektivitas Ko-kemoterapi Tablet Mengandung Ekstrak Cacing Tanah Dikombinasi dengan Doksorubisin

Pada penelitian ini dilakukan kombinasi antara kandungan tablet mengandung ekstrak cacing tanah sebagai kandidat senyawa ko-kemoterapi dengan agen kemoterapi yaitu doksorubisin. Untuk mengetahui potensi penggunaan ekstrak cacing tanah sebagai agen ko-kemotrapi untuk doksorubisin terhadap jumlah kematian larva udang *Artemia salina* Leach dilakukan pemaparan kombinasi tablet mengandung ekstrak cacing tanah dengan konsentrasi 27,54 ppm (LC<sub>50</sub>) dengan 0,847 ppm, 0,565 ppm, dan 0,282 ppm doksorubisin. Pengujian ini dilakukan dengan mengkombinasikan setiap 1,5 mL dari kedua larutan uji. Sebagai pembanding dibuat kontrol positif yang masing-masing berisi larutan tablet mengandung ekstrak tersebut dan doksorubisin pada setiap konsentrasi uji.

**Tabel 2.** Pengaruh Pemberian Konsentrasi Kontrol Positif terhadap Kematian Larva Udang *Artemia salina* Leach

TABLET (PPM)	KONTROL DOXO (PPM)			
	27.54	0.282	0.565	0.0847
3	1	2	2	3
3	1	1	2	3
4	1	1	1	3

**Tabel 3.** Konsentrasi Kombinasi Tablet Mengandung Ekstrak Cacing Tanah dengan Doksorubisin terhadap Jumlah Kematian Larva *Artemia salina* Leach

TABLET (PPM)	DOXO (PPM)	0.282	0.565	0.0847	1.13
		3	3	4	5
27,54	3	4	4	5	
	3	3	5	4	

Dari hasil pengamatan pada **Tabel 2** dan **3** dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan jumlah kematian larva udang yang disebabkan kombinasi doksorubisin yang dibandingkan dengan setiap konsentrasi kontrol positif yang berisi doksorubisin tunggal tanpa kombinasi. Untuk memastikan validitas dari data yang diperoleh, maka dilakukan pengujian analisis statistik menggunakan SPSS 21.

Uji kombinasi pada doksorubisin dengan konsentrasi 0,282 ; 0,565 ; dan 0,847 ppm yang dikombinasi tablet mengandung ekstrak cacing tanah dengan konsentrasi 27,54 ppm menunjukkan hasil analisis dengan nilai signifikansi  $< 0,05$ . Hasil uji kombinasi menunjukkan bahwa ekstrak cacing tanah memberikan efek yang sinergis terhadap penggunaan doksorubisin. Sinergisitas ekstrak cacing tanah dengan doksorubisin menyebabkan penggunaan dosis doksorubisin dapat diturunkan untuk memperoleh potensi yang sama. Sehingga dosis penggunaan lebih kecil dan efek samping dapat ditekan. Efek sinergis ditimbulkan karena adanya kesamaan mekanisme kerja oleh doksorubisin yang dapat menginduksi *DNA strand break* atau pemecahan untai ganda DNA pada sel udang sehingga memicu terjadinya apoptosis terhadap ekstrak cacing yang diketahui menyebabkan apoptosis pada sel dengan cara mengaktifkan caspase pada sel yang mengatur apoptosis.

#### D. Kesimpulan

Tablet mengandung ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) memiliki potensi sitotoksik yang baik terhadap larva *Artemia salina* Leach karena hasil perhitungan menunjukkan nilai  $LC_{50}$  kurang dari 1000 ppm yaitu 27,54 ppm. Selain itu, tablet tersebut menunjukkan efek yang sinergis ketika dilakukan pengujian efektifitas ko-kemoterapi yang dikombinasikan dengan doksorubisin. Sehingga ekstrak cacing tanah dapat dijadikan kandidat sebagai agen ko-kemoterapi yang dapat menurunkan dosis pakai serta peningkatan efikasi penggunaan doksorubisin.

#### E. Saran

Dengan hasil yang ada, diharapkan dapat mengisolasi senyawa dari ekstrak cacing tanah yang berpotensi sebagai agen sitotoksik untuk pengembangan obat dan agen ko-kemoterapi kanker dengan pengujian lebih lanjut menggunakan metode yang lebih spesifik terhadap suatu jenis sel kanker.

#### Daftar Pustaka

- Istigfari Riris Jenie. (2007). *Ko-kemoterapi Ekstrak Etanolik Daun Sambung Nyawa (Gynura procumbens (Lour.) Merr.) dan Doxorubicin pada Sel Kanker Payudara*, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2015). *Pusat data dan informasi kementerian kesehatan RI*, Kemenkes RI, Jakarta
- Kim YS, Pyo MK, Park KM, Hahn BS, Yang KY, Yun-Choi HS. (1998). *Dose dependency of earthworm powder on antithrombotic and fibrinolytic effects*. Arch Pharm Res.;21:374-7
- Kumar Mahendra. (2013). *Evaluation of Cytotoxic and Anti-tumor Activity of Partially Purified Serine Protease Isolate From The Indian Earthworm Pheretima posthuma*, India Institute of Medical Science, New Delhi
- Nakajima N, Mihara H, Sumi H. (1993). *Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, Lumbricus rubellus*, Biosci Biotech Biochem.; 57: 1726-30.
- Palungkun, R. (2008). *Sukses Beternak Cacing Tanah Lumbricus rubellus*. Penebar Swadaya, Jakarta.

- Popovic, M.; Hrcenjak, T.M.; Babic, T.; Kos, J.; Grdisa, M. (2001). *Pathol Oncol*, Elsevier Journal
- Stephen, F. B., Gasparini Giampietro, Harris Adrian L., Review. (2001). *Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs*. *Lancet Oncol*; 2: 278–89.
- Stricker T.P., Kumar V. (2008). *Neoplasia*. In: Kumar F., Abbas A.K., Fausto N., Aster J.C., Robbins and Cotran . *Pathologic Basis of Disease 8<sup>th</sup> Edition*, Saunders Elsevier, Philadelphia, p. 284-292.
- Zaki Nur. (2015). *Uji Sitotoksik Ekstrak Metanol Daun Sirsak (Annona muricata L.) Terhadap Larva Artemia salina Leach Dengan Metode Brine Shrimp Lethaly Test (BSLT)*, UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta
- Zhao Jing. (2003). *Hydrolysis of Fibrinogen and Plasminogen by Immobilized Earthworm Fibrinolytic Enzyme II From Eisenia fetida*, Institute of Biophysyc, China