

Uji Toksisitas Kurkumin pada Kultur Sel Luteal

Zulkhah Noor

Bagian Fisiologi FK. Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

Abstract

Curcumin, an active substance of turmeric (Curcuma domestica Val.; Curcuma xanthorrhiza Roxb.), is found to be an anti-fertility substance. The research was aimed to examine the toxicity of curcumin to ovarian cell, especially luteal cell and to investigate the threshold of curcumin toxicity to luteal-cell culture.

The sample used were luteal cell cultures of 3-day-old corpus luteum of immature Sprague-Dawley rats which received ovulation induction of 8 IU PMSG. Luteal cell cultures were divided into 7 groups (n=10), each of which was given curcumin (mg/ml) 0 (vehicle); 0.075; 0.15; 0.3; 0.6; 1.2; 2.4, and incubated for 24 hours. Toxicity effect of curcumin was counted by hemocytometer with trypan blue. The difference of alive-cell number of each group was tested statistically with student t-test and Cythopatic Effect (CPE₅₀) is counted with Reed & Muench formulation.

Student t-test of mean data of alive cell showed significant difference ($p < 0.05$) between the control group and groups which were given curcumin the same or greater than 0.15 mg/ml. Cythopatic Effect (CPE₅₀) of curcumin to cell luteal culture is 0.55 mg/ml.

Key words: Curcumin, Toxicity, cell luteal.

Abstrak

Kurkumin zat aktif yang terdapat dalam rimpang kunyit (*curcuma domestica Val*), temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Robx*) dan beberapa marga curcuma, ditemukan memiliki efek anti fertilitas. Penelitian ini dilakukan untuk uji toksisitas kurkumin pada sel ovarium untuk mengetahui ambang batas kurkumin yang menyebabkan kematian sel (toksis).

Sampel penelitian adalah kultur sel luteal dari korpus luteum umur tiga hari dari tikus Sprague Dawley prepubertal yang mendapat induksi ovulasi dengan 8 iu PMSG. Kultur sel luteal dikelompokkan menjadi 7 kelompok ($n=10$), masing-masing kelompok mendapat kurkumin kadar bertingkat(mg/ml) 0; 0,075, 0,15; 0,3; 0,6; 1,2; dan 2,4; kemudian diinkubasi selama 24 jam . Efek toksis kurkumin (kematian sel) dihitung menggunakan hemositometer dengan zat warna tripan blue. Perbedaan jumlah sel hidup tiap kelompok di uji dengan student t-test. Sedangkan *Cytopathic Effect* (CPE_{50}) dihitung dengan rumus Reed & Muench.

Student t-test rerata data sel luteal hidup menunjukkan perbedaan bermakna ($p<0,05$) antara kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapat kurkumin mulai konsentrasi 0,15 mg/ml. Perhitungan *Cytopathic Effect* (CPE_{50}) kadar kurkumin sintesis murni dalam metanol yang menyebabkan kematian sel luteal umur tiga hari sebanyak 50% adalah 0,55 mg/ml.

Kata kunci: Kurkumin, toksisitas, sel luteal.

Pendahuluan

Pada dasawarsa terakhir, kurkumin banyak diteliti dengan tujuan untuk digunakan sebagai obat. Ammon dan Wahl (1991) melaporkan bahwa kurkumin merupakan substansi choleretik, anti radang, hipotensif, anti hepatotoksik, anti koagulan, penurun kolesterol darah, anti bakteri, anti fungi, anti tumor dan anti fertilitas. Berkaitan dengan efek anti fertilitas, Garg (1974) melaporkan bahwa kurkumin yang diekstrak dari kunyit menyebabkan anovulasi pada tikus. Darma (1985) menulis bahwa kunyit dalam jamu tradisional digunakan untuk membatasi kelahiran.

Untuk mengetahui pangaruh kurkumin pada organ ovarium secara spesifik, bagaimana kurkumin dapat menimbulkan anovulasi, maka diperlukan teknik penelitian *in vitro* dengan menggunakan kultur jaringan. Penelitian *in vitro* lebih banyak dipilih mengingat lebih praktis, cepat dan mudah dilakukan pengulangan. Selain itu teknik kultur jaringan memberi kondisi lingkungan yang lebih mudah dikontrol karena jumlah sel yang diamati terbatas, lebih seragam, mudah dilakukan pengendalian, terhindar dari variasi sistemik dan kompleksitas kondisi *in vivo*.

Agar penelitian *in vitro* berjalan baik, perlu dilakukan uji toksisitas kurkumin pada kultur jaringan. Hal ini dimaksudkan untuk mengetahui ambang batas kadar kurkumin yang dapat ditambahkan pada kultur jaringan tanpa mengakibatkan kematian sel. Dipilih sel luteal korpus luteum sebagai sampel karena korpus luteum dapat dikatakan sebagai kelenjar yang hidupnya singkat kemudian regresi (mati) menjadi korpus albikan. Keberadaan korpus luteum ini menentukan panjang siklus menstruasi dan menentukan kemampuan ovulasi. Selain itu penggunaan kurkumin secara luas oleh masyarakat dapat memberikan dampak atau efek samping bagi kesehatan, dalam hal ini adalah toksisitas. Sedikit sekali pengetahuan masyarakat mengenai efek samping obat tradisional. Mereka menganggap bahwa obat tradisional yang berasal dari alam tidak toksik. Untuk itu diperlukan penelitian tentang ambang batas kadar kurkumin yang dapat menyebabkan toksisitas.

Kurkumin merupakan salah satu obat tradisional yang telah secara luas digunakan mengingat berbagai macam kegunaannya, yang hal ini dapat memberikan dampak pada kesehatan terutama efek farmakologi yang tidak diharapkan karena obat yang berasal dari alam tidak berarti tidak toksik. Dalam penelitian ini akan dilakukan uji toksisitas kurkumin pada kultur sel luteal tikus Strain Sprague-Dawley, sehingga diketahui kadar (dosis) kurkumin yang dapat menyebabkan kematian sel (toksis).

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan Penelitian terdiri dari: kristal kurkumin sintesis murni diperoleh dari Drs. Supardjan Apt. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada; Kultur sel luteal tikus Strain Sprague Dawley dibuat di Laboratorium Ilmu Hayati UGM. Tikus dibeli dari UPHP Universitas Gadjah Mada; Metanol 95%; Aquadest steril; Me-

dalam penumbuh MEM yang mengandung NaHCO_3 , Hapes dan garam earle, pH 7,4. Larutan saline buffer (PBS) steril; Fetal bovine Serum (FBS); Fungison pro kultur; Penisilin dan streptomisin pro kultur; Tripsin 0,25%; dan Trypan blue.

Adapun alat penelitian terdiri dari: Laminar Flow Hood; Inkubator CO_2 5%; Sentrifus; Tabung Sentrifus; Botol Kultur; Cawan kultur 24 sumuran; Berbagai macam bentuk dan ukuran pipet steril; Saringan millipore; Mikroskop inversi; Labu erlenmeyer 25 cc; Gelas ukur 25 cc; Hemositometer; Spektrofotometer.

Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental. Penelitian terdiri dari 2 (dua) kelompok, yaitu: kelompok perlakuan dan kelompok pembandingan. Masing-masing kelompok itu dibuat replikasi sebanyak 10 sampel. Adapun prosedur penelitian diraikan berikut ini.

Pembuatan suspensi kurkumin dengan konsentrasi bertingkat. Semua alat yang akan digunakan harus sudah dalam keadaan aseptik/steril. Kurkumin sintesis murni ditimbang sebanyak 36 mg dan ditaruh dalam erlenmeyer steril. Kurkumin ini dilarutkan dengan metanol 95% hingga larut sempurna. Diperlukan 10 ml metanol, sehingga diperoleh larutan kurkumin dalam metanol dengan konsentrasi 3,6 mg/ml. Selanjutnya konsentrasi kurkumin tersebut dilihat absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 420 A.

Larutan kurkumin disterilisasi dengan millipore 0,22 μ kemudian dicek ulang absorbansinya. Terbukti konsentrasi kurkumin tidak berubah karena perlakuan sterilisasi dengan millipore tersebut. Selanjutnya larutan kurkumin ini dibuat pengenceran dua kali sehingga diperoleh konsentrasi kurkumin bertingkat sebagai berikut: 3,6 mg/ml, 1,8 mg/ml, 0,9 mg/ml, 0,45 mg/ml, 0,225 mg/ml dan 0,1125 mg/ml. Larutan kurkumin dengan konsentrasi bertingkat ini siap untuk digunakan dalam uji toksisitas *in vitro* pada sel luteal.

Penentuan konsentrasi mula-mula yang dipakai dalam penelitian ini berdasarkan pada acuan yang ada pada penelitian sebelumnya, yaitu penelitian mengenai aktivitas antitoksitas dan sitoprotektif kurkumin yang dilakukan Commandeur dan Vermeulen (1997) dari Belanda, dimana pada studi *in vitro* yang telah mereka lakukan, ditemukan bahwa pada kadar kurkumin di atas 5 mM terdapat sedikit kematian sel pada hepatosit tikus segar yang diisolasi.

Induksi Ovulasi. Untuk mendapatkan korpus luteum tikus, tikus diberi suntikan tunggal 8 IU PMSG (*pregnant mare's serum gonadotrophin*) untuk menginduksi terjadinya super ovulasi. Suntikan diberikan pada jam 09:00 tepat umur tikus 28 hari. Ovulasi akan terjadi 2 hari berikutnya sekitar jam 03:00 - 05:00. Pada hari berikutnya terbentuk korpus luteum umur 1 hari (Ahren *et al.*, 1980; Thomas, 1978).

Isolasi korpus Luteum. Tikus yang sudah mengandung korpus luteum umur 3

hari dibunuh dengan memberi eter sebelumnya. Ovarium segera diambil dan ditempatkan dalam PBS (*phosphate buffer saline*) dingin steril yang mengandung penstrep 2% dan dibawa ke laboratorium dalam termos/foam es.

Pengambilan korpus luteum dari ovarium dilakukan dengan forsep tumpul di bawah mikroskop deseksi dan dibersihkan dari jaringan interstitial lainnya. Selama preparasi korpus luteum tetap dalam PBS dingin (Soejono, 1981)

Pembuatan kultur sel luteal. Siapkan dalam botol kultur MEM yang mengandung NaHCO_3 , Hepes, garam earle, 2000 IU collagenase, 3000 IU Dnase per mg jaringan dan 2% penstrep, yang telah diinkubasi terlebih dahulu sehingga suhunya 37°C . Masukkan korpus luteum yang telah bersih ke dalam MEM tersebut dan diinkubasi pada CO_2 5%, 37°C selama dua jam. Saring dengan kasa nilon, kemudian disentrifuge $400 \times g$ dalam 10 menit. Supernatan dibuang, pellet dicuci 3 kali dengan MEM segar.

Resuspensi dengan MEM yang mengandung 25 ml bufer N-2-hydroxyethyl piperazine, N-2-ethane sulfonate (hepes), garam Earle, Fetal Calf Serum (FCS) 10% dan antibiotik (penstrep) 2%. Hitung dengan hemocytometer menggunakan metoda trypan blue. Prosentase sel hidup minimal 60%. Konsentrasi sel yang dipakai $3,4 \times 10^5$ sel/ml.

Setelah diperoleh konsentrasi $3,4 \times 10^5$ sel/ml, sel ditanam pada cawan kultur 96 sumuran sebanyak 0,1 ml per sumuran. Suspensi sel ditanam sebanyak 70 sumuran dibagi menjadi 7 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 10 sumuran. Satu kelompok digunakan sebagai kontrol dan 6 kelompok digunakan sebagai kelompok perlakuan yang menerima kurkumin dengan konsentrasi 3,6 mg/ml, 1,8 mg/ml, 0,9 mg/ml, 0,45 mg/ml, 0,225 mg/ml dan 0,1125 mg/ml masing-masing sebanyak 0,05 ml per sumuran, sehingga akan diperoleh konsentrasi kurkumin setelah ditambahkan pada 0,1 ml suspensi sel per sumuran adalah 0,075 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml, 1,2 mg/ml, 2,4 mg/ml.

Untuk kelompok kontrol diberi perlakuan pelarut kurkumin saja yang disebut vehicle yaitu 0,05 ml metanol 95% per sumuran. Kelompok kontrol ini digunakan sebagai pembanding sehingga perlu perlakuan yang sama dengan kelompok-kelompok lain kecuali kurkumin sebagai zat yang akan diteliti.

Kultur sel luteal yang telah mendapat perlakuan tadi diinkubasi dalam 37°C CO_2 5% selama 24 jam. Terakhir dilakukan penghitungan ulang untuk menghitung jumlah sel yang mati (toksik) akibat pemberian kurkumin.

Pengukuran Hasil Penelitian. Dari tiap sumuran dihitung jumlah sel hidup dengan hemositometer. Media dari tiap sumuran dibuang dan dibilas dengan PBS. Selanjutnya tiap sumuran diberi tripsin 0,25% dan PBS masing-masing satu tetes kemudian diberi trypan blue sebagai pewarna sebanyak satu tetes dan diaduk biar merata. Dari tiap sumuran, diambil satu tetes dan diteteskan pada hemositometer kemudian dilihat di bawah mikroskop inversi dan dihitung banyaknya sel yang masih hidup. Setelah

didapat semua datanya, dihitung rerata jumlah sel yang hidup dari masing-masing konsentrasi kurkumin yang diberikan dan dibandingkan dengan kontrol dan hasilnya dinyatakan dalam persentase.

Toksisitas kurkumin pada kultur sel luteal dapat diketahui secara pasti dengan metode *cythopathic effect* atau CPE_{50} , yakni kematian sel 50% yang diakibatkan oleh perlakuan kurkumin konsentrasi tertentu. Nilai CPE_{50} dihitung dengan menggunakan rumus Reed & Muench, analog dengan menentukan titer netralisasi virus dari serum anti virus.

Rumus:

$$\log CPE_{50} = \log A - p \log 2$$

Keterangan:

CPE_{50} : Kerusakan sel luteal sebesar 50%

A : Kadar zat (kurkumin) yang memberikan kerusakan sel luteal di atas 50%

P : Proportionate distance

$$: \frac{a - 50}{a - b}$$

$$a - b$$

dimana

a = jumlah sampel (dalam %) yang kerusakan selnya di atas 50%

b = jumlah sampel (dalam %) yang kerusakan selnya di bawah 50%.

2 : Faktor pengenceran serial kadar kurkumin dengan metanol

Hasil dan Pembahasan

Sebelum penelitian dilakukan telah dilaksanakan uji stabilitas kurkumin dalam media MEM. Caranya kurkumin 1,8 mg/ml metanol dilarutkan dalam MEM 1:1, sehingga diperoleh larutan 0,9 mg/ml MEM. Larutan kurkumin ini diukur absorbansinya dengan spektrofotometer kemudian disimpan dalam refrigator 4°C. Selang 24 jam kemudian diukur absorbansinya kembali ternyata absorbansi larutan kurkumin tersebut tidak berubah walaupun sudah disimpan selama 1 minggu.

Terdapatnya rusakan kurkumin membentuk kristal kaca dan endapan hitam pada penelitian mungkin karena larutan kurkumin terlalu pekat dan juga karena suhu inkubator (37°C) yang dapat mempercepat degradasi kurkumin. Untuk itu perlu dilakukan uji stabilitas kurkumin berbagai konsentrasi dalam MEM pada suhu inkubator 37°C.

Hasil foto sulit untuk menetapkan toksisitas kurkumin terhadap kultur sel luteal. Untuk mengetahui secara pasti toksisitas kurkumin terhadap kultur sel luteal adalah dengan menghitung jumlah sel luteal yang hidup atau yang mati pada setiap sumuran dengan memakai metoda pewarna trypan blue dan dihitung dengan hemositometer. Dengan metoda pewarna trypan blue ini sel mati akan berbeda dengan sel hidup. Sel yang mati akan menyerap warna biru karena sel mati telah mengalami kebocoran atau kerusakan membran selnya sehingga sel mati akan berwarna biru. Sebaliknya, pada sel hidup, membran selnya masih baik sehingga warna biru dari trypan blue tidak dapat menembus membran sel. Dengan demikian sel hidup akan tampak jernih dan mengkilap.

Data rerata jumlah sel hidup, persentase jumlah sel luteal yang hidup (dengan menganggap jumlah sel luteal pada kelompok kontrol adalah 100%) dan persentase jumlah sel luteal yang mati, dapat dilihat pada tabel 1.

Dalam kondisi *in vitro* hampir semua sel tumbuhan maupun sel hewan dapat hidup dan berproliferasi apabila kondisinya sesuai dengan kondisi *in vivo*. Sel-sel dalam kultur jaringan akan menyebar migrasi dari fragmen organ atau sel yang terurai dari suatu jaringan. Dalam kondisi yang sesuai serta adanya nutrisi yang cukup, sel mampu menyebar, migrasi dan berproliferasi tanpa mengalami deferensiasi khusus. Kultur sel primer yaitu kultur sel yang diperoleh langsung dari jaringan asal belum mengalami perubahan sifat dan fungsi. Berbeda dengan sel turunan (*sel line*), banyaknya penanaman ulang (*passage*) akan menyebabkan kultur sel ini mengalami sedikit perubahan sifat dan fungsinya (Freshney, 1990).

Jumlah sel pada kelompok kontrol yang hanya mendapat *vehycle* (metanol) terdapat peningkatan dari jumlah sel ditanam, yaitu mulai $3,4 \times 10^5$ sel/ml menjadi $4,89 \times 10^5$ sel/ml atau bertambah sebanyak $1,49 \times 10^5$ sel/ml. Sedangkan pada kelompok perlakuan terlihat adanya pengaruh kurkumin terhadap pertumbuhan sel luteal. Semakin besar kadar kurkumin yang diberikan semakin menghambat pertumbuhan sel bahkan mematikan sel.

Pemberian kurkumin 0,075 mg/ml telah memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan sel dimana jumlah sel hidup pada kelompok ini lebih rendah dibandingkan dengan jumlah sel hidup pada kelompok kontrol. Walaupun demikian, sel masih mampu berkembang, yang dalam hal ini terdapat pertambahan sebanyak $1,39 \times 10^5$ sel/ml. Begitu juga dengan kelompok yang mendapat 0,15 mg/ml dan 0,3 mg/ml, sel masih mampu berkembang masing-masing bertambah sebanyak $0,75 \times 10^5$ sel/ml dan $0,4 \times 10^5$ sel/ml.

Pemberian kurkumin dengan konsentrasi yang lebih tinggi tidak hanya menghambat pertumbuhan sel, akan tetapi akan mematikan sel yang telah ada. Pemberian kurkumin 0,6 mg/ml, 1,2 mg/ml dan 2,4 mg/ml mematikan sel masing-masing sejumlah $1,16 \times 10^5$ sel/ml, $1,85 \times 10^5$ sel/ml dan $2,32 \times 10^5$ sel/ml berturut-turut.

Dari rerata data pada tabel 1 setelah dilakukan uji beda *student t-test* antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang mendapat kurkumin mulai konsentrasi 0,075 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,6 mg/ml, 1,2 mg/ml, hingga 2,4 mg/ml, maka antara kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapat kurkumin kadar 0,075 mg/ml yang menunjukkan hasil tidak berbeda secara bermakna ($p > 0,05$), sedangkan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang lain masing-masing menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$).

Tabel 1. Jumlah ($M \pm SD$) Sel Luteal yang Masih Hidup, Persentase Sel Hidup dan Persentase Sel Mati dari Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan

Ke- lom- pok No.	Kadar Kurkumin mg/ml (mg/ml)	Rerata Data Jumlah Sel Luteal (10^3 sel)	Persentase Sel Luteal Hidup (%)	Persentase Sel Luteal Mati (%)
1	0	489 \pm 9	100	0
2	0,075	479 \pm 10	97,96	2,04
3	0,15	415 \pm 10	84,87	15,13
4	0,3	380 \pm 8	77,71	22,29
5	0,6	224 \pm 10	45,80	54,20
6	1,2	155 \pm 10	31,70	68,30
7	2,4	108 \pm 8	22,09	77,91

Toksisitas kurkumin pada kultur sel luteal dapat diketahui secara pasti dengan metoda *Cytophatic Effect* atau CPE_{50} yakni kematian sel sebanyak 50%, seperti halnya *lethal dose 50* (LD_{50}) pada penelitian *in vivo*. Dari data-data di atas terlihat bahwa konsentrasi kurkumin 0,6 mg/ml telah menyebabkan kematian sel sebesar 54,20%, sedangkan kadar kurkumin 0,3 mg/ml menyebabkan kematian sel sebesar 22,29 %. Dengan demikian, kadar kurkumin yang menyebabkan kematian sel sebesar 50% berada di antara kadar 0,3 mg/ml dan 0,6 mg/ml atau hampir konsentrasi 0,6 mg/ml. Dari perhitungan *Cytophatic Effect* atau CPE_{50} dengan rumus Reed dan Muench didapatkan nilai sebesar 0,55 mg/ml. Kadar kurkumin 0,55 mg/ml tersebut menyebabkan kematian sel sebesar 50%.

Hasil perhitungan CPE_{50} tersebut berbeda dengan dengan hasil penelitian Commander dan Vermeulen (1989) yang melakukan penelitian aktivitas sitotoksisitas dan citoprotektif kurkumin pada hepatosit tikus, yaitu 1,8 mg/ml. Perbedaan tersebut dimungkinkan karena perbedaan jalan penelitian, perbedaan sel yang digunakan dan perbedaan perlakuan yang diberikan. Hasil penelitian ini juga berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Budiman (1998) yang melakukan uji toksisitas kurkumin pada sel fibroblas (sel *vero line*) yakni 0,807 mg/ml. Perbedaan tersebut terjadi karena pada penelitian ini menggunakan kultur sel luteal primer. Sedang peneliti terdahulu

menggunakan kultur sel vero line, yang pada umumnya sel turunan akan lebih tahan/resisten terhadap perlakuan, sedang sel primer sangat sensitif dengan per bagian perlakuan. Penyebab lain perbedaan hasil penelitian diduga karena perbedaan lama perlakuan dan pelarut kurkumin yang digunakan serta jenis kurkumin yang digunakan.

Dari hasil perhitungan student t-test antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan hanya antara kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapat kurkumin kadar 0,075 mg/ml yang menunjukkan tidak berbeda secara bermakna. Sedangkan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang mendapat kurkumin lebih besar dari 0,075 mg/ml, menunjukkan berbeda secara bermakna dengan $p > 0,05$. Hal itu menunjukkan bahwa pemakaian kurkumin sintesis murni dengan pelarut metanol 0,075 mg/ml aman untuk kultur sel luteal. Walaupun ada perbedaan jumlah sel hidup yang terhitung, tetapi perbedaan tersebut tidak berbeda secara bermakna. Untuk itu perlu diperhatikan jika memberi perlakuan kurkumin sintesis murni dengan pelarut metanol pada kultur sel luteal, kadar tersebut dianggap tidak mempengaruhi viabilitas sel.

Dari hasil pengamatan kelompok perlakuan seperti terlihat pada gambar 2 sampai 4, terlihat adanya endapan kurkumin pada kadar kurkumin 1,2 mg/ml dan 2,4 mg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa semakin pekat kadar kurkumin semakin tidak stabil sehingga kematian sel tidak hanya disebabkan oleh kadar kurkumin yang diberikan, tetapi adanya zat-zat hasil degradasi kurkumin ini dimungkinkan dapat menimbulkan peningkatan toksisitas. Dengan demikian perlu digunakan metoda tertentu untuk mencegah kurkumin terdegradasi karena suhu 37°C dan ph 7,4 dari MEM. Suatu metoda yang dapat dicoba terapkan adalah dengan penambahan vitamin C yang telah terbukti dapat menstabilkan kurkumin.

Pada penelitian ini digunakan pelarut metanol karena hasil penelitian Tonnesen dan Karlsen (1986) menunjukkan kurkumin paling stabil pada metanol, sehingga kerusakan akibat penyimpanan sebelum diberikan pada kultur sel dapat dihindari. Namun demikian perlu dipertimbangkan pengaruh metanol terhadap kultur sel luteal. Dalam hal ini hasil penelitian dan nilai CPE_{50} baru dapat digunakan untuk menghitung dosis penggunaan kurkumin pada kultur sel *in vitro* dan belum dapat dipakai untuk menghitung dosis penggunaan kurkumin *in vivo*. Untuk keperluan pemakaian *in vivo* uji toksisitas dapat dilakukan seperti penelitian Shankar *et al.* (1979) yakni zat/kurkumin diberikan secara *in vivo*, parenteral per oral atau injeksi, kemudian dilihat toksisitasnya pada organ-organ tertentu dengan melihat kerusakan sel pada organ-organ tadi.

Sampai saat ini belum ada perhitungan baku untuk mengkonversikan nilai kematian sel sebesar 50% (CPE_{50}) dari pemakaian *in vitro* ke dalam dosis untuk pemakaian *in vivo*, apalagi ke dalam dosis untuk manusia. Hal ini disebabkan karena penelitian *in vitro* berbeda dengan penelitian *in vivo*, masing-masing memiliki kekhususan dalam jangkauan penelitian. Penelitian *in vitro* dapat untuk mengkaji

secara mendalam dan mencari mekanisme seluler pengaruh suatu zat terhadap sel/organ yang tidak mungkin dilakukan dengan penelitian *in vivo*, sedangkan penelitian *in vivo* lebih mengarah pada efek farmakologi obat secara sistematis atau lokal pada individu.

Simpulan

1. Hasil yang diperoleh dapat dikatakan bahwa peningkatan kadar kurkumin akan meningkatkan kematian sel atau menurunkan viabilitas sel.
2. Dengan rumus Reed dan Muench diperoleh nilai CPE_{50} sebesar 0,55 mg/ml.
3. Analisis Student t-test antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan menunjukkan hasil berbeda secara bermakna dengan $p \leq 0,05$ antara kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapat kurkumin sama atau lebih besar dari kadar 0,15 mg/ml.

Saran

Berdasar hasil penelitian ini dikemukakan hal-hal yang perlu diperhatikan sebagai berikut:

- a. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai stabilitas kurkumin pada media-media yang digunakan untuk kultur dan efek inkubasi dalam inkubator CO_2 5% $37^{\circ}C$.
- b. Perlu dilakukan penelitian efek toksis kurkumin dengan beberapa masa inkubasi yang berbeda, dengan pelarut kurkumin yang lebih cocok untuk penggunaan pada kultur sel.
- c. Perlu adanya penelitian efek toksis kurkumin pada sel-sel gonad yang lain, seperti sel granulosa dan sel luteal dengan umur yang berbeda-beda karena tiap jenis sel memiliki sifat dan karakteristik yang berbeda.

Ucapan Terimakasih

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Prof. dr. Sri Kadarsih Soejono, MSc, PhD. yang telah memberi bimbingan dan bantuan untuk terlaksananya penelitian ini. Peneliti juga mengucapkan terimakasih kepada Kopertis Wilayah V Yogyakarta yang telah memberi dana untuk pelaksanaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Ahren, K., Rosberg, S., Khan, I., 1980. On the Mechanism of Tropic Hormone Action in the Ovary. *Hormone and Cells Regulation* Vol. 4, J. Dumont and J. Numez eds. Elsevier North-Holland Biomedical Press.

- Ammon, H.P., N. Wahl, N.A., 1991. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Medica* 57; 1-7.
- Budiman, N., 1998. Model Kultur Jaringan dalam mempelajari Toksisitas *Curcumin* pada Kultur Fivroblas. Karya Tulis Ilmiah. Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Commandeur JNM, Vermeulen NPE, 1997. Cytotoxicity and Cytoprotective Activity of Curcumin. In: Pramono S. et al, editors. *Recent Developments in Curcumin Pharmacology*. Yogyakarta: Aditya Media, 66-78.
- Garg, S.K., 1974. Effect of *Curcuma longa* (Rhizomes) on Fertility in Experimental Animals. *Planta Medica*, 26: 225-227
- Huang, M.T. , Lysz, T., Ferraro, T., Abidi, T.F., Laskin, J.D., and Conney, A.H., 1991. Inhibitory Effects of Curcumin on In-vitro Lipoxygenase and Cyclooxygenase Activities in Mouse Epidermis. *Cancer-Res.* 1991 Feb.; 51(3); 813-9.
- Soejono, S.K., 1988. Korpus Luteum. *Bahan Pengajaran*. Pusat Antar Universitas Bidang Ilmu Hayati Institut Teknologi Bandung.
- Soejono, S.K., 1988. *Laporan Penelitian Pengembangan Teknik Kultur Jaringan yang Berperan dalam Sistem Hormonal, Sistem Enzim dan Faktor Tropik*. PAU Bioteknologi UGM, Yogyakarta.
- Soejono, S.K., 1990. *Petunjuk Laboratorium Kultur Jaringan Hewan*. PAU Bioteknologi UGM, Yogyakarta.
- Thomas, et.al., 1978. Mechanism of Rapid Antigonadotrophic Action of Prostaglandin in Cultured Luteal Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol., 75 No.3, pp. 1344-1348.
- Tornesen, H.H., Karlsen J. High, 1983. Performance Liquid Chromatography of Curcumin and Related Compounds. *Journal of Chromatography*. 259: 367-371.