

EFEK SITOTOKSIK *HAARLEM OIL* TERHADAP *HL-60 CELL LINE* DAN *Steinernema feltiae*

Cytotoxic Effect of Haarlem Oil on HL-60 Cell Line and Steinernema feltiae

Muhammad Bahi¹, Claus Jacob², dan Khairan Khairan^{3*}

¹Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²School of Pharmacy, Universitaet des Saarlandes, Saarbruecken, Germany

³Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

*Corresponding author: khannazia_yusuf@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan efek sitotoksik *Haarlem oil* (HO) terhadap sel HL-60 dan *Steinernema feltiae* (*S. feltiae*). Hasil uji menggunakan *trypan blue* dan *CellTiter-Glo® assay* menunjukkan bahwa HO mempunyai efek sitotoksik yang paling tinggi terhadap sel HL-60 baik pada konsentrasi 1:10 dan 1:5. Hasil uji MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*) assay memperlihatkan bahwa efek sitotoksik yang paling tinggi adalah pada konsentrasi 1:5 dengan persen sel viabilitas berkisar 40-65%. Uji nematisidal HO terhadap cacing *S. feltiae* menunjukkan bahwa HO pada konsentrasi 1:5 memperlihatkan aktivitas lebih tinggi dengan persen viabilitas sekitar 70%. Hasil penelitian beberapa metode uji menunjukkan bahwa produk bahan alam semisintetik HO memberikan efek toksisitas yang paling baik terhadap sel HL-60 dan uji nematisidal HO terhadap *S. feltiae* menunjukkan aktivitas yang cukup baik.

Kata kunci: *Haarlem oil*, *HL-60 cell line*, senyawa organosulfur, *Steinernema feltiae*

ABSTRACT

The objective of this research was to investigate cytotoxicity effect of *Haarlem oil* (HO) on *HL-60 cell line* and *Steinernema feltiae* (*S. feltiae*). The test results using *trypan blue* method and *CellTiter-Glo® assays* revealed that HO showed higher cytotoxicity effect against *HL-60 cell line* especially at concentration of 1:10 and 1:5. Meanwhile, the MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*) assay revealed that the higher cytotoxicity effect showed at 1:5, with the cell viabilities were around 40-65%. The nematocidal assay discovered that HO at concentration of 1:5 showed higher activities compare to other concentrations with percentage viability of 70%. These studies have shown that HO shows cytotoxic effect against *HL-60 cell lines*, and moderate activity against *S. feltiae* as well.

Key words: *Haarlem oil*, *HL-60 cell line*, organosulfur compounds, *Steinernema feltiae*

PENDAHULUAN

Haarlem oil (HO) merupakan suatu bahan alam semisintetik (*semisynthetic of natural product*) yang mengandung senyawa organosulfur dan terpena. *Haarlem oil* pertama sekali diperkenalkan di Belanda pada abad ke-18, oleh seorang peneliti yang bernama Claas Tilly. Pada saat itu, Claas Tilly menggunakan HO pertama sekali untuk pengobatan ginjal dan batu kemih. Penggunaan HO kemudian menjadi semakin populer di Belanda pada masa itu terutama untuk pengobatan berbagai penyakit dan juga digunakan sebagai terapi dalam bidang kesehatan. Produksi HO saat itu makin terus berkembang, dan kemudian menjadi perhatian para ilmuwan karena khasiat dan kegunaannya. Pada abad ke-19, Thomas Monsieur, seorang ilmuwan berkebangsaan Perancis, adalah orang yang pertama sekali mempelajari kegunaan dan efek HO secara farmakologis, terutama untuk meningkatkan kebugaran dan stamina. Selanjutnya pada tahun 1924, HO telah diperdagangkan secara meluas di Perancis sebagai suplemen makanan (*food supplement*). Pada tahun 1980-an dan 1990-an, HO kembali mendapat perhatian para ilmuwan karena kandungan sulfur yang terkandung di dalamnya. Saat ini, HO diproduksi sebagai produk semisintetik dari bahan alam yang dibuat dari minyak terpena dan elemen sulfur yang direaksikan secara bersamaan pada suhu tinggi (Sarakbi, 2009).

Haarlem oil juga sangat berpotensi digunakan sebagai obat-obatan dalam bidang kesehatan. *Haarlem oil* sebagai suplemen alami telah dilaporkan mempunyai aktivitas untuk mengobati penyakit rematik, bronkitis, hati, dan ginjal (Wittop-Koenig, 1972a; Wittop-Koenig, 1972b). Uji histologis dan bioklinis terhadap mencit menunjukkan bahwa *sulfo-terpene* secara signifikan mampu menstimulasi adrenal korteks dengan cara menyekresi *cortico-trophine pituitary* (ACTH) dan mengeliminasi kortikosteroid dalam urin (Lefevre, 1959). *Haarlem oil* juga mempunyai sifat antiseptik yang kuat. Sifat antiseptik ini diduga berasal dari kandungan terpena yang terdapat dalam HO. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa HO mampu terdistribusi dalam jaringan *bronchial-pulmonary* selama 15-60 menit. Aksi anti-inflamasi juga memperlihatkan bahwa HO mampu meningkatkan aksi *superoxidase dismutase* (SOD) dengan cara meningkatnya gugus tiol (-SH) dalam plasma. Uji aktivitas anti-oksidan memperlihatkan bahwa HO mampu meningkatkan aktivitas enzim SOD. Uji toksikologi dan posologi memperlihatkan bahwa tidak ditemukan adanya kasus intoksikasi pada pasien yang diberikan HO pada dosis pemberian 2500 mg/kg (Jae *et al.*, 2008). Perlakuan terhadap pasien yang terinfeksi bronkitis menunjukkan bahwa perlakuan HO pada dosis 10 mg/kg selama 10 hari menunjukkan hasil yang sangat bagus setelah dianalisis berdasarkan hasil X-ray (Chan *et al.*, 2013).

Dalam tubuh, sulfur sangat esensial karena berfungsi sebagai suatu agen regulasi dalam pengeluaran kelenjar empedu, sebagai stimulator dalam sistem respiratori, sebagai penetral toksin, dan membantu dalam penghilangan anti-alergi. Di dalam sel, sulfur sangat berperan dalam pembentukan struktur protein, dan juga berkontribusi dalam pembentukan asam-asam amino esensial (seperti sistein dan metionin), beberapa vitamin (tiamin atau vitamin B₁, Biotin, dan B₆), dan koenzim A (CoA), yang sangat berperan dalam banyak sistem metabolisme. Senyawa sulfur juga sangat berperan dalam pencegahan berbagai penyakit kanker, dan beberapa mikroorganisme seperti bakteri dan jamur. *Haarlem oil* merupakan suatu produk alami mengandung senyawa sulfur yang tidak umum (*unusual sulphur compound*) seperti thiosulfinat, polisulfan, *1,2-dithiin*, dan *1,2-dithiole-3-thione*, dan beberapa isotiosianat lainnya. Selain itu, senyawa ini juga banyak ditemukan dalam bahan alami lainnya seperti bawang-bawangan (*Allium* sp.), *mustard*, dan asparagus. *Unusual sulphur compound* umumnya mengandung *reactive sulphur species* (RSS) yang berfungsi sebagai anti-oksidan dan mempunyai aktivitas sebagai senyawa sitotoksik karena mempunyai kemampuan sebagai antikanker, antibakteri, antijamur, dan antiskleroderma (Stephen *et al.*, 2015).

Sel HL-60 adalah sel *human promyelocytic leukemia* yang umumnya digunakan sebagai model untuk mengukur aktivitas sitotoksik suatu senyawa (Lehmann, 1998; Gebreselassie, 2006). Sel HL-60 juga sering digunakan untuk melihat sifat anti-oksidan suatu senyawa. *Steinernema feltiae* (*S. feltiae*) adalah nematoda bersifat mikroskopis. Cacing ini termasuk cacing golongan *entomopathogenic nematodes* karena mampu menginfeksi *host* insek (Gaugler *et al.*, 1997). Pemilihan *S. feltiae* sebagai organisme uji dikarenakan organisme ini merupakan *higher organism* dan digunakan sebagai model untuk *whole organism* (Jorgensen *et al.*, 1998; Gaugler, 2006). Pada penelitian ini, dilakukan uji aktivitas HO terhadap sel HL-60 dan *S. feltiae*.

MATERI DAN METODE

Haarlem oil diperoleh atas pemberian dari Dr. J. Lafevre, ZI La Pelouse-55 190, Void Vacon, Perancis. Bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Sigma Aldrich (Darmstadt, Jerman). Selain itu, larutan yang digunakan dalam penelitian adalah *deionized MilliQwater* (dMilliQ) (R= 18.2 MΩ). Kultur sel HL-60 diperoleh dari Prof. Dr. Alexandra K. Kiemer (Dept. of Pharmaceutical Biology, Saarland University, Germany).

Trypan Blue Assay

Sel HL-60 ditumbuhkan dalam media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI1640) yang disuplementasi dengan 10% *fetal calf serum* (FCS), 100 U/ml penisilin G, 100 µg/ml streptomisin, dan 1% l-glutamin, diinkubasi pada suhu 37° C, pada tekanan atmosfer dengan CO₂ 5%. Sel yang tumbuh digunakan untuk uji

viabilitas sel. Sebanyak 200 µl sel (densitas sel sebanyak 5000 sel) dimasukkan ke dalam eppendorf 1,5 ml yang berisi HO dengan konsentrasi akhir HO dan dMilliQ adalah 1:100; 1:10; dan 1:5. Transfer sel dilakukan dalam keadaan steril, dan diinkubasi selama 3 menit pada suhu ruang dalam kondisi gelap. Dengan jumlah volume yang sama, larutan *trypan blue* 0,4% (w/v) yang dilarutkan dalam larutan salin 0,81% (NaCl) dan larutan kalium posfat 0,06% (w/v). Selanjutnya, sel diinkubasi selama 8, 24, dan 48 jam. Setelah tercapainya waktu inkubasi, sel dihitung dengan menggunakan hemositometer dua kamar (Steven *et al.*, 1993). Persentase sel yang hidup dan sel yang mati menggunakan rumus:

$$\text{viable cells (\%)} = \frac{\text{total number of viable cells per ml of aliquot}}{\text{total number of cells per ml of aliquot}} \times 100$$

CellTiter-Glo® Assay

Sel HL-60 ditumbuhkan dalam media RPMI1640 yang disuplementasi dengan 10% FCS, 100 U/ml penisilin G, 100 µg/ml streptomisin, dan 1% l-glutamin, diinkubasi pada suhu 37° C, pada tekanan atmosfer dengan CO₂ 5%. Sel yang tumbuh digunakan untuk uji viabilitas sel. CellTiter-Glo® assay digunakan untuk mengukur inhibisi dari proliferasi sel. Densitas sel yang digunakan dalam uji ini adalah 5.000 sel *per well* dalam *96-well plate*. Sel selanjutnya diinkubasikan selama 24 jam. Setelah 24 jam, sel diberikan HO dengan berbagai variasi konsentrasi (HO: dMilliQ adalah 1:100; 1:10; dan 1:5), dan selanjutnya ditambahkan antibiotik rapamisin untuk menghindari sel dari kontaminasi. Sinyal sel CellTiter-Glo® assay selanjutnya ditentukan setelah inkubasi 8, 24, dan 48 jam (Jessica *et al.*, 2011). Data selanjutnya dianalisis menggunakan program PRISM (*Graphpad Software*).

MTT (3 - (4,5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5 - diphenyl tetrazolium bromide) Assay

Sel HL-60 ditumbuhkan dalam media RPMI1640 yang disuplementasi dengan 10% FCS, 100 U/ml penisilin G, 100 µg/ml streptomisin, dan 1% l-glutamin, diinkubasi pada suhu 37° C, pada tekanan atmosfer dengan CO₂ 5%. Sel yang tumbuh digunakan untuk uji viabilitas sel. Selanjutnya, sel diinkubasi dengan HO (2 x 10³ sel/*well* dalam *96-well plate*) selama 8, 24, dan 48 jam. Setelah tercapainya waktu inkubasi, media pertumbuhan sel HL-60 diganti dengan 200 µl senyawa uji yang terbebas dari media pertumbuhan dan disuplementasi dengan 50 µl 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) selama 3 jam pada suhu 37° C dan terlindungi dari cahaya sampai terbentuknya kristal violet *formazan*. Kristal *formazan* yang terbentuk selanjutnya dilarutkan dalam 200 µl *dimethyl sulfoxide* (DMSO), dan diukur absorbansi *optical density* (OD) pada panjang gelombang 570 nm (*Microplate Reader, SpectraMax M 5, EUA; Molecular Devices, Sunnyvale, CA*) dengan panjang gelombang referensi sebesar 630 nm (Berridge *et al.*, 2005). Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan program PRISM (*Graphpad Software*).

Nematode Assay

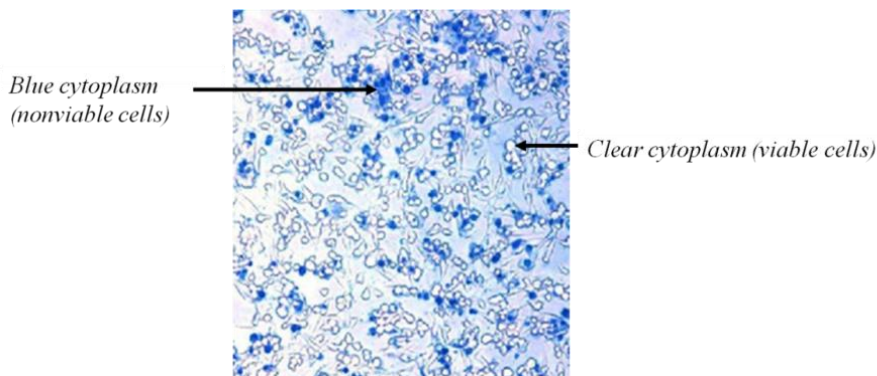
Uji nematoda dilakukan berdasarkan metode yang telah dikembangkan oleh Sarakbi (2009), dengan sedikit modifikasi. *Steinernema feltiae* sebelum digunakan terlebih dahulu disimpan pada suhu 4-8° C. Untuk pengujian nematoda, 200 mg *soft cake* dari *S. feltiae* dilarutkan dalam 50 ml dMilliQ untuk membentuk larutan suspensi nematoda. Sebelum digunakan, larutan suspensi ini didiamkan terlebih dahulu selama 10-15 menit pada suhu ruang untuk menyegarkan kembali cacing *S. feltiae*. Untuk uji aktivitas, larutan suspensi dilarutkan dalam sampel HO yang telah dibuat dalam berbagai konsentrasi. Dalam penelitian ini, HO dibuat dalam tiga bentuk variasi konsentrasi dengan dMilliQ dengan perbedaan konsentrasi HO:dMilliQ adalah HO:dMilliQ (1:100; 1:10; dan 1:5). Untuk kontrol positif, 100 µl larutan suspensi cacing dimasukkan ke dalam satu *well-plate* steril (*96 well plate flat bottom tissue cell culture*) yang telah berisi DMSO 2%. Untuk setiap konsentrasi, dibuat tiga kali pengulangan. Untuk setiap kali pengulangan, dibuat tiga sampel, *S. feltiae* yang hidup dan yang mati dihitung segera setelah inkubasi (24 jam) terhadap sampel dengan menggunakan mikroskop (*four-fold magnification*). Kemudian dianalisis persen viabilitas nematoda terhadap sampel uji. Selanjutnya, *plate* uji ditutup dan diinkubasi pada suhu ruang dalam ruang tertutup. Selanjutnya, dilakukan penghitungan kembali setelah 24 jam pemaparan (Sarakbi, 2009). Data yang dihasilkan dan dianalisis menggunakan program PRISM (*Graphpad Software*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

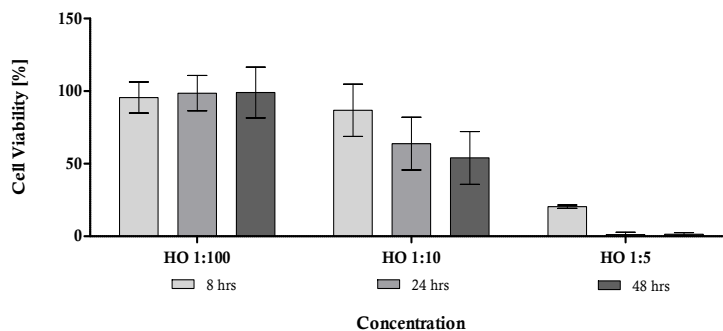
Trypan Blue Assay

Trypan blue assay merupakan suatu metode yang digunakan untuk menentukan jumlah viabilitas suatu sel. Prinsip dasar metode ini adalah bahwa sel normal mempunyai membran sel yang utuh yang mampu menahan zat asing yang masuk ke dalam sel seperti pewarna *trypan blue*, sementara sel yang tidak normal, membran selnya tidak mempunyai kemampuan untuk menahan zat asing untuk masuk ke dalam sel. Pada uji ini, suspensi sel dicampur dengan suatu pewarna (*dye*) yaitu *trypan blue*, yang selanjutnya secara visual, sel diamati dan dihitung menggunakan mikroskop. Pengamatan dilakukan dengan melihat apakah sel tersebut mampu mengeluarkan (*exclude*) atau mengambil (*uptake*) zat pewarna (*dye*) tersebut. Dalam uji ini, sel yang sehat (*viable cells*) mempunyai sitoplasma yang jernih karena membran selnya tidak bisa ditembusi oleh *dye*, sementara sel yang tidak sehat (*nonviable cells*) mempunyai sitoplasma yang berwarna biru (*blue*), karena membran selnya telah rusak sehingga mudah ditembusi oleh zat asing seperti *trypan blue* (Gambar 1).

Viabilitas sel HL-60 yang telah terpapar dengan HO disajikan pada Gambar 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa HO mempunyai efek sitotoksik terhadap sel secara signifikan hampir pada semua waktu dan konsentrasi yang digunakan. Hasil ini juga menunjukkan bahwa, HO pada konsentrasi yang tinggi yakni HO: dMilliQ (1:5) dan (1:1) menunjukkan efek



Gambar 1. *Blue cytoplasm (non viable cells)* dan *clear cytoplasm (viable cells)* yang diamati di bawah mikroskop dengan menggunakan metode *trypan-blue assay*



Gambar 2. Efek konsentrasi dan waktu inkubasi *Haarlem oil* terhadap sel HL-60 menggunakan *trypan-blue assay*. Data dinyatakan dalam persen viabilitas (%±SD)

yang sangat kuat terhadap persen viabilitas sel HL-60 dengan persen viabilitasnya <10% pada inkubasi 8 jam, sementara bila waktu inkubasinya diperpanjang sampai 24 dan 48 jam persen viabilitasnya hampir 0%. Hasil ini menunjukkan bahwa, HO mempunyai efek sitotoksik yang paling tinggi terhadap sel HL-60.

CellTiter-Glo® Assay

CellTiter-Glo® *luminescent* sel viabilitas adalah suatu metode *homogenous* yang digunakan untuk menentukan jumlah sel aktif dalam kultur sel yang secara metabolik dikuantifikasi berdasarkan adanya nukleotida adenosin triposfat (ATP) dalam sel. Dalam metode ini, keberadaan ATP dinyatakan sebagai indikator adanya proliferasi sel dan juga digunakan sebagai indikator adanya perubahan energi dalam sistim biologis sel. Adenosin triposfat banyak ditemukan dalam sel hidup (*living cells*) karena berperan dalam proses katabolik dan anabolik sel. Pengukuran ATP merupakan hal yang fundamental dalam mempelajari sel, karena ATP secara langsung berkorelasi dengan jumlah sel. Dalam metode ini, penggunaan enzim lusiferase diperlukan untuk proses reaksi untuk menghasilkan luminesensnya, yang kemudian diukur cahaya atau sinyal yang dihasilkan. Cahaya atau sinyal yang dihasilkan sangat berkaitan dengan jumlah ATP yang ada, dan juga sangat berkorelasi dengan jumlah sel yang hidup.

Dalam metode ini, senyawa uji dibuat pada konsentrasi tertentu dan diinkubasi selama 8, 24, dan 48 jam. Jumlah ATP diamati pada akhir waktu inkubasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa HO pada konsentrasi 1:10 sudah mampu mereduksi ATP sel HL-60 sebesar 50%, sementara pada konsentrasi lebih besar yaitu 1:5, HO mampu mereduksi ATP sampai 100%, artinya pada konsentrasi ini sel HL-60 tidak mampu lagi mereduksi ATP karena selnya telah mengalami lisis atau kematian karena terjadinya penurunan glikogenesis di dalam sel. Glikogenesis sangat diperlukan untuk pembentukan ATP. Penurunan glikogenesis ini mengakibatkan pembentukan glikogennya terhenti akibatnya sel mengalami kematian. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa

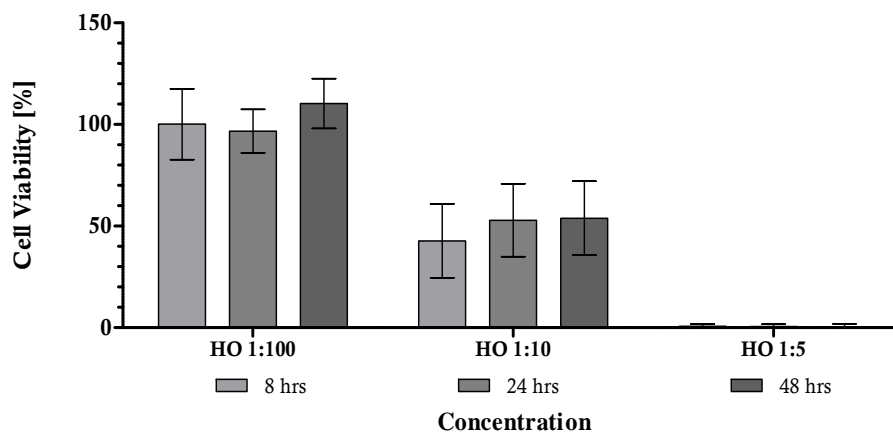
HO secara signifikan mampu mereduksi ATP pada sel HL-60 pada semua waktu inkubasi. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah ATP yang dilepaskan oleh HO sangat cepat (Gambar 3).

MTT Assay

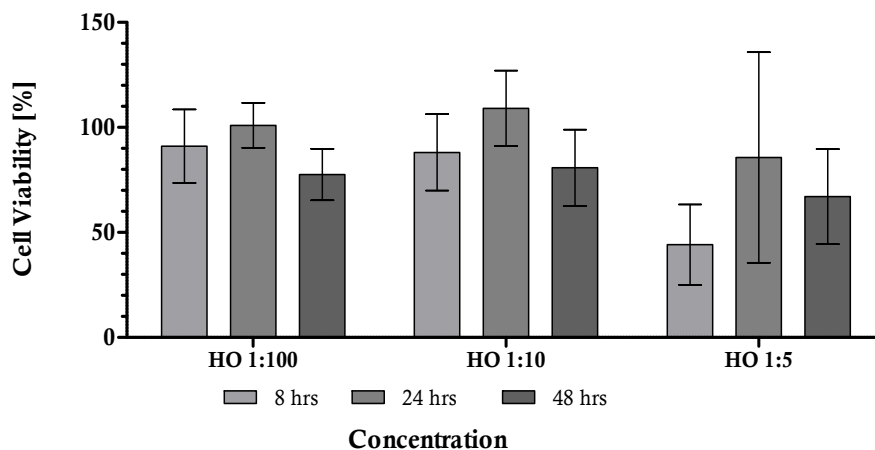
Uji MTT adalah metode *colorimetric* yang didasarkan pada *enzyme-based* yang umumnya digunakan untuk menguji aktivitas dehidrogenase mitokondrial dalam sel. Metode ini sangat lazim digunakan karena mudah, aman, dan memiliki sensitivitas yang tinggi, dan merupakan metode yang paling umum digunakan untuk menguji toksisitas dan viabilitas sel (Berridge *et al.*, 2005).

Uji MTT digunakan untuk mengevaluasi kemampuan sel untuk mereduksi garam tetrazolium atau 3-(4,5-dimethylthiazole-2-il) 2,5 diphenyltetrazolium bromide, untuk membentuk kristal violet *formazan*. Kristal ini tidak larut dalam air. Garam tetrazolium yang berwarna, bila berinteraksi dengan selakan berubah menjadi warna ungu (*formazan*). Warna ini disebabkan karena sel mengalami reduksi secara metabolik oleh adanya enzim dehidrogenase membentuk NADH atau NADPH. Warna ungu inilah yang kemudian diukur nilai absorbansinya. Nilai absorbansi ini digunakan untuk menentukan persen viabilitas sel. Bila nilai absorbansinya yang teramati lebih kecil dari nilai absorbansi kontrol, maka sel mengalami reduksi atau dengan kata lain kemampuan sel untuk berproliferasi rendah. Namun, sebaliknya bila absorbansi yang dihasilkan lebih tinggi dari kontrol, maka kemampuan sel untuk berproliferasi sangat tinggi, tetapi bila tingkat proliferasinya terlalu tinggi akan mengakibatkan kematian sel, karena kemungkinan terjadinya perubahan morfologi sel.

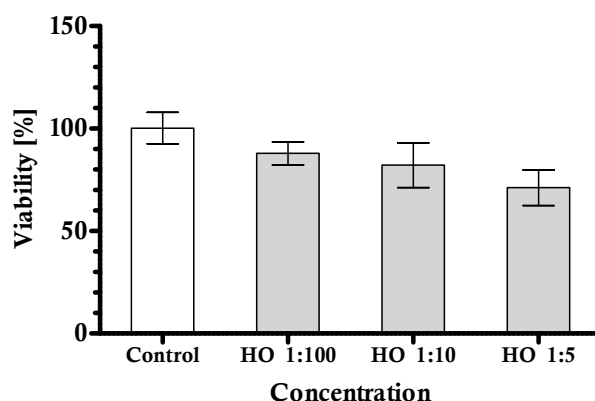
Dalam uji ini, digunakan sel HL-60 karena sel ini umum digunakan sebagai model untuk mempelajari diferensiasi sel *myeloid* pada manusia (Gallagher *et al.*, 1979; Mosmann, 1983). Sel HL-60 yang telah dipaparkan dengan HO pada konsentrasi 1:100; 1:10; dan 1:5 pada waktu inkubasi 8, 24, dan 48 jam disajikan pada Gambar 4. Hasil ini menunjukkan bahwa HO pada konsentrasi 1:5 menunjukkan



Gambar 3. Efek konsentrasi dan waktu inkubasi *Haarlem oil* terhadap sel HL-60 menggunakan CellTiter-Glo® assay. Data dinyatakan dalam persen viabilitas (%±SD)



Gambar 4. Persen viabilitas *Haarlem oil* terhadap sel HL-60 menggunakan MTT assay setelah inkubasi selama 24 dan 48 jam. Data dinyatakan dalam persen viabilitas (%±SD)



Gambar 5. Uji nematisidal *Haarlem oil* terhadap *Steinernema feltiae*. Uji Data diambil setelah 24 jam perlakuan (dalam uji ini air digunakan sebagai kontrol dan diatur pada viabilitas 100%. Uji signifikansi diekspresikan terhadap kontrol. Data dinyatakan dalam persen viabilitas (%±SD)

efektivitas yang lebih tinggi pada semua waktu inkubasi yang digunakan dengan persen sel viabilitasnya antara 40-65%. Hal ini bermakna bahwa HL-60 hanya mampu berproliferasi sebesar 40-65%. Namun, pada konsentrasi 1:100 dan 1:5, menunjukkan hasil yang hampir sama, yaitu persen sel viabilitas yang dihasilkan berkisar antara 70-85%.

Nematode Assay

Efek HO terhadap cacing *S. feltiae* diamati berdasarkan uji pergerakan nematoda setelah 24 jam inkubasi. Dalam penelitian ini, DMSO digunakan sebagai pelarut, dalam uji aktivitas, pelarut ini digunakan sebagai kontrol. Aktivitas yang dihasilkan dalam penelitian ini relatif terhadap kontrol. Konsentrasi HO yang digunakan dalam metoda ini berkisar antara 1:100 sampai dengan 1:5.

Gambar 5 menunjukkan bahwa HO pada konsentrasi 1:5 memperlihatkan aktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan *S. feltiae* yang diperlakukan pada konsentrasi 1:100 dan 1:10, dengan persen viabilitas sebesar 65%. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi akan meningkatkan sifat toksisitas dan motilitas terhadap *S. feltiae*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil *trypan blue* dan CellTiter-Glo® assay menunjukkan bahwa HO mempunyai efek sitotoksik yang paling baik terhadap sel HL-60 terutama pada konsentrasi 1:10 dan 1:5. Akan tetapi, hasil uji MTT assay memperlihatkan bahwa HO pada konsentrasi 1:5 menunjukkan efektivitas yang lebih tinggi dari pada konsentrasi 1:10. dengan persen sel viabilitasnya antara 40-65%. Uji nematisidal terhadap *S. feltiae* menunjukkan bahwa hanya pada konsentrasi 1:5 yang memperlihatkan aktivitas yang lebih baik dengan persen viabilitasnya sebesar 70%, sementara pada konsentrasi 1:100 dan 1:10 tidak menunjukkan aktivitas cukup terhadap *S. feltiae*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh *University of Saarland, Saarbruecken* dan *University of Applied Sciences-Zweibruecken, Germany*. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Pengembangan Sumber Daya Manusia Pemerintah Aceh atas beasiswa yang diberikan selama melanjutkan pendidikan doktoral (S3) dan juga *Post Doctoral* pada kedua universitas tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Berridge, M.V., P.M. Herst, and A.S. Tan, 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnol. Annual Review**.11:127-152.
- Chan, B.A. and J.I.G. Coward. 2013. Chemotherapy advances in small-cell lung cancer. **J. Thorac. Dis.** 5:S565-S578.
- Gallagher, R., S. Collins, and J. Trujillo. 1979. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. **Blood**. 54(3):713-733.
- Gaugler, R., E. Lewis, and R.J. Stuart. 1997. Ecology in the service of biological control: The case of entomopathogenic nematodes. **Oecologia**. 109:483-489.
- Gaugler, R. 2006, **Nematodes-Biological Control**. Yaxin Li (Ed.), Cornell University Press, New York.
- Gebreselassie, D. 2006. Sampling of major histocompatibility complex class I-associated peptidome suggests relatively looser global association of HLA-B 5101 with peptides. **Hum. Immunol.** 67(11):894-906.
- Jae, J. An., Y.P. Lee, S.Y. Kim, S.H. Lee, M.J. Lee, M.S. Jeong, D. W. Kim, S.H. Jang, K.-Y. Yoo, M.H. Won, T.-C. Kang, O.-S. Kwon, S.-W. Cho, K.S. Lee, J. Park, W.S. Eum, S.Y. Choi. 2008. Transduced human PEP-1-heat shock protein 27 efficiently protects against brain ischemic insult. **FEBS J.** 275:1296-1308.
- Jessica, K.A., A. Sassano, S. Kaur, H. Glaser, B. Kroczyńska, A.J. Redig, S. Russo, S. Barr, and L.C. Platanius. 2011. Dual mTORC2/mTORC1 targeting results in potent suppressive effects on acute myeloid leukemia (AML) progenitors. **Clin. Cancer Res.** 7(13):4378-4388.
- Jorgensen, L.V., C. Cornett, U. Justesen, L.H. Skibsted, and D.O. Dragsted.1998. Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoid C-ring. **Free Radic. Res.** 29:339-350.
- Lefevre, J.R. 1959. du Boistesselin. **Theraphy J.** 14:1044-52.
- Lehmann, M.H. 1998. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor triggers interleukin-10 expression in the monocytic cell line U937. **Mol. Immunol.** 35(8):479-485.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.** 65(1-2):55-63.
- Sarakbi, M.B. 2009. Natural Products and Related Compounds as Promising Antioxidants and Antimicrobial Agents. Bioorganic Chemistry. **Thesis**. Universitaet des Saarlandes, Saarbruecken. Germany.
- Stephen, M.R., J.P. Kehrer, and L.-O. Klotz. 2015. **Studies on Experimental Toxicology and Pharmacology**. Springer International Publishing. Switzerland.
- Steven, A. A., L. Randers, and G. Rao. 1993. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. **Biotechnol. Prog.** 9(6):671-674.
- Wittop-Koenig, D.A. 1972a. History of Haarlem oil. **Ceskoslovenska Farmacie.** 2:199-200.
- Wittop-Koenig, D.A. 1972b. Contribution to the history of Haarlem oil. **Pharmaceutisch Weekblad.** 107:165-172.