

Efek Antiproliferasi Ekstrak Etanolik Daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. pada Sel Paru Tikus Jantan yang Diinduksi 7,12 Dimetilbenz[*a*]antrasen

HENDRI WASITO^{A)}, RETNO MURWANTI^{B)},

EDY MEIYANTO^{C)}

^{A)} Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Islam Bandung

^{B,C)} Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui efek ekstrak etanolik daun *G. procumbens* terhadap aktivitas proliferasi sel paru tikus jantan galur Sprague Dawley yang diinduksi oleh 7,12-dimetilbenz[*a*]antrasen (DMBA). Hasil pengamatan preparat histopatologi organ paru tikus dengan pengecatan H&E dan AgNOR pada minggu ke-16 serta analisis statistik dengan metode non parametrik Kruskal-wallis Test dan diteruskan dengan Mann-Whitney Test menunjukkan bahwa pemberian DMBA 20 mg/kg BB dua kali seminggu selama 3 minggu meningkatkan aktivitas proliferasi sel paru tikus jantan, namun belum dapat menunjukkan insidensi kanker paru serta pemberian ekstrak *G. procumbens* 300 mg/kg BB dan 750 mg/Kg BB belum dapat menghambat proliferasi sel paru tikus jantan yang diinduksi DMBA 20 mg/kg BB.

Kata kunci : *G. procumbens*, proliferasi, sel paru, DMBA

1. Pendahuluan

Penyakit kanker masih menjadi masalah kesehatan di dunia, angka kematian karena penyakit ini setiap tahun terus bertambah. Kanker paru merupakan penyebab utama kematian akibat kanker di dunia. Setiap tahun diperkirakan 178.100 kasus baru kanker paru terjadi di Amerika, dan 160.400 orang akan mengalami kematian akibat penyakit mematikan ini meskipun telah dilakukan terapi yang baik (Forgacs *et al.*, 2001). Di Indonesia diperkirakan sedikitnya akan terdapat 170 – 190 kasus kanker per 100.000 orang (Tjindarbuni dan Mangunkusumo, 2002).

Penemuan tanaman obat yang menunjukkan efek farmakologis terhadap penyakit kanker terutama yang telah mengalami uji secara ilmiah telah memberikan alternatif dalam mengatasi dan mengobati penyakit kanker (Novalina, 2003). Secara ilmiah telah dibuktikan bahwa tanaman *G. procumbens* yang memiliki kandungan kimia antara lain flavonoid, saponin, alkaloid, tanin dan minyak atsiri (Sudarto, 1985) mempunyai aktivitas sebagai antikanker baik secara *in vitro* (Arianti, 1998) maupun *in vivo* (Sugiyanto *et al.*, 1993) serta bersifat antiangiogenik (Jenie, 2003).

Berdasarkan hal-hal tersebut di atas, penelitian dan pengembangan *G. procumbens* sebagai obat kanker menjadi sangat penting untuk terus dilakukan. Pada penelitian ini dilakukan penelitian mengenai efek antiproliferasi dari ekstrak etanolik *G. procumbens* terhadap sel paru tikus jantan dengan 7,12-dimetilbenz[*a*]antrasen (DMBA) sebagai agen penginduksi kanker.

2. Metodologi

Bahan dan Alat

Bahan simplisia yang digunakan adalah daun *G. procumbens* yang diambil dari daerah Ngaglik, Sleman, Yogyakarta pada bulan Juli 2004. Tanaman *G. procumbens* yang digunakan dideterminasi di Laboratorium Farmakognosi, Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM.

Simplisia dibersihkan, dikeringkan, diserbuk menggunakan blender dan diekstrak dengan alat sokhlet memakai etanol 96 %.

Bahan kimia yang digunakan berupa etanol 96 %, alkohol 70 %, eter *anasthetikum*, akuades, 7,12-dimetilbenz[*a*]antrasen (DMBA) (Sigma Chem., Steinherm) sebagai agen penginduksi kanker paru, CMC-Na sebagai pensuspensi ekstrak, minyak jagung (*corn oil*) sebagai pelarut DMBA, buffer formalin 10 %, paraffin, minyak imersi, pewarna sediaan histologik (Hematoksilin dan Eosin), serta perak nitrat (AgNO₃) sebagai pewarna pengecatan AgNOR.

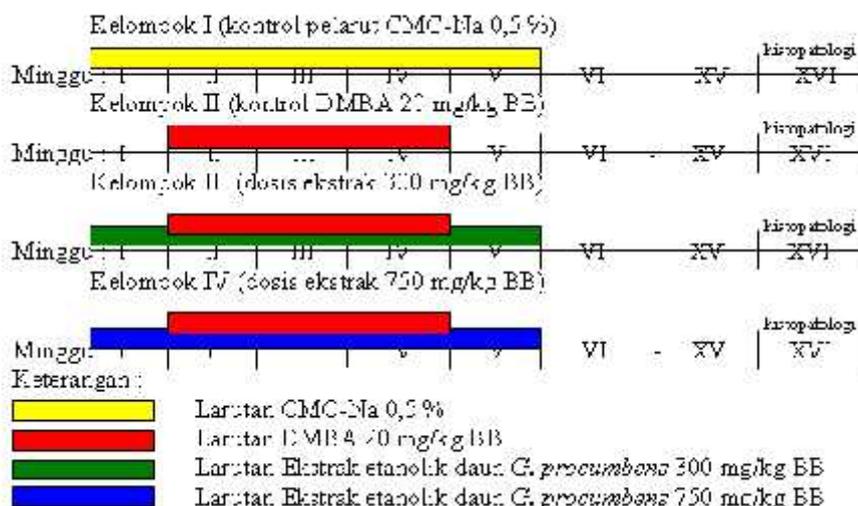
Subyek uji yang digunakan berupa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sprague Dawley* umur 40 hari yang diperoleh dari Unit Penyediaan Hewan Percobaan (UPHP) UGM. Pakan mencil berupa pellet dan minum dari air ledeng yang masing-masing diberikan secara *ad libitum*.

Alat-alat yang digunakan berupa alat bedah, kandang tikus, alat pengecatan histologik H&E dan AgNOR, sarung tangan, masker, *cassette* untuk memproses jaringan, *bedding*, kertas saring, kapas, *staining jars*, spuit injeksi oral 1 ml dan 3 ml, blender, labu sokhlet, *waterbath*, cawan porselin, kipas angin, vortex, mortir dan stamper, labu takar, pipet tetes, timbangan analitik, neraca elektrik, mikroskop binokuler, kamera digital, dan alat-alat gelas yang lazim.

Jalannya Penelitian

Tikus jantan *Sprague Dawley* umur 40 hari diadaptasikan di kandang percobaan selama satu minggu sebelum diberikan perlakuan. Tikus dibagi menjadi 4 kelompok, tiap-tiap kelompok sebanyak 10 ekor. Kelompok I sebagai kontrol pelarut diberi CMC-Na 0,5 % dengan volume disesuaikan dengan bobot badan tikus. Pemberian dilakukan setiap hari secara peroral dari minggu ke-1 sampai minggu ke-5 percobaan. Kelompok II sebagai kontrol DMBA diberikan larutan DMBA dalam minyak jagung (*corn oil*) secara peroral dengan dosis 20 mg/kg BB sebanyak dua hari sekali selama 3 minggu pada minggu ke-2 sampai minggu ke-4. Kelompok III dan IV sebagai dosis ekstrak 300 mg/kg BB dan dosis ekstrak 750 mg/kg BB diberikan ekstrak dalam pelarut CMC Na 0,5 % secara peroral setiap hari selama 5 minggu, larutan DMBA diberikan setelah minggu pertama pemberian ekstrak dengan dosis 20 mg/kg BB dan diberikan satu jam setelah pemberian ekstrak uji. Frekuensi pemberian larutan DMBA disesuaikan dengan perlakuan kelompok II.

Pada minggu ke-6 sampai ke-16 tidak dilakukan perlakuan, hanya diberi makan pelet dan minum air. Kemudian pada minggu ke-16 dilakukan pengorbanan hewan uji dengan dekapitasi dan dilakukan nekropsi untuk diambil organ paru untuk diamati secara makroskopik dan mikroskopik histopatologinya dengan pengecatan H&E dan AgNOR. Data pengamatan mAgNOR dianalisis secara statistik dengan metode nonparametrik *Kruskal Wallis* yang diteruskan dengan Uji *Mann-Whitney* (SPSS ver.12).



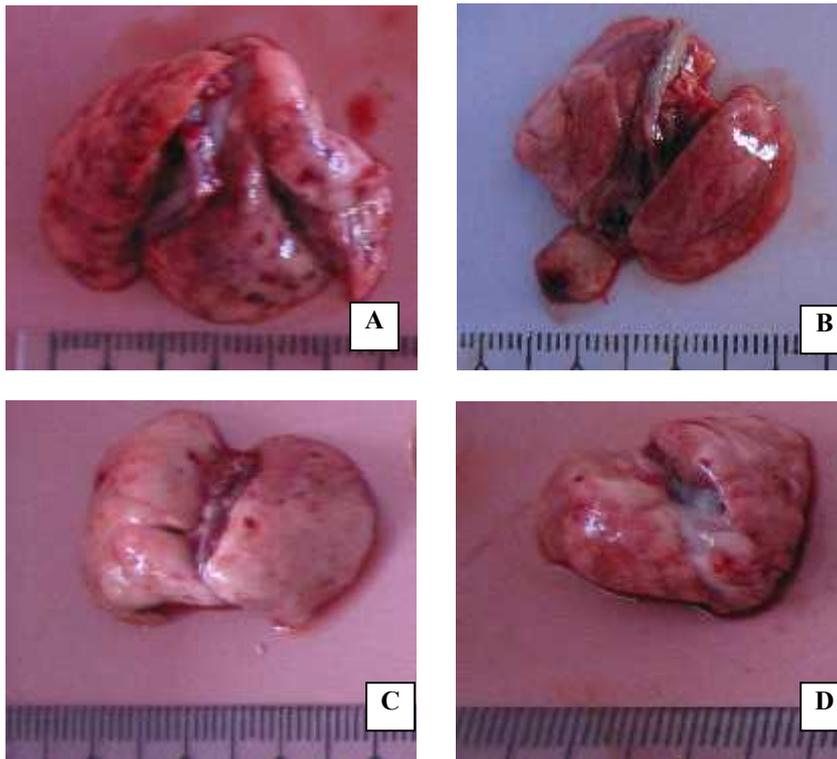
Gambar 1. Protokol penelitian efek antiproliferasi ekstrak etanolik daun *G. procumbens* pada selparu tikus jantan yang diinduksi DMBA

Efek Antiproliferasi Ekstrak Etanolik Daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. pada 15 Sel Paru Tikus Jantan yang Diinduksi 7,12 Dimetilbenz[*a*]antrasen

3. Hasil dan Pembahasan

Pengamatan terhadap uji antiproliferasi dilakukan pada minggu ke-16 secara makroskopis dan mikroskopis terhadap kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan ekstrak etanolik daun *G. procumbens*. Pemeriksaan mikroskopis meliputi analisis histopatologi sel paru dengan pewarnaan H&E dan aktivitas proliferasi dengan pewarnaan AgNOR.

Dari hasil nekropsi pada akhir minggu ke-16, secara makroskopis tidak ditemukan perubahan yang signifikan berupa insidensi kanker pada paru tikus kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg BB maupun kelompok kontrol perlakuan yang ditunjukkan oleh gambaran morfologi organ paru, serta tidak ditemukan adanya nodul tumor pada organ paru yang diamati.

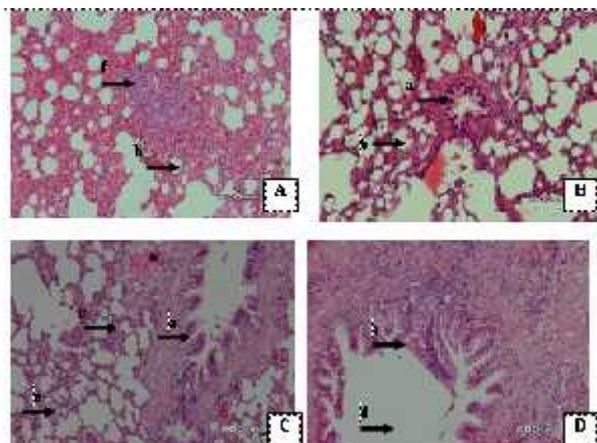


Gambar 2. Gambaran makroskopis paru tikus (A) tikus kontrol DMBA 20 mg/kg BB, (B) tikus kontrol pelarut CMC-Na 0,5 %, (C) tikus dosis ekstrak 300 mg/kg BB, (D) tikus dosis ekstrak 750 mg/kg BB

Perubahan yang terjadi meliputi reaksi radang pada paru, perubahan warna paru dari merah menjadi merah agak pudar, permukaan paru yang berubah lebih kasar terutama pada kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg BB, serta timbulnya timbunan lemak pada kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg BB dan perlakuan dosis ekstrak 300 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB.

Pengamatan histopatologi dengan pengecatan H&E yang dilakukan terhadap sel paru tikus normal (kontrol pelarut CMC-Na 0,5 %), tikus perlakuan dosis ekstrak 300 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB maupun tikus kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg BB tidak menunjukkan terjadinya perubahan spesifik yang mengindikasikan terjadinya kanker pada sel paru akibat induksi DMBA.

Tidak adanya insidensi kanker pada sel paru baik pada tikus kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg BB, kelompok perlakuan dosis ekstrak 300 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB, mengakibatkan pengaruh ekstrak etanolik daun *G. procumbens* terhadap penghambatan kanker dan aktivitas proliferasi pada sel paru tikus jantan yang diinduksi DMBA 20 mg/kg BB dengan metode pengecatan Hematoksin dan Eosin (H&E) tidak bisa teramati dengan jelas.



Gambar 3. Gambaran histopatologi H&E paru tikus (A) tikus kontrol DMBA 20 mg/kg BB,

(B) tikus kontrol Pelarut CMC-Na 0,5 %, (C) tikus dosis ekstrak 300 mg/kg BB,

(D) tikus dosis ekstrak 750 mg/kg BB (perbesaran 20x10)

Keterangan : a. bronkus, b. bronkeolus, c. septa alveoli, d. lumen, e. sel radang limfosit

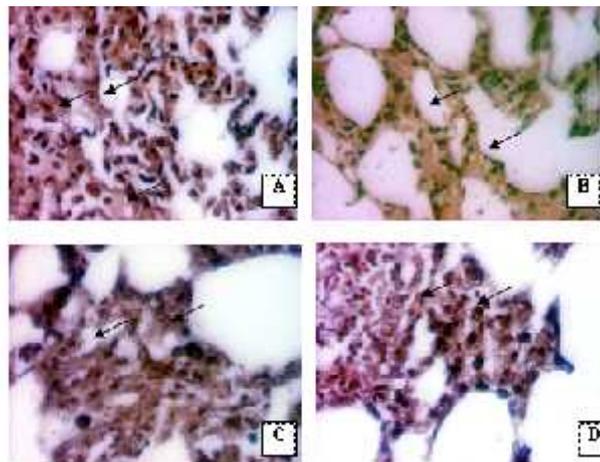
Gambaran histopatologi jaringan paru pada kelompok kontrol pelarut CMC-Na 0,5 % tidak ditemukan adanya perubahan spesifik, sel-sel paru tampak normal, sel-sel epitel bronkus masih tersusun selapis, meskipun terdapat pertumbuhan epitel bronkeolus dan bronkus ke arah lumen disertai adanya reaksi radang dengan infiltrasi limfosit pada daerah sekitar bronkeolus.

Pada kelompok tikus kontrol DMBA 20 mg/kg BB ditemukan pertumbuhan epitel bronkeolus dan bronkus ke arah lumen, selain itu juga ditemukan penebalan septa interveoli dengan infiltrasi sel radang limfosit disekitar bronkus dan bronkeolus. Pada kelompok dosis ekstrak 300 mg/kg BB sebagian besar tidak ditemukan perubahan spesifik pada sel paru, hanya sebagian kecil tikus mengalami kongesti dan ditemukan infiltrasi sel radang limfosit pada jaringan interstitial serta pada septa alveoli.

Sedangkan hasil pemeriksaan histopatologi pada kelompok perlakuan dosis ekstrak 750 mg/kg BB menunjukkan sebagian besar paru tikus tidak mengalami perubahan yang spesifik, pada beberapa paru ditemukan proliferasi sel sub mukosa dari bronkus ke arah lumen. Adanya beberapa perubahan pada jaringan paru yang diamati bukanlah karena hasil dari perlakuan, kemungkinan disebabkan oleh proses iritasi kronis seperti proses radang yang disebabkan oleh agen infeksi atau kondisi lingkungan kandang yang kurang memadai.

Dengan pewarnaan *silver*, protein AgNOR akan tampak sebagai titik hitam (*black dot*) yang kemudian dapat dihitung. Aktivitas proliferasi disini diukur dengan nilai mAgNOR, yaitu perbandingan antara jumlah titik hitam dalam sel (*black dot*) dengan jumlah sel. Semakin tinggi tingkat proliferasi maka semakin banyak titik hitam yang teramati (Rizali dan Auerkari, 2003).

Efek Antiproliferasi Ekstrak Etanolik Daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. pada 17
Sel Paru Tikus Jantan yang Diinduksi 7,12 Dimetilbenz[*a*]antrasen

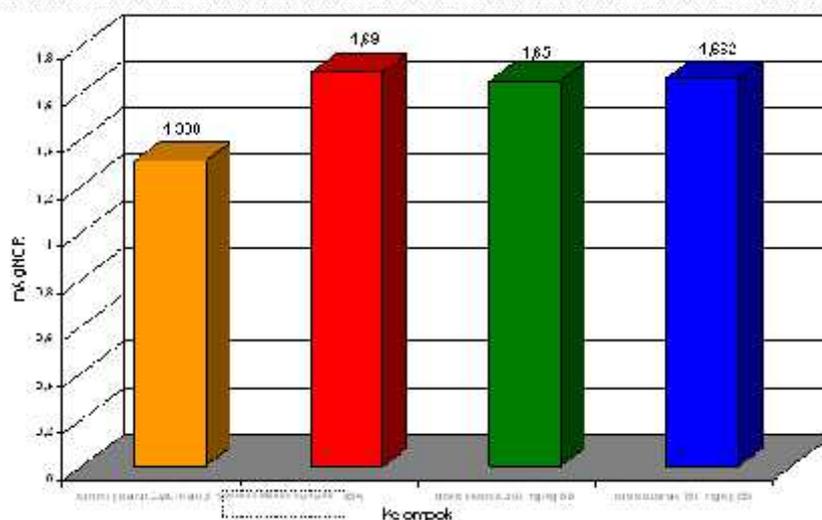


Gambar 4. Gambaran histopatologi hasil pewarnaan AgNOR dari sel paru tikus:
(A) tikus kontrol DMBA 20 mg/kg BB, (B) tikus kontrol pelarut CMC-Na 0,5
%, (C) tikus dosis ekstrak 300 mg/kg BB, (D) tikus dosis ekstrak 750 mg/kg BB
(perbesaran 100x10), Ketetapan : \rightarrow : NOR yang tercat silver

Nilai mAgNOR (rata-rata \pm SD) untuk kelompok kontrol pelarut CMC-Na 0,5 % adalah $1,31 \pm 0,066$; kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg BB sebesar $1,69 \pm 0,156$; kelompok perlakuan dosis ekstrak 300 mg/kg BB adalah $1,65 \pm 0,182$; sedangkan kelompok perlakuan dosis ekstrak 750 mg/kg BB adalah $1,66 \pm 0,094$.

Kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg BB memiliki nilai mAgNOR terbesar dan kelompok kontrol pelarut CMC-Na 0,5 % memiliki nilai mAgNOR paling kecil dibandingkan kelompok yang lain. Hal ini menunjukkan bahwa tingkat proliferasi sel-sel paru pada tikus kelompok kontrol DMBA paling tinggi dan tingkat proliferasi untuk tikus kelompok kontrol pelarut CMC-Na 0,5 % paling rendah.

Tingkat proliferasi pada kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg BB belum menunjukkan terbentuknya kanker, pada keadaan jaringan normal rata-rata jumlah titik hitam (mAgNOR) sebanyak $1,2 \pm 0,1$ dan pada jaringan yang menunjukkan terbentuknya kanker memiliki nilai mAgNOR sebanyak $3,8 \pm 0,6$ atau bisa lebih besar lagi yakni sebanyak $4,8 \pm 1,1$ (Rizali dan Auerkari, 2003).



Gambar 5. Efek ekstrak etanol daun *G. procumbens* terhadap aktivitas proliferasi sel paru tikus jantan yang diinduksi DMBA

Analisis statistik dengan menggunakan uji nonparametrik *Kruskal Wallis* dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* menunjukkan terjadinya perbedaan signifikan antara nilai mAgNOR kelompok kontrol pelarut CMC-Na 0,5 % dengan kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg BB serta kelompok perlakuan dosis ekstrak 300 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB.

Penurunan aktivitas proliferasi akibat pemberian DMBA tidak signifikan pada pemberian dosis ekstrak 300 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB. Karena penurunan aktivitas proliferasi sel-sel paru oleh ekstrak etanolik daun *G. procumbens* tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak etanolik *G. procumbens* dengan dosis 300 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB belum dapat menghambat proliferasi sel paru tikus jantan yang diinduksi DMBA 20 mg/kg BB dua hari sekali selama 3 minggu.

Hal ini terjadi mungkin karena adanya kemampuan DMBA untuk menginduksi enzim Glutathion S-Transferase (GST). Enzim Glutathion-S-Transferase (GST) merupakan enzim pemetabolisme fase II yang mampu mendetoksifikasi senyawa asing, xenobiotika atau karsinogen. Kusharyanti (2004) melaporkan bahwa pemberian DMBA dapat menginduksi aktivitas maupun ekspresi enzim GST di hati, selain itu juga pemberian ekstrak etanolik daun *G. procumbens* pada tikus jantan yang diinduksi DMBA dapat meningkatkan ekspresi GST.

Peningkatan aktivitas enzim GST akan meningkatkan kecepatan detoksifikasi metabolit DMBA. Metabolit reaktifnya tidak akan membentuk *adduct* dengan DNA karena ekskresi metabolit tersebut ditingkatkan sehingga menurunkan aktivitas karsinogennya. Senyawa metabolit DMBA berupa 3,4-epoksida DMBA dapat berinteraksi dengan glutathion S-transferase menghasilkan konjugat glutathion yang dapat segera dimetabolisir membentuk asam merkapturat sehingga akan meningkatkan kecepatan eliminasi dari DMBA.

Tidak adanya insidensi kanker juga dapat dipengaruhi oleh kurang lamanya waktu pengamatan mengingat kanker merupakan penyakit yang berbanding linear dengan waktu. Karsinogenesis membutuhkan akumulasi perubahan seluler yang membutuhkan waktu untuk memperolehnya. Semakin lama waktu pengamatan, probabilitas insidensi kanker semakin besar.

Kanker merupakan hasil proliferasi klonal sel tunggal memerlukan waktu yang lama dari sel tunggal yang terubah (*transformed cell*) untuk tumbuh menjadi nodul yang cukup besar yang memberikan tanda dan gejala klinis. Pada penelitian ini, subyek uji dikorbankan 12 minggu setelah pemberian DMBA terakhir, namun belum mampu menimbulkan kanker pada paru.

4. Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Pemberian DMBA dosis 20 mg/kg BB dua hari sekali dalam waktu 3 minggu pada tikus jantan meningkatkan aktivitas proliferasi sel paru tikus jantan, namun belum dapat menunjukkan insidensi kanker paru, dan pemberian ekstrak etanolik daun *G. procumbens* 300 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB belum dapat menghambat proliferasi sel paru tikus jantan yang diinduksi DMBA.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menghasilkan insidensi kanker pada sel paru tikus jantan dengan DMBA maupun oleh senyawa penginduksi kanker lainnya.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada *Cancer Research Group* Fakultas Farmasi UGM yang telah memberikan bantuan dan dukungan selama proses penelitian.

5. Daftar Pustaka

Arianti, S., 1998, Aktivitas Biologis Ekstrak Etanol Daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. Terhadap Kultur Sel Vero dan Kultur Sel Mieloma, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Efek Antiproliferasi Ekstrak Etanolik Daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. pada 19 Sel Paru Tikus Jantan yang Diinduksi 7,12 Dimetilbenz[*a*]antrasen

- Forgacs, E., Zochbauer-Muller, S., Olah, E., dan Minna, J.D., 2001, Molecular Genetic Abnormalities in the Pathogenesis of Human Lung Cancer, *Pathology Oncology Research*, Vol 7, No 1.
- Jenie, R.I., 2003, Efek Antiangiogenik Ekstrak Etanolik Daun Dewa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) pada Membran Korio Alantois (CAM) Embrio Ayam Terinduksi b-FGF, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Novalina, 2003, Penggunaan Tanaman Obat Sebagai Upaya Alternatif Dalam Terapi Kanker, *Makalah Pribadi Pengantar Ke Falsafah Sains*, Program Pasca Sarjana IPB , Bogor.
- Kusharyanti, I., 2004, Efek Ekstrak Etanol Daun Dewa (*Gynura procumbens* (Lour) Merr) Terhadap Aktivitas Enzim Glutation S-Transferase Pada Hepar Tikus Jantan Terinduksi 7,12-Dimetilbenz(*a*)antrasen, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Rizali, E., dan Auerkari, E. I., 2003, Teknik Pewarnaan Silver (AgNOR) Sebagai Salah Satu Cara Menentukan Aktivitas Proliferasi sel Tumor dan Apoptosis, *Jurnal Kedokteran Gigi Indonesia*, 10(3): 41-45
- Sudarto, B., dan Pramono, S., 1985, Skrining Fitokimia Daun Dewa (*Gynura procumbens*), Lour. Merr. yang Diduga Berkhasiat Sebagai Anti-kanker, *PPPT-UGM*, Lembaga Penelitian UGM, Yogyakarta.
- Sugiyanto, Sudarto, B., dan Meiyanto, E., 1993, Efek Penghambatan Karsinogenisitas Benzo(*a*)piren Oleh Preparat Tradisional Tanaman *Gynura sp.* Dan identifikasi Awal Senyawa yang Berkhasiat, *Laporan Penelitian P4M DitJen DikTi*, Fak. Farmasi UGM, Yogyakarta.
- Sugiyanto, Sudarto, B., Meiyanto, E., Nugroho, A.E., dan Jenie, U.A., 2003, Aktivitas Antikarsinogenik Senyawa yang Berasal dari Tumbuhan, *Majalah Farmasi Indonesia*, 14 (4), 216-225.
- Tjindarbumi, D., dan Mangunkusumo, R., 2002, cancer in Indonesia, Present and future, *Jpn J Clin Oncol* : 32 (Suplement 1), S17-S21.

