

IDENTIFIKASI APOPTOSIS DENGAN METODE TUNEL PASCA PEMBERIAN EKSTRAK SAMBILOTO DAN PENGARUHNYA TERHADAP VOLUME TUMOR

Nugrahaningsih WH, Ari Yuniastuti

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang

Abstrak. Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan pengaruh ekstrak sambiloto terhadap apoptosis dan volume tumor bila diberikan secara oral dan diidentifikasi dengan metode TUNEL. Penelitian dilakukan dengan desain *Randomized post test control group*. Sebanyak 24 ekor mencit C3H yang telah tumbuh kanker mamma dibagi secara acak menjadi 4 kelompok masing-masing 6 ekor. Diberikan ekstrak sambiloto dengan dosis 5, 10 dan 15 mg per ekor per hari, dan kelompok kontrol. Pemberian ekstrak sambiloto dilakukan secara oral selama 14 hari. Pengukuran volume tumor dilakukan pada hari ke 1, 4, 8, 12 dan 15. Pada hari ke 15 mencit dimatikan dengan menggunakan eter. Jaringan kanker dibuat blok parafin untuk pemeriksaan apoptosis dengan metode TUNEL. Hasil Penelitian menunjukkan adanya peningkatan signifikan sel apoptosis ($p=0,000$), dengan dosis terbaik 15 mg/hari. Ada beda yang bermakna pada rerata kelipatan penambahan volume tumor ($p=0,049$). Hasil uji *post hoc* menunjukkan bahwa perbedaan terletak antara kelompok kontrol dengan kelompok dosis 10 mg/hr. Dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak sambiloto secara oral meningkatkan sel yang mengalami apoptosis dengan pemeriksaan TUNEL namun belum dapat menurunkan volume tumor.

Kata kunci: sambiloto, apoptosis, TUNEL

PENDAHULUAN

Homeostasis pada organisme multiseluler dikontrol oleh proliferasi, diferensiasi dan kematian sel. Kematian sel dapat berupa nekrosis dan apoptosis. Apoptosis adalah kematian sel terprogram (*programed cell death*) yang bertujuan untuk mempertahankan kestabilan populasi sel. Kegagalan pengaturan apoptosis dapat menyebabkan sel membelah tanpa terkendali, yang disebut sebagai sel kanker. Sel kanker dapat berkembang dengan cepat pada lingkungan yang dapat memicu apoptosis sel normal, misalnya hipoksia. Proses metastase juga dipermudah oleh adanya penghambatan suatu jenis apoptosis yang disebut anoikis, yang secara normal menghalangi pelepasan sel dari matriks ekstrasel.

Penghambatan proses apoptosis berhubungan dengan resistensi sel kanker terhadap kemoterapi maupun radioterapi (Williamson,2007). Peningkatan apoptosis merupakan suatu upaya yang dikembangkan sebagai terapi kanker.

Deteksi apoptosis dapat dilakukan dengan melakukan identifikasi protein-protein yang terlibat dalam apoptosis, gen-gen pengatur apoptosis atau identifikasi pada sel yang mengalami apoptosis (Vaculova, et al., 2008) Pemilihan metode identifikasi apoptosis tergantung pada beberapa faktor antara lain jenis eksperimen, tipe sel, dan berdasar pengalaman yg telah dilakukan. TUNEL (*Terminal deoxyribonucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) merupakan salah satu metode deteksi apoptosis dengan memeriksa fragmentasi DNA. Pemeriksaan apoptosis dengan metode TUNEL dapat memberikan gambaran proses apoptosis pada tingkat sel tunggal sehingga lebih spesifik dan memiliki akurasi tinggi.

Sambiloto merupakan salah satu tanaman obat tradisional yang digunakan sebagai anti kanker. Beberapa penelitian yang dilakukan secara *in vitro* menunjukkan pengaruh andrografolid yang diisolasi dari sambiloto terhadap apoptosis kultur sel kanker HeLa dengan IC_{50} sebesar 109.90 $\mu\text{g/ml}$ (Sukardiman, 2005). Ekstrak aquades yang diberikan pada kultur sel adenokarsinoma mamma dari mencit C3H menunjukkan adanya peningkatan apoptosis mulai pada konsentrasi 1 mg/L (Nugrahaningsih,2003). Pada penelitian ini idntifikasi apoptosis dilakukan dengan pewarnaan *Acridine Orange*.

Pertumbuhan jaringan kanker juga sangat dipengaruhi oleh lingkungan mikro sel kanker. Pengaruh zat antikanker juga sangat dipengaruhi oleh cara pemberian, dosis, lama pemberia, penyerapan usus, protein pembawa, dan lain-lain. Adanya faktor-faktor tersebut memungkinkan hasil yang berbeda antara penelitian secara *in vitro* dan *in vivo*. Meskipun penelitian dengan menggunakan ekstrak sambiloto yang dilakukan secara *in vitro* telah memberikan hasil adanya peningkatan apoptosis sel kanker (Nugrahaningsih, 2003), namun hasil tersebut masih memerlukan penelitian lebih lanjut, terutama pengaruhnya bila diberikan secara oral dan dengan tehnik identifikasi yang lebih spesifik, yaitu metode *Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL)*. Dari uraian latar belakang tersebut maka perlu dilakukan penelitian pada hewan coba untuk melihat pengaruh sambiloto yang diberikan secara oral terhadap apoptosis sel dengan metode TUNEL dan untuk melihat pengaruhnya terhadap volume tumor.

METODE

Penelitian dilakukan dengan desain *the randomized posttest only control group*. Hewan coba dalam penelitian ini adalah mencit C3H yang diperoleh dari Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Ekstrak sambiloto adalah ekstrak dari tumbuhan

sambiloto (*Andrographis paniculata*) yang diekstraksi dengan pelarut aquadest. Penetapan taksonomi tumbuhan dan standarisasi bahan ekstrak dilakukan di LPPT UGM.

Populasi target penelitian ini adalah mencit C3H. Populasi terjangkau adalah mencit C3H berumur 2-4 bulan yang telah tumbuh kanker mamma melalui transplant dari mencit donor. Sampel penelitian adalah 24 ekor mencit C3H yang telah tumbuh kanker mamma melalui transplant sel adenokarsinoma mamma. Penghitungan jumlah sampel tiap kelompok menggunakan rumus Federer.

Variabel bebas penelitian ini adalah pemberian ekstrak sambiloto selama 14 hari dengan variasi dosis 5, 10 dan 15 mg/ekor/hari, serta kelompok kontrol yang tidak mendapat ekstrak sambiloto. Dosis peroral mengacu pada penelitian in vivo yang dilakukan Sheeja, et al. yang menggunakan ekstrak sambiloto sebanyak 10 mg/ekor/hari yang diambil sebagai dosis tengah. Lama pemberian berdasarkan pada penelitian yang telah dilakukan dan dipublikasikan (Nugrahaningsih, 2009).

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah indeks apoptosis dan volume tumor. Identifikasi apoptosis dengan metode *Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling* sesuai dengan cara kerja yang tercantum dalam kit *Apo-BrdU-IHC In Situ DNA Fragmentation Assay Kit* (BioVision K403). Pengukuran volume tumor dilakukan dengan kaliper digital. Diukur panjang dan lebar tumor dalam satuan milimeter (mm). Volume dihitung dengan rumus: $\text{Volume} = \frac{1}{2} (p \times l^2)$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji normalitas data dilakukan dengan Shapiro-Wilk dan uji homogenitas dengan tes Lavene. Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen. Selanjutnya dilakukan uji Anova untuk melihat adanya perbedaan pada kelompok penelitian. Rerata indeks apoptosis dan hasil uji anova disajikan pada Tabel 1.

Hasil uji anova menunjukkan adanya perbedaan nilai rerata indeks apoptosis pada keempat kelompok dengan $p=0,000$. Selanjutnya dilakukan *Post Hoc Test* - LSD untuk melihat perbedaan nilai rerata indeks apoptosis antar kelompok penelitian. Dari hasil *Post Hoc Test*- LSD disajikan dalam Tabel 2 menunjukkan adanya perbedaan indeks apoptosis antar kelompok penelitian.

Uji Pearson untuk melihat korelasi dosis dengan indeks apoptosis didapatkan hubungan yang kuat ($r = 0,974$), yang berarti dosis 15 mg/hari memberikan pengaruh peningkatan apoptosis paling besar. Uji Pearson juga dilakukan untuk melihat hubungan antara ekspresi VEGF dan ekspresi Ki-67 terhadap apoptosis. Hasil penghitungan menunjukkan adanya hubungan yang kuat antara ekspresi VEGF dengan indeks apoptosis ($r = - 0,957$) dan antara ekspresi Ki-67 dengan indeks apoptosis ($r = - 0,931$).

Tabel 1 . Perbedaan rerata indeks apoptosis dan hasil uji Anova

Kelompok	Rerata	Anova
Kontrol	0,88 ± 0,183	p=0,000
Dosis 5 mg	1,37 ± 0,150	
Dosis 10 mg	2,03 ± 0,121	
Dosis 15 mg	2,53 ± 0,150	

Tabel 2. Hasil *Post Hoc Test-LSD* indeks apoptosis antar kelompok

	Kontrol	Dosis 5 mg	Dosis 10 mg	Dosis 15 mg
Kontrol		0,000	0,000	0,000
Dosis 5 mg	0,000		0,000	0,000
Dosis 10 mg	0,000	0,000		0,000
Dosis 15 mg	0,000	0,000	0,000	

Pengukuran volume tumor dilakukan pada hari ke-1, 4, 8, 12 dan hari ke-15 untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak sambiloto secara serial. Pengukuran volume tumor dilakukan menggunakan kaliper digital dengan mengukur panjang dan lebar tumor. Volume tumor dihitung dengan rumus: $0,5(px \times l^2)$. Rerata volume tumor pada pengukuran hari ke-1, 4, 8, 12 dan 15 pada masing-masing kelompok penelitian disajikan dalam Tabel 3.

Volume tumor pada hari ke-1 pada kelompok penelitian mempunyai distribusi data yang normal dan homogen. Selanjutnya dilakukan uji Anova untuk melihat beda pada kelompok-kelompok penelitian. Hasil uji Anova menunjukkan adanya perbedaan volume tumor pada awal perlakuan ($p=0,032$). Perbedaan volume tumor hari ke-1 didapatkan antara kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapat ekstrak 10 mg/hr ($p=0,006$) dan antara kelompok yang mendapat ekstrak 10 mg/hr dengan kelompok yang mendapat ekstrak 15 mg/hr ($p=0,019$).

Tabel 3. Rerata volume tumor pada hari ke-1, 4, 8, 12 dan 15

Kelompok	Volume tumor (mm ³)				
	Hari ke-1	Hari ke-4	Hari ke-8	Hari ke-12	Hari ke-15
Kontrol	50,86	130,46	231,24	536,69	914,39
Dosis 5 mg/hr	91,98	213,02	365,17	840,55	1226,41
Dosis 10 mg/hr	135,96	410,92	667,82	1040,34	1540,32
Dosis 15 mg/hr	65,63	180,20	235,72	602,42	983,90

Volume tumor pada hari ke-4 pada kelompok penelitian mempunyai distribusi data yang tidak normal dengan varian yang homogen. Setelah dilakukan transformasi data berhasil dinormalkan sehingga dilakukan uji Anova untuk melihat beda pada kelompok penelitian. Hasil uji anova menunjukkan adanya perbedaan volume tumor hari ke-4 ($p=0,028$). Perbedaan volume tumor hari ke-4 didapatkan antara kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapat ekstrak 10 mg/hr ($p=0,004$) dan antara kelompok yang mendapat ekstrak 10 mg/hr dengan kelompok yang mendapat ekstrak 15 mg/hr ($p=0,026$).

Volume tumor pada hari ke-8 pada kelompok penelitian mempunyai distribusi data yang normal tetapi tidak homogen. Setelah dilakukan transformasi data berhasil memiliki varian yang sama sehingga dilakukan uji Anova untuk melihat beda pada kelompok-kelompok penelitian. Hasil uji anova menunjukkan adanya perbedaan volume tumor pada hari ke-8 ($p=0,033$). Perbedaan volume tumor hari ke-8 didapatkan antara kelompok kontrol dengan kelompok yang mendapat ekstrak 10 mg/hr ($p=0,009$) dan antara kelompok yang mendapat ekstrak 10 mg/hr dengan kelompok yang mendapat ekstrak 15 mg/hr ($p=0,018$).

Volume tumor pada hari ke-12 pada kelompok penelitian mempunyai distribusi data yang normal dan homogen. Selanjutnya dilakukan uji Anova untuk melihat beda pada kelompok-kelompok penelitian. Hasil uji anova menunjukkan tidak ada perbedaan volume tumor pada kelompok-kelompok penelitian ($p=0,149$).

Volume tumor pada hari ke 15 mempunyai distribusi normal tetapi tidak homogen. Setelah dilakukan transformasi data, varians tetap tidak homogen sehingga uji beda dilakukan dengan uji non parametrik Kruskal-Wallis. Dari hasil uji Kruskal-Wallis didapatkan tidak adanya perbedaan volume tumor pada kelompok penelitian ($p=0,367$).

Pembelahan sel somatik adalah pembelahan dari 1 menjadi 2 sel dan seterusnya. Apabila faktor sel yang mati diabaikan, maka pertumbuhan jaringan adalah kelipatan dari ukuran sebelumnya. Berdasar hal tersebut maka volume tumor dalam penelitian ini dihitung kelipatannya, dari volume hari ke-1 menjadi volume hari ke-15.

Sambiloto mengandung lebih dari 20 diterpenoid dan 10 flavonoid yang telah dikenal. Komponen yang terkandung dalam sambiloto tersebut dapat bekerja secara bersama dengan hubungan saling menguatkan (sinergi), antagonis atau saling menetralkan. Efek sinergi dari bioaktif dan kandungan dalam ekstrak tumbuhan dapat meningkatkan efektifitas dari beberapa ekstrak. Meskipun telah banyak dilakukan penelitian menggunakan andrografolid, namun belum banyak dieksplorasi interaksi dengan komponen lain dalam ekstrak atau efek multifaktornya. .

Pemberian ekstrak sambiloto secara oral menyebabkan terjadinya perubahan struktur kimiawi dari zat aktif yang terdapat dalam sambiloto. Enzim pencernaan, asam lambung, empedu dan sitokrom P450 dapat memecah struktur ekstrak atau bereaksi dengan ekstrak sambiloto sehingga membentuk zat turunan yang dapat bereaksi secara spesifik dengan reseptor yang terdapat pada sel target sehingga menimbulkan efek. Zat turunan tersebut dapat dilihat dari beberapa metabolit yang berhasil diisolasi dari urin, feces maupun dari usus halus. Perubahan struktur kimia yang terjadi ketika suatu zat melewati sistem pencernaan, pendistribusian dan metabolisme sangat mempengaruhi efek zat tersebut pada sel target karena struktur kimia yang berbeda dapat memberikan reaksi yang berbeda meskipun mempunyai rumus kimia sama.

Struktur bisiklik diterpen lakton pada andrografolid yang diisolasi dari sambiloto memiliki tiga gugus hidroksil dan dua gugus metil. Pada pemberian andrografolid secara oral, gugus

tersebut dapat menurunkan sekresi H^+ -K ATPase pada lambung sehingga melindungi mucin lambung dari asam dan melalui fungsinya sebagai *scavenger* dari *Reactive Oxygen Species*.

Setelah terjadi proses absorpsi, ekstrak yang diberikan secara oral akan dimetabolisme di dalam hati. Pada umumnya zat akan mengalami metabolisme fase 1 dan diikuti metabolisme fase 2 agar lebih mudah diekskresi dari tubuh. Metabolisme fase 1 adalah proses oksidasi, reduksi, hidrolisis dan hidrosilasi. Metabolisme fase 2 meliputi glukuronidasi, sulfasi, asetilasi dan metilasi. Metabolisme fase 1 melibatkan sistem enzim *mixed-function oxidase* sitokrom P-450 yang disebut CYP. CYP1A1 dan CYP2B10 merupakan respon isoform P-450 terhadap ekstrak sambiloto. Fungsi metabolisme obat di sel hati sangat dipengaruhi oleh fungsi hati.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak sambiloto pada mencit C3H dapat memicu terjadinya apoptosis pada sel kanker. Pengaruh terhadap apoptosis mulai pada dosis 5 mg/hari yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan kelompok yang tidak mendapatkan ekstrak sambiloto. Apoptosis semakin meningkat sebanding dengan peningkatan dosis sambiloto yang diberikan.

Hasil ini sesuai dengan penelitian *in vitro* terdahulu yang telah dilakukan peneliti (Nugrahaningsih, 2003). Penelitian dilakukan untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak sambiloto terhadap apoptosis dan nekrosis pada kultur sel adenokarsinoma mamma yang diperoleh dari mencit C3H. Apoptosis diperiksa dengan pengecatan *acridine orange* yang menampilkan fluoresen warna orange pada sel yang mengalami apoptosis. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak sambiloto mampu meningkatkan apoptosis sel adenokarsinoma mamma baik diberikan secara langsung pada sel maupun melewati proses ADME ketika diberikan per oral.

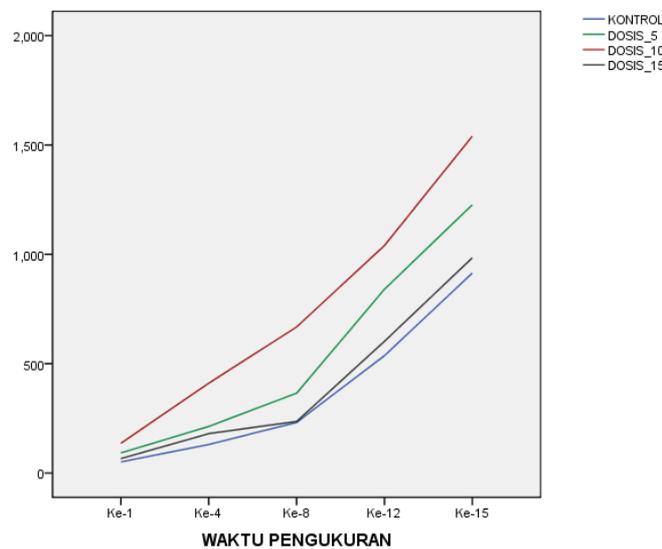
Apoptosis terjadi karena adanya sinyal eksternal ataupun sinyal internal. Tidak seperti pada sel normal, apoptosis pada sel kanker tidak berlangsung dengan baik akibat adanya kekacauan sistem dalam sehingga terjadi hambatan ekspresi gen proapoptosis. Proses apoptosis membutuhkan ATP sebagai kofaktor. Pemecahan ATP menghasilkan energi yang digunakan untuk pergerakan sitokrom-c keluar dari mitokondria. ATP diperoleh dari nutrisi yang ditransport melalui pembuluh darah dalam jaringan kanker. Bila tidak tersedia ATP maka sel dapat menuju ke arah nekrosis dan menimbulkan reaksi inflamasi.

Sambiloto dapat menginduksi terjadinya apoptosis baik melalui jalur internal maupun jalur eksternal. Andrografolid yang merupakan zat aktif utama dari sambiloto dapat mengisiasi apoptosis pada p53 yang merupakan jalur internal. (Zhou, 2008; Sukardiman, 2007). Adanya sinyal internal akan menyebabkan lepasnya ikatan Apaf-1 pada bcl-2. Apaf-1 kemudian bergabung dengan sitokrom-c dan membentuk apoptosom dengan caspase-9 dan ATP. Kompleks tersebut akan mengaktifkan pro-caspase 3 menjadi caspase 3 yang merupakan eksekutor kaskade caspase.

Andrografolid dapat juga mengaktivasi caspase 8 pada jalur eksternal, yang selanjutnya

akan mengaktivasi caspase 9 dan caspase 3 yang merupakan eksekutor. Sinyal eksternal berupa ikatan komplementer antara Fas dan TNF yang membentuk *death activator*. Sinyal dari *death activator* menuju ke sitoplasma dan mengaktivasi caspase 8. Caspase 8 akan menginisiasi jalur caspase dan membentuk kaskade caspase sehingga menyebabkan apoptosis. Aktivasi caspase 8 juga menyebabkan Bid menjadi aktif sehingga menginisiasi program apoptosis melalui peningkatan aktivitas Bax dan Bak.

Ukuran jaringan kanker merupakan indikator penting keberhasilan suatu terapi. Pengukuran jaringan kanker secara tepat memiliki keterbatasan. Ukuran jaringan kanker yang diperiksa dalam penelitian ini adalah volume tumor. Volume tumor diukur sebanyak 5 kali yaitu pada hari ke 1, 4, 8, 12 dan hari ke 15 sebelum dilakukan terminasi. Pengukuran volume tumor pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan kaliper digital. Pengukuran dengan kaliper lebih cepat, lebih mudah dan tidak invasif terhadap mencit. Pengukuran dengan kaliper dilakukan dengan mengukur panjang dan lebar tumor (aksis x dan y), tetapi tidak mengukur aksis tinggi (aksis z). Selain itu pengukuran dengan kaliper akan ikut terukur lapisan kulit dan jaringan lemak. Karena hal tersebut maka pengukuran dengan kaliper digital merupakan tehnik pengukuran yang dapat memberikan bias. Pengukuran yang memberikan presisi dan akurasi yang lebih baik dapat dilakukan dengan menggunakan pencitraan ultrasonografi. atau dengan menggunakan CT scan. Namun pengukuran tersebut sulit dilakukan dalam penelitian ini mengingat peralatan yang tidak tersedia.



Gambar 1. Grafik yang menggambarkan hasil pengukuran volume tumor pada ke -1, 4, 8, 12 dan 15

Pengaruh ekstrak sambiloto terhadap pertumbuhan tumor dapat dilihat dari adanya kecenderungan menurunnya kelipatan penambahan volume tumor pada kelompok perlakuan seperti dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil tersebut menunjukkan terjadi perlambatan laju pertumbuhan tumor pada mencit yang mendapat ekstrak sambiloto

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Penelitian secara *in vivo* dengan memberikan ekstrak sambiloto secara oral mempengaruhi apoptosis sel adenokarsinoma mamma dengan indikator peningkatan sel yang mengalami apoptosis dengan pemeriksaan TUNEL. Volume tumor setelah pemberian ekstrak sambiloto tidak berkurang. Pertumbuhan adenokarsinoma mamma merupakan suatu hal kompleks yang dipengaruhi oleh banyak faktor. Apoptosis sel yang diperiksa dengan metode TUNEL merupakan bagian kecil dari indikator pertumbuhan kanker yang dalam penelitian ini perubahannya tidak linier dengan perubahan volume tumor.

Saran

Diperlukan penelitian lain untuk menghitung persentase sel kanker, jaringan penyokong, dan jaringan nekrotik dalam tumor massa sehingga dapat diketahui pengaruh dalam hubungannya dengan terapi kanker.

DAFTAR PUSTAKA

- Nugrahaningsih, Tjahjono, Dharmana E. 2003. Apoptosis Sel Adenokarsinoma Mamma Mencit C3H setelah Pemberian Ekstrak Sambiloto (*Andrographis paniculata*) (Penelitian In Vitro). *Media Medika Indonesiana* 38(3):121-124
- Nugrahaningsih, Utami NR, Sugiarti E. 2009. Pengaruh Ekstrak sambiloto Terhadap Pertumbuhan Kanker Mamma dan Mikroanatomi Ginjal Mencit C3H. *Biosaintifika* 1(2)
- Sukardiman, Rahman A, Ekasari W, Sismindari. 2005. Induksi apoptosis senyawa *Andrographolida* dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) terhadap kultur sel kanker. *Media Kedokteran Hewan* Vol 21. No. 3:105-110
- Vaculova A, Zhivotovsky B. 2008. Caspases: Determination of Their Activities in Apoptotic Cells. *Methods in Enzymology* 442: 157-181
- Williamson KE, El Din OS, O’Kane HF. 2007. Apoptosis. In *The Cancer Handbook*. 2nd ed. Editor Alison MR. John Wiley&Sons Ltd
- Zhou J, Lu GD, Ong CS, Ong CN, dan Shen HM.2008. *Andrographolide* sensitizes cancer cells to TRAIL –induced apoptosis via p53-mediated death receptor 4 up-regulation. *Molecular cancer Therapy*. Vol 7(7):2170-2180.