

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

Nugrahaningsih, Ari Yuniastuti

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

Abstrak. 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 kanker. Peningkatan apoptosis merupakan suatu upaya yang dikembangkan sebagai terapi kanker. Pemeriksaan apoptosis dengan metode TUNEL (*Terminal deoxyribonucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) 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 sel kanker pada kultur. Hasil tersebut masih memerlukan penelitian lebih lanjut, terutama pengaruhnya bila diberikan secara oral. 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 (Gavrieli, et al., 1992).

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 identifikasi apoptosis dilakukan dengan pewarnaan *Acridine Orange*.

Pertumbuhan jaringan kanker juga sangat dipengaruhi oleh lingkungan mikro sel kanker (Shojaei, et al., 2008). 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 transplan sel adenokarsinoma mamma. Penghitungan jumlah sampel tiap kelompok menggunakan rumus Federer.

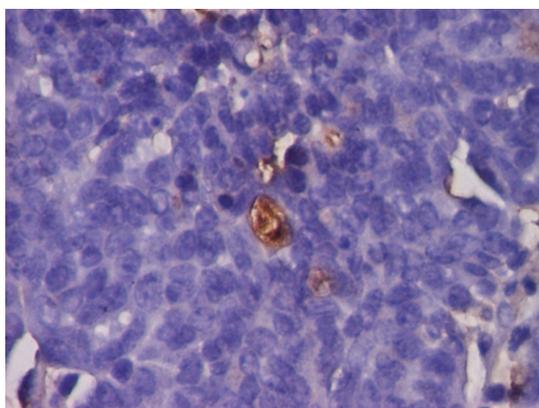
Variabel bebas penelitian ini adalah pemberian ekstrak sambiloto selama 14 hari dengan variasi dosis 5, 10 dan 15 mg/ekor/hari, serta kelompok kontrol yang tidak mendapat ekstrak sambiloto. Dosis peroral mengacu pada penelitian *in vivo* yang dilakukan Sheeja, et al. yang menggunakan ekstrak sambiloto 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 PENELITIAN

Apoptosis

Sel yang mengalami apoptosis diperiksa dengan menggunakan metode TUNEL. Sel yang mengalami apoptosis tampak berwarna coklat pada daerah inti sel (Gambar 1). Pemeriksaan indeks apoptosis dilakukan dengan menghitung sel yang positif pada 1000 sel yang dihitung dalam 5 daerah pembacaan.



Gambar 1. Sel yang mengalami apoptosis (tanda panah) pada pemeriksaan dengan metode TUNEL

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.

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	

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 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	

Volume tumor

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.

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-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 ($p=0,019$).

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 ($p=0,149$).

Tabel 4. Rata-rata kelipatan penambahan volume tumor

Kelompok	Rata-rata kelipatan penambahan volume	Anova
Kontrol	19,39 ± 6,144	p=0,049
Dosis 5 mg	16,46 ± 6,175	
Dosis 10 mg	10,67 ± 3,226	
Dosis 15 mg	14,28 ± 4,194	

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. Hasil penghitungan kelipatan bertambahnya volume tumor disajikan pada Tabel 4.

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.

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 menampakkan 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.

Pemberian ekstrak sambiloto secara oral pada tikus mencapai kadar maksimum plasma

dalam waktu yang relatif cepat yaitu 1,5 – 2 jam, sedangkan waktu paruh berkisar antara 6,6 – 10 jam (Panossian, 2000; Naidu et al, 2009). Andrografolid diekskresi dari tubuh secara cepat kurang lebih 80% dalam 8 jam (Jarukamjorn, 2008). Untuk mendapatkan efek terapi yang optimum kadar maksimum ekstrak dalam darah harus dipertahankan dengan pemberian berulang. Pemberian ekstrak sambiloto dalam penelitian ini dilakukan satu kali sehari sehingga kadar maksimum dalam darah tidak bertahan lama karena zat aktif dari sambiloto dieliminasi dari tubuh dalam waktu cepat.

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

Beberapa saran antara lain 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. Juga masih diperlukan penelitian lanjutan untuk mendukung penggunaan ekstrak sambiloto sebagai antikanker antara lain kombinasi pemberian ekstrak sambiloto dengan zat lain atau kombinasi dengan terapi standar kanker.

DAFTAR PUSTAKA

- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA., 1992, “Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation”, *The Journal of Cell Biology*, Vol.119. Number 3:493-501.
- Nugrahaningsih, Tjahjono, Dharmana E., 2003, “Apoptosis Sel Adenokarsinoma Mamma Mncit 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).
- Shojaei F, Ferrara N., 2008, “Role of The Microenvironment in Tumor Growth and in

Refactoriness/resistance to anti-angiogenic Therapies”, *Drug Resistance Updates* 11:219-230.

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.