

Aktivitas Antiproliferasi Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) Terhadap Sel Hepar Tikus Betina Galur Sprague Dawley Terinduksi 7,12-Dimetilbenz[a]antrasena

Ilham Agusta Fauzi¹, Fikri Amalia², Nurma Sabila³, Adam Hermawan⁴, Muthi Ikawati⁵ dan Edy Meiyanto⁶

Abstract

¹⁻⁶Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC) Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara II, Yogyakarta 55281.

Correspondence

Prof.Dr.Edy Meiyanto,
MSi,Apt. ,Fakultas Farmasi,
Universitas Gadjah Mada,
Sekip Utara II, Yogyakarta
55281. Email :
meiyan_e@ugm.ac.id

One of the natural materials as potentially efficacious chemopreventive agents are Ciplukan (*Physalis angulata* L.). Several previous studies reported that *Physalis angulata* L. herbs ethanolic extract (PEE) has cytotoxic activity and induction of apoptosis in breast cancer cells MCF-7 and HeLa cervical cancer cells. This study aims to determine the effects of PEE as an chemopreventive agent on rat liver cells induced 7,12-dimetilbenz[a]anthracene (DMBA). This study used Sprague Dawley strain female rats aged 40-50 days were divided into 5 groups : (1) DMBA control group, mice were induced with DMBA in per oral dose of 20 mg/kg; (2) DMBA + PEE dose 750 mg/kgBW group ; (3) DMBA + PEE dose 1500 mg/kgBW group ; (4) solvent control group of CMC-Na 0,5%; (5) PEE dose 1500 mg/kgBW control group. PEE was dissolved in CMC-Na 0,5% and administered daily, starting the seventh week after administration of DMBA. At the beginning of the tenth week of the study, rats were necropted and liver organs were isolated and stored in buffered formalin 4%. Qualitative analysis to determine the histopathology of liver cells through staining method of Hematoxyllin & Eosin (HE), while quantitative analysis to determine the level of liver cell proliferation by AgNOR staining method. The results showed in the DMBA control group that liver cell morphology changes that hiperproliferation leading to carcinogenesis. In DMBA + PEE dose of 1500 mg/kgBW group improved the situation of DMBA-induced liver cells histopathology and antiproliferation activity better than DMBA + PEE dose of 750 mg/kgBW on DMBA-induced rat liver cells. The results showed that *Physalis angulata* L. herbs ethanolic extract can inhibit cell proliferation in rat liver caused by DMBA administration through antiproliferation mechanism and have potential for the development as chemoprevention material on liver cancer

Keywords : *Physalis angulata* L.,liver cancer, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, carcinogenesis, antiproliferation

Pendahuluan

Kanker hepar merupakan kanker dengan insidensi kematian ketiga terbesar di dunia (Garcia *et al.*, 2007). Jumlah kematian di dunia yang disebabkan oleh kanker hepar menunjukkan lebih dari satu juta kematian per tahun. Sedangkan di Amerika Serikat terdapat lebih dari 18.910 kematian disebabkan oleh kanker hepar (NCI, 2009). Kematian akibat kanker hepar diproyeksikan akan terus meningkat hingga tahun 2025 (Parkin *et al.*, 2008). Penyebab kanker hepar secara umum adalah akibat infeksi virus hepatitis B dan C, sirosis hati, infeksi parasit, alkohol serta paparan karsinogen seperti aflatoxin (Hayat, 2005; Fong, 2010). Oleh karena itu, pemilihan pengobatan baru yang aman,

efektif, dan selektif untuk kanker hepar sangat penting untuk diusahakan.

Salah satu target dalam pengobatan kanker adalah melalui penghambatan proliferasi sel kanker. Pada proliferasi sel normal memerlukan sinyal pertumbuhan untuk terus membelah. Tanpa adanya rangsangan sinyal ini sel-sel normal tidak dapat berkembang. Berbeda dengan sel normal, sel kanker dapat memproduksi *growth factor* sendiri sehingga tidak bergantung pada rangsangan sinyal pertumbuhan dari luar untuk melakukan proliferasi (Hanahan and Weinberg, 2000). Oleh karena itu, sel kanker mampu tumbuh tidak terkendali walaupun tanpa adanya sinyal pertumbuhan.

Ciplukan (*Physalis angulata* L.) merupakan salah satu tanaman yang diduga secara kuat mampu menghambat proliferasi sel kanker. Hal ini terbukti pada penelitian (Hsieh *et al.*, 2006) yang telah mengevaluasi herba ciplukan sebagai agen kemopreventif yang mampu meregulasi proliferasi, menginduksi G2/M arrest, serta apoptosis pada sel kanker payudara MDA-MB 231. Selain itu, *Physalis angulata* L. dapat menghambat sel kanker tersebut pada fase G2/M melalui penghambatan sintesis atau stabilitas mRNA, penurunan level cyclin A atau cyclin B, serta meningkatkan level p21^(waf1/cip1), p27^(kip1) dan Chk2 pada fase G2/M (Hsieh, *et al.*, 2006). Ekstrak etanolik *Physalis angulata* L. secara *in vitro* memiliki aktivitas sitotoksik dan mampu menginduksi terjadinya apoptosis pada sel kanker leher rahim HeLa dan sel kanker payudara MCF-7 (Darma *et al.*, 2010; Fitria *et al.*, 2011).

Berdasarkan data tersebut, penting dilakukan penelitian kajian histopatologi *Physalis angulata* L. pada sel hepar tikus galur Sprague dawley terinduksi 7,12-dimetilbenz[a]antrasena. Pengujian histopatologi berfungsi untuk mengetahui keadaan histologis serta tingkat keparahan kanker yang terjadi. Penelitian ini diharapkan mampu mengetahui aktivitas ekstrak etanolik *Physalis angulata* L. terhadap proliferasi sel hepar tikus galur Sprague dawley terinduksi 7,12-dimetilbenz[a]antrasena sehingga dapat dikembangkan menjadi salah satu solusi dalam pencegahan kanker hepar.

Metode Penelitian

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian berjalan selama lima bulan pada Bulan Februari hingga Juni 2010 di Laboratorium *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC) Fakultas Farmasi UGM, Laboratorium Patologi dan Anatomi, serta Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta.

Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang di ambil dari daerah Besi, Kaliurang, Sleman, Yogyakarta pada bulan Januari 2010 dan telah dideterminasi di laboratorium Farmakognosi, Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM. Sebanyak 1000 gram serbuk herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) dimaserasi dengan larutan penyari etanol 96% (*Merck*) sebanyak 1:10. Fraksi etanol yang diperoleh dipisahkan dengan *rotary vaccum evaporator* hingga

diperoleh ekstrak kental sejumlah 31,5 gram. 7,12-dimetilbenz[a]antrasena / DMBA (*Sigma*) digunakan dalam pembuatan model kanker atau sebagai agen penginduksi kanker.

Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus betina galur *Sprague Dawley* berumur 40-50 hari dengan berat antara 70-120 gram yang diperoleh dari Unit pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM sebanyak 6 ekor tiap kelompok ditempatkan dalam kandang dengan suhu sekitar 28-32°C, kelembaban nisbi 98%, dan diberi makanan pellet serta diberi minum air ledeng. Tikus diadaptasikan selama 3 hari.

Prosedur Penelitian

Uji *In Vivo*

Penelitian ini bersifat eksperimental murni dengan *post test only*. Dalam penelitian ini, perlakuan terhadap hewan uji dilakukan untuk melihat proliferasi sel baik karena DMBA dan ekstrak etanolik *Physalis angulata* L. pada sel hepar. Tikus betina galur Sprague Dawley berusia 40 hari dibagi menjadi 5 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. Sebelum digunakan, tikus diadaptasikan selama 3 hari dan hanya mendapat pakan dan minum secukupnya. Kelompok kontrol DMBA, kelompok DMBA + ekstrak 750 mg/kgBB, kelompok DMBA + ekstrak 1500 mg/kgBB, diinduksi DMBA dosis 20 mg/kgBB dalam minyak jagung peroral 10 kali dalam 5 minggu. Pada awal minggu ketujuh setelah pemberian DMBA, kelompok DMBA + ekstrak diberi perlakuan ekstrak etanolik *Physalis angulata* L. dalam CMC-Na 0,5% dengan dosis 750 dan 1500 mg/kgBB setiap hari dalam 1 minggu. Sedangkan kelompok kontrol pelarut CMC-Na 0,5% dan kelompok ekstrak dosis 1500 mg/kgBB, hewan uji diberi pelarut CMC-Na 0,5% dan ekstrak dosis 1500 mg/kgBB setiap hari selama 1 minggu. Pada awal minggu kesepuluh penelitian, tikus nekropsis dan organ hepar disimpan dalam buffer formalin 4% untuk mengamati histopatologi dan aktivitas proliferasi.

Pengamatan Histopatologi

Pengamatan histopatologi dilakukan dengan melihat secara makroskopis maupun mikroskopis untuk mengamati sifat karsinogenisitas seluler pada jaringan yang diperiksa dengan menggunakan zat warna untuk sediaan histologi Hematoksilin & Eosin

(HE) yang dilakukan sesuai prosedur standar pengecatan yang dilakukan di Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Kemudian dilakukan pemeriksaan histopatologi secara deskriptif kualitatif di bawah mikroskop binokuler (Olympus® DP12 *microscope digital camera system*,Japan) di laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dengan perbesaran 40x lensa objektif

Pengamatan Aktivitas Proliferasi Sel dengan *Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions* (AgNOR)

Preparat histologi diimersikan dalam buffer sodium sitrat (pH 6,0), diinkubasi di dalam autoclave pada suhu 120° C (tekanan 1,1-1,2 bar) selama 20 menit, didinginkan sampai suhu 37° C, kemudian diimersikan ke dalam larutan pengecatan perak yang terdiri dari 1 bagian volume gelatin 2% dalam asam formiat 1% dan 2 bagian larutan perak nitrat 25% dalam suhu 37° C, selama 13 menit (Derenzini *et al.*,2000). Selanjutnya, jumlah titik hitam (*black dots*) tiap sampel dihitung di bawah mikroskop binokuler (Olympus® DP12 *microscope digital camera system*,Japan) dengan perbesaran 1000 kali dalam minyak imersi. Pengecatan dan pengamatan AgNOR dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM.

Analisis Data

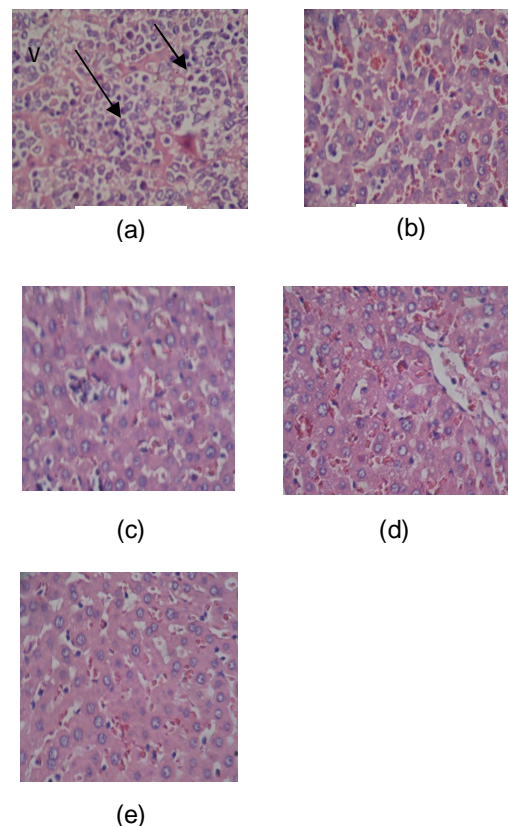
Evaluasi hasil uji terdiri dari 3 tahap, meliputi pengamatan keadaan histopatologi organ hepar dari hasil pengecatan Hematoksilin & Eosin (HE) secara deskriptif kualitatif untuk mengetahui informasi tentang tingkat keparahan tumor hepar. Analisis mikroskopis dilakukan dengan mengamati tingkat proliferasi sel melalui metode pengecatan AgNOR. Analisis kuantitatif proliferasi sel dilakukan dengan parameter mAgNOR, yaitu dengan menghitung rerata *black dots* pada minimal 100 sel yang diamati dan dilanjutkan analisis statistik dengan metode *one way ANOVA* dengan tes Tukey menggunakan taraf kepercayaan 95%. Uji statistik dilakukan dengan bantuan perangkat lunak SPSS® 13.0 for Windows®.

Hasil Penelitian dan Pembahasan

Histopatologi Sel Hepar

Teknik pengecatan Hematoksilin & Eosin (HE) merupakan salah satu metode mikroskopis untuk mengetahui gambaran histopatologi sel. Analisis histopatologi yang dilakukan terhadap sel hepar tikus kelompok kontrol DMBA menunjukkan terjadinya *multiple nucleoli* dan perubahan morfologi sel hepar yaitu hiperproliferasi yang mengarah karsinogenesis (Gambar 1a). Hal tersebut berbeda

pada kelompok kontrol pelarut CMC-Na 0,5% (Gambar 1d) dan kelompok kontrol EEP dosis 1500 mg/kgBB (Gambar 1e) terlihat susunan hepatosit yang masih teratur dimana inti sel-sel hepar kedua kelompok tampak monokromatis tercat ungu dengan pengecatan Hematoksilin & Eosin (HE), bentuk sel tampak sama (isositosis), dan tidak terdapat kelainan pada sitoplasma. Pada kelompok perlakuan DMBA + EEP dosis 1500 mg/kgBB (Gambar 1c) mampu memperbaiki keadaan histopatologi sel hepar yang terinduksi DMBA lebih baik dibanding kelompok perlakuan DMBA + EEP dosis 750 mg/kgBB (Gambar 1b). Untuk menegaskan telah terjadinya karsinogenesis melalui aktivitas proliferasi sel dapat diamati lebih lanjut dengan teknik pengecatan *Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions* (AgNOR).



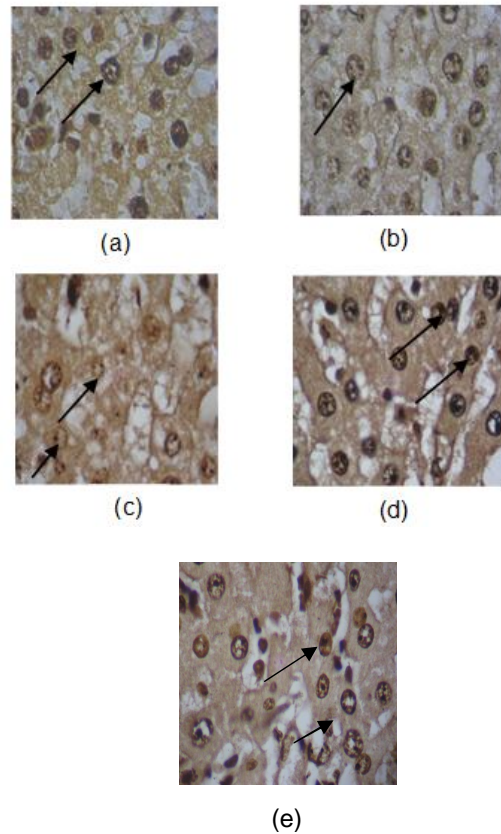
Gambar 1. Efek ekstrak etanolik *Physalis angulata* L. terhadap gambaran histopatologi sel hepar terinduksi DMBA. Kontrol DMBA 20mg/kg BB (a), perlakuan DMBA + dosis 750 mg/kgBB (b), perlakuan DMBA + dosis 1500 mg/kgBB (c), kontrol pelarut (CMC-Na) (d), Kontrol ekstrak dosis 1500 mg/kgBB (e). Pada semua preparat tampak susunan hepatosit yang masih teratur dan tampak sama dengan inti sel tercat ungu. Tidak tampak perbedaan gambaran histologi antar kelompok (perbesaran 40x lensa objektif). Tanda panah menunjukkan sel hepar mengalami hiperproliferasi yang mengarah pada karsinogenesis.

Proliferasi Sel Hepar

Teknik pengecatan *Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNOR)* digunakan dalam memperkirakan aktivitas pembelahan sel dengan mengkuantifikasi protein NORs (*Nucleolar Organizer Regions*) yang mengindikasikan aktivitas proliferasi kultur sel atau sebuah tumor (Derenzini *et al.*, 2003). Preparat AgNOR digunakan untuk mengamati tingkat proliferasi sel hepar normal maupun sel hepar dengan prognosis menuju kanker dengan menghitung jumlah seluruh *blackdots* pada minimal 100 sel kemudian dirata-rata dengan cara membagi jumlah seluruh *blackdots* dengan jumlah sel yang diamati

Gambaran preparat AgNOR organ hepar menunjukkan bahwa jumlah jumlah *black dots* kelompok kontrol DMBA (Gambar 2a) lebih banyak dibanding kelompok yang lain. Hal ini terbukti melalui analisis kuantitatif (Gambar 3) bahwa kelompok kontrol DMBA memiliki nilai mAgNOR ($X \pm SD$) yang paling tinggi sebesar $1,97 \pm 0,18$. Hasil ini menunjukkan adanya aktivitas proliferasi sel yang paling tinggi pada kelompok kontrol DMBA. Adanya aktivitas proliferasi sel yang berlebih ini dimungkinkan terjadinya karsinogenesis pada sel hepar tikus. Sedangkan kelompok perlakuan DMBA + EEP dosis 1500 mg/kgBB (Gambar 2c) memiliki jumlah *black dots* lebih sedikit dibanding kelompok perlakuan DMBA + EEP dosis 750 mg/kgBB (Gambar 2b) dengan perolehan nilai mAgNOR masing-masing $1,75 \pm 0,07$ dan $1,58 \pm 0,17$.

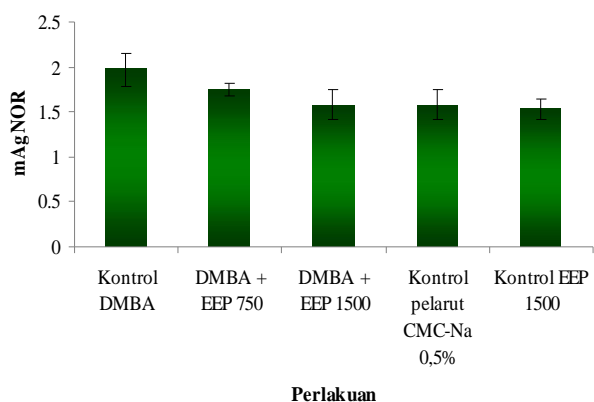
Hasil ini menunjukkan bahwa EEP dapat menurunkan proliferasi sel hepar tikus terinduksi DMBA. Penurunan jumlah *black dots* tersebut bersifat tergantung dosis (*dose dependent*) dengan nilai mAgNOR kelompok kontrol pelarut CMC-Na dan kelompok kontrol EEP dosis 1500 mg/kgBB, artinya perlakuan EEP dosis 1500 mg/kgBB mampu mengembalikan tingkat proliferasi sel yang telah mengalami inisiasi karsinogen ke tingkat proliferasi sel normal. Hal ini dibuktikan melalui penentuan persentase penghambatan proliferasi yang diperoleh dengan cara membagi selisih antara nilai mAgNOR kelompok DMBA + EEP dosis tertentu dan kelompok kontrol DMBA dengan nilai mAgNOR kontrol DMBA.



Gambar 2. Ekstrak etanolik *Physalis angulata* L. menghambat proliferasi sel hepar tikus terinduksi DMBA.

Pengamatan tingkat proliferasi sel dilakukan dengan pewarnaan AgNOR. Aktivitas proliferasi ditunjukkan oleh jumlah *blackdots* yang terdapat di setiap sel. Profil di atas menunjukkan sel hepar tikus kelompok : DMBA (a), DMBA+ EEP dosis 750 mg/kgBB (b), DMBA + EEP dosis 1500 mg/kgBB (c), Pelarut CMC-Na (d), EEP dosis 1500 mg/kgBB (e) pada mikroskop dengan perbesaran 1000x. Preparasi dalam buffer natrium sitrat pH 6,0, kemudian diinkubasi dalam autoklaf pada suhu 120 dengan tekanan 1,1-1,2 atm.

→ :menunjukkan *blackdots* dalam sel hepar.



Gambar 3. Efek penurunan jumlah black dots sel hepar tikus akibat pemberian ekstrak etanolik herba *Physalis angulata* L. (EEP).

Keterangan : Data diperoleh dengan menghitung jumlah seluruh black dots pada minimal 100 sel kemudian dirata-rata dengan cara membagi jumlah seluruh black dots dengan jumlah sel yang diamati. Replikasi tiap kelompok 10 lapang pandang. Analisis data menggunakan uji one way ANOVA yang dilanjutkan dengan uji Tukey dengan taraf kepercayaan 95%. Grafik menunjukkan purata ± SD black dots tiap kelompok

Hasil yang diperoleh (Tabel 1) menunjukkan bahwa EEP dosis 1500 mg/kgBB memiliki persentase penghambatan proliferasi sebesar 20%, lebih besar dibanding EEP dosis 750 mg/kgBB sebesar 11%. Berdasarkan hasil penelitian ini, EEP dosis 1500 mg/kgBB memiliki kemampuan dalam menghambat proliferasi sel hepar tikus terinduksi DMBA lebih baik dibanding EEP dosis 750 mg/kgBB

Tabel 1. Efek perlakuan ekstrak etanolik *Physalis angulata*, L terhadap proliferasi sel hepar

Perlakuan	mAgNOR	% Penghambatan Proliferasi
Kontrol DMBA	1,97 ± 0,18	-
DMBA + EEP 750	1,75 ± 0,07	11%
DMBA + EEP 1500	1,58 ± 0,17	20%
Kontrol Pelarut CMC-Na 0,5%	1,58 ± 0,17	-
Kontrol EEP 1500	1,53 ± 0,11	-

Adanya penurunan nilai mAgNOR yang tidak terlalu signifikan antara EEP dosis 750 mg/kgBB dan 1500 mg/kgBB kemungkinan dikarenakan adanya pengaruh campuran berbagai kandungan senyawa yang terkandung dalam ekstrak tersebut. Hal tersebut dapat terjadi karena ekstrak yang digunakan masih dalam bentuk ekstrak kasar, sehingga kandungan senyawa yang terdapat dalam ekstrak masih banyak. Hal ini memungkinkan terjadinya

efek yang berlawanan antar senyawa yang terdapat dalam ekstrak (zat ballast) sehingga efek yang ditimbulkan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada pemberian dosis yang meningkat. Oleh karena itu perlu dilakukan fraksinasi pada ekstrak yang digunakan sehingga efek yang ditimbulkan dapat meningkat secara signifikan seiring dengan bertambahnya dosis ekstrak yang digunakan.

Prospek ekstrak etanolik *Physalis angulata* L. dapat berperan sebagai agen kemopreventif dan menurunkan resiko terjadinya karsinogenesis. Hal ini dibuktikan melalui penelitian (Wu et al., 2006) secara in vitro bahwa EEP dapat meningkatkan ekspresi p53 dan menurunkan ekspresi Bcl-2 pada sel HepG2. Sedangkan pada penelitian (Darma et al., 2010) dapat meningkatkan ekspresi p53 dan menurunkan ekspresi Bcl-2 pada sel kanker leher rahim HeLa. Protein p53 merupakan tumor suppressor yang berperan dalam penghambatan proliferasi melalui regulasi siklus sel dan proses kematian sel secara terprogram (apoptosis) (Gasco et al., 2002). Oleh sebab itu perlu dilakukan studi dan pengamatan lebih lanjut terhadap ekspresi p53 dalam sel hepar untuk mengetahui bagaimana pengaruh EEP terhadap ekspresi protein tersebut.

Simpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanolik herba *Physalis angulata* L. dapat menghambat aktivitas proliferasi sel hepar tikus terinduksi DMBA, sehingga ekstrak etanolik herba *Physalis angulata* L. dapat dijadikan bahan kemopreventif.

Daftar Pustaka

- Darma AP, Ashari Anna R, Nugroho P, Monikawati A, Agusta I, Hermawan A, and Meiyanto E. 2010, Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan Pada Sel Kanker Leher Rahim HeLa Melalui Modulasi Ekspresi Protein p53, *Farmasains*, In Press
- Derezini M, Tere D, O' Donohue, MF and Ploton D., 2003, *Interphase Nucleolar Organiser Regions in Tumor Pathology*. Crocker, J and Murray, P.G (editor), *Molecular Biology in Cellular Pathology*. Chichester : John Willey & Sons Ltd.
- Fitria M, Armandari I, Septhea D., Hermawan A, Ikawati M, and Meiyanto E, 2011, Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) Berefek Sitotoksik dan Menginduksi Apoptosis pada Sel kanker Payudara MCF-7, *Jurnal Bionatura*, In Press.

- Fong, Tse-Ling, Hepatocellular Carcinoma (Liver Cancer), Available from :URL:<http://www.medicinet.com>, Accessed October 5,2010.
- Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center M, Hao Y, Siegel RL, and Thun M J. Global Cancer Facts and Figures. Atlanta, GA: American Cancer Society ; 2007.
- Gasco M., Shami S, and Crock T, 2002, The p53 pathway in breast cancer, Review, Breast Cancer Res.; 4 : 70-76.
- Hanahan D, and Weinberg RA. 2000, The Hallmarks of Cancer, Cell, 100 : 57-70.
- Hayat MA, 2005, Handbook of immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas. Molecular Genetic, Liver Carcinomas, and Pancreatic Carcinomas. Elsevier Academic Press, 130-140.
- Hsieh WT, Huang KY, Lin HY, and Chung JG, 2006, Physalis angulata Induced G2/M Phase Arrest in Human Breast Cancer Cells., Food Chem. Toxicol.; 44:974 – 983.
- National Cancer Institute. What You Need To Know About™ Liver Cancer. 2009. Available from:URL: <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/liver.pdf>, Accessed October 20, 2010.
- Parkin, DM, Bray, F, Ferlay, J, and Pisani, P. Global cancer statistics, CA Cancer. J Clin. 2008 ; 55 : 74-108.
- Wu Ng, Chen, Lin, Wang, and Lin., 2006, Antihepatoma Activity of Physalis Angulata L. and P. Peruviana Extracts and Their Effects on Apoptosis in Human Hep G2 Cells. Life Sci, 74(16):2061-2073.