Potensi Alkaloid *Achyranthes aspera* Linn Terhadap Ekspresi Protein Bax Sel Kanker Payudara pada Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Benzopyrene

Alkaloid *Achyranthes Aspera* Linn Potential to Bax Protein Mammae Cancer Cell Expression in Mice (*Mus musculus*) Induced Benzopyrene

Sunarni Zakaria

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Kampus A. Jl. Myjen. Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya
Telp.031 5030252-3, 5032803 / 031 5032803
e-mail:drnarni@yahoo.co.id

Abstract

Cancer was a complete disease in the world, include in Indonesia. In 2010, WHO showed that cancer was a 2nd cause of death after cardiovascular disease, and a 6th cause a death in Indonesia. A third a cancer suffered was able to be cured before metastase case. When metastase phase occurred, mortality was high and needed an sppropriste chemotherapy treatment. Ideal chemotherapy medicine or anticancer was able to kill whole cancer cell without endanger a normal cell. Aims of research was to prove alkaloid potential within Achyranthes aspera Linn leaf to Bax protein expression in mice cancer mammae induced benzopyrene. Thirty female of mice aged 3-4 months, 20-30 gram of body weight. Female divided into 5 treatment groups which consisted of six mice. Mice wasinjected by benzopyrene intra mammae 10 mg/kg body weight, twice a week during 8 weeks in order to infect a cancer of mammae. A cancer signed by swollen in mice's mammae and proven by proliferation mammae cell in histopathological representation. Then, mice got therapy used alkaloid Achyranthes aspera Linn fraction peroral through negative control treatment were health mice, 4 groups of mice suffer of mammae cancer P0, P1, P2, and P3 which each group treated Metotreksatdosis 30 mg/kg body weight, 60 mg/kg body weight, and 100 mg/kg body weight. Result of Bax protein expression research after stastical test showed significant differences in 5 groups treatment, as large dose of Achyranthes aspera Linn as Bax protein expression. Conclusion Achyranthes aspera Linn which was given peroral caused improvement of Bax protein in mice mammae cancer induced benzopyrene thus could improve apoptosis and used to be anticancer.

Keywords: Benzopyrene, breast cancer cell, mice, aschyranthes aspera, bax protein

---

Pendahuluan

Kanker merupakan salah satu penyakit tidak menular yang telah menjadi masalah kesehatan di dunia, termasuk di Indonesia. Data Badan Kesehatan Dunia (WHO) tahun 2010 menunjukkan kanker merupakan penyebab kematian nomor 2 setelah penyakit kardiovaskuler. Sedangkan berdasarkan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2007, kanker menempati urutan ke 6 penyebab kematian terbesar di Indonesia. Kanker dapat menyerang semua kelompok umur, masyarakat miskin dan kaya dan semua strata pendidikan, dari tidak sekolah

sampai perguruan tinggi (Menkes, 2012). Di Indonesia prevalensi tumor/kanker adalah 4,3 per 1000 penduduk. Sedangkan berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2007, kanker payudara menempati urutan pertama pada pasien rawat inap di seluruh RS di Indonesia (16,85%), disusul kanker leher rahim (11,78%) (Tjandra,2010).

Pengobatan kanker dapat dilakukan dengan berbagai cara antara lain pembedahan, radiasi, kemoterapi, endokrinoterapi dan imunoterapi. Kemoterapi herbal dikalangan dokter Indonesia sangat meningkat dewasa ini. Hal ini tidak lepas dari kebijakan pemerintah yang telah bertekad mengembangkan jamu Indonesia melalui berbagai langkah. Berdasarkan Undang-undang Republik Indonesia Nomor 23 Tahun 1992 Tentang Kesehatan ayat 10 bahwa Obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dan bahan tersebut yang secara turun temurun telah digunakan untuk pengobatan berdasarkan pengalaman (Barry, 2009). Minat terhadap terapi herbal dikalangan dokter Indonesia sangat meningkat dewasa ini. Hal ini tidak lepas dari kebijakan pemerintah yang telah bertekad mengembangkan jamu Indonesia melalui berbagai langkah. Berdasarkan Undang-undang Republik Indonesia Nomor 23 Tahun 1992 Tentang Kesehatan ayat 10 bahwa Obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dan bahan tersebut yang secara turun temurun telah digunakan untuk pengobatan berdasarkan pengalaman dan diperkuat dengan keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 1076/MENKES/SK/VII/2003 tentang Penyelenggaraan Pengobatan Tradisional, dimana pengobatan komplementer dan alternatif berdampingan sejajar dengan kedokteran Barat (Japaries, 2011). Berbagai langkah awal dalam pengembangan obat baru adalah sebelumnya kita mengetahui penggunaan secara empirik di masyarakat dan kemudian bahan tersebut harus dibuktikan terlebih dahulu sebelum dapat digunakan sebagai obat yaitu dengan tahapan sebagai berikut; (1) Penelitian invitro pada media,(2) Uji efek biologik dan farmakodinamik, kemudian bila ditemukan suatu aktifitas farmakologik yang mungkin bermanfaat, maka senyawa yang lolos penyaringan ini akan diteliti lebih lanjut; (3) Metabolisme obat, farmakokinetik obat serta keamanan obat dimana dilakukan pada hewan coba terlebih dahulu sebelum diberikan pada manusia, dalam studi farmakokinetik tercakup juga pengembangan tehnik analisis untuk mengukur kadar senyawa tersebut dan metabolitnya dalam cairan biologik. (4) Studi toksikologi pada hewan. (5) Pengujian pada manusia/uji klinik.

Tanaman Achyranthes aspera Linn yang dikenal dengan nama jarong, jarongan dan remek getih secara empirik telah digunakan untuk menjarangkan kelahiran dengan meminum perasan daun setelah melakukan hubungan seksual dan wanita hamil tidak diperkenankan meminum perasan daun ini karena akan menyebabkan keguguran (Mardisiswoyo dan Harsono,1968). Penelitian terdahulu untuk fraksi alkaloid Achyranthes aspera Linn dimulai dari aktivitas rebusan daun Achyranthes aspera Linn dalam mencegah dan mengobati penyakit kanker kulit pada mencit (Chakraborty *et al*., 2002). Kemudian dilanjutkan ditemukannya fraksi alkaloid Achyranthes aspera Linn dapat menyebabkan apoptosis dan fragmentasi DNA pada sel kanker payudara (Wurlina dkk., 2006), selain itu secara invitro dapatmenyebabkan nekrosis & apoptosis dari sel myeloma (Zakaria dkk., 2007), dan peran fraksi alkaloid Achyranthes aspera Linnpada aktivasi Caspase 3 (*Caspase Executor*) sebagai penyebab apoptosis sel kanker uterus (Wurlina dkk., 2008). Beberapa

penelitian untuk fraksi alkaloid, misalnya fraksi alkaloidpada tanaman *Uncaria rhynchophylla* dapat menginduksi apoptosis dengan meningkatkan ekspresi p53 dan bax (Lee *et al.*, 2009) dan fraksi alkaloid dari tanaman *Artemisia* dapat menurunkan ekspresi ras pada sel epitel kanker payudara (Kim *et al.*,2007).

Tanaman Achyranthes asperaLinn yang dapat digunakan baik untuk pengobatan maupun pencegahan terhadap penyakit adalah daun, akar dan seluruh tanaman. Ekstraksi daun Achyranthes aspera Linndengan metanolditemukan senyawa alkaloid,non alkaloid dan saponin (Chakraborty *et al.*,2002). Hasil pengukuran kadar alkaloid yang terkandung dalam esktrak fraksi alkaloid daun Achyranthes aspera Linndengan HPLC, dengan melihat kurva kromatografi dapat diketahui bahwa terdapat 13 macam zat kimia yang terdapat pada fraksi alkaloid tersebut. Dari tiga belas macam zat kimia tersebut sebanyak 52,3636% luas puncak adalah alkaloid yang berhasil dipisahkan dengan menggunakan KLT dan HPLC; dan 13,0624% luas puncak adalah zat hijau daun (klorofil), ini membuktikan bahwa kandungan aktif yang terbanyak pada daun Achyranthes aspera Linn adalah fraksi alkaloid (Meles,2005). Walaupun secara teori berdasarkan beberapa penelitian terdahulu dapat dikatakan bahwa Achyranthes aspera Linn sebagai anti kanker, tetapi belum jelas apakah dapat untuk mengobati atau mencegah kanker payudara. Oleh karenanya pada penelitian kali ini membuktikan apakah fraksi alkaloid Achyranthes aspera Linn mempunyai efek sebagai anti kanker pada kanker payudara. Karena pembuatan kanker payudara belum pernah dilakukan pada binatang coba mencit (*Musmusculus*), maka sebelumnya dilakukan penelitian pendahuluan (eksplorasi) untuk membuat kanker payudara pada mencit setelah itu baru dilakukan pemberian fraksi alkaloid Achyranthes aspera Linn untuk pengujian efek anti kanker. Induksi dilakukan dengan cara menginjeksi benzopyrene intrapayudara (Sattar *etal.*,1999) pada payudara yang paling posterior. Kanker payudara yang terjadi setelah induksi benzopyrene mirip dengan kanker payudara pada manusia.

Penelitian ini mencoba untuk membuktikan bahwa *Achyranthes aspera* L bekerja dengan memicu apoptosis dengan melihat protein bax.

Gambar 1 : Tanaman Achyranthes aspera Linn dalam usia 12-16 minggu

Materi dan Metode Penelitian

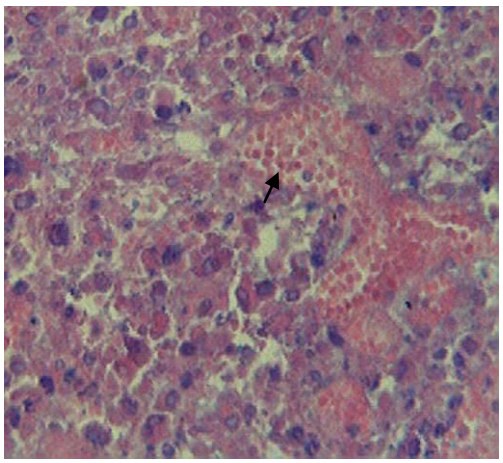
Sebanyak 30 ekor mencit betina berumur 2,5 bulan, dibagi secara acak menjadi 5 kelompok sehingga tiap kelompok terdiri dari 6 ekor. Kelompok tersebut yaitu sebagai berikut :

Kelompok kontrol negatif (K-) yaitu kelompok mencit normal tidak menderita kanker payudara. Kelompok P1 yaitu kelompok mencit menderita kanker payudara diberi alkaloid*Achyranthes aspera* L dosis 30 mg/Kg BB/peroral/hari selama 8 minggu. Kelompok P2 yaitu kelompok mencit menderita kanker payudara diberi alkaloid*Achyranthes aspera* L dosis 60 mg/Kg BB/peroral/hari selama 8 minggu. Kelompok P3 yaitu kelompok mencit menderita kanker payudara diberi alkaloid *Achyranthes aspera* L dosis 100 mg/Kg BB/peroral/hari selama 8 minggu. Kelompok kontrol positif (K+) yaitu kelompok mencit menderita kanker payudara hanya diberi metotreksat.

Setelah dilakukan perlakuan, semua kelompok mencit tersebut dimatikan kemudian diambil jaringan payudara dan

sekitarnya untuk dilakukan pemeriksaan ekspresi protein bax secara imunohistokimia. Pemeriksaan dilanjutkan dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 x kemudian dilakukan penghitungan jumlah sel kanker payudara yang mengekspresikan protein bax. Sel kanker yang positif bax memberikan warna coklat kehitaman diantara sel kanker yang negatif berwarna kebiruan/kehijauan. Tiap satu sediaan diamati pada 5 lapang pandang. Tiap satu lapang pandang diamati dan dihitung sesuai arah jarum jam 3; 6; 9 dan 12. Tiap satu lapang pandang diamati dan dihitung pada dua tempat sesuai arah jarum jam 6 dan 12 dengan menggunakan grateculae (kamar hitung).

Gambar 2 : Kanker Payudara Mencit Hasil Induksi Benzopyrene Selama 2 bulan



Gambar 3 : Hyoervaskularisasi Pembuluh Darah Kanker Payudara

Hasil dan Pembahsan

Pemeriksaan Imunohistokimia dengan menggunakan antibodi monoklonal terhadap protein bax . Hasil positif ditandai dengan adanya bercak coklat pada sitoplasma. Diperiksa pada mikroskop dengan pembesaran 10 x 40 dengan 5 perlakuan. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Ekspresi protein bax kanker payudara mencit setelah diberi alkaloid *Achyranthes aspera* linn

Perlakuan	Mean ± SD	Replikasi
Kelompok Kontrol negatif	213,33^{e} ± 74,476	6
Kelompok P1	266,67^{d} ± 102,307	6
Kelompok P2	311,67^{c} ± 119,401	6
Kelompok P3	488,00 ^{a} ± 83,487	5
Kelompok Kontrol positif	424,00 ^{b} ± 66,933	5

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf kepercayaan $\alpha = 0.05$ ($p<0.05$)

Pada Tabel 1. Terlihat bahwa semakin tinggi dosis *alkaloid Achyranthes aspera* Linn maka ekspresi protein bax semakin tinggi, selain itu ekspresi protein bax pada kelompok kontrol negatif tidak berbeda bermakna dengan P1 dan P2, tetapi berbeda dengan P3

Gen bax merupakan salah satu gen penting yang berperanan pada proses apoptosis dan termasuk family dari BCl-2, apoptosis seperti halnya karsinogenesis berhubungan dengan berbagai gen yang mengatur perkembangan sel,dan bahwa kelainan pada aktivitas proliferasi sel juga berhubungan erat dengan kontrol apoptosis, sehingga ada dugaan bahwa pada kanker terjadi kelainan pada berbagai gen yang

terlibat dalam apoptosis yang berakibat disregulasi proses yang juga berakibat disregulasi apoptosis. Apoptosis yang merupakan programmed cell death, terjadi normal selama proses perkembangan dan penuaan sebagai mekanisme homeostatik untuk memelihara populasi sel dalam jaringan.Apoptosis juga terjadi sebagai mekanisme pertahanan, misalnya reaksi imun atau apabila sel rusak akibat penyakit atau agen perusak. Walaupun ada berbagai jenis rangsangan dan keadaan, baik fisiologik ataupun patologik, tidak semua sel harus mati sebagai respon terhadap rangsangan yang sama.Obat yang digunakan untuk terapi kanker menyebabkan kerusakan DNA dalam sel yang dapat berakibat apoptosis melalui jalur p53.Mekanisme kerja p53 sangat kompleks. Ia dapat berikatan dengan berbagai jenis protein dan terlibat dalam mengatur ekspresi berbagai gen. Dalam beberapa penelitian terakhir mengatakan bahwa p53 dapat mengatur proliferasi sel maupun apoptosis tergantung situasi dan latar belakang sel (Weinberg,2007).

Faktor lain yang berperanan pada apoptosis adalah sitokrom-c, penglepasan sitokrom-c oleh mitokondria, atas rangsangan ini protein bax yang merupakan faktor proapoptotik akan berpindah tempat dari sitoplasma ke mitokondria dan secara langsung dapat menginduksi pelepasan sitokrom c melalui pori yang dibuatnya pada membran mitokondria yang kemudian engaktifkan caspase (caspase 9, caspase 3, caspase 6, yang merupakan enzim katalitik untuk membantu terjadinya apoptosis (Green, 1998).

Kesimpulan

Pemberian alkaloid Achyranthes aspera Linn peroral pada mencit yang menderita kanker payudara akibat diinduksi benzopirine dapat meningkatkan ekspresi protein bax

Daftar Pustaka

Barry A. and Berkowitz. 2009. Development and Regulation of Drugs. In Bertram G. Katzung; Susan B.Masters; Anthony J.Trevor. Basic And Cinical Pharmacology 11th ed.Mc Graw Hill. 67-76.

Chakraborty, A., A. Branther, T. Mukainaka, T. Konoshima, H. Tokuda and H. Nishino. 2002. Cancer hemopreventive Activity of *Achyranthes aspera L* Leaves on Eipsten Barr Virus Activation and Two stage Mouse Skin carcinogenesis. Cancer Let.Mar. 177(1) : 1-5.

Green D.R. 1998. Apoptotic pathways, Road to ruin. J. Cell. 94 : 695-698.

Japaries W, 2011. Farmakologi Herbal Plus Tabel Toksisitas, Interaksi dan Penatalaksanaan Toksisitas Herbal. Balai Penerbit FKUI, Jakarta. 2-10.

Kim M.J., D.H. Kim, K.W. Lee, D.Y. Yoon and Y.J. Surh. 2007. Alkaloid Induces Apoptosis in Ras Transformed Human Breast Epithelial Cells Through generation of Reactive Oxygen Species. New York Academy of Sciences. 483 – 495.

Mardisiswoyo S. dan R.M. Harsono. 1968. Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang. Balai Pustaka. 20-24.

MenKes. 2012. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, diunduh tanggal 14 juni 2012 pada http://www.depkes. go.id.

Tjandra Y.A. 2010. Angka morbiditas kanker. Majalah Tempo interactive 23: 45-47.

Weinberg R.A. 2007. Tumor suppressor genes. In The Biology of Cancer, New York, Garland Sc. 209-254.

Weinberg R.A. 2007. P53 and apoptosis, master guardian and executioner.In

The Biology of Cancer.New York, Garland Sc. 307-356.

Wurlina, D.K. Meles dan S. Zakaria. 2006. Efek Anti Telomerase Alkaloid *Achyranthes aspera L* Terhadap Pembelahan Kromosom Dan Induksi Apoptosis Pada Kultur Sel Mieloma. Veterinaria medika 2 : 87-91.

Wurlina, D.K. Meles, S. Zakaria dan W. Sastrowardoyo. 2006. Peranan Caspase 3 (Caspase Exekutor) Penyebab apoptosis Sel Kanker Uterus yang terinduksi Alkaloid *Achyrantes aspera L* secara inivitro.Veterinaria medika 3 : 81-86.

Wurlina, W. Sastrowardoyo, S. Zakaria, D.K. Meles, M.S. Putra dan N. Suwasanti. 2010. Aktivitas Alkaloid *Achyranthes Aspera L* Penyebab Apoptosis dan Pragmentasi DNA pada sel kanker mammae. Veterinaria medika 3 : 169-176.

Zakaria S., W. Sastrowardoyo, D.K. Meles, Wurlina, D.M.S. Putra dan N. Suwasanti. 2010. Efek antimitogenik Alkaloid *Achyranthes aspera L* terhadap induksi apoptosis pada Sel yang Terinfeksi *Mycobacterium Tuberculosis*. Veterinaria medika 3 : 177-184.