

PENGARUH EKSTRAK ETANOL AKAR WIDURI (*Calotropis gigantea* L.) TERHADAP KADAR IFN- γ DAN EKSPRESI CASPASE 3 PADA FIBROSARCOMA MENCIT (*Mus musculus* L.)

Andri setiawan (10620048)

Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Terknologi UIN Maliki Malang

andre.bbc4088@gmail.com

Widuri (*Calotropis gigantea* L.) adalah salah satu jenis tanaman yang diduga memiliki khasiat sebagai anti kanker. Berdasarkan laporan komponen bioaktif yang dikandung dan sifat antioksidan serta aktivitas biologis dari ekstrak Widuri (*Calotropis gigantea* L.) tersebut, tumbuhan Widuri (*Calotropis gigantea* L.) diharapkan berpotensi terhadap peningkatan kadar IFN- γ dan ekspresi Caspase 3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada dosis 150 mg/Kg BB kadar IFN- γ paling tinggi ($178,6 \pm 79,2$), dibandingkan dengan P4 ($146,3 \pm 86,6$), maupun K- ($48,7 \pm 25,7$). Hasil ekspresi Caspase 3 menunjukkan bahwa pada dosis 150 mg/Kg BB juga paling efektif dalam meningkatkan ekspresi Caspase 3 yaitu (79.05 ± 12.05) penurunan berat badan pada saat induksi DMBA, setelah induksi DMBA berakhir dan dilanjutkan terapi dengan ekstrak etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) terjadi peningkatan rata-rata berat badan pada semua perlakuan.

Kata kunci: Akar Widuri, Fibrosarcoma, IFN- γ , dan Caspase 3.

Kanker merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal dan tak terkontrol. Sel-sel tersebut terbentuk karena terjadinya mutasi gen sehingga mengalami perubahan baik bentuk, ukuran, maupun fungsi dari sel tubuh yang asli. (Sumarno, 2008. Di Indonesia, kanker berada di urutan ke-6 sebagai penyebab kematian dan setiap tahunnya terdapat 100 penderita kanker baru dari setiap 100.000 penduduk. Pengobatan kanker yang biasa dilakukan seperti pembedahan (operasi), kemoterapi (termasuk imunoterapi dan pemberian hormon) dan radioterapi belum memberikan hasil yang memuaskan dan memiliki beberapa kelemahan sehingga dicari suatu alternatif untuk antikanker.

Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea* L.) merupakan salah satu tanaman yang kaya akan kandungan senyawa kimia dan sering digunakan sebagai obat, tanaman ini merupakan tanaman yang mudah didapatkan karena tanaman ini tumbuh liar di daerah dataran rendah dan merupakan tanaman semak yang banyak tumbuh di daerah beriklim tropis dan secara empiris banyak dimanfaatkan masyarakat sebagai obat tradisional untuk obat sakit gigi, penawar racun, obat masuk angin dan batuk asma (Kartasaputra, 1988).

Tanaman Widuri telah ditemukan lebih dari 23 jenis senyawa bioaktif dari berbagai bagian tanaman, salah satu senyawa bioaktif tersebut adalah cardenolide. Cardenolide banyak ditemukan pada bagian daun Widuri (*Calotropis*

gigantea L.) (Kumar, 2011). Cardenolide merupakan kumpulan senyawa aktif yang berpotensi sebagai senyawa sitotoksik yaitu beracun terhadap sel. Sifatnya yang sitotoksik ini bermanfaat bagi kesehatan dan sangat berguna dalam menyerang sel kanker.

Berdasarkan laporan komponen bioaktif yang dikandung dan sifat antioksidan serta aktivitas biologis dari ekstrak Widuri (*Calotropis gigantea* L.) tersebut, tumbuhan Widuri (*Calotropis gigantea* L.) diharapkan berpengaruh sebagai imunomodulator atau dapat meningkatkan sistem imun tubuh. Dalam hubungannya dengan sistem imun, lebih lanjut Vinardell dan Mitjaans (2008), menyatakan bahwa senyawa polifenol bersifat sebagai imunomodulator yaitu secara efektif dapat menstimulasi IFN- γ . IFN- γ adalah sitokin utama yang mengaktifasi CD8⁺ pada tumor (Dewanti, 2012). IFN- γ juga sangat penting untuk menstimulasi komponen *immunosurveillance* yaitu sel NK, sel T sitotoksik (CD8+) dan makrofag yang berperan di dalam proses killing dan apoptosis pada sel-sel kanker (Abbas *et al.*, 2005). Selain itu juga dapat meningkatkan aktivasi Caspase, 3 yang merupakan kelompok protease sitokin intraseluler yang menjadi komponen utama pada respon terhadap apoptosis. Dalam hal ini, caspase 3 adalah salah satu jenis caspase efektor yang berperan dalam aktivasi proteolitik selama apoptosis.

Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) terhadap kadar IFN- γ , ekspresi caspase 3 dan rata-rata berat badan pada fibrosarcoma mencit (*Mus musculus* L.) akibat induksi 7,12-Dimetilbenz(α) Antrasena (DMBA). Hal ini juga menjadi dasar ilmiah untuk pengembangan ekstrak etanol akar Widuri

(*Calotropis gigantea* L.) sebagai tumbuhan obat fungsional untuk meningkatkan sistem imun tubuh dalam terapi adjuvan pada kanker, terutama fibrosarcoma.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Hewan coba mencit (*Mus musculus* L.) jenis kelamin jantan, galur balb/c, umur 50-60 hari dengan berat badan antara 20-30 g. Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70% akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.), sampel uji dari daerah Pasuruhan. Senyawa 7,12-dimetilbenz (α) Antrasena (DMBA) untuk karsinogenesis fibrosarcoma mencit. Reagen untuk analisis kadar IFN- γ dari serum mencit menggunakan *Interferon-gamma* (IFN- γ) *Mouse pre-coated*, ELISA Kit Komabiotech No katalog K0331138.

Pembuatan Ekstrak Etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.)

Ekstrak etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) hasil ekstraksi secara meserasi (60 g serbuk akar widuri dengan 300 ml etanol 70%). Kemudian dipekatkan dengan *Rotary vacuum evaporator* sampai kental.

Pembuatan Sediaan Larutan CMC Na 0,5%

Sediaan larutan CMC Na 0,5% dibuat dengan menimbang 0,5 g CMC Na dan dimasukkan kedalam 10 ml aquades panas kemudian dibiarkan selama kurang lebih 15 menit sampai berwarna bening dan berbentuk menyerupai jel. Selanjutnya diaduk hingga menjadi massa yang homogen dan diencerkan dalam beaker

glass dengan aquades hingga volume 100 ml.

Pembuatan Larutan 7,12-dimetilbenz(α) Antresena

Penyediaan 7,12-dimetilbenz(α) Antrasena (DMBA) diberikan pada dosis 0,025 mg/ gram BB. Larutan DMBA dibuat dengan melarutkan 25 μ g DMBA dengan 0,1 ml aseton. Senyawa DMBA disimpan pada suhu 40° C dan dibungkus dengan aluminium foil.

Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

Penimbangan berat badan hewan coba dilakukan 1 minggu sekali selama masa percobaan, dan dilakukan palpasi untuk mengamati perkembangan kanker. Adanya kematian hewan coba serta keadaan klinis sehari-hari yang sesuai dengan penelitian dicatat.

Pengukuran kadar IFN- γ dengan Metode ELISA

Wash buffer yang tersedia adalah yang 20X, dibutuhkan wash buffer 1X sehingga dilakukan pengenceran dengan cara, 50 ml dari wash buffer 20X ditambahkan ke dalam air deionisasi 1000 ml. Apabila terbentuk kristal pada wash buffer 20X, maka ditempatkan pada suhu ruang kemudian divortex sampai larut. Rekonstitusi standar IFN- γ dilakukan dengan menambahkan *Assay Buffer A* sesuai dengan label yang tertera pada vial untuk membuat 20 ng/ml standar *stock solution*. Larutan dibiarkan pada suhu ruang selama 15 menit kemudian divortex agar tercampur sempurna.

Assay buffer A dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 1-6, pada tabung 1 sebanyak 487,5 μ l dan pada tabung 2-6 masing-masing 250 μ l. Dipipet 12,5 μ l dari stock solution dan dimasukkan ke dalam tabung 1, kemudian dari tabung 1 dipipet 250 μ l dan dimasukkan ke dalam tabung 2, dari tabung 2 dipipet 250 μ l dan dimasukkan ke dalam tabung 3, demikian seterusnya sampai tabung 6, sehingga didapat konsentrasi mulai dari 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 pg/ml. Plate dicuci sebanyak 4 X dengan *wash buffer* 1X masing-masing 300 μ l. Plate kolom 1 dan 2, diisi dengan Matrix A masing-masing 50 μ l kemudian ditambahkan 50 μ l standard dilution ke dalam plate kecuali pada baris terakhir, ditambahkan assay buffer sebanyak 50 μ l. Plate kolom 3-8, diisi dengan assay buffer A masing-masing 50 μ l kemudian ditambahkan 50 μ l plasma sampel ke dalam plate kecuali pada baris terakhir. Plate ditutup rapat dengan plate sealer dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam sambil dishaker pada 200 rpm. Larutan IFN- γ detection antibody ditambahkan 100 μ l pada setiap lubang kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam sambil dishaker. Isi plate dibuang kemudian plate dicuci 4 kali dengan wash buffer 1X. Larutan Avidin-HRP D ditambahkan 100 μ l pada setiap lubang kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit sambil dishaker. Isi plate dibuang kemudian plate dicuci 5 kali dengan wash buffer 1X. Pada pencucian terakhir tunggu sekitar 1

menit 30 detik. 11. Substrat solution F ditambahkan 100 μ l pada setiap lubang dalam kondisi gelap kemudian diinkubasi selama 15 menit, terjadi perubahan warna menjadi biru. Stop solution ditambahkan 100 μ l pada setiap lubang. Terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 450 nm maksimal dalam waktu 30 menit setelah penambahan stop solution (Komabiotech, 2014).

Analisis Ekspresi Caspase 3 dengan Imunohistokimia

Imunohistokimia merupakan suatu teknik untuk menentukan keberadaan suatu antigen atau protein target dalam jaringan atau sel dengan menggunakan reaksi antigen-antibodi. Prinsip metode ini adalah perpaduan antara reaksi molekular dengan imunohistokimia. Reaksi molekular ditandai adanya ligasi antara fragmen DNA dengan deoxigenin melalui bantuan enzim TdT (Terminal deoxinucleotide Transferase), reaksi positif pada pemeriksaan imunohistokimia ditandai adanya reaksi antigen antibodi dan reaksi kimiawi antara enzim dengan substrat.

Pewarnaan diawali dengan jaringan diinkubasi pada gelas objek dengan PBS. Selanjutnya ditetesi dengan larutan 3% H₂O₂ (Hidrogen Peroksida) selama 20 menit. Setelah itu, ditetesi dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Inkubasi dilanjutkan di dalam larutan blocking (blocking solution) selama 30 menit pada suhu ruang. Larutan blocking dibuat dengan cara melarutkan susu skim (skim milk) ke dalam PBS, dengan

perbandingan 0,1 g susu skim dalam 100 ml PBS. Larutan blocking sebanyak 100-400 μ L ditetaskan tepat di atas jaringan dengan mikropipet, selanjutnya ditetesi dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit.

Tahapan selanjutnya adalah inkubasi jaringan dalam larutan antibodi primer pada suhu 4°C (suhu kulkas) selama semalam. Antibodi primer (1:2500) sebanyak 100-400 μ L ditetaskan tepat di atas jaringan dengan mikropipet. Inkubasi ini bertujuan mengaktifkan reaksi antara antigen yang terdapat pada jaringan dengan antibodi primer (reaksi Ag-Ab). Pada penelitian ini, antibodi primer yang digunakan adalah antibodi Caspase 3. Setelah semalam, ditetesi dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya, jaringan diinkubasi dalam larutan antibodi sekunder berlabel biotin (anti rabi 196 biotin berlabel) selama 60 menit pada suhu ruang. Antibodi sekunder dengan pengenceran 1:2500 sebanyak 100-400 μ L ditetaskan tepat di atas jaringan dengan mikropipet. Inkubasi ini bertujuan mengaktifkan reaksi antara antibodi primer yang sudah terikat pada jaringan dengan antibodi sekunder (reaksi Ag-Ab), selanjutnya ditetesi dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. antibodi sekunder yang digunakan adalah antibodi anti rabi yang dilabel dengan enzim SA-HRP (Sterp advin - horseradish peroxidase) Selama 60 menit. Selanjutnya antibodi sekunder dilarutkan dan dilanjutkan dengan menginkubasi jaringan dalam larutan PBS sebanyak tiga kali, masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya, jaringan diinkubasi dengan

larutan DAB (diaminobenzidine) dengan pengenceran 1:1000 selama pada suhu ruang, DAB ini sebagai substrat bagi enzim SA-HRP. Reaksi antara DAB dan enzim SA-HRP menghasilkan warna coklat. Proses dehidrasi dilakukan dengan menginkubasi jaringan dalam larutan etanol dengan konsentrasi bertingkat, mulai dari konsentrasi rendah ke tinggi. Konsentrasi etanol yang digunakan adalah 70, 80, 96 dan 100%. Inkubasi dilakukan masing-masing selama tiga menit. Setelah inkubasi dalam etanol 100%, selanjutnya adalah mounting dengan cara jaringan diinkubasi dalam larutan xylool selama 3 menit. Selanjutnya, jaringan siap ditutup dengan obyek glass. Sediaan histologis siap diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

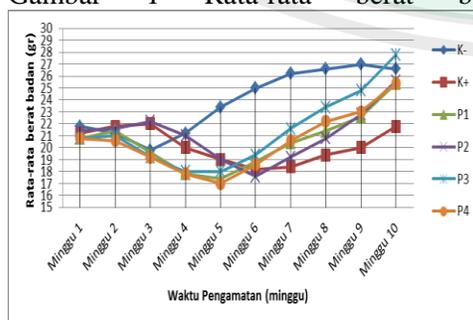
Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA untuk mengetahui pengaruh perlakuan dosis ekstrak etanol akar Widuri terhadap kadar IFN- γ dan ekspresi Caspase 3.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh ekstrak etanol akar Widuri terhadap rata-rata berat badan

Gambar 1 Rata-rata berat badan



Gambar 1 menunjukkan bahwa pada minggu ke-1 sampai minggu ke-2 pada semua perlakuan termasuk K- mengalami penurunan berat badan. Penurunan berat badan pada minggu ini disebabkan kurangnya masa adaptasi pada hewan coba dan menyebabkan stress. Selanjutnya pada minggu ke-3, K- berat badannya mulai stabil sedangkan pada kelompok perlakuan DMBA semuanya mengalami penurunan berat badan

Menurut Hanahan dan Weinberg (2000), kanker memiliki beberapa karakteristik diantaranya adalah sel kanker mampu mencukupi kebutuhan sinyal pertumbuhannya sendiri. Sinyal pertumbuhan diperlukan agar sel dapat terus membelah. Berbeda dengan sel normal, sel kanker dapat terus menerus tumbuh, sehingga memerlukan nutrisi yang banyak untuk memacu pertumbuhannya. Asupan nutrisi tersebut diperoleh dari inangnya. Hal ini dapat ditunjukkan bahwa dalam tubuh penderita kanker terjadi gangguan metabolisme, baik makronutrien maupun mikronutrien. Gangguan tersebut mungkin meliputi gangguan pada metabolisme karbohidrat, oksidasi lipid, peningkatan katabolisme protein otot, atau penurunan sintesis protein otot. Menurut Rusmarilin (2008), menyatakan bahwa kanker dapat menyebabkan kondisi tubuh yang lemah dan dapat menyebabkan kematian pada penderita.

Pengaruh Ekstrak etanol akar Widuri Terhadap kadar IFN- γ

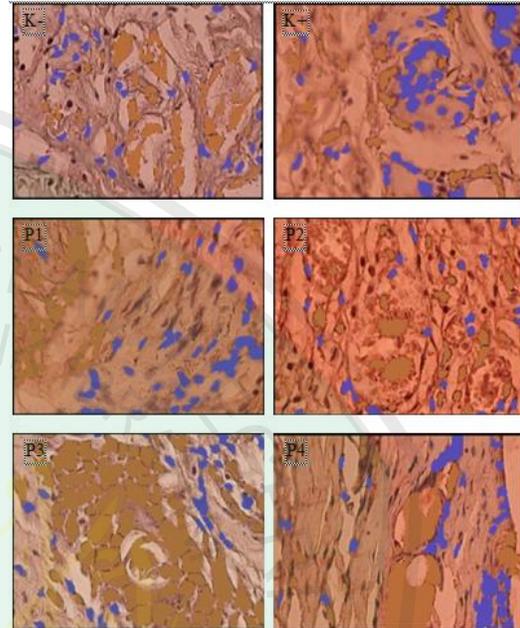
Perlakuan induksi 7,12-Dimetilbenz(α) antrasena (DMBA) pada mencit menyebabkan terjadinya proses karsinogenesis. DMBA merupakan karsinogen yang paling kuat untuk menimbulkan terjadinya kanker fibrosarcoma pada mencit.

Tabel 1

Kelompok Perlakuan	N	Rata-rata \pm SD (pg/ml)
K+ (Kontrol Positif)	5	48,7 \pm 25,7 ^a
P1 (dosis 50 mg/Kg BB)	5	83,7 \pm 41,5 ^b
K- (Kontrol Negatif)	5	105 \pm 44,3 ^c
P2 (dosis 100 mg/Kg BB)	5	114 \pm 53,1 ^c
P4 (Metotreksat)	5	146,3 \pm 86,6 ^d
P3 (dosis 150 mg/Kg BB)	5	178,6 \pm 79,2 ^e

Hasil ini menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) dosis 100, 150 mg/Kg BB yang diinduksi 7,12-dimetilbenz(α) Antrasena (DMBA) ternyata berpengaruh terhadap rata-rata kadar IFN- γ secara bermakna ($p < 0,05$). Perlakuan ekstrak etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) menunjukkan peningkatan IFN- γ paling tinggi diantara Perlakuan termasuk perlakuan Obat antianker Metotreksat (Tabel 1).

Pengaruh Ekstrak Etanol Akar Widuri Terhadap Ekspresi Caspase 3



Gambar 2 Persentase Luas Ekspresi Caspase 3 dengan Imunoratio. K-; 61,1%, K+; 21,6%, P1:40,7%, P2: 52,4%, P3: 61

Setiap kelompok perlakuan dilakukan pengamatan ekspresi Caspase 3 dengan pemeriksaan hispatologi menggunakan pewarnaan imunohistokimia. Antibodi yang digunakan dalam penelitian ini adalah antibodi primer Caspase 3. Antibodi Caspase 3 ini digunakan sebagai penanda apoptosis. Hal ini dapat didukung oleh pernyataan Hadjiloucas *et al.*, (2001), bahwa keberadaan kaspase-3 menunjukkan awal terjadinya apoptosis. Hadjiloucas *et al.*, (2001) juga menyatakan bahwa apoptosis akan lebih banyak terjadi pada jaringan tumor yang invasif. Pada dasarnya, sel tersebut menunjukkan perubahan morfologis yang disebabkan oleh apoptosis. Jumlah sel yang sedikit menyebabkannya

tidak dapat terwarnai secara kontras oleh DAB.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea* L) berpengaruh terhadap kenaikan IFN- γ dan ekspresi Caspase 3, dosis yang paling optimal adalah 150 mg/BB yang masing masing adalah (178,8 \pm 79,2) dan (79,05 \pm 12,05) hal ini juga didukung dengan adanya penambahan rata-rata berat badan mencit setelah terapi ekstrak etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea* L)

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K, Lichtman, A.H., and Pober, J.S. 2005. Cellular and mollecular immunology.Philadelphia, WB Saunders co.
- Dewanti, W, Tri, Sukardiman. 2012. Efek Imunodulator Air Cincau Hitam (*Mesona Palustris* BL) Terhadap Karsinogenesis Mencit. J. Teknol. dan Industri Pangan, Vol. XXIII No. 1. 29-35.
- Hanahan, D, & Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. Cell (2000) 100:57-70.
- H Hadjiloucas I, Gilmore AP, Bundred NJ, Streull CH. Assessment of apoptosis in human breast tissue using an antibody against the active form of caspase 3: relation to tumour histopathological characteristics. Br J Cancer. 2001;85:1522–1526.
- Kartasaputra, A.G. 1988. Budidaya Tanaman Berkhasiat Obat. Jakarta: Bina Aksara.
- Komabiotech, 2014, Mouse IFN-gamma ELISA Kit. Seoul: Komabiotech Inc.
- Kumar, V., Abbas, A. K. and Fausto, N. 2005. Robbins and Cotran Pathology Basic Disease 7th ed. Elsevier, 3251 USA: Riverport Ln Maryland Height, Missouri.
- Rusmarilin, H. 2008. Aktivitas antikanker ekstrak rimpang lengkuas lokal (*Alpinia galanga* L) pada alur sel kanker manusia serta mencit yang ditransplantasi dengan sel tumor primer. Disertasi. Semarang: UNDIP.
- Sumarno. 2008. Pengaruh Ekstrak Sarang Semut (*Myrmecodia pendens* Merr & Perry) terhadap Aktifitas Proliferasi Sel dan Indeks Apoptosis Kanker Payudara Mencit C3H. Semarang: Departemen Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung.
- Vinardell. M.P, Mitjaans. 2008. Immunomodulatory effects of polyphenols. EJEAF Che 7: 3356-3362.