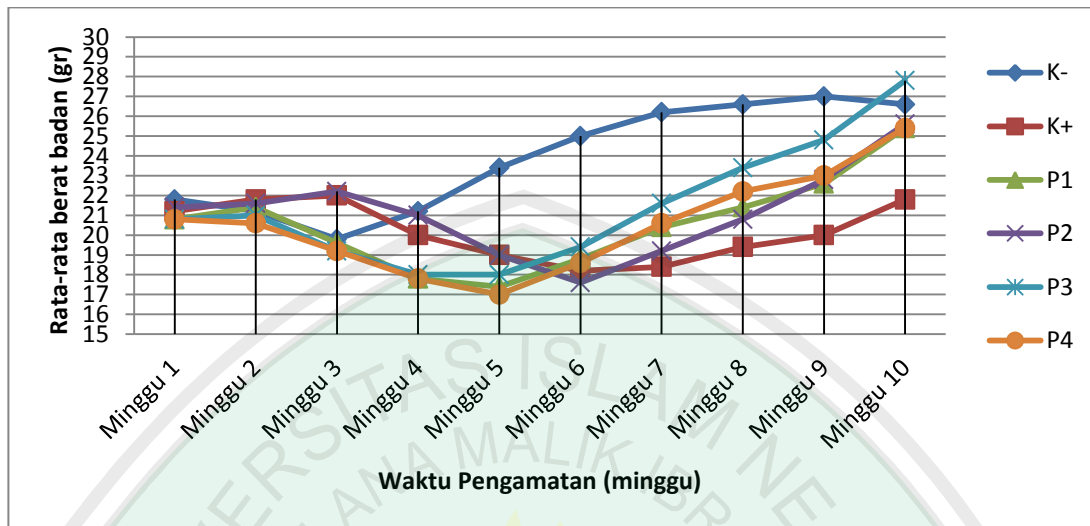


BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Ekstrak Etanol Akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) Terhadap Rata-rata Berat Badan Pada Fibrosarcoma Mencit (*Mus musculus* L.)

Berat badan adalah salah satu respon yang menggambarkan perkembangan mencit. Pengamatan perubahan rata-rata berat badan mencit dilakukan selama 10 minggu dan setiap minggunya dilakukan penimbangan untuk mengetahui perubahan rata-rata berat badan, dan fase awal terjadinya proses karsinogenesis. Gambar 4.1.1 menunjukkan adanya perbedaan berarti penurunan berat badan antara kelompok perlakuan DMBA (K+, P1, P2, P3 dan P4) dibanding kelompok normal (K-). Penurunan rata-rata berat badan ini disebabkan oleh bahan aktif yang terkandung di dalam DMBA. Penginduksian kanker dengan menggunakan DMBA ini dapat menurunkan berat badan pada mencit, jika dibandingkan dengan mencit yang tidak diinduksi DMBA (K-). Setelah penginduksian DMBA berakhir dan dilakukan terapi ekstrak etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) maka rata-rata berat badan mencit semakin naik.



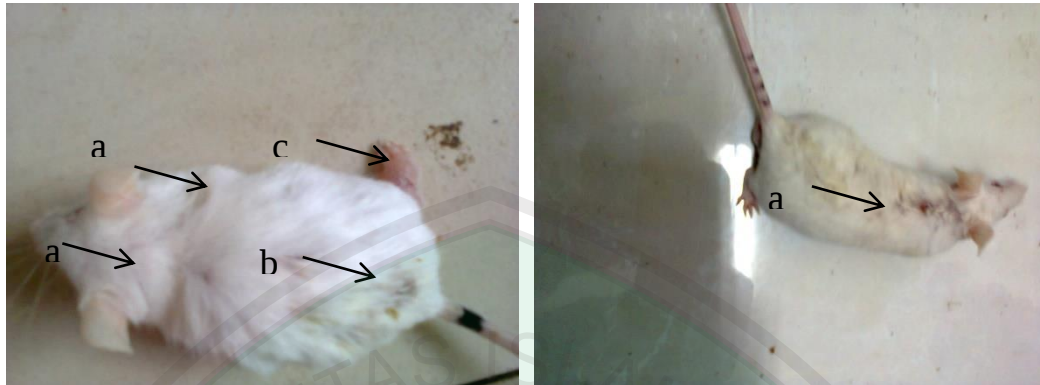
Gambar 4.1.1 Rata-rata Berat Badan Selama Pengamatan. Minggu 1: aklimatisasi, Minggu 2-7: induksi DMBA, Minggu 8: masa adaptasi, Minggu 9-10: terapi ekstrak akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.)

Gambar 4.1.1 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.

Penelitian ini menggunakan 7,12-Dimetilbenz(α) antrasen (DMBA) dengan dosis 0,025 mg/ gram BB mencit sebagai penginduksi karsinogenesis fibrosarcoma dan aseton sebagai pelarutnya, karena aseton merupakan pelarut yang efektif untuk DMBA (Susilowati, 2010). Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan, DMBA merupakan karsinogen poten yang banyak digunakan pada hewan pengerat seperti mencit. Prokarsinogen DMBA dapat menimbulkan kanker pada organ seperti paru, hati, jantung, kolon, lambung, ovarium, uterus, dan ginjal (Aryudhani, 2011). Perlakuan penginduksian DMBA setelah 2 minggu induksi menyebabkan terjadinya karsinogenesis pada mencit terlihat dari adanya nodul pada semua sampel penelitian (100%). Selain itu terdapat 15% mencit mengalami kerontokan pada bulunya dan 3% mati serta 1% mengalami pembekakan di kakinya. Kelainan morfologi mencit akibat DMBA disajikan pada gambar 4.1.2.



Gambar 4.1.2. Morfologi mencit (*Mus musculus* L.) pada Minggu ke-3 setelah Induksi DMBA . a: nodul, b: bulu rontok, c: kaki bengkak.

Pengamatan secara morfologi, mencit yang mengalami kanker terlihat dari adanya nodul di sekitar tubuh. Ukuran nodul dan jumlah nodul sangat bervariasi karena sangat tergantung dari lamanya kanker tersebut tumbuh pada jaringan mencit serta daya imunitas mencit tersebut. Menurut Kubatka *et al.*, (2002) ada beberapa faktor yang telah diketahui mempengaruhi keberhasilan terjadinya kanker melalui induksi DMBA yaitu umur, musim, jenis kelamin, dan dosis karsinogen. Pada penelitian ini terlihat bahwa faktor dosis DMBA memainkan peran yang signifikan dalam menginduksi terjadinya kanker pada mencit uji. Senyawa ini di dalam tubuh hewan pengerat akan bereaksi dengan sitokrom P-450 untuk membentuk ikatan kovalen dengan DNA sel yang aktif sehingga menyebabkan DNA adducts Menurut Meiyanto *et al.*, (2007) DMBA secara umum dapat mengakibatkan mutasi gen ras. Beberapa fakta (gambar 4.1.2) di atas tersebut mengindikasikan bahwa DMBA merupakan senyawa yang dapat menyebabkan kematian. Gejala klinis yang dapat ditimbulkan oleh senyawa ini antara lain gangguan proses pencernaan, pernapasan, serta dapat menimbulkan iritasi pada kulit, mata, dan saluran gastrointestinal.

Pembuktian bahwa nodul yang terbentuk adalah kanker juga dapat dilakukan melalui pengamatan morfologis. Nodul kanker terbentuk melalui perkembangan sel yang berlebih sehingga membentuk agregat yang padat. Apabila nodul ini terus dibiarkan maka ukurannya akan bertambah besar hingga pada akhirnya pecah. Sedangkan apabila terjadi inflamasi atau infeksi maka organ akan terlihat kemerah-merahan, terjadi vasodilatasi sehingga terjadi pengumpulan darah.

Faktor-faktor lingkungan baik internal maupun eksternal dapat menginduksi perubahan fisiologis atau tingkah laku dari hewan percobaan. Faktor-faktor tersebut dinamakan stressor. Berbagai macam stressor tersebut dapat mengakibatkan terjadinya kondisi stres. Stres yang dialami mencit juga dapat disebabkan oleh luka paska induksi DMBA di daerah subkutan. Menurut National Academic of Sciences, (1996), adanya luka yang dialami mencit adalah rasa sakit sebagai efek adanya stressor induksi. Efek ini diatasi dengan menggunakan etanol 70% pada bagian tubuh yang diinduksi DMBA. Hal ini sebagai tindakan pengurangan rasa sakit yang dialami mencit, sehingga diharapkan stres yang muncul selama masa pertumbuhan kanker dapat diringankan.

National Academic of Sciences (1996), menambahkan bahwa tanda-tanda secara klinis dan perubahan tingkah laku menjadi abnormal yang diakibatkan oleh adanya luka dan stres dapat mempengaruhi konsumsi pakan dan air minum, akumulasi eksudat berwarna coklat kemerahan di sekeliling mata dan lubang hidung, hilangnya berat badan, penurunan aktivitas, postur yang membungkuk, piloereksi,

poor grooming habits, pernafasan yang sulit, vokalisasi, meningkat atau menurunnya keagresifan, dan *self-mutilation*.

Hal ini membuktikan bahwa kondisi mencit kanker menyebabkan berat badan mencit cenderung menurun. Sindrom seperti ini sering terjadi pada penderita kanker, yang dinamakan kakeksia. Kakeksia dicirikan dari profil berat badan yang menurun dan lebih dari 80% pasien yang menderita kanker mengalami kakeksia sebelum kematiannya. Menurut Setiawati (2003), kakeksia pada mencit diduga akibat metabolit abnormal yang dihasilkan selama perkembangan tumor baik oleh sistem imun maupun oleh kanker itu sendiri. Interaksi kanker dengan inangnya juga dapat mempengaruhi metabolisme di dalam tubuh. Sel-sel kanker juga membutuhkan asupan nutrisi untuk terus bertahan hidup. 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. Dengan demikian, hal ini sesuai dengan pernyataan Setiawati (2003), bahwa meski kecukupan gizi mencit telah terpenuhi dengan baik ternyata banyak faktor lain yang dapat menyebabkan mencit mengalami kekurangan gizi dan terjadi kakeksia. Menurut (Aryudhani, 2011) kakeksia merupakan konsekuensi berupa kondisi tubuh yang lemah akibat kanker pada penderita dan dapat menyebabkan kematian.

Komponen atau senyawa kimia seperti antioksidan, termasuk senyawa fitokimia pada tanaman, menunjukkan kemampuan selektif dalam hal membunuh sel

kanker dengan cara apoptosis sambil tetap mencegah terjadinya apoptosis pada sel normal secara *in vitro* dan *in vivo*, serta menghambat angiogenesis kanker dan metastasis (Aryudhani, 2011). Alkaloid yang terdapat pada tomat, baik hijau maupun merah, menunjukkan kemampuan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker. Ekstrak tomat hijau aktif melawan semua galur sel kanker dan lebih mampu menghambat sel kanker dibandingkan tomat merah. Komponen alkaloid yang diduga bertanggung jawab dalam efek anti karsinogenik adalah glikoalkaloid, yang memiliki mekanisme antikanker berbeda dengan likopen pada tomat (Aryudhani, 2011). Reaksi biokimia kompleks juga berperan mempengaruhi metabolisme seperti enzim pencernaan, senyawa pembawa untuk absorpsi, sistem transportasi, dan gangguan metabolisme pada penderita kanker (Aryudhani, 2011).

4.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) Terhadap Kadar IFN- γ Pada Fibrosarcoma Mencit (*Mus musculus* L.)

Sel kanker dikenal sebagai *non self* yang bersifat antigenik pada sistem imunitas tubuh manusia sehingga ia akan menimbulkan respons imun secara seluler maupun humoral. Imunitas humoral lebih sedikit berperan daripada imunitas seluler dalam proses penghancuran sel kanker, tetapi tubuh tetap membentuk antibodi terhadap antigen tumor.

Interferon dapat meningkatkan sekaligus menghambat fungsi sel. Fungsi penghambat utamanya adalah memperlambat pertumbuhan sel normal dan sel neoplastic. IFN- γ meningkatkan kemampuan makrofag untuk membunuh bakteri dan protozoa dengan cara aktivasi makrofag.

Perlakuan induksi 7,12-dimetilbenz(α)Antrasena (DMBA) pada mencit menyebabkan terjadinya proses karsinogenesis. Senyawa 7,12-dimetilbenz(α)Antrasena (DMBA) merupakan karsinogen yang sangat kuat untuk menimbulkan terjadinya kanker fibrosarcoma, mencit yang diinduksi 7,12-dimetilbenz(α)Antrasena (DMBA) semuanya mengalami kanker, beberapa cirinya yang terdapat pada penelitian ini diantaranya terdapat nodul, bulu rontok, berat badan berkurang. Setelah diberi perlakuan dengan dosis yang berbeda perlakuan ekstrak etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) terjadi proses penghambatan karsinogenesis, hal ini terjadi karena peranan IFN- γ (Abbas *et al.*, 2005).

Tabel 4.1. Rata-rata Kadar IFN- γ pada Fibrosarcoma Mencit (*Mus musculus* L.)

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

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan, P= nilai signifikansi.

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA, dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey* berbeda nyata antar perlakuan secara signifikan ($P > 0,05$). 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 4.1). Salah satu senyawa yang terkandung di dalam Widuri (*Calotropis gigantea* L.) adalah polifenol (Habib dan Karim, 2011). Menurut Vinardell dan Mitjaans (2008) menyatakan bahwa polifenol mempunyai efek sebagai antioksidan, anti radang, dan anti kanker. Mekanisme antikanker pada polifenol yang telah diteliti sebelumnya antara lain menghambat sekresi IL-10 dan memicu sekresi IL-12 (Tosetti *et al.*, 2002). IL-12 akan memicu sekresi IFN- γ (Abbas *et al.*, 2005). Selain senyawa polifenol senyawa yang bersifat antioksidan pada Widuri (*Calotropis gigantea* L.) adalah senyawa triterpenoid (*Di-(2-ethylhexyl) Phthalate* dan *Anhydrosophoradiol-3-acetate*) (Kumar, 2011).

IFN adalah kelompok sitokin yang memiliki aktivitas antivirus, imodulasi, dan antiproliferatif. Protein ini disintesis oleh sel sebagai respon terhadap berbagai pemicu seperti partikel virus, antigen, asam nukleat asing, dan sebagainya. IFN paling penting digunakan sebagai terapi untuk pengobatan berbagai jenis tumor, kanker, dan penyakit kelainan darah yang mematikan. IFN menghambat replikasi virus tidak hanya pada sel yang memproduksi IFN, tetapi juga sel sekelilingnya.

Gambaran kadar IFN- γ pada semua perlakuan membuktikan bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu yang ada di alam semesta ini dalam keadaan seimbang, sebagaimana firman Allah SWT dalam Qs. al Mulk (67): 3.

الَّذِي خَلَقَ سَبْعَ سَمَوَاتٍ طِبَاقًا مَّا تَرَىٰ فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِن تَفَوتٍ فَأَرْجِعِ الْبَصَرَ
هَلْ تَرَىٰ مِن فُطُورٍ ﴿٦٧﴾

Artinya; Yang telah menciptakan tujuh langit berlapis-lapis. kamu sekali-kali tidak melihat pada ciptaan Tuhan yang Maha Pemurah sesuatu yang tidak seimbang. Maka lihatlah berulang-ulang, Adakah kamu Lihat sesuatu yang tidak seimbang?(Qs. Al Mulk: 67).

Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah SWT memberikan kesempatan kepada manusia untuk dapat menjawab pertanyaan itu sesuai dengan hasil pengamatan manusia itu sendiri, Allah tidak memaksakan jawabannya harus “Tidak ada cacat”, karena Allah SWT Tahu bahwa tidak ada kecacatan pada langit ciptaannya (Jalaluddin. Al-Mahally, 1990). Jika dihubungkan dalam penelitian ini Allah SWT menciptakan segala sesuatu dalam keadaan seimbang, keseimbangan disini apabila terjadi keseimbangan dihasilkan oleh metabolisme tubuh.

Semua kelompok perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda terhadap kadar IFN- γ pada karsinogenesis mencit (*Mus musculus* L.), dan yang memberikan pengaruh paling tinggi ditunjukkan pada perlakuan dosis 150 mg/kg BB, hal tersebut membuktikan akan konsep pemakaian obat, karena setiap obat memiliki aturan dosis yang berbeda-beda sehingga tidak sampai membahayakan maupun menimbulkan penyakit baru. Seperti firman Allah SWT dalam al-Qamar (54): 49.

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

Artinya: “Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran” (Qs.Qamar: 49).

Ayat di atas menunjukkan bahwa segala sesuatu yang ada di muka bumi ini diciptakan oleh Allah SWT menurut ukuran atau takaran masing-masing, hal tersebut telah diatur sedemikian rupa demi kebaikan manusia. Perlakuan dosis 150 mg/kg ekstrak akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) pada karsinogenesis fibrosarcoma ini, jika dikorelasikan dengan surat al Qamar ayat 49 menerangkan begitu pentingnya dosis pemakaian obat, karena di dalam ekstrak etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) meskipun dosisnya kecil tetapi kandungan di dalamnya begitu besar. Menurut Dalimarta (2003), menyatakan bahwa akar widuri banyak mengandung senyawa kimia yang dapat menghambat atau menghentikan pertumbuhan mikroorganisme, senyawa itu adalah: saponin, flavonoida, polifenol dan tanin.

Tanaman widuri termasuk salah satu tanaman yang berkhasiat sebagai obat, karena terdapat banyak kandungan kimia. Kartasapoetra (2004), menyatakan bahwa daun widuri banyak diperlukan karena mengandung zat glukosida, kalotropin, sedikit damar, alban dan fluavil yang sangat baik bagi pengobatan penyakit kadas. Dalimartha (2003), menyatakan bahwa akar widuri mengandung saponin, sapogenin, kalotropin, kalotoksin, uskarin, kalaktin, gigantini, dan harsa. Daun widuri mengandung saponin, flavonoida, polifenol, tanin, dan kalsium oksalat. Batang widuri mengandung tanin, saponin, dan kalsium oksalat. Getahnya mengandung racun jantung yang menyerupai digitalis.

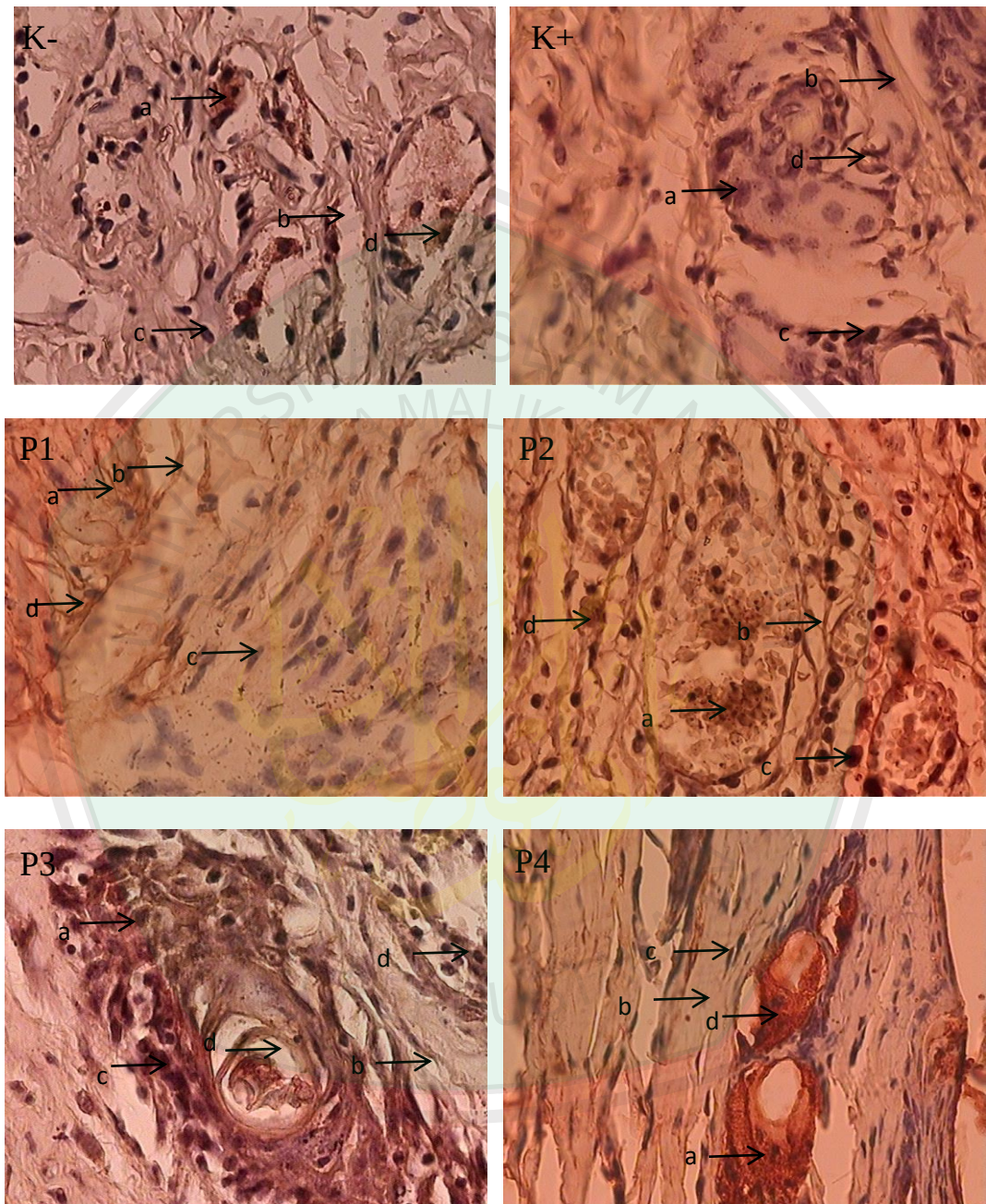
Tanin berfungsi sebagai anti mikroba, tanin diduga berperan sebagai antijamur karena dapat membentuk kompleks protein dengan protein dan interaksi hidrofobik, jika terjadi ikatan antara tanin dan protein maka akan menyebabkan jamur

terdenaturasi dan merusak sel (Yusuf, 2005). Robinson (1995) menyatakan bahwa saponin mempunyai sifat yang menyerupai sabun, saponin adalah senyawa aktif permukaan yang menimbulkan busa jika dikocok dalam air dan pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah, saponin bekerja sebagai antimikroba.

4.2 Pengaruh Ekstrak Etanol Akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) Terhadap Ekspresi Caspase-3 Pada Fibrosarcoma Mencit (*Mus musculus* L.)

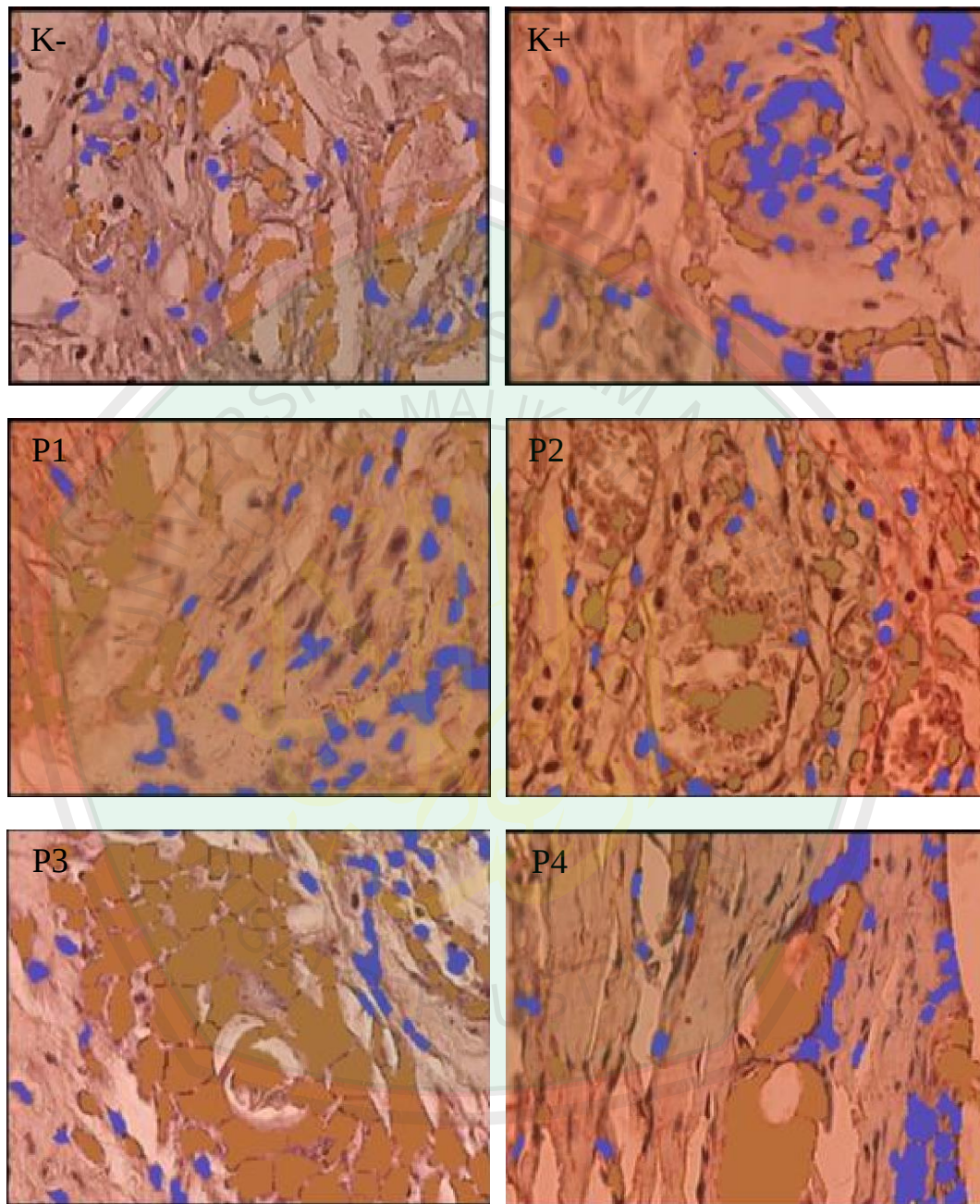
Pewarnaan imunohistokimia pada slide sediaan jaringan subkutan ini menggunakan antibodi caspase-3, dimana sel yang positif mengekspresikan caspase-3 akan memiliki sitoplasma yang berwarna coklat. Hal ini disebabkan karena lokalisasi caspase-3 adalah di sitoplasma. Pada penelitian ini banyak sekali sel yang sitoplasmanya berwarna coklat setelah dilakukan pengamatan pada hasil pewarnaan slide sediaan jaringan. Hal ini tidak hanya ditemukan pada kelompok hewan coba yang diberi perlakuan ekstrak akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.), tetapi juga ditemukan pada kelompok k-. Gambaran histopatologi jaringan subkutan dengan pewarnaan imunohistokimia pada kelompok perlakuan dapat dilihat pada gambar

4.3.1



Gambar 4.3.1 Pewarnaan Imunohistokimia Jaringan Subkutan (400x) Coklat Pekat pada sitoplasma. Menunjukkan Ekspresi Caspase 3. a: inti sel, b: serat kolagen, c: fibroblast, d: sitoplasma.

Hasil pewarnaan imunohistokimia pada penelitian ini tidak hanya mewarnai inti sel nya saja tetapi juga mewarnai jaringan yang lain seperti serat kolagen dan jaringan lemak. Hal ini mungkin disebabkan kromogen DAB yang terlalu pekat sehingga mewarnai semua jaringan yang ada di sekitar inti sel. Gambar 4.3.1 terlihat bahwa pada gambaran preparat imunohistokimia yang mengekspresikan Caspase 3, terdapat spot-spot berwarna kecoklatan pada semua kelompok perlakuan. Spot-spot kecoklatan yang muncul pada peraparat imunohistokimia merupakan gambaran ekspresi Caspase 3. Ekspresi Caspase 3 dapat terlihat dalam bentuk spot kecoklatan diakibatkan oleh adanya ikatan antara antigen yang berada pada jaringan dengan antibodi yang diberikan. Pada penelitian ini digunakan 2 jenis antibodi, yaitu antibodi primer yang berikatan dengan antigen pada jaringan, dan antibodi sekunder berlabel biotin. Pemberian antibodi sekunder diikuti dengan penambahan enzim berupa SA-HRP (*Strepta Avidin-Horseradish Peroxidase*) dan substratnya berupa kromogen DAB. Kromogen DAB merupakan substrat dari peroksidase yang dapat menghasilkan warna kecoklatan, sehingga akan terbentuk warna yang lebih jelas pada jaringan tersebut (Elias *et al.*, 1989)



Gambar 4.3.2 Persentase Luas Ekspresi Caspase 3 dengan Imunoratio. K-; 61,1%, K+: 21,6%, P1:40,7%, P2: 52,4%, P3: 61,1%, P4: 21,6%. Ekspresi caspase 3 ditunjukkan oleh warna coklat (■).

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.

Tabel 4.2. Rata-rata Persentase Ekspresi Caspase 3 Pada Fibrosarcoma Mencit (*Mus musculus* L.)

Kelompok Perlakuan	N	Rata-rata $\pm$ SD
K+ (Kontrol Positif)	4	31.85 $\pm$ 26.18 ^a
P1 (dosis 50 mg/Kg BB)	4	45.85 $\pm$ 18.50 ^{ab}
P2 (dosis 100 mg/Kg BB)	4	60.32 $\pm$ 13.2 ^{bc}
P4 (Metotreksat)	4	75.0 $\pm$ 22.13 ^c
P3 (dosis 150 mg/Kg BB)	4	79.05 $\pm$ 12.05 ^d
K- (Kontrol Negatif)	4	79.92 $\pm$ 23.20 ^d

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan, P= nilai signifaikansi.

Hasil ANOVA menunjukkan adanya perbedaan antar perlakuan, dilanjutkan uji *Post Hoc Tukey* berbeda nyata antar perlakuan secara signifikan ($P > 0,05$). Hasil rata-rata ekspresi Caspase 3 (tabel 4.2) didapatkan dengan analisis pengolahan Citra (Imunoratio), hasil data yang diperoleh selanjutnya dilakukan skoring. Kelompok perlakuan Dosis 150 ml/mg BB memiliki nilai rata-rata ekspresi Caspase 3 yang paling tinggi yaitu sebesar 79.05 $\pm$ 12.05, jika dibandingkan dengan perlakuan dosis

50 ml/mg BB sebesar 45.85 ± 18.50 , perlakuan dosis 100 ml/mg BB sebesar 360.32 ± 13.21 , obat antikanker sebesar 75.0 ± 22.13 , dan lebih rendah terhadap kontrol negatif sebesar 4.25 ± 0.95 , hasil ini menunjukkan adanya pengaruh pada masing-masing kelompok perlakuan yang ditunjukkan dengan perbedaan nilai rata-rata ekspresi Caspase 3.

Caspase 3 merupakan suatu protein yang berperan sebagai eksekutor untuk menginisiasi proses apoptosis baik melalui jalur intrinsic maupun jalur ekstrinsik. Berdasarkan hasil penelitian ekspresi Caspase 3 menurut masing-masing perlakuan diperoleh hasil yang signifikan. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) dengan dosis yang berturut-turut 50 mg/kg BB, 100 mg/kg BB dan 150 mg/kg BB menunjukkan efek peningkatan dari rerata kadar Caspase 3 pada jaringan. Sesuai dengan hipotesis pada penelitian ini rerata kadar Caspase 3 pada masing-masing perlakuan terhadap jaringan kontrol negatif (mencit normal) memiliki arti bahwa jaringan tersebut mengalami apoptosis yang lebih tinggi dibandingkan jaringan normal dengan demikian pemberian ekstrak etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) berpengaruh terhadap peningkatan proses apoptosis pada jaringan tikus pada model kanker fibrosarcoma, yang ditunjukkan pada tabel anova pada (lampiran 3) *Tes One Way Anova*.

Pada penelitian ini ternyata ekstrak etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea* L.) meningkatkan apoptosis aktivasi caspase-3. Caspase adalah pemecahan protein oleh satu golongan protease, yang dapat mengakibatkan apoptosis selular. Caspase berperan pada *initiation phase* pada jalur terjadinya apoptosis. ACA juga mempunyai

efek penghambatan proses inflamasi melalui penghambatan *Nitric oxide* (NO), *Cyclooxygenase-2* (COX)-2 dan menghilangkan radikal bebas (antioksidan). Proses inflamasi akan menyebabkan kerusakan protein (DNA repair, caspase) yang akan menyebabkan kerusakan DNA dan mutasi, sehingga dapat menginduksi sel tumor berkembang menjadi sel ganas (gangguan proliferasi). Di samping itu ACA juga mempunyai efek menghambat NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*). NF- κ B bila teraktivasi akan menekan apoptosis dan gangguan proliferasi (Putra, 2011).

Peningkatan ekspresi Caspase 3, dan memicu terjadinya apoptosis pada kelompok perlakuan disebabkan karena flavonoid dapat menstimulasi produksi IFN- γ dalam suatu populasi immunosit, yang sangat penting dalam memacu aktivasi CTL's dan sel NK pada sistem perondaan imun terhadap sel-sel kanker. Bila CTL's dan NK sel ini aktif maka akan banyak terjadi proses killing terhadap sel-sel tumor yang menyebabkan banyak terjadi apoptosis sel-sel tumor. Apoptosis dapat terjadi karena aktifnya enzyme caspase, pengaktifan enzyme ini dapat melalui berbagai pathway diantaranya melalui *T-cell Receptor* (TCR) maupun aktifitas granzyme yang masuk ke dalam sel dengan bantuan *pore forming factors perforin* (Abbas *et al.*, 2005).

Pada tingkat molekuler transformasi sel normal menjadi sel kanker disebabkan perubahan salah satu atau keseluruhannya dari tiga gen pengatur yang dijumpai pada semua sel, yaitu protein pertumbuhan disebut proto-onkogen, gen supresor yang menghasilkan protein menghambat pertumbuhan sel dan gen apoptosis yang menghasilkan bahan yang memprogram kematian sel. Masih ada satu gen lagi yang ikut mempengaruhi proses karsinogenesis yaitu gen yang berperan dalam proses

repair DNA. Kerusakan DNA menyebabkan mutasi di dalam genome sel somatik, kemudian proto onkogen berubah sifat menjadi onkogen sehingga bersifat mengaktivasi yang berarti menstimulasi sel bertumbuh dan berdeferensiasi. Onkogen merupakan onkoprotein yaitu protein yang menyebabkan sel mengalami transformasi tidak dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan atau sinyal eksternal (Baratawidjaja,. 2013).

