

Penurunan Aktivitas Proliferasi Sel Adenokarsinoma Mamma Mencit C3H Akibat Pemberian Ekstrak Etanol Lengkuas (*Alpinia galanga*)

Susanto Winarko,¹ Yanwirasti,² Aswiyanti Asri,¹ Salmiah Agus¹¹Departemen Patologi Anatomi, ²Pasca Sarjana Magister Biomedik,
Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang

ABSTRAK

Latar belakang

Data WHO tahun 2011 menunjukkan bahwa kematian akibat kanker payudara di Indonesia mencapai 20.052 jiwa dari keseluruhan kematian. Hal ini antara lain disebabkan tingginya biaya pengobatan sehingga masyarakat banyak yang berpaling pada terapi alternatif seperti tanaman tradisional. Lengkuas (*Alpinia galanga* (L) Wild adalah bahan tradisional yang murah dan mudah didapatkan di Indonesia. Kandungan zat aktif *l-acetoxychavicol acetate* (ACA), dalam lengkuas menurut penelitian terdahulu mempunyai khasiat anti kanker dengan menghambat aktivitas proliferasi sel melalui penghambatan jalur *nuclear factor kappa B* (NFκB). Tujuan penelitian ini untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak etanol lengkuas (*Alpinia galanga*) terhadap aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mamma pada mencit C3H dengan berbagai dosis.

Metode

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental menggunakan mencit C3H dengan rancangan penelitian *post test only controlled design group*. Hewan coba terdiri atas 32 ekor mencit C3H yang diinokulasi sel tumor kemudian dibagi 4 kelompok: kelompok kontrol (K) dan tiga kelompok perlakuan (P1, P2 dan P3) yang diberi ekstrak etanol lengkuas dosis bertingkat 225 mg/kgBB/hari, 450 mg/kgBB/hari dan 675 mg/kgBB/hari selama 2 minggu. Setelah semua mencit diterminasi, dilakukan pemeriksaan aktivitas proliferasi sel tumor dengan antibodi Ki-67. Perbedaan aktivitas proliferasi antara kelompok diuji menggunakan *one-way anova* yang dilanjutkan dengan *post hoc Bonferroni*.

Hasil

Penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan aktivitas proliferasi yang bermakna ($p=0,000$) di antara keempat kelompok. Pada analisa *post hoc Bonferroni* didapatkan perbedaan aktivitas proliferasi yang bermakna antara kelompok kontrol dengan P1, P2, dan P3, kelompok P1 dengan P3, dan kelompok P2 dengan P3 ($p<0,05$).

Kesimpulan

Ekstrak etanol lengkuas dengan dosis 225 mg/kgBB/hari menghambat aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mamma mencit C3H. Hasil terbaik pada dosis 675 mg/kgBB/hari.

Kata kunci: adenokarsinoma mamma mencit, *Alpinia galanga*, Ki-67, *l-acetoxychavicol acetate*, NFκB, proliferasi sel.

ABSTRACT

Background

WHO data in 2011 showed that deaths from breast cancer in Indonesia reached 20,052 peoples of all deaths. This is partly due to the high cost of treatment, so that many people are turning to alternative therapies such as traditional plants. Lengkuas (*Alpinia galanga* (L) Wild is the traditional material that is cheap and easily available in Indonesia. Lengkuas-containing active substances *l-acetoxychavicol acetate* (ACA), and according to past research has anti-cancer properties by inhibiting the activity through the inhibition of cell proliferation pathways nuclear factor kappa B (NFκB). To investigate the effect of ethanol extract of lengkuas against mammary adenocarcinoma cell proliferation activities in C3H mice with various dose levels.

Methods

This study was an experimental study using C3H mice with post-test only research design controlled group design. Experimental animals consisted of 32 C3H mice were inoculated with tumor cells and then divided into 4 groups: control group (K) and three treatment groups (P1, P2 and P3) were given graded doses of ethanol extract of lengkuas 225 mg/kgBW/day, 450 mg/kgBW/day and 675 mg/kgBW/ day for 2 weeks. After all mice were terminated, examined the proliferative activity of tumor cells with Ki-67 antibody. Differences in proliferative activity between the groups were tested using one-way anova followed by post hoc Bonferroni test.

Results

There were significant differences in proliferative activities ($p=0.000$) among the four groups. By the post hoc Bonferroni analysis was found the significant differences in proliferative activities between the control group P1, with P2 controls, P3 control group, between P1 with P3 group, P2 with P3 group ($p<0.05$).

Conclusion

Ethanol extract of lengkuas at a dose 225 mg/kgBW/day be able to inhibit mammary adenocarcinoma cell proliferation activities of C3H mice, and the best results obtained at doses 675 mg/kgBW/day.

Key words: *Alpinia galanga*, cell proliferation, Ki-67, *l-acetoxychavicol acetate*, mouse mammary carcinoma, NFκB.

PENDAHULUAN

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%).¹ Di Indonesia prevalensi tumor/kanker adalah 4,3 per 1000 penduduk. Data terakhir dari WHO tahun 2011 menyebutkan kematian akibat kanker payudara di Indonesia mencapai 20.052 atau 1,41% dari total kematian.² Berdasarkan data histopatologik dari Badan Registrasi Kanker Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia pada tahun 2006, karsinoma payudara di Indonesia menempati urutan kedua sebanyak 2.148 orang (14,28%) setelah karsinoma leher rahim.³ Di kota Padang jumlah penderita kanker payudara berada di urutan pertama dengan jumlah penderita sebanyak 232 orang.³

Dalam keadaan normal atau homeostasis, pertumbuhan jaringan ditentukan oleh kecepatan proliferasi, diferensiasi dan apoptosis. Apabila tubuh mengalami gangguan seperti pada kanker maka kecepatan proliferasi, dan diferensiasi meningkat.⁴

Siklus sel terkontrol dengan baik dalam keadaan normal tetapi pada keganasan, aktivitas siklin dan *cycline dependent kinase* (CDK) mengalami disregulasi sehingga memudahkan sel untuk berproliferasi. Aktivitas proliferasi sel dapat dideteksi dengan menggunakan imunohistokimia Ki-67 yang diekspresikan pada tiap fase di siklus sel.^{4,5}

Pengobatan kanker payudara secara medis dapat dilakukan dengan cara operasi, radioterapi, kemoterapi atau kombinasi ketiganya. Permasalahan yang sering timbul pada masyarakat kita adalah biaya yang tidak terjangkau untuk pengobatan kanker payudara. Oleh sebab itu banyak masyarakat yang menderita kanker payudara mencoba mencari terapi alternatif dalam pengobatannya.

Beberapa tumbuhan memiliki komponen antitumor berupa senyawa fitokimia yang dikenal dapat mencegah pertumbuhan kanker. Senyawa antitumor dan antikanker pada tanaman di antaranya yang telah dikenal luas oleh masyarakat adalah lengkuas (*Alpinia galanga* (L) Wild). Lengkuas merupakan tanaman tradisional yang mudah didapatkan di Indonesia dan seringkali digunakan sehari-hari sebagai bumbu penyedap masakan atau

rempah. Beberapa zat bioaktif yang terkandung di dalamnya antara lain: flavonoid, terpenoid, fenol, dan fenilpropanoid. Golongan senyawa fenilpropanoid sering dipergunakan sebagai bahan dasar obat modern, contohnya senyawa fenilpropanoid dan *l-acetoxychavicol acetat* (ACA) merupakan senyawa yang bersifat antitumor dari tumbuhan lengkuas.⁶

Lengkuas merupakan salah satu tanaman obat yang memiliki efek antiinflamasi dan memiliki jalur penghambatan pada NF κ B sehingga menurunkan aktivitas proliferasi sel. Sebagian besar dari mediator utama pertumbuhan tumor adalah inflamasi kronik, dan *nuclear factor kappa B* (NF κ B) merupakan salah satu faktor transkripsi inflamasi utama yang berperan dalam pengaturan beberapa perkembangan sel tumor. NF κ B merupakan target terapi dari beberapa tanaman obat dan ditemukan pada jaringan tumor.^{7,8,9}

Pemilihan pelarut untuk proses ekstraksi tergantung dari komponen yang akan diisolasi. Salah satu sifat yang penting adalah polaritas suatu senyawa. Suatu senyawa polar diekstraksi dengan menggunakan pelarut polar, demikian pula untuk senyawa semi polar dan non polar. Derajat polaritas tergantung pada besarnya tetapan dielektrik, makin besar tetapan dielektrik makin polar pelarut tersebut. Beberapa pelarut ekstraksi yang sering digunakan antara lain adalah air, etanol dan eter. Ekstrak etanol sebagai pelarut polar sering dipergunakan pada pembuatan obat-obatan karena memiliki beberapa keuntungan di antaranya tidak bersifat toksik, tidak menyebabkan pembengkakan pada membran sel, memperbaiki stabilitas dari bahan obat terlarut. Ekstrak etanol lengkuas telah dibuktikan memiliki fungsi sebagai anti-oksidan.^{10,11,12}

Berdasarkan beberapa penelitian yang terdahulu lengkuas mengandung zat aktif ACA yang diduga bersifat sebagai anti kanker, anti inflamasi, dan menghambat proliferasi. Rusmarilin pada tahun 2003 membuktikan ekstrak etil asetat lengkuas menghambat proliferasi sel kanker dalam kultur baik menggunakan galur sel kanker mencit maupun sel kanker primer manusia. Pada penelitian tersebut menggunakan dosis lengkuas yang bertingkat untuk mengetahui dosis efektif lengkuas terhadap penghambatan proliferasi sel.¹³

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan apakah ada pengaruh pemberian ekstrak etanol lengkuas terhadap proliferasi sel adeno-

karsinoma mamma mencit C3H dengan dosis yang bervariasi.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan penelitian *post test only controled design group*. Sampel yang digunakan adalah mencit strain C3H sebanyak 32 ekor, berumur 3-4 bulan, berat badan 15-25 gram yang diperoleh dari Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Semua mencit mendapat pakan standar dan air minum secara *ad libitum*.

Pembuatan Ekstrak Etanol Lengkuas

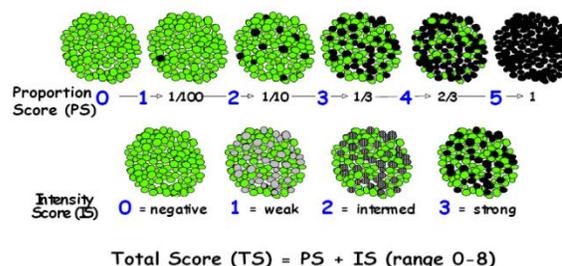
Lengkuas merah segar yang berumur 9 bulan, dipotong dan dikeringkan dengan oven suhu 50°C, selanjutnya dihaluskan menjadi serbuk. Sebanyak 40 g serbuk dibungkus dengan kertas saring dan diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 10 kali sirkulasi. Kemudian diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* menjadi ekstrak kasar, dibuat larutan dengan menggunakan larutan akuades menjadi 0,2 ml.

Inokulasi Tumor, Pemberian Ekstrak dan Pengukuran Volume Tumor

Tiga puluh dua ekor mencit betina strain C3H dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol (K), perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2), perlakuan 3 (P3). Masing-masing kelompok terdiri dari 8 ekor mencit C3H, dilakukan alokasi random. Dilakukan penimbangan berat badan semua mencit, kemudian semua mencit diinokulasi suspensi sel tumor mamma sebanyak 10⁶ sel. Setelah timbul masa tumor dilakukan pengukuran volume tumor menggunakan kaliper dua kali per minggu selama 21 hari. Satu minggu setelah inokulasi, kelompok K tidak mendapatkan perlakuan, kelompok P1 diberi ekstrak etanol lengkuas merah 225 mg/kgBB/hari, P2 450 mg/kgBB/hari, P3 675 mg/kgBB/hari. Ekstrak etanol lengkuas sebelum diberikan ke mencit terlebih dahulu dilarutkan dengan akuabides, dilakukan dengan sonde lambung sebanyak 0,2 ml ekstrak selama 2 minggu. Pada hari ke-21 semua mencit dikorbankan menggunakan eter untuk diambil jaringan tumornya. Jaringan tumor diproses menjadi blok parafin, dibuat preparat untuk pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan HE .

Pewarnaan Ki-67

Pewarnaan Ki-67 menggunakan produk dari Dako cytomation dengan nomer katalog M 7249. Indeks proliferasi sel adenokarsinoma didapatkan dengan cara menggunakan *Allred Scoring* (Gambar 1) yaitu menjumlahkan *intensity scoring* dan *proportion scoring*. Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan menghitung jumlah sel yang mengekspresikan Ki-67 pada inti sel yang terwarnai coklat. *Scoring* dilakukan pada tiap slaid sebanyak 5 lapang pandang kuat (pembesaran 400x).¹⁴



Gambar 1. *Scoring* imunohistokimia Ki-67 menurut *Allred Scoring*.

Analisis data

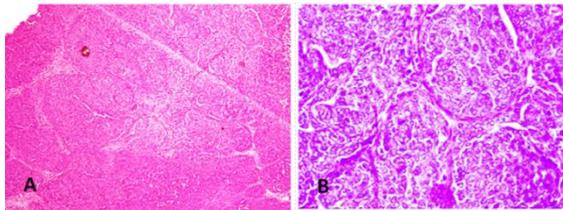
Dilakukan analisa deskriptif ditampilkan dalam bentuk mean, median, modus dan simpangan baku. Data memiliki distribusi normal dengan uji Kolmogorov Smirnov dan varian sama dilanjutkan dengan uji *one-way anova*, dengan derajat kepercayaan 95%. Untuk melihat perbedaan antar kelompok dilakukan uji *post hoc* Bonferroni.

HASIL

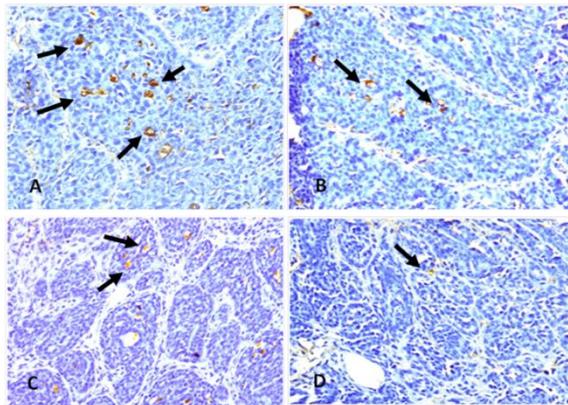
Mencit yang inokulasi sel adenokarsinoma mamma memiliki masa laten kurang lebih satu minggu. Pada awal minggu pertama setelah dilakukan inokulasi, sudah timbul massa tumor pada tempat inokulasi. Masing-masing kandang diambil 1 ekor mencit secara acak dan diterminasi untuk diperiksa sel tumornya melalui pemeriksaan patologi anatomi dengan pewarnaan hematoxilin eosin (HE). Hasil pemeriksaan pada tumor adenokarsinoma ditunjukkan dalam Ki-67 (Gambar 2).

Berdasarkan hasil uji *one-way anova* terdapat perbedaan yang bermakna (p=0,001) yang berarti terdapat perbedaan aktivitas proliferasi di antara kelompok penelitian. Selanjutnya

untuk melihat kelompok mana yang memiliki perbedaan aktivitas proliferasi dilanjutkan dengan pemeriksaan *post hoc test* yaitu Bonferroni.



Gambar 2. Sel tumor adenokarsinoma mamma mencit, setelah inokulasi tumor 1 minggu, (HE, A. pembesaran 100x, B. pembesaran 400x).



Gambar 3. Aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma, berupa warna coklat pada inti sel tumor (panah hitam), pembesaran 400x. A. Kelompok kontrol; B. Kelompok perlakuan 1; C. Kelompok perlakuan 2; D. Kelompok perlakuan 3.

Tabel 1. Rerata aktivitas proliferasi kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan pada mencit.

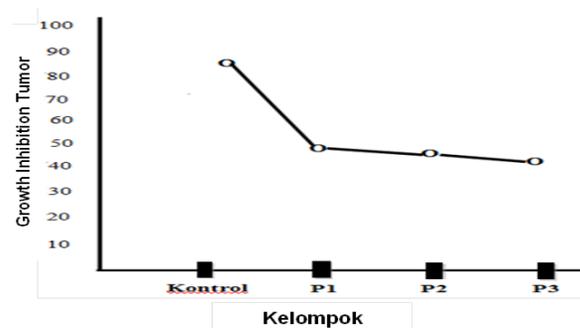
Kelompok	Rerata±SD	Median	p
Kontrol	5,00±0,25	5,0	0,001
P1	3,46±0,47	3,4	
P2	3,20±0,86	3,0	
P3	2,23±0,69	2,0	

Hasil rerata aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mamma mencit yang tertinggi didapatkan pada kelompok Kontrol yaitu 5,00 ±0,25, diikuti kelompok P1 dengan 3,45±0,47, kemudian P2 dengan 3,20±0,86 dan terendah adalah kelompok P3 dengan 2,22±0,69.

Dari analisa test *post hoc* Bonferroni hasil aktivitas proliferasi yang bermakna terdapat pada kelompok kontrol dengan

P1(p=0,001), kelompok kontrol dengan P2 (p=0,001), kelompok kontrol dengan P3 (p=0,001), kelompok P1 dengan kelompok P3 (p=0,006), kelompok P2 dengan kelompok P3 (p=0,042). Perbedaan yang tidak bermakna terdapat pada kelompok P1 dengan P2 (p=1,000).

Berdasarkan pengukuran volume tumor mencit setelah timbul masa tumor hingga akhirnya diterminasi, didapatkan *growth inhibition tumor* dengan menggunakan rumus volume akhir tumor dikurangi volume awal tumor, dibagi volume akhir tumor dan dikalikan 100%.



Gambar 4. *Growth inhibition* tumor pada mencit.

DISKUSI

Penelitian ini menggunakan mencit strain C3H karena jenis mencit ini memiliki kecenderungan untuk mendapat keganasan melalui kerentanan genetik dan transmisi virus *mouse mamary tumor virus* (MMTV) melalui mammae sehingga mudah terjadi proses karsinogenesis. Dengan mempergunakan tehnik inokulasi berupa transplantasi sel-sel tumor akan menyebabkan terjadinya tranformasi nodular beberapa saat kemudian disertai dengan perkembangan sel-sel tumor. Pertumbuhan tumor mencit pada minggu berikutnya sampai menjelang terminasi bervariasi, di mana pada kelompok kontrol terlihat volume tumor mencit cenderung bertambah besar, sedangkan pada kelompok perlakuan volume tumor cenderung mengecil karena efek dari pemberian ekstrak lengkuas. Berdasarkan literatur Turusov and Mohr (1994) menyatakan bahwa pertumbuhan tumor mammae pada mencit strain C3H bisa mencapai 2,4 mm setiap minggunya.¹⁵

Dari hasil penelitian didapatkan rerata aktivitas proliferasi terjadi pada semua mencit, dimana aktivitas tertinggi didapatkan pada

kelompok Kontrol (5,00), diikuti kelompok P1 (3,45), kemudian P2 (3,20) dan terendah pada kelompok P3 (2,22). Sedangkan hasil pengujian antar kelompok didapatkan perbedaan yang bermakna di antara keempat kelompok percobaan ($p=0,001$). Aktivitas proliferasi yang bermakna terdapat antara kelompok kontrol dengan P1 ($p=0,001$), kelompok kontrol dengan P2 ($p=0,001$), kelompok kontrol dengan P3 ($p=0,001$), antara kelompok P1 dengan P3 dan antara kelompok P2 dibandingkan kelompok P3. Sedang antara kelompok P1 dengan kelompok P2 tidak didapatkan perbedaan aktivitas proliferasi yang bermakna walaupun secara merata terdapat penurunan aktivitas proliferasi.

Pemberian ekstrak etanol lengkuas dengan dosis 225mg/kgBB/hari sudah terjadi penurunan aktivitas proliferasi, dan bila dosis dinaikkan hingga 675mg/kgBB/hr terjadi penurunan aktivitas proliferasi yang lebih bermakna secara statistik, yang sesuai dengan penurunan rerata aktivitas proliferasi.

Lengkuas (*Alpinia galanga*) sebagai salah satu tanaman obat memiliki zat aktif ACA yang memiliki potensi untuk menurunkan kejadian kanker dengan cara menurunkan aktivitas proliferasi. Hal ini dapat dijelaskan bahwa sebagian besar dari mediator utama pertumbuhan tumor adalah inflamasi kronik dan NF κ B merupakan salah satu faktor transkripsi inflamasi utama yang berperan dalam pengaturan dari beberapa perkembangan sel tumor. NF κ B juga ditemukan pada jaringan tumor dan merupakan target molekul dari beberapa tanaman obat yang memiliki efek anti kanker. Lengkuas dengan kandungan ACA memiliki peran menghambat NF κ B melalui jalur penghambatan regulator protein siklus sel yaitu Siklin D1 yang berakibat terjadinya hambatan transisi siklus sel dari fase G1 ke S, dengan demikian aktivitas proliferasi sel akan menurun dan sel tumor tidak tumbuh.^{7,8,9}

Beberapa penelitian terdahulu yang menggunakan lengkuas sebagai terapi alternatif anti kanker seperti pada penelitian Herla Rusmarilin (2003) yang telah membuktikan bahwa ekstrak etil asetat lengkuas ternyata dapat menghambat proliferasi sel kanker dalam kultur baik menggunakan alur sel kanker maupun sel kanker primer manusia.^{12,15} Demikian pula Lee and Houghton (2005), penelitian Hartono (2009) yang menggunakan ekstrak etil asetat lengkuas, serta penelitian

yang dilakukan Chudiwal *et al* (2010) juga telah membuktikan khasiat dari ACA sebagai anti kanker terhadap *Michigan Cancer Foundation 7* (MCF7) pada kanker payudara dan sel COR L23 pada kanker paru.^{6,16,17}

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanol lengkuas (*Alpinia galanga*) dengan dosis 225 mg/kgBB/hari menghambat aktivitas proliferasi sel adenokarsinoma mencit C3H. Hasil penghambatan terbaik terjadi oleh dosis 675 mg/kgBB/hari.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia [internet]. Jika tidak dikendalikan 26 juta orang di dunia menderita kanker. [cited 2012 February 13]. Available from: <http://www.depkes.go.id>
2. Jemal A, Bray F, Melissa M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics, *Ca Cancer J Clin*. 2011; 61: 69-90.
3. Badan Registrasi Kanker IAPI. Kanker di Indonesia tahun 2006: Data histopatologik Yayasan Kanker Indonesia. Jakarta: Direktorat Jenderal Pelayanan Medik, Departemen Kesehatan RI; 2006.
4. Kumar V, Abbas, Fausto AK, Aster. *Robins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Eight edition, Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010.
5. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, *et al*. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*. 1991; 138: 867-73.
6. Chudiwal AK, Jain DP, Somani RS. *Alpinia galangal Willd. An Overview on Phytopharmacological properties*. *Indian J Nat Prod Res*. 2010; 1: 143-9.
7. Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. Nuclear Factor- κ B activation: From bench to bedside. *Minireview. Exp Biol Med*. 2008; 233: 21-31.
8. Shisodia S, Aggarwal B. Nuclear factor κ B: a friend or a foe in cancer?. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68:1071-80.
9. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol*. 2006; 71: 1397-1421.

10. Voigt R. Buku Pelajaran Teknologi Farmasi, Edisi kelima, Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 1995.
11. Mahae N, Chaiser S. Antioxidant activities and antioxidative components in extracts of *Alpinia galangal* (L) Sw, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro Industry, Kasetsart University, Bangkok, Thailand; 2009.
12. Srividya AR, Dhanabal SP, Kumar S, Kumar PH. Antioxidant and antidiabetic activity of *Alpinia galangal*. *Int J Pharmacog Phytochem Res.* 2010; 3: 6-12.
13. Rusmarilin H. Anticancer activity of local *Alpinia galangal* L (SW) rhizome extracts on cancer cell line of human and mice transplanted with primary tumor cell. *USU reporitary* 2006 (cited 2007 Feb 14). Available from: <http://library.usu.ac.id/download/fp/D0300608.pdf>
14. Allred DC. Scoring immunostained slides. *Modern Pathol:* 1998;11:155-68.
15. Turusov VS, Mohr U. Pathology of Tumours in Laboratory Animals. 2nd Edition Tumours of the mouse. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1994.
16. Hartono NWB. Pengaruh pemberian ekstrak lengkuas (*Alpinia galangal*) terhadap aktivitas proliferasi dan indeks apoptosis pada adenokarsinoma mammae mencit C3H. [Tesis]. Universitas Diponegoro; 2009.
17. Lee CC , Houghton P. Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. *J Ethno-Pharmacol.* 2005; 100: 237-43.