

**PENGARUH EKSTRAK SARANG SEMUT (*Myrmecodia pendens* Merr. & Perry)
TERHADAP AKTIFITAS PROLIFERASI SEL DAN INDEKS APOPTOSIS
KANKER PAYUDARA MENCIT C3H**

**THE EFFECTS OF MYRMECODIA PENDENS (*Myrmecodia pendens* Merr. &
Perry) ON THE PROLIFERATION ACTIVITY AND APOPTOTIC INDEX OF
THE BREAST CANCER CELLS. IN C3H MICE**

Sumarno

Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung
Semarang

ABSTRAK

Alternatif pengobatan kanker payudara dengan tanaman obat saat ini sedang dieksplorasi. Sarang semut (*myrmecodia pendens* Merr & Perry) merupakan tumbuhan asli Indonesia yang berasal dari papua. Secara empiris banyak digunakan untuk mengobati berbagai penyakit. Uji in vitro menunjukkan bahwa *myrmecodia pendens* dapat menghambat pertumbuhan kanker usus, serviks dan paru. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh dosis bertingkat ekstrak *myrmecodia pendens* terhadap aktifitas proliferasi dan indeks apoptosis adenokarsinoma mamma. Penelitian eksperimental pada hewan coba dengan desain penelitian *randomized post test only control group*. Sampel 28 ekor mencit C3H yang diinokulasi tumor, dibagi dalam 4 kelompok : kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan yang diberi ekstrak *myrmecodia pendens* dosis bertingkat (4 mg/hari, 8 mg/hari, 16 mg/hari) selama 3 minggu. Kemudian dilakukan pemeriksaan aktifitas proliferasi dan indeks apoptosis. Proliferasi sel tumor diketahui dengan menghitung AgNOR setelah dipulas dengan perak nitrat koloidal. Sel yang mengalami apoptosis diketahui dengan menghitung indeks apoptosis setelah dipulas dengan TUNEL. Terdapat perbedaan bermakna aktifitas proliferasi ($p < 0,05$) ketiga kelompok yang diberikan ekstrak *myrmecodia pendens* dibandingkan kontrol ($P_1 = 3,2 \pm 1,40$, $P_2 = 3,2 \pm 0,52$, $P_3 = 4,6 \pm 1,06$, $K = 5,8 \pm 0,51$) peningkatan dosis tidak diikuti penurunan aktifitas proliferasi. Terdapat perbedaan bermakna indeks apoptosis ($p < 0,05$) pada ketiga kelompok yang diberikan ekstrak *myrmecodia pendens* dibandingkan kontrol ($P_1 = 2,9 \pm 0,46$, $P_2 = 3,2 \pm 0,196$, $P_3 = 2,9 \pm 0,35$, $K = 1,6 \pm 0,55$) peningkatan dosis tidak diikuti peningkatan indeks apoptosis. Pemberian ekstrak *myrmecodia pendens* dapat menginduksi apoptosis dan menurunkan aktifitas proliferasi sel kanker.

Kata kunci: *Myrmecodia pendens*, proliferasi, indeks apoptosis, adenocarcinoma mammae.

ABSTRACT

The treatment of breast cancer with herb medicine is now being explored. Sarang semut (*myrmecodia pendens* Merr & Perry) is an Indonesian indigenous plant from papua, empirically used to treat many diseases. In vitro study indicated that *myrmecodia pendens* could inhibit the growth of cancer in intestinal tract, cervic and lung. This study was conducted to investigate the effects of *myrmecodia pendens* given in gradual dosage on the proliferation activity and apoptotic index of the breast cancer cells. Animal experiment using post test only control group design was done. Twenty-eight C3H mice were inoculated with tumour and were divided into four group : one control group and three groups were given by the extract of *myrmecodia pendens* in gradual dosage (4 mg/day, 8 mg/day, 16 mg/day). All of the groups were treated for three weeks. The proliferation activity of tumour was examined by counting the AgNOR deposits detected after colloidal AgNOR staining. Index apoptotic was assessed by mean of TUNEL method. There was significant differences on the proliferation activity ($p < 0,05$) between three group administered with *myrmecodia pendens* extract compared with control group ($P_1 = 3,2 \pm 1,40$, $P_2 = 3,2 \pm 0,52$, $P_3 = 4,6 \pm 1,06$, $K = 5,8 \pm 0,51$) respectively. The increasing dosage was not followed by the reduction of proliferation activities. There were significant differences of the apoptotic index ($p < 0,05$) of the three group given *myrmecodia pendens* extract compared with control group ($P_1 = 2,9 \pm 0,46$, $P_2 =$

3,2±0,0,196, P3= 2,9±0,35, K= 1,6±0,55) respectively. Increasing of the dosage was not followed by increasing of the increasing apoptotic index. Myrmecodia pendens extract can induce apoptotic index and reduce proliferation activities of cancer cell.

Key words : *Myrmecodia pendens, proliferation activity, apoptotic index, adenocarcinoma of the breast.*

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan penyakit keganasan yang sering ditemukan di seluruh dunia dengan insidensi relatif tinggi, yaitu 20% dari seluruh keganasan (pane, 2008). Setiap tahunnya 600.000 kasus kanker payudara baru ditemukan, sebanyak 350.000 kasus diantaranya ditemukan di negara maju, sedangkan 250.000 kasus ditemukan di negara berkembang (Sadhana, 2006). Data yang diperoleh di negara Amerika pada tahun 2007 menunjukkan bahwa terdapat 178.480 pasien baru kanker payudara dan sebanyak 40.460 pasien meninggal dunia (Breast Cancer, 2008). Data BRK-IAPI (Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia) 1994 menunjukkan bahwa persentase kanker payudara wanita menduduki urutan kedua tertinggi (11,77%) setelah kanker rahim (17,70%) dari semua kasus tumor di seluruh senter Patologi Anatomi di Indonesia (Sugito, 1994). Kanker payudara yang ditemukan di Semarang pada tahun 2001 terdapat sebanyak 769 kasus dan insiden ini berada pada urutan tertinggi kedua setelah kanker mulut rahim. Insiden puncak pada kelompok umur 45-54 tahun (Sardjadi, 2001). Hasil survei kesehatan rumah tangga (SKRT) Departemen Kesehatan RI menunjukkan angka kematian karena kanker payudara meningkat yaitu pada tahun 1992: 4,5%, tahun 1995:4,9%, dan pada tahun 2001 menjadi 6,0%. Sedangkan Data statistik rumah sakit dalam Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2006, menunjukkan bahwa kanker payudara menempati urutan pertama pada pasien rawat inap (19,64%), disusul kanker leher rahim (11,07%), kanker hati dan saluran empedu intrahepatik (8,12%), Limfoma non Hodgkin (6,77%), dan Leukemia (5,93%) (Depkes RI, 2010).

Cara pengobatan kanker payudara yang berlaku selama ini adalah dengan pembedahan, radioterapi dan sitostatika. Pembedahan dan radioterapi bersifat terapi definitif lokal, sedangkan secara sistemik, di mana sel kanker menyebar/metastasis dilakukan dengan kemoterapi. Terapi lain kanker adalah dengan terapi hormonal, tetapi hal ini akan tidak berhasil bila reseptor hormon pada sel tumornya negatif atau sel kankernya bersifat hormonal independent. Saat ini sedang dikembangkan terapi

baru pada kanker berupa Imunoterapi, yaitu dengan memodulasi sistem kekebalan tubuh terhadap tumor yang diharapkan dapat membunuh sel-sel kanker yang tersebar secara sistemik setelah terapi definitif lokal dilakukan (Roitt, 1994). Zat-zat immunomodulator banyak terdapat pada tanaman obat. Sehingga saat ini sedang dicari alternatif terapi dari tanaman obat yang dapat memodulasi sistem imun terhadap sel kanker, bahkan bila ada, dicari tanaman obat yang dapat bersifat sitostatika.

Sarang semut merupakan salah satu tanaman obat tradisional Indonesia yang masih belum memiliki acuan informasi yang lengkap baik dari segi farmakologi maupun Fitokimia. Pemanfaatan Sarang semut ini antara lain adalah sebagai tanaman obat anti kanker / sitostatika yang mempunyai efek dapat mengecilkan massa tumor, tetapi hal ini masih memerlukan suatu pembuktian (Subroto, 2008).

Penelitian awal terhadap ekstrak sarang semut menunjukkan adanya kandungan zat aktif berupa flavonoid dan tanin. Pengujian aktifitas antikanker ekstrak tanaman sarang semut dengan menguji daya hambat ekspresi p53 mutan dari sel kanker payudara T47D (Budhiani, 2007), serta aktifitas antikanker ekstrak tanaman sarang semut terhadap kanker serviks, kanker paru dan kanker usus dengan berbagai pelarut seperti air, methanol, dan campuran methanol-air juga telah dilakukan (Riset Ilmiah Sarang Semut, 2008). Hasilnya sarang semut mampu menghambat secara bermakna ekspresi p53 mutan dari sel kanker payudara T47D (Budhiani, 2007), serta mempunyai aktivitas antiproliferasi terhadap kanker serviks, kanker paru dan kanker usus (Riset Ilmiah Sarang Semut, 2008).

Golongan senyawa kimia dalam herbal medicine yang berkaitan dengan aktifitas anti kanker salah satunya adalah flavonoid, di mana senyawa ini akan menghambat pertumbuhan dan menginduksi proses apoptosis pada target sel-sel kanker (Lisdawati, 2008; Sumastuti dan Sonlimar, 2003). Flavonoid menghambat proliferasi sel kanker dengan jalan menghambat enzim *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK). Disamping itu menurut beberapa peneliti - yang meneliti efek kandungan flavonoid pada salah satu herbal medicine Di Gamaleya Institute of Microbiology and Epidemiology, Moscow, Russia dan Chittaranjan National Cancer Institute, Kolkata, India - mengemukakan bahwa flavonoid alamiah dapat menstimulasi produksi Interferon- γ (IFN- γ) dalam suatu populasi immunosit, yang

sangat penting dalam memacu aktivasi *Citotoxic T Lymphocyte* (CTL) dan sel *Natural Killer* (NK) pada sistem perondaan imun terhadap sel-sel kanker yang berperan dalam terjadinya apoptosis dalam sel kanker tersebut (Amit *et al.*, 2001; Tazulakhova *et al.*, 200; Abbas *et al.*, 2005). Belum ditemukan studi *in vivo* yang membuktikan efek ekstrak sarang semut pada respon imunologis seluler terhadap sel kanker. Penelitian ini akan mempelajari pengaruh ekstrak sarang semut terhadap aktifitas proliferasi dan indeks apoptosis sel tumor payudara pada mencit C3H selama 3 minggu.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan "*Post test only control group design*". Kelompok penelitian dibagi menjadi 4 yaitu kelompok Kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2), dan Perlakuan 3 (P3).

Adapun pembagian kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

- K : Kelompok kontrol, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, tidak mendapat sarang semut
- P1 : Kelompok perlakuan 1, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan, mendapat ekstrak sarang semut 4 mg /hari (0,2 mL /hari)
- P2 : Kelompok perlakuan 2, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat ekstrak sarang semut 8 mg /hari (0,2 mL /hari)
- P3 : Kelompok perlakuan 3, mencit yang di inokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan mendapat ekstrak sarang semut 16 mg /hari (0,2 mL /hari)

Digunakan metode inokulasi (penanaman sel adenokarsinoma mamma dari mencit C3H donor) untuk menumbuhkan sel adenokarsinoma mamma pada hewan coba. Pada tiap-tiap kelompok setelah muncul tumor sebelum diberi perlakuan ekstrak sarang semut diambil satu mencit yang kemudian diterminasi dan diperiksa tumor tersebut secara mikroskopis guna memastikan bahwa tumor yang muncul tersebut adalah adenokarsinoma mamma. Sehingga jumlah mencit C3H pada tiap-tiap kelompok setelah dimulainya perlakuan ekstrak sarang semut adalah 6 ekor kemudian diberikan perlakuan selama 3 minggu, dan pemberian ekstrak dilakukan dengan pipet mikro.

Dosis ekstrak sarang semut yang digunakan adalah dosis dengan konversi dosis lazim ekstrak sarang semut untuk manusia dewasa terhadap dosis mencit dengan bobot 20 gram. Dosis lazim untuk manusia dewasa tersebut 1500 mg per hari. Faktor konversi manusia terhadap mencit 20 gr menggunakan metode Laurence & Bacharach yaitu sebesar 0,0026 sehingga diperoleh dosis ekstrak sarang semut untuk mencit C3H sebesar 4 mg/hari. Kemudian dari dosis tersebut ditentukan dosis bertingkat ekstrak sarang semut yaitu dosis 4 mg/hari, dosis 8 mg/ hari dan dosis 16 mg/hari.

Aktifitas proliferasi sel dinilai dengan menggunakan metode AgNOR yang dilakukan sesuai metode ploton dengan menghitung jumlah AgNOR interfase per sel pada 100 sel tumor dengan pembesaran 1000x menggunakan minyak emersi, kemudian diambil rata-ratanya. Pada setiap sediaan dilakukan penghitungan pada daerah yang paling anaplastik, hindari nekrotik dan sel yang bertumpuk. Kontrol internal reaksi dilakukan dengan penghitungan AgNOR pada limfosit yang hanya memiliki satu bintik AgNOR. Pengecatan AgNOR tampak sebagai titik coklat atau hitam dalam inti sel epitel kelenjar (Fonseca dan do Carmo, 2008; Padi, 2002).

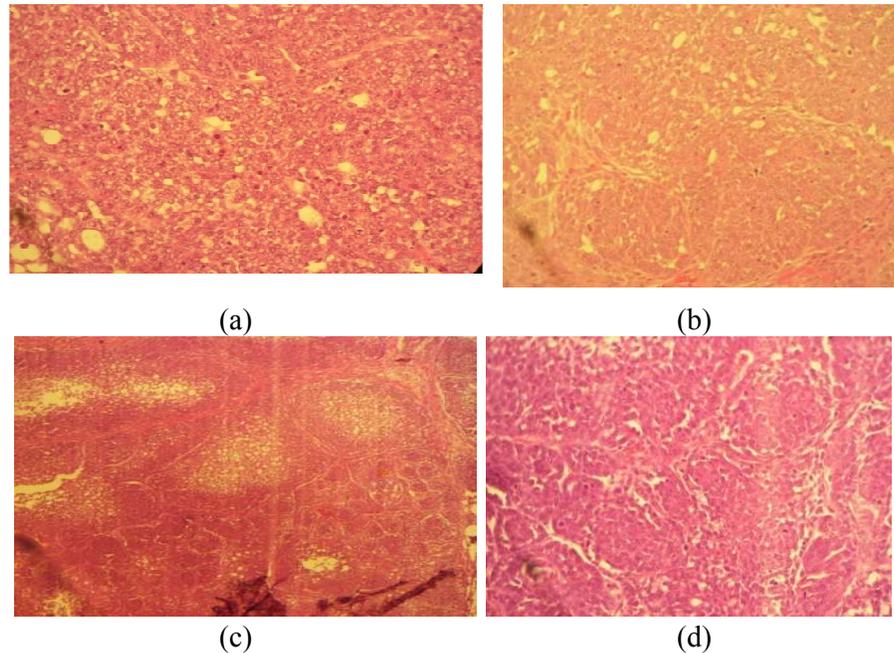
Indeks apoptosis dengan pewarnaan TUNEL pada seluruh jaringan tumor adenokarsinoma. Pemeriksaan dilakukan secara acak dengan menggunakan mikroskop fluorescent pembesaran 40 kali. Sel yang mengalami apoptosis dihitung pada 100 sel tumor dalam 1 lapang pandang, sebanyak 5 lapang pandang. Indeks apoptosis dihitung menggunakan rumus : $IA = (\text{sel apoptosis} / \text{total sel tumor}) \times 100\%$ (Shriro *et al.*, 1993). Adapun penghitungan skor apoptosis menurut Purnawati *et al.* (2006) adalah sebagai berikut :

- Skor 1 : jumlah sel yang mengalami apoptosis < 5 sel
- Skor 2 : jumlah sel yang mengalami apoptosis 5 sel – 25%
- Skor 3 : jumlah sel yang mengalami apoptosis >25% - <50%
- Skor 4 : jumlah sel yang mengalami apoptosis >50% - <75%
- Skor 5 : jumlah sel yang mengalami apoptosis >75% - 100%

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data hasil pengamatan pada kelompok kontrol dan ketiga kelompok perlakuan yang masing-masing diberikan ekstrak sarang semut dengan dosis P1 (4 mg/hari) , P2 (8

mg/hari), P3 (16 mg/hari) per oral selama 3 minggu berturut-turut dapat dilihat pada **Gambar 1**. sebagai berikut :



Gambar 1: (a) Kelompok kontrol; (b) Kelompok P1; (c) Kelompok P2 ; (d) Kelompok P3
Gambaran mikroskopis sampel adenocarcinoma mamma pada mencit C3H masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan yang diterminasi sebelum pemberian ekstrak sarang semut (HE, 40 kali)

Berdasarkan penggunaan sarang semut sebagai antikanker secara empiris, maka dilakukan penelitian ini sebagai salah satu usaha untuk membuktikan kebenaran penggunaan (*evidence-based*) sarang semut sebagai antikanker khususnya kanker payudara. Pada penelitian-penelitian invitro sebelumnya diketahui bahwa sarang semut memiliki efek menghambat ekspresi p53 mutan dari sel kanker payudara T47D serta mempunyai aktifitas antiproliferasi terhadap kanker serviks, kanker paru dan kanker usus (Budiani *et al.*, 2007; Riset Ilmiah Sarang Semut, 2008). Berdasarkan hal tersebut, diduga bahwa sarang semut juga memiliki aktifitas antikanker in vivo pada hewan coba.

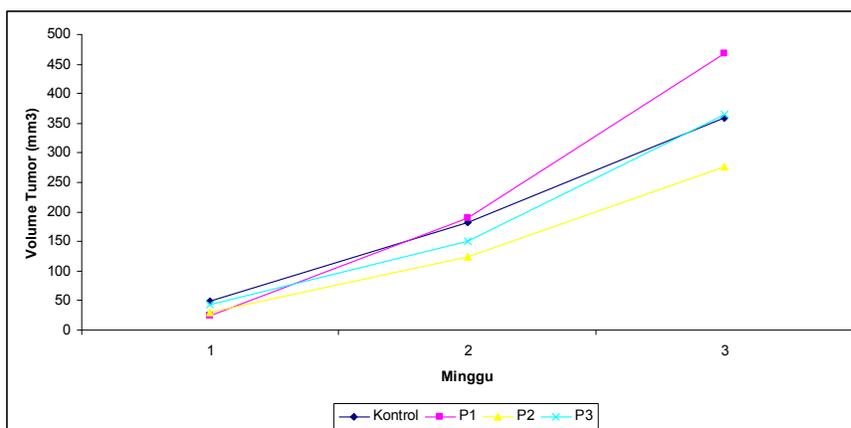
Volume tumor pada minggu ke 1, 2, dan 3.

Pengukuran panjang dan lebar tumor dilakukan setiap minggu dengan menggunakan kaliper (mm). untuk pengukuran volume tumor menggunakan rumus : (panjang x lebar² x 0,5) (Cox, 2004).

Tabel 1. Volume tumor pada minggu ke 1, 2 dan 3 pada tiap-tiap kelompok percobaan

| Kelompok Percobaan | Volume (mm ³) | | | | | |
|--------------------------|---------------------------|-------|-----------|--------|------------|--------|
| | Minggu I | | Minggu II | | Minggu III | |
| | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD |
| Kontrol | 44,30 | 13,97 | 229,13 | 106,43 | 472,00 | 103,28 |
| Perlakuan 1 (4 mg/hari) | 42,62 | 34,35 | 175,07 | 39,58 | 402,68 | 109,29 |
| Perlakuan 2 (8 mg/hari) | 23,48 | 5,10 | 113,2 | 35,23 | 269,18 | 90,92 |
| Perlakuan 3 (16 mg/hari) | 30,74 | 9,34 | 151,66 | 110,04 | 334,00 | 130,63 |
| <i>P</i> * | 0,146 | | 0,131 | | 0,026 | |

Ket. : *ANOVA minggu I $p > 0,05$; ANOVA minggu II $p > 0,05$; ANOVA minggu III $p < 0,05$



Gambar 2. Rerata volume tumor pada minggu 1, 2 dan 3 pada mencit C3H kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat ekstrak sarang semut

Uji normalitas data volume tumor minggu 1, 2 dan 3 menggunakan uji Saphiro Wilk, menunjukkan bahwa data berdistribusi normal setelah ditransformasi. Uji homogenitas juga memberikan hasil data homogen pada kelompok kontrol dan uji. Analisis varian menggunakan uji Anova yang memberikan hasil tidak berbeda secara bermakna ($p > 0,05$) pada kelompok kontrol dan ketiga kelompok uji untuk volume tumor minggu pertama dan kedua sedangkan pada minggu ketiga berbeda secara bermakna $p = 0,026$ ($p < 0,05$). Perbedaan rerata volume tumor pada minggu ketiga kelompok kontrol dengan kelompok uji terletak pada uji kedua (8 mg/hari) dan ketiga (16 mg/hari) yang berbeda secara bermakna.

Tabel 2. Hasil uji beda *LSD test* rerata volume tumor minggu ketiga antar kelompok pada semua mencit

| Antar kelompok | <i>p</i> |
|----------------|----------|
| K-P1 | ,286 |
| K-P2 | ,004 |
| K-P3 | ,041 |
| P1-P2 | ,047 |
| P1-P3 | ,290 |
| P2-P3 | ,317 |

Hasil ini menunjukkan bahwa terjadi peningkatan volume tumor setiap minggunya pada tiap-tiap kelompok selama 3 minggu penelitian dan peningkatan berat badan mencit pada minggu pertama dan kedua, diikuti oleh penurunan berat badan mencit pada minggu ketiga pada seluruh kelompok. Penurunan ini kemungkinan terjadi karena peningkatan produksi TNF- α yang berkepanjangan dan TNF- α tersebut dapat mengakibatkan katabolisme pada otot dan lemak sehingga menyebabkan terjadinya kaheksia pada penderita kanker (Abbas *et al.*, 2005).

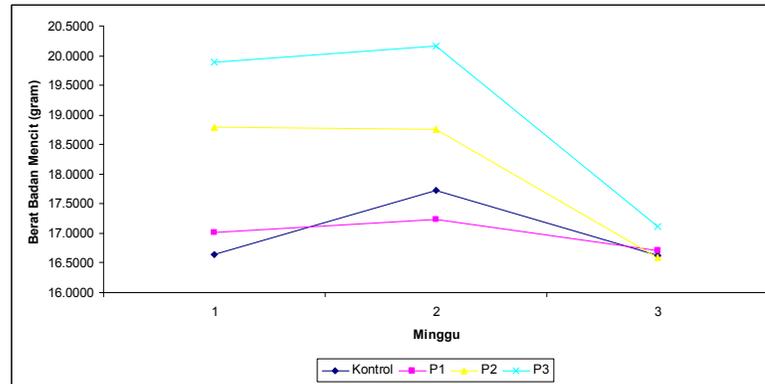
Berat badan mencit pada minggu 1, 2 dan 3

Berat badan mencit yang diamati tiap minggu menunjukkan terjadinya fluktuasi berat badan pada tiap minggunya. Pada minggu pertama dan kedua hampir semua mencit mengalami peningkatan berat badan. Pada minggu ketiga, hampir semua mencit mengalami penurunan berat badan.

Tabel 3. Berat mencit pada minggu ke 1, 2 dan 3 pada tiap-tiap kelompok percobaan.

| Kelompok Percobaan | Berat Mencit (g) | | | | | |
|--------------------------|------------------|------|-----------|------|------------|------|
| | Minggu I | | Minggu II | | Minggu III | |
| | Mean | SD | Mean | SD | Mean | SD |
| Kontrol | 16,65 | 1,34 | 17,73 | 1,77 | 16,63 | 1,67 |
| Perlakuan 1 (4 mg/hari) | 17,01 | 1,30 | 17,23 | 1,52 | 16,71 | 2,03 |
| Perlakuan 2 (8 mg/hari) | 18,78 | 1,39 | 18,75 | 1,56 | 16,60 | 3,06 |
| Perlakuan 3 (16 mg/hari) | 19,88 | 2,09 | 20,16 | 2,25 | 17,11 | 1,94 |
| <i>p</i> * | 0,006 | | 0,050 | | 0,976 | |

Ket. : *ANOVA minggu I $p > 0,05$; ANOVA minggu II $p > 0,05$; ANOVA minggu III $p < 0,05$



Gambar 3. Rerata berat badan mencit pada minggu 1, 2 dan 3 kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat ekstrak sarang semut.

Uji normalitas data berat badan mencit minggu 1, 2 dan 3 menggunakan uji Saphiro Wilk, menunjukkan bahwa data berdistribusi normal. Uji homogenitas juga memberikan hasil data homogen pada kelompok kontrol dan uji. Analisis varian menggunakan uji Anova yang memberikan hasil berbeda secara bermakna $p = 0,06$ ($p < 0,05$) pada kelompok kontrol dan ketiga kelompok uji pada minggu pertama, sedangkan pada minggu kedua dan ketiga memberikan hasil tidak berbeda secara bermakna $p = 0,05$ dan $0,976$ ($p > 0,05$).

Tabel 4. Hasil uji beda *LSD test* rerata berat mencit antar kelompok minggu I

| Antar kelompok | <i>P</i> |
|----------------|----------|
| K-P1 | ,689 |
| K-P2 | ,029 |
| K-P3 | ,002 |
| P1-P2 | ,065 |
| P1-P3 | ,005 |
| P2-P3 | ,238 |

Uji Delta perubahan berat badan mencit

Sebelum dilakukan analisa dilakukan eksplorasi data terlebih dahulu. Pada eksplorasi data perubahan berat badan mencit, uji normalitas data dengan uji Shapiro-Wilk didapatkan bahwa berat badan mencit minggu 1 dan berat badan mencit minggu 3 tumor distribusi datanya normal. Pada pengujian homogenitas kelompok variabel dependen didapatkan bahwa data adalah homogen.

Tabel 5. Hasil uji delta pada variabel perubahan berat badan mencit

| Kelompok | Minggu I | | Minggu III | | t | p |
|-------------|----------|------|------------|------|-------|-------|
| | mean | SD | mean | SD | | |
| Kontrol | 16,7 | 1,34 | 16,6 | 1,67 | 0,354 | 0,698 |
| Perlakuan 1 | 17,0 | 1,30 | 16,7 | 2,03 | 0,736 | 0,495 |
| Perlakuan 2 | 18,8 | 1,39 | 16,6 | 3,06 | 2,557 | 0,051 |
| Perlakuan 3 | 19,9 | 2,09 | 17,1 | 1,94 | 8,251 | 0,000 |

Pada uji delta perubahan berat badan mencit didapatkan perubahan yang tidak bermakna pada kelompok perlakuan 1 ($p=0,495$) dan perlakuan 2 ($p=0,051$), sedangkan pada perlakuan 3 terdapat perubahan berat badan mencit yang bermakna ($p<0,001$). Hal ini menunjukkan bahwa terjadi suatu hambatan pertumbuhan berat badan mencit yang bermakna mulai pada kelompok perlakuan 3, dimana perubahan berat badan mencit pada minggu 1 dan minggu 3 didapatkan perbedaan yang cukup bermakna.

Nilai AgNOR

Sediaan-sediaan yang telah dipulas dengan AgNOR diperiksa secara manual menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 1000 kali yang ditetesi minyak emersi. Tidak dilakukan penghitungan pada daerah nekrosis, peradangan atau daerah dengan pulasan yang tidak adekuat. Penghitungan butir AgNOR dilakukan pada 100 inti sel tumor secara acak kemudian dihitung nilai rerata AgNOR dalam setiap sediaan.

Tabel 6. Nilai AgNOR pada tiap-tiap kelompok percobaan.

| Kelompok Percobaan | Nilai AgNOR | |
|--------------------------|-------------|------|
| | Mean | SD |
| Kontrol | 5,84 | 0,51 |
| Perlakuan 1 (4 mg/hari) | 3,17 | 1,40 |
| Perlakuan 2 (8 mg/hari) | 3,15 | 0,52 |
| Perlakuan 3 (16 mg/hari) | 4,58 | 1,06 |
| p^* | 0,002 | |

Ket. : [#]Kruskal Wallis $p<0,05$

Penghitungan butir AgNOR pada kelompok kontrol diperoleh nilai AgNOR $5.8 \pm 0,51$, sedangkan pada kelompok uji dosis 4 mg/hari $3,2 \pm 1,40$; dosis 8 mg/hari $3,2 \pm 0,52$ dan dosis 16 mg/hari $4,6 \pm 1,06$. Gambaran proliferasi dengan menggunakan pulasan AgNOR dapat dilihat pada **Gambar 4**. Uji normalitas data nilai AgNOR

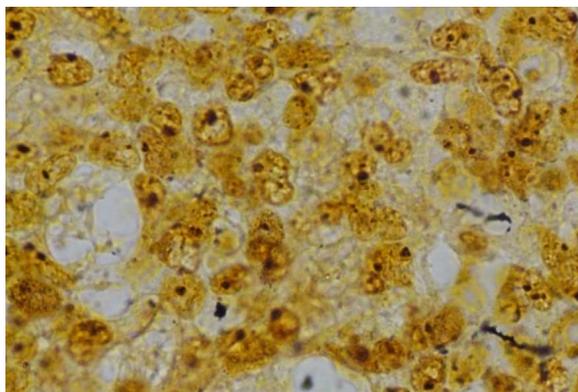
dengan uji Saphiro Wilk menunjukkan bahwa data terdistribusi normal. Uji homogenitas memperlihatkan data tidak homogen. Analisis yang digunakan adalah Kruskal Wallis menunjukkan hasil yang bermakna antara kelompok kontrol dan ketiga kelompok uji dengan nilai $p = 0,002$ ($p < 0,05$).

Tabel 7. Hasil uji beda nilai AgNOR antar kelompok

| Antar kelompok | <i>P</i> |
|----------------|----------|
| K-P1 | ,004 |
| K-P2 | ,004 |
| K-P3 | ,025 |
| P1-P2 | ,873 |
| P1-P3 | ,054 |
| P2-P3 | ,037 |

Mann-whithney test

Rerata nilai AgNOR pada kelompok P1 adalah lebih rendah secara bermakna dibandingkan kelompok K ($p=0,004$) dan hal yang sama didapatkan pada perbandingan antara kelompok P2 dengan K ($p=0,004$), kelompok P3 dengan kelompok K ($p=0,025$) serta kelompok P3 dibandingkan P2 ($p=0,037$). Didapatkan perbedaan tidak bermakna pada kelompok P1 dengan P2 ($p=0,873$) dan kelompok P1 dengan P3 ($p=0,054$).



Gambar 4. Pulasan AgNOR pemeriksaan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 kali.

Pada parameter proliferasi sel tumor yaitu nilai AgNOR menunjukkan bahwa terdapat daya hambat ekstrak sarang semut terhadap proliferasi sel tumor kelenjar susu mencit C3H pada dosis 4 mg/hari, 8 mg/hari dan 16 mg/hari selama 3 minggu berturut-turut setelah transplantasi tumor.

Penghitungan butir AgNOR pada kelompok kontrol diperoleh nilai AgNOR $5.8 \pm 0,51$, sedangkan pada kelompok uji dosis 4 mg/hari $3,2 \pm 1,40$; dosis 8 mg/hari $3,2 \pm 0,52$ dan dosis 16 mg/hari $4,6 \pm 1,06$. Analisis Kruskal Wallis menunjukkan hasil yang bermakna antara kelompok kontrol dan ketiga kelompok uji. Perbedaan nilai AgNOR terdapat pada kelompok kontrol dengan kelompok uji P1 (4 mg/hari), P2 (8 mg/hari), dan P3 (16 mg/hari). Aktifitas proliferasi terendah dijumpai pada kelompok perlakuan 2 (pemberian ekstrak sarang semut 8 mg/hari). Pada parameter pertumbuhan dan proliferasi yaitu volume tumor dan nilai AgNOR menunjukkan bahwa terdapat daya hambat ekstrak sarang semut terhadap pertumbuhan tumor kelenjar susu mencit C3H pada dosis 4 mg/hari, 8 mg/hari dan 16 mg/hari selama 3 minggu berturut-turut setelah transplantasi tumor. Volume tumor yang besar mungkin tidak hanya terdiri atas sel tumor saja tetapi juga dapat disebabkan oleh adanya stroma yang terdiri dari sel jaringan normal seperti sel darah dan fibroblast, yang pada beberapa kasus jumlahnya dapat melebihi jumlah sel neoplasma (Begg, 1997).

Indeks apoptosis

Pemeriksaan dilakukan secara acak dengan menggunakan mikroskop fluorescent pembesaran 40 kali. Sel yang mengalami apoptosis dihitung pada 100 sel tumor dalam 1 lapang pandang, sebanyak 5 lapang pandang. Indeks apoptosis dihitung menggunakan rumus : $IA = (\text{sel apoptosis} / \text{total sel tumor}) \times 100\%$ (Shiro *et al.*, 1993).

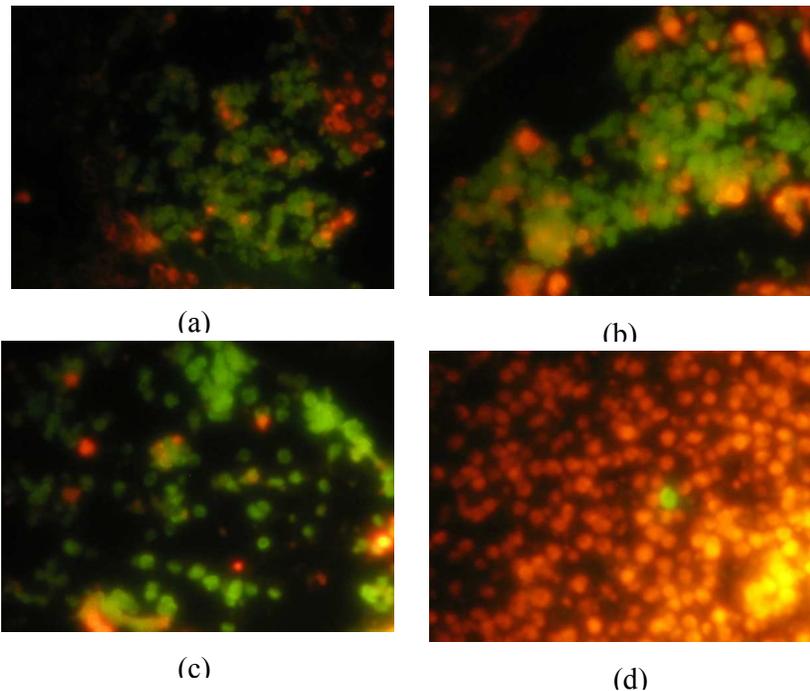
Tabel 8. Rerata Indeks apoptosis pada tiap-tiap kelompok percobaan.

| Kelompok Percobaan | Indeks Apoptosis | |
|--------------------------|------------------|------|
| | Mean | SD |
| Kontrol | 1,63 | 0,55 |
| Perlakuan 1 (4 mg/hari) | 2,90 | 0,46 |
| Perlakuan 2 (8 mg/hari) | 3,23 | 0,19 |
| Perlakuan 3 (16 mg/hari) | 2,90 | 0,35 |
| <i>P</i> * | 0,000 | |

Ket. : *ANOVA $p < 0,05$

Penghitungan indeks apoptosis memberikan hasil pada kelompok kontrol diperoleh indeks apoptosis sebesar $1,6 \pm 0,55$ sedangkan kelompok uji dosis 4 mg/hari $2,9 \pm 0,46$; dosis 8 mg/hari $3,2 \pm 0,196$; dosis 16 mg/hari $2,9 \pm 0,35$.

Secara histopatologis terlihat lebih banyak sel yang mengalami apoptosis pada kelompok P1, P2, dan P3 dibandingkan kontrol (**Gambar 5**). Sel yang mengalami apoptosis berwarna hijau dan dihitung dari sel tunggal, tidak berada pada daerah nekrosis dan tidak berada pada jaringan penunjang seperti fibroblas.



Gambar 5. (a) Tunel kelompok P1 skor 5; (b) Tunel kelompok P2 skor 5; (c) Tunel kelompok P3 skor 3; (d) Tunel kelompok kontrol skor 1. Pemeriksaan menggunakan mikroskop fluorescent dengan pembesaran 400 kali.

Uji normalitas data indeks apoptosis dengan uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan bahwa data terdistribusi normal antara kelompok kontrol dengan kelompok uji. Uji homogenitas menunjukkan data homogen. Analisis varian yang dilakukan dengan uji Anova satu arah memberikan hasil terdapat perbedaan bermakna $p = 0,000$ ($p < 0,05$) diantara kelompok penelitian, selanjutnya dilakukan uji LSD untuk mengetahui kelompok-kelompok yang memiliki perbedaan bermakna.

Rerata indeks apoptosis pada kelompok P1 adalah lebih tinggi secara bermakna dibandingkan kelompok K ($p=0,000$), hal yang sama didapatkan pada perbandingan antara kelompok P2 dengan K ($p=0,000$) dan kelompok P3 dengan K ($p=0,000$). Didapatkan perbedaan tidak bermakna pada kelompok P1 dengan P2 ($p=0,181$), P1 dengan P3 ($p=1,000$) dan P2 dengan P3 ($P=0,181$).

Tabel 9. Hasil uji beda *LSD test* indeks apoptosis antar kelompok

| Antar Kelompok | <i>p</i> |
|----------------|----------|
| K-P1 | ,000 |
| K-P2 | ,000 |
| K-P3 | ,000 |
| P1-P2 | ,181 |
| P1-P3 | 1,000 |
| P2-P3 | ,181 |

Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa sarang semut yang didalamnya mengandung flavonoid yang dapat memacu kematian sel melalui apoptosis, dimana terdapat perbedaan bermakna indeks apoptosis antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Indeks apoptosis tertinggi dijumpai pada kelompok perlakuan 2 (pemberian ekstrak sarang semut 8 mg/hari).

Peningkatan indeks apoptosis pada kelompok perlakuan disebabkan karena flavonoid dapat menstimulasi produksi interferon- γ (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 (Amit *et al.*, 2001; Tazulakhova *et al.*, 2001; Abbas *et al.*,2005). 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).

Jalur lain yang dapat mengaktifkan caspase adalah melalui Fas –reseptor (CD95). Flavonoid pada tanaman obat dapat berfungsi sebagai Fas-ligand yang akan memicu apoptosis sel melalui Fas-reseptors (Abbas *et al.*,2005; Lieberman, 2003; Soini *et al.*, 2008). Pada penelitian yang dilakukan di Cleveland University, diketahui bahwa metabolit flavonoid dalam teh hijau dapat menginduksi terjadinya apoptosis melalui jalur TNF- α (Tazulakhova *et al.*, 2001). Sarang semut mengandung flavonoid ternyata yang mempunyai efikasi cukup bermakna dalam meningkatkan indeks apoptosis.

Perbandingan indeks apoptosis dengan nilai AgNOR

Sebelum dilakukan analisa perbandingan indeks apoptosis dengan nilai AgNOR pada kelompok percobaan, dilakukan eksplorasi data terlebih dahulu dengan hasil sebagai berikut:

Tabel 10. Perbandingan indeks apoptosis dengan nilai AgNOR pada tiap-tiap kelompok percobaan.

| Kelompok Percobaan | Indeks Apoptosis / Nilai AgNOR | |
|--------------------------|--------------------------------|------|
| | Mean | SD |
| Kontrol | 0,28 | 0,11 |
| Perlakuan 1 (4 mg/hari) | 1,14 | 0,66 |
| Perlakuan 2 (8 mg/hari) | 1,04 | 0,13 |
| Perlakuan 3 (16 mg/hari) | 0,66 | 0,19 |
| <i>P#</i> | 0,001 | |

Ket. : [#]Kruskal Wallis $p < 0,05$

Bila besarnya indeks apoptosis dibandingkan dengan proliferasi (nilai AgNOR), maka diperoleh data kelompok kontrol $0,3 \pm 0,11$; pada kelompok uji ekstrak sarang semut dosis 4 mg/hari $1,1 \pm 0,66$; dosis 8 mg/hari $1,0 \pm 0,13$; dosis 16 mg/hari $0,7 \pm 0,19$. Uji normalitas data perbandingan indeks apoptosis dengan nilai AgNOR menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan bahwa data terdistribusi normal antara kelompok kontrol dengan kelompok uji. Uji homogenitas menunjukkan data tidak homogen. Analisis varian yang digunakan adalah Kruskal Wallis memberikan hasil terdapat perbedaan bermakna $p = 0,001$ ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol dengan ketiga kelompok perlakuan.

Tabel 11. Hasil uji beda *Mann-whithney test* perbandingan indeks apoptosis dengan nilai AgNOR tiap kelompok percobaan

| Antar kelompok | <i>p</i> |
|----------------|----------|
| K-P1 | ,004 |
| K-P2 | ,004 |
| K-P3 | ,004 |
| P1-P2 | ,873 |
| P1-P3 | ,197 |
| P2-P3 | ,015 |

Perbedaan rerata perbandingan indeks apoptosis dengan nilai AgNOR tiap kelompok percobaan secara bermakna terjadi antara kelompok kontrol dengan ketiga kelompok uji P1 (4 mg/hari), P2 (8 mg/hari) dan P3. (16 mg/hari).

Dibandingkan dengan proliferasi atau indeks apoptosis dibagi dengan nilai AgNOR maka pada kelompok kontrol diperoleh nilai $0,3 \pm 0,11$; pada kelompok perlakuan ekstrak sarang semut dosis 4 mg/hari $1,1 \pm 0,66$; dosis 8 mg/hari $1,0 \pm 0,13$; dosis 16 mg/hari $0,7 \pm 0,19$. Setelah dianalisis secara statistik memberikan hasil terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol dengan ketiga kelompok uji. Data ini menunjukkan bahwa kecepatan terjadinya apoptosis sel tumor lebih tinggi daripada kecepatan proliferasi sel tumor.

Ekstrak sarang semut mempunyai potensi sebagai imunostimulator dan sitostatika. Sarang semut sebagai sumber alternatif penggunaan obat-obat sitostatika yang saat ini harganya relatif mahal. Peneliti juga menyadari masih banyak hal yang harus diteliti untuk melengkapi/menyempurnakan penelitian ini. Bila memungkinkan penelitian ini dapat ditingkatkan menjadi uji klinis pada manusia.

KESIMPULAN

1. Pemberian ekstrak sarang semut dengan dosis bertingkat (4mg/hari, 8mg/hari dan 16 mg/hari) menurunkan aktifitas proliferasi dan meningkatkan indeks apoptosis pada sel adenokarsinoma mamma mencit C3H.
2. Dosis 4 mg/hari sudah menampakkan penurunan aktifitas proliferasi dan peningkatan indeks apoptosis pada sel adenokarsinoma mamma mencit C3H.
3. Dosis 8 mg/hari mempunyai kemampuan tertinggi dalam menurunkan aktifitas proliferasi pada sel adenokarsinoma mamma mencit C3H dibandingkan dosis 4 mg/hari dan dosis 16 mg/hari.
4. Dosis 8 mg/hari mempunyai kemampuan tertinggi dalam meningkatkan indeks apoptosis pada sel adenokarsinoma mamma mencit C3H dibandingkan dosis 4 mg/hari dan dosis 16 mg/hari.
5. Peningkatan dosis ekstrak sarang semut tidak diikuti dengan penurunan aktifitas proliferasi.
6. Peningkatan dosis ekstrak sarang semut tidak diikuti dengan peningkatan indeks apoptosis.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders; 2005. p. 4-15,22-3,65-80,81-103,1827,247-53,258-9,266,268-9,279-80,290-5.
- Amit KT, Madhumita R, Bhattacharya RK. Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Current Science* 2001;80(11):1387-96.
- Begg AC. Cell Proliferation in tumours in Basic clinical radiobiology ed 2nd. Arnold. London. 1997; 14-5
- Breast Cancer : Statistics on Incidence Survival, and Screening. (cited on August 2008). Available from: URL <http://www.imaginis.com/breasthealth/statistics.asp>
- Budiani DR, Setiawan Y, Wijono WY, Pesik RN, Dlidir D, Mudigdo A. Pengaruh Ekstrak Batang Sarang Semut (*Myrmecodia pendans*, Merr & Perry) Terhadap Ekspresi Protein p53 Mutan Galur Sel Kanker Payudara T47D.PIT,IAPI Banjarmasin,2007.
- Cox C. Inhibition of the growth of squamous cell carcinoma by tetrathiomolybdate-induced copper suppression in a murine model. *Circulation research*.2004; 95:415
- Departemen Kesehatan RI. Obesitas dan Kurang Aktivitas Fisik Menyumbang 30% Kanker. (cited on February 2010) Available from URL: <http://www.depkes.go.id/index.php?option=news&task=viewarticle&sid=3328>
- Fonseca LM, do Carmo MAV. AgNORS in hyperplasia, papilloma and oral squamous cell carcinoma. Universidade Federal de Minas Gerais.[on line]. [cited 2008 May 4]. Available from : URL, : <http://www.forp.usp.br/bdj/bdj11920/t05112.html>
- Lieberman J. The ABCS of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immuno*2003;5(3):361-70.
- Lisdawati V. Mahkota Dewa, toksisitas, efek anti oksidan, dan efek antikanker berdasarkan uji penapisan farmakologi. Jakarta (INA): PT Phaleria macrocarpa; 2002. (cited on July 2008). Available from URL: <http://www.indonetwork.phalerindofarma/34716.htm>
- Padmi Tri Hartini. Hubungan antara hitung AgNOR dengan grading histology pada karsinoma duktus infiltratif payudara. Thesis. Semarang 2002 : 22.
- Pane M. Aspek klinis dan epidemiologis penyakit kanker payudara.2002 (cited on November 2008). Available from: URL <http://www.tempo.co.id/medika/arsip/082002/pus-3.htm>
- Purnawati RD, Miranti IP, Dharmana E, Tjahjono. Pengaruh Ganoderma *Lucidum* (Jamur Lingzhi) terhadap Ekspresi Perforin Sel Mononuklear dan Derajat Histologik Adenokarsinoma Mamma Mencit C3H. *Media Medika Indonesiana*. 2006; 41(3); 140

- Riset Ilmiah Sarang Semut. (cited on June 2008). Available from: URL <http://trubusonline.co.id/mod.php?mod=publisher&op=printarticle&artid=295>
- Roitt IM. Essential Immunology. 8th ed. Barcelona: Times Miror International: 1994. p. 354-5.
- Sadhana U. Kanker payudara wanita: ekspresi reseptor esterogen, reseptor progesterone dan HER-2. Media Media Muda, 2006; 3:1-6
- Sarjadi, Trihartini. Cancer registration in Indonesia Asian Pasific. J Cancer 2001;2:21-4.
- Shiro T, Toshihito S, Yuji N, Kyoichi I, Akihiro O. A correlation of argyrophilic nucleolar organizer regions with stages of hepatocellular carcinoma. Cancer. 1993; 71(1): 44-9
- Soini Y, Paakko P, Lehto V. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. Am J Pathol 1998;153:1041-53. (cited on June 2008). Available from: URL: <http://www.ajp.amjpathol.org/cizi/content/full/153/4/1041>
- Subroto MA. Sekilas Sarang Semut. (cited on June 2008). Available from URL : <http://www.deherba.com/sekilas-sarang-semut.html>
- Sugito H. Kanker di Indonesia tahun 1994: Data Histopatologik. Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia. Jakarta (INA): Dirjen YanMed Dep. Kes RI; 1994. p. 3-G.
- Sumastuti R, Sonlimar M. Efek sitotoksii: elatrak buah dan daun Nlakhota Dewa terhadap sel hela. Yogyakarta: Farmakologi FK UGM; 2003. p. 112.
- Tazulakhova EB, Parshina OV, Guseva TS, Ershov Fl. Russian experience in screening, analysis, and clinical application of novel interferon inducers. J Interferon Cytol:ine Res 2001;21(2):65-73.