

**PENGARUH DERIVAT KUMARIN DARI KULIT BATANG
Calophyllum biflorum TERHADAP PERTUMBUHAN
IN VIVO TUMOR KELENJAR SUSU MENCIT C3H**

Lies K Wibisono

Bagian Kimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jl. Salemba Raya No. 6, Jakarta, 10430

E-mail: lieskw@cbn.net.id

Abstrak

Kalanon merupakan derivat kumarin yang diisolasi dari kulit batang *Calophyllum biflorum*. Untuk mengetahui pengaruh kalanon terhadap pertumbuhan *in vivo* tumor transplantabel kelenjar susu, telah dilakukan penelitian dengan menggunakan mencit C3H. Mencit dibagi dalam enam kelompok, yaitu kelompok kontrol tanpa perlakuan, kelompok kontrol pelarut yang disuntik 0,1 mL pelarut PEG 400, dan 4 kelompok perlakuan masing-masing disuntik 0,1 mL larutan kalanon dalam PEG 400 dengan dosis 1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL, dan 8 mg/mL. Penyuntikan secara subkutis di sekitar tumor dilakukan tiga kali seminggu selama 4 minggu. Dari hasil uji statistik non parametrik menurut metode Friedman terhadap besar tumor, terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok dosis 4 mg/mL dibandingkan dengan kedua kelompok kontrol dan kelompok dosis lainnya.

Abstract

The effect of coumarin derivate from the stem bark of *Calophyllum biflorum* on the in vivo growth of transplantable C3H mammary tumor cells. Calanone, is a coumarin derivate which was isolated from the stem bark of *Calophyllum biflorum*. To know the effect of calanone on the in vivo growth of transplantable C3H mammary tumor cells, C3H mice were used which were divided into : one group of untreated control, one group of solvent control (injected with 0,1 mL PEG 400) and four treated groups, each of which were injected subcutaneously near the tumor with 0,1 mL of 1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL, and 8 mg/mL of calanone in PEG 400 solvent respectively. The injections were given three times a week, for four weeks. By using Friedman test, for non parametric statistical analysis of the weekly observed tumor volume, it was shown that there was a significant decrease in the tumor growth of the group treated with calanone solution of 4 mg/mL dosage, compared to the control or other groups.

Keywords: Calophyllum biflorum, calanone, tumor, mice

Pendahuluan

Permasalahan kanker di Indonesia sebenarnya sudah dirasakan sejak awal abad 20. Pada dekade terakhir abad 20 ini, kanker sebagai salah satu penyakit kronis, dirasakan perkembangannya makin menonjol. Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 1972, 1980, 1986, dan 1992, memperlihatkan bahwa kanker termasuk dalam 10 penyebab kematian utama¹. Salah satu alternatif pengobatan adalah pemanfaatan tanaman untuk pengobatan. Pemanfaatan tanaman baik sebagai obat tradisional maupun sebagai jamu, sudah merupakan warisan bangsa yang berakar kuat dalam masyarakat Indonesia.

Berbagai spesies *Calophyllum* yang tumbuh di hutan tropis Kalimantan dan Malaysia, ternyata mengandung berbagai macam senyawa yang dapat dimanfaatkan untuk pengobatan dan sudah sejak lama digunakan sebagai obat tradisional. Getah pohon *Calophyllum inophyllum* (nyamplung) dan *Calophyllum tallichianum* (betur terujam) banyak digunakan sebagai obat penyakit kulit, sedang biji nyamplung digunakan antara lain sebagai obat rematik dan kanker². Dari sekitar 100 jenis *Calophyllum*, telah dilakukan penelitian terhadap sekitar 20 jenis, dan telah berhasil diisolasi berbagai senyawa terpenoid, xanton, flavonoid, dan senyawa derivat kumarin.

Kumarin dan turunannya sudah sejak lama digunakan sebagai antikoagulan⁴ dan peneliti terdahulu juga

melaporkan manfaat senyawa derivat kumarin untuk mencegah pertumbuhan sel-sel kanker⁵.

Dari kulit batang *Calophyllum biflorum* yang tumbuh di hutan tropis Kalimantan, telah berhasil diisolasi suatu senyawa derivat kumarin, yang diidentifikasi sebagai kаланon⁷.

Penelitian ini dilakukan sebagai tahap awal untuk mengetahui pengaruh kаланon terhadap pertumbuhan sel tumor transplantabel kelenjar susu mencit C3H. Penelitian dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan mencit C3H sebagai hewan coba.

Eksperimental

Kаланon yang digunakan merupakan hasil isolasi dari serbuk kulit batang *Calophyllum biflorum*⁷.

Untuk transplantasi digunakan seekor mencit C3H bertumor sebagai donor. Mencit donor dimatikan dengan cara dibius dengan eter. Jaringan tumor yang akan ditransplantasikan, dibersihkan dari pembuluh darah dan sel-sel yang sudah mengalami nekrosis. Tumor kemudian digunting-gunting, sehingga menjadi bubuk dan ditambahkan larutan garam fisiologis dengan perbandingan kira-kira 1:1. Bubur tumor sebanyak 0,2 mL disuntikkan secara subkutis ke setiap mencit resipien. Sebagai resipien digunakan 24 ekor mencit betina hibrid F-1 (C3H×GR) umur 8-12 minggu, berat 18 – 20 g, belum pernah mempunyai anak. Mencit resipien dibagi menjadi enam kelompok dan setiap kelompok diberi perlakuan yang berbeda. Dosis tertinggi penyuntikan kumarin adalah 40 mg/kg berat badan dan pemilihan dosis ini berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Von Angerer dan kawan-kawan⁸ yang mengamati aktivitas antitumor dari kumarin terhadap pertumbuhan tumor kelenjar susu tikus.

Ko: kelompok mencit kontrol tanpa perlakuan

Kp: kelompok mencit kontrol perlakuan yang disuntik dengan 0,1 mL pelarut polietilenglikol (PEG 400)

D1: kelompok mencit yang disuntik 0,1 mL larutan derivat kumarin dalam PEG dengan kadar 1 mg/mL

D2: kelompok mencit yang disuntik 0,1 mL larutan derivat kumarin dalam PEG dengan kadar 2 mg/mL

D4: kelompok mencit yang disuntik 0,1 mL larutan derivat kumarin dalam PEG dengan kadar 4 mg/mL

D8: kelompok mencit yang disuntik 0,1 mL larutan derivat kumarin dalam PEG dengan kadar 8 mg/mL

Jumlah ulangan mencit percobaan untuk rancangan acak lengkap dihitung berdasarkan rumus Federer $t(n-1) \geq 15$, di mana n menyatakan jumlah ulangan dan t menyatakan jumlah perlakuan⁹. Karena ada enam macam perlakuan, maka n minimum adalah empat. Setiap mencit dalam satu kelompok diberi penomoran secara acak. Penyuntikan awal larutan kumarin dilakukan pada hari yang sama setelah transplantasi. Kecuali mencit dari kelompok kontrol, mencit-mencit kelompok lain disuntik secara subkutis di daerah abdomen tiga kali seminggu selama empat minggu. Pengamatan mulai dilakukan setelah melewati periode laten, yaitu tiga hari setelah transplantasi.

Parameter yang diselidiki adalah besar tumor. Pengukuran besar tumor dilakukan dengan menggunakan kaliper dan diukur panjang, lebar, serta tingginya.

Pengukuran awal dilakukan seminggu setelah transplantasi dan diulangi setiap minggu sampai minggu keempat. Untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian kаланon terhadap besar tumor, dilakukan uji nonparametrik dua arah menurut metode Friedman's¹⁰.

Hasil dan Pembahasan

Hasil pengukuran besar tumor setiap minggu dapat dilihat pada Tabel 1. Uji statistik yang digunakan adalah uji nonparametrik dua arah menurut metode Friedman. Dari hasil uji non parametrik Friedman, ternyata perlakuan dosis dan perlakuan waktu berpengaruh sangat nyata terhadap besar tumor pada tingkat kepercayaan lebih kecil dari satu persen. Untuk perlakuan dosis diperoleh nilai χ^2 hitung = 17,6071 (χ^2 tabel (5;1%) = 15,086) dan untuk perlakuan waktu diperoleh nilai χ^2 hitung = 45,65 (χ^2 tabel (3;1%) = 11,341).

Uji berganda Friedman untuk besar tumor yang berhubungan dengan perlakuan dosis memberikan hasil akhir seperti tertera pada Tabel 2.

Dari uji berganda Friedman untuk perlakuan dosis ternyata ada beda yang bermakna untuk besar tumor dari mencit kelompok kontrol pelarut dengan kelompok yang disuntik kаланon dengan dosis 1 mg/mL dan 2 mg/mL. Beda besar tumor yang bermakna juga dijumpai antara kelompok mencit yang disuntik kаланon dengan dosis 1 mg/mL dan 2 mg/mL dengan kelompok yang disuntik kаланon dengan dosis 8mg/mL. Beda besar tumor yang sangat bermakna dijumpai antara kelompok mencit yang disuntik kаланon dengan dosis 1mg/mL dan 2 mg/mL dengan kelompok mencit yang disuntik kаланon dengan kadar 4 mg/mL.

Tabel 1. Data besar tumor mencit (dalam cm³) pada pengukuran setiap minggu

	<p>sangat bermakna antara besar tumor pada minggu pertama dan kedua dengan besar tumor pada minggu ketiga dan keempat. Sedangkan besar tumor pada minggu pertama tidak menunjukkan beda yang bermakna dengan besar tumor pada minggu kedua, demikian juga besar tumor pada minggu ketiga dengan minggu keempat.</p> <p>Interaksi perlakuan dosis dan waktu, ternyata juga berpengaruh sangat nyata terhadap besar tumor pada uji nonparametrik Friedman, dengan nilai χ^2 hitung = 49,3275 (χ^2 tabel (23;1%) = 41,638).</p> <p>Untuk besar tumor yang berhubungan dengan perlakuan dosis dan waktu memberikan hasil akhir uji berganda Friedman tampak seperti tertera pada Tabel 4. Dari data tersebut ternyata bahwa interaksi perlakuan dosis dan waktu juga berpengaruh terhadap besar tumor. Hal ini terlihat antara lain pada kelompok mencit yang disuntik kalanon dengan dosis 4 mg/mL yang menunjukkan perbedaan besar tumor dengan kelompok perlakuan lainnya, kecuali dengan kelompok dosis 8 mg/mL.</p> <p>Jika dihitung pertumbuhan besar tumor rata-rata untuk tiap kelompok perlakuan pada pengukuran setiap minggu, maka akan diperoleh data seperti terlihat pada Tabel 5. Dari tabel tersebut juga terlihat bahwa besar tumor untuk tiap kelompok juga sangat heterogen, dan ini terbukti dari nilai standar deviasi yang cukup besar untuk tiap kelompok. Salah satu kemungkinan, besar tumor dalam satu kelompok heterogen, adalah variasi biologik yaitu variasi antar individu dalam besarnya respons terhadap dosis yang sama dari suatu obat¹¹.</p> <p>Jika tabel tersebut dikonversikan menjadi grafik pertumbuhan besar tumor rata-rata pada pengukuran setiap minggu, maka akan diperoleh grafik seperti terlihat pada Gambar 1. Dari gambar grafik pertumbuhan tersebut, terlihat bahwa kelompok mencit yang disuntik kalanon dengan dosis 4 mg/mL, menunjukkan pertumbuhan yang paling kecil dan hal ini sesuai dengan uji nonparametrik yang juga menunjukkan perbedaan yang bermakna antara besar</p>
--	--

Uji berganda Friedman untuk besar tumor yang berhubungan dengan perlakuan waktu memberikan hasil akhir seperti tertera pada Tabel 3. Dari hasil uji berganda Friedman untuk perlakuan waktu ternyata ada beda yang

Tabel 2. Uji berganda Friedman untuk besar tumor dengan perlakuan dosis

--

*) berbeda nyata (p<0,05) ; **) berbeda sangat nyata (p<0,01)

Tabel 3. Uji berganda Friedman untuk besar tumor dengan perlakuan waktu

<p>*) berbeda nyata ($p < 0,05$) ; **) berbeda sangat nyata ($p < 0,01$)</p>
--

tumor kelompok dosis ini dengan besar tumor kelompok dosis lainnya. Dari gambaran grafik tersebut, terlihat juga bahwa dosis 4 mg/mL lebih menghambat pertumbuhan tumor dibandingkan dengan dosis yang lebih tinggi, yaitu dosis 8 mg/mL. Mungkin dosis 4 mg/mL, merupakan dosis yang memberikan efek yang paling optimal, jika ditinjau dari hubungan dosis dan intensitas obat ¹¹.

Dari hasil uji statistik nonparametrik dan dari grafik pertumbuhan besar tumor rata-rata setiap minggu, ada kecenderungan pengaruh daya hambat kulanon pada dosis tertentu terhadap besar tumor. Hal ini sesuai dengan penelitian Angerer dan kawan-kawan ⁸ yang menyatakan bahwa pemberian kumarin dengan dosis 40 mg/kg berat badan, dan yang diberikan tiga kali seminggu akan menghambat pertumbuhan tumor prostat pada tikus strain

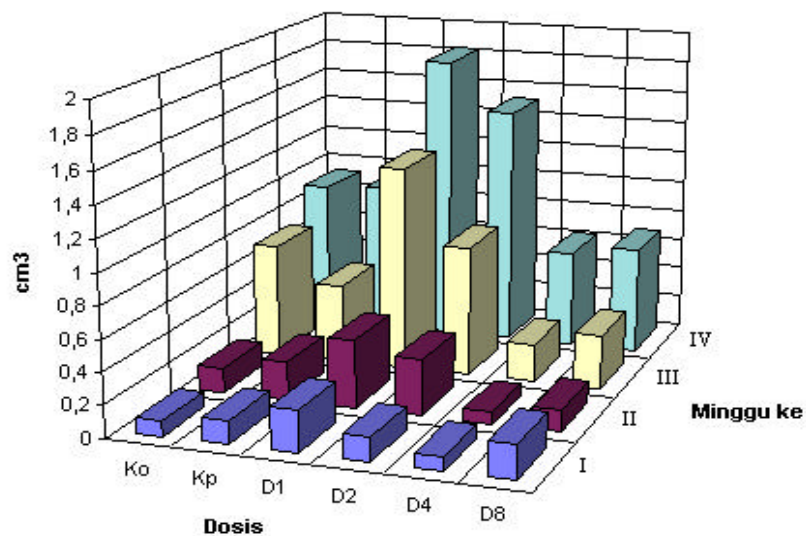
Noble Nb-R. Pemberian kumarin dengan dosis 40 mg setiap hari juga dapat menghambat metastase tumor paru. Penelitian awal dari peneliti yang sama juga menunjukkan bahwa tumor kelenjar susu tikus juga sensitif terhadap kumarin dan 7-hidroksi kumarin. Penelitian Myers dan kawan-kawan ¹² dengan menggunakan *cell lines*, juga menunjukkan bahwa kumarin dapat menghambat proliferasi sel karsinoma ginjal dan sel kanker prostat. Penelitian yang dilakukan Thornes dan kawan-kawan ¹³ menunjukkan bahwa pengobatan dengan kumarin dapat mencegah timbulnya kembali melanoma ganas pada penderita yang sebelumnya mengalami melanoma. Hasil ini diperoleh dengan membandingkannya dengan penderita yang sudah sembuh dan kemudian diberi plasebo sebagai pengganti kumarin.

Tabel 4. Uji berganda Friedman untuk besar tumor terhadap perlakuan dosis dan waktu

<p>$R_i - R_j _{0,01} = 51,5(**)$</p>

Tabel 5. Data pertumbuhan besar tumor rata-rata (dalam cm³) pada pengukuran setiap minggu

--



Gambar 1. Grafik pertumbuhan besar tumor rata-rata pada pengukuran tiap minggu

Kesimpulan

Penyuntikan kalanon pada berbagai dosis, mulai dosis 1 mg/mencit sampai 8 mg/mencit, tiga kali seminggu, selama 4 minggu, secara kuantitatif berpengaruh pada pertumbuhan besar tumor mencit C3H, pada pengukuran setiap minggu. Dosis yang paling berpengaruh terhadap pertumbuhan besar tumor adalah dosis 4 mg/mencit.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Prof.Dr.Soleh Kosela M.Sc. dan Prof.dr. Sudarto Pringgoutomo Sp.PA yang telah membimbing penulis dalam melaksanakan penelitian ini.

Daftar Acuan

1. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan, *Pusat Penelitian Penyakit Tidak Menular. Rancangan Program Penelitian Penyakit Kanker dan Kesehatan Radiasi Repelita VI*. Disajikan Dalam Pra Lokakarya Tingkat Puslitbang, 1993 Agustus 2-7.
2. Eisai. *Medicinal Herb Index in Indonesia*, PT Eisai Indonesia, 1986.
3. Heyne K. *Tumbuhan Berguna Indonesia II*, Badan Litbang Dep. Kehutanan, 1987.
4. Guyton AC. *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia: WB Saunders Co, 1991.
5. Berkarda B, Bouffard-Eyuboglu H, *Derman U. Agents-Actions* 1983; 13: 50.
6. Nair RV, Fisher EP, Safe SH, Cortez C, Harvey RG, *J DiGiovanni. Carcinogenesis* 1991; 12: 65.
7. Wibisono LK, Kosela S. *Akta Kimia* 1996; 6: 36.
8. Angerer E, Kager M, Maucher A. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990; 120 (Suppl): S14.
9. Srigandono B. *Rancangan Percobaan*, Universitas Diponegoro, Semarang, 1981.
10. Daniel WW. *Statistika Nonparametrik Terapan*, Alih Bahasa Alex Tri Kancono. Jakarta: PT Gramedia, 1989.
11. Setiawati A, Zunilda SB, Suyatna FD. In: Gan S. *Pengantar Farmakologi, dalam Farmakologi dan Terapi*, 4th ed. Jakarta: Bagian Farmakologi FKUI, 1995.
12. Myers RB, Parker M, Grizzle WE. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120 Suppl: 11.
13. Thornes RD, Daly L, Lynch G, Breslin B, Browne H, Browne HY et.al. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120 Suppl: 32.