

**EKSTRAK PURWACENG (*PIMPINELLA ALPINNA*) SEBAGAI AGEN
KEMOPREVENTIF DAN KEMOTERAPI KANKER PARU (KAJIAN
ANTIPROLIFERATIF SERTA UJI APOPTOSIS MELALUI JALUR P53, BCL-2, RB
DAN CASPASE- 9)**

Fariz Ihsan^{1,*}, Indra Setyawan¹, Suniawan Satrio¹, Ayunda Dewi Jayanti¹, Shahylananda Tito¹,
Elizabeth Henny Herningtyas²

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta, ²Bagian Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada,
Yogyakarta. Email: ihsan_fire@yahoo.co.id

ABSTRAK

*Kanker paru merupakan kanker urutan ke-3 terbanyak dan penyebab kematian utama pada pria yang kemoterapinya memberikan banyak efek samping sehingga perlu dicari kemoterapi alternatif. Kumarin psoralidin diketahui memiliki efek kemotoksik pada sel kanker dan terkandung di dalam purwaceng (*Pimpinella alpinna*) namun efek ekstrak air *Pimpinella alpinna* sebagai agen antiproliferasi, sitotoksik, penginduksi apoptosis, dan jalur mekanismenya pada sel kanker belum diteliti secara ilmiah. Penelitian eksperimental murni dengan kultur sel kanker paru A549 ini menggunakan rentang dosis ekstrak purwaceng 1-10.000 µg/mL dan rentang dosis kontrol positif cisplatin 1-10 µg/mL yang direplikasi 6 kali serta dengan rentang waktu inkubasi 24-72 jam. Pada uji sitotoksik dengan inkubasi 24 jam yang dideteksi dengan pewarnaan MTT didapatkan IC_{50} sebesar 3.862 µg/mL, sedangkan uji antiproliferasi dengan dosis 550 dan 275 µg/mL mampu menghambat kecepatan pertumbuhan sel 24 jam pertama dan kedua terhadap kontrol. Uji ANOVA satu jalan menunjukkan terdapat perbedaan bermakna rerata kadar ekstrak purwaceng terhadap variasi waktu ($p < 0.05$). Uji apoptosis yang dideteksi menggunakan fluoresensi etidium bromide-acridine orange mendapatkan nilai EC_{50} sebesar 5.271 µg/mL yang ditandai dengan penurunan ekspresi Rb dan bcl-2 serta peningkatan p53 dan caspase-9. Statistik Chi-Square menunjukkan proporsi efek IC_{50} pada ekspresi gen berbeda secara bermakna ($p < 0.05$) terhadap kontrol. Dapat disimpulkan bahwa *Pimpinella alpinna* mempunyai efek antiproliferasi dan sitotoksik terhadap sel kanker paru A549 dan menginduksi apoptosis melalui perubahan jalur apoptosis berupa penurunan ekspresi Rb dan bcl-2 serta peningkatan p53 dan caspase-9.*

Kata kunci: *Pimpinella alpinna*, kanker paru, antiproliferasi, sitotoksik, apoptosis.

1. PENDAHULUAN

Setiap penyakit kanker hingga saat ini masih dianggap sebagai ancaman kematian yang utama bagi sebagian orang (Sabrina, 2009). Menurut WHO, kanker juga merupakan masalah utama di dunia dan pada tahun 2008 kanker adalah penyebab kematian tertinggi di dunia yaitu mencapai 7,6 juta kematian atau sekitar 13 % dari seluruh kematian (WHO, 2008). Kematian yang disebabkan kanker diperkirakan akan terus meningkat

sampai tahun 2030 dan akan mencapai 11 juta kematian (IUCC, 2009).

Di antara penyakit kanker yang ada, kanker paru memiliki prevalensi tertinggi di dunia dengan 18 % dari total kanker (WHO, 2008). Selain itu, kanker paru diakui mempunyai tingkat insidensi yang tinggi di dunia karena sebanyak 17% insidensi terjadi pada pria (peringkat kedua setelah kanker prostat) dan 19% pada wanita (peringkat ketiga setelah kanker payudara dan kanker kolorektal) (Ancuceanu and

Victoria, 2004). Insidensi kanker ini cenderung meningkat hingga 0,5% setiap tahunnya, terutama di negara – negara berkembang. Negara-negara berkembang yang dimaksud adalah negara yang paling rentan memiliki banyak faktor risiko, salah satunya Indonesia. Indonesia memiliki prevalensi yang tinggi terhadap salah satu faktor risiko kanker paru yaitu konsumsi rokok (WHO Indonesia & DepKes RI, 2003). Selain itu, berdasarkan keterangan Global Adult Tobacco Survey (GATS), sebuah survei global standar untuk memonitor penggunaan tembakau di suatu negara, menunjukkan prevalensi perokok aktif pria di Indonesia sebesar 67,4 persen. Peningkatan konsumsi rokok di suatu populasi ini yang akan meningkatkan pula prevalensi kejadian kanker paru (Sat Sharma, 2009).

Telah banyak upaya yang dilakukan untuk mengatasi penyakit kanker paru yang prevalensinya begitu tinggi di dunia. Pemberian kemoterapi sebagai pengobatan pada kanker paru sering menimbulkan efek samping berupa mual, muntah (Abdul muthalib, 2006), kelelahan, kehilangan nafsu makan (National cancer center Singapore, 2012) dan kerontokan rambut (Wills *et al.*, 2009). Penderitaan yang dialami pasien kanker paru akibat efek samping kemoterapi tersebut akan mempengaruhi kondisi psikologis pasien menjadi lebih buruk sehingga proses penyembuhan akan semakin lama.

Hal tersebut mendorong dilakukannya pencarian sumber obat baru yang berasal dari alam, salah satunya adalah tanaman herbal. Kekayaan Indonesia akan tanaman herbal merupakan suatu

2. METODE

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental murni dengan metode *post test only with control group design*.

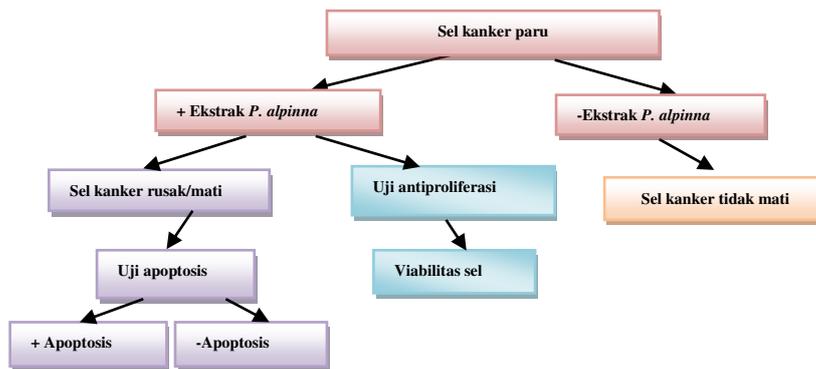
Rancangan Penelitian

keuntungan untuk mengembangkan berbagai penelitian di bidang medis (Indrayani *et al.*, 2006).

Pimpinella alpinna merupakan salah satu tanaman herbal yang berpotensi untuk mengobati penyakit kanker. Kumarin yang terkandung dalam akar *Pimpinella alpinna* dalam bentuk kumarin psoraldin. Kumarin psoraldin meningkatkan efek anti kanker pada nekrosis tumor. Psoraldin adalah furanokumarin alami terisolasi dari *coryfoliapsoralea* yang memiliki sifat anti kanker dan kemopreventif yang memicu apoptosis pada sel kanker tanpa toksisitas terhadap jaringan normal (Medical University of Silesia in Katowice, Jordana 19, 41-808). Selain kumarin, kandungan Alkaloida pada akar *Pimpinella Alpinna* juga berpotensi sebagai agen anti kanker dengan menghambat proliferasi (antiproliferatif) dan menginduksi proses apoptosis dari sel kanker tersebut (Sreelatha *and* padma, 2009).

Berdasarkan manfaat tanaman *Pimpinella alpinna* sebagai afrodisiak atau penambah vitalitas pria, yang mana faktor risiko kanker paru yakni merokok juga menjadi suatu prevalensi yang tinggi pada pria di Indonesiaserta belum adanya penelitian yang secara spesifik mengevaluasi efektivitas akar *Pimpinella alpinna* pada pencegahan dan penyembuhan penyakit kanker paru melalui aktivitas anti kanker yaitu apoptosis dan antiproliferasi sel kanker, sehingga hal tersebut mendasari diadakannya penelitian untuk mengetahui potensi akar *Pimpinella alpinna* dalam proses pencegahan dan penyembuhan penyakit kanker paru.

Penelitian ini akan dilaksanakan dalam rentang waktu empat bulan.



Pembuatan larutan uji dan kontrol

Pimpinella alpina kering dihaluskan menjadi serbuk, lima ratus gram diaduk dalam tujuh bagian air distilat 80° C selama 2 jam, dan di dinginkan dalam suhu ruangan. Supernatan diambil setelah larutan disaring. Masing masing larutan dievaporasi menggunakan rotator evaporator. Cisplatin(kontrol) dibuat dalam berbagai konsentrasi dengan pengenceran menggunakan medium.

Standarisasi Ekstrak (pengujian kandungan kimia ekstrak)

Pengujian dilakukan terhadap parameter non spesifik yang meliputi *penetapan kadar air*, *penetapan kadar abu*. Pengujian terhadap parameter spesifik meliputi *Identitas Ekstrak*, *Organoleptik dan Kandungan kimia ekstrak*. Untuk mengetahui profil adanya senyawa alkaloid dan kumarin dengan menggunakan uji analisis bahan kimia. Deteksi alkaloid pada ekstrak dengan penambahan Dragendorf pada suasana asam dan memberikan hasil positif apabila muncul endapan merah-coklat. Deteksi kumarin pada ekstrak dengan penambahan amonia dan memberikan hasil positif jika mengalami fluorsensi warna hijau (kumarin isobergapten) pada UV 365 nm.

Uji Apoptosis

Sel kanker paru kecil dikultur dalam 24 sumuran. Pada uji sitotoksik tahap 2 telah diperoleh nilai IC50 untuk ekstrak air *Pimpinella alpina*. Sumuran yang akan diisi diberi coverslip pada dasar sumuran. Sel kanker paru A549 dan medium sebanyak 500 µl dengan jumlah sel 1×10^4 diisikan dalam sumuran microplate. Selanjutnya, ditambahkan

Uji antiproliferasi

Sel kanker paru A549 di kultur pada medium, 36 sumuran pada total volume 200 mikroliter DMEM yang disuplemen dengan 1% FBS. Sel yang dikultur diberikan 0.2% DMSO dan ekstrak air *Pimpinella alpina* pada berbagai konsentrasi. Lalu diinkubasi dengan beberapa variasi waktu yakni 24, 48, dan 72 jam, setelah diinkubasi ditambahkan 1 mg/ml MTT dan di inkubasi 4 jam. Hasilnya di absorbansi pada 550 nm.

Uji Sitotoksik

Sel kanker paru A549 di kultur pada medium, 96 sumuran pada total volume 200 mikroliter DMEM yang disuplemen dengan 1% FBS. Sel yang dikultur diberikan 0.2% DMSO dan ekstrak air *Pimpinella alpina* pada berbagai konsentrasi (1 – 10.000 µg/mL) dan cisplatin sebagai kontrol positif pada berbagai konsentrasi 1-10 µg/mL, pada 24 jam dalam keadaan yang sama setiap grup dibuat 6 kali pengulangan. Lalu setelah inkubasi 24 jam, ditambahkan 1 mg/ml MTT dan di inkubasi 4 jam. Hasilnya di absorbansi pada 550 nm.

ekstrak air *Pimpinella alpina* dengan konsentrasi ½ IC50, IC50, dan 2 IC50. Cisplatin diberikan sebagai kontrol positif dengan berbagai konsentrasi (1 – 10 µg/mL). Tiap konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Microplate diinkubasi dalam inkubator 5% CO2 pada suhu 37° C dan pH 7,4-7,7. Setelah 24 jam, medium dibuang, dicuci dengan PBS. Coverslip diambil dan diletakkan pada kaca obyek,

ditambahkan tetesan larutan etidium bromid-acridine orange dan diamati dengan mikroskop fluoresen dengan perbesaran 100kali.

Uji Jalur Induksi Apoptosis

Uji ini dilakukan menggunakan microplate 24 sumuran. Sumuran yang akan diisi diberi coverslip pada dasar sumuran. Sel kanker paru kecil (NSCLC) dan medium sebanyak 500 µl dengan jumlah sel 1×10^4 diisikan dalam sumuran microplate. Selanjutnya, ditambahkan ekstrak air *Pimpinella alpinna* dengan konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀, dan 2 IC₅₀. Cisplatin diberikan sebagai kontrol positif dengan berbagai konsentrasi (1 – 10 µg/mL). Tiap konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Microplate diinkubasi dalam inkubator 5% CO₂ pada suhu 37^o C dan pH 7,4-7,7. Setelah 24 jam, medium dibuang, dicuci dengan PBS. Isi

sumuran dipindahkan dalam tabung 1,5 ml kemudian ditambahkan DMEM hingga volume 1 ml. Isi tabung diteteskan pada kaca obyek yang telah

dilapisi Poly L-Lysin dan ditunggu hingga kering. Setelah kering, dilakukan fiksasi menggunakan metanol kemudian direndam dalam peroxide blocking solution. Slide diinkubasi dalam prediluted blocking serum pada suhu 25% selama 10 menit dan ditambahkan antibodi anti p53, Rb, Bcl-2, caspase 9. Selanjutnya ditetesi mounting media dan ditutup dengan deck glass. Ekspresi p53, Rb, Bcl-2, Caspase-9 diamati menggunakan mikroskop cahaya.

Analisis Statistik

Uji antiproliferasi akan melihat kemampuan ekstrak air *Pimpinella alpinna* dengan dosis efektifnya dalam mempertahankan sel kanker paru A549 yang hidup (viabilitas sel) untuk tetap bertahan atau tidak berproliferasi (tumbuh menjadi bertambah banyak) pada skala % viabilitas yang tetap. Aktivitas antiproliferasi dinyatakan dalam % viabilitas sel yang hidup. Data absorbansi yang diperoleh dari uji kinetika proliferasi sel dikonversi ke dalam persen sel hidup. Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Hidup} = \frac{\text{Absorbansi sel dengan perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol media Sel} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100 \%$$

Dalam hal ini % viabilitas sel dilihat berdasarkan satuan waktu (24,48,dan 72 jam). Adapun kemampuan mempertahankan % viabilitas sel dalam variasi waktu dapat dihitung dengan menggunakan analisis Uji ANOVA menggunakan SPSS 20 untuk mengetahui signifikansi perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.

Uji sitotoksik akan melihat kemampuan ekstrak air *Pimpinella alpinna* dengan dosis efektifnya (IC₅₀) untuk membuat efek toksik pada sel kanker paru A549. Aktivitas Sitotoksik dinyatakan dalam IC₅₀ (konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel) dengan analisis regresi linier menggunakan SPSS 20.

Uji Induksi Apoptosis akan melihat kemampuan ekstrak air *Pimpinella alpinna*

dengan dosis efektifnya (EC₅₀) untuk membuat apoptosis pada sel kanker paru A549. Kemampuan induksi apoptosis dinyatakan dalam EC₅₀(konsentrasi yang menyebabkan apoptosis 50% populasi sel) dengan analisis regresi linier. Perbedaan kemampuan apoptosis ekstrak air *Pimpinella alpinna* dan cisplatin(kontrol positif) dinilai dengan uji regresi linear menggunakan SPSS 20.

Uji Jalur Induksi Apoptosis akan melihat kemampuan ekstrak air *Pimpinella alpinna* dengan dosis efektifnya (IC₅₀) untuk membuat apoptosis sel kanker paru A549 melalui jalur ekspresi gen p53, Rb, Bcl-2, Caspase-9. Kemampuan apoptosis dinilai berdasarkan jalur ekspresi gen yang dominan pada sel kanker paru A549 yang diuji dengan uji χ^2 (chi-square) menggunakan SPSS 20.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Standarisasi Ekstrak

Standarisasi Ekstrak dilakukan untuk memastikan ekstrak *Pimpinella alpinna* yang digunakan dalam penelitian ini sesuai standar. Hasil Analisis bahan kimia menunjukkan bahwa ekstrak air *Pimpinella alpinna* yang akan digunakan dalam penelitian ini mengandung alkaloid dan



(a)



(b)

Gambar 1. Hasil Analisis bahan kimia menunjukkan bahwa (a) terdapat kandungan kumarin yang ditunjukkan dengan warna fluoresensi hijau pada UV 365 nm dan (b) terdapat kandungan alkaloid yang ditunjukkan dengan adanya endapan merah-coklat.

Uji Antiproliferasi

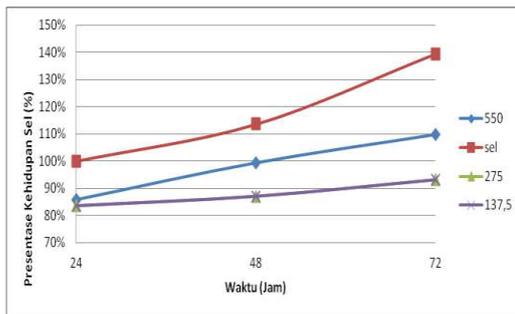
Untuk melihat aktifitas proliferasi sel kanker paru A549 pada perlakuan ekstrak air *Pimpinella alpinna*, maka dilakukan uji *doubling time*. Hasil uji terhadap sel kanker paru A549 memperlihatkan bahwa perlakuan dengan ekstrak air *Pimpinella alpinna* (550, 275, 137,5 μ g/mL) mampu menghambat pertumbuhan sel A549 (Gambar 2) pada jam ke 24, 48 dan 72 secara signifikan ($P < 0,05$). Penetapan konsentrasi ekstrak air *Pimpinella alpinna* mempertimbangkan bahwa konsentrasi tersebut dibawah harga IC_{50} -nya pada uji sitotoksitas, sehingga sel tidak terlalu banyak yang mati pada pengamatan pada jam ke-48 dan 72 dan lebih lanjut agar kinetika proliferasi sel dapat teramati hingga jam ke-72. Hasil uji antiproliferatif ekstrak air *Pimpinella alpinna* terhadap sel kanker paru A549 (gambar 2).

Dari Gambar 2, kurva rerata selisih % kehidupan sel terhadap waktu pengamatan dari kelompok ekstrak air

kumarin, sehingga dapat diketahui bahwa zat aktif di dalam ekstrak *Pimpinella alpinna* yang digunakan adalah alkaloid dan kumarin (gambar 1). Profil kandungan kimia ekstrak sangat penting karena digunakan sebagai acuan untuk memperkirakan penelusuran mekanisme kerja ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini.

Pimpinella alpinna lebih rendah dibandingkan kurva dari kelompok kontrol/sel antara 24 jam pertama dan 24 jam kedua. Ini berarti bahwa perlakuan ekstrak air *Pimpinella alpinna* mampu mempengaruhi kinetika proliferasi sel kanker paru A549 secara bermakna ($P < 0,05$) pada semua variasi waktu. Dalam artian lainnya, Ekstrak air *Pimpinella alpinna* mampu menghambat proliferasi sel berdasarkan variasi waktu terhadap kontrol sel dimana terjadi memperpanjang waktu penggandaan sel (*doubling time*).

Berdasarkan profil proliferasi sel, ekstrak air *Pimpinella alpinna* mampu menghambat pertumbuhan sel kanker paru A549. Mekanisme penghambatan pertumbuhan sel kanker bisa melalui *cell cycle arrest*, *cell cycledelay* maupun mekanisme apoptosis. Untuk mengetahui apakah mekanisme penghambatan melalui mekanisme apoptosis, maka dilakukan pengamatan apoptosis.

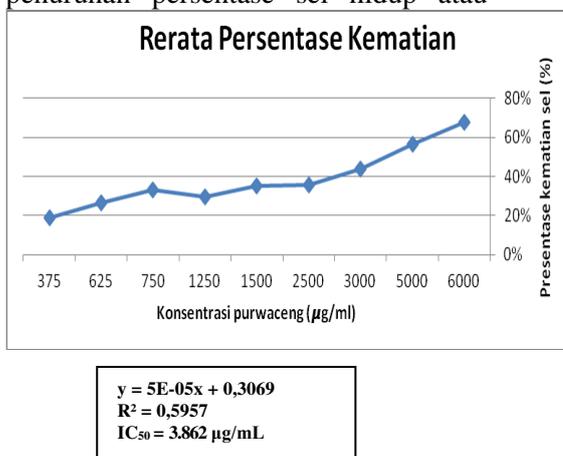


Gambar 2. Efek variasi kadar ekstrak air *Pimpinella alpinna* terhadap kinetika pertumbuhan sel kanker paru A549. Hasil uji *doubling time* ekstrak air *Pimpinella alpinna* dilakukan dengan menginkubasi sel kanker paru A549 dengan kepadatan 2×10^4 di dalam sumuran dengan ekstrak air *Pimpinella alpinna* (kadar 550, 275, 137,5 µg/mL) dan dilihat absorbansinya pada jam ke-24, 48 dan 72.

Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik dilakukan terhadap sel kanker paru A549 untuk mengetahui potensi penghambatan dan efek toksik terhadap pertumbuhan sel akibat perlakuan ekstrak air *Pimpinella alpinna*. Uji ini dilakukan untuk menentukan kadar sampel uji yang dapat memberikan efek toksik pada pertumbuhan sel kanker paru A549 sampai 50% populasi sel (IC_{50}). Hasil uji memperlihatkan bahwa kenaikan kadar perlakuan sampel menyebabkan penurunan persentase sel hidup atau

kenaikan persentase kematian sel. Pada perlakuan ekstrak air *Pimpinella alpinna* dengan kadar 3.000 µg/mL dan 5000 µg/mL dapat menaikkan persentase kematian sel secara signifikan ($P < 0.05$). Ekstrak air *Pimpinella alpinna* memiliki aktifitas penghambatan pertumbuhan sel kanker paru A549 dengan (IC_{50}) sebesar 3.862 µg/mL (gambar 3). Nilai IC_{50} diatas 100 µg/mL menunjukkan adanya potensi ekstrak uji sebagai agen kemoterapi.



Gambar 3. Hasil uji statistik regresi linear yang menunjukkan bahwa Ekstrak air *Pimpinella alpinna* memiliki aktifitas toksik dan penghambatan pertumbuhan sel kanker paru A549 dengan (IC_{50}) sebesar 3.862 µg/mL.

Uji Apoptosis

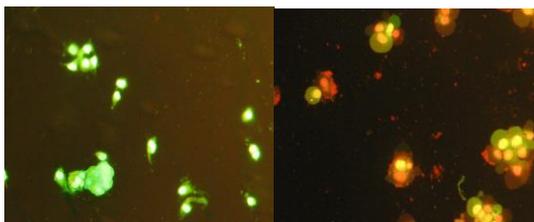
Pengamatan apoptosis dilakukan dengan metode *doublestaining* menggunakan *etidium bromide-acrydine orange* (EB-AO). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada kontrol sel terlihat kebanyakan sel kanker paru A549 berfluorosensi hijau karena sebagian

besar menyerap *Acrydine orange*. Dan hanya sebagian kecil sel kanker paru A549 yang menyerap *Etidium bromide* pada kontrol sel karena integritas sel masih baik.

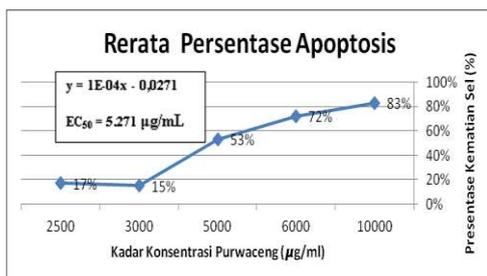
Sel kanker paru A549 diberi perlakuan dengan berbagai kadar ekstrak air

Pimpinella alpinna. Pada sel dengan perlakuan ekstrak air *Pimpinella alpinna* kadar 5000 µg/mL sebagian besar sel berfluorosensi merah dan orange (sel yang apoptosis) serta ada beberapa saja yang berfluorosensi hijau (gambar 2). Hal ini menandakan mulai hilangnya permeabilitas membran pada sebagian besar sel (53 % populasi sel) karena perlakuan ekstrak air *Pimpinella alpinna*. Akibatnya *etidium bromide* dapat masuk ke dalam sel dan menimbulkan fluorosensi oranye/merah sebagai indikator kematian sel (apoptosis sel). Sehingga secara signifikan ($P < 0.05$) ekstrak air *Pimpinella alpinna* dengan kadar tertentu dapat menaikkan persentase apoptosis sel. Dapat dilihat pada sajian data beserta analisisnya memperlihatkan bahwa semakin tinggi kadar perlakuan sampel maka semakin tinggi pula

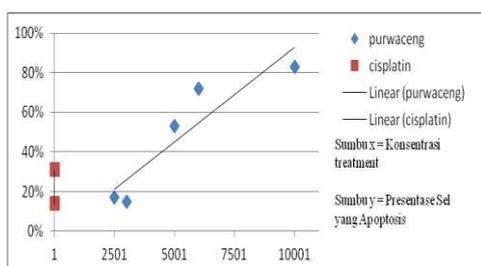
persentase apoptosis sel kanker paru A549. Adapun yang menjadi kadar efektif (EC_{50}) untuk membuat 50 % populasi sel mengalami apoptosis yakni sebesar 5.271 µg/mL (gambar 5). Selain itu pada sel dengan perlakuan ekstrak air *Pimpinella alpinna* juga terlihat adanya fragmentasi inti sel yang kemudian menjadi badan-badan apoptosis. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak air *Pimpinella alpinna* menyebabkan terjadinya apoptosis (gambar 4). Untuk melihat perbedaan antara kemampuan apoptosis ekstrak air *Pimpinella alpinna* dan cisplatin (kontrol positif kemoterapi kanker paru) digunakan uji regresi linear, dimana didapatkan hasil adanya perbedaan yang signifikan antara kemampuan apoptosis ekstrak air *Pimpinella alpinna* dan cisplatin (kontrol positif kemoterapi kanker paru) (gambar 5).



Gambar 4. Efek ekstrak air *Pimpinella alpinna* menginduksi apoptosis pada sel A549 setelah 24 jam perlakuan dengan sampel uji. Pengecatan dilakukan dengan menanam sel A549 sebanyak 2×10^4 sel/sumuran pada *coverslips* dalam plate 24, dilakukan pewarnaan menggunakan *acrydine orange-etidium bromide* dan dilihat dengan mikroskop fluorosense. A. kontrol sel, B. Ekstrak air *Pimpinella alpinna* µg/mL. Perbesaran 100x, apoptosis (sel merah), sel hidup (sel hijau).



Gambar 5. Hasil uji statistik regresi linear yang menunjukkan bahwa Ekstrak air *Pimpinella alpinna* memiliki kemampuan menginduksi apoptosis kanker paru A549 dengan (EC_{50}) sebesar 5.271 µg/mL.



Gambar 6. Hasil uji statistik regresi linear yang menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang signifikan antara kemampuan apoptosis ekstrak air *Pimpinella alpinna* dan cisplatin (kontrol positif kemoterapi kanker paru).

Uji Jalur Induksi Apoptosis

Pada uji jalur induksi apoptosis, sel yang mengekspresikan p53, Rb, Bcl-2, dan caspase-9 (sel imunopositif) tampak sebagai gambaran sel dengan sitoplasma

berwarna coklat, sedangkan sel imunonegatif berwarna biru keunguan pada nukleusnya dengan sitoplasma jernih (gambar 7).



(a) (b)

Gambar 7. Sel kanker A549 setelah pewarnaan imunohistokimia (a) sel imunopositif berwarna coklat (b) sel imunonegatif berwarna biru keunguan. Selanjutnya, persentase sel imunopositif dihitung untuk mendapatkan data rerata persentase ekspresi p53, Rb, Bcl-2, dan caspase-9 setelah diinkubasi dengan ekstrak air *Pimpinella alpinna* selama 24 jam yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rerata persentase ekspresi p53, Rb, Bcl-2, dan caspase-9 sel kanker paru A549 setelah perlakuan

Perlakuan	Konse ntrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Eks pre resi p53 (%)	Eksp resi Rb (%)	Eks pre resi si Bcl -2 (%)	Eksp resi casp ase-9 (%)
Ekstrak air <i>Pimpinella</i> <i>alpinna</i>	2250	23, 50	37,7 0	44, 80	0,32
	4500 (IC_{50})	61, 90	0,05	51, 48	93,4 0
	9000	0,0 0	0,00	0,0 0	40,0 0
Kontrol negatif	0	19, 90	32,3 0	84, 00	17,2 0

Proporsi efek IC_{50} ekstrak air *Pimpinella alpinna* pada ekspresi p53, Rb, Bcl-2, dan caspase-9 terhadap kontrol negatif (sel kanker paru A549 tanpa perlakuan) diuji secara statistik dengan analisis *Chi-Square*. Dari hasil analisis, didapatkan nilai $p < 0,05$. Nilai ini menunjukkan bahwa proporsi efek IC_{50} ekstrak air *Pimpinella alpinna* pada peningkatan Rb dan caspase-9 berbeda

secara signifikan ($p < 0,05$) terhadap kontrol (sel kanker paru A549 tanpa perlakuan).

Pembahasan

Berdasarkan uji sitotoksik, didapatkan nilai dosis IC_{50} *Pimpinella alpinna* adalah $3.862 \mu\text{g/mL}$. Nilai ini sangat jauh jika dibandingkan dengan nilai IC_{50} cisplatin (kontrol , yaitu sebesar

4,62 μ g/ml (Scrivenet *et al.*, 2009). Suatu ekstrak dianggap berpotensi untuk dikembangkan sebagai terapi antikanker jika memiliki IC₅₀ lebih dari 100 μ g/ml (Mans *et al.*, 2000). Tingginya nilai IC₅₀ pada ekstrak air *Pimpinella alpinna* dapat disebabkan oleh penggunaan pelarut air yang diduga melarutkan kandungan zat aktif yang ada pada tanaman *Pimpinella alpinna*. Berbeda dengan cisplatin yang merupakan zat murni, ekstrak mengandung berbagai zat aktif nonspesifik sehingga membutuhkan dosis lebih besar untuk menimbulkan efek yang sama.

Suatu senyawa dapat bersifat toksik pada sel kanker dengan beberapa mekanisme yang berbeda, yaitu melalui efek antiproliferasi, penghambatan siklus sel, inhibisi angiogenesis, pengrusakan sel secara langsung yang menyebabkan nekrosis, serta induksi apoptosis. Semua proses ini merupakan efek toksik yang pada akhirnya menimbulkan kematian pada sel kanker (Ren *et al.*, 2003). Pada penelitian ini, ekstrak air *Pimpinella alpinna* diharapkan mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker, sehingga didapatkan kematian sel kanker tanpa menimbulkan reaksi inflamasi dan rendah efek samping bagi tubuh. Berdasarkan hal ini, nilai IC₅₀ ekstrak air *Pimpinella alpinna* yang tinggi sepenuhnya menunjukkan bahwa *Pimpinella alpinna* berpotensi untuk dikembangkan sebagai terapi antikanker. *Pimpinella alpinna* tidak menimbulkan efek toksik dengan pengrusakan sel secara langsung (nekrosis), melainkan bersifat toksik melalui induksi apoptosis, sehingga *Pimpinella alpinna* ini cukup berpotensi untuk dijadikan terapi antikanker. Kemampuan ekstrak air *Pimpinella alpinna* dalam menginduksi apoptosis ini terbukti dari hasil uji apoptosis menggunakan pewarnaan *acridine orange*. *Acridine orange* merupakan zat pengecat yang selektif terhadap asam nukleat dan mampu menembus membrane plasma. Pada sel yang mengalami apoptosis, *acridine orange* ini akan berikatan dengan DNA dan memancarkan warna oranye pada

pengamatan dengan mikroskop fluoresen.

Pengendalian apoptosis dihubungkan dengan gen yang mengatur siklus sel, termasuk di antaranya gen p53, Rb, myc dan lain-lain. Beberapa jenis gen berfungsi sebagai penghambat apoptosis, di antaranya keluarga gen bcl-2 dan beberapa jenis onkogen virus yang dikenal memiliki potensi untuk mengakibatkan transformasi sel menjadi ganas. Fungsi produk gen p53 dan Rb terkait erat dengan peristiwa dalam siklus sel pada fase G1. Gen retinoblastoma (Rb) mencegah berlangsungnya siklus sel pada fase G1/S dengan menghambat fungsi faktor transkripsi E2F dan dengan demikian menghambat fungsi berbagai gen yang bekerja pada fase S, termasuk di antaranya myc, myb, dan DNA polimerase α . Sebagian besar partner Rb1 dalam mengatur siklus sel adalah regulator transkripsi seperti E2F, c-Abl dan Mdm2. Mdm2 merupakan salah satu faktor yang menghambat apoptosis. Pada saat apoptosis Mdm2 mengalami degradasi oleh caspases.

Pada induksi apoptosis terjadi cleavage pada C-terminal molekul Rb oleh caspases sehingga terjadi akumulasi Δ Rb1. Fragmen Δ Rb1 ini secara biologis tetap aktif karena domain fungsional minimal Rb1 sebagai gen supresor terletak pada bagian ini, sehingga apoptosis lebih banyak diasosiasikan dengan kehilangan seluruh rantai Rb1 dan tidak bergantung pada akumulasi Δ Rb1. Adanya degradasi Rb1 menjadi Δ Rb1, membuat Δ Rb1 kehilangan kemampuan dalam mengikat Mdm2 sehingga Mdm2 didegradasi oleh caspase. Terjadinya degradasi Rb dan Mdm2 oleh caspase menyebabkan aktivasi E2F-1 dan p53, sehingga menginduksi apoptosis. Perombakan Rb1 di-katalisasi oleh upstream caspase(s) yang tidak memiliki kemampuan untuk membunuh sel sehingga harus dirombak oleh caspase(s) yang mampu membunuh sel (death effector caspases). Pada apoptosis yang diinduksi oleh Fas/FasL death effector caspases diaktivasi melalui jalur yang tidak bergantung pada Rb1. Preservasi Rb1 melalui

ekspresi $\Delta Rb1$ tidak berdampak pada apoptosis melalui jalur Fas/FasL, tetapi pada induksi melalui TNF- α R, upstream caspases diaktifkan untuk merombak Rb1, walaupun mekanisme ini tidak cukup efisien untuk menghasilkan kematian sel. Degradasi selanjutnya bersama-sama dengan perombakan Mdm2 mengakibatkan aktivasi E2F dan p53.

Eksresi Rb1 mutant yang resisten terhadap perombakan oleh caspases melindungi E2F dan mencegah degradasi Mdm2, sehingga aktivasi death effector caspases terhambat dan tidak terjadi apoptosis. Dalam konteks ini Rb1 merupakan substrat penting bagi caspases. Dalam fungsinya myc membentuk heterodimer dengan gen max. Kompleks onkoprotein myc-max meningkatkan apoptosis bila sel kehilangan faktor pertumbuhan, atau bila ada intervensi farmakologis. Dimerisasi myc-max diperlukan baik untuk proliferasi maupun apoptosis. Walaupun demikian myc dan max masing-masing memodulasi jalur apoptotik yang berbeda. Hal ini dibuktikan dalam suatu penelitian yang menyatakan bahwa Bcl-xL menghambat apoptosis sel yang mengekspresikan max berlebihan tetapi tidak pada sel-sel yang mengekspresikan c-myc berlebihan.

Gen Bcl 2 dikenal sebagai inhibitor apoptosis. Gen bcl2 menghambat kemampuan c-myc untuk menginduksi apoptosis. Tidak semua apoptosis dapat dihambat oleh gen bcl2. Induksi apoptosis oleh TNF tidak dapat dihambat oleh bcl2. Gen bcl2 termasuk keluarga gen yang beberapa anggota keluarganya bersifat menghambat apoptosis (Bcl2, Bcl-x1, Mcl1 dan lain-lain), tetapi beberapa anggota keluarga yang lain ternyata bersifat memudahkan apoptosis (Bax, Bcl-xs, Bad, Bak, dan lain-lain). Keluarga Bcl-2 ini sangat banyak, saat ini terdapat 19 anggota yang telah teridentifikasi. Bcl-2 adalah protein homolog dengan Ced-9 yang merupakan prototype semua domain BH3 homolog dengan Bcl-2.

Faktor lain yang berperan pada apoptosis adalah cytochrome-c. Pengelepasan cytochrome-c oleh

mitokhondria tidak bergantung pada caspases, dan dampaknya tidak selalu diasosiasikan dengan terjadinya pori pada membran mitokhondria. Atas rangsangan apoptosis, bax yang merupakan faktor proapoptotik segera berpindah tempat dari sitoplasma ke mitokhondria dan secara langsung dapat menginduksi pelepasan cytochrome-c melalui pori yang dibuatnya pada membran mitokhondria. Apabila aktivasi caspase-8 melalui cara ini inefisien, ditempuh jalur lain yaitu melalui Bid, faktor proapoptotik anggota keluarga bcl2 yang lain. Bid segera mengalami cleavage dan fragmen C-terminalnya segera merangsang mitokhondria untuk melepaskan cytochrome-c. Caspase-8 yang teraktivasi (misalnya karena pengikatan Fas/FasL) memecah Bid, menghasilkan fragmen C-terminal yang kemudian melekat pada mitokhondria dan menginduksi pelepasan cytochrome-c. Cytochrome-c kemudian berfungsi mengaktifkan Apaf-1 (apoptosis protease activating factor) dan pemrosesan caspases-9 yang selanjutnya mengaktifkan kaskade caspase yang lainnya. Bcl-2/bcl-xL berfungsi menghambat pelepasan cytochrome-c dan dengan demikian menghambat apoptosis.

Kemampuan ekstrak air *Pimpinella alpinna* dalam menginduksi apoptosis kemungkinan berkaitan dengan kandungan kumarin dan alkaloid pada tanaman ini. Dalam hal ini, dapat disimpulkan bahwa mekanisme kumarin dalam menginduksi apoptosis terjadi melalui jalur ikatan dengan mengaktifkan reseptor TNF- α R dan juga melalui penghambatan aktivitas DNA topoisomerase I/II, modulasi *signalling pathways*, pelepasan sitokrom C dengan aktivasi caspase-3 dan -9, dimana terjadi penurunan ekspresi gen Rb dan Bcl-2, serta peningkatan ekspresi gen p53 (Ren *et al.*, 2003). Pada pemberian ekstrak air *Pimpinella alpinna* terhadap sel kanker paru A549, induksi apoptosis ini diduga terjadi melalui aktivasi p53, Bcl-2, Rb dan Caspase 9, dimana terjadi penurunan ekspresi Rb dan bcl-2 serta peningkatan ekspresi p53 dan caspase-9 yang terbukti dari hasil uji jalur induksi

apoptosis menggunakan pewarnaan imunohistokimia.

Hal ini menandakan bahwa ekstrak air *Pimpinella alpinna* mempunyai efek antiproliferasi dan efek sitotoksik terhadap sel kanker paru A549 yang terjadi melalui induksi apoptosis dengan aktivasi *p53*, *Bcl-2*, *Rb* dan *Caspase 9*.

4. KESIMPULAN

Ekstrak air *Pimpinella alpinna* mempunyai efek antiproliferasi, sitotoksik dan apoptosis terhadap sel line A549 kanker paru. Antiproliferasi ditunjukkan dengan kemampuan ekstrak mempertahankan viabilitas sel dalam variasi waktu. Sitotoksik ditunjukkan dengan adanya dosis efektif IC_{50} untuk membunuh sel kanker paru A549. Apoptosis ditunjukkan dengan pengamatan sel apoptosis, penurunan ekspresi *Rb* dan *bcl-2* serta peningkatan ekspresi *p53* dan *caspase-9*. Dalam ekstrak air *Pimpinella alpina* ditemukan kumarin dan alkaloid sebagai senyawa aktif yang bekerja secara langsung pada *cell line* kanker paru A549. Dengan melihat hasil dari penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa ekstrak air *Pimpinella alpinna* mempunyai efek antiproliferasi dan efek sitotoksik terhadap sel kanker paru A549 yang terjadi melalui induksi apoptosis dengan aktivasi *p53*, *Bcl-2*, *Rb* dan *Caspase-9*.

5. REFERENSI

Abdulmuthalib, 2006. Prinsip Dasar Terapi Sistemik pada Kanker. Dalam: Sudoyo, A.W., Setiyohadi, B., Alwi, I., Simadibrata, M.K., dan Setiati, S. (Ed): *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid 2*. Edisi 4. Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. Pp: 849-854.

- Adams, J.M., and Cory, S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326
- Guevara AP, Vargas C, Sakurai H et al. 1999. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutat Res* 440: 181-188
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, et al. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 61: 69-90
- Kumar, V., Cotran, R.S., and Robbins, S.L. 2005. *Basic Pathology. 8th ed.* Philadelphia.
- Quinn, A., Wong, C., Younus, J., Dranitsaris, G., Goel, R., and Trudeau, M. 2009. Canadian Pattern of Care for Anemia: Comparison of Chemotherapies in Adjuvant Breast Cancer Setting. *American Association for Cancer Research.*
- Riset Kesehatan Dasar. 2007.
- Szewczyk, A., and Wojtczak, L. 2002. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol. Rev.* 54:101-127
- Tjindarbumi, D., dan Mangunkusumo, R., 2002. *Cancer in Indonesia, Present and Future*, Jpn. Clin. Oncol.
- Mardaryev AN, Ahmed MI, Vlahov NV, Fessing MY, Gill JH, Sharov AA, Botchkareva NV. 2009. 2010. Micro-RNA-31 controls hair cycle-associated changes in gene expression programs of the skin and hair follicle. *FASEB J.* 24(10):3869-81.
- Zeuner, A., Signore, M., Martinetti, D., Bartucci, M., Peschle, C., Maria, R.D. 2007. Chemotherapy-Induced Thrombocytopenia Derives from the Selective Death of Megakaryocyte Progenitors and Can Be Rescued by Stem Cell Factor. *Cancer Research.* 67(10):4767-4773.