

Pengaruh Pemberian Kombinasi Ekstrak Rumput Mutiara (*Hedyotis corymbosa* Lamk) dan Meniran (*Phyllanthus Niruri* L.) terhadap Jumlah AgNOR Jaringan Adenokarsinoma Mammae Mencit C3H

Putri Reno Intan, M. Wien Winarno

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan, Kemenkes RI
email : putrirenointan@yahoo.com

Diterima: 6 November 2013 Direvisi: 25 November 2013 Disetujui: 3 Desember 2013

Abstract

*Cancer is one of the non-communicable diseases that has become a health problem in the world, including in Indonesia. Data World Health Organization (WHO) data in 2010 showed that cancer is the second leading cause of death after cardiovascular disease. Mean while, result at Basic Health Research Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2007 showed that cancer ranks sixth in the leading cause of death in Indonesia. Number of cancer patients in Indonesia continues to increase and is expected to be the main cause of the increasing economic burden, for the patient, family, and also country. Types of cancer in Indonesia is dominated by breast cancer (30%) cervical cancer (24%) This study aims to determine the effect of a combination of rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* Lamk) and meniran (*Phyllanthus niruri* L) against mammary adenocarcinoma in strain C3H mice. This study is an experimental study. The study sample consisted of 20 strains of C3H mice that were divided into 4 groups: control group (K) and three dose groups (P1 - P3), namely : dose 750 ; 1500; 2250 mg/kg BW. Extract of the test material were given after the tumor is palpable, It was given to the mice for 19 days, once a day orally using a stomach sonde. The results of this study indicate that based on the average number of AgNOR mammary adenocarcinoma, the extract at a dose of 2250 mg/kg BW can reduce the proliferation of mammary tumor cells.*

Keywords : Adenocarcinoma, AgNOR, *Hedyotis corymbosa*, *Phyllanthus niruri*

Abstrak

Kanker adalah salah satu penyakit tidak menular yang menjadi masalah kesehatan di dunia, termasuk di Indonesia. Data Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) tahun 2010 menunjukkan bahwa kanker merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit kardiovaskular. Sementara itu hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2007 menunjukkan kanker berada di peringkat ke-6 penyebab kematian di Indonesia. Jumlah penderita kanker di Indonesia terus meningkat dan diperkirakan menjadi penyebab utama meningkatnya beban ekonomi untuk individu pasien, keluarga, dan negara. Jenis kanker di Indonesia didominasi oleh kanker payudara (30%) dan kanker serviks atau kanker leher rahim (24%). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* Lamk) dan meniran (*Phyllanthus niruri* L) terhadap adenokarsinoma mammae mencit strain C3H. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Sampel penelitian terdiri dari 20 ekor mencit strain C3H yang dibagi menjadi 4 kelompok, terdiri dari satu kelompok kontrol (K) dan tiga kelompok dosis (P1 - P3), yaitu: dosis 750; 1500; 2250 mg/kg berat badan. Ekstrak bahan uji dimulai setelah tumor teraba, ekstrak kombinasi meniran dan rumput mutiara diberikan selama 19 hari sekali sehari secara oral menggunakan sonde lambung. Hasil penelitian menunjukkan bahwa berdasarkan rata-rata jumlah AgNOR adenokarsinoma mammae, ekstrak kombinasi dengan dosis 2250 mg/kg BB dapat mengurangi proliferasi sel tumor mammae pada kelompok yang diberikan dosis tersebut

Kata kunci : Adenokarsinoma, AgNOR, *Hedyotis corymbosa*, *Phyllanthus niruri*

Pendahuluan

Kanker payudara merupakan bentuk penyakit keganasan yang menyerang wanita¹ Penatalaksanaan penderita kanker payudara berhubungan dengan sistem imunitas penderitanya karena seperti pada umumnya penyakit keganasan, kanker berhubungan dengan lemahnya *immunologic surveillance* penderitanya. Akhir-akhir ini berkembang penelitian tanaman obat sebagai antikanker yang bertujuan untuk menemukan tanaman obat yang berpotensi sitostatika dan imunomodulator serta memiliki toksisitas yang rendah dibanding obat sitostatika konvensional.

Meniran adalah salah satu tanaman yang mempunyai aktivitas imunomodulator, yang membantu tubuh untuk mengoptimalkan sistem imun yang berperan dalam pertahanan tubuh.² Sementara itu rumput mutiara termasuk famili Rubiaceae dan merupakan salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antikanker.³

Rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* Lamk) secara tradisional sering digunakan dalam membantu pengobatan kanker payudara. Rumput mutiara mengandung senyawa asam ursolat yang berkhasiat antitumor⁴. Aktivitas antioksidan ekstrak alkohol 70% rumput mutiara konsentrasi 500 ppm dapat menghambat laju pembentukan MDA (malonaldehid)⁴.

Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) digunakan untuk menstimulasi sistem imun. Pemberian ekstrak meniran selama 7 hari dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag pada mencit balb/c yang diinfeksi *Salmonella sp.* dengan indeks fagositosis tertinggi pada dosis 250 µg/hari.⁶

Dalam penilaian histopatologi sel tumor, proliferasi sel merupakan faktor penilaian utama. Penilaian histopatologi yang sekaligus dapat menilai perubahan gen sel tumor dan proliferasi sel dapat ditunjukkan dengan melihat kuantitas *nuclear organization region* (NOR). (NOR) merupakan lengkung *rDNA* ribosom yang terletak di lengan akrosentrik kromosom 13,14,-

15,21,22. NOR merupakan protein yang mampu mengikat perak (Ag) sehingga dinamakan AgNOR (*Agyrophilic Nuclear Organizer Region*). Dengan menggunakan mikroskop cahaya, AgNOR terlihat sebagai titik hitam/coklat yang terletak di dalam nukleus⁶. Menurut penelitian oleh Guskey et al, dikatakan bahwa terdapat hubungan antara jumlah AgNOR dengan tingkat proliferasi dan prognosis Ca Mammae.^{7,8,9,10} Adenokarsinoma mammae tumor yang berasal dari epitel berbentuk glandular dari jaringan mammae.

Penelitian ini menggunakan hewan coba sebagai subjek penelitian dan telah mendapatkan persetujuan etik (*Ethical Clearance*) dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan dengan nomor : KE. 01.04/ EC/281/2012.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan data pengaruh pemberian kombinasi rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* Lamk) dan meniran (*Phyllanthus niruri* L.) terhadap jumlah AgNOR jaringan adenokarsinoma mammae mencit C3H

Metode

Penelitian ini dilakukan di laboratorium hewan coba Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, meliputi pemeliharaan dan perlakuan hewan coba, sedangkan pewarnaan histopatologi dengan pewarnaan AgNOR dilakukan di Laboratorium Patologi Departmen Patologi Anatomi FK UI. Penelitian yang dilakukan selama bulan Januari sampai dengan Oktober 2012 ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain penelitian eksploratif dan rancangan acak lengkap (RAL).

Bahan

Bahan uji berupa kombinasi ekstrak etanol 70% *Hedyotis corymbosa* Lamk dan *Phyllanthus niruri* L yang dibuat secara maserasi. Rumput mutiara berasal dari ke-

bun obat Karyasari, Bogor dan meniran berasal dari Balitro Bogor.

Pembuatan ekstrak yang digunakan dalam percobaan ini dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Masing-masing simplisia dikeringkan, kemudian diserbuk dan diayak dengan ayakan berukuran 40. Serbuk ditimbang sejumlah 250 g dibasahi dengan pelarut etanol 70% didiamkan selama 18 jam dalam wadah tertutup dari gelas. Ekstrak cair yang diperoleh dikentalkan dengan *rotary evaporator* ekstrak kental diuapkan dalam cawan porselen hingga etanol menguap dan diperoleh ekstrak kering kemudian dihitung rendemen dari ekstrak

11

Ekstrak yang digunakan berasal dari dua bagian ekstrak rumput mutiara dan satu bagian ekstrak meniran. Perbandingan ini didapat dari hasil toksisitas akut yang telah dilakukan. Cara pembuatan ekstrak campuran adalah dengan menimbang dua bagian rumput mutiara dan satu bagian meniran kemudian dicampur dan dilarutkan menggunakan akuades.

Bahan kimia yang digunakan terdiri dari larutan formalin buffer, alkohol, xylol, etanol, gelatin, asam format, perak nitrat dan sodium tiosulfat 5%.

Peralatan yang digunakan yaitu rotary evaporator (Buchi), timbangan analitik, seperangkat alat bedah dan alat gelas.

Hewan coba yang digunakan adalah mencit strain C3H, jenis kelamin betina umur 8-10 minggu, berat badan 15-20 gram yang berasal dari Departemen Patologi Anatomi FK UI. Mencit diberi pakan standar serta minum secara *ad libitum*.

Transplantasi tumor mencit

Pada hari ke-0, dilakukan transplantasi tumor mencit. Sebelumnya, 20 mencit resipien yang sudah diacak dimasukkan ke dalam kandang masing-masing. Satu kelompok berisi lima ekor mencit dalam satu kandang. Kandang mencit dibuat dengan

serbuk kayu dan dilengkapi makanan dan minuman *ad libitum*.

Transplantasi dilakukan dengan mengeluarkan jaringan tumor dari mencit donor. Pertama-tama mencit donor dimatikan dengan eter, kemudian jaringan tumor diambil menggunakan alat bedah. Jaringan tumor dimasukkan ke dalam cawan arloji, dilarutkan dengan PBS, dicacah-cacah sampai menjadi bubur tumor yang halus.

Bubur tumor yang sudah halus dan merata tersebut disuntikkan subkutan di daerah lengan kanan bawah resipien sebanyak 0,1 ml, dengan menggunakan spuit 1 cc.

Uji *in vivo*

Uji *in vivo* menggunakan mencit strain C3H yang telah diinduksi tumor kemudian diberi perlakuan (ekstrak RM-M). Pemberian ekstrak bahan uji dimulai pada hari ke-2 setelah induksi tumor dan pencekokan dilakukan selama 19 hari. Mencit dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol (K) yang diberi akuades dan tiga kelompok dosis (P1-P3), yaitu dosis 750; 1500; dan 2250 mg/kg bb. Perhitungan dosis didapatkan dari penelitian LD50 per oral pada tikus yang telah dilakukan sebelumnya. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit

Ketentuan besar sampel dihitung berdasarkan rumus Federrer (1955) dengan rumus^{12,13}

$$(t-1)(n-1) > 15$$

Keterangan

t = banyaknya kelompok perlakuan (t=4)

n = jumlah replikasi/ jumlah sampel dalam satu kelompok

Pengukuran pertumbuhan tumor dimulai sejak hari ke-3 Sebanyak dua kali seminggu. Pengukuran dilakukan dengan cara membasahi kulit badan mencit dengan air agar bulu-bulunya tidak mengganggu

pengukuran, kemudian mengukur diameter terbesar dan diameter terkecil dari tumor, menggunakan kaliper Rumus volume tumor yaitu : $\text{Volume} = 0,4 \times \text{diameter terbesar} \times (\text{diameter terkecil})$ pembulatan volume adalah sampai dengan tiga angka di belakang koma.¹⁴

Setelah 19 hari pemberian perlakuan, mencit diterminasi dengan cara pembiusan menggunakan larutan eter. Jaringan tumor diambil dengan pembedahan dan dimasukkan ke dalam buffer formalin. Selanjutnya dibuat preparat dengan pewarnaan AgNOR yang dilakukan di laboratorium patologi departemen patologi anatomi FK-UI.

Pewarnaan preparat AgNOR

Potongan jaringan tumor dimasukkan kedalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam buffer natrium fosfat sampai mencapai pH 7,0). Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan kedalam larutan akuades selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi. Potongan jaringan tumor dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam dan kemudian larutan xylol murni selama 2×2 jam. Jaringan dimasukkan dalam parafin cair selama 2×2 jam. Jaringan ditanam dalam parafin padat yang mempunyai titik lebur 56-58°C, ditunggu sampai parafin padat.

Jaringan dalam parafin dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca objek yang sebelumnya telah diolesi poliolisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca objek dipanaskan dalam inkubator suhu 56-58°C sampai parafin mencair.

Preparat dibilas dengan larutan xylene selama 5-10 menit sebanyak 3 kali, kemudian dalam etanol (100%) selama 2-5 menit, dicuci air mengalir selama 5 menit kemudian dibilas dengan *deionized water* selama 2-3 menit sebanyak 2-3 kali.

Preparat direndam dalam satu bagian larutan A dan 2 bagian larutan B kemudian dibiarkan ditempat yang gelap selama 30-60 menit. Kemudian preparat dicuci dengan deionized water 3 kali, dengan sodium tiosulfat 5% selama 5 menit, kemudian dibilas dengan etanol (100%) dan larutan xylene. Adapun Larutan A (Coloid Developer Solution) dibuat dengan melarutkan 100 ml akuades dengan 2 gr gelatin dan 1 mL asam format 1% kemudian diaduk selama 20-30 menit dalam suhu 40-60° C. Larutan B dibuat dengan melarutkan 100 mL akuades dengan 50 gr perak nitrat. Larutan ini harus disimpan dalam tempat yang gelap dan dibungkus dengan kertas aluminium foil.

Data didapat dari pembacaan dan pengamatan preparat histopatologi secara mikroskopis dengan menghitung persentase jumlah sel yang menyerap AgNOR terhadap 200 sel, dengan perbesaran 400 kali. Analisis data dilakukan dengan uji ANOVA *one way* yang dilanjutkan dengan uji post hoc.

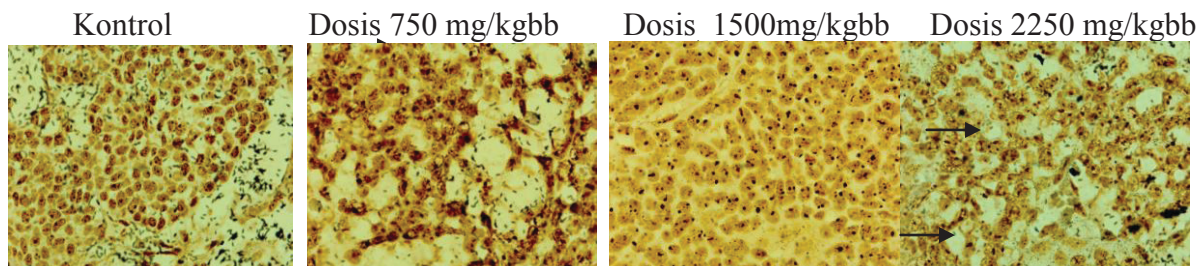
Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan dan proliferasi sel merupakan dua hal yang berkaitan erat pada fenomena koordinasi biologi. Pada saat proliferasi, penambahan sintesis protein dipenuhi dengan cara mengubah biogenesis ribosom. Perubahan gen pada sel tumor yang berhubungan dengan biogenesis ribosom dapat ditunjukkan dengan kuantitas dari *nuclear organization region* (NOR). Pewarnaan NOR dengan perak (Ag) disebut AgNOR. Bercak AgNOR menggambarkan peningkatan aktivitas transkripsi rDNA dan maturasi RNA ribosom sehingga dapat digunakan sebagai indikator peningkatan aktivitas proliferasi sel¹⁵. Dari pengamatan mikroskopik terhadap jumlah AgNOR, didapat nilai rata-rata persen AgNOR pada tabel berikut

Tabel 1. Hasil penghitungan jumlah AgNOR sediaan jaringan adenokarsinoma mammae untuk kelompok kontrol dalam tabel berikut

No	Kontrol (%)	Perlakuan 1(%)	Perlakuan 2(%)	Perlakuan 3(%)
1	70,50	63,00	45,00	50,00
2	61,50	57,50	46,50	40,00
3	68,50	61,50	48,50	44,00
4	59,00	55,00	64,00	40,50
5	57,50	52,50	44,50	42,50
Rerata ± SD	63,4000 ±5,7922a	57,9000 ±4,37893a	49,7000 ±8,14402b	43,4000 ±4,02182b

Keterangan : huruf yang sama pada kolom yang berbeda tidak berbeda nyata ($p>0,05$)
 K: kelompok Kontrol, P1: kelompok dosis 750 mg/kgbb, P2: kelompok dosis 1500 mg/kgbb.
 P3: kelompok dosis 2250 mg/kgbb



Perbesaran foto 400 kali, tanda panah menunjukkan sel yang berproliferasi.

Gambar 1 . Hispatologi AgNO, kepadatan proliferasi sel tumor

Rerata jumlah AgNOR pada kelompok P3 lebih rendah diantara semua kelompok. Kelompok K memiliki rerata jumlah AgNOR lebih tinggi dibandingkan dengan P1, P2 maupun P3. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian Ekstrak kombinasi meniran dan rumput mutiara dengan dosis besar selama 19 hari dapat menurunkan jumlah AgNOR dalam jaringan adenokarsinoma mencit C3H.

Mencit strain C3H untuk penelitian ini dipilih karena strain C3H mempunyai insidensi kejadian tumor lebih tinggi dibanding mencit strain lainnya.

Peningkatan jumlah AgNOR berbanding lurus dengan tingkat proliferasi sel sehingga secara tidak langsung menunjukkan progresivitas tumor¹⁶ Penurunan jumlah AgNOR pada kelompok P1, P2 dan P3 menunjukkan bahwa ekstrak

kombinasi meniran dan rumput mutiara dapat menghambat progresivitas dari adenokarsinoma mammae. Hal tersebut dimungkinkan karena asam ursolat dan asam oleanoat memiliki sifat antikarsinogenik yang diduga mampu menurunkan proliferasi sel kanker payudara⁷.

Pengobatan menggunakan tanaman obat pada praktiknya selalu menggunakan terapi kombinasi dari beberapa macam tanaman obat dengan memperhatikan efek samping yang mungkin terjadi.¹⁸ Pada penelitian ini dipilih kombinasi rumput mutiara dan meniran. Meniran yang bersifat imunostimulator bermanfaat sebagai imunoterapi mendampingi obat kanker lainnya¹⁹. sementara itu Berdasarkan penelitian oleh Hsu dkk, komponen utama dalam rumput mutiara, yaitu asam oleanolat dan asam ursolat dapat menghambat pertumbuhan tumor yang sudah ditransplantasikan subkutan dan sel hepatoma secara *in vitro* dan *in vivo*.^{19,20,21}

Dari uji lanjut post hoc terlihat perbandingan antara dosis 750 mg/kg BB (P1) dengan dosis 1500 mg/kg BB (P2) dan dosis 2250 mg/kg BB (P3) yang menunjukkan adanya perbedaan yang cukup signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa perubahan dosis akan mempengaruhi kemampuan ekstrak untuk menekan proliferasi sel tumor mammae pada hewan yang di uji.

Kesimpulan dan Saran

Kombinasi ekstrak rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa* Lamk) dan Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dosis 2250mg/kg bb dapat menurunkan derajat histologis adenokarsinoma mammae mencit strain C3H.

Ucapan Terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan yang telah memberikan dukungan penulisan.

Daftar Rujukan

1. <http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/1060>. diakses 11 Juli 2011. Pk 5.02
2. Sintha Suhiman, Christina Winarti. Prospek dan fungsi tanaman obat sebagai imunomodulator. balitro.litbang.deptan.go.id/ind/imaget/
3. Ruwaida DG. Uji toksisitas senyawa hasil isolasi rumput mutiara (*Hedyotis Corymbosa* Lamk) dengan metode brine shrimp lethality test (BST). Skripsi. Jurusan Biologi Fak MIPA universitas sebelas maret. Surakarta.2010.
4. Amelia G. Potensi Rumput Mutiara (*Hedyotis Corymbosa* L) sebagai antioksidan alami. skripsi. biokimia FMIPA. IPB. Bogor. 2006.
5. Lestarini, Arum I. Pengaruh Pemberian *Phyllanthus Niruri* L terhadap respon imunitas seluler mencit balb/c yang diinfeksi dengan salmonella typhimurium. Thesis. Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.2008.
6. Utami SA. Efek *cyclophosphamid factor* Terhadap Proliferasi Sel (Agnor) dan volume tumor adeno *Ca Mammae* Mencit. Tesis. Program Pasca Sarjana. Universitas Diponegoro. 2008.
7. Trere D, Ceccarelli C, Montanaro L, Tosti E, Derenzini M. Nukleolar size and activity are related by pRb and p53 status in human breast cancer. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2004; 52:1601-7
8. Guski H , Hufnagl P , Kaufmann O , Krause M , Winzer KJ . *AgNOR* analysis of atypical ductal hyperplasia and intraductal carcinoma of the breast. [internet]. 2014 Maret. Available from: Pubmed.
9. Ceccarelli C, Trerè D, Santini D, Taffurelli M, Chieco P, Derenzini M. *AgNOR* in breast tumors. [internet]. [cited 2014 Maret]; Available from: <http://www.sciencedirect.-com>
10. Derenzini M, Ceccarelli C, Trerè D, Santini D, Taffurelli M, Trerè D. The prognostic value of the *AgNOR* parameter in human breast cancer depends on the pRb and p53 Status. [internet]. [cited Maret]; Available from : <http://www.sciencedirect.com>
11. Budwan, Susan. The Merck Index. An encyclopedia of chemical drug biological. Publish by Merck Co & USA, 260. 1989
12. Hanafiah KA. Rancangan percobaan : Teori dan aplikasi. Edisi Revisi. Raja Grafindo Persada, Jakarta. 2001.
13. Suryatno. Menghitung besar sampel penelitian kesehatan masyarakat. Fakultas Kesehatan Masyarakat-UNDIP. Semarang.

14. Shibata M, et al. Comparative effect of lovastatin on mammary and prostate oncogenesis in transgenic mouse models. *Carcinogenesis* 2003; 24: 453-9.)
15. Sawitri E. Pengaruh ekstrak *Phyllanthus niruri* Linn terhadap kanker kolon tikus sprague dawley yang diinduksi 1,2 dimethyl Hydrazine. Disertasi. Universitas Diponegoro. Semarang. 2008.
16. Dewi VAN. Pengaruh pemberian polifenol teh hijau terhadap gambaran jumlah Agnor jaringan adenokarsinoma mamma mencit C3H. Skripsi. 2008. FK Universitas Diponegoro. Semarang.
17. Ma'at S. tanaman obat untuk pengobatan kanker. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*. 2003;2(4).
18. Ma'at S. Tanaman obat untuk pengobatan kanker (Bagian 3). *Jurnal Bahan Alam Indonesia*. 2004 ;3(2).
19. Lin CC, Ng LT, Yang JJ, Hsu YF. Anti-inflammatory and hepatoprotective activity of Peh-Hue-Juwa-Chi-Cao in male rats. 2002. *Am J Chin Med*. Spring-Summer. Available at: http://www.findarticles.com/cf_dls/mOHKP/2002_SpringSummer/91913154/p1/article.jhtml.
20. Hsu HY. Tumor inhibition by several components extracted from hedyotis corymbosa and hedyotis diffusa. 1998. *Cancer detection and prevention* 22 Suppl 1. Available at: <http://www.cancerprev.org/Journal/Issues/22/101/28/2864>.
21. Hsu HY. Involvement of P-151NK4b gene expression in oleanolic acid and ursolic acid induced apoptosis of He pg 2 cells. Available at: <http://www.cancerprev.Org/Journal/Issues/26/101/1092/4315>.

