

Efikasi Fraksi Etanolik Akar Tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) sebagai Kemoterapi Kanker Kolon Berdasarkan Ekspresi Caspase-9

An Efficacy Effect of Ethanolic Fraction of Tempuyung's Root (Sonchus arvensis L.) As Colon Cancer Chemoterapy Upon The Expresion of Caspase-9

Brilliana Nur Rohima¹, Indwiani Astuti², Muhammad Ghufron³

¹Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, ²Bagian Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, ³Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

Email: briliananurrohimah_z@yahoo.com

Abstrak

Kanker kolon merupakan salah satu kanker banyak dijumpai. Kanker kolon merupakan satu dari 10 kanker primer paling sering di Indonesia pada 1988, 1989, dan 1991. Berdasarkan perkembangan globalisasi di Indonesia diperkirakan insidensi dan prevalensi kanker kolon akan meningkat. Apigenin adalah bioflavonoid subkelas flavone yang memiliki potensi terapeutik yang besar, salah satunya adalah memacu apoptosis. Apigenin terdapat dalam tempuyung (*Sonchus arvensis L.*). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi fraksi etanolik akar tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) untuk kemoterapi kanker kolon melalui ekspresi caspase-9 pada cell line kanker kolon WiDr. Penelitian dilakukan dengan cara sampel tanaman dideterminasi. Akar tempuyung difraksinasi dan dilakukan uji sitotoksisitas, kemudian dilakukan uji imunohistokimia pada *cell line* kanker kolon WiDr dengan ditambahkan fraksi akar tempuyung $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀, dan 2 IC₅₀. Sebagai kontrol negatif digunakan media kultur dan kontrol positif digunakan fluorouracil dosis 46,56 µg/mL, kemudian dibuat preparat histopatologi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa determinasi spesies sampel adalah *Sonchus arvensis L.* Hasil uji sitotoksisitas IC₅₀ fraksi etanolik akar tempuyung adalah 2865,5 µg/mL. Pada penelitian ini tidak dilakukan uji imunohistokimia karena IC₅₀ fraksi etanolik akar tempuyung terlalu besar (e^{50} µg/mL). Disimpulkan bahwa fraksi etanolik akar tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) memiliki potensi yang rendah untuk kemoterapi kanker kolon berdasarkan ekspresi caspase-9 pada *cell line* kanker kolon WiDr

Kata kunci: kanker kolon; apigenin; *Sonchus arvensis*; apoptosis; caspase-9

Abstract

Colon cancer is one of the most common malignant disease. In Indonesia, colon cancer became top-ten most frequent and primary cancer in 1988, 1989, and 1991. In fact, with the word globalization which's used in Indonesia may make the incidence and prevalence colon cancer become higher. Apigenin is bioflavonoid in the flavone subclass having great therapeutic potential. Apigenin can find on tempuyung's root (Sonchus arvensis L.). The objective of this research is to know the effect of ethanolic fraction of tempuyung's root (Sonchus arvensis L.) to induce the expresion of caspase-9 in colon cancer cell line WiDr. The sample was determinated. The tempuyung's root was fract and cytotoxicity assay was been done. Immunohistochemistry assay was done in the WiDr cell line of colon cancer added with the fraction of tempuyung's root $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀, and 2 IC₅₀. For negative control, culture media was used. The positive control's used fluorouracil 46,56 µg/mL. The last, histopathologic slide was made and the immunopositive cell was calculated in every slide. The result showed that sampel spesies is Sonchus arvensis L. The cytotoxicity assay for IC₅₀ ethanolic fraction of tempuyung's root is 2865,5 µg/mL. In this study, immunohistochemistry is not be done because of the IC₅₀ ethanolic fraction of tempuyung's root is too big (e^{50} µg/mL). The conclusion is the ethanolic fraction of tempuyung's root (Sonchus arvensis L.) have low potention effect to be a colon cancer chemoterapy drug founded upon the expresion of caspase-9 in colon cancer cell line WiDr.

Key words: colon cancer; apigenin; *Sonchus arvensis L.*; apoptosis; caspase-9

PENDAHULUAN

Kanker kolon merupakan salah satu kanker yang banyak dijumpai baik pada laki-laki maupun perempuan. Diperkirakan di dunia terdapat 1.023.000 kasus baru dengan kematian 529.000 tiap tahunnya.¹ Di Indonesia tidak ada data yang pasti mengenai prevalensi dan insidensi kanker. Data ini biasanya didapatkan dari Rumah Sakit pendidikan dengan angka insidensi diperkirakan minimal 170—190/ 100.000 pasien tiap tahun.

Kanker kolon merupakan satu dari 10 kanker primer paling sering di Indonesia dari tahun 1988, 1989, dan 1991. Kejadiannya lebih banyak menimpa laki-laki dari pada perempuan. Kanker kolon pada laki-laki selalu menempati urutan ke-9 pada tahun 1988—1991.² Diperkirakan insidensi dan prevalensi kanker kolon di Indonesia akan meningkat dengan makin beralihnya pola makan ke makanan yang berlemak dan makin banyaknya penduduk usia tua.³ Sebagian besar pasien kanker kolon didiagnosis pada stadium yang masih dapat dioperasi, tetapi ternyata hampir setengah pasien akhirnya meninggal karena kanker tersebut.⁴

Fluorouracil merupakan satu-satunya obat kemoterapi untuk kanker kolon yang paling efektif sebagai *first-line drug* kemoterapi kanker kolon yang direkomendasikan oleh *Food and Drugs Administration* (FDA),^{1,4} namun efek samping obat ini relatif banyak,^{1,5,6} sehingga isu yang sekarang berkembang adalah peningkatan *life survival* dan kualitas hidup pasien kanker kolon.

Flavonoid merupakan kelompok dari komponen polifenol yang terdapat pada sayuran dan buah. Flavonoid ini memiliki berbagai macam efek biologis, mulai dari penghambatan berbagai macam enzim hingga ikut mempengaruhi berbagai

hormon. Karena aksinya ini, maka flavonoid memiliki potensi terapeutik yang besar. Apigenin merupakan bioflavonoid yang masuk subkelas flavon.⁷

Apigenin telah terbukti memiliki efek terapeutik berbagai kanker, di antaranya kanker kolon, prostat, melanoma, leukemia, ovarian carcinoma, *squamous cell carcinoma*, kanker tiroid, serta kanker payudara. Efek terapeutik ini diperoleh dari berbagai jalur, yaitu menghambat perkembangan kanker, meregulasi siklus sel (dengan pengaktifan p21 melalui jalur independent p53), memacu apoptosis, menghambat invasi sel kanker serta meningkatkan stabilitas p53.⁸

Apigenin dapat menginduksi apoptosis dalam berbagai jalur. Apigenin telah terbukti menginduksi apoptosis yang dimediasi oleh TNF alfa pada kanker kolon. Dalam pemeriksaan tidak terdapat penurunan ekspresi Bcl2 Family serta molekul proapoptosis Bad dan Bax pada kanker kolon dan kanker prostat.^{8,9} Hal ini menunjukkan bahwa terdapat caspase yang diaktifkan melalui jalur ekstrinsik apoptosis.¹⁰

Apigenin yang merupakan salah satu flavonoid ini terdapat dalam tempuyung (*Sonchus arvensis L.*). Tanaman ini merupakan salah satu yang digunakan sebagai obat tradisional sebagai jamu tradisional dan sebagai terapi alternatif bagi penderita asam urat. Kandungan flavonoidnya sebagian besar adalah apigenin. Kandungan flavonoid dalam daun sebanyak 0,1044%, sedangkan dalam akar tanaman sebanyak 0,5%.¹¹

Hal ini menjadi alasan pentingnya dilakukan penelitian tentang tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) yang telah diketahui mengandung apigenin. Apigenin dalam tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) digunakan dalam pengobatan kanker kolon dengan

meningkatkan ekspresi caspase-9 yang merupakan salah satu protein spesifik pada proses apoptosis. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi fraksi etanolik akar tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) dalam pengembangan obat kemoterapi kanker kolon melalui ekspresi caspase-9 pada *cell line* kanker kolon WiDr.

BAHAN DAN CARA

Sampel tempuyung yang berasal dari Wates, Yogyakarta dideterminasi di Bagian Biologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada melalui Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM.

Fraksinasi dilakukan di LPPT UGM dengan hasil fraksi etanolik akar tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) memiliki kandungan apigenin yang relatif tinggi.

Penelitian ini bertujuan untuk menemukan IC_{50} (konsentrasi bahan/obat yang menghambat pertumbuhan sel 50% berdasarkan nilai absorbansi pada hari ke-0 dan ke-3 setelah paparan bahan/obat).¹² *Cell line* kanker kolon WiDr dalam 96 sumuran dengan densitas $1,5 \times 10^4$ sel/sumuran setelah 24 jam inkubasi, ditambahkan fraksi akar tempuyung dengan berbagai macam konsentrasi yang diikuti inkubasi kembali selama 24 jam. Sebelum 4 jam penghentian inkubasi, tiap sumuran ditambahkan MTT $110 \mu\text{L}$, dibiarkan dalam ruang gelap lalu dibaca absorbansi (A)-nya dengan ELISA. Efek sitotoksitas diekspresikan dalam persentase penghambatan pertumbuhan yang dikalkulasi sebagai berikut:

$$\text{Persen hidup} = (A_{exp} - A_{control}) : (A_{blank} - A_{control}) \times 100\%.$$
¹³

Cell line kanker kolon WiDr dengan densitas 3×10^5 sel/ sumuran diberi fraksi akar tempuyung sebanyak $\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} dan $2 IC_{50}$ yang dibandingkan dengan kontrol positif (fluorouracil $46,56 \mu\text{g/mL}$) dan kontrol negatif (media kultur). Preparat histopatologi dibuat dengan antibodi anti-caspase-9 di bagian Patologi Anatomi RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta dan sel imunopositif dihitung. Pengukuran hasil penelitian dilakukan dengan melihat ekspresi caspase-9 pada *cell line* kanker kolon WiDr dengan menggunakan mikroskop cahaya. Sel yang mengekspresikan caspase-9 memberikan warna coklat, sedangkan yang tidak mengekspresikan akan berwarna biru pada intinya. Ekspresi caspase-9 dihitung berdasarkan jumlah sel imunopositif per 500 sel dan dinyatakan dalam satuan persen.

HASIL

Hasil determinasi sampel tanaman menunjukkan bahwa spesiesnya adalah *Sonchus arvensis L.*

Persen hidup dari perlakuan kadar akar tempuyung yang dianalisis dengan regresi linier dan regresi probit digunakan untuk mendapatkan rumus untuk menentukan IC_{50} fraksi akar tempuyung.

Rumus tersebut adalah sebagai berikut:

$y = 5473,966 - 5217,029 x$; dengan y adalah IC_{50} dan x adalah 50% (0,5) maka

$$IC_{50} = 5473,966 - (5217,029 \times 0,5)$$

$$IC_{50} = 2865,5 \mu\text{g/mL}.$$

Digunakan analisis regresi probit untuk memperoleh rumus:

$$p = 3,525 - 0,933 x$$

Keterangan:

- p = transformasi persentase menjadi probit (dilihat dalam Tabel Finney, 1952).¹⁴ Nilai yang

digunakan adalah probit 5 yang diperoleh dari transformasi 50%.

- $x = \log$ (konsentrasi fraksi etanolik akar tempuyung dalam g/mL). Dalam penelitian ini x adalah $\log [IC_{50}]$.

Jika nilai-nilai yang telah diketahui dimasukkan ke dalam rumus maka:

$$p = 3,525 - 0,933 x$$

$$5 = 3,525 - 0,933 x$$

$$x = -1,58$$

$$IC_{50} = 2624,7 \mu\text{g/mL}.$$

Jumlah IC_{50} dengan menggunakan analisis regresi probit lebih kecil dibandingkan dengan menggunakan regresi linier. Kemungkinan besar ini disebabkan 5 data dieksklusi dari analisis regresi probit karena lebih dari 100% sehingga dianggap tidak representatif untuk analisis regresi probit. Pada penelitian ini digunakan IC_{50} dari analisis regresi linier yang memperhitungkan semua data.

Hasil penghitungan uji sitotoksitas fraksi etanolik akar tempuyung menunjukkan bahwa IC_{50} akar tempuyung adalah sebesar 2865,5 $\mu\text{g/mL}$. Menurut Mans, *et al.* 2000,¹⁵ jumlah ini menunjukkan bahwa akar tempuyung memiliki potensi yang rendah untuk dikembangkan sebagai obat kemoterapi. Hal ini disebabkan karena dengan konsentrasi yang sangat besar ($e^50 \mu\text{g/mL}$) fraksi etanolik akar tempuyung baru dapat menghambat proliferasi *cell line* kanker kolon WiDr 50%.

DISKUSI

Akar tempuyung digunakan sebagian bahan utama pembuatan fraksi etanolik dalam penelitian ini karena akar tempuyung memiliki kandungan flavonoid paling besar dibanding bagian yang lain,

yaitu sebesar 0,5%. Kandungan flavonoid tempuyung ini sebagian besar adalah apigenin. Walaupun demikian, jumlah apigenin yang merupakan zat aktifnya sebenarnya relatif kecil sehingga untuk menghambat proliferasi *cell line* kanker kolon WiDr 50% diperlukan konsentrasi yang mencapai 2865,5 $\mu\text{g/mL}$.

Pada setiap kelompok perlakuan dihitung jumlah sel yang mengekspresikan caspase-9 aktif. Sel kanker kolon WiDr yang mengekspresikan caspase-9 (sel imunopositif) berwarna coklat pada sitoplasmanya dan yang tidak mengekspresikan caspase-9 (sel imunonegatif) hanya berwarna biru pada intinya karena pengecatan hematoksilin. Hal tersebut memperlihatkan bahwa antibodi yang digunakan pada pengecatan ini secara spesifik menandai sel yang mengekspresikan caspase-9. Pada setiap preparat histopatologi dihitung jumlah sel yang imunopositif pada 500 sel dan dinyatakan dalam persentase.

Caspase-9 merupakan inisiator dalam jalur intrinsik apoptosis. Caspase-9 aktif dengan munculnya berbagai macam anggota keluarga protein pro-apoptosis seperti Bax, Bam, Bid dan Bim akibat aktivasi p53.^{16,17} Dalam penelitian ini, ekspresi caspase-9 diukur untuk menggambarkan proliferasi sel kanker.

Tempuyung atau *Sonchus arvensis L.* merupakan tanaman herbal liar menahun yang hidup tersebar di berbagai daerah di Indonesia.¹⁸ Di dalam akarnya, terdapat flavonoid sebanyak 0,5% yang merupakan kandungan paling banyak dibandingkan bagian tanaman lainnya.¹⁹ Flavonoid ini sebagian besar adalah apigenin yang merupakan zat aktif untuk menginduksi ekspresi caspase-9. Fraksinasi akar tempuyung dilakukan sehingga diharap-

kan sampel yang digunakan mengandung flavonoid dalam jumlah yang relatif banyak.

Apigenin merupakan bioflavonoid yang termasuk dalam kelas flavone yang memiliki potensi terapeutik.⁷ Menurut penelitian Takagaki, *et al.* pada tahun 2004, ternyata apigenin mampu menginduksi peningkatan ekspresi p21 pada sel dengan mutasi p53 dengan *p53-independent pathway*.²⁰ Selain itu, pada penelitian oleh Wang, *et al.*, pada tahun 1999 pada sel HL60 leukemia, apoptosis juga diaktifkan dengan meningkatnya ekspresi sitokrom-c serta aktivasi caspase-9 dan caspase-3 yang diperkirakan melalui *caspase-independent pathway*.^{21,22} Dalam pemeriksaan juga tidak didapati penurunan ekspresi protein keluarga Bcl2 serta molekul pro-apoptosis Bad dan Bax pada kanker kolon serta kanker prostat sehingga seharusnya ekspresi caspase-9 aktif juga tidak mengalami penurunan.^{8,9}

Dalam penelitian ini walaupun digunakan *cell line* kanker kolon WiDr yang mengalami mutasi p53 tetapi ternyata caspase-9 tetap diekspresikan.²³ Pada *cell line* kanker kolon WiDr ekspresi caspase-9 lebih tinggi pada sel yang diberi fraksi etanolik akar tempuyung dibandingkan kontrol negatif yang hanya diberi media kultur. Hal ini karena walaupun gen p53 mengalami mutasi, tetapi jalur kerja gen ini masih dapat difungsikan. Kemungkinan besar caspase-9 dapat bekerja dengan fungsi apigenin dalam mengaktifkan *p53-independent pathway* dan *caspase independent pathway*.

Pada penelitian ini tidak dilakukan uji imunohistokimia karena IC₅₀ fraksi etanolik akar tempuyung yang terlalu besar (e⁵⁰ µg/mL). Hal ini menunjukkan bahwa akar tempuyung memiliki potensi yang rendah untuk dikembangkan sebagai obat kemoterapi.¹⁵

SIMPULAN

Fraksi etanolik akar tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) memiliki potensi yang rendah sebagai obat kemoterapi kanker kolon berdasarkan ekspresi caspase-9 pada *cell line* kanker kolon WiDr.

SARAN

Sebaiknya penelitian selanjutnya mengenai pengaruh akar tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) terhadap ekspresi caspase-9 pada *cell line* kanker kolon WiDr menggunakan isolasi senyawa aktif flavonoid atau apigenin sehingga hasil yang didapatkan akan lebih representatif untuk dikembangkan sebagai obat kemoterapi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic Therapy for Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2005; 352: 476-87.
2. Tjindarbumi D, Mangunkusumo R. Cancer in Indonesia, Present and Future. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32 Suppl 1: S17-21.
3. Mortensen N. Prevention and Early Detection of Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 1997; 336:448.
4. Moertel CG. Chemotherapy for Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 1994;330:1136-1142.
5. Katzung BG. *Basic and Clinical Pharmacology*. 10th Edition. San Francisco: Mc Graw Hill, 2006.
6. Giaccone G, Pinedo HM. Drug Resistance. *The Oncologist* Feb 1996;1(1-2):82-87.
7. Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishna DR. Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential. *Indian J of Pharm* 2001; 33:2-16.

8. Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Involvement of Nuclear Factor-Kappa B, Bax and Bcl-2 in Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptosis by Apigenin in Human Prostate Carcinoma Cells. *Oncogene* 2002; 21:3727-3738.
9. Farah M, Parhar K, Moussavi M, Eivemark S, Salh B. 5-6-Dichloro-Ribifurano-sylbenzimidazole- and Apigenin-Induced Sensitization of Colon Cancer Cells to TNF- α -mediated Apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:919-928.
10. Lin JD. The Role of Apoptosis in Autoimmune Thyroid Disorders and Thyroid Cancer. *BMJ* 2001;322:1522-1527.
11. Sriningsih A, Hapsoro W, Sumaryono W, Wibowo AE, Caidir Firdayani KS, Kartakusuma P. *Analisa Senyawa Golongan Flavonoid Herbal Tempuyung (Sonchus Arvensis L.)*. (Disertasi). Universitas Gadjah Mada; 2002.
12. Triest B, Pinedo HM, Hensbergen Y, Smid K, Telleman F, Schoenmakers PS. *et al.* Thymidylate Synthase Level as the Main Predictive Parameter for Sensitivity to 5-Fluorouracil, but not for Folate-based Thymidylate Synthase Inhibitors, in 13 Nonselected Colon Cancer Cell Lines. *Clinical Cancer Research* March 1999;5:643-654.
13. Zhang C, Wu L, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Oridonin Induces Apoptosis of HeLa Cells via Alternating Expression of Bcl-2/ Bax and Activating Caspase-3/ ICAD Pathway. *Acta Pharmacol Sin* May 2004;25(5):691-698.
14. Vincent K. Probit Analysis. [serial online] [cited 2008 November 27]; [8 screens] Available from: URL: BIOONE Online Journal.
15. Mans DRA, DaRocha AB, Schwartzmann G. Anti-Cancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds. *Oncologis* 2000;3:185-198
16. Watson AJM, Apoptosis and Colorectal Cancer. *Gut* 2004;53:1701-1709.
17. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Robbins and Cotran Pathology Basic of Disease, 7th Edition*. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2005.
18. LIPI, Mengenal Tanaman Obat Tempuyung (*Sonchus arvensis*) [serial online] [cited 2007 Jul 27]; [1 screen] Available from: URL: www.iptekda.lipi.go.id/buletin_detail.htm
19. Takagaki N, Sowa Y, Oki T, Nakanishi R, Yogosawa S, Sakai T, Apigenin Induces Cell Cycle Arrest and P21/WAF1 Expression in a p53-Independent Pathway. *Int J Oncol.* 2005;26:185-189.
20. Alonso M, Tamasdan C, Miller D C, Newcomb E W, Flavopiridol Induces Apoptosis in Glioma Cell Lines Independent of Retinoblastoma and p53 Tumor Suppressor Pathway Alterations by a Caspase-independent Pathway. *Mol. Cancer Ther.* 2003;2:139-150.
21. Anonim, Apigenin Overview [serial online] [cited 2007 Jul 17]; [1 screen] Available from: URL: http://www.lef.org/abstracts/codex/apigenin_index.htm ²³Takagaki N., Sowa Y.,

- Oki T., Nakanishi R., Yogosawa S., Sakai T. 2005. Apigenin Induces Cell Cycle Arrest and P21/WAF1 Expression in a p53-Independent Pathway. *Intern JI of Oncology* 2005;26:185-189.
22. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP. p53 Mutation in Colorectal Cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* October 1990;87(19):7555-7559.