

Pengaruh Pemberian Ekstrak Batang Sarang Semut (*Myrmecodia Pendens Merr & Perry*) terhadap Ekspresi p21 dan Ekspresi ki67 pada Galur Sel Karsinoma Mammae T47D

Mudjahid¹, Sarjadi¹, Dyah Ratna Budiani²

Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang
Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta

ABSTRAK

Latar belakang

Pendekatan empiris banyak dilakukan masyarakat Indonesia dalam penggunaan herbal batang sarang semut sebagai obat anti kanker, tanpa adanya penelitian yang mendasarinya. Ekstrak batang sarang semut beberapa tahun belakangan ini banyak digunakan dalam penanganan kanker payudara tanpa pengawasan secara medik. Penelitian tentang potensi antikanker ekstrak batang sarang semut dilaksanakan antara lain dengan melihat pengaruhnya terhadap ekspresi p21 dan ki67 pada sel T47D secara *in vitro*. p21 suatu tumor suppressor protein yang berfungsi dalam induksi *cell cycle arrest* dan *repair* DNA. Sedangkan ki67 merupakan *marker proliferasi* sel yang selalu hadir pada setiap aktivitas proliferasi sel

Metode

Jenis penelitian eksperimental dengan *design post test only control group* menggunakan 24 *well kultur* sel kanker *mammae* T47D pada medium RPMI 1640, masing-masing *well* berisi $2 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$. Empat *well* pada perlakuan dengan fraksi etanolik ekstrak batang sarang semut pada konsentrasi 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 31,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 62,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dan 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Penilaian

Makna tampilan p21, ki67 dinyatakan sebagai Skor Sitologi

Hasil

Uji Regresi korelasi menunjukkan adanya hubungan yang positif antara kenaikan konsentrasi sarang semut dengan tingkat ekspresi p21 $R^2 = 0,889$

Ekstrak sarang semut menunjukkan hubungan negatif antara kenaikan konsentrasi sarang semut dengan penurunan terhadap ekspresi ki67 $R^2 = 0,827$

Kesimpulan

Ekstrak sarang semut fraksi etanolik menurunkan ki67 dan meningkatkan tingkat ekspresi p21

Kata kunci: Sarang semut (*Myrmecodia pendens*, Merr & Perry), p21 dan ki67.

ABSTRACT

Background

Empirical Approaches was done by a lot of Indonesian society on the extract of batang sarang semut as a component of herbal anti-cancer, in the absence of the underlying research. Extract of batang sarang semut in recent years is widely used in the treatment of breast cancer without clinical and laboratory supervision.

Study *in vitro* on the anticancer potential of stem extracts of sarang semut conducted among others by looking at its effect on the expression of p21 and ki67 on T47D cell line.

p21 is a tumor suppressor protein that functions in the induction of cell cycle arrest and DNA repair. While ki67 is cell proliferation marker that is always present in every proliferation cell activity that is nutritious.

Methods

This experimental was designed as a post test only control group using 24 well culture T47D mammary cancer cells in RPMI 1640 medium, each well containing $2 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$. Four well were treated with the fraction of ethanolic extract of stem until the concentration of 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 31.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Assessment

The expressions of p21 and ki67 is declared as Cytologic Score.

Results

Regression test of correlation showed a positive relationship between the increasing concentration of sarang semut with the expression of p21, $R^2 = 0.889$. Extract sarang semut showed a negative relationship between the increasing concentration of sarang semut with a decreasing expression of ki67 $R^2 = 0.827$

Conclusion

The fraction of ethanolic extract of sarang semut decreasing the level of ki67 expressions and increasing the level of p21 expressions.

Keyword : sarang semut (*Myrmecodia pendens*, Merr & Perry), p21 and ki67.

PENDAHULUAN

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. Zat-zat imunomodulator banyak terdapat pada tanaman obat. Oleh karena itu, saat ini sedang dicari tanaman obat yang dapat memodulasi sistem imun terhadap sel kanker, bahkan bila mungkin dicari tanaman obat yang dapat bersifat sebagai sitostatika.¹⁻⁸

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 sebagai tanaman obat anti kanker/sitostatika mempunyai efek dapat mengecilkan massa tumor, tetapi masih memerlukan pembuktian.⁹⁻¹²

Penelitian awal terhadap ekstrak etanolik sarang semut menunjukkan adanya kandungan zat aktif berupa flavonoid dan tanin. Di samping itu pengujian terhadap kadar toksisitas ekstrak etanolik sarang semut juga telah dilakukan^{10,11}.

Aktivitas antikanker ekstrak etanolik tanaman sarang semut dilakukan dengan menguji kemampuannya menekan ekspresi p53 mutan dari sel kanker payudara T47D⁹ serta aktivitas antikanker terhadap kanker serviks, kanker paru dan kanker usus dengan berbagai pelarut seperti air, methanol, dan campuran methanol-air.¹⁰ Hasilnya sarang semut mampu menghambat secara bermakna ekspresi p53 mutan dari sel kanker payudara T47D⁹ serta mempunyai aktivitas antiproliferasi terhadap kanker serviks, kanker paru dan kanker usus¹³.

Salah satu golongan senyawa kimia dalam *herbal medicine* yang berkaitan dengan aktivitas anti kanker adalah flavonoid, yang akan menghambat pertumbuhan dan menginduksi proses apoptosis pada sel-sel kanker.^{11,12}

Flavonoid menghambat proliferasi sel kanker dengan jalan menghambat enzim MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase).^{11,12}

Untuk melihat lebih mendalam tentang pengaruh ekstrak etanolik sarang semut terhadap apoptosis dan proliferasi sel kanker maka dilakukan studi eksperimental ekspresi

p21 dan ekspresi ki 67 pada galur sel karsinoma mammae T47D.

Penelitian ini bertujuan mempelajari pengaruh pemberian ekstrak etanolik batang sarang semut terhadap apoptosis melalui ekspresi p21 dan proliferasi sel kanker melalui ekspresi ki 67 pada galur sel kanker payudara T47D .

Penelitian ini sebagai tambahan wawasan di Bidang Patologi Anatomi dan Biomolekuler mengenai peranan ekstrak etanolik batang sarang semut terhadap apoptosis dan antiproliferasi ditinjau dari ekspresi p21 dan ekspresi ki67 sekaligus sebagai masukan dalam penanganan kanker payudara terutama di bidang Fitofarmaka. Di bidang pelayanan masyarakat penelitian ini dapat meningkatkan pengetahuan masyarakat terhadap manfaat ekstrak etanolik batang sarang semut untuk mengobati kanker payudara serta meningkatkan status ekstrak etanolik batang sarang semut dari obat tradisional menjadi obat yang telah diuji secara eksperimental.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan jenis penelitian analitik eksperimental dengan subjek penelitian Sel karsinoma Mammae T47D dari ATCC (*American Tissue Culture Collection*). Penelitian ini menggunakan 24 *well kultur* sel T47D pada medium RPMI 1640, masing-masing *well* berisi 2×10^5 sel/200 μ l. Empat *well* berisi fraksi etanolik batang sarang semut, dengan konsentrasi 0 μ gr/ml; 31,25 μ gr/ml; 62,5 μ gr/ml; 125 μ gr/ml. Dalam menentukan jumlah sampel tersebut digunakan patokan *rule of thumb*, sebagaimana dituliskan oleh Murti (2006), yang menyatakan apabila sampel dibagi dalam sejumlah kelompok studi berdasar tingkat perlakuan maka jangan sampai kurang dari 5 subjek

Kultur sel karsinoma Mammae T47D dilakukan setelah *thawing* dari tangki nitrogen cair. Sel dikultur pada media RPMI 1640, FBS 10%, Penstrep 2%, Fungizone 0,5%. Adaptasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan CO₂ 5%. Setelah konfluen sel dipanen dengan tripsin 0,25%.

Selanjutnya dilakukan starvasi dengan tujuan mencapai keseragaman umur sel T47D dalam kultur, dengan menggunakan RPMI 1640, FBS 10%, Penstrep 2%, Fungizone 0,5% selama 7 hari setiap 3 hari sekali media diganti dengan yang baru dalam inkubator CO₂ 5%.

Setelah hari ke-tujuh, sel dilepas dari *flask* dengan tripsin 0,25% ditambah RPMI 1640, disentrifuse selama lima menit kemudian supernatan dibuang, jumlah sel dihitung dengan bilik hitung *Improved Neubauer haemocytometer*.

Disiapkan alat mikro kultur 48 sumuran yang terdiri atas baris A sampai dengan F dan kolom 1 sampai 6. Masing-masing sumuran diisi dengan sel karsinoma Mammae T47D yang telah dilakukan starvasi dengan kepadatan sel sama, yaitu 2×10^5 sel/200 μ l.

Bahan uji fraksi etanolik batang sarang semut yang telah disiapkan dengan masing-masing enam konsentrasi, ditambahkan dengan menggunakan mikro pipet ke dalam sumuran. Setiap konsentrasi dibuat lima kali ulangan.

Perlakuan dengan fraksi etanolik batang sarang semut, ditentukan dengan variasi konsentrasi 0 μ gr/ml; 31,25 μ gr/ml; 62,5 μ gr/ml; 125 μ gr/ml. Dilakukan perhitungan jumlah sel yang hidup dengan menggunakan *Improved Neubauer* dan mikroskop *interved*.

Biakan sel T47D pada media RPMI1640 dan setelah diberi perlakuan dengan ekstrak batang sarang semut pada konsentrasi 0 μ gr/ml; 31,25 μ gr/ml; 62,5 μ gr/ml; 125 μ gr/ml sebanyak 2×10^5 sel ditetaskan di atas kaca objek yang sudah dilapisi poli L-lysine, masing-masing kelompok dengan 5 ulangan. Dilakukan *blocking* dengan serum normal selama 20 menit, diinkubasi dengan *monoklonal antibodi primer anti-human p21* (dengan pengenceran 1:100) selama 18 jam pada 4°C. Dicuci dengan *wasing buffer* (PBS) 2 kali selanjutnya diinkubasi 20 menit dengan *polyvalent universal HRP conjugate*. Dicuci dengan PBS 2 kali selanjutnya diinkubasi dengan DAB (*Deamino Benzidin*) sebagai substrat enzim. Pewarnaan tanding (*counterstain*) menggunakan Hematoxilin Mayer. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop Olympus DP40 untuk menentukan intensitas ekspresi dan prosentase sel.

Penilaian makna tampilan p21, ki67 dinyatakan sebagai Skor Sitologi (SS) dilakukan berdasar rumus sebagai berikut :

$$SS = (IK \times PK) + (IS \times PS) + (IL \times PL) + (IN \times PN)$$

(Tan, *et al.*, 2002)

Keterangan:

- I = Intensitas
- P = Prosentase
- K = Kuat
- S = Sedang
- L = Lemah
- N = Negatif

Data yang diperoleh dalam penelitian, dilakukan uji statistik untuk mengetahui reaksi pemberian ekstrak batang tumbuhan sarang semut terhadap proliferasi galur sel karsinoma mammae T47D serta uji regresi pemberian fraksi etanolik ekstrak batang tumbuhan sarang semut pada galur sel karsinoma mammae T47D terhadap skor sitologi p21 dan ki67.

HASIL

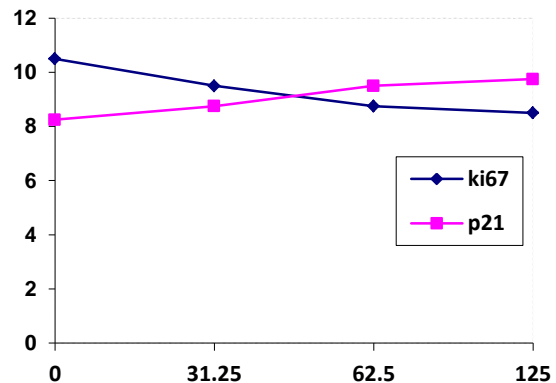
Pada penelitian eksperimental *in vitro* tentang pengaruh pemberian ekstrak sarang semut pada biakan sel T47D (sel kanker payudara) pada media RPMI dengan 10% FBS pada 5% CO₂ didapatkan hasil sebagai berikut :

Tabel 1. Hasil Pengamatan ekspresi p21 dan ki67 sel T47D pada pemberian ekstrak sarang semut (μ g/ ml), dinyatakan sebagai skor sitologis.

No	Konsentrasi (μ g/ ml)	Skor sitologis p21	Skor sitologis ki67
1	0	8,5	10,5
2	31,25	8,75	9,5
3	62,5	9,5	8,75
4	125	9,75	8,5

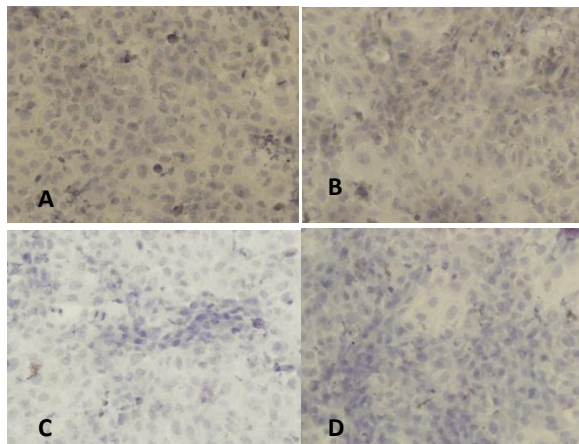
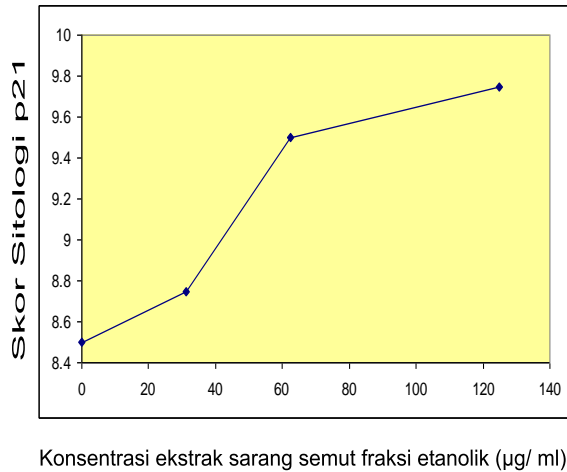
Hasil pengamatan pengaruh pemberian ekstrak sarang semut fraksi etanolik terhadap ekspresi p21 dinyatakan dalam skor sitologi, ditampilkan dalam grafik-grafik berikut ini :

Grafik 1. Grafik pengaruh pemberian fraksi etanolik ekstrak sarang semut terhadap ekspresi ki67 dan p21 sel T47D.



Konsentrasi ekstrak sarang semut fraksi etanolik (μ g/ml)

Grafik 2. Grafik pengaruh pemberian fraksi etanolik ekstrak sarang semut terhadap ekspresi p21 sel T47D.

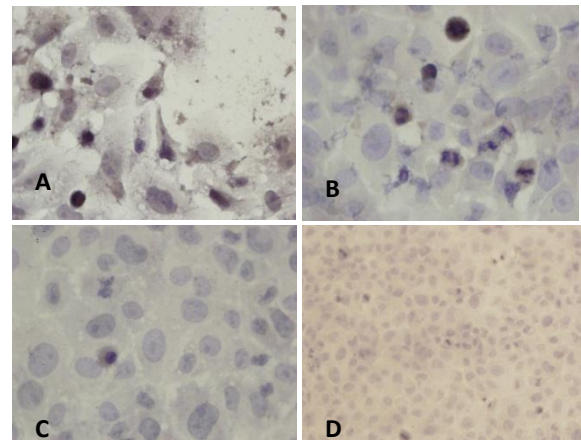
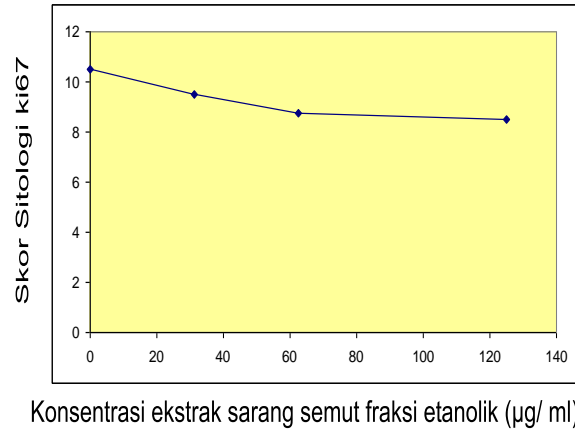


Gambar 1. Ekspresi p21 pada uji dengan fraksi etanolik batang sarang semut
 A. Perlakuan 1 (0 µg/ml), menunjukkan ekspresi positif dengan skor 8,5
 B. Perlakuan 2 (31,25 µg/ml), menunjukkan ekspresi positif dengan skor 8,75
 C. Perlakuan 3 (62,5 µg/ml), menunjukkan ekspresi positif dengan skor 9,5
 D. Perlakuan 4 (125 µg/ml), menunjukkan ekspresi positif dengan skor 9,75

Dari gambar tabel dan grafik hubungan antara konsentrasi pemberian ekstrak sarang semut dan skor histologis p21, menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi pemberian ekstrak sarang semut meningkatkan skor histologis sel kanker payudara T47D. Grafik hasil pengamatan pengaruh pemberian ekstrak sarang semut fraksi etanolik terhadap

ekspresi ki67 (dinyatakan dalam skor sitologi), ditampilkan dalam grafik berikut ini :

Grafik 3. Grafik pengaruh pemberian fraksi etanolik ekstrak sarang semut terhadap ekspresi ki67 sel T47D.



Gambar 2. Gambaran mikroskopik ekspresi ki67 pada uji dengan fraksi etanolik batang sarang semut.
 A. Perlakuan 1 (0 µg/ ml), menunjukkan ekspresi positif dengan skor 10,5
 B. Perlakuan 2 (31,25 µg/ ml), menunjukkan ekspresi positif dengan skor 9,5
 C. Perlakuan 3 (62,5 µg/ ml), menunjukkan ekspresi positif dengan skor 8,75
 D. Perlakuan 4 (125 µg/ ml), menunjukkan ekspresi positif dengan skor 8,5

Dari gambar tabel dan grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak sarang semut dan ekspresi ki67, menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi pemberian ekstrak sarang semut menurunkan skor histologis sel kanker payudara T47D.

DISKUSI

Pengaruh Pemberian Fraksi Etanolik Ekstrak Sarang Semut Terhadap Ekspresi p21 sel T47D

Hasil penelitian menggambarkan adanya potensi peningkatan tingkat ekspresi p21 (suatu tumor supresor) pada pemberian konsentrasi ekstrak sarang semut yang bertingkat, pada kultur sel kanker payudara T47D yang memiliki p53 mutan. Hasil uji regresi linier didapatkan nilai koefisien korelasi (R^2)=0,889; $R=0,943$; $F_{hit}=16,03$ dengan taraf signifikansi (α)=0,057; dengan persamaan garis lurus $y=8,550+0,0105x$. Hasil ini sejalan dengan laporan Budiani et.al³, bahwa pemberian fraksi etanolik umbi sarang semut menurunkan ekspresi p53 mutan. Sel T47D dan meningkatkan indeks apoptosis. Turunnya ekspresi p53 mutan dilaporkan lebih lanjut oleh Budiani.et.al³ akibat berjalannya mekanisme *Repair DNA* p53 mutan, sehingga p53 WT terbentuk. Dengan demikian, protein p21 yang merupakan *Down Stream effect* dari p53 *Wild Type* akan terinduksi dan terekspresi sehingga mekanisme *cell cycle arrest* maupun *repair DNA* yang diperankan oleh p21 akan dapat dilaksanakan, dan proliferasi sel akan terhambat. Keadaan ini dimungkinkan akan dapat menginduksi adanya apoptosis (kematian sel yang terprogram).

Tabel Hasil uji Regresi Korelasi linier hubungan antara konsentrasi pemberian ekstrak sarang semut dan skor histologis p21 adalah sebagai berikut:

Tabel 2. Hasil uji Regresi Korelasi linier hubungan antara konsentrasi pemberian ekstrak sarang semut dan skor histologis p21.

R^2	df	F	Sig	b0	b1
0.889	2	16,03	0,057	8.55	0,015

Hasil perhitungan statistik uji regresi linier dengan program SPSS versi 15 adalah sebagai berikut: nilai R atau koefisien korelasi yang didapatkan sebesar 0.943, $R\ square=0.889$; $F_{hit}=16,030$, signifikansi=0.0057 dan persamaan garis liner yang didapatkan adalah $y=8.55+ 0.0105 X$. Pemberian ekstrak sarang semut meningkatkan skor histologis p21 atau meningkatkan proliferasi sel kanker payudara T47D.

Pengaruh Pemberian Fraksi Etanolik Ekstrak Sarang Semut Terhadap Ekspresi ki67 sel T47D

Hasil analisis uji linier pengaruh pemberian fraksi etanolik sarang semut terhadap ekspresi ki67 menggambarkan ada korelasi negatif antara pemberian fraksi etanolik sarang semut terhadap peningkatan ekspresi ki67 pada sel T47D. Nilai koefisien korelasi ($R^2=0,827$; $R=0,910$); $\alpha=0,090>0,05$; $F_{hit}=9,592$, persamaan garis linier mengikuti $y=10,150-0,0153x$. Hasil ini mengindikasikan bahwa peningkatan konsentrasi pemberian fraksi etanolik sarang semut mampu menekan atau menurunkan proliferasi sel. ki67 merupakan marker proliferasi sel. Keberadaannya dikaitkan dengan aktivitas pembelahan sel. Selanjutnya penurunan tingkat ekspresi ki67 dianalogikan sebagai penurunan aktifitas proliferasi sel.

Tabel hasil uji Regresi Korelasi linier hubungan antara konsentrasi ekstrak sarang semut dan ekspresi ki67 adalah sebagai berikut :

Tabel 3. Hasil uji Regresi Korelasi linier hubungan antara konsentrasi ekstrak sarang semut dan ekspresi ki67.

R^2	Df	F	Sig	b0	b1
0.827	2	9.59	0.090	10.15	-0,0153

Hasil perhitungan statistik uji regresi linier dengan program SPSS versi 15 adalah sebagai berikut: nilai R atau koefisien korelasi yang didapatkan sebesar 0.910, $R\ square=0,827$; $F_{hit}=9,59$, signifikansi=0,090 dan persamaan garis liner yang didapatkan adalah $y=10,15- 0.0153x$. Pemberian ekstrak sarang semut menurunkan skor histologis ki67 atau menurunkan proliferasi sel kanker payudara T47D.

KESIMPULAN

Pemberian fraksi etanolik sarang semut meningkatkan ekspresi p21 dan menurunkan ekspresi ki67 pada sel T47D

SARAN

Dilaksanakan penelitian lanjutan *in vivo* pada hewan coba dengan karsinoma baik yang memiliki p53 mutan maupun *wild type*, untuk mengetahui mekanisme penghambatan malig-

nasi yang diperankan oleh fraksi etanolit sarang semut

DAFTAR PUSTAKA

1. Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 5th ed. Philadelphia: Elsevier-Saunders. 2005: 4-15, 65-103, 247-53, 258-59, 268-69, 279-80, 290-95.
2. Amit KT, Madhumita R, Bhattacharya RK. Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Current Science*. 2001;80:1387-96.
3. 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.
4. Bandaso, Randanan. Telaah pustaka: mekanisme apoptosis. *Majalah Patologi Indonesia* 2005;14:29-34.
5. Constatinides P. General pathobiology. Connecticut: Appleton & Lange;1994:173-190.
6. Pokok-Pokok penanggulangan penyakit kanker di Indonesia. Jakarta (INA): Dep Kes RI 1989.
7. Dickson RB, Lippman ME. Cancer of the breast. In: Vincent TD, Samuel H, Steven AR, editors. Principles & practice of oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1997: 1541-1616.
8. Hiroko D, Teruhiko F, Shino N, Toshihiro K, Kazuo S. Analysis of cell growth inhibitory effect of catechin through MAPK in human breast cancer cell line T47h. *Int J Onco*1. 2002: 21: 1301-05.
9. Goodman, J.W. The immune response. In: Stites DP, Terr A I editors. Basic and clinical immunology. 8th ed. USA: Prentice-Hall Int; 1998: 40-49.
10. Kresno SB. Aspek imunologi pada kanker. Nelwan, editor. Simposium ke-4 Jakarta Antimicrobial Update 2003. Jakarta: Sub Bagian Penyakit Tropik dan Infeksi Bagian Ilmu penyakit Dalam FK UI/ RSUPN. 2003: 59-77.
11. Kumar V, Abbas All, Fausto N. Robbins and Conran. Pathologic basis of disease. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Inc. 2009.
12. Ladish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky, S. Lawrence, Matsudaira P, Darnell J. Molecular cell Biology 3rd ed. New York: Scientific American Books; 1996: 886-98, 1247-70.
13. Lehman C, Zeis M, Schmithz N, Uharek L. Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells. *Blood*. 2000;59-77.
14. Murti, Bhisma. Prinsip dan metode riset epidemiologi. Yogyakarta: UGM Press; 1997.