

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Hasil Pembuatan Ekstrak Etanol Tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*)

Pembuatan ekstrak etanol *Myrmecodia pendens* dilakukan di Laboratorium Farmasi FKIK UMY dengan metode maserasi. Pada ekstraksi digunakan larutan etanol 70% karena pelarut ini dapat melarutkan lebih banyak flavonoid. Pertimbangan lain digunakannya etanol sebagai pelarut adalah karena pada etanol dengan kadar 20% atau lebih kuman sulit tumbuh. Etanol merupakan pelarut yang baik untuk senyawa hidrofilik dan lipofilik. Hasil ekstraksi tanaman sarang semut digambarkan secara makroskopik adalah kental, coklat kehitaman. Hasil dari ekstraksi tanaman sarang semut seberat 200 g menghasilkan ekstrak kental sebanyak 13,04 gram.

Perkembangan Berat Badan Mencit

Penginjeksian sel kanker lidah dilakukan pada hari -7 lalu pada hari ke 0 masing masing kelompok mulai diberi perlakuan hingga hari ke 6, dimana Kelompok 1 tanpa perlakuan injeksi sel kanker lidah, kelompok 2 injeksi sel kanker lidah $5 \cdot 10^6$, kelompok 3 injeksi sel kanker lidah dan diberi ekstrak *Myrmecodia pendens*, dan kelompok 4 diinjeksikan sel kanker lidah beserta cisplatin. Selama pemberian perlakuan masing-masing mencit ditimbang berat badannya menggunakan neraca elektrik.

Secara deskriptif tabel penimbangan berat badan adalah sebagai berikut :

Tabel 2 . Perubahan berat badan mencit Balb/c yang diberikan ekstrak etanol sarang semut.

Hari	Berat Badan Kelompok (gram)			
	1	2	3	4
1	35	40,1	39,15	34
2	35,1	42,05	38,85	34,85
3	36,1	39,25	38,45	34,35
4	36,2	39,6	38,45	34,4
5	36,35	39,1	37,9	33,95
6	36,45	39,35	38,3	34,4
7	36,75	38,75	38,15	35,7

Ket : 1 (Tidak diinjeksi sel kanker); 2 (Diinjeksi sel kanker dan diberi aquades); 3 = Diinjeksi sel kanker dan diberi ekstrak sarang semut 3mg; 4 (Diinjeksi sel kanker dan diberi cisplatin 0,27mg).

Selanjutnya dilakukan analisis statistik pada hasil pengamatan berat badan untuk membandingkan antara hasil pengamatan yang diberi perlakuan sebagai kelompok tanpa injeksi sel kanker lidah manusia, kontrol positif, aquades sebagai kontrol negatif, dan dosis ekstrak etanol *Myrmecodia pendens*.

Analisa data secara statistik pada hasil pengamatan berat badan mencit diawali dengan menguji normalitas dengan uji *Shapiro-Wilk* dan homogenitas varian menggunakan uji *Levene statistic*.

Hasil uji *Shapiro-Wilk* menunjukkan masing masing kelompok memiliki nilai $p > 0,05$ artinya dapat disimpulkan bahwa semua data kelompok perlakuan terdistribusi normal. Untuk mengetahui apakah data sampel homogen atau tidak dilanjutkan dengan uji *Levene statistic*.

Hasil dari uji *Levene* statistik homogenitas variannya $p (0,318) > 0,05$ artinya data perlakuan sampel homogen, dengan demikian data ini termasuk

data parametrik yang kemudian dilanjutkan dengan test ANOVA untuk melihat perbandingan dari semua kelompok.

Hasil uji ANOVA menunjukkan nilai $p (0,000) < 0,05$ yang artinya dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada tiap kelompok, sehingga dilanjutkan dengan uji *Least Significant Differences* (LSD).

Tabel 3. Efek kemoterapi sarang semut terhadap berat badan mencit balb/c ditentukan oleh index berat badan (IBB), Uji *Shapiro Wilk*, Homogenitas dan ANOVA.

Kelompok	Perubahan Berat Badan	IBB (Mean + SD)	<i>Shapiro Wilk</i>	Uji Levene	Anova
1	(+) 1,75gr	36,071 + 0,586	0,202	0,318	0,000
2	(-) 1,25 gr	39,742 + 1,100	0,039		
3	(-) 1 gr	38,464 + 0,421	0,846		
4	(+) 1,7 gr	34,5214 + 0,59	0,129		

Ket : $P > 0,05$ memiliki perbedaan signifikan; $P < 0,05$ tidak memiliki perbedaan yang signifikan.. (+) Bertambah; (-) Berkurang

Uji LSD dilakukan untuk memastikan ada atau tidaknya perbedaan pasangan atau dalam 2 kelompok perlakuan.

Tabel 4. Efek kemoterapi sarang semut terhadap berat badan mencit balb/c masing-masing kelompok ditentukan oleh uji LSD.

Kelompok	Uji LSD		
	Mean Difference	Nilai p	Keterangan
Kelompok 1 dan 2	-3,75000(*)	0,000	Perbedaan Bermakna
Kelompok 1 dan 3	-2,47143 (*)	0,000	Perbedaan Bermakna
Kelompok 1 dan 4	1,47143 (*)	0,001	Perbedaan Bermakna
Kelompok 2 dan 3	1,27857 (*)	0,004	Perbedaan Bermakna
Kelompok 2 dan 4	5,22143 (*)	0,000	Perbedaan Bermakna
Kelompok 3 dan 4	3,94286 (*)	0,000	Perbedaan Bermakna

*Menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan

Variasi berat badan diperkirakan akibat stress yang dialami mencit selama percobaan yaitu : akibat pergantian makanan, minuman, pengukuran volume nodul dan penimbangan berat badan yang dilakukan setiap hari.

Hasil Pengukuran Volume Nodul

Pengukuran volume nodul tumor menggunakan *Caliper*. Pengukuran volume nodul dilakukan dengan mengukur panjang (L) dan lebar (W) diameter tumor, lalu dimasukkan kedalam rumus $V = L \times W^2$ (Supriatno, 2007). Pengukuran nodul dilakukan dari hari pertama sampai hari keenam setelah diberikan perlakuan. Secara deskripsi dari tabel pengukuran volume tumor adalah sebagai berikut:

Tabel 5. Perubahan volume tumor pada mencit balb/c yang diberikan ekstrak etanol sarang semut.

Hari	Volume Tumor (cm ³)		
	2	3	4
1	0,21185	0,6475	0,5545
2	0,157	0,4955	0,485
3	0,1255	0,393	0,3945
4	0,1075	0,2315	0,3115
5	0,0695	0,1587	0,2805
6	0,026	0,0855	0,2545

Ket : 2 (Diberikan aquades); 3 (Diberikan ekstrak etanol sarang semut 3mg); 4 (Diberikan cisplatin 0,27mg).

Selanjutnya dilakukan analisis statistik pada hasil pengamatan volume nodul untuk membandingkan antara hasil pengamatan yang diberi perlakuan sebagai aquades sebagai kontrol negatif, kontrol positif, dan dosis ekstrak etanol *Myrmecodia pendens*.

Analisis data secara statistik pada hasil pengukuran volume nodul mencit diawali dengan menguji normalitas dengan uji *Shapiro-Wilk* dan homogenitas varian menggunakan uji *Levene*. Hasil uji *Shapiro wilk* menunjukkan nilai $p > 0,05$ artinya dapat disimpulkan bahwa semua data kelompok perlakuan terdistribusi normal. Untuk mengetahui apakah data sampel homogen atau

tidak dilanjutkan dengan uji *Levene statistic*. Hasil dari uji *Levene statistic* homogenitas variannya $p < 0,05$ artinya data perlakuan sampel tidak homogen dengan demikian data ini termasuk data non parametrik yang kemudian dilanjutkan dengan test *Kruskal wallis* untuk melihat perbedaan dari semua kelompok.

Hasil uji *Kruskal wallis* menunjukkan nilai $p < 0,05$ yang artinya terdapat perbedaan yang bermakna pada tiapkelompok. Sehingga dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.

Tabel 6. Efek kemoterapi sarang semut terhadap perubahan volume tumor balb/c ditentukan oleh index volume tumor (IVT), Uji *Shapiro Wilk*, Homogenitas dan *Kruskal Wallis*.

Kelompok	Penurunan Volume Tumor (%)	IVT(Mean + SD)	<i>Shapiro Wilk</i>	Uji Levene statistik	<i>Kruskal Wallis</i>
2	45 %	0,116 + 0,652	0,999		
3	73 %	0,335 + 0,214	0,801	0,014	0,012
4	88 %	0,380 + 0,120	0,516		

Ket : $P > 0,05$ memiliki perbedaan signifikan; $P < 0,05$ tidak memiliki perbedaan yang signifikan

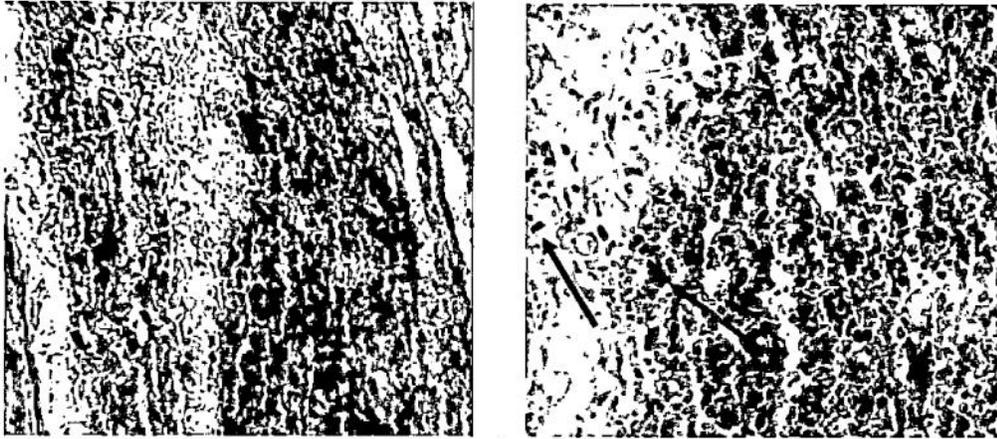
Uji *Mann Whitney* dilakukan untuk memastikan ada atau tidaknya perbedaan pasangan atau dalam 2 kelompok perlakuan.

Tabel 7. Efek kemoterapi sarang semut terhadap perubahan volume tumor mencit balb/c pada masing-masing kelompok ditentukan oleh uji *Mann whitney*.

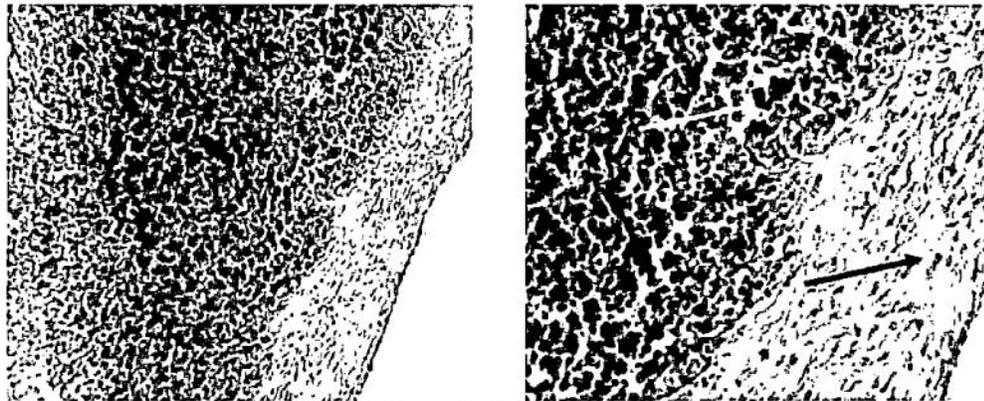
Kelompok	Uji <i>Mann Whitney</i>	
	Nilai p	Keterangan
Kelompok 2 dan 3	0,037	Terdapat perbedaan
Kelompok 2 dan 4	0,004	Terdapat perbedaan
Kelompok 3 dan 4	0,589	Tidak Terdapat perbedaan

Nilai p menunjukkan nilai signifikansi dimana jika $p > 0,05$ berarti tidak mengalami perbedaan yang signifikan. $p < 0,05$ berarti memiliki perbedaan

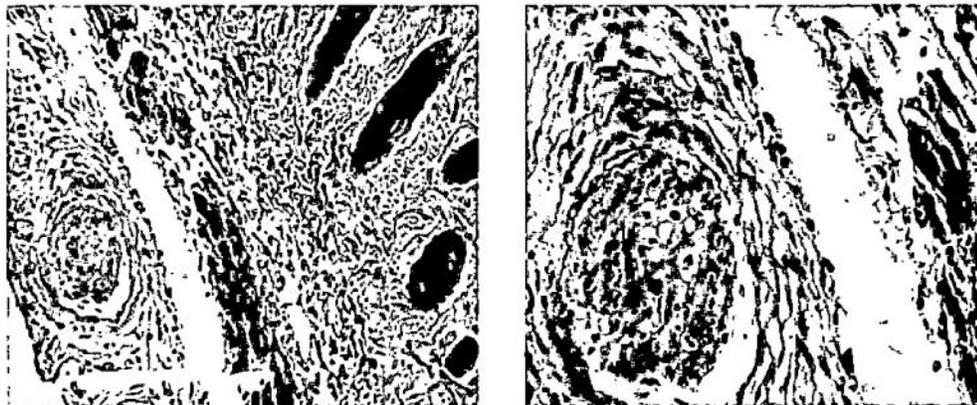
yang signifikan dengan uji *one way ANOVA*. Pada hasil tabel 5. di atas didapatkan hasil uji *Mann whitney* antara kelompok 2 (aquades) dan kelompok 3 (ekstrak etanol sarang semut 3 mg) menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan. Hal ini dapat disimpulkan bahwa pengurangan volume tumor saat diberikan ekstrak sarang semut lebih efektif dibandingkan hanya diberikan aquades. Pernyataan tersebut tidak berbeda dengan kelompok 4 (cisplatin). Pemberian cisplatin pada kelompok 4 menunjukkan perubahan volume tumor yang signifikan bila dibandingkan kelompok yang di beri aquades. Namun pada perbandingan antara kelompok 3 dan kelompok 4 menunjukkan tidak terjadi perbedaan yang signifikan di antara kedua kelompok.

Gambar Histopatologi

Gambar 6. Gambar Histologi kelompok Aquades perbesaran 40x dan 100x



Gambar 7. Gambar Histologi kelompok Sarang Semut Perbesaran 40x dan 100x



Gambar 8. Gambar Histologi kelompok Cisplatin Perbesaran 40x dan 100x

B. PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan 8 ekor mencit jantan. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah berat badan dan volume nodul sebelum dan setelah dilakukan injeksi serta perlakuan. Cara menumbuhkan sel SP-C1 pada hewan coba dapat dilakukan dengan berbagai cara. Salah satunya dengan injeksi sel kanker sebagaimana yang dilakukan pada penelitian ini. Metode injeksi dilakukan secara subkutan (penanaman sel SP-C1) pada daerah punggung mencit Balb/c. Kelompok 1 merupakan kelompok tanpa perlakuan, kelompok 2 diberikan injeksi sel kanker lidah manusia dan diberi aquades, kelompok 3 diinjeksi sel SP-C1 dan diberi ekstrak etanol *Myrmecodia pendens* sebanyak 3 mg/kgBB, kelompok 4 diinjeksi sel SP-C1 dan diberi cisplatin sebanyak 0,27 mg/kgBB. Pada tiap-tiap kelompok setelah muncul nodul diberi perlakuan secara intubasi oral selama 6 hari kemudian pada hari ke tujuh seluruh hewan uji didekapitulasi nodul tumor. Tidak ada mencit yang mati selama penelitian dari awal pemberian injeksi sel kanker lidah manusia hingga hari ketujuh atau akhir penelitian.

Pengukuran efek kemoterapi dievaluasi berdasarkan perubahan berat badan dan volume nodul tumor hewan uji. Pengukuran berat badan dianalisis menggunakan *one way ANOVA Test*, sedangkan volume nodul diuji menggunakan *Mann Whitney Test*. Tujuan dari analisa ini adalah untuk mengetahui efek kemoterapi tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendens*) terhadap berat badan dan volume nodul mencit yang diinjeksi Sel SP-C1.

Hasil Penelitian mengenai efek kemoterapi ekstrak *Myrmecodia pendens* terhadap perkembangan berat badan mencit yang diinjeksi sel kanker lidah manusia menunjukkan bahwa terdapat perbedaan berat badan yang signifikan antara kelompok 2 (aquades) dan kelompok 3 (ekstrak *Myrmecodia pendens*). Seperti yang telah tertera pada Tabel 2 menunjukkan, kelompok 1 dan kelompok 4 mengalami penambahan berat badan, namun pada kelompok 2 dan kelompok 3 mengalami penurunan berat badan. Pertambahan dan penurunan berat badan pada masing masing kelompok dapat disebabkan oleh berbagai sebab. Penurunan berat badan pada kelompok yang diberikan ekstrak sarang semut mungkin disebabkan karena serat ekstrak *Myrmecodia pendens* yang tinggi. Menurut Muchtadi (2001) serat pangan dapat menghalangi penyerapan zat gizi seperti gula, protein dan lemak. Penurunan berat badan mencit sama dengan penambahan berat badan manusia, yang dipengaruhi oleh zat gizi yang dimakan meliputi : protein, karbohidrat, lemak, vitamin dan mineral yang cukup seimbang (Linder 1992).

Respon imun tubuh mencit terhadap penolakan sel kanker lidah manusia juga diduga berperan dalam terjadinya penurunan berat badan mencit. Pengerusakan sel yang terjadi menyebabkan reaksi inflamasi, peningkatan sitokin proinflamasi antara lain *IL-1*, *TNF alpha* dan *IL-2*. Sitokin *IL-1* dan *TNF alpha* bersifat termogen, kebutuhan kalori tubuh meningkat sehingga kanker, lemak dan karbohidrat diubah menjadi kalor atau panas tubuh yang menyebabkan penurunan berat badan hewan coba (Akrom, 2012).

Sebaliknya pada kelompok 1 yang tidak diinjeksi sel kanker dan kelompok 4 yang diberi cisplatin 0,27 mg mengalami peningkatan berat badan. Peningkatan berat badan pada kedua kelompok diduga karena proses metabolisme asupan nutrisi yang diberikan pada masing-masing kelompok telah kembali normal.

Pengukuran volume tumor selama 6 hari, perbedaan antara kelompok sarang semut dan cisplatin tidak mengalami perbedaan yang signifikan antar kelompok sarang semut dan cisplatin ($p > 0,05$). Namun pada Pemberian ekstrak sarang semut (3 mg/kgBB) menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($p < 0,05$) bila dibandingkan kelompok yang diberikan aquades. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol sarang semut memiliki khasiat sebagai agen kemoterapi terhadap perkembangan sel kanker lidah manusia.

Peneliti lain juga melaporkan tentang pengaruh ekstrak *Myrmecodia pendens* terhadap aktivitas karsinogenesis. Fatmawati *et al*, (2011) telah membuktikan secara *in vitro* aktivitas sitotoksik ekstrak etanol *Myrmecodia pendens*. Secara umum efek sitotoksik menunjukkan adanya fenomena *dose dependent response* yaitu efek sitotoksik meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak yang diberikan. Pada penelitiannya efek sitotoksik *Myrmecodia pendens* terhadap sel HeLa terjadi pada dosis 33,28 µg/ml. Berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya Soeksmanto *et al*. (2010) membuktikan secara *in vitro* ekstrak *n-Butanol Myrmecodia pendens* dapat bersifat sitotoksik pada sel kanker serviks (Sel Hela) dan sel kanker payudara (MCM-B2) pada dosis 27,61 dan 54,57 ppm.

Sumarno 2010, melakukan percobaan efek ekstrak etanol *Myrmecodia pendens* pada mencit model kanker payudara C3H dengan dosis yang berbeda, hasil penelitiannya menunjukkan ekstrak *Myrmecodia pendens* dapat menurunkan aktifitas proliferasi dan menginduksi apoptosis sel kanker pada dosis 8 mg. Sejalan dengan Sumarno (2010), Suwondo *et al.* (2011) secara in vitro mencoba mengkaji efek ekstrak etanol *Myrmecodia pendens* terhadap jalur apoptosis sel kanker payudara. Hasil yang didapatkan adalah ekstrak etanol *Myrmecodia pendens* dapat menghambat perkembangan tumor dengan meningkatkan ekspresi *caspase-9*, *Bcl-2*, *Bax* dan *p53* melalui pengamatan immunohistokimia.

Kemampuan ekstrak etanol *Myrmecodia pendens* dalam menghambat perkembangan kanker diduga karena terkandung senyawa flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa alam yang menunjukkan aktivitas sebagai reduktor untuk senyawa hidroksil, superoksida dan peroxy radikal (Soeksmanto, 2010). Flavonoid telah terbukti dapat menghambat perkembangan sel-sel kanker dengan cara menstimulasi produksi interferon gamma dalam populasi immunosit, yang sangat penting dalam memacu aktivitas CTL's dan sel NK pada sistem perondaan imun terhadap sel sel kanker. Bila CTL's dan NK sel ini aktif maka akan banyak terjadi proses *killing* terhadap sel-sel tumor yang menyebabkan banyak terjadi apoptosis sel-sel tumor. Apoptosis dapat terjadi karena aktifnya enzim caspase, pengaktifan enzim ini dapat melalui berbagai jalur, di antaranya melalui *T-cell Receptor* (TCR) maupun aktifitas *granzyme* yang masuk kedalam

sel dengan bantuan *pore forming factors perforin* (Abbas *et al.*, 2012). Selain itu senyawa flavonoid dapat menghambat perkembangan tumor melalui penghambatan siklus sel, pelepasan sitokrom c, aktivasi *caspase 9*, *caspase 3*, meningkatkan ekspresi protein p21, p27, Bax penurunan ekspresi protein *cyclin B1*, *cyclin A* dan *Cdc2* (Aryapour *et al.*, 2012).

Bukti bahwa ekstrak sarang semut dapat meningkatkan jumlah apoptosis bisa dilihat pada gambar 7. Pada gambar tersebut terdapat anak panah berwarna kuning yang menandakan telah terjadi proses apoptosis. Apoptosis dalam pewarnaan HE ditandai dengan bercak berwarna hitam. Jumlah bercak berwarna hitam pada kelompok yang diberikan ekstrak sarang semut berjumlah lebih banyak dibandingkan kelompok yang diberikan aquades. Tidak hanya meningkatkan jumlah apoptosis, sel-sel lain yang berperan membunuh sel kanker pun terjadi peningkatan. Anak panah berwarna merah menunjukkan terjadinya peningkatan sel NK di antaranya makrofag dan neutrofil.

Lee *et al.* (2008) mencoba mengkaji mekanisme antiinflamasi flavonoid pada alergi dengan menggunakan sel HEK 293. Hasilnya menunjukkan bahwa flavonoid menghambat ekspresi mRNA TNF- α . Aktivasi IL-8 *promoter-reporter* bersifat meningkatkan ekspresi NFkB sub unit p65 dan p50 di nukleus dan mengaktifasi promotor TNF- α . Pengamatan yang dilakukan dengan menggunakan fluoresensi menunjukkan pemberian flavonoid pada sel HEK 293 terbukti menghambat fosforilasi dan degradasi

I κ B α serta translokasi NF- κ B p65 dalam sel HEK 293 yang terstimulasi TNF- α .

Penelitian *in vitro* yang dilakukan oleh Romier *et al.* (2008) menggunakan sel usus manusia Caco-2 mencoba mengkaji efek flavonoid pada kegiatan *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B) dalam mengikat DNA. NF- κ B adalah suatu *transcription factor* yang berperan penting dalam regulasi molekul pembentuk sitokin. Jalur klasik aktivasi NF- κ B terjadi melalui heterodimer p50 dan p65 selanjutnya NF- κ B dimer di-inaktifkan oleh protein I- κ B. Signal reseptor cenderung mengaktifasi multisubunit I- κ B kinase (IKK) kompleks yang akan memfosforilasi I- κ B dalam dua kunci serin. Fosforilasi I- κ B menandainya untuk degradasi translokasi ke dalam inti, mengikat DNA dan terjadi aktivasi transkripsi. Hasil ini menunjukkan bahwa flavonoid mengatur kegiatan NF- κ B dan mengurangi kerusakan oksidatif pada sel adenokarsinoma kolon (Caco-2).

Penurunan volume nodul tumor tidak hanya disebabkan karena aktivitas senyawa flavonoid, peneliti menduga terjadi reaksi penolakan terhadap sel SP-C1 yang ditanamkan pada mencit Balb/c. Dugaan peneliti diperkuat pada pengamatan gambaran histopatologi kelompok yang diberi aquades pada gambar 6.

Aquades merupakan larutan fisiologis yang tidak memiliki khasiat apapun, namun pada gambar histopatologi kelompok aquades telah terjadi peningkatan produksi sel netrofil, monosit, makrofag dan proses apoptosis. Sel-sel tersebut memiliki fungsi sebagai fagosit yaitu memakan serta

menghancurkan bahan-bahan yang tidak diperlukan dalam tubuh *host*. Sel tumor yang diinjeksi secara subkutan pada punggung mencit merupakan faktor penyebab terjadinya peradangan. Sel-sel tumor yang diinjeksi diduga sebagai benda asing oleh sistem imun tubuh *host* kemudian terjadi reaksi penolakan. Pernyataan ini senada dengan pendapat Abbas *et al.* (2012) bahwa penanaman sel kanker dari berbeda spesies (*Xenograft*) memiliki kecenderungan untuk ditolak oleh tubuh *host*. Hal tersebut disebabkan karena sel yang mengandung antigen tumor mengekspresikan antigennya bersama molekul MHC kelas I, kemudian membentuk kompleks TCR dari sel T sitotoksik (CD8) dan mengaktivasi sel T sitotoksik untuk menghancurkan sel tumor tersebut (Abbas *et al.*, 2012).

Proses pengukuran berat badan dan penumbuhan tumor selama 6 hari kurang memberikan hasil yang memuaskan, hal ini mungkin disebabkan karena waktu yang kurang lama atau cara yang kurang efektif. Hasil pengukuran berat badan menggunakan peneraan digital memiliki beberapa kelemahan antara lain berat badan tikus terpengaruh dengan variasi harian tikus serta peneraan yang kurang teliti dan ketidakseragaman pengukuran dari masing-masing anggota peneliti. Pewarnaan preparat menggunakan HE dirasakan kurang efektif karena tidak bisa mendeteksi kerusakan minimal yang terjadi pada proses karsinogenesis. Oleh sebab itu peneliti mengharapkan kekurangan dari penelitian ini dapat menjadi bahan pertimbangan bagi peneliti selanjutnya.