

Potensi Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* Tenorea Steenis) Terhadap Peningkatan Apoptosis Sel Kanker Lidah Manusia (SP-C1) *In Vitro*

Harysuda Maulana, Ana Medawati, Supriatno

Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Prodi Pendidikan Dokter Gigi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

Corresponden to : Harysuda Maulana

Prodi Pendidikan Dokter Gigi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

Email :harysudamaulana@yahoo.co.id

Abstract

Kanker lidah merupakan kanker yang paling sering terjadi pada rongga mulut. Penyebabnya multifaktorial dimana memacu pertumbuhan karsinogenesis. Sampai saat ini terapi untuk kanker dilakukan dengan pembedahan, kemoterapi, radioterapi dan terapi kombinasi. Terobosan baru untuk terapi kanker yang berpotensi dalam peningkatan apoptosis adalah dengan menggunakan terapi herbal. Dalam hal ini yaitu fenol, fenol adalah suatu senyawa agen antikanker yang berpotensi dalam peningkatan apoptosis sel kanker lidah. Daun Binahong merupakan salah satu tanaman herbal yang berpotensi karena terdapat kandungan senyawa fenol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaji hubungan antara ekstrak etanol daun binahong dengan apoptosis sel kanker lidah manusia (SP-C1). Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental laboratoris murni. Sel kanker lidah manusia (SP-C1) diperlakukan dengan tujuh konsentrasi bawah dan atas IC50 dan ekstrak etanol daun binahong, termasuk 0,50,100,200,300,400,500 µg/ml. pada uji apoptosis, dilakukan pengecatan sel menggunakan Aridine orange dan etidium bromide setelah diinkubasi selama 24 jam. Penggunaan mikroskop fluorescence digunakan untuk menghitung sel. Sel yang hidup akan tercatat hijau, sel yang apoptosis berwarna kekuningan sedangkan yang nekrosis akan tercatat merah. Data dianalisis dengan uji saphiro-wilk dan uji levene untuk normalitas dan homogenitas data, jika analisis data normal maka dilanjutkan dengan uji parametrik: korelasi Pearson, regresi linear dan salah satu hasil ANOVA satu jalur. Menunjukkan bahwa ada korelasi yang kuat antara ekstrak etanol daun binahong dengan apoptosis sel.

Keyword : Sel kanker lidah manusia, *Anredera cordifolia* Tenorae Steenis, apoptosis

Pendahuluan

Kanker merupakan penyebab kematian nomor dua di dunia (Damayanti, 2010). Kanker terdapat di berbagai jaringan dan organ, sejalan dengan pertumbuhan dan perkembangannya, sel-sel kanker membentuk suatu komunitas dari jaringan ganas yang bisa menyebar (Metastasis) ke seluruh tubuh (Sarmoko, 2008). Macam kanker yaitu kanker payudara, kanker prostat, kanker kulit, kanker usus, kanker paru, kanker mulut dan kanker lidah.

Kanker mulut merupakan penyebab kematian yang menempati peringkat ketiga sesudah kanker lambung dan rahim sedangkan kanker lidah menempati 39,95% dari kanker mulut. Peningkatan kanker mulut pada laki-laki dijumpai 20000 kasus setiap tahun, sedangkan pada wanita sekitar 10.000 kasus setiap tahunnya.

Karsinoma sel skuamosa mempunyai ciri-ciri penyakit yang sulit untuk disembuhkan dan termasuk masalah kesehatan utama di dunia. Prognosis kanker masih belum memuaskan, walaupun telah dilakukan secara holistik (Syafriadi, 2008). Karsinoma lidah bisaanya berupa ulserasi dengan ukuran yang kecil berwarna abu-abu, merah muda sampai merah. Kurang lebih 60% dari lesi tersebut terdapat pada 2/3 anterior lidah, umumnya dijumpai pada permukaan ventral dan bagian lateral lidah, karena kedua permukaan tersebut dilapisi mukosa non keratinisasi yang lebih tipis sehingga kemampuan karsinogen lebih kecil.

Insidensi pada kanker lidah pada usia tua lebih besar disbanding dengan usia muda. Semakin meningkatnya usia semakin tinggi insidensi terjadinya kanker.

Etiologi karsinoma sel lidah manusia masih belum diketahui penyebab jelas dari kanker tersebut. Tetapi dapat dikaitkan dengan beberapa faktor yang memicu terjadinya karsinogenesis yaitu dari faktor karsinogen kimia, misalnya perokok yang didalamnya mengandung senyawa nikotin yang berefek pada karsinogen, faktor karsinogen fisika, misalnya kebersihan mulut yang buruk, radiasi, kebiasaan buruk seperti mengunyah pinang, sirih, dan sebagainya yang dapat memicu karsinogen (Desen, 2011), faktor karsinogen biologik, mikroorganisme dapat juga terinfeksi *treponema pallidum*, HPV (Human papilloma virus) dan timbulnya kanker lidah jenis tertentu (Desen, 2011).

Metode

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratoris murni. Variabel pengaruhnya adalah konsentrasi ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* Tenorea Steenis), yaitu 0, 50, 100, 200, 300, 400, dan 500 µg/ml, variabel terpengaruhnya adalah potensi peningkatan apoptosis pada karsinoma sel skumosa lidah manusia (biakan sel SP-C1). Untuk variabel terkendalinya yaitu volume ekstrak etanol daun binahong, biakan sel kanker lidah (SP-C1), jumlah sel yang digunakan, yaitu 20.000 sel/well untuk uji apoptosis, waktu inkubasi selama 24 jam, dalam kondisi inkubasi (Kelembaban udara 95%, 5% CO₂ dan temperature 37⁰C).

Uji apoptosis yang digunakan adalah dengan pewarnaan *Ethidium bromide* dan *Acridine Orange*. Sel yang sehat akan tercatat warna hijau, sel yang tercatat berwarna kuning adalah sel yang apoptosis sedangkan sel yang tercatat warna merah yaitu sel nekrosis dengan alat pengamatan menggunakan mikroskop *flourosence*. Obyek pada penelitian ini adalah biakan sel *Supri's clone* (SP-C1) yang mengalami apoptosis terlihat berwarna kuning dengan pewarnaan *ethidium bromide* dan *Acridine Orange*.

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah laminar air flow, mikropipet, gelas corong, inkubator CO₂, neraca digital, *tabung centrifuse*, *centrifuge*, mikro plat 24 well, NUNC *Coverslip*, mikroskop *flouresence*, mikroskop *inverted*, flask, almari pengering, *vacuum evaporator*, *appendorf cup*, *rak appendorf* obyek gelas, pinset serta blender, kamera digital.

Sedangkan bahan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* Tenorae Steenis), biakan sel *Supri's clone*(SP-C1), DMEM(*Dubecco's modfield eagle medium*), Penissilin streptomycin 3%, DMSO(*Dimethylsulphoxide*),Aquadest, Etanol 70%, FBS (*Fetal bovine serum*), Fungizon 1%, PBS(*Phospat buffer saline*), *Ettidium bromide acridine*, *Acridine Orange*.

Pembuatan ekstrak pada penelitian ini Daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.)Steenis) yang sudah dicuci bersih kemudian dikeringkan dalam almari pengering 45⁰C kemudian dijadikan serbuk menggunakan blender sampai halus. Pembuatan ekstrak ini menggunakan cara maserasi, yaitu dengan merendam 1000 mg bubuk simplisia daun binahong dalam 1000 ml etanol 70%, kemudian di inkubasi selama 3 kali 24 jam atau 3 hari. Selanjutnya dilakukan pemisahan zat aktif dan etanol menggunakan vacum evaporator. Zat aktif dibuat stok 1 gr/ml. selanjutnya diencerkan menjadi konsentrasi (0,50,100,200,300,400 dan 500 µg/ml). Etanol digunakan sebagai bahan pengekstrak karna memiliki

beberapa kelebihan, yaitu lebih selektif, mudah saat pengenceran dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20%.

Setelah itu dilakukan pengecatan menggunakan *Acridine Orange* yang dilanjutkan dengan *etidium bromide* lalu diamati menggunakan mikroskop *flouresence* dari tiap-tiap konsentrasi dimulai konsentrasi tertinggi hingga konsentrasi terendah. Kemudian dilakukan foto sel dari pengecatan yang dilakukan. Hasil penelitian potensi peningkatan apoptosis dengan ekstrak etanol daun binahong terhadap sel kanker lidah manusia (SP-C1) dapat diketahui dengan uji apoptosis sel kanker lidah manusia.

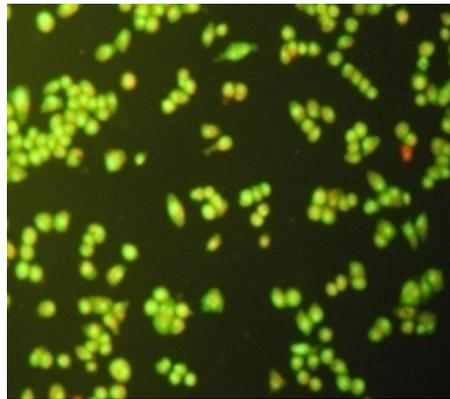
Semakin banyak tingkat apoptosis sel akibat perlakuan dengan ekstrak etanol daun binahong menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak tersebut berpotensi pada apoptosis sel SP-C1. Sebaliknya, jika sel SP-C1 tidak banyak yang terapoptosis maka ekstrak etanol daun binahong tidak mempunyai efek dalam potensi peningkatan apoptosis.

Sebelum dilakukan analisis lebih lanjut, data di analisis dengan uji *Saphiro Wilk* untuk menunjukkan apakah data terdistribusi normal atau tidak. Jika normal maka dapat dilakukan analisis selanjutnya yaitu dengan analisis untuk memprediksi besarnya nilai variabel pengaruh terhadap variabel terpengaruh. Syarat uji ANOVA adalah distribusi datanya yang normal dan variansi nya sama. Uji ANOVA diikuti dengan uji LSD untuk melihat apakah ada perbedaan yang bermakna antara masing-masing kelompok variabel pengaruh dan variabel terpengaruh.

Jika hasil uji *Saphiro Wilk* menunjukka data yang tidak normal, analisis bisa dilanjutkan dengan uji Non Parametrik. Untuk melihat apakah ada perbedaan yang bermakna atara variabel pengaruh dan variabel terpengaruh dilakukan uji *Kruskal Walls* yang diikuti dengan *Mann Whitney* untuk melihat apakah ada perbedaan bermakna antara tiap kelompok variabel pengaruh terhadap variabel terpengaruh.

Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian mengenai potensi ekstrak etanol daun binahong terhadap peningkatan apoptosis sel kanker lidah manusia secara *in vitro* menunjukkan bahwa. Sel kanker lidah manusia *Supri's clone* (SP-C1) yang sudah di inkubasi dapat digunakan untuk uji apoptosis dengan metode *double staining* yaitu dengan *Etidium Bromida* dan *Acridine Orange*. Metode ini adalah metode yang digunakan untuk melihat apoptosis sel, sel yang hidup akan larut dengan *Acridine Orange* sehingga menghasilkan warna hijau sedangkan sel yang apoptosis akan larut dengan *ettidium bromida* sehingga menghasilkan warna orange. Sel kanker lidah manusia (SP-C1) tampak pada Gambar 1. dibawah ini setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam dengan ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* Tenorea Steenis).



Gambar 1. Morfologi biakan sel karsinoma skuamosa lidah manusia yang hidup

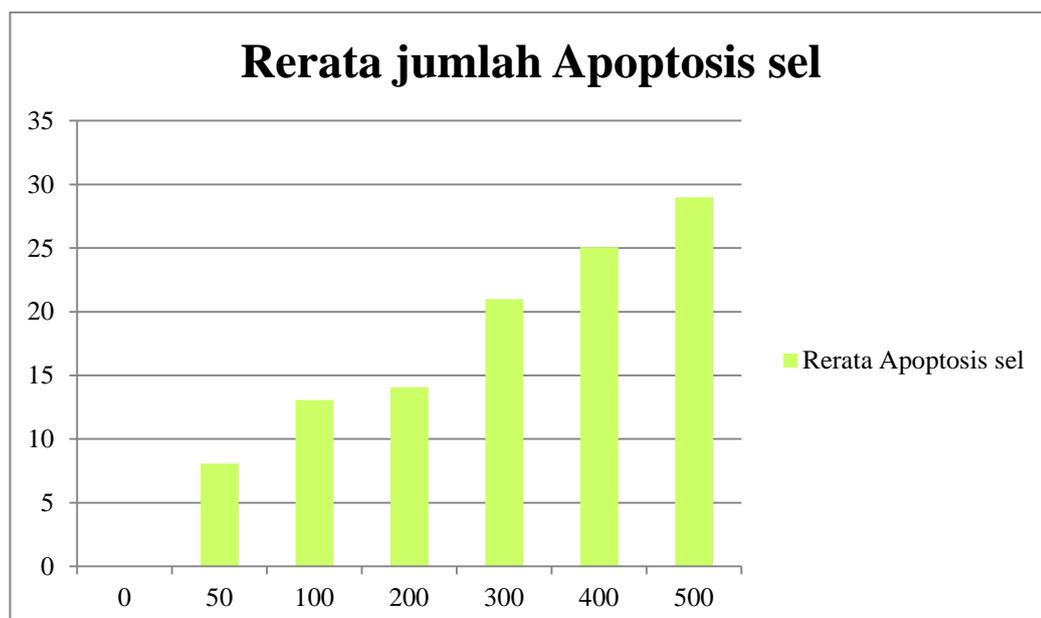
Untuk sel kanker SP-C1 dengan perlakuan ekstrak etanol daun binahong menunjukkan pewarnaan orange berarti sel tersebut mengalami apoptosis. Sedangkan sel tanpa perlakuan atau sel kontrol akan menghasilkan pewarnaan bewarna hijau. *Acridine Orange* merupakan penggambaran dari asam nukleat. *Acridine Orange* dapat melewati permeabilitas sel normal dan akan berkorelasi dengan DNA/RNA.

Perhitungan dilakukan dengan menghitung jumlah sel yang mengalami apoptosis dari tiap kelompok mulai dari kontrol konsentrasi terendah sampai tertinggi, hasil perhitungan merupakan apoptosis sel yang dihitung dalam Tabel 1 berikut :

Tabel 1. Rerata sel dan simpangan baku sel yang mengalami apoptosis

Konsentrasi	Mean \pm S. Deviation
Kontrol	.00 \pm .00
50	8.07 \pm 1.033
100	13.07 \pm 1.033
200	14.07 \pm 1.280
300	21.00 \pm 1.309
400	25.07 \pm .884
500	29.00 \pm .756

Berdasarkan Tabel 1. diketahui bahwa rerata sel dan simpangan baku yang mengalami apoptosis meningkat mulai dari konsentrasi 300 $\mu\text{g/ml}$ yang mempunyai rerata sel mengalami apoptosis 21.00 \pm 1.309, awal peningkatan terjadinya sel yang mengalami apoptosis lalu konsentrasi 400 $\mu\text{g/ml}$ dengan nilai rerata sel yang mengalami apoptosis 25.07 \pm .884, kemudian konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$ dengan nilai rerata sel yang mengalami apoptosis 29.00 \pm .756 mempunyai hambatan yang kuat dibandingkan kontrol, untuk dapat lebih mudah dipahami dapat dilihat pada Gambar 5. di bawah ini.



Gambar 2. Rerata jumlah apoptosis sel setelah perlakuan dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun binahong.

Gambar 2. menunjukkan terjadi peningkatan sel yang mengalami apoptosis mulai dari konsentrasi awal 50 µg/ml sampai dengan konsentrasi 500 µg/ml dengan jumlah rerata sel yang mengalami apoptosis 29.00 %.

Tes normalitas data menggunakan analisis *Shapiro Wilk*, dikarenakan jumlah sampel kurang dari 50. Agar analisis *Shapiro Wilk* terdistribusi normal, maka nilai signifikansinya lebih besar dari 0,05 ($P > 0,05$)

Tabel 2. Hasil Tes Uji Normalitas *Saphiro-Wilk* Dari Berbagai Konsentrasi

Konsentrasi	Statistik	DF	Signifikan
Kontrol	.000	15	.000
50 µg/ml	.932	15	.293
100 µg/ml	.817	15	.006
200 µg/ml	.781	15	.002
300 µg/ml	.868	15	.031
400 µg/ml	.823	15	.007
500 µg/ml	.932	15	.293

Keterangan :

DF : *Degree of Freedom* (Derajat Kebebasan)

Sig. : Signifikansi (perbedaan yang bermakna)

Data Tabel 2. terlihat beberapa angka signifikansi *Shapiro wilk* $P > 0,05$, data tersebut mengindikasikan terdistribusi normal. Langkah selanjutnya melakukan uji varians. Data dikatakan memiliki varians yang normal jika signifikansi lebih besar dari 0,05 ($P > 0,05$).

Uji analisis varians satu jalur menunjukkan hasil nilai signifikansi 0.000 ($P < 0,05$), maka dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan yang sangat bermakna jumlah sel yang mengalami apoptosis setelah diberi berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun binahong.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat diambil kesimpulan yaitu :

1. Ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) mempunyai potensi meningkatkan apoptosis sel kanker lidah manusia Supri's clone (SP-C1).
2. Konsentrasi ekstrak etanol daun binahong yang paling efektif dalam meningkatkan apoptosis terjadi pada konsentrasi 500 µg/ml.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan bahan ekstrak alami yang mengandung *Polifenol* yang merupakan senyawa aktif.

Daftar Pustaka

Andrijono., Aziz, M.F., Saifuddin, A.B. (2006). *Onkologi Ginekologi*. Edisi 1.Cet. 1. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo. h. 33.

Damayanti, E, Kustiyah, L., Kardinah, Roosita, K. (2011). Efektivitas Jus tomat dan minuman Bekatul terhadap Pengecilan Ukuran Lesi Kista Payudara, *Indonesian J cancer*, 5(1). H. 25.30

Wan. D (2011).*Buku ajar onkologi klinis*, (Japaries. Willie trans.). China : Sun yatsen university of medical sciences. (Buku asli diterbitkan pada 2003).

Fatima, M., Supriatno., Medawati,A. (2012). “Apoptosis Induction Human tongue cancer cells supri’s clone – 1 (SP-C1) Using different Concentration ethanol extract at pukul empat leaf (Mirabilis Jalapa L.)”, *Proceeding book : The 2nd International Joint Symposium on Oral and dental sciences*.

Guyton, A.C., & Hall, JE. (2012). *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*.Edisi 11. Jakarta: EGC. h. 41-42

Bachinsky, H., Y., Ryoo, H.D., Ciechanover, A., Gonen, H. (2007) Regulation fo the Drosophila ubiquitin ligase DIAP1 is mediated via several distinct ubiquitin system pathways. *Cell Death Differ*.14(4): 861-871.

Kholifa, M. (2010) “Pengaruh konsentrasi ekstrak etanol buah delma (punica granatum linn.)terhadap peningkatan apoptosis sel kanker lidah manusia SP-C1 in vitro”, *Biomedika*, vol. 2 no. 2.

Maryani, HI,, Suharmiati., Winarto(2004). *Khasiat dan Manfaat Daun Sambung Nyawa dan Daun Dewa*. Agromedia Pustaka.

Mangan, Y. (2005). *Cara bijak menaklukkan kanker*.Jakarta : Agromedia Pustaka. h. 59

Meiyanto, E ., Susidarti R. A., Handayani S., Rahmi F. (2008). Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (Areca Catechu L.)Mampu Menghambat Proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7.*Majalah Farmasi Indonesia*, 19(1)

Shabella, R. (2012). *Terapi daun binahong*.Klaten : Penerbit cable book

Sudiana, I., K., (2008). *Patologi molekuler kanker*.Jakarta : Penerbit salemba medika

Suseno, M. (2013). *Sehat dengan daun*. Yogyakarta : Penerbit buku pintar

Susetya, D. (2012). *Khasiat dan Manfaat Daun Ajaib Binahong*.

Yogyakarta : Pustaka baru press. h. 15-31

Syafriadi, M. (2008). *Patologi mulut : Tumor Neoplastik dan Non Neoplastik Rongga mulut*. Yogyakarta : Penerbit andi. h. 73,82,83,89

Selawa, W., R., M, Runtuwene, John, Citraningtyas, Gayatri. (2013). “Kandungan flavonoid dan kapasitas antioksidan total ekstrak etanol daun binahong”, *jurnal ilmiah farmasi, Vol. 2 No. 01*.

Sudiono, J. (2008). *Pemeriksaan Patologi Diagnosis Neoplasma Mulut*. Jakarta: EGC.

Supriatno.(2007). Oligonukleotid S-Phase Kinase Associated Protein-2 (SKP2) Antisense Menginduksi Hambatan Proliferasi dan Peningkatan Aktivitas Apoptosis Pada Sel Kanker Leher dan Kepala. *Kemajuan Terkini Riset*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada. h. 28-34.

Supriatno.(2010). “Analisis Hambatan Siklus sel kanker lidah manusia (SP-C1) yang diinduksi oleh biskoklaurin alkaloid lepharante menggunakan flow cytometer”, *Indonesian journal of cancer, vol. 4 no. 3*.

Supriatno., Yuletnawati., Widiasto. (2010). Effect of intratumoral injection of mutant type p27^{KIP1} followed by in vivo electroporation on radiotherapy-resistant human oral tongue cancer xenografts. *Molecular Medicine Report*.h. 1-6

Sugiyanto, Sudarto, B., Meiyanto, E., Nugroho, A.E., dan Jenie, U.A., 2003, Aktivitas Antikarsinogenik Senyawa yang Berasal dari Tumbuhan, *Majalah Farmasi Indonesia*, 14 (4), 216-225.