

**EFEK KO-KEMOTERAPI *Parkia speciosa* DENGAN *DOXORUBICIN* TERHADAP
SEL KANKER LIDAH dan KARDITOKSISITAS SEL JANTUNG TIKUS *Sprague
dawley***

Naskah Publikasi



| | |
|---------------------------|--------------------|
| IKHSAN NUR ARIFIN | 20120340023 |
| ARYA NUR IHSAN | 20120340018 |
| YUSRINA LUKITASARI | 20120340084 |

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA**

2016

Efek Ko-Kemoterapi *Parkia speciosa* dengan *Doxorubicin* terhadap Sel Kanker Lidah dan Kardiotoksisitas Sel Jantung Tikus *Sprague dawley*

Ikhsan Nur Arifin¹, Arya Nur Ihsan², Yusrina Lukitasari³, Erlina Sih Mahanani⁴

^{1,2,3}Dental Student of Dentistry Department, Muhammadiyah University of Yogyakarta

⁴Lecturer of Dentistry Department, Muhammadiyah University of Yogyakarta

ABSTRACT

The use of chemotherapeutic agent has various drawbacks, one of which may cause toxic effects to normal tissue. Combination of chemotherapy with another agent has been known as one of efforts to improve the treatment efficacy as well as to decrease the toxicity of chemotherapy drugs. This study investigated the potential of co-chemotherapy of Petai seed extract (*Parkia speciosa*) with *doxorubicin* against epithelial thickness, proliferation, and vacuolization which experienced healing in a rat model of tongue cancer.

A total of 42 *Sprague Dawley* rats were divided into six groups: group without treatment, cancer group, *doxorubicin* 4.6 mg/kgBW group, treatment group were each given a combination of *doxorubicin* 4.6 mg/kgBW and Petai seed extract (100, 200 and 400mg/kgBW). Administration of *doxorubicin* and Petai seed extract performed at week 12. At the end, the rats were euthanized then the tongue and heart were removed. Histological evaluations for thickness of the tongue epithelium of rat in Hematoxylin-Eosin staining, proliferation in IHC Ki-67 staining, and vacuolization of heart were carried out under a light microscope.

ANOVA results showed a highly significant difference $p < 0,05$ of each dose group petai seed extract against epithelial thickness of tongue cancer models. Further statistical test with Tukey's showed the combinations of *doxorubicin* and doses of 400mg/kg group had a significance value of $p < 0.05$ compared with combination dose group of extract 100mg/kg, 200mg/kg and *doxorubicin*.

The conclusion is combination of chemotherapy petai seed extract (*Parkia speciosa*) and *doxorubicin* have potential as anticancer seen from the thickness of the epithelium, expression of IHC Ki-67, and cardiotoxicity in rat models of tongue cancer.

Keywords: *Doxorubicin*, *Parkia speciosa*, tongue cancer, co-chemotherapy

Efek Ko-Kemoterapi *Parkia speciosa* dengan *Doxorubicin* terhadap Sel Kanker Lidah dan Kardiotoksisitas Sel Jantung Tikus *Sprague dawley*

Ikhsan Nur Arifin¹, Arya Nur Ihsan², Yusrina Lukitasari³, Erlina Sih Mahanani⁴

^{1,2,3} Mahasiswa Program Studi Pendidikan Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

⁴ Dosen Program Studi Pendidikan Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

INTISARI

Penggunaan agen kemoterapi memiliki berbagai kekurangan, salah satunya dapat menyebabkan efek toksik pada jaringan yang sehat. Penggunaan kombinasi kemoterapi dengan agen lain diketahui mampu sebagai salah satu upaya peningkatan efikasi terapi sekaligus menurunkan toksisitas akibat peningkatan obat kemoterapi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ko-kemoterapi dari ekstrak biji petai (*Parkia speciosa*) dengan *doxorubicin* terhadap ketebalan epitel yang mengalami penyembuhan pada tikus model kanker lidah.

Subjek penelitian ini menggunakan 42 ekor tikus *Sprague Dawley* dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu kelompok tanpa perlakuan, kelompok kanker, kelompok *doxorubicin* 4,6 mg/kgBB, kelompok perlakuan yang masing-masing diberi kombinasi *doxorubicin* 4,6 mg/kgBB dan ekstrak biji petai dengan dosis 100mg/kgBB, 200mg/kgBB dan 400mg/kgBB. Pemberian *doxorubicin* dan ekstrak biji petai dilakukan pada minggu ke-12. Pada akhir penelitian tikus dilakukan euthanasia dan pembedahan untuk pengambilan lidah tikus. Evaluasi histologis ketebalan epitel lidah tikus dengan pewarnaan Hematoksilin-eosin dilakukan di bawah mikroskop cahaya.

Hasil uji ANOVA menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna $p= 0,001$ dari masing-masing kelompok dosis ekstrak biji petai terhadap ketebalan epitel model kanker lidah. Uji statistik lanjutan dengan Post Hoc Tukey menunjukkan bahwa kelompok kombinasi *doxorubicin* dan dosis 400mg/kgBB memiliki nilai signifikansi $p<0,05$ dibandingkan kelompok kombinasi dengan dosis ekstrak 100mg/kgBB, 200mg/kgBB dan *doxorubicin*.

Hasil penelitian disimpulkan bahwa kombinasi kemoterapi ekstrak biji petai (*Parkia speciosa*) dan *doxorubicin* memiliki potensi sebagai antikanker yang dilihat dari ketebalan epitel pada tikus model kanker lidah.

Kata Kunci: *Doxorubicin*, ketebalan epitel, *Parkia speciosa*

A. Latar Belakang

Kanker menjadi salah satu masalah dan penyebab kematian terbesar di dunia kedokteran. Kanker rongga mulut merupakan salah satu dari 25 jenis kanker yang dipresentasikan dalam 40 negara Uni Eropa PBB¹. Kanker rongga mulut berada di urutan kedelapan dari kasus kanker yang sering terjadi secara global². Kanker rongga mulut memiliki banyak jenis, namun 90% tergolong jenis karsinoma sel skuamosa (KSS) dengan 300.000 kasus baru yang terdiagnosis setiap tahunnya secara global³.

Lidah merupakan bagian yang paling sering mengalami keganasan di rongga mulut. Karsinoma sel skuamosa pada lidah sering terjadi pada bagian posterior dan samping lidah yang angka kejadiannya mencapai 45% dari seluruh insidensi kanker lidah⁴. Secara umum epitelium lidah mengalami perubahan klinis seiring dengan bertambahnya keparahan. Tahap awal berupa lesi putih (*leukoplakia*) menjadi ulserasi kemudian lesi *exophytic* dan tumor papila. Hal ini terjadi akibat perubahan nuklear dan molekuler dari sel yang dapat dilihat secara klinis pada epitel normal⁵. Deteksi invasi kanker dapat ditentukan dengan melihat ketebalan epitel dari kanker melalui pengamatan histopatologi. Hal ini juga dapat digunakan untuk melihat metastasis yang menyebar pada limfonodi leher, kekambuhan lokal, dan kelangsungan hidup pasien karsinoma lidah⁶. Pengamatan mikroskopis meliputi keadaan histologi organ lidah dari hasil pewarnaan hematoksilin-eosin (HE). Proliferasi sel kanker yang terjadi juga dapat diamati dengan baik menggunakan imunohistokimia atau

immunohistochemistry (IHC) Ki-67 yang diekspresikan hampir di seluruh siklus pembelahan sel⁷.

Terapi kanker menggunakan obat kemoterapi masih dirasakan kurang efektif karena tidak hanya menyerang sel kanker tetapi juga sel normal. Berbagai penelitian telah dilakukan oleh peneliti untuk mengatasi masalah tersebut. Salah satu pendekatan yang sedang mendapat perhatian dewasa ini adalah penggunaan kombinasi antara obat kemoterapi dan senyawa kemoprevensi yang bersifat nontoksik. Kombinasi senyawa tersebut diharapkan dapat meningkatkan keefektifan dan menurunkan penggunaan dosis obat kemoterapi⁸.

Doxorubicin adalah antibiotik antrasiklin yang dihasilkan oleh *Streptomyces peucetius* var. *Cassius*⁹. *Doxorubicin* merupakan obat kemoterapi yang mempunyai efektivitas baik. Aksi antikanker dari *doxorubicin* melibatkan kerusakan DNA melalui inhibisi dari *topoisomerase II* yang berfungsi menguraikan pilin DNA untuk persiapan proses transkripsi dan kemudian memproduksi radikal bebas untuk membunuh sel kanker. Aktivitas doxorubicin memiliki efek toksisitas pada sel jantung¹⁰. Kerusakan tersebut diakibatkan oleh terakumulasinya zat besi sistemik yang memediasi terbentuknya radikal bebas berupa Reactive oxygen species pada mitokondria sel jantung¹¹. Kerusakan akibat doxorubicin sering ditemui pada ventrikel kiri jantung.¹² Kerusakan tersebut dapat bermanifestasi menjadi kardiomiopati, gagal jantung kongestif, dan pada akhirnya berakibat fatal¹³. Indonesia merupakan negara *megabiodiversity* yang kaya akan tumbuhan herbal. Sebagian

besar tumbuhan herbal yang tumbuh di Indonesia dipercaya memiliki khasiat sebagai bahan alternatif pengobatan berbagai penyakit, salah satu di antaranya adalah kanker. Berbagai macam tanaman herbal tersebut terdapat satu tanaman yang dipercaya dapat dijadikan anti kanker yaitu petai. Petai (*Parkia speciosa*) merupakan salah satu tumbuhan obat yang telah diketahui memiliki khasiat sebagai antioksidan terutama pada bijinya dan sering digunakan masyarakat untuk dikonsumsi, baik dalam kondisi segar maupun diolah bersama bahan pangan lainnya. Petai (*Parkia speciosa*) dipercaya masyarakat memiliki khasiat obat untuk menyembuhkan penyakit liver (*hepatalgia*), edema (*oedema*), radang ginjal (*nefritis*), diabetes, kolera, cacingan dan kanker¹⁴. Kemampuan antikanker yang dimiliki oleh petai diduga karena kandungan senyawa antioksidan seperti alkaloid, saponin, tanin dan flavonoid¹⁵. Penelitian lain juga telah menyebutkan bahwa flavonoid terbukti dapat mencegah perkembangan sel kanker melalui mekanisme apoptosis, penghambatan angiogenesis dan antiproliferatif.¹⁵ Berdasarkan referensi tentang senyawa yang terkandung pada petai, maka hal ini mendorong penulis untuk melakukan penelitian terhadap kemampuan petai dalam menyembuhkan dan menghambat perkembangan proliferasi sel kanker lidah serta proteksinya terhadap sel jantung.

B. Metode Penelitian

1. Hewan Coba

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratoris yang dilakukan pada hewan coba (*in vivo*). Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini

adalah tikus *Rattus norvegicus* galur *Sprague dawley*. Sebanyak 42 ekor tikus dibagi ke dalam 6 kelompok perlakuan. Tikus diperoleh dari dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) unit IV Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, dengan kriteria inklusi : jenis kelamin jantan, berat sekitar 100-150 gram, umur 5-6 minggu, kandang pemeliharaan serta pakan terkendali. *Ethical clearance* diperoleh dari Komisi Etika Penelitian, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dengan nomor surat: 049/EP-FKIK-UMY/II/2015.

2. Biji Petai

Biji petai diperoleh dari Pasar Tradisional Giwangan, Yogyakarta yang dibeli dari satu penjual yang sama. Biji petai yang digunakan sebanyak 7 Kg dengan kriteria inklusi : biji petai muda, berwarna hijau segar, terbebas dari ulat, dan sudah dikupas dari kulitnya.

3. Ekstraksi dan Perlakuan

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi menggunakan larutan etanol 70% dengan perbandingan serbuk dengan cairan 1:7. Pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penumbuhan sel kanker dilakukan dengan cara mengoleskan karsinogen 0,15mg 4-NQO yang dilarutkan ke dalam larutan Propilenglikol 90%. Pengolesan dilakukan sebanyak 3 kali setiap minggu selama 12 minggu. Teknik pengolesannya dengan menggunakan kuas ukuran 2 dioleskan pada dorsal lidah dari arah posterior ke anterior. Terapi ko-kemoterapi

dilakukan setelah sel tumbuh dengan mengkombinasikan ekstrak biji petai (*Parkia speciosa*) dan *Doxorubicin*. Kelompok 1 adalah kontrol negatif dan kelompok 2 adalah kontrol positif. Kelompok 3 diberikan terapi *Doxorubicin* 4,6mg/KgBB, sedangkan untuk kelompok 4,5, dan 6 diberikan ko-kemoterapi ekstrak biji petai (*Parkia speciosa*) dosis 100 mg, 200 mg, 400 mg, yang dikombinasikan *Doxorubicin* 4,6 mg/KgBB. Penumbuhan sel kanker lidah dan proses pemberian terapi dilakukan di Laboratorium Pemeliharaan Hewan Coba, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

4. Analisis Histopatologi

Pembedahan dilakukan pada minggu kedua pasca pemberian dengan cara euthanasia terhadap seluruh hewan uji. Organ lidah dan jantung diambil kemudian difiksasi ke dalam larutan buffer formalin 10%. Organ lidah dibuat preparat untuk 2 macam pewarnaan yaitu HE dan IHC Ki-67, sedangkan untuk organ jantung dibuat preparat untuk pewarnaan HE. Pembuatan preparat dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada dan RSUP Dr. Sardjito. Analisis histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Pengamatan mikroskopis ketebalan epitel dengan mengambil rata-rata antara batas maksimum dan minimum dari batas membran basalis dan lapisan stratum korneum. Skrining pengamatan ketebalan epitel menggunakan software *AxioVision* 4.7. Semakin kecil rata-rata tingkat ketebalan epitel akibat pemberian ekstrak biji

petai dan *Doxorubicin* menunjukkan bahwa ekstrak biji petai berpotensi sebagai ko-kemoterapi. Sebaliknya, jika rata-rata tingkat ketebalan epitel dari kanker semakin besar maka ekstrak biji petai tidak memiliki potensi sebagai ko-kemoterapi. Analisis histopatologis IHC Ki-67 dilakukan dengan cara menghitung rata-rata banyaknya titik-titik berwarna merah dalam 5 lapang pandang. Interpretasi pengecatan IHC Ki-67 dinyatakan sebagai presentase sel epitel skuamosa yang terwarnai positif dengan berbagai intensitas. Interpretasi dilakukan dengan menghitung rata-rata proliferasi sel karsinoma skuamosa dari 5 lapang pandang pada perbesaran 400x.

Penilaian histopatologi kerusakan jaringan jantung yang diakibatkan oleh *Doxorubicin* dilihat melalui terbentuknya vakuola dan kerusakan serta hilangnya miofibril. Derajat kerusakan diukur dalam 5 ukuran yaitu derajat 1 bila kerusakan < 5%, derajat 1,5 kerusakan 5%-15%, derajat 2 apabila kerusakan 16%-25%, dikatakan derajat 2.5 apabila kerusakan 26%-35%, dan bila kerusakan > 35% digolongkan menjadi derajat 3. Analisis dilakukan dengan metode *single-blind method*.

5. Hasil Penelitian

Pertumbuhan sel kanker dapat diamati secara makroskopis dengan melihat tanda-tanda klinis pada permukaan lidah tikus berupa lesi-lesi leukoplakia dan eritoplakia. Pada minggu pertama bulan Juni 2015 dilakukan pemberian perlakuan pada masing-masing kelompok. Perlakuan dilakukan selama 2 minggu hingga minggu kedua bulan Juni 2015. Setelah diberikan perlakuan, tikus kemudian dimatikan untuk dinekropsi lidah dan jantungnya.

a. Pengamatan Histopatologis *Hematoxylin-eosin* (HE)

Hasil penelitian mengenai efek ko-kemoterapi ekstrak biji petai (*Parkia speciosa*) dan *doxorubicin* terhadap ketebalan epitel pada tikus model kanker lidah dapat diketahui dengan cara mengambil rata-rata antara batas maksimum dan minimum dari batas membran basalis dan lapisan stratum korneum.

Tabel 1. Rata-rata Ketebalan Epitel Kanker

| | N | Mean | Std. Deviation |
|-------------|----|----------|----------------|
| 100 | 3 | 225,4547 | 10,91742 |
| 200 | 3 | 199,8480 | 16,22471 |
| 400 | 3 | 139,7403 | 21,72728 |
| Doxorubicin | 3 | 183,7450 | 5,07700 |
| Kanker | 3 | 259,3187 | 22,48609 |
| Total | 15 | 201,6213 | 43,84937 |

Berdasarkan tabel 1 menunjukkan rerata ketebalan epitel paling kecil adalah kelompok dosis 400 dan selanjutnya adalah kelompok *doxorubicin*, sedangkan rerata dari ketebalan epitel yang paling besar terjadi pada kelompok kanker, yang berarti dosis 400 efektif sebagai ko-kemoterapi untuk menghambat kanker.

Tabel 2. Shapiro-Wilk

| Kelompok Perlakuan | Shapiro-Wilk | | | |
|-----------------------|--------------|------|------|------|
| | Statistic | df | Sig. | |
| Ketebalan Kanker | 100 | ,903 | 3 | ,396 |
| | 200 | ,946 | 3 | ,553 |
| | 400 | ,903 | 3 | ,396 |
| | Doxorubicin | 1,00 | 3 | 1,00 |

uji Shapiro-

Wilk untuk mengetahui data termasuk distribusi normal atau tidak, diperoleh hasil pengujian normalitas data pada masing-masing kelompok $P > 0,05$ atau sebaran data normal.

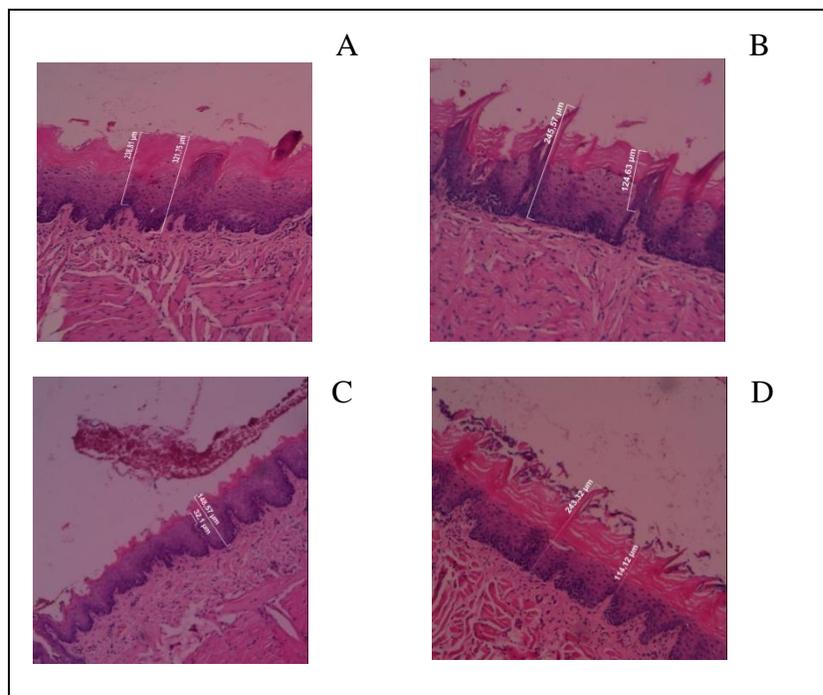
Tabel 3. Analisis Uji ANOVA

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-------------------|-------------------|----|----------------|--------|------|
| Between Groups | 11663,245 | 3 | 3887,748 | 17,666 | ,001 |
| Within Groups | 1760,564 | 8 | 220,070 | | |
| Total | 13423,809 | 11 | | | |

Uji *one way ANOVA* menunjukan hasil nilai $p=0,01$ ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat bermakna dari masing-masing kelompok dosis ekstrak biji petai terhadap ketebalan epitel model kanker lidah. Oleh karena itu, uji statistik dilanjutkan dengan uji *Tukey HSD*. Hasil uji lanjutan *Tukey HSD* menunjukan bahwa kelompok perlakuan dosis 400 dengan 100, 200 dan *doxorubicin* juga menunjukan $p < 0,05$ yang menunjukan adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok yang diperbandingkan.

Tabel 4. Analisis Tukey HSD

| Kelompok Dosis Efektif | Kelompok Pemanding | Dosis Perlakuan | Uji Tukey HSD | |
|------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | | Mean Difference | Significant (p) |
| | Doxorubicin | Doxo 4,6 mg | -44,00467* | 0,027 |
| Dosis 400 | 100 | Ekstrak 100 mg | -85,71433* | 0,000 |
| | 200 | Ekstrak 200 mg | -60,10767* | 0,005 |



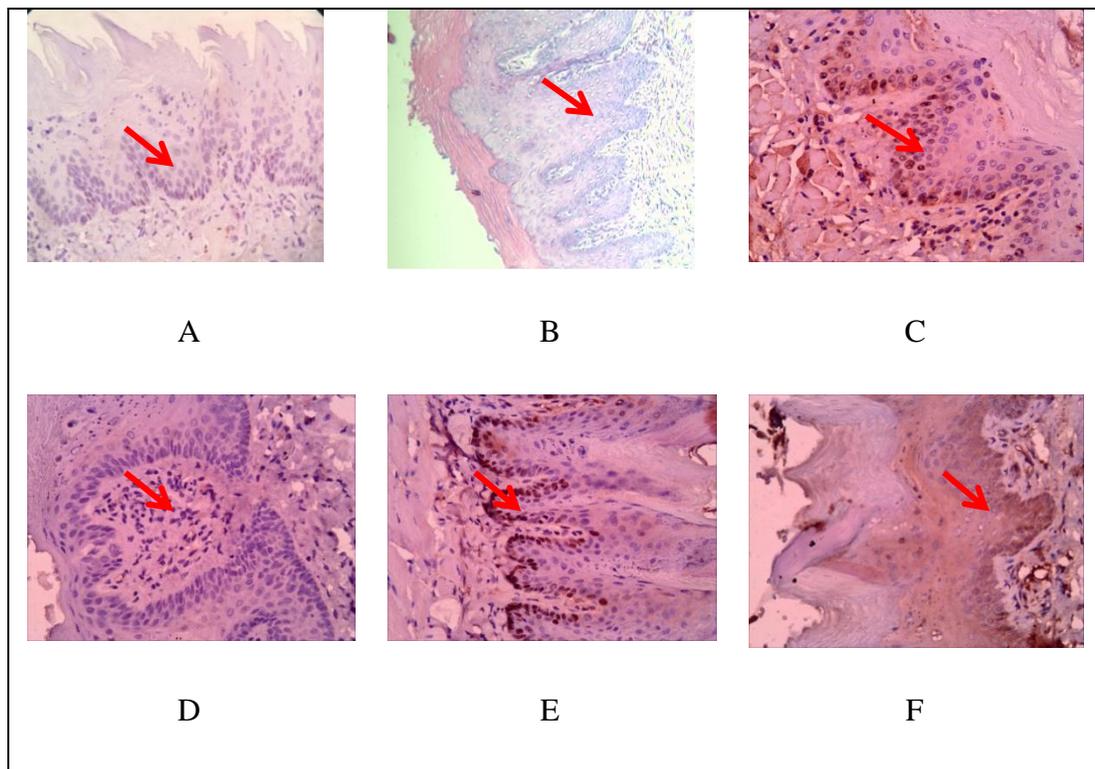
Gambar 1. Histopatologi Ketebalan Epitel Kanker pada Lidah Tikus. (A) Dosis Ekstrak 100 mg, (B) Dosis Ekstrak 200 mg, (C) Dosis Ekstrak 400 mg, (D) Dosis Doxorubicin

b. Pengamatan Histopatologis IHC Ki-67

Pengamatan histopatologis menggunakan imunohistokimia Ki-67 bertujuan untuk melihat proliferasi sel kanker lidah. Pengamatan dilakukan dengan melihat

preparat menggunakan mikroskop monokuler perbesaran 400x sebanyak 5 lapang pandang.

Sajian tabel diskriptif jumlah sel yang mengalami imunopositif Ki-67 adalah sebagai berikut :



Gambar 2. Histopatologi Ki-67 Lidah Tikus. (A) Kelompok 1 Sel Normal Lidah Tikus, (B) Kelompok 2 Sel Kanker Lidah Tikus, (C) Kelompok 3 *Doxorubicin* 4,6 mg, (D) Kelompok 4 Dosis Ekstrak 100 mg, (E) Kelompok 5 Dosis Ekstrak 200 mg, dan (F) Kelompok 6 Dosis Ekstrak 400 mg.

Tabel 1. Jumlah Sel Imunopositif Kelompok Uji

| | Kelompok Uji | | | | | |
|-----------------------------------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Rata-rata Jumlah Sel Imunopositif | 68 | 302 | 246 | 252 | 240 | 169 |

Tabel 2. Hasil analisis statistik *Shapiro-Wilk*, *Homogeneity of Variances*, dan *one way ANOVA*.

| Kelompok | Dosis Ekstrak | Jumlah Sel Imunopositif | <i>Shapiro-Wilk</i> | <i>Levene Statistic</i> | ANOVA |
|----------|---------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|-------|
| 3 | 0 mg | 246 | 0,659 | | |
| 4 | 100 mg | 252 | 0,316 | 0,193 | 0,018 |
| 5 | 200 mg | 240 | 0,921 | | |
| 6 | 400 mg | 169 | 0,708 | | |

Keterangan : Uji *Shapiro-Wilk* dan *Levene Statistic* normal dan homogen ($p > 0,05$), ANOVA bermakna signifikan ($p < 0,05$).

Tabel 3. Uji Dosis Efektif dengan *Tukey HSD*

| Kelompok Dosis Efektif | Kelompok Pembanding | Dosis Perlakuan | Uji <i>Tukey HSD</i> | |
|------------------------|---------------------|-----------------|----------------------|-----------------|
| | | | Mean Difference | Significant (p) |
| | Kelompok 3 | Doxo 4,6 mg | -71,0000* | 0,050 |
| Kelompok 6 | Kelompok 4 | Ekstrak 100 mg | -76,6667* | 0,035 |
| | Kelompok 5 | Ekstrak 200 mg | -83,3333* | 0,023 |

Keterangan : Uji *Tukey HSD* bermakna signifikan ($p < 0,05$)

Uji *one way ANOVA* menunjukan hasil nilai $p=0,018$ ($p < 0,05$). Hasil tersebut berarti ada perbedaan yang signifikan secara statistik antar kelompok perlakuan. Oleh karena itu, uji statistik dilanjutkan dengan uji *Tukey HSD*. Hasil uji lanjutan *Tukey HSD* menunjukkan bahwa kelompok 6 yang diberi perlakuan terapi kombinasi *Doxorubicin* 4,67 mg dan ekstrak biji petai 400 mg memiliki nilai signifikansi $p < 0,05$ dibandingkan dengan kelompok 3, 4, dan 5.

c. Pengamatan Histopatologis Jantung

Pengamatan histopatologi jantung bertujuan untuk melihat kerusakan sel-sel pada jantung dengan melihat pembentukan vakuola dan hilangnya myofibril jaringan jantung. Pengamatan dilakukan pada preparat jaringan jantung menggunakan mikroskop monokuler dengan perbesaran 400x.

Tabel 1. Kerusakan sel jantung

| Kelompok | Nomor tikus | Median Kerusakan (%) | Derajat kerusakan |
|-----------------------------------|-------------|----------------------|-------------------|
| Dox+100mg/kgBB ekstrak biji petai | 100 A | 25.67 | 2 |
| | 100 B | 26.33 | 2.5 |
| | 100 C | 24.67 | 2 |
| Dox+200mg/kgBB ekstrak biji petai | 200 A | 26.00 | 2.5 |
| | 200 B | 25.67 | 2 |
| | 200 C | 24.00 | 2 |
| Dox+400mg/kgBB ekstrak biji petai | 400 A | 10.00 | 1.5 |
| | 400 B | 11.67 | 1.5 |
| | 400 C | 9.00 | 1.5 |
| <i>Doxorubicin</i> | DOX A | 27.67 | 2.5 |
| | DOX B | 28.00 | 2.5 |
| | DOX C | 27.33 | 2.5 |

Tabel 2. Analisis data

| Kelompok | Variabel | <i>Shapiro-Wilk</i> | <i>Levene Statistic</i> | ANOVA |
|----------|----------|---------------------|-------------------------|-------|
| 3 | Dox | 0,984 | | |
| 4 | 100 mg | 0,775 | 0,269 | 0,000 |
| 5 | 200 mg | 0,295 | | |
| 6 | 400 mg | 0,725 | | |

Keterangan : Untuk uji *Shapiro-Wilk* dan *Levene Statistic* nilai $p > 0,05$ berarti data normal dan homogen, sedangkan untuk uji ANOVA nilai $p < 0,05$ berarti ada perbedaan bermakna secara statistik.

Tabel 3. Tukey HSD

| Kelompok (I) | Kelompok (J) | P |
|--------------|---------------------------|-------|
| Doxorubicin | Dox + 100mg/Kg BB ekstrak | 0,108 |
| | Dox + 200mg/Kg BB ekstrak | 0,060 |
| | Dox + 400mg/Kg BB ekstrak | 0,000 |

Keterangan : Dalam uji tersebut, didapatkan nilai pada kelompok Dox + 400mg/Kg BB ekstrak dengan nilai $p < 0,05$ yaitu $p = 0,000$. Nilai tersebut menunjukkan bahwa perlakuan kelompok dengan dosis ekstrak 400mg/Kg BB menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok Doxorubicin jika dibandingkan dengan kelompok dosis lainnya.

C. Pembahasan

Penelitian ini menggunakan 42 tikus galur *Sprague dawley* jantan. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah jumlah proliferasi sel kanker yang imunopositif terhadap pewarnaan imunohistokimia Ki-67 setelah dilakukan

penumbuhan kanker dan pemberian perlakuan. Metode penumbuhan kanker ada banyak pilihannya, namun yang dipakai selama penelitian ini adalah dengan mengoleskan senyawa 4-NQO yang dilarutkan ke dalam Propilenglikol 98% pada permukaan lidah tikus. Setelah lesi kanker muncul kemudian dilakukan pemberian perlakuan sesuai dengan kelompok masing-masing. Sebanyak 23 ekor tikus mati selama pelaksanaan penelitian sehingga hanya tersisa 19 ekor tikus hingga akhir penelitian.

Kematian dari beberapa sampel tikus terjadi hampir setiap minggu selama proses induksi karsinogen. Sebelum sampel tersebut mati, ada tanda-tanda klinis yang menyertainya seperti munculnya lesi-lesi *eritematous* pada lidah, nafsu makan berkurang, dan penurunan berat badan tikus. Hal ini sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Viswanathan *et al* (2015) bahwa penampakan klinis karsinoma sel skuamosa rongga mulut yang paling sering terlihat adalah *leukoplakia* dan *eritroplakia*¹⁸. Terkait menurunnya berat badan hewan uji selama dilakukan induksi karsinogen, hal tersebut dimungkinkan karena adanya respon imun dari dalam tubuh tikus. Menurut Akrom (2012) respon imun tubuh tikus terhadap penolakan induksi karsinogen berperan penting terhadap menurunnya berat badan tikus. Kerusakan sel akibat paparan karsinogen menyebabkan timbulnya reaksi inflamasi dengan ditandai adanya peningkatan sitokin proinflamasi antara lain *IL-1*, *TNF alpha*, dan *IL-2*. Sitokin proinflamasi *IL-1* dengan *TNF alpha* memiliki sifat termogen yang memberikan efek peningkatan kebutuhan kalori tubuh sehingga karbohidrat, lemak,

dan protein diubah menjadi panas tubuh (kalor) yang menyebabkan penurunan berat badan hewan coba. Sebaliknya, kondisi seperti ini tidak terjadi pada kelompok 1 yang merupakan kelompok kontrol negatif. Kelompok ini tidak diberikan paparan karsinogen sehingga tidak terjadi penurunan berat badan dan tidak ada tikus yang mengalami kematian.¹⁹

Kemampuan ekstrak etanol biji petai (*Parkia speciosa*) sebagai agen ko-kemoterapi dalam menghambat perkembangan sel kanker lidah tikus karena di dalam ekstrak tersebut terkandung senyawa antioksidan flavonoid. Senyawa flavonoid merupakan reduktor bagi senyawa hidroksil, superoksida, dan peroksil radikal.²⁰ Flavonoid dapat menghambat perkembangan sel kanker dikarenakan senyawa ini dapat meningkatkan produksi interferon gamma yang memiliki fungsi sebagai stimulator aktivitas sel NK (*natural killer*) dan CTL's pada sistem imun tubuh terhadap sel kanker. Aktifnya sel NK dan CTL's di dalam tubuh menimbulkan proses pematian (*killing*) secara terprogram terhadap sel-sel kanker yang telah mengalami perkembangan sehingga terjadilah proses yang dinamakan apoptosis. Ketika proses apoptosis dapat berjalan dengan baik di dalam tubuh maka proses proliferasi sel yang ada di dalam tubuh pun dapat dikendalikan. Mekanisme terjadinya apoptosis sel ini karena pengaruh dari enzim *caspase* yang teraktivasi melalui jalur *T-cell Receptor* (TCR) yang masuk ke dalam sel dengan bantuan *pore forming factors perforia*²¹.

Bukti ilmiah lain mengenai flavonoid yang dapat memberikan efek terapi terhadap kanker disampaikan oleh Wang *et al* (2015) tentang efek flavonoid dari

ekstrak *Cotinus coggygia* terhadap kanker Glioblastoma melalui studi *in vitro* dan *in vivo*. Pada penelitian tersebut dibuktikan bahwa *Cotinus coggygia* flavonoid (CCF) dapat menghambat proliferasi dari sel kanker Glioblastoma. Proses penghambatan ini secara spesifik disebutkan melalui *P13K/AKT-ERK Pathway for Its Antitumor Mechanism*. CCF meregulasi peningkatan ekspresi aktivitas ERK dan level phosphor-ERK (p-ERK) sehingga proses penghambatan pertumbuhan serta proliferasi dapat berjalan dengan maksimal dan sekaligus menginisiasi terjadinya apoptosis²².

Penelitian lain tentang manfaat flavonoid disampaikan oleh Busch *et al* (2015) yang menyatakan bahwa flavonoid merupakan substansi yang berfungsi sebagai pencegah maupun perawatan kanker melalui dua mekanisme epigenetik yaitu modulasi *DNA methylation status* dan *Histone Acetylation*. Mekanisme epigenetic merupakan mekanisme yang terdiri dari perubahan susunan *DNA methylation*, *posttranslational histone modifications*, dan variasi ekspresi dari *non-coding microRNA* (miRNA). Mekanisme epigenetik dapat ditemukan di dalam gen selama proses pembentukan kanker yang berdampak terhadap aktivitas diferensiasi sel, proliferasi, dan apoptosis. Ketika terjadi DNA damage dan timbul kegagalan koding DNA, maka peran flavonoid di sini sebagai activator *DNA methyltransferase inhibitors* (DNMTi). Mekanisme lain flavonoid yang merupakan agen fitokimia ini adalah senyawa ini memiliki kemampuan sebagai *Histone deacetylase inhibitors* (HDACi)²³.

Doxorubicin merupakan kemoterapi yang digunakan secara luas. Agen kemoterapi yang berasal dari golongan antrasiklin ini menghambat kerja enzim topoisomerase dan berikutnya memblok DNA pada tahap replikasi sel. Penggunaan *Doxorubicin* dilaporkan memberi efek toksisitas pada jantung. Beberapa hipotesis menyebutkan adanya kardiotoksisitas *Doxorubicin* disebabkan oleh bertambahnya jumlah ROS yang dimediasi oleh zat besi. Hasil dari beberapa penelitian menyatakan pertambahan jumlah zat besi secara sistemik meningkatkan kerusakan jantung akibat *Doxorubicin*. Zat besi secara spesifik terakumulasi pada mitokondria sel jantung, menyebabkan kerusakan dan degradasi dari jaringan tersebut¹¹.

Pengamatan histologi menunjukkan adanya kardiomiopati yang ditandai dengan hilangnya miofilamen, miofibril, serta degenerasi vakuola. Pada kardiomiopati oleh *Doxorubicin* terlihat area fibrosis interstisial myokardium dan cardiomyosit tervakuolasi dan tersebar (Chatterjee *et al.*, 2011). Manifestasi dari kardiotoksisitas oleh *Doxorubicin* adalah penurunan fungsi kerja jantung pada ventrikel kiri yang dapat menyebabkan kegagalan jantung ireversibel¹⁰.

Ekstrak biji petai dibuat menggunakan metode maserasi 1 : 7 dengan pelarut etanol 70%. Tujuan dari pembuatan ekstrak ini adalah untuk mendapatkan kandungan flavonoid dari biji petai. Flavonoid memiliki antioksidan yang dapat melawan radikal bebas dan menjadi agen kelasi zat besi untuk mencegah meningkatnya pembentukan ROS yang dimediasi oleh akumulasi zat besi pada mitokondria sel jantung²⁴.

Flavonoid memiliki properti sebagai antioksidan dan agen kelasi zat besi [23]. Salah satu radikal bebas yaitu ROS yang jumlahnya meningkat akibat mediasi zat besi sistemik oleh pemberian *Doxorubicin* memiliki peran penting dalam terbentuknya kardiotoxicitas. Flavonoid memiliki properti antioksidan yang sangat baik, hal ini dapat dilihat dari struktur flavonoid yang memicu aktifnya properti antioksidan. Selain itu, properti sebagai kelasi zat besi dapat menurunkan kadar besi sistemik berlebih yang memediasi terbentuknya ROS. Flavonoid sebagai agen kelasi zat besi bekerja dalam dua tahap. Tahap pertama flavonoid akan mengkelasi zat besi dan selanjutnya ROS yang terbentuk dalam proses akumulasi akan dihancurkan oleh aktifitas antioksidan, sehingga dalam proses ini, radikal bebas atau ROS yang terbentuk akan dihancurkan bersamaan dimana mereka terbentuk²⁴.

Studi yang lain telah mengemukakan bahwa flavonoid memiliki efek antiinflamasi dalam reperfusi iskemik pada jantung tikus²⁴. Flavonoid yang ditemukan dalam propolis juga telah terbukti menghambat pertumbuhan dari berbagai sel kanker *in vitro* dan *in vivo* tanpa menimbulkan toksisitas pada sel normal. Beberapa penulis menyatakan bahwa flavonoid dapat meregulasi gen yang mengatur proliferasi sel, siklus sel, apoptosis, onkogenesis, regulasi transkripsi, angiogenesis, dan metastasi dari sel kanker. Studi lain juga menyatakan flavonoid dapat melawan toksisitas pada hati yang diakibatkan oleh *microcystin* dari *cyanobacteria* pada tikus²⁵

D. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak biji petai dengan *doxorubicin* efektif sebagai agen ko-kemoterapi terhadap sel kanker lidah tikus dilihat dari aspek ketebalan epitel, tingkat proliferasi, serta toksisitas terhadap sel jantung. Penelitian ini masih banyak kekurangan sehingga diharapkan akan ada penelitian lebih lanjut untuk menyempurnakan penelitian terdahulu.

E. Daftar Pustaka

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer Incidence and Mortality Patterns in Europe for 40 Countries in 2012. *Elsevier* 2013: 1374-1403.
2. Anis R, Gaballah K. Oral Cancer in the UAE: a Multicenter, Retrospective Study. *The Libyan Journal of Medicine* 2013
3. Rivera MCA. 4NQO Carcinogenesis: A Model of Oral Squamous Cell Carcinoma. *International Journal Morphology* 2012 : 30 (1). 309-314.
4. Regezi Joseph A, Sciubba James J, Jordan Richard CK. *Oral Pathology, Clinical Pathologic Correlations*. 5th ed. Missouri : Saunders 2008.
5. Vered M, Grinstein-Koren O, Reiter S, Allon I, Dayan D. The Effect Of Desalivation on The Malignant Transformation of The Tongue Epithelium and Associated Stromal Myofibroblasts in A Rat 4-Nitroquinoline 1-Oxide-Induced Carcinogenesis Model. *International Journal of Experimental Pathology* 2010 : Vol (91) : 314-323
6. Taufiqurrahman, Herdini, Camelia. Metastasis Leher Tersembunyi pada Karsinoma Lidah T1-T2. *Jurnal Kesehatan Andalas* 2014 : 3 (3) : 529-562.
7. Bonhin GB, Carvalhoa de MG, Guimarãesa CA, Chonea TC, Crespoa NA, Altemanib M de AMA, Amstaldenb MIE. Histologic Correlation Of Expression of Ki-67 in Squamous Cell Carcinoma of The Glottis According to The Degree of Cell Differentiation. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* 2014 : Vol 80 (4) : 290-295.
8. Jenie IR, Meiyanto Edy. Aplikasi ko-kemoterapi fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun sambung nyawa (*gynura procumbens* (Lour.) Merr.) Pada sel kanker payudara mcf-7. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2009 : Vol (7) : 132-141.
9. Khiavi M. M, Rostami A, Hamishekar H, Abassi MM, Aghbali A, Salehi R, Abdollahi B, Fotoohi S, Sina M. Therapeutic Efficacy of Orally Delivered

- Doxorubicin Nanoparticles in Rat Tongue Cancer Induced by 4-Nitroquinoline 1-Oxide. *Advance Pharmaceutical Buletin* 2015: 5 (2), 209-216.
10. Oliveira SM, Melo BM, L Carvalho LJ, Melo MI, Lavor SLM, Gomes AD, de Goes M A. *Doxorubicin* Cardiotoxicity and Cardiac Function Improvement After Stem Cell Therapy Diagnosed by Strain Echocardiography. *Journal of Cancer Science and Therapy* 2013 : 5. 052-057.
 11. Ichikawa Y, Ghanefar M, Bayeva, Wu R, Khechaduri A, Prasad SVN, Mutharasan RK, Naik TJ, Ardehali H. Cardiotoxicity of *Doxorubicin* is Mediated Through Mitochondrial Iron Accumulation. *The Journal of Clinical Investigation* 2015: 124. 617-630.
 13. Chen Jing-Yi, Hu Ren-Yu, Chou Hsiu-Chuan. Quercetin-induced Cardioprotein Against Doxorubicin Cytotoxicity. *J Biomedical Science* 2013 : 1-10.
 14. Rahman NNNA, Zhari S, Sarker MZI, Ferdosh S, Yunus MAC, Kadir MOA. Profile of *Parkia speciosa* Hassk metabolites extracted with SFE using FTIR- PCA method. *J Chin Chem Soc* 2011 : Vol 58 (6) :1-9.
 15. Talib W H., Zarga M H A., Mahasneh A M. (2012). Antiproliferative, Antimicrobial and Apoptosis Inducing Effects of Compounds Isolated from *Inula viscosa*. *Mol Journal*. Vol 2(17) : 3291-3303.
 16. Mahardika C. *Fraksionasi Ekstrak Kulit Petai Berpotensi Antioksidan*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor 2013.
 17. Tanaka T., Shimizu M., Kochi T., Shirakami Y., Mori T., Watanabe N., Naiki T., Moriwaki H., Yoshimi K., Serikawa T., Kuramoto T. (2014). Apc-Mutant Kyoto Apc Delta (KAD) Rats Are Susceptible to 4-NQO-Induced Tongue Carcinogenesis. *Cancers Journal*, Vol 6 : 1522-1539.
 18. Viswanathan V, Juluri R, Goel S, Madan J, Mitra SK, Gopalakrishnan D. Apoptotic Index and Proliferative Index in Premalignant and Malignant Squamous Cell Lesions of the Oral Cavity. *Journal of International Oral Health* 2015 : Vol 7 (1) : 40-43
 19. Akrom. (2012). *Mekanisme Kemopreventif Ekstrak Heksan Biji Jinten Hitam (Nigella sativa Lor) pada Tikus Sprague dawley Diinduksi 7,12 DimethylBenz(a)antracene : Kajian Antioksidan dan Immunomodulator*. Disertasi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
 20. Tocmo R., Liang D., Wang C., Huang D. Organopolysulfides with potential H₂S-releasing activity from shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum Group) and stinky beans (*Parkia speciosa*) [Abstrak]. *Food Science and Technology Abstracts*, 1, 12.
 21. Abbas, A., Litchman, A H., Pober, J S. (2012). *Celluler and Moleculer Immunology*. 7ed. Philadelphia : Elsevier-Saunders.
 22. Wilkey, JF., Buchberger, G., Saucier, K., Patel, SM., Eisenberg, E., Nakagawa, H., Michaylira, CZ., Rustgi, AK. & Mallya, S. M. (2009). Cyclin

- D1 Overexpression Increases Susceptibility to 4- Nitroquinoline-1-Oxide-Induced Dysplasia and Neoplasia in Murine Squamous Oral Epithelium. *Mol. Carcinog*, Vol 48 : 853-61.
23. Busch, C., Burkard, M., Leischner, C., Lauer, U., Frank, J., Venturelli, S. (2015). *Epigenetic Activities of Flavonoids In The Prevention and Treatment of Cancer. Clinical Epigenetics*, Vol 7 : 64.
 24. Kaiserova H, Simunek T, Van der Vijgh WJF, Bast A, Kvasnickova E.. Flavonoids as Protectors Against *Doxorubicin* Cardiotoxicity: Role of Iron Chelation, Antioxidant Activity and Inhibition of Carbonyl Reductase. *Elsevier* 2007 : 1065-1074.
 25. Jayaraj R, Deb U, Bhaskar ASB, Prasad GBKS, Rao P.VL. Hepatoprotective Efficacy of Certain Flavonoids Against Microcystin Induced Toxicity in Mice. *Environmental Toxicology* 2010 : 472-479.