The Effect of Giving Soursop Leaves (*Annona Muricata* L.) Extract to Lung Histopathology Appearance on Female Rats Induced by Carcinogen 7,12 Dimethylbenz[]anthrancene (DMBA)

Susantiningsih T, Pertiwi AS, Fiana DN, Carolia N

Medical Faculty of Lampung University

Abstract

Cancer is the process of body cells proliferation that are not controlled. Treatment of cancer such as surgery, radiotherapy and chemotherapy have side effects so natural anticancer is needed such as soursop (*Annona muricata* L.) that contains antioxidant and anticancer material. The aim for this research was to detemine effect of giving soursop leaves extract to lung histopathology appearance on female rat that induced by dimethylbenz[]anthrancene (DMBA). This study was an experimental design. Twenty rats were divided into four groups: a negative control with aquadest 1 ml, a positive control with DMBA 20 mg/kgBB, and two treatment groups with DMBA 20 mg/kgBB and soursop leaves extract of dose 20 mg/kgBB and 40 mg/kgBB. In this study, statistical test was using *Kruskal Wallis* test (p<0,05) and *Post Hoc Mann Whitney* test (p<0,05). Based on the *Post Hoc Mann Whitney* test, there was significant difference (p<0,05) to lung histopathology appearance between group I-II, I-III, I-IV, and II-IV. The result showed the soursop leaves extract 40 mg/kgBB has the highest effect to lung histopathology appearance changed.

Keywords: DMBA, lung histopathology, soursop.

Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap Gambaran Histopatologi Jaringan Paru Tikus Putih Betina yang Diinduksi Karsinogen 7,12 Dimethylbenz []anthrancene (DMBA)

Abstrak

Kanker merupakan proses proliferasi sel-sel tubuh yang tidak terkendali. Pengobatan kanker berupa pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi memiliki efek samping sehingga perlu penggunaan bahan alami, salah satunya tanaman sirsak (Annona muricata L.) yang memiliki kandungan antioksidan dan antikanker. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak (Annona muricata L.) terhadap gambaran histopatologi jaringan paru tikus putih betina yang diinduksi dimethylbenz[]anthrancene (DMBA). Desain penelitian ini adalah eksperimental. Dua puluh tikus dibagi ke dalam empat kelompok yaitu kontrol negatif dengan aquadest 1 ml, kontrol positif dengan DMBA 20 mg/kgBB, dan dua kelompok perlakuan dengan DMBA 20 mg/kgBB dan ekstrak daun sirsak dosis 20 mg/kgBB dan 40 mg/kgBB. Dari perhitungan statistik menggunakan uji Kruskal Wallis diperoleh nilai p<0,05 yang menunjukkan terdapat perbedaan signifikan dan selanjutnya dilakukan uji Post Hoc Mann Whitney (p<0,05). Dari analisis uji Post Hoc Mann Whitney, terdapat perbedaan gambaran histopatologi paru yang signifikan (p<0,05) antara kelompok I-II, I-III, I-IV, dan II-IV. Hasil penelitian menunjukkan dosis ekstrak daun sirsak 40 mg/kgBB memiliki efek paling besar terhadap perubahan gambaran histopatologi paru.

Kata kunci: DMBA, histopatologi paru, sirsak.

Pendahuluan

Kanker merupakan suatu proses *proliferasi* sel-sel di dalam tubuh yang tidak terkendali. Salah satu jenis kanker yang mempunyai tingkat insidensi tinggi di dunia adalah kanker paru. Di perkirakan setiap tahun, 12 juta orang di seluruh dunia menderita kanker dan 7,6 juta di antaranya meninggal dunia. Jika tidak dikendalikan, pada tahun 2030, diperkirakan 26 juta orang akan menderita kanker dan 17 juta orang meninggal karena kanker (WHO, 2013).

Kanker dapat terjadi karena adanya perubahan DNA sel atau disebut juga mutasi. Salah satu mutagen adalah *polisiklik aromatis hidrokarbon* (PAH) yang ditemukan pada saat pembakaran bahan organik yang tidak sempurna. 7,12 dimethylbenz[]anthrancene (DMBA) merupakan salah satu dari tiga produk degradasi PAH yang berpotensi sebagai bahan sitotoksik, mutagenik, agen imunosupresif, dan karsinogen (Hartono, 2013).

Pengobatan pada kanker umumnya meliputi pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi. Namun ketiga cara tersebut memiliki efek samping seperti perdarahan, infeksi berat, mual, muntah, kulit kering, rambut rontok, dan sulit menelan (Amin, 2006; Siregar, 2007).

Kecenderungan penggunaan obat yang berasal dari alam semakin meningkat, salah satunya adalah tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) yang banyak tersebar di Indonesia (Amelia dkk., 2012). Tanaman sirsak memiliki kandungan seperti *acetogenins, flavonoid, terpenoid, phytosterol,* dan senyawa *polyphenol* yang memiliki efek antioksidan serta antikanker (Retnani, 2011; Adewole, 2008). Oleh karena itu, pada penelitian ini dipilih daun sirsak untuk mengetahui pengaruhnya sebagai antikanker terhadap gambaran histopatologi jaringan paru.

Metode

Sampel dibagi menjadi empat kelompok yang terdiri dari masing-masing 5 tikus betina galur *Sprague dawley*, yaitu:

- Kelompok I: kontrol negatif dengan pemberian aquadest 1 ml
- Kelompok II: kontrol positif dengan pemberian DMBA 20 mg/kgBB

- Kelompok III: perlakuan dengan pemberian DMBA 20 mg/kgBB dan pemberian ekstrak daun sirsak 20 mg/kgBB
- Kelompok IV: perlakuan dengan pemberian DMBA 20 mg/kgBB danpemberian ekstrak daun sirsak 40 mg/kgBB

Setiap tikus diukur berat badannya untuk menghitung dosis ekstrak daun sirsak yang akan diberikan. Pemberian DMBA dilakukan setiap 2 kali seminggu menggunakan sonde lambung, sedangkan pemberian *aquadest* dan ekstrak daun sirsak dilakukan setiap hari sesuai dosis dengan menggunakan sonde lambung.

Setelah 4 minggu, tikus diterminasi dengan anastesi terlebih dahulu menggunakan *Ketamine-xylazine* 75-100mg/Kg + 5-10 mg/Kg secara intraperitoneal, kemudian di *euthanasia* dengan metode *cervical dislocation* berdasarkan *Institusional Animal Care and Use Committee* (IACUC) (Leary dkk., 2013). Setelah itu jaringan paru tikus di ambil melalui pembedahan untuk dilihat gambaran histopatologinya. Penilaian dilakukan menggunakan skala kategorik ordinal pada 5 lapang pandang dengan skoring 0-3 untuk melihat derajat kerusakan alveolus paru (Kirana, 2009):

Skor 0 = Tidak terjadi perubahan struktur histologis (normal)

Skor 1 = Kerusakan alveolus paru 0-30% (kerusakan ringan)

Skor 2 = Kerusakan alveolus paru 31-60% (kerusakan sedang)

Skor 3 = Kerusakan alveolus paru >60% (kerusakan berat)

Data hasil penelitian akan dianalisis menggunakan program pengolah data statistik. Karena penelitian ini merupakan komparatif kategorik lebih dari dua kelompok tidak berpasangan maka digunakan uji *Kruskal Wallis*. Apabila pada uji tersebut didapatkan hasil bermakna (p<0,05) maka dilakukan uji *Post Hoc Mann Whitney* (Dahlan, 2011).

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian ini menggunakan hewan coba sebagai sampel sehingga dalam pelaksanaan penelitian, peneliti akan menerapkan prinsip 3R yaitu *Replacement*, *Reduction*, dan *Refinement*.

Hasil

Analisis hasil pengamatan pada masing-masing kelompok perlakuan tampak pada Tabel 1.

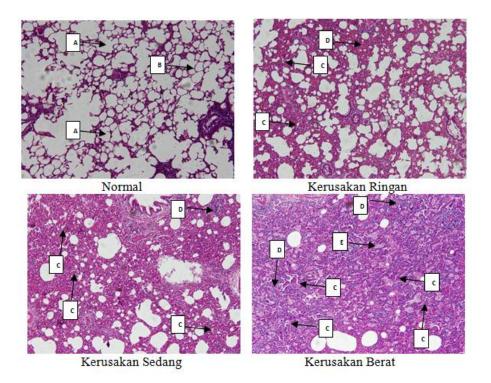
k
k

Kelompok	Normal	Kerusakan Ringan	Kerusakan Sedang	Kerusakan Berat	Total
I	3	2	0	0	5
II	0	0	1	4	5
III	0	2	2	1	5
IV	0	3	2	0	5

Berdasarkan Tabel 1, dapat diketahui bahwa pada kelompok I yang hanya diberi *aquadest* 1 ml terdapat 3 buah gambaran mikroskopis paru normal dan 2 buah gambaran mikroskopis paru dengan kerusakan ringan yaitu kerusakan alveolus paru 0-30%. Pada kelompok II yang di induksi DMBA 20 mg/kgBB, ditemukan sebuah gambaran mikroskopis paru dengan kerusakan sedang yaitu kerusakan alveolus paru 31-60% dan 4 buah gambaran mikroskopis paru dengan kerusakan berat yaitu kerusakan alveolus paru >60%.

Pada kelompok III yang di induksi DMBA 20 mg/kgBB dan ekstrak daun sirsak 20 mg/kgBB, didapatkan 2 buah gambaran mikroskopis paru dengan kerusakan ringan yaitu kerusakan alveolus paru 0-30%, 2 buah gambaran mikroskopis paru dengan kerusakan sedang yaitu kerusakan alveolus paru 31-60%, dan sebuah gambaran mikroskopis paru dengan kerusakan berat yaitu kerusakan alveolus paru >60%. Sedangkan pada kelompok IV yang di induksi DMBA 20 mg/kgBB dan ekstrak daun sirsak 40 mg/kgBB, terdapat 3 buah gambaran mikroskopis paru dengan kerusakan ringan yaitu kerusakan alveolus paru 0-30% dan 2 buah gambaran mikroskopis paru dengan kerusakan sedang yaitu kerusakan alveolus paru 31-60%.

Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 100 kali. Gambaran histopatologi yang diamati adalah kerusakan alveolus paru dalam 5 lapang pandang yang dibagi dalam 4 kategori. Keempat kategori itu adalah kategori normal, kerusakan ringan, kerusakan sedang, dan kerusakan berat seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Mikroskopis Jaringan Paru Tikus dengan Pewarnaan Hematoxylin-Eosin Perbesaran 100x. A = Gambaran alveolus normal, B = Gambaran septum interalveolar normal, C = Gambaran alveolus yang kolaps (atelektasis), D = Gambaran infiltrasi sel radang, E = Gambaran oedem paru.

Pada gambaran paru normal terlihat alveolus yang berbentuk normal, septum interalveolar tidak menebal, tidak ada infiltrasi sel radang, oedem paru, maupun gambaran alveolus yang kolaps. Gambaran paru normal banyak terdapat pada kelompok I sebagai kontrol negatif yang hanya diberikan 1 ml *aquadest* per hari.

Pada gambaran paru dengan kerusakan ringan terlihat adanya infiltrasi sel radang dan atelektasis minimal yaitu 0-30%. Gambaran paru dengan kerusakan ringan banyak terdapat pada kelompok IV sebagai perlakuan 2 yang diberikan DMBA 20 mg/kgBB 2 kali seminggu dan ekstrak daun sirsak 40 mg/kgBB per hari.

Pada gambaran paru dengan kerusakan sedang terlihat adanya infiltrasi sel radang dan atelektasis sebanyak 31-60%. Gambaran paru dengan kerusakan sedang banyak terdapat pada kelompok III sebagai perlakuan 1 yang diberikan DMBA 20 mg/kgBB 2 kali seminggu dan ekstrak daun sirsak 20 mg/kgBB per hari.

Pada gambaran paru dengan kerusakan berat terlihat adanya infiltrasi sel radang, oedem paru, dan atelektasis sebanyak >60%. Gambaran paru dengan kerusakan berat banyak terdapat pada kelompok II sebagai kontrol positif yang diberikan DMBA 20 mg/kgBB 2 kali seminggu.

Analasis data dilakukan dengan menggunakan uji statistik *Kruskal Wallis* dan *Mann Whitney*. Uji statistik *Kruskal Wallis* dilakukan untuk mengetahui bahwa paling sedikit satu populasi menunjukkan nilai yang lebih besar daripada populasi lainnya kemudian untuk analisis *Post Hoc* dilakukan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui adanya perbedaan bermakna diantara dua kelompok perlakuan yang tidak berpasangan.

Dari perhitungan statistik menggunakan uji *Kruskal Wallis*, diperoleh nilai p=0,004. Oleh karena nilai p<0,05, maka hasil uji statistik *Kruskal Wallis* menunjukkan perbedaan yang signifikan dan selanjutnya perlu dilakukan uji *Post Hoc Mann Whitney*. Berikut ini adalah data hasil uji *Mann Whitney*.

Tabel 2. Data Hasil Analisis Uji *Mann Whitney*

	I	II	III	IV
I				
II	0,006*			
III	0,021*	0,054		
IV	0,031*	0,011*	0,419	

Keterangan: Tanda * menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan

Dari hasil analisis uji *Mann Whitney* pada Tabel 2, didapatkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok yaitu pada kelompok I-II, I-III, I-IV, dan II-IV. Sedangkan untuk kelompok II-III dan III-IV menunjukkan perbedaan antar kelompok yang tidak signifikan.

`Pembahasan

Hasil perbandingan rata-rata kerusakan alveolus paru dari kelompok perlakuan 2 terhadap kelompok kontrol positif mempunyai nilai yang signifikan. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak daun sirsak dengan dosis 40 mg/kgBB/hari memiliki pengaruh protektif terhadap kerusakan alveolus paru akibat pembentukan sel kanker paru yang telah diinduksi DMBA. Tetapi pada perbandingan rata-rata dari kelompok perlakuan 1 terhadap kelompok kontrol positif terjadi penghambatan yang kurang bermakna. Hal ini dapat disebabkan karena dosis ekstrak daun sirsak 20 mg/kgBB/hari yang diberikan adalah dosis minimal sehingga penghambatan terhadap kerusakan alveolus paru belum maksimal.

Analisis data perbandingan antara kedua kelompok perlakuan, yaitu kelompok perlakuan 1 dan perlakuan 2 mendapatkan hasil perbedaan yang tidak signifikan pada rata-rata kerusakan alveolus paru. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun sirsak dengan dosis 20 mg/kgBB/hari dan 40 mg/kgBB/hari memberikan efek proteksi terhadap kerusakan alveolus paru yang tidak berbeda jauh. Hal ini dapat disebabkan karena kedua dosis yang diberikan memiliki selisih yang tidak jauh berbeda.

Berdasarkan data yang diperoleh dari hasil penelitian yang telah dianalisis dengan uji *Kruskal Wallis* dan *Mann Whitney* menunjukkan adanya pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak terhadap gambaran histopatologi jaringan paru tikus putih betina yang diinduksi DMBA. Pada kelompok perlakuan 2 yang diberikan DMBA 20 mg/kgBB dan ekstrak daun sirsak 40 mg/kgBB/hari menunjukkan adanya perubahan yang signifikan terhadap kelompok kontrol positif. Hal ini sesuai dengan penelitian-penelitian sebelumnya yang menyatakan ekstrak daun sirsak memiliki kandungan *acetogenin*, *flavonoid*, *terpenoid*, *alkaloid*, *polifenol*, *saponin*, dan *tanin* yang berperan sebagai antitumor, antimikroba, antiparasit, dan antivirus (Wijaya, 2012).

Aktivitas *acetogenin* berkaitan dengan inhibisi kompleks I mitokondria yang akan menyebabkan menurunnya produksi *adenosin triphospat* (ATP). Penurunan jumlah ATP tersebut akan menginduksi terjadinya apoptosis. Selain itu

hipoksia akibat penurunan produksi ATP juga dapat mengaktifkan p53 yang menyebabkan terhentinya siklus sel sehingga mencegah *proliferasi* sel yang berlebihan (Retnani, 2011).

Senyawa golongan *flavonoid* juga mampu menginduksi apoptosis dan menghentikan siklus sel melalui mekanisme inhibisi enzim *topoisomerase*. Selain itu *flavonoid* juga menghambat aktivitas karsinogen melalui inhibisi sitokrom P450 sehingga senyawa karsinogen menjadi tidak reaktif. *Flavonoid* juga meningkatkan ekspresi enzim *gluthation S-transferase* yang dapat mendetoksifikasi karsinogen sehingga cepat dieliminasi tubuh (Ren, 2003).

Senyawa *terpenoid* dapat memblok siklus sel dengan menstabilkan benang-benang spindel pada fase mitosis sehingga proses mitosis dapat terhambat. *Terpenoid* juga dapat memicu apoptosis melalui mekanisme seperti *flavonoid* (Sugianto, 2003). Selain itu ekstrak daun sirsak juga memiliki aktivitas antioksidan yang diduga berperan dalam pencegahan kanker (Baskar, 2007).

Penelitian ini juga sejalan dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, yaitu pada penelitian Pretysta (2012) mengenai pengaruh sari kedelai (Glycine max L.) terhadap gambaran histopatologi sel kanker paru pada tikus putih (Rattus norvegicus) yang diinduksi DMBA. Sari kedelai memiliki senyawa flavonoid yang juga dimiliki oleh ekstrak daun sirsak. Pada penelitian tersebut kandungan dalam sari kedelai terbukti dapat mencegah terjadinya sel kanker paru dan pada pemberian dosis yang berbeda terdapat pula perbedaan jumlah sel kanker paru.

Simpulan

Pemberian ekstrak daun sirsak dapat mencegah terjadinya kerusakan alveolus paru akibat pemberian 7,12-dimetilbenz()anthracene (DMBA). Dosis ekstrak daun sirsak yang paling efektif dalam mencegah terjadinya kerusakan alveolus paru akibat pemberian 7,12-dimetilbenz()anthracene (DMBA) dalam penelitian ini adalah 40 mg/kgBB/hari.

Daftar Pustaka

- Adewole SO, Ojewole JAO. 2008. Protective effects of *Annona muricata* L. (*annonaceae*) leaf aqueous extract on serum lipid profiles & oxidative stress in hepatocytes of streptozotocintreated diabetic rats. African journal of traditional, complementary and alternative medicines. 6(1):30-41.
- Amelia F, Angeline E, Wahyu K. 2012. Tablet salut enterik ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) sebagai anti kanker kolon yang potensial. [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada.
- Amin Z. 2006. Kanker paru. Dalam: Sudoyo AW, Setyohadi B, Alwi I, Simadibrata MK, Setiati S. (penyunting). Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Edisi ke-4. Jakarta: Interna Publishing. hlm.1984–92.
- Baskar R, Rajeswari V, Kumar TS.2007. In vitro antioxidant studies in leaves of annona species. Indian J Exp Biol. 45(5):480-5.
- Dahlan MS. 2011. Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan Edisi 5. Jakarta: Salemba Medika.
- Hartono IA, Indra MR, Rahayu P. 2013. Pengaruh pemberian ekstrak metanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap jumlah CSCs (cancer stem cells) pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA(7,12 dimetilbenz[]anthrancene). [Skripsi]. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Kirana R. 2009. Pengaruh pemberian the hijau (*Camelia sinensis*) terhadap kerusakan struktur histologis alveolus paru mencit yang dipapar asap rokok. [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.
- Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T, dkk. 2013. AVMA Guidelines for Euthanasia of Animals. hlm. 30–48.
- Pretysta YN. 2012. Pengaruh sari kedelai (*Glycine max* L.) terhadap gambaran histopatologi sel kanker paru pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12-dimetilbenz()antrasen (DMBA). [Skripsi]. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agent. Medicinal Research Review. 23(4):519-34.
- Retnani V. 2011. Pengaruh suplementasi ekstrak daun *Annona muricata* terhadap kejadian displasia epitel kelenjar payudara tikus *Sprague dawley* yang di induksi 7,12 dimetilbenz[]anthrancene. [Skripsi]. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Siregar GA. 2007. Deteksi dini dan penatalaksanaan kanker usus besar. [Skripsi]. Medan: Fakultas Kedokteran Universitas Sumatra Utara.
- Sugianto SB, Meiyanto E, Nugroho AE, Jenie UA. 2003. Aktivitas antikarsinogenik senyawa yang berasal dari tumbuhan. Majalah Farmasi Indonesia. 14(4):216-25.
- WHO. 2013. Preventing Chronic Disease a Vital Investment. http://www.who.int/chp/chronic_disease_report/en/. Diakses tanggal 29 Oktober 2013 pukul 15.00.
- Wijaya M. 2012. Ekstraksi *annonaceous acetogenin* dari daun sirsak, *Annona muricata*, sebagai senyawa bioaktif antikanker. [Skripsi]. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.