

The Effect of Giving Soursop Leaves *Annona muricata* L Extract to Sialic Acid Level on Female Rats Induced DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene)

Tiwuk Susantingsih

Biochemistry Departement, Faculty of Medicine Lampung University

Abstract

Breast cancer is the second most common cancer in Indonesia after cervical cancer. Treatment of cancer by herbal with natural anticancer especially *Annona muricata* L is needed. The aim for this research was to determine the effect of giving soursop leaves extract to sialic acid level on blood plasma female rat that induced by DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene). This study was an experimental design. Twenty rats were divided into four groups: a negative control with aquadest 1ml, a positive control with DMBA 20mg/kgBB, and two treatment groups with DMBA 20 mg/kgBB and soursop leaves extract of dose 20 mg/kgBB and 40 mg/kgBB. The sialic acid level was measured with Warren method. The result shows the soursop leaves extract *Annona muricata* L was decreased the sialic acid level statistically on blood plasma female rats that induced by DMBA. [JuKeUnila 2014;4(7):125-130]

Keywords: DMBA, sialic acid, tumorigenesis.

Pendahuluan

Tumor payudara merupakan masalah kesehatan dunia, baik di negara yang sedang berkembang maupun di negara maju, dengan mortalitas dan morbiditas yang terus meningkat. Di Indonesia pada tahun 1995 diperkirakan kasus baru kanker payudara paling sedikit ditemukan 19.000 per tahun, merupakan kasus terbanyak kedua setelah karsinoma serviks yaitu antara 17-18/100.000 wanita per tahun. Pada tahun 2007 diperkirakan menjadi 34,3/100.000 wanita per tahun dan pada tahun ini juga kemungkinan makin meningkat.¹ Kecenderungan peningkatan tersebut kemungkinan akibat perubahan pola hidup yang tidak sehat, seperti kurangnya olahraga, merokok, dan pola konsumsi makanan yang tidak seimbang.

Pengobatan tumor/kanker dapat dilakukan dengan operasi/pembedahan, kemoterapi, radioterapi ataupun dengan terapi hormon. Diantara cara pengobatan kanker tersebut, kemoterapi merupakan cara yang paling populer karena dianggap paling efektif dan efisien. Kemoterapi dilakukan dengan memberikan obat-obatan

antikanker yang bertujuan membunuh sel-sel kanker. Tetapi kemoterapi ini tidak hanya mengenai sel-sel kanker saja, tetapi sel-sel normal yang sedang dalam fase tertentu juga ikut terbunuh.²

Karena kelemahan pengobatan tumor/kanker ini, membuat masyarakat beralih pada pengobatan herbal. Indonesia merupakan negara tropis yang kaya akan tumbuh-tumbuhan herbal. Berbagai tumbuhan obat/herbal sejak dahulu kala telah dipergunakan oleh nenek moyang kita untuk mengobati berbagai penyakit seperti antidiabetik, antipiretik, antidiare, antitifoid, dan antikanker. Salah satu usaha untuk menemukan pengobatan tumor adalah melalui eksplorasi senyawa aktif dari bahan obat alam utamanya tanaman obat yang secara tradisional digunakan masyarakat untuk mengobati tumor payudara di berbagai daerah. Hal ini merupakan salah satu solusi yang tepat dalam rangka mendukung pemanfaatan obat herbal.¹

Sirsak, nangka Belanda, atau durian Belanda (*Annona muricata* L.) adalah tumbuhan berguna yang berasal dari Karibia, Amerika Tengah dan Amerika

Selatan. Di berbagai daerah Indonesia dikenal sebagai nangka sebrang, nangka landa (Jawa), nangka walanda, sirsak (Sunda), nangka buris (Madura), srikaya jawa (Bali), durian betawi (Minangkabau), serta jambu landa (di Lampung). Penyebutan "Belanda" dan variasinya menunjukkan bahwa sirsak (dari bahasa Belanda: zuurzak, berarti "kantong asam") didatangkan oleh pemerintah kolonial Hindia-Belanda ke Nusantara, yaitu pada abad ke-19.³

Indonesia merupakan salah satu negara yang mempunyai pohon sirsak yang banyak. Tapi ternyata pemanfaatannya hanya sebatas pada buahnya saja, ini karena kurangnya pengetahuan tentang manfaat daun sirsak. Daun sirsak ternyata mengandung banyak manfaat untuk bahan pengobatan herbal, karena banyak mengandung zat aktif acetogenins dan annocatacin. Kandungan senyawa ini merupakan senyawa yang berguna untuk menangkal tumor.¹

Karsinogenesis adalah proses transformasi sel normal menjadi ganas. Karsinogenesis merupakan proses yang kompleks dan bertingkat, dimulai dari terbentuknya suatu populasi sel yang abnormal, kemudian abnormalitas ini meningkat akibat serangkaian mutasi dan perubahan pola ekspresi gen. Proses transformasi sel hingga menjadi ganas membutuhkan waktu yang lama. Karsinogenesis dapat diinisiasi oleh karsinogen kimia, (zat kimia lingkungan, makanan dan lain-lain), fisik (radiasi uv, sinar X dan lain-lain) atau biologis (virus) yang menyebabkan kerusakan DNA hingga terjadi mutasi. Sel-sel yang telah terinisiasi kemudian berkembang menjadi sel kanker melalui tahap promosi dan progresi yaitu proliferasi, infiltrasi dan metastasis.⁴

DMBA (7,12 dimethylbenz-(a)anthracene) telah banyak digunakan terutama sebagai induktor kanker payudara dan kanker kulit. DMBA dapat menyebabkan karsinogenesis dengan cara

tidak langsung, yaitu melalui bioaktivasi dalam sitokrom P450 membentuk DMBA-5,6-dihidrodiol dan 7,12-epoxid yang akan bereaksi dengan DNA membentuk *adduct*, menyebabkan inisiasi tumor.⁵

Kejadian karsinogenesis payudara pada tikus yang diinduksi dengan DMBA, akan memicu terjadi perubahan penanda biokimia tumor yang dimonitor oleh suatu protein, seperti asam sialat. Asam sialat adalah sekelompok senyawa amino karbohidrat yang tersebar sangat luas dari bakteri sampai hewan vertebrata. Transformasi neoplastik/kanker bisa menyebabkan hipersialasi glikoprotein dan dapat digunakan sebagai salah satu penanda tumor.⁶ Kadar asam sialat sebagai penanda tumor perlu dilihat pada kejadian tumor, seperti misalnya pada tumor payudara.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis sejauh mana pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L*) terhadap kadar asam sialat plasma tikus putih sebagai petanda tumor payudara yang diinduksi dengan DMBA (7,12 dimethylbenz-(a)anthracene).

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan hewan coba berupa tikus putih betina strain Sprague Dawley. Penelitian ini telah mendapatkan *ethical approval* dari unit etik penelitian FK UNILA. Penelitian ini dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Populasi adalah tikus putih betina Sprague Dawley betina (*Rattus norvegicus L*) berusia 5-7 minggu dengan berat antara 100-200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Badan Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta. Sampel adalah plasma darah tikus putih populasi yang telah diinduksi dengan DMBA dengan dosis dan kurun waktu tertentu. DMBA diperoleh dari LABTIAP, Serpong.

Digunakan 24 ekor tikus putih Sprague Dawley betina yang terbagi dalam 4 kelompok (masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor), yaitu: Kelompok kontrol (K) : tikus tidak diinduksi DMBA,

dan hanya diberi sonde aquades 1 ml sekali sehari selama 4 minggu, untuk menyamakan perlakuan. Kelompok 1: diinduksi DMBA 2 x 20 mg/kg BB seminggu selama 4 minggu, dan diberi sonde aquades 1 ml sekali sehari selama 4 minggu, untuk menyamakan perlakuan. Kelompok 2 : diinduksi DMBA 2 x 20 mg/kg BB seminggu selama 4 minggu dan diberi sonde ekstrak daun sirsak dosis 20 mg/kg BB sekali sehari selama 4 minggu. Kelompok 3 : diinduksi DMBA 2 x 20 mg/kg BB seminggu selama 4 minggu dan diberi sonde ekstrak daun sirsak dosis 40 mg/kg BB sekali sehari selama 4 minggu.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: sonde, set bedah minor, alas bedah, toples kaca, timbangan analitik, timbangan hewan coba, sentrifuse, vortex, penanggas air, inkubator, spektrofotometer, *ice box*, freezer, pipet mikro + tips, tube mikro 1,5 mL dan 2 mL, *Sputit* 1 mL dan jarum dengan ukuran 27G.

Bahan penelitian ini adalah simplisia daun sirsak, darah tikus, akuades, larutan TCA 5%, larutan TCA 10%, H₂SO₄ 0,1 N, larutan natrium periodat, larutan natrium arsenit 10%, larutan TBA (asam tiobarbiturat) 0,6% dalam Na₂SO₄ 0,5 M, dan larutan sikloheksanon, etanol 70%, eter.

Ekstraksi daun sirsak dilakukan dengan etanol 70%. Simplisia kering daun sirsak di giling dan di ayak dengan ayakan yang sesuai. Sebanyak 500 g daun sirsak direndam dalam larutan etanol 70%. Setiap hari rendaman diaduk-aduk dan disaring sampai didapatkan maserat yang jernih. Maserat di kentalkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kering. Larutan terapi diberikan kepada tikus dengan dosis yang telah ditentukan.

Aklimatisasi hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus L.*) betina galur *Sprague Dowley* yang berusia 5 minggu dengan berat antara 130-200 g selama 1 pekan untuk adaptasi di *animal house*. Makanan tikus yang diberikan

berupa *pellet*. Pemberian makanan dan minuman kepada binatang percobaan dilakukan secara *ad libitum*, suhu kandang dijaga sekitar 25°C dan ada pertukaran gelap dan terang setiap 12 jam.

Masing-masing kelompok tikus diletakkan dalam kandang tersendiri dan dijaga sedemikian rupa sehingga tidak saling berinteraksi. Setiap kali akan diinduksi dan setiap pekan setelah induksi terakhir berat badan tikus ditimbang sampai tikus diterminasi.

Mula-mula tikus ditimbang untuk mengetahui volume larutan DMBA yang akan diberikan. Bahan yang digunakan adalah serbuk DMBA (Sigma®) yang dilarutkan dalam minyak jagung. Induksi menggunakan sonde oral, seminggu dua kali dengan dosis 20 mg/kg BB yang dilarutkan dalam minyak jagung, diberikan selama 4 minggu. Setiap tikus dengan berat ± 200g mendapatkan ± 1mL larutan dengan konsentrasai 4 mg/mL. Sonde untuk tikus kontrol dibedakan dengan tikus perlakuan untuk mencegah adanya kontaminasi.

Berat badan tikus ditimbang sebelum, selama dan setelah induksi. Terminasi tikus dilakukan setelah perlakuan terakhir. Tikus dimatikan/diterminasi dengan anestesi kemudian dilakukan dislokasi servikal. Darah diambil dari vena infraorbitalis dan jantung.

Pengukuran kadar asam sialat dilakukan dengan modifikasi metode Warren.⁷ Prinsipnya adalah membebaskan terlebih dahulu asam sialat dari protein plasma atau jaringan dengan cara hidrolisis ringan, kemudian dioksidasi dengan natrium metaperiodat dalam asam sulfat pekat. Hasil oksidasi direaksikan dengan asam tiobarbiturat sehingga terbentuk kromofor yang dilarutkan dalam sikloheksanon dan diukur serapannya pada panjang gelombang 549-550 nm.⁸

Analisis statistik dilakukan dengan bantuan program statistik SPSS 18 for windows. Semua data hasil pengukuran dilakukan uji normalisasi menurut

distribusi Gaussian dengan pendekatan uji Kolmogorov-Smirnov dan uji homogenitas Levene. Bila distribusi data tidak memenuhi persyaratan, maka dilakukan proses transformasi. Analisis dilanjutkan dengan uji Anova dan uji post hoc untuk melihat adanya perbedaan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.

Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Penelitian ini adalah penelitian awal untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L*) terhadap kadar asam sialat plasma tikus putih sebagai petanda tumor payudara yang diinduksi dengan DMBA (7,12 dimethylbenz-(a)anthracene).

Telah dilakukan induksi tumorigenesis tumor payudara tikus Sprague Dawley betina dengan menggunakan DMBA secara oral dengan dosis 20 mg/kg BB yang dilarutkan dalam minyak jagung. Hasil penimbangan berat badan sebelum, selama dan setelah induksi tidak ditunjukkan dalam penelitian ini. Berdasarkan penelitian Meiyanto dan kawan-kawan yang menginduksi 20 mg/kg BB 2 x seminggu selama 5 minggu DMBA pada tikus SD betina usia 45 hari, euthanasia dilakukan 2 hari (16 minggu) kemudian, hasilnya tidak ada penurunan berat badan antara kontrol dan perlakuan (DMBA).

Pada penelitian ini telah dilakukan optimasi kondisi untuk pengukuran kadar asam sialat plasma darah dan jaringan dengan memodifikasi metode Warren. Optimasi diawali dengan membuat spektrum absorpsi asam sialat untuk mengetahui panjang gelombang maksimal yang akan dipergunakan selanjutnya. Digunakan kadar 100 µg/mL dan dimulai dari panjang gelombang 500 nm sampai 575 nm. Diperoleh absorpsi maksimal terjadi pada panjang gelombang 549-550 nm, sehingga pengukuran selanjutnya

dilakukan pada panjang gelombang 549 nm. Menurut Warren, ada sejumlah lipid tidak jenuh yang menghasilkan MDA pada oksidasi periodat dan berkontribusi pada densitas optik pada panjang gelombang 532 dan 549 nm, namun dari hasil optimasi ini tidak ditemukan puncak pada 532 nm dan hanya ada satu puncak tajam pada panjang gelombang antara 549-550 nm.

Penggunaan TCA sebagai pengendap protein juga memerlukan optimasi karena kandungan protein sampel berbeda-beda untuk tiap jaringan dan plasma. Stabilitas larutan TBA juga berpengaruh karena larutan ini relatif tidak stabil, mengendap pada suhu kamar. Menurut Warren larutan TBA stabil selama \pm satu bulan. Tahap penambahan larutan periodat mempengaruhi pengukuran kadar asam sialat karena oksidasi periodat membutuhkan suasana asam kuat agar gugus asetil atau gliksil lepas dari gugus amino. Pembentukan warna meningkat dengan peningkatan jumlah periodat dan menurun pada suhu 37°C dibandingkan pada suhu kamar.

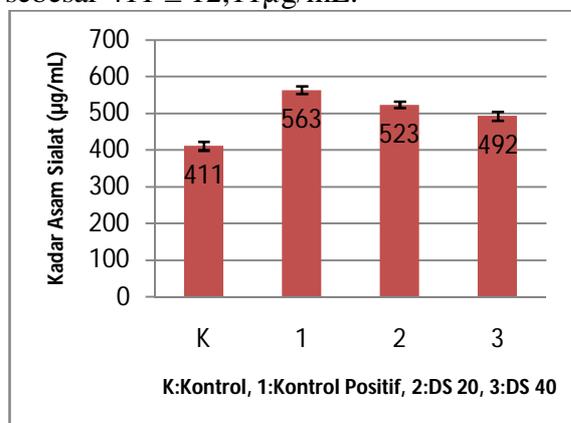
Metode Warren ini dipilih karena pertimbangan bahan dan alat yang digunakan meskipun menurut Sobenin metode kolorimetri Warren tidak terlalu spesifik karena adanya beberapa senyawa yang dapat mengganggu hasil, diantaranya MDA dan aldehid-aldehid lain dalam sirkulasi. Kekurangan ini diminimalisir dengan menggunakan kontrol yang dibuat dengan perlakuan yang sama dengan sampel di setiap langkah.

Setiap kali pengukuran kadar asam sialat sampel, dibuat juga kurva standar menggunakan NANA (*N-Asetil Neuraminic Acid*) dengan berbagai konsentrasi mulai dari 50 µg/mL sampai 300 µg/mL atau disesuaikan dengan sampel yang akan diukur. Persamaan yang didapat digunakan untuk menghitung kadar asam sialat sampel.

Pemeriksaan kadar asam sialat plasma tikus yang diinduksi dengan DMBA menunjukkan bahwaterjadi

peningkatan kadar asam sialat plasma pada kelompok 1 ($563 \pm 10,29 \mu\text{g/mL}$) dibandingkan dengan kontrol ($411 \pm 12,11 \mu\text{g/mL}$). Pada kelompok 2 dan 3 terjadi penurunan kadar asam sialat masing-masing $523 \pm 8,48 \mu\text{g/mL}$ dan $492 \pm 12,14 \mu\text{g/mL}$. Secara statistik peningkatan kadar asam sialat terhadap kelompok kontrol bermakna pada kelompok 2 dan 3 ($p < 0,05$). Peningkatan kadar asam sialat plasma darah terjadi pada kelompok 1, yaitu terjadi peningkatan kadar asam sialat yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok 2 dan 3. Hal ini dimungkinkan karena kadar asam sialat dalam darah mewakili kadar sistemiknya. Tingginya kadar asam sialat di plasma darah tikus yang mendapat perlakuan induksi karsinogen DMBA adalah karena adanya proses pengelupasan membran pada keganasan sehingga asam sialat yang terikat pada glikoprotein dan glikolipid membran akan turut dilepaskan ke dalam plasma. Peristiwa ini disebut dengan *shedding*.

Peningkatan kadar asam sialat plasma pada penelitian ini menambah kemungkinan bahwa kadar asam sialat plasma dapat digunakan sebagai penanda dini tumor. Pada kelompok 2 dan 3 berturut-turut terjadi penurunan kadar asam sialat plasma darah tikus dibandingkan dengan kelompok 1, tetapi penurunan ini tidak sampai menyamai kadar asam sialat pada kelompok K yaitu sebesar $411 \pm 12,11 \mu\text{g/mL}$.



Gambar1. Kadar asam sialat darah tikus yang diinduksi DMBA dan diberi ekstrak daun sirsak.

Peningkatan kadar asam sialat tumor di dalam plasma akan diikuti dengan peningkatan kadarnya di dalam jaringan. Kadar asam sialat jaringan payudara tikus yang diinduksi DMBA meningkat dibanding kontrol ($p < 0,05$). Peningkatan kadar asam sialat pada jaringan payudara tikus mulai meningkat secara bermakna pada kelompok 1, 2 dan 3 dibandingkan kontrol.

Asam sialat merupakan komponen glikoprotein dan glikolipid membran yang banyak berperan dalam pengenalan seluler dan molekuler. Peningkatan kadar asam sialat dalam berbagai jaringan tumor mencerminkan reaksi inflamasi terhadap tumor yang mengakibatkan meningkatnya sekresi protein fase akut oleh sel. Teori lain yang mendukung tingginya kadar asam sialat pada jaringan tumor adalah bertambahnya jumlah sel-sel baru yang banyak mengandung asam sialat. Selain itu peningkatan ini juga disebabkan oleh peningkatan ekspresi enzim sialiltransferase, yaitu enzim yang diperlukan untuk biosintesis sialokonjugat pada berbagai jaringan tumor. Peningkatan enzim ini akan menyebabkan peningkatan jumlah asam sialat pada glikoprotein yang terdapat pada membran sel.

Kadar asam sialat pada plasma kelompok perlakuan meningkat dibandingkan dengan kontrol, sedangkan kadar asam sialat di jaringan meningkat sejalan dengan makin banyaknya induksi DMBA. Pada kelompok yang diberi terapi ekstrak daun sirsak, terjadi penurunan kadar asam sialat plasma. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Prijanti, 1997⁶, dimana asam sialat dijadikan petanda dini terjadinya tumor payudara. Penelitian ini juga sesuai dengan penelitian Sinaga, 1991, bahwa terjadi perubahan kadar asam sialat pada serum dan jaringan hepar tikus yang diinduksi aflatoxin B1⁹. Efek pemberian ekstrak daun sirsak adalah menurunkan petanda kadar asam sialat plasma yang bisa diartikan sebagai bentuk penghambatan terjadinya proses tumorigenesis tumor

payudara oleh karsinogen DMBA. Oleh karena itu, secara statistik bisa disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun sirsak dapat berpengaruh terhadap penurunan kadar asam sialat plasma pada tikus yang diinduksi DMBA.

Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut: Terdapat pengaruh pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L*) terhadap kadar asam sialat plasma tikus putih sebagai petanda tumor payudara yang diinduksi karsinogen DMBA, yaitu terjadi penurunan secara bermakna pada kelompok perlakuan ekstrak daun sirsak 20mg/kgBB dan 40mg/kgBB, baik pada plasma darah maupun jaringan payudara ($p < 0.05$).

Daftar Pustaka

1. Anonim. *Annona muricata* information from NPGS/GRIN. www.ars-grin.gov. Diakses pada 3 Maret 2013
2. Banerjee S, Ramos CB, Aggarwal BB. Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: Role Of nuclear factor κ B, cyclooxygenase-2 and matrix metalloprotease. 2002. *Cancer Res*;62:4945-54.
3. Meiyanto E, Tasmiatun S, Susilowati S, Murwanti R, Sugiyanto. Penghambatan karsinogenesis kanker payudara tikus terinduksi DMBA pada fase post inisiasi oleh ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* (Lour), Merr. 2007. *Majalah Farmasi Indonesia*.;18(4):169-75
4. Cooper, G.M., Hausman, RE. *The Cell A Molecular Approach*. 2003. 3rd ed. Washington:ASM Press:631-80.
5. Girolami F, Abbadessa G, Racca S, Spaccamiglio A, Piccione F, Dacasto M, et.al. Time-dependent acetyl salicylic acid effects on liver CYP1A and antioxidant enzymes in rat model of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary. 2008. *Carcinogenesis*.181:87-92.
6. Prijanti AR. Penetapan kedinian α -fetoprotein (AFP) dan asam sialat plasma tikus sebagai petanda tumor pada induksi kanker hati dengan aflatoksin B1. 1997. [tesis]. Univesitas Indonesia. Jakarta.
7. Warren L. The tiobarbituric acid assay of sialic acid. 1959. *J Biol Chem*.234(9):1971-7
8. Victor Ginsburg. 2004. The role of sialic acids in biological recognition (review). Schauer, R., *Arch. Biochem Biophys*.426(2),132-141.
9. Sinaga E. Perubahan kadar asam sialat pada serum dan jaringan hepar tikus yang diinduksi karsinogenesis dengan aflatoksin B1. 1991. [tesis]. Universitas Indonesia Jakarta.