

EFEK PEMBERIAN EKSTRAK DAUN *Carica pubescens* TERHADAP JUMLAH LEUKOSIT PADA TIKUS *Sprague Dawley* YANG DIINDUKSI AZOXYMETHANE : STUDI DI LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERPADU 4 UNIVERSITAS GADJAH MADA

Eka Meyliana Sugeng¹, Ainun Rahmasari Gumay², Saekhol Bakri³

¹Mahasiswa Program Pendidikan S-1 Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

²Staf Pengajar Ilmu Fisiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

³Staf Pengajar Ilmu Kesehatan Masyarakat, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang-Semarang 50275, Telp. 02476928010

ABSTRAK

Latar belakang: Inflamasi adalah salah satu faktor penyebab terjadinya kanker kolorektal. Flavonoid adalah suatu senyawa yang terkandung dalam daun *Carica pubescens* diyakini memiliki efek antiinflamasi. **Tujuan:** mengetahui efek pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* terhadap jumlah leukosit pada tikus *Sprague dawley* yang diinduksi *azoxymethane*. **Metode:** jenis penelitian ini adalah *post test only control group design* dengan sampel terdiri dari 25 tikus *Sprague dawley* yang dibagi dalam 5 kelompok yaitu K1 diberi injeksi NaCl 0,9% seminggu sekali selama dua minggu, K2 diberi injeksi *azoxymethane* seminggu sekali selama dua minggu. P1, P2 dan P3 yang diberi injeksi *azoxymethane* seminggu sekali dalam dua minggu dan diberi ekstrak daun *Carica pubescens* dengan dosis 100 mg/KgBB, 200 mg/KgBB dan 400 mg/KgBB. Jumlah leukosit dihitung dengan alat *hematology analyzer* Sysmex KX-21 yang dinyatakan dalam sel/ μ L. Data dianalisis dengan One way Anova dan uji Post Hoc. **Hasil:** rerata jumlah leukosit kelompok K2 ($7000 \pm 2065,2 \mu$ L) lebih tinggi signifikan dibanding K1 ($4830 \pm 449,4 \mu$ L, $p=0,002$) dan P1 ($4380 \pm 715,5 \mu$ L, $p=0,002$). Rerata kelompok K2 ($7000 \pm 2065,2 \mu$ L) lebih tinggi namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok P2 ($6820 \pm 1030,5 \mu$ L, $p=0,807$) dan P3 ($6020 \pm 759,6 \mu$ L, $p=0,193$). **Kesimpulan:** ekstrak daun *Carica pubescens* menurunkan jumlah leukosit.

Kata Kunci: *Carica pubescens*, leukosit, kanker kolorektal.

ABSTRACT

EFFECT OF CARICA PUBESCENS'S LEAVES EXTRACT ON THE NUMBER OF LEUCOCYTE IN SPRAGUE DAWLEY INDUCED AZOXYMETHANE

Background: inflammation is one of the causative factors of colorectal cancer. Flavonoids are compounds contained in the leaves of *Carica pubescens* that have an effect as anti-inflammatory. **Aim:** to know the chemopreventive effect of *Carica pubescens*'s leaves extract on the number of leucocyte in *Sprague dawley* that induced by *azoxymethane*. **Method:** this study is a true experimental study with randomized post test only control group design with a sample of 25 *Sprague dawley* divided into 5 groups, K1 was given intraabdominal injection of NaCl 0,9% once a week for two weeks, K2 was given intraabdominal injection of *azoxymethane* once a week for two weeks. P1, P2 and P3 was given intraabdominal injection of *azoxymethane* once a week for two weeks and given *Carica pubescens*'s leaves extract with dose of 100 mg/KgBW, 200 mg/KgBW and 400 mg/KgBW everyday for 14 days. Leucocytes count calculated by *hematology analyzer* Sysmex KX-21 expressed in cells/ μ L. Data were analyzed with One way Anova and Post Hoc test. **Result:** The mean number of

leucocytes count in group K2 ($7000 \pm 2065,2 \mu\text{L}$) was significantly higher than group K1 ($4830 \pm 449,4 \mu\text{L}$, $p=0,002$) and P1 ($4380 \pm 715,5 \mu\text{L}$, $p=0,002$). The mean number of leucocytes count in group K2 ($7000 \pm 2065,2 \mu\text{L}$) was higher but not significantly different from P2 ($6820 \pm 1030,5 \mu\text{L}$, $p=0,807$) and P3 ($6020 \pm 759,6 \mu\text{L}$, $p=0,193$). **Conclusion:** *Carica pubescens* leaf extract reduce the number of leukocytes.

Keyword: *Carica pubescens*, leucocytes, colorectal cancer

PENDAHULUAN

Kanker kolorektal adalah keganasan yang berasal dari jaringan usus besar di bagian kolon dan atau rektum yang merupakan keganasan ketiga penyebab kematian di Amerika Serikat.^{1,2,3re} Menurut Globocan 2012, prevalensi kanker kolorektal di Indonesia 5 tahun terakhir adalah 9% atau sebanyak 57.892 orang per 644.264 penduduk dewasa.⁴ Penelitian epidemiologi di Indonesia juga telah menunjukkan bahwa penderita kanker kolorektal di Indonesia berusia yang lebih muda dibandingkan dengan negara-negara yang sudah maju. Lebih dari 30% kasus berusia 40 tahun atau lebih muda, sedangkan pasien yang berusia kurang dari 50 tahun di negara berkembang terhitung hanya 2-8% kasus.⁵

Banyak penelitian yang telah membuktikan bahwa faktor inflamasi berhubungan dengan patogenesis kanker kolorektal terutama inflamasi kronik.⁶ Penyakit inflamatorik seperti penyakit Crohn dan kolitis ulseratif yang dapat menyebabkan kanker kolorektal

mendukung teori bahwa kanker sering ditemukan pada organ-organ yang mengalami inflamasi kronik.^{6,7} Saat terjadi inflamasi, leukosit dan faktor fagosit lain akan menginduksi kerusakan DNA pada sel yang sedang membelah melalui *reactive oxygen* dan *nitrogen species* yang secara normal dihasilkan oleh sel untuk melawan infeksi.⁸ Salah satu penanda dari reaksi inflamasi non-spesifik adalah leukosit. Peningkatan jumlah leukosit berhubungan dengan meningkatnya risiko insidensi dan mortalitas kanker kolorektal.

Terapi yang biasa digunakan untuk pengobatan kanker kolorektal adalah pembedahan, kemoterapi dan radioterapi serta beberapa obat-obatan seperti *non-steroidal anti-inflammation drug* (NSAID), aspirin dan obat hormonal (*epidermal growth hormon receptor inhibitor* dan *vascular endothelial growth factor inhibitor*).^{1,7} Meskipun demikian terapi-terapi tersebut memiliki banyak sekali efek samping. *American Cancer Assosiation* tidak merekomendasikan penggunaan obat-obatan tersebut dikarenakan efek

sampingnya yang berupa perdarahan gastrointestinal atau serangan jantung yang diakibatkan oleh inhibitor selektif COX-2 (*Cyclooxygenase-2*).^{7,9,10}

Saat ini banyak penelitian tentang obat-obat herbal untuk berbagai terapi ajuvan dan kemopreventif salah satunya untuk pengobatan kanker. Tanaman dari genus *Carica* yang mempunyai dua spesies *Carica papaya* L. dan *Carica pubescens* merupakan salah satu tanaman yang saat ini diteliti untuk pengobatan. Tanaman *Carica pubescens* mempunyai kandungan aktif berupa senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, polifenol dan tanin, serta triterpenoid dan saponin.¹¹ Penelitian secara *in vivo* maupun *in vitro* menunjukkan bahwa flavonoid memiliki efek anti-radang, anti-bakteri, anti-alergi, anti-karsinogen dan melindungi pembuluh darah.¹² Penelitian mengenai efek anti-inflamasi tumbuhan *Carica pubescens* pada kanker kolorektal masih belum banyak sehingga penulis tertarik untuk mengetahui efek pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* terhadap jumlah leukosit pada tikus *Sprague dawley* yang diinduksi dengan *azoxymethane*.

METODE

Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni dengan desain

penelitian *randomized post test only control group design*. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus *Sprague dawley* berumur 5-7 minggu dengan berat 120-150 gram yang diperoleh dari LPPT 4 UGM. Sampel dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu K1, K2, P1, P2 dan P3 dengan K1 diberi diet standar dan 1 ml injeksi intraperitoneal NaCl fisiologis 0,9% seminggu sekali selama 14 hari lalu K2, P1, P2 dan P3 diberi diet standar dan injeksi 10 mg/KgBB *azoxymethane* intraperitoneal seminggu sekali selama 14 hari dan pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* pada kelompok P1, P2 dan P3 dengan dosis 100, 200 dan 400 mg/KgBB diberikan satu kali sehari selama 14 hari.

Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke-15 di daerah retroorbital hewan coba sebanyak 2 cc dan ditampung dalam botol EDTA dengan perbandingan 2 ml darah dan 1 mg EDTA. Pengukuran jumlah leukosit dilakukan dengan pemeriksaan darah rutin dengan *hematology analyzer* Sysmex KX-21.

HASIL

Pada uji normalitas *Saphiro-Wilk* yang dilakukan pada hitung leukosit di kelima kelompok perlakuan menunjukkan distribusi data yang normal ($p > 0,05$)

sehingga ukuran pemusatan data yang digunakan adalah standar deviasi.

Tabel 1. Rerata jumlah leukosit (sel/ μ L) pada semua kelompok

Kelompok	Jumlah Leukosit
	Rerata \pm SD
K1	4830 \pm 449,4
K2	7000 \pm 2065,2
P1	4380 \pm 715,5
P2	6820 \pm 1030,5
P3	6020 \pm 759,6

Dari tabel 1. rerata leukosit terbesar adalah kelompok kontrol yang diinduksi *azoxymethane* (K2) dengan rerata 7000 \pm 2065,2 μ L dan rerata leukosit terendah adalah kelompok perlakuan satu (P1) dengan rerata 4380 \pm 715,5 μ L. Selanjutnya dilakukan uji One Way Anova dan Post Hoc dan didapatkan *p* pada uji one way anova *p*=0,02 sehingga didapatkan hasil uji Post Hoc sebagai berikut:

Tabel 2. Nilai *p* Hasil Uji *Post-Hoc* LSD Perbandingan Jumlah Leukosit Antar Kelompok

	K1	K2	P1	P2	P3
K1	-	<i>p</i> =0,002*	<i>p</i> =1,000	<i>p</i> =0,003*	<i>p</i> =0,036*
K2	-	-	<i>p</i> =0,002*	<i>p</i> =0,807	<i>p</i> =0,193
P1	-	-	-	<i>p</i> =0,003*	<i>p</i> =0,036*
P2	-	-	-	-	<i>p</i> =0,285
P3	-	-	-	-	-

*signifikan bila *p*<0,05

Dari uji LSD didapatkan perbedaan yang bermakna pada kelompok K1 dan K2 dengan *p*=0,002 juga terdapat perbedaan bermakna pada kelompok K2 dan P1 dengan *p*=0,002. Namun, perbedaan yang tidak bermakna didapatkan pada kelompok K2 dengan P2 dengan nilai *p*=0,807 dan dengan P3 dengan nilai *p*=0,193.

PEMBAHASAN

Setelah dilakukan penelitian selama 14 hari didapatkan hasil penelitian yang menunjukkan terdapat perbedaan

signifikan antara kelompok kontrol normal (K1) dengan kelompok kontrol yang diinduksi *azoxymethane* (K2), hal ini menunjukkan bila induksi AOM berhasil. Seperti diketahui AOM memutasi *K-ras*, β -katenin dan TGF- β yang akan menyebabkan proliferasi sel kanker meningkat.¹³ Selain itu melalui mutasi β -katenin, AOM dapat menyebabkan inflamasi di mana semakin banyak β -katenin yang terakumulasi semakin banyak agen-agen inflamasi berkumpul dan hal ini yang menyebabkan peningkatan jumlah

leukosit pada kelompok kontrol yang diinduksi *azoxymethane*.¹⁴

Perbedaan signifikan yang lain juga ditemukan pada kelompok perlakuan satu (P1) dan kontrol yang diinduksi *azoxymethane* (K2) dengan $p=0,002$. Ini membuktikan bahwa ekstrak daun *Carica pubescens* dengan dosis 100 mg/KgBB dapat menurunkan jumlah leukosit. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh O.J. Sule (2016) yang menunjukkan bahwa ekstrak daun *Carica pubescens* dengan melalui senyawa flavonoid dapat menurunkan jumlah leukosit.¹⁵ Penelitian lain yang dilakukan oleh Dimas Bramanto Satrya Utama dkk (2014) dan Rio Jeffri Sudarko dkk (2013) juga menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* dapat menurunkan jumlah leukosit melalui efek senyawa flavonoid yang menghambat sintesis *eikosanoid* melalui penurunan kandungan asam arakidonat pada jaringan membran fosfolipid sel yang mengakibatkan terhambatnya pelepasan sejumlah mediator inflamasi seperti prostaglandin, leukotrin dan tromboksan.^{16,17}

Di sisi lain hasil penelitian pada kelompok perlakuan dua (P2) dan tiga (P3) tidak memberikan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol yang

diinduksi *azoxymethane* (K2), namun sudah menunjukkan adanya tren penurunan pada keduanya. Dalam hal ini, injeksi ketamin juga tidak berpengaruh terhadap peningkatan maupun penurunan jumlah leukosit.¹⁸

Pada penelitian ini jumlah rerata kelompok P1 lebih rendah daripada kelompok kontrol normal, namun kelompok P2 dan P3 lebih tinggi, dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa dosis efektif ekstrak daun *Carica pubescens* adalah 100 mg/KgBB. Diperkirakan peningkatan dosis di atas dosis efektif menyebabkan penurunan efek antiinflamasi dari ekstrak daun *Carica pubescens*. Tetapi pada penelitian lain disebutkan bahwa flavonoid memiliki fungsi lain sebagai imunomodulator yang dapat meningkatkan jumlah leukosit melalui peningkatan IL-2 dan proliferasi limfosit. Proliferasi limfosit akan memengaruhi CD4 kemudian sel TH1 teraktivasi yang akan meningkatkan jumlah leukosit.¹⁹ Jalur patogenesis yang diteliti pada penelitian ini adalah jalur inflamasi.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa

terdapat efek pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* terhadap jumlah leukosit pada tikus *Sparague dawley* yang diinduksi azoxymethane.

Saran

Perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut dengan melihat gambaran histopatologi kolon dan pemeriksaan lain seperti stress oksidatif dan pelaksanaan penelitian dalam waktu yang lebih lama.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wibowo N, Irwinda R, Frisdiantiny E. Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran. *Kanker Kolor*. 2016:1. <http://kanker.kemkes.go.id/guidelines/PNPKkolorektal.pdf>.
2. Marley AR, Nan H. Epidemiology of Colorectal Cancer. 2016;7(3):105-114.
3. Research WCRF/ AI for C, Pekmezi D, Demark-Wahnefried W. Updated evidence in support of diet and exercise interventions in cancer survivors. *Acta Oncol (Madr)*. 2011;50(2):167-178. doi: 10.3109/0284186X.2010.529822.Updated.
4. IARC W. No Title. GLOBOCAN. http://globocan.iarc.fr/old/pie_pop_prev.asp?selection=90360&title=Indonesia&sex=0&type=4&window=1&join=1&submit=%25C2%25A0Execute. Published 2018.
5. Abdullah M, Sudoyo AW, Utomo AR, Fauzi A, Rani AA. Molecular profile of colorectal cancer in Indonesia: Is there another pathway? *Gastroenterol Hepatol from Bed to Bench*. 2012;5(2):71-78.
6. Lee Y-J, Lee H-R, Nam C-M, Hwang U-K, Jee S-H. White Blood Cell Count and the Risk of Colon Cancer. *Yonsei Med J*. 2006;47(5):646-656.
7. American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2017 - 2019. *Atlanta*. 2017:1-40. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61649-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9).
8. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-545. doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0.
9. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-867. doi: 10.1038/nature01322.Inflammation.
10. Yamada T, Alpers DH, Kalloo AN, Kaplowitz N, Owyang C, Powell DW. *Textbook of Gastroenterology, Fifth Edition*. Vol 1-2.; 2009. doi:10.1002/9781444303254.
11. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and

- mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet*. 2010;376(9754):1741-1750. doi:10.1016/S0140-6736(10)61543-7.
12. Biller JR, Elajaili H, Meyer V, Rosen GM, Eaton SS, Eaton GR. NIH Public Access. *J Magn Reson*. 2013;236(8):47-56. doi:10.1016/j.jmr.2013.08.006.
13. Chen J, Huang XF. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(14):1313-1317. doi:10.4161/cbt.8.14.8983.
14. Mayer RJ, Wolpin Brian M. Systemic Treatment of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2009;134(5):1296-1310. doi: 10.1053/j.gastro.2008.02.098.Systemic.
15. Sule O, Abdu A, Kiridi K. Effect of Carica papaya (L) Leaves on Haematological Parameters in Ccl4-induced Wistar Albino Rats. *Br J Med Med Res*. 2016;16(3):1-6. doi:10.9734/BJMMR/2016/13686.
16. Utama, Dimas Bramanto Satrya, Yuliana Mahdiyah Da'at Arina MNA. Pengaruh Ekstrak Daun Pepaya Terhadap Jumlah Sel Limfosit Pada Gingiva Tikus Wistar Jantan Yang Mengalami Periodontitis (The effect of papaya leaves extract to the number of that undergo periodontitis). *Gigi, Fak Kedokt Unej, Univ Jember*. 2014;2(1):50-57. <http://jurnal.unej.ac.id/index.php/JPK/article/view/596>.
17. Sudarko RJ, Amin MN, Praharani D. Efek Pemberian Ekstrak Daun Pepaya Terhadap Jumlah Sel Neutrofil Pada Model Tikus Periodontitis (Effect Of Papaya Leaf Extract Against The Amount of Neutrophils on Rat Model with Periodontitis). 2013.
18. Kurniawan T. Perbedaan pengaruh induksi antara propofol dengan ketamin terhadap hitung jenis leukosit. *Perpust uns.ac.id*. 2012.
19. Dewi LK, Widyarti S, Rifa'i M. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (Annona muricata Linn .) terhadap Peningkatan. :24-26.