

EFEK PEMBERIAN EKSTRAK DAUN *CARICA PUBESCENS* TERHADAP JUMLAH NEUTROFIL PADA TIKUS *SPRAGUE DAWLEY* YANG DIINDUKSI AZOXYMETHANE

Faradilla Nadya Blezeinsky¹, Ainun Rahmasari Gumay², Hardian²

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

²Staf Pengajar Ilmu Fisiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang-Semarang 50275, Telp. 02476928010

ABSTRAK

Latar Belakang : Inflamasi yang terjadi terus menerus adalah salah satu penyebab terjadinya kanker kolorektal. Ekstrak daun *Carica pubescens* mengandung flavonoid yang memiliki efek antiinflamasi diyakini mampu menurunkan jumlah sel neutrofil. **Tujuan :** Mengetahui efek pengaruh pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* terhadap jumlah sel neutrofil tikus *Sprague dawley* yang diinduksi *Azoxymethane*. **Metode :** Jenis penelitian ini menggunakan *true eksperimental* laboratorium dengan *Post Test Only with Control Group Design*. Sampel sebanyak 25 ekor tikus *Sprague dawley* dibagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok K1 hanya diberi pakan dan minum standar injeksi NaCl 0,9% seminggu sekali selama dua minggu, Kelompok K2 diberi pakan minum standar dan diinjeksi *azoxymethane* seminggu sekali selama dua minggu, P1, P2, dan P3 diberi pakan dan *Carica pubescens* dengan dosis 100, 200, 400 mg/kgBB dan diinjeksi *azoxymethane* seminggu sekali dalam dua minggu. Jumlah neutrofil dihitung dengan alat *hematology analyser* Sysmex KX-21 yang dinyatakan dalam sel/ μ L. Data dianalisis dengan *One Way Anova* dan uji *post Hoc* LSD. **Hasil :** Rerata jumlah neutrofil kelompok P1 (940,0 \pm 554,98 μ L) lebih rendah signifikan dibanding K2 (2040,0 \pm 270,19 μ L p=0,001), rerata jumlah neutrofil kelompok P2 (1220,0 \pm 342,05 μ L) lebih rendah signifikan dibanding K2 (2040,0 \pm 270,19 μ L p=0,008), rerata jumlah neutrofil kelompok P3 (1240,0 \pm 680,44 μ L) lebih rendah signifikan dibanding kelompok K2 (2040,0 \pm 270,19 μ L p=0,010) serta rerata jumlah neutrofil kelompok K1 (1160,0 \pm 114,02 μ L) lebih rendah signifikan dibanding kelompok K2 (2040,0 \pm 270,19 μ L p=0,005). **Kesimpulan :** Ekstrak daun *Carica pubescens* dapat menurunkan jumlah sel neutrofil pada tikus SD yang diinduksi *Azoxymethane*

Kata Kunci : *Carica pubescens*, neutrofil, kanker kolorektal

ABSTRACT

THE EFFECT OF GIVING *CARICA PUBESCENS* LEAVES EXTRACT ON THE NUMBER OF NEUTROPHILS IN *SPRAGUE DAWLEY* RATS INDUCED BY AZOXYMETHANE

Background : Inflammation that occurs continuously is one of the causes of colorectal cancer. *Carica pubescens* leaf extract containing flavonoids which have anti-inflammatory effects are believed to be able to reduce the number of neutrophil cells. **Aim :** To understand the effect of giving *Carica pubescens* leaves extract on *Sprague dawley* rat neutrophil cells induced by *Azoxymethane*. **Methods :** This study is a true laboratory experimental research with *Post Test Only with Control Group Design*. Samples of 25 *Sprague dawley* rats were 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 neutrophils in group P1 ($940.0 \pm 554.98 \mu$ L) was significantly lower than in K2 ($2040.0 \pm 270.19 \mu$ L $p = 0.001$), the average number of neutrophils in group P2 ($1220.0 \pm 342.05 \mu$ L) was more was significantly lower than K2 ($2040.0 \pm 270.19 \mu$ L $p = 0.008$), the mean neutrophil number in the P3 group ($1240.0 \pm 680.44 \mu$ L) was significantly lower than in the K2 group ($2040.0 \pm 270.19 \mu$ L $p = 0.010$) and the mean neutrophil number of the K1 group ($1160.0 \pm 114.02 \mu$ L) was significantly lower than in the K2 group ($2040.0 \pm 270.19 \mu$ L $p = 0.005$). **Conclusion :** Carica pubescens leaves extract can reduce the number of neutrophil cells in SD mice induced by Azoxymethane

Keywords : Carica pubescens, neutrofil, kanker kolorektal

PENDAHULUAN

Kanker kolorektal adalah keganasan yang berasal dari jaringan usus besar, terdiri dari kolon dan atau rektum.¹

Berdasarkan survei *Global Burden of Cancer Study* (Globocan) tahun 2012, insidensi kanker kolorektal di seluruh dunia menempati urutan ketiga yaitu 1360 dari 100.000 penduduk (9,7%).²

Banyak penelitian yang menyatakan bahwa inflamasi kronik berkaitan dengan patogenesis kanker kolorektal. Kondisi inflamatorik, seperti penyakit Crohn dan kolitis ulseratif yang menyebabkan kanker kolorektal, mendukung teori bahwa kanker sering ditemukan pada organ-organ yang mengalami inflamasi kronik.³

Saat terjadi inflamasi, neutrofil adalah fagosit utama dalam sirkulasi darah yang mempunyai peran sebagai fagosit bagi bahan pengganggu seperti bakteri, virus, dan bahan asing dengan cara

mengeluarkan enzim-enzim sebagai sumber terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) terutama enzim NADPH oksidase dan mieloperoksidase.⁴

Penatalaksanaan kanker kolorektal bersifat multidisiplin. Pilihan dan rekomendasi terapi tergantung pada beberapa faktor. Pembedahan merupakan prosedur definitif untuk menghilangkan massa kanker, radioterapi dapat meningkatkan kesembuhan setelah reseksi bedah dan dapat mengurangi gejala dan komplikasi yang terkait dengan penyakit lanjut, sedangkan kemoterapi digunakan sebagai ajuvan terapi atau terapi kanker kolorektal pada stadium lanjut. Kemoterapi adjuvan merupakan terapi standar untuk pasien kanker kolorektal. Obat kemoterapi yang paling banyak digunakan untuk terapi ajuvan adalah fluorourasil dan leukovorin.⁵

Beberapa efek samping yang umum terjadi pada pemberian terapi

antikanker yaitu mual muntah, mielosupresi, mukositis, alopesia, infertilitas dan karsinogenesis.⁶ Jenis jenis terapi tersebut membawa efek samping terhadap tubuh dan juga memerlukan biaya yang mahal. Hal tersebut menumbuhkan keinginan penulis untuk mencari agen kemopreventif dan terapi ajuvan lain untuk kanker kolorektal.

Carica pubescens Lenne & K. Koch merupakan tumbuhan khas di dataran tinggi Dieng yang termasuk dalam family *Caricaceae* dan satu genus dengan *Carica papaya*. Dalam daun karika (*Carica pubescens*) selain terdapat vitamin C juga terdapat senyawa fitokimia yaitu flavonoid, alkaloid, tannin dan fenol.⁷ Bagi manusia, flavonoid berguna sebagai antioksidan, antimikroba, antibakteri, antivirus, antiinflamasi, antialergi.⁸ Flavonoid juga berperan sebagai antiinflamasi dengan cara penghambatan aktivitas enzim siklooksigenase (COX) dan lipooksigenase, penghambatan degranulasi neutrofil sehingga akan menghambat pengeluaran sitokin, radikal bebas, serta enzim yang berperan dalam peradangan.⁹

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti ingin mempelajari efek pengaruh dari pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* terhadap jumlah sel neutrofil

pada model hewan coba yang diinduksi *Azoxymethane*.

METODE

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian *post test only group design*. Penelitian ini menggunakan 5 (lima) kelompok yang terdiri atas 5 tikus tiap kelompoknya, yaitu: Kelompok kontrol 1 (merupakan kelompok yang hanya diinjeksi 1 ml NaCL fisiologis seminggu sekali selama 2 minggu), kelompok kontrol 2 (merupakan kelompok yang diinjeksi AOM 10 mg/kgBB seminggu sekali selama 2 minggu), kelompok perlakuan 1 (merupakan kelompok yang diinjeksi AOM 10 mg/kgBB seminggu sekali selama 2 minggu dan diberikan ekstrak daun *Carica pubescens* dosis 100 mg/kgBB per oral setiap hari selama 2 minggu), kelompok perlakuan 2 (merupakan kelompok yang diinjeksi AOM 10 mg/kgBB seminggu sekali selama 2 minggu dan diberikan ekstrak daun *Carica pubescens* 200 mg/kgBB per oral setiap hari selama 2 minggu) dan kelompok perlakuan 3 (merupakan kelompok yang diinjeksi AOM 10 mg/kgBB seminggu sekali selama 2 minggu dan diberikan ekstrak daun *Carica pubescens* 400 mg/kgBB per

oral setiap hari selama 2 minggu). Kriteria inklusi dari penelitian ini adalah tikus *Sprague dawley* jantan, usia 5-7 minggu, berat badan 120-150 gram, kondisi fisik sehat, gerakan aktif, tidak ada abnormalitas anatomi yang tampak kriteria eksklusi tikus mati atau sakit ketika diaklimatisasi dan kriteria dropout dari penelitian ini adalah tikus mati pada saat penelitian.

Untuk menghindari bias karena faktor variasi umur dan berat badan maka pengambilan sampel dilakukan dengan *allocation random sampling*. Randomisasi langsung dilakukan karena sampel diambil dari tikus *Sprague dawley* yang sudah memenuhi kriteria inklusi sehingga dianggap cukup homogen.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun *Carica pubescens* pada beberapa tingkatan dosis (100, 200, 400 mg/kgBB), sedangkan variabel tergantung yang digunakan adalah jumlah neutrophil darah.

Uji hipotesis yang digunakan adalah uji komparatif Chi-Square karena kelompok kelompok pengukuran dalam penelitian ini tidak berpasangan dan berjumlah lebih dari dua kelompok, serta variabel-variabel dalam penelitian ini berskala katagorikal (ordinal/ordinal).

Nilai p dianggap bermakna apabila $p < 0.05$.

HASIL

Penelitian ini dilakukan Agustus-September 2018 di Laboratorium penelitian dan pengujian terpadu 4 dan 2 Universitas Gadjah Mada. Penelitian ini menggunakan sampel darah tikus hepar tikus *Sprague dawley* yang dikelompokkan menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor tikus *Sprague dawley* yang memenuhi kriteria inklusi.

Jumlah neutrofil didapatkan dengan pemeriksaan darah rutin dengan *hematology analyzer* Sysmex KX-21. Dikatakan terjadi progresifitas sel kanker bilamana terjadi peningkatan jumlah sel neutrofil. Perhitungan dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x untuk melihat lapangan pandang kecil. Pemeriksaan neutrofil darah tikus SD pada kelompok penelitian ditampilkan pada tabel 1

Tabel 1. Data Jumlah Neutrofil (sel/ μ L) pada Semua Kelompok

Kelompok	Rerata Nilai neutrofil \pm SD	Median (min-max)
K1	1160,0 \pm 114,02	1200 (1000 – 1300)
K2	2040,0 \pm 270,19	2100 (1600 – 2300)
P1	940,0 \pm 554,98	1200 (200 – 1400)
P2	1220,0 \pm 342,05	1200 (900 – 1700)
P3	1240,0 \pm 680,44	1200 (400– 2100)

Uji *One way Anova* : (p=0,009).

Pada tabel 1 tampak rerata jumlah neutrofil darah yang paling tinggi adalah pada K2 yaitu 2040,0 \pm 270,19 sel/ μ L sedangkan yang paling rendah adalah pada

kelompok K1 yaitu 1160,0 \pm 114,02 sel/ μ L. Pada table 2 juga tampak peningkatan jumlah neutrofil seiring dengan peningkatan dosis *Carica pubescens* dengan dosis 100, 200, dan 400 mg/KgBB

Hasil uji *Anova* menunjukkan perbedaan jumlah neutrofil darah antara kelompok penelitian adalah bermakna (p=0,009). Nilai p hasil uji post Hoc LSD antara kelompok penelitian ditampilkan pada tabel 2. Perbandingan jumlah neutrofil juga ditampilkan pada gambar 2.

Tabel 2. Nilai p hasil uji Post Hoc LSD perbedaan kadar neutrofil antar kelompok penelitian

	K1	K2	P1	P2	P3
K1	-	p=0,005*	p=0,440	p=0,832	p=0,777
K2		-	p=0,001*	p=0,008*	p=0,010*
P1			-	p=0,328	p=0,295
P2				-	p=0,944
P3					-

*Signifikan p < 0,05

Pada tabel 2 nampak perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol negatif (K1) dan (K2) dengan nilai p=0,005. Perbedaan bermakna juga dijumpai antara kelompok positif (K2) dan P1 dengan nilai p=0,001, antara kelompok kontrol 2 (K2) dengan P2 dengan nilai p=0,008. Kemudian kelompok kontrol 2 (K2) dengan P3 dengan nilai p=0,010.

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dijumpai pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* dengan dosis bertingkat 100, 200, 400 mg/kgBB menyebabkan jumlah neutrofil yang lebih rendah secara bermakna di banding kelompok yang diinduksi dengan AOM. Namun tidak berbeda dengan kelompok yang tidak diinduksi. Hasil penelitian ini juga menjumpai dosis efektif

Carica pubescens adalah dosis 100 mg/kgBB. Hal ini disebabkan oleh aktivitas antiinflamasi ekstrak daun *Carica pubescens* yang memiliki senyawa flavonoid dan implikasi dari efek ini yaitu menurunkan jumlah neutrofil pada kanker kolorektal.^{9 10}

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Otsuki N yang juga menunjukkan bahwa ekstrak daun *Carica pubescens* dengan melalui senyawa flavonoid dapat memediasi pergeseran dari sitokin-sitokin kekebalan tubuh dalam manusia dan menurunkan jumlah neutrofil.¹¹ Hasil penelitian serupa lain yang mendukung dilakukan oleh Sudarko RJ, dkk yang juga menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* dapat menurunkan jumlah neutrofil. Penurunan sel neutrofil ini disebabkan karena adanya kandungan flavonoid dari ekstrak daun pepaya yang dapat menghambat sintesis *eicosanoid* sehingga penurunan kandungan asam arakhidonat pada jaringan membran fosfolipid sel yang mengakibatkan terhambatnya pelepasan sejumlah mediator inflamasi.¹²

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* dosis 200, 400 mg/kgBB didapatkan peningkatan sel neutrofil

semakin tinggi. Pada penelitian Middleton et al, menyebutkan bahwa senyawa flavonoid selain mempunyai efek antiinflamasi juga memiliki efek imunomodulasi.¹³ Dimana kandungan flavonoid ini dapat meningkatkan proliferasi sel B dan sel T. Dan peningkatan sitokin, sitokin seperti IL-6.

Proses kanker kolorektal dari epitel kolon normal memerlukan serangkaian proses genetik dan faktor inflamasi untuk mengaktifkan dan membentuk lingkungan tumorigenik.¹⁴ *Azoxymethane* atau AOM adalah zat karsinogenik yang bersifat poten yang dapat menyebabkan kanker kolorektal pada tikus. Model ini sangat bernilai karena reproduksibilitas dan potensinya yang tinggi. AOM merupakan prokarsinogen indirek yang kuat dan stabil. AOM diubah oleh sitokrom p450 menjadi *methylazoxymethane* (MAM) yang dapat memproduksi DNA adducts dan menyebabkan inisiasi inflamasi, yang apabila terjadi terus-menerus akan menyebabkan inflamasi kronik.¹⁵

Neutrofil adalah leukosit yang paling banyak ditemukan dalam darah dan dianggap sebagai pertahanan tubuh selama inflamasi dan infeksi. Selain itu, neutrofil juga ditemukan sering menginfiltrasi banyak jenis tumor. *Tumor Associated Neutrophils* (TAN) memiliki peran dalam

penyakit ganas.¹⁶ Memang neutrofil bisa menjadi sel-sel antitumor. Namun, bukti klinis menunjukkan bahwa TAN berkolerasi dengan prognosis buruk, oleh karena itu TAN dapat bermanfaat atau malah bisa merugikan tuan rumah itu sendiri. Dimana pada awal tumor, TAN mampu menstimulasi respon sel T dimana sel T dikenal sebagai sel Th17 yang mampu memodulasi peradangan di dalam usus besar dan berkontribusi pada kanker kolorektal terkait inflamasi. Selain itu neutrofil juga mampu menghasilkan sitokin proinflamasi seperti IL-6, Tumor Nekrosis Faktor (TNF) dan Siklooksigenase 2 (COX-2) yang dapat mempengaruhi respon inflamasi seperti respon imun.¹⁷

Pemberian *Carica pubescens* menyebabkan penurunan jumlah neutrofil, hal ini merupakan bukti secara tidak langsung bahwa *Carica pubescens* dapat menghambat proses pertumbuhan sel ca kolorektal. Namun hal ini masih perlu di buktikan dengan melihat gambaran histopatologis pada kelompok perlakuan yang mendapat *Carica pubescens*.

Keterbatasan penelitian ini adalah hanya dilakukan pemeriksaan parameter jumlah neutrofil sehingga belum bisa menjelaskan kejadian yang sebenarnya. Pada saat laporan penelitian ini disusun

belum didapatkan hasil pemeriksaan histopatologi. Perlu dilakukan kajian lebih lanjut tentang hubungan antara jumlah neutrofil dengan gambaran histopatologis ca kolorektal.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Terbukti terdapat perbedaan bermakna jumlah neutrofil pada kelompok yang diberi ekstrak daun *Carica pubescens* dosis 100 200 400 mg/kgBB lebih rendah daripada kelompok kontrol yang diinduksi *Azoxymethane*.

Saran

Perlu dilakukan penelitian pemeriksaan gambaran histopatologi kolon sehingga terdapat perbandingan yang lebih jelas antar perlakuan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jong D. Buku Ajar Ilmu Bedah, In: Riwanto Ignatius, Hamami AH, Pieter Johnm Tjambolang Tadjudiin Ahmadsyah Ibrahim. Usus Halus, Apendiks, Kolon, dan Anorektum. Jakarta:EGC,2013.731-98
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer 2015; 136: E359–E386.

3. Neagoe A, Molnar AM, Acalovschi M, Seicean A, and Serban A. Risk factor for colorectal cancer: an epidemiologic descriptive study of a series of 333 patients. *Romanian Journal of Gastroenterology* 2004; 13 (3): 187-193
4. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Ann Rev Immunol* 2005; 23: 197-223
5. Andre T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, et al. 2009. Improved overall survival with Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the Mosaic Trial. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, pp. 1-8
6. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf, L, Navarro, M, Tabernero, J, Hickish, T, et al. 2004. Oxaliplatin 5-fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *New England journal of medicine*, vol. 350, pp. 2343-51
7. Laily AN, Suranto, Sugiyarto. 2012. Characteristics of *Carica pubescens* of Dieng Plateau, Central Java according to its morphology, antioxidant, and protein pattern. *Nusantara Bioscience* 4: 16-21
8. Alex Adeolu, Adedapo, Vivian Eguonor Orherhe. 2013. Antinociceptive and Anti-inflammatory Studies of the Aqueous Leaf Extract of *Carica papaya* in Laboratory Animals. *Asian J. Exp. Biol. SCI*. Vol 4 (1) 2013: 89-96.
9. Neelam Pathak, Saba Khan, Arpit Bhargava. Cancer Chemopreventive Effects of the Flavonoid-Rich Fraction Isolated from Papaya Seeds. *nutrition and cancer*. 2015 jan; 66:5, 857-871, DOI: 10.1080/01635581.2014.904912
10. Owoyele BV, Adebukola OM, Funmikayo AA, Soladoye AO. Anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Carica papaya* leaves. *Inflammopharmacology*. 2008 Aug; 16(4):168-73.
11. Otsuki N, Dang N H, Kumagai E, Kondo A, Iwata S and Morimoto C. Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects. *Journal of Ethnopharmacology* 2010; 127: 760-767.
12. 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
13. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. Desember 2000;52 (4): 673-751
 14. Caitlin A. Brennan and Wendy S. Garrett. Gut microbiota, inflammation, and colorectal cancer. *Annu Rev microbial*. Author manuscript; available in PMC 2017 Sep 8.
 15. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A Novel Inflammation-related Mouse Colon Carcinogenesis Model Induced by Azoxymethane and Dextran Sodium Sulfate. *Cancer Sci*. 2003; 24(11): 965– 73
 16. Querol EU. Neutrophils in Cancer: Two Sides Of The Same Coin. *Journal of Immunology Research* 2015
 17. Beaugerie L, Itzkowitz SH. Cancer complicating inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2015;372(15):1441-1