

Ekstrak Buah Legundi (*Vitex trifolia*) Mampu Menghambat Pembelahan dan Pertumbuhan Sel Tumor Kulit Tikus

Legundi Fruit (Vitex trifolia) Extract Potent as Proliferative and Growth Activity Inhibitor of Skin Tumor Cells in Wistar Rats Induced Benzoalphyrene

Humairah Medina Liza Lubis^{1*}, Ilham Hariaji²

¹Departemen Patologi Anatomi, Program Studi Pendidikan Dokter
Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

²Departemen Farmakologi dan Terapi, Program Studi Pendidikan Dokter
Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, Medan, Indonesia

*Email: humairahmedina@umsu.ac.id

Abstrak

Dengan perubahan gaya hidup manusia yang tidak sehat, terpapar radiasi sinar ultraviolet, agen fisika dan kimia secara berlebihan, luka yang lama tidak sembuh khususnya luka bakar dan infeksi virus, yang apabila dibiarkan dan tidak diobati bisa berkembang menjadi kanker. Pengobatan untuk tumor lebih banyak menggunakan obat-obatan sintetik yang juga dapat menimbulkan komplikasi dan kebanyakan belum menunjukkan hasil yang memuaskan, sehingga banyak penelitian ditujukan pada tanaman tradisional yang banyak tumbuh di Indonesia. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi penghambat pembelahan sel dari ekstrak buah legundi (*Vitex trifolia*). Penelitian ini adalah studi eksperimental dengan menggunakan tikus Wistar yang dibagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol normal (K₁), kontrol positif (K₂), P₁, P₂, P₃. Ekstrak etanol buah *V. trifolia* dibagi dalam 2 dosis yaitu 0,5g dan 1g/kgBB/hari/oral selama 3 minggu. Hasil penelitian berupa 3 slide (60%) adalah tumor ganas (*nonkeratinizing squamous cell carcinoma*), 1 slide (20%) adalah lesi atipik dan 1 slide (20%) adalah lesi jinak. Setelah pemberian terapi menggunakan buah *V. trifolia*, kelompok 2, 3, dan 4 yang memiliki lesi tumor mengalami penurunan ukuran (mengecil). Disimpulkan bahwa ekstrak etanol buah *V. trifolia* memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas proliferasi dan pertumbuhan dengan dosis pemberian 0,5 g dan 1 gr/hari.

Kata kunci: tumor kulit, *benzoalphyrene*, buah legundi (*Vitex trifolia*), aktivitas proliferasi dan pertumbuhan

Abstract

According to the changes in human lifestyle which tend to unhealthy life, exposure ultraviolet radiation, toxins, and genetics makes the cells who build the skin do the abnormal growth being cancer cells. Modern therapies such as surgery, chemotherapy, and radiation have not been satisfying. Side effects are inconvenient and costly, encouraging patients to seek a cheaper alternative therapy, through the use of herbs growing lately. This study aims to test the potential of legundi fruit (Vitex trifolia) in inhibiting cell proliferation and growth activity of skin tumors. This is an experimental study. Wistar rats used in this study were divided into five groups. Ethanolic extracts of Vitex trifolia fruit with two doses, 0,5 g and 1g/kg/day/orally for three weeks after exposure of benzoalphyrene. Three slides (60%) of the control slide that induced of benzoalphyrene are malignant tumors (nonkeratinizing squamous cell carcinoma), one slide (20%) is an atypical lesion, and one slide (20%) is a benign lesion. After treatment of V. trifolia fruit, group 2, 3, and 4 had lesion of skin tumors that decrease of size. Ethanolic extract of fruit Vitex trifolia able to inhibit proliferation and growth activity at 0,5 g and 1 gr/day doses.

Key words: skin tumor, *benzoalphyrene*, legundi fruit (*Vitex trifolia*), proliferation and growth activity

PENDAHULUAN

Penyakit kulit terutama tumor semakin banyak ditemukan di masyarakat. Secara umum, timbulnya tumor kulit memiliki faktor risiko yang potensial, antara lain adalah akibat terpapar oleh radiasi sinar ultraviolet secara berlebihan dan luka yang lama tidak sembuh khususnya luka bakar, diantaranya adalah *Marjolin's ulcer* yang bisa berkembang menjadi karsinoma sel skuamosa.¹ Faktor predisposisi genetik termasuk tahi lalat berukuran lebih besar dari 20 mm, infeksi *Human Papilloma Virus (HPV)*, toksin arsenik dan kekurangan beberapa vitamin dan mineral tertentu serta pada perokok berisiko tinggi berkembang menjadi tumor. Secara mikroskopik, sel-sel penyusun kulit mengalami pembelahan dan pertumbuhan (proliferasi) yang berlebihan. Apabila proliferasi ini berlangsung secara terus menerus maka dapat menimbulkan kanker.²

Banyak sekali penelitian yang membuktikan potensi tanaman tradisional untuk pengobatan berbagai penyakit. Salah satunya adalah tanaman legundi (*V. trifolia*) yang mempunyai efek farmakologi antara lain sebagai antibakteri, antifungi, insektisida, antikanker, analgesik, trakeospasmolitik, antialergi maupun antipiretik. Beberapa penelitian melaporkan kandungan kimia dari buah maupun daun legundi yaitu senyawa golongan flavonoid (kastisin; 3,6,7-trimetil kuersetagetin; vitexin; artemetin; 5-metil artemetin; 7-desmetil artemetin; luteolin; luteolin-7-O-²-D-glukuronida; luteolin-3-O-²-D-glukuronida dan isoorientin), terpenoid, maupun sterol (²-sitosterol dan ²-sitosterol-²-D-glukosida).^{3,4,5,6}

Aktivitas sitotoksik ekstrak heksan, diklorometan dan metanol tanaman *V. trifolia* telah diteliti oleh Hernández *et al* (1999),⁷ terhadap empat sel tumor manusia yaitu sel karsinoma leher, sel kanker

ovarium, sel karsinoma kolon dan sel nasofaringeal manusia. Secara umum, ekstrak heksan dan diklorometan mempunyai aktivitas sitotoksik yang memadai, sedangkan efek dari ekstrak metanol adalah rendah. Ekstrak diklorometan daun *V. trifolia* mempunyai aktivitas paling tinggi, terutama terhadap sel karsinoma kolon dengan harga ED50 kurang dari 1 ¼g/ML. Di lain pihak, Li *et al.* (2005),⁸ berhasil menemukan lima senyawa aktif antikanker diterpen tipe lab dan *in vitro* dengan metode *bioassay-guided separation* yaitu (1) viteksilakton, (2) (rel 5S,6R,8R,9R,10S)-6-asetoksi-9-hidroksi-13(14)-labden-16,15-olida, (3) rotundifuran, (4) vitetrifolin D dan (5) vitetrifolin E. Kelima senyawa tersebut dapat menginduksi apoptosis dan menghambat siklus sel baru pada sel line tsFT210 dan K562. Lebih lanjut, Li *et al.* (2005),⁸ mengisolasi enam flavonoid yang diisolasi dari *V. trifolia* yaitu persikogenin, artemetin, luteolin, penduletin, viteksikarpin dan krisosplenol-D, yang selanjutnya di uji terhadap proliferasi sel kanker tsFT210 tikus. Keenam flavonoid menghambat proliferasi sel kanker K562, dan diduga mempunyai mekanisme aksi menginduksi apoptosis pada sel kanker tersebut melalui jalur apoptosis yang diatur oleh mitokondria. Penemuan tersebut diperkuat oleh Li *et al.* (2005),⁸ enam flavonoid yang diisolasi dari *V. trifolia* yaitu persikogenin, artemetin, luteolin, penduletin, viteksikarpin dan krisosplenol-D.^{8,9}

Timbul ketertarikan dari peneliti untuk membuktikan potensi dari buah legundi yang kemungkinan juga mengandung senyawa flavonoid yang berfungsi untuk melindungi tubuh dari bahaya timbulnya tumor.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi penghambat pembelahan sel dari ekstrak buah *V. trifolia*.

BAHAN DAN CARA

Bahan uji yang digunakan adalah buah *V. trifolia* yang diperoleh dari daerah Tiga Binanga Tanah Karo dan bahan yang digunakan untuk ekstraksi simplisia adalah etanol 70%.

Bahan uji antikarsinogenesis adalah ekstrak etanol buah *V. trifolia*, *benzoalphapyrene*, *oleum olivarium* sebagai pelarut *benzoalphapyrene*, dan Hematoksin Eosin sebagai pewarna pengecatan histopatologi.

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih jantan jenis Wistar dengan berat 200gr-300gr dan dalam kondisi sehat yang diperoleh dari Unit Pengelola Hewan Laboratorium Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara Medan.

Alat yang digunakan untuk membuat ekstrak etanol buah legundi adalah panik infusa, alat-alat gelas, corong Buchner, penangas air, dan timbangan analitik.

Uji antikarsinogenesis menggunakan 1 gr *Benzoalphapyrene* dilarutkan dalam 100 ml *oleum olivarium* dan diberikan pada hewan coba dengan dosis 20 mg/kgBB secara subkutan. Larutan *benzoalphapyrene* dalam *oleum olivarium* selalu dibuat baru, sebelum pemberian terhadap hewan uji.

Tikus jantan jenis Wistar dibagi menjadi 5 kelompok secara random. Masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. K1 (kelompok normal) hanya diberi diet standar tanpa induksi *benzoalphapyrene*, K2 (kelompok kontrol positif) diberi diet standar, diinduksi *benzoalphapyrene* pada lapisan subkutan, setelah timbul massa tumor tidak diberi ekstrak buah *V. trifolia*, dan diterminasi pada minggu ke-3 untuk melihat jenis tumor kulit secara mikroskopik, P1 (Perlakuan 1) diberi diet standar, diinduksi *benzoalphapyrene* pada lapisan subkutan bersama-

an dengan pemberian ekstrak buah legundi 0,5g/kgBB/hari selama 2 minggu secara oral, P2 (Perlakuan 2) diberi diet standar, diinduksi *benzoalphapyrene* pada lapisan subkutan, setelah timbul massa tumor diberi ekstrak buah legundi 0,5g/kgBB/hari selama 2 minggu secara oral dan P3 (Perlakuan 3) diberi diet standar, diinduksi *benzoalphapyrene* pada lapisan subkutan, setelah timbul massa tumor diberi ekstrak buah legundi 1g/kgBB/hari selama 2 minggu secara oral.

Pada minggu ke-3 dilakukan nekropsi terhadap hewan uji kelompok K2. Organ yang diperiksa adalah kulit yang difiksasi dengan *buffer formalin*.

Analisis deskriptif dilakukan secara sitologi dan histopatologi. Pembuatan preparat jaringan dan pemeriksaan histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.

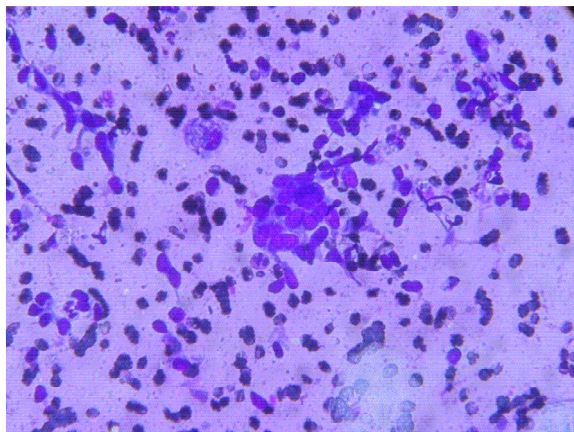
HASIL

Hasil induksi *benzoalphapyrene* dosis 20 mg/kg BB sebanyak 10 kali pemberian dengan pengamatan selama 3 minggu setelah pemberian *benzoalphapyrene* terakhir secara makroskopis terlihat nodul *palpable* pada kulit tikus dengan konsistensi elastis hingga keras padat. Secara mikroskopis berdasarkan analisis histopatologi 3 tikus terdiagnosis sebagai tumor ganas dengan tipe *non keratinizing squamous cell carcinoma*, 1 slide dengan diagnosis lesi atipik dan 1 slide dengan tumor jinak.

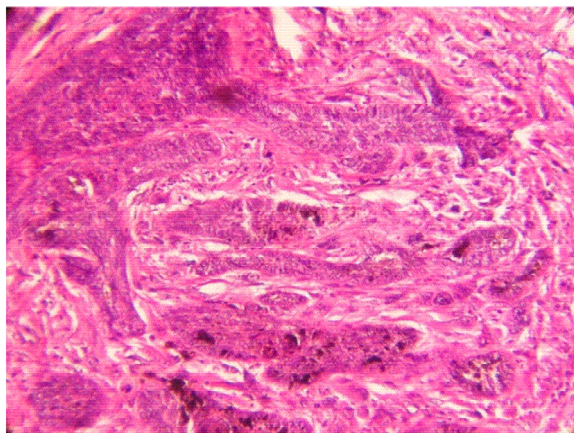
Munculnya nodul yang teramati secara makroskopis pertama kali terjadi pada tikus perlakuan pada minggu ke-2 setelah pemberian *benzoalphapyrene* yang terakhir. Jumlah nodul hanya satu yang timbul di tempat penyuntikan daerah punggung dengan diameter 52 mm.

Pemberian ekstrak etanol buah legundi pada kelompok perlakuan 2, 3 dan 4 menunjukkan pengecilan ukuran dari nodul sebesar 20-30mm bahkan pada 2 slide perlakuan 3 nodul menghilang.

Uji perbandingan dengan menggunakan uji sampel berpasangan didapatkan ada beda nyata antara K1 dan P1 dengan nilai $p=0,003$ dan K1 dan P2 dengan nilai $0,005$ sedangkan pada K1 dan P3 tidak ada beda nyata dengan nilai $p=0,391$. Perbandingan P1 dan P2 nilai $p=0,374$ sedangkan P2 dan P3 nilai $p=0,015$ berarti buah legundi dengan dosis 1 kg/BB lebih efektif dalam menurunkan ukuran tumor dan proliferasi sel tumor dibandingkan dosis 0,5 g/kgBB secara oral.



Gambar 1. Gambaran sitologi salah satu perlakuan dari kelompok K2 teridentifikasi sebagai malignansi.



Gambar 2. Gambaran histopatologi salah satu sampel dari kelompok K2 teridentifikasi sebagai karsinoma sel skuamosa non keratin

DISKUSI

Secara klinis tumor jinak menunjukkan perilaku yang tidak agresif tetapi akibat paparan sinar ultraviolet, agen fisika dan kimia, virus, merokok, serta genetika (riwayat keluarga) dapat merubah susunan dan struktur sel-selnya.² Pada kelompok tikus kontrol dengan pemberian *benzoalphapyrene* terlihat pada minggu ke-3 terjadi penurunan nafsu makan yang diikuti penurunan berat badan dan tikus tidak mampu bergerak. Hasil penelitian yang dilakukan Abdul Mun'in menggunakan Dimetilbenz(a) Antrasen (DMBA), umumnya rata-rata berat badan kelompok perlakuan dengan pemberian sari buah merah lebih rendah dari kelompok kontrol DMBA serta mulai terjadi penurunan pada sekitar minggu ke-9.⁸

Berdasarkan hasil pemeriksaan pada slide yang mengalami perubahan keganasan jaringan pada nodul yang muncul pada minggu ke-2 terlihat jaringan epidermis mengalami *hyperkeratosis* dan proliferasi sel pelapis kulit (skuamosa) yang menembus sampai ke lapisan dermis. Sel-sel mengalami proses keganasan dapat dilihat dari inti sel membesar yang didiagnosis sebagai karsinoma sel skuamosa.^{2,10} Karsinoma ini diakibatkan oleh mutasi pada gen p53, dimana fungsi gen p53 ini dalam keadaan normal adalah untuk mencegah perbanyakan sel yang secara genetik sudah rusak. Bila DNA sel dirusak oleh sinar ultraviolet, transkripsi p53 yang normal akan diperbanyak dan selanjutnya menghasilkan transkripsi beberapa gen abnormal yang menyebabkan penghentian siklus sel dari fase G1 menuju S serta perbaikan DNA. Jika selama penghentian siklus sel dapat dilakukan perbaikan DNA, sel tersebut diperbolehkan untuk melanjutkan perkembangannya ke fase S. Jika kerusakan DNA

tidak dapat diperbaiki akan menimbulkan apoptosis. Dengan terjadinya kehilangan p53, kerusakan DNA terus menerus tidak dapat diperbaiki, sehingga sel yang membawa gen mutan akan terus membelah, makin lama kerusakan sel menjadi makin parah dan akhirnya mengakibatkan kanker.²

Kemungkinan besar proses keganasan ini disebabkan oleh karena induksi *Benzoalphapyrene*. Zat ini dapat dijumpai di lingkungan sebagai hasil pirolisis lemak atau sebagai hasil proses pembakaran yang tidak sempurna, seperti pada daging panggang, sate, makanan diasap, asap rokok dan asap kendaraan bermotor. Sebagai senyawa karsinogen, *benzoalphapyrene* dapat menyebabkan mutasi gen yang dimanifestasikan sebagai kerusakan kromosom, yaitu terjadi abrasi atau terbentuk patahan-patahan kromosom.¹¹

Secara *in vivo*, *benzoalphapyrene* telah terbukti dapat menyebabkan tumor pada setiap percobaan, baik melalui jalur makanan, pernafasan, maupun kontak pada permukaan kulit. Inisiasi proses karsinogenik dari *benzoalphapyrene* bahkan dapat terjadi pada bagian jaringan yang jauh dari titik asal paparannya.¹¹

Hasil penelitian menggunakan ekstrak buah legundi terlihat perbaikan sel yang ditunjukkan dengan pengecilan ukuran dari nodul sebesar 20-30mm bahkan pada 2 slide perlakuan 3 nodul menghilang. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang disimpulkan oleh Li *et al.* (2005),⁸ dengan cara mengisolasi enam flavonoid yang diisolasi dari *V. trifolia* yaitu persikogenin, artemetin, luteolin, penduletin, viteksikarpin dan krisosplenol-D, yang selanjutnya di uji terhadap proliferasi sel kanker tsFT210 tikus. Keenam flavonoid tersebut mampu menghambat

proliferasi sel kanker, dengan mekanisme penghambatan siklus sel dan menginduksi apoptosis.⁸

SIMPULAN

Ekstrak etanol buah legundi (*Vitex trifolia*) dengan dosis 0,5 g dan 1 gr/kg BB yang diberikan bersamaan dengan induksi *benzoalphapyrene* maupun setelah timbul massa tumor mampu menghambat pertumbuhan dan pembelahan sel tumor.

Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan berbagai dosis untuk mendapatkan dosis efektif buah legundi yang berkhasiat sebagai penghambat pertumbuhan dan pembelahan sel tumor kulit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diberikan kepada Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia yang telah memberikan hibah penelitian dosen pemula pendanaan tahun 2016.

DAFTAR PUSTAKA

1. Buljan, M., Bulana, V, Stanic, S. Variation in Clinical Presentation of Basal Cell Carcinoma. *University Department of Dermatology and Venereology Zagreb Croatia*. 2008; 25-30.
2. Kumar, V., Cotran S. R., Robbins L. St. *Robbins Basic Pathology*. 8th Edition. W.B Saunders Company. Philadelphia. Pennsylvania. 2007; 307: 1244-46.
3. Nair, A.G.R., Ramesh, P. and Subramanian, S. Two unusual flavones (artemetin and 7-desmethyl artemetin) from the leaves of *V. trifolia*., *Curr. Sci.*, 1975; 44 (7) : 214–216.
4. Vedantham, T.N.C. and Subramanian, S.S. Non-flavonoid components of *V. trifolia*., *Indian J. Pharmacol.*, 1976; 38 (1) : 13.

5. Ramesh, P., Nair, A.G.R. and Subramanian, S.S. Flavone glycosides of *V. trifolia*. *Fitoterapia*, LVII 4, 1986; pp. 282–283.
6. Zeng, X., Fang, Z., Wu, Y., Zhang, H. Chemical constituents of the fruits of *V. trifolia*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.*, 1996; 21(3):167-168, 191.
7. Hernández, M.M., Heraso, C., Villarreal, M.L., Vargas-Arispuro, Aranda, E., 1999, Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae), *J. of Ethnopharmacol.*, 67 : 37–44.
8. Li, W.X., Cui, C.B., Cai, B., Yao, X.S. Labdane-type diterpenes as new cell cycle inhibitors and apoptosis inducers from *V. trifolia*, *J Asian Nat Prod Res.*, 2005; 7(2) : 95-105.
9. Mustanir dan Rosnani. 2008. Isolasi Senyawa Bioaktif Penolak (Repellent) Nyamuk Dari Ekstrak Aseton Batang Tumbuhan Legundi (*Vitex trifolia*). *Bul. Littro*. Vol. XIX No. 2 : 174-180.
10. Junqueira, LC & Carneiro, J. *Basic Histology Text and Atlas* (10th ed.). United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc. 2007. Hal:372-378.
11. Mahardini, T., Renawati., Yulistia, A, Parameter *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)* dalam Standarisasi Produk Pangan. Balai Besar Industri Agro Deprin, Bogor.