

Pengaruh Ekstrak Cincau Hijau *Cyclea barbata* L. Miers Terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase Dan Katalase Pada Mencit C3H Bertumor Kelenjar Susu

Sri Yadihal Chalid

Program Studi Kimia FST UIN Syarif Hidayatullah Jakarta

sriyadihal@yahoo.com

Abstrak

Telah dilakukan penelitian tentang pengaruh ekstrak daun cincau hijau terhadap aktivitas enzim antioksidan superoksida dismutase dan katalase pada mencit bertumor *mammary*. Makhluk hidup yang mengalami gangguan kesehatan penderita kanker dapat mengalami stress oksidatif dan gangguan system imun pada waktu yang bersamaan yang dapat memperburuk kondisi tubuh penderita. Untuk memperbaiki kondisi tubuhnya, penderita kanker memerlukan sumber makanan dan minuman sehat dan bergizi seperti minuman cincau. Penelitian ini menggunakan 20 ekor mencit C3H yang dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan dengan 5 kali ulangan. KP adalah kelompok mencit kontrol yang diberi pakan standar yang tidak mengandung ekstrak daun cincau dan tidak ditransplantasi tumor kelenjar susu. KN adalah kelompok mencit *control negative* yang diberi pakan standar yang tidak mengandung ekstrak daun cincau, CB adalah kelompok mencit yang diberi pakan ekstrak *Cyclea barbata* L. Miers bubuk sebanyak 1,21%, dan CS adalah kelompok mencit yang diberi minum seduhan ekstrak *Cyclea barbata* L. Miers sebanyak 7,30 mg/ml *ad-libitum* dan pakan standar. Setelah pemberian pakan selama 30 hari maka mencit KN, CB dan CS ditransplantasi dengan suspensi tumor kelenjar susu sebanyak 0,2 ml ($\pm 10^6$ sel hidup) dan pemberian pakan dilanjutkan kembali selama 27 hari setelah transplantasi. Masa laten diukur dengan cara perabaan, berat badan ditimbang dan volume tumor dengan menggunakan alat Kaliper untuk mengukur panjang, lebar dan tinggi tumor. Pada hari ke-57 semua mencit dimatikan untuk mengambil hati. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim SOD, katalase serta daya hambat ekstrak daun cincau terhadap pertumbuhan tumor kelenjar susu dan kemampuannya dalam meningkatkan aktivitas enzim antioksidan. Secara statistik, pemberian ekstrak daun cincau hijau tidak meningkatkan berat badan mencit sebelum ataupun sesudah transplantasi tumor. Masa laten tumor rata-rata 3,2 hari. Volume tumor kelompok CB kecil dari CS dan lebih rendah dibandingkan dengan KN. Aktivitas enzim SOD tidak berbeda nyata sedangkan aktivitas katalase menunjukkan perbedaan yang nyata antara kelompok mencit perlakuan dibandingkan dengan kelompok KP dan KN.

Kata kunci : aktivitas SOD, katalase, tumor kelenjar susu , transplantasi, ekstrak cincau hijau, mencit C3H.

Abstract

A research had been carried out toward the activity of antioxidant enzyme on liver of C3H mice which were transplanted with cell tumor mammary. Twenty C3H mice divided to four groups with five repeater and. KN and KP are mice as negative and positive control. CB group were administrated powder of green leaves cincau (1,21%)(g/g) and the water extract of green leaves cincau were given to CS group 7,30 mg/ml *ad-libitum* for 4 weeks. The mice were then transplanted with 0,2 ml ($\pm 10^6$ cells) tumor mammary. Tumor latent period were measured by hand and growth of tumor were exammed two times a week. The activity of antioxidant enzyme on liver, Superoxide dismutase (SOD) and Catalase were determined by spectrometric. The result showed that the extract of green leaves cincau did not influence tumor latent period (2,3 days) but decrease tumor size, Tumor growth significantly lower liver SOD activity. The activity of Catalase demonstrated improvement in antioxidant status in tumor bearing mice.

Key note: green cincau, SOD, Catalase, mammary tumor, C3H mice

1. PENDAHULUAN

Kanker merupakan pertumbuhan sel yang disebabkan oleh karsinogen dan secara genetik telah mengalami perubahan permanen melalui proses karsinogenesis. Karsinogenesis terjadi melalui tahap-tahap yang kompleks yaitu: inisiasi, promosi dan progresif. Sumber karsinogen dapat berupa xenobiotik melalui makanan, kelebihan paparan sinar UV, hormon dan mikroorganisme seperti virus dan parasit (Cerutti *at al.* 1994; Lippton 1994)

Di Amerika dan Eropa penyakit kanker payudara merupakan penyebab utama kematian pada wanita usia antara 30-45 tahun, sedangkan di Indonesia kanker payudara merupakan kasus kanker kedua tertinggi setelah kanker leher rahim (Depkes RI 1996, Ensminger *at al.* 1998).

Peningkatan jumlah radikal bebas pada penderita kanker disebabkan oleh inflamasi kronik, aktivitas sel kanker sendiri, kemoterapi serta penyinaran selama pengobatan. Perlukah antioksidan diberikan kepada penderita kanker?. Menurut hasil penelitian, pemberian antioksidan seperti vitamin C, beta karoten dan vitamin E dosis tinggi pada penderita melanoma yang sedang menjalani kemoterapi dapat menekan pertumbuhan sel kanker sebanyak 50% tanpa mempengaruhi sel normal. Isoflavon bekerja secara sinergis dengan tamoxifen, cisplatin dan adriamisin dan bersifat *anti-angiogenesis* serta mempertinggi *apoptosis* sel kanker (Lam 2002).

Beberapa produk pangan telah dikembangkan untuk tujuan ini, diantaranya minuman daun teh hijau dan susu kedele. Kedua produk ini terbukti mengandung senyawa antioksidan : polifenol, klorofil dan isoflavon, namun jenis dan ragamnya masih terbatas. Salah satu tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai produk pangan yang kaya antioksidan dan dapat memperbaiki kondisi penderita kanker adalah cincau hijau *Cyclea barbata* L. Mier. Penelitian tentang kemampuan ekstrak cincau hijau meningkatkan aktivitas enzim antioksidan perlu dikembangkan.

Tanaman cincau hijau merupakan tanaman asli Asia Tenggara yang hidup merambat atau melilit. Di Indonesia cincau hijau banyak ditemukan di semak belukar dan pinggiran hutan di daerah Jawa, Sumatra dan Sulawesi. Tumbuh baik dan rimbun bila tidak kekurangan air.

Kandungan senyawa kimia daun cincau hijau adalah sebagai berikut :

Tabel 1. komposisi kimia daun cincau hijau

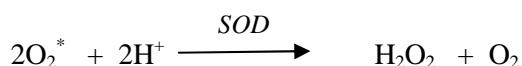
| No | Jenis senyawa | Kadar (dlm %) |
|----|---------------|---------------|
| 1 | air | 66,3 – 74,5 |
| 2 | protein | 2,4 – 2,7 |
| 3 | karbohidrat | 8,4 – 8,9 |
| 4 | Serat kasar | 6,2 – 6,7 |
| 5 | lemak | 0,4 – 0,5 |

*Syamsuhidayat dan Hutapea 1991

Berdasarkan penelitian Heyne (1987), tanaman cincau hijau mengandung senyawa kimia seperti : alkaloid, saponin, flavonoid, klorofil dan karotenoid. Penelitian Heyne ini diperkuat oleh penelitian Zakaria dan Prangdimurti (2000) yang mendapatkan bahwa tanaman cincau hijau *Cyclea barbata* L. Miers mengandung alkaloid 0,98% dan total fenol 2,21%. Guinoudeau 1992 dalam Zakaria (2000) menyebutkan bahwa alkaloid bisbenzylisoquinoline dari akar cincau hijau mempunyai aktifitas sitotoksik, sangat potensial sebagai kemoprotektif serta bersifat sebagai antioksidan yaitu mampu menghambat peroksida lipid secara nonenzimatik. Ekstrak daun cincau hijau mempunyai efek sitotoksik terhadap sel kanker K-562 (*chronic mylogenous leukemia*) antara 61-95% dan kanker servik *hela* 31% secara *in-vitro*.

Superoksida dismutase (SOD)

SOD mengkatalis dismutasi radikal anion superoksida menjadi hidrogen peroksida



Aktivitas SOD dihambat oleh H_2O_2 maka dalam kerjanya SOD sangat membutuhkan katalase (Rice-Evan *et al.* 1991). SOD banyak ditemukan pada kelenjar adrenal, ginjal, darah, limfa, pankreas, hati, usus, ovarium, otak dan timus.

Katalase

Katalase mengkatalis reaksi pemecahan hidrogen peroksida menjadi senyawa oksigen dan air.



Pada manusia katalase banyak ditemukan dalam eritrosit, ginjal, limfe, pankreas, otak,

jantung, adiposa, kelenjar adrenal dan konsentrasi terbanyak terdapat pada hati (\pm 1.400 U/mg protein)

2. METODOLOGI PENELITIAN

Bahan

30 ekor mencit starin C3H sebagai mencit *resipien* berumur lebih kurang 2 bulan dengan berat badan 20 sampai 22 gram dan 5 ekor mencit C3H bertumor kelenjar susu (MMTV) sebagai mencit donor.

Pakan standar mengacu pada AIN 1976, daun cincau hijau jenis *Cyclea barbata* L Mier dan *Premna oblingofolia* Merr yang telah dikeringkan dengan *drum dyer*. Daun cincau ditambahkan ke dalam pakan mencit dan sebagian lagi diseduh menjadi minuman, diberikan secara *ad-libitum*. Jumlah yang ditambahkan ke dalam pakan masing-masing 1,21% (b/b) dan yang diseduh 7,30 mg/ml. Bahan kimia yang digunakan : eter, buffer posfat, alkohol 70%, MDA, glution, epinefrin, SOD 3000 Unit, NADPH, Glutation reduktase 100 Unit, DTNB, TCA, H₂O₂, asam asetat glasial.

Alat

Blender, *drum dyer*, oven, spektrofotometer UV-Vis, *sentrifuse* dingin, mikropipet, jarum trokar, gunting dan alat-alat lab dari kaca seperti tabung reaksi dan erlemeyer.

Pembuatan ekstrak daun cincau hijau

Daun cincau hijau segar dari daerah Ciawi Bogor dibersihkan dan dicuci, diblender kemudian dikeringkan dengan *drum drayer* pada suhu tinggi dan waktu 5 detik

Daun cincau seduh dibuat dengan cara mengeringkan cincau hijau dengan oven suhu 40°C sampai kering. Hasil kering diblender kering. Untuk cincau seduh diberikan kepada mencit dengan cara menyeduh dengan air panas

Persiapan pakan

Persiapan pakan standar AIN 1976 dan pakan yang mengandung ekstrak daun cincau hijau. Sebanyak 30 ekor mencit dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan dengan 5 kali ulangan yaitu :

- Kelompok kontrol (KP) diberi pakan standar dan tidak ditransplantasi tumor
- Kelompok kontrol negatif (KN) diberi pakan standar dan ditransplantasi tumor
- 3. Kelompok CB diberi pakan standar yang ditambah dengan bubuk *Cyclea barbata* L Mier dan ditransplantasi tumor
- Kelompok CS diberi pakan standar yang ditambah bubuk *Cyclea barbata* L Mier dan ditransplantasi tumor secara *ad-libitum*

Adaptasi mencit dengan lingkungan percobaan dan pemberian pakan yang mengandung ekstrak daun cincau hijau. Mencit perlakuan dan kontrol diadaptasi selama satu bulan dengan kondisi sesuai AIN 1976

Transplantasi tumor *mammary*

Sebanyak 1ml (10⁶) sel tumor *mammary* dari mencit donor ditransplantasikan kepada mencit resipien KN, CB dan CS. Pemeliharaan mencit dilanjutkan selama satu bulan

Pengamatan masa laten dan pengukuran berat badan

Masa laten diukur dengan perabaan dan berat badan diukur dua kali dalam satu minggu

Pengambilan hati dan organ lain

Tepat satu bulan setelah transplantasi, semua mencit dimatikan dengan cara pembiusan dengan eter. Hati dan organ lainnya diambil dan ditimbang.

Penentuan aktivitas enzim antioksidan

Hati mencit dihancurkan dengan menggunakan alat blender pada putaran sedang selama 30 detik kemudian dilarutkan dalam larutan garam fisiologis dengan perbandingan 1: 2. Ekstrak larutan hati didinginkan, dalam kondisi dingin disentrifuse pada kecepatan 1000 rpm selama 15 menit. Filtrat diuji aktivitas SOD dan Katalase.

Penentuan Aktivitas Enzim Antioksidan

SOD (Misra dan Fridovich 1972)

Prinsip metoda ini berdasarkan kemampuan SOD menghambat autooksidasi epinefrin menjadi adenokrom. Warna coklat adenokrom diukur secara spektrofotometer pada panjang gelombang 480 nm.

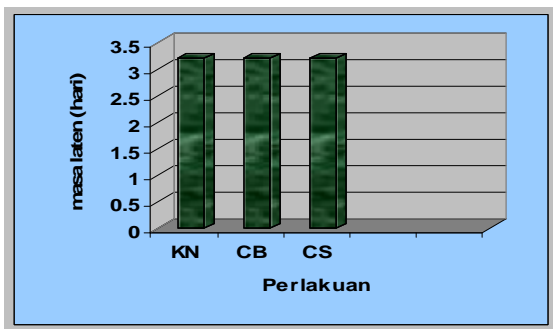
Katalase (Sinha 1978)

Metoda Sinha menggunakan zat warna sebagai indikator. Ion bikromat dari $K_2Cr_2O_7$ dalam suasana asam asetat glasial direduksi oleh H_2O_2 menjadi kromat yang berwarna hijau kekuningan pada panjang gelombang 570 nm. 1 unit aktivitas katalase dinyatakan sebagai banyaknya H_2O_2 dalam mol.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Masa Laten Tumor

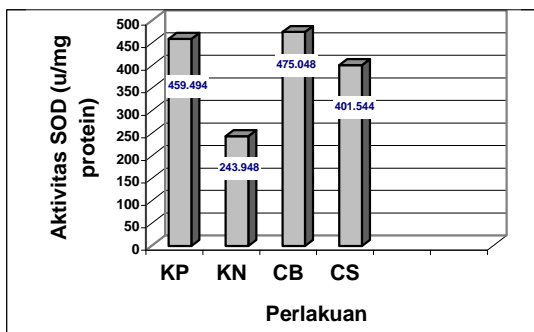
Masa laten mencit perlakuan 3 hari tidak berbeda dengan masa laten mencit kontrol negatif. Pemberian ekstrak daun cincau hijau tidak mempengaruhi masa latent tumor mammary pada mencit C3H



Gambar 1. Masa laten (hari) mencit C3H

Aktivitas SOD

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas SOD rata-rata kelompok CB, CS relatif lebih tinggi dibandingkan kontrol KN, walaupun secara statistik tidak berbeda nyata. Hal ini mungkin disebabkan oleh dosis antioksidan yang ditambahkan dalam pakan tidak efektif. Pertumbuhan kanker dapat ditekan oleh aktivitas MnSOD sehingga dihipotesiskan bahwa gen MnSOD adalah

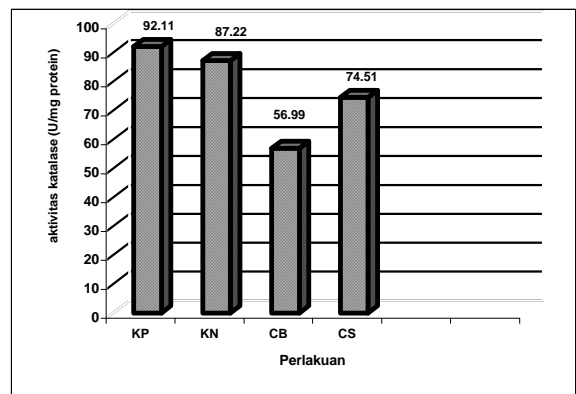


Gambar 2. Aktivitas SOD (U/mg protein) hati mencit C3H bertumor

tumour suppressor yang dapat menekan pertumbuhan *neoplasma embryonic fibroblast* yang diinduksi dengan radiasi (Oberley 2000). Pada penderita kanker diharapkan aktivitas SOD meningkat sehingga pertumbuhan kanker dapat ditekan. Menurut Juraga *et al.* (2000) dari 23 pasien kanker payudara ditemukan aktivitas CuSOD dan GSH-Px tinggi.

Katalase

Pemberian ekstrak daun cincau hijau menurunkan aktivitas katalase, hal ini analog dengan penelitian Juraga (2000) dimana aktivitas katalase pada penderita kanker payudara lebih rendah dibandingkan dengan wanita normal. Pada keadaan *stress oksidatif* jumlah katalase dan GSH-Px diturunkan oleh modifikasi ekspresi gen (Klauning 1998). Disamping itu aktivitas katalase yang rendah mungkin juga disebabkan oleh kandungan antioksidan alkaloid, karotenoid dan klorofil daun cincau. Senyawa ini dapat mengendalikan H_2O_2 dan radikal bebas lain dengan cara *quencher*.



Gambar 3. Aktivitas katalase (U/mg protein) hati mencit C3H bertumor

4. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Aktivitas SOD mencit perlakuan lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol walaupun secara statistik tidak berbeda nyata
2. Aktivitas katalase mencit perlakuan lebih rendah dibandingkan kontrol

3. Masa laten masing-masing perlakuan berkisar antara 2-3 hari dan tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif.

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut mencari dosis efektif cincau hijau dan sebaiknya senyawa antioksidan yang ditambahkan ke dalam pakan adalah hasil isolasi. Karena banyak kasus kanker disebabkan oleh karsinogen disarankan juga untuk melakukan penelitian tentang efektifitas ekstrak daun cincau dalam mencegah kanker secara *in-vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cerutti P, Ghosh R, Oya Y, and Amstad P. 1994. *The Role of the Cellular Antioxidant Defense in Oxidant Carcinogenesis*. Environmental Health Perspective. vol. 102. no. 10.
2. Heyne K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia II*, Badan Litbang Dep. Kehutanan.
3. Halliwell B, Gutteridge JMC, and Cross CE. 1992. *Free Radical, Antioxidants and Human Disease: Where are we now*. J. Lab. Clin. Med. 119 : 598-613.
4. Halliwell B, and Gutteridge JMC. 1999. *Free Radical in Biology and Medicine*. Oxford University Press. Ed 3. hlm 105-220
5. Hodgson E. and Levi PE. 2000. *Modern Toxicology*. Mc Graw Hill. Singapore. hlm 171-180.
6. Jaruga. 2000. *Antioxidant enzymes in Cancer*, (Oulu University Library).
7. Kris-Ethon PM, and Keen CL. 2002. *Evidence that the Antioxidant Flavonoids in Tea and Cocoa are Beneficial for Cardiovascular Health*. Davis, California. USA.
8. Lam. M. 2002. *Cancer and Antioxidants*. www.LamMD.com.
9. Lipton AL. et al. 1994. Letrozol: A Phase I Study of a New Potent Oral Aromatase Inhibitor of Breast Cancer. J. Cancer. Vol. 75. no. 8: 2132-2136.
10. Oberley. L. 2001. Free Radicals Biology: A Molecular Approach Suppressing cancer Cell Growth. UI Healty Care. Vol. 2. no.3.
11. Rice-Evans CA, Diplock AT, Symons MCR. 1991. *Technique in Free Radical Research*. Elsevier Amsterdam, London, Tokyo
12. Sunanto H. 1995. *Budidaya Cincau*. Yogyakarta. Penerbit Kanisius. 45 hlm
13. Syamsulhidayat SS, Hutapea JR. 1991. *Investaris Tanaman Obat Indonesia*. Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Departemen Kesehatan RI. Jakarta.
14. Tjarta A. Neoplasma. 1990. Di dalam: Himawan S, editor. *Patologi. Bagian Patologi Anatomi*. FK. UI. Jakarta. hlm 65- 84
15. Zakaria FR. 1996. *Sintesis Senyawa Radikal dan Elektrofil Dalam dan Oleh Komponen Pangan : Reaksi Biomolekuler, dampak Terhadap Kesehatan dan Penangkalannya*. Prosiding Seminar. Pusat Studi Pangan dan Gizi- IPB dan Kedutaan Besar Perancis. Jakarta. Bogor.