



Pengaruh Ekstrak Lengkuas Merah (*Alpinia Galanga*) Dosis Bertingkat Terhadap Ekspresi *Caspase 3* dan Grading Kanker Payudara Mencit C3H

Vega Karlowee *, Tjahjono *, Noor Wijayahadi **

ABSTRACT

Effect of oral administered graded doses of alpinia galanga on the caspase 3 expression and histopathological grading of breast cancer in C3H mice

Background: 1'-Acetoxychavicol Acetate (ACA), in *Alpinia galanga*, known to have pro apoptotic and anticancer effects. The pro apoptotic effect is by elevating caspase 8 and 9 activity. ACA causes the cycle cell stops at G0/G1 phase. The aim of this study is to prove the effect on caspase 3 and histopathological grading of breast cancer.

Method: It was an laboratory experimental with post test only control group design. Four groups of C3H mice, aged 2-3 months, had breast cancer inoculation. After the tumor mass were palpabled, K received no extract, P1, P2, P3 received *Alpinia galanga* extract at dose levels of 225, 450, 750 mg/kgBW/day, for 2 weeks. Immunohistochemistry examination of caspase 3 expression was scored with Allred criteria and cancer grading was scored with modified Scarff-Bloom-Richardson (MSBR) criteria. All data were analyzed by Kruskal-Wallis test, with level of significant $\alpha < 0.05$.

Result: At P1, P2, P3 there were 1, 5, 7 mice dead in each group before termination, while in K all were survived. Pro protocol analysis showed no significance difference on caspase 3 expression ($p=0.137$) and grading score ($p=0.399$) between groups. Intention to treat analysis showed significance differences on caspase 3 expression between P1 with K ($p=0.033$) and P3 ($p=0.005$), and significance difference on grading score between P3 with K ($p=0.002$) and P1 ($p=0.004$). Histopathology examination showed damages on liver and kidney, especially in P3, which might be the mice's cause of death.

Conclusion: Caspase 3 expression is the highest at dose level of 225 mg/kgBW/day. Grading score is the lowest at dose level of 750 mg/kgBW/day.

Key words: *Alpinia galanga*, caspase 3 expression, breast cancer grading

ABSTRAK

Latar belakang: Senyawa 1'-Acetoxychavicol Acetate (ACA) dalam *Alpinia galanga* memiliki efek proapoptosis dan antikanker. Efek proapoptosis melalui aktivasi caspase 8 dan 9. ACA menyebabkan terhentinya siklus sel fase G0/G1. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan adanya efek terhadap caspase 3 dan grading kanker payudara.

Metode: Jenis penelitian eksperimental dengan desain post test only control group. Mencit C3H usia 2-3 bulan dibagi 4 kelompok, diinokulasi kanker payudara. Setelah tumbuh massa tumor, kontrol (K) tidak diberi perlakuan dan P1, P2, P3 diberi ekstrak *Alpinia galanga* dosis 225, 450, 750 mg/kgBB/hari selama 2 minggu. Penilaian ekspresi caspase 3 berdasarkan kriteria Allred dan grading kanker berdasarkan kriteria modified Scarff-Bloom-Richardson (MSBR). Dilakukan uji beda Kruskal-Wallis dengan tingkat kemaknaan $\alpha < 0,05$.

Hasil: Pada P1, P2, P3, didapatkan kematian mencit sebanyak 1, 5, dan 7 ekor, sedangkan K tidak ada. Dalam pro protocol analysis, tidak ada perbedaan bermakna ekspresi caspase 3 ($p=0,137$) maupun grading kanker ($p=0,399$) antar kelompok. Pada intention to treat analysis ekspresi caspase 3, ada perbedaan bermakna antara P1 dengan K ($p=0,033$) dan P3 ($p=0,005$). Pada grading kanker payudara, ada perbedaan bermakna antara P3 dengan K ($p=0,002$) dan P1 ($p=0,004$). Pada histopatologis organ, ditemukan kerusakan hati dan ginjal, terutama pada P3, yang kemungkinan mengakibatkan kematian mencit.

Kesimpulan: Skor ekspresi caspase 3 kanker payudara tertinggi didapatkan pada dosis 225 mg/kgBB/hari. Skor grading kanker payudara terendah didapatkan pada dosis 750 mg/kgBB/hari.

* Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Jl Dr. Sutomo 18, Semarang

** Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Jl. Dr. Sutomo 18, Semarang

PENDAHULUAN

Selaras dengan perkembangan pengetahuan mengenai mekanisme biomolekuler apoptosis, mulai dikembangkan pula terapi antikanker dengan target spesifik agen proapoptotik maupun antiapoptotik untuk mendukung terapi konvensional kanker yang telah ada.¹⁻⁴ Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker yang menempati urutan kedua terbanyak setelah kanker serviks di Jawa Tengah dan Indonesia.⁵ Kasus terbanyak kanker payudara di Jawa Tengah ditemukan di Semarang.⁵⁻⁶

Lengkuas merah (*Alpinia galanga*) merupakan salah satu jenis tanaman obat tradisional Indonesia. Akar rimpang tanaman ini telah diketahui mengandung senyawa 1'-Acetoxychavicol Acetate (ACA).^{7,8} Pemberian ACA diketahui menghambat proliferasi lesi preneoplastik kolon dan hepar pada hewan coba tikus.^{9,10} Penelitian *in vitro* ACA pada sel mieloma multipel, menunjukkan peningkatan aktivasi *caspase* 8 dan 9, penghambatan aktivasi *nuclear factor- κ B* (NF κ B), serta peningkatan ekspresi Fas dan apoptosis.¹⁰ Penelitian lain terhadap sel leukemia mieloid, menunjukkan efek induksi *caspase* 3, 8, 9, *cytochrome c* (cyt c) dan *second mitochondria-derived activator of caspases* (Smac)/DIABLO (*direct IAP-binding protein with low pI*), translokasi Bax, dan ekspresi Fas dan FasL secara *in vitro*.¹¹ Penelitian Rusmarilin pada hewan coba mencit menunjukkan bahwa ekstrak *Alpinia galanga* dosis 50 dan 750 mg/kgBB menghasilkan skor derajat histopatologis yang paling rendah dan dosis 50 mg/kgBB memberikan pengaruh paling baik dalam menghambat pertumbuhan jaringan kanker payudara.⁹

Penelitian efek ekstrak *Alpinia galanga* terhadap kanker payudara mencit telah dilakukan, tetapi belum dihubungkan dengan mekanisme antikanker secara biomolekuler. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis mekanisme proapoptotik senyawa ACA ekstrak *Alpinia galanga* melalui ekspresi *caspase* 3 pada kanker payudara. *Caspase* 3 merupakan salah satu agen proapoptotik yang berperan sebagai *caspase* efektor utama (eksekutor) dalam mekanisme apoptosis, serta mempengaruhi aktivasi *caspase* efektor lain, yaitu *caspase* 6 dan 7.¹² Peningkatan ekspresi *caspase* 3 mengindikasikan potensi atau sensitivitas sel terhadap apoptosis pada kanker payudara.¹³ Penelitian lain mengemukakan bahwa gangguan *caspase* 3 mengakibatkan terjadinya tumorigenesis serta perkembangan kanker payudara.¹⁴ Penelitian ini menggunakan indikator *caspase* 3 untuk mengetahui efek proapoptosis *Alpinia galanga*.

Selain mempengaruhi mekanisme apoptosis, diperkirakan ACA juga mempengaruhi proliferasi sel karena menyebabkan siklus sel terhenti pada fase G (*Gap*) 0/G (*Gap*) 1.¹¹ Hal ini dapat mengakibatkan penurunan

jumlah sel yang memasuki fase mitosis dalam siklus sel. Penurunan jumlah mitosis yang terjadi ini dapat dianalisis secara histopatologis.

Dalam penelitian Rusmarilin, masih terdapat kerancuan mengenai dosis optimal untuk menghasilkan gambaran mikroskopis dengan skor terbaik karena dosis ekstrak terkecil dan terbesar menunjukkan hasil skor yang sama.⁹ Pada penelitian ini juga akan dilakukan pemberian dosis bertingkat, dengan acuan dosis menurut penelitian Rusmarilin untuk menemukan dosis optimal dalam rentang dosis aman ekstrak *Alpinia galanga* yang memberikan efek proapoptosis dan menurunkan proliferasi kanker.

METODE

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium, menggunakan desain *post test only control group*. Sampel penelitian sebanyak 29 ekor mencit C3H, diperoleh dari populasi mencit C3H di Laboratorium Penelitian Departemen Patologi Anatomi FK UI Jakarta. Ekstrak etil asetat *Alpinia galanga* merah diperoleh dari Laboratorium Pengujian Nutrisi Bahan Baku Obat UNDIP Semarang di Institusi Obat Alam Indonesia. Bahan ekstrak dibuat dalam bentuk suspensi dengan dosis 225, 450, 750 mg.

Setelah adaptasi, semua mencit diinokulasi dengan jaringan kanker payudara. Kemudian, setelah tumbuh massa tumor (\pm 1 minggu), salah satu mencit diterminasi dan massa tumor diperiksa secara histopatologi. Mencit yang tersisa dirandomisasi dan dibagi dalam 4 kelompok (setiap kelompok terdiri atas 7 mencit), dikandangkan dan diberi ransum pakan standar *ad libitum*. Kelompok kontrol (K) adalah mencit yang diinokulasi sel kanker payudara. Kelompok perlakuan 1 (P1), 2 (P2), dan 3 (P3) adalah mencit yang diinokulasi kanker payudara, dan setelah teraba massa tumor (\pm 1 minggu) tanpa memperhatikan ukuran massa, diberi ekstrak *Alpinia galanga* dengan dosis 225, 450, dan 750 mg/kgBB/hari selama 2 minggu.

Inokulasi tumor payudara berasal dari mencit donor dengan umur tumor 10-14 hari. Mencit donor diterminasi, dipilih bagian tumor yang terbesar dan tanpa ulserasi. Tumor dipindahkan ke cawan petri dan diberi larutan garam fisiologis, kemudian dipotong kecil ukuran \pm 2,5mm³ dan berat 8 mg dengan menggunakan pisau tajam. Potongan jaringan tumor diinokulasi menggunakan trokar pada subkutan regio aksila kanan. Sisa jaringan tumor kemudian dibuat sediaan histopatologi.

Setelah perlakuan selesai, seluruh mencit diterminasi. Jaringan kanker payudara, organ hati, ginjal, dan lambung diambil dan diproses menurut pedoman penanganan bahan pemeriksaan untuk histopatologi

IAP1¹⁵ dan dilakukan pengecatan rutin (HE) menurut *laboratory methods in histotechnology American Registry of Pathology*.¹⁶ Pada jaringan tumor juga dilakukan pengecatan imunohistokimia *caspase 3* (*Thermo Caspase 3 (CPP32) Ab-4 Rabbit Polyclonal Antibody Cat. #RB-1197-PO*) menurut *Lab Vision Corporation Immunohistology protocols*.¹⁷

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah hasil penghitungan skor ekspresi *caspase 3* dan skor *grading* kanker payudara mencit C3H sesudah diberi perlakuan. Penentuan skor ekspresi *caspase 3* dilakukan berdasarkan metode Allred¹⁸, yang melakukan penilaian terhadap proporsi jumlah sel yang positif tercat dan tingkat kekuatan positifitas tersebut (intensitas pewarnaan). Gambaran histopatologis kanker dinilai berdasarkan atas *grading* menurut metode *modified Scarff-Bloom-Richardson* (MSBR)¹⁹, yang berdasarkan atas jumlah mitosis dan pleomorfisitas inti. Penentuan ekspresi *caspase 3* dan *grading* kanker payudara dilakukan secara mikroskopis, dengan pembesaran 400x pada 10 lapangan pandang, untuk setiap mencit. Kemudian, dilakukan penghitungan rata-rata data pada setiap mencit, dan dilanjutkan dengan pengolahan secara statistik. Selain itu, juga dilakukan pengambilan data kerusakan pada organ hati, ginjal, dan lambung dengan penilaian skor *grading* kerusakan yang dibuat menurut skala likert berdasarkan atas patogenesis kerusakan organ akibat pemberian senyawa tertentu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian, sebagian mencit mati sebelum waktu terminasi. Hal ini menyebabkan jumlah sampel hewan coba dalam kelompok perlakuan yang ada sampai waktu terminasi tidak seragam, sehingga dilakukan 2 prinsip analisis data, yaitu *pro protocol analysis* dan *intention to treat analysis*.

Pengaruh Pemberian Ekstrak *Alpinia galanga* terhadap Ekspresi *Caspase 3* Kanker Payudara

Uji beda Kruskal-Wallis pada seluruh kelompok kontrol dan hewan coba dari kelompok perlakuan yang masih hidup sampai waktu terminasi (*pro protocol analysis*) menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok tersebut ($p=0,137$).

Hasil skor ekspresi *caspase 3* menurut Allred pada kanker payudara pada seluruh kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (*intention to treat analysis*) dapat dilihat pada Tabel 1.

Pada kelompok P2 terdapat 1 sampel hewan coba yang membusuk dan tidak dapat dianalisis. Uji Mann-Whitney menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok P1 dengan kelompok K dan P3.

Tabel 1. Median hasil penentuan skor ekspresi *caspase 3* kanker payudara pada seluruh mencit

Kelompok	Jumlah Sampel	Median
K	7	0,00
P1	7	1,60
P2	6	0,75
P3	7	0,00

* Perbedaan bermakna ($p=0,033$) dengan kelompok K

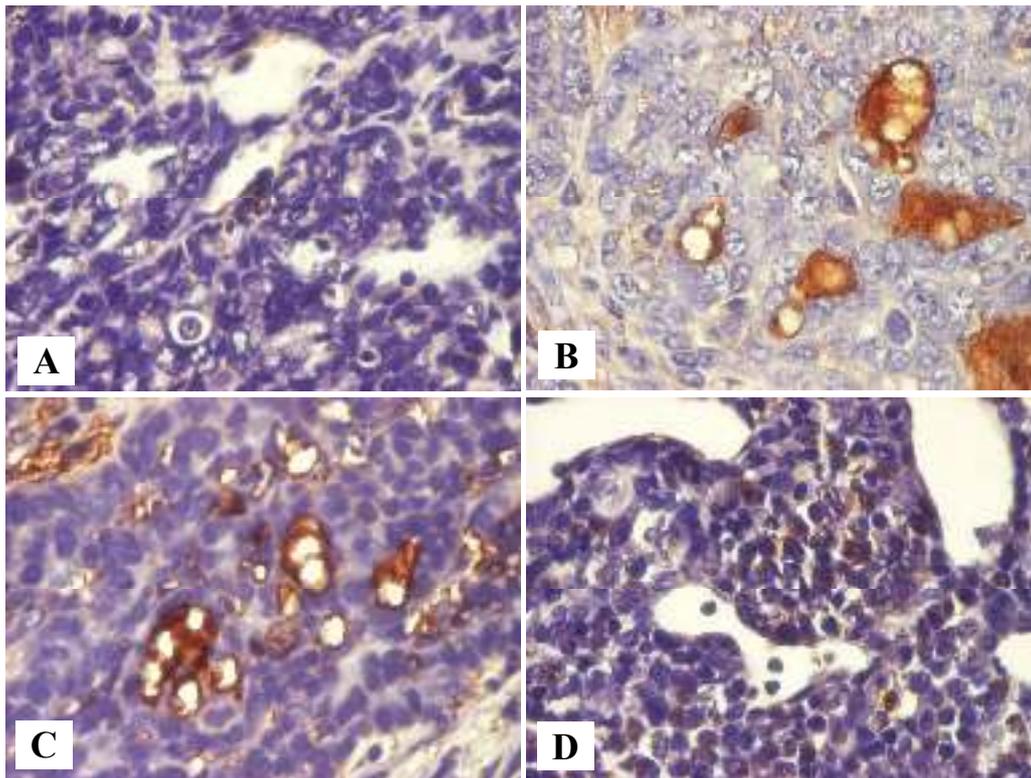
^ Perbedaan bermakna ($p=0,005$) dengan kelompok P3

Skor tertinggi ekspresi *caspase 3* didapatkan pada kelompok P1 dengan dosis ekstrak 225 mg/kgBB/hari. Skor ekspresi ini justru lebih rendah pada kelompok dengan dosis yang lebih besar. *Intention to treat analysis* menunjukkan bahwa pada kelompok P3, dengan dosis tertinggi 750 mg/kgBB/hari, justru memiliki median skor ekspresi *caspase 3* yang lebih kecil dibandingkan kelompok kontrol.

Uji beda pada *pro protocol analysis* menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antar kelompok. Uji beda pada *intention to treat analysis* menunjukkan ada perbedaan bermakna antara kelompok P1, dengan skor tertinggi, dengan kelompok kontrol dan P3. Skor ekspresi *caspase 3* tertinggi dicapai pada pemberian ekstrak *Alpinia galanga* dosis 225 mg/kgBB/hari, kemudian tampak semakin menurun dengan peningkatan dosis ekstrak. Jika hasil ini dimasukkan dalam grafik hubungan dosis dan efek, akan tampak bahwa efek meningkatkan ekspresi *caspase 3* pada dosis 225 mg/kgBB/hari, menjadi efek menurunkan dengan peningkatan dosis (dosis 450 dan 750 mg/kgBB/hari).

Adanya kendala perbedaan lama pemberian ekstrak pada kelompok perlakuan juga berperan dalam hasil ekspresi *caspase 3* kelompok P2 dan P3 yang lebih rendah dibandingkan kelompok P1. Waktu pemberian ekstrak pada hewan coba mencit kelompok P2 dan P3 lebih singkat dibandingkan pada kelompok P1. Hal ini disebabkan adanya kematian sebagian mencit pada kelompok P2 dan P3 sebelum waktu terminasi (Tabel 3). Penelitian ini masih belum dapat mengetahui apakah adanya efek penurunan ekspresi *caspase 3* pada dosis di atas 225 mg/kgBB/hari merupakan efek ekstrak yang sebenarnya atau karena adanya masalah waktu (lama) pemberian ekstrak yang masih kurang pada kelompok P2 dan P3.

Penelitian lebih lanjut, dengan keseragaman waktu, masih dibutuhkan untuk mengetahui efek ekstrak *Alpinia galanga* yang sebenarnya terhadap ekspresi *caspase 3*. Dosis ekstrak yang ditemukan dalam penelitian ini dapat menjadi acuan untuk menemukan dosis optimal ekstrak yang efektif untuk meningkatkan ekspresi *caspase 3*. Pencarian dosis yang tepat dibutuhkan agar didapatkan bentuk kurva log dosis dan intensitas yang



Gambar 1. Gambaran mikroskopis ekspresi caspase 3 kanker payudara. Pewarnaan caspase 3, pembesaran 600x.

A. Kelompok kontrol, menunjukkan ekspresi positif dengan skor intensitas 1 (lemah). B. Kelompok perlakuan 1 (dosis 225 mg/kgBB/hari), menunjukkan ekspresi positif dengan skor intensitas 3 (kuat). C. Kelompok perlakuan 2 (dosis 450 mg/kgBB/hari), menunjukkan ekspresi positif dengan skor intensitas 3 (kuat). D. Kelompok perlakuan 3 (dosis 750 mg/kgBB/hari), menunjukkan ekspresi positif dengan skor intensitas 2 (sedang).

berbentuk sigmoid, sehingga karakteristik farmakologi ekstrak *Alpinia galanga* dapat diketahui.

Penelitian ini menunjukkan hasil bahwa pemberian ekstrak *Alpinia galanga* (pada dosis 225 mg/kgBB/hari) dapat meningkatkan ekspresi caspase 3 secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol. Hasil penelitian ini dapat dikatakan mendukung penelitian-penelitian sebelumnya mengenai pemberian ekstrak *Alpinia galanga* untuk meningkatkan aktivasi caspase 3.

Foto sediaan mikroskopis kanker payudara sampel penelitian dengan pengecatan imunohistokimia caspase 3 dapat dilihat pada Gambar 1.

Pengaruh Pemberian Ekstrak *Alpinia galanga* terhadap Grading Kanker Payudara

Uji Kruskal-Wallis pada seluruh kelompok kontrol dan hewan coba dari kelompok perlakuan yang masih hidup sampai waktu terminasi (*pro protocol analysis*) menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok tersebut ($p=0,399$).

Hasil skor grading kanker payudara pada seluruh kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (*intention to treat analysis*) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Median hasil penentuan skor grading kanker payudara pada seluruh mencit

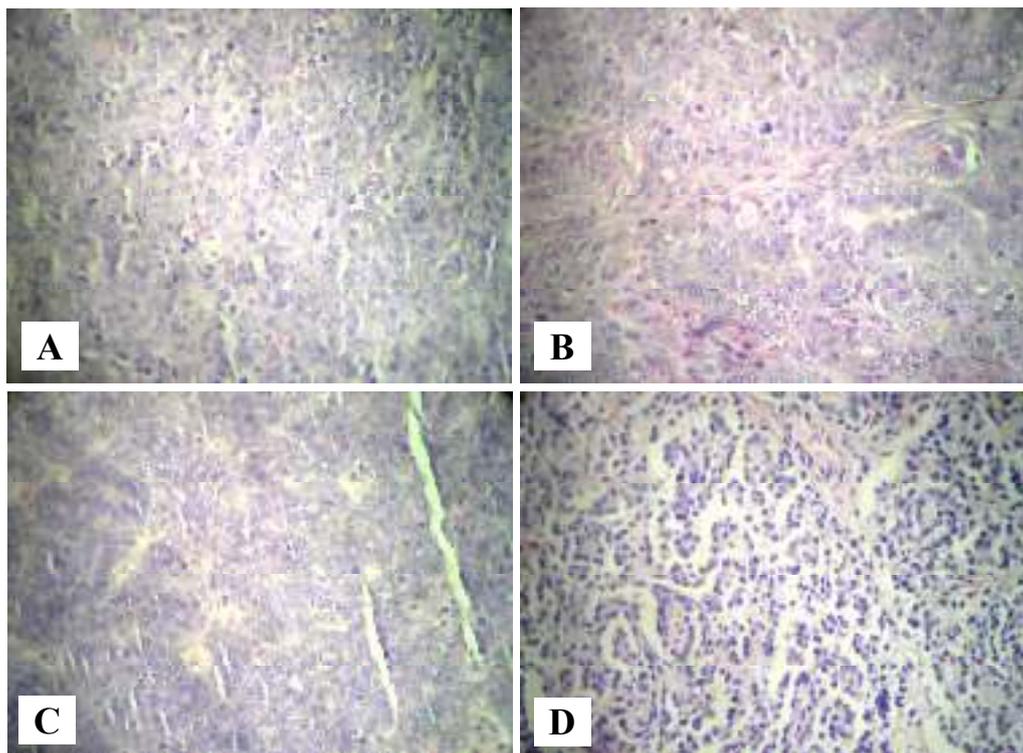
Kelompok	Jumlah Sampel	Median
K	7	2,30
P1	7	2,00
P2	6	2,10
P3	7	1,00

* Perbedaan bermakna ($p = 0,002$) dengan kelompok K

^ Perbedaan bermakna ($p = 0,004$) dengan kelompok P1

Uji Mann-Whitney menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok P3 dengan kelompok K dan P1.

Pada kelompok P1, sebagian besar mencit masih dapat bertahan hidup, tetapi dosis ini ternyata belum memberikan efek menurunkan grading kanker payudara. Pada kelompok P3, hewan coba tidak dapat bertahan hidup sampai saat terminasi, tetapi dosis ini ternyata paling efektif menurunkan grading kanker payudara dibandingkan dosis yang lain. Penurunan grading kanker juga disertai dengan adanya penurunan jumlah mitosis pada kanker payudara. Hasil ini juga mendukung dugaan adanya efek penghentian siklus sel kanker pada penelitian Ito dkk mengenai pemberian ACA, yang dapat meningkatkan jumlah sel pada fase G0/G1.



Gambar 2. Gambaran histopatologi grading kanker payudara. Pewarnaan HE, pembesaran 400x.

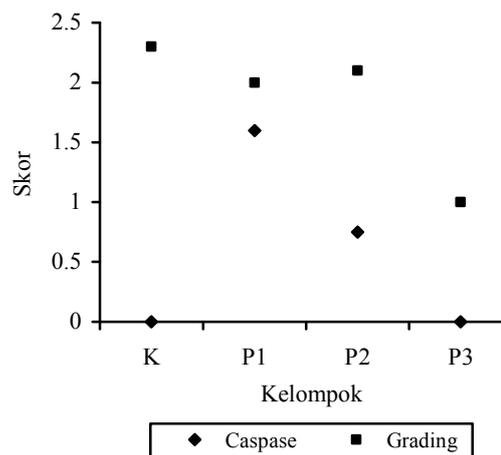
A. Kelompok kontrol, menunjukkan aktivitas mitosis ≥ 3 /LPB (skor mitosis 3), tampak nukleus agak pleomorfik, berukuran sedang, disertai nukleoli prominen (skor pleomorfisitas 2) (MSBR grup 4). B. Kelompok perlakuan 1 (dosis 225 mg/kgBB/hari), menunjukkan aktivitas mitosis ≥ 3 /LPB (skor mitosis 3), tampak nukleus agak pleomorfik, berukuran sedang, disertai nukleoli prominen (skor pleomorfisitas 2) (MSBR grup 4). C. Kelompok perlakuan 2 (dosis 450 mg/kgBB/hari), menunjukkan aktivitas mitosis 2/LPB (skor mitosis 2), tampak nukleus agak pleomorfik, berukuran sedang, disertai nukleoli prominen (skor pleomorfisitas 2) (MSBR grup 3). D. Kelompok perlakuan 3 (dosis 750 mg/kgBB/hari), menunjukkan tak tampak aktivitas mitosis (skor mitosis 1), tampak bentuk dan ukuran nukleus seragam, relatif kecil, dengan kromatin halus, tak tampak nukleoli prominen (skor pleomorfisitas 1) (MSBR grup 1).

Foto sediaan mikroskopis kanker payudara sampel penelitian dengan pengecatan rutin HE dapat dilihat pada Gambar 2.

Pengaruh Pemberian Ekstrak *Alpinia galanga* terhadap Perbandingan Ekspresi *Caspase 3* dan Grading Kanker Payudara

Berdasarkan atas hasil median skor pemeriksaan *caspase 3* dan *grading* kanker mamma, didapatkan hasil dalam bentuk grafik (Gambar 3).

Gambar 3 menunjukkan bahwa setelah dosis kelompok P1, terdapat penurunan grafik ekspresi *caspase 3*, sebagai *caspase* eksekutor apoptosis, dan grafik *grading* (jumlah mitosis), yang menunjukkan aktivitas proliferasi pada kanker mamma. Hal ini dapat disebabkan oleh kurangnya waktu pemberian ekstrak karena kematian hewan coba pada kelompok P2 dan P3. Penyebab lain yang mungkin terjadi berhubungan dengan dasar teori adanya aktivitas apoptosis bertujuan untuk menjaga keseimbangan dengan proliferasi sel yang terjadi.^{43,46} Efek ekstrak *Alpinia galanga* yang mengakibatkan penurunan aktivitas siklus sel kanker,



Gambar 3. Grafik median skor pemeriksaan *caspase 3* dan *grading* kanker payudara pada seluruh mencit.

yang tampak dari penurunan *grading* secara bermakna pada kelompok P2 dan P3. Hal ini menyebabkan ekspresi *caspase 3*, sebagai mekanisme penyeimbang proliferasi sel, menjadi menurun pada kedua kelompok tersebut. Kemungkinan lain adalah adanya pemberian

dosis tertentu di atas 225 mg/kgBB/hari memang memberikan menekan ekspresi *caspase 3*.

Hasil skor ekspresi *caspase 3* ini tidak sesuai dengan hipotesis penelitian karena referensi yang ditemukan penulis, terutama merujuk pada peningkatan aktivitas *caspase 3* oleh ACA dalam *Alpinia galanga*. Selain penelitian Rusmarilin, belum ada referensi penelitian yang menghubungkan antara aktivitas *caspase 3* dengan dosis ekstrak *Alpinia galanga* secara *in vivo*. Penelitian mengenai jenis efek yang lebih dominan (anti proliferasi atau pro apoptosis) pada pemberian ekstrak lengkuas maupun ACA juga belum ditemukan.

Gambaran Mikroskopis Organ pada Hewan Coba Mencit

Selain massa tumor, juga dilakukan pengambilan organ hati, ginjal, dan lambung untuk mengetahui penyebab kematian pada mencit.

Data hewan coba mencit yang mati dalam penelitian pada Tabel 3.

Tabel 3. Data hewan coba mencit yang mati

Kelompok	Setelah tumbuh massa tumor	Akhir minggu I perlakuan	Akhir minggu II perlakuan
K	0	0	0
P1	0	1	1
P2	0	3	5*^
P3	0	4	7*^

* Perbedaan bermakna ($p=0,007$) dengan kelompok K minggu II
 * Perbedaan bermakna ($p=0,000$) dengan kelompok K minggu II
 ^ Perbedaan bermakna ($p=0,037$) dengan kelompok P1 minggu II
 ^ Perbedaan bermakna ($p=0,002$) dengan kelompok P1 minggu II

Uji Mann-Whitney menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok P2 dan P3 dengan kelompok K dan P1. Uji korelasi Spearman, yang dilakukan untuk mengetahui adanya hubungan antara besarnya dosis dengan jumlah kematian pada minggu kedua, menunjukkan adanya korelasi yang bermakna, dengan nilai $p=0,000$ dan koefisien korelasi $=0,801$.

Adanya hubungan antara besar dosis dengan jumlah kematian, membuka kemungkinan mengenai adanya efek toksisitas ekstrak *Alpinia galanga*. Terjadinya toksisitas akibat suatu bahan memiliki *onset* waktu yang bervariasi. Penting pula untuk memperhatikan adanya perbedaan metabolisme pada suatu spesies, yang dapat mempengaruhi interpretasi gambaran histopatologis, terutama relevansinya pada manusia.²² Pada penelitian ini, gambaran histopatologis kelompok kontrol menjadi acuan dalam menentukan derajat kerusakan histopatologis pada kelompok perlakuan. Penentuan derajat kerusakan organ ditentukan berdasarkan atas patogenesis kerusakan organ akibat paparan bahan secara umum

karena belum ditemukan referensi mengenai kerusakan histopatologis yang spesifik akibat pemberian *Alpinia galanga*.

Pada sediaan hati hewan coba mencit kelompok kontrol, didapatkan gambaran batas sel yang tidak jelas, tetapi secara keseluruhan masih tampak dalam batas normal. Kerusakan hati hewan coba belum sampai pada tahap yang berat seperti steatosis mikrovesikuler atau makrovesikuler. Pada kelompok P1, tampak hepatosit agak membengkak disertai vakuolisasi pada sitoplasma yang mengelilingi inti yang terletak di tengah. Gambaran ini hanya ditemukan pada daerah tertentu dan keadaan yang sama juga didapatkan pada kelompok P2, tetapi pada daerah yang sedikit lebih luas. Pada kelompok P3, daerah yang mengalami kelainan tampak lebih luas dan difus, dibandingkan kedua kelompok perlakuan yang lain. Ekstrak dosis tertinggi 750 mg/kgBB/hari memberikan gambaran derajat kerusakan yang paling berat, padahal waktu pemberian ekstrak pada kelompok ini lebih singkat dibandingkan kelompok lain. Gambaran histopatologis *grading* kerusakan hati yang terjadi pada kelompok P3 masih berada pada derajat 3 dari 5 derajat kerusakan yang ditentukan. Uji Mann-Whitney derajat kerusakan hati menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok K dengan seluruh kelompok perlakuan, antara kelompok P3 dengan kelompok P1 dan P2, dan antara kelompok P2 dengan P1. Dengan box-plot, terdapat *dose-response relationship* antara dosis ekstrak dengan derajat kerusakan hati, yaitu terjadi peningkatan derajat kerusakan pada organ hati sesuai dengan peningkatan pemberian dosis ekstrak.

Gambaran mikroskopis ginjal kelompok kontrol dan P1 dalam batas normal. Pada ginjal hewan coba kelompok P2 dan P3, didapatkan gambaran yang hampir sama. Kelainan yang ditemukan terutama pada tubulus korteks, sementara struktur glomerulus dalam batas normal. Pada sel epitel tubulus didapatkan adanya pembengkakan sel dan pada bagian lain ada yang mengalami degenerasi albuminosa. Namun, pada kelompok P2, kelainan yang didapat lebih ringan dibandingkan kelompok P3. Kerusakan ginjal hewan coba belum sampai pada keadaan nekrosis tubular akut nefrotoksik. Ekstrak dosis tertinggi 750 mg/kgBB/hari menunjukkan gambaran derajat kerusakan ginjal yang paling berat, tetapi masih pada derajat 1-2 dari 4 derajat kerusakan yang ditentukan. Uji Mann-Whitney derajat kerusakan ginjal menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok K dan P1 dengan kelompok P2 dan P3, dan antara kelompok P3 dengan kelompok P2. Dengan box-plot, terdapat *dose-response relationship* antara dosis kelompok P2 dan P3 dengan derajat kerusakan ginjal, yaitu terjadi peningkatan derajat kerusakan ginjal antara dosis ekstrak kelompok P2 dibandingkan P3.

Pada sediaan lambung hewan coba, ditemukan erosi superfisial yang bersifat fokal pada beberapa mencit terutama pada kelompok P3. Namun, pada sebagian besar sediaan, termasuk dari kelompok kontrol, mukosa lambung masih tampak utuh. Hasil uji beda menunjukkan ada perbedaan bermakna derajat kerusakan lambung antara kelompok P3 dengan kelompok lain. Ekstrak dosis tertinggi 750 mg/kgBB/hari menunjukkan gambaran derajat kerusakan lambung yang paling berat, tetapi masih pada derajat 2 dari 4 derajat kerusakan yang ditentukan. Uji Mann-Whitney derajat kerusakan lambung menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok P3 dengan kelompok K, P1, dan P2. Dengan box-plot, terdapat *dose-response relationship* antara dosis kelompok P3 dengan terjadinya kerusakan pada lambung.

Didapatkan kesulitan untuk menentukan kelainan yang ditemukan dapat menimbulkan kematian pada hewan coba karena tidak dilakukan pemeriksaan fungsi dari organ-organ tersebut untuk memastikan adanya kegagalan fungsi organ, terutama pada hati dan ginjal. Gambaran histopatologi merupakan perangkat yang penting dalam mengidentifikasi adanya toksisitas pada organ, termasuk reversibilitasnya, tetapi juga harus didukung dengan adanya pemeriksaan lain, seperti evaluasi kimia darah, bioakumulasi, pembentukan metabolit reaktif, dan adanya reaksi imunitas.^{22,23} Adanya kematian dan kelainan pada organ hewan coba kelompok perlakuan, walaupun tidak pada derajat kerusakan yang paling berat, mengindikasikan perlunya pembuktian adanya efek toksisitas ekstrak *Alpinia galanga* dalam suatu penelitian tersendiri.

Suatu penelitian pemberian ekstrak *Alpinia galanga* secara oral pada mencit menunjukkan hasil LD50 61900 mg/kgBB dengan dosis lazim 1200 mg/kgBB mencit.²⁴ Berbeda dengan penelitian tersebut, Rusmarilin mendapatkan hasil LD50 ekstrak *Alpinia galanga* sebesar 764,33 mg/kgBB.⁹ Dalam hal dosis LD50, ternyata masih ditemukan ketidaksesuaian dari penelitian yang sudah ada. Selain mengenai dosis, penelitian lain mengenai efek *Alpinia galanga* ada yang juga menunjukkan hasil bertentangan dengan penelitian ini. Penelitian ekstrak *Alpinia galanga* pada tikus Sprague-Dawley yang diberi parasetamol, menunjukkan efek hepatoprotektif.²⁵ Penelitian pada tikus Wistar albino menunjukkan efek antiulkus ekstrak *Alpinia galanga* pada gaster.²⁶ Hasil-hasil penelitian tersebut tampak bertentangan dengan keadaan yang didapat pada penelitian ini, tetapi tidak ditemukannya laporan maupun dokumentasi mengenai efek samping, bukan merupakan jaminan pasti mengenai keamanan (*safety*) suatu obat herbal. Berbagai tes pemeriksaan adanya efek-efek toksisitas harus dilakukan sebelum penelitian berlanjut secara klinis pada manusia.²⁷

Dibandingkan penelitian-penelitian tersebut di atas, penelitian ini menggunakan hewan coba maupun media ekstraksi yang berbeda. Perlakuan dan *strain* mencit yang digunakan pada penelitian ini sesuai dengan penelitian Rusmarilin. Karena pada penelitian Rusmarilin tidak didapatkan kematian hewan coba, maka faktor pembeda dengan penelitian ini adalah asal *Alpinia galanga*. Hal ini berhubungan dengan perbedaan media tanah tempat tumbuh tanaman. Kandungan-kandungan zat di dalam tanah dapat terserap dan terakumulasi pada bagian-bagian tanaman, seperti akar, daun, sampai buah.^{28,29} Adanya perbedaan waktu dan tempat tanam dengan penelitian Rusmarilin, masih membuka kemungkinan adanya perbedaan jenis senyawa dan kadar ACA dalam *Alpinia galanga* pada penelitian ini. Perbedaan jenis senyawa yang terkandung dapat menjadi penyebab terjadinya kematian hewan coba. Hal ini sulit dipastikan karena peneliti tidak melakukan uji kadar ACA dan jenis senyawa yang terkandung dalam ekstrak *Alpinia galanga*. Secara keseluruhan, kepastian mengenai efek toksisitas ekstrak *Alpinia galanga* belum dapat diketahui melalui penelitian ini, sehingga masih perlu dilakukan penelitian-penelitian lebih lanjut.

Keterbatasan Penelitian

Dalam penelitian ini, tidak menggunakan ACA sebagai bahan aktif tunggal, sehingga bahan-bahan lain yang terkandung dalam ekstrak etil asetat *Alpinia galanga* dapat mengganggu efek yang diharapkan.

Kadar ACA dalam *Alpinia galanga* tidak diuji seperti dalam penelitian Rusmarilin, sehingga tidak diketahui apakah memiliki kadar yang sama dengan penelitian tersebut.

Waktu kematian hewan coba yang tidak bersamaan menyebabkan peneliti tidak dapat mengambil kesimpulan atas hasil uji beda skoring ekspresi *caspase 3* dan *grading* kanker payudara dengan keseragaman waktu.

SIMPULAN

Dalam penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa pada pemberian ekstrak lengkuas merah (*Alpinia galanga*) dosis bertingkat, skor ekspresi *caspase 3* kanker payudara mencit C3H kelompok perlakuan dosis 225 mg/kgBB/hari lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dosis 750 mg/kgBB/hari dan skor *grading* kanker payudara kelompok perlakuan dosis 750 mg/kgBB/hari lebih rendah secara bermakna dibandingkan dosis 225 mg/kgBB/hari.

Skor ekspresi *caspase 3* kanker payudara mencit C3H pada kelompok perlakuan ekstrak lengkuas merah (*Alpinia galanga*) dosis 225 mg/kgBB/hari lebih tinggi

secara bermakna dibandingkan kelompok yang tidak diberi dan skor *grading* kanker payudara kelompok perlakuan) dosis 750 mg/kgBB/hari lebih rendah secara bermakna dibandingkan kelompok yang tidak diberi.

SARAN

Penelitian mengenai dosis ekstrak *Alpinia galanga* untuk menentukan dosis optimal yang efektif meningkatkan aktivitas *caspase 3* dan menurunkan *grading* kanker payudara. Penelitian menggunakan bahan aktif 1'-Acetoxychavicol Acetate (ACA) yang terkandung dalam *Alpinia galanga*. Penelitian mengenai efek toksisitas ekstrak *Alpinia galanga*, terutama terhadap organ hati dan ginjal.

DAFTAR PUSTAKA

- Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cells sensitivity to anticancer agent. *Cancer Res* 1999 Apr 1;59:1391-9.
- Kim R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer* 2005 Apr 15;103(8):1551-9.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2005 May/June;55(3):178-92.
- Fischer U, Schulze-Osthoff K. Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death and Differentiation* 2005;12:942-61.
- Sarjadi, Trihartini P. Cancer registration in Indonesia. *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention* 2001;2:21-4.
- Dinas Kesehatan Pemerintah Provinsi Jawa Tengah. Profil kesehatan provinsi Jawa Tengah tahun 2005 [serial online] 2005 [cited 2008 Feb 9]. Available from: URL: <http://www.dinkesjateng.org/profil2005/bab4.htm>.
- Kondo A, Ohigashi H, Murakami A, Suratwadee J, Koshimizu K. 1'-acetoxychavicol acetate as a potent inhibitor of tumor promoted-induced epstein-barr virus activation from *Languas galangal*, a traditional Thai condiment. *Biosci, Biotech, Biochem.* 1993;57(8):1344-5.
- Rusmarilin H. Aktivitas antikanker ekstrak lengkuas lokal (*Alpinia galanga* (L) Sw) pada alur sel kanker manusia serta mencit yang ditransplantasi dengan tumor primer [disertasi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor; 2003.
- Kobayashi Y, Nakae D, Akai H, Kishida H, Okajima E, Kitayama W, Denda A, Tsujiuchi T, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H, Konishi Y. Prevention by 1' - Acetoxychavicol Acetate of the induction but not the growth of putative preneoplastic, glutathione S-transferase placental form-positive, focal lesion in the livers of rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Carcinogenesis* 1998;19(10):1809-14.
- Ito K, Nakazato T, Xian MJ, Yamada T, Hozumi N, Murakami A, Ohigashi A, Ikeda Y, Kizaki M. 1'-Acetoxychavicol Acetate is a novel nuclear factor κB inhibitor with significant activity againts multiple myeloma in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2005;65(10):4417-24.
- Ito K, Nakazato T, Murakami A, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, Ohigashi H, Ikeda Y, Kizaki M. Induction of apoptosis in human myeloid leucemic cells by 1'-Acetoxychavicol Acetate through a mitochondrial and Fas mediated dual mechanism. *Clin Cancer Res* 2004 Mar 15;10:2120-30.
- Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kagi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 1998;12:806-19.
- Vegan F, Boidot R, Oudin C, Riedinger JM, Bonnetain F, Nacol SL. Overexpression of caspase 3s splice variant in locally advanced breast carcinoma is associated with poor response to neoadjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006 Oct 1;12(19):5794-800.
- Essmann F, Engels IH, Totzke G, Schulze-Osthoff K, Janicke RU. Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cell to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase 3 and caffeine-inhibitable event. *Cancer Res* 2004 Oct 4;64:7065-72.
- Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia (IAPI). Pedoman penanganan bahan pemeriksaan untuk histopatologi. 1th ed. Jakarta, 2008.
- Prophet E, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Laboratory methods in histotechnology. 1th ed. Washington DC: American Registry of Pathology, 1994.
- Lab Vision Corporation. Immunohistology protocols [Online]. 2004 [cited 2008 Jun 24]. Available from: URL: <http://www.labvision.com/pdf/Immunochemistry.pdf>.
- Allred DC, Clark GM, Elledge R, Fuqua SAW, Brown RW, Chamness GC, Osborne CK, McGuire WL. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1993 Feb 3;85(3):200-6.
- Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyrtos F, Brunet M. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR): an improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* 1989;64:1914-1921.
- Elmore S. Apoptosis : a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4):495-516.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995 Mar 10;267:1456-62.
- European medicines Agency. Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity [Online]. 2008 [cited 2010 Jan 10]. Available from: URL: <http://www.emea.europa.eu>.
- Kerem M, Bedirli N, Gurbuz N, Ekinci O, Bedirli A, Akkaya T, Sakrak O, Pasaoglu H. Effects of acute fenthion toxicity on liver and kidney function and histology in rats. *Turk J Med Sci* 2007;37(5):281-88.

24. Pujiastuti, Dzulkarnain B, Nuratmi B. Toksisitas akut (LD50) dan pengaruh beberapa tanaman obat terhadap mencit putih. *Cermin Dunia Kedokteran* 1988;53:44-7.
25. Hemabarathy B, Budin SB, Feizal V. Paracetamol hepatotoxicity in rats treated with crude extract of *Alpinia galanga*. *Journal of Biological Science* 2009;9(1):57-62.
26. Al-Yahya MA, Rafatullah S, Mossa JS, Ageel AM, Al-Said MS, Tariq M. Gastric antisecretory, antiulcer and cytoprotective properties of ethanolic extract of *Alpinia galanga Willd* in rats. *Phytotherapy research* 1990;4(3):112-15.
27. World Health Organization. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicines [Online]. 2000 [cited 2010 Jan 10]. Available from: URL: http://whqlibdoc.who.inet/hq/2000/who_trm_2000.1.pdf
28. Suryani A. Perbaikan media tanaman jeruk dengan berbagai bahan organik dalam bentuk kompos [Online]. 2007 [cited 2010 Jan 10]. Available from: URL: <http://www.damandiri.or.id/detail.php?id=576>
29. Aryantha INP. Membangun sistim pertanian berkelanjutan [Online]. [cited 2010 Mar 5]. Available from: URL: http://www.hayati.itb.ac.id/artikel/pertanian_bermoral.pdf

Ucapan Terima Kasih kepada Mitra Bestari pada Volume 44 No. 2 Tahun 2010

1. Prof. dr. Adi Hidayat, MPH, Bagian Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti, Jl. Kyai Tapa Kampus B, Grogol Jakarta Barat
2. Prof. Dr .dr. Hardiyanto, Sp.KK(K), Bagian Ilmu Penyakit Kulit & Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada/RSUP Dr. Sarjito, Jl. Sekip Utara Yogyakarta - 55281
3. Dr. Eli Herwana, M.Biomed, Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti Jakarta.
4. Dr. Martha I Kertasurya, Magister Ilmu Kesehatan Masyarakat, Universitas Diponegoro Semarang.