

Aktivitas Kemopreventif Fraksi Kloroform Herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) Terhadap Ekspresi Protein VEGF Pada Hepar Tikus Galur *Sprague dawley* Terinduksi DMBA secara *In Vivo* dan *In Silico*

¹Heni Ratnasari, ²Rifki Febriansah

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY

²Biologi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY

Email: heniratnasari@gmail.com

Abstrak

Kematian akibat kanker terus mengalami peningkatan setiap tahunnya. *Hepatocellular carcinoma* (HCC) adalah kanker kelima yang paling umum pada pria. Pengobatan kanker selain mahal dan sifatnya yang tidak selektif, kemoterapi memicu terjadinya efek samping yang serius. Oleh karenanya diperlukan agen kemopreventif berbahan dasar alam untuk meningkatkan efektivitas pengobatan kanker yang sudah ada. Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) mengandung senyawa nobiletin golongan flavonoid yang dapat dijadikan agen kemopreventif. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui aktivitas kemopreventif Fraksi Kloroform Herba Bandotan (FKHB) terhadap ekspresi protein VEGF secara *in vivo* dan kemampuan penghambatan nobiletin terhadap protein VEGF secara *in silico*. Simplisia dimaserasi menggunakan etanol 70% dilanjutkan fraksinasi menggunakan kloroform. Identifikasi fitokimia FKHB dilakukan dengan metode KLT. Uji *molecular docking* senyawa nobiletin terhadap protein VEGF, COX-2 dan c-Myc dengan pembanding 5-Fluorouracil. Uji karsinogenesis memerlukan 20 ekor tikus dibagi dalam 5 kelompok pemberian. Induksi dilakukan secara per oral menggunakan CMC-Na 0,5% 1 ml/200 gram, DMBA 20 mg/kgBB dan FKHB dengan dosis 750 mg/kgBB dan 1500 mg/kgBB. DMBA diinduksikan 2 kali seminggu selama 5 minggu. Pengamatan histologi dilakukan dengan metode *Immunohistochemistry* dan *Haematoxylin-Eosin*. Hasil uji KLT menyatakan bahwa FKHB mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid. *Molecular docking* membuktikan bahwa senyawa nobiletin lebih baik dalam menghambat ekspresi protein VEGF dengan nilai afinitas -7.6 kcal/mol. Induksi DMBA menyebabkan *over* ekspresi VEGF moderat terhadap jaringan hepar. Secara histologi, pemberian FKHB dengan dosis 1500 mg/kgBB memberikan perbaikan derajat histologi yang lebih baik dibandingkan pemberian FKHB 750 mg/kgBB. Dapat disimpulkan bahwa FKHB memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi agen kemopreventif kanker hepar.

Kata kunci: *Ageratum conyzoides L.*, karsinoma hepatoselular, DMBA, *In Silico*, *In Vivo*

Abstract

Cancer deaths continue to increase annually. *Hepatocellular carcinoma* (HCC) is the fifth most common cancer in men. Cancer treatment basically expensive and non-selective, beside that chemotherapy induced the occurrence of serious side effects. Therefore, a natural-based chemopreventive agent is required to improve the effectiveness of the existing cancer treatment. Bandotan Herbs (*Ageratum conyzoides L.*) contains a large type of flavonoids compound that can be used as a chemopreventive agent. The purpose of this research is to know the chemopreventive activity of Bandotan Herbs Chloroform Fraction (BHCF) due to the expression of VEGF based on *in vivo* study and the inhibition nobiletin to VEGF proteins based on *in silico* study. The simplisia macerated using ethanol 70% followed by fractionations using chloroform. The phytochemicals identification of BHCF is done by the TLC method. Molecular docking test of nobiletin compounds against VEGF proteins, COX-2 and C-Myc compared to 5-Fluorouracil. The carcinogenesis test required 20 mice tails to be divided into 5 feeding groups. Induction is conducted on a per-oral using CMC-Na 0.5% 1 ml/200 gram, DMBA 20 mg/kgBW and BHCF at a dose of 750 mg/kgBW and 1500 mg/kgBW. DMBA is injected 2 times a week for 5 weeks. Histological observation is done by the *Immunohistochemistry* and *Haematoxylin-Eosin* methods. The TLC results state that BHCF contains flavonoid as a secondary metabolites. *Molecular docking* proves that nobiletin is better in inhibiting the expression of VEGF with an affinity value -7.6 kcal/mol. Induction of DMBA causes moderate over-expression of VEGF against liver tissue. Histologically, the introduction of BHCF at a dose of 1500 mg/kgBW provides better improvement degrees of histology than 750 mg/kgBW. It can be concluded that BHCF has the potential to be developed into a chemopreventive agent of liver cancer.

Keywords: *Ageratum conyzoides L.*, hepatocellular carcinoma, DMBA, *In Silico*, *In Vivo*

1. Pendahuluan

Kematian akibat kanker terus mengalami peningkatan setiap tahunnya. Kanker hepar menjadi penyebab paling umum kedua kematian akibat kanker di seluruh dunia, diperkirakan bertanggung jawab untuk hampir 746.000 kematian pada tahun 2012 (9,1% dari total).¹ *Hepatocellular carcinoma* (HCC) adalah kanker kelima yang paling umum pada pria (554.000 kasus, 7,5% dari total) dan kesembilan pada wanita (228.000 kasus, 3,4%).² Angiogenesis dipercaya memiliki peranan sangat penting terhadap munculnya peristiwa HCC yang digambarkan melalui faktor angiogenesis yaitu VEGF. VEGF merupakan regulator angiogenesis yang paling utama dan digunakan sebagai penanda/ *marker* biologi dalam kemunculan tumor dan prognosis HCC.³

Pengobatan yang dilakukan sampai saat ini berupa kemoterapi dengan obat sitostatik seperti 5-Fluorourasil, radioterapi dan pembedahan. Keterbatasan masyarakat dalam pengobatan kanker meliputi mahalnya biaya pengobatan, lama pengobatan serta efek samping yang berat. Meskipun demikian, kemoterapi masih penuh dengan beberapa tantangan, yang paling terkemuka adalah resistensi obat, toksisitas, rambut rontok yang berlebihan, mual dan spesifisitas rendah dari obat sitotoksik yang tersedia saat ini.⁴ Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) merupakan salah satu tanaman yang berpotensi sebagai agen kemopreventif. Secara empiris, tanaman ini dipercaya menunjukkan beberapa efek biologis seperti antiinflamasi, antitumor dan penurunan tekanan darah.⁵ Tanaman ini mengandung senyawa alkaloid, resin, saponin, tannin, glukosida dan flavonoid yang memiliki aktivitas antikanker. Nobiletin yang termasuk dalam golongan senyawa flavonoid digunakan sebagai agen kemopreventif maupun ko-kemoterapi.⁶

Penelitian sebelumnya oleh Komalasari (2017) melakukan penyarian ekstrak menggunakan metode maserasi dengan bantuan pelarut etanol. Fraksinasi menggunakan pelarut kloroform dilakukan untuk

memisahkan senyawa polar dan non polar.⁷ Penelitian serupa dilakukan oleh Prabowo (2015) terhadap herba bandotan secara *in vivo* berupa kajian kanker payudara terhadap tikus galur *Sprague dawley* terinduksi DMBA.⁸ Percobaan karsinogenesis menggunakan Dimetilbenz (a) antrasene (DMBA) yaitu hidrokarbon polisiklik aromatik yang bersifat toksik sehingga dapat memicu kerusakan struktur sel yang berujung pada nekrosis sel.⁹ Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, herba bandotan mengandung metabolit sekunder flavonoid yang dapat dimanfaatkan sebagai agen kemopreventif. Fokus penelitian ini ditujukan untuk mengetahui hubungan flavonoid terhadap protein VEGF melalui pengamatan histologi.

2. Metode Penelitian

Desain penelitian menggunakan eksperimental laboratoris meliputi uji fitokimia, uji *molecular docking*, uji *in vivo* dan pengamatan histologi. Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi FKIK UMY, uji karsinogenesis di LPPT Unit IV UGM dan pengamatan histologi dilakukan di Laboratorium Mikroanatomi dan Makroanatomi FKH UGM.

a. Alat

Laptop, pipet volum (pyrex), wadah (pyrex), mikroskop, peralatan ekstraksi, *rotary evaporator*, *waterbath*, *wellplate (tissue culture plate)*, *laminar air flow*, botol sampel, alat bedah, *object glass*, inkubator, kulkas.

b. Bahan

Herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*), etanol 70% (brataco), Xylol, alcohol absolut (brataco), alkohol 90% (brataco), alkohol 80% (brataco), *Hematoxylin*, HCl 0,6%, Lithium karbonat 0,5%, Eosin, Entellan/*Canada Balsam*, pelarut non polar, kloroform, *butyl acetate*, *acetyl acetate*, air.

Preparasi Ekstrak

Sebanyak 1000 mg serbuk simplisia Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) yang diperoleh

dari Banguntapan, Bantul, Yogyakarta dimaserasi menggunakan etanol 70% (1:10 v/v) selama 5 hari di dalam bejana tertutup kemudian disaring. Ampas penyarian diremaserasi selama 2 hari. Ekstrak etanolik kemudian difraksinasi menggunakan kloroform (1:1 v/v). Fraksi kloroform ditimbang dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dan diuapkan menggunakan *waterbath* pada suhu 60°C hingga terbentuk ekstrak kental.

Analisis Fitokimia

Analisis kandungan fitokimia menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase gerak methanol:kloroform (7:2 v/v) dan fase diam berupa *silica gel 60 F 254* dengan jarak elusi 8 cm. Penjenuhan *chamber twintrough* dilakukan menggunakan campuran fase gerak. Penotolan ekstrak dilakukan menggunakan *microcaps* sebanyak 2 kali dengan senyawa pembanding rutin dan quinine. Plat dimasukkan kedalam *chamber* hingga jenuh. Plat diamati dibawah sinar UV 254 dan 366 nm dengan pereaksi warna ammonia.

Molecular Docking

Molecular docking merupakan metode komputasi dengan model penambatan protein, enzim, maupun reseptor secara kompetitif menggunakan *cavity* pada sisi aktif protein.¹⁰ Uji dilakukan untuk mengetahui aktivitas penambatan senyawa nobiletin yang merupakan senyawa flavonoid terhadap 3 protein target (VEGF, COX-2 dan c-Myc) dibandingkan agen sitotoksik 5-FU.

a. Pengunduhan aplikasi pendukung

Autodock Vina

<https://vina.scripps.edu/download.html>

DS Visualizer

<http://accelrys.com/products/collaborativescience/bio-via-discovery-studio/visualization-download.php>

MGL Tools

<http://mgltools.scripps.edu/download>

Python

<http://www.python.org/ftp/python/2.5.2/python2.5.2.msi>

YASARA

<http://www.yasara.org/viewdl.htm>

Open Babel

<http://openbabel.org/wiki/Category:Installation>

b. Pengunduhan reseptor target

Struktur protein target diunduh melalui laman www.rcsb.org dengan PDB ID 5XV7 untuk VEGF, 5IKQ untuk protein COX-2 dan 1MV0 untuk c-Myc. Data unduhan tersebut berupa struktur, sisi aktif, ligan asli (*native ligand*) dan sekuen dengan format .pdb.

c. Preparasi protein target

Preparasi protein target menggunakan aplikasi *DS Visualizer* dengan menghapus ligan, molekul air, hemoglobin dan sebagainya. Ligan yang telah dipreparasi disimpan dengan nama 5xv7.pdb, 5ikq.pdb dan 1mv0.pdb. Preparasi ligan asli dilakukan dengan membuka file tersimpan kemudian menghapus residu protein dan menyisakan ligan. Ligan disimpan dengan nama ligan1.pdb, ligan2.pdb dan ligan3.pdb. Ligan asli 5-Fluorourasil dan nobiletin dipreparasi dengan mengunduh struktur ligan dengan format .sdf kemudian diubah menjadi .pdb dengan aplikasi *Open Babel*.

d. Konversi file protein dan ligan

Tipe file format .pdb diubah menjadi tipe dokumen .pdbqt menggunakan *MGLTools* dan *Autodock Tools*. Penambahan atom hidrogen pada protein uji dengan file format 5xv7.pdbqt, 5ikq.pdbqt dan 1mv0.pdbqt. Luas wilayah *docking* diatur melalui submenu *Grid* pada *Grid Box* yang mempengaruhi nilai RMSD pada setiap konformasi. Dokumen disimpan dengan nama ligan1.pdbqt, ligan2.pdbqt dan ligan3.pdbqt di dalam berkas *Vina*.

e. *Molecular Docking* dengan *Autodock Vina*

Membuat dokumen baru dengan nama conf.txt. Reseptor diisi dengan 5xv7.pdbqt, ligan diisi dengan ligan1.pdbqt, center_x, y, z dan size_x, y, z diisi dengan nilai sesuai *grid box*. Setelah selesai dokumen

disimpan di berkas Vina. Nilai RMSD didapat dengan mengisi *Command Prompt Windows*. Dokumen output.pdbqt kemudian dipecah menjadi masing-masing konformasi untuk memudahkan analisis dan visualisasi.

f. Visualisasi hasil

Dokumen dengan file format .pdbqt diubah menjadi .pdb melalui *Open Babel*. Visualisasi menggunakan aplikasi *DS Visualizer* untuk menganalisis gambaran posisi dan ikatan protein pada setiap ligan yang diujikan.. Visualisasi diperjelas dengan mengubah latar warna dan melabeli protein dengan asam amino.

Uji In Vivo

Sebanyak 20 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague Dawley* berusia 40 hari dengan berat 70-100 gram diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gadjah Mada. Hewan uji ditempatkan di kandang dengan suhu 28-32 °C, kelembaban 98% diberi makanan pelet dan diberi minum. Adaptasi dilakukan selama 3 hari kemudian dibagi menjadi 5 kelompok sesuai dengan kelompok pemberian. Injeksi dilakukan dengan menelusur melalui langit-langit mulut menuju kerongkongan.

Kelompok A (kontrol tanpa pengobatan) diberikan larutan CMC-Na 0,5% dengan dosis 1 ml/200 gram. Kelompok B (kontrol DMBA) dengan DMBA (7,12-Dimetilbenzen antrasena) dengan dosis 20mg/kg BB dua kali seminggu selama 5 minggu. Larutan DMBA diperoleh dengan melarutkannya dalam minyak jagung pada tabung dan di vortex selama 15 menit. Kelompok C (kontrol ekstrak) dengan dosis 1500 mg/kg BB setiap hari selama 5 minggu. Kelompok D dan E (DMBA + ekstrak) diberikan dosis pembanding 750mg/kgBB dan 1500 mg/kg BB pada minggu keempat dan kelima.

Pengamatan Histologi

Uji histologi dimulai dengan proses penghapusan parafin dari preparat histologi dengan melakukan pencelupan dalam Xylol III selama 3

menit. Proses ini dilanjutkan dengan perendaman dengan Xylol II selama 3 menit. Slide mengalami dehidrasi (pengangkatan fasa air) dengan kadar alkohol berurutan menjadi 100%, 95% dan 70%. Slide kemudian dicelupkan di dalam air *deionized* (D. I), setiap tingkat selama 3 menit. Slide dioksidasi oleh H₂O₂ (hidrogen peroksida), diinapkan selama 10 menit dalam *deionized water*. Setelah itu, slide dibilas dengan air keran. Slide dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali, masing-masing selama 2 menit. Untuk membuka pori preparat histologi dan penghapusan sisa parafin, dilakukan dengan pemanasan menggunakan kompor suhu 100 ° C selama 10 menit. Setelah mendidih, slide didinginkan dalam suhu kamar selama 20 menit. Slide kemudian dicuci dengan air keran dan dibilas dengan aquadest. Bilas dengan air di D.I. Slide diberi set pewarna Haematoxylin-Eosin, diamkan selama 2 menit dan dibilas dengan air keran. Kemudian dehidrasi (penghapusan fasa air) dengan alkohol 100% dan dibersihkan dalam tahap xylene. Proses terakhir pada tahap ini adalah proses *mounting* dan *coverslip*.

Sementara, dalam proses pewarnaan imunohistokimia, prosedur dimulai dengan deparafinasi menggunakan xylene sebanyak 3 kali selama 3 menit. Selanjutnya, dehidrasi menggunakan etanol 100% selama 2 menit, etanol 95% selama 2 menit dan 70% etanol selama 1 menit, kemudian dilanjutkan dehidrasi menggunakan air selama 1 menit. Preparat direndam selama 10 menit pada suhu kamar dalam larutan PBS, inkubasi dalam serum *prediluted blocking solution* suhu 25 ° C selama 10 menit. Preparat direndam dalam antibodi monoklonal anti-VEGF 25 °C selama 10 menit. Selanjutnya preparat

dicuci dengan Phosphate Buffer Saline (PBS) selama 5 menit, kemudian diinkubasi dengan kromogen Diaminobenzinidine (DAB) 25 ° C selama 10 menit, inkubasi dengan Haematoxylin-Eosin selama 3 menit. Preparat dicuci dengan air yang mengalir, kemudian dibersihkan dan ditambah dengan mounting media, preparat siap diamati dibawah mikroskop.

3. Hasil dan Pembahasan

Preparasi Ekstrak

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi selama 5 hari dengan rasio 1:10 dilanjutkan diremaserasi selama 2 hari. Ekstraksi menghasilkan 18 L ekstrak cair kemudian dilakukan pemisahan menggunakan kloroform. Sebanyak 5 L ekstrak cair dipisahkan dengan metode partisi cair-cair dengan rasio 1:1 dan menghasilkan 8,1 L dari FKHB. Selanjutnya, FKHB dievaporasi menggunakan rotavapor dan diperoleh FKHB terkonsentrasi 2 L dan etanol sisa pemisahan. FKHB terkondensasi diperoleh melalui proses pemanasan menggunakan *waterbath* pada suhu 60 ° C dengan kecepatan rotasi 90 rpm dan menghasilkan ekstrak kental 17,4 gram dengan nilai hasil 4,22%.

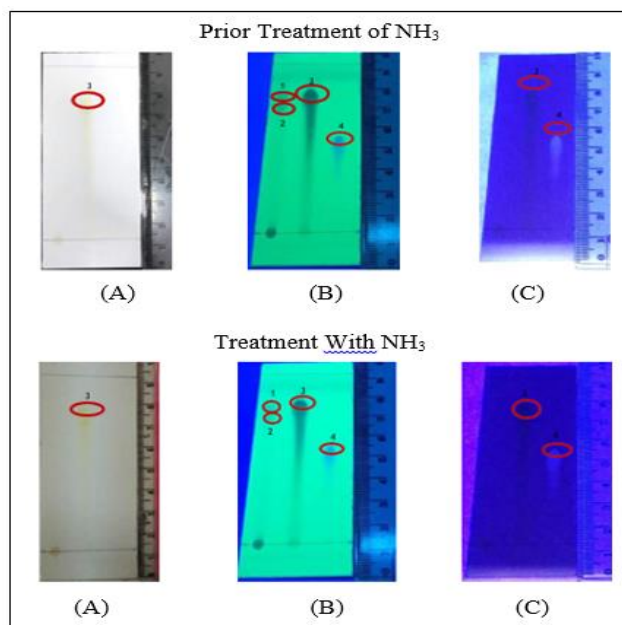
Ekstraksi dapat dijelaskan oleh kerusakan dinding sel akibat adanya perbedaan tekanan baik di dalam maupun di luar sel sehingga metabolit sekunder dalam sitoplasma akan terbentuk.¹⁰ Proses fraksi cair cair dilakukan dengan menggunakan kloroform yang digunakan untuk mendapatkan senyawa flavonoid yang lebih baik dan optimal berdasarkan pada indeks polaritasnya. Corong pemisah menunjukkan 2 fase, fase atas (fraksi etanol 70%) dan fase bawah (fraksi kloroform) akibat perbedaan massa jenis kedua pelarut.

Analisis Fitokimia

Identifikasi flavonoid dilakukan menggunakan metode KLT dengan cara menotolkan bercak FKHB di atas pelat silika gel. Hasilnya KLT ditunjukkan dengan nilai RF, yaitu jarak yang didorong oleh senyawa dari

titik asal dibagi dengan jarak yang didorong oleh pelarut dari titik asal. Reaksi warna dilakukan dengan menggunakan uap amonia. Warna bercak dan analisis kualitatif flavonoid dapat dilihat pada gambar 1.

Fase gerak kloroform:metanol (7:2 V/V) telah banyak digunakan dalam beberapa penelitian dengan perbandingan kloroform: metanol: air (65:25:4 V/V).¹² Pemilihan fase diam juga berkaitan dengan polaritas, kelarutan, berat molekul, dan kemampuan mengionisasi. Sebanyak 64% peneliti menggunakan sorben silica, 9% menggunakan selulosa diikuti alumina 3%.



Gambar 1. Identifikasi senyawa menggunakan KLT (A) Sinar tampak (B) UV 254 nm (C) UV 366 nm

TABEL 1. HASIL PEWARNAAN KLT DENGAN NH₃

Spot	Rf	Color Spots with NH ₃		
		Visible Light	UV 254 nm	UV 366 nm
1	0,75	-	Bright Purple	-
2	0,81	-	Bright Purple	-
3	0,83	Yellow	Dark Purple	White
4	0,53	-	Bright Purple	White

Pengamatan sampel FKHB di bawah sinar UV 254 nm menghasilkan warna ungu sementara di bawah UV 366 tidak menunjukkan warna *spotting*. Berdasarkan nilai *rf*, FKHB mengandung senyawa flavonoid dengan jenis aglikon non polar. Bintik ungu yang terlihat pada pengamatan visual KLT diperkirakan sebagai flavon dan

flavonol. Salah satu senyawa yang diidentifikasi adalah flavon termetoksilasi yang mengandung senyawa nobiletin dan turunannya.¹³ Warna kuning dan violet pada sinar UV mengindikasikan kuersetin dan glikosida flavonoid. Glikosida flavonoid adalah flavonoid yang sering ditemukan pada tanaman dan senyawa ini berikatan dengan gula. Rutin (senyawa pembanding) adalah contoh glikosida flavonoid. Sehingga pada bercak ke-3, warna kuning menunjukkan bahwa bercak adalah glikosida flavonoid. Sementara bercak ke-4 merupakan senyawa alkaloid. Untuk penelitian lebih lanjut dapat dilakukan kuantifikasi menggunakan KLT-Densitometri dan KCKT untuk menelusuri kandungan nobiletin dalam senyawa flavon.

Molecular Docking

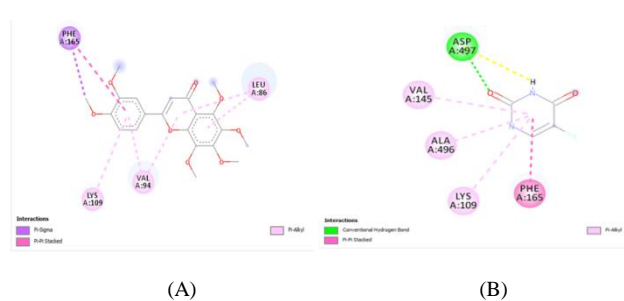
Molecular docking dilakukan untuk menganalisis kekuatan ikatan onkogen VEGF terhadap nobiletin. Interpretasi data ditunjukkan pada tabel 2 dengan menggunakan skor *docking*.

TABEL 2. NILAI SKOR DOCKING

Compound	Protein	RMSD	Score	Conformation
Nobiletin	VEGF	1.122	-7.6	6
5-Fluorouracil	VEGF	1.534	-4.7	3
Nobiletin	COX-2	1.038	-7.5	3
5-Fluorouracil	COX-2	1.927	-5.2	6
Nobiletin	c-Myc	1.395	-4.9	5

Setiap senyawa menghasilkan 9 konformasi. RMSD adalah nilai deviasi antara ligan dan perbandingannya, yaitu, jika deviasi terlalu besar, semakin besar kesalahan prediksi ligan dan interaksi protein.¹⁴ Hasil terbaik merujuk pada kebutuhan energi nobiletin untuk berinteraksi dengan VEGF (-7,6 kkal/mol) lebih rendah dari 5-FU untuk VEGF (-4,7 kkal/mol) yang mengakibatkan ikatan kurang stabil. Berdasarkan penelitian sebelumnya, nobiletin telah terbukti memiliki aktivitas antitumor melalui deregulasi siklus sel, anti

proliferasi, induksi apoptosis, antiangiogenesis, anti-inflamasi dan antikarsinogenik.¹⁵⁻¹⁷



Gambar 2. Visualisasi interaksi senyawa aktif pada protein VEGF (A) Nobiletin (B) 5-Fluorourasil

Adapun hasil penelitian ini, nobiletin memiliki potensi sebagai aktivitas antikanker melalui mekanisme apoptosis yang melibatkan VEGF. Peran nobiletin/*polymethoxyflavon* melalui regulasi siklus sel dengan menghambat VEGF dan FGF melalui regulasi bawah ERK 1/2 reseptor, C-JNK dan aktivasi jalur caspase.¹⁸ Terdapat dua jenis ikatan asam amino yang terbentuk dalam pengikatan nobiletin terhadap protein VEGF, ikatan Phi Sigma (ikatan kovalen paling kuat) dan ikatan Phi alkil (gambar 2).

Skor docking berlawanan dengan energi afinitas, berdasarkan informasi, senyawa nobiletin memiliki potensi yang lebih baik, membutuhkan sedikit energi untuk mempertahankan keadaan stabil. nobiletin merupakan polimetoksi flavonoid terisolasi dari alam dan memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan kanker melalui anti angiogenesis dan anti apoptosis. Anti angiogenesis dilakukan dengan mengurangi kadar Akt, HIF-1 α , NF- κ B dan VEGF dalam kasus kanker ovarium.¹⁹

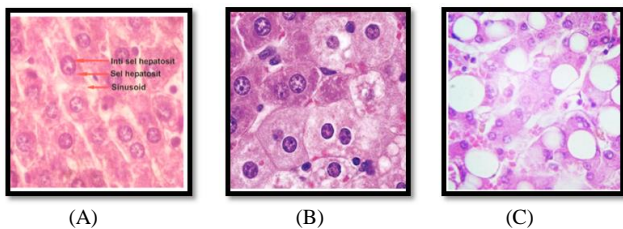
Uji In Vivo

DMBA (7, 12-Dimethylbenz (a) anthracene merupakan *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAHs) yang digunakan untuk tujuan medis sebagai karsinogen sintesis paling kuat. DMBA mengakibatkan nekrosis dengan merusak struktur sel melalui stres oksidatif yang mengarah ke hiperplasia lobular yang kemudian memicu adenoma tubular yang merupakan patologi mamalia non-invasif.²⁰ kondisi ini terjadi pada karsinoma situ dan berkembang menjadi karsinoma lobular invasif.²¹

Jaringan hati mengalami perubahan mikroskopis (dapat diamati melalui pengamatan histologi dengan pewarnaan HE dan IHC) setelah minggu keenam melalui bedah toraks. Pengamatan makroskopik digunakan untuk mengetahui jumlah dan ukuran nodul yang terbentuk pada tikus. Tetapi dalam pengamatan makroskopik dibutuhkan waktu yang lama sampai nodul muncul.

Pengamatan Histologi

Pengamatan histopatologi dilakukan secara mikroskopik menggunakan perangkat lunak toupview® untuk mengamati pengaruh administrasi FKHB terhadap jaringan sel hepar tikus galur *Sprague dawley* terinduksi DMBA. Sifat karsinogenesis dapat dilihat dengan membandingkan struktur sel normal dan sel rusak pada pewarnaan HE terhadap perubahan sitoplasmik terutama di sekitar vena sentralis serta sinusoid jaringan hepar. Adapun mekanisme lainnya bisa ditempuh melalui proses degenerasi hidropik akibat pembengkakan sitoplasma.



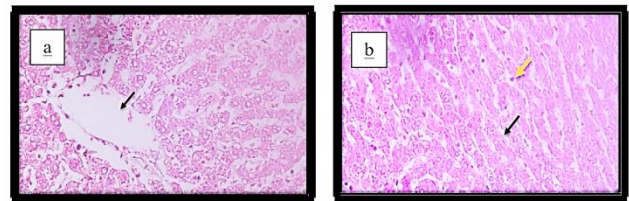
Gambar 3. (A) Gambaran hepatosit normal (B) jaringan hepar mengalami degenerasi hipeponik perbesaran 40x10 (C) jaringan hepar mengalami degenerasi lemak²²

Berdasarkan pewarnaan IHC, warna coklat menunjukkan adanya ekspresi protein sedangkan warna biru menunjukkan jaringan normal. Penilaian derajat merusak dilakukan secara kualitatif dan dilanjutkan dengan analisis semi-kuantitatif (Tabel 3).

TABEL 3. SKORING PEWARNAAN IHC²³

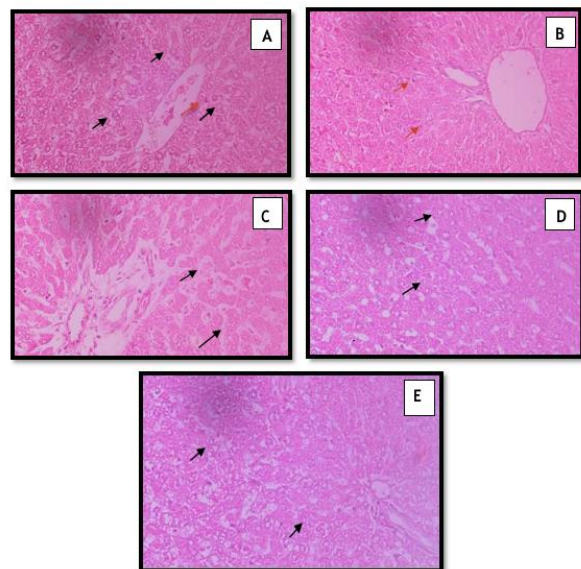
IHC Painting Pattern	Score	Classification
No membrane staining of IHC painting results	0	Negative
Membrane staining is incomplete (< 10%) and weak	1+	Negative
Membrane staining is complete (not uniform (10% - 30%))	2+	Equivocal
Staining of the uniform membrane intensity (> 30%)	3+	Positive

Pewarnaan dilakukan untuk menganalisis histopatologi tikus galur *Sprague dawley* terhadap aktivitas kemopreventif FKHB berdasarkan perbaikan dan kerusakan sel. Jaringan hepar terdiri dari kapsula glison dan lobules hati berupa sel hepatosit dan sinusoid. Lobulus hepar memiliki bentuk prisma segi enam yang dikelilingi oleh sinusoid, sedangkan secara mikroskopis sel hepatosis berbentuk bulat dengan inti pusat.



Gambar. 4. Gambaran sel fungsional hepatosit jaringan hepar terhadap pewarnaan HE perbesaran 40x (a) vena sentralis (→) (b) sinusoid (→) endotelium (→)

Kerusakan sel dapat dijelaskan melalui proses degeneratif dan nekrosis. Degenerasi hidropik merupakan proses pembengkakan sitoplasma karena kerusakan membran sel akibat hipoksia yang disebabkan oleh keracunan kimia.²⁴



Gambar. 5. Histologi hepar pewarnaan HE, sel normal (→) sel rusak (→) (A) CMC-Na 0,5% (B) DMBA 20 g/kgBB (C) FKHB 1500 mg/kg BB (D) DMBA + FKHB 750 mg/kg BB (E) DMBA + FKHB 1500 mg/kgBB

Pada kelompok pemberian A dan C tidak ada perbedaan yang signifikan. Keduanya menerima kontrol pelarut dan FKHB. Sampel B dengan induksi DMBA 20

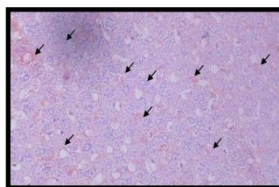
mg/kgBB menunjukkan perbedaan nyata dalam hepatosit. Sel hepatosit yang mengalami perubahan (peradangan) dapat dijelaskan oleh struktur batas antara sel, sitoplasma dan penyimpangan bentuk sel. Sinusoid tidak terlihat begitu jelas seperti pada sampel lainnya. Jaringan hepar mengalami hiperproliferasi yang mengarah ke karsinogen moderat. Beberapa perbaikan histologis pada sampel D dan E menunjukkan hasil yang lebih baik pada pemberian dosis 1500 mg/kgBB.

TABEL 4. SKORING PEWARNAAN HE

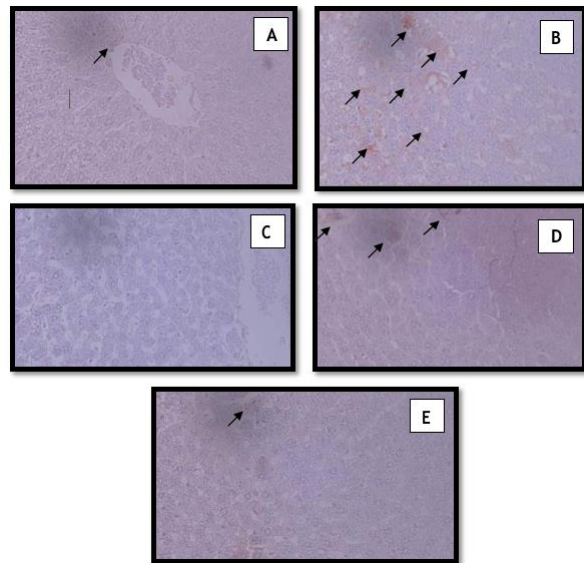
Group	Number of Broken Cells			Average (%)
	Replication 1	Replication 2	Replication 3	
Group A	3 of 60 cells	3 of 56 cells	2 of 50 cells	± 6%
Group B	25 of 68 cells	21 of 65 cells	27 of 76 cells	± 46.1%
Group C	3 of 43 cells	5 of 55 cells	3 of 36 cells	± 8.2
Group D	18 of 65 cells	13 of 46 cells	17 of 69 cells	± 26
Group E	10 of 68 cells	7 of 62 cells	9 of 65 cells	± 13.2%

Kelompok pemberian A dan C menunjukkan rata kerusakan rendah yaitu 6% dan 8,2% sel. Administrasi CMC Na pada hewan uji memicu terjadinya regenerasi sel. Administrasi DMBA (kelompok pemberian B) menunjukkan ± 46,1% kerusakan sel yang menunjukkan tingkat tertinggi, namun efek karsinogenesis DMBA (kelompok B) di jaringan hepar dinilai kurang signifikan. Selain itu, kelompok pemberian D dan E menyebabkan ± 26% dan ± 13,2% sel rusak. Pemberian dosis ekstrak FKHB 1500 mg/kgBB menunjukkan perbaikan sel yang lebih baik.

Ekspresi VEGF dapat diketahui dengan pewarnaan imunohistokimia melalui prinsip pengikatan antibodi (AB) dan antigen (AG). Metode ini sering digunakan untuk mendeteksi distribusi serta lokalisasi protein tertentu pada jaringan tubuh (gambar 6).



Gambar. 6. Paparan protein VEGF pada jaringan hepar (→)



Gambar 7. Oewarnaan IHC,ekspresi VEGF (→); (A) CMC-Na 0,5% (B) DMBA 20 mg/kg BB (C) BHCF 1500 mg/kg BB (D) DMBA + FKHB 750 mg/kg BB (E) DMBA + FKHB 1500 mg/kg BB

TABEL 5. SKORING DAN KLASIFIKASI PEWARNAAN IHC

Group	IHC Score		
	Replication 1	Replication 2	Replication 3
Group A	1+	0	1+
Group B	2+	2+	1+
Group C	0	1+	0
Group D	0	1+	1+
Group E	0	0	1+

Data semi-kuantitatif ditunjukkan dengan derajat penilaian di atas. Hasil positif ditunjukkan dengan bintik coklat. Kelompok B dengan hasil 2 +, 2 + dan 1 + menunjukkan ekspresi VEGF tertinggi. Hal ini terkait dengan induksi DMBA, tambahan DNA dan over-ekspresi VEGF protein. Ekspresi VEGF kelompok B menunjukkan hasil < 30% (moderat). Hasil untuk kelompok pemberian D dan E adalah 2 + dan 1 +. Hasil perbandingan administrasi FKHB 1500 mg/kg BB terbukti lebih baik mengalami perbaikan jaringan sel hepar

4. Kesimpulan

Ageratum conyzoides L mengandung metabolit sekunder dari senyawa flavonoid. Salah satu senyawa flavonoid yang diuji dalam bentuk nobiletin memiliki aktivitas penghambatan ekspresi protein VEGF dan lebih baik dari 5-FU dengan skor docking -7,6 kcal/mol. Administrasi DMBA selama 5 minggu mampu mempengaruhi histologi seluler dan administrasi 1500 mg/kgBB FKHB mampu mengurangi keparahan dan

memperbaiki struktur sel hepatosit hati jaringan.

Penelitian pengembangan disarankan menggunakan *TLC-Densitometry* dan metode HPLC untuk menentukan senyawa aktif yang lebih spesifik. Pengamatan histologis menggunakan pewarnaan IHC harus dilakukan terhadap beberapa protein (COX-2 protein, VEGF dan C-myc) untuk membandingkan tingkat protein pada jaringan hepar tikus galur *Sprague dawley*.

DAFTAR PUSTAKA

1. International Agency for Research on Cancer (IARC) / WHO. (2012). GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality, and prevalence world wide in 2012
2. WHO. World health statistics 2014. Geneva: WHO; 2014. [cited 2018 Jan 2]. Available from: <https://www.google.com/search?q=who+2014&oq=who+2014&aqs=chrome..69i57j0l5.4635j0j8&sourceid=chrome&ie=UTF-8>
3. Yamaguchi R, Yano H, Nakashima Y, et al. Expression and Localization of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors in Human Hepatocellular Carcinoma and Non-HCC Tissues. *Oncol Rep.* 2000;7: 725–729.
4. Moustafa SMA, Menshawi BM, Wassel GM, Mahmoud K, Mounier MM. Screening of Some Plants in Egypt for Their Cytotoxicity Against Four Human Cancer Cell Lines. *Int J Pharm Tech Res.* 2014; 6(3): 1074-1084.
5. Meiyanto, E. & Hermawan, A. & Anindyajati. Natural Products for Cancer-Targeted Therapy: Citrus Flavonoids as Potent Chemopreventive Agents. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP* 13,427–436 (2012).
6. Hsiao, P.C., Lee, W.J., Yang, S.F., Tan, P., Chen, H.Y., Lee, L.M., Chang, J.L., Lai, G.M., Chow, J.M., Chien, M.H., 2014, Nobiletin Suppresses The Proliferation and Induces Apoptosis Involving Mapks and Caspase-8/-9/3 Signals in Human Acute Myeloid Leukemia Cells, *Tumor Biology*, 35(12), 11903-11911
7. Komalasari, T., 2017, *Uji Aktivitas Fraksi Kloroform Herba Bandotan (Ageratum conyzoides L.) dan 5-Fluorourasil sebagai Ko-Kemoterapi pada Sel Kanker Serviks HeLa secara In Vitro dan In Silico*. Yogyakarta: FKIK UMY
8. Prabowo, D., 2015, *Upaya Pengembangan Herba Bandotan (Ageratum conyzoides L.) sebagai Agen Kemopreventif pada Kanker Payudara: Kajian secara In Silico dan In Vivo*. Yogyakarta: FKIK UMY
9. Al-Attar MA. The Influence of Dietary Grapeseed Oil on DMBA-Induced Liver Enzymes Disturbance in the Frog, *Rana ridibunda*. *Pakistan Journal of Nutritional* 2004; 3:304-309
10. Claverie, J. and Notredame, C., 2006, *Bioinformatic for Dummies*, 2nd edition, Wiley Publishing Inc., Indiana.
11. Koirewoa, Y.A., Fatimawali, and W.I. Wiyono, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Daun Beluntas (*Pluchea indica L.*), 2008, Universitas Sam Ratulangi: Manado: p. 83-96
12. Dewi, N. L. A., Adnyani, L. P. S., Pratama, R. B. R., Yanti, N. N. D., Manibuy, J. I., Warditiani N. K, 2018. Pemisahan, Isolasi, dan Identifikasi Senyawa Saponin dari Herba Pegagan (*Centella asiatica L. Urban*). *Jurnal Farmasi Udayana*, Vol 7, No 2, Tahun 2018, 68-76
13. Markham, K.R., *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, London, 1988.
14. Korb, O., Stutzle, T., Exner, T.E., 2006, *PLANTS: Application of Ant Colony Optimization to Structure-Based Drug Design*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
15. Yoshimizu, N., Otani, Y., Sikawa T., Kubota, T., Yoshida, M., Furukawa, T., Kumai, K., Kameyama, K., Fuji, M., Yano, M., Sato, T., Ito, A., Kitajima, M., 2004, Anti-tumor Effects of Nobiletin, a Citrus Flavonoid, on Gastric Cancer Include: Antiproliferative Effect, Induction of Apoptosis, and Cell Cycle Deregulation, *Alments Pharmacol Ther*, 20 (Suppl. 1), 95101
16. Wang, Q., Ge, X., Tian, X., Zhang, Y., Zhang, J., Zhang, P., 2013. The Effect of Soy Isoflavones on Various Diseases. *Biomed Rep.* 21:1-5.
17. Li, S., Pan, M-H., Wang Z., Lambros, T., Ho, C-T., 2008, Biological Activity, Metabolism, and Separation of Polymethoxyflavonoids from Citrus Peels, *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 2(1), 36-51.
18. Talmadge, J.E. & Fidler, I.J., 2010. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Research*, 70(14), pp.5649–5669
19. Chen, Jianchu et al., (2015). The Flavonoid Nobiletin Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis of Ovarian Cancers via the Akt pathway. *International Journal Of Oncology* 46: 2629-2638.
20. Patri M dan Padmini P. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Air and Their Neurotoxic Potency in Association With Oxidative Stress: a Brief Prespective. *Annual Review Neuroscience* 2009;16:340-349

21. Russo J and Russo IH (1996). Experimentally Induced Mammary Tumors in Rats. *Breast Cancer Res Treat* 39:7–20.
22. DiGiovanna, JJ (2001) Isotretinoin effects on bone. *J Am Acad Dermatol* 45(5): S176-182
23. Dobson, L. d., Conway, C., Hanley, A., Johnson, A., Costello, S., O'Grady, A., Connolly, Y., Magee, H., O'Shea, D., Jeffers, M., Kay, E. (2010). Image Analysis as an Adjust to Manual HER2 Immunohistochemical Review: a Diagnostic Tool to Standardize Interpretation. *Histopathology*, 27-38
24. McGavin MD, Zachary JF. 2007. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Ed ke4. An affiliate of Elsevier Inc.