

EFEK KEMOTERAPI EKSTRAK BAWANG PUTIH PADA KANKER SERVIKS UTERI

¹Lelly Yuniarti, ²Maya Tejasari, ³Wida Pubaningsih, dan ⁴Egi Pratama

^{1, 2, 3, 4}Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung, Jalan Hariang Banga No. 2 Bandung
E-mail : lely.yuniarti@gmail.com

Abstrak. Kanker Serviks Uteri merupakan kanker penyebab kematian pertama pada wanita. Angka kematian akibat penyakit kanker di Indonesia terus meningkat dan merupakan penyebab kematian kelima di Indonesia. Perhimpunan Onkologi Indonesia (POI) juga menyatakan peningkatan kasus kanker akan menjadi tujuh kali lipat pada tahun 2030. Pengembangan agen antikanker diarahkan pada induksi apoptosis atau jalur kematian lain dari sel kanker, penghambatan faktor pertumbuhan dan sinyal faktor pertumbuhan yang meregulasi siklus sel. dan kontrol checkpoint.

Zat allicin dan Diallyl disulfide (DADS) yang terkandung dalam bawang putih menunjukkan kemampuan sebagai antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak air bawang putih terhadap jumlah kematian sel dan menganalisa variasi jenis kematian sel pada kultur sel kanker serviks uteri HeLa. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vitro* terhadap kultur sel kanker serviks uteri HeLa. Sampel dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok 1 adalah kultur sel HeLa yang tidak diberi ekstrak air bawang putih, kelompok 2 adalah kultur sel HeLa yang diberi ekstrak air bawang putih dengan konsentrasi 250µg/mL, kelompok 3 adalah kelompok 2 adalah kultur sel HeLa yang diberi ekstrak air bawang putih dengan konsentrasi 500µg/mL, sedangkan kelompok 4 adalah kultur sel HeLa yang diberi ekstrak air bawang putih dengan konsentrasi 1000µg/mL. Kepada masing-masing kelompok dilakukan perhitungan jumlah apoptosis dan nekrosis pada kultur sel HeLa menggunakan imunohistokimia TUNEL. Data dianalisis secara statistik menggunakan metoda ANOVA lalu dilakukan analisis lanjutan dengan menggunakan ANOVA dan Post Hoc metode Tukey HSD. Hasil menunjukkan ekstrak bawang putih meningkatkan jumlah apoptosis kultur sel HeLa pada konsentrasi 1000µg/mL dan meningkatkan nekrosis pada konsentrasi 500µg/mL dan 1000µg/mL. Terdapat variasi kematian sel yang bermakna yaitu apoptosis dan nekrosis pada kultur sel HeLa yang diberi ekstrak bawang putih konsentrasi 500µg/mL dan 1000µg/mL. Hal ini disebabkan kandungan allicin, DADS dan DAS pada bawang putih yang dapat menyebabkan supresi faktor survival sel dan meningkatkan (Ca^{2+}) intraseluler.

Kata Kunci : kemoterapi, ekstrak bawang putih, kanker serviks.

1. Pendahuluan

Kanker serviks uteri adalah kanker yang paling sering ditemukan di negara-negara berkembang dan sekaligus merupakan salah satu penyebab kematian perempuan di dunia.¹ kira-kira 10% angka kematian wanita disebabkan oleh kanker serviks uteri.² Di Indonesia kanker serviks uteri menduduki tingkat pertama diantara jenis kanker lainnya.³

Banyak faktor penyebab terjadinya kanker serviks uteri, baik internal maupun eksternal. Faktor eksternal seperti: infeksi Human Papilloma Virus (HPV), zat karsinogenik, kontrasepsi oral, gaya hidup tidak sehat seperti merokok dan sering berganti pasangan,⁴

sedangkan faktor internal terutama keberadaan gen-gen yang berperan pada siklus sel (contohnya gen p53, gen Rb dan gen p27^{KIP1}). Hubungan gen-gen ini dengan proses terjadinya pertumbuhan tumor kini menjadi pusat perhatian dan penelitian.¹

Kanker terjadi karena adanya perubahan mendasar dalam fisiologi sel yang akhirnya tumbuh menjadi maligna serta mempunyai ciri-ciri umum sebagai berikut: (1) mandiri dalam signal pertumbuhan, (2) tidak peka terhadap signal pertumbuhan, (3) menghindari apoptosis, (4) memiliki potensi replikasi yang tidak terbatas, (5) angiogenesis, (6) invasi dan metastasis ke jaringan lain.⁶ Oleh karena itu target pengembangan antikanker diarahkan pada induksi/pemacuan apoptosis,⁷ penghambatan angiogenesis terutama untuk kanker solid seperti kanker payudara,⁸ faktor pertumbuhan dan signal faktor pertumbuhan yang meregulasi siklus sel dan kontrol *checkpoint*.⁷

Perkembangan agen kemoterapi dari bahan alam yang efektif dan toksisitasnya rendah masih kurang, sehingga perlu dilakukan penelitian ilmiah agar dapat dihasilkan agen kemoterapi lain yang berasal dari bahan alam yang efisien dan terjangkau oleh masyarakat.

Indonesia banyak dikenal mempunyai bahan alam yang dipercaya dapat mencegah bahkan mengobati kanker, salah satunya adalah bawang putih yang dikenal memiliki aktivitas antikanker. Zat "*allicin*" dan *Diallyl disulfide (DADS)* yang terkandung dalam bawang putih diketahui mampu menghambat pertumbuhan sel-sel kanker. Bahwa senyawa allicin menunjukkan penghambatan pertumbuhan sel kanker telah banyak diteliti, sedangkan penelitian ilmiah tentang jenis dan mekanisme kematian sel oleh bawang putih secara utuh masih sangat kurang. Pada penelitian ini dilakukan uji pemberian ekstrak air bawang putih terhadap jumlah dan jenis kematian sel kanker serviks uteri dengan menggunakan kultur sel HeLa yang merupakan lini sel kanker serviks uteri.

2. Metode Penelitian

2.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan pada percobaan ini adalah kultur sel HeLa. Media tumbuh yang digunakan adalah RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Instituted*), yaitu medium yang digunakan secara luas untuk menumbuhkan sel mamalia, dengan penambahan 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*), Fungison 0,5% dan 1% penisilin-streptomisin. Konsentrasi sel yang digunakan yaitu 1×10^5 sel/mL ke dalam 15 sumuran masing-masing dimasukkan 1 mL suspensi sel.

Kultur sel dibagi menjadi 4 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 3 sampel, yaitu :

- Kelompok I : 1 mL suspensi sel HeLa dalam media kultur RPMI-1640.
- Kelompok II: 1 mL suspensi sel HeLa + 1 mL ekstrak bawang putih konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$ dalam media kultur RPMI-1640.
- Kelompok III: 1 mL suspensi sel HeLa + 1 mL ekstrak bawang putih konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ dalam media kultur RPMI-1640.
- Kelompok IV: 1 mL suspensi sel HeLa + 1 mL ekstrak bawang putih konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ dalam media kultur RPMI-1640.

Selanjutnya mikroplate diinkubasi dalam inkubator 5% CO₂ selama 72 jam pada suhu 37°C.

2.2 Ekstrak Bawang Putih

Bawang putih yang digunakan adalah bawang putih yang banyak dijual di pasaran dan mudah diperoleh masyarakat. Bahan uji ini diekstrak dengan air, pengekstrakan dilakukan di Laboratorium Pusat Ilmu Hayati ITB, Bandung dengan prosedur sebagai berikut :

1. 200 g bawang putih dipotong-potong membentuk simplisia dan dicuci sampai bersih, kemudian dikeringkan. Setelah kering simplisia ini dihancurkan.
2. Bawang putih yang telah menjadi bubuk direbus dengan menambahkan 1 L aquadest selama 2 jam disaring dengan ukuran 125 mesh, bagian yang masih kasar diekstrak.
3. Campuran di atas lalu dimasukkan ke waterbath pada suhu 70 derajat celsius sampai lunak.
4. Panaskan dalam oven dengan suhu 58 derajat celsius sampai kering.
5. Hasil akhirnya adalah serbuk kering.

Kadar ekstrak bawang putih yang digunakan adalah 250 µg/mL, 500 µg/mL dan 1000 µg/mL

2.3 Pemeriksaan Imunohistokimia TUNEL

Metoda untuk mendeteksi sel yang mengalami apoptosis dapat berdasarkan pada karakteristik apoptosis yang salah satunya adalah terjadinya fragmentasi DNA. Metoda yang umum digunakan untuk mendeteksi fragmentasi DNA secara enzimatik adalah dengan menggunakan metoda TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling*). Reagen TUNEL terdiri dari enzim terminal transferase yang bertugas mengenali ujung-ujung 3'OH (nick end) yang dihasilkan oleh adanya fragmentasi DNA dan fluorescein-dUTP untuk memvisualisasikan ujung 3'OH tersebut yang dapat diamati menggunakan mikroskop fluoresensi, *flow cytometry* ataupun mikroskop cahaya.

Pada penelitian ini akan dilakukan pengamatan dengan mikroskop cahaya dan untuk memvisualisasikan perbandingan sel apoptosis dengan sel non apoptosis dalam satu lapang pandang pengamatan, digunakan metoda *double staining* menggunakan reagen TUNEL dan giemsa. TUNEL hanya akan mendeteksi sel apoptosis dan menghasilkan warna coklat, sedangkan giemsa akan mendeteksi sel non apoptosis dan memberikan warna biru keunguan.

Jumlah kematian sel jenis apoptosis dihitung berdasarkan karakteristik apoptosis berupa:

- Pengkerutan sel (*cell shrinkage*). Ukuran sel menjadi lebih kecil, sitoplasma menjadi lebih padat sedangkan organelnya sekalipun relative normal namun tampak lebih tersusun lebih rapat
- Kondensasi kromatin. Merupakan karakteristik yang paling umum pada apoptosis. Kromatin inti memadat membentuk agregasi di perifer, dibawah membran inti mejadi masa padat berbatas tegas dalam berbagai bentuk dan ukuran. Inti dapat terbelah menjadi dua atau lebih fragmen.

Jumlah kematian sel jenis nekrosis dihitung berdasarkan adanya ciri khas nekrosis pada sediaan dengan melihat pembengkakan (oedem) pada sel.

2.4 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan uji parametrik yaitu ANOVA (*Analysis of Varians*) dengan nilai $p < 0,001$, dilanjutkan dengan uji statistik lanjutan menggunakan *Post Hoc Test* metoda *Tukey HSD* untuk mengetahui pada kelompok perlakuan mana yang menunjukkan hasil paling bermakna. Untuk variasi jenis kematian sel dilakukan uji perbandingan *dependent t-test*.

3. Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan pemberian ekstrak bawang putih terhadap kultur sel HeLa untuk melihat pengaruhnya terhadap pertumbuhan sel HeLa dan jenis kematian sel yang terjadi. Parameter yang diukur adalah jumlah apoptosis dan nekrosis sel pada kultur sel HeLa yang diberi ekstrak bawang putih dengan berbagai kadar pemberian.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat pengaruh pemberian ekstrak bawang putih terhadap jumlah kematian sel baik apoptosis maupun nekrosis. Dari hasil analisis statistik tampak bahwa, pada dosis 250 μg dan 500 μg belum menunjukkan hasil yang signifikan namun mulai dosis 1000 μg pengaruh ekstrak bawang putih menunjukkan hasil yang signifikan dalam menyebabkan kematian sel baik apoptosis maupun nekrosis. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak bawang putih baru memiliki pengaruh terhadap kematian sel HeLa pada dosis tertentu saja. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Nakagawa dkk tahun 2001 yang menyimpulkan bahwa *diallyl disulfide (DADS)* yang terdapat dalam bawang putih mampu menghambat pertumbuhan sel kanker. Juga sesuai dengan penelitian Young Park dkk tahun 2005 dan penelitian Mirion dkk tahun 2007 bahwa *allicin* yang terdapat dalam bawang putih mampu menginduksi kematian sel kanker.

Pada penelitian ini terdapat pula variasi kematian sel, yaitu melalui apoptosis dan nekrosis. Variasi kematian sel tersebut mulai tampak pada dosis pertama (250 μg), tetapi perbedaan yang signifikan mulai tampak pada dosis 500 μg dan 1000 μg . Dari hasil analisis statistik tampak kematian melalui nekrosis jumlahnya lebih besar dari pada melalui apoptosis pada dosis tersebut.

Penelitian-penelitian pengaruh bawang putih terhadap penghambatan pertumbuhan sel cancer melalui apoptosis sudah banyak dilakukan. Senyawa organosulfur turunan bawang putih termasuk allicin, ajoene, DAS, DADS, DATS dan SAMC ditemukan dapat menginduksi apoptosis ketika ditambahkan ke dalam beragam kultur sel kanker. Pemberian ekstrak air bawang putih dan S-alilsistein dilaporkan meningkatkan apoptosis pada hewan coba untuk beberapa kanker oral.

Penelitian Karmakar dkk 2007 menunjukkan bahwa DAS dan DADS menginduksi apoptosis pada sel neuroblastoma maligna manusia SH-SY5Y dengan supresi faktor survival seperti IAP dan NF κ B dan aktivasi kalpain dan jalur caspase intrinsik. Baik DAS maupun DADS menginduksi apoptosis tergantung pada dosis yang dipakai, dan meskipun memiliki struktur yang berbeda, efikasi terapeutik terhadap kultur sel ini hampir sama.

Pemberian DAS dan DADS menginduksi peningkatan $[Ca^{2+}]$ intraseluler yang dapat memicu kematian sel. Mekanisme bagaimana DADS meningkatkan $[Ca^{2+}]$ intraseluler berkaitan dengan regulasi pengurangan protein anti apoptotik seluler dan stress retikulum endoplasma. Korelasi antara peningkatan $[Ca^{2+}]$ intraseluler dan induksi apoptosis dalam berbagai sel telah dilaporkan oleh peneliti lain.⁴²

4. Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak bawang putih meningkatkan jumlah apoptosis kultur sel HeLa pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ dan meningkatkan jumlah nekrosis pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ dan 1000 $\mu\text{g/mL}$. Selain itu disimpulkan pula bahwa terdapat variasi kematian sel yang bermakna yaitu apoptosis dan nekrosis pada kultur sel HeLa yang diberi ekstrak bawang putih konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ dan 1000 $\mu\text{g/mL}$.

5. Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dapat terlaksana berkat dukungan penuh dari Prof. Dr. Herri S Sastramihardja sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Unisba, dukungan finansial dari LPPM Unisba serta kerjasama dengan Lab. Parasitologi Bagian Kedokteran Tropis UGM dan Lab. Biomedis Fak. Kedokteran UNISBA.

6. Daftar Pustaka

- Lynn J, Shepherd MD, FRCSC, FACOG, Peter, Bryson SC. Human Papillomavirus-Lesson From History and Challenges for the Future. *J Obstet Gynaecol Can.* 2008 November; 30(11): p. 1025-33.
- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez A, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2007; 370: p. 890-907.
- Badan Registrasi Kanker. Ikatan Ahli Patologi Indonesia Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1998.
- Lee H.N, Firuza P, Santam C, Suresh S. The oncologic management of carcinoma cervix after primary treatment failure. *Indian J. Palliative Care.* 2005; 11(2): p. 82-92.
- Alfonso D-Gonzales, Marcela L, Myrna C, Lucely C, Caludia A, Eduardo C, et al. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular Cancer.* 2005; 4: p. 38.
- Ngan HYS, Stanley M, Liu SS, Ma HK. HPV and P53 in cervical cancer. *Genitourin Medical.* 1994; 70: p. 1888-901.
- Seong HJ, GwGuillaume M, Wienjec, Jessie LS. Enhancement of paclitaxel delivery to solid tumor by apoptosis inducing pretreatment: Effect of treatment schedule. *J. Pharmacology experimental therapeutic.* 2001.
- Stelios K. Faotio MD. Carcinoma of the uterine cervix-prognostic implications of the mode of therapy and quality of life. *CME Journal of Gynecologic Oncology.* 2001; 6: p. 385-90.
- Corney RH, Crowther ME, Everett H. Psychosexual dysfunction in women with gynaecological cancer following radical pelvic surgery. *J Obstet Gynaecol.* 1993; 100: p. 73.
- Amagase, Harunobu. 2006. Clarifying the Real Bioactive Constituents of Garlic. *The Journal of Nutrition* 136: 716S-725S
- Kamporo N. Penanganan kanker masa depan. In ; 2000; Denpasar. p. 34-41.
- Suwiyoga IK. Kanker Serviks: Evaluasi Faktor Risiko Klinis. *Maj. Obstet Ginekologi Indonesia.* 2000: p. 29-32.
- Suwiyoga IK. Beberapa Masalah Pap Smear sebagai Alat Diagnosis Dini Kanker Serviks. *Udayana Med. J.* 2004; 35(124): p. 79-82.

- Herrero *et al.* Population-Based Study of Human Papillomavirus Infection and Cervical Neoplasia in Rural Costa Rica. *J of Natl Cancer Inst.* 2000; 92(6): p. 464-74.
- Hausen Z. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000 May 3; 92(9): p. 690-8.
- D Mendoza-Villanueva, Diaz CL, Uribe FL, Rangel EC, Rangel EC, *et al.* Gene expression profile of cervical and skin tissues from human papillomavirus type 16 E6 transgenic mice. *BMC Cancer.* 2008; 8: p. 347.
- Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, *et al.* Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* 1999; 59(24): p. 6132-6.
- Rose F, Bundy B, Watkins E, *et al.* Concurrent cisplatin-based chemotherapy and radiotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med.* 1999; 340: p. 1141.
- Peter IW, Lin P, Barret HR. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of servix. *J. Clin Oncol.* 2000; 18(8): p. 1606.
- Wallin KL, Wiklund F, Angstrom T, Bergman F, Stendah U, Wadell G. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341: p. 1633-8.
- Clarke B, Chetty R. Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2001; 82: p. 238-46.
- Masumoto T, Fuji T, Ishikawa M, Saito M, Iwata T, Fukuchi T, *et al.* p16 overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Hum Pathol.* 2003; 34: p. 778-83.
- Tino F, Marek S, Achim S, Jacek W, Andrzej G, Pamela P. Immunogenicity and tolerability of an HPV-16/18 AS04-adjuvanted prophylactic cervical cancer vaccine in women aged 15-55 years. *Vaccine.* 2009; 27: p. 581-7.
- Cotrans RS, Kumar V, Robbins SL. *Robbins Pathologic Basis of Disease.* 8th ed. London: WB Saunders Co; 2009.
- Spitkovsky D, Aengeneyndt F, Braspenning J, Doeberitz VK. P53-independent growth regulation of cervical cancer cells by the papillomavirus E6 oncogene. *Oncogene.* 1996; 13: p. 1027-35.
- Cho HN, Kim TY, Kim JW. Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with Human Papillomavirus - Cyclin-Dependent kinase inhibitors. *Yonsei Med J.* 2002; 43(6): p. 722-8.
- LEE M, YANG H. Regulators of G1 cyclin-dependent kinases and cancers : Protein kinases. *Cancer metastasis reviews.* 2003; 22(4): p. 435-49.
- Pagano, Bloom. Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin Cancer Biol.* 2003 Feb; 13(1): p. 41-7.
- Crews CM, Shotwell JB. Small-molecule inhibitors of the cell cycle: an overview. *Progress in cell cycle research.* 2003; 5: p. 125-33.
- Espinosa M. Inhibitors of apoptosis proteins in human cervical cancer. *BMC Cancer.* 2006; 6: p. 45.
- Klein G. Cancer, apoptosis, and non immune surveillance. *Cell Death Differ.* 2004; 11: p. 13-7.
- Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell.* 2002; 1: p. 19-30.
- Petit PX, Susin SA, Zamzami N, Mignotte B, Kroemer G. Mitochondria and programmed cell death: Back to the future. *FEBS Lett.* 1996; 396: p. 7-13.
- Liang, J; Luo, G; Ning, X; Shi, Y; Zhai, H; Sun, S, *et al.* Differential expression of calcium-related genes in gastric cancer cells transfected with cellular prion protein. *Biochem Cell Biol.* 2007; 85: p. 375-83.
- Ting-Jun F, Li-Hui H, Ri-Shan C, Jin L. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* 2005; 37(11): p. 719-27.
- Dash P. www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash. [Online]. London: St. George's, University of London [cited 2009 December 2. Available from: HYPERLINK "<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/apoptosis.pdf>"]
- Mcknight J, Samuel B, Hugh F, O'Kane, Samuel R, Johnston, *et al.* Apoptosis and chemotherapy for bladder cancer. *J of Urology.* 2005 March; 173: p. 683-90.
- Amagase, H., B.L. Petesch, H. Matsuura, S. Kasuga, dan Y. Itakura. 2001. Intake of Garlic and Its Bioactive Components. *The Journal of Nutrition* 131:955S-962S
- El-Bayoumy, K., R. Sinha, J.T. Pinto, dan R.S. Rivlin. 2006. Cancer Chemoprevention by Garlic and Garlic-Containing Sulfur and Selenium Compounds. *The Journal of Nutrition* 136: 864S-869S.