

EFEK IMUNOMODULATOR EKSTRAK AIR CINCAU HITAM (*Mesona palustris* BL) TERHADAP KARSINOGENESIS MENCIT

[Immunomodulatory Effects of Water Extracts of Black Cincau (*Mesona palustris* BL)
on Carcinogenesis in Mice]

Tri Dewanti W.^{1)*}, Sukardiman²⁾, Djoko Agus P.³⁾, dan Win Darmanto⁴⁾

¹⁾ Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang

²⁾ Departemen Fitokimia dan Farmakognosi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

³⁾ Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

⁴⁾ Jurusan Biologi Fakultas Sain dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya

Diterima 14 Januari 2011 / Disetujui 12 Maret 2012

ABSTRACT

Janggolan or black cincau (*Mesona palustris* BL) is commonly consumed as dessert and also used as herbal remedy in the folk medicine. This study aimed to test the potency of water extract of black cincau in inhibiting fibrosarcoma cancer induced by benzo(a)pyrene. Mice used in this study were divided into 6 groups. Solution of benzo(a)pyrene 0.3% was given during two days for five times to induce cancer. Water extract of black cincau at concentration of 100, 500 and 1000 mg/kg BW was given daily for 2 weeks before initiation (induction of benzo(a)pyrene) during the initiation and until 4 weeks after initiation. The IFN- γ was observed with IFN- γ ELISA Kit immunosurveillance parameters while the CD 8^+ , NK cells and macrophages were observed with a flow cytometer. Cancer incidence was observed by palpation every week until 10 weeks after benzo(a)pyrene last induction. The results showed that a high dose of water extract of black cincau (1000 mg/kg BW) increased IFN- γ expression and immunosurveillance of CD 8^+ , NK cells and macrophages of the mice. The treatment also increased cell apoptosis and reduced the cancer incidence in mice by 57%.

Key words: apoptosis, black cincau (*Mesona palustris* BL), IFN- γ , immunomodulator, immunosurveillance

PENDAHULUAN

Cincau hitam merupakan makanan tradisional yang sudah lama dikenal di berbagai daerah Indonesia. Cincau hitam adalah bahan pangan yang biasa digunakan sebagai campuran untuk isian minuman segar (*dessert*), berbentuk gel yang menyerupai agar-agar. Minuman cincau hitam tidak saja hanya dikenal di Indonesia tetapi juga di negara-negara Asia seperti China, Taiwan, Korea, Jepang, Singapura dan Malaysia. Sejak jaman dahulu cincau hitam selain sebagai bahan pangan juga diyakini mempunyai khasiat sebagai obat. Cincau hitam dilaporkan dapat digunakan sebagai penurun panas dalam, demam, sakit perut (perut mual), diare, batuk, sariawan, pencegah gangguan pencernaan, dan penurun tekanan darah tinggi (Ruhnayat, 2002). Di Korea Selatan, cincau hitam yang dibuat dengan menambahkan rempah-rempah tertentu ke dalam adonannya, dipromosikan sebagai makanan kesehatan. Di China dan Taiwan cincau hitam yang disebut *hsian tsao* merupakan minuman herbal tradisional yang digunakan sebagai obat untuk hipertensi, diabetes dan liver (Hung dan Yen, 2002).

Hsian tsao adalah sejenis cincau hitam yang ada di China maupun Taiwan yang dibuat dari simplisia kering tanaman *Mesona procumbens* Hemsl, sedangkan cincau hitam yang ada di Indonesia termasuk jenis *Mesona palustris* BL (Haryadi et al., 2002). *Hsian tsao* sudah teridentifikasi mengandung senyawa

senyawa yang bersifat antioksidan, bahkan aktivitas antioksidannya lebih tinggi dari pada α -tokoferol (Hung dan Yen, 2001). Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat spesies oksigen reaktif/spesies nitrogen reaktif (ROS/RNS) dan juga radikal bebas sehingga antioksidan dapat mencegah penyakit-penyakit yang dihubungkan dengan radikal bebas seperti karsinogenesis, kardiovaskuler dan penuaan dini (Halliwell dan Gutteridge, 2000). Pada *hsian-tsao* (*Mesona procumbens* Hemsl) senyawa bioaktif yang bersifat antioksidan adalah senyawa komponen fenol (polifenol), triterpenoid (oleanolic acid dan ursolic acid), stigmasterol dan β -sitosterol (Hung dan Yen, 2001; Hung dan Yen, 2002). Komponen fenol ekstrak *hsian-tsao* dominan yang telah teridentifikasi adalah *protocatechuic acid*, β -hydroxybenzoic acid, *vanillic acid*, *caffeic acid* dan *syringic acid* (Hung dan Yen, 2002).

Komponen senyawa fenol dari beberapa tanaman telah terbukti mempunyai efek positif terhadap respon proliferasi dan sitolitik pada sel limfosit tetapi bersifat antiproliferasi dan toksik terhadap sel kanker (Tang dan Eisenbrand, 1992). Polifenol juga dapat menghambat penurunan kuantitas dan kualitas sel-sel imun limfosit T CD4, limfosit B, monosit/makrofag, sel NK dan sel *lymphokine activated killer* (LAK) yang disebabkan oleh radikal bebas sinar ultraviolet, bahan karsinogenik dan endotoksin (Katiyar et al., 1999). Hasil penelitian Yen et al. (2000), menunjukkan bahwa ekstrak *hsian-tsao* mampu melindungi sel limfosit dari kerusakan DNA akibat terpapar hidrogen peroksida dan UV. Yen et al. (2004) melanjutkan bahwa *water extract of hsian-tsao* ternyata juga dapat me-

*Korespondensi Penulis :
Email : tridewantiw@ub.ac.id

lindungi kerusakan hati tikus yang diinduksi dengan tert-butyl hydroperoxide. Yeh *et al.* (2008), meneliti efek *water extract of hsian-tsao* sebagai antihipertensi pada tikus dan Yang *et al.* (2008) meneliti aktivitas protektif terhadap renal pada tikus yang diabet. Hasilnya menunjukkan *water extract of hsian-tsao* memiliki aktivitas sebagai antihipertensi dan antidiabetes.

Berdasarkan laporan komponen bioaktif yang dikandung dan sifat antioksidan serta aktivitas biologis dari ekstrak *hsian-tsao* (*Mesona procumbens* Hemsl) tersebut, maka ekstrak air cincau hitam dari Indonesia (*Mesona palustris* BL) diduga berpotensi sebagai imunomodulator atau dapat meningkatkan sistem imun tubuh. Dalam hubungannya dengan sistem imun, lebih lanjut Vinardell dan Mitjaans (2008), menyatakan bahwa senyawa polifenol bersifat sebagai imunomodulator yaitu secara efektif dapat menghambat mitogen dan menstimulasi proliferasi *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC), produksi Ig, IL-2 dan interferon gama (IFN- γ). IFN- γ adalah sitokin utama yang mengaktifasi fagositosis sel mononuklear terhadap tumor (Cruse dan Lewis, 1999). IFN- γ juga sangat penting untuk menstimulasi komponen *immunosurveillance* yaitu sel NK, sel T sitotoksik (CD 8+) dan makrofag yang berperan terhadap proses killing dan apoptosis pada sel-sel kanker (Abbas *et al.*, 2005).

Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* terhadap mencit untuk menguji potensi ekstrak air cincau hitam (*Mesona palustris* BL) sebagai imunomodulator dengan peningkatan ekspresi IFN- γ dan peningkatan aktivitas komponen *immunosurveillance*: sel NK, sel T sitotoksik (CD 8+) dan makrofag yang berperan dalam karsinogenesis fibrosarkoma pada mencit akibat induksi benzo(a)pirena. Hal ini juga akan dapat menjadi dasar ilmiah untuk pengembangan ekstrak air cincau hitam (*Mesona palustris* BL) sebagai bahan pangan fungsional untuk meningkatkan sistem imun tubuh dan pencegahan kanker.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur BALB-C berumur 2–2,5 bulan dengan berat badan antara 20–30 g dari Laboratorium PUSVETMA Surabaya. Mencit dalam keadaan sehat berdasarkan pengamatan visual. Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia kering dari tanaman cincau hitam atau janggolan (*Mesona palustris* BL) yang terdiri dari seluruh bagian tanaman (batang, ranting dan daun). Sampel diambil dari daerah Magetan. Senyawa Benzo(a)pirena untuk karsinogenesis. Pada mencit reagen untuk analisis IFN- γ dari plasma darah mencit menggunakan Mouse IFN- γ ELISA Kit dari *Bender Med-Systems*. Untuk analisis jumlah sel T sitotoksik (CD 8+), sel natural killer dan makrofag dari limfa mencit, membutuhkan: PBS, antibody monoclonal untuk sel NK (e Bio science cat # 1,5911,81), CD 8+ (e Bio science cat # 11,0081,82) dan makrofag (*Santa Crus Sc* # 52699) dan *Apoptag Detection Kit* (*Bio Vision Apo-BrdtU-IHC™ Kit*).

Penyiapan larutan ekstrak air cincau hitam untuk dosis uji Induksi karsinogenesis dengan benzo(a)pirena

Ekstrak air cincau hitam hasil ekstraksi secara infusa (200 gram serbuk cincau hitam dengan 5 liter air) kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* sampai kental (\pm 600 ml) baru dilakukan *Freeze drying* sampai berbentuk bubuk halus atau serbuk dihitung rendemennya (Yen *et al.*, 2004). Serbuk ekstrak air cincau hitam untuk diberikan kepada mencit dibuat larutan terlebih dahulu dengan ditambahkan aquades dengan dosis 100; 500 dan 1000 mg/kg BB. Larutan dibuat saat akan diberikan pada mencit sehingga keadaan larutan selalu baru. Banyaknya larutan ekstrak air cincau hitam yang diberikan adalah 0,2 ml/30 g berat badan mencit.

Mencit jantan dibagi menjadi 6 kelompok secara random. Masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor mencit. Kelompok I merupakan perlakuan kontrol tanpa perlakuan ekstrak air cincau hitam dan tanpa diinduksi benzo(a)pirena hanya diberi aquades. Sedangkan Kelompok II – IV yaitu kelompok perlakuan ekstrak dengan dosis 100, 500 dan 1000 mg/kg BB, diberikan setiap hari selama 14 hari sebelum inisiasi (induksi benzo(a)pirena) dan selama inisiasi dan dilanjutkan sampai 4 minggu sejak inisiasi. Larutan benzo(a)pirena 0,3% di induksi setiap 2 hari sekali selama 5 kali. Kelompok V merupakan kontrol positif dengan induksi larutan benzo(a)pirena 0,3% dan tanpa perlakuan ekstrak air cincau hitam diganti aquades. Kelompok VI adalah perlakuan dengan menggunakan obat antikanker siklofosamid dosis 50 mg/Kg BB selama inisiasi dan dilanjutkan sampai 4 minggu sejak inisiasi dengan induksi larutan benzo(a)pirena 0,3%.

Setiap hari mencit diberi ekstrak air cincau hitam sesuai dosis perlakuan sebanyak 0,2 ml untuk setiap 30 g berat badan mencit dengan cara disonde. Induksi larutan benzo(a)pirena 0,3% juga diberikan sebanyak 0,2 ml untuk setiap 30 g berat badan mencit dengan cara disuntikkan secara subkutan pada tengkuk mencit setiap 2 hari sekali selama 5 kali. Pakan berupa pelet AD2 yang diproduksi oleh PT COMFED Surabaya dan air minum dalam botol diberikan secara *ad libitum*. Kandang pemeliharaan dalam kondisi bersih ditempatkan pada ruangan dengan sirkulasi udara yang cukup. Setiap minggu dilakukan penimbangan berat badan mencit dan palpasi. Setelah perlakuan selesai mencit dikorbankan dengan petroleum eter atau kloroform, diambil benjolan kanker yang terjadi dan dibedah bagian dada dengan gunting sehingga terlihat isi perutnya. Darah dan limfanya diambil untuk digunakan pemeriksaan lebih lanjut. Pemeriksaan IFN- γ dilakukan dengan *Mouse IFN- γ ELISA Kit* dari *Bender Med-Systems*. dan limfa untuk pemeriksaan sel NK, CD 8+ dan makrofag dengan metode *Flowcytometry*.

Isolasi darah dan limfosit dari limfa mencit

Mencit dibius menggunakan eter atau kloroform. Bagian dada mencit dibuka dengan menggunakan gunting sehingga terlihat jantung dan isi perutnya. Darah diambil dari vena dengan menggunakan syringe 1 ml dan dimasukkan tabung vac 5 ml yang telah diberi EDTA K3. Tabung disentrifus 4000 rpm selama 7 menit sehingga sel-sel darah mengendap. Bagian

yang bening diambil dan dimasukkan dalam tabung ependorf 1 ml untuk penentuan kadar IFN- γ menggunakan ELISA Kit.

Limfa diambil menggunakan pipet dan diletakkan pada cawan petri steril yang sudah diberi sPBS (steril PBS) pH 7,2. Limfa ditekan-tekan dengan alat penumbuk steril (ujung syringe), disaring menggunakan filter dan dibuang debrisnya. Suspensi sel dipindahkan menggunakan pipet steril ke tabung sentrifus 15 ml steril. Dilakukan sentrifus 1600 rpm selama 5 menit dan diambil supernatannya. Diambil sebanyak 1 ml dan dilakukan sentrifus pada 5000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatannya dibuang dan ditambahkan 400 μ L PBS pH 7,2 dan sampel siap dianalisis.

Penentuan kadar IFN- γ dengan metode ELISA

Untuk menentukan kadar IFN- γ dalam penelitian ini digunakan ELISA Kit (*Mouse IFN- γ ELISA Kit, Bender Med System*). Prosedur ELISA pada tahap berikutnya dilakukan mengikuti metode yang dilakukan oleh Purwanto *et al.* (2005) dengan beberapa modifikasi.

Microplate ELISA (96 well) dicuci dengan kira-kira 300 μ L wash *buffer*. Untuk pembuatan kurva standar sebanyak 100 μ L sampel diluent dimasukkan pada tiap well yang digunakan standar (biasanya well A-1 sampai H-1 dan A-2 sampai H-2) (H-1 dan H-2 digunakan untuk blanko). Ditambahkan 100 μ L ml IFN- γ standar pada well A-1 dan A-2 (duplo). Setelah dicampur, dari A-1 dan A-2 diambil 100 μ L dan dimasukkan ke B-1 dan B-2. Setelah dicampur, dari B-1 dan B-2 diambil 100 μ L dan dimasukkan ke C-1 dan C-2 dan seterusnya hingga sampai G-1 dan G-2 karena H-1 dan H-2 digunakan sebagai blanko.

Dengan demikian terjadi pengenceran dengan kadar ml IFN- γ standar berturut-turut 1000, 500, 250, 125, 63, 32, dan 16 pg/ml. Kemudian diambil dan dimasukkan 50 μ L *sample diluent* pada well sampel dan ditambahkan 50 μ L sampel. Ditambahkan 50 μ L *biotin conjugate* dan diinkubasi (*shaker* 200 rpm) selama 2 jam pada suhu ruang. Well *microplate* dicuci 3 x dengan wash *buffer* 300 μ L, kemudian ditambahkan 100 μ L Streptavidin-HRP pada setiap sampel, diinkubasi 1 jam pada *shaker* 200 rpm dengan suhu ruang. Well *microplate* dicuci 3 x dengan wash *buffer* dan di tambahkan 100 μ L TMB substrat solution pada semua well dan diinkubasi 10 menit pada suhu ruang. Ditambahkan stop solution 100 μ L untuk menghentikan reaksi. Setelah itu diukur kadar IFN- γ dengan menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm setelah diinkubasi selama 30 menit.

Pemeriksaan aktivitas sel NK, limfosit T sitotoksik (CD8+) dan makrofag dengan metode Flowcytometry

Untuk pemeriksaan dengan *flowcytometry* sesuai protokol, FACS CaliburTM flow-cytometer (BD-Biosciences). Diambil 1 ml supernatan dari sampel hasil isolasi limfosit dilakukan sentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Dibuang supernatannya dan ditambahkan 400 μ L sPBS pH 7,2 kemudian ditambahkan 100 μ L antibodi primer (2 ng/ml) sesuai dengan sel yang akan dianalisis yaitu sel CD8+, sel NK dan makrofag. Diinkubasikan selama 20 menit pada keadaan gelap dan sorting sel dibaca pada *flowcytometry* dengan mesin FACS CaliburTM flowcytometer, BD-Biosciences, San Jose, CA (Atochina dan Harn, 2005).

Pewarnaan imunohistokimia untuk penentuan jumlah sel yang mengalami apoptosis dengan metode Tunel Assay

Prinsip dari metode ini adalah perpaduan antara reaksi molekuler dengan imunohistokimia. Reaksi molekuler ditandai adanya ligasi antara fragmen DNA dengan degoxigenin melalui bantuan enzim TdT (Terminal deoxynucleotide Transferase), reaksi positif pada pemeriksaan imunohistokimia ditandai adanya reaksi antigen antibodi dan reaksi kimiawi antara enzim dengan substrat. Reagen yang dipakai adalah dari Bio Vision Apo-BrdU-IHC™ Kit (*Apotag Detection Kit*).

Prosedur pemeriksaan imunohistokimia apoptosis adalah sebagai berikut: Sampel berupa blok parafin jaringan kanker yang telah difiksasi dengan *buffer* formalin ditempatkan pada rak pengecetan, dilakukan *dewax* (deparafinisasi) dengan xylol sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Dilakukan hidrasi dengan alkohol absolut 100% selama 5 menit, alkohol 96% selama 5 menit, alkohol 70% selama 5 menit. Dilakukan pencucian dengan PBS. Diinkubasi dalam citrat *buffer* PH 6 dalam microwave, didinginkan pada suhu ruang selama 20 menit. Dicuci dengan PBS dua kali masing-masing 5 menit. Diinkubasi dalam Proteinase-K selama 15 menit. Dicuci PBS dua kali masing-masing 5 menit. Inkubasi dalam H2O2 3% selama 10 menit, dicuci kembali dengan PBS 2 x @ 5 menit. Inkubasi Equilibrium *Buffer* minimal 10 detik lalu dihisap cairan equilibrium *buffer* di sekitar jaringan tanpa dicuci. Diinkubasi dalam *working strength* TdT Enzyme selama 1 jam. Dicuci *working strength stop/wash buffer* digetarkan selama 15 detik dan diinkubasi selama 10 menit, dicuci PBS 2 x @ 5 menit. Diinkubasi dengan Anti-Degoxigenin conjugate selama 30 menit, dicuci dengan PBS 2 x @ 5 menit. Diinkubasikan dalam Peroxidase Substrat selama 6 menit, dicuci dengan aquadestilata 2 x @ 5 menit. Diinkubasi dalam Methyl Green 10 menit, dicuci dengan aquadestilata 2 x @ 5 menit, lalu dilakukan *Mounting*. Preparat slide hasil pewarnaan imunohistokimia diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 40 x lapangan pandang. Sel yang positif apoptosis berwarna kecoklatan (Liu *et al.*, 2001; Gregoraszcuk, 2008).

Pengolahan data dengan uji statistik SPSS

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan ANOVA untuk mengetahui pengaruh perlakuan dosis ekstrak air cincau hitam terhadap kadar IFN- γ , sel CD 8+, sel NK dan makrofag dan apoptosis. Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan kadar IFN- γ dengan peningkatan sel CD 8+, sel NK dan makrofag.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hubungan interferon gama (IFN- γ) dengan komponen immune surveillance

Persamaan kadar IFN- γ standar dan absorbansi yang ditentukan adalah: $Y = 0,060 X + 0,122$ dan nilai $R^2 = 0,953$. Hal ini menunjukkan bahwa koefisien korelasi (R) yang diperoleh sebesar 95,3%. Penentuan kadar IFN- γ pada plasma dihitung dari persamaan regresi tersebut.

Tubuh pada dasarnya mempunyai kemampuan untuk melawan benda asing yang masuk tubuh termasuk kanker. Pada hakekatnya *immune surveillance* adalah respon imun yang melindungi tubuh. *Immune surveillance* merupakan kegiatan imunologik yang melindungi tubuh dari penyakit, seperti halnya pada reaksi imunopatologik yang lain. Sel yang terlibat dalam *immune surveillance* terutama sel NK, sel T sitotoksik (CD 8+), dan makrofag (Abbas *et al.*, 2005). Interferon gama adalah limfokin yang dapat mengaktifasi komponen *immune surveillance* seperti sel NK, sel CD8+, makrofag dan sel LAK (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Hubungan ini dapat dilihat dengan koefisien korelasi yang cukup kuat antara IFN- γ dengan CD8+ (0,756); IFN- γ dengan sel NK (0,775); IFN- γ dengan makrofag (0,921). Korelasi antara variabel IFN- γ dengan sel NK, sel CD8+, makrofag sangat bermakna dapat dilihat pada Tabel. 1.

Tabel 1. Hasil uji korelasi antara IFN- γ dengan komponen *immune surveillance* pada mencit yang diinduksi benzo(a)pirena

Komponen yang Diuji	Hasil Uji Korelasi
IFN- γ dengan CD8+	Pearson correlation = 0,757 p = 0,00
IFN- γ dengan NK sel	Pearson correlation = 0,775 p = 0,00
IFN- γ dgnn Makrofag	Pearson correlation = 0,921 p = 0,00

Pengaruh dosis ekstrak air cincau hitam pada IFN- γ dan komponen *immune surveillance*

Perlakuan induksi benzo(a)pirena pada mencit menyebabkan terjadinya proses karsinogenesis. Benzo(a)pirena merupakan karsinogen yang sangat kuat untuk menimbulkan terjadinya kanker fibrosarkoma pada mencit. Mencit yang diinduksi benzo(a)pirena dan tanpa perlakuan pemberian ekstrak air cincau hitam pada percobaan ini semuanya mengalami karsinogenesis. Sedangkan mencit yang diberi perlakuan ekstrak air cincau hitam terjadi proses penghambatan karsinogenesis bahkan ada yang tidak terjadi proses karsinogenesis. Penghambatan proses karsinogenesis dapat terjadi karena peranan IFN- γ dan komponen *immune surveillance* (Abbas *et al.*, 2005; Kresno, 2001).

Tabel 2. Pengaruh perlakuan dosis ekstrak air cincau hitam terhadap rerata IFN- γ plasma darah mencit yang diinduksi benzo(a)pirena

Kelompok Perlakuan	N	Rerata IFN- γ	SD	Kenaikan IFN- γ	Brown Forsythe	
					Hasil	Kesimpulan
0	5	8,24	0,17	-	F= 31,54 p= 0,00	Berbeda nyata
100	5	10,96	1,37	turun		
500	5	17,0	2,20	1,33 kali		
1000	5	29,60	4,85	2,33 kali		
Kanker BP	5	12,70	0,44	-		
Obat antikanker (siklofosfamid)	5	19,08	4,98	1,50 kali		

Pemberian ekstrak air cincau hitam (dosis 500 dan 1000 mg/kg BB) pada mencit yang diinduksi benzo(a)pirena ternyata dapat meningkatkan kadar IFN- γ secara bermakna (p<0,05). Perlakuan ekstrak air cincau hitam dosis 1000 mg/kg BB menunjukkan peningkatan IFN- γ paling tinggi diantara perlakuan termasuk perlakuan dengan obat kanker siklofosfamid (Tabel 2). Ekstrak air cincau hitam mengandung senyawa polifenol yang cukup dominan yaitu 17,33% (Widyarningsih, 2009). Menurut Vinardell dan Mitjaans (2008) polifenol mempunyai efek sebagai antioksidan, anti radang, dan antikanker. Mekanisme antikanker pada polifenol yang telah diteliti sebelumnya antara lain menghambat sekresi interleukin-10 dan memicu sekresi interleukin-12 (Tosetti *et al.*, 2002). Interleukin-12 (IL-12) akan memicu sekresi IFN- γ (Abbas *et al.*, 2005). Selain senyawa polifenol senyawa bioaktif yang bersifat antioksidan pada *hsian tsaio* sejenis cincau hitam dari China adalah senyawa triterpenoid (oleanolic acid dan ursolic acid), sigmasterol dan β -sitosterol (Hung dan Yen, 2001; Hung dan Yen, 2002). Senyawa-senyawa bioaktif ini terbukti dapat meningkatkan IFN- γ melalui sekresi IL-12 (Chiang *et al.*, 2003).

Dari hasil analisis (Tabel 3, 4 dan 5) diperoleh peningkatan dosis ekstrak air cincau hitam ternyata juga menyebabkan kenaikan komponen *immune surveillance*, yaitu CD8+, Sel NK dan makrofag dibandingkan dengan yang tanpa pemberian ekstrak air cincau hitam (perlakuan kanker maupun kontrol). Hal ini karena semakin tinggi dosis ekstrak air cincau hitam kandungan senyawa bioaktifnya juga semakin meningkat sehingga menyebabkan kemampuan untuk mensekresi IFN- γ juga meningkat. Selanjutnya IFN- γ akan mengaktifasi komponen *immune surveillance* yaitu CD8+, sel NK dan makrofag sehingga jumlahnya akan meningkat juga (Abbas *et al.*, 2005). Gambar 1 menunjukkan pengaruh dosis ekstrak air cincau hitam terhadap komponen *immune surveillance*.

Tabel 3. Pengaruh perlakuan dosis ekstrak air cincau hitam terhadap rerata CD8+ plasma darah mencit yang diinduksi benzo(a)pirena

Kelompok Perlakuan	N	Rerata CD8+	SD	Kenaikan CD8+	ANOVA	
					Hasil	Kesimpulan
0	5	53,16	4,51	-	F = 112,93 p = 0,00	Berbeda nyata
100	5	46,20	5,20	1,29 kali		
500	5	56,81	7,17	1,59 kali		
1000	5	103,72	5,94	2,91 kali		
Kanker BP	5	35,65	6,76	-		
Obat antikanker (siklofosfamid)	5	96,41	5,24	2,70 kali		

Sel T sitotoksik atau sel CD8+ adalah sel yang paling berperan dalam menghancurkan infeksi virus, mikroba dan tumor/kanker. Pemberian ekstrak air cincau hitam dosis 500 dan 1,000 mg/kg BB selama perlakuan induksi benzo(a)pirena dapat meningkatkan jumlah sel CD8+ secara bermakna (p<0,05). Peningkatan sel CD8+ dapat juga sebagai indikator peningkatan sistem imun. Sel NK memegang peranan alamiah dan

kemampuan membunuh sel kanker. IFN- γ dan IL-2 menstimulasi sel NK secara langsung sehingga meningkatkan kemampuan sitotoksiknya. Pemberian ekstrak air cincau hitam dosis 500 dan 1000 g/kg BB selama perlakuan induksi benzo(a)pirena ternyata juga dapat meningkatkan jumlah sel NK secara bermakna ($p < 0,05$).

Makrofag merupakan komponen *immune surveillance* yang bertindak sebagai fagosit. Makrofag dapat membunuh sel tumor apabila telah diaktifkan oleh IFN- γ (Abbas *et al.*, 2005). Pemberian ekstrak air cincau hitam 100, 500 dan 1000 g/kg BB selama perlakuan induksi benzo(a)pirena ternyata juga dapat meningkatkan jumlah makrofag secara bermakna ($p < 0,05$). Dosis ekstrak air cincau hitam 1000 mg/kg BB bahkan dapat meningkatkan makrofag hingga 9 kali lipat dibandingkan perlakuan dengan obat antikanker siklofosfamid dosis 50 mg/Kg.

Tabel 4. Pengaruh perlakuan dosis ekstrak air cincau hitam terhadap rerata sel NK *limfe* mencit yang diinduksi benzo(a)pirena

Kelompok Perlakuan	N	Rerata Sel NK	SD	Kenaikan Sel NK	<i>Brown Forsythe*</i>	
					Hasil	Kesimpulan
0	5	36,39	3,76	-		
100	5	31,19	2,46	1,10 kali		
500	5	57,09	11,75	2,02 kali		
1000	5	84,85	3,70	2,99 kali	F= 108,11 p= 0,00	Berbeda nyata
Kanker BP	5	28,29	1,59	-		
Obat antikanker (siklofosfamid)	5	80,79	1,01	2,85 kali		

Tabel 5. Pengaruh perlakuan dosis ekstrak air cincau hitam terhadap rerata makrofag *limfe* mencit yang diinduksi benzo(a)pirena

Kelompok Perlakuan	N	Rerata makrofag	SD	Kenaikan Makrofag	<i>Brown Forsythe*</i>	
					Hasil	Kesimpulan
0	5	55,59	4,27	-		
100	5	106,51	7,50	2,85 kali		
500	5	136,30	14,27	3,65 kali		
1000	5	355,73	64,73	9,54 kali	F= 89,94 p= 0,00	Berbeda nyata
Kanker BP	5	37,26	3,95	-		
Obat antikanker (siklofosfamid)	5	229,42	18,33	6,15 kali		

Pengaruh pemberian ekstrak air cincau hitam terhadap insidensi kanker dan apoptosis

Perlakuan kanker (induksi benzo(a)pirena tanpa perlakuan ekstrak air cincau hitam) setelah 3 minggu induksi menyebabkan terjadinya karsinogenesis yang terlihat dari nodul yang mulai membesar pada semua sampel mencit (100%). Sedangkan perlakuan induksi benzo(a)pirena dan pemberian ekstrak air cincau hitam dengan dosis 100, 500 dan 1000 mg/kg BB

terjadinya karsinogenesis membutuhkan waktu yang lebih panjang (5–6 minggu setelah induksi). Insidensi atau penghambatannya juga lebih rendah karena tidak semua sampel mengalami karsinogenesis (Tabel 6).

Pada semua kelompok perlakuan ada mencit yang mati sebelum waktu pengamatan berakhir. Kematian terjadi setelah minggu ke 6 sehingga dapat disimpulkan kematian mencit karena kanker. Penghambatan karsinogenesis tertinggi terjadi pada pemberian ekstrak air cincau hitam dosis 1000 mg/kg BB (57%) bahkan sama dengan penghambatan perlakuan dengan obat kanker (siklofosfamid dosis 50 mg/Kg BB). Berdasarkan pengamatan sampai 10 minggu, mencit dengan perlakuan pemberian ekstrak air cincau hitam dosis 1000 mg/kg BB yang mengalami karsinogenesis, terjadi pengeringan pada nodul kankernya sama dengan perlakuan obat anti kanker siklofosfamid. Senyawa bioaktif pada ekstrak air cincau hitam terbukti dapat menghambat insidensi kanker dan menghambat proses karsinogenesis pada mencit yang diinduksi benzo (a)pirena. Penghambatan insidensi kanker dan karsinogenesis oleh ekstrak air cincau hitam terjadi karena kandungan senyawa bioaktifnya yang bersifat antioksidan dan imunomodulator.

Tabel 6. Jumlah insidensi karsinogenesis pada berbagai perlakuan tahap inisiasi dengan karsinogen benzo(a)pirena

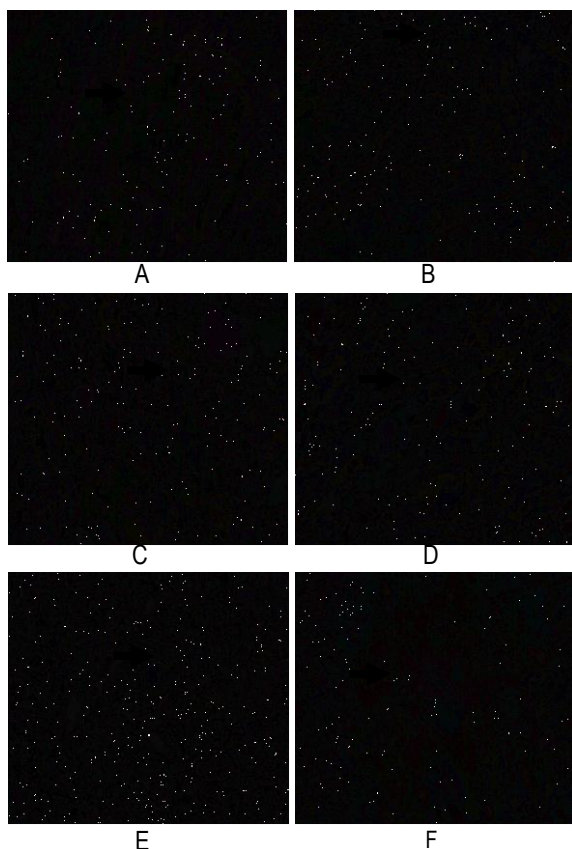
Kelompok Perlakuan	Jumlah Mencit	Jumlah Mencit Kanker	Insidensi Kanker (%)	Waktu Latensi (Minggu)	Jumlah Mencit Mati	Penghambatan (%)
Kanker – B(a)P	7	7	100	3	2	-
Dosis 100	7	6	85	5	2	15
Dosis 500	7	5	70	5	1	30
Dosis 1000	7	4	43	6	1	57
Obat antikanker (siklofosfamid)	7	4	43	6	1	57

Apoptosis pada mencit dengan perlakuan ekstrak air cincau hitam dosis 1000 mg/kgBB menunjukkan jumlah yang paling tinggi (Tabel 7), penampakan karsinogenesisnya juga berbeda dengan perlakuan yang tanpa ekstrak air cincau hitam. Pada perlakuan ekstrak air cincau hitam dosis 1000 mg/kg BB kanker yang timbul mengering sedangkan yang tanpa ekstrak air cincau hitam membesar dan basah.

Peningkatan jumlah sel yang mengalami apoptosis disebabkan karena peran komponen *immune surveillance*. Interaksi antara CD8+ dan juga sel NK dengan sel kanker akan memicu aktivasi gen supresi sehingga terjadi kematian sel secara apoptosis (Dotti *et al.*, 2005). Apoptosis juga dapat diinduksi oleh CD8+ dan sel NK yang diinduksi baik oleh *nonsecretory induced*, *ligand-induced*, dan *secretory induced* dengan granzyme melalui perantaraan sekresi perforin (Soini *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 2005). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak air cincau hitam dosis 1000 mg/kg BB dapat memicu terjadinya apoptosis yang dapat menghambat karsinogenesis.

Tabel 7. Pengaruh perlakuan dosis ekstrak air cincau hitam terhadap apoptosis pada karsinogenesis mencit yang diinduksi benzo(a)pirena

Kelompok Perlakuan	N	Rerata apoptosis	SD	Kenaikan Apoptosis	ANOVA	
					Hasil	Ke-simpulan
0	5	5,80	1,48	-		
100	5	13,00	2,34	2,95 kali		
500	5	18,44	2,07	4,19 kali	F= 120,5	Ber-beda Nyata
1000	5	34,40	3,50	7,81 kali	0	
Kanker BP	5	4,40	1,14	-	p= 0,00	
Obat antikanker (siklofosfamid)	5	30,40	3,64	6,90 kali		



Keterangan: A = perlakuan kontrol, EACH=0; B = perlakuan EACH 100 mg/kg BB; C = perlakuan EACH 500 mg/kg BB; D = perlakuan EACH 1000 mg/kg BB; E = perlakuan kontrol negatif benzo (a)pirena; F = perlakuan kontrol positif (obat anti kanker siklofosfamid 50 mg/Kg BB); Tanda panah menunjukkan sel yang mengalami apoptosis. Perbesaran 400 x EACH = Ekstrak Air Cincau Hitam

Gambar 1. Apoptosis jaringan kulit dengan Apoptag Detection Kit

Gambar 1, memperlihatkan terjadinya apoptosis pada jaringan kulit mencit. Perlakuan perlakuan dengan ekstrak air cincau hitam 1000 mg/kg BB dan perlakuan dengan obat antikanker siklofosfamid 50 mg/kg BB memperlihatkan banyak terjadi apoptosis.

KESIMPULAN

Ekstrak air cincau hitam (*Mesona palustris* BL) bersifat imunomodulator dengan meningkatnya ekspresi kadar IFN- γ dan komponen *immune surveillance* (sel NK, sel T sitotoksik (CD8+), dan makrofag) pada mencit yang diinduksi benzo(a)pirena. Ekstrak air cincau hitam mempunyai potensi dapat mencegah terjadinya karsinogenesis pada mencit yang diinduksi dengan karsinogen benzo(a)pirena. Hal ini juga ditunjang dengan terjadinya apoptosis pada mencit yang mengalami karsinogenesis. Perlakuan ekstrak air cincau hitam dosis 1000 mg/kg BB menunjukkan kenaikan jumlah apoptosis yang paling tinggi dengan persentase penghambatan karsinogenik sampai 57%.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. 2005. Cells and Tissue of the Immune System in Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Elsevier-Saunders. Philadelphia.

Atochina, Harn. 2005. LNFPIII/LeX-Stimulated Macrophages Activate Natural Killer Cells via CD40-CD40L Interaction. Clin Vaccine Immunol 12: 1041-1049.

Baratawidjaja KG, Rengganis I. 2010. Immunologi Dasar. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.

Chiang LC, Ng Lean T, Chiang W, Chang MY, Lin CC. 2003. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpeneoids, triterpeneoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of plantago species. Planta Med 69: 600-604.

Cruse JM, Lewis RE. 1999. Cytokines. In: Atlas of immunology. CRC Press. Boca Raton.

Dotti G, Savoldo B, Pule M, Karin C, Straathof, Biagi E, Yvon, Vigouroux S, Brenner, Rooney CM. 2005. Human cytotoxic T lymphocytes with reduced sensitivity to Fas-induced apoptosis. Blood 105: 4677-4684.

Gregoraszcuk. 2008. Modulatory effect of ghrelin in prepubertal porcine ovarian follicles. J Physiol Pharmacol 59: 781-793.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 2000. Free Radical In Biology And Medicine. Oxford University Press. New York.

Haryadi Purnamo D, Bangun P Nuswantoro. 2002. Purification of gel forming component extracted from janggolan (*Mesona palustris* BL) and characterization of the resulted gel. Dalam Proseding Seminar PATPI, Malang. Juli 30-31.

Hung CY, Yen GC. 2001. Extraction and Identification of Antioxidative Components of Hsian-Tsao (*Mesona*

- Procumbens* Hemsl). Academic Press. <http://www.idea-library.com> [18 September 2008].
- Hung CY, Yen GC. 2002. Antioxidant activity of phenolic compounds isolated from *Mesona Procumbens* Hemsl. *J Agric Food Chem* 50: 2993-2997.
- Katiyar SK, Matsui MS, Elmets CA, Mukhtar H. 1999: Polyphenolic antioxidant (-) epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. *Photochem Photobiol* 69: 148-153.
- Kresno Siti B. 2001. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Liu S, Edgerton SM, Moore DH, Thor AD. 2001. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their Association with survival in breast cancer. *Clin cancer res* 7: 1716-23.
- Purwanto Agus D, Retno PR, Toto P. 2005. Peningkatan Ekspresi Gen IFN- γ dan Aktivasi Fungsi Immuno surveillance oleh Ekstrak Air Teh Hijau. Laporan Penelitian Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Ruhnayat A. 2002. *Cincau Hitam Tanaman Obat Penyembuh*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Soini Y, Paakko P, Lehto V. 1998. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *American J of Pathology* 153: 1041-1053.
- Tang W, Einsenbrand G. 1992. *Chinese Drugs of Plant Origin : Chemistry, Pharmacology and Use in Traditional and Modern Medicine*. Spring-Verlag. New York. Pp 1011-1015.
- Tosetti F, Ferrari N, Deflora S, Albini A. 2002. Angioprevention: angiogenesis is a common key target for cancer chemopreventive agents. *FASEB J* 16: 2-14.
- Vinardell MP, Mitjaans. 2008. Immunomodulatory effects of polyphenols. *EJEAF Che* 7: 3356-3362.
- Widyaningsih TD. 2009. Potensi cincau hitam sebagai bahan pangan fungsional yang bersifat imunomodulator. *Prosiding Seminar Pengembangan Teknologi Berbasis Bahan Baku Lokal*. LIPI.
- Yang M, Xu ZP, Meng J, Ding QG, Zhang MX, Weng Y. 2008. Renal protective activity of hsian-tsao extracts in diabetic rats. *Biomedical and Environmental Sci* 21: 222-227.
- Yeh CT, Huang WH, Yen GC. 2008. Antihypertensive effects of hsian-tsao and its active compound in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem in Sci Direct*.
- Yen GC, Hung YL, Hsieh LC. 2000. Protective effect of extracts of *Mesona procumbens* Hemsl. on DNA damage in human lymphocytes exposed to hydrogen peroxide and UV irradiation. *Food Chem Toxicol* 38: 747-754.
- Yen GC, Yeh TC, Chen J Yen. 2004. Protective effect of *Mesona procumbens* against tert-butyl hydroperoxide-induced acute hepatic damage in rats. *J Agric and Food Chem* 52: 4121-4127.