

ARTIKEL

PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI 5FU-LEUCOVORIN DENGAN *PHALERIA MACROCARPA* TERHADAP DENSITAS SEL NK DAN EKSPRESI GRANZYMB TUMOR KOLON TIKUS *SPRAGUE DAWLEY*

disusun oleh

Syamsir Alam Lubis
22010112410036

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
Pada tanggal 2 Desember 2015
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,
Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr.dr. Selamat Budijitno, MSi.Med,Sp.B,Sp.B(K)Onk
NIP.19710807200812 1 001

dr.Johnny Syoeib Sp.B(K)BD
NIP.195210111982031001

Mengetahui,

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Dr.dr.RA. Kisdjiamiatun RMD, M.Sc
NIP. 196401301990032001

Pengaruh Pemberian Kombinasi 5fu-Leucovorin dengan *Phaleria Macrocarpa* Terhadap Densitas Sel-Nk Dan Ekspresi Granzym B Studi Eksperimental Tumor Kolon Tikus *Sprague Dawley*

Lubis SA*, Budijitno S**, Syoeib J ***

*) Residen Bedah Umum Universitas Diponegoro /RSUP Dr. Kariadi, Semarang

***) Staf Subbagian Bedah Onkologi Universitas Diponegoro / RSUP Dr. Kariadi, Semarang

****) Staf Subbagian Bedah Digestif Universitas Diponegoro / RSUP Dr. Kariadi, Semarang

Abstrak

Pendahuluan

5FU-leucovorin (5FU) sebagai agen kemoterapi standar pengobatan kanker kolon memiliki efek samping neutropenia berat dan penurunan fungsi sel *Natural Killer* (NK) yang dikenal memiliki sifat anti tumor. *Phaleria macrocarpa* (PM) dikenal sebagai imunostimulator dan diduga sebagai anti tumor. Ekstrak tanamannya dilaporkan berperan meningkatkan fungsi sel NK mengapoptosis sel tumor melalui jalur *perforin-granzym*. Pemberian PM bersama 5FU diharapkan meningkatkan densitas sel NK beserta ekspresi *granzym B* dan bersinergi dalam membunuh sel tumor.

Metode

12 ekor tikus *Sprague dawley* yang berhasil diinokulasi *adenokarsinoma* kolon dibagi menjadi kelompok kontrol (5FU) dan kelompok perlakuan (5FU + PM 0.495/hari). Setelah 7 minggu perlakuan dilakukan pemeriksaan histopatologi jaringan tumor. Densitas sel NK dan ekspresi *granzym B* kedua kelompok dianalisa statistik menggunakan *independent t test* dan uji korelasi *Pearson*

Hasil

5FU + PM meningkatkan densitas sel NK dan ekspresi *granzym B* secara bermakna ($P < 0.001$ dan $p = 0.002$) dibanding 5FU saja. Terdapat hubungan positif yang bermakna antara keduanya ($p = 0.001$ dan $r = 0,819$).

Kesimpulan

PM merupakan imunostimulator potensial yang memiliki efek sinergis bila diberikan bersama 5FU dalam meningkatkan densitas sel NK dan ekspresi *Granzym B*

Kata kunci : *Phaleria macrocarpa*, densitas sel NK, ekspresi *Granzym B*, 5FU-Leucovorin

The Effect Of 5FU-Leucovorin With Phaleria Macrocarpa Combination To Nk Cell Density And Granzym B Expression

Experiment Study To Colon Tumor Of Sprague Dawley Rat

Lubis SA*, Budijitno S**, Syoeib J ***

*) General Surgery Resident of Diponegoro University / RSUP Dr. Kariadi, Semarang

***) Staff on Oncology Surgery of Diponegoro University / RSUP Dr. Kariadi, Semarang

****) Staff on Digestive Surgery of Diponegoro University / RSUP Dr. Kariadi, Semarang

Abstract

Introduction

5 FU-leucovorin (5 FU) as standard chemotherapeutic agents colon cancer treatments have side effects severe neutropenia and decrease Natural Killer (NK) cell function as known as anti-tumor properties. *Phaleria macrocarpa* (PM) is known as immunostimulatory and anti-tumor suspected. Extracts of the plant reportedly served to increase NK cell function therefore triggering apoptotic tumor cells via the *perforin-granzym*. Giving PM along with 5FU is expected to increase the density of NK cells and its expression *granzym B* and synergy in killing tumor cells.

Methods

12 *Sprague Dawley* rats were successfully inoculated with colon *adenocarcinoma* then divided into a control group (5FU) and the treatment group (5FU + PM 0.495 / day). After 7 weeks of treatment histopathology of tumor tissue was examined. NK cell density and expression *granzym B* two groups were statistically analyzed by independent t test and Pearson correlation test.

Results

5 FU + PM increase NK cell density and expression of *Granzyme B* was significantly ($P < 0.001$ and $p = 0.002$) compared to 5FU alone. There is a significant positive correlation between NK cell density and expression of *granzym B* ($p = 0.001$ and $r = 0.819$).

Conclusions

PM is an immunostimulatory potential to have a synergistic effect when administered together with 5FU in enhancing NK cell density and expression *Granzym B*

Keywords: *Phaleria macrocarpa*, NK cell density, B granzym expression, 5FU –Leucovorin.

Pendahuluan

5FU - Leucovorin (5FU) adalah regimen kemoterapi adjuvant *lini pertama* yang saat ini direkomendasikan pada kanker kolorektal. Namun obat-obatan sitostatika seperti 5FU bersifat toksik dan memiliki efek samping merugikan, salah satunya yaitu immunosupresi. Cassidy dkk. melaporkan efek toksik neutropenia grade 3 sampai 4 yang sering terjadi akibat 5FU serta penurunan fungsi aktivitas dari sel *Natural Killer* (NK) yang signifikan.¹

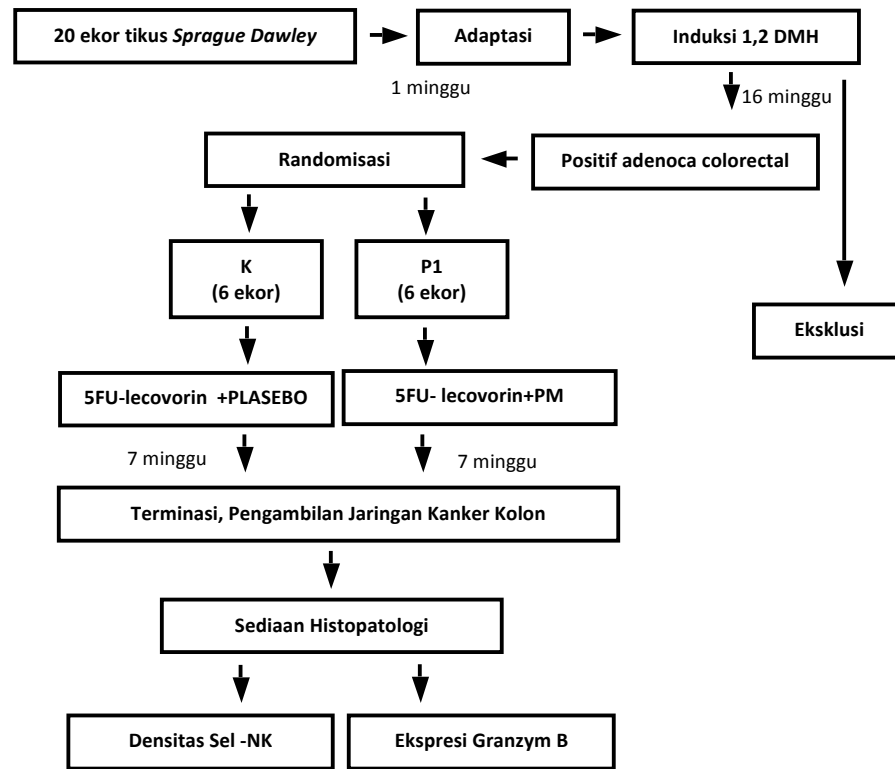
Tujuan dari terapi adjuvant dengan strategi yang berbasis imunitas yaitu merangsang sel-sel efektor imunitas untuk membunuh sel-sel maligna dengan hasil klinis yang mungkin lebih baik. sel NK memiliki peran penting dalam mengeliminasi sel tumor dalam sirkulasi.² Aktivitas Sel NK membunuh sel kanker melalui mekanisme *perforin dan granzyme* mirip *Citotoxic T Lymphocyte* (CTL) namun tanpa melalui ekspresi antigen tumor dengan molekul MHC kelas I sehingga biasanya lolos dari CTL, termasuk salah satunya adalah sel tumor kolorektal.³ Beberapa studi menunjukkan bahwa infiltrasi sel NK pada tumor ganas menghasilkan outcome klinis yang lebih baik dan *Disease Survival Rate* (DFS) pasien kanker kolon yang lebih lama.^{4,10} Aktivitas sel NK dapat ditingkatkan oleh sitokin-sitokin yang dihasilkan sel-sel imunosit seperti, interferon- γ , tumor necrosis factor- α and - β , and interleukin-12 (IL-12).⁵

Tanaman obat populer dari Indonesia, *Phaleria macrocarpa* (PM) dikenal sebagai imunostimulator dan diduga sebagai anti tumor. Ekstrak tanamannya berupa *Gallic acid* dan *flavonoid* dilaporkan berperan meningkatkan fungsi sel NK mengapoptosis sel tumor.⁶ Selain itu ekstrak polifenolnya memiliki efek protektif terhadap fungsi sel imunitas, antara lain meningkatkan kemotaksis makrofag, fagositosis, fungsi sel NK, limfoproliferasi dan IL-2.⁷ Riwanto dkk. melaporkan suplementasi PM dengan Adriamycin Cyclophosphamid (AC) memiliki efek sinergis dalam mengurangi pertumbuhan sel tumor payudara dengan menginduksi apoptosis, selain juga memiliki efek protektif terhadap toksisitas akibat pemberian AC.⁶

Penelitian ini ingin membuktikan pengaruh PM terhadap densitas sel NK dan ekspresi granzym B sel adenokarsinoma kolon tikus *Sprague dawley* yang diberi terapi utama 5FU.

Metode

Penelitian ini menggunakan tikus strain *Sprague dawley* (SD) yang diperoleh serta dirawat di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 4 (LPPT4), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dengan metoda eksperimental. 20 Tikus berusia 6-7 minggu, berat 200 gram diinokulasi tumor kolon dengan cara diinduksi 1,2 DMH dosis 30 mg/kgBB/minggu selama 7 minggu. Setelah inokulasi tumor berhasil, tikus dibagi secara acak menjadi 2 kelompok: kontrol (K); diberi 5FU + placebo, Perlakuan (P1); diberi 5FU + PM 0.495/hari. Tiap kelompok berjumlah 6 tikus sesuai dengan aturan jumlah minimal hewan coba World Health Organization (WHO). Ekstrak buah PM berupa etanol yang menggunakan metoda sokletasi, konsentrasi larutan 0,5 mg/mL, yang mengandung *3,4,5-trihydroxybenzoic acid* 10%, diberikan selama 7 minggu. 5FU (0.27 mg 5FU, 0.27mg leucovorin) diberikan tiap minggu intravena sebanyak 6 siklus. Setelah perlakuan selama 7 minggu tikus diterminasi dan dipersiapkan untuk pemeriksaan patologi menggunakan pengecatan imunohistokimia, sel NK menggunakan CD-56 dan ekspresi granzym B menggunakan antibody monoclonal anti granzyme B. Densitas sel NK dan ekspresi granzym B diukur oleh 2 ahli patologi anatomi dengan clinical agreement lebih dari 95%. Perbedaan kedua kelompok dianalisa dengan *independent t test* dan korelasi antara variabel Densitas sel NK dan ekspresi *granzym B* menggunakan uji *Pearson*. Hasil analisa statistik dianggap bermakna bila $P < 0.05$.



Gambar 1 Consolidated report penelitian

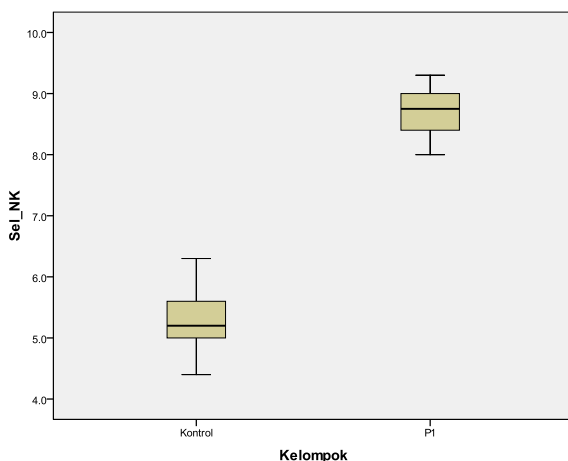
Hasil

Telah dilakukan penelitian 12 ekor tikus Sd yang berhasil diinokulasi sel *adenokarsinoma* kolon kemudian dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol (5FU) dan kelompok perlakuan (5FU + PM 0.495/hari).

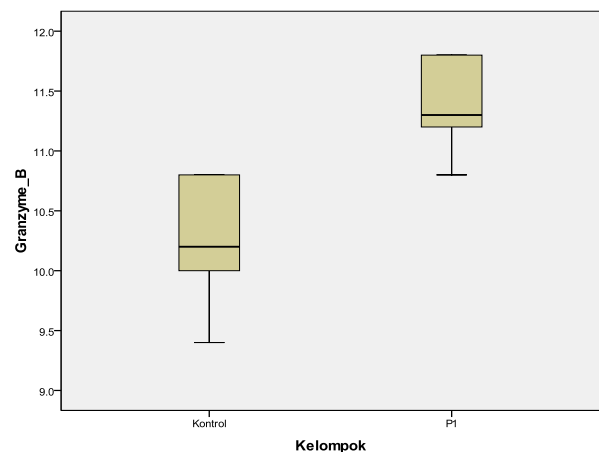
Tabel 1 Analisis perbedaan densitas sel NK antara kelompok Kontrol dan Perlakuan

Kelompok	N	Rerata±SD(%)	Median(%)	Min(%)	Max(%)
Kontrol (K)	6	5.283±0.64	5.200	4.4	6.3
Perlakuan (P1)	6	8.700±0.45	8.750	8.0	9.3

* Diuji dengan *independent t test* (signifikan $P < 0.05$)



Gambar 2 Box plot densitas sel NK (%) kelompok kontrol (K) (5 Fu+placebo), kelompok perlakuan (P1) (5 Fu+PM). terdapat perbedaan statistik yang bermakna antara kelompok K dan P1 (*independent t test* (signifikan $P < 0.05$)).



Gambar 3 Box plot ekspresi granzym B (%) kelompok kontrol (K) (5 Fu+placebo), kelompok perlakuan (P1) (5 Fu+PM). terdapat perbedaan statistik yang bermakna antara kelompok K dan P1 (*independent t test* (signifikan $P < 0.05$)).

Pada perkembangannya terdapat peningkatan rerata densitas sel NK sel adenokarsinoma kolon Sd kelompok perlakuan dibanding kelompok Kontrol yaitu berturut –turut 8.700 ± 0.45 % dibanding 5.283 ± 0.64 %. Secara statistik kedua kelompok berbeda secara bermakna (*independent t test*, $P < 0.000$).

Demikian juga rerata ekspresi *granzym B* sel adenokarsinoma kolon Sd kelompok perlakuan yang lebih tinggi dibanding kelompok perlakuan. Berturut – turut yaitu $11.367 \pm 0.39\%$ dibanding $10.233 \pm 0.54\%$. kedua kelompok secara statistik juga berbeda secara bermakna (*independent t test*, $P = 0.002$). terdapat korelasi positif yang bermakna antara peningkatan densitas sel NK dan ekspresi *granzym B* sel adenokarsinoma kolon Sd ($P = 0.001$ dan $r = 0,819$).

Tabel 2 Analisis perbedaan ekspresi granzym B antara kelompok Kontrol dan Perlakuan

Kelompok	N	Rerata \pm SD (%)	Median(%)	Min(%)	Max(%)
Kontrol(K)	6	10.233 \pm 0.54	10.200	9.4	10.8
Perlakuan(P1)	6	11.367 \pm 0.39	11.300	10.8	11.8

* Diuji dengan *independent t test* (signifikan $P < 0.05$)

Tabel 3 Uji korelasi pearson antara densitas sel NK dan ekspresi granzym B

Variabel	p	r
Sel NK	0,001	0,819
Granzym B		

* Diuji dengan *pearson* (signifikan $P < 0.05$)

Pembahasan

Suplementasi *phaleria macrocarpa* terhadap sel adenokarsinoma kolon tikus *Sprague dawley* yang diterapi 5 FU dapat meningkatkan densitas sel NK dan ekspresi *granzym B* secara bermakna dibandingkan yang hanya diberi placebo. 5 FU berperan sebagai anti tumor dengan cara menghambat sintesis dan fungsi DNA sel tumor yang menginduksi kematian sel tumor.^{7,8} Namun 5 FU memiliki efek toksik myelosupresi berupa neutropenia berat serta penurunan fungsi aktivitas sel NK yang signifikan.¹ Sel NK memiliki sifat anti tumor melalui jalur *caspase* dengan *perforin* dan *granzyme*, dimana salah satunya yaitu *Granzym B* yang merupakan proapoptosis yang paling kuat di antara anggota family *granzym* lainnya.^{10,11} Sel NK mampu melakukan sitotoksitas terhadap sel tumor yang tidak mengekspresikan MHC I yang biasanya terhindar dari sitotoksik sel imunitas lain seperti *Citotoxic T Lymfosit*.³ *Phaleria macrocarpa* berperan sebagai stimulator proliferasi sel NK dan regulator respon imun inangnya melalui kandungan *Gallic acid*, flavonoid dan poyphenolsnya.^{5,6,7} Suplementasi *phaleria macrocarpa* pada pengobatan 5 FU meningkatkan ekspresi *granzym B* secara bermakna dibanding pengobatan dengan 5 FU saja. Hal ini didukung dengan adanya hubungan positif antara densitas sel NK dan ekspresi *granzym B* ($P = 0.001$ dan $r = 0,819$). *Granzym B* suatu protease serin eksogen yang terdapat dalam granul-granul sel T-sitotoksik dan sel NK, dapat masuk ke sitoplasma sel kanker melalui lubang (pore) yang dibentuk oleh *perforin* kemudian mengaktifkan *caspase* endosom sel target yang kemudian menginduksi apoptosis.^{12,13,14}

Kesimpulan, *phaleria macrocarpa* memiliki potensi sebagai imunostimulator dan memiliki efek sinergis dengan 5 FU dalam meningkatkan densitas sel NK dan *granzym B* sel karsinoma kolon tikus *Sprague dawley*.

Daftar Pustaka

- Cassidy J, Twelves C, Van Cutsem E, et al: first-line capecitabine therapy in metastatic colorectal cancer: a favourable safety profile compared with intravenous 5-fluorouracil/leucoforin. *Annals of oncology* 2002;13:596-570.

- 2 Trapani JA, Smyth M J. Functional Significance of the perforin/ granzyme cell death pathway. *Int J Immunol.* 2002; 22 (2) : 735-47.
- 3 D.C. Bicknell, A . Rowan, and W. F. Bodmer, “ $\beta 2$ Mi crog lobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America:* 1994.vol. 91, 4751–4755
- 4 Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 2000;88: 577 – 83.
- 5 Agung BS, Faried A, Arifin MZ, Wiriadisastra K, Ohta T. Herbal Medicine Isolation, *Phaleria macrocarpa* for primary glioblastoma multiforme cells. *Ann Epidemiol.* 2008;18:708–41.
- 6 Riwanto I, Budijitno S, Dharmana E, Handoyo D, Prasetyo SA, Eko A, et al. Effect of *phaleria macrocarpa* supplementation on apoptosis and tumor growth of C3H mice with breast cancer under treatment with adriamycin- cyclophosphamide. *Int Surg.* 2011;96:164–70.
- 7 Han X, Shen T, Lou H. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int. J. Mol. Sci.* 2007;8,950-988.
- 8 Pallis AG, Mouzas IA. Adjuvant chemotherapy for colon cancer (Review). *Anticancer research.* 2006: 26: 4809-16.
- 9 Johnson PW. A less toxic regimen of 5-fluorouracil and high-dose folinic acid for advanced gastrointestinal adenocarcinomas. *British journal cancer.* 1991: 64: 603-5
- 10 Trapani JA. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Protein Family Review. Genome Biology* 2001;2(12).1-7.
- 11 Bots M, Madema JP. Granzymes at glance. *Journal of cell science.* 2006:119.5011-5014.
- 12 Peng YP, Zhu Y, Zhang JJ, Xu ZK, Qian ZY, Dai CC, et al. Comprehensive analysis of the percentage of surface receptors and cytotoxic granules positive natural killer cells in patients with pancreatic cancer, gastric cancer, and colorectal cancer. *J Transl Med (2013) 11:262.10.1186/1479-5876-11-262.*
- 13 Berke G, Clark WR. *Killer lymphocytes.* Dordrecht, Netherland: Springer; 2005. 201 -216
- 14 Kumar, Abbas, Fausto, Mitchell. *Robbins basic pathology 8th ed.* Philadelphia: Elsevier Saunders; 2007