

MODULASI CYP1A1 DAN GST SERTA EKSPRESI p53 DAN RAS
SETELAH INDUKSI 7,12-Dimethyl Benz(α)antrasen (DMBA) DAN
PEMBERIAN ANTI KARSINOGENESIS GYNURA PROCUMBENS
DAN CURCUMA ZEDOARIA PADA
TIKUS GALUR Sprague dawley

CYP1A1 AND GST MODULATION, p53 AND RAS EXPRESSION AFTER 7,12-
Dimethyl Benz(a)anthracene (DMBA) INDUCTION AND WERE GIVEN GYNURA
PROCUMBENS AND CURCUMA ZEDOARIA EXTRACT TO SPRAQUE DAWLEY
RATS

Iwan Sahrial Hamid^{1*}, Edy Meiyanto²

ABSTRACT

The aims of this experiment is to evaluate the inhibitory effect of ethanolic extract leaves of Gynura procumbens and Roots of Curcuma zedoaria administrated at pre initiation period on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced rat mammary carcinoma. Foamy five female Sprague Dawley rats with the age of 40 day, were randomly divided into 5 treatment. Treatment I, rats aged 54 day were given DMBA 20mg/kg bb. ig. twice a week for 5 weeks. Treatment II, rats were given DMBA and ethanolic extract of G. procumbens and C. zedoaria with dose 300 mg/kg bb. were given everyday during 7 weeks. Treatment III, same like 2nd treatment, these extracts with dose 750 mg/kg bb. Ig. Treatment IV, rats aged 40 day were given etanollic extract of G. procunibens and C. zedoaria with dose 300 mg/kg BB, everyday during 7 weeks. Treatment V, same as 4th group, these extracts with dose 750 mg/kg bb. Initiation with DMBA in all groups were started at 3 weeks of age. Palpation of mammary tumour was started at one week after the last DMBA treatment during 12 weeks to know about the tumour incidence. Necropsy was performed at 12 weeks after last DMBA treatment has been terminated to be taken up their mammary gland for Immunohistochemistry staining microscopic examination to analyze the expression of mutant p53 and H-ras protein. Result of this study demonstrated that etanolic extract of G. procumbens and C. zedoaria 300 mg/kg bb. and 750 mg/kg bb. could inhibit the development of DMBA-induced rat mammary tumour by reducing the tumour incidence, and the level expression of p53 and H-ras protein as a blocking and suppressing agent. It can be concluded that etanolic extract of G. procumbens and C. zedoaria are capable to delay the progression of mammary tumour, therefore it should be taken into account for chemopreventing agent in mammary tumor model.

Keywords: mammary carcinoma, incidence, p53, H-ras, Gynura procumbens and Curcuma zedoaria

¹ Basic Medical Science of Veteriner Departement, Airlangga University

² Pharmacy Chemical Laboratory on Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University

PENDAHULUAN

Bahan alam yang telah terbukti berkhasiat sebagai antikanker adalah daun Sambung nyawa (*Gynura procumbens*) dan rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*) yang menunjukkan efek farmakologis terhadap kanker. *Gynura procumbens* mengandung senyawa flavonoid seperti quersetin, polifenol, alkaloid dan sebagainya yang dapat menghambat karsinogenesis (Shapiro *et al.*, 1999). Quersetin sebagai senyawa golongan flavonoid yang terkandung di dalam tanaman tersebut kemungkinan besar memiliki potensi sebagai regulator negatif onkogen dan regulator positif gen tumor suppressor sehingga berpotensi sebagai anti-tumor melalui beberapa mekanisme, yakni menghambat proses sinyal transduksi, memacu cell cycle arrest, apoptosis, atau bahkan menghambat metastasis (Rizali dan Auerkari, 2003). Sedangkan *Curcuma zedoaria* mengandung sesquiterpen dan beberapa komponen lain yaitu germacrone-4,5-epoxide, germacrone, furanodienone, curzerenone, zederone, dehidrocurdione, curcumenol, isocurcumenol, curcumenone, curmanolide A dan curmanolide B. (Katzner, 2003). Senyawa penting yang terkandung dalam rimpang temu putih adalah kurkumin. Menurut penelitian yang dilakukan, Singletary, *et al.*, (1998) telah membuktikan bahwa senyawa kurkumin {(3-diketones diferuloil-metan) yang diisolasi dari ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) memiliki efek menginduksi enzim-enzim yang berperan dalam proses detoksifikasi tahap kedua yaitu GST (Glutathione S-Transferase), QR (Quinone Reductase) dan EROD (Ethoxy Resorufin O-Diethylase).

7,12-Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA) sebagai inisiator pembentukan kanker payudara memerlukan aktivasi metabolik oleh enzim yang secara normal ada dalam tubuh dan merupakan bagian dari proses metabolisme xenobiotik fase I, mekanisme aktivasi DMBA melibatkan enzim sitokrom P450 isoform CYP1A1

dan peroksidase menjadi *intermediate* reaktif yang dapat merusak DNA yaitu terbentuknya epoksida dihidrodiol dan kation radikal. Epoksida dehidrodiol akan mengikat gugus amino ekosiklik purin DNA secara kovalen menjadi bentuk *adduct* yang stabil, sedangkan kation radikal akan mengikat N7 atau C8 purin menjadi bentuk *adduct* tidak stabil yaitu depurinisasi menjadi tempat yang kehilangan purin pada DNA. Jalur epoksida dehidrodiol inilah yang bertanggung jawab terhadap inisiasi tumor karsinogenik DMBA dibanding bentuk kation radikal (Melendez-Colon *et al.*, 1999).

Kajian penelitian yang dianggap penting adalah analisis mekanisme karsinogenesis dan onkogenesis molekuler yang melibatkan aktivitas senyawa yang terkandung dalam tanaman obat. Mekanisme tersebut diperantarai oleh faktor dalam tubuh yang melibatkan regulasi enzimatis dan genetik, diantaranya ekspresi S-transferase (UST) dan sitokrom P450 (CYP1A1). Demikian pula regulasi gen penekan tumor *p53* dan *H-ras*. Penelitian tahap kedua ini dilakukan dengan pengamatan terhadap ekspresi *p53* dan *H-ras* pada sel epitel kelenjar mammae tikus.

METODE PENELITIAN

Perlakuan pada Hewan Percobaan

Disain penelitian ini pada dasarnya menggunakan model pre inisiasi DMBA yang dimaksudkan adalah pemberian ekstrak etanol senyawa anti kanker *Gynura procumbens* diberikan sebelum pemberian senyawa karsinogen DMBA. Hewan coba yang digunakan tikus putih galur *Sprague dawley* betina umur 40 hari dengan berat badan rata-rata 60-70 g. Tikus ditempatkan pada kandang dengan ukuran sama berupa bak dari plastik yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum, setiap bak terdapat 6-8 ekor tikus, pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*. Seluruh kandang ditempatkan pada satu ruang yang memiliki ventilasi cukup baik.

Sejumlah 45 ekor tikus betina galur *Sprague dawley* dikelompokkan menjadi lima kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan memerlukan 9 ekor tikus. Pengelompokan hewan percobaan pada setiap kelompok perlakuan adalah sebagai berikut.

Kelompok I: Kelompok Kontrol Positif DMBA. Pada umur 55 hari tikus diberi DMBA 20 mg/kg bb dalam corn oil intragastrik frekuensi seminggu dua kali selama lima minggu, mulai minggu ketiga sampai dengan akhir minggu ketujuh. Kelompok ini tanpa diberi ekstrak.

Kelompok II: Kelompok Perlakuan dosis ekstrak 300 mg/kg bb. Pada umur 40 hari tikus diberi ekstrak etanol *Gynura procumbens* dosis 300 mg/kgBB intragastric, pemberian dilakukan setiap hari selama tujuh minggu mulai minggu pertama sampai akhir minggu ketujuh, mulai diberikan dua minggu sebelum pemberian DMBA. DMBA 20 mg/kg bb intragastrik diberikan mulai minggu ke-3 sampai dengan akhir minggu ketujuh, pemberian dilakukan dua kali seminggu.

Kelompok III: Kelompok Perlakuan dosis ekstrak 750 mg/kg bb. Pada umur 40 hari tikus diberi ekstrak etanol *Gynura procumbens* dosis 750 mg/kgBB intragastrik, pemberian dilakukan setiap hari selama tujuh minggu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekspresi p53 pada Pemberian Ekstrak Gynura procumbens

Pemberian Ekstrak etanolik *Gynura procumbens* menunjukkan terjadinya penurunan ekspresi protein *Mutant p53* pada sel kelenjar mammae tikus galur *Sprague dawley* yang diinduksi DMBA ini yang sangat bermakna ($p < 0,05$) pada analisis varian satu arah. Pada Tabel 1 tampak adanya penurunan ekspresi *Mutant p53* protein pada masing-masing perlakuan ekstrak dibandingkan dengan perlakuan I.

Hasil pengamatan dan penghitungan persentase rata-rata ekspresi *Mutant p53* pada perlakuan I adalah $66,23 \pm 4,57$ dibandingkan dengan perlakuan II dengan persentase rata-rata $38,44 \pm 6,33$ menunjukkan terjadinya penurunan sebesar 41,95%. Demikian pula bila dibandingkan dengan perlakuan II dengan persentase rata-rata $43,97 \pm 4,31$ menunjukkan terjadinya penurunan sebesar 33,61%. Ekspresi *Mutant p53* pada Pemberian Ekstrak *Curcuma zedoaria* mulai minggu pertama sampai minggu ketujuh, mulai diberikan dua minggu sebelum pemberian DMBA. DMBA 20 mg/kg bb intragastrik diberikan mulai minggu ke-3 sampai dengan akhir minggu ketujuh, pemberian dilakukan dua kali seminggu.

Kelompok IV: Kelompok Perlakuan Kontrol Negatif ekstrak tanpa DMBA. Kelompok perlakuan ini hanya diberi ekstrak *Gynura procumbens* 300 mg/kg bb intragastrik pada tikus umur 40 hari, diberikan setiap hari mulai minggu pertama sampai dengan akhir minggu ketujuh. Kelompok perlakuan ini tanpa pemberian DMBA.

Kelompok V: Kelompok Perlakuan Kontrol Negatif Ekstrak. Kelompok perlakuan ini hanya diberi ekstrak *Gynura procumbens* 750 mg/kg bb intragastrik pada tikus umur 40 hari, diberikan setiap hari mulai minggu pertama sampai dengan akhir minggu ketujuh. Kelompok perlakuan ini tanpa pemberian DMBA.

Pengelompokan dan perlakuan yang sama juga dilakukan pada percobaan pemberian DMBA dan ekstrak *Curcuma Zedoaria*.

Pengelompokan dan perlakuan yang sama juga dilakukan pada percobaan pemberian DMBA dan ekstrak *Curcuma Zedoaria*.

Pengamatan pertama, sebanyak tiga ekor tikus pada setiap perlakuan dikorbankan dengan melakukan dislokasi pada leher, dilakukan pada akhir minggu keduabelas untuk pengamatan ekspresi gen *p53* dan *H-ras* pada organ

Tabel 1. Efek ekstrak etanolik *Gynura procumbens* terhadap peningkatan ekspresi *Mutant p53* pada sel epitel duktus mammae tikus yang diinduksi DMBA

Perlakuan	Rata-rata Jumlah sel terekspresi	Persentase Rata-rata $\pm$ SD	Penurunan (%)
I	70,00	66,23 $\pm$ 4,57	
II	43,33	38,44 $\pm$ 6,33 ⁶	41,95
III	48,33	43,97 $\pm$ 4,31 ⁶	33,61
IV	18,33	16,37 $\pm$ 2,04 ⁶	
V	15,67	14,61 $\pm$ 4,01 ⁶	

Keterangan:

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara perlakuan ($p < 0,05$).

Perlakuan I : DMBf 20 mg/kg bb.

Perlakuan II : DMBf 20 mg/kg bb + *Gynura procumbens* 300 mg/kg bb.

Perlakuan III : DMBA 20 mg/kg bb + *Gynura procumbens* 750 mg/kg bb.

Perlakuan IV : Ekstrak *Gynura procumbens* 300 mg/kg bb.

Perlakuan V : Ekstrak *Gynura procumbens* 750 mg/kg bb.

kelenjar mammae, dengan teknik imuno-histokimia.

Pengamatan kedua, sebanyak enam ekor tikus pada setiap perlakuan dikorbankan dengan melakukan dislokasi leher pada akhir minggu kesembilan belas untuk pengamatan insidensi pembentukan nodul tumor pada kelenjar mammae.

Hasil pengamatan uji imunohistokimia pada sel kelenjar mammae tikus menunjukkan bahwa pada pemberian ekstrak etanolik *Curcuma zedoaria* terjadi penurunan ekspresi protein *Mutant p53* pada sel kelenjar mammae tikus galur *Sprague dawley* yang diinduksi DMBA sangat bermakna ($p < 0,05$) pada analisis varian satu arah. Pada Tabel 2 tampak adanya penurunan ekspresi *Mutant p53* protein pada masing-masing perlakuan ekstrak dibandingkan dengan perlakuan I.

Persentase ekspresi *Mutant p53* sel epitel kelenjar mammae tertinggi didapatkan pada kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg bb sebesar $63,39 \pm 5,39\%$. Terdapat penurunan ekspresi *Mutant p53* secara signifikan ($p < 0,05$) sebesar 37,42% pada pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* 300 mg/kg bb dibandingkan dengan kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg bb. Penurunan persentase ekspresi *Mutant p53* juga terdapat pada pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* 750 mg/kg bb yaitu sebesar 29,87% dibandingkan dengan kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg bb.

Pemberian ekstrak etanol *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria* dosis 300 dan 750 mg/kg bb tampaknya memberikan hasil penurunan ekspresi *Mutant p53* dibandingkan dengan kelompok kontrol yang hanya diinduksi DMBA 20 mg/kg bb. Hal tersebut berarti terjadi hambatan pada ekspresi protein *Mutant p53* yang mengarah pada hambatan terjadinya mutasi pada gen *p53*. Berkaitan dengan tingginya ekspresi *Mutant p53* pada kelompok kontrol yang hanya diinduksi DMBA, hal tersebut tampaknya sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Molina, *et al.* (2000) bahwa kanker yang membawa perubahan genetik *p53* mempunyai karakter yang agresif. Protein *p53* adalah produk dari *tumor supresor gen* yang berada di kromosom manusia ke-17 yang kemudian akan mengatur proliferasi sel normal. Mutasi dari gen *p53* telah dilaporkan terjadi pada kanker payudara pada manusia, khususnya pada kanker stadium lanjut dan lebih agresif. Gen *p53* terekspresi pada level yang rendah pada sel normal ketika terjadi kerusakan DNA.

Penurunan ekspresi *Mutant p53* pada kelompok II lebih besar dibandingkan dengan kelompok III. Hal ini kemungkinan disebabkan karena mekanisme penghambatan karsinogenesis ekstrak etanolik *Gynura procumbens* maupun *Curcuma zedoaria* sebagai *blocking agent* dan

Tabel 2. Efek ekstrak etanolik *Curcuma zedoaria* terhadap peningkatan ekspresi *Mutant p53* pada sel epitel duktus mammae tikus yang diinduksi DMBA

Perlakuan	Rata-rata Jumlah sel terekspresi	Persentase Rata-rata f SD	Penurunan (%)
I	67,67	63,39 ± 5,39 ^a	–
II	44,00	39,67 ± 6,69 ^b	37,42
III	47,00	44,45 ± 5,34 ^b	29,87
IV	24,00	22,21 ± 4,47 ^c	
V	19,33	17,78 ± 1,79 ^c	

Keterangan:

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara perlakuan ($p < 0,05$).

suppressing agent pada dosis 300mg/kg bb lebih efektif dibandingkan dengan dosis 750mg/kg bb. Hal ini dikarenakan ekstrak etanolik *Gynura procumbens* maupun *Curcuma zedoaria* bekerja di fase yang pertama yaitu *blocking agent* dimana ekstrak ini mencegah perubahan bahan *procarcinogen* (DMBA) menjadi bahan *ultimate carcinogen* (epokside dehidrodiol) dengan meningkatkan aktivitas enzim GST yang bekerja mengkonjugasi bahan karsinogen tersebut untuk dikeluarkan dari dalam tubuh melalui ekskresi urin. Akibatnya kerusakan DNA atau kejadian mutasi dari *oncogene* dapat dihindari karena penghambatan pembentukan senyawa reaktif dan interaksinya dengan DNA.

Ekspresi *Mutant H-ras* pada Pemberian Ekstrak *Gynura procumbens*

Pemberian Ekstrak etanolik *Gynura procumbens* menunjukkan terjadinya penurunan ekspresi protein *Mutant H-ras* pada sel kelenjar mammae tikus galur *Sprague dawley* yang diinduksi DMBA ini yang sangat

bermakna ($p < 0,05$) pada analisis varian satu arah. Pada Tabel 3 tampak adanya penurunan ekspresi protein *Mutant H-ras* pada masing-masing perlakuan ekstrak dibandingkan dengan perlakuan I.

Hasil pengamatan dan penghitungan persentase rata-rata ekspresi *Mutant H-ras* pada perlakuan I adalah $61,54 \pm 3,50$ dibandingkan dengan perlakuan II dengan persentase rata-rata $39,32 \pm 7,12$ menunjukkan terjadinya penurunan sebesar 36,11%. Demikian pula bila dibandingkan dengan perlakuan II dengan persentase rata-rata $43,27 \pm 13,76$ menunjukkan terjadinya penurunan sebesar 29,69%.

Ekspresi *Mutant H-ras* pada Pemberian Ekstrak *Curcuma zedoaria*

Hasil pengamatan uji imunohistokimia pada sel kelenjar mammae tikus menunjukkan bahwa pada pemberian pemberian ekstrak etanolik *Curcuma zedoaria* terjadi penurunan ekspresi protein *Mutant H-ras* pada sel kelenjar mammae tikus galur *Sprague dawley* yang diinduksi

Tabel 3. Efek ekstrak etanolik *Gynura procumbens* terhadap peningkatan ekspresi *Mutant H-ras* pada sel epitel duktus mammae tikus yang diinduksi DMBA

Perlakuan	Rata-rata Jumlah sel terekspresi	Persentase Rata-rata ± SD	Penurunan (%)
I	66,33	61,54 ± 3,50	
II	41,33	39,32 ± 7,12 ^b	36,11
III	41,67	43,27 ± 13,76 ^b	29,69
IV	20,67	19,34 ± 7,73 ^c	
V	18,33	17,51 ± 5,83 ^c	

Keterangan:

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara perlakuan ($p < 0,05$).

DMBA sangat bermakna ($p < 0,05$) pada analisis varian satu arah. Pada Tabel 4 tampak adanya penurunan ekspresi *Mutant H-ras* protein pada masing-masing perlakuan ekstrak dibandingkan dengan perlakuan I.

Persentase ekspresi *Mutant H-ras* sel epitel kelenjar mammae tertinggi didapatkan pada kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg bb sebesar $70,41 \pm 1,33^8$. Terdapat penurunan ekspresi *Mutant H-ras* secara signifikan ($p < 0,05$) sebesar 30,28 pada pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* 300 mg/kg bb dibandingkan dengan kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg bb. Penurunan persentase ekspresi *Mutant H-ras* juga terdapat pada pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* 750 mg/kg bb yaitu sebesar 29,87% dibandingkan dengan kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg bb.

Pemberian ekstrak etanol *Gynura zedoaria* dan *Curcuma zedoaria* dosis 300 dan 750 mg/kg bb tampaknya memberikan hasil penurunan ekspresi *Mutant H-ras* dibandingkan dengan kelompok kontrol yang hanya diinduksi DMBA 20 mg/kg bb. Hal tersebut berarti terjadi hambatan pada ekspresi protein *Mutant H-ras* yang mengarah pada hambatan terjadinya mutasi pada gen *H-ras*. Hal tersebut tampaknya sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan Limtrakul *et al.* (2001) bahwa curcumin yang terkandung di dalam ekstrak *Curcuma zedoaria* dapat memblokir salah satu titik tangkap pada jalur sinyal transduksi awal yaitu ekspresi onkogen Fos dan Ras, salah satu titik tangkap tersebut diduga adalah Nf-KB.

Pada aras molekuler, metabolit reaktif DMBA telah dibuktikan mampu menimbulkan sires pada DNA melalui pembentukan *DNA adduct* di hepar pada dosis pemberian DMBA 12 mg/kgBB (Izzotti *et al.*, 1999). Akibat *DNA adduct* tersebut dapat mempengaruhi perubahan ekspresi gen regulator pertumbuhan (Perjesi *et al.*, 2006) seperti onkogen *H-ras* pada sel kelenjar mammae. Pada fase inisiasi, kemungkinan titik tangkap penekanan ekspresi *H-ras* pada sel epitel kelenjar mammae adalah pada penghambatan aktivasi DMBA menjadi *ultimate carcinogen* yang menyebabkan abnormalitas pada sel hepar dengan ditunjukkan meningkatnya ekspresi protein *H-ras* karena terbentuknya *DNA adduct*. Target aksi yang efektif pada penghambatan tersebut adalah enzim-enzim pemetabolisme baik fase I dan II. Pada enzim pemetabolisme fase I, kemampuan ekstrak dalam mengurangi ekspresi *H-ras* sel hepar dapat dimungkinkan melalui penghambatan aktivasi DMBA dalam bentuk *ultimate carcinogen* tersebut. Enzim sitokrom P450 (CYP) dikenal sebagai enzim pemacu aktivasi senyawa prokarsinogen menjadi karsinogen. Keluarga enzim sitokrom P450 yang terlibat dalam aktivasi DMBA adalah CYP1A1 dan CYP1B1 (Smart dan Akunda, 2001). Sehingga penghambatan ekspresi dan aktivitas sitokrom P450 dapat menghambat aktivasi DMBA.

Penurunan ekspresi *Mutant H-ras* pada kelompok II lebih besar dibandingkan dengan kelompok III.

Tabel 4. Efek ekstrak etanolik *Curcuma zedoaria* terhadap peningkatan ekspresi *Mutant H-ras* pada sel epitel duktus mammae tikus yang diinduksi DMBA

Perlakuan	Rata-rata Jumlah sel terekspresi	Persentase Rata-rata $\pm$ SD	Penurunan (%)
I	67,67	$70,41 \pm 1,33^8$	
II	44,00	$49,09 \pm 14,14^6$	30,28
III	47,00	$48,63 \pm 12,20^6$	30,93
IV	24,00	$19,92 \pm 6,91^*$	
V	19,33	$16,59 \pm 3,73^*$	

Keterangan:

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara perlakuan ($p < 0,05$)

Hal ini kemungkinan disebabkan karena mekanisme penghambatan karsinogenesis ekstrak etanolik *Gynura procumbens* maupun *Curcuma zedoaria* sebagai *blocking agent* dan *suppressing agent* pada dosis 300mg/kgBB lebih efektif dibandingkan dengan dosis 750mg/kgBB. Hal ini dikarenakan ekstrak etanolik *Gynura procumbens* maupun *Curcuma zedoaria* bekerja di fase yang pertama yaitu *blocking agent* dimana ekstrak ini mencegah perubahan bahan *procarcinogen* (DMBA) menjadi bahan *ultimate carcinogen* (epokside dehidrodiol) dengan meningkatkan aktivitas enzim GST yang bekerja mengkonjugasi bahan karcinogen tersebut untuk dikeluarkan dari dalam tubuh melalui ekskresi urin. Akibatnya kerusakan DNA atau kejadian mutasi dari *oncogene* dapat dihindari karena penghambatan pembentukan senyawa reaktif dan interaksinya dengan DNA.

Insidensi Tumor Kelenjar Mamae pada Pemberian Gynura procumbens

Pengamatan terhadap uji antikarsinogenesis dilakukan secara makroskopis yang meliputi jumlah tikus yang terkena tumor (insidensi) pada setiap perlakuan. Pengamatan dilakukan selama 12 minggu setelah inisiasi DMBA terakhir. Hasil induksi DMBA dosis 20 mg/kg BB, frekuensi pemberian 10 kali pemberian, memunculkan nodul pertama kali pada mammae tikus pada minggu ketiga setelah inisiasi DMBA terakhir. Insidensi timbulnya nodul mencapai 100% (semua tikus dalam satu kelompok terkena kanker) terjadi pada minggu ke-12, dengan per-

kembangan jumlah nodul per tikus yang begitu pesat dan ukuran nodul yang besar.

Tikus perlakuan II dan III tampak pertumbuhan kanker tidak begitu pesat, nodul pertama kali muncul pada minggu keenam. Secara makroskopis tikus perlakuan IV dan V tidak menunjukkan adanya pertumbuhan kanker payudara hingga akhir pengamatan. Kecenderungan muncul kanker pada perlakuan II, dilihat dari jumlah tikus yang terkena kanker pada flap kelompok (insidensi), lebih sedikit dibandingkan dengan perlakuan III. Pada minggu ke-12, perlakuan II terdapat dua ekor tikus yang muncul kanker, sedangkan pada perlakuan III terdapat lima ekor tikus yang muncul nodul.

Hewan uji dipalpasi setiap akhir minggu untuk mengetahui munculnya nodul. Sampai akhir pengamatan yaitu pada minggu ke-12 setelah inisiasi DMBA yang terakhir, pada perlakuan I insidensi mencapai angka 100%, Sedangkan pada perlakuan II dan III dibandingkan dengan perlakuan I mengalami penurunan insidensi yang berarti ada penghambatan terhadap pertumbuhan kanker payudara.

Berdasarkan analisa statistik, sampai akhir pengamatan (minggu ke-19) pada perlakuan II insidensi mencapai angka 33,3% ($p < 0,05$), dan perlakuan III insidensi mencapai 83,3% ($p < 0,05$). Tampak insidensi kanker payudara perlakuan II dibandingkan dengan perlakuan I berbeda signifikan dan mengalami penurunan sebesar 66,7%. Sedangkan insidensi kanker payudara

Tabel 5. Efek ekstrak etanolik *G. procumbens* terhadap insidensi kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA

Perlakuan	Jumlah tikus yang diuji	Jumlah tikus terkena kanker	Insidensi (%)	Penurunan Insidensi (%)
I	6	6	100 ^e	
II	6	2	33,3 ^b	66,70
III	6	5	83,3 ^b	16,70
IV	6	0	0	
V	6	0	0	

Keterangan:

Superskrip yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara perlakuan ($p < 0,05$).

perlakuan In juga berbeda signifikan dibanding dengan perlakuan I dan mengalami penurunan sebesar 16,7 (Tabel 5).

Selain dapat menurunkan jumlah tikus yang terkena tumor (insidensi) ternyata ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* juga dapat mempengaruhi waktu mula munculnya nodul pada kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA. Terjadi penundaan waktu timbulnya nodul pada kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA karena pemberian ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens*. Pada perlakuan I waktu mula muncul nodul terjadi pada minggu ke-3 setelah inisiasi DMBA terakhir. Pada perlakuan II nodul pertama muncul pada minggu ke-6 setelah inisiasi DMBA terakhir, Sedangkan pada perlakuan III nodul pertama muncul pada minggu ke-6 setelah inisiasi DMBA terakhir. Pada kedua dosis di atas terjadi penundaan waktu mula munculnya nodul sekitar 2 minggu dibanding perlakuan I.

Insidensi Tumor Kelenjar Mamae pada Pemberian Curcuma zedoaria

Hasil induksi DMBA dosis 20 mg/kg BB, frekuensi pemberian 10 kali pemberian, memunculkan nodul pertama kali pada mammae tikus pada minggu ketiga setelah inisiasi DMBA terakhir. ZL1S1del1S1 tunbUlnya nodal melcapai 100% (semua tikus dalam satu kelompok terkena kanker) terjadi pada minggu ke-12, dengan perkembangan jumlah nodul per tikus yang begitu pesat dan ukuran nodul yang besar.

Tikus perlakuan II dan III tampak

pertumbuhan kanker tidak begitu pesat, nodul pertama kali muncul pada minggu keenam. Secara makroskopis tikus perlakuan IV dan V tidak menunjukkan adanya pertumbuhan kanker payudara hingga akhir pengamatan. Kecenderungan muncul kanker pada perlakuan II, dilihat dari jumlah tikes yang terkena kanker pada tiap kelompok (insidensi), lebih sedikit dibandingkan dengan perlakuan III. Pada minggu ke-12, perlakuan II terdapat tiga ekor tikes yang muncul kanker, sedangkan pada perlakuan III terdapat empat ekor tikes yang muncul nodal.

Hewan uji dipalpasi setiap akhir minggu untuk mengetahui munculnya nodal. Sampai akhir pengamatan yaitu pada minggu ke-12 setelah inisiasi DMBA yang terakhir, pada perlakuan I insidensi mencapai angka 100%, Sedangkan pada perlakuan II dan III dibandingkan dengan perlakuan I mengalami penurunan insidensi yang berarti ada penghambatan terhadap pertumbuhan kanker payudara.

Berdasarkan analisa statistik, sampai akhir pengamatan (minggu ke-19) pada perlakuan II insidensi mencapai angka 50,00% ($p < 0,05$), dan perlakuan III insidensi mencapai 66,67% ($p < 0,05$). Tampak insidensi kanker payudara perlakuan II dibandingkan dengan perlakuan I berbeda signifikan dan mengalami penurunan sebesar 50,00%. Sedangkan insidensi kanker payudara perlakuan III juga berbeda signifikan dibanding dengan perlakuan I dan mengalami penurunan sebesar 33,30%.

Tabel 6. Efek ekstrak etanolik *C. zedoaria* terhadap insidensi kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA

Perlakuan	Jumlah tikes yang diuji	Jumlah tikes terkena kanker	Insidensi (%)	Penurunan Insidensi (%)
I	6	6	100	
II	6	3	50,00 b	50,00
III	6	4	66,67 b	33,30
IV	6	0	0	
V	6	0	0	

Keterangan:

Superskrip yang berbeda pada kolom dan baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara perlakuan ($p < 0,05$).

Hasil data insidensi kanker payudara pada kelompok I menunjukkan kejadian insidensi tumor mencapai 100%. Hal ini membuktikan bahwa senyawa karsinogen 7,12-dimetilbenz(a)antrasen (DMBA) golongan PAH (Polisiklik Aromatik Hidrokarbon) sangat spesifik untuk pembuatan model kanker payudara pada hewan uji tikus secara intragastrik dengan pemberian *multiple dose carcinogen* lebih meningkatkan insidensi atau frekuensi terjadinya kanker payudara (Kubatka *et al.*, 2002).

Ekstrak etanolik *G. procumbens* yang mengandung senyawa flavonoid sejenis flavon atau flavonol mampu menghambat efek karsinogenesis melalui penurunan insidensi kanker payudara. Hal ini juga sejalan dengan penelitian Sugiyanto (2003) bahwa senyawa flavonoid golongan flavon dan flavonol dalatri fraksi etil asetat ekstrak etanolik *Gynura procumbens* dapat menghambat pertumbuhan sel mieloma dan sel vero melalui penghambatan proliferasi, pemacuan apoptosis dan penghambatan angiogenesis yang diduga berperan pada efek penurunan insidensi dan *tumour multiplicity*.

Pada kelompok IV dan V tidak terjadi insidensi kanker payudara. Hal ini terjadi mungkin karena ekstrak etanolik *Gynura procumbens* tidak mempunyai kaIdiIlig2iI yang dapat memiCU terjadinya kanker. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Susilowati (2002) yang menunjukkan tidak adanya toksisitas yang ditimbulkan oleh ekstrak etanolik *Gynura procumbens* pada kelenjar mammae tikus. Secara makroskopis kelenjar mammae yang diperiksa menunjukkan tanda-tanda normal.

Pada kelompok perlakuan II didapat penunman insidensi kanker payudara lebih tinggi daripada kelompok III, hal ini terjadi diduga karena pada ekstrak etanolik *Gynura procumbens* dosis 300mg/kgBB lebih mampu secara nyata dan efektif dalam menurunkan insidensi kanker

payudara melalui penghambatan karsinogenesis pada mekanisme *blocking agent* dalam tahap inisiasi karsinogenesis, sementara pada dosis 750mg/kgBB lebih bekerja menghambat karsinogenesis melalui mekanismenya sebagai *suppressing agent*.

Kurkumin yang terkandung dalam *Curcuma zedoaria* adalah suatu senyawa fenol yang secara luas digunakan sebagai rempah-rempah dan pewarna makanan. Studi invivo dan invitro menunjukkan mekanisme mencegah inisiasi pembentukan kerusakan DNA dan juga terlibat dalam antipromosi pada mekanisme yang memperantarai terjadinya apoptosis. Sejumlah studi pada hewan juga menunjukkan bahwa kurkumin efektif di dalam menghambat karsinogenesis pada kanker kulit, kolon, rongga muliut, lambung dan kelenjar mainae (Tamimi, *et al.*, 2002).

Simpulan

Berdasarkan evaluasi dan analisis hasil penelitian, maka secara umum dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanolik *Gynura procumbens* (Lour) Merr dan *Curcuma zedoaria* yang diberikan setiap hari selama dua minggu dengan dosis 300 mg/kgBB dan 750 mg/kgBB sebelum inisiasi dan lima minggu selama inisiasi 7,12-dimetilbenz(a)antrasen (DMBA). Mampu menghambat ekspresi p53 dan H-ras mutan sel kelenjar mammae serta mampu menurunkan insidensi tumor kelenjar mammae.

DAFTAR PUSTAKA

- Izzotti, Alberto, Camoirano, Anna, Cartiglia, C., Grubbs, & Clinton J., 1999, Patterns of DNA Adduct Formation in Liver and Mammary Epithelial Cells of Rats Treated with 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene, and Selective Effects of Chemopreventive Agents, *J.Can. Res.*, 59, 4285-4290
- Katzer, G. 2003. Zedoary (*Curcuma zedoaria* [Christm.] Rosc.). diambil dari <http://www.uni-graz.at/~katzer/html40-gk-ext.dtd>.

- Kubatka, P., Ahlersova, E., Ahlers, I., Bojkova, B., Kalicka, K., Adamekova, E., Markova, M., Chamilova, M., Cermakova, M. 2002. Variability of Mammary Carcinogenesis Induction in Female Sprague-Dawley and Wistar-Kyoto Rats: The Effect of Season and Age, *Physiol. Res.*, 51,633-640
- Limtrakul, P., S. Anuchapreeda, S. Lipigorngoson and F. W., Dunn, 2001. Inhibition of carcinogen induced c-Ha-ras and c-fos protooncogenes expression by dietary curcumin. *BMC Cancer*. 1:1
- Melendez-Colon,V., L Luch, A. Seidel and A. Baird. 1999. Cancer Initiation by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Results from Formation of Stable DNA Adducts rather than Apurinic Sites, *Carcinogenesis*, 20 (10), 1885-1891
- Molina, R., Segui, M.A., Climent MA. 1998. p53 oncoprotein as a prognostic indicator in patients with breast cancer. *Anticancer Res.* 1998; 18:507-511.
- Perjesi, P., Ember, I., Bozak, RE., Nadasi, E., Rozmer Z., Varjas, T., & Hicks, RJ., 2006, Effect of the chalcone analog E,E-bis(2-hydroxybenzylidene) acetone on the 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced Ha-ras gene activity in vivo, *In vivo*, 20(1), 141-146
- Rizali, E dan Auerkari E.I. 2003. Teknik Pewarnaan Silver (AgNOR) Sebagai Salah Satu Cara Menentukan Aktivitas Proliferasi Sel Tumor dan Apoptosis, *Jurnal Kedokteran Gigi Indonesia*, 10(3), 41-45
- Smart, R.C. & Akunda, J.K., 2001, Carcinogenesis, in Hodgson, E., dan Smart, R., C., 2001, *Introductions to biochemical Toxicology*, 3rd Ed., A John Wiley & Sons, Inc, New York
- Shapiro, G.I. & Harper, J.W., 1999, Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control, *J. Clin. Invest.*, 104, 1645-1653
- Singletary, K., Macdonald, C., and Wallig, M. 1997. The Plasticizer Benzyl Butyl Phthalate (BBP) Inhibits 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced rat Mammary DNA Adduct Formation and Tumorigenesis, *Carcinogenesis* 18 (8) 1669-1673
- Sugiyanto, Sudarto, B., Meiyanto, E., Nugroho, AE dan Jenie, U.A., 2003, Aktivitas antikarsinogenik senyawa yang berasal dari tumbuhan, *MFI*, 14 (4), 216-225.
- Tamimi, R. M., P. Lagiou, H. Adami, D. Trichopoulos. 2002. Prospects For Chemoprevention of Cancer, *Journal of Internal Medicine*, 251 (4), 286-300