

## LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING XV.2



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

**Modulasi CYP1A1 Dan GST Serta Ekspresi p53 Dan RAS Setelah  
Induksi 7,12-Dimethyl Benz(á)antracen (DMBA) Dan Pemberian  
Anti Karsinogenesis *Gynura procumbens* Dan *Curcuma zedoaria*  
Pada Tikus Galur *Sprague dawley***

**Iwan Sahrial Hamid, M.Si., Drh.  
Dr. Edy Meiyanto, M.Si., Apt.**

**DIBIYAI OLEH DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI  
DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL**

**Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Penelitian dan  
Pengabdian Kepada Masyarakat Nomor : 319/SP2H/PP/DP2M III/2008  
Tanggal 29 April 2008**

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2008**

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING XV.2

KFC  
KK  
LP. 230/10  
Ham  
m



**Modulasi CYP1A1 Dan GST Serta Ekspresi p53 Dan RAS Setelah  
Induksi 7,12-Dimethyl Benz(ó)antrasen (DMBA) Dan Pemberian  
Anti Karsinogenesis *Gynura procumbens* Dan *Curcuma zedoaria*  
Pada Tikus Galur *Sprague dawley***

**Iwan Sahrial Hamid, M.Si., Drh.  
Dr. Edy Meiyanto, M.Si., Apt.**

**DIBIYAI OLEH DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI  
DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL  
Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Penelitian dan  
Pengabdian Kepada Masyarakat Nomor : 319/SP2H/PP/DP2M III/2008  
Tanggal 29 April 2008**

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2008**

## HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR

1. Judul Penelitian : Modulasi CYP1A1 Dan GST Serta Ekspresi p53 Dan RAS Setelah Induksi 7,12-Dimethyl Benz(á)antrasen (DMBA) Dan Pemberian Anti Karsinogenesis *Gynura procumbens* Dan *Curcuma zedoaria* Pada Tikus Galur *Sprague dawley*.

2. Ketua Peneliti :

- a. Nama Lengkap : Iwan Sahrial Hamid, MSi., drh.
- b. Jenis Kelamin : Laki-laki
- c. N I P : 132047721
- d. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
- e. Jabatan Struktural : Pembina / IVa
- f. Bidang Keahlian : Farmakologi, Biologi Molekuler
- g. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan /Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
- i. Tim Peneliti :

No	Nama dan Gelar Akademik	Bidang keahlian	Fakultas/ Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Iwan Sahrial Hamid, M.Si., drh.	Imuno farmakologi	Fak. Kedokteran Hewan, IKDV	Universitas Airlangga
2.	Dr. Edy Meiyanto, M.Si, Apt.	Onkologi molekuler	Fak. Farmasi, Kimia Farmasi	Universitas Gadjah Mada

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian :

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 (dua) tahun
- b. Biaya Total yang diusulkan : Rp. 99.500.000,-
- c. Biaya yang disetujui tahun II : Rp. 35.000.000,-

Surabaya, 24 Desember 2008

Ketua Peneliti,

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

Prof. Hj. Romziah Sidik, PhD., drh.  
NIP. 130 687 305

Iwan Sahrial Hamid, M.Si., drh.  
NIP. 132 047 721

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian

Prof. Dr. Bambang Sektiari L.,DEA, drh.  
NIP. 131 837 004



## RINGKASAN

Modulasi CYP1A1 Dan GST Serta Ekspresi *p53* Dan *RAS* Setelah Induksi 7,12-Dimethyl Benz(a)antrasen (DMBA) Dan Pemberian Anti Karsinogenesis *Gynura procumbens* Dan *Curcuma zedoaria* Pada Tikus Galur *Sprague dawley*.

( Iwan Sahrial Hamid dan Edy Meiyanto. 2008, 85 halaman )

Daun Sambung nyawa (*Gynura procumbens*) dan rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*) menunjukkan efek farmakologis terhadap kanker. *Gynura procumbens* mengandung senyawa flavonoid, quersetin, polifenol, alkaloid dan sebagainya yang dapat menghambat karsinogenesis (Shapiro *et al.*, 1999). Flavonoid dan quersetin 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* *Curcuma zedoaria* mengandung sesquiterpen dan beberapa komponen lain yaitu germacrone-4,5-epoxide, germacrone, furanodienone, curzerenone, zederone, dehydrocurdione, curcumenol, isocurcumenol, curcumenone, curmanolide A dan curmanolide B. (Katzer, 2003).

Dimetilbenz(a)antrasen 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 menjadi *intermediate* reaktif yang dapat merusak DNA yaitu terbentuknya epokside dihidrodiol dan kation radikal. Epokside dihidrodiol 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 pada DNA. DNA-*adduct* yang terjadi sebagai aktivitas karsinogen *benzilic carbonium* mengawali terjadinya mutasi pada gen *p53* dan *ras* (Gregus & Klaasen, 2001).

Hasil penelitian sebelumnya pengamatan ekspresi CYP1A1 dan GST $\mu$  menunjukkan adanya hambatan karsinogenesis pada pemberian ekstrak *Gynura*

*procumbens* dan *Curcuma Zedoaria* melalui hambatan ekspresi CYP1A1 dan peningkatan ekspresi GST $\mu$ .

Tujuan Penelitian ini adalah mengetahui ekspresi gen *p53* dan H-ras pada sel epitel kelenjar mammae tikus galur *Sprague dawley* yang diinduksi DMBA dan diberi ekstrak etanol *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria* serta mengetahui insidensi pertumbuhan nodul tumor pada kelenjar mammae.

Disain penelitian ini pada dasarnya menggunakan model pre inisiasi DMBA yang dimaksudkan adalah pemberian ekstrak etanol senyawa anti kanker *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria* 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 gram. Sejumlah 90 ekor tikus betina galur *Sprague dawley* dikelompokkan menjadi lima kelompok perlakuan, baik untuk kelompok *Gynura procumbens* maupun untuk *Curcuma zedoaria*. Setiap kelompok perlakuan memerlukan 9 ekor tikus. Kedua ekstrak diberikan dengan dosis 300 dan 750 mg/kg bb, sedangkan DMBA diberikan dosis 20 mg/kg bb. Akhir minggu ke 12, 3 ekor dari setiap perlakuan dikurbankan dan diisolasi organ kelenjar mammae untuk dianalisis imunohistokimia terhadap ekspresi *p53* dan H-ras. Akhir minggu ke 19, 6 ekor tikus dari setiap perlakuan diambil data pengamatan nodul tumor dengan palpasi pada kelenjar mammae.

Hasil penelitian menunjukkan 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)anthracene (DMBA) mampu menghambat ekspresi *p53* dan H-ras mutan sel kelenjar mammae, serta mampu menurunkan insidensi tumor kelenjar mammae.

**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 Sprague Dawley Rats**

Iwan Sahrial Hamid\*, Edy Meiyanto\*\*

\*) Basic Medical Science of Veteriner Departement, Airlangga University , \*\*) Pharmacy Chemical Laboratory on Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University

**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. Fourty 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 2<sup>nd</sup> treatment, these extracts with dose 750 mg/kg bb. Ig. Treatment IV, rats aged 40 day were given ethanolic extract of *G. procumbens* and *C. zedoaria* with dose 300 mg/kg BB, everyday during 7 weeks. Treatment V, same as 4<sup>th</sup> 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.

Key words : mammary carcinoma , incidence, p53, H-ras, *Gynura procumbens* and *Curcuma zedoaria*.

Modulasi CYP1A1 Dan GST Serta Ekspresi *p53* Dan *RAS* Setelah Induksi 7,12-Dimethyl Benz( $\alpha$ )antrasen (DMBA) Dan Pemberian Anti Karsinogenesis *Gynura procumbens* Dan *Curcuma zedoaria* Pada Tikus Galur *Sprague dawley*.

Abstrak

Iwan Sahrial Hamid\* dan Edy Meiyanto\*\*

\*)Departemen Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Unair,  
\*\*) Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi UGM

Penelitian ini mempunyai tujuan untuk mengamati pengaruh hambatan oleh ekstrak etanol daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*) dan rimpang kunyit putih (*Curcuma zedoaria*) yang diberikan sebelum inisiasi 7,12-Dimethyl Benz( $\alpha$ )antrasen (DMBA) pada karsinoma kelenjar mammae tikus. Sebanyak 45 ekor tikus betina galur *Sprague dawley* umur 40 hari digunakan pada masing-masing percobaan *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria*. Masing-masing percobaan terbagi ke dalam lima kelompok perlakuan. Perlakuan I sebagai kontrol positif, tikus diinisiasi dengan DMBA 20 mg/kg bb ig dua kali seminggu selama lima minggu. Perlakuan II tikus diberi DMBA dan dua minggu sebelumnya diberi ekstrak etanol *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria* 300 mg/kg bb. ig setiap hari selama tujuh minggu. Perlakuan III sama dengan Perlakuan II tetapi ekstraknya dosis 750 mg/kg bb. Perlakuan IV tikus diberi ekstrak *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria* 300 mg/kg bb tanpa inisiasi DMBA setiap hari selama tujuh minggu dan Perlakuan V sama dengan Perlakuan IV tetapi diberi ekstrak dosis 750 mg/kg bb. Pada akhir minggu ke 12, sebanyak 3 ekor tikus dikorbankan untuk dilakukan analisis ekspresi *p53* dan *H-ras* pada kelenjar mammae melalui teknik imunohistokimia. Sedangkan untuk mengetahui insidensi tumor dilakukan pengamatan pada 6 ekor tikus setiap perlakuan melalui palpasi kelenjar mammae mulai minggu pertama pemberian DMBA terakhir sampai dengan minggu ke 12. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ada hambatan pada ekspresi *p53* dan *H-ras* mutan oleh ekstrak *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria* baik dosis 300 maupun 750 mg/kg bb. Hal tersebut tampak pada penurunan persentasi ekspresi *p53* dan *H-ras* dibandingkan dengan kelompok kontrol DMBA. Insidensi Tumor kelenjar mammae juga mengalami penurunan pada kelompok tikus yang diinisiasi DMBA dan sebelumnya diberi ekstrak. Hasil penelitian ini disimpulkan bahwa pemberian ekstrak *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria* dapat mencegah terjadinya progresi tumor kelenjar mammae dan sebagai agen kemopreventif terhadap tumor kelenjar mammae.

Kata Kunci : karsinoma mammae, insidensi, *p53*, *H-ras*, *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria*.



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah swt. atas segala limpahan rahmadNya penelitian yang berjudul “ Modulasi CYP1A1 Dan GST Serta Ekspresi *p53* Dan *RAS* Setelah Induksi 7,12-Dimethyl Benz(á)antrasen (DMBA) Dan Pemberian Anti Karsinogenesis *Gynura procumbens* Dan *Curcuma zedoaria* Pada Tikus Galur *Sprague dawley* “ dapat kami selesaikan. Kajian utama dalam penelitian ini adalah pemanfaatan tanaman sambung nyawa (*G. procumbens*) dan kunyit putih (*C. zedoaria*) sebagai kemopreventif pada model kanker keleujar mammae tikus. Kajian ilmiah yang dihasilkan meliputi pengamatan molekuler tentang mekanisme efek ekstrak tanaman tersebut terhadap ekspresi enzim CYP1A1 dan GST (tahun I) serta secara genetis pengamatan terhadap ekspresi gen *p53* dan *H-ras* (tahun II).

Ucapan terima kasih kami sampaikan Dirjen Dikti Depdiknas melalui proyek penelitian DP2M yang telah mengalokasikan dana untuk penelitian Hibah Bersaing XV. Terima kasih kami sampaikan pula kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Unair yang telah member kesempatan dan perkenannya untuk melaksanakan penelitian ini. Kepada segenap pimpinan Laboratorium (Patologi FKH Unair, Biologi Molekuler FKH Unair, PA RS. Sardjito Yogyakarta, CCRC Farmasi UGM) tempat dilakukannya penelitian ini disampaikan terima kasih.

Masih banyaknya kekurangan dan keterbatasan laporan penelitian ini, memberi kesempatan pada pembaca untuk kritik dan sarannya demi peningkatan kualitas. Besar harapan semoga hasil penelitian bermanfaat bagi kemajuan ilmu.

Surabaya, 24 Desember 2004

Penulis

## DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Penelitian	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Hipotesis	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Karsinogenesis pada Kanker Payudara oleh DMBA	7
2.2. Tinjauan Gen <i>p53</i>	12
2.2.1. Peran <i>p53</i> pada <i>cell cycle</i>	14
2.2.2. Peran <i>p53</i> pada <i>DNA repair</i>	17
2.2.3. Mutasi gen <i>p53</i> pada Kanker Payudara	19
2.3. Tinjauan Gen Ras	20
2.4. Tinjauan Tanaman <i>Gynura procumbens</i> sebagai Antikanker	22
2.5. Tinjauan Tanaman <i>Curcuma zedoaria</i> sebagai Antikanker	27
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	30
3.1. Tujuan Penelitian	30
3.1.1. Tujuan Umum	30
3.1.2. Tujuan Khusus	30
3.2. Manfaat Penelitian	30
BAB 4. METODE PENELITIAN	32
4.1. Waktu dan Tempat Penelitian	32
4.2. Materi Penelitian	32
4.2.1. Hewan percobaan	30
4.2.2. Bahan penelitian	30
4.2.3. Alat penelitian	33
4.3. Variabel Penelitian	34
4.4. Metode Penelitian	34
4.4.1. Pembuatan ekstrak etanolik daun <i>G. procumbens</i>	34
4.4.2. Pembuatan larutan DMBA dalam minyak jagung	35
4.4.3. Penyiapan sediaan uji	35
4.4.4. Perlakuan pada hewan percobaan	36
4.4.5. Uji imunohistokimia ekspresi protein <i>p53</i> dan H-ras	40

4.4.6. Pengamatan insidensi tumor	43
4.5. Analisis Data	44
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	<b>45</b>
5.1. Ekspresi p53 pada Pemberian Ekstrak <i>G. procumbens</i>	45
5.2. Ekspresi p53 pada Pemberian Ekstrak <i>C. zedoaria</i>	47
5.3. Ekspresi H-ras pada Pemberian Ekstrak <i>G. procumbens</i>	51
5.4. Ekspresi H-ras pada pemberian Ekstrak <i>C. Zedoaria</i>	53
5.5. Insidensi Tumor Kelenjar Mamae pada Pemberian Ekstrak <i>G. Procumbens</i>	58
5.6. Insidensi Tumor Kelenjar Mamae pada Pemberian Ekstrak <i>C. Zedoaria</i>	60
<b>BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	<b>66</b>
6.1. Kesimpulan	66
6.2. Saran	66
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>67</b>
<b>LAMPIRAN</b>	<b>74</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 5.1. Efek ekstrak etanolik <i>Gynura procumbens</i> terhadap peningkatan ekspresi <i>Mutant p53</i> pada sel epitel duktus mammae tikus yang diinduksi DMBA	45
Tabel 5.2. Efek ekstrak etanolik <i>Curcuma zedoaria</i> terhadap peningkatan ekspresi <i>Mutant p53</i> pada sel epitel duktus mammae tikus yang diinduksi DMBA	47
Tabel 5.3. Efek ekstrak etanolik <i>Gynura procumbens</i> terhadap peningkatan ekspresi <i>Mutant H-ras</i> pada sel epitel duktus mammae tikus yang diinduksi DMBA	51
Tabel 5.4. Efek ekstrak etanolik <i>Curcuma zedoaria</i> terhadap peningkatan ekspresi <i>Mutant H-ras</i> pada sel epitel duktus mammae tikus yang diinduksi DMBA	53
Tabel 5.5. Efek ekstrak etanolik <i>G. procumbens</i> terhadap insidensi kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA	59
Tabel 5.6. Efek ekstrak etanolik <i>C. zedoaria</i> terhadap insidensi kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA	63

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur kimia 7,12-dimetilbenz(a)antrasen	8
Gambar 2.2. Jalur metabolisme 7,12-dimetilbenz(a)antrasen	10
Gambar 2.3. <i>p53</i> -target gen dan alur fisiologisnya	17
Gambar 2.4. Model <i>re-entry</i> ke dalam sel setelah G1 arrest.	18
Gambar 2.5. Daun Tanaman <i>Gynura procumbens</i>	23
Gambar 2.6. Struktur kimia Quarcetin	25
Gambar 2.7. Daun dan bunga <i>Curcuma zedoaria</i> (A) Rimpang dari <i>Curcuma zedoaria</i> atau temu putih (B)	29
Gambar 5.1. Ekspresi <i>Mutant p53</i> pada sel epitel kelenjar mammae tikus setelah pemberian <i>Gynura procumbens</i> dan inisiasi dengan DMBA, ditunjukkan dengan warna coklat gelap pada sitoplasma dan inti sel (panah merah), sedangkan yang tidak mengekspresikan <i>Mutant p53</i> ditunjukkan warna putih pada sitoplasma sel dengan inti gelap (panah hitam).	46
Gambar 5.2. Ekspresi <i>Mutant p53</i> pada sel epitel kelenjar mammae tikus setelah pemberian ekstrak <i>Curcuma zedoaria</i> dan inisiasi DMBA, ditunjukkan dengan warna coklat gelap pada sitoplasma dan inti sel (panah merah), sedangkan yang tidak mengekspresikan <i>Mutant p53</i> ditunjukkan warna putih pada sitoplasma sel dengan inti gelap (panah hitam).	50
Gambar 5.3. Ekspresi <i>Mutant H-ras</i> pada sel epitel kelenjar mammae tikus setelah pemberian ekstrak <i>Gynura procumbens</i> dan inisiasi DMBA, ditunjukkan dengan warna coklat gelap pada sitoplasma dan inti sel (panah merah), sedangkan yang tidak mengekspresikan <i>Mutant p53</i> ditunjukkan warna putih pada sitoplasma sel dengan inti gelap (panah hitam).	52
Gambar 5.4. Skema dari target-target kemopreventif dari kurkumin dalam menekan inisiasi tumor.	56
Gambar 5.5. Ekspresi <i>Mutant H-ras</i> pada sel epitel kelenjar mammae tikus setelah pemberian ekstrak <i>Curcuma zedoaria</i> dan inisiasi DMBA, ditunjukkan dengan warna coklat gelap	57

pada sitoplasma dan inti sel (panah merah), sedangkan yang tidak mengekspresikan *Mutant p53* ditunjukkan warna putih pada sitoplasma sel dengan inti gelap (panah hitam).

Gambar 5.6. Nodul tumor kelenjar mammae pada tikus (mingu ke-19) setelah inisiasi dengan DMBA 20 mg/kg bb.

61

**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1. Analisis data ekspresi <i>Mutant p53</i> pada pemberian <i>Gynura procumbens</i>	74
Lampiran 2. Analisis data ekspresi <i>Mutant p53</i> pada pemberian <i>Curcuma zedoaria</i>	76
Lampiran 3. Analisis data ekspresi <i>Mutant H-ras</i> pada pemberian <i>Gynura procumbens</i>	78
Lampiran 4. Analisis data ekspresi <i>Mutant H-ras</i> pada pemberian <i>Gynura procumbens</i>	80
Lampiran 5. Analisis data insidensi tumor kelenjar mammae pada pemberian <i>Gynura procumbens</i>	82
Lampiran 6. Analisis data insidensi tumor kelenjar mammae pada pemberian <i>Gynura procumbens</i>	84

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1.Latar Belakang Penelitian

Kanker merupakan suatu penyakit yang ditandai oleh adanya pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal dan tidak terkontrol. Sel-sel terbentuk akibat terjadinya mutasi gen sehingga mengalami perubahan baik bentuk, ukuran maupun fungsi dari sel tubuh asalnya. Mutasi gen ini dipicu oleh suatu bahan yang dapat berupa bahan tambahan makanan, radioaktif, oksidan atau karsinogenik yang dihasilkan oleh tubuh akibat proses gangguan imunitas (Griffiths *et al.*, 1993).

Menurut Shepel (1998) prevalensi kanker payudara di Amerika Serikat mencapai populasi lebih dari 10 % dari total penduduk wanita. Menurut Brauch *et al.* (2004) insidensi kanker payudara meningkat 1-2 % setiap tahun dan menyebabkan kematian wanita terutama di negara industri. Berdasarkan statistik dunia, satu dari delapan wanita beresiko terkena kanker payudara.

Hal serupa tampaknya juga terjadi pada hewan, khususnya anjing dan kucing. Kasus kanker kelenjar *mamae* pada anjing betina menempati tempat kedua terbanyak setelah kanker kulit. Diperkirakan 165-198 dari 10.000 ekor anjing betina mengidap kanker kelenjar *mamae* dimana 50% bersifat benigna dan 50% bersifat maligna. Kejadian kanker kelenjar *mamae* pada kucing lebih jarang terjadi namun dari keseluruhan kasus kanker kelenjar *mamae* pada kucing, tercatat 85% bersifat maligna dan sisanya bersifat benigna (Liptak, 2004). Berdasarkan penelitian terbaru oleh Dhaygude (2006) yang dilakukan di Mumbai, India, selama periode Januari 2001



sampai Desember 2005, dari total 124 ekor anjing yang diautopsi/biopsi beberapa jenis tumor pada anjing telah dicatat. Tumor kulit tercatat paling banyak yaitu 74 ekor (59,67%) diikuti tumor kelenjar mammae sebanyak 43 ekor (34,67%) dan tempat ketiga adalah *transmissible granuloma* pada alat kelamin sebanyak 3 ekor serta tumor pada ovarium dan testis masing-masing sejumlah 2 ekor (1,6%).

Beberapa upaya penatalaksanaan penyakit kanker masih banyak menemui kendala yang mengakibatkan kurangnya keberhasilan dalam mencegah dan mengobati kanker. Pengobatan yang selama ini dilakukan meliputi pembedahan, penyinaran dengan sinar rontgen (radioterapi) dan penggunaan obat-obat kemoterapi (Novalina, 2003). Tindakan operasi untuk mengangkat jaringan kanker belum sepenuhnya menjamin kesembuhan dan ada kecenderungan untuk terjadinya remultiplikasi jaringan tersebut. Penggunaan radioterapi jelas menimbulkan risiko terjadinya kerusakan lain disekitar jaringan yang terkena kanker. Pemberian kemoterapi antikanker memiliki efek farmakologi yang kurang selektif, efek samping yang merugikan dan dilaporkan adanya resistensi beberapa jenis kanker (King, 2000).

Penemuan tanaman-tanaman obat yang menunjukkan efek farmakologis terhadap penyakit kanker terutama yang telah mengalami uji secara ilmiah telah memberikan alternatif dalam mengatasi dan mengobati penyakit kanker (Herba, 2003). 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. (Katzer, 2003). Senyawa penting yang terkandung dalam rimpang temu putih adalah kurkumin. Menurut penelitian yang dilakukan Singletary, et al (1998) telah membuktikan bahwa senyawa kurkumin ( $\beta$ -diketones diferuloilmetan) 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*). Hal tersebut tampaknya yang mendasari penelitian untuk diketahui khasiat rimpang temu putih sebagai salah satu bahan terapi kemopreventif terhadap kanker.

Dimetilbenz(a)antrasen 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).

DNA-*adduct* yang terjadi sebagai aktivitas karsinogen *benzilic carbonium* mengawali terjadinya mutasi pada gen *p53* dan *ras* (Gregus & Klaasen, 2001). Inaktivasi gen penekan tumor *p53* merupakan kunci penting awal kejadian karsinogenesis. Protein *p53* berperan menginduksi hambatan pertumbuhan, reparasi DNA atau apoptosis pada respon stres seluler. Mutasi pada gen H-*ras* terjadi pada tumor *mamae* tikus yang diinduksi DMBA, terjadi transversasi urutan CAA menjadi CTA dengan mutasi terjadi pada kodon 62 (El-Soheby *et al.*, 2000). Berdasarkan latar belakang penelitian yang akan dilakukan maka perlu dilakukan penelitian yang berlandaskan penggunaan tanaman obat *Gynura procumbens* yang secara laboratoris terbukti mempunyai khasiat sebagai anti kanker. 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 Glutation S-transferase (GST) 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 *mamae* tikus.

## 1.2. Rumusan Masalah

- a. Apakah terdapat penurunan insidensi kanker payudara setelah pemberian ekstrak etanolik *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria* dosis 300 dan 750 mg/kgBB pada tikus yang diinisiasi DMBA ?
- b. Apakah terjadi hambatan ekspresi *p53* mutan pada sel epitel kelenjar mammae tikus galur *Sprague dawley* yang diinisiasi DMBA dengan pemberian ekstrak etanolik *Gynura Procumbens* dan *Curcuma zedoaria* 300 dan 750 mg/kgBB ?
- c. Apakah terjadi hambatan ekspresi H-ras mutan pada sel epitel kelenjar mammae tikus galur *Sprague dawley* yang diinisiasi DMBA dengan pemberian ekstrak etanolik *Gynura Procumbens* dan *Curcuma zedoaria* 300 dan 750 mg/kgBB ?

## 1.3. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan landasan teoritik penelitian maka dapat ditarik suatu hipotesis :

1. Pemberian ekstrak *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria* dosis 300 dan 750 mg/kg bb pada tikus galur *Sprague dawley* dapat menghambat ekspresi *p53* mutan sel kelenjar mammae.

2. Pemberian ekstrak *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria* dosis 300 dan 750 mg/kg bb pada tikus galur *Sprague dawley* dapat menghambat ekspresi H-ras mutan sel kelenjar mammae.
3. Pemberian ekstrak *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria* dosis 300 dan 750 mg/kg bb pada tikus galur *Sprague dawley* dapat menurunkan insidensi tumor kelenjar mammae.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2. 1. Karsinogenesis pada Kanker Payudara

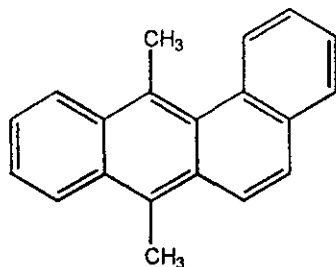
Pengetahuan tentang karsinogenesis pada kanker payudara diawali dengan penelitian pada hewan coba tikus yang diamati secara periodik perkembangan patogenesis. Induksi kanker payudara menggunakan senyawa kimia karsinogen yang lazim yaitu DMBA , PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo (4-5-b)pyridine) dan NMU (nitrosomethylurea) (Minshu dan Snyderwine 2002). Perkembangan tumor biasanya diamati dengan cara palpasi dan pengambilan darah kapiler setiap minggunya dimulai 4 minggu sampai 13 minggu setelah pemberian DMBA. Pada akhir eksperimen semua tumor yang dapat dipalpasi dan yang tidak dapat dipalpasi dieksisi dan selanjutnya dimasukkan ke dalam formalin 10% lalu siap dianalisis secara histopatologis (Appelt dan Reicks, 1999).

Saat ini diketahui bahwa banyak senyawa alam dan sintetik, sisa-sisa industri batu bara, industri minyak, zat warna, bahan makanan dan minuman serta asap rokok mengandung senyawa karsinogen. Diperkirakan 80 % penyakit kanker manusia disebabkan oleh faktor-faktor lingkungan, khususnya zat kimia yang bersifat karsinogenik (Crank, 1992).

Salah satu senyawa karsinogen penyebab kanker adalah golongan hidrokarbon aromatik polisiklik (PAH). PAH merupakan kontaminan yang umum pada udara, air, tanah, serta merupakan hasil konjugasi dari agen radikal bebas selama proses pembakaran yang tidak sempurna dari minyak bumi dan batubara. Senyawa

PAH akan dimetabolisme dalam tubuh menjadi bentuk epoksida yang reaktif. Senyawa reaktif ini akan mudah berikatan kovalen dengan makromolekul jaringan termasuk DNA. Pada mamalia metabolisme PAH dilakukan oleh aktivitas gen *CYP* yang mengkode enzim sitokrom P450, enzim tersebut diregulasi oleh *Aromatic Hydrocarbon Reseptor* (AHR), sitokrom P450 responsibel terhadap aktivitas metabolisme dan detoksikasi sejumlah PAH dan aromatik amin (Nebert *et al.*, 2004).

Salah satu senyawa PAH adalah 7,12-dimetilbenz(a)antrasen (DMBA). DMBA sudah banyak dipakai sebagai senyawa karsinogen dalam berbagai penelitian sebelumnya untuk menginduksi kanker payudara tikus (Singletary *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1999 ; Kubatka *et al.*, 2002). Struktur kimia DMBA memiliki 4 cincin aromatik yang berikatan, khas struktur PAH dengan tiga atau lebih cincin aromatik, dan 2 substituent metil (Pitot dan Dragan, 2001).



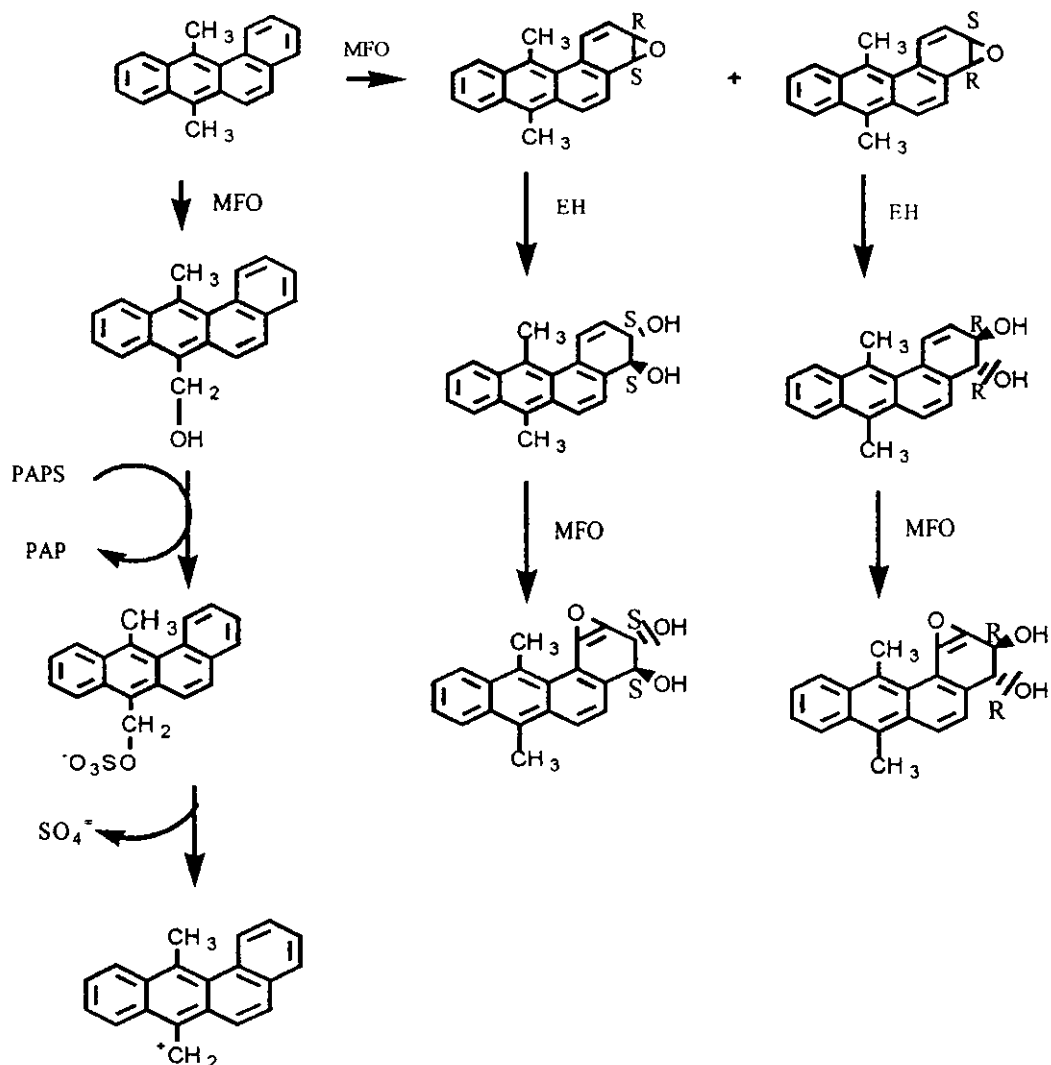
Gambar 2.1. Struktur kimia 7,12-dimetilbenz(a)antrasen (Pitot dan Dragan, 2001).

Tahap perkembangan patogenesis kanker juga diamati dari hasil penelitian Minshu dan Snyderwine (2002) yang menggunakan DMBA sebagai inisiator untuk kanker payudara pada tikus, perkembangan karsinoma pada kelenjar mammae tikus dimulai dari elemen duktal mammae yang secara progresif berkembang menjadi

hiperplasi intraduktal, hiperplasi duktal atipikal, karsinoma insitu dan karsinoma. Dikatakan pula bahwa terdapat kesamaan perkembangan patogenesis kanker payudara antara manusia dan tikus setelah diinduksi DMBA, sehingga perkembangan karsinogenesis pada tikus dapat dipakai sebagai model yang lebih representatif untuk studi karsinogenesis pada manusia. Gambaran histopatologis ditunjukkan pada hasil penelitian induksi kanker payudara dengan *2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol 4,5-b pyridin* (PhIP) pada tikus dengan perkembangan proliferasi intraduktal, karsinoma insitu dan karsinoma 7 – 14 minggu kemudian. Mutasi *H-ras* pada kodon 12-13 dideteksi sebesar 73%, 75%, 100% dan 100% terdiri dari kelenjar payudara normal, intraduktal proliferasi, karsinoma insitu dan karsinoma.

Mekanisme aktivasi DMBA melibatkan enzim sitokrom P-450 dan atau peroksidase menjadi intermediate reaktif yang dapat merusak DNA yaitu terbentuknya epoksid dihidrodiol dan kation radikal. Epoksid dihidrodiol akan mengikat gugus amino ekosiklik purin DNA secara kovalen menjadi bentuk *adduct* stabil, sedangkan kation radikal akan mengikat N7 atau C8 purin menjadi bentuk *adduct* tidak stabil yaitu depurinisasi menjadi tempat yang kehilangan apurinik pada DNA. Jalur epoksid dihidrodiol inilah yang bertanggungjawab terhadap inisiasi tumor oleh karsinogen DMBA dari pada bentuk kation radikal (Melendez-Colon *et al.*, 1999).





Gambar 2.2. Jalur metabolisme 7,12-dimetilbenz(a)antrasen (Yang, *et al.*, 1985 ; Gregus dan Klaasen, 2001).

Selain digunakan untuk induksi kanker payudara, DMBA juga digunakan untuk induksi kanker kulit pada hewan percobaan. Aktivitas karsinogenik dari DMBA terjadi karena kemampuannya (metabolit DMBA, *ultimate carcinogen*) berikatan dengan DNA dan menyebabkan mutasi somatik. Mutasi onkogen Harvey *ras-1* (*H ras-1*) pada kodon 61 ditemukan pada kanker payudara dan kanker kulit dari hewan percobaan yang induksi senyawa kimia DMBA (Dandekar *et al.*, 1986).

Pada sel normal terjadi keseimbangan antara pembuatan sel-sel baru dengan hilangnya sel-sel lama. Sedangkan pada kanker, pertumbuhan lebih bersifat otonom daripada sel normal di sekitarnya. Pertumbuhan kanker biasanya mempunyai keseimbangan positif yaitu jumlah sel yang dibuat lebih besar daripada jumlah sel yang hilang. Sel kanker juga menunjukkan beberapa sifat morfologik yang agak spesifik. Inti sel biasanya besar dan menunjukkan perbedaan yang nyata dalam bentuk dan ukurannya. Kadar asam nukleat dalam inti seringkali tinggi dan distribusi kromatin dalam intinya kasar. Pola kromosomnya seringkali menjadi tetraploidi, hal ini disebabkan penambahan kromosom yang tidak teratur. Sel kanker kurang bersifat melekat, artinya pertautan antar sel pada sel-sel penyusun kanker kurang terikat erat satu dengan yang lainnya (Barl *et al.*, 2004 ).

Antara tumor benigna dan maligna terdapat perbedaan yang jelas karakteristiknya. Pada tumor benigna berbatas tajam, terkapsulasi, cara pertumbuhannya ekspansif, kecepatan pertumbuhannya rendah, jarang terjadi nekrosis, diferensiasi sel masih sempurna dan aktivitas mitotiknya rendah. Sedangkan pada tumor maligna batas tidak jelas dan tidak teratur, kapsul jarang, cara pertumbuhannya infiltratif, kecepatan mitotiknya tinggi, sering terjadi nekrosis (Van de Velde, 1999).

Ferembangan kanker payudara sangat tergantung pada kondisi ovarium dan endokrin yang dimodulasi fungsi ovarium, bagaimanapun juga hormon spesifik atau kombinasi hormon sangat responsif dalam inisiasi kanker yang belum banyak diidentifikasi, apakah berperan sebagai protektif atau sebagai faktor resiko. Faktor hormonal yang signifikan pada wanita adalah keberadaan estrogen yang terlibat pada

perkembangan beberapa kanker, tetapi belum banyak diketahui sifat estrogen sebagai substansi karsinogenik pada kanker payudara. Dapat dimengerti bahwa apakah estrogen menyebabkan mutasi, dan jika memang seperti itu apakah aktifitas hormon tersebut dipengaruhi oleh aktifitas ikatan dengan reseptornya (Russo *et al.*, 2000).

## 2.2. Tinjauan Gen p53

Salah satu strategi untuk pengembangan obat-obat antikanker adalah dengan menemukan senyawa-senyawa yang mendasarkan target aksinya pada gen-gen pengatur pertumbuhan, yakni onkogen dan *tumor suppressor gen*. (Gibbs, 2000). *Tumor suppressor gen* atau gen penekan tumor, merupakan kelompok gen yang membatasi perkembangan tumor. *Tumor suppressor gen* merupakan fungsi penyeimbang dari onkogen. *Tumor suppressor gen* antara lain adalah protein *p53* dan protein Retinoblastoma (pRb) (Gibbs, 2000). Protein *p53* mempunyai beberapa mekanisme sebagai antikanker antara lain, dapat mengaktifkan *DNA repair* apabila terjadi kerusakan DNA, dapat menghentikan siklus sel pada *checkpoint* dari fase G1 ke fase S (*cell cycle arrest*) untuk regulasi *cell cycle* dalam pengenalan kerusakan DNA, dan dapat menginisiasi mekanisme apoptosis untuk memprogramkan kematian sel jika kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki (Bell *et al.*, 2002). Selama fase pertama dalam siklus sel yaitu G1, ada proses yang perlu dilalui oleh sel, yang disebut *checkpoint*. *Checkpoint* ini bertujuan untuk mengontrol, apakah sel diizinkan untuk membelah atau tidak. *Tumor suppressor gen*, berfungsi sebagai *checkpoint* untuk mengatur pembelahan sel (Taufik, 2008).

Molekul pengatur yang sangat penting dan sering mengalami mutasi adalah protein p53. Pada *checkpoint* p53 bekerja untuk mengecek apakah terjadi kerusakan DNA atau tidak. Jika terdeteksi adanya kerusakan DNA, maka ada dua hal yang diperintahkan oleh p53, yaitu mengaktifkan *DNA repair* gen dan penghentian *cell cycle* pada fase G1 sampai kerusakannya dapat diperbaiki. Mekanisme penghentian *cell cycle*, yaitu dengan mengaktifkan p21. Gen p21 ini berfungsi untuk mencegah aktivasi CDKs oleh cycline, sehingga CDKs tidak bisa memfosforilasi Rb. Akibatnya E2F tetap terikat dengan Rb (Taufik, 2008). Protein p53 sering juga disebut sebagai *guardian* atau pelindung dari genom. Protein ini mencegah replikasi dari DNA yang rusak pada sel normal dan mendorong penghancuran sendiri dari sel yang mengandung DNA yang tidak normal. Molekul p53 yang tidak normal akan membiarkan sel yang mengandung DNA yang rusak untuk tetap bertahan padahal seharusnya mati, atau melakukan replikasi padahal seharusnya berhenti. Sel yang terganggu dan mengalami mutasi diturunkan pada keturunannya dan selanjutnya mempunyai kesempatan untuk akumulasi dan terjadi mutasi tambahan yang membuka peluang untuk membentuk tumor yang letal. Kebanyakan tumor pada manusia, disebabkan oleh adanya cacat pada gen p53 (Tjahjono, 1999).

Inaktivasi gen penekan tumor p53 merupakan kunci penting awal kejadian karsinogenesis pada mammae. Protein p53 berperan menginduksi hambatan pertumbuhan, reparasi DNA atau apoptosis pada respon stres seluler (Mechanic *et al.*, 2005). Perlu diketahui sebelumnya bahwa p53 mempunyai dua tipe yaitu *p53 Mutant* dan *p53 mutant*. *Mutant p53* merupakan tipe protein p53 yang secara alami terdapat

dalam sel normal, protein *Mutant p53* mempunyai waktu paruh kurang dari 30 menit dan konsentrasinya rendah jika terjadi kerusakan pada DNA, konsentrasi ini akan bertambah dan berfungsi menghambat *cell cycle* pada fase 6, sehingga memberi kesempatan untuk perbaikan DNA (*DNA Repair*) atau apoptosis. Mutasi gen p53 menimbulkan perubahan pada protein produk dan disebut *Mutan- type p53* yaitu gen p53 yang sudah mengalami mutasi akibat pengaruh dari induksi agen karsinogenik salah satunya DMBA yang dalam penelitian ini sebagai inisiator. Protein *Mutan- type p53* mempunyai waktu paruh yang lebih lama dari protein *Mutant p53* karena tidak mengatur aktifitas transkripsi, tidak menghambat pertumbuhan sel tumor, tidak menghambat transformasi sel, dan tidak menghambat pertumbuhan pada fase G1 dari *cell cycle*, sehingga gen tidak stabil dan pembelahan sel dengan kerusakan DNA bertambah. Protein *Mutan- type p53* bereaksi dengan Pab-240 sedangkan protein *Mutant p53* bereaksi dengan monoclonal antibodi Pab-1620 (Soengeng, 2000).

### 2.2.1. Peran p53 pada *cell cycle*

*Cell cycle* sangat ditentukan oleh faktor-faktor pertumbuhan yang terdiri dari *cyclins* (*Cyc*) dan *cyclin dependent kinase* (CDK4, CDK6, dan CDK2), sedangkan inhibitor CDK adalah p16, p21 dan p27 (Gibbs, 2000).

Pada sel normal, *p53* selalu dalam keadaan inaktif, dibatasi oleh protein *Mouse double minute 2* (MDM2) (di manusia, HDM2), yang mencegah dan memicu degradasi *p53* melalui aktivasi penetapan sebagai *ubiquitin ligase*. Protein p53 yang aktif diinduksi setelah suatu sel tubuh terpapar oleh agen karsinogen, salah satunya DMBA. Kerusakan DNA dapat dikontrol oleh *checkpoint* dalam *cell cycle*, dan

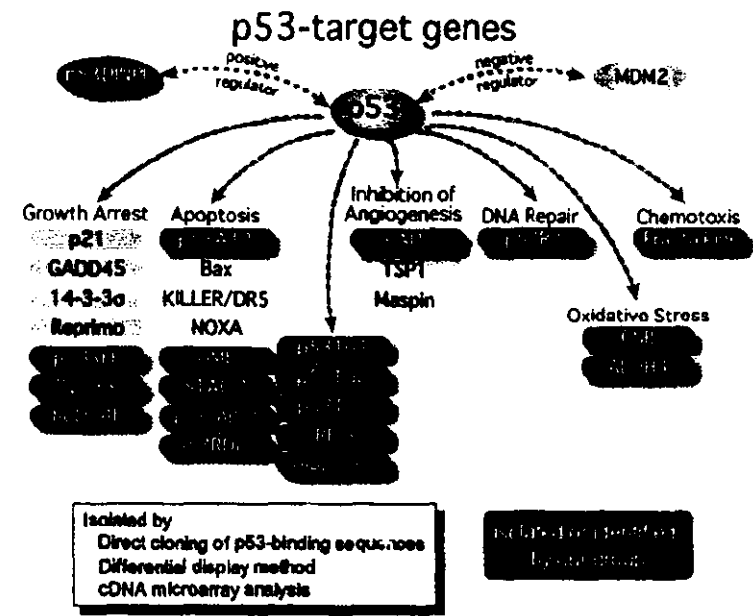
menyebabkan beberapa protein seperti ATM, CHK1, dan CHK2 memfosforilasi p53 untuk melakukan ikatan protein MDM2 *Oncogene*, yaitu kelompok gen yang menstimulasi perkembangan sel melalui daur sel atau *cell cycle* (serangkaian peristiwa meliputi pembesaran sel, replikasi DNA dan pembelahan sel, serta pemindahan set gen yang lengkap pada sel anak). *Oncogene* juga dapat menstimulasi aktivasi p53, yang dimediasi oleh transkripsi protein p14ARF yang melakukan ikatan dengan MDM2 dan menghambat aktifitasnya. Suatu ekspresi dari aktivasi p53 melibatkan aktivasi dari gen *p21* yang melakukan ikatan dengan CDK pada fase G1-S dan CDK kompleks (molekul yang sangat penting dalam tahapan transisi dari fase G1 ke fase S dalam siklus sel) dengan menghambat aktifitas p53 (Gambar 2.4) (Bates *et al.*, 1998).

Perjalanan *cell cycle* dimulai dari adanya sinyal ekstraselular yang berupa faktor pertumbuhan akan memacu pertumbuhan sel melalui proses sinyal transduksi. Aktivitas sinyal transduksi melalui proses fosforilasi yang melibatkan Adenosin Tri Phosphatase (ATP) sebagai sumber fosfat. Suatu protein akan mengambil fosfat dari ATP dan dilekatkan pada protein vektornya, begitu seterusnya dalam suatu rangkaian yang berakhir didalam nukleus (Weinberg, 1996).

Di dalam nukleus, suatu aktivator transkripsi merespon dengan mengaktifkan sekelompok gen yang diperlukan sel untuk melakukan siklus pertumbuhan. Adanya aktivator transkripsi menyebabkan sel yang semula berada pada fase G0 masuk ke fase G1. Pada fase ini sel mensintesis protein-protein khusus antara lain Cyc dan Cdk. CycD membentuk kompleks dengan Cdk4 atau Cdk6 dan memfosforilasi pRb. Fosforilasi pRb menyebabkan pelepasan E2F, suatu faktor transkripsi yang

menginduksi transkripsi CycE dan CycA. Fosforilasi pRb dilanjutkan oleh kompleks CycE-Cdk2 dan kemudian oleh CycA-Cdk2 dan menjadi pRb yang sangat terfosforilasi. Protein E2F menginduksi gen-gen yang esensial untuk sintesis, mitosis dan terjadinya *cell cycle progression*. Pada tiap tahap dari *cell cycle* baik G1, S, G2 atau M terdapat mekanisme control (*check point*) yang melibatkan p53, pRb, INK4 (*Cdk-inhibitor*) dan ARF. Mekanisme ini menyebabkan *delay*, *arrest* atau kematian sel bila terdapat hal yang tidak sesuai, misalnya terdapat DNA yang rusak atau tidak tereplikasi (King, 2000).

*Gen p53* sebagai *tumor suppressor gen* merupakan penyeimbang dari *oncogene*. Tumor supresor antara lain adalah protein p53 dan protein Retinoblastoma (pRb). Protein Rb merupakan protein penekan tumor yang klasik, protein ini mampu mengikat protein E<sub>2</sub>F. Protein E<sub>2</sub>F berperan pada proses replikasi (faktor replikasi), sehingga dengan terikatnya E<sub>2</sub>F pada pRb siklus sel akan dihambat. Pada kanker payudara diketahui terjadi ekspresi mutasi pada protein penekan tumor p53 dan ekspresi berlebihan dari erb-2, ras p21 dan *Cyclin D1*. Hal itu telah ditunjukkan untuk sejumlah tipe tumor yang mengekspresikan protein sering didapatkan pada sel malignan dan dapat dideteksi di plasma darah. (Rundle *et al.*, 2002). Jika terjadi mutasi pada *p53* maka kerusakan DNA tidak akan dapat dideteksi, yang pada akhirnya akan membawa kepada pertumbuhan sel neoplastik (Taufik. 2008).



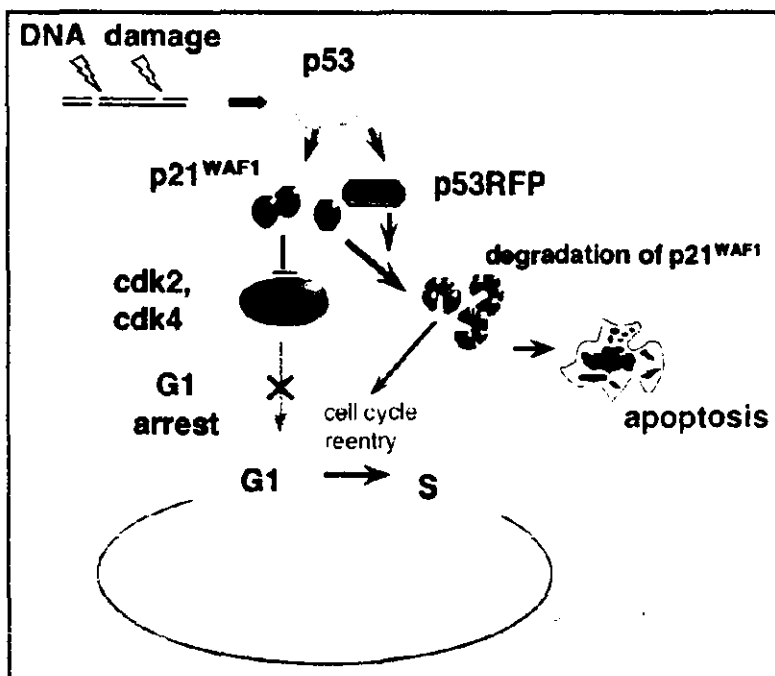
Gambar 2.3. *p53*-target gen dan alur fisiologisnya (Rundle *et al.*, 2002).

### 2.2.2. Peran *p53* terhadap DNA-Repair (*P53R2*, novel ribonucleotide reductase)

Titik pemberhentian (*check point*) dari kerusakan DNA memegang peranan penting dalam pencegahan ketidakstabilan gen dengan cara meregulasi *cell cycle* dan *DNA repair*. Inaktivasi dari *check point* mungkin mengganggu mekanisme *DNA repair* dan meningkatkan kesesuaian sel terhadap agen genotoksik. Gen *p53R2* mengandung perlekatan sekuensing *p53* di intron 1 dan mengkode sebuah 351-asam amino peptide yang menunjukkan kemiripan dengan sub unit kecil ribonucleotide reductase (R2). Ekspresi *p53R2* diinduksi oleh  $\gamma$  dan iradiasi sinar UV dan juga oleh terapi adriamycin di *Mutant p53*, yang dulu dikenali sebagai R2, yang berperan penting dalam sintesis DNA selama pembagian sel, tetapi ternyata bukan. Induksi dari ekspresi *p53R2* di sel-sel menyebabkan G2/M arrest dan mencegah kematian sel setelah memberi respon terhadap adriamycin (Tanaka *et al.*, 2000).



Produk dari p53R2 terakumulasi di nukleus, ketika level R2 di sitoplasma menurun ditemukan titik mutasi dari p53R2 pada *cancer cell line HCT116* yang mampu menghilangkan aktivitas *ribonucleotide reductase* (RR), menunjukkan bahwa sintesis DNA di p53R2 memiliki peran sentral dalam pertahanan sel dengan cara memperbaiki DNA yang rusak di dalam nucleus (Yamaguchi *et al.*, 2001). Fungsi p53 mungkin sebagai *check point* untuk sel-sel yang rusak dengan cara menyeimbangkan antara mekanisme apoptosis dan *cell cycle arrest* (Kimura *et al.*, 2003).



Gambar 2.4. Model re-entry ke dalam sel setelah G1 arrest.

Pada gambar 2.4 menunjukkan re-entry ke dalam sel setelah G1 arrest disebabkan oleh p21WAF1. p53RFP mempunyai aktifitas ligasi E3 ubiquitin dan interaksi dengan p21WAF1 secara *in vitro* and *in vivo*. Setelah *cell cycle arrest* and *DNA repair*, p53 menampilkan completion dari *DNA repair* melewati sebuah

mekanisme yang tidak diketahui namanya dan mengaktifkan p53RFP untuk mendegradasi p21, menghasilkan re-entry sel menuju ke *cell cycle progression*. Destabilisasi dari p21WAF1 melewati regulasi transkripsi p53RFP menampilkan kembali mekanismenya untuk *p53-dependent cell-cycle checkpoint* (Kimura *et al.*, 2003).

### 2.2.3. Mutasi gen p53 pada kanker payudara

Gen p53 adalah sebuah target gen utama dari perubahan genetik yang telah diidentifikasi pada kanker payudara manusia, dan apabila ada sel yang mengalami inaktivasi gen p53 akan mengalami proses pertumbuhan yang berlebihan. (Hollstein *et al.* 1991). Banyak studi yang mengindikasikan bahwa p53 mempunyai fungsi ganda fisiologis yaitu melewati regulasi transkripsi dari gen *down-stream* melalui pembelahan sisi genom spesifik sebagai tetramer. p53 ditampilkan untuk mengikat DNA dalam *sequence-spesifik fashion* (Kem *et al.* 1991) dan untuk mengaktifasi transkripsi gen yang meliputi *consensus binding site*. DNA sequence ini merupakan fungsi dari *enhancer transcription*.

Fungsi normal p53 dapat hilang melalui berbagai cara, pada umumnya melalui kehilangan beberapa bagian kromosom yang meliputi satu alel dari gen (atau dari entire kromosom 17p) dan mutasi yang tidak terlihat (*insertion mutation*) yang meliputi alel lain. Mekanisme ini memfokuskan model "*two-hit*" untuk mendefinisikan apa yang dapat disebut sebagai *tumor suppressor gen*. Inaktifasi dari kedua alel p53 telah didokumentasikan dalam jumlah besar dari kanker payudara manusia, meliputi pemunculan tumor di kolon, otak, paru-paru, hepar, dan kandung

kemih. Akan tetapi, pada beberapa kasus *missense mutation* yang terjadi pada salah satu alel p53 berkemampuan untuk mengaktivasi fungsi p53, ketika ada kejadian peningkatan proporsi dari hetero-tetramers yang memuat kedua tipe yaitu *mutant-type p53* dan molekul *Mutant p53*, kompleks chimeric tidak dapat mengaktifasi transkripsi dari target gen (Knudson, 1995)

Efek “dominant-negative” ini mungkin diperburuk melalui peningkatan stabilitas (peningkatan konsentrasi intraseluler) dari protein mutant bergabung dengan protein *Mutant p53*. Mekanisme lain untuk inaktivasi dapat dilihat dari jaringan sarcoma, dimana amplifikasi dari MDM2 memunculkan sejumlah kehilangan fungsi *p53* melewati ikatan dan subsequent degradasi dari protein p53 itu sendiri (Kubbutat *et al.*, 1997).

### 2.3. Tinjauan Gen Ras

Gen *ras* juga memberikan kontribusi bagi kelangsungan mutagenesis, sebagaimana yang dikatakan Roitt (1997) bahwa gen *ras* yang terdapat pada onkogenik manusia berbeda dibanding mereka yang normal, titik mutasi selalu diawali perubahan asam amino tunggal pada posisi 12, 13 atau 61, peptida pada mutasi *ras* dapat menginduksi proliferasi sel T secara *in vitro*. Kejadian mutasi titik tunggal pada onkogenik gen *ras* dan *p53* memicu tumor dengan potensi terbentuknya epitop spesifik sel T yang mana ini kecenderungan sebagai karakteristik individu penderita tumor dengan mutasi gen *ras* dan *p53*.

Promotor gen Ras memiliki karakteristik tersusun dari sekuen yang kaya akan nukleotida GC. Selain promoter, terdapat daerah lain pada gen Ras yang mengontrol ekspresi yaitu pada intron pertama dari ujung 5' nukleotida. Ekspresi N-

ras memiliki regulator negatif berupa interferensi dari transkripsi gen lain yang disebut dengan *unr* (*upstream* N-ras). Aktivasi transkripsi pada promotor gen *unr* dapat menurunkan ekspresi N-ras (Paciucci dan Pellicer, 1991).

Produk dari gen Ras berupa protein monomer 21 kd yang terletak dalam sitoplasma. Ras merupakan protein *GTP-binding switch* yang berinteraksi dengan membran. Protein keluarga Ras berperan penting sebagai intermediet jalur transduksi sinyal dari membran sel ke dalam nukleus, yang terinisiasi oleh adanya aktivasi reseptor tirosin kinase. Terdapat tiga macam Ras yang berpotensi menjadi protein yaitu Harvey (H)-ras, Neuroblastoma (N)-ras dan Kirsten (K)-ras (K4A- dan K4B-). Tiap protein Ras tersusun dari 190 asam amino. Perbedaan diantara ketiga macam protein tersebut hanya terletak pada 25 asam amino penyusun ujung karboksil (C-terminus). Mutasi pada Ras seringkali hanya terbatas pada satu macam gen Ras pada jaringan tertentu. Pada kanker hepar, 30% mutasi yang sering terjadi adalah pada N-ras (Adjei, 2001). Mutasi N-ras yang sering terjadi terletak pada kodon 12, 13 dan 61 (Feng *et al.*, 2002).

Satu kandidat gen yang potensial dihubungkan dengan kejadian kanker kelenjar payudara akibat induksi senyawa kimia adalah gen H-ras. H-ras merupakan protein yang terikat GTP dan berfungsi seperti perubahan molekul, dalam bentuk aktif terikat GTP dan inaktif terikat GDP, menghantarkan sinyal ekstraseluler dari plasma membran ke nukleus. Mutasi onkogenik pada H-ras menurunkan kemampuan Ras berinteraksi dengan GTPase aktivator protein (GAP) yang secara terus menerus mengaktivasi sinyal *downstream* termasuk untuk pertumbuhan dan proliferasi (Minshu dan Snyderwine, 2002). Penelitian yang dilakukan oleh Barbacid *et al.*

(1985), dengan menginduksi Nitrosomethylurea (NMU) pada tikus menimbulkan karsinoma kelenjar payudara yang membawa perubahan G<sup>35</sup> menjadi A mutasi transisi H-ras pada kodon 12. Karsinoma pada induksi MNU mempunyai frekuensi mutasi H-ras 90% transisi pada G<sup>35</sup>, terutama perkembangan neoplasia G<sup>35</sup> menjadi A<sup>35</sup>.

Transversi mutasi G-C menjadi C-G pada G<sup>35</sup> dideteksi pada kelenjar mammae normal yang tampak aktivitas mutasi secara alami dari tikus *Sprague dawley*. Berdasarkan hasil penelitian 3 dari 75 total klon yang disekuensi dengan mikrodiseksi pada kelenjar mammae normal terdapat mutasi jenis tersebut, kejadian mutasi itu persentasenya rendah pada sel epitel mammae. Mutasi H-ras tidak dideteksi pada isolasi DNA dari hepar (Minshu dan Snyderwine, 2002).

#### 2.4. Tinjauan tanaman *Gynura procumbens* sebagai antikanker

Adapun klasifikasi tanaman tersebut adalah sebagai berikut :

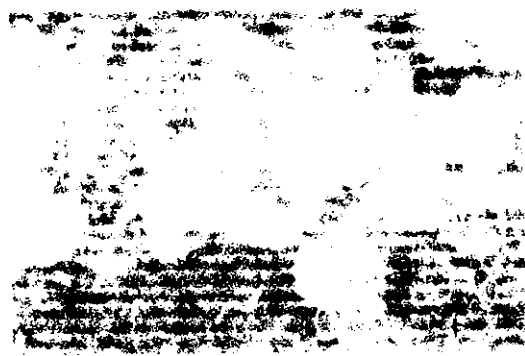
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Asterales (Campanulatae)
Suku	: Asteraceae (Compositae)
Marga	: Gynura
Jenis	: <i>Gynura procumbens</i> (Lour.) Merr.

(Backer dan Van den Brink, 1965)



**Gambar 2.5. Daun Tanaman *Gynura procumbens* (Backer dan Van den Brink, 1965)**

Tanaman *Gynura procumbens* (Gambar 2.5) berbentuk perdu tegak bila masih muda dan dapat merambat setelah cukup tua. Bila daunnya diremas berbau aromatis. Batangnya segi empat beruas-ruas, berdaging, panjang ruas dari pangkal sampai ke ujung semakin pendek, ruas berwarna hijau dengan bercak ungu. Daun tunggal bentuk elips memanjang atau bulat telur terbalik. Daun duduk, tersebar serta agak berdaging, tepi daun bergerigi dan berambut halus. Tangkai daun panjang  $\frac{1}{2}$ - $3\frac{1}{2}$  cm, helaian daun panjang  $3\frac{1}{2}$ - $12\frac{1}{2}$  cm, lebar 1- $5\frac{1}{2}$  cm. Helaian daun bagian atas berwarna hijau dan bagian bawah berwarna hijau muda dan mengkilat. Kedua permukaan daun berambut pendek. Tulang daun menyirip dan menonjol pada permukaan daun bagian bawah. Pada tiap pangkal ruas terdapat tunas kecil berwarna hijau kekuningan. Tumbuhan ini mempunyai bunga bongkol, di dalam bongkol terdapat bunga tabung berwarna kuning oranye coklat kemerahan panjang 1- $1\frac{1}{2}$  cm, berbau tidak enak. Tiap tangkai daun dan helai daunnya mempunyai banyak sel kelenjar minyak (Perry, 1980; Van Steenis, 1975; Backer dan Van den Brink, 1965).



Di Indonesia, *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. memiliki beberapa nama daerah seperti sambung nyawa, ngokilo (Jawa) (Thomas, 1989) dan daun dewa (Melayu) (Heyne, 1987). Tumbuhan ini berasal dari daerah Afrika yang beriklim tropis yg kemudian menyebar ke Srilangka, Sumatera dan Jawa. *Gynura procumbens* dapat tumbuh pada ketinggian 1-1200 m dpl, terutama tumbuh dengan baik pada ketinggian 500 m di atas permukaan laut. Banyak ditemukan tumbuh di selokan, semak belukar dan padang rumput (Backer dan Van den Brink, 1965).

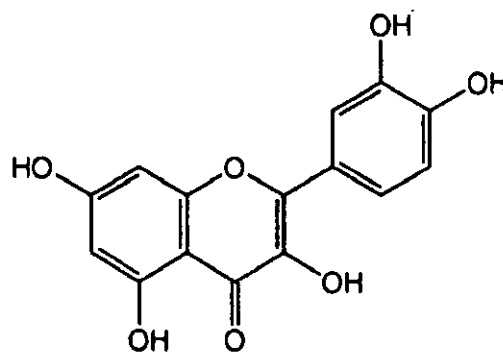
Senyawa aktif yang terkandung dalam daun tanaman *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. antara lain sterol ( $\beta$  sitosterol, stigmasterol), glikosida sterol, nonadecane, phytol valerat, adenosin, kaemferol-3-O-neohesperidosid, metal 9-oktadekanoat, 4-hidroksi-4-metil-2-pentanon, stigmasterol asetat, quercetin, quercetin dalam bentuk glikosida dan kaemferol-3 glukosida (Heyne, 1987). Daun tumbuhan *Gynura procumbens*, L. Merr mengandung senyawa flavonoid, sterol tak jenuh, triterpen, polifenol, minyak atsiri dan lain-lain (Sudarto, 1985; Asepganda S, 1988). Flavonoid, sterol tak jenuh, triterpen, polifenol, tanin, saponin dan minyak atsiri merupakan senyawa hasil skrining daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. yang dilakukan beberapa peneliti secara kualitatif (Sudarto, 1985; Suganda dkk., 1988; Hariyadi, 1991). Berdasar penelitian mengenai isolasi dan identifikasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* ternyata dalam fraksi etil asetat ekstrak etanolik *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. terdapat senyawa flavonoid yang mengarah ke golongan flavon atau flavonol (Suprapti, 2000).



Pada penelitian ini ekstrak etanolik *G. procumbens* diberikan sebelum inisiasi DMBA dengan frekuensi pemberian 10 kali sehingga mekanisme kerja diduga melalui *blocking agent* dan *Suppressing Agent* dengan mekanisme menghambat terbentuknya *DNA Adduct* dan menghambat transformasi kanker menjadi *malignant*.

Senyawa kemopreventif mempunyai efek melalui dua mekanisme yaitu *blocking agent* dan *suppressing agent*. *Blocking agent* mencegah bahan karsinogen mencapai target aksinya, baik melalui penghambatan aktivasi metabolisme atau menghambat interaksi dengan target makromolekul seperti DNA, RNA atau protein. Sedangkan *suppressing agent* menghambat pembentukan *malignant* dari sel yang telah terinisiasi pada stadium promosi atau progresi (Surh, 1999).

Komponen yang diduga memiliki efek antikarsinogenesis dari ekstrak etanolik *Gynura procumbens* adalah quercetin karena quersetin dapat meningkatkan level *cyclic AMP* dan menurunkan DNA, RNA dan sintesis protein pada sel tumor *Ehrlich*. Quercetin juga menghambat glikolisis aerobik pada sel kanker. Mekanisme ini mengakibatkan proliferasi sel terganggu (Middleton *et al.*, 2000) (Gambar 2.6).



**Gambar 2.6. Struktur kimia Quercetin (Crystal, *et al.*, 2003).**

Penelitian laboratorium mengenai khasiat *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. sebagai obat antikanker juga telah banyak dikembangkan. Secara *in vitro*, *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. baik dalam bentuk ekstrak etanolik ataupun residunya dilaporkan mempunyai aktivitas antikarsinogenik terhadap sel vero dan sel mieloma (Arianti, 1998; Anggraita, 1998). Beberapa penelitian *in vivo* membuktikan bahwa ekstrak etanolik *Gynura procumbens* mampu menghambat pertumbuhan kanker paru dan kanker lambung mencit yang diakibatkan oleh benzo( $\alpha$ )piren (Sugiyanto dkk., 1993; Ulfa, 1999). Ekstrak etanolik *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. dilaporkan mempunyai efek antimutagenik terhadap kanker paru-paru mencit yang diakibatkan oleh benzo( $\alpha$ )piren (Meiyanto, 1999).

Ekstrak etanolik *Gynura procumbens* ini terbukti mampu menghambat pertumbuhan kanker paru pada mencit yang diinduksi dengan Benzo( $\alpha$ )pirene (Sugiyanto et al., 2000) dan bersifat sitotoksik terhadap sel mieloma. Daun tumbuhan *Gynura procumbens*, L. Merr mengandung senyawa flavonoid, sterol tak jenuh, triterpen, polifenol, minyak atsiri dan lain-lain (Sudarto, 1985; Asepganda, 1988).

Berdasarkan kenyataan empiris dan data-data yang tersedia tersebut, maka dapat dikatakan bahwa tanaman *Gynura procumbens* memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat anti-kanker. Senyawa-senyawa yang terkandung di dalam tanaman tersebut kemungkinan besar memiliki aktivitas sebagai anti-tumor melalui beberapa kemungkinan mekanisme, yakni sebagai penghambat proses sinyal transduksi, memicu *cell cycle arrest*, apoptosis, atau bahkan menghambat metastasis. Dengan kata lain, kandungan senyawa tanaman *Gynura procumbens* kemungkinan mempunyai aktivitas sebagai anti kanker, pada awal terjadinya kanker (inisiasi) juga

pada stadium lanjut, yaitu pada keadaan displasia, *invasive carcinoma*, angiogenesis dan metastasis (Sudarto dan Pramono, 1985; Asepganda, 1988).

Mengingat banyaknya senyawa yang terkandung di dalamnya, maka kemungkinan mekanisme tersebut saling mendukung sehingga menguatkan aksinya. Untuk itu maka penelitian ini dirancang untuk mempelajari kecenderungan mekanisme aksi dari aktivitas ekstrak etanolik *Gynura procumbens* terhadap jenis kanker tertentu (payudara) dan pada stadium tertentu (displasia, *carcinoma in situ*, metastasis dan angiogenesis) (Backer dan Van den Brink, 1965).

## 2. 5. Tinjauan Tanaman *Curcuma zedoaria* Sebagai Antikanker

*Curcuma zedoaria* (Rosc), di Indonesia disebut temu putih, temu kuning. Tumbuhan ini berasal dari Himalaya, India, dan terutama tersebar di negara-negara Asia meliputi China, vietnam, dan Jepang. *Curcuma zedoaria* (Rosc) tumbuh liar di Sumatra (Gunung Dempo), di hutan jati Jawa Timur, banyak dijumpai di Jawa Barat dan Jawa Tengah, di ketinggian sampai 1000 dpl. Berupa tanaman tahunan, tinggi mencapai 2 m, tumbuh tidak berkelompok. Daun berbentuk lanset memanjang berwarna merah lembayung di sepanjang tulang tengahnya. Bunga keluar dari rimpang samping, menjulang ke atas membentuk bongkol bunga yang besar. Mahkota bunga berwarna putih, dengan tepi bergaris merah tipis atau kuning. Rimpang berwarna putih atau kuning muda, rasa sangat pahit (Windono, dkk, 2002).

Rimpang *Curcuma zedoaria* digunakan sebagai pembersih nifas, karminativum, tonikum, hepatoprotektor, melancarkan menstruasi, penawar gigitan ular, pengobatan luka dan tukak, lemah syahwat, penambah nafsu makan,

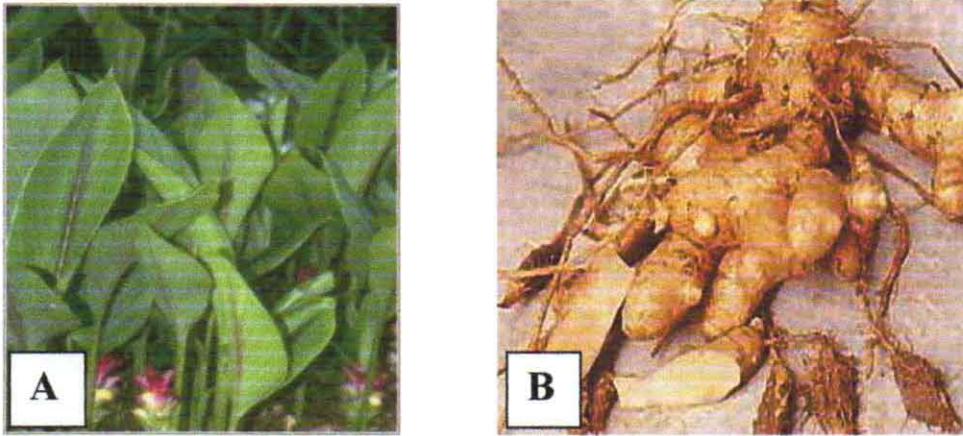
melancarkan peredaran darah. Di China telah digunakan di klinik untuk terapi kanker cervic (Windono *dkk*, 2002).

Kandungan kimia rimpang *Curcuma zedoaria* Rosc terdiri dari : kurkuminoid (diarilheptanoid), minyak atsiri, polisakarida serta golongan lain. Diarilheptanoid yang telah diketahui meliputi : kurkumin, demetoksikurkumin, bisdemetoksikurkumin, dan 1,7 bis (4-hidroksifenil)-1,4,6-heptatrien-3-on (Windono *dkk*, 2002).

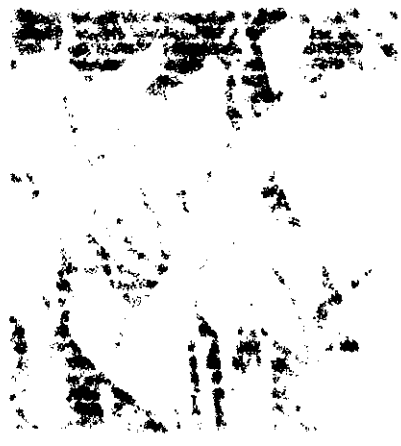
Minyak atsiri berupa cairan kental kuning emas mengandung : monoterpen dan sesquiterpen. Monoterpen *Curcuma zedoaria* terdiri dari : monoterpen hidrokarbon (alfa pinen, D-kamfen), monoterpen alkohol (D-borneol), monoterpen keton (D-kamfer), monoterpen oksida (sineol). Sesquiterpen dalam *Curcuma zedoaria* terdiri dari berbagai golongan dan berdasarkan penggolongan yang dilakukan terdiri dari : golongan bisabolen, elema, germakran, eudesman, guaian dan golongan spironolakton. Kandungan lain meliputi : *etil-p-metoksisinamat*, *3,7-dimetillindan-5-asam karboksilat* (Windono *dkk*, 2002).

Ekstrak etanol rimpang *Curcuma zedoaria* menunjukkan aktivitas menghambat sel-sel OVCAR-3 ( Cell-line kanker ovarium manusia). Isolasi yang dipantau dengan bioaktivitas hambatan terhadap sel OVSCAR-3 menghasilkan senyawa aktif demetoksi kurkumin (Windono *dkk*, 2002). Pemberian ekstrak etanol temu putih optimum pada dosis 500 mg/kg BB mampu menghambat pertumbuhan tumor paru pada fase post inisiasi. Ekstrak etanol 50% *turmeric* memperlihatkan penghambatan pada sel normal dan bersifat sitotoksis pada sel lymphoma pada konsentrasi 0,4 mg/ml. Ekstrak etanol *turmeric* juga menunjukkan penghambatan

fase mitosis pada sel mamalia secara *in vitro* dengan menghambat pembentukan kromosom (Matter, 2001).



Gambar 2.7. Daun dan bunga *Curcuma zedoaria* (A) Rimpang dari *Curcuma zedoaria* atau temu putih (B)



### BAB III

#### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

##### 3.1. TUJUAN PENELITIAN

###### 3.1.1. Tujuan Umum :

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengetahui aktifitas ekstrak etanol tanaman daun Mahkota Dewa (*Gynura procumbens*) dan Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoaria*) sebagai antikarsinogenesis setelah inisiasi kanker payudara pada tikus dengan 7,12-Dimethylbenz(a)antrasen (DMBA). Hasil penelitian diharapkan dapat dipergunakan sebagai pembuktian ilmiah penggunaan tanaman obat tersebut sebagai antikanker khususnya kanker payudara.

###### 3.1.2. Tujuan Khusus

- a. Mengetahui ekspresi gen *p53* pada kelenjar mammae tikus galur *Sprague dawley* yang diinduksi DMBA dan diberi ekstrak etanol *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria*.
- b. Mengetahui ekspresi gen H-ras pada kelenjar mammae tikus galur *Sprague dawley* yang diinduksi DMBA dan diberi ekstrak etanol *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria*.
- c. Untuk mengetahui insidensi tumor kelenjar mammae tikus galur *Sprague dawley* yang diinduksi DMBA dan diberi ekstrak etanol *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria*.

##### 3.2. MANFAAT PENELITIAN

Data yang akan diungkap dari penelitian ini penting artinya untuk memberi landasan yang kuat dan rasional pada penggunaan ekstrak etanol Daun Dewa (*Gynura*

*procumbens*) dan Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoaria*) sebagai agen fitoterapi. Dengan diketahuinya data ekspresi gen *p53* dan *H-ras*, serta insidensi pertumbuhan tumor dapat diperoleh landasan yang kuat tentang kinerja tanaman obat tersebut sebagai anti kanker. Dimana penelitian selama ini belum memberikan pembuktian akurat sampai pada pengamatan tingkat molekuler. Hasil akhir penelitian ini dapat memberikan kontribusi bagi dunia farmasi untuk menambah khasanah obat secara alami maupun skala industri. Kontribusi bagi bidang kesehatan dan pendidikan diperoleh melalui menurunnya angka insidensi kanker payudara dan kesadaran masyarakat akan tindakan preventif untuk menghindari penyakit kanker.



## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4. 1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama delapan bulan mulai Mei – Desember di kandang hewan coba FKH Unair meliputi pemeliharaan hewan coba, percobaan karsinogenesis, pemberian ekstrak tanaman dan pengamatan karsinogenesis. Pembuatan ekstrak tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta, Uji imunohistokimia ekspresi p53 dan H-ras dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Dr. Sardjito Yogyakarta.

#### 4. 2. Materi Penelitian

##### 4. 2. 1. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan adalah Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* betina umur 40 hari dengan berat rata-rata 60-70 g. Jumlah hewan coba yang digunakan sebanyak 90 ekor, terbagi dalam dua kelompok yang terdiri dari kelompok penelitian *Gynura procumbens* 45 ekor dan kelompok penelitian *Curcuma zedoaria* 45 ekor. Kelompok penelitian tersebut terbagi dalam lima kelompok perlakuan. Sebelumnya hewan diaklimatisasi pada ruang dan kandang percobaan serta dikelompokkan berdasarkan perlakuan yang akan diberikan. Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*.

##### 4. 2 .2. Bahan Penelitian

- Tanaman

Penelitian ini menggunakan bahan yang berasal dari tanaman, yaitu daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*) dan rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*). Bagian dari tanaman tersebut diambil secara acak dengan kondisi yang masih segar lalu diproses hingga mendapatkan ekstrak etanolnya. Ekstrak etanol yang diperoleh dibagi dalam dua macam dosis yaitu 300 dan 750 mg/kg berat badan.

- Karsinogen

Sebagai bahan karsinogen digunakan 7-12, Dimethylbenz(a)antrasen (DMBA) (Sigma Chem Co).

- Bahan Imunohistokimia :

Bahan untuk uji imunohistokimia menggunakan teknik pemotongan jaringan yang sebelumnya difiksasi dalam buffer formalin, sebagai berikut : Aceton, 2-methylbutane (isopentane), *dry ice*, tempat cetakan *Peel-away*®, matriks untuk jaringan beku (*OCT*® atau *Cryomatrix*®), forceps panjang, slide *Superfrost Plus*, Antibodi monoklonal anti p53 dan anti H-ras, Phospat Buffer Saline (PBS), larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diluent antibodi untuk imunohistokimia, *Streptavidin - Horseradish Peroxidase*, substrat Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), hematoksilin, reagen biru, etanol, *xylene*.

#### 4. 2. 3. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan meliputi : Seperangkat alat bedah, steril disposable siringe , microspuit injektor, pot-pot salep, alat gelas, kandang pemeliharaan, tube steril, erlenmeyer, pipet tetes, timbangan gram elektrik, pH meter TOA HM-60S, ultra sentrifugator (Hitachi SCP 85H), neraca elektrik (Shimadzu, tipe LS-6DT), *vortex*, mikropipet, dan alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium.

### 4. 3. Variabel Penelitian

Beberapa variabel penelitian yang diperlukan dalam penelitian ini meliputi:

- Variabel Bebas : ekstrak etanol *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria* yang menggunakan dua dosis yaitu 300 dan 750 mg / kgBB dan DMBA 20 mg / kgBB.
- Variabel Tergantung : ekspresi p53 dan H-ras.
- Variabel Kendali : tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*, umur, jenis kelamin, kandang, densitas hewan coba, jenis, jumlah pakan dan minum *ad libitum*.

### 4. 4. Metode Penelitian

#### 4. 4. 1. Pembuatan ekstrak etanolik

Daun *Gynura procumbens* dan Rimpang *Curcuma zedoaria* dibersihkan dengan air mengalir, diiris menjadi bagian-bagian yang lebih kecil, ditiriskan, dijemur dengan panas matahari tidak langsung dengan ditutupi kain warna gelap. Setelah kering, diserbuk, dan diayak sehingga diperoleh serbuk *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria*. Sebanyak 500 gram serbuk diekstrak dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 L. Pengadukan dilakukan dua kali yaitu pada pagi dan sore hari, setelah 3 x 24 jam dilakukan penyaringan. Maserasi dilakukan 3 kali. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diendapkan, lalu disaring untuk selanjutnya diuapkan dengan pengurangan tekanan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

#### 4. 4. 2. Pembuatan larutan karsinogen DMBA dalam minyak jagung

DMBA ditimbang secara analitik ,dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah dengan minyak jagung dengan volume tertentu. Selanjutnya diaduk dengan alat vortex sampai terlarut dan homogen. Pembuatan larutan DMBA diperhitungkan sehingga volume yang diberikan ke tikus antara 0,5-1,0 ml untuk dosis DMBA 20 mg/kgBB.

Rumus umum yang digunakan adalah :

$$\text{Volume pemberian DMBA} = \text{berat badan tikus} / 1000 \times 20 / \text{kadar DMBA}$$

Sebanyak 50,0 mg DMBA ditimbang dan dilarutkan dalam 20,0 ml minyak jagung, hingga diperoleh larutan DMBA dengan kadar 2,5 mg/ ml. Tikus dengan berat badan 60 gr membutuhkan DMBA 2 mg atau sebanyak 0,2 ml larutan DMBA.

#### 4. 4. 3. Penyiapan sediaan uji (ekstrak etanolik *G. Procumbens* dan *C. zedoaria* )

Ekstrak etanolik *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria* yang akan diberikan pada hewan coba disuspensikan dalam aquades dengan suspending agent CMC Na 0,5 % di dalam mortir. Pembuatan CMC Na 0,5 % dengan cara mnaburkan CMC Na 0,5 gr dalam aquades hangat 100 ml dan diaduk sampai larut. Ekstrak, sesuai dengan dosis, disuspensikan dengan larutan CMC Na 0,5 % hingga diperoleh suspensi ekstrak dengan konsentrasi yang jika diberikan kepada hewan coba masing-masing akan mendapatkan volume pemberian antara 0,5 – 1,5 ml. Volume pemberian

ini tidak melebihi volume maksimal yang diperbolehkan jika diberikan secara peroral kepada hewan coba (tikus).

Rumus umum yang digunakan adalah :

$$\text{Volume pemberian} = \text{berat badan tikus} / 1000 \times \text{dosis} / \text{kadar ekstrak}$$

Sebanyak 750 mg ekstrak etanolik *Curcuma zedoaria* disuspensikan dalam CMC Na 0,5 % 25 ml, sehingga diperoleh kadar ekstrak 30 mg/ml. Untuk mendapat volume pemberian ekstrak, tikus dengan berat badan 60 gram, dosis ekstrak 300 mg/kgBB dibutuhkan 0,6 ml suspensi ekstrak, sedangkan pada dosis 750 mg/kgBB membutuhkan 1,5 ml suspensi ekstrak. Larutan ekstrak etanolik daun *Curcuma zedoaria* dalam CMC Na ini selalu dibuat baru, sebelum diberikan kepada hewan coba. Berhubung selalu ada peningkatan berat badan hewan coba setiap minggunya, maka selalu ada peningkatan jumlah ekstrak yang diberikan pada hewan coba setiap minggu serta penyesuaian kadar ekstrak yang dibuat.

#### 4.4.4. 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 intragastrik, 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 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*.**

Variabel pengamatan meliputi : insidensi pembentukan nodul tumor pada kelenjar mammae dan ekspresi gen *p53* dan *H-ras*. Pengamatan setiap variabel tersebut sangat spesifik pada waktu tertentu selama perjalanan penelitian atau perlakuan pada setiap kelompok perlakuan.

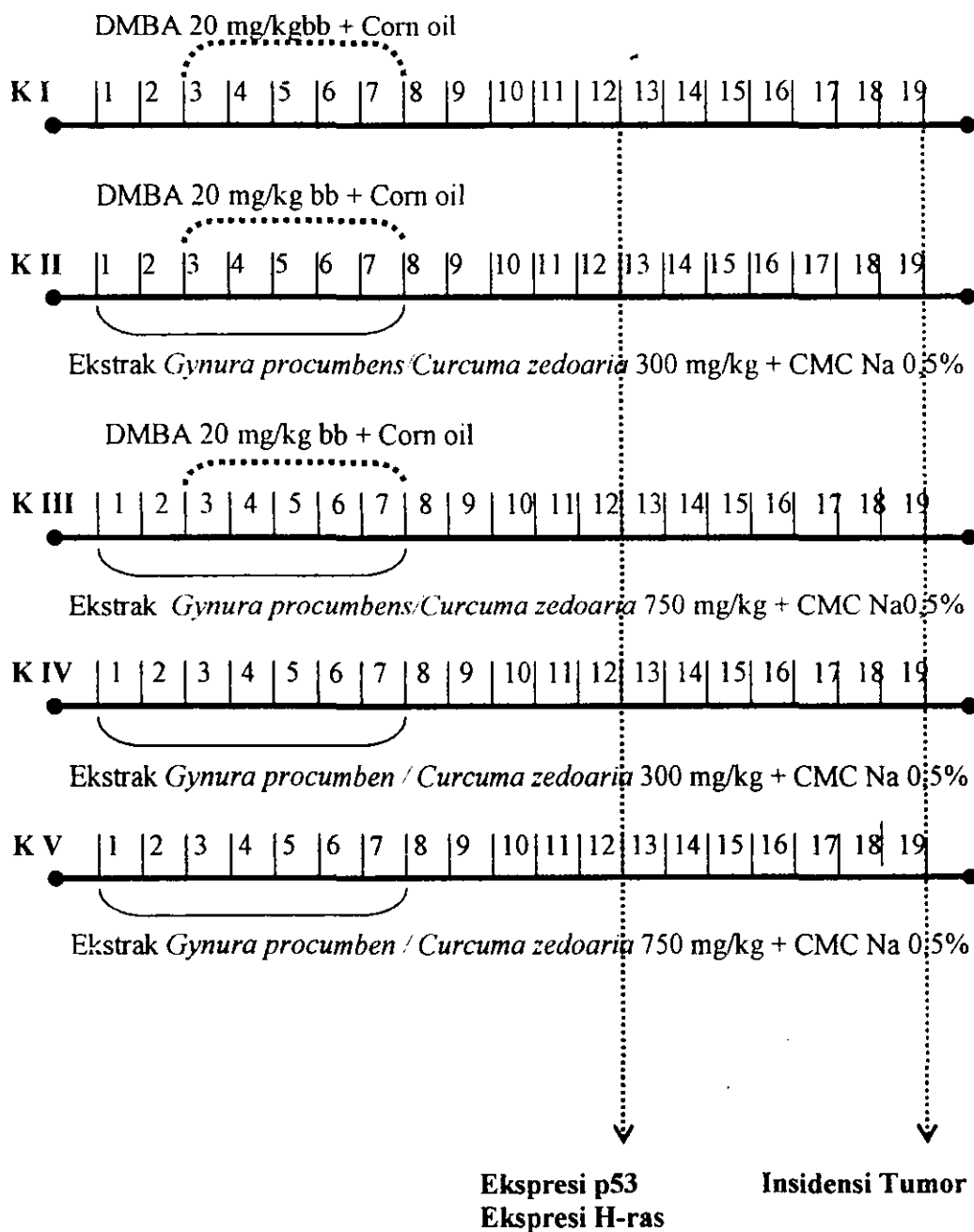
Seperti yang tercantum pada skema di bawah setiap perlakuan yang terdiri dari 9 ekor tikus, dilakukan pengamatan perkembangan karsinogenesis dan ekspresi gen secara runtut yaitu dengan mengorbankan sebagian tikus setiap tahap pengamatan. Secara rinci dapat disebutkan sebagai berikut :

**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 kelenjar mammae.

**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.



**Skema Kelompok Perlakuan :**



#### 4.4.5. Uji Imunohistokimia Ekspresi p53 dan H-ras

Proses pembuatan sediaan jaringan histopatologi dalam bentuk blok parafin diawali dengan sampel kelenjar mammae difiksasi dengan larutan buffer formalin 10% dalam pot salep, kemudian dilakukan pemisahan lemak pada kelenjar mammae dan organ tersebut dipotong kira-kira setebal 3-5 mm. Selanjutnya kelenjar mammae diletakkan dalam kaset dan dibungkus kertas saring untuk dehidrasi jaringan, lalu dicuci dengan air mengalir  $\pm$  5 menit. Selanjutnya dilakukan tahap *embedding*, bahan dasar parafin dicairkan pada suhu 70°C untuk menarik sisa-sisa minyak atau xylon agar bersih dan juga untuk menkonsistensikan keadaan jaringan agar tidak berubah struktur atau bentuknya selama 90 menit. Proses ini dilanjutkan dengan dehidrasi, penjernihan, penembusan, dan blocking dengan paraffin. Selanjutnya dilakukan proses dehidrasi dengan etanol 70%, 80%, 90%, 96% dan alcohol absolute secara berturut-turut masing-masing selama 60 menit. Kemudian dilanjutkan dengan *hyring* menggunakan xylol diulang hingga tiga kali penyaringan masing-masing penyaringan dilakukan selama 45-60 menit. Langkah selanjutnya adalah penanaman kelenjar mammae dalam parafin cair selama 24 jam (*blocking*).

Blok parafin yang telah berisi jaringan dipotong setebal 3-4  $\mu$ m dengan mikrotom dan diletakkan di atas *slide* Poly-L-Lysine kemudian diinkubasi semalam di inkubator pada suhu 45<sup>o</sup> C. Selanjutnya dilakukan deparafinisasi dengan xylen sebanyak 3 kali masing-masing selama 3 menit. Dilanjutkan dengan pencucian dengan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat kemudian direndam dalam 3 % hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam metanol) selama 20 menit, lalu dicuci dengan aquadest dilanjutkan pencucian dengan

PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan *antigen retrieval* dengan melakukan perendaman preparat dalam bufer sitrat pH 6,0 di dalam *microwave*. Biarkan dingin selama 20-30 menit dilanjutkan dengan pencucian PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat diinkubasikan dalam *normal mouse serum* selama 5 menit. Selanjutnya *normal mouse serum* dibersihkan (tanpa dicuci), kemudian preparat ditetesi dengan antibodi primer IgG<sub>2b</sub> (mouse monoklonal antibodi anti *p53*) ab-1 (clone Pab 240) dan H-*ras* IgG1 (F235) : sc-29, disimpan selama 24 jam di dalam lemari es (8°C). Setelah itu, preparat dicuci dalam PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit, kemudian diinkubasikan dengan antibodi sekunder terbiotinilasi selama 5 menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya ditetesi dengan *streptavidin-peroksidase* selama 5 menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Dilanjutkan dengan inkubasi dalam 3,3-Diaminobenzidin (DAB) selama 5-15 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10-15 menit, selanjutnya dilakukan *counterstain* dengan *Meyers* selama 3-4 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir selama 10-15 menit. Dilanjutkan rehidrasi secara bertingkat dengan etanol absolut, etanol 95%, etanol 80% dan xylol sebanyak 2 kali. Terakhir dilakukan *mounting* sebelum ditutup dengan *cover glass*. Pengecatan imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Dr. Sardjito-Yogyakarta dan Laboratorium Patologi Anatomi dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM-Yogyakarta. Selanjutnya dilakukan pengamatan ekspresi protein *p53* dan H-*ras* pada sel epitel duktus mammae pada semua perlakuan hewan uji. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x lensa

objektif. Metode pengecatan imunohistokimia mendeteksi ekspresi protein secara spesifik berdasarkan reaksi antigen-antibodi. Hasil reaksi antigen-antibodi divisualisasi dengan kromogen DAB yang akan berwarna coklat pada daerah membran sel dilihat dibawah mikroskop, sedangkan sel yang tidak mengekspresikan memberikan warna biru pada membran sel. Pengamatan dilakukan dengan tiga lapangan pandang (dengan masing-masing lapangan pandang terdiri dari minimal 100 sel epitel duktus mammae pada 3-5 duktus kelenjar mammae) pada semua preparat setiap kelompok perlakuan untuk mengetahui efek ekstrak etanolik *Gynura procumbens* terhadap peningkatan ekspresi *Mutant p53* dan *H-ras*. Nilai ekspresi *p53* dan *H-ras* dinyatakan dengan jumlah sel epitel duktus mammae yang mengekspresikan protein *p53* dan *H-ras*. Jumlah sel tersebut didapatkan dengan melakukan penghitungan rata-rata sel epitel duktus kelenjar mammae pada tiga lapang pandang yang mengekspresikan *p53* dan *H-ras* tiap sampel pada setiap kelompok hewan uji. Pemeriksaan dilakukan di bawah mikroskop binokuler (Olympus® CX21 microscope digital camera system) di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

#### **4.4.6. Pengamatan insidensi tumor**

Mulai minggu pertama setelah inisiasi DMBA terakhir dilakukan palpasi pada kelenjar mammae tikus. Palpasi dilakukan setiap minggu hingga minggu ke-12 setelah inisiasi DMBA terakhir. Jumlah nodul tumor masing masing tikus dicatat. Insidensi adalah persentase dari jumlah tikus yang mengandung tumor pada satu kelompok perlakuan.

#### 4.5. Analisis Data

Evaluasi hasil uji antikarsinogenesis meliputi pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi insidensi tumor, tikus setelah diinisiasi dengan DMBA yang menggambarkan tentang jumlah tikus yang terkena tumor (insidensi tumor) Pengamatan mikroskopis meliputi keadaan sitologi kelenjar mammae dari hasil pewarnaan Immunohistokimia, untuk mengetahui adanya peningkatan ekspresi protein mutant p53 dan H-ras.

Analisis hasil penelitian meliputi data jumlah tikus yang mengandung tumor mammae (insidensi) dan jumlah sel yang mengekspresikan p53 dan H-ras diuji normalitas data dengan *Kolmogorov-Smirnov*. Bila data terdistribusi normal, kemudian dianalisa dengan *One-Way ANOVA* dilanjutkan dengan *post-hoc test* Uji Jarak Berganda (*Duncan test*) dengan taraf kepercayaan 95%. Uji statistik dilakukan dengan bantuan perangkat lunak *SPSS® 16 for Windows®*.

## BAB V

## HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. 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 5.1 tampak adanya penurunan ekspresi *Mutant p53* protein pada masing-masing perlakuan ekstrak dibandingkan dengan perlakuan I.

**Tabel 5.1. 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 <sup>a</sup>	
II	43,33	38,44 $\pm$ 6,33 <sup>b</sup>	41,95 %
III	48,33	43,97 $\pm$ 4,31 <sup>b</sup>	33,61 %
IV	18,33	16,37 $\pm$ 2,04 <sup>c</sup>	
V	15,67	14,61 $\pm$ 4,01 <sup>c</sup>	

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

Perlakuan I : DMBA 20 mg/kg bb.

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

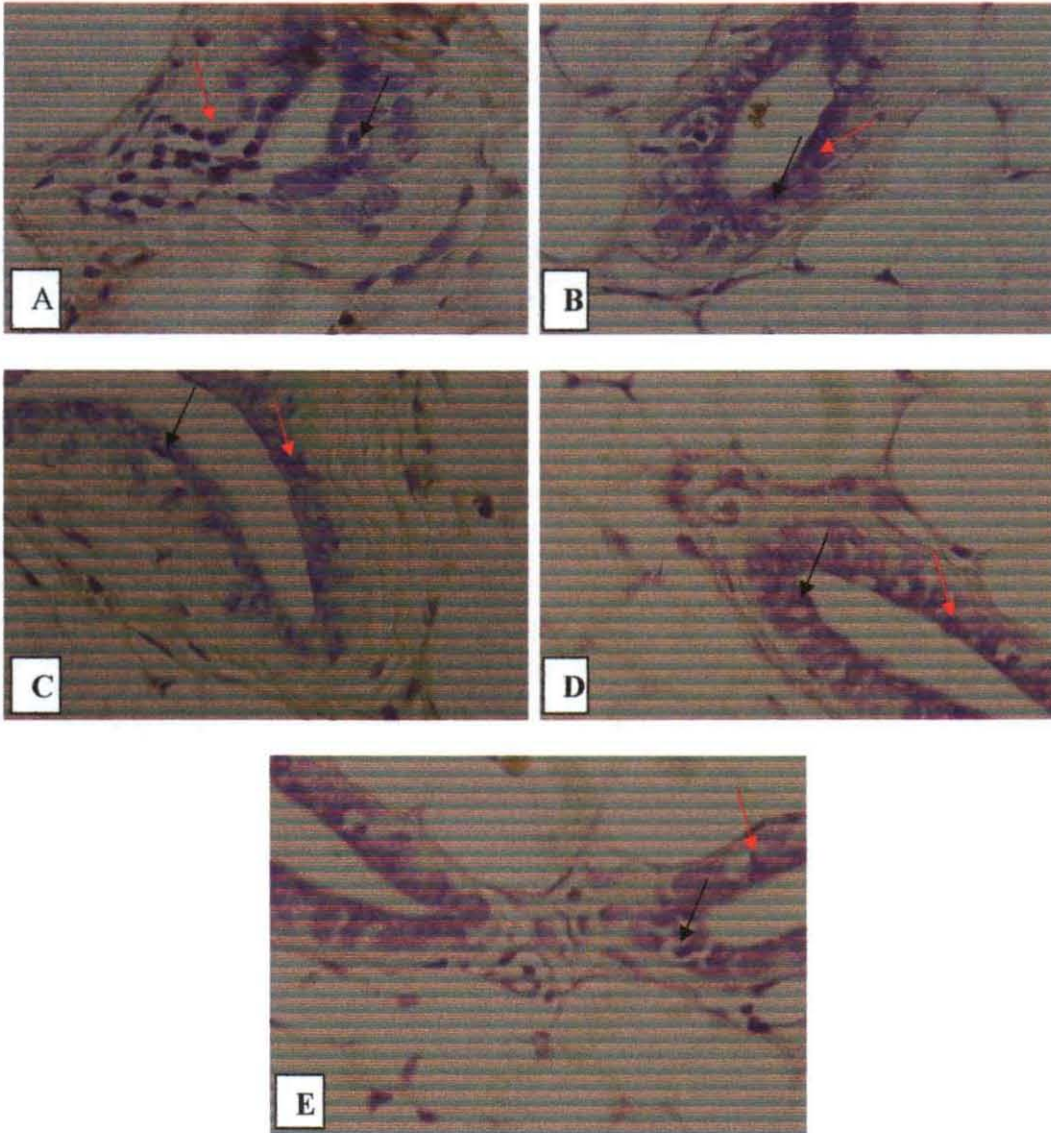
Perlakuan III : DMBA 20 mg/kg bb + *Gynura procumbens* 750 mg/kg bb.

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

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

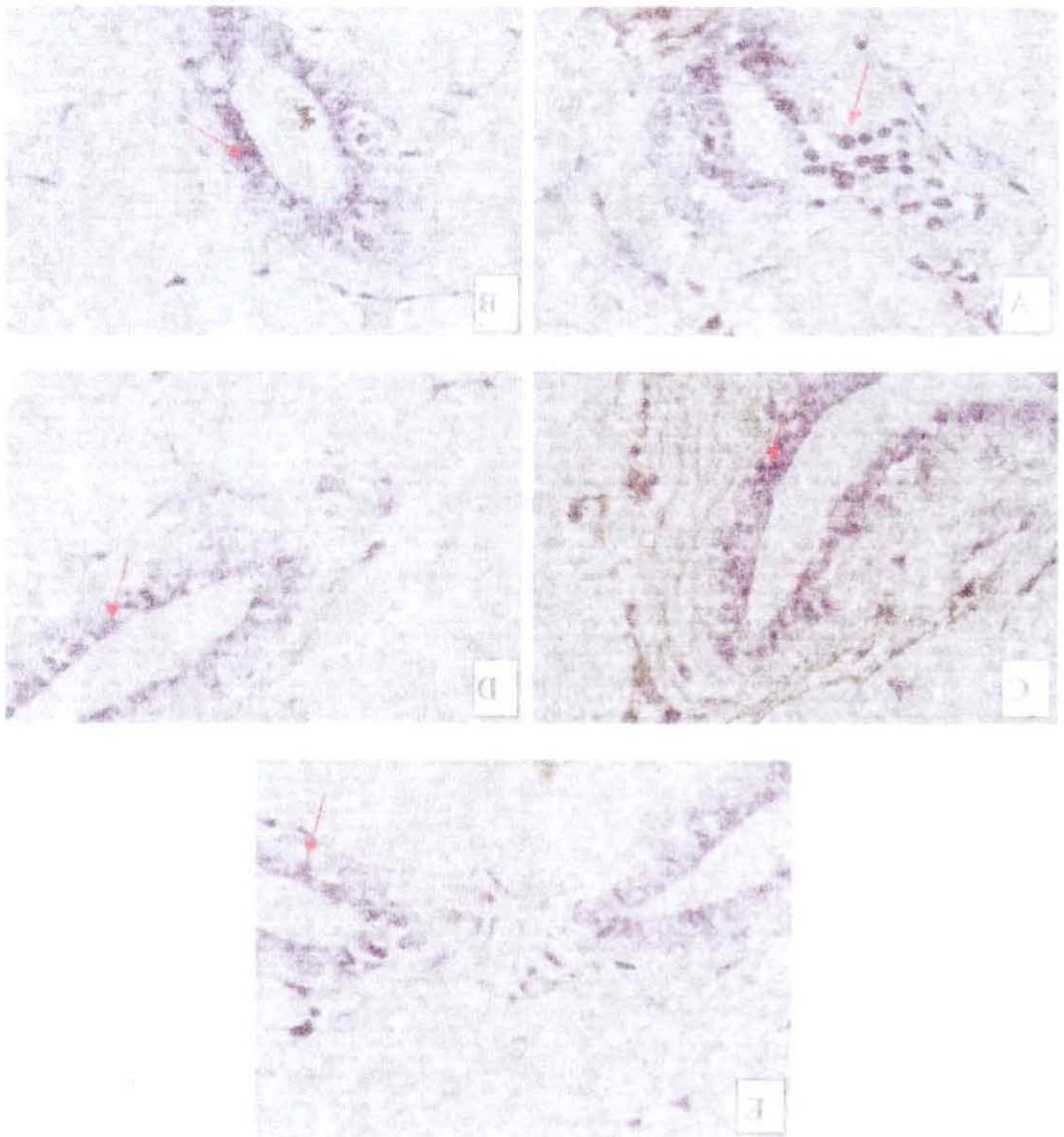
Hasil pengamatan dan penghitungan persentase rata-rata ekspresi *Mutant p53* pada perlakuan I adalah 66,23  $\pm$  4,57 dibandingkan dengan perlakuan II dengan persentase rata-rata 38,44 + 6,33 menunjukkan terjadinya penurunan sebesar 41,95

%. Demikian pula bila dibandingkan dengan perlakuan II dengan persentase rata-rata  $43,97 \pm 4,31$



Gambar 5.1. Ekspresi *Mutant p53* pada sel epitel kelenjar mammae tikus setelah pemberian *Gynura procumbens* dan inisiasi dengan DMBA, ditunjukkan dengan warna coklat gelap pada sitoplasma dan inti sel (panah merah), sedangkan yang tidak mengekspresikan *Mutant p53* ditunjukkan warna putih pada sitoplasma sel dengan inti gelap (panah hitam).

Keterangan : A) Perlakuan I ; B) Perlakuan II ; C) Perlakuan III ; D) Perlakuan IV dan E) Perlakuan V.



Gambar 2.1. Ekspresi protein p53 pada sel epitel kolon mamaria tikus setelah pemberian DMBA. A) Kontrol, B) 1 minggu, C) 2 minggu, D) 3 minggu, E) 4 minggu. (Papan basah, H&E, 40x). Keterangan : A) Kontrol, B) 1 minggu, C) 2 minggu, D) 3 minggu, E) 4 minggu.



menunjukkan terjadinya penurunan sebesar 33,61 %. Hasil uji lanjutan dengan uji jarak berganda Duncan menunjukkan perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) perlakuan I dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Sedangkan pada perlakuan II dan III tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ), hal tersebut membuktikan bahwa pemberian ekstrak *Gynura procumbens* 300 dan 750 mg/kg bb memberikan efek yang relatif sama dalam hal penurunan ekspresi *Mutant p53* bila dibandingkan dengan perlakuan I. Demikian pula perlakuan IV dan V tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ).

### 5.2. Ekspresi *Mutant p53* pada Pemberian Ekstrak *Curcuma zedoaria*

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 5.2 tampak adanya penurunan ekspresi *Mutant p53* protein pada masing-masing perlakuan ekstrak dibandingkan dengan perlakuan I.

**Tabel 5.2. 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 $\pm$ SD	Penurunan (%)
I	67,67	63,39 $\pm$ 5,39 <sup>a</sup>	
II	44,00	39,67 $\pm$ 6,69 <sup>b</sup>	37,42 %
III	47,00	44,45 $\pm$ 5,34 <sup>b</sup>	29,87 %
IV	24,00	22,21 $\pm$ 4,47 <sup>c</sup>	
V	19,33	17,78 $\pm$ 1,79 <sup>c</sup>	

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

Perlakuan I : DMBA 20 mg/kg bb.

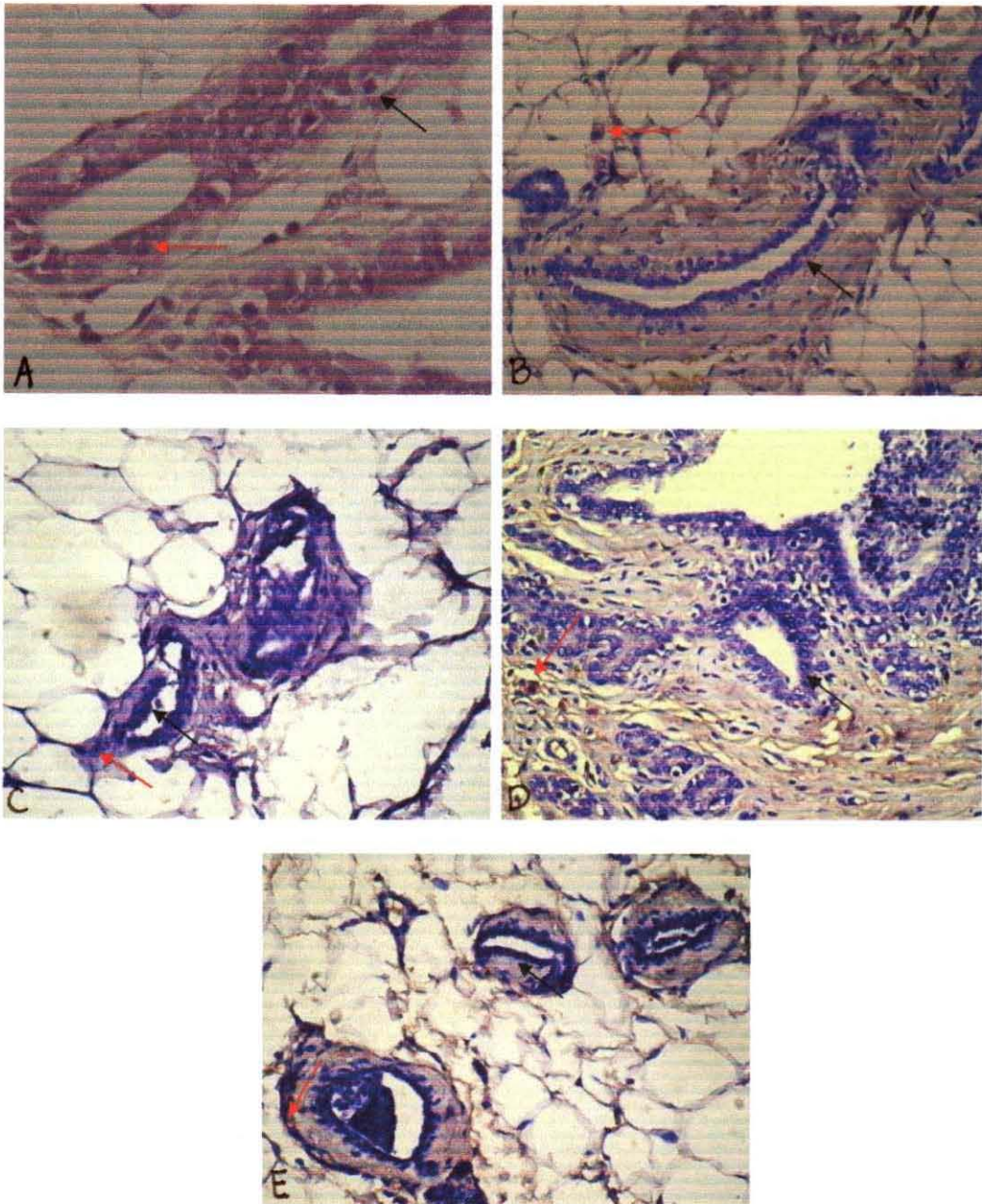
- Perlakuan II : DMBA 20 mg/kg bb + *Curcuma zedoaria* 300 mg/kg bb.  
Perlakuan III : DMBA 20 mg/kg bb + *Curcuma zedoaria* 750 mg/kg bb.  
Perlakuan IV : Ekstrak *Curcuma zedoaria* 300 mg/kg bb.  
Perlakuan V : Ekstrak *Curcuma zedoaria* 750 mg/kg bb.

Hasil uji normalitas dengan *Kolmogorov-Smirnov* menunjukkan bahwa data keseluruhan terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ), selanjutnya uji anova satu arah menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) pada pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* terhadap persentase ekspresi *Mutant p53* sel epitel kelenjar mammae. Uji lanjutan dilakukan dengan menggunakan uji jarak berganda *Duncan* untuk mengetahui perbedaan rata-rata persentase ekspresi *Mutant p53* di setiap kelompok perlakuan. Persentase ekspresi *Mutant p53* sel epitel kelenjar mammae tertinggi didapatkan pada kelompok control 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*

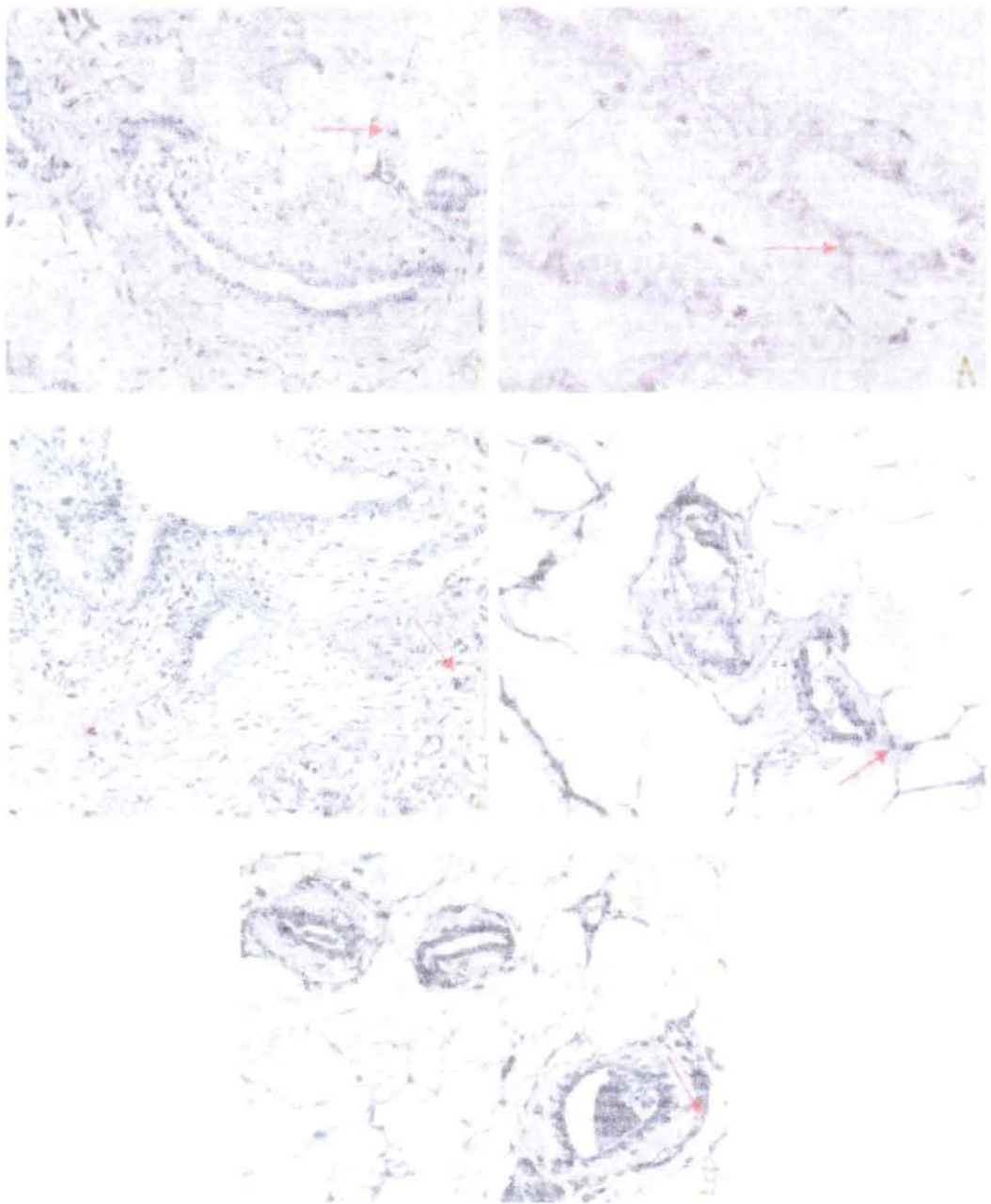
al. (2000) bahwa kanker yang membawa perubahan genetik *p53* mempunyai karakter yang agresif. Protein *p53* adalah produk dari *tumor supresor gen* yang berada di kromosom manusia ke 17 yang kemudian akan mengatur proliferasi sel normal. Mutasi dari gen *p53* telah dilaporkan terjadi pada kanker payudara 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 *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* (epoksid dehidrodioI) 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.



Gambar 5.2. Ekspresi *Mutant p53* pada sel epitel kelenjar mammae tikus setelah pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* dan inisiasi DMBA, ditunjukkan dengan warna coklat gelap pada sitoplasma dan inti sel (panah merah), sedangkan yang tidak mengekspresikan *Mutant p53* ditunjukkan warna putih pada sitoplasma sel dengan inti gelap (panah hitam).

Keterangan : A) Perlakuan I ; B) Perlakuan II ; C) Perlakuan III ; D) Perlakuan IV dan E) Perlakuan V.



Gambar 5.2. Efek dari *Wuwei yu* pada sel epitel ketuban manusia tidak terdapat perubahan elastik (warna *Masson's* dan nisiasi DAB // ditunjukkan dengan warna coklat gelap pada epitelium dan inti sel (panah merah) sedangkan yang tidak menunjukkan *Wuwei yu* ditunjukkan warna putih pada epitelium sel dengan inti gelap (panah hitam).

Keterangan : (A) Kontrol ; (B) Perlakuan I ; (C) Perlakuan II ; (D) Perlakuan III ; (E) Perlakuan IV dan E) Perlakuan V.

### 5.3. 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 5.3 tampak adanya penurunan ekspresi protein *Mutant H-ras* pada masing-masing perlakuan ekstrak dibandingkan dengan perlakuan I.

**Tabel 5.3. 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 $\pm$ SD	Penurunan (%)
I	66,33	$61,54 \pm 3,50^a$	
II	41,33	$39,32 \pm 7,12^b$	36,11 %
III	41,67	$43,27 \pm 13,76^b$	29,69 %
IV	20,67	$19,34 \pm 7,73^c$	
V	18,33	$17,51 \pm 5,83^c$	

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

Perlakuan I : DMBA 20 mg/kg bb.

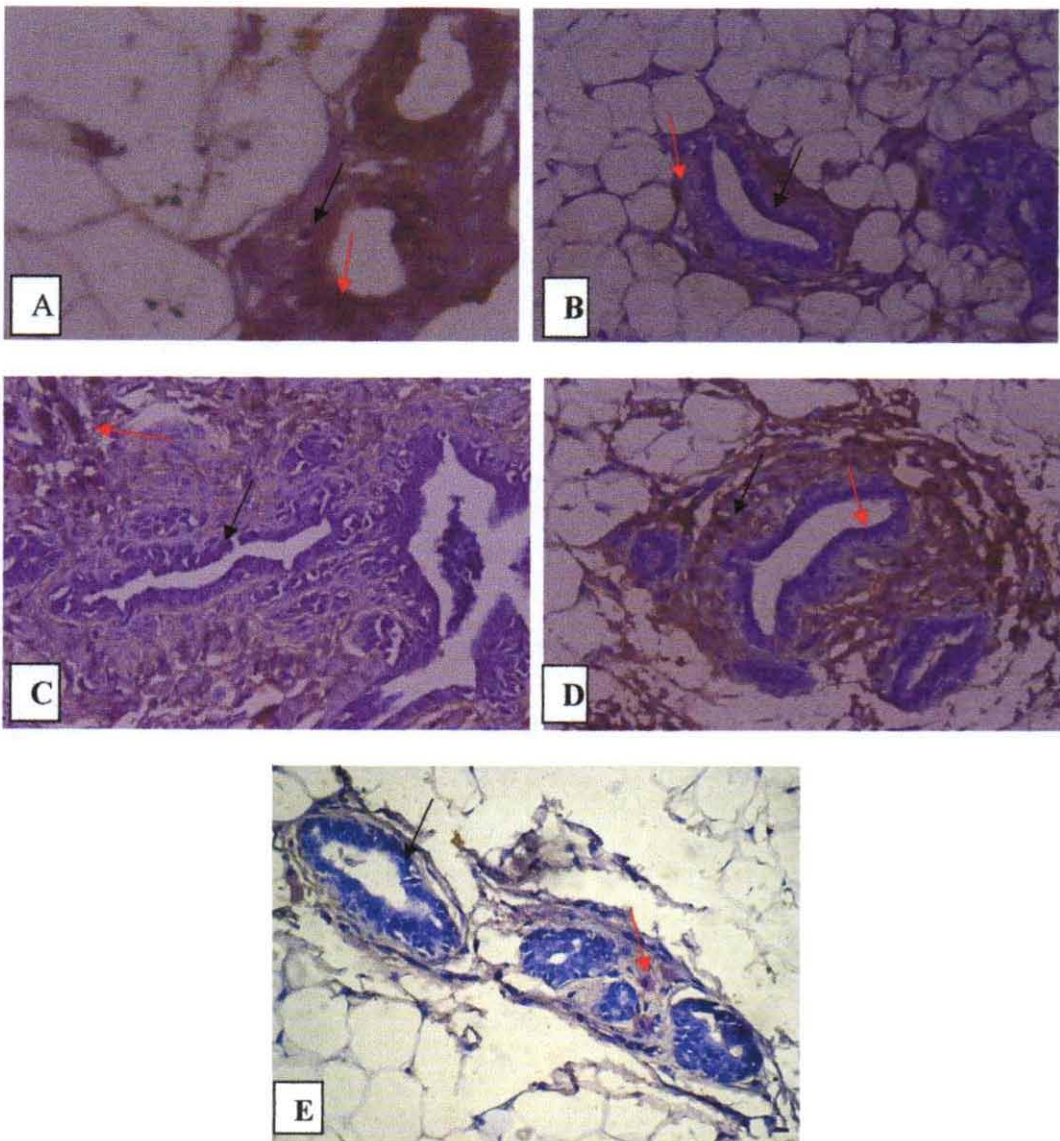
Perlakuan II : DMBA 20 mg/kg bb + *Gynura procumbens* 300 mg/kg bb.

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.

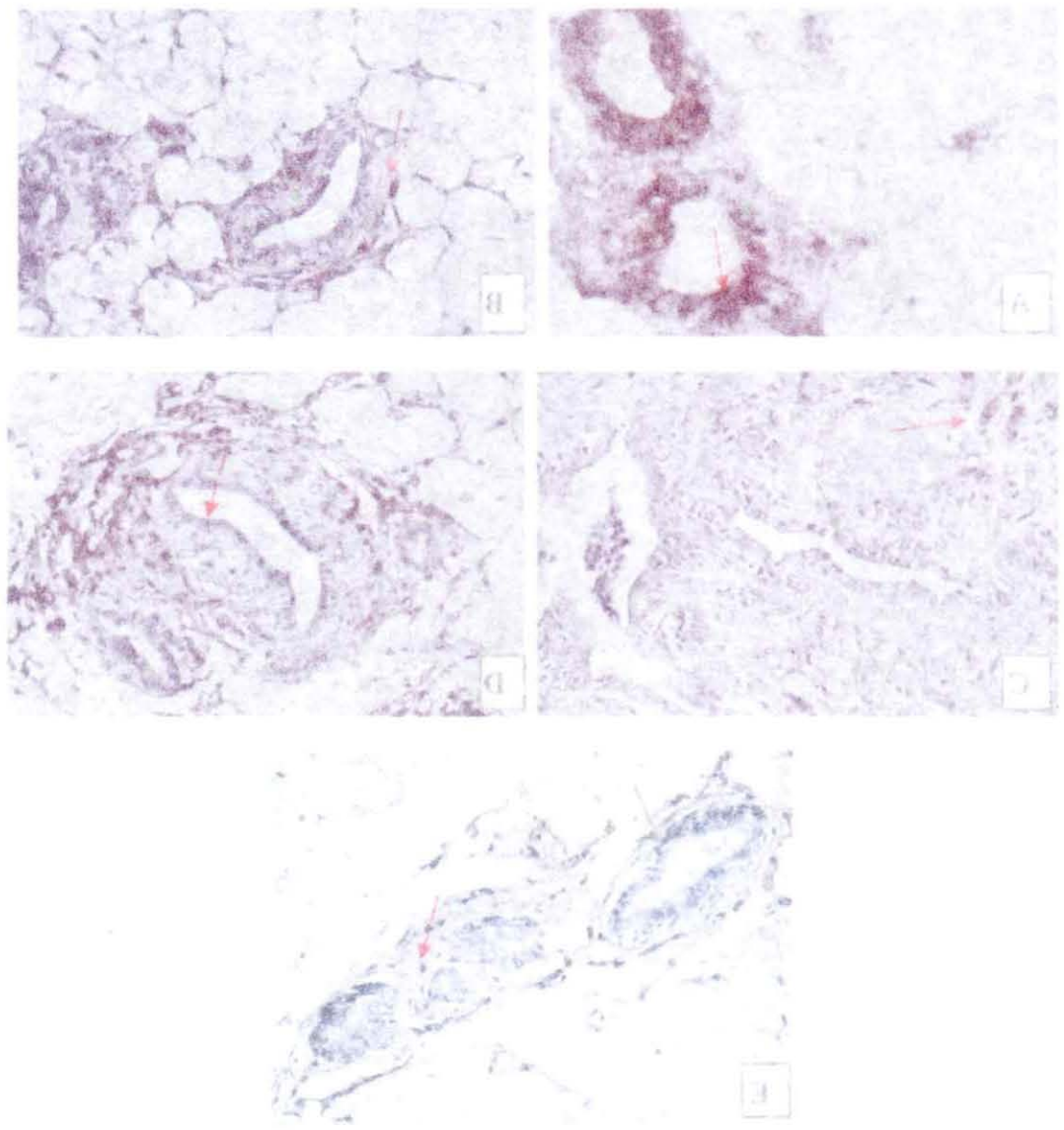
Hasil pengamatan dan penghitungan persentase rata-rata ekspresi *Mutant H-ras* pada perlakuan I adalah  $61,54 \pm 3,50$  dibandingkan dengan perlakuan II dengan persentase rata-rata  $39,32 \pm 7,12$  menunjukkan terjadinya penurunan sebesar 36,11 %. Demikian pula bila dibandingkan dengan perlakuan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



Gambar 5.3. Ekspresi *Mutant H-ras* pada sel epitel kelenjar mammae tikus, ditunjukkan dengan warna coklat gelap pada sitoplasma dan inti sel (panah merah), sedangkan yang tidak mengekspresikan *Mutant H-ras* ditunjukkan warna biru pada sitoplasma dan inti sel gelap (panah hitam).

Keterangan : A) Perlakuan I ; B) Perlakuan II ; C) Perlakuan III ; D) Perlakuan IV dan E) Perlakuan V.

Hasil uji lanjutan dengan uji jarak berganda Duncan untuk mengetahui perbedaan rata-rata setiap kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) antara perlakuan I dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Sedangkan pada



Gambar 3.3. Ekspresi H-vex pada sel epitel kolonik manusia tidak ditunjukkan dengan warna coklat gelap pada sitoplasma dan inti sel pada kontrol (A) sedangkan yang tidak mengekspresikan H-vex ditunjukkan warna biru pada sitoplasma dan inti sel gelap (pemeriksaan H&E). (A) Perlakuan I ; (B) Perlakuan II ; (C) Perlakuan III ; (D) Perlakuan IV dan (E) Perlakuan V.

Hasil uji lanjut dengan uji t-test berganda Duncan untuk mengetahui perbedaan antar setiap kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) antara perlakuan I dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Sedangkan pada



perlakuan II dan III tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p>0,05$ ), hal tersebut membuktikan bahwa pemberian ekstrak *Gynura procumbens* 300 dan 750 mg/kg bb memberikan efek yang relatif sama dalam hal penurunan ekspresi *Mutant H-ras* bila dibandingkan dengan perlakuan I. Demikian pula perlakuan IV dan V tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p>0,05$ ).

#### 5.4. Ekspresi *Mutant H-ras* pada Pemberian Ekstrak *Curcuma zedoaria*

Hasil pengamatan uji imunohistokimia pada sel kelenjar mammae tikus menunjukkan bahwa pada pemberian ekstrak etanolik *Curcuma zedoaria* terjadi penurunan ekspresi protein *Mutant H-ras* pada sel kelenjar mammae tikus galur *Sprague dawley* yang diinduksi DMBA sangat bermakna ( $p<0,05$ ) pada analisis varian satu arah. Pada Tabel 5.4 tampak adanya penurunan ekspresi *Mutant H-ras* protein pada masing-masing perlakuan ekstrak dibandingkan dengan perlakuan I.

**Tabel 5.4. 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 <sup>a</sup>	
II	44,00	49,09 $\pm$ 14,14 <sup>b</sup>	30,28 %
III	47,00	48,63 $\pm$ 12,20 <sup>b</sup>	30,93 %
IV	24,00	19,92 $\pm$ 6,91 <sup>c</sup>	
V	19,33	16,59 $\pm$ 3,73 <sup>c</sup>	

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

Perlakuan I : DMBA 20 mg/kg bb.

Perlakuan II : DMBA 20 mg/kg bb + *Curcuma zedoaria* 300 mg/kg bb.

Perlakuan III : DMBA 20 mg/kg bb + *Curcuma zedoaria* 750 mg/kg bb.

Perlakuan IV : Ekstrak *Curcuma zedoaria* 300 mg/kg bb.

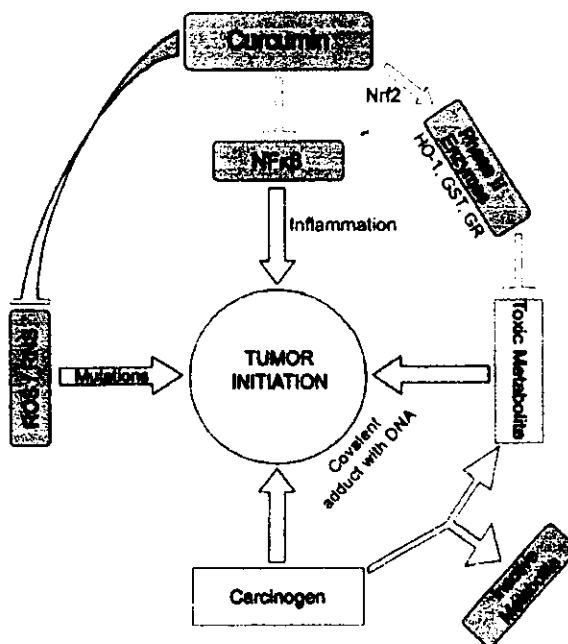
Perlakuan V : Ekstrak *Curcuma zedoaria* 750 mg/kg bb.

Hasil uji normalitas dengan *Kolmogorov-Smirnov* menunjukkan bahwa data keseluruhan terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ), selanjutnya uji anova satu arah menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) pada pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* terhadap persentase ekspresi *Mutant p53* sel epitel kelenjar mammae. Uji lanjutan dilakukan dengan menggunakan uji jarak berganda *Duncan* untuk mengetahui perbedaan rata-rata persentase ekspresi *Mutant H-ras* di setiap kelompok perlakuan. Persentase ekspresi *Mutant H-ras* sel epitel kelenjar mammae tertinggi didapatkan pada kelompok kontrol DMBA 20 mg/kg bb sebesar  $70,41 \pm 1,33^a$ . 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  $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ .

Pada aras molekuler, metabolit reaktif DMBA telah dibuktikan mampu menimbulkan stres 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 & Akunda, 2001). Sehingga penghambatan ekspresi dan aktivitas sitokrom P450 dapat menghambat aktivasi DMBA.

Mekanisme induksi enzim GST- $\mu$  oleh kurkumin telah diteliti Thangapazham *et al.* (2006), yang menjelaskan bahwa kurkumin bekerja dengan cara menginduksi ekspresi HO-1 memberikan sinyal melalui (NF-E2)-related factor 2 (Nrf-2) dan NF- $\kappa$ B sehingga demikian berpotensi mengurangi stress oksidasi. Nrf2 adalah faktor transkripsi yang meregulasi ekspresi enzim konjugasi seperti glutathione S-transferase (GST) melalui *antioxidant response element* (ARE).

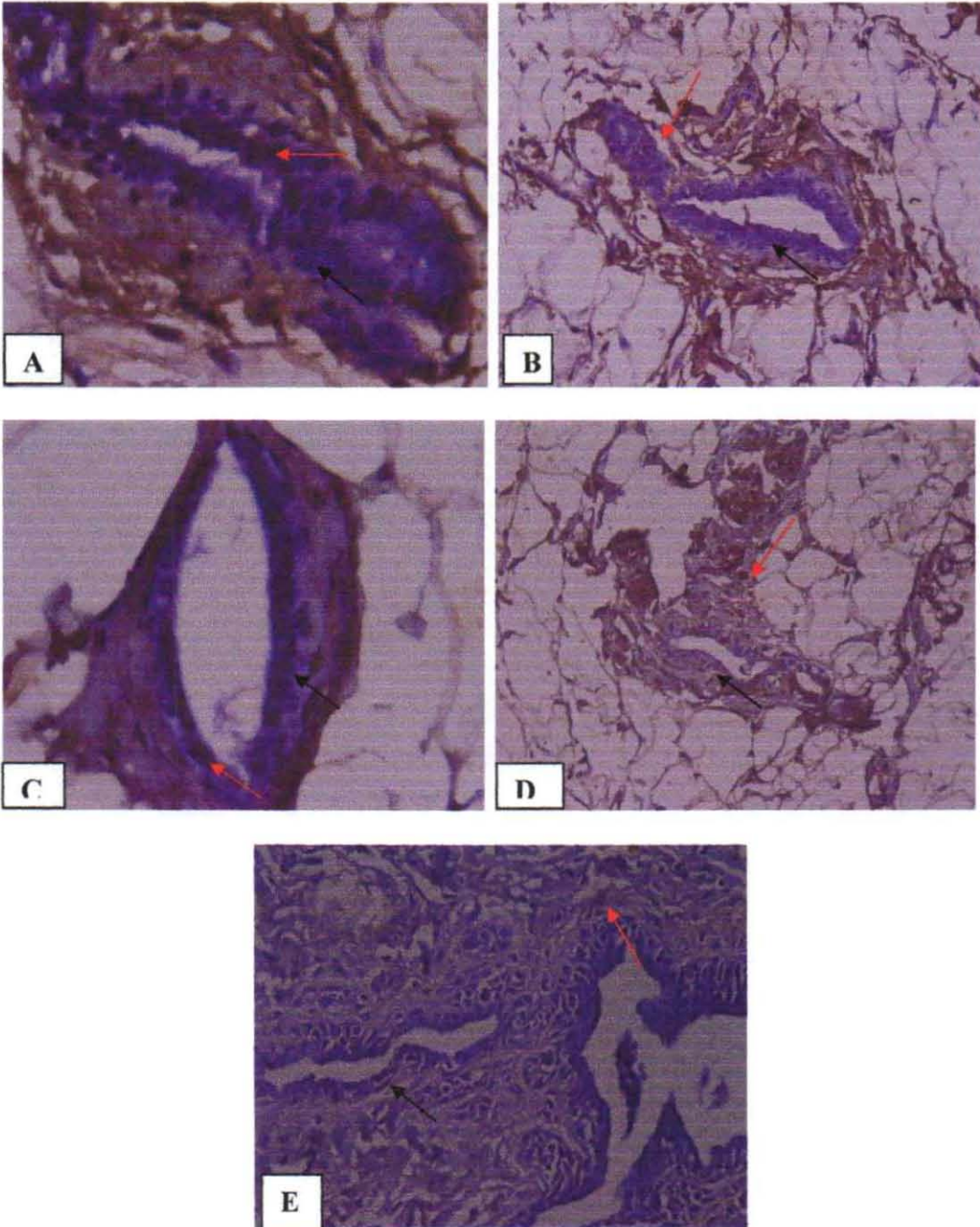


**Gambar 5.4.** Skema dari target-target kemopreventif dari kurkumin dalam menekan inisiasi tumor. (Thangapazham, *et al.*, 2006)

**Keterangan:** ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; NFκB, nuclear factor kappa B; Nrf2, (NF-E2)-related factor 2; HO-1, hemoxygenase-1; GST, glutathione S-transferase; GR, glutathione reductase.

Penurunan ekspresi *Mutant H-ras* 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 *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* (epoksid dehidrodiol) dengan meningkatkan aktivitas enzim GST yang bekerja mengkonjugasi bahan karsinogen tersebut untuk dikeluarkan dari dalam tubuh melalui ekskresi urin.

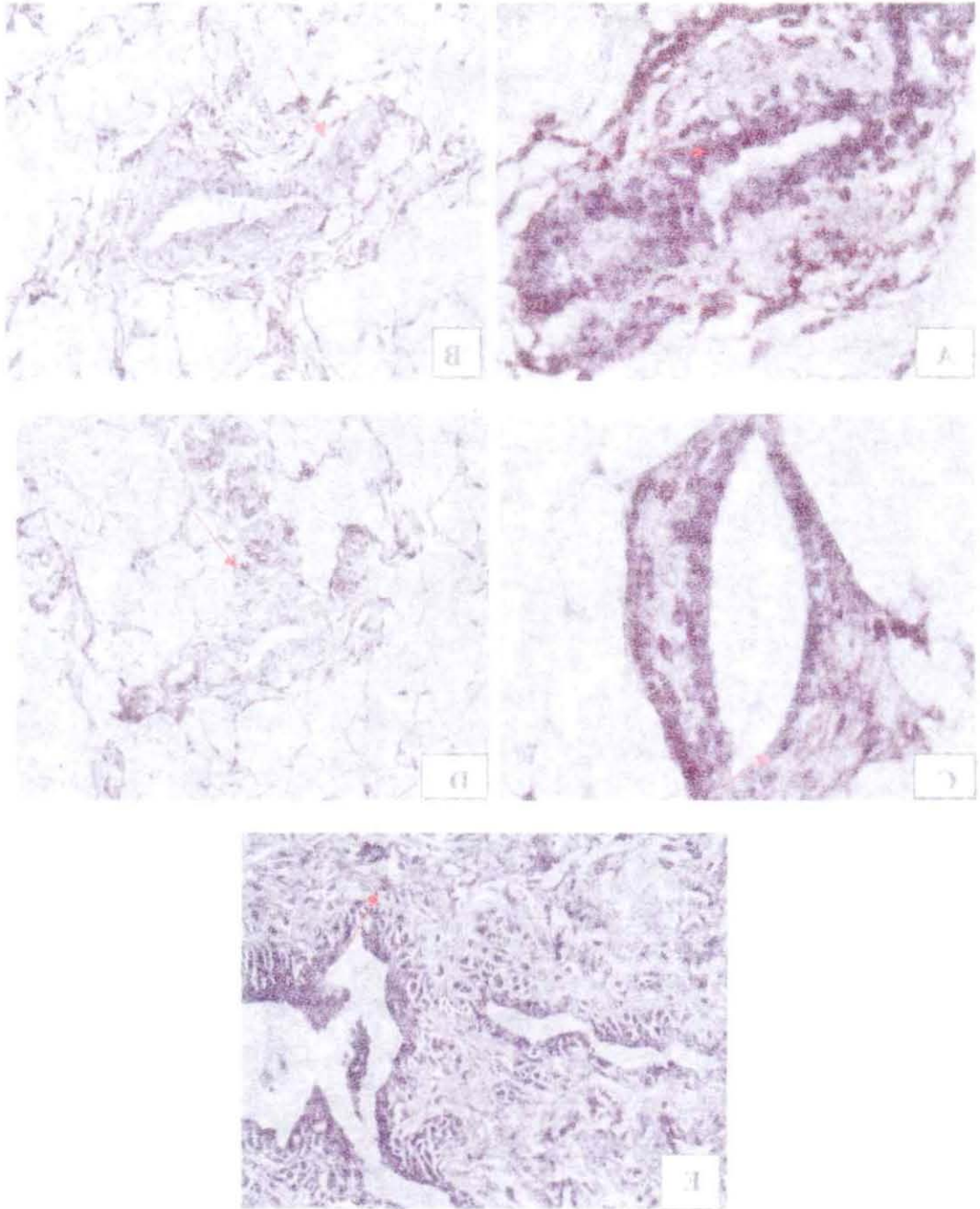
Akibatnya kerusakan DNA atau kejadian mutasi dari *oncogene* dapat dihindari karena penghambatan pembentukan senyawa reaktif dan interaksinya dengan DNA.



Gambar 5.5. Ekspresi *Mutant p53* pada sel epitel kelenjar mammae tikus setelah pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* dan inisiasi DMBA, ditunjukkan dengan warna coklat gelap pada sitoplasma dan inti sel (panah merah),

Alibanza kerangka DNA anak kambing mata- dan aw wawa- daga- dhihina- kama-

peogha-pan be-berak-an serawa- rek-til dan in-ter-ak-sya- den-gan DNA.



Gambar 2.5. Ekspresi Awawa- woz pada sel epitel kelenjar mammae tikus setelah pemberian ekstrak ( wawa- serawa- dan inisiasi DMBA- dan ap-lik-a-si- den-gan warna coltan- pada sitoplasma dan inti sel (panah merah).

sedangkan yang tidak mengekspresikan *Mutant p53* ditunjukkan warna putih pada sitoplasma sel dengan inti gelap (panah hitam).

Keterangan : A) Perlakuan I ; B) Perlakuan II ; C) Perlakuan III ; D) Perlakuan IV dan E) Perlakuan V.

### **5.5. 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 .ng/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 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 tikus yang terkena kanker pada tiap 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.

Hasil uji normalitas data dengan *Kolmogorov-Smirnov Test* menunjukkan bahwa data insidensi kanker payudara terdistribusi normal, kemudian dilanjutkan dengan *One-Way ANOVA* menunjukkan bahwa ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap penurunan insidensi kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA. Analisis lanjutan untuk mengetahui perbedaan rerata antar perlakuan dilakukan dengan *Duncan Test* menunjukkan penurunan insidensi secara signifikan, tampak pada perlakuan II, III, IV, dan V berbeda signifikan dengan perlakuan I. Tetapi tidak ada perbedaan yang signifikan antar masing-masing perlakuan II, III, IV, dan V ( $p < 0,05$ ).

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 perlakuan III juga berbeda signifikan dibanding dengan perlakuan I dan mengalami penurunan sebesar 16,7 % (Tabel 5.5).

**Tabel 5.5. 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 <sup>a</sup>	



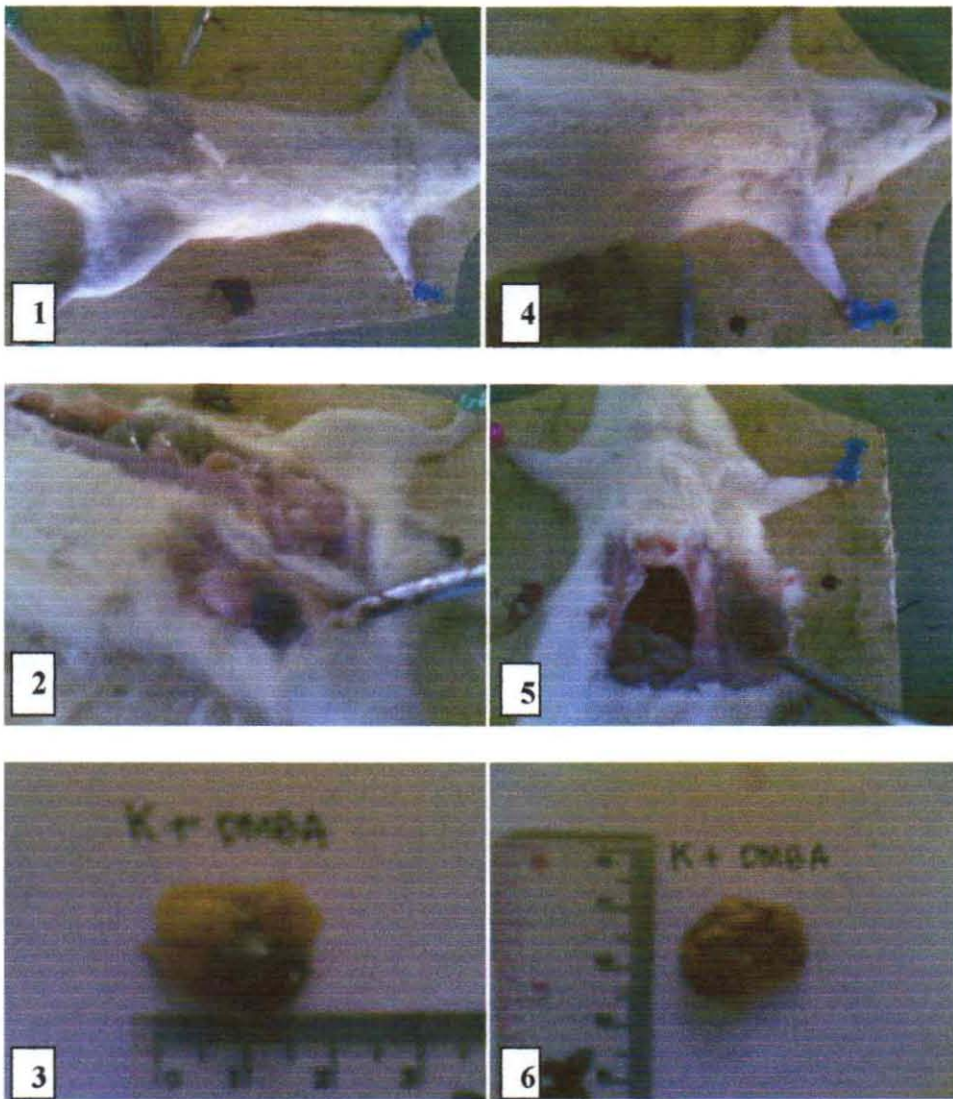
II	6	2	33,3 <sup>bc</sup>	66,70
III	6	5	83,3 <sup>b</sup>	16,70
IV	6	0	0 <sup>c</sup>	
V	6	0	0 <sup>c</sup>	

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

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 diatas terjadi penundaan waktu mula munculnya nodul sekitar 2 minggu dibanding perlakuan I.

#### 5.6. Insidensi Tumor Kelenjar Mamae pada Pemberian *Curcuma zedoaria*

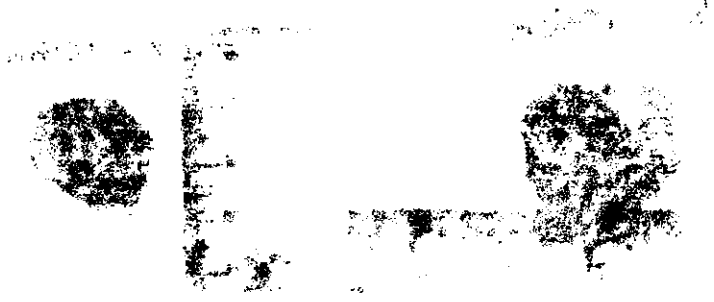
Hasil induksi DMBA dosis 20 mg/kg BB, frekuensi pemberian 10 kali pemberian, memunculkan nodul pertama kali pada mammae tikus pada minggu ketiga setelah inisiasi DMBA terakhir. Insidensi timbulnya nodul mencapai 100% (semua tikus dalam satu kelompok terkena kanker) terjadi pada minggu ke-12, dengan perkembangan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



Gambar 5.6. Nodul tumor kelenjar mammae pada tikus (minggu ke-19) setelah inisiasi dengan DMBA 20 mg/kg bb.

Keterangan : 1 dan 4 Pertumbuhan nodul tumor pada daerah inguinal dan lateral  
 2 dan 5. Nekropsi nodul tumor  
 3 dan 6. Isolasi nodul tumor setelah nekropsi

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 tiap kelompok (insidensi), lebih sedikit dibandingkan dengan perlakuan III. Pada minggu ke-12, perlakuan II terdapat tiga ekor tikus yang muncul kanker, sedangkan pada perlakuan III terdapat empat 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.

Hasil uji normalitas data dengan *Kolmogorov-Smirnov Test* menunjukkan bahwa data insidensi kanker payudara terdistribusi normal, kemudian dilanjutkan dengan *One-Way ANOVA* menunjukkan bahwa ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* berpengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap penurunan insidensi kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA. Analisis lanjutan untuk mengetahui perbedaan rerata antar perlakuan dilakukan dengan *Duncan Test* menunjukkan penurunan insidensi secara signifikan, tampak pada perlakuan II, III, IV, dan V berbeda signifikan dengan perlakuan I. Tetapi tidak ada perbedaan yang signifikan antar masing-masing perlakuan II, III, IV, dan V ( $p < 0,05$ ).

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 50,50%. Sedangkan insidensi kanker payudara perlakuan III juga berbeda

signifikan dibanding dengan perlakuan I dan mengalami penurunan sebesar 33,30 % (Tabel 5.6).

**Tabel 5.6.** Efek ekstrak etanolik *C. zedoaria* terhadap insidensi kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA

Perlakuan	Jumlah tikus yang diuji	Jumlah tikus terkena kanker	Insidensi (%)	Penurunan Insidensi (%)
I	6	6	100 <sup>a</sup>	
II	6	3	50,00 <sup>b</sup>	50,00
III	6	4	66,67 <sup>b</sup>	33,30
IV	6	0	0 <sup>c</sup>	
V	6	0	0 <sup>c</sup>	

**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 dalam 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 kandungan 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 penurunan 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 memperlambat terjadinya apoptosis. Sejumlah studi pada hewan juga menunjukkan

bahwa kurkumin efektif di dalam menghambat karsinogenesis pada kanker kulit, kolon, rongga muliut, lambung dan kelenjar mammae (Tamimi, *et al.*, 2002).

## BAB 6

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. KESIMPULAN

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) :

1. Mampu menghambat ekspresi *p53* mutan sel kelenjar mammae.
2. Mampu menghambat ekspresi H-ras mutan sel kelenjar mammae.
3. Mampu menurunkan insidensi tumor kelenjar mammae.

#### 6.2. SARAN

Perlu dilakukan standarisasi ekstrak etanolik *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria* sehingga dapat digunakan untuk kepentingan klinis sebagai kemopreventif kanker, khususnya kanker payudara. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menegaskan senyawa bioaktif dari ekstrak etanolik *Gynura procumbens* dan *Curcuma zedoaria* yang berfungsi sebagai antikarsinogenik atau antiproliferatif dan juga perlu untuk mengeksplorasi mekanisme-mekanisme molekuler seperti terjadinya mutasi pada gen penekan tumor ataupun onkogen.



### DAFTAR PUSTAKA

- Adjei, A.A., 2001. Review: Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy, *J. Nat. Canc. Inst.*, **93**(14), 1062-1074.
- Anderson, L.E., Boorman, G.A., Morris, J.E., Sasser, L., Mann, P., Grumbein, S.L., Hailey, J.R., Mc Nally, A., Sills, R.C., and Haseman J.K. 1999. Effect of 13 week Magnetic Fields Exposure on DMBA-Initiated Mammary Gland Carcinomas in Female Sprague-Dawley Rats, *Carcinogenesis* **20** (8) , 1615-1620.
- Anggraita, H. 1998. Aktivitas Biologis Fraksi Residu Ekstrak Etanol Daun *Gynura procumbens* (Luor.) Merr. Terhadap Kultur Sel Vero dan Kultur Sel Mieloma, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Appelt, L.C., and M.M. Reicks. 1999. Soy Induces Phase II But Does Not Inhibit Dimethylbenz(a)anthracene-Induced Carcinogenesis in Female Rats. *J of Nutrition*. **129** : 1820-1826.
- Arianti, S. 1998. Aktivitas Biologis Ekstrak Etanol Daun *Gynura Procumbens* (Lour) Merr. Terhadap Sel Vero dan Sel Mieloma, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Asepganda, S., Sudiro, I., Ganthina. 1988. Skrining Fitokimia dan Asam Fenolat Daun Dewa (*Gynura procumbens* (Luor) Merr), Simposium Penelitian Tumbuhan Obat III, Universitas Indonesia Jakarta.
- Backer, C.A., and Van Den Brink, R.C.B., 1965, *Flora of Java (Spermatophytes Only)*, Vol II., N.V.D. Noordhoff-Groningen-The Netherlands.
- Barl, J., E. Cohen-Noyman, B. Geiger, and M. Oren. 2004. Attenuation of the p53 response to DNA damage by high cell density. *J. Oncogene*. 1-10.
- Barbacid, M., S. Sukumar, V. Notario, and D. Martin-Sanca, 1985. Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature*. **306**. 658-661.
- Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L., Vousden, K.H. 1998. p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature*. 1998 *Sep 10*; **395**(6698): 124-5; [Entrez PubMed 9744267](#).

- Bell, S., Klein, C., Muller, L., Hansen, S., Buchner, J. 2002. p53 contains large unstructured regions in its native state. *J Mol Biol.* 2002 Oct 4; 322(5): 917-27; [Entrez PubMed 12367518](#).
- Brauch, H., Bruning, T., Fischer, H., Hamann, U., Hart, V., Justenhoven, C., Ko, Y, Pesch, B. 2004. *Breast Cancer Risk and Predictive Factors : Association with Genetic Polymorphisms and Expression of human Drug-Metabolizing Enzymes.*  
<http://www.dhgp.de/research/projects/abstracts/9975.html>
- Crank, G. 1992. Environmental Carcinogenesis, *Majalah Farmasi Indonesia*, 3, 4.
- Crystal, S., Lombard, K.A., Ellen, B. Peffley, Weixin, Liu. 2003. "Genetic Analysis of Quercetin in Onion (Allium cepa L.) Lady Raider". *The Texas Journal of Agriculture and Natural Resource* 16: 24-28. (<http://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin>)
- Dandekar, S., Sukumar, S., Zaehl, H., Young, L.J.T., Cardiff, R.D. 1986. Specific Activation of The Cellular Harvey-ras Oncogene in Dimethylbenzanthracene-Induced Mouse Mammary Tumors, *Mol Cell Biol*, 6 (11), 4104-4108.
- Dhaygude, V. 2006. *The Study of Canine Mammary Tumors with Special Reference to Mutations in p53 Tumor Suppressor Gene by PCR-SSCP*. Masters thesis, College of Veterinary Science and Animal Husbandry, Anand Agricultural University, Anand, Gujarat, INDIA.
- El Sohemy A and M.C. Archer, 2000, Inhibition of *N*-methyl-*N*-nitrosourea- and 7,12-dimethylbenz[*a*] anthracene-induced rat mammary tumorigenesis by dietary cholesterol is independent of Ha-*ras* mutations. *Carcinogenesis*, 21 (4), 827-831.
- Feng Z., Hu W., Chen, JX., Pao A., and Tang M., 2002. Preferential DNA Damage and Poor Repair Determine Ras Gene Mutational Hotspot in Human Cancer, *J. Nat. Canc. Inst.*, 94 (20), 1527-1536.
- Gregus, Z., Klaasen, C.D. 2001. Mechanisms of Toxicity, in Curtis D. Klaasen, Casarett & Doull's : *Toxicology, The Basic Science of Poisons*, 6<sup>th</sup> Ed., Mc.Graw Hill. Medical Publishing Division, New York, 40-41.
- Griffits, E.J.F., Miller, D.T., Suzuki, R.D., Lewontin, W., and M. Gelbart. 1993. *An Introduction to Genetic Analysis*. 5<sup>th</sup> Ed. W.H. Freeman and Company. New York. p. 841.

- Gibbs, J.B. 2000. Mechanism-based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research, *Science* vol 287, 1969-1973.
- Hariyadi. 1991. Analisis Kualitatif Kandungan Kimia dan Isolasi Kandungan Kimia Utama Daun *Gynura procumbens* (Luor) Merr. Dengan Kromatografi Lapis Tipis, Skripsi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Herba. 2003. Panduan Pengembangan Tanaman Obat. <http://www.karyasari.com>.
- Heyne, K. 1987. *Tanaman Berguna Indonesia*, jilid II, cetakan pertama, diterjemahkan oleh Badan Litbang Departemen Kehutanan, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta, p. 1029.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C. 1991. p53 mutation in human cancers. *Science*; 253: 49-53.
- 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>.
- Kem, S.E., Pitenpol, J.A., Thiagalingam, S., Seymour, A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 1991. Oncogenic forms of p53 Inhibit p53-regulated gene expression. *Science*; 252: 1708-11.
- Kimura, T., Takeda, S., Sagiya, Y., Gotoh, M., Nakamura, Y., Arakawa, H. 2003. Impaired function of p53R2 in *Rrm2b*-null mice causes severe renal failure through attenuation of dNTP pools. *Nat Genet*; 34: 440-5.
- King, R.J.B. 2000. *Cancer Biology*, 2<sup>nd</sup> Ed., Pearson Education Limited, London.
- Knudson, A.G. Jr. 1995. Hereditary cancer, oncogen, and antioncogene. *Cancer Res* 45: 1437-43.
- 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 Wista: Han Rats : the Effect of Season and Age, *Physiol. Res.* , 51,633-640
- Kubbutat, M.H.G., Jones, S.N., Vousden, K.H. 1997. Regulation of p53 Stability by Mdm2. *Nature*; 387: 299-303.

- Limtrakul, P., S. Anuchapreeda, S. Lipigornngoson and F. W., Dunn, 2001. Inhibition of carcinogen induced c-Ha-ras and c-fos protooncogenes expression by dietary curcumin. *BMC Cancer*. 1:1.
- Liptak, J. 2004. *Mammary Tumors in Cats and Dogs*. (<http://www.acvs.org/AnimalOwners/HealthConditions/SmallAnimalTopics/MammaryTumorsinCatsandDogs/>).
- Matter, A. 2001. Tumor Angiogenesis as a Therapeutic Target, *Drug Disc. Today*, 6(19): 1005-1020
- Mechanic, L.E., Marrogi, A.G., Welsh, J.A., Bowman, E.D., Khan, M.A., Enewold, L., Zheng, Y.L., Chanock, S., Shields, P.G., Harris, C.C. 2004. Polymorphism in XPD and TP53 and mutation in human lung cancer. *Carcinogenesis*. Vol. 26. No.3. pp. 597-604.
- Meiyanto, E.; 1999, Kurkumin sebagai anti-kanker; menelusuri mekanisme aksinya (Review), *MFI*, 10 (4 ),224-23.
- Melendez-Colon, V., I. 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.
- Middleton, EJR., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells : Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer, *Pharmacol Rev* 52 (4),673-751.
- Minshu Yu and Snyderwine, E.G. 2002. H-ras Oncogene Mutation During Development of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5b)pyridine (PhIP)-Induced Rat Mammary Gland Cancer. *Carcinogenesis*. Vol. 23(12) : 2123-2128.
- 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.
- Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., Gonzalez, F.J. 2004. Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 enzyme in Environmental Toxicity and Cancer. *J. Biol. Chem*. Vol. 279. 23847-23850.
- Novalina. 2003. Penggunaan Tanaman Obat Sebagai Upaya Alternatif dalam Terapi Kanker. Pengantar ke Falsafah Sain. PPS Institut Pertanian Bogor.

- Paciucci, R. & Pellicer A., 1990, Dissection of The Mouse N-ras Gene Upstream Regulatory Sequences and Identification of The Promoter and a Negative Regulatory Elements, *Mol. Cell. Bio.*, **11**(3), 1334-1343.
- 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
- Perry, L.M. 1980. *The Medical Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses*, The MIT Press, London: 94-95.
- Pitot, H.C. 1993. The Molekuler Biology of Carcinogenesis, *Cancer*, (72) 962-970.
- Pramono, S., 1996, *Tanaman Obat Pilihan*, Penerbit Yayasan Sidowayah, Jakarta, 58.
- 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.
- Roitt, I. 1997. *Roitt's Essential Immunology*. 380-385. 9th Edition. Blackwell Science Ltd. London.
- Rundle, A., Tang D., Brandt R.P., Zhou, J., Kellyc, A., Schnabeld, F., Pererab F.P. 2002. Association between the ras p21 oncoprotein in blood samples and breast cancer. *Cancer Letters* **185**. 71-78.
- Russo, J., Y. Hu, X. Yang, and I.H. Russo. 2000. Chapter 1 : Developmental, Cellular, and Molecular Basic of Human Breast Cancer. *J. Of National Cancer Institut Monographs*. No. 27. 17-37.
- Smart, R.C. & Akunda, J.K., 2001, Carcinogenesis, in Hodgson, E., dan Smart, R., C., 2001, *Introductions to biochemical Toxicology*, 3<sup>rd</sup> Ed., A John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Shapiro, G.I. & Harper, J.W., 1999, Anticancer drug targets: cell cycle and chekpoint control, *J. Clin. Invest.*, **104**, 1645-1653.
- Shepel, L.A., Hong L, J.D. Hagg, G.M., Brasic, M.E., Ghenn, J.S., Simon, P., Hoff, M.A., Newton, Gould, M.N.. 1998. Genetic Identification of Control Breast Cancer Susceptibility in The Rat. *Genetic*. Vol. 149. 289-299.
- Singletary, K., Macdonald, C., and Wallig, M. 1997. The Plasticizer Benzyl Butyl Phtalate (BBP) Inhibits 7,12-dimethylbenz(α)anthracene (DMBA)-induced rat

- Mammary DNA Adduct Formation and Tumorigenesis, *Carcinogenesis* 18 (8) 1669-1673.
- Soegeng, S. 2000. Neoplasma dan Deteksi Dini Kanker [Disertasi Doktor]. Universitas Airlangga.
- Soeripto. 1977. *Mekanisme Molekuler Karsinogenesis*, Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta, 38-42.
- Sudarto, B., dan Pramono S. 1985. Skrining Fitokimia Daun Dewa (*Gynura procumbens*, Luor Merr yang diduga berkhasiat sebagai anti-kanker, PPPT-UGM, Lembaga Penelitian UGM, Yogyakarta.
- Suganda, A.G., Iwang, S. dan Ganthina. 1988. *Skrining Fitokimia dan Asam Fenolat dalam daun dewa*, Simposium Penelitian Tumbuhan Obat III, UI, Jakarta.
- Sugiyanto, B., Sudarto, Meiyanto E. 1993. Efek Penghambatan Karsinogenisitas Benzo(a)piren oleh preparat tradisional tanaman *Gynura* sp. Dan identifikasi awal senyawa yang berkhasiat, Laporan Penelitian P4M Ditjen DikTi, Fak. Farmasi UGM, Yogyakarta.
- Sugiyanto, Sudarto, B., Meiyanto, E., Nugroho, AE dan Jenie, U.A., 2003, Aktivitas antikarsinogenik senyawa yang berasal dari tumbuhan, *MFI*, 14 (4), 216-225
- Suprpti, S. 2000. Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Flavonoid Dalam Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun *Gynura procumbens* (Lour) Merr., Skripsi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Surh, Y. J. 1999. Molecular Mechanism of Chemopreventive Effect of Selected Dietary and Medicinal Phenolic Substances, *Mutation Res.* 428: 305-327
- Susilowati, S. 2004. Efek Kemopreventif Ekstrak Etanolik Daun *Gynura procumbens* (Lour) Merr Terhadap Kanker Payudara Tikus Yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA). Tesis Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada.
- Tamimi, R. M., P. Lagiou, H. Adami, D. Trichopoulos. 2002. Prospects For Chemoprevention of Cancer, *Journal of Internal Medicine*, **251** (4), 286-300
- Tanaka, H., Arakawa, H., Shiraishi, K., Yamaguchi, T., Takei, Y., Nakamura, Y. 2000. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53 dependent DNA damage checkpoint. *Nature*, 404: 42-9.
- Taufik. 2008. Dasar-dasar neoplasma, neoplasma, p53. Thomas, A.N.S., 1989, Tanaman Obat Tradisional, Penerbit Kanisius, Yogyakarta, hal 120-121.

- Thangapazham, R. L., A. Sharma, R. K. Maheshwari. 2006. Multiple Molecular Targets in Cancer Chemoprevention by Curcumin, *The AAPS Journal* 2006; 8(3) Article 2 (<http://www.aapsj.org>)
- Thomas, A.N.S. 1989. *Tanaman Obat Tradisional*, Penerbit Kanisius, Yogyakarta : 120-121.
- Tjahjono. 1999. Deteksi dini kanker: Peran pemeriksaan sitologik dan antisipasi era pasca genom. *MKI* 49 (7) : 278-90.
- Ulfa E.M., 1999. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun *Gynura procumbens* (Lour) Merr Pada Fase Pre Inisiasi Sampai Fase Inisiasi Pertumbuhan Tumor Lambung Mencit Karena Benz(a)pirena, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Van S, C.G.G.J. 1975. *Flora, Pradnya Paramitha*, Jakarta, hal 128-131.
- Velde CJH, 1999. Tumor Payudara dalam Velde CJH, Bosman FT, Wagener DJT, Onkologi, Edisi e-5, Panitia Kanker RSUP Dr Sardjito Yogyakarta, hal 467-92.
- Weinberg, R.A. 1996. How Cancer Arise, *Sci. Am.*, September, 62-69.
- Windono, M. S., dan Parfiati, N, 2002, *Curcuma zedoaria* Rosc., Kajian Pustaka Kandungan Kimia dan Aktivitas Farmakologik, *Artocarpus*, 2(1) : 1-10.
- Yamaguchi T., Matsuda, K., Sagiya, Y., Iwadate, M., Fujino, M.A., Nakamura, Y., Arakawa, H. 2001. p53R2-dependent pathway for DNA synthesis in a p53-regulated cell-cycle checkpoint. *Cancer Res*; 61: 8256-62.
- Yang, S.K., Mustaq, M., Chiu P.L. 1985. Stereoselective Metabolism and Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Harvey, R.G. (Editor): *Polycyclic Hydrocarbons & Carcinogenesis*, American Societis Washington, 19-31.
- Zambetti, G.P., Bargonetti, J., Walker, K. 1992. Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element. *Genes Dev.* 6:1143-1152.

## LAMPIRAN

Lampiran 1. Analisis data ekspresi *Mutant p53* pada pemberian *Gynura procumbens*

## One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Hasil Ekspresi p53
N		15
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	35.924248
	Std. Deviation	20.1363580
Most Extreme Differences	Absolute	.211
	Positive	.211
	Negative	-.101
Kolmogorov-Smirnov Z		.817
Asymp. Sig. (2-tailed)		.517

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## Oneway

## Descriptives

## Hasil Ekspresi p53

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
DMBA 20 mg	3	66.227139	4.5728205	2.6401191	54.867623	77.58661
DMBA 20 mg + G. procumbens 300 mg	3	38.439752	6.3277186	3.6533101	22.720828	54.15867
DMBA 20 mg + G. procumbens 750	3	43.968318	4.3118929	2.4894725	33.256982	54.67961
G. procumbens 300 mg	3	16.370428	2.0371896	1.1761720	11.309768	21.43101
G. perocumbens 750	3	14.615602	4.0064624	2.3131322	4.662998	24.56821
Total	15	35.924248	20.1363580	5.1991853	24.773104	47.07531

## Test of Homogeneity of Variances

## Hasil Ekspresi p53

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.505	4	10	.733



## ANOVA

Hasil Ekspresi p53

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5477.131	4	1369.283	68.639	.000
Within Groups	199.490	10	19.949		
Total	5676.621	14			

## Post Hoc Tests

## Homogeneous Subsets

Hasil Ekspresi p53

Duncan<sup>a</sup>

Perlakuan G. procumbens	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
G. perocumbens 750	3	14.615602		
G. procumbens 300 mg	3	16.370428		
DMBA 20 mg + G. procumbens 300 mg	3		38.439752	
DMBA 20 mg + G. procumbens 750	3		43.968318	
DMBA 20 mg	3			66.227139
Sig.		.641	.160	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**Lampiran 2. Analisis data ekspresi *Mutant p53* pada pemberian *Curcuma zedoaria***

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Eksp53 Curcuma
N		15
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	37.499905
	Std. Deviation	17.330261
Most Extreme Differences	Absolute	.177
	Positive	.177
	Negative	-.105
Kolmogorov-Smirnov Z		.686
Asymp. Sig. (2-tailed)		.735

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

**Oneway**

**Descriptives**

**Eksp53 Curcuma**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Mir
					Lower Bound	Upper Bound	
DMBA 20 mg	3	63.386101	5.3952119	3.1149270	49.983651	76.788550	6
DMBA 20 mg + C. zedoaria 300 mg	3	39.666860	1.6896056	.9754943	35.469647	43.864073	3
DMBA 20 mg + C. zedoaria 750 mg	3	44.454992	5.3431946	3.0848948	31.181761	57.728223	4
C. zedoaria 300 mg	3	22.208182	4.4753691	2.5838556	11.090749	33.325615	1
C. zedoaria 750 mg	3	17.783389	1.7919872	1.0346043	13.331847	22.234932	1
Total	15	37.499905	17.3302613	4.4746542	27.902726	47.097084	1

**Test of Homogeneity of Variances**

**Eksp53 Curcuma**

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.717	4	10	.091

## ANOVA

Eksp53 Curcuma

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4037.225	4	1009.306	60.255	.000
Within Groups	167.506	10	16.751		
Total	4204.731	14			

## Post Hoc Tests

## Homogeneous Subsets

Eksp53 Curcuma

Duncan<sup>a</sup>

Kelompok Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
C. zedoaria 750 mg	3	17.783389		
C. zedoaria 300 mg	3	22.208182		
DMBA 20 mg + C. zedoaria 300 mg	3		39.666860	
DMBA 20 mg + C. zedoaria 750 mg	3		44.454992	
DMBA 20 mg	3			63.386101
Sig.		.215	.182	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 3. Analisis data ekspresi *Mutant H-ras* pada pemberian *Gynura procumbens*.

## NPar Tests

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ekspresi H-ras Gyn
N		15
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	36.196221
	Std. Deviation	18.320166
Most Extreme Differences	Absolute	.146
	Positive	.121
	Negative	-.146
Kolmogorov-Smirnov Z		.567
Asymp. Sig. (2-tailed)		.905

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## Oneway

### Descriptives

Ekspresi H-ras Gyn	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Mir
					Lower Bound	Upper Bound	
DMBA 20 mg	3	61.541028	3.5037164	2.0228716	52.837314	70.244742	5
DMBA 20 mg + C. zedoaria 300 mg	3	39.319538	7.1239506	4.1130148	21.622664	57.016413	3
DMBA 20 mg + C. zedoaria 750 mg	3	43.271518	13.7609543	7.9448906	9.087412	77.455623	3
C. zedoaria 300 mg	3	19.339781	7.7264230	4.4608524	.146283	38.533230	1
C. zedoaria 750 mg	3	17.509239	5.8340036	3.3682636	3.016771	32.001707	1
Total	15	36.196221	18.3201657	4.7302465	26.050851	46.341591	1

### Test of Homogeneity of Variances

#### Ekspresi H-ras Gyn

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.841	4	10	.198

## ANOVA

Ekspresi H-ras Gyn

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4006.551	4	1001.638	14.469	.000
Within Groups	692.248	10	69.225		
Total	4698.799	14			

## Post Hoc Tests

## Homogeneous Subsets

Ekspresi H-ras Gyn

Duncan<sup>a</sup>

Kelompok Perlakuan	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
C. zedoaria 750 mg	3	17.509239		
C. zedoaria 300 mg	3	19.339781		
DMBA 20 mg + C. zedoaria 300 mg	3		39.319538	
DMBA 20 mg + C. zedoaria 750 mg	3		43.271518	
DMBA 20 mg	3			61.541028
Sig.		.793	.574	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 4. Analisis data ekspresi *Mutant H-ras* pada pemberian *Curcuma zedoaria*

**NPar Tests**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Ekspresi H-ras Cur
N		15
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	40.930569
	Std. Deviation	22.218318
Most Extreme Differences	Absolute	.147
	Positive	.147
	Negative	-.133
Kolmogorov-Smirnov Z		.570
Asymp. Sig. (2-tailed)		.901

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

**Oneway**

**Descriptives**

**Ekspresi H-ras Cur**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
DMBA 20 mg	3	70.414560	1.3315738	.7687845	67.106747	73.722372
DMBA 20 mg + C. zedoaria 300 mg	3	49.090814	14.1428386	8.1653717	13.958055	84.223572
DMBA 20 mg + C. zedoaria 750 mg	3	48.631561	12.2007217	7.0440899	18.323288	78.939834
C. zedoaria 300 mg	3	19.923047	6.9098207	3.9893869	2.758101	37.087993
C. zedoaria 750	3	16.592863	3.7307828	2.1539684	7.325085	25.860641
Total	15	40.930569	22.2183182	5.7367451	28.626474	53.234663

**Test of Homogeneity of Variances**

**Ekspresi H-ras Cur**

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.681	4	10	.094

## ANOVA

Ekspresi H-ras Cur

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6086.521	4	1521.630	18.452	.000
Within Groups	824.630	10	82.463		
Total	6911.151	14			

## Post Hoc Tests

## Homogeneous Subsets

Ekspresi H-ras Cur

Duncan<sup>a</sup>

Kelompok Perlakuan Cur	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
C. zedoaria 750	3	16.592863		
C. zedoaria 300 mg	3	19.923047		
DMBA 20 mg + C. zedoaria 750 mg	3		48.631561	
DMBA 20 mg + C. zedoaria 300 mg	3		49.090814	
DMBA 20 mg	3			70.414560
Sig.		.663	.952	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3 000.

**Lampiran 5. Analisis data insidensi tumor kelenjar mammae pada pemberian  
*Gynura procumbens***

**NPar Tests**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		JUMLAH NODUL TUMOR
N		30
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.63
	Std. Deviation	1.066
Most Extreme Differences	Absolute	.390
	Positive	.390
	Negative	-.276
Kolmogorov-Smirnov Z		2.138
Asymp. Sig. (2-tailed)		.000

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

**Oneway**

**Descriptives**

**JUMLAH NODUL TUMOR**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum
					Lower Bound	Upper Bound	
DMBA	6	2.33	1.033	.422	1.25	3.42	1
G300+DMBA	6	.33	.516	.211	-.21	.88	0
G750+DMBA	6	.50	.837	.342	-.38	1.38	0
G300	6	.00	.000	.000	.00	.00	0
G750	6	.00	.000	.000	.00	.00	0
Total	30	.63	1.066	.195	.24	1.03	0

**Test of Homogeneity of Variances**

**JUMLAH NODUL TUMOR**

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7.448	4	25	.000



## ANOVA

## JUMLAH NODUL TUMOR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22.800	4	5.700	14.016	.000
Within Groups	10.167	25	.407		
Total	32.967	29			

## Post Hoc Tests

## Homogeneous Subsets

## JUMLAH NODUL TUMOR

Duncan<sup>a</sup>

PERLAKUAN	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
G300	6	.00	
G750	6	.00	
G300+DMBA	6	.33	
G750+DMBA	6	.50	
DMBA	6		2.33
Sig.		.226	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

**Lampiran 6. Analisis data insidensi tumor kelenjar mammae pada pemberian  
*Curcuma zedoaria***

**NPar Tests**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Insidensi Tumor Curcuma
N		30
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.766667
	Std. Deviation	1.0726485
Most Extreme Differences	Absolute	.329
	Positive	.329
	Negative	-.237
Kolmogorov-Smirnov Z		1.804
Asymp. Sig. (2-tailed)		.003

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

**Oneway**

**Descriptives**

**Insidensi Tumor Curcuma**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
DMBA 20 mg/kg bb	6	2.333333	1.0327956	.4216370	1.249481	3.417186
DMBA 20 mg/kg bb + C. zedoaria 300 mg/kg bb	6	.666667	.8164966	.3333333	-.190194	1.523527
DMBA 20 mg/kg bb + C. zedoaria 750 mg/kg bb	6	.833333	.7527727	.3073181	.043347	1.623320
C. zedoaria 300 mg/kg bb	6	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000
C. zedoaria 750 mg/kg bb	6	.000000	.0000000	.0000000	.000000	.000000
Total	30	.766667	1.0726485	.1958379	.366133	1.167200

**Test of Homogeneity of Variances**

**Insidensi Tumor Curcuma**

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.243	4	25	.001

## ANOVA

## Insidensi Tumor Curcuma

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21.867	4	5.467	11.884	.000
Within Groups	11.500	25	.460		
Total	33.367	29			

## Post Hoc Tests

## Homogeneous Subsets

## Insidensi Tumor Curcuma

Duncan<sup>a</sup>

Kelompok Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
C. zedoaria 300 mg/kg bb	6	.000000	
C. zedoaria 750 mg/kg bb	6	.000000	
DMBA 20 mg/kg bb + C. zedoaria 300 mg/kg bb	6	.666667	
DMBA 20 mg/kg bb + C. zedoaria 750 mg/kg bb	6	.833333	
DMBA 20 mg/kg bb	6		2.333333
Sig.		.061	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

