

# SKRIPSI

**Efek Pemberian Temu Putih (*Curcuma zedoaria*)  
Sebelum Dan Sesudah Inisiasi 7,12  
Dimethylbenz (a)antrasen (DMBA) Pada Tikus  
*Sprague Dawley* Terhadap Ekspresi Enzim CYP1A1**



Olah :

**AVELINE WIDYA YOLANDA**

**NIM 060710263**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2012**


**Efek Pemberian Ekstrak Temu Putih (*Curcuma zedoaria*) Sebelum dan  
Sesudah Inisiasi 7,12 Dimethylbenz(a)antrasen (DMBA)  
pada Tikus *Sprague Dawley* Terhadap  
Ekspresi Enzim CYP1A1**


SKRIPSI

sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan  
pada  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh :  
AVELINE WIDYA YOLANDA  
060710263

Menyetujui  
Komisi Pembimbing,

  
(M. Gandul Atik Y., M.Kes., drh.)  
Pembimbing Utama

  
(Dr. Widjiati, M.Si., drh.)  
Pembimbing Serta

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam penelitian berjudul :

**Efek Pemberian Ekstrak Temu Putih (*Curcuma zedoaria*) Sebelum dan Sesudah Inisiasi 7,12 Dimethylbenz(a)antrasen (DMBA) pada Tikus *Sprague Dawley* Terhadap Ekspresi Enzim CYP1A1**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, Juli 2012



Aveline Widya Yolanda  
NIM. 060710263

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 25 Juli 2012

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Dr. Iwan Sabrial Hamid, M.Si., drh.

Sekretaris : Hanna Eliyani, M.Kes., drh.

Anggota : Setyawati Sigit, M.S., drh.

Pembimbing I : M. Gandul Atik Y., M.Kes., drh.

Pembimbing II : Dr. Widjiati, M.Si., drh.

Telah diuji pada

Tanggal : 1 Agustus 2012

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Dr. Iwan Sahrial Hamid, M.Si., drh.

Anggota : Hanna Eliyani, M.Kes., drh.

Setyawati Sigit, M.S., drh.

M. Gandul Atik Y., M.Kes., drh.

Dr. Widjiati, M.Si., drh.

Surabaya, 28 Juli 2008

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh

NIP. 130 687 305

**EFFECTS OF *Curcuma zedoaria* ADMINISTRATION TO *Sprague dawley* MICE PRIOR AND AFTER DMBA INITIATION ON THE EXPRESSION OF CYP1A1 ENZYME**

Aveline Widya Yolanda

**ABSTRACT**

*Curcuma zedoaria* has been widely used to treat various types of cancer, but research with scientific evidence of its efficacy has not been done. This study aims to determine the effect of ethanol extracts of *Curcuma zedoaria* on mammary gland cancer in DMBA (7,12 - dimetilbenz(a)antrasen)-induced female mice. *Sprague dawley* strain female mice age 40 days were divided into 4 groups: group 1 as the DMBA-positive control, group 2 was given *C.zedoaria* extract 1 week after the last DMBA administration, group 3 was given *C.zedoaria* extract 2 weeks prior the DMBA administration, group 4 was given *C.zedoaria* extract 3 weeks after the last DMBA administration. On a dose of 300 mg per kg of body weight, *Curcuma zedoaria* ethanol extract can restrain the growth of mammary cancer in female mice, as evidenced by the restrained CYP1A1 enzyme. In conclusion, *Curcuma zedoaria* extract is more appropriately used in the prevention of breast cancer, but can also be used as a therapeutic treatment of breast cancer.

**Keywords** : *Sprague dawley*, Dimetilbenz(a)antrasen, *Curcuma zedoaria*, Mammary cancer

### UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur yang tak terhingga penulis panjatkan kehadirat Allah yang Maha Kuasa karena atas kasih dan penyertaan-Nya penulis dapat menyelesaikan makalah ini. Penelitian dan penyusunan makalah ini dapat diselesaikan oleh penulis tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, karena itu penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya pertama-tama kepada yang terhormat Prof. Hj. Romziah Sidik, PhD., drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan kepada ibu M. Gandul Atik Y., M.Kes., drh. juga ibu Dr. Widjiati, M.Si., drh. selaku dosen pembimbing atas bimbingannya sehingga penyusunan makalah ini dapat terselesaikan dengan baik.

Dengan segala ketulusan hati penulis menyampaikan terima kasih kepada Yth :

Bapak Iwan Sahrial Hamid, M.Si., drh. sebagai pembimbing dalam penelitian sekaligus ketua penguji atas semua jerih payah beliau dalam membimbing, memberikan masukan-masukan, bekal pengetahuan serta dorongan semangat yang tiada henti-hentinya dengan penuh kesabaran sejak usulan penelitian hingga terselesaikannya penulisan makalah ini.

Ibu Hana Eliyani, drh., M. Kes., dan ibu Setiawati Sigit, M.S., drh selaku dosen penguji yang banyak memberikan saran demi kemajuan dan penyelesaian makalah ini.

Bapak Chairul Anwar, M.S., drh. selaku dosen wali yang telah membimbing dengan penuh perhatian, memberi masukan-masukan yang berharga serta motivasi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan kuliah ini.

Seluruh staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ayahanda Sastra Sugiana dan ibunda Tan Kwie Djoen, kakak saya Ferdy Leon Cyrilius, juga Rizki Dwi P., dan mas Gesang Manggala atas doa dan

bantuan serta dukungan semangat yang telah diberikan kepada penulis. Kepada teman-teman satu penelitian, Setyo Bhakti, Ratih Prajnya P., Fariz Amsyari K., dan Bodhi Agustono, Oktavia Putri S.N. teman seperjuangan semasa kuliah dan kepada semua pihak yang tak dapat penulis sebutkan satu-persatu yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung.

Semoga Tuhan senantiasa membalas budi baik yang telah diberikan oleh semua pihak kepada penulis. Amin.

Akhirnya penulis menyadari skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan untuk kemajuan bersama di masa datang. Semoga makalah ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Surabaya, 31 Juli 2012

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iii
HALAMAN IDENTITAS .....	iv
ABSTRACT .....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH .....	v
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG .....	xii
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang Penelitian .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	4
1.3. Landasan Teori .....	4
1.4. Tujuan Penelitian .....	6
1.5. Manfaat Hasil Penelitian .....	6
1.6. Hipotesis .....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	7
2.1. Kanker .....	7
2.2. Karsinogenesis .....	8
2.3. Karsinogenesis pada Kanker Payudara oleh Karsinogen DMBA ...	11
2.4. Proses Enzimatik pada Karsinogenesis.....	13
2.5. Tinjauan Hepar Tikus .....	14
2.6. Tinjauan Sitokrom p450 (CYP1A1) .....	15
2.7. Tinjauan Rimpang Temu Putih sebagai Antikanker .....	16
2.8. Tinjauan Tikus <i>Sprague dawley</i> .....	19
BAB 3 MATERI DAN METODE.....	20
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian .....	20
3.2. Materi Penelitian .....	20
3.2.1. Hewan Uji .....	20
3.2.2. Alat Penelitian .....	21
3.2.3. Bahan Penelitian .....	21
3.3. Metode Penelitian .....	22
3.3.1. Variabel Penelitian .....	22
3.3.2. Pembuatan Ekstrak Etanolik Rimpang Temu Putih .....	22
3.3.3. Pembuatan Larutan Karsinogen DMBA dalam Minyak jagung .....	23
3.3.4. Penyiapan Sediaan Uji (Ekstrak Etanol Temu Putih) .....	23
3.3.5. Perlakuan pada Hewan Percobaan .....	24

3.3.6. Pengamatan Ekspresi CYP1A1 dengan Uji Imunohistokimia .....	28
3.4. Rancangan Penelitian .....	30
3.5. Analisis data .....	31
BAB 4 HASIL PENELITIAN .....	32
4.1 Ekspresi enzim CYP1A1 pada sel hepar hewan uji .....	32
BAB 5 PEMBAHASAN .....	36
5.1 Ekspresi enzim CYP1A1 sel hepar hewaa uji .....	36
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN .....	39
6.1 Kesimpulan .....	39
6.2 Saran .....	39
RINGKASAN .....	40
DAFTAR PUSTAKA .....	43
LAMPIRAN .....	49

**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
3.1. Ekspresi CYP1A1 pada hepar .....	30
4.1. Rataan dan standar deviasi ekspresi CYP1A1 masing-masing kelompok perlakuan .....	34

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Skema dari Tahap Karsinogenesis (kiri) dan Mekanisme Kemopreventif .....	10
2.2. Struktur kimia 7,12-dimetilbenz(a)antrasen .....	13
2.3. Rimpang temu putih (A) Daun dan bunga Temu putih (B) .....	17
4.1. Hasil pengecatan imunohistokimia sel hepar tikus dengan antibodi CYP1A1 yang menunjukkan sel yang mengekspresikan enzim CYP1A1 .....	33
5.1. Mekanisme induksi CYP1A1 oleh PAH melibatkan aryl hydrocarbon reseptor (AhR) .....	38

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>		<b>Halaman</b>
Lampiran 1	Dokumentasi Penelitian .....	49
Lampiran 2	Skema prosedur imunohistokimia dengan <i>frozen section</i> .....	50
Lampiran 3	Hasil Penghitungan Ekspresi Enzim CYP1A1 .....	51
Lampiran 4	Tabel Hasil Analisa Statistik .....	52

## SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

AhR	: Aromatic Hydrocarbon Reseptor
ANOVA	: Analysis of Variance
BaP	: Benzo[a]pyrene
CAMs	: Cell-cell Adhesion Molecules
CYP	: Cytochrome P450
CYP1A1	: Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
DAB	: Diaminobenzidine tetrahydrochloride
DMBA	: 7,12-dimetilbenz[a]antrasen
EGFR	: Epidermal Growth Factor Reseptor
GST	: Glutation S-Transferase
GST $\mu$	: Glutation S-Transferase kelas mu
HE	: Hematoxylin Eosin
kgBB	: Kilogram berat badan
NMU	: nitrosomethylurea
NF- $\kappa$ B	: Nuclear Factor-kappa B
PAH	: Policyclic Aromatic Hydrocarbon
PBS	: Phospat Buffer Saline
PhIP	: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo (4-5-b)pyridine
QR	: Quinone Reductase
ROS	: Reactive Oxygen Species
SD	: Sprague Dawley
TPA	: 12-0-tetradecanoyl phorbol-13-acetate
TCDD	: 2,3,7,8-Tetrachloridibenzo-p-Dioxin
VEGF	: Vascular Endhotelial Growth Factor

# **BAB 1**

# **PENDAHULUAN**

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Penelitian

Kanker merupakan suatu penyakit yang ditandai oleh adanya pertumbuhan sel jaringan tubuh yang tidak normal dan tidak terkontrol. Sel terbentuk akibat terjadinya mutasi gen sehingga mengalami perubahan baik bentuk, ukuran maupun fungsi dari sel asalnya. Mutasi gen ini dipicu oleh suatu bahan kontaminan yang terdapat di lingkungan seperti bahan tambahan makanan, radioaktif, oksidan atau polutan yang menghasilkan senyawa karsinogen (Griffiths *et al.*, 1993).

Kasus kanker tampaknya juga terjadi pada hewan, khususnya anjing dan kucing. Angka kejadian kanker kelenjar mammae pada anjing betina menempati tempat kedua terbanyak setelah kanker kulit. Sumber informasi lain dari sebuah penelitian mengenai prevalensi kasus tumor kelenjar mammae pada anjing trah kecil yang dilakukan di Tokyo, Jepang, menunjukkan bahwa prevalensi kasus tumor payudara mencapai 7,9 persen dari keseluruhan populasi anjing betina trah kecil di Tokyo. Lebih jauh lagi, dari hasil pemeriksaan histopatologi yang didapatkan, 93% tumor payudara tersebut bersifat maligna dan sisanya bersifat benigna (Hashimoto *et al.*, 2002).

Sampai saat ini upaya yang dilakukan dalam menangani kanker pada manusia maupun hewan masih banyak menemui kendala yang mengakibatkan kurangnya keberhasilan dalam mencegah dan mengobati kanker. Tindakan kemopreventif lebih dipilih untuk menekan angka pertumbuhan kanker di dunia.



Kemopreventif merupakan salah satu usaha dalam mencegah, membalikkan, menekan dan menunda terjadinya karsinogenesis melalui penggunaan bahan alam maupun agen farmakologi (Tamimi dkk., 2002; Tsao dkk., 2004; Russo dkk., 2005). Agen kemopreventif dapat bertindak sebagai *blocking agent* yang mencegah senyawa reaktif untuk menempel pada target aksinya atau *supressing agent* yang menghambat perkembangan proses neoplastik ke arah yang lebih berat (Wattenberg, 1993).

Penggunaan obat herbal kini lebih diminati oleh masyarakat karena minimnya efek samping yang ditimbulkan dibanding obat yang terbuat dari bahan kimia. Pada dasarnya penanganan kanker melalui kemoterapi dan dengan menggunakan obat herbal tidak jauh berbeda. Tanaman obat dengan sifat alamiahnya akan meningkatkan daya tahan tubuh penderita terutama sel yang berada di sekitar kanker (Farikha, 2008). Senyawa aktif tanaman obat juga akan meredakan keganasan racun yang dikeluarkan sel kanker (anti toksik), menghambat pertumbuhan sel kanker (sitostatika), memutus pasokan zat makanan dan oksigen ke jaringan kanker dengan cara menghentikan aliran darah ke sel kanker. Selain alasan-alasan tersebut diatas, penggunaan obat herbal dalam menangani kanker merupakan cara pengobatan dengan biaya yang relatif murah (Heyne, 1987).

*Curcuma zedoaria* atau yang lebih dikenal dengan temu putih menarik beberapa peneliti untuk melakukan eksplorasi bahan bioaktif dari tanaman tersebut terutama untuk mengetahui aktivitasnya sebagai obat anti kanker. Zat yang terkandung dalam rimpang temu putih ternyata bersifat anti neoplastik (merusak pembentukan ribosoma pada sel dan jaringan liar) dengan cara

meningkatkan pembentukan jaringan fibroblas di sekeliling jaringan tumor kanker, lalu membentuk lapisan limposit dalam sel jaringan tumor kanker dan membungkusnya, sehingga sel jaringan tersebut tidak dapat berkembang, dan memudahkan untuk mengobati penyakit tersebut (Prakoso, 2007).

Kemampuan senyawa toksik dalam menyebabkan karsinogenesis ditentukan oleh proses metabolisme yang melibatkan enzim-enzim tubuh (Russek, 2005). Salah satu senyawa yang dapat dimetabolisme menjadi senyawa toksik dalam tubuh adalah Dimetilbenz[a]antrasen. Senyawa 7,12-dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) merupakan salah satu karsinogen kimiawi dan induktor aktivitas enzim mikrosomal hati paling poten dari golongan Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) (King, 2000). Karsinogen DMBA sangat efisien dalam menginduksi tumor pada mamalia. Mekanisme bioaktivasi dan interaksinya dengan DNA mamalia juga telah banyak dipelajari (Weimer *et al.*, 2000). Tasminaton dengan penelitiannya yang dilakukan tahun 2005 telah membuktikan bahwa senyawa DMBA mampu menginduksi terjadinya kanker pada hepar tikus betina galur *Sprague dawley* (SD) yang diinduksi DMBA 20 mg/kgBB. DMBA sebagai inisiator pembentukan kanker payudara memerlukan aktivasi metabolik oleh enzim yang secara normal ada dalam tubuh dan merupakan bagian dari proses metabolisme xenobiotik fase I. mekanisme aktivasi DMBA melibatkan enzim sitokrom P450 (CYP) isoform CYP1A1 dan atau peroksidase menjadi intermediate reaktif yang dapat merusak DNA yaitu terbentuknya Epokside Dehidrodiol dan kation radikal (Kubatka, 2002).

Berdasarkan latar belakang penelitian permasalahan tersebut, maka perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan hewan coba tikus *Sprague dawley* betina umur 40 hari untuk mengetahui manfaat tanaman obat rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*) yang mempunyai khasiat sebagai anti kanker. Pengamatan difokuskan pada ekspresi dan aktivitas enzim Sitokrom P450 (CYP1A1) yang merupakan regulasi enzimatik yang dilibatkan dalam memperantarai mekanisme karsinogenesis.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasar latar belakang permasalahan di atas, maka dapat dirumuskan suatu permasalahan sebagai berikut :

Apakah terdapat hambatan ekspresi enzim CYP1A1 di antara kelompok perlakuan pada tikus galur *Sprague dawley* yang diinduksi DMBA dan diberi ekstrak Temu Putih?

## 1.3 Landasan Teori

Kanker adalah penyakit seluler yang bercirikan pertumbuhan sel yang tidak terkendali dan membentuk satu koloni kecil dalam jaringan yang sama. Proses pertumbuhan kanker atau yang dinamakan proses karsinogenesis ini merupakan proses pertumbuhan mikroevolusioner yang dapat berlangsung dalam beberapa bulan atau beberapa tahun. Perubahan sifat pertumbuhan tersebut disebabkan karena adanya mutasi genetik ( Parkin *et al.*, 2000).

Proses karsinogenesis meliputi beberapa tahapan yaitu tahap *inisiasi*, *promosi*, dan *progresi*. Perkembangan berikutnya akan terjadi perubahan genetik

(seperti aktivasi onkogen) yang disebabkan koloni dari sel abnormal ini menjadi maligna. Keseimbangan proliferasi sel dan apoptosis sangat penting dalam pertumbuhan dan homeostasis jaringan normal. Pada sel kanker keseimbangan ini sudah tidak berjalan (Guo dan Hay, 1999; Farikha, 2008). Terjadinya kanker, termasuk kanker payudara dapat dipicu oleh beberapa faktor seperti zat kimia dan radiasi.

DMBA adalah salah satu senyawa karsinogen dari golongan Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) yang berperan sebagai inisiator pembentukan kanker payudara pada tikus (Singletary *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1999; Kubatka *et al.*, 2002). Senyawa karsinogen ini menghasilkan senyawa metabolit genotoksik *benzilio carbonium*. Kerja langsung agen genotoksik sering memiliki perangkat elektrofilik dan kemudian bereaksi dengan molekul nukleofilik seperti DNA (Anderson *et al.*, 1999).

Senyawa genotoksik secara langsung mempunyai mekanisme melalui aktivasi enzimatis CYP yang berperan dalam biotransformasi (Melendez-Colon *et al.*, 1999). Senyawa metabolit sering bersifat lipofilik kemudian sel merubah mereka menjadi produk larut air. Efek samping konversi ini dihasilkan elektrofilik yang dapat bereaksi dengan beberapa nukleofilik yang kontak dengan protein, DNA dan RNA, di sinilah awal terjadinya mutasi genetik yang nantinya akan terbentuk kanker (Weimer *et al.*, 2000).

Ekstrak temu putih mempunyai kandungan bahan yang berkhasiat sebagai bahan antikanker, memainkan peranan pada hambatan enzim CYP1A1 (Sugiyanto dkk., 2003). Aktifitas dan ekspresi enzim CYP1A1 sebagai indikator

meningkatnya metabolit DMBA yaitu *benzilio carbonium*. Berdasarkan kenyataan empiris dan data-data yang tersedia, maka tanaman *Curcuma zedoaria* memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat anti-kanker.

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

Berdasarkan latar belakang penelitian yang dipakai sebagai landasan teoritik, maka pada penelitian yang akan dilakukan bertujuan sebagai berikut :  
Mengetahui adanya hambatan ekspresi enzim CYP1A1 setelah pemberian ekstrak Temu Putih pada tikus yang diinduksi DMBA.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

1. Memberikan informasi tentang pentingnya pengamatan molekuler mekanisme kerja ekstrak Temu Putih, mengingat efisiensi khasiat kinerja yang lebih akurat dalam penentuan waktu pemberian dan aplikasi klinis sebagai anti kanker.
2. Untuk mengetahui secara pasti khasiat pemberian ekstrak Temu Putih sebagai alternatif dalam penatalaksanaan pencegahan penyakit kanker kelenjar mammae.

#### **1.6 Hipotesis**

Berdasar rumusan masalah dan landasan teori di depan, maka dapat diajukan suatu hipotesis yaitu :  
Terdapat hambatan ekspresi enzim CYP1A1 setelah pemberian ekstrak Temu Putih pada tikus yang diinduksi DMBA.

**BAB 2**  
**TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kanker

Kanker merupakan kumpulan penyakit dengan ciri-ciri umum yaitu pertumbuhan yang tidak terkontrol (King, 2000). Definisi lain menyatakan kanker adalah penyakit seluler yang pertumbuhannya tidak terkendali karena kehilangan fungsi pada pengaturan sirkulasi proliferasi sel dan penjagaan homeostasis sedangkan sel normal dapat mengendalikan pertumbuhan dan diferensiasi untuk menjaga homeostasis (Hanahan and Weinberg, 2000). Setiap sel yang menyusun tubuh dapat menjadi kanker sehingga dapat mengakibatkan terganggunya keseimbangan fungsi tubuh secara keseluruhan. Perubahan sifat pertumbuhan tersebut disebabkan karena adanya perubahan genetik (transformasi), utamanya pada gen yang mengatur pertumbuhan, yaitu onkogen dan gen tumor suppressor (Meiyanto, 1999).

Neoplasma diklasifikasikan menjadi dua yaitu benigna dengan kecepatan pertumbuhan lambat (jinak) biasa disebut sebagai tumor dan maligna dengan kecepatan pertumbuhannya sangat tinggi (ganas) dan sering disertai invasi dan metastasis. Bentuk maligna ini sering disebut sebagai kanker. Terkadang bentuk benigna merupakan awal terjadinya maligna. Istilah kanker sendiri berdasarkan pada histogenesis (asal sel tumornya) dibedakan menjadi carcinoma yaitu terjadi dari sel epithelial dan sarcoma yang terjadi dari sel mesenchymal (King, 2000).

Menurut Hanahan and Weinberg (2000) terdapat enam perubahan pada sel normal menjadi kanker. Perubahan tersebut antara lain 1) sel kanker mampu mencukupi sinyal pertumbuhannya sendiri, 2) tidak sensitif terhadap sinyal antipertumbuhan, 3) mampu menghindar dari mekanisme apoptosis, 4) memiliki potensi untuk bereplikasi tidak terbatas, 5) mampu mencukupi kebutuhan oksigen dan nutrisi melalui pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis), serta 6) mampu menginvasi jaringan sekitarnya dan metastasis. Sel normal tidak akan berproliferasi tanpa adanya stimulasi sinyal pertumbuhan berupa mitogenik faktor, tetapi sel kanker mampu menghasilkan sinyal pertumbuhannya sendiri, sehingga mengurangi ketergantungan sel terhadap sinyal pertumbuhan dari lingkungan sekitarnya.

Pada sel kanker pertumbuhannya lebih bersifat otonom daripada sel normal disekitarnya. Biasanya pertumbuhan kanker mempunyai keseimbangan positif yaitu jumlah sel yang dibuat lebih banyak daripada jumlah sel yang hilang. Sel kanker mempunyai beberapa sifat morfologik yang spesifik. Inti selnya besar dan berbeda nyata dalam bentuk maupun ukurannya. Kadar asam nukleat dalam inti tinggi dan distribusi kromatin dalam intinya kasar. Sedangkan pola kromosomnya seringkali tetraploid hal ini dikarenakan adanya penambahan kromosom yang tidak teratur (Barl *et al.*, 2004).

## 2.2 Karsinogenesis

Pertumbuhan kanker merupakan proses mikroevolusioner yang dapat berlangsung beberapa bulan atau beberapa tahun (Albert *et al.*, 1994), proses

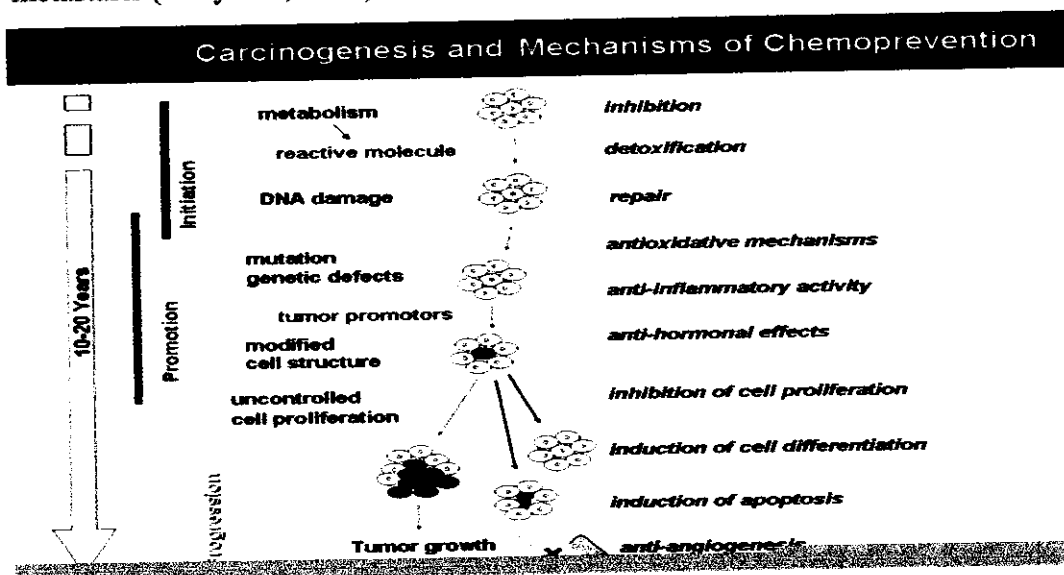


pertumbuhan ini dinamakan karsinogenesis, meliputi 4 tahapan, yaitu tahap inisiasi, promosi, progresi, dan metastasis. Pada tahap inisiasi zat karsinogenik diaktifasi terlebih dahulu oleh enzim di dalam tubuh terutama di hepar menjadi senyawa metabolitnya. Senyawa metabolit ini ada yang bersifat reaktif, mutagenik dan mampu berikatan dengan makromolekul dalam tubuh seperti DNA dengan ikatan irreversibel. Inisiasi adalah tahap pertama karsinogenesis dan merupakan hasil dari perubahan genetik yang mengakibatkan proliferasi sel yang abnormal dari sebuah sel (Pitot, 1993)

Tahap promosi tidak melibatkan perubahan struktural dalam genom secara langsung, tetapi biasanya ditandai dengan perubahan ekspresi gen dari sel yang terinisiasi. Perubahan ini diduga terjadi dari interaksi perubahan genetik pada stadium inisiasi dan faktor lingkungan yang disebut *promoting agents* yang berfungsi untuk pertumbuhan stadium promosi dan mengantarkan tumbuh lebih lanjut menjadi stadium progresi. Contoh dari *promoting agent* adalah croton oil. Senyawa aktif dari minyak ini adalah *12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate* (TPA) yang akan berikatan dengan reseptor membran, protein kinase C, yang kemudian akan mengaktifkan *cytoplasmic serine - threonine protein kinase cascade* yang akan memacu faktor transkripsi dari proliferasi sel. Perubahan ekspresi gen yang terjadi tidak hanya melibatkan perubahan dan susunan genetik saja, tetapi juga peningkatan replikasi selektif sel yang terinisiasi akibat pengaruh *promoting agents* (King, 2000).

Tahap progresi lebih sering terjadi dari sel promosi, ditandai munculnya neoplasma ganas diikuti perubahan genetik nyata yang melibatkan perubahan

struktur dalam inti sel. Jika stadium promosi adalah stadium yang potensial untuk maksud pencegahan terhadap perkembangan kanker, maka stadium progresi harus diobati dengan harapan kesembuhan (Pitot, 1993). Pada tahap ini populasi sel tumor sepenuhnya adalah maligna. Sel maligna ini selanjutnya mengalami perubahan lebih lanjut sehingga mencapai tahap selanjutnya yaitu metastasis (Schneider, 1997). Pada fase ini juga akan terjadi aktivasi onkogen dan kehilangan fungsi dari enzim topoisomerase sehingga akan menyebabkan karsinoma dan metastasis (Meiyanto, 1999).



Gambar 2.1 Skema dari tahap-tahap karsinogenesis (kiri) dan mekanisme kemopreventif (Gerhauser *et al.*, 2003)

Pada tahap metastasis terjadi ekspansi sel kanker ke jaringan lain di seluruh tubuh melalui pembuluh darah maupun pembuluh limfe, atau bisa juga melewati rongga tubuh. Sel yang lepas akan menempel pada jaringan lain dan membentuk tumor sekunder (Murray *et al.*, 1990). Mekanisme tersebut berbeda dengan sel normal, pada sel normal pertautan antar sel sangat kuat (didukung matriks ekstraseluler) sehingga kecil kemungkinan sel lepas dan juga jika ada

sedikit sel normal yang lepas akan segera dihancurkan saat perjalanannya ataupun mengalami proses apoptosis (King, 2000). CAMs (Cell-cell Adhesion Molecules) menjaga sel untuk tetap berikatan satu sama lain. Molekul tersebut mengalami degradasi pada sel kanker sehingga pertautan antar sel lemah. *E-cadherin* merupakan salah satu molekul yang berperan dalam pertautan antar sel tersebut, dan molekul ini hanya sedikit atau bahkan sudah tidak ditemukan pada sel kanker (Rouslahti, 1996).

Invasi dan metastasis merupakan suatu peristiwa yang tergantung pada angiogenesis. Berdasarkan sebuah pandangan praktis dari penemuan dan terapi obat, kebanyakan inhibitor angiogenesis juga mempunyai aksi sebagai antiinvasi atau sebagai komponen antimetastasis (Brem, 1999).

Pendekatan terapi kanker melalui mekanisme antiangiogenesis dapat dilakukan dengan agen vaskulostatik, yaitu agen yang mengganggu proses pembentukan pembuluh darah baru. Agen ini dapat bereaksi dengan cara menekan ekspresi atau menghambat aktivitas faktor-faktor angiogenesis. Yang termasuk dalam golongan ini misalnya senyawa-senyawa flavonoid yang banyak terdapat dalam tanaman (Matter, 2001).

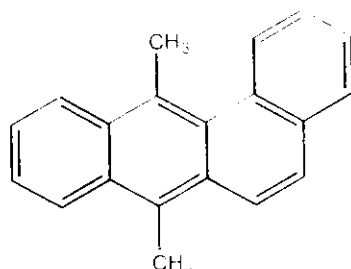
### **2.3 Karsinogenesis pada Kanker Payudara oleh Karsinogen DMBA**

Pengetahuan tentang karsinogenesis pada kanker payudara diawali dengan penelitian pada hewan coba tikus yang diamati secara periodik perkembangan patogenesisnya. Induksi kanker payudara menggunakan senyawa kimia karsinogen yang lazim yaitu DMBA (dimetilbenz(a)antrasen), PhIP (2-amino-1-

methyl-6-phenylimidazo (4-5-b)pyridine) dan NMU (nitrosomethylurea) (Minshu Yu and Snyderwine 2002).

Salah satu senyawa karsinogen penyebab kanker adalah golongan polisiklik aromatik hidrokarbon (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 bertanggung jawab terhadap aktivitas metabolisme dan detoksikasi sejumlah PAH dan aromatik amn (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 and Dragan, 2001).



Gambar 2.2 Struktur kimia 7,12-dimetilbenz(a)antrasen (Pitot and Dragan, 2001)

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. Jalur epoksid dihidrodiol inilah yang bertanggungjawab terhadap inisiasi tumor oleh karsinogen DMBA dari pada bentuk kation radikal (Melendez-Colon *et al.*, 1999).

#### 2.4 Proses Enzimatik pada Karsinogenesis

Setelah diketahui beberapa senyawa bersifat karsinogen, diantaranya dimethylbenz(a)antrazen atau DMBA termasuk kedalam senyawa xenobiotik. Keberadaan senyawa xenobiotik di dalam hepar mengalami metabolisme yang diperantarai atau melibatkan beberapa proses enzimatik, metabolisme xenobiotik pada umumnya terjadi dalam beberapa langkah reaksi kimia yang terjadi secara berurutan melalui beberapa fase. Reaksi fase I. Penambahan kelompok senyawa polar yang fungsional, di sini dihasilkan relatif peningkatan hidrofilisitas dan kemungkinan menyebabkan aktivasi metabolit. Enzim yang terlibat pada fase I diantaranya adalah : Sitokrom P450, P450 reduktase, Sitokrom b5, P450 subtrat dan pruduk Epoxide hydrolase (Bend and Singh, 1994).

Fungsi oksidasi campuran sitokrom P450 adalah keterlibatan enzim mikrosomal yang lebih bersifat katalitik dan membutuhkan enzim seperti pada fase I. Reaksi yang dikatalis oleh sitokrom P450 termasuk aromatic hidroksilasi, oksidatif dealkilasi, N- dan S-oksidasi dan deaminasi. Lebih dari 4000 isoform, tetapi hanya sedikit yang diidentifikasi sebagai famili supergen sitokrom P450 (Bend and Singh, 1994).

Reaksi fase II, konjugasi dengan substansi endogenous hidrofilik, sering tetapi tidak selalu pada kelompok fungsional ditentukan oleh reaksi fase I, juga terjadi peningkatan hidrofilisitas yang signifikan. Reaksi fase II meliputi konjugasi xenobiotik pada substansi lain yaitu glukoronik acid, glutation, asetilasi, metilasi, asam amino konjugasi atau sistein, merubah menjadi lebih hidrofilik memfasilitasi ekskresi melalui empedu dan urin (Bend and Singh, 1994).

## 2.5 Tinjauan Hepar Tikus

Hepar merupakan organ kelenjar terbesar dalam tubuh dengan konsistensi lunak, lentur dan tercetak oleh struktur sekitarnya. Hepar terletak pada bagian kanan atas cavum abdomen, menempati hampir seluruh hipochondrium kanan, sebagian besar epigastrium, dan mencapai hipokondrium kiri sampai sejauh linea mamaria. Bagian bawah hepar berbentuk cekung dan merupakan atap dari ginjal kanan, lambung, pankreas, dan usus (Naiya, 2011).

Hati atau hepar merupakan organ utama sebagai pusat dari metabolisme seluruh tubuh, organ lainnya adalah paru-paru, ginjal, kulit, dan saluran gastrointestinal. Obat yang digunakan secara oral akan melalui liver/hepar

sebelum masuk ke dalam darah menuju ke daerah lain dari tubuh seperti otak, jantung, paru-paru dan jaringan lainnya. Di dalam hepar terdapat enzim khusus yaitu sitokrom P450 yang akan mengubah bahan karsinogenik menjadi bentuk metabolitnya melalui metabolisme fase I (Naiya, 2011).

## 2.6 Tinjauan Sitokrom P450 (CYP1A1)

Sitokrom P450 (CYP) adalah enzim super famili heme-thiolate yang dimiliki lebih dari 750 individu baik manusia maupun hewan berdasarkan karakterisasi sekuen gen dan proteinnya. Sitokrom P450 berperan dalam metabolisme ribuan senyawa eksogen dan endogen. Senyawa-senyawa eksogen meliputi obat dan senyawa toksik atau disebut *xenobiotik*. *Xenobiotik* adalah molekul yang tidak dihasilkan secara *in vitro*, tetapi didapatkan pada tubuh sebelumnya dari lingkungan dan dimetabolisme oleh tubuh. Jalur masuknya ke dalam tubuh bisa melalui inhalasi (seperti aromatik hidrokarbon dalam asap rokok), intra vena (beberapa anestetika), transdermal dan untuk agen farmasetika seperti obat bisa masuk melalui saluran pencernaan. Beberapa bahan karsinogen yang diaktifasi oleh enzim Sitokrom P450 isoform CYP1A1 adalah *benzo[a]pyrene* (BaP), 2 - amino - 1 - methyl - 6 - phenylimidazo (4-5-b) pyridine (PhIP) dan PAH (Lewis *et al.*, 1998).

Termasuk dalam senyawa endogen adalah hormon, sintesis kolesterol dan metabolisme vitamin D. Sitokrom P450 diekspresikan oleh gen yang terbagi menjadi beberapa family dan subfamily. Famili CYP 1-3 terlibat dalam metabolisme xenobiotik, sedangkan kelompok famili CYP yang lainnya terlibat dalam metabolisme steroid dan substansi endogen lainnya. Ada 22 isoform pada

famili CYP 1,2 dan 3, hanya 6 isoform yang terlibat pada fase I metabolisme yang sebenarnya secara klinik relevan untuk metabolisme obat. Salah satunya adalah CYP1A1 yang secara spesifik berperan dalam metabolisme PAH (Lewis *et al.*, 1998).

Sebagian besar isoform P450 yang memetabolisme xenobiotik didapatkan pada lima spesies mamalia yaitu manusia, kerbau, kelinci, tikus (rat) dan mencit. CYP1A1 merupakan isoform yang sering dihubungkan dengan aktivasi prokarsinogen (benzo(a)pirene dan dimetilbenz(a)antrasen-DMBA) pada rodensia dan diinduksi oleh *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) dan 2,3,7,8-*Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin* (TCDD). CYP1A1 juga diekspresikan pada paru manusia yang diinduksi oleh prokarsinogen PAH, termasuk asap rokok dan gas emisi pembuangan yang potensial sebagai faktor penting pada karsinoma paru (Lewis *et al.*, 1998).

## 2.7 Tinjauan Rimpang Temu Putih sebagai Antikanker

Di Indonesia *Curcuma zedoaria* memiliki beberapa sinonim seperti temu putih atau kunyit putih. Di beberapa negara lain *Curcuma zedoaria* juga sudah cukup dikenal. Salah satunya di Malaysia dikenal dengan nama temu kuning dan di Jerman dikenal dengan nama *zitwer*. Batang sesungguhnya berupa rimpang yang bercabang di bawah tanah, berwarna coklat muda atau coklat tua, di dalamnya berwarna putih atau putih kebiruan, memiliki umbi bulat dan bersifat aromatis (berbau khas). Memiliki daun tunggal, pelepah daun membentuk batang semu yang berwarna hijau tua dengan bentuk memanjang lanset 2,5 kali lebar



bagian daun yang terlebar dengan ujung meruncing. Bunga majemuk berbentuk susunan bulir yang terletak diketiak rimpang primer dengan tangkai berambut. Terdiri dari 3 kelopak daun berwarna putih atau kekuningan, bagian tengah merah atau coklat kemerahan. Waktu berbunga antara bulan Agustus - Mei. Banyak tumbuh di daerah tropis dengan ketinggian 750 m di atas permukaan laut pada tempat teduh (Anonimus, IPTEknet.,2005).



Gambar 2.3. Rimpang temu putih (A) Daun dan bunga temu putih (B)  
(Anonimus, IPTEknet.,2005)

Adapun klasifikasi tanaman tersebut adalah sebagai berikut :

- Kingdom : *Plantae*
- Subkingdom : *Viridaplantae*
- Phylum : *Tracheophyta*
- Subphylum : *Spermatophytina*
- Infraphylum : *Angiospermae*
- Class : *Liliopsida - monocotyledons*
- Order : *Zingiberales*
- Family : *Zingiberaceae*
- Subfamily : *Zingiberoideae*

Tribe : *Zingiberaceae*

Genus : *Curcuma* L.

Species : *zedoaria* Roscoe

Botanical Name : *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe

(The International Plant Names Index dalam [www.w3c.org/TR/1999/REC-html401-19991224](http://www.w3c.org/TR/1999/REC-html401-19991224), 2007)

Kurkumin, kurkumenol dan kurkudione adalah senyawa-senyawa yang paling aktif yang terdapat pada *Curcuma zedoaria* (Huang., 2000).

Berdasarkan penelitian terbaru oleh Anderson (2005) menunjukkan bahwa curcumin yang diisolasi dari *Curcuma longa* dapat menghentikan proliferasi sel dan dorongan sel kanker untuk melakukan invasi ke jaringan. Selain itu kurkumin terbukti dapat menghentikan factor kappa  $\beta$  pada nuklear atau yang disebut NF- $\kappa$ B, yaitu suatu protein yang memiliki pengaruh kuat dalam menunjang respon peradangan yang menyebabkan beberapa penyakit seperti arthritis dan kanker. Anderson (2005) juga melakukan dua penelitian sekaligus untuk melihat efek dari pemberian kapsul kurkumin terhadap manusia penderita kanker pankreas dan kanker payudara. Hasilnya menunjukkan bahwa curcumin dapat menghambat pertumbuhan tumor dengan cara menekan regulasi aktifitas EGFR sebagai mediator proliferasi sel tumor dan menekan VEGF yang berperan dalam angiogenesis. Menurut sumber informasi lain menyatakan bahwa kurkumin adalah antioksidan polyphenolic yang dapat menghambat aktivitas kanker pada hewan pengerat dan manusia. Kurkumin bekerja dengan cara menginduksi enzim

glutathione S-transferase, menghambat produksi prostaglandin E(2) (PGF(2)) dan menekan oksidasi *DNA adduct* (M<sub>1</sub>G) (Sabelian, 2004).

Berdasarkan kenyataan empiris dan data-data yang tersedia tersebut, maka dapat dikatakan bahwa rimpang temu putih memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat anti-kanker. (Fedjo dkk., 2005).

## 2.8 Tinjauan Tikus Sprague Dawley

Tikus laboratorium adalah spesies tikus *Rattus norvegicus* yang dibesarkan dan disimpan untuk penelitian ilmiah. Tikus laboratorium telah digunakan sebagai model hewan yang penting untuk penelitian di bidang psikologi, kedokteran, dan bidang lainnya (Pribadi, 2008).

Tikus *Sprague dawley* yang merupakan jenis outbreed tikus albino serbaguna pilihan digunakan secara ekstensif dalam riset medis untuk studi kesehatan manusia dan penyakit. Keuntungan utamanya adalah ketenangan dan kemudahan penanganannya. Tikus jenis ini pertama kali diproduksi oleh peternakan *Sprague dawley* (kemudian menjadi Perusahaan Animal Sprague Dawley) di Madison, Wisconsin. (Harlan, 2012).

*Sprague dawley* memiliki warna tubuh putih (albino). Rata-rata ukuran berat tubuh tikus *Sprague dawley* adalah 10.5. Berat badan dewasa adalah 250-300g bagi betina, dan 450-520g untuk jantan. Masa pubertas tikus ini dicapai pada umur 60 hari. Masa hidup yang khas adalah 2,5-3,5 tahun (Harlan, 2012).

# **BAB 3**

## **MATERI DAN METODE**

## BAB 3 MATERI DAN METODE

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengamatan preparat imunohistokimia ini dimulai pada bulan Februari 2012 di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan kandang hewan coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga meliputi pemeliharaan hewan coba, percobaan karsinogenesis, pemberian ekstrak rimpang temu putih dan pengamatan karsinogenesis. Proses pembuatan ekstrak rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*) dilakukan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Uji imunohistokimia untuk melihat ekspresi enzim CYP1A1 dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Sardjito Yogyakarta.

### 3.2 Materi penelitian

#### 3.2.1 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 yang dibeli dari fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Jumlah hewan coba yang digunakan sebanyak 20 ekor dibagi dalam empat kelompok perlakuan secara random dengan menggunakan lotre. Sebelumnya hewan diaklimatisasi pada ruang dan kandang percobaan serta dikelompokkan berdasarkan perlakuan yang akan diberikan. Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*.

### 3.2.2 Alat penelitian

Peralatan yang digunakan meliputi : kandang, seperangkat alat bedah, *steril disposable syringe*, microspuit injektor, alat gelas, pot salep, vortex, sonde, tube steril, labu takar, pipet tetes, timbangan gram elektrik, pH meter TOA HM-60S, ultra sentrifugator (Hitachi SCP 8511), neraca elektrik (Shimadzu, tipe LS-6DT), dan alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium.

### 3.2.3 Bahan penelitian

#### a). Tanaman :

Tanaman yang digunakan sebagai bahan dalam penelitian ini adalah rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*). Bagian dari tanaman ini diambil secara acak dengan kondisi yang masih segar lalu diproses hingga mendapatkan ekstrak etanolnya.

#### b). Karsinogen : Sebagai bahan karsinogen digunakan DMBA (Sigma Chem. Co).

#### c). Bahan Imunohistokimia :

Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Biotin), Streptavidin Peroxidase (Streptavidin), Large Volume Ultra V Block (normal serum) (Lab. Vision), Antibodi CYP1A1 (antibodi primer) (Lab. Vision) phosphate buffer saline 10%, Counterstain haematoxylin dan eosin mayer, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB).

### 3.3 Metode Penelitian

#### 3.3.1 Variabel Penelitian

Beberapa variabel penelitian yang diperlukan dalam penelitian ini meliputi :

- Variabel Bebas : pola pemberian ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* yang menggunakan dosis 300 mg / kgBB dan DMBA 20 mg / kgBB.
- Variabel Tergantung : ekspresi enzim CYP1A1
- Variabel Kendali : tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*, umur, jenis kelamin, kandang, densitas hewan coba, jenis, jumlah pakan dan minum *ad libitum*.

#### 3.3.2 Pembuatan Ekstrak Etanolik Rimpang Temu Putih

Rimpang temu putih dicuci bersih 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 Temu Putih. 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 tiga kali. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan kemudian diendapkan, lalu disaring untuk selanjutnya diuapkan dengan pengurangan tekanan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental (Hargono, 1986).

### 3.3.3 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/kg BB setiap pemberian (Singletary *et al.*, 1998 ; Kubatka *et al.*, 2000 yang dimodifikasi).

Rumus umum yang digunakan adalah :

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

Sebanyak 50 mg DMBA ditimbang dan dilarutkan dalam 20 ml minyak jagung, hingga diperoleh larutan DMBA dengan kadar 2,5 mg/ml. Tikus dengan berat badan 60 gr membutuhkan 0,48 ml larutan DMBA. Larutan DMBA dalam minyak jagung ini selalu dibuat baru, sebelum diberikan kepada hewan coba secara per oral.

### 3.3.4 Penyiapan Sediaan Uji (Ekstrak Etanol Temu Putih)

Ekstrak etanolik *Cucumis zedoaria* yang akan diberikan pada hewan coba disuspensikan dalam air dengan suspending agent CMC Na 0,5 % di dalam mortir. Pembuatan CMC Na 0,5 % dengan cara menaburkan 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 :

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

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. Larutan ekstrak etanolik *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.

### 3.3.5 Perlakuan pada Hewan Percobaan

Hewan coba yang digunakan tikus putih galur *Sprague dawley* betina umur 40 hari dengan berat badan rata-rata 60-70 gram. Tikus ditempatkan pada kandang dengan ukuran sama berupa bak dari plastik yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum, setiap bak terdapat 5 ekor tikus, pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*. Pemberian DMBA pada tikus dilakukan seminggu dua kali selama lima minggu sedangkan ekstrak temu putih diberikan setiap hari selama empat minggu (Hamid dkk., 2009). Seluruh kandang ditempatkan pada satu ruang yang memiliki ventilasi cukup baik.

Sejumlah 20 ekor tikus betina galur *Sprague dawley* dikelompokkan menjadi empat kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan memerlukan 5 ekor tikus. Pengelompokan hewan percobaan pada setiap kelompok perlakuan adalah sebagai berikut :

**Kelompok I** : Kelompok Kontrol Positif DMBA.

Pada umur 40 hari tikus diberi DMBA 20 mg kgBB dalam minyak jagung per oral frekuensi seminggu dua kali selama lima minggu. Kelompok ini tanpa diberi ekstrak.

**Kelompok II** : Kelompok Perlakuan pemberian ekstrak sesudah pemberian DMBA terakhir.

Pada umur 40 hari tikus diberi DMBA 20 mg kgBB dalam minyak jagung per oral frekuensi seminggu dua kali selama lima minggu, dan mulai minggu ke 6 diberikan ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* 300 mg kgBB dalam CMC Na 0,5% per oral setiap hari selama 4 minggu

**Kelompok III** : Kelompok Perlakuan pemberian ekstrak sebelum 2 minggu pemberian DMBA.

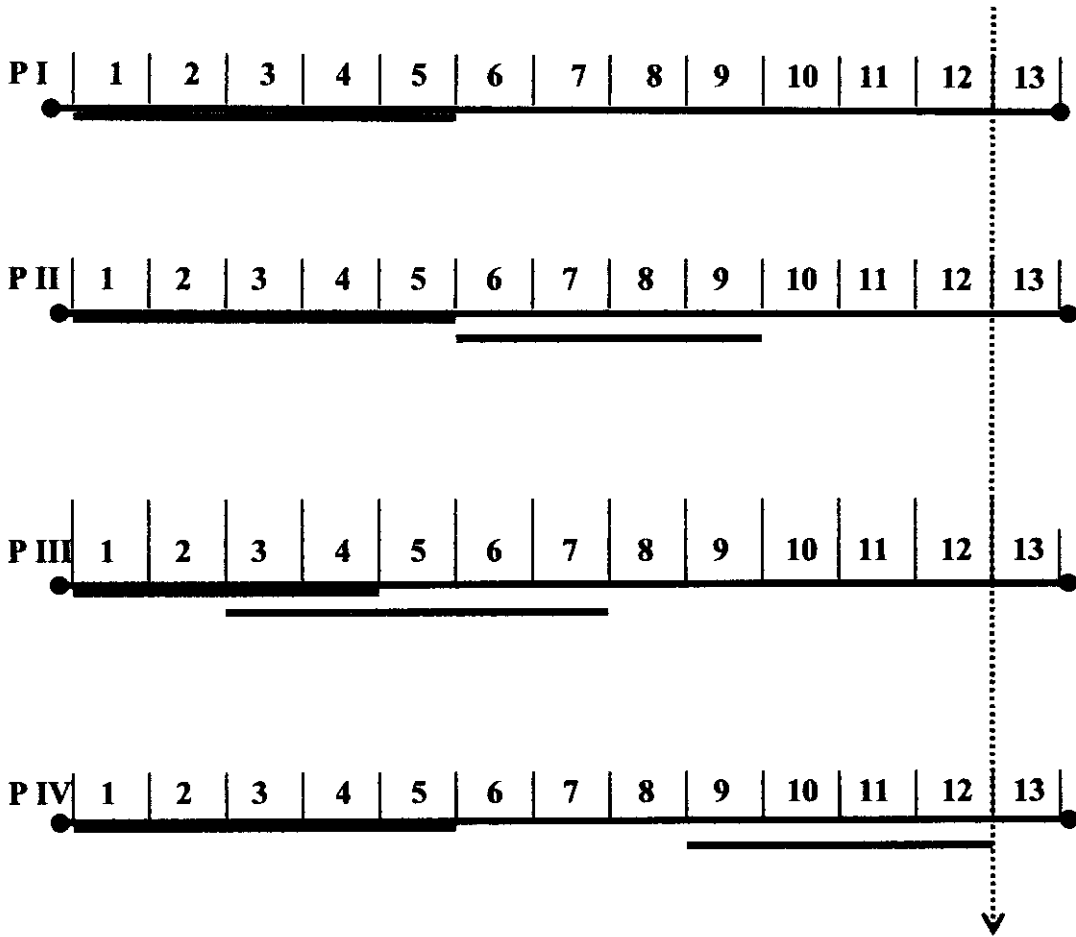
Pada umur 40 hari tikus diberi ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* dosis 300 mg kgBB dalam CMC Na 0,5% per oral, pemberian dilakukan setiap hari selama 4 minggu dan DMBA 20 mg kgBB dalam minyak jagung per oral diberikan mulai minggu ke 2, pemberian dilakukan seminggu dua kali selama 5 minggu.

**Kelompok IV:** Kelompok Perlakuan pemberian ekstrak sesudah 3 minggu pemberian DMBA.

Pada umur 40 hari tikus diberi DMBA 20 mg/kgBB dalam minyak jagung per oral frekuensi seminggu dua kali selama 5 minggu, dan pada minggu ke 9 diberikan ekstrak etanol *Curcuma zedoaria* 300 mg/kgBB dalam CMC Na 0,5% per oral setiap hari selama 4 minggu.

Sebanyak dua puluh ekor tikus dikorbankan dengan melakukan dislokasi pada leher, dilakukan pada saat pemberian ekstrak terakhir bagi kelompok perlakuan, sedangkan bagi kelompok kontrol positif pada saat setelah pemberian DMBA terakhir untuk pengamatan ekspresi enzim CYP1A1 pada organ hepar. Organ yang diambil adalah hepar karena enzim CYP1A1 merupakan enzim metabolisme fase satu yang berada pada hepar.

**Skema Kelompok Perlakuan (minggu ke-) :**



Keterangan :

———— : DMBA 20 mg/kgBB dalam minyak jagung

———— : Ekstrak *Curcuma zedoaria* dalam CMC Na 0,5%

(Dislokasio cervikalis )  
Pengambilan organ hepar untuk analisis ekspresi enzim CYP1A1

### 3.3.6 Pengamatan Ekspresi enzim CYP1A1 Dengan Uji Imunohistokimia

#### Persiapan Pemotongan untuk *Frozen Sections*

Pertama-tama tempat cetakan diberi label dan sebagian diisi dengan matriks jaringan yang telah dibekukan. Jaringan yang diinginkan diambil kemudian dipotong dengan ketebalan tidak lebih dari 5 mm. Potongan jaringan tersebut diletakkan kedalam cetakkan yang telah dilabel dan terisi matriks jaringan beku. Jaringan disusun dalam matriks dan diusahakan posisi dekat dengan bagian dasar cetakan sehingga jaringan mudah terekspose ketika dipotong.

Selanjutnya cairan 2-methylbutane dituangkan dalam nitrogen cair ke dalam gelas reaksi yang terbuat dari *stainless steel* dan diletakkan pada suhu yang cukup dingin (sejuk). Cetakan yang berisi jaringan tadi segera dibenamkan ke dalam gelas kimia yang telah terisi cairan 2-methylbutane. Matriks jaringan dibiarkan sampai mengeras secara keseluruhan kemudian diangkat dan dipindahkan ke *dry ice* atau *cryostat*.

#### Pemotongan untuk *Frozen Sections*

Sebelum tahap pemotongan diusahakan suhu cetakan menjadi sama dengan suhu *cryostat* (-20°). Cetakan jaringan diletakkan di piringan untuk spesimen pada *cryostat*. Posisi cetakan diatur agar sejajar dengan mata pisau, kemudian dipotong sampai jaringan yang diinginkan tampak. Ketebalan dari potongan yang diinginkan biasanya lima mikro meter ( $\mu\text{m}$ ). Potongan tersebut ditempatkan di *Fisher Superfrost* dan dikeringkan dalam suhu kamar selama satu malam. Slide difiksasi dengan cara direndam pada larutan acetone dingin (-20°)

selama dua menit dan disimpan pada suhu kamar kemudian dapat dilanjutkan untuk tahap selanjutnya.

#### Prosedur Standar Pewarnaan Imunohistokimia untuk *Frozen Sections*

Pertama-tama slide dari organ hepar dikeringkan dan dilabel dengan pena anti air kemudian difiksasi dalam larutan aseton selama 10 menit dalam freezer. Selanjutnya dicuci dengan PBS selama lima menit sebanyak tiga kali. Setelah itu slide ditetesi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dan dibiarkan selama 20 menit lalu dicuci dengan air selama tiga sampai lima menit. Lalu dicuci dengan PBS selama lima menit sebanyak tiga kali.

Setelah dilakukan pencucian, slide ditetesi dengan normal serum (blocking) selama lima menit dan dikeringkan tepinya. Kemudian dilanjutkan dengan pemberian antibodi dan dibiarkan selama 60 menit pada suhu kamar atau satu malam dalam lemari es. Selanjutnya antibodi dibuang lalu dicuci dengan PBS selama 5 menit sebanyak tiga kali. Langkah selanjutnya adalah penetesan dengan Biotin (warna kuning) lalu dibiarkan selama lima menit. Kemudian dicuci lagi dengan PBS selama 5 menit sebanyak tiga kali.

Selanjutnya slide ditetesi dengan Streptavidin (warna pink) dan dibiarkan selama lima menit. Lakukan pencucian lagi dengan PBS selama 5 menit sebanyak tiga kali dimana larutan PBS harus baru, lalu setelah dipakai mencuci segera dibuang. Setelah itu slide ditetesi dengan DAB dan dibiarkan selama 8 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10-15 menit. Selanjutnya slide dimasukkan dalam HE mayer selama dua sampai empat menit dan dicuci dengan

air mengalir. Langkah terakhir dilakukan mounting dan ditunggu sampai mengering. (Metode Imunohistokimia mengadopsi protokol dari Lab Vision)

Masing-masing hepar tikus perlakuan akan dibuat preparat slide dengan penambahan antibodi CYP1A1, sehingga akan didapatkan 20 preparat slide untuk pengamatan enzim CYP1A1. Pengamatan preparat imunohistokimia dilakukan dengan menghitung persentase sel yang mengekspresikan enzim CYP1A1 di sitoplasmanya dalam 3 lapang pandang dengan perbesaran 40x lensa objektif, kemudian dirata-rata. Sel yang mengekspresikan enzim CYP1A1 akan tampak berwarna coklat pada sitoplasma, sedangkan sel yang tidak mengekspresikan enzim CYP1A1 akan berwarna biru keunguan ( Hamid dkk., 2009)

### 3.4 Rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan tipe Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan empat perlakuan dengan lima ulangan. Seperti yang tertera pada tabel berikut

Tabel 3.1 Ekspresi CYP1A1 pada hepar

Perlakuan	P I	P II	P III	P IV
Tikus 1				
Tikus 2				
Tikus 3				
Tikus 4				
Tikus 5				

### 3.5 Analisis data

Perhitungan ekspresi enzim CYP1A1 dilakukan melalui pengamatan mikroskopis pada preparat imunohistokimia organ hepar dimana tiap slide akan dilakukan pengamatan dengan tiga lapang pandang berbeda. Kemudian akan dihitung jumlah sel yang mengekspresikan enzim di sitoplasma pada minimal 100 sel pada tiap lapang pandang kemudian dirata-rata.

Digunakan model statistika parametrik dengan melakukan uji normalitas data dengan uji *Kolmogorov-smirnov*. Bila data terdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji ANOVA (*Univariate Analysis of Variance*) satu arah dengan *post-hoc test* uji *Duncan* dengan taraf kepercayaan 95% untuk membandingkan ekspresi enzim CYP1A1 antar kelompok perlakuan. Uji statistik dilakukan dengan bantuan perangkat lunak *SPSS® 17.0 for Windows®*.



## **BAB 4**

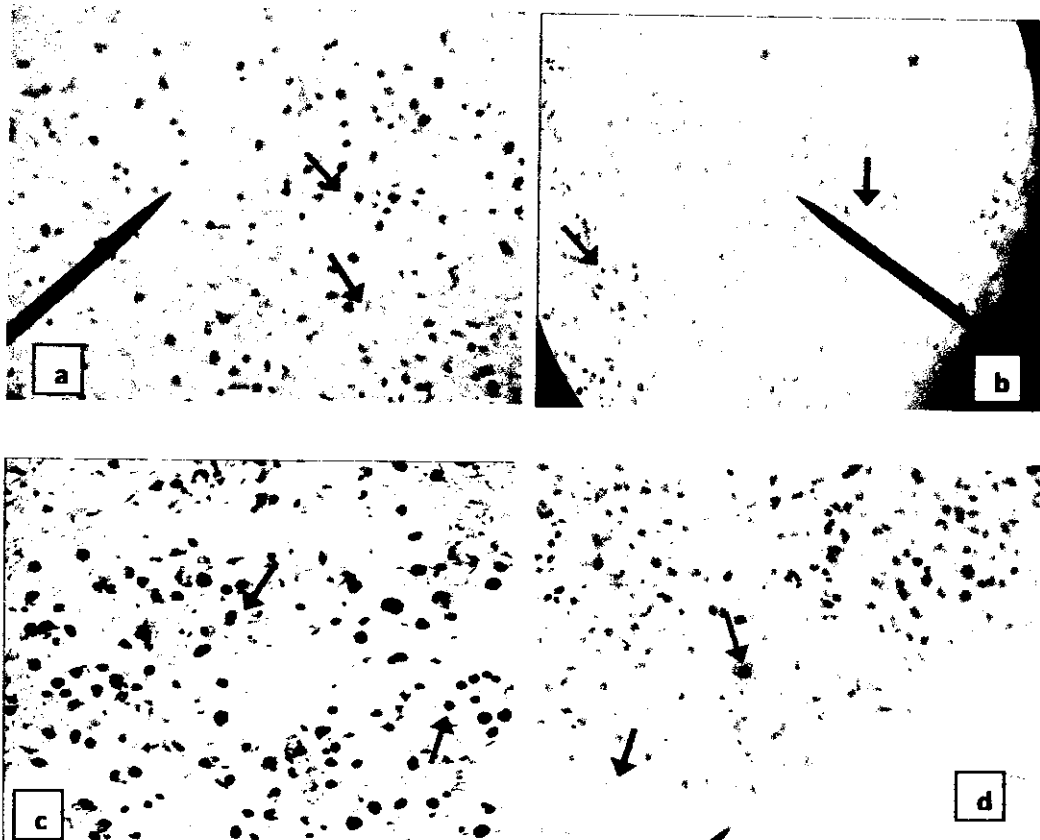
# HASIL PENELITIAN

## BAB 4 HASIL PENELITIAN

### 4.1 Ekspresi enzim CYP1A1 pada sel hepar hewan uji

Metode pengecatan imunohistokimia mendeteksi ekspresi protein secara spesifik berdasarkan reaksi antigen-antibodi. Antibodi monoklonal yang digunakan untuk mendeteksi enzim CYP1A1 adalah antibodi CYP1A1 yang dapat mengenali antigen CYP1A1. Hasil reaksi antigen-antibodi divisualisasi dengan kromogen DAB (3,3-Diaminobenzidin) yang akan berwarna coklat dilihat dibawah mikroskop. Sel yang mengekspresikan enzim akan tampak coklat pada daerah sekitar sitoplasma sel karena ekspresi enzim tersebut yang aktif terlokalisasi pada daerah tersebut (tanda panah merah), sedangkan sel yang normal (tidak mengekspresikan enzim CYP1A1) akan berwarna biru pada sitoplasma selnya (tanda panah biru) (Gambar 4.1). Dengan metode ini, tingkat ekspresi CYP1A1 dinyatakan dengan jumlah sel yang mengekspresikan enzim CYP1A1.

Visualisasi hasil pengamatan metode imunohistokimia pada kelompok tikus perlakuan menunjukkan bahwa jumlah sel hepar yang mengekspresikan enzim CYP1A1 pada kelompok perlakuan kontrol positif DMBA lebih banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan ekstrak sebelum maupun sesudah pemberian DMBA. Terlihat bahwa sel hepar yang berwarna coklat di daerah sitoplasma sel pada kelompok perlakuan kontrol positif DMBA lebih mendominasi dan lebih jelas dibandingkan dengan sel hepar kelompok perlakuan lainnya (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Hasil pengecatan imunohistokimia sel hepar tikus dengan antibodi CYP1A1 yang menunjukkan sel yang mengekspresikan enzim CYP1A1

Keterangan: Banyaknya sel yang mengekspresikan enzim CYP1A1 ditunjukkan dengan jumlah sel yang berwarna coklat pada sitoplasma selnya (tanda panah merah). Gambar di atas menunjukkan hepatosit tikus kelompok perlakuan: kontrol positif DMBA (a), ekstrak sesudah DMBA terakhir(b), ekstrak sebelum dua minggu DMBA terakhir (c), ekstrak sesudah tiga minggu DMBA terakhir (d) dengan perbesaran 40x lensa objektif.

Hasil penghitungan sel positif (terekspresi enzim CYP1A1) dalam 3 lapang pandang berbeda selanjutnya dirata-rata dan diubah dalam bentuk presentase untuk mempermudah dalam analisa statistik selanjutnya seperti yang tampak pada tabel 4.1.

**Tabel 4.1. Rata-rata dan standar deviasi ekspresi CYP1A1 masing-masing kelompok perlakuan**

PERLAKUAN	Rataan $\pm$ SD
P I	73,15 <sup>a</sup> $\pm$ 4,70
P IV	62,32 <sup>ab</sup> $\pm$ 8,63
P II	47,21 <sup>b</sup> $\pm$ 9,71
P III	28,82 <sup>c</sup> $\pm$ 13,16

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

Hasil penghitungan sel yang terekspresi enzim CYP1A1 yang telah dirata-rata dalam bentuk persentase diolah lebih lanjut menggunakan analisa statistik *Kolmogorov-Smirnov* (lampiran 4) untuk mengetahui normalitas data.

Setelah data yang dihasilkan terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji statistik *One-Way ANOVA* (Anova Satu Arah) (lampiran 4) dengan *post-hoc test Duncan* dengan taraf kepercayaan 95% (lampiran 4) untuk membandingkan ekspresi enzim CYP1A1 antar kelompok perlakuan.

Perhitungan statistik dengan Anova terhadap ekspresi enzim CYP1A1 menunjukkan bahwa F hitung 20.344 dan terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0.01$ ) dan ( $p < 0.05$ ) dari keempat kelompok perlakuan. Untuk melihat adanya perbedaan antara kelompok perlakuan dilakukan uji dengan *post-hoc test Duncan*. Pada *post-hoc test Duncan* ditunjukkan bahwa kelompok perlakuan kontrol positif DMBA tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan ekstrak sesudah tiga minggu DMBA, tetapi berbeda nyata dengan kelompok perlakuan ekstrak sesudah pemberian DMBA terakhir dan kelompok ekstrak sebelum dua minggu DMBA.

## **BAB 5**

# **PEMBAHASAN**

## BAB 5 PEMBAHASAN

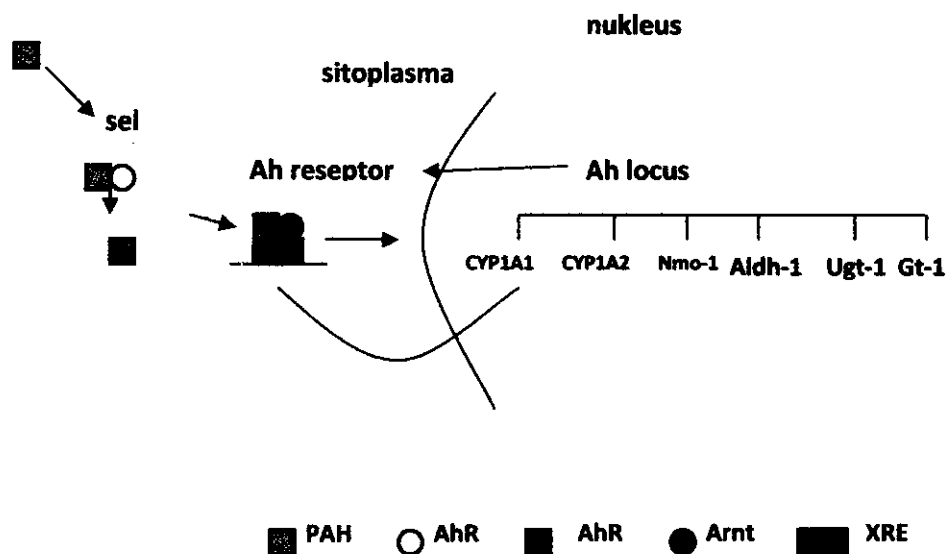
### 5.1 Ekspresi enzim CYP1A1 sel hepar hewan uji

Berdasarkan hasil pengamatan visual melalui penghitungan sel hepar tikus hewan coba dari masing-masing perlakuan dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanolik temu putih mampu menekan ekspresi CYP1A1. Penekanan ekspresi enzim CYP1A1 ini terlihat disebabkan adanya perbedaan ekspresi CYP1A1 yang nyata ( $P < 0,001$ ) antara kelompok perlakuan kontrol positif DMBA dengan kelompok perlakuan ekstrak sebelum pemberian DMBA dan kelompok perlakuan ekstrak sesudah pemberian DMBA. Dimana rata-rata presentasi ekspresi enzim per 100 sel ( $\bar{x} \pm SD$ ) pada kelompok perlakuan kontrol positif DMBA sebesar  $(73,15 \pm 4,70)$  sedangkan rata-rata presentasi ekspresi enzim per 100 sel ( $\bar{x} \pm SD$ ) pada kelompok perlakuan ekstrak sesudah pemberian DMBA terakhir, kelompok perlakuan ekstrak sebelum dua minggu pemberian DMBA, kelompok perlakuan ekstrak sesudah tiga minggu pemberian DMBA secara berturut-turut adalah  $47,21 \pm 9,71$ ;  $28,82 \pm 13,16$ ;  $62,32 \pm 8,63$ . Hal ini sesuai dengan pernyataan bahwa kurkumin, salah satu senyawa aktif yang terdapat dalam rimpang temu putih memiliki efek dalam menekan level CYP1A1 pada hepar dan paru (Garg *et al.* 2007). Hasil dari penelitian ini juga sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan Oetari dkk. (1995) bahwa kurkumin dapat menjadi inhibitor enzim P450 1A1 yang potensial pada hepar tikus dengan yang diukur aktifitasnya melalui ethoxyresorufin deethylation (EROD) dalam -naphthoflavone ( $\beta$ NF).

Mekanisme penekanan ekspresi enzim CYP1A1 oleh kurkumin telah diteliti Garg dkk. (2007) yang menjelaskan bahwa kurkumin bekerja bukan dengan cara alterasi AhR melainkan secara signifikan menurunkan induksi AhR oleh PAH dimana pada proses induksi tersebut terjadi fosforilasi, translokasi nuklear dan ikatan dengan sekuen DNA yang selanjutnya menekan transaktivasi CYP1A1. Sebenarnya dalam keadaan normal (tanpa paparan senyawa karsinogenik) dalam tubuh, enzim CYP1A1 tetap diekspresikan oleh suatu promotor yang diasumsikan sebagai sebuah nukleosom yang diposisikan di dalam nukleosom. Kumpulan nukleosom tersebut hanya sedikit mengekspresikan CYP1A1 dikarenakan penekanan transkripsi secara berulang-ulang oleh nukleosom. Adanya paparan PAH pada sel akan diikuti adanya ikatan heterodimer *aryl hydro receptor* (AhR) dengan *AhR nuclear translocator* (Arnt) dengan *enhancer* atau promotor yang mengakibatkan perubahan struktur kromatin dan promotor DNA akan lebih terakses dengan ikatan protein (AhR Arnt). *Aryl hydrocarbon receptor* (Ahr) merupakan faktor transkripsi yang berperan dalam metabolisme senyawa xenobiotik dalam tubuh (Chanas dkk. 2002). Mekanisme ikatan heterodimer AhR dengan Arnt diawali dengan adanya paparan PAH (DMBA) yang akan berdifusi ke dalam sel dan akan berikatan dengan AhR yang akan memediasi ikatan ligan, interaksi protein dengan DNA serta transaktivasi (Whitlock, 1995 dalam Hamid, dkk. 2009). Selanjutnya terjadi heterodimerisasi dengan Arnt yang memiliki fungsi serupa dengan AhR. Ikatan Ahr dengan Arnt dapat mengenali sekuen DNA yang spesifik dan berikatan dengan *xenobiotik*



*responsive element* (XRE) yang selanjutnya mengaktifasi *upstream* target gen CYP1A1 (gambar 5.1)



Gambar 5.1 Mekanisme induksi CYP1A1 oleh PAH melibatkan aryl hydrocarbon reseptor (AhR) (adaptasi dari Hayes and Pulford, 1995)

Berdasarkan data yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol rimpang *Curcuma zedoaria* memiliki efek inhibisi terhadap enzim CYP1A1 lebih tinggi padapola pemberian sebelum diinduksi dengan DMBA dibandingkan pemberian ekstrak yang dilakukan sesudah tiga minggu induksi DMBA maupun pemberian ekstrak sesudah DMBA terakhir, akan tetapi pemberian ekstrak yang dilakukan pada sebelum maupun sesudah pemberian DMBA masih menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan perlakuan kontrol positif DMBA.

## **BAB 6**

# **KESIMPULAN DAN SARAN**

## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak *Curcuma zedoaria* dapat menghambat ekspresi enzim CYP1A1 pada tikus yang diinduksi DMBA dengan pola pemberian paling efektif *Curcuma zedoaria* dua minggu sebelum induksi DMBA.

### 6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian saran yang dapat diuraikan adalah :

1. Uji pada hewan coba dengan Ekstrak *Curcuma zedoaria* dosis 300 mg/kgBB sebagai alternatif terapi kemopreventif dalam upaya pencegahan kanker mammae tuntas tetapi masih perlu dilakukan uji klinis.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas CYP1A1 untuk memperoleh data yang kuantitatif.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menegaskan senyawa bioaktif dari ekstrak *Curcuma zedoaria* yang berfungsi sebagai antikarsinogenik.
4. Perlu dilakukan eksplorasi mengenai mekanisme-mekanisme molekuler lain yang mungkin terjadi dari senyawa antikarsinogenik tersebut.

# RINGKASAN

## RINGKASAN

**Aveline Widya Yolanda. Efek Pemberian Ekstrak Temu Putih (*Curcuma zedoaria*) Sebelum dan Sesudah Inisiasi 7,12 Dimethylbenz(a)antrasen (DMBA) pada Tikus *Sprague Dawley* Terhadap Ekspresi Enzim CYP1A1.** Di bawah bimbingan M. Gandul Atik Y., M.Kes., drh. sebagai pembimbing pertama dan Dr. Widjati, M.Si., drh. sebagai pembimbing kedua.

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab permasalahan mengenai penatalaksanaan penyakit kanker khususnya kanker payudara baik pada manusia maupun hewan dimana prevalensinya semakin meningkat dari tahun ke tahun dan dengan tingkat keberhasilan pengobatan sangat kecil serta seringkali mengakibatkan efek samping yang merugikan bagi penderita.

Pengobatan alternatif dengan menggunakan herbal alami dalam menangani kanker baik sebagai kemopreventif maupun pengobatan kini lebih banyak dipilih masyarakat karena minimnya efek samping yang ditimbulkan. Rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*) merupakan salah satu tanaman obat yang mengandung zat bioaktif kurkumin dimana sebelumnya terbukti dapat menghambat karsinogenesis. Rimpang temu putih di ekstraksi kemudian diberikan pada hewan uji yang dikelompokkan menjadi empat kelompok perlakuan yaitu kontrol positif DMBA 20 mg/kgBB, ekstrak temu putih 300 mg/kgBB sesudah DMBA terakhir, ekstrak temu putih 300 mg/kgBB sebelum dua minggu DMBA, ekstrak temu putih 300 mg/kgBB sesudah tiga minggu DMBA untuk diketahui efeknya dalam mencegah karsinogenesis. Dalam hal ini DMBA dosis 20 mkg/kgBB digunakan sebagai inisiator kanker. Dalam penelitian

ini pemeriksaan enzim sitokrom P450 family 1A1 (CYP1A1) dijadikan tolok ukur keberhasilan pencegahan kanker payudara akibat adanya metabolisme xenobiotik khususnya senyawa-senyawa yang bersifat prokarsinogen seperti PAH yang melibatkan enzim tersebut. Pada akhir minggu ke 12 tikus dikorbankan untuk diambil organ hepar sebagai organ yang berfungsi memproduksi enzim CYP1A1 dan selanjutnya akan dilakukan metode pengecatan imunohistokimia untuk melihat ekspresi enzim CYP1A1. Penentuan ekspresi enzim dilakukan dengan cara pengamatan visual preparat imunohistokimia melalui mikroskop dengan cara menghitung sel yang terekspresi pada minimal 100 sel pada tiga lapang pandang berbeda dengan perbesaran lensa objektif 40x.

Selanjutnya hasil penghitungan dianalisa menggunakan analisa statistik *Kolmogorov-Smirnov* dilanjutkan uji Anova satu arah dengan *post-hoc test Duncan* untuk membandingkan ekspresi enzim CYP1A1 antar kelompok perlakuan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak temu putih (*Curcuma zedoaria*) memiliki efek mencegah karsinogenesis dengan cara menekan CYP1A1.

Dalam pemeriksaan ekspresi enzim CYP1A1, terbukti bahwa ekstrak rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria*) 300 mg/kgBB lebih optimal menghambat enzim CYP1A1 saat diberikan sebelum dua minggu induksi DMBA dibandingkan dengan pemberian ekstrak dilakukan sesudah induksi DMBA. Namun pemberian ekstrak sebelum maupun sesudah induksi DMBA masih terlihat dapat menekan ekspresi enzim CYP1A1 jika dibandingkan dengan kontrol positif DMBA. Ekstrak rimpang temu putih lebih tepat digunakan dalam

pencegahan penyakit kanker mammae. namun juga dapat dimanfaatkan sebagai terapi pengobatan kanker mammae.

## DAFTAR PUSTAKA



## DAFTAR PUSTAKA

- Albert, B., J. Lewis., M. Rarr., K. Roberts *and* J.O. Watson. 1994. *Moleccular Biology of The Cell*, 3 rd Edition. Garland Publishing Inc. New York.
- Aller, M.A, J.L. Arias, J.G. Domínguez, J.I. Arias, M. Durán, J. Arias. 2008. Experimental obstructive cholestasis: the wound - like inflammatory liver response. *Fibrogenesis Tissue Repair.*: 1: 6
- Anderson. L.E., G.A. Boorman , J.E. Morris, L.B. Sasser , P.C. Mann, S.L. Grumbein, J.R. Hailey , A. Mc Nally, R.C. Sills , and J.K. Haseman. 1999. Effect of 13 weeks Magnetic Fields Exposure on DMBA-Initiated Mammary Gland Carcinomas in Female Sprague-Dawley Rats. *Carcinogenesis*. 20(8):1615-1620.
- Anderson, M. D. 2005. Curcumin Has Potent Anticancer Powers. University of Texas-Cancer Center. <http://www.news-medical.net/info> [16 November 2011]
- Anonim. 2005. Tanaman Obat Indonesia. Temu Putih. diambil dari <http://www.IPTEknet.co/tanamanobat/temuputih> [16 November 2011]
- Anonim. 2007. The International Plant Names Index , dalam [www.w3c.org/TR/1999/REC-html401-19991224](http://www.w3c.org/TR/1999/REC-html401-19991224). [16 November 2011]
- Appel, 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.
- 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*.
- Bend, R.J., and C.J. Scrabjit-Singh. 1994. *Xenobiotic Metabolism by Extrahepatic Tissue: Relationship to Target Organ and Cell Toxicity. Drug Metabolism and Drug Toxicity*. Raven Press, New York.
- Brauch, H., T. Bruning, H. Fischer, U. Hamann, V. Hart, C. Justenhoven, Y. Ko, and B. Pesch. 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> [16 November 2011]
- Brem, S. MD. 1999. Angiogenesis and Cancer Control: From Concept to Therapeutic Trial. Moffit Cancer Center & Research Institute (<http://www.medscape.com>). [16 November 2011]

- Chanas, S. A., Q. Jiang, M. McMahon, G.K. McWalter, L. I. McLellan, C.R. Elcombe, C. J. Henderson, C. J. Wolf, G. J. Moffat, K. Itohs, M. Yamamotos, J. D. Hayes, 2002. Loss of The Nrf2 Transcription Factor Causes A Marked Reduction In Constitutive and Inducible Expression of The Glutathione S-Transferase GSTA1, GSTA2, GSTM1, GSTM2, GSTM3, and GSTM4 Genes In The Liver Of Male and Female Mice, *Biochem J.*, 365: 405-416
- Commandeur, J.N.M., Stijntjes G., and Vermeulen N.P.E., 1995. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates, *Pharmacol. Rev.*, 47 (2): 271-330.
- Farikha, J. 2008. Insidensi, Tumeur Multiplicity, dan Ekspresi Protein p53 pada Mammac Tikus Galur *Sprague dawley* Setelah Inisiasi Dimethylbenz(a)anthracene dengan Pemberian *Gynura procumbens* [SKRIPSI]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
- Garg, R., S. Gupta, and G. Maru, 2008. *Dietary curcumin modulates transcriptional regulator(s) of phase I and phase II enzymes in benzo(a)pyrene-treated mice: mechanism of its anti-initiating action.* Carcinogenesis Advance Access. Carcinogenesis.
- Gerhauser, 2003. diambil dari [www.w3.org/TR/xhtml1/DTD/xhtml1-transitional](http://www.w3.org/TR/xhtml1/DTD/xhtml1-transitional) [16 November 2011]
- Griffits, E.J.F., D.T. Miller, R.D. Suzuki, W. Lewontin, and M. Gelbart, 1993. *An Introduction to Genetic Analysis*, 5<sup>th</sup> Ed. W.H. Preeman and Company, New York.
- Guo Ming and B.A. Hay, 1999. Cell proliferation and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 745-752.
- Hamid, I.S., Sugiyanto, Edy Meiyanto dan Sitarina Widyarini.2009. Ekspresi CYP1A1 dan GST $\mu$  hepatosit terinduksi 7,12-dimetilbenz(a)antrasena dan pengaruh pemberian ekstrak etanolik *Gynura procumbens*. ([http://mfi.farmasi.ugm.ac.id/files/news/6\\_2\\_Kolom\\_Iwan.pdf](http://mfi.farmasi.ugm.ac.id/files/news/6_2_Kolom_Iwan.pdf)) [29 Desember 2011]
- Hanahan, D and R.A. Weinberg, 2000. The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100: 57-70.
- Hargono, Djoko, 1986. *Sediaan Galenik*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta

- Harlan. 2012. Harlan Laboratories, Inc . (<http://www.harlaneurope.com>) [24 Januari 2012]
- Hashimoto S., H. Yamamura, T. Sato, K. Kanayama, T. Sakai. 2002. Prevalence of Mammary Gland Tumor of Small Breed Dog in the Tokyo Metropolitan Area. (<http://sciencelinks.jp/j-east/article>). [16 November 2011]
- Haves, J.D., and D.J. Pulford. 1995. S-Transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprevention and drug resistance. *Biochem Mol Biol.* 30(6) : 445-609.
- Heyne, K. 1987. Tanaman Berguna Indonesia, jilid II, cetakan pertama, diterjemahkan oleh Badan Litbang Departemen Kehutanan, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta.
- King, R.J.B. 2000. *Cancer Biology*, 2nd Ed., Pearson Education Limited, London.
- Kubatka, P., E. Ahlersova, I. Ahlers, B. Bojkova, K. Kalicka, E. Adamekova, M. Markova, M. Chamilova, M. Cermakov. 2002. Variability of Mammary Carcinogenesis Induction in Female *Sprague dawley* and Wistar:Han Rats: the Effect of Season and Age. *Institute of Animal Physiology, Safarik University, Slovak Republic.* 51:663-640
- Lewis, D.F.V., I. Costas, and D.V. Parker. 1998. Cytochromes P450 and Species Different in Xenobiotic Metabolism and Activation of Carcinogenesis. *Environment Health Perspective.* 106(10) : 653-641.
- Matter, A. 2001. Tumor Angiogenesis as a Therapeutic Target. *Drug Disc. Today.* 6(19): 1005-1020
- Meiyanto, E. 1999. Kurkumin Sebagai Obat Antikanker: Menelusuri Mekanisme Aksinya. *Majalah Farmasi Indonesia.* 10(4): 224-236.
- Melendez-Colon, V., A. Luch., A. Seidel and W.M. Baird. 1999. Cancer Initiation by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Results from Formation of Stable DNA Adducts rather than Apurinic Sites. *Carcinogenesis.* 20 (10): 1885-1891.
- Minshu Yu and E.G. Snyderwine. 2002. H-ras Oncogene Mutation During Development of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5b)pyridine (PhIP)-Induced Rat Mamary Gland Cancer. *Carcinogenesis.* 23(12) : 2123-2128.
- Murray, R.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell. 1990. Kanker, Onkogen, dan Faktor-Faktor Pertumbuhan, dalam *Biokimia Harper*, diterjemahkan oleh: Hartono, A., Edisi II, Penerbit EGC, Jakarta.

- Naiyah. 2011. Ilmu Farmasi: Metabolisme Obat. Diambil dari (<http://inayatush.blogspot.com/2011/06/metabolime-obat.html>) [ 1 Januari 2012]
- Novalina. 2003. Penggunaan Tanaman Obat Sebagai Upaya Alternatif dalam Terapi Kanker. Pengantar ke Falsafah Sain. PPS Institut Pertanian Bogor.
- Oetari, S., M. Sudibyo, Commandeur, N. M. Jan, R. Samhoedi, Vermeulen, P. E. Nico. 1996. Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver. 53:39-45
- Parkin, MD; Freddie Bray; J. Ferlay; Paola Pisani, PhD. 2005. Global Cancer Statistics. CA Cancer J Clin 55:74-108
- Pitot, H.C. 1993. The Molekuler Biology of Carcinogenesis. Cancer. 72: 962-970
- Pitot, H.C. and Y.P. Dragan. 2001. Chemical Carcinogenesis, 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.
- Prakoso, B. 2007. Mari Sehat dengan Herbal. Temu Putih. Diambil dari (<http://sehatherbal.blogspot.com/2007/08/temu-putih-curcuma-zedoaria-rose.html>)
- Pribadi, G.A. 2008. Penggunaan Mencit dan Tikus Sebagai Hewan Model Penelitian Nikotin [SKRIPSI]. Program Studi Teknologi Produksi Ternak Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor
- Rouslahti, E. 1996. How Cancer Spread. Scientific American. 9:72-77.
- Russo, J., Y. Hu, X. Yang, and I.H. Russo. 2000. Chapter 1 : Developmental, Cellular, and Molecular Basis of Human Breast Cancer. J. Of National Cancer Institut Monographs. 27: 17-37.
- Russo, M., I. Tedesco, G. Iacomino, R. Palumbo, G. Galano, G. L. Russo. 2005. Dietary Phytochemicals in Chemoprevention of Cancer. Curr. Med. Chem. - Immun., Endoc. & Metab. Agents. 5: 61-72
- Sahelian, R. 2004. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. (<http://www.raysahelian.com/curcumin.html>) [16 November 2011]
- Schneider, K.A., 1997, Cancer Genetics. Encyclopedia of Human Biology. 2:311-320.

- Sharma R.A., A.J. Gescher, W.P. Steward. 2005. Curcumin : The story so far. *European Journal of Cancer*
- Shepel, L.A., Hong Lan, J.D. Hagg, G.M. Brasic, M.E. Ghenn, J.S. Simon, P. Hoff, M.A. Newton, and M.N. Gould. 1998. Genetic Identification of Control Breast Cancer Susceptibility in The Rat. *Genetic*. 149: 289-299.
- Singletary, K., C. Macdonald, M. Wallig. 1997. The Plasticizer Benzyl Butyl Phthalate (BBP) Inhibits 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced rat Mammary DNA Adduct Formation and Tumorigenesis, *Carcinogenesis* 18 (8): 1669-1673.
- Singletary.K., C. Macdonald, M. Iovinelli, M. Wallig. 1998. Effect of the  $\beta$ -diketones diferuloylmethane (curcumin) and benzoylmethane on rat mammary DNA adducts and tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Carcinogenesis*. 19 (6): 1039-1043.
- Sugiyanto, Sudarto, B., Meiyanto, E., Nugroho, A. E., dan Jenie, U. A., 2003. Aktivitas Antikarsinogenik Senyawa Yang Berasal Dari Tumbuhan. *Majalah Farmasi Indonesia*. 14(4): 216-225.
- Tamimi, R. M., P. Lagiou, H. Adami, D. Trichopoulo. 2002. Prospects For Chemoprevention of Cancer, *Journal of Internal Medicine*. 251 (4): 286-300
- Tasminatun, S. 2005. Efek Antikarsinogenesis Ekstrak Etanolik Daun *Gynura Procumbens* (Lour.) Merr. Setelah Inisiasi Pada Kanker Payudara Tikus Terinduksi 7,12-Dimetil Benz(A)Antrasen (DMBA). Thesis Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Tedjo, A., D. Sajuthi, L.K. Darusman. 2005. Aktivitas Kemoprevensi Ekstrak Temu Mangga. *Makara, Kesehatan*. 9( 2) : 57-62
- Tjindarbuni, D. and Mangunkusumo, R., 2002. Cancer in Indonesia, Present and Future, *Jpn J. Clin. Oncol.*, 32: 17-21.
- Tsao, A. S., E. S. Kim, Waun Ki Hong. 2004. Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J. Clin.* 54: 150-180
- Wattenberg L.W. 1993. Prevention, Therapy and Basic Science and The Resolution of The Cancer Problem, *Cancer Res*. 53: 5890-5896
- Weimer, T. L., A. P. Reddy, U. Harttig, D. Alexander, S. C. Stamm, M. R. Miller, W. Baird, J.Hendricks, and G.Bailey. 2000. Influence of  $\beta$ -Naphthoflavone on 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene Metabolism, DNA

Adduction, and Tumorigenicity in Rainbow Trout, *Toxicological Sciences*, 57:217-228.

Whitlock, JP, Jr. 1995. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39: 103-25.

## LAMPIRAN

## LAMPIRAN

## Lampiran 1. Dokumentasi Penelitian

Tikus *Sprague Dawley*

Corn oil

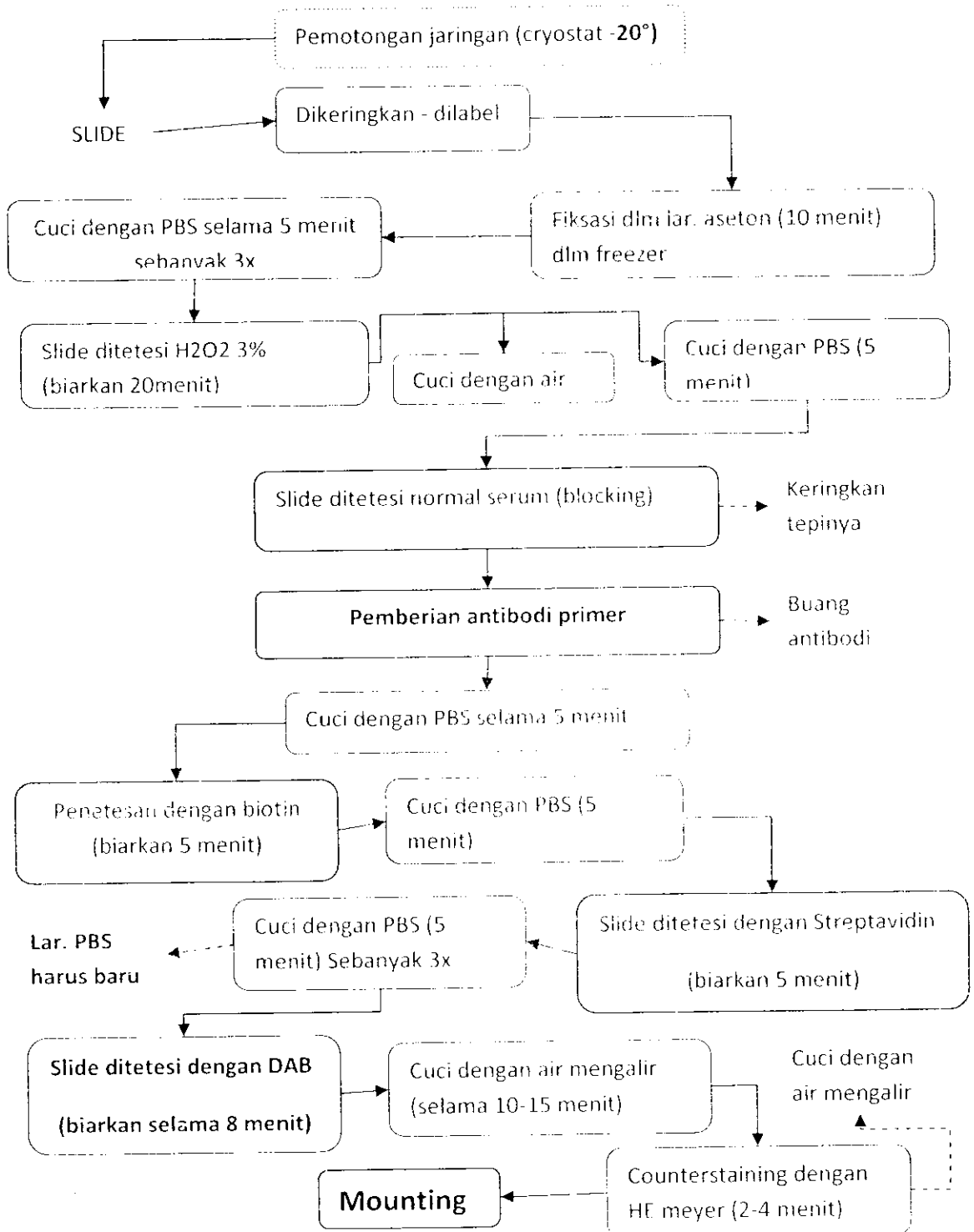


Proses suspensi ekstrak

Ekstrak rimpang  
temu putih  
300 mg/kgBB  
+ CMC NA 0,5%Larutan DMBA  
20 mg/kgBB  
dalam  
corn oil

Proses Penyondean



Lampiran 2. Skema prosedur imunohistokimia dengan *frozen section*

## Lampiran 3. Hasil penghitungan ekspresi enzim CYP1A1

## PERSENTASE EKSPRESI ENZIM CYP1A1

K. P. (t)	UL.(n)	LAPANG PANDANG									MEAN % PER TIKUS	MEAN % PER PERLAKUAN
		1			2			3				
		+	-	%	+	-	%	+	-	%		
1	1	106	33	76.2590	96	19	83.4783	75	31	70.7547	76.8307	73.1446
	2	89	23	79.4643	79	28	73.8318	82	23	78.0952	77.1304	
	3	84	19	81.5534	90	23	79.6460	58	43	57.4257	72.8751	
	4	77	49	61.1111	94	46	67.1429	103	48	68.2119	65.4886	
	5	76	26	74.5098	84	30	73.6842	90	35	72.0000	73.3980	
2	1	127	90	58.5253	111	112	49.7758	119	104	53.3632	53.8881	47.2116
	2	145	72	66.8203	86	56	60.5634	75	60	55.5556	60.9797	
	3	27	75	26.4706	24	79	23.3010	76	24	76.0000	41.9239	
	4	54	51	51.4286	12	97	11.0092	59	44	57.2816	39.9064	
	5	47	91	34.0580	52	54	49.0566	50	93	34.9650	39.3599	
3	1	69	134	33.9901	89	63	58.5526	126	86	59.4340	50.6589	28.8190
	2	12	93	11.4286	36	73	33.0275	9	108	7.6923	17.3828	
	3	26	83	23.8532	58	78	42.6471	23	86	21.1009	29.2004	
	4	36	75	32.4324	16	96	14.2857	14	97	12.6126	19.7769	
	5	19	85	18.2692	8	103	7.2072	63	50	55.7522	27.0762	
4	1	98	76	56.3218	89	40	68.9922	65	40	61.9048	62.4063	62.3227
	2	102	23	81.6000	73	35	67.5926	68	34	66.6667	71.9531	
	3	67	45	59.8214	96	17	84.8558	61	42	59.2233	68.0002	
	4	58	52	52.7273	57	48	54.2857	74	28	72.5490	59.8540	
	5	62	43	59.0476	29	86	25.2174	78	44	63.9344	49.3998	

#### Lampiran 4. Tabel hasil analisa statistik

Tabel hasil rata-rata ekspresi CYP1A1 menggunakan analisa statistik *Kolmogorov-Smirnov*

##### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ekspresi_Enzim_CYP1A1
N		20
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	52.8745
	Std. Deviation	19.20871
Most Extreme Differences	Absolute	.142
	Positive	.103
	Negative	-.142
Kolmogorov-Smirnov Z		.634
Asymp. Sig. (2-tailed)		.816

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Tabel hasil rata-rata ekspresi CYP 1A1 menggunakan analisa statistik *Anova* satu arah

##### ANOVA

Ekspresi Enzim\_CYP1A1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5554.385	3	1851.462	20.344	.000
Within Groups	1456.128	16	91.008		
Total	7010.513	19			

Tabel hasil rata-rata ekspresi CYP1A1 tiap kelompok perlakuan menggunakan sesudah *hoc test* Duncan

### Ekspresi Enzim CYP1A1

Duncan<sup>a</sup>

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Ekstrak <i>C. zedoaria</i> sebelum 2 minggu	5	28.8190		
Ekstrak <i>C. zedoaria</i> sesudah DMBA terakhir	5		47.2116	
Ekstrak <i>C. zedoaria</i> sesudah 3 minggu	5			62.3227
Kontrol DMBA 20 mg/kg BB	5			75.1446
Sig.		1.000	1.000	.092

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.