

RINGKASAN

Pengaruh Ekstrak Etanol Tumbuhan *Cayratia Trifolia L* (Domin) Terhadap Penurunan Ekspresi *Matrixmetalloproteinase - 9* (MMP - 9) Dan *Vascular Endothelial Growth Factor - A* (VEGF -A) Pada Tikus Putih Model Kanker Payudara

Penelitian Eksperimental Laboratorium

Angka kejadian kanker setiap tahun mengalami peningkatan. Berdasarkan laporan, kanker payudara menduduki peringkat paling tinggi. Saat ini metode yang digunakan untuk menanggulangi kanker adalah menggunakan pembedahan, pemberian radioterapi, dan kemoterapi. Namun, metode tersebut belum memberikan hasil yang memuaskan malah sering kali memberikan efek samping yang sangat merugikan bagi penderita. Oleh karena itu, perlu dipikirkan cara penanggulangan dengan memberikan bahan obat yang dapat membunuh sel kanker dan memberikan efek samping sekecil mungkin. Salah satu upaya untuk menanggulangi kanker adalah dengan memanfaatkan jenis tanaman yang berkasiat obat sebagai contoh tanaman galing (*Cayratia trifolia*). Tanaman ini mengandung bahan beberapa kimia diantaranya stilbenes (seperti: piceid, resveratrol, viniferin, dan ampelopsin), kaempferol, dan quercetin (Kumar, 2011). Beberapa peneliti melaporkan bahwa kaempferol merupakan bahan kimia yang digunakan sebagai anti angiogenesis pada terapi kanker ovarium (Luo, 2009).

Untuk mengetahui progresivitas pada sel kanker yaitu dengan melihat ekspresi dari *Matrixmetalloproteinase - 9* (MMP- 9) dan *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), apabila MMP - 9 dan VEGF meningkat maka angiogenesis pada sel kanker juga meningkat. Untuk menurunkan ekspresi dari *Matrixmetalloproteinase - 9* (MMP- 9) dan *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) pada sel kanker bisa dilakukan dengan pemberian suatu senyawa anti angiogenesis seperti stilbenes (seperti: piceid, resveratrol, viniferin, dan ampelopsin), kaempferol, quercetin (Kumar, 2011). Beberapa peneliti melaporkan bahwa kaempferol merupakan bahan kimia yang digunakan sebagai anti angiogenesis pada terapi kanker ovarium (Luo, 2009). Senyawa kimia tersebut terkandung dalam tumbuhan *Cayratia trifolia L* (Domin), sebagai bahan uji untuk membuktikan penurunan angiogenesis pada tikus putih model kanker payudara khususnya penurunan terhadap ekspresi dari *Matrixmetalloproteinase - 9* (MMP- 9) dan *Vascular endothelial growth factor* (VEGF).

Pada penelitian ini peneliti menggunakan tiga kelompok hewan coba (*Rattus Sprague dawley*), yaitu kelompok I (hewan coba normal sebanyak 5 ekor/K0), kelompok II (hewan coba yang mengalami kanker payudara dan diberi CMC secara oral sebanyak 9 ekor/KI), dan kelompok III (hewan coba yang mengalami kanker payudara dan diberi ekstrak *Cayratia trifolia* secara oral 300 mg/kgBB sebanyak 9 ekor/KP). Adapun bahan yang digunakan untuk menginduksi terjadinya kanker payudara adalah DMBA 20mg/kgBB yang dilarutkan dalam 1 ml minyak jagung yang diberikan secara gastrik sonde sebanyak 2 kali seminggu selama 5 minggu, kemudian ditunggu selama 10 minggu sampai timbul tumor payudara. Dari hasil induksi DMBA hewan coba yang mengalami kanker payudara sebanyak 18 ekor. Hewan coba yang mengalami kanker payudara tersebut kemudian digunakan sebagai sampel. Sedangkan lama pemberian ekstrak *Cayratia trifolia* adalah empat minggu secara oral.

Adapun hasil yang diperoleh K0 (normal) 5 ekor, Kel II /KI (hewan coba yang mengalami kanker payudara dan diberi CMC) mengalami kematian tiga ekor, sedangkan kelompok KP (hewan coba yang mengalami kanker payudara dan diberi ekstrak *Cayratia trifolia*) mengalami kematian satu ekor.

Berdasarkan uji statistik Anova diperoleh hasil dari sel kanker payudara yang mengekspresikan MMP-9 antara kelompok K0 ($X=0,0000$; $SD=0,0000$) dengan KI ($X=22,5167$; $SD=6,03702$) menunjukkan suatu perbedaan yang signifikan ($p<0,05$). Hal ini terjadi karena DMBA (7,12-Dimethylbenz (a) anthracene/ $C_{20}H_{16}$) adalah bahan karsinogen kuat dan enzim yang berperan dalam metabolisme DMBA adalah *cytochrome P450 1B1 (CYP1B1)* dan *microsomal epoxide hydrolase (EPHX1)*, DMBA dirubah menjadi bentuk aktifnya, *DMBA-3,4-dihydrodiol-1,2-epoxide (DMBA-DE)*. Bahan inilah yang akan berikatan kovalen dengan DNA (*DNA adduct*) dan memicu proses terjadinya kanker. CYP1B1 yang berperan dalam metabolisme DMBA, ternyata juga diekspresi pada organ di luar hati, seperti kelenjar mamma. Makrofag mensekresikan IFN- γ dan menginduksi aktivitas CTL dan NK sel, sehingga CTL/NK sel yang diaktifkan oleh makrofag akan merusak sel kanker, namun sel kanker berupaya melindungi diri dan melepaskan MAF (*Makrofag Activating Factor*) kemudian makrofag tersebut diinduksi menjadi TAM (*Tumor Associated Makrofag*). TAM inilah yang kemudian tidak menghasilkan IFN- γ sehingga NK sel dan CTL tidak aktif, dan apabila CTL dan NK sel tidak aktif maka sel tumor tidak diserang oleh NK sel dan CTL, selanjutnya sel kanker melepaskan MMP-9 yang bertujuan untuk merusak membrane basalis sehingga sel kanker menembus membrane basalis sehingga terjadi peningkatan ekspresi MMP-9 dan sel kanker melakukan proliferasi menjadi massa kanker sehingga terjadi metastasis pada sel kanker.

Setelah pemberian perlakuan (KP), ekspresi MMP-9 antara kelompok K0 ($X=0,0000$; $SD=0,0000$) dengan kelompok KP ($X=2,2500$; $SD=1,29505$) juga

menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), di mana pada kelompok hewan coba perlakuan (yang mendapat ekstrak tanaman *Cayratia trifolia*), ekspresi MMP-9 masih lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok hewan coba normal. Sedangkan uji beda dari ekspresi MMP-9 antara kelompok KI ($X=22,5167$; $SD=6,03702$) dengan kelompok KP ($X=2,2500$; $SD=1,29505$) menunjukkan suatu perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tanaman *Cayratia trifolia* L (Domin) dalam waktu 4 minggu sudah mampu merusak sel abnormal namun belum secara tuntas. Hal ini dikarenakan sel yang mengekspresi MMP-9 pada kelompok perlakuan masih lebih tinggi dari pada kelompok normal. Tumbuhan *Cayratia trifolia* L (Domin) mengandung senyawa aktif *Resveratrol*, *Delphinidin / Malvidin* dan *Quercetin* kandungan senyawa kimia ini memiliki efek imunomodulator, yang berpotensi menghambat angiopoitin dan FGF serta angiogenesis menurun, neovaskularisasi menurun sehingga metastasis pada sel kanker dapat dihambat (Gao *et al.*, 2003 ; Vetvicka *et al.*, 2007).

Berdasarkan uji statistik Anova diperoleh hasil dari sel kanker payudara yang mengekspresikan VEGF-A antara kelompok K0 ($X=0,0000$; $SD=0,0000$) dengan KI ($X=30,5333$; $SD=16,65193$) menunjukkan suatu perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Hal ini terjadi karena DMBA (7,12-Dimethylbenz (a) anthracene/ $C_{20}H_{16}$ adalah bahan karsinogen kuat dan enzim yang berperan dalam metabolisme DMBA adalah *cytochrome P450 1B1 (CYP1B1)* dan *microsomal epoxide hydrolase (EPHX1)*, DMBA dirubah menjadi bentuk aktifnya, *DMBA-3,4-dihydrodiol-1,2-epoxide (DMBA-DE)*. Bahan inilah yang akan berikatan kovalen dengan DNA (*DNA adduct*) dan memicu proses terjadinya kanker. CYP1B1 yang berperan dalam metabolisme DMBA, ternyata juga diekspresi pada organ di luar hati, seperti kelenjar mamma. Makrofag mensekresikan $IFN-\gamma$ dan menginduksi aktivitas CTL dan NK sel, sehingga CTL/NK sel yang diaktifkan oleh makrofag akan merusak sel kanker, namun sel kanker berupaya melindungi diri dan melepaskan MAF kemudian makrofag tersebut diinduksi menjadi TAM. TAM inilah yang kemudian tidak menghasilkan $IFN-\gamma$ sehingga NK sel dan CTL tidak aktif, dan apabila CTL dan NK sel tidak aktif maka sel tumor tidak diserang oleh NK sel dan CTL, selanjutnya sel tumor melakukan proliferasi menjadi massa tumor dan sel tumor tersebut membutuhkan oksigen dan nutrisi sehingga sel kanker tersebut melepaskan VEGF untuk proses angiogenesis / vaskularisasi sehingga terjadi peningkatan ekspresi VEGF. Namun antara kelompok K0 ($X=0,0000$; $SD=0,0000$) dengan kelompok KP ($X=5,8750$; $SD = 1,89567$) juga menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), di mana pada kelompok hewan coba perlakuan (yang mendapat ekstrak tanaman *Cayratia trifolia*), ekspresi VEGF masih lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok hewan coba normal. Sedangkan sel yang mengekspresikan VEGF antara kelompok KI ($X=30,5333$; $SD=16,65193$) dengan kelompok KP ($X=5,8750$; $SD=1,89567$) menunjukkan suatu

perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tanaman *Cayratia trifolia* dalam waktu 4 minggu sudah mampu merusak sel abnormal namun belum secara tuntas. Hal ini dikarenakan sel yang mengekspresi VEGF-A pada kelompok perlakuan (KP) lebih rendah dari pada kelompok control positif (K1). Tumbuhan *Cayratia trifolia* L (Domin) mengandung senyawa aktif *Resveratrol*, *Delphinidin / Malvidin* dan *Quercetin* kandungan senyawa kimia ini memiliki efek imunomodulator, yang berpotensi menghambat angiopoitin dan FGF serta angiogenesis menurun, neovaskularisasi menurun sehingga metastasis pada sel kanker dapat dihambat (Gao *et al.*, 2003 ; Vetvicka *et al.*, 2007).

Berdasarkan hasil penelitian ini nampak dengan jelas ditunjukkan bahwa pada hewan coba yang tidak mendapatkan perlakuan, jumlah sel pengeksresi VEGF sangat tinggi yaitu lebih besar dari pada hewan coba yang mendapat perlakuan ekstrak tanaman *Cayratia trifolia* L. Hal ini dapat dilihat dari hasil yang menunjukkan bahwa KI (kelompok hewan coba yang mengalami kanker payudara tetapi tidak diberi ekstrak tanaman *Cayratia trifolia*) mengekspresi VEGF ($X=30,5333$; $SD=16,65193$) dan KP (kelompok hewan coba yang mengalami kanker payudara yang diberi ekstrak tanaman *Cayratia trifolia*) mengekspresi VEGF ($X=5,8750$; $SD=1,89567$).

Pada hasil statistik uji korelasi antara jumlah sel yang mengekspresikan MMP-9 dengan jumlah sel yang mengekspresikan VEGF-A menunjukkan hubungan yang kuat dan bermakna antara jumlah sel yang mengekspresikan MMP-9 dengan jumlah sel yang mengekspresikan VEGF-A ($r = 0,917$) dengan $p < 0,01$ (analisis uji korelasi pada lampiran 6B). Hal ini menunjukkan bahwa semakin menurun jumlah sel yang mengekspresikan MMP-9 maka jumlah sel yang mengekspresikan VEGF juga semakin menurun dan atau sebaliknya.

SUMMARY

Effect of Ethanol Extracts Plant *Cayratia trifolia* L (Domin) To Decrease of Expression *Matrixmetalloproteinase - 9* (MMP - 9) And *Vascular Endothelial Growth Factor - A* (VEGF - A) In White Rat Breast Cancer Models

Experimental Research Laboratory

The incidence of cancer every year seems to have increased. Based on the report, breast cancer ranks the highest. Nowadays the method that used to combat cancer are using surgery, radiotherapy, and chemotherapy. However, these methods do not provide satisfactory results even often give very harmful side effects for the patient. Therefore, it needed to think about how to provide drug substance that can kill cancer cells and has side effects as small as possible. One attempt to overcome cancer is to utilize medicinal plant species for example galing (*Cayratia trifolia*). This plant contains chemical ingredients, some of which stilbenes (such as: piceid, resveratrol, viniferin, and ampelopsin), kaempferol, and quercetin (Kumar, 2011). Some researchers reported that kaempferol is a chemical used as an anti-angiogenesis in ovarian cancer therapy (Luo, 2009).

To know angiogenesis in cancer cells by looking at the expression of Matrixmetalloproteinase - 9 (MMP-9) and Vascular endothelial growth factor (VEGF), when MMP - 9 and VEGF increases, angiogenesis in cancer cells also decrease. To decrease the expression of Matrixmetalloproteinase - 9 (MMP-9) and Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cancer cells can be performed by administering an anti-angiogenic compounds such as stilbenes (such as: piceid, resveratrol, viniferin, and ampelopsin), kaempferol, quercetin (Kumar, 2011). Some researchers report that kaempferol is a chemical used as an anti-angiogenesis in the treatment of ovarian cancer (Luo, 2009). The chemical compounds contained in plant *Cayratia trifolia* L (Domin), as a test to prove a decrease angiogenesis in mice models of breast cancer in particular a decrease in the expression of Matrixmetalloproteinase - 9 (MMP-9) and Vascular endothelial growth factor (VEGF).

This study researchers used three groups of experimental animals (*Rattus Sprague Dawley*). Group I (5 normal rats /K0), group II (9 rats who have breast cancer and given orally CMC/KI), and group III (9 rats who have breast cancer and given the extract of *Cayratia trifolia* orally 300 mg/kg body weight/ KP). The materials used to induce breast cancer is DMBA 20 mg/kg body weight, dissolved in 1 ml of corn oil, given by sonde gatrik 2 times a week for 5 weeks, and then wait for 10 weeks to arise breast cancer. From the results of DMBA induced, experimental

animals who have breast cancer as much as 18 rats. Experimental animals who have breast cancer are then used as a sample. *Cayratia trifolia* extract was given orally for four weeks.

The results obtained K0 (normal) 5 rats, group II/KI (rats who have breast cancer and given orally CMC) 3 rats died, while the KP group (rats who have breast cancer and given the extract of *Cayratia trifolia*) 1 rats died.

Based on statistical tests Anova result of breast cancer cells that express MMP-9 between the groups K0 ($X = 0.0000$; $SD = 0.0000$) with KI ($X = 22.5167$; $SD = 6.03702$) showed a difference significantly ($p < 0.05$). This happens because of DMBA (7,12-Dimethylbenz (a) anthracene / $C_{20}H_{16}$) is a powerful carcinogen materials and enzymes involved in the metabolism of DMBA is cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) and microsomal epoxide hydrolase (EPHX1), DMBA is converted into its active form, DMBA -3,4-dihydrodiol-1,2-epoxide (DMBA-DE). This material will bind covalently to DNA (DNA adducts) and trigger the cancer process. CYP1B1 that play a role in the metabolism of DMBA, was also expressed in the organ outside liver, such as mamma gland. Macrophages secrete $IFN-\gamma$ and induces CTL and NK cell activity, thus CTL / NK cells were activated by macrophages will destroy cancer cells, but cancer cells seek to protect themselves and release MAF (Macrophage Activating Factor) then the macrophages induced into TAM (Tumor Associated Macrophages). TAM is then not produce $IFN-\gamma$ so that NK cells and CTL is off, and when CTL and NK cells are not activated, the tumor cells are not attacked by NK cells and CTL, then the cancer cells release MMP -9 that aim to undermine the basement membrane so that the cancer cells to penetrate the basement membrane resulting in increased expression of MMP-9 and do proliferation of cancer cells become cancerous masses that occur in cancer cell metastasis.

After giving treatment (KP), the expression of MMP-9 between the groups K0 ($X = 0.0000$; $SD = 0.0000$) with the KP group ($X = 2.2500$; $SD = 1.29505$) also showed a significant difference ($p < 0.05$), in which the experimental animals treated group (who received the plant extract *Cayratia trifolia*), the expression of MMP-9 is still higher when compared with the normal group of experimental animals. While the different test of expression of MMP-9 between the KI ($X = 22.5167$; $SD = 6.03702$) with the KP group ($X = 2.2500$; $SD = 1.29505$) showed a significant difference ($p < 0, 05$). It shows that the administration of the plant extract *Cayratia trifolia* L (Domin) within 4 weeks has been able to damage the abnormal cells but not yet completely. This is because cells express MMP-9 in the treatment group was higher than in the normal group. Plant *Cayratia trifolia* L (Domin) containing the active compound Resveratrol, delphinidin / malvidin and quercetin content of these chemical compounds have immunomodulatory effects, which could potentially hamper

angiopoitin and FGF and decreased angiogenesis, neovascularization decreased so that metastatic cancer cells can be inhibited (Gao et al., 2003; Vetvicka et al., 2007).

Based on statistical tests Anova result of breast cancer cells that express VEGF-A between group K0 ($X = 0.0000$; $SD = 0.0000$) with KI ($X = 30.5333$; $SD = 16.65193$) showed a difference significantly ($p < 0.05$). This happens because of DMBA (7,12-Dimethylbenz (a) anthracene / $C_{20}H_{16}$) is a powerful carcinogen materials and enzymes involved in the metabolism of DMBA is cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) and microsomal epoxide hydrolase (EPHX1), DMBA is converted into its active form, DMBA -3,4-dihydrodiol-1,2-epoxide (DMBA-DE). This material will bind covalently to DNA (DNA adducts) and trigger the cancer process. CYP1B1 that play a role in the metabolism of DMBA, was also expressed in the organ outside liver, such as mamma gland. Macrophages secrete $IFN-\gamma$ and induces CTL and NK cell activity, thus CTL / NK cells were activated by macrophages will destroy cancer cells, but cancer cells seek to protect themselves and releasing the MAF then macrophages induced into TAM. TAM is then not produce $IFN-\gamma$ so that NK cells and CTL is off, and when CTL and NK cells are not activated then the tumor cells are not attacked by NK cells and CTL, then do the proliferation of tumor cells into the tumor mass and the tumor cells need oxygen and nutrients so that the cancer cells release VEGF for angiogenesis process / vascularization resulting in increased expression of VEGF. But between batches K0 ($X = 0.0000$; $SD = 0.0000$) with the KP group ($X = 5.8750$; $SD = 1.89567$) also showed a significant difference ($p < 0.05$), in which the group treatment of experimental animals (which received the plant extract *Cayratia trifolia*), VEGF expression was higher when compared with the normal group of experimental animals. Whereas cells expressing VEGF between the groups KI ($X = 30.5333$; $SD = 16.65193$) with the KP group ($X = 5.8750$; $SD = 1.89567$) showed a significant difference ($p < 0.05$). It shows that the administration of the plant extract *Cayratia trifolia* within 4 weeks has been able to damage the abnormal cells but not yet completely. This is because the cells expressing VEGF-A in the treatment group (KP) is lower than the positive control group (K1). Plant *Cayratia trifolia* L (Domin) containing the active compound Resveratrol, delphinidin / malvidin and quercetin content of these chemical compounds have immunomodulatory effects, which could potentially hamper angiopoitin and FGF and decreased angiogenesis, neovascularization decreased so that metastatic cancer cells can be inhibited (Gao et al., 2003; Vetvicka et al., 2007).

Based on these results appears clearly shown that in animals that did not receive treatment, the cell number is as high as VEGF pengekspresi greater than in animals that received treatment plant extracts *Cayratia trifolia* L. It can be seen from the results indicate that the KI (groups of experimental animals who have breast cancer but were not given the plant extract *Cayratia trifolia*) expressing VEGF ($X =$

30.5333; SD = 16.65193) and KP (groups of experimental animals who have breast cancer are given the plant extract *Cayratia trifolia*) expressing VEGF ($X = 5.8750$; SD = 1.89567).

On the results of the test statistic correlation between the number of cells that express MMP-9 with the number of cells that express VEGF-A showed a strong and significant relationship between the number of cells that express MMP-9 with the number of cells that express VEGF-A ($r = 0.917$) with $p < 0.01$ (analysis of the correlation test in Annex 6B). This suggests that the declining number of cells expressing MMP-9, the number of cells that express VEGF also decreased and vice versa.