

Penghambatan karsinogenesis kanker payudara tikus terinduksi DMBA pada fase post inisiasi oleh ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* (Lour), Merr

Suppression of DMBA-induced carcinogenesis of breast cancer in post initiation stage by ethanolic extract of *Gynura procumbens* (Lour), Merr leaves

Edy Meiyanto^{1*)}, Sri Tasminatun²⁾, Sri Susilowati³⁾, Retno Murwanti¹⁾ dan Sugiyanto¹⁾

¹⁾ CCRC-Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

²⁾ Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

³⁾ Universitas Wahid Hasyim, Semarang

Abstrak

Tanaman *Gynura procumbens*, (Lour) Merr atau sambung nyawa telah terbukti mampu mengurangi insidensi tumor paru pada mencit dan mengurangi insidensi tumor payudara tikus, serta menghambat angiogenesis. Penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi ekstrak etanolik daun *G. procumbens* dalam menghambat perkembangan tumor payudara akibat pemaparan DMBA pada tahap post inisiasi. Tikus Sprague Dawley (SD) digunakan pada penelitian ini yang digabagi ke dalam beberapa kelompok. Senyawa DMBA digunakan untuk induksi terjadinya tumor payudara yang diberikan seminggu dua kali selama lima minggu pada tikus yang berumur 50 hari. Ekstrak etanolik *G. procumbens* dengan peringkat 2 dosis, yakni 250, 750 mg/kgBB diberikan mulai seminggu (post inisiasi I) dan enam minggu (post inisiasi II) setelah pemaparan DMBA setiap hari selama satu bulan. Timbulnya tumor diamati dengan palpasi setiap minggu hingga 16 minggu setelah pemberian DMBA terakhir. Hasilnya menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanolik *G. procumbens* pada konsentrai 250, 750 mg/kgBB pada post inisiasi I tidak mampu menurunkan insidensi tumor payudara tetapi mampu menurunkan jumlah nodul tumor per tikus. Pada perlakuan post inisiasi II, ekstrak tersebut tidak memberi efek penghambatan, baik insidensi maupun jumlah nodul. Secara keseluruhan dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanolik *G. procumbens* dengan dosis 250 mg/kgBB yang diberikan pada tahap awal perkembangan tumor (post inisiasi I) dapat memberikan efek penghambatan terhadap karsinogenesis kanker payudara.

Kata kunci: Penghambatan karsinogenesis *G. procumbens*, kanker payudara, post inisiasi

Abstract

Gynura procumbens (Lour) Merr., has been shown to suppress lung cancer development in mice and breast cancer development in rat when the extract was given at initiation stage. The aim of this research is to examine the potential of ethanolic extract of *G. procumbens* to suppress DMBA-induced breast cancer development at early development (post initiation I) and late development (post initiation II). Sprague Dawley Rats were used in this research and were grouped as indicated treatment. Ethanolic extract of *G. procumbens* was administered into 2 levels of doses, namely 250, 750

mg/kgBW. Tumor development was examined by palpation every week and terminated at week 16th after the end of DMBA treatment. The result showed that extract treatment at the dose of 250, and 750 mg/kgBW at the post initiation I could not reduce tumor incidence but suppressed of tumor multiplicity. However, the treatment at the post initiation II, the extract could not reduce neither incidence nor multiplicity. In conclusion, ethanolic extract of *G. procumbens* performs potential effect to suppress breast cancer development at the dose of 250 mg/kgBW when administered at the early stage of carcinogenesis.

Key words : Carcinogenesis inhibition, *G. procumbens*, breast cancer, post initiation

Pendahuluan

G. procumbens (Lour.) Merr. atau sambung nyawa merupakan tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen antikanker. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanolik daun *G. procumbens* mampu menurunkan insidensi tumor paru pada model mencit yang diinduksi dengan benzo(a)pirena (Sugiyanto *et al.*, 2003) dan mampu menghambat angiogenesis pada model CAM (Jenie *et al.*, 2006). Ekstrak etanolik daun *G. procumbens* juga menunjukkan aktifitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dan menunjukkan efek sinergistik dengan agen kemoterapi doxorubisin pada sel tersebut (Jenie and Meiyanto, 2007). Pada percobaan karsinogenesis kanker payudara tikus yang diinduksi dengan DMBA, ekstrak etanolik daun *G. procumbens* mampu menghambat inisiasi dan menurunkan insidensi tumor (Meiyanto *et al.*, 2007). Namun demikian penelitian-penelitian tersebut belum menunjukkan kemampuan ekstrak tersebut dalam menghambat karsinogenesis *in vivo* pada tahap post inisiasi (promosi dan progresi).

Tanaman *G. procumbens* (Lour.) Merr. memiliki bermacam-macam kandungan kimia diantaranya flavonoid, saponin, alkaloid, tanin, minyak atsiri, (Sugiyanto *et al.*, 2003) yang kemungkinan besar mempunyai efek anti-karsinogenesis dan bersifat sitotoksik terhadap sel kanker payudara. Istighfari and Meiyanto, 2007 melaporkan bahwa fraksi etil asetat, dari ekstrak etanolik daun *G. procumbens* yang banyak mengandung flavonoid memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D yang lebih kuat dari pada ekstrak etanolik tersebut. Fraksi tersebut juga mampu menurunkan proliferasi dan memacu apoptosis dengan menurunkan ekspresi Bcl2 yang diduga melalui penghambatan signal MAPK.

Flavonoid merupakan senyawa fenolik alam (seringkali dalam formasi polifenol) yang memiliki sifat antioksidan (Zai *et al.*, 1998) dan berpotensi sebagai penghambat pertumbuhan sel kanker (Rana *et al.*, 2005). Beberapa jenis flavonoid, misalnya genistein dan quersetin, mampu menghambat aktivitas protein kinase (Murkies *et al.*, 1998) dengan menduduki ATP binding site protein kinase sehingga menurunkan aktivitas kinasenya. Banyak jenis Protein kinase berperan penting dalam signal pertumbuhan yang memacu *cell cycle progression* pada sel-sel kanker (Hanahan and Weinberg, 2000), termasuk pada karsinogenesis tahap promosi dan progresi (Nooble *et al.*, 2004). Beberapa protein kinase juga berperan penting pada jalur antiapoptosis (Cory and Adams, 2002) dan angiogenesis (Kerbel and Folkman, 2002). Dengan demikian senyawa golongan flavonoid memiliki potensi dalam menghambat perkembangan tumor, baik pada tahap promosi maupun progresi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek penghambatan ekstrak etanolik daun *G. procumbens* terhadap perkembangan tumor payudara pada tahap lanjut.

Metodologi

Bahan uji karsinogenesis

Daun tanaman *Gynura procumbens*, (Lour) Merr yang diperoleh dari daerah Ngaglik Sleman Yogyakarta dikeringkan pada temperatur tidak lebih dari 60 °C kemudian diekstraksi dengan etanol 96 % (p.a.) hingga diperoleh ekstrak etanolik. Untuk pembuatan model kanker payudara digunakan DMBA (7,12-dimetilbenz(a)ntrasen) (Sigma Chem.)

Subyek uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus betina galur Sprague Dawley umur 1 bulan dengan berat badan 40-60 g yang diperoleh dari BPOM Jakarta, yang kemudian dipelihara dalam kandang hewan Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.

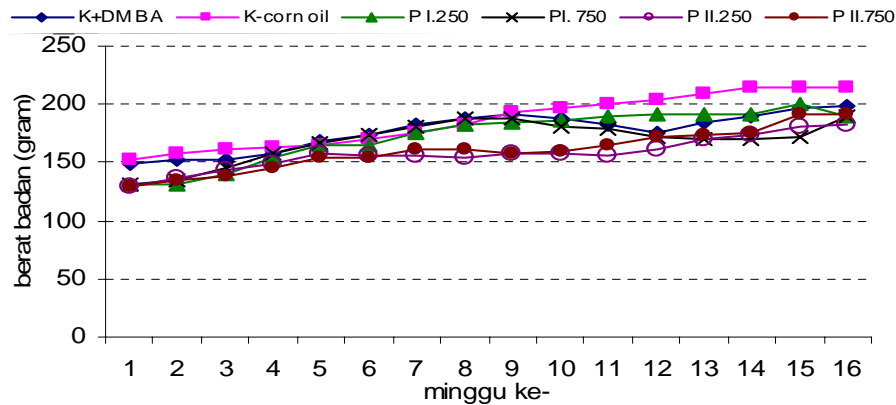
Induksi karsinogenesis dengan DMBA dan perlakuan dengan ekstrak etanol daun *Gynura procumbens*, (Lour) Merr

Enam puluh tikus betina (Female) umur 50 hari dibagi menjadi 6 kelompok secara random. Kelompok I digunakan sebagai kelompok kontrol (K), diberi makanan kontrol saja, yaitu pelet AD2 yang diproduksi oleh PT COMFED Surabaya. Kelompok II (perlakuan DMBA saja), III dan IV (perlakuan pada tahap karsinogenesis awal: post-inisiasi I), dan V dan VI (perlakuan pada tahap karsinogenesis lanjut: post-inisiasi II) diberi DMBA (20 mg/kgBB, i.g. dalam minyak jagung) dan ekstrak. Inisiasi DMBA dilakukan 2 kali seminggu selama 5 minggu. Kelompok III dan IV diberi ekstrak masing-masing dengan dosis 250 mg/KgBB dan 750 mg/KgBB pada minggu ke - 1 setelah DMBA terakhir, hingga akhir pengamatan. Kelompok V dan VI, diberi ekstrak dengan

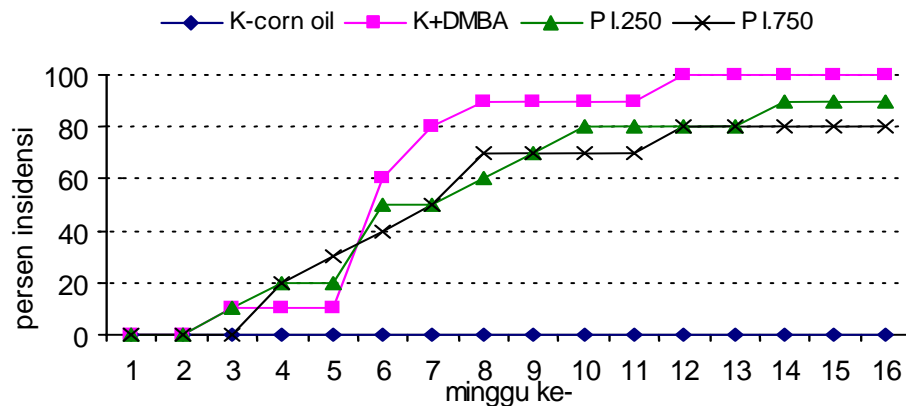
peringkat dosis yang sama dengan post-inisiasi I pada minggu ke - 6 setelah DMBA terakhir hingga akhir pengamatan. Tikus ditimbang setiap minggunya, dan mulai minggu ke-1 setelah pemberian DMBA dilakukan palpasi payudara setiap minggu untuk mengamati perkembangan tumor sampai minggu ke-16 (modifikasi dari Singletary, *et al.*, 1998 dan Kubatka *et al.*, 2002).

Pemeriksaan histopatologi

Pada akhir pengamatan (minggu ke 16), dilakukan nekropsi terhadap hewan uji. Analisis histopatologi dilakukan dengan pengecatan H&E terhadap organ mammae, untuk mengetahui keadaan sitologinya serta tingkat keparahan tumor/kanker yang terjadi. Analisis mikroskopis dilakukan dengan mengamati sifat karsinogenisitas seluler pada jaringan yang diperiksa.



Gambar 1. Perkembangan berat badan tikus kelompok perlakuan pelarut, perlakuan DMBA dan perlakuan ekstrak post I dan II dosis 250 dan 750.



Gambar 2. Pengaruh pemberian ekstrak pada Post I terhadap persen insidensi tumor payudara tikus. Setiap titik merupakan nilai persen insidensi tumor payudara tikus yang dihitung dari n = 10.

Cara analisis data

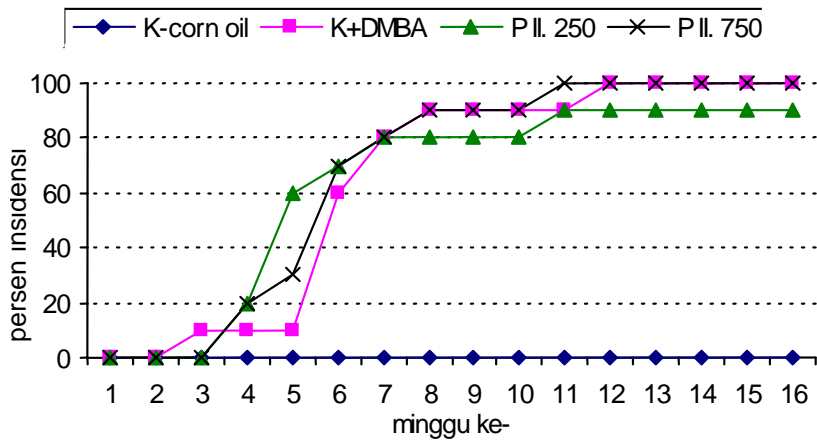
Insidensi tumor dihitung dari jumlah tikus yang terkena tumor pada setiap kelompok. Potensi penghambatan dihitung dari selisih jumlah tikus yang terkena tumor antara perlakuan ekstrak dan perlakuan DMBA dibagi jumlah tikus yang terkena tumor pada perlakuan DMBA kali 100 %.

Tumour multiplicity dihitung dari rata-rata jumlah nodul tumor setiap tikus dalam satu kelompok, selanjutnya keberbedaan antar kelompok dianalisis menggunakan statistik non parametrik Kruskal Wallis dilanjutkan Mann-Whitney test dengan taraf kepercayaan 95 %.

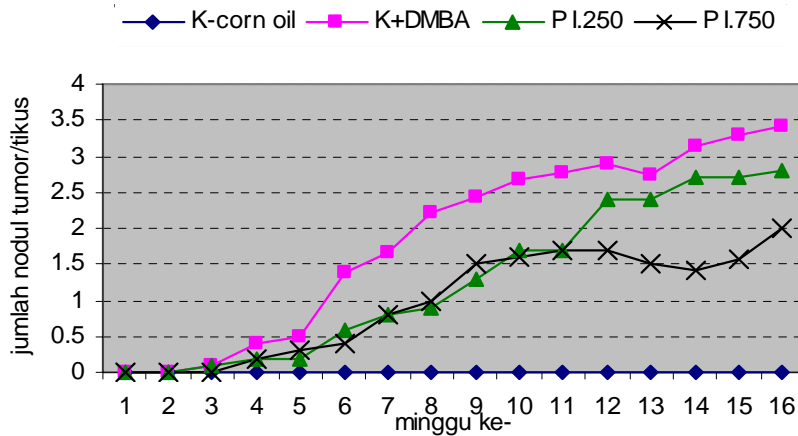
Hasil Dan Pembahasan

Pengaruh pemberian ekstrak terhadap perkembangan berat badan

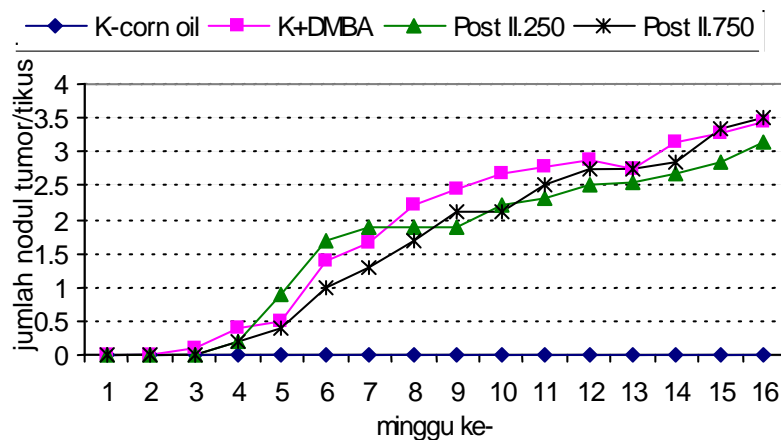
Perkembangan berat badan tikus masing-masing kelompok dapat dilihat pada Gambar 1 yang merupakan hasil penimbangan berat badan setiap minggu. Dari gambar tersebut dapat dilihat bahwa tikus semua kelompok mengalami kenaikan berat badan seiring dengan bertambahnya usia. Kelompok kontrol (K) yang hanya diberi *corn oil* mempunyai rata-rata berat-badan yang lebih besar



Gambar 3. Pengaruh pemberian ekstrak pada Post II terhadap persentase insidensi tumor payudara tikus. Setiap titik merupakan nilai persentase insidensi tumor payudara tikus yang dihitung dari n = 10.



Gambar 4. Pengaruh pemberian ekstrak Post I terhadap *tumour multiplicity*. *Tumour multiplicity* dihitung sebagai rata-rata jumlah nodul tumor tiap tikus dengan n= 10 pada setiap minggu untuk masing-masing kelompok.



Gambar 5. Pengaruh pemberian ekstrak Post II terhadap *tumor multiplicity*. Tumor *multiplicity* dihitung sebagai rata-rata jumlah nodul tumor tiap tikus dengan n= 10 pada setiap minggu untuk masing-masing kelompok.

Tabel I. Rata-rata jumlah nodul / tikus pada minggu ke-16 (akhir pengamatan)

	Perlakuan				
	DMBA	Post I 250	Post I 750	Post II.250	Post II.750
Jumlah nodul *)	3,4 ± 1,81	2,8 ± 1,75	2,0 ± 1,67	3.1 ± 2,03	3.5 ± 1.87

*) rata-rata dari n=10

dibanding kelompok lainnya. *Corn oil* merupakan senyawa inert yang digunakan untuk melarutkan DMBA, tidak mempunyai sifat karsinogenik (Singletary *et al.*,1998).

Pengaruh pemberian ekstrak terhadap insidensi tumor

Hasil penelitian efek antikarsinogenesis ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens*, (Lour) Merr pada kanker payudara tikus Post I dan Post II menunjukkan pengurangan insidensi tumor, tetapi tidak signifikan. Persen insidensi tumor mammae kelompok Post I dosis 250 dan 750 mg/kgBB dapat dilihat pada Gambar 2 dan Post II dosis 250 dan 750 mg/kgBB dapat dilihat pada Gambar 3.

Pada Gambar 2 dan 3 terlihat insidensi kanker mammae kelompok perlakuan DMBA mencapai 100 % pada minggu ke-12, sedangkan Post I dosis 250 mg/kgBB pada minggu yang sama sebesar 80 % hingga akhir pengamatan. Sedangkan Post I dosis 750 mg/kgBB pada minggu ke-12 angka insidensinya 80 % dan di akhir pengamatan menjadi 90 %. Sedangkan kelompok Post II dosis 250 mg/kgBB pada minggu ke-12 mencapai 90 % hingga akhir

pengamatan dan Post II dosis 750 mg/kgBB justru mencapai 100 % pada minggu ke-11. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens*, (Lour) Merr pada kanker payudara tikus yang diinduksi senyawa Dimetil benzo (a) antrazena (DMBA) yang diberikan satu minggu setelah inisiasi DMBA terakhir (Post I) dengan dosis 250 mg/kgBB dan 750 mg/kgBB dan minggu keenam setelah inisiasi DMBA terakhir (Post II) dengan dosis 250 mg/kgBB dapat mengurangi insidensi kanker mammae tetapi tidak signifikan, sedangkan pada Post II dosis 750 mg/kgBB tidak mampu mengurangi insidensinya.

Pengaruh perlakuan ekstrak post inisiasi terhadap jumlah nodul

Pada Gambar 4 dan 5 memperlihatkan rata-rata jumlah nodul tumor tiap tikus kelompok DMBA lebih tinggi dari pada rata-rata jumlah nodul tumor tiap tikus Post I dosis 250 mg/kgBB dan 750 mg/kgBB serta Post II dosis 250 mg/kgBB. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanolik daun

G. procumbens, pada kanker payudara tikus yang diinduksi senyawa Dimetil benzo(a) antrazena (DMBA) yang diberikan satu minggu setelah inisiasi DMBA terakhir (Post I) dengan dosis 250 mg/kgBB dan 750 mg/kgBB dan minggu ke-enam setelah inisiasi DMBA terakhir (Post II) dengan dosis 250 mg/kgBB berkecenderungan menurunkan jumlah nodul tumor mammae, sedangkan pada Post II dosis 750 mg/kgBB tidak mengurangi jumlah nodul tumor (Tabel I).

Pembahasan

Pada percobaan post-inisiasi, pemberian ekstrak juga masih terlihat mengurangi tingkat progresivitas tumor; khususnya pada pemberian post-inisiasi I yaitu dimulai sejak satu minggu setelah inisiasi DMBA yang terakhir. Pada tahap ini terlihat sudah terjadi tumor in situ, namun belum kelihatan progresif dan metastasis (tidak ditemukan anak sebar tumor pada hepar maupun pada paru). Diperkirakan, tumor pada tahap ini telah mengalami kelainan fisiologis berupa tingkat proliferasi yang meningkat dibanding dengan sel normal (perlu penelitian lebih lanjut).

Ekstrak yang diberikan kemungkinan dapat menghambat perkembangan tumor tahap awal melalui modulasi proliferasi sel. Flavonoid yang terkandung dalam ekstrak memungkinkan dapat menghambat pertumbuhan tumor dengan berbagai cara. Hasil ini juga sesuai dengan yang ditunjukkan pada sifat sitotoksiknya terhadap kanker payudara. Flavonoid tersebut kemungkinan bersifat antiestrogenik sehingga dapat menghambat pertumbuhan tumor yang dipacu oleh estrogen. Flavonoid juga mungkin menghambat beberapa protein kinase pada proses signal transduksi ataupun daur sel. Kemungkinan lain adalah menghambat proses angiogenesis sebagaimana yang telah ditunjukkan pada percobaan in vitro menggunakan CAM (Jenie *et al.*, 2006). Penghambatan ini misalnya dengan menekan

ekspresi COX-2 dan VEGF (Kerbel and Folkman, 2002). Untuk itu penelitian lanjutan perlu dilakukan. Berbagai kemungkinan yang telah dipaparkan diatas belum bisa dibuktikan pada penelitian ini dikarenakan berbagai keterbatasan. Oleh karena itu kiranya hasil penelitian ini dapat menjadi acuan dalam melakukan penelitian-penelitian lanjutan untuk menggali potensi dari tanaman obat Indonesia, terutama *G. procumbens* (Lour) Merr.

Sementara itu pemberian ekstrak 6 minggu setelah akhir inisiasi ternyata tidak mampu menurunkan insidensi tumor hingga akhir pengamatan. Hal ini kemungkinan disebabkan karena pada saat itu perkembangan tumor sudah mencapai tingkat progresi yang melibatkan mekanisme karsinogenesis dengan perubahan molekuler yang kompleks. Pada keadaan ini tumor sudah mengalami angiogenesis dan metastasis sehingga tidak dapat diremediasi secara total. Demikian juga pada pengamatan perkembangan jumlah nodul tumor, ekstrak tersebut tidak mampu mengurangi jumlah nodul secara signifikan pada akhir pengamatan. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa dalam ekstrak tersebut masih belum cukup mampu memberikan efek penghambatan terhadap tumor pada fase progresi.

Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanolik daun *G. procumbens* pada dosis 250 mg/kgBB masih cukup poten dalam menghambat pertumbuhan tumor pada post inisiasi I, namun kurang mampu menghambat pertumbuhan tumor setelah memasuki fase progresi.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih diucapkan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian ini melalui program Hibah Bersaing XI.2 2004.

Daftar Pustaka

- Cory S., and Adams M., 2002, The BCL-2 Family: Regulators of the Cellular Life or Death Switch, *Nature Rev.*, 2, 647-656
 Hanahan, D., and Weinberg, R.A., 2000, The Hallmarks of Cancer, *Cell* 100, 57-70

- Jenie, R. I., Meiyanto, E., and Murwanti, R., 2006, Efek antiangiogenik ekstrak etanolik daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) pada membran korio alantois (cam) embrio ayam, *Majalah Farmasi Indonesia*, 17, 50 –55.
- Jenie, R. I., and Meiyanto, E., 2007, Aplikasi ko-kemoterapi ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. pada sel kanker payudara, *Majalah Farmasi Indonesia*, 18, 81-87.
- Kerbel R., and Folkman J., 2002, Clinical Translation of Angiogenesis inhibitor, *Nature Rev.*, 2, 727 - 739.
- Kubatka, P., Ahlersova E., Ahlers I., Bojkova B., Kalicka K., Adamekova E., Markova M., Chamilova, M., and Cermakova, M., 2002, Variability of Mammary Carcinogenesis Induction in Female Sprague-Dawley and Wistar : Han Rats : the Effect of Season and Age, *Physiol. Res.* , 51, 633 - 640.
- Meiyanto, E., Susilowati, S., Tasminatun, S., Murwanti, R., and Sugiyanto, 2007, Efek kemopreventif ekstrak etanolik *Gynura procumbens* (Lour), Merr pada karsinogenesis kanker payudara tikus, *MFI*, 18, 154 – 161.
- Murkies, A. L., Wilcox, G., and Davis, S. R., 1998, Phytoestrogens, *J Clin Endocrinol Metab* 83, 297 - 303.
- Nooble MEM., Endicott JA., and Johnson LN., 2004, Protein Kinase Inhibitors: Insights into Drug Design from Structure (Rev.), *Science*, 303, 1800 - 1805
- Rana P.Singh¹, Puja Agrawal¹, Dongsool Yim^{1, 2}, Chapla Agarwal^{1,3} and Rajesh Agarwal, 2005, Acacetin inhibits cell growth and cell cycle progression, and induces apoptosis in human prostate cancer cells: structure-activity relationship with linarin and linarin acetate, *Carcinogenesis* , 26, 845 - 85.
- Singletery, K., MacDonald, Iovinelli, M., Fisher, C., and Walling, M., 1998, Effect of the beta-diketones diferuloylmethane (curcumin) and dibenzoylmethane on Rat Mammary DNA adducts and Tumor induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthrazene, *Carcinogenesis*, 19, 1039 - 1043
- Sugiyanto, Sudarto, B., Meiyanto, E., Nugroho, A. E., and Jenie U. A., 2003, Aktivitas Antikarsinogenik Senyawa Yang Berasal Dari Tumbuhan, *Majalah Farmasi Indonesia*, 14, 132 - 141
- Zhai. S., Dai, R., Friedman, F., and Vestal, R., 1998, Comparative Inhibition Of Human cytochromes P450 1A1 and 1A2 By Flavonoids, *Drug Metabolism and Disposition*, 26, 989 - 992

* Korespondensi : Dr Edy Meiyanto, M.Si., Apt.
Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada
Sekip Utara Yogyakarta, 55281. Telp. 0274-543120
E-mail: meiyanto_e@ugm.ac.id