

PENGARUH TERAPI PREVENTIF DAN KURATIF KOMBINASI CURCUMIN
dan VITAMIN E DIBANDINGKAN DOXORUBICIN TERHADAP KADAR
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dan GAMBARAN
HISTOPATOLOGI MAMMAE TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL KANKER MAMMAE HASIL INDUKSI
7,12 Dimethylbenz ()antrasen (DMBA)

SKRIPSI

Oleh:
RIZKY SYAFUADI
105130100111018



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2017

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH TERAPI PREVENTIF DAN KURATIF KOMBINASI CURCUMIN
dan VITAMIN E DIBANDINGKAN DOXORUBICIN TERHADAP KADAR
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dan GAMBARAN
HISTOPATOLOGI MAMMAE TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL KANKER MAMMAE HASIL INDUKSI
7,12 Dimethylbenz ()antrasen (DMBA)

Oleh :
RIZKY SYAFUADI
105130100111018

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 11 Desember 2017
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc
NIP. 19580711 199203 2 002

drh. Dyah Ayu O.A.P.,M.Biotech
NIP. 19841026 100812 2 004

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rizky Syafuadi
NIM : 105130100111018
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Terapi Preventif Dan Kuratif Kombinasi Curcumin Dan Vitamin E Dibandingkan Doxorubicin terhadap Kadar Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dan Gambaran Histopatologi Mammae Tikus (*Rattus Norvegicus*) Model Kanker Mammae Hasil Induksi 7,12 Dimetylbenz () Antrasen (DMBA)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 11 Desember 2017
Yang menyatakan,

RIZKY SYAFUADI
NIM. 105130100111018

PENGARUH TERAPI PREVENTIF DAN KURATIF KOMBINASI CURCUMIN
dan VITAMIN E DIBANDINGKAN DOXORUBICIN TERHADAP KADAR
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dan GAMBARAN
HISTOPATOLOGI MAMMAE TIKUS (*Rattus norvegicus*)
MODEL KANKER MAMMAE HASIL INDUKSI
7,12 Dimethylbenz ()antrasen (DMBA)

ABSTRAK

Kanker mammae merupakan kasus kanker yang banyak terjadi pada hewan betina. Zat karsinogen DMBA diketahui mampu menginisiasi timbulnya kanker mammae pada hewan percobaan. Salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk terapi kanker mammae adalah kombinasi curcumin dan vitamin E. Curcumin dan vitamin E dapat berperan sebagai antioksidan, antikanker, dan antiproliferasi. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh kombinasi curcumin dengan vitamin E sebagai tindakan preventif terhadap kadar VEGF pada darah dan gambaran histopatologi mammae. Pada penelitian ini digunakan tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar betina umur 10-12 minggu yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (tidak diinduksi DMBA dan estrogen), kelompok kontrol positif (diinduksi DMBA dan estrogen), kelompok terapi doxorubicin dosis 0,198 mg/kgBB, kelompok terapi preventif dan kelompok terapi kuratif kombinasi curcumin dosis 108 mg/kgBB dengan vitamin E dosis 300 IU/ekor. DMBA diberikan 2 hari sekali dengan dosis 5 mg/kg BB, sebanyak 10 kali. Estrogen diberikan dengan dosis 20.000 IU/kgBB sebanyak dua kali dalam seminggu. Kadar VEGF dalam darah diukur dengan metode ELISA dan histopatologi mammae diamati dengan metode pewarnaan Hematoksin Eosin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi preventif secara signifikan ($p < 0,05$) mampu menurunkan kadar VEGF sampai 46 % dibandingkan kelompok kontrol positif dan gambaran histopatologi mammae menunjukkan perbaikan pada alveoli, duktus dan stroma mammae. Kesimpulan dari penelitian ini adalah terapi preventif kombinasi curcumin dan vitamin E mengandung antioksidan yang menurunkan kadar VEGF dan mengurangi kerusakan jaringan kelenjar mammae pada hewan model kanker mammae.

Kata kunci : Kanker mamme, DMBA, VEGF, histopatologi kelenjar mammae, Curcumin , Vitamin E.

EFFECT OF PREVENTIVE AND CURRATIVE THERAPY OF CURCUMIN AND VITAMIN E COMPARE WITH DOXORUBICIN TOWARDS VEGF LEVEL AND MAMMARY HISTOPATOLOGY ON RATS (*Rattus norvegicus*) MAMMARY CANCER MODEL INDUCED BY 7.12 Dimethylbenz () anthracene (DMBA)

ABSTRACT

Cancer mammae is a case of cancer that occurs in many females. DMBA is carcinogen substances that able to induce of mammary cancer in experimental animals. One alternative that can be used for cancer mammae is a combination of curcumin and vitamin E. Curcumin and vitamin E can act as antioxidants, anticancer, and antiproliferation. The purpose of this study was to determine the effect of combination of curcumin with vitamin E as a preventive against blood VEGF levels and histopathologic images of rats mammary. This study used mice (*Rattus norvegicus*) female strain Wistar aged 10-12 weeks which was divided into 5 groups ie negative control group (normal rats), positive control group (induced DMBA and estrogen), doxorubicin therapy group dose 0,198 mg/kgBW, preventive therapy group and curative curcumin therapy group dose 108 mg/kgBW with vitamin E dose 300 IU /rat. DMBA was induce every 2 days with a dose of 5 mg / kg BW and Estrogen at a dose of 20,000 IU / kgBW twice a week. VEGF levels in blood were measured by ELISA method and histopathology of mammary was observed by the staining method of Hematoxylin Eosin. The results showed that preventive therapy ($p < 0.05$) was able to reduce significantly VEGF levels up to 46% compared to the positive control group and the mammary histopathology showed improvement in alveoli, ductus and mammary stroma. The conclusion of this research is preventive therapy of curcumin and vitamin E combination containing antioxidant enable to decrease VEGF level and reduce damage of mammary gland network in mammary cancer model.

Keywords: Mammary, DMBA, VEGF, histopathology of mammary glands, Curcumin, Vitamin E.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “PENGARUH TERAPI PREVENTIF DAN KURATIF KOMBINASI CURCUMIN dan VITAMIN E DIBANDINGKAN DOXORUBICIN TERHADAP KADAR Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dan GAMBARAN HISTOPATOLOGI MAMMAE TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL KANKER MAMMAE HASIL INDUKSI 7,12 Dimethylbenz ()antrasen (DMBA)”

Pada penulisan ini penulis tidak lupa mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dra. Anna Roosdiana, M.App, SC selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu dalam penyelesaian skripsi ini.
2. Drh. Dyah Ayu Oktavianie, M. Biotech. selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, kesabaran, fasilitas dan waktu dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Drh. Aulia Firmawati, M.Vet selaku dosen penguji I yang telah bersedia memberikan arahan sehingga skripsi ini menjadi lebih baik.
4. Drh. M. Arfan Lesmana, M.Sc selaku dosen penguji II yang telah bersedia memberikan arahan sehingga skripsi ini menjadi lebih baik.
5. Bapak Drs. T. Supriadi, M.Si, Ibu Suhartatik, Dian Syahfutra A, M. Firdaus Adi W, atas kesabaran, kasih sayang, inspirasi, dukungan serta doa yang tidak pernah putus untuk penulis.
6. Teman-teman seperjuangan tim 2010 yang senantiasa bahu membahu, berjuang, dan memberikan pencerahan.

Penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan skripsi ini dapat memberikan manfaat.

Malang, Desember 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG.....	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan masalah	3
1.4 Tujuan	4
1.5 Manfaat	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kanker Mammae	6
2.1.1 Definisi	6
2.1.2 Etiologi	6
2.1.3 Patomekanisme	7
2.2 7,12-Dimethylbenz () Anthracene (DMBA)	11
2.3 Histologi Kelenjar Mammae	13
2.4 Curcumin	16
2.5 Vitamin E	16
2.6 Hewan Coba Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	17
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	20
3.1 Kerangka Konseptual	20
3.2 Hipotesis Penelitian	22
BAB 4 METODE PENELITIAN	23
4.1 Tempat dan Waktu	23
4.2 Rancangan Penelitian	23
4.3 Variabel Penelitian	25
4.4 Alat dan Bahan	25
4.5 Tahapan Penelitian	26
4.5.1 Penyiapan Hewan Coba	26
4.5.2 Preparasi DMBA.....	26
4.5.3 Induksi DMBA	27
4.5.4 Induksi Estrogen	27
4.5.5 Terapi Curcumin dan Vitamin E.....	27
4.5.6 Terapi Doxorubycine	28

4.5.7	Pengambilan sampel darah hewan coba.....	28
4.5.8	Pengukuran Kadar VEGF.....	28
4.5.9	Pembedahan dan pengambilan organ.....	29
4.5.10	Pembuatan Preparat histopatologi	30
4.5.11	Pewarnaan Hematoxylen Eosin (HE).....	31
4.5.12	Analisis Data	32
BAB 5	HASIL DAN PEMBAHASAN	38
5.1	Pengaruh Terapi Preventif Dan Kuratif Kombinasi Curcumin Dan Vitamin E dibandingkan doxorubicin Pada Hewan Model Kanker Mammae Hasil Induksi DMBA Terhadap Kadar Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Pada Darah Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	38
5.2	Pengaruh Terapi Preventif Dan Kuratif Kombinasi Curcumin Dan Vitamin E dibandingkan doxorubicin Pada Hewan Model Kanker Mammae Hasil Induksi DMBA Terhadap Histopatologi Kelenjar Mammae Pada Hewan Coba Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	42
BAB 6	KESIMPULAN DAN SARAN.....	
6.1	Kesimpulan	51
6.2	Saran.....	51
	DAFTAR PUSTAKA	52
	LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Tabel Rancangan Penelitian	23
5.1. Tabel Peningkatan kadar VEGF	38
9.1. Uji Normalitas Data	63
9.2. Uji Homogenitas Varian.....	64
9.3. Uji Statistik Anova.....	64
9.4. Uji Tukey.....	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Gambaran histologi normal kelenjar mammae menggunakan pewarnaan Hematoxylen Eosin (HE)	14
2.2. Gambaran histopatologi kanker kelenjar mamae menggunakan pewarnaan Hematoxylen Eosin (HE) dengan perbesaran 400x.....	15
2.1. Gambaran histologi kelenjar mammae menggunakan pewarnaan Hematoxylen Eosin (HE)	42
2.2. Gambaran histopatologi kelenjar mamae menggunakan pewarnaan Hematoxylen Eosin (HE) dengan perbesaran 400x.....	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional Penelitian.....	52
2. Timeline Penelitian.	53
3. Perhitungan Dosis DMBA.....	55
4. Perhitungan Estrogen	55
5. Pembuatan DMBA.....	55
6. Pembuatan Curcumin dan Vit E	56
7. Pengambilan Sampel Darah dan Isolasi Serum.....	42
8. Pengukuran Kadar VEGF dengan ELISA.....	43
9. Pembuatan Preparat Histopatologi.....	44

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan	Keterangan
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DMBA	7,12-Dimethylbenz (a) Anthracene)
mg	miligram
kg	kilogram
BB	Berat Badan
KEP	Komisi Etik Penelitian
UPHP	Unit Pengembangan Hewan Percobaan
HE	Hematoxylen Eosin
ERK	Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase
MRI	Magnetic Resonance Imaging
FNAC	Fine Needle Aspiration Cytology
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
mEH	microsomal epoxide hydrolase
dA	deoksiadenosin
dG	deoksiguanosinn
EGFR-2	Epidermal Growth Factor Receptor-2
RTKs	Reseptor Tirosin Kinase
IHK	Imunohistokimia
CIS	Carcinoma in situ
IM	intramuscular
PFA	Paraformaldehid
PBS	Phospate Buffer Saline
DAB	Diamano Benzidine
cm	centimeter
ml	mililiter
NaCl	Natrium Chlorida
kDa	kilo Dalton
mRNA	messenger Riboksinuklei Acid
NS	Normal Salin

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kanker mammae merupakan kasus kanker yang banyak terjadi pada wanita di seluruh dunia dengan angka kejadian yang terus meningkat. Kanker mammae juga merupakan kejadian kanker yang paling sering terjadi pada hewan betina. Kasus kanker mammae dapat terjadi pada anjing, kucing, dan juga kuda, namun kebanyakan kasus lebih sering terjadi pada anjing. Peningkatan angka kejadian kanker mammae didasari oleh pengaruh dari beberapa faktor seperti nutrisi, inbreeding, genetika, hormon, infeksi virus, radiasi, karsinogenesis, lingkungan dan penggunaan obat-obatan yang diberikan pada hewan (Amstrong, 2009 ; Polton, 2009).

Banyak penelitian dilakukan untuk mempelajari kanker mammae. Pembuatan hewan model kanker mammae selama ini dilakukan dengan induksi bahan karsinogen seperti 7,12 dimethylbenz () antrasen (DMBA), benz[a]pyrene (BP), 4-nitroquinoline-1-oxide, dan N-nitroso-N-methylure. Zat-zat tersebut diketahui mampu menginisiasi timbulnya kanker mammae pada hewan percobaan (Cordeiro and Kaliwal, 2011). Senyawa 7,12 dimethylbenz () antrasen (DMBA) merupakan zat yang sering digunakan karena memiliki potensi yang lebih tinggi dan lebih stabil sebagai zat karsinogen untuk pembuatan hewan model kanker.

Berdasarkan histologinya, kelenjar mammae normal tikus dibentuk oleh 15-25 lobus yang setiap lobusnya tersusun atas kelenjar jenis tubulo-alveolar kompleks. Setiap kelenjar mammae terdapat duktus laktiferus atau saluran air susu

yang dilapisi oleh sel epitel (Junqueira, 1998). Terjadinya kanker mammae menyebabkan banyak sel yang mengalami mitosis secara abnormal dan sel-sel epitel akan terlihat mengalami proliferasi berat yang melebar ke arah lumen duktus (Schnitt, 2003). Senyawa DMBA yang diinduksikan akan dimetabolisme di hepar oleh sitokrom P450 CYP1A1 atau CYP1B1 menjadi DMBA 3,4 diol-1,2 epoxida membentuk DNA adduct sekaligus dapat membuat kerusakan pada hepar sebagai tempat metabolisme. DNA adduct akan berpengaruh pada peningkatan jumlah (Reactive oxygen species) ROS sehingga terjadi stres oksidatif (Akrom, 2012). Stres oksidatif terjadi karena kekurangan oksigen akibat ROS sehingga memacu reseptor hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) mensekresi Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) untuk pembentukan pembuluh darah baru atau angiogenesis guna mensuplai nutrisi dan oksigen ke sel kanker sehingga dapat berkembang terus menerus (Tammama, 2012).

Doxorubicin merupakan antibiotik golongan antrasiklin yang banyak digunakan untuk terapi berbagai macam jenis kanker seperti leukemia akut, kanker payudara, kanker tulang dan ovarium (Childs et al., 2002). Senyawa ini diisolasi dari *Streptomyces peucetius* var *caesius* pada tahun 1960-an dan digunakan secara luas (Minotti et al., 2004). Doxorubicin dapat menyebabkan kardiotoxicitas pada penggunaan jangka panjang, hal itu menyebabkan penggunaannya secara klinis menjadi terbatas.

Pencegahan pada kanker mammae umumnya dilakukan dengan menggunakan bahan - bahan herbal. Indonesia memiliki banyak jenis tumbuhan herbal yang dapat dimanfaatkan sebagai pengobatan. Akhir - akhir ini sangat

banyak obat - obat alami yang digunakan untuk pencegahan suatu penyakit kanker. Bahan alam yang diketahui dapat menghambat laju pertumbuhan kanker adalah kunyit, karena adanya kandungan curcumin di dalamnya. Selain itu, vitamin E yang berfungsi sebagai antioksidan juga dapat memperlambat laju pertumbuhan sel kanker. Curcumin merupakan senyawa polifenol dengan aktivitas biologi sebagai antioksidan (Pari, 2008). Curcumin juga memiliki aktivitas antikanker yang berhubungan dengan aktivitasnya sebagai antioksidan dan penangkal radikal bebas. (Sandur et al., 2005).

Berdasarkan latar belakang tersebut penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh terapi preventif kombinasi Curcumin dan Vitamin E terhadap kadar Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dan histopatologi kelenjar mammae tikus (*Rattus norvegicus*) hasil induksi DMBA.

1.2. Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh terapi preventif dan kuratif kombinasi curcumin dan vitamin E serta doxorubicin pada hewan model kanker mammae hasil induksi DMBA terhadap kadar Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pada darah tikus (*Rattus norvegicus*) ?
2. Bagaimana pengaruh terapi preventif dan kuratif kombinasi curcumin dan vitamin E serta doxorubicin pada hewan model kanker mammae hasil induksi DMBA terhadap histopatologi kelenjar mammae pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) ?

1.3. Batasan Masalah

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus novergicus*) strain Wistar berjenis kelamin betina dengan umur 10-12 minggu dan berat badan 150-200 gram yang sedang dalam proses pengajuan laik etik kepada Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (KEP UB).
2. Pembuatan hewan coba kanker mammae dilakukan dengan induksi Multiple Low Dose (MLD) DMBA dengan dosis 5 mg/kgBB yang diberikan melalui injeksi subkutan pada mammae tikus setiap 2 hari sekali sebanyak 10 kali induksi (modifikasi Jalantha et al., 2014), ditambah estrogen 2 kali dalam satu minggu dengan dosis 20.000 IU/kg BB secara intramuscular.
3. Terapi preventif menggunakan kombinasi curcumin dengan dosis 108 mg/kgBB dan vitamin E 300 IU/ekor tikus diberikan secara sonde lambung per oral sebelum induksi DMBA.
4. Terapi kuratif menggunakan kombinasi curcumin dengan dosis 108 mg/kgBB dan vitamin E 300 IU/ekor tikus diberikan secara sonde lambung per oral setelah induksi DMBA.
5. Terapi Doxorubicin diberikan dengan dosis 0,198 mg/kgBB diberikan melalui injeksi subkutan pada mammae tikus setelah induksi DMBA.
6. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah Kadar Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) yang dilihat dengan menggunakan metode ELISA dan histopatologi dari kelenjar mammae dengan pewarnaan Hematoxylen Eosin (HE).

7. Pembacaan preparat histopatologi kelenjar mammae dilakukan dengan mikroskop cahaya (Olympus) perbesaran 400x. Pengamatan meliputi perubahan pada duktus, alveoli, dan stroma kelenjar mammae.

1.4. Tujuan

1. Mengetahui pengaruh terapi preventif dan kuratif kombinasi curcumin dan vitamin E serta obat doxorubicin pada hewan model kanker mammae hasil induksi DMBA terhadap kadar Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pada darah tikus (*Rattus norvegicus*) ?
2. Mengetahui pengaruh terapi preventif dan kuratif kombinasi curcumin dan vitamin E serta obat doxorubicin pada hewan model kanker mammae hasil induksi DMBA terhadap histopatologi kelenjar mammae pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) ?

1.5. Manfaat

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memberi informasi tentang pengaruh terapi preventif dan kuratif kombinasi curcumin dan vitamin E serta doxorubicin pada hewan model kanker mammae hasil induksi DMBA
2. Mengetahui pengaruh terapi preventif dan kuratif kombinasi curcumin dan vitamin E serta doxorubicin pada hewan model kanker mammae hasil induksi DMBA dilihat dari kadar Vascular Endothelial Growth

Factor (VEGF) pada darah dan histopatologi pada kelenjar mammae tikus (*Rattus novergicus*) model kanker mammae.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Mammae

2.1.1 Definisi

Kanker di dunia medis disebut juga dengan istilah neoplasma dan tumor. Neoplasma berasal dari bahasa Yunani *neos* yang berarti baru dan *plasma* yang berarti pembentukan sedangkan tumor berasal dari bahasa Latin *tumere* yang berarti bengkak. Istilah kanker, neoplasma dan tumor sering diartikan sama, walau sebenarnya ketiganya memiliki arti yang berbeda. Tumor digunakan untuk bentuk abnormal massa sel yang tidak mengalami inflamasi dan tidak memiliki fungsi fisiologis. Neoplasma merupakan pertumbuhan sel baru yang tidak memiliki fungsi fisiologis. Tumor dibagi menjadi dua tingkat yaitu tumor jinak atau tumor yang tidak menyebar ke jaringan sekitar, dan tumor ganas yang disebut kanker merupakan neoplasma dengan sifat menyebar ke jaringan lain, bermetastasis, dan menyebabkan kematian bagi inang (penderita) (Ranasmita, 2008).

Tumor pada kelenjar mammae merupakan kasus kanker yang banyak pada hewan betina terutama anjing di seluruh dunia dengan angka kejadian yang terus meningkat. Setengah dari keseluruhan kasus kejadian tumor mammae pada anjing adalah tumor ganas atau malignant yang dapat menyebar ke organ yang lainnya (Chun, 2005).

2.1.2 Etiologi

Kanker mammae merupakan kelanjutan dari tumor mammae yang bisa terjadi akibat proses kegagalan apoptosis pada sel tumor mammae, sehingga sel-sel

akan bermutasi berkembang semakin ganas. Kanker mammae adalah kanker yang menyerang lobulus-lobulus pada kelenjar mammae dan tumbuh dari glandula epithelium pada kelenjar mammae (Chun, 2005).

Menurut Kuddah (2009), ada beberapa pengaruh penting pada kanker mammae yaitu faktor genetik, hormon dan faktor lingkungan. Kanker mammae pada anjing dipengaruhi oleh lingkungan, onkogen dan gen supresor tumor. Pengaruh hormon juga dapat menyebabkan kanker mammae sehingga ketidak seimbangan hormon terlihat jelas pada kanker mammae. Hormon progesterin mampu menginduksi perkembangan lobulo alveolar pada kelenjar mammae dan terjadi hiperplasia pada sekretori dan mioepitel (Morrison, 2002).

Kanker mammae pada hewan dikelompokkan dalam beberapa tipe berdasarkan asal jaringannya yaitu, glandular (adenoma/adenocarcinoma), ductular (papilloma/carcinoma), myoepithelial dan pluripotential (mixed) cells (Polton, 2009). Berdasarkan gambaran histologi, kanker mammae dibedakan menjadi kanker mammae non invasif dan kanker mammae invasif. Kanker mammae non invasif terdiri dari karsinoma intraduktus non invasif dan karsinoma lobular insitu. Kanker mammae invasif terdiri dari karsinoma duktus invasif, karsinoma lobular invasif, karsinoma musinosum, karsinoma meduler, karsinoma papiler invasif, karsinoma tubuler, karsinoma adenokistik, dan karsinoma apokrin (Abbas et al., 2013).

2.1.3 Patomekanisme

Penyakit kanker ditandai pertumbuhan abnormal sel pada jaringan tubuh yang secara terus menerus dan tidak terkendali. Tiga ciri utama yang menandai

keberadaan sel kanker yaitu kontrol pertumbuhan yang menurun atau tidak terbatas, invasi pada jaringan setempat dan metastasis (penyebaran) ke bagian tubuh lain melalui aliran darah dan kelenjar getah bening (Ranasmita, 2008). Awal terjadinya kanker dimulai dari hilangnya tanggapan atau respon terhadap kendali pertumbuhan normal dikarenakan mutasi dari gen-gen dalam tubuh (Abbas et al., 2013).

Proses terjadinya kanker terdapat pada teori karsinogenesis menurut Kartawiguna (2001) dibagi menjadi tiga fase utama yaitu fase inisiasi, promosi dan progresi. 1). Fase inisiasi berlangsung dengan cepat, saat bahan karsinogen golongan polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) menyerang akan diaktifkan dahulu secara metabolik (kimiawi) menjadi bentuk karsinogen elektrolit reaktif. Tempat yang diserang adalah asam nukleat (DNA/RNA) atau protein dalam sel terutama nitrogen, oksigen dan sulfur. Ikatan dengan DNA menghasilkan lesi di materi genetik dan RNA yang berikatan dengan karsinogen bermodifikasi menjadi DNA yang dimutasi. Saat terjadi lesi sel berusaha untuk mengoreksi dengan detoksifikasi kemudian dieksresi sehingga terjadi kematian sel atau terjadi reparasi DNA. Namun pada proses penon-aktifan atau detoksifikasi dapat terbentuk metabolit yang karsinogenik. 2). Fase promosi yaitu proses sel terinisiasi berkembang menjadi sel preneoplasma oleh stimulus zat lain (promotor). Pada kanker payudara promotor yang mempengaruhi antara lain adalah estrogen sintesis nonsteroid dan lemak yang dapat menaikkan kadar estrogen. 3). Fase terakhir adalah progresi, pada fase ini sel preneoplasma dalam stadium metaplasia berkembang menjadi stadium displasia sebelum menjadi neoplasma. Terjadi ekspansi populasi sel secara spontan dan

irreversibel yang membuat sel-sel menjadi kurang responsif terhadap sistem imunitas tubuh dan regulasi sel.

Neoplasma yang terbentuk dari fase terakhir progresi masih dalam ukuran yang kecil yang dikarenakan aktivitas onkogen mengakibatkan deregulasi proliferasi sel yang sering dihubungkan dengan peningkatan apoptosis yang menyebabkan tumor tidak bertambah besar. Peningkatan daya hidup sel tumor terjadi karena perubahan genetik yang mencegah apoptosis seperti BCL-2 dan mutasi pada gen P53 sebagai sinyal hipoxia akibat peningkatan jumlah ROS yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Keadaan hipoxia ini menyebabkan HIF-1 mengeluarkan faktor pertumbuhan (Vascular endothelial growth factor) VEGF yang merupakan faktor pertumbuhan endotel berperan mendukung pembentukan pembuluh darah baru pada tumor (Angiogenesis). Adanya aktivitas angiogenesis ini membantu tumor berkembang menjadi lebih besar dan ganas karena mendapat suplay nutrisi dan oksigen yang mencukupi kebutuhannya dan meningkatkan resiko metastasis (Kresno, 2011).

2.1.3.1 Pengaruh Patomekanisme Kanker pada Ekspresi Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Angiogenesis terjadi dengan mengaktifasi beberapa faktor pertumbuhan seperti Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Platelet derived Growth Factor (PDGF), Epidermal Growth factor (EGF), dan Tumor Necrosis Factor (TNF) (Hamid et al., 2013). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) diketahui mempunyai kontribusi besar terhadap angiogenesis sebab merupakan stimulator potensial yang keberadaannya

sebagai faktor pertumbuhan mengakibatkan proliferasi dan migrasi sel endotel, bahkan pembentukan tube formation pada perangkaian pembuluh darah (Papetti dan Herman, 2002).

VEGF memiliki struktur yang mirip dengan platelet derived growth factor (PDGF) (Samiasih, 2010). Famili gen VEGF yang telah ditemukan seperti VEGF A, B, C, D, dan E, tetapi VEGF A yang banyak berperan. VEGF A bekerja melalui ikatan reseptor (Vascular Endothelial Growth Factor Reseptor) VEGFR-1 dan (Vascular Endothelial Growth Factor Reseptor 2) VEGFR-2 untuk menginduksi diferensiasi, proliferasi dan migrasi sel endotel (Abdullah, 2009). VEGF memiliki kemampuan untuk memicu pertumbuhan sel endotel vaskular yang berasal dari arteri, vena, dan pembuluh limfe serta menginduksi ekspresi protein anti apoptosis seperti Bcl-2, AI dan surtitrim pada endotel (Saerang, 2013). Gen VEGF berlokasi pada kromosom 6p213 dan ekspresinya diatur oleh faktor pertumbuhan seperti bFGF, estrogen, hipoksia, dan sitokin (Abdullah, 2009).

Ekspresi VEGF berpotensi pada respon terhadap hipoksia dan aktivasi oleh onkogen VEGF, yang disebut vascular permeability factor (VPF), termasuk keluarga supergene VEGF-platelet-derived growth factor (PDGF). Banyak peneliti mengungkapkan bahwa level VEGF dalam sirkulasi berhubungan dengan progresifitas penyakit (Abdullah, 2012). Tumor yang telah tumbuh hingga ukuran tertentu, sel-sel yang terletak di tengah tumor akan menjadi jauh dari pembuluh darah yang ada untuk menerima oksigen dan nutrisi untuk pertahanan hidup sel.

Terjadinya penurunan oksigen, sensor-sensor molekuler dari sel-sel akan menstimulasi produksi faktor-faktor pertumbuhan angiogenik, terutama VEGF.

VEGF disekresikan oleh sel-sel tumor kemudian menempel pada reseptor yaitu hypoxia inducible factor-1a (HIF-1) yang juga merupakan molekul penarik makrofag (Frisca, 2009). VEGF yang menempel pada HIF-1 di sel-sel endotel pembuluh darah yang telah ada, lalu menstimulasi sejumlah proses, termasuk sekresi enzim pendegradasi matriks, pergerakan seluler ke dalam ruangan yang baru diciptakan, dan terjadi proliferasi sel. Sel-sel endotel lalu membentuk tube kapiler-kapiler darah baru, yang memberikan nutrisi penting bagi pertahanan sel tumor dan pertumbuhan tumor (Tammama, 2012).

2.2 7,12-Dimethylbenz () Anthracene (DMBA)

(7,12-Dimethylbenzene (a) Anthracene) DMBA adalah senyawa karsinogen golongan polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) dengan rumus empiris $C_{20}H_{16}$. DMBA memiliki berat molekul 256.34 g/mol, dan titik leleh 122-123°C. DMBA memiliki struktur kimia dengan empat cincin aromatik yang berikatan khas struktur polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) dengan tiga cincin aromatik dan dua substituen metil (Meiyanto E, 2007). Warna bubuk DMBA ini adalah kuning hingga kuning agak kecokelatan dengan sedikit kandungan warna hijau (Sigma-Aldrich, 2007).

Kubatka et al., (2002) melaporkan bahwa, DMBA merupakan karsinogen yang berpotensi untuk memicu timbulnya kanker mammae tikus. DMBA sering digunakan dalam penelitian onkologi terutama kanker mammae. DMBA dapat ditransmisikan melalui kulit, saluran pencernaan, saluran respirasi, intravena, injeksi intraperitoneal, dan inhalasi. Namazi (2009), mengatakan bahwa aktivasi metabolisme diperlukan oleh DMBA untuk menjadi reaktif dengan melibatkan

enzim-enzim sitokrom dan epoksida hidrolase. Pernyataan tersebut diperjelas lagi oleh Melendez et al., (1999) yang menyebutkan bahwa metabolisme DMBA oleh enzim-enzim sitokrom P450 dan epoksida hidrolase akan membentuk proximate carcinogen (karsinogen awal) yang kemudian berubah menjadi ultimate carcinogen (karsinogen akhir). Aktivasi enzim P450 oleh gen CYP dimulai dari aktivasi Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR). Aktivasi AhR terjadi apabila AhR berikatan dengan ligannya antara lain senyawa PAH dan ROS, fitoestrogen, asam lemak dan asam lemak tak jenuh, polifenol, flavonoid, timokuinon, kaemferol dan asam retinoat (Akrom, 2012).

Senyawa DMBA akan berikatan dengan AhR di dalam sitosol, kemudian di nukleus AhR akan berinteraksi dengan Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT) dan akan mengaktivasi sitokrom P450 (Callero dan Loaiza-Perez, 2011). Selanjutnya enzim sitokrom P450 dan microsomal epoxide hydrolase (mEH) akan memetabolisme DMBA menjadi dua metabolit, yaitu metabolit elektrofilik dan metabolit yang mampu membentuk DNA adduct (DNA yang berikatan dengan senyawa karsinogenik). Sitokrom P450 CYP1B1 mengoksidasi DMBA menjadi 3,4-epoxides dan diikuti oleh mEH yang membentuk metabolit proximate carcinogenic dan DMBA-3,4-diol dengan hidrolisis epoxides. Kemudian metabolit ini nantinya dioksidasi oleh CYP1A1 atau CYP1B1 menjadi metabolit ultimate carcinogenic (DMBA-3,4-diol-1,2 epoxide) (Hatim, 2012). DNA adduct terbentuk dari ikatan senyawa epoxide DMBA dengan gugus amino eksosiklik deoksiadenosin (dA) atau deoksiguanosin (dG) pada DNA secara kovalen. Interaksi ini (DNA adduct) dapat menginduksi mutasi pada gen-gen penting, sehingga

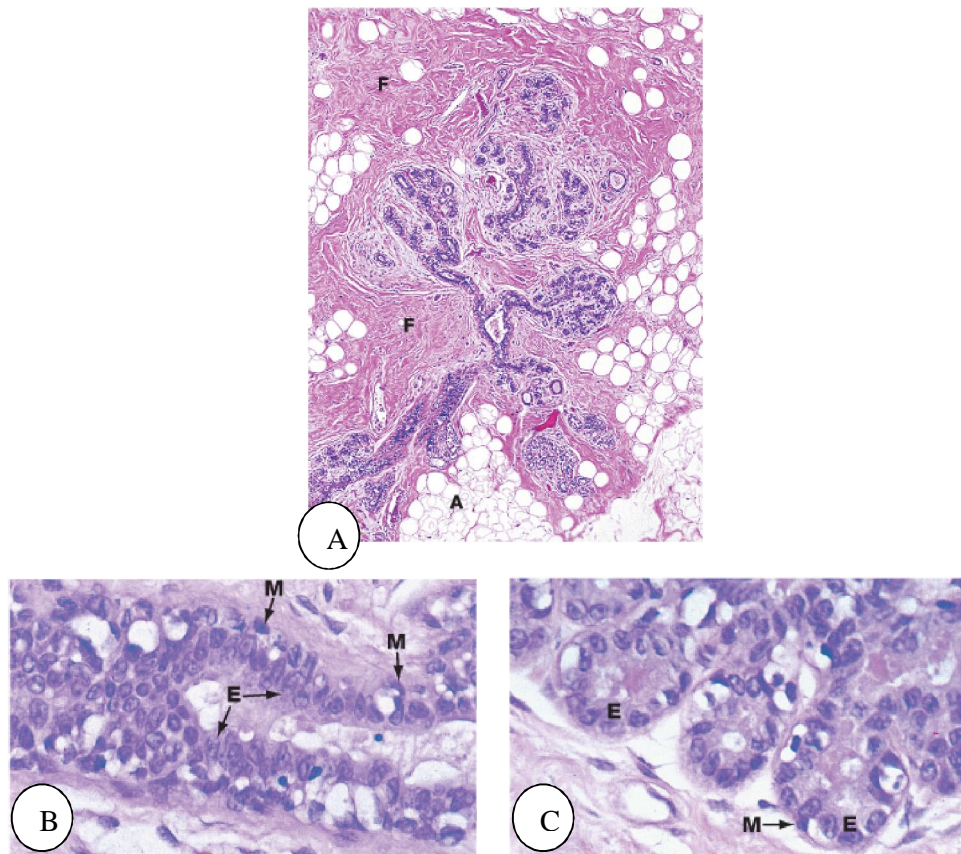
menyebabkan inisiasi kanker. Selain itu DNA adduct mampu mengendalikan siklus sel, sehingga mendorong pembelahan sel kanker (Hakkak et al., 2005).

2.3 Histologi Kelenjar Mammae

Kelenjar mammae merupakan kelenjar kulit khusus yang terletak didalam jaringan bawah kulit atau subcutan (Leeson, 1986). Berdasarkan histologinya, kelenjar mammae normal dibentuk oleh 15-25 lobus yang setiap lobusnya tersusun atas kelenjar jenis tubulo-alveolar. Alveoli merupakan unit terkecil pembentuk susu yang dilapisi oleh acini, yaitu sel-sel pensекреksi air susu. Setiap kelenjar mammae terdapat duktus laktiferus atau saluran air susu yang dilapisi oleh sel epitel (Junqueira et al., 2007). Menurut Hurley (2000), struktur kelenjar mammae tersusun atas jaringan parenkim dan stroma (jaringan ikat). Parenkim merupakan jaringan sekretori berbentuk kelenjar tubulo-alveolar yang mensekresikan susu ke dalam lumen alveoli. Lumen alveoli ini dibatasi oleh sel epitel kuboid selapis. Sel epitel ini dikelilingi oleh sel myoepitel dan selanjutnya dikelilingi oleh stroma yang berupa jaringan ikat membran basalis. Beberapa alveoli bersatu membentuk lobulus dan beberapa lobulus bergabung dalam satu lobus yang lebih besar. Pembuluh darah dan kapiler terdapat di antara alveoli (Hurley, 2000).

Setiap lobus diliputi jaringan interlobular yang mengandung banyak sel lemak (Gambar 2.1). Lemak dan jaringan ikat tersebut membagi lobus menjadi banyak lobulus. Duktus intralobular bermuara kedalam duktus interlobular yang kemudian bersatu membentuk sebuah saluran keluar dari setiap lobus yang disebut duktus laktiferus yang bermuara di puting susu (Leeson, 1986). Duktus pada kelenjar mammae dan acini terdiri dari dua lapisan, yaitu lapisan luminal dengan

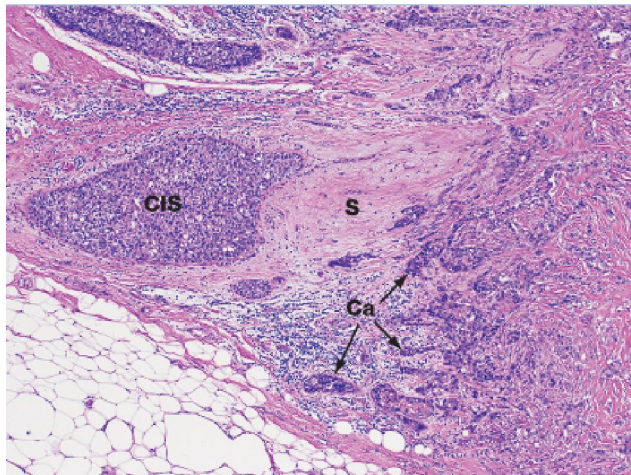
sel epitel dan lapisan basal dengan sel myoepitel. Sel epitel pada lapisan luminal adalah sel epitel berbentuk columnar, sedangkan pada duktus yang lebih kecil dan lumen acini sel epitelnya berbentuk kuboid (Gambar 2.1) (Young et al., 2007).



Gambar 2.1. Gambaran histologi normal kelenjar mammae menggunakan pewarnaan Hematoxylen Eosin (HE). Keterangan: (A) Gambaran normal jaringan ikat dan lemak kelenjar mammae dengan perbesaran 200x ; (B) Sel epitel dan myoepitel lumen (C) Sel epitel dan myoepitel acini dengan perbesaran 400x (Young et al., 2007).

Histopatologi kelenjar mammae yang mengalami kanker memiliki ciri yang sangat khas saat diamati dengan mikroskop, diantaranya adalah terbentuk sel abnormal pada jaringan kelenjar, terutama pada duktusnya (Peeters et al., 2003). Selain itu, terjadi perubahan yang menampakkan proliferasi berat dari sel-sel epitel dengan dua atau lebih lapisan sel yang melebar ke arah lumen duktus, dengan

ukuran epitel bervariasi disertai dengan banyaknya jumlah sel yang mengalami mitosis secara abnormal (Schnitt, 2003). Berikut ini adalah gambaran histopatologi dari ductal carcinoma atau kanker pada saluran kelenjar mammae yang menunjukkan adanya sel kanker yang menyebar ke stroma dan satu duktus yang merupakan ductal carcinoma in situ (CIS) (Gambar 2.2) (Young et al., 2007):



Gambar 2.2. Gambaran histopatologi kanker kelenjar mammae menggunakan pewarnaan Hematoxylen Eosin (HE) dengan perbesaran 400x (Young et al., 2007).

2.4 Curcumin

Curcumin merupakan zat warna kuning yang banyak terkandung dalam rimpang kunyit (*Curcuma longa* L.). Curcumin diketahui memiliki aktivitas farmakologis sebagai antioksidan, antihepatoksik, antiinflamasi, antitumor, antikanker dan antimikroba. Aktivitas antioksidan dan penangkal radikal dari curcumin mampu menghambat proses karsinogenesis kanker (tahap inisiasi, promosi dan progresi). Aktivitas antiinflamasinya berperan sebagai inhibitor enzim siklooksigenase (suatu enzim yang mengkatalisis pembentukan prostanoïd dari asam arakidonat) yang berkaitan dengan aktivitasnya sebagai antikanker. Curcumin

juga memiliki efek memacu proses apoptosis dan menghambat proliferasi sel. Curcumin juga mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara tanpa tergantung pada ekspresi reseptor estrogen (Anonim, 2013).

Curcumin mampu bertindak sebagai radical scavenger terhadap metabolit reaktif senyawa karsinogen, sehingga pemberian curcumin dapat mengurangi insiden terjadinya kanker. Suatu penelitian menunjukkan bahwa pemberian curcumin pada punggung mencit mampu menghambat pembentukan tumor kulit yang diinduksi benzo[a]piren atau DMBA (7,12-dimetilbenz[a]antrasen). Sifat kemopreventif curcumin selain dapat menangkap radikal juga mampu menghambat sitokrom P450 dan enzim glutathion S-transferase sehingga akan menghambat aktivitas benzo[a]piren sebagai mutagen (Anonim, 2013).

Curcumin merupakan penangkal radikal terhadap radikal hidroksil, anion superoksid, dan oksigen singlet. Curcumin mampu memproteksi plasmid pBR322 DNA terhadap pecahnya untai tunggal DNA akibat induksi oleh singlet oksigen, sebuah ROS yang bersifat genotoksik dan mutagenik. Curcumin juga berpotensi sebagai inhibitor lipid peroksidase yang terinduksi berbagai agen selular atau asing (Da'i et al., 2007).

Pada mamalia, perkembangbiakan sel diatur oleh serangkaian protein yang diproduksi oleh gen-gen pengatur tumor yang disebut onkogen (yang pada keadaan normal disebut protoonkogen) dan tumor suppressor gene (TS) (suatu tipe gen penghambat perkembangbiakan sel). Kedua jenis gen tersebut dibedakan berdasarkan fungsinya. Onkogen berfungsi sebagai pemacu perkembangbiakan sel, sedangkan tumor suppressor gen (TS) berfungsi sebagai penghambat

perkembangbiakan. Kedua jenis gen tersebut bekerja secara harmonis dalam mengatur perkembangbiakan sel dalam rangka menjaga integritas tubuh secara keseluruhan. Kerusakan atau terjadinya mutasi pada gen-gen tersebut beresiko terjadinya kanker atau proliferasi sel yang berlebihan (Da'i et al., 2007).

Curcumin mampu menghambat proses perkembangbiakan sel, sehingga disebut senyawa antiproliferasi. Curcumin dilaporkan mampu menghambat aktivitas protein kinase C (PKC) yang berperan pada awal pembelahan sel. Penghambatan terhadap PKC berarti menghambat satu proses perkembangbiakan sel sehingga senyawa yang menghambat aktivitas PKC tersebut berpotensi sebagai antikanker atau sebagai zat kemopreventif (Meiyanto, 1999).

Curcumin juga mampu menghambat perkembangbiakan sel kanker payudara. Penghambatan tersebut lebih efektif pada pertumbuhan sel ER (estrogen receptor) negatif daripada sel ER positif. Aktivasi pada reseptor estrogen ini akan mengakibatkan aktivasi faktor transkripsi untuk memacu pertumbuhan sel melalui induksi RNA polimerase. Aktivasi pada keadaan normal dilakukan oleh estrogen atau senyawa yang menyerupai estrogen. Pada jalur ini penghambatan perkembangbiakan sel kanker payudara oleh curcumin akan lebih efektif bila dilakukan bersama-sama dengan senyawa isoflavonoid. Curcumin juga mampu menghambat aktivitas tirosin kinase dari protein p185neu yaitu suatu protein yang dihasilkan oleh onkogen erb B-2/neu (atau dikenal sebagai HER-2). Onkogen ini diekspresi secara berlebihan pada sekitar 30 % kasus kanker payudara. Mekanisme penghambatan ini melalui dua cara, pertama dengan menghambat aktivitas enzimatis dari protein tersebut dan kedua dengan cara menurunkan kadarnya.

Aktivitas ganda yang ditunjukkan oleh curcumin tersebut terbukti sangat efektif untuk mencegah proliferasi sel-sel kanker dan sekaligus mencegah penyebarannya (Shao et al., 2002).

Curcumin pada kadar rendah (10-100 μg) mampu menghambat ekspresi c-myc (suatu tipe gen pemacu proliferasi sel). Gen ini merupakan protoonkogen yang mempunyai peran yang sangat penting dalam proliferasi sel yaitu mengaktivasi faktor transkripsi sehingga akan memasuki daur sel sehingga dapat menginduksi terjadinya mitosis. Gen ini diketahui diekspresi sangat kuat pada berbagai jenis tumor (Da'i et al., 2007).

Curcumin merupakan bahan aktif yang diekstraksi dari rimpang kunyit (*Curcuma longa* L.). Curcumin merupakan senyawa polifenol yang terdapat dalam rimpang kunyit (*Curcuma longa* L.) dengan aktivitas biologi sebagai antioksidan, antiinflamasi, kemopreventif dan kemoterapi (Parl, 2008). Curcumin diketahui memiliki aktivitas sebagai sebagai antikanker, antimutagenik, antikoagulan, antidiabetes, antibakteri, antijamur, antiprotozoa, antivirus, dan antifibrosis (Wiesser et al., 2007). Aktivitas antikanker Curcumin dilaporkan berhubungan dengan aktivitasnya sebagai antioksidan dan penangkap radikal bebas (Sandur et al., 2005).

2.1 Vitamin E

Vitamin E merupakan antioksidan yang banyak ditemukan di alam, penangkal radikal bebas dan bersifat hipofilik. Vitamin E memiliki 4 golongan famili yaitu α -tocopherol, β -tocopherol, γ -tocopherol dan δ -tocopherol. Vitamin E

berperan dalam melindungi integritas membrana sel normal, mencegah hemolisis eritrosit, meningkatkan respon imun, sebagai antioksidan, melindungi vitamin A, C, -karotin, dan asam lemak tak jenuh dari oksidasi. Vitamin E merupakan vitamin yang larut lemak dan dijumpai pada semua membran sel. Sebagai antioksidan, vitamin E akan mengurangi peroksidasi dari asam lemak yang tidak tersaturasi oleh radikal bebas. Efek antioksidan dari vitamin E bekerja dengan cara membersihkan radikal bebas, menghambat enzim peroksidase dan melindungi membran sel dari degradasi oksidatif (Martha et al., 2013).

Vitamin E terletak di dalam lapisan fosfolipid membran sel, berfungsi melindungi asam lemak jenuh ganda dan komponen penyusun membran sel yang lain dari oksidasi radikal bebas. Vitamin E akan memutus rantai peroksida lipid dan menyumbangkan atom hidrogen dari gugus OH ke radikal bebas, sehingga terbentuk radikal vitamin E yang stabil dan tidak merusak. Vitamin E berfungsi sebagai pelindung terhadap peroksidasi lipid dalam membran serta berinteraksi langsung dengan radikal peroksida lipid sehingga atom hidrogen lainnya berkurang menjadi tocopheril quinon yang teroksidasi sempurna. Selain menyumbangkan hidrogen ke dalam reaksi, vitamin E juga akan menyekat aktivitas tambahan yang dilakukan oleh peroksida, memutus reaksi berantai dan membatasi kerusakan akibat stres oksidatif. Pasien kanker membutuhkan vitamin E hingga 400 mg/hari untuk meningkatkan imunitas tubuh dalam melawan radikal bebas. Dosis yang dapat ditoleransi adalah 1000 mg/hari (Mustika, 2005).

Vitamin E ditemukan pada tahun 1922 dengan istilah tokoferol (dari bahasa Yunani, toesa berarti kelahiran anak dan phero berarti mengasuh) oleh Evans dan

Bishop. Vitamin E merupakan nama umum untuk semua metil-tokol, jadi untuk istilah tokoferol bukan merupakan sinonim dari vitamin E, namun pada penggunaan sehari-hari, kedua istilah tersebut disinonimkan (Landvik et al., 2002 di dalam Cadenas dan Packer, 2002). Sumber vitamin E di alam banyak dijumpai pada minyak biji kapas, taoge, minyak biji bunga matahari, kacang-kacangan dan kentang manis (Kumalaningsih, 2006). Fungsi dari vitamin E sangat penting seperti dapat mencegah timbulnya kanker, penyakit kardiovaskuler, sebagai antioksidan, osteoporosis dan meningkatkan kinerja sistem kekebalan dari tubuh (Landvik et al., 2002 di dalam Cadenas dan Packer, 2002).

Terapi pemberian kombinasi curcumin dan vitamin E sangat berpotensi sebagai terapi preventif dari kanker. Senyawa antioksidan alami polifenolik pada vitamin E dan curcumin dapat berfungsi sebagai pengikat radikal bebas, peredam terbentuknya oksigen radikal, dan menghambat aktivitas enzim oksidatif (Parker et al., 2014).

2.6 Doxorubicin

Doxorubicin merupakan antibiotik golongan antrasiklin yang banyak digunakan untuk terapi berbagai macam jenis kanker seperti leukemia akut, kanker payudara, kanker tulang dan ovarium (Childs et al., 2002). Senyawa ini diisolasi dari *Streptomyces peucetius* var. *caesius* pada tahun 1960-an dan digunakan secara luas (Minotti et al., 2004). Doxorubicin dapat menyebabkan kardiotoxicitas pada penggunaan jangka panjang, hal itu menyebabkan penggunaannya secara klinis menjadi terbatas. Efek samping pada pemakaian kronisnya bersifat ireversibel, termasuk terbentuknya cardiomyopathy dan congestive heart failure (Han et al.,

2008). Umumnya doxorubicin digunakan dalam bentuk kombinasi dengan agen antikanker lainnya seperti siklofosamid, cisplatin dan 5-FU. Peningkatan respon klinis dan pengurangan efek samping cenderung lebih baik pada penggunaan kombinasi dengan agen lain dibandingkan penggunaan doxorubicin tunggal (Brunton et al., 2005).

2.7 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hewan coba adalah hewan yang sengaja dipelihara yang digunakan sebagai hewan model untuk mempelajari dan mengembangkan berbagai bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan penelitian. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang juga dikenal dengan sebutan “Norway Rat” merupakan hewan yang sering digunakan dalam berbagai penelitian karena merupakan binatang yang memiliki kemampuan yang baik dalam menyesuaikan diri dengan lingkungannya sehingga banyak digunakan sebagai hewan percobaan.

Menurut Myers dan Armitage (2004) tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Kelas : Mamalia

Ordo : Rodentia

Subordo : Sciurognathi

Famili : Muridae

Subfamili : Murinae

Genus : *Rattus*

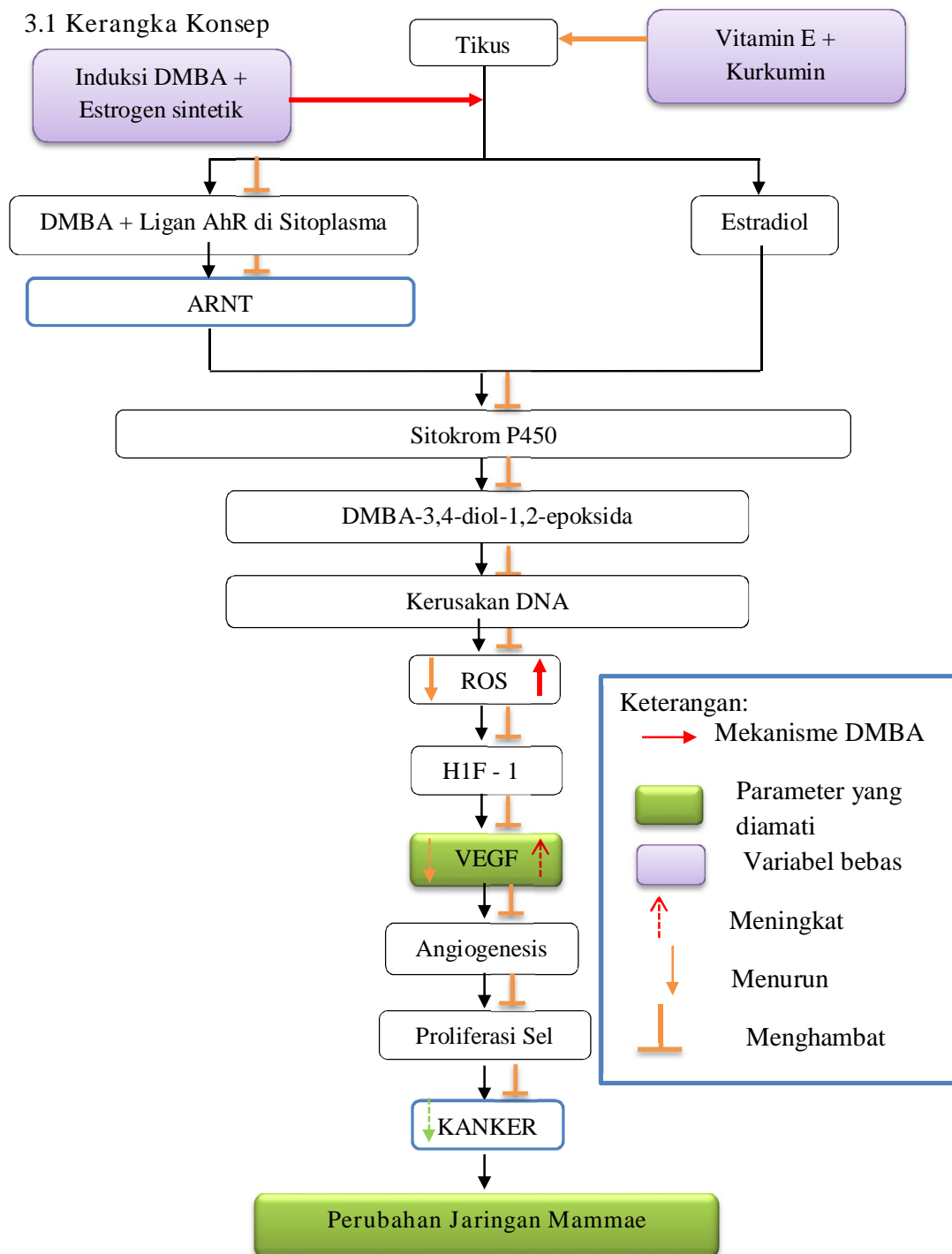
Spesies : *Rattus norvegicus*

Tikus (*Rattus norvegicus*) memiliki banyak strain, salah satunya adalah strain Wistar. Karakteristik fisik tikus *Rattus norvegicus* yaitu memiliki sepasang gigi seri berbentuk pahat yang tidak berhenti tumbuh, memiliki mata yang kecil, telinganya tidak berambut, dan ekor bersisik yang panjangnya melebihi panjang tubuh dan kepalanya. *Rattus norvegicus* adalah hewan omnivor yang memiliki sifat *opportunistic terrestrial*. Spesies ini biasanya berwarna abu-abu coklat, namun jenis albino memiliki warna putih dan biasa digunakan sebagai hewan laboratorium (Myers and Armitage, 2004). Biasanya tikus dapat bertahan tanpa makanan selama 14 hari. Tikus laboratorium jarang hidup lebih dari 3 tahun. Tikus jantan dewasa berat badannya dapat mencapai 500 g sedangkan tikus betina jarang dengan berat badan lebih dari 350 g. Pertambahan berat badan dipengaruhi oleh bangsa dan spesies, suhu lingkungan, jenis kelamin, energi metabolis dan kadar protein dalam pakan, dan pemberian pakan yang cukup dengan jumlah pakan yang dikonsumsi (Farida, 2007).

Keunggulan tikus putih strain Wistar dibandingkan tikus liar antara lain lebih cepat dewasa, tidak memperlihatkan perkawinan musiman, lebih cepat berkembang biak, masa kebuntingan pendek, mudah dikelola, tahan terhadap penyakit, lebih besar dibanding mencit, siklus reproduksi mudah diikuti, fertilitas maksimum bisa diketahui, mudah dilakukan pemeriksaan siklus birahi, hormon reproduksi mirip manusia, beberapa metabolisme tubuhnya diketahui mirip manusia, dan sebagai hewan laboratorium sangat mudah ditangani (Porter, 2005).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN METODE PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

DMBA yang diinduksikan ke tubuh tikus akan berikatan dengan Aryl Hydrocarbon Reseptor (AhR) di sitoplasma. Kemudian ikatan tersebut akan dibawa ke nucleus dan berikatan dengan Aryl Receptor Nuclear Translocator (ARNT) dan menginduksi sitokrom P450 di hepar . Aktivasi sitokrom P450 dipengaruhi juga oleh kadar estrogen dalam tubuh tikus. Induksi estrogen dilakukan ke dalam tubuh tikus untuk menaikkan kadar estrogen dalam tubuh tikus, sehingga terjadi peningkatan kadar estradiol (E2). Estradiol akan dimanfaatkan untuk mengaktifasi sitokrom p450 yang berada di sitoplasma sel-sel mammae. Sitokrom P450 (CYP1A1 atau CYP1B1) memetabolisme DMBA sehingga menjadi DMBA 3,4 diol-1,2 epoxida (DMBA-DE). DMBA 3,4 diol-1,2 epoxida dapat menyebabkan kerusakan DNA sehingga membentuk DNA adduct.

DNA adduct memicu peningkatan radikal bebas yang berlebih, salah satunya Reactive oxygen species (ROS) dalam sel premaligna dapat mengakibatkan stress oksidatif. Stress oksidatif memacu peningkatan Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) yang merupakan aktivator angiogenik untuk memediasi ekspresi yang berlebih Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) yang kemudian akan berikatan dengan reseptornya (VEGFR). Pengikatan VEGF pada VEGFR mengaktifkan sinyal intraseluler yang berakibat peningkatan permeabilitas vaskuler selanjutnya akan terjadi angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru yang mensuplai nutrisi untuk tumor sehingga tumor berkembang menjadi sel kanker. Kanker yang terjadi pada kelenjar mammae akan menyebabkan kerusakan kelenjar mammae sehingga terjadi perubahan jaringan kelenjar mammae.

Curcumin dan vitamin E sebagai kombinasi terapi preventif dapat menghambat terjadinya aktivasi sitokrom P450 sehingga akan mencegah terbentuknya DNA adduct, maka peningkatan Reactive oxygen species (ROS) tidak akan terjadi. Dengan tidak terjadinya peningkatan ROS maka stress oksidatif yang dapat memicu peningkatan dari HIF-1 terhambat, maka akan berdampak pada ekspresi VEGF dan mencegah berikatan dengan reseptornya. Penghambatan ikatan VEGF pada VEGFR dapat mengakibatkan pencegahan dari pembentukan pembuluh darah baru yang mensuplai nutrisi untuk tumor agar berkembang menjadi kanker.

Hewan model yang diinduksi DMBA juga diberikan terapi preventif kombinasi dari curcumin dengan vitamin E. Vitamin E mengandung antioksidan akan mengikat radikal bebas sehingga dapat menghambat terjadinya proliferasi sel dan meningkatkan apoptosis sel. Curcumin memiliki kemampuan menghambat dan menekan proliferasi sel kanker dalam berbagai fase siklus sel kanker dan merangsang apoptosis, Menghambat bioaktivasi karsinogen dengan menekan enzim sitokrom p450 dan sebagai anti angiogenesis melalui penekanan produksi dari Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sehingga dapat mencegah terbentuknya sel kanker.

3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian terapi preventif kombinasi curcumin dan vitamin E dapat menyebabkan penurunan kadar VEGF dan mencegah kerusakan jaringan kelenjar mammae pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) model kanker Mammae hasil induksi DMBA.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilakukan dari Bulan Juli sampai bulan Oktober.

4.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan true experimental laboratory dengan rancangan penelitian RAL yang menggunakan hewan percobaan sebagai objek penelitian. Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok yang dicantumkan pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Perlakuan
1. Kelompok P1 (kontrol negatif)	Tikus tanpa perlakuan
2. Kelompok P2 (Kontrol positif)	Tikus dengan injeksi DMBA dosis 5 mg/kg BB sebanyak 10 kali induksi selama 20 hari dan injeksi estrogen dengan dosis 20000 IU/KgBB sebanyak 5 kali pada selang waktu sehari sebelum induksi DMBA
3. Kelompok P3 (preventif)	Tikus diberi kombinasi Curcumin 108 mg/kgBB dan Vitamin E 300 IU \pm 4 jam sebelum induksi DMBA dengan injeksi DMBA dosis 5 mg/kg BB

	sebanyak 10 kali induksi selama 20 hari dan injeksi estrogen dengan dosis 20000 IU/KgBB sebanyak 5 kali pada selang waktu sehari sebelum induksi DMBA
4. Kelompok P4 (Terapi curcumin + vitamin E)	Tikus dengan injeksi DMBA dosis 5 mg/kg BB sebanyak 10 kali induksi selama 20 hari dan injeksi estrogen dengan dosis 20000 IU/KgBB sebanyak 5 kali pada selang waktu sehari sebelum induksi DMBA yang setelah itu diberikan terapi kombinasi Curcumin 108 mg/kgBB dan Vitamin E 300 IU sebanyak 10 kali induksi selama 10 hari
5. Kelompok P5 (Terapi Doxorubicin)	Tikus dengan injeksi DMBA dosis 5 mg/kg BB sebanyak 10 kali induksi selama 20 hari dan injeksi estrogen dengan dosis 20000 IU/KgBB sebanyak 5 kali pada selang waktu sehari sebelum induksi DMBA yang setelah itu diberikan terapi doxorubicin dengan dosis 0,198mg/ kgBB sebanyak 10 kali induksi selama 10 hari

Penentuan jumlah sampel dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008).

$P(n-1)$	15
$5(n-1)$	15
$5n-5$	15
$5n$	20
n	4

Keterangan :

P = Jumlah Kelompok

n = Jumlah Ulangan yang diperlukan

Dari perhitungan diatas, maka untuk 5 kelompok diperlukan ulangan sedikitnya 4 kali dalam setiap kelompok, sehingga diperlukan 20 hewan coba.

4.3 Variabel Penelitian

- 4.3.1 Variabel Bebas :Induksi DMBA, Curcumin dan Vitamin E
Doxorubicin
- 4.3.2 Variabel tergantung :Kadar VEGF, Histopatologi kelenjar mammae tikus
- 4.3.3 Variabel kendali : Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar betina, umur 10 - 12 minggu, berat badan 150 – 200 gram yang diberi pakan standar 2 hari sekali , minum secara ad libitum, dan ditempatkan pada suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$)

4.4 Bahan dan Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain kandang tikus, botol minum tikus, pakan tikus, air minum, spuit 1 ml dan 3 ml, timbangan hewan, mortar, mikrotube, sentrifuge, tabung EDTA, tabung reaksi, baker glass, object

glass, cover glass, tabung ukur, botol steril ,apron, glove latek, gunting, Skapel blade, timbangan analitik, pinset, mikroskop.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) strain Wistar usia 10-12 minggu, 7,12 dimetylbenz () antrasene (DMBA), minyak biji bunga matahari, NS (Normal Saline) , alkohol 70% Nacl fisiologis, Xylol, Etanol 100%, PFA 4%, Aquades, PBS pH 4,4 , Hydrogen Peroksida, VEGF kit, dan pakan standar tikus (SP).

4.5 Tahapan Penelitian

4.5.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan yang digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) strain Wistar betina yang berusia kurang lebih 10-12 minggu dengan aklimatisasi selama 1 minggu. Tikus yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 20 ekor, yang kemudian dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, terapi preventif, terapi kuratif dan terapi doxorubicin yang masing-masing perlakuan terdiri dari 4 ekor tikus yang ditempatkan dalam 1 buah kandang. Pada masing-masing kandang, diberi makan dua hari sekali yang berupa pakan sapi yaitu konsentrat susu pap dan air minum ad libitum. Selama penelitian tikus ditempatkan di kandang hewan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya.

4.5.2 Preparasi DMBA

7,12 Dimetylbenz () antrasene (DMBA) yang digunakan 5mg/kgBB ditimbang sesuai BB pada lampiran 3. Setelah ditimbang, DMBA tersebut

dihaluskan terlebih dahulu didalam mortar dan dicampur dengan pelarut yang menggunakan Minyak Biji Bunga Matahari dan Normal Saline dengan perbandingan 3:1. Proses Pelarutan dilakukan dengan menambahkan secara perlahan-lahan NS dan minyak biji bunga matahari sementara tetap dilakukan penghalusan. Selanjutnya, larutan dituang ke dalam botol steril yang tertutup rapat kemudian dihomogenkan kembali sebelum digunakan hingga benar-benar homogen.

4.5.3 Terapi Preventif curcumin dan vitamin E

Pemberian curcumin dan vitamin E dilakukan secara sonde lambung per oral dengan volume pemberian sebanyak 1 ml per ekor. Dosis yang diberikan tertera pada lampiran 3. Pemberian dilakukan induksi DMBA. Induksi pada perlakuan ini digunakan sebagai terapi preventif pada kanker yang akan disebabkan oleh DMBA.

4.5.4 Induksi DMBA

Induksi DMBA dilakukan secara injeksi subkutan pada kelenjar mammae tikus sesuai dengan dosis yang diberikan sesuai dengan perhitungan pada lampiran 3. Volume pemberian pada tiap tikus adalah 1 ml menggunakan syringe dengan masing-masing (0,5 ml) pada flank kanan dan kiri tikus. Induksi dilakukan setiap 48 jam sekali selama 10 kali.

4.5.5 Induksi Estrogen

Induksi estrogen secara intramuskular (IM) dengan dosis 20.000 IU/kg BB yang merupakan modifikasi dari Naciff et al., (2002), setiap tikus diinduksi

estrogen sebanyak 0,2 ml/ekor sesuai dengan perhitungan pada lampiran 3. Induksi estrogen diberikan sebanyak dua kali dalam seminggu dengan interval waktu pemberian setiap 4 hari sekali. Induksi estrogen diberikan dengan waktu bergantian dengan pemberian induksi DMBA.

4.5.6 Terapi Kuratif Curcumin dan Vitamin E

Pemberian curcumin dan vitamin E dilakukan secara sonde lambung per oral dengan volume pemberian sebanyak 1 ml per ekor. Dosis yang diberikan tertera pada lampiran 3. Pemberian dilakukan sesudah induksi DMBA selesai, Induksi pada perlakuan ini digunakan sebagai terapi pada kanker yang disebabkan DMBA.

4.5.7 Terapi Doxorubycine

Induksi Doxorubycine dilakukan secara injeksi Intramuscular dengan volume pemberian sebanyak 0,2 ml per ekor yang diberikan sesuai dengan perhitungan pada lampiran 3. Induksi pada perlakuan ini digunakan sebagai terapi pada kanker yang disebabkan DMBA.

4.5.8 Pengambilan sampel darah hewan coba

Pengambilan darah pada hewan coba mempunyai tujuan untuk menguji kadar Vascular Endothelial Growth factor (VEGF) melalui ELISA. Pengambilan darah pada hewan coba dilakukan melalui ekor hewan coba. Pertama hewan coba di restrain menggunakan kandang jepit, kemudian ekor dibersihkan menggunakan kapas alkohol. Digunting sedikit pada bagian ujung ekor, lalu ditekan sampai darah keluar dan masuk pada mikrotube lalu dimiringkan. Setelah 3 jam tabung

disentrifus lalu dibuang supernatannya. Serum dipindahkan pada tabung appendorf dan kemudian diberi label untuk disimpan.

4.5.9 Pengukuran Kadar Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Menguji kadar VEGF dilakukan dengan uji ELISA menggunakan VEGF ELISA kit. Uji VEGF ini menggunakan sampel darah tikus. Prosedur ELISA untuk mengetahui kadar VEGF yakni :

1. Reagen, standart dilutions, kontrol dan sampel disiapkan terlebih dahulu
2. Diambil mikroplate yang dibutuhkan dan disimpan kembali yang tidak terpakai pada wadah, kemudian disegel kembali
3. Dimasukkan 50 μ l Assay diluent RD1-41 pada tiap well
4. Dimasukkan 50 μ l dari standar, kontrol atau sampel pada tiap well, Tutup dengan aluminium foil lalu inkubasi selama 2 jam di suhu ruang pada microplate shaker yang diatur 500 ± 50 rpm.
5. Aspirasi tiap well dan cuci dengan cara mengisi tiap well dengan buffer cuci (400 μ l) menggunakan botol semprot dan untuk hasil yang bagus cairan harus benar-benar bersih. Lakukan pencucian selama 4 kali dari total 5 kali pencucian. Setelah pencucian terakhir untuk membuang buffer cuci balikkan plate dan keringkan dengan tissue.
6. Dimasukkan 100 μ l dari Rat VEGF Conjugate pada setiap well. Tutup menggunakan aluminium foil. Inkubasi pada suhu ruang selama 11 jam pada shaker.
7. Diulangi pencucian pada langkah 5

8. Dimasukkan 100 μ l dari Substrat Solution pada tiap well. Inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang diatas benctop dan lindungi dari cahaya dengan cara mematikan lampu
9. Dimasukkan 100 μ l stop solution pada tiap well. Ketuk-ketuk well secara perlahan agar teracmpur sempurna
10. Dibaca hasil pada microplate reader.

4.5.10 Pembedahan dan Pengambilan Organ

Hewan coba dieuthanasi dengan cara memasukkan pada wadah berisi kloroform 10 % , setelah hewan kondisi mati, hewan diposisikan rebah dorsal kemudian disayat pada bagian abdomen dari cranial ke caudal. Organ kelenjar mammae diambil pada bagian bawah kulit abdomen. Organ yang telah diambil, dicuci dengan NaCl fisiologis untuk selanjutnya disimpan dan direndam dalam pot berisi PFA 4%. Harus dipastikan bahwa organ benar-benar terendam seluruhnya dalam larutan PFA.

4.5.11 Pembuatan Preparat Histopatologi

Tahapan pembuatan preparat histopatologi kelenjar mammae adalah sebagai berikut: Proses pembuatan preparat histopatologi kelenjar mamae diawali dengan embedding kelenjar mamae, yang dilakukan dengan perendaman kelenjar mammae dalam larutan PFA 4% kemudian direndam dalam etanol 70% minimal selama 24 jam, dan dilanjutkan dengan perendaman kedalam etanol 80% selama 2 jam. Selanjutnya organ direndam dalam etanol 90% dan 95% secara berurutan selama masing-masing 30 menit. Proses dilanjutkan dengan merendam organ dalam

etanol absolute selama 3 x 30 menit dalam botol yang berbeda. Selanjutnya dilakukan penjernihan dengan cara perendaman dalam xylol, yaitu xylol I dan xylol II masing-masing selama 2 x 30 menit. Kemudian, dilakukan infiltrasi pada paraffin cair, lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 56-58°C. Dilanjutkan dengan perendaman kedalam xylol sebanyak 3x, paraffin sebanyak 3x, lalu dilanjutkan dengan embedding dengan mencelupkan kelenjar mammae dalam paraffin cair yang telah dituang dalam wadah. Setelah beberapa saat paraffin akan memadat dan kelenjar mammae akan berada dalam blok paraffin.

Proses embedding dilakukan dengan menggunakan cetakan yang didalamnya diisi paraffin cair hingga membeku. Setelah membeku, cetakan tersebut dipotong-potong dan ditempelkan pada blok kayu. Blok kayu tersebut dipasang pada mikrotom dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisi pisau. Blok paraffin kemudian dipotong dengan ketebalan 4 µm. Pada awal pemotongan dilakukan trimming karena jaringan yang terpotong masih belum sempurna. Hasil irisan selanjutnya dipindahkan dengan kuas ke dalam air hangat dengan suhu 38-40°C untuk meluruskan kerutan halus yang ada. Irisan yang terentang sempurna diambil dengan gelas obyek. Potongan yang terpilih kemudian dikeringkan di atas hot plate yang bersuhu 38-40°C hingga kering dan disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama kurang lebih 24 jam. Selanjutnya preparat kelenjar mammae siap diwarnai dengan pewarnaan HE (Muntiha, 2001).

4.5.12 Pewarnaan Hematoxylen Eosin (HE)

Metode pewarnaan Hematoxylen Eosin (HE) dilakukan untuk membuat preparat dengan jaringan kelenjar mammae tikus. Proses pewarnaan HE diawali dengan proses deparafinasi menggunakan xylol yang dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan menggunakan etanol absolut I, II dan III masing-masing 5 menit. Setelah itu secara berurutan masing-masing selama 5 menit dengan etanol 95%, 90%, 80% dan 70%. Sediaan dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Dilanjutkan dengan perendaman menggunakan air aquades selama 5 menit. Kemudian selama 10 menit sediaan diwarnai dengan pewarna Hematoksilin, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 30 menit. Sediaan yang sudah dicuci lalu direndam dalam air aquades selama 5 menit. Setelah itu selama 5 menit sediaan diwarnai dengan pewarna Eosin kemudian direndam dalam air aquades hingga perwarna eosin tidak berlebihan. Sediaan yang sudah diwarnai lalu dilakukan dehidrasi dengan etanol 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama 5 menit, dan dilanjutkan dengan alkohol absolut I, II dan III masing-masing 5 menit. Setelah itu dilakukan proses Clearing dengan xilol I dan II selama 5 menit kemudian preparat dikering anginkan. Setelah preparat kering, dilakukan mouting dengan menggunakan entelan dan ditutup menggunakan cover glass. Selanjutnya dilakukan pengamatan histopatologi dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Pengamatan histopatologi kelenjar mammae dilakukan dengan mengamati perubahan dari jaringan kelenjar mammae yang meliputi perubahan alveoli, duktus, dan stroma.

4.5.13 Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa hasil pengamatan histopatologi kelenjar mammae yang dianalisis secara deskriptif kualitatif. Data Kuantitatif berupa data kadar VEGF dalam serum darah hewan coba yang dianalisis secara statistik dengan uji one-way ANOVA (Analysis of variance) kemudian dilanjutkan uji Tukey (Beda Nyata Jujur) dengan $\alpha = 0,05$ (Kusriningrum, 2008).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Terapi Preventif Dan Kuratif Kombinasi Curcumin Dan Vitamin E Dibandingkan Doxorubicin Pada Hewan Model Kanker Mammae Hasil Induksi DMBA Terhadap Kadar Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Pada Darah Tikus (*Rattus norvegicus*)

Kanker mammae dapat tumbuh dan bermetastasis apabila memperoleh oksigen dan nutrisi yang cukup melalui suplai darah. Suplai darah bisa terjadi apabila sel tumor mengalami angiogenesis. Proses angiogenesis dapat dipengaruhi oleh Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) yang disekresikan sel-sel endotel. Kadar VEGF tersebut dapat diamati dalam darah dengan menggunakan metode ELISA. Rata-rata kadar VEGF dalam darah dari hewan model kanker mammae dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Tabel Peningkatan Kadar VEGF

Kelompok	Rata - Rata Kadar VEGF (mIU/ml)	% Kadar VEGF	
		Peningkatan	Penurunan
Kontrol - (P1)	14,675 ± 0,961 ^a	-	-
Kontrol + (P2)	33,015 ± 2,047 ^c	125	-
Prefentif (P3)	17,793 ± 1,585 ^a	-	46
Kuratif (P4)	23,882 ± 2,430 ^b	-	28
Doxorubicyn (P5)	29,610 ± 1,986 ^c	-	10

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p < 0,05$). Persentase peningkatan terhadap kontrol negatif. Persentase penurunan terhadap kontrol positif

Perbedaan kadar VEGF antara kelompok P1 (tidak diinduksi DMBA dan tidak diberikan terapi) dengan kelompok P2 (diinduksi DMBA dan tidak diberikan terapi) menunjukkan perbedaan hasil yang signifikan ($p < 0,05$) (Tabel 5.1). Pada kelompok P2 terjadi peningkatan rata-rata kadar VEGF dalam darah tikus sebesar 125% dibandingkan dengan kelompok P1. Peningkatan kadar VEGF pada kelompok P2 menunjukkan bahwa induksi DMBA yang diberikan pada tikus

selama 22 hari dapat menyebabkan kerusakan DNA dan memacu timbulnya kanker mammae pada hewan model kanker mammae. Kondisi kanker mammae akan merangsang terjadinya proses angiogenesis yang ditandai dengan peningkatan VEGF dalam darah.

DMBA yang diinduksikan di dalam tubuh dimetabolisme oleh sitokrom p450. Metabolisme tersebut akan membentuk DMBA reaktif yang akan berikatan dengan DNA yang disebut dengan DNA adduct. Ikatan tersebut menghasilkan DMBA 3,4 diol-1,2 epoxida (DMBA-DE) yang dapat menyebabkan kerusakan DNA serta membentuk Reactive oxygen species (ROS) (Hatim, 2012).

ROS yang terbentuk secara berlebihan mengakibatkan stress oksidatif. Stress oksidatif memacu peningkatan Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) yang merupakan aktivator angiogenik untuk memediasi ekspresi Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). VEGF yang menempel pada HIF-1 di sel-sel endotel pembuluh darah yang telah ada, lalu menstimulasi sejumlah proses, termasuk sekresi enzim pendegradasi matriks, pergerakan seluler ke dalam ruangan yang baru diciptakan, dan terjadi proliferasi sel. Sel-sel endotel lalu membentuk tube kapiler-kapiler darah baru, yang memberikan nutrisi penting bagi pertahanan sel tumor dan pertumbuhan tumor (Tammama, 2012).

Kerusakan DNA yang berpengaruh pada gen-gen pengatur pertumbuhan menyebabkan terjadinya pertumbuhan sel yang tidak terkontrol. Pertumbuhan yang berlebihan terjadi di semua sel termasuk sel endotel dan berpengaruh pada peningkatan produksi VEGF dan terjadinya proses angiogenesis. Mekanisme

angiogenesis yang terjadi bertujuan untuk membantu pemberian nutrisi dan oksigen pada sel kanker sehingga sel kanker dapat berkembang (Frisca, 2009).

Pada penelitian ini senyawa yang digunakan sebagai terapi preventif dan kuratif adalah kombinasi vitamin E dan curcumin. Curcumin memiliki sifat larut dalam air sehingga hanya bekerja di sitoplasma. Oleh karena itu, perlu adanya kombinasi dari antioksidan lain yaitu vitamin E yang dapat bekerja secara sinergis untuk membantu kerja curcumin. Menurut hasil penelitian Shao et al. (2002), curcumin memiliki sifat antiestrogenik yang mampu menghambat pertumbuhan sel kanker mammae. Curcumin juga bersifat sebagai antioksidan yang akan menstabilkan ROS dengan cara menyumbangkan salah satu atom hidrogen sehingga ROS tersebut menjadi kurang reaktif. Sedangkan, efek antioksidan dari vitamin E bekerja dengan cara membersihkan radikal bebas, menghambat enzim peroksidase dan melindungi membran sel dari degradasi oksidatif.

Pemberian terapi kombinasi curcumin dosis 108 mg/kgBB dan Vitamin E 300 IU/ekor menunjukkan hasil perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) pada perbandingan rata-rata kadar VEGF antara kelompok P3 (preventif) dan kelompok P4 (kuratif) dibandingkan dengan kelompok P2 (tikus kanker mammae induksi DMBA). Terjadi penurunan rata-rata kadar VEGF pada kelompok P3 dan P4 secara berturut-turut yaitu sebesar 46% dan 28%. Penurunan yang terjadi tersebut dapat diartikan bahwa penggunaan kombinasi vitamin E dan curcumin sebagai preventif maupun kuratif pada penelitian ini dapat berperan sebagai antikanker dan antioksidan yang mampu menurunkan kadar VEGF pada kondisi kanker mammae.

Terapi kuratif menggunakan injeksi doxorubicyn secara Intramuscular dengan dosis 0,198 mg/kgBB (kelompok P5) dibandingkan dengan kelompok P2 menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($p>0,05$). Hasil tersebut dapat diartikan bahwa rata-rata kadar VEGF kelompok P5 sama dengan rata-rata kadar VEGF kelompok P2 dengan persentase penurunan rata-rata kadar estrogen sebesar 10% dengan kelompok P2. Sedangkan perbandingan rata-rata kadar VEGF antara kelompok P5 dengan kelompok P1 menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian obat kemoterapi doxorubicin terhadap hewan model kanker mammae dapat berperan sebagai antikanker dan menurunkan rata-rata kadar VEGF tetapi belum dapat mencapai rata-rata kadar VEGF kelompok kontrol negatif (P1).

Pada hasil penelitian ini penggunaan kombinasi vitamin E dan curcumin sebagai terapi preventif lebih baik dalam penurunan kadar VEGF dibandingkan sebagai terapi kuratif dan penggunaan kemoterapi doxorubicin. Hal ini didukung dengan hasil perbandingan rata-rata kadar VEGF yang berbeda nyata ($p>0,05$) antara kelompok P3 dengan kelompok P2, P4 dan P5, dan menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($p>0,05$) antara kelompok P3 dengan kelompok P1.

Curcumin diketahui memiliki aktivitas antioksidan, penangkal radikal, antikanker, dan antiproliferasi. Aktivitas antioksidan dan penangkal radikal dari curcumin akan menghambat proses karsinogenesis kanker (tahap inisiasi, promosi dan progresi) dan menghambat aktivitas sitokrom P450. Curcumin akan memacu proses apoptosis dan menghambat proliferasi sel dengan menekan ekspresi VEGF. Curcumin akan berkompetisi dengan estrogen untuk berikatan dengan reseptor

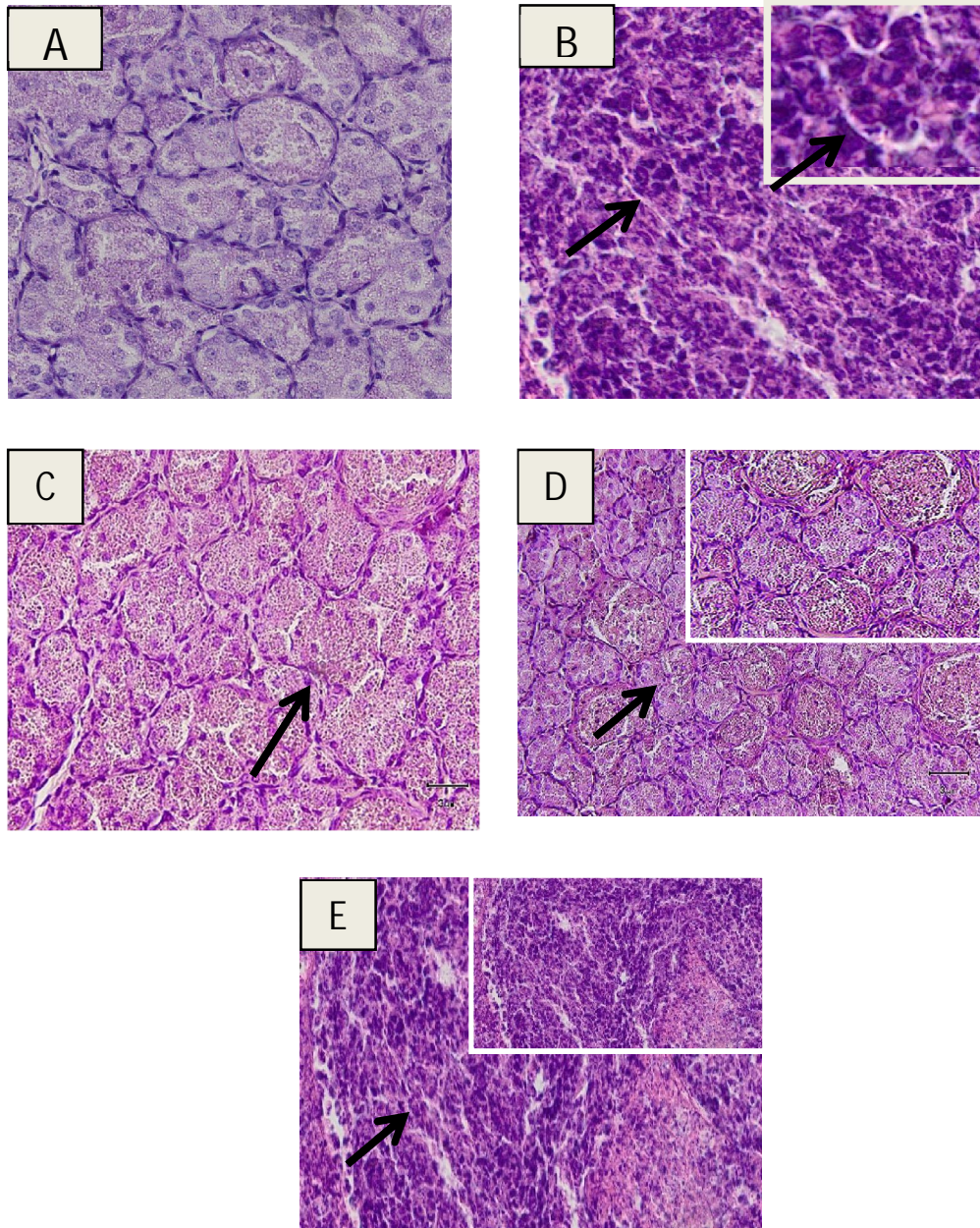
estrogen, sehingga sel kanker tidak berkembang dan akhirnya mengalami apoptosis secara intrinsic dengan mengaktifkan caspase 3 (Shao et al., 2002).

Sebagai antioksidan, vitamin E akan mengurangi peroksidasi dari asam lemak yang tidak tersaturasi oleh radikal bebas. Efek antioksidan dari vitamin E bekerja dengan cara membersihkan radikal bebas, menghambat enzim peroksidase dan melindungi membran sel dari degradasi oksidatif (Martha et al., 2013). Vitamin E berfungsi sebagai pelindung terhadap peroksidasi lipid dalam membran serta berinteraksi langsung dengan radikal peroksida lipid sehingga atom hidrogen lainnya berkurang menjadi tocopherilquinon yang teroksidasi sempurna. Selain menyumbangkan hidrogen ke dalam reaksi, vitamin E juga akan menyekat aktivitas tambahan yang dilakukan oleh peroksida, memutus reaksi berantai dan membatasi kerusakan akibat stres oksidatif. Pasien kanker membutuhkan vitamin E hingga 400 mg/hari untuk meningkatkan imunitas tubuh dalam melawan radikal bebas (Mustika, 2005).

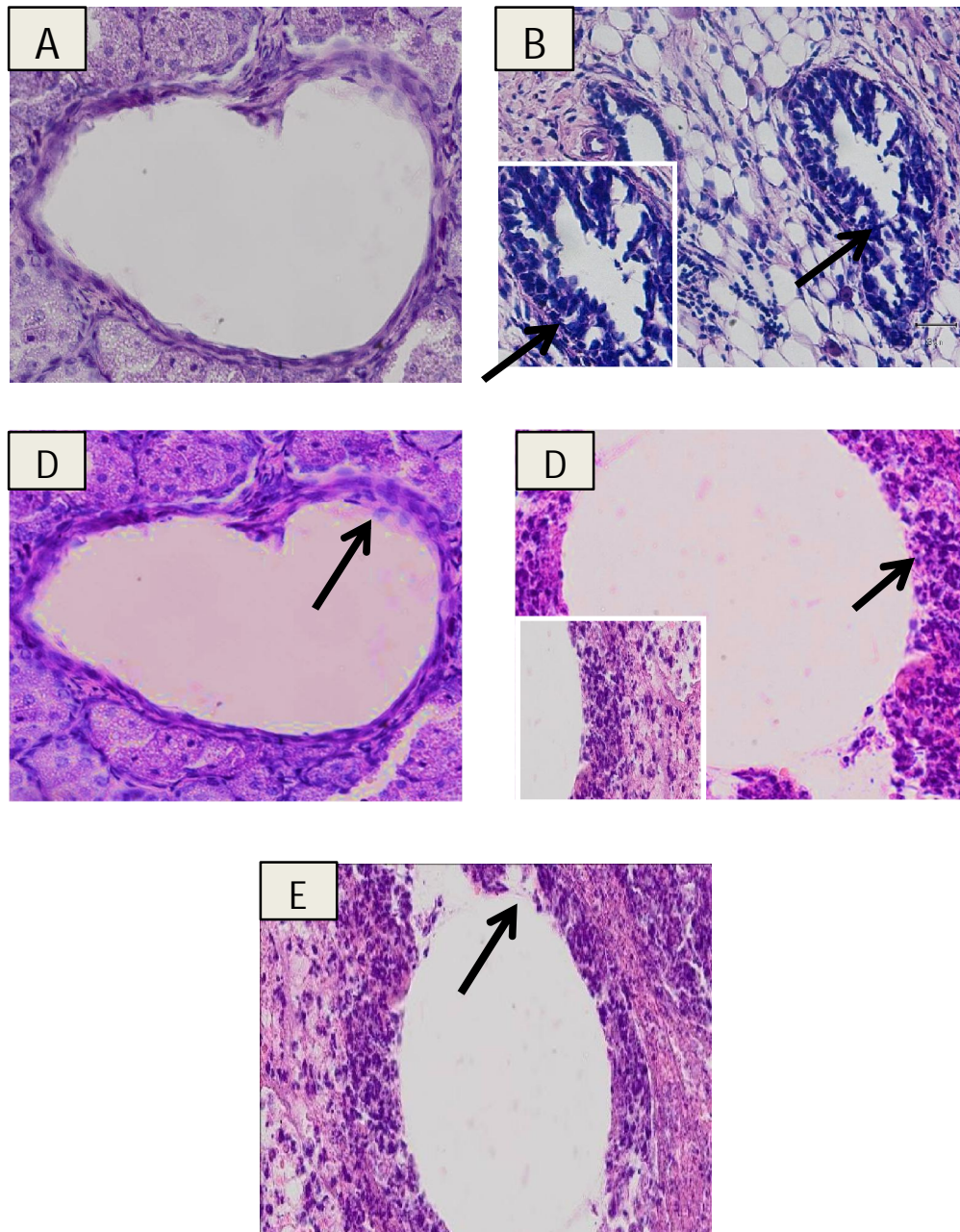
5.2 Pengaruh Terapi Preventif Dan Kuratif Kombinasi Curcumin Dan Vitamin E Dibandingkan doxorubicin Pada Hewan Model Kanker Mammae Hasil Induksi DMBA Terhadap Histopatologi Kelenjar Mammae Pada Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*)

Pengaruh terapi preventif dan kuratif kombinasi curcumin dosis 108 mg/kgBB dan Vitamin E 300 IU/ekor serta doxorubicin dosis 0,198 mg/kgBB terhadap kelenjar mammae hewan model kanker mammae diamati melalui gambaran histologi menggunakan pewarnaan hematoxilin eosin (HE) secara mikroskopis dengan perbesaran 400x. Perbandingan hasil pengamatan preparat

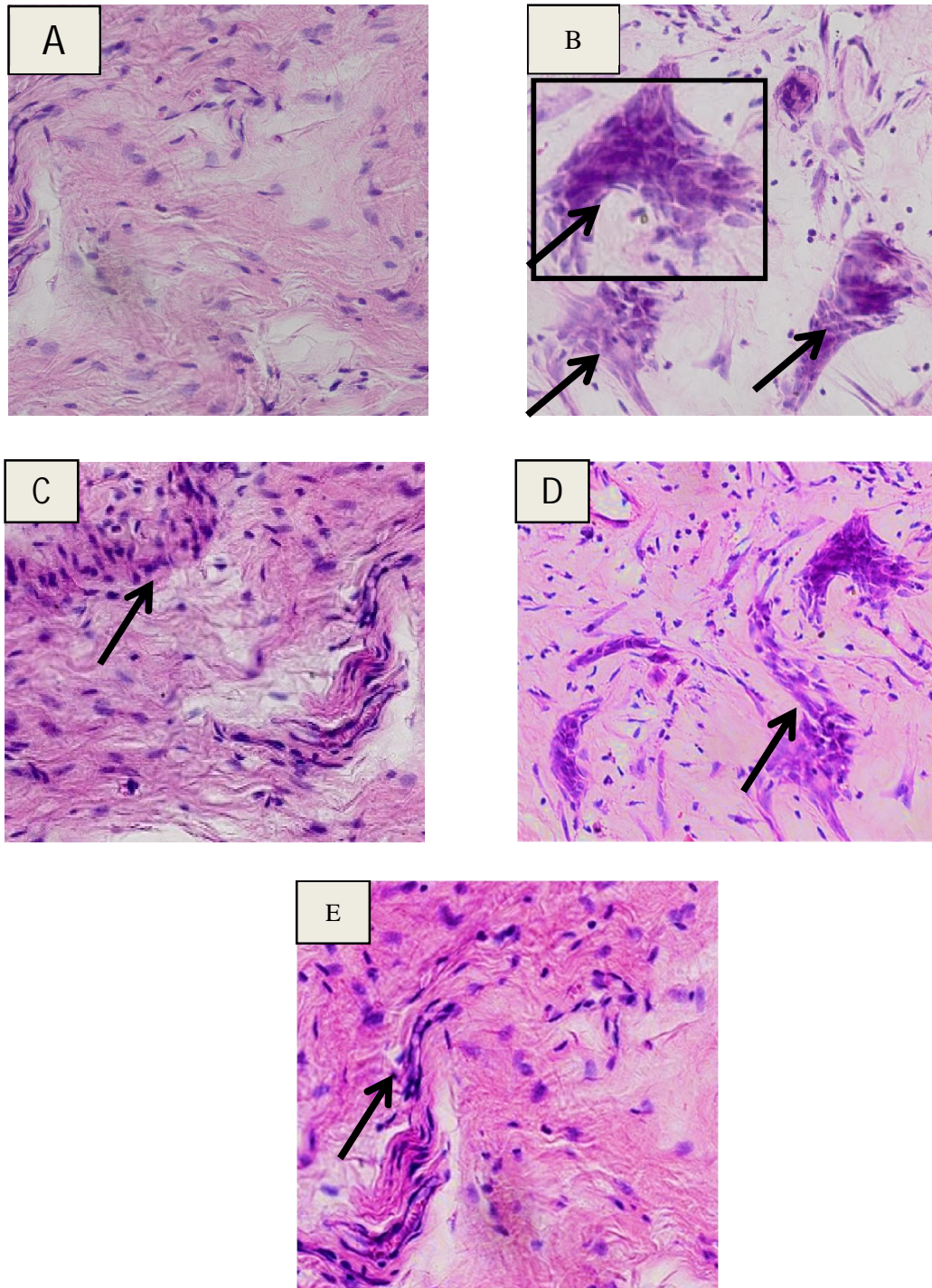
pada penelitian ini memperlihatkan adanya perbedaan pada bagian alveoli, duktus dan stroma mammae (Gambar 5.1).



Gambar 5.1 : Histopatologi alveoli kelenjar mammae dengan pewarnaan HE (400x).
Keterangan : (A) kelompok kontrol negatif (P1); (B) kelompok kontrol positif (P2) ; (C) kelompok preventif (P3) ; (D) kelompok kuratif (P4) ; (E) kelompok doxorubicin (P5)



Gambar 5.2 : Histopatologi duktus kelenjar mammae dengan pewarnaan HE (400x).
 Keterangan : (A) kelompok kontrol negatif (P1); (B) kelompok kontrol positif (P2) ; (C) kelompok preventif (P3) ; (D) kelompok kuratif (P4) ; (E) kelompok doxorubicin (P5)



Gambar 5.3 : Histopatologi stroma kelenjar mammae dengan pewarnaan HE (400x).
Keterangan : (A) kelompok kontrol negatif (P1); (B) kelompok kontrol positif (P2) ; (C) kelompok preventif (P3) ; (D) kelompok kuratif (P4) ; (E) kelompok doxorubicin (P5)

Gambaran histologi kelenjar mammae pada penelitian ini menunjukkan bahwa pada keadaan normal (kelompok P1/kontrol negatif) struktur alveoli berbentuk bulat dengan permukaan dilapisi oleh sel epitel kuboid, sel mioepitel, dan membrane basalis (Gambar 5.1-A). Sedangkan duktus mammae lumen duktus terlihat kosong dan dilapisi oleh sel epitel kuboid selapis (Gambar 5.2-A). Bagian stroma tersusun atas jaringan ikat dan jaringan lemak (Gambar 5.3-A). Gambaran ini sesuai dengan penjelasan Junqueira et al. (2007) dan Hurley (2000), bahwa gambaran histologi normal kelenjar mammae tersusun atas banyak lobulus yang membentuk beberapa lobus. Duktus interlobularis yang terdapat diantara lobus tersebut bermuara pada duktus laktiferus. Duktus interlobularis dilapisi oleh sel epitel kolumnar selapis. Jaringan pada mammae atau stroma berupa jaringan ikat dan jaringan lemak yang mengelilingi lobus-lobus. Alveoli mammae merupakan kumpulan bulat sel-sel epitel yang dilapisi oleh membran basalis. Diantara epitel alveoli dan membrane basalis terdapat sel mioepitel.

Gambaran histopatologi kelenjar mammae hewan model kanker mammae hasil induksi DMBA (Kelompok P2 / kontrol positif) menunjukkan susunan alveoli yang tidak beraturan dan tidak berbatas jelas. Sel epitel tidak berbentuk kuboid, mengalami uniformitas (dysplasia) dengan inti sel yang tampak lebih gelap (hiperkromatik) (Gambar 5.1-B). Pada gambaran histopatologi duktus mammae terlihat lumen duktus yang dipenuhi oleh sel epitel yang mengalami proliferasi sel dari permukaan duktus yang menuju lumen duktus (Gambar 5.2-B). Gambaran histopatologi stroma mammae menunjukkan adanya pembentukan gerombolan sel-sel epitel baru yang merupakan sel-sel kanker dan telah menyebar ke jaringan

sekitar (Gambar 5.3-B). Perubahan gambaran histologi alveoli, duktus dan stroma kelenjar mammae yang terjadi pada kelompok P2 menunjukkan adanya kanker mammae. Menurut Kamaralis (2009), umumnya, kanker mammae terbentuk dari sel-sel yang berasal dari duktus, namun beberapa dapat berasal dari lobulus dan jaringan lainnya.

Kanker mammae yang terjadi pada kelompok P2 disebabkan oleh induksi DMBA. Di dalam tubuh tikus, DMBA dimetabolisme oleh sitokrom p450 dan menghasilkan DMBA reaktif yang dapat merusak DNA. Kerusakan DNA memicu terjadinya mutasi gen sehingga proliferasi sel tidak terkendali dan sel mengalami perubahan bentuk. Menurut Chrestella (2009), mutasi pada DNA sel menyebabkan kemungkinan terjadinya neoplasma sehingga terdapat gangguan pada proses regulasi homeostasis sel. Karsinogenesis akibat mutasi materi genetik ini menyebabkan pembelahan sel yang tidak terkontrol dan pembentukan tumor atau neoplasma.

Mutasi yang terjadi akibat paparan DMBA selanjutnya akan merubah fungsi normal tiga gen yang mengatur pertumbuhan sel, yaitu tumor suppressor gen, gen pengatur apoptosis dan protoonkogen. Mutasi dari protoonkogen menjadi onkogen akan menyebabkan mekanisme proses pembelahan sel mengalami gangguan yaitu pembelahan sel tak terkendali yang menyebabkan proliferasi sel meningkat dan mengalami dysplasia. Inti sel dari sel dysplasia abnormal akan tampak lebih gelap (hiperkromasi). Hiperkromasi terjadi karena jumlah kromatin inti bertambah sehingga menyebabkan gambaran yang kasar dan berkelompok di tepi inti (Kresno, 2011).

Pada kondisi kanker mammae umumnya mendapatkan terapi berupa obat kemoterapi. Salah satu obat kemoterapi yang sering digunakan adalah doxorubicin. Doxorubicin adalah jenis antibiotik golongan antrasiklin yang banyak digunakan untuk terapi berbagai macam jenis kanker seperti leukemia akut, kanker payudara, kanker tulang dan ovarium (Childs et al., 2002). Doxorubicin dapat menyebabkan kardiotoxicitas pada penggunaan jangka panjang, hal itu menyebabkan penggunaannya secara klinis menjadi terbatas. Efek samping pada pemakaian kronisnya bersifat irreversibel, termasuk terbentuknya cardiomyopathy dan congestive heart failure (Han et al., 2008).

Salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk terapi kanker mammae adalah kombinasi curcumin dan vitamin E. Curcumin dan vitamin E dapat berperan sebagai antioksidan, antikanker, dan antiproliferasi. Gambaran histopatologi pada kelompok P3 (diberikan terapi preventif kombinasi curcumin dosis 108 mg/kgBB dan vitamin E 300 IU/ekor) menunjukkan perubahan yang signifikan pada alveoli, duktus dan stroma kelenjar mammae dibandingkan dengan kelompok P2. Hasil histopatologi alveoli menunjukkan terjadinya pengurangan proliferasi sel, alveoli tampak berbentuk bulat, beraturan dan berbatas jelas (Gambar 5.1-C). Pada gambaran duktus terlihat lumen duktus kosong yang menandakan proliferasi sel di dalam lumen berkurang (Gambar 5.2-C). Sedangkan pada gambaran histopatologi stroma mammae terlihat sel kanker yang menginvasi stroma berkurang serta terlihat jaringan ikat dan jaringan lemak (Gambar 5.3-C).

Gambaran histopatologi pada kelompok P4 (diberikan terapi kuratif kombinasi curcumin dosis 108 mg/kgBB dan vitamin E 300 IU/ekor) dan kelompok

P5 (diberi terapi obat doxorubicin) dibandingkan dengan kelompok P2 menunjukkan adanya pengurangan proliferasi sel yang tidak signifikan pada alveoli. Gambaran histopatologi alveoli kelompok P4 terlihat berbentuk bulat namun tidak beraturan (Gambar 5.1-D). Sedangkan gambaran histopatologi alveoli kelompok P5 sel epitel masih terlihat tidak berbentuk dan mengalami dysplasia (Gambar 5.1-E). Pada duktus kelompok P4 dan P5 masih terlihat mengalami proliferasi sel dari permukaan duktus yang menuju lumen duktus namun tidak memenuhi lumen duktus (Gambar 5.2-D-E). Pada stroma mammae kelompok P4 dan P5 masih terlihat adanya pembentukan sel kanker yang membentuk grombolan sel-sel epitel baru, namun lebih berkurang dibandingkan kelompok P2 (Gambar 5.3-D-E).

Berkurangnya proliferasi sel pada alveoli dan duktus kelenjar mammae kelompok P3 dan P4 disebabkan oleh pemberian kombinasi curcumin dan vitamin E. Vitamin E dan curcumin tersebut berperan sebagai antioksidan yang mengikat radikal bebas yang terbentuk dari kerusakan DNA akibat ikatan DMBA reaktif dengan DNA. Radikal bebas tersebut merupakan faktor yang dapat memicu peningkatan kadar Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Curcumin dan vitamin E juga akan menghambat bioaktivasi karsinogen dengan menekan enzim sitokrom p450 dan sebagai anti angiogenesis bekerja melalui penekanan produksi dari VEGF. Produksi VEGF yang ditekan akan menghambat terjadinya proses angiogenesis. Ketika proses angiogenesis terhambat maka sel kanker tidak memperoleh suplai nutrisi dan oksigen sehingga sel kanker tidak dapat

berkembang. Hal tersebut akan menghambat terjadinya proliferasi sel dan memicu apoptisis sel, sehingga pembentukan sel kanker dapat ditekan.

Berkurangnya proliferasi sel pada alveoli dan duktus kelenjar mammae kelompok P5 disebabkan karena obat doxorubicin menghambat enzim topoisomerasi II. Penghambatan enzim topoisomerase II menyebabkan proses pembelahan sel dan pembentukan DNA sel kanker terhambat, serta memicu terjadinya apoptosis. Doxorubicin dengan adanya gugus quinon yang dimilikinya juga mampu menghasilkan radikal bebas (hidrogen peroksida dan radikal hidroksil) yang menyerang DNA baik pada sel normal maupun sel kanker (Minotti et al., 2004).

Pada gambaran histopatologi alveoli, duktus dan stroma jaringan mammae yang telah diamati menunjukkan adanya keterkaitan antara perbaikan histopatologi dengan terapi yang diberikan. Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa terapi preventif kombinasi curcumin dan vitamin E memberikan hasil yang terbaik dibandingkan dengan terapi kuratif kombinasi curcumin dan vitamin E dan terapi dengan obat doxorubicin. Hal ini sesuai dengan Parker et al. (2014), bahwa terapi pemberian kombinasi curcumin dan vitamin E sangat berpotensi sebagai terapi preventif dari kanker. Senyawa antioksidan alami polifenolik pada vitamin E dan curcumin dapat berfungsi sebagai pengikat radikal bebas, peredam terbentuknya oksigen radikal, dan menghambat aktivitas enzim oksidatif.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian terapi preventif kombinasi curcumin dan vitamin E pada hewan model kanker mammae lebih efektif dibandingkan kemoterapi doxorubicin dalam menurunkan kadar VEGF hingga mendekati kadar kelompok normal (kontrol negatif)
2. Pemberian terapi preventif kombinasi curcumin dan vitamin E pada hewan model kanker mammae lebih efektif dalam menurunkan proliferasi pada sel duktus , alveoli dan stroma yang disebabkan oleh radikal bebas pada kanker.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kombinasi curcumin dan vitamin E yang dapat digunakan untuk terapi pada kanker mammae.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, T., Hannaneh, G., Annahita, R., and Mohammad, F. 2013. Classification and Grading of Canine Malignant Mammary Tumors. *Veterinary Research Forum*; 4 (1) 25-30.
- Abdullah, A., Syahrul, R., dan Isharyah, S. 2012. Penilaian Respon Kemoterapi Kombinasi Paklitaksel-Karboplatin berdasarkan Kadar Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Serum pada Kanker Ovarium Epitelial. *Bagian Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanudin. Makasar.*
- Abdullah, N. 2009. Analisis Polimorfisme Gen Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pada Endometriosis. *J Obstet Gynecol*; 33-2: 108-17.
- Akrom. 2012. Mekanisme Kemopreventif Ekstrak Heksan Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa* Lor) Pada Tikus Sprague Dawley Diinduksi 7,12 Dimethylbenz (a) antrasene Kajian Antioksidan dan Imunomodulator [Disertasi] Fakultas Kedokteran. Universitas Gajah Mada.
- Amstrong S. 2009. Homeopathic Approach to Cancer in Animal. *Homeopathy in Practice*. Page 56-59.
- Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. 2005. *Goodman & Gillman's the pharmacological basis of theurapeutics*. New York: McGraw Hill.
- Callero, M. A. dan Loaiza-Perez, A. I. 2011. The Role of Aryl Hydrocarbon Receptor and Crosstalk with Estrogen Receptor in Response of Breast Cancer Cells to the Novel Antitumor Agents Benzothiazoles and Aminoflavonei. 1-2.
- Childs, A.C., Phaneuf, S.L., Dirks, A.J., Phillips, T., and Leeuwenburgh, 2002, Doxorubicin Treatment in Vivo Causes Cytochrome c Release and Cardiomyocyte Apoptosis, As Well As Increased Mitochondrial Efficiency, Superoxide Dismutase Activity, and Bcl-2:Bax Ratio, *Cancer Research*, 62:4592-4598.
- Chun, R. 2005. Mammary Gland (Breast) Tumors in Dogs and Cats. *Textbook of Vetreinary internal Medicine*. Ettinger and Feldman.
- Chrestella, J. 2009. Neoplasma. Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran – Universitas Sumatera Utara. Medan

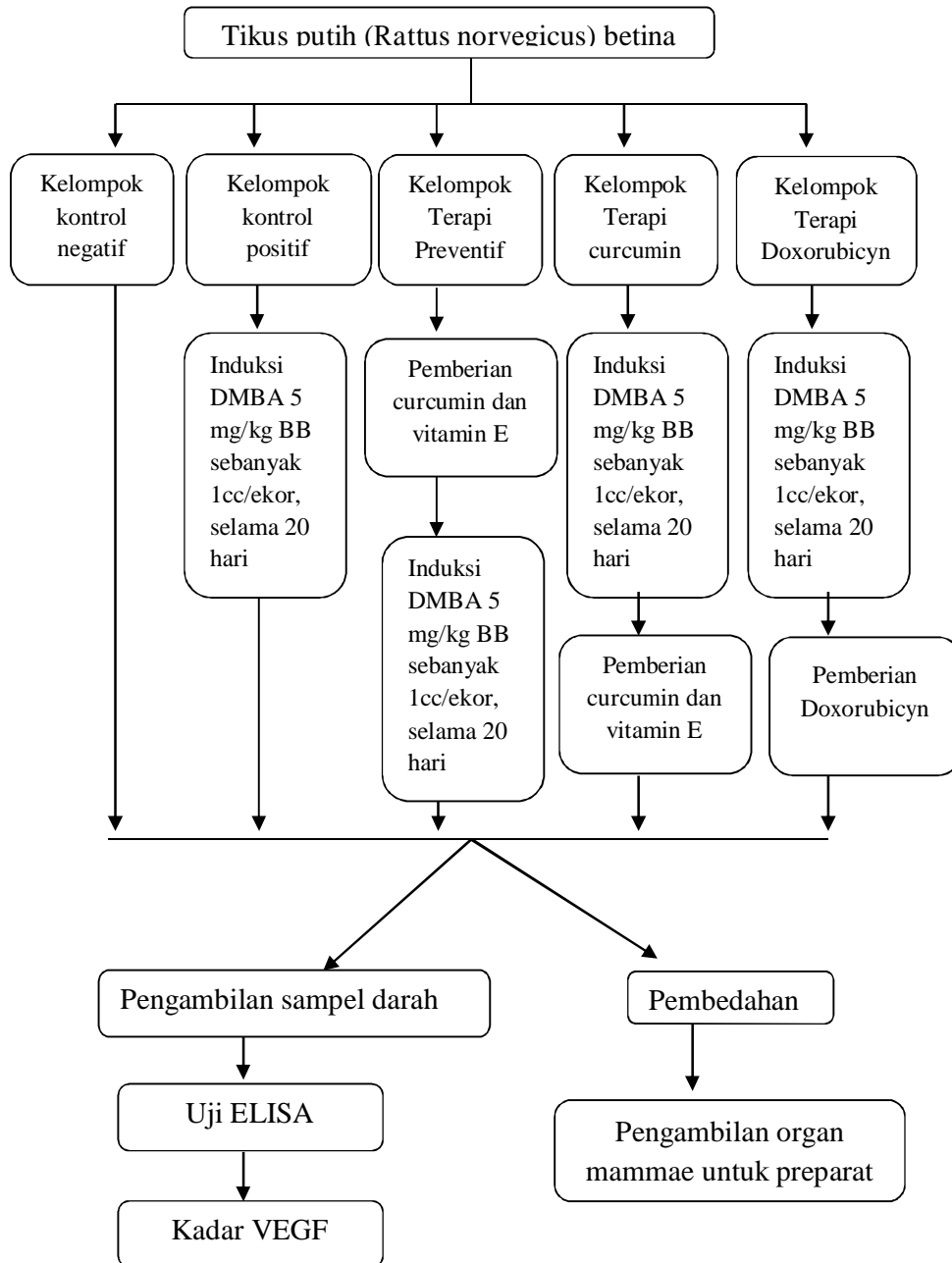
- Cordeiro M.C and Kaliwal B.B. 2011. Antioxidant Activity of Bark Extract of *Bridelia Retusa Spreng* on DMBA Induced Mammary Carcinogenesis in Female Sprague Dwley Rats. *Journal of Pharmacognosy*. Vol. Dampa2, Issue 1, 2011, pp-14-20.
- Da'I, M., E. Meiyanto, A.M Supradjan, U.A Jenie, dan M. Kawaichi. 2007. Potensi Antiproliferatif Analog Kurkumin Pentagamavunon Terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Artocarpus* 7(1):14-20
- Farida, N. 2007. Tampilan Anak Tikus (*Rattus norvegicus*) dari Induk yang Diberi Bovine Somatotropin (bST) pada Awal Kebuntingan [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Frisca, C.T., Sardjono, dan Ferry, S. 2009. Angiogenesis : Patofisiologi dan Aplikasi Klinis. *JKM*. Vol.8 No.2:174-187.
- Hakkak et al. 2005. Obesity promotes 7,12- dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor development in female zucker rats. *Breast Canc Res*. 7: 627-633.
- Hamid, I.S., Sugiyanto, Edy Meiyanto dan Sitarina Widyarini. 2013. Ekspresi CYP1A1 dan GST μ Hepatosit Terinduksi 7,12-dimetilbenz () antrasena dan Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanolik *Gynura procumbens*. *Majalah Farmasi Indonesia*, 20(4):198-206.
- Han, X., Pan, J., Ren, D., Cheng, Y., Fan, P., and Lou, H., 2008, Naringenin-7-O-glucoside protects against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by induction of endogenous antioxidant enzymes, *Food and Chemical Toxicology*, 46:3140-3146.
- Hatim, N. 2012. Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol Daun Surian (*Toona sinensis*) Pada Tikus Betina Sprague Dawley Yang Diinduksi 7,12-Dimetylbenz () antrasena [Skripsi]. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.
- Howlader, N., et al. 2011. Improved Estimates of Cancer – Specific S
- Hurley, W.L. dan D.E. Morin. 2000. Mastitis Lesson A Lactation Biology. ANSCI
- Junqueira, L.C. dan Jose C. 2007. Basic Histology Text and Atlas 11th Edition. The McGraw -Hill Company
- Kartawiguna, E. 2001. Faktor-Faktor Yang Berperan Pada Karsinogenesis. *J Kedokteran Trisakti*;20(1):16-26.

- Kresno, S.B. 2011. Ilmu Dasar Onkologi. Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Pp:183-314.
- Kuddah, A. 2009. Pengaruh Pemberian Echinacea Purpurea terhadap Produksi TNF- Makrofag dan Indeks Apoptosis Sel Tumor Mencit C3H dengan Adenokarsinoma mammae yang Mengalami Stress. Program Pendidikan Dokter Spesialis I. Ilmu Bedah. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Kubatka, P., Ahlersova E., Ahlers I., Bojkova B., Kalicka K., Adamekova E., Markova M., Mish F.C. et al., editor. 1990. Webster Ninth New Colegiate Dictionary. Springfield: Merriam- Webster.
- Leeson, C. Roland, T.S. Leeson dan A.A. Paparo. 1986. Buku ajar histologi. Edisi V. Terj. dari Textbook of histology, oleh Koesparto Siswojo dkk. EGC. Jakarta.622.
- Martha, S.A., F.F Karwur, dan F.S Rondonuwu. 2013. Mekanisme Kerja dan Fungsi Hayati Vitamin E pada Tumbuhan dan Mamalia. Seminar Nasional X Pendidikan Biologi FKIP UNS
- Meiyanto, E., Sri, T., Sri, S., Retno, M., dan Sugiyanto. 2007..Efek Kemopreventif Ekstrak Etanolik Gynura procumbens (Lour), Merr pada Karsinogenesis Kanker Payudara Tikus. Majalah Farmasi Indonesia, 18(3),154-161.
- Meiyanto, E., Rosita, M., dan Muhammad, D. 2006. PGV-1 Menurunkan Ekspresi Faktor angiogenesis (VEGF dan COX-2) pada Sel T47D Terinduksi Estrogen. Majalah Farmasi Indonesia, 17(1),1-6.
- Morrison, B.W. 2002. Cancer in Dogs and Cats: Medical and Surgical Management Second Edition. Teton NewMedia
- Melendez, C.V., L. Andreas, S. Albrecht, dan M.B. William. 1999. Cancer Initiation by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Results from Formation of Stable DNA Adducts rather than Apurinic Sites, Carcinogenesis, 20 (10) 1885-1891.
- Mustika, E.R. 2005. Pengaruh Pemberian Dosis Vitamin E Berbeda Pada Kadar Asam Lemak n-3 dan n-6 Tetap (1:3) dalam Pakan Terhadap Penampilan Reproduksi Ikan Zebra (Brachydanio rerio) Prasalin. [Skripsi]. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor

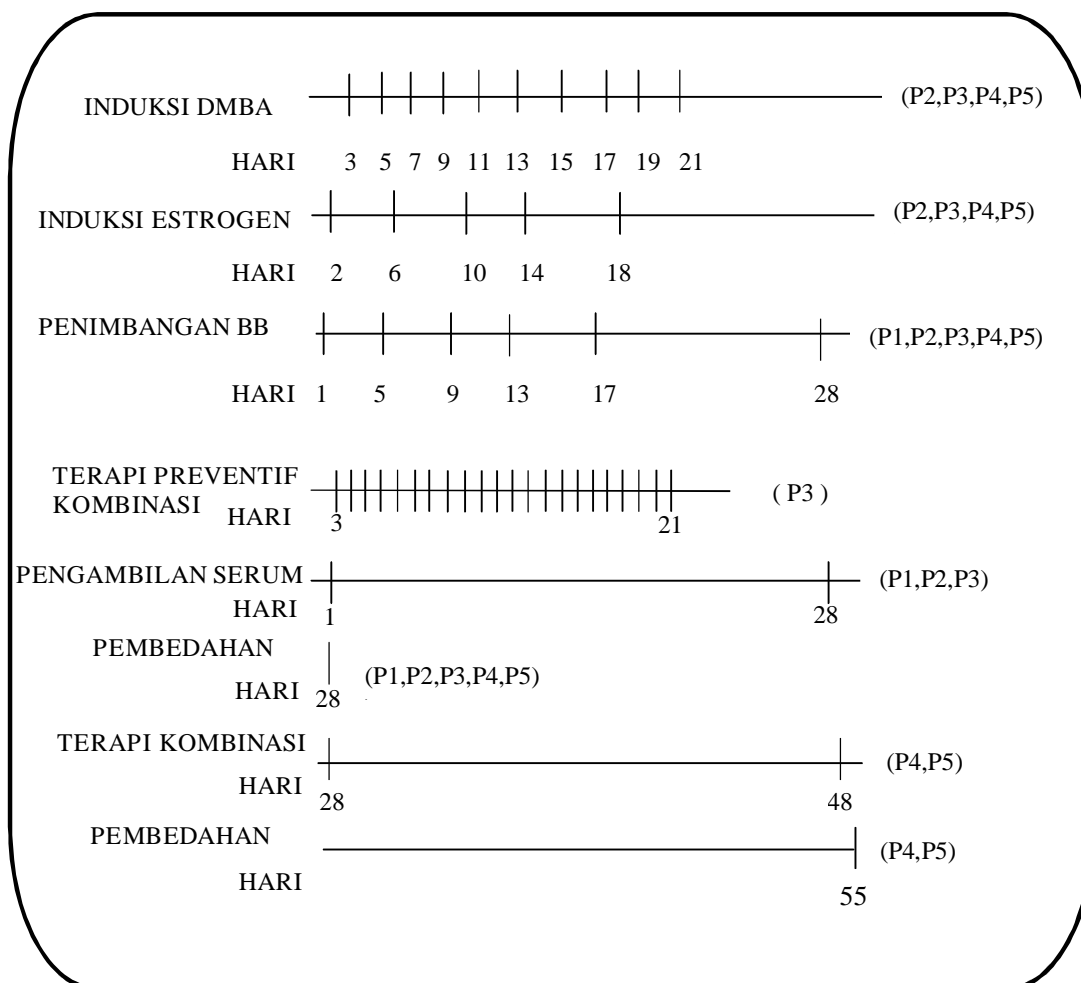
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., and Gianni, L. 2004. Anthracyclins: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.*, 56:185-228.
- Myers, P. dan Armitage D., 2004, *Rattus norvegicus*, Animal Diversity Web, http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_norvegicus.html yang diakses pada tanggal 21 April 2017
- Namazi, M.R. 2009. Cytochrome P-450 Enzymes And Autoimmunity: Expansion Of The Relationship And Introduction Of Free Radicals As The Link. 6: 4.
- Packer, L. dan Cadenas, E., 2002, *Handbook of Antioxidants*, ed. 2, Marcel Dekker, Inc., New York
- Parker, R; L. Ulatowski, G. Warriar, R. Sultana. 2014. Vitamin E Is Essential For Purkinje Neuron Integrity. *Neuroscience* 260 120 – 129.
- Papetti, M., and Herman, I.M. 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C947-C970.
- Peeters, P.H., L. Keinan-Boker, Y.T. van der Schouw, dan D.E. Grobbee. 2003. Phytoestrogens and Breast Cancer Risk, Review of The Epidemiological Evidence, 77: 175-83.
- Polton, G. 2009. Mammary Tumours in Dogs. *Irish Veterinary Journal* Vol. 62 No.1.
- Porter William P. 2005. *Rats and Mice: Introduction and Use in Research*. Cincinnati, Ohio. Laboratory Animaland Science, Marion Merrel Dow Inc.
- Ranasasmita, R. 2008. Aktifitas Antikanker Ekstrak Etanol Daun *Aglaia elliptica* Blume Pada Tikus Betina Yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz(0)Antrasena [Skripsi]. Program Studi Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.
- Sandur SK, Ichikawa H, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Sethi G, Aggarwal BB. 2007. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane) Free radical biology & medicine. a;43:568–580. [PMC free article] [PubMed]
- Samiasih, A. 2010. Perbedaan Ekspresi VEGF Sel Adenokarsinoma Kolorektal Tikus Sprague Dawley dengan dan Tanpa Pemberian Ekstrak *Phyllanthus niruri* [Tesis]. Megister Ilmu Biomedik. Universitas Diponegoro.Semarang.

- Shao, Z., Shen, Z., Liu, C., Sartippour, M.R., Go, V.L., Heber, D., and Nguyen, M., 2002, Curcumin Exerts Multiple Suppressive Effects on Human Breast Carcinoma Cells. *Int. J. Cancer*. 98: 234-240
- Schnitt, S.J., 2003, The Diagnosis and Management of Pre-invasive Breast Disease: Flat Epithelial Atypia-Classification, Pathologic Features and Clinical Significance, *Breast Cancer Res.*, 5(5): 263–268.
- Sigma-Aldrich. 2007. 7,12-Dimethylbenz[] anthracene. <http://www.sigmaaldrich.com>. [26 April 2007].
- Tammama, T. 2012. Angiogenesis dan Metastasis. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Young, B., Lowe, J.S., Stevens A. dan Heath, J.W. 2007. Wheater's Functional Histology A Text and Colour Atlas Fifth Edition, Elsevier Inc. 386-390.

Lampiran 1: Kerangka Operasional Penelitian



Lampiran 2. Timeline Penelitian



Keterangan:

Induksi DMBA dilakukan setiap dua hari sekali sebanyak 10 kali. Induksi DMBA dilakukan pada hari ke-3, ke-5, ke-7, ke-9, ke-11, ke-13, ke-15, ke-17, ke-19, dan hari terakhir induksi ke-21. Induksi estrogen dilakukan satu minggu dua kali selang waktu sehari sebelum induksi DMBA. Induksi estrogen dilakukan sebanyak lima kali pada hari ke-2, ke-6, ke-10, ke-14, dan hari ke-18. Tikus

ditimbang berat badannya sebanyak lima kali pada hari ke-1, Tikus diambil sampel darahnya untuk pembuatan serum pada hari ke-1 dan ke-28.

Lampiran 3:

1. Dosis DMBA

- Dosis Induksi : 5 mg/kg BB

$$\begin{aligned} \text{Dosis} &= \frac{\quad}{\quad} \times 200 \text{ gram} \\ &= 1 \text{ mg/ekor} \end{aligned}$$

- Volume Pelarut : 1ml/ekor tikus
Perbandingan Pelarut = NS : MBBM
1 : 3 = 4

Maka Pelarut yang dibutuhkan

$$\begin{aligned} \text{NS} &= \text{—} \\ &= 0,25 \text{ ml/ ekor} \\ &= 1 \text{ ml} - 0,25 \text{ ml} = 0,75 \text{ ml/ekor} \end{aligned}$$

2. Dosis Estrogen

- Dalam 1 ml mengandung dosis estrogen 20.000 IU
- Dosis induksi estrogen 0,2 ml
= 0,2 ml/1 ml x 20.000 IU
= 4000 IU per ekor

3. Dosis Curcumin

$$\begin{aligned} \text{Dosis} &= \frac{\quad}{\quad} \times 200 \text{ gram} \\ &= 21,6 \text{ mg/ekor} \end{aligned}$$

4. Dosis Doxorubicyn

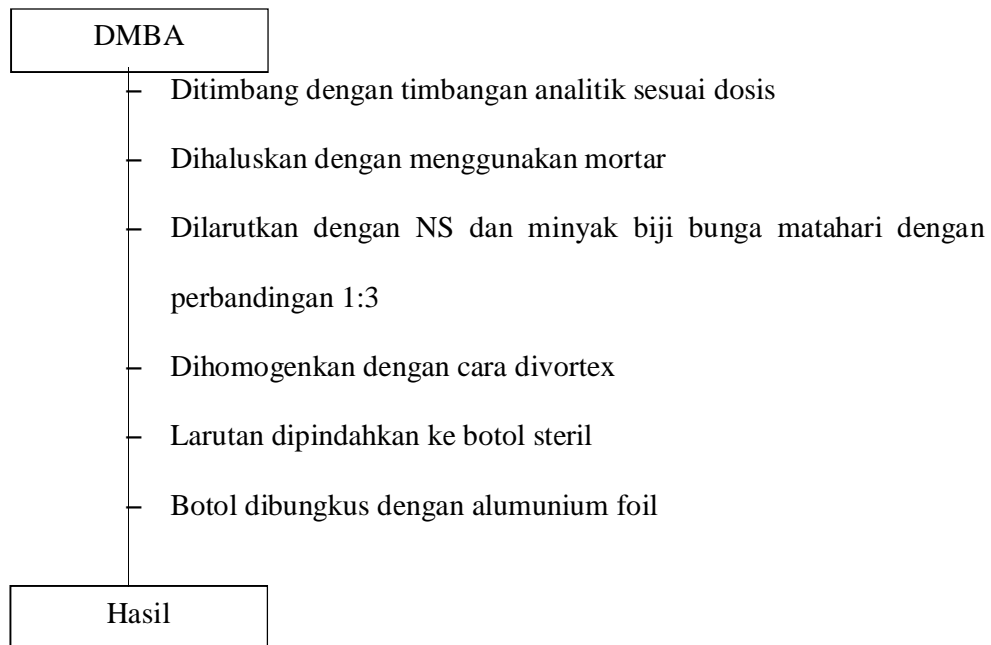
$$\begin{aligned} \text{Dosis} &= \frac{\quad}{\quad} \times 200 \text{ gram} \\ &= 0,0396 \text{ mg/ekor} \\ \text{Sediaan : 1 vial} &= 5 \text{ ml} \Rightarrow 1 \text{ ml} = 2 \text{ mg} \\ \text{Dosis pemberian :} &= \frac{\quad}{\quad} \end{aligned}$$

$$X = 0,02 \text{ ml}$$

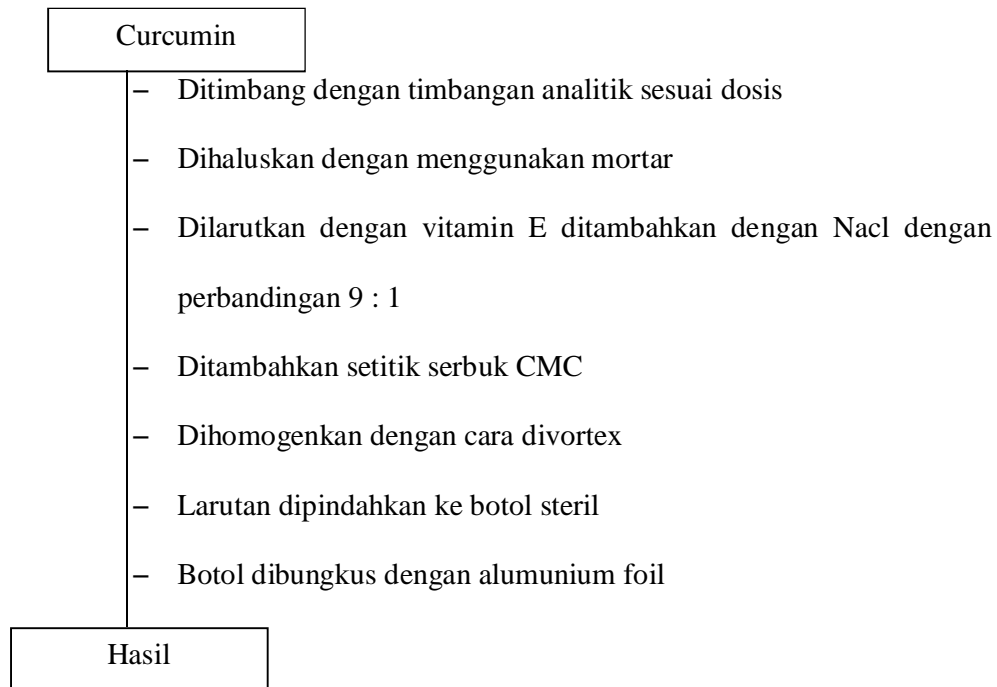
5. Dosis Vitamin E

- Sediaan d – a – tocopherol = 100IU/kapsul
- Dosis = 300IU/ekor
- Sediaan yang digunakan 3 kapsul d – a – tocopherol

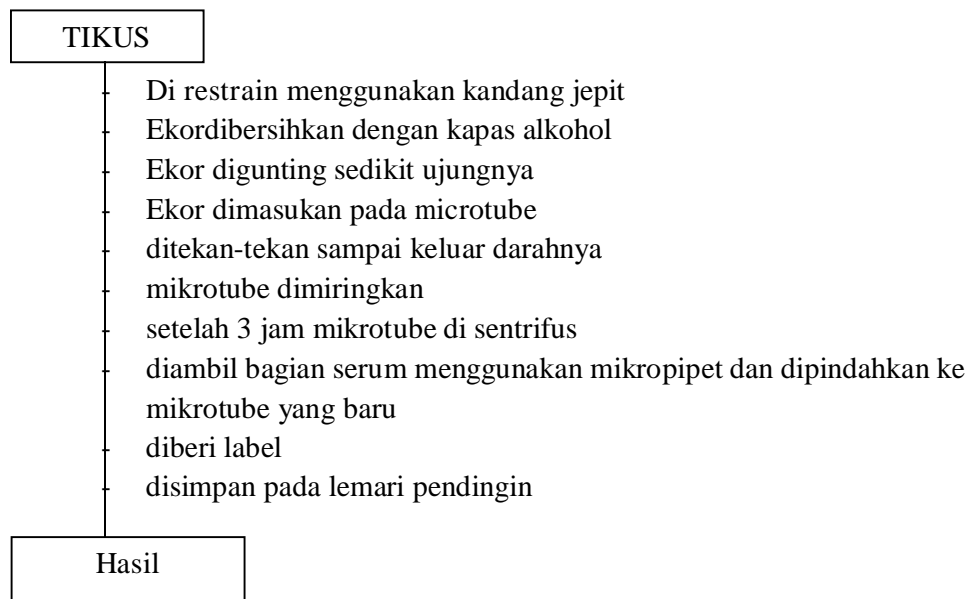
Lampiran 4: Pembuatan larutan DMBA



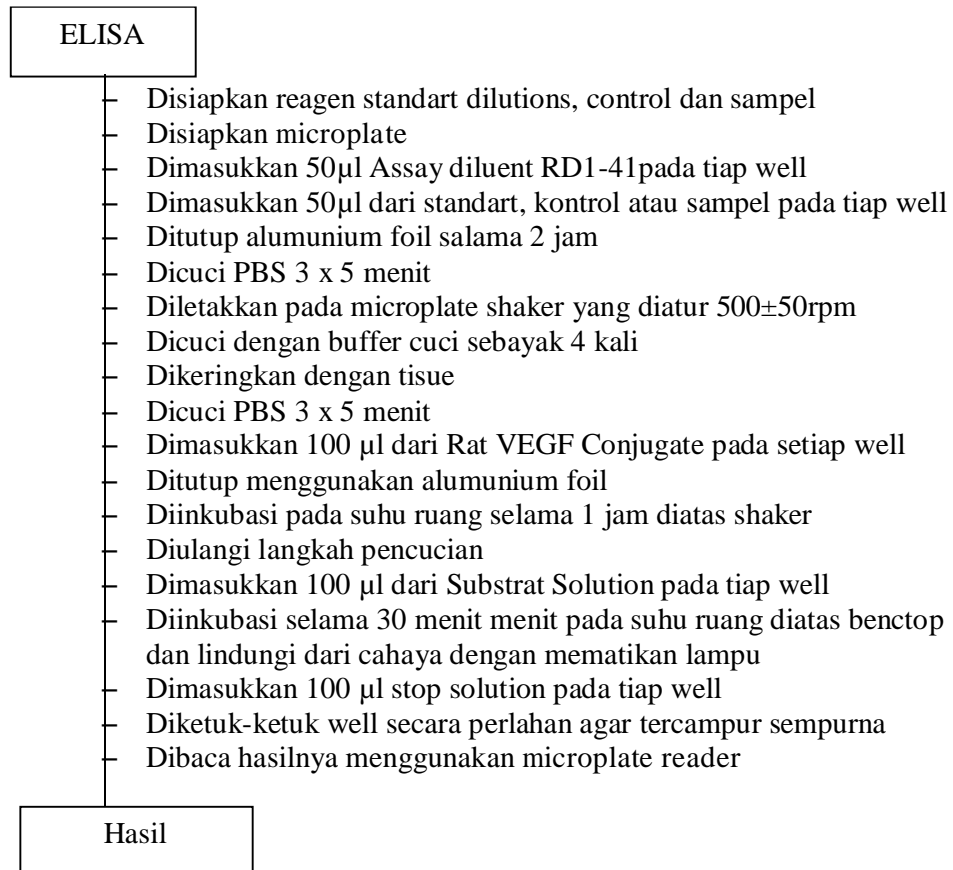
Lampiran 5: Pembuatan larutan Curcumin dan Vitamin E



Lampiran 6: Pengambilan Sampel Darah dan Isolasi Serum

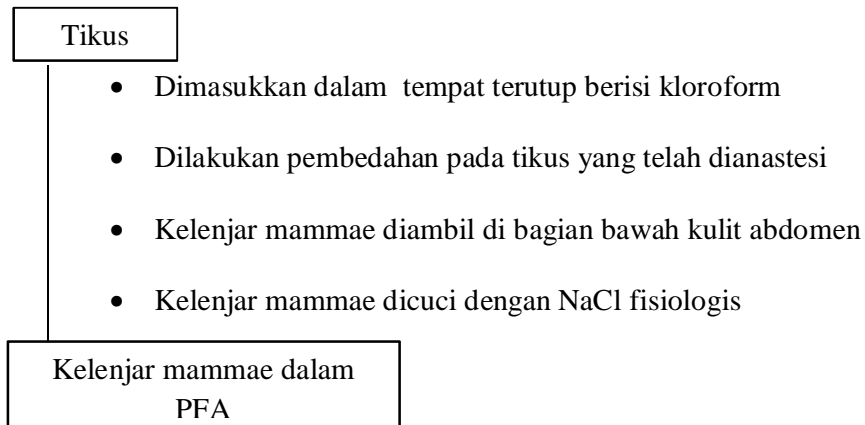


Lampiran 7: Pengukuran Kadar VEGF dengan ELISA

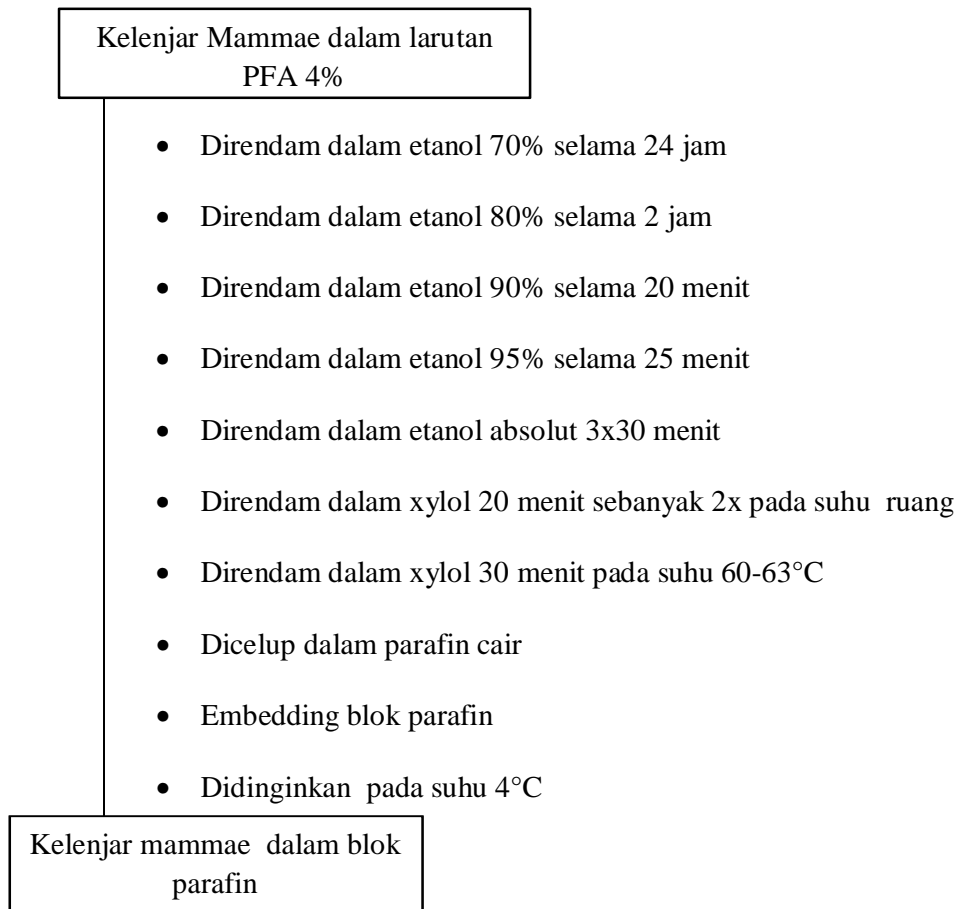


Lampiran 8. Pembuatan Preparat Histopatologi

8.1 Pengambilan Organ



8.2 Pembuatan Preparat



Pembuatan preparat organ

Kelenjar Mammae dalam blok parafin

- Diiris seukuran 4 μm pada bagian median
- Didinginkan diatas air dingin
- Dimasukkan dalam air hangat pada suhu 37°C
- Diambil dan ditempatkan pada gelas objek
- Preparat hepar disimpan dalam inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam

Preparat siap pewarnaan

8.3 Pewarnaan Hematoxylen Eosin

Preparat

- Dideparafinasi dengan xilol selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol absolut selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 90% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 70% selama 5 menit
- Dicuci dengan air mengalir selama 15 menit
- Direndam dengan akuades steril selama 5 menit
- Diwarnai dengn hematoksilin selama 10 menit
- Dicuci dengan air mengalir selama 30 menit
- Dibilas dan direndam dengan akuades selama 5 menit

- Diwarnai dengan eosin selama 5 menit
- Dimasukkan dalam etanol 70% selama 5 detik
- Dimasukkan dalam etanol 80% selama 5 detik
- Dimasukkan dalam etanol 90% selama 5 detik
- Dimasukkan dalam etanol 95% selama 5 detik
- Dimasukkan ke dalam etanol absolut 3 x 2 menit
- Dimasukkan dalam lantan xilol diulang 3 x 3 menit
- Dikering anginkan
- Dimounting dengan menggunakan entellan
- Ditutup dengan cover glass

Preparat Kelenjar Mammae
Pewarnaan HE

Lampiran 9 Hasil Uji Statistika

Tabel 9.1 Uji Normalitas Data (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kadar VEGF
N		20
Normal Parameters ^a	Mean	23.79475
	Std. Deviation	7.271211
Most Extreme Differences	Absolute	.144
	Positive	.144
	Negative	-.124
Kolmogorov-Smirnov Z		.642
Asymp. Sig. (2-tailed)		.805

a. Test distribution is Normal.

Hasil pengujian normalitas nilai menunjukkan nilai signifikansi (p) sebesar 0,805. Oleh karena nilai $p > 0.05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar dengan normal

Tabel 9. 2 Uji Homogenitas Varian

Test of Homogeneity of Variances

Kadar VEGF

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.200	4	15	.351

Hasil pengujian menunjukkan nilai dari levene test sebesar 0.351 dengan nilai signifikansi (p) sebesar 1.200. Oleh karena nilai $p > 0,05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai ragam yang homogen

Pengujian nilai homogenitas dan nilai normalitas sampel telah memenuhi asumsi sehingga pengujian dengan menggunakan ANOVA dapat dilanjutkan.

Tabel 9.3 Uji statistik ANOVA

ANOVA

Kadar VEGF					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	952.124	4	238.031	68.119	.000
Within Groups	52.415	15	3.494		
Total	1004.540	19			

Nilai $p < 0,05$ dan F hitung $> F$ tabel, maka dapat diputuskan untuk tolak H_0 , yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara perlakuan

Tabel 9.4 Uji Tukey

Kadar VEGF

Tukey HSD

kelompok	N	Subset for alpha = 0.05		
		a	b	c
kontrol negatif	4	14.67475		
terapi preventif	4	17.79250		
terapi kuratif	4		23.88175	
terapi doxorubicyn	4			29.61050
kontrol positif	4			33.01425
Sig.		.180	1.000	.126

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 189-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL : KOMBINASI TERAPI CURCUMIN DENGAN
VITAMIN E SEBAGAI PRODUK HERBAL
PENUNJANG PENGOBATAN KANKER MAMMAE
PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) MODEL KANKER
MAMMAE

PENELITI : ANNA ROOSDIANA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : KIMIA /F-MIPA/ UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 6 Desember 2013
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001