

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Pemeriksaan Hewan Model Kanker Mammae

Hewan model kanker dibuat dengan induksi 7,12 *dimethylbenz [α] anthracene* (DMBA) dengan dosis 10 mg/kgBB yang diberikan sebanyak 10 kali dengan interval waktu 48 jam secara *subcutan* dan induksi estrogen dengan dosis 20.000 IU/kgBB yang diberikan sebanyak 5 kali dengan interval waktu 96 jam secara *intramuscular*. Menurut Khasanah (2013) salah satu gejala kanker mammae adalah terbentuknya nodul atau massa keras yang bentuknya tidak beraturan di sekitar mammae. Oleh karena itu, pemeriksaan hewan coba dilakukan dengan mengamati terbentuknya nodul pada mammae. Pemeriksaan nodul dilakukan dengan palpasi atau perabaan yang dilakukan seminggu sekali. Nodul kanker pertama muncul pada hari ke 14 setelah induksi DMBA 10 mg/kgBB. Pada hari ke 28 nodul semakin membesar, mengeras dan tidak dapat digerakan. Nodul tersebut digunakan sebagai penanda keberhasilan induksi DMBA dapat menyebabkan terjadinya kanker mammae. Nodul kanker terbentuk melalui perkembangan sel yang berlebih (proliferasi) sehingga membentuk massa padat, dan bentuknya tidak beraturan. Pada pemeriksaan makroskopis terlihat jaringan yang berwarna kuning serta jaringan ikat fibrosa yang banyaknya tergantung dari lamanya lesi. Pernyataan tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan (Laili, 2015) yang menyatakan bahwa hasil pengamatan mikroskopis kelenjar mammae tikus yang diinduksi DMBA dosis 10 mg/kg BB sebanyak 10 kali dengan interval 48 jam secara *subcutan*, menunjukkan bahwa nodul yang terbentuk adalah berupa proliferasi sel epitel yang berkembang menjadi sel kanker.



Gambar 5.1 Gambar A: Tikus kelompok kontrol pada hari ke-14; Gambar B: Tikus kelompok perlakuan hari ke-14 telah terbentuk nodul (↑)

Menurut McCarthy *et al* (2003), kanker pada kelenjar mammae dapat didiagnosis melalui adanya benjolan pada daerah sekitar mammae yang ditandai dengan adanya massa padat, keras dan tidak bergerak. Pada penelitian ini, diketahui terdapat bentukan massa padat atau nodul semakin membesar dan mengeras pada hari ke-28 atau satu minggu setelah 10x induksi diberikan, yang menunjukkan massa kanker telah terbentuk pada mammae tikus.

Pemberian induksi DMBA secara subkutan menyebabkan paparan DMBA langsung menuju ke organ target yaitu mammae. Menurut Kuhl (2013), 90% zat DMBA yang masuk ke dalam tubuh akan tereliminasi setelah 48 jam. Oleh sebab itu, dengan waktu induksi selama 2 hari sekali, diharapkan kadar DMBA dalam tubuh akan tetap stabil dan secara konstan terpapar pada jaringan sehingga inisiasi kanker dapat berlangsung lebih cepat. Pemberian estradiol dalam penelitian ini juga bertujuan untuk mempercepat terjadinya kanker mammae. Estradiol mampu meregulasi peningkatan ekspresi P450 melalui ikatannya dengan *estrogen receptor* (ER). Dengan demikian, pemberian estradiol mampu meregulasi

sitokrom P450 yang kemudian berfungsi untuk memetabolisme DMBA menjadi zat metabolit aktif yang memicu terjadinya kanker. Kerusakan DNA oleh metabolit aktif DMBA akan menyebabkan mutasi DNA yang berakibat inaktivasi dari *Tumor Suppressor Gen* (p53) yang merupakan inhibit terhadap pertumbuhan sel sehingga pertumbuhan sel tidak dapat dihambat dan proliferasi sel terjadi secara terus-menerus (Perhimpunan Onkologi Indonesia, 2010).

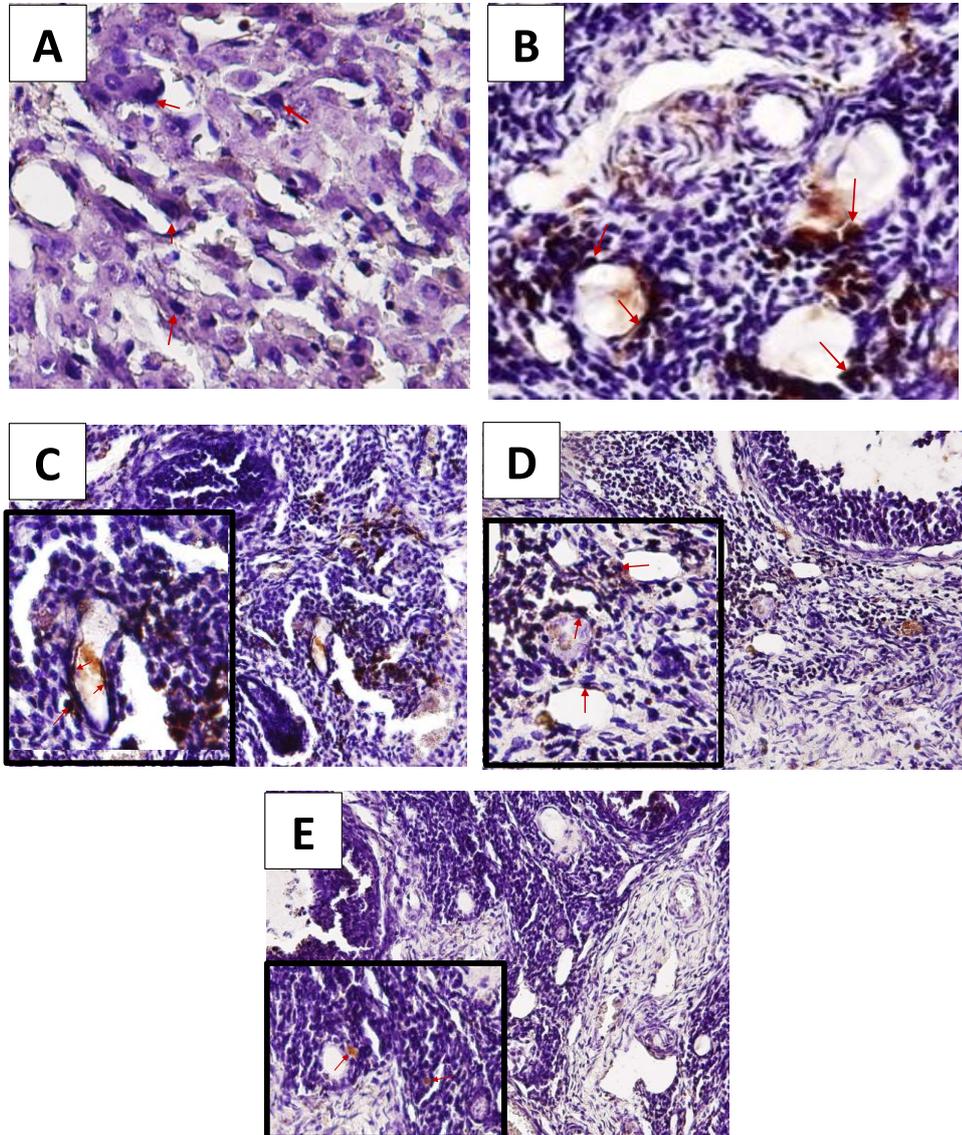
Terlihatnya nodul sebagai marker timbulnya kanker dapat digunakan sebagai pemeriksaan awal keberhasilan terjadinya kanker untuk selanjutnya dilakukan pemeriksaan terhadap ekspresi IL-1 dan COX-2 dalam mengetahui pengaruh terjadinya kanker mammae hasil induksi zat DMBA terhadap organ ovarium.

5.2 Pengaruh Terapi Kombinasi Kurkumin dan Vitamin E Terhadap Ekspresi Interleukin- 1 (IL-1) pada Ovarium Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Kanker Mammae Hasil Induksi DMBA

Ekspresi IL-1 pada ovarium tikus kanker mammae dapat diamati melalui pewarnaan IHK dengan adanya ekspresi warna coklat pada jaringan. Warna coklat tersebut dihasilkan melalui adanya ikatan antara antigen dan antibodi, dimana antigen dari protein IL-1 akan berikatan dengan antibodi yang spesifik. Ikatan antara antigen dan antibodi yang spesifik ini kemudian akan diidentifikasi oleh marker DAB yang berikatan dengan O₂ untuk memberikan warna coklat, sebagai penanda adanya ikatan antara antibodi dengan antigen spesifik. Banyaknya ikatan antara antigen dan antibodi menunjukkan adanya ekspresi IL-1

melalui adanya warna coklat yang terlihat pada sel-sel epitel ovarium seperti pada

Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Ekspresi IL-1 pada ovarium tikus dengan perbesaran 400x.
Keterangan (A): Kontrol Negatif (KN); (B): kelompok kontrol positif (KP); (C): kelompok perlakuan dosis 1 (P1); (D) kelompok perlakuan dosis 2 (P2); (E): kelompok perlakuan dosis 3 (P3); (↖): warna coklat ekspresi IL-1.

Perhitungan jumlah ekspresi IL-1 diukur menggunakan software *Immunoratio* dari rata-rata persentase area yang diukur pada 5 lapang pandang.

Persentase area ekspresi IL-1 pada ovarium tikus hewan model kanker mammae ditampilkan pada **Tabel 5.2**.

Tabel 5.2 Rata-rata Presentase Area Ekspresi IL-1 pada Ovarium Tikus Hewan Model Kanker Mammae

Kelompok		Rata-rata Ekspresi IL-1 ± SD (%)	Peningkatan terhadap (K-)	Penurunan terhadap (K+)
Kontrol –	(KN)	24,87 ± 2,18 ^{ab}	-	-
Kontrol +	(KP)	55,29 ± 5,58 ^d	122,3 %	-
Terapi 1	(P1)	41,62 ± 3,55 ^c	-	24,72 %
Terapi 2	(P2)	30,06 ± 3,37 ^b	-	45,62 %
Terapi 3	(P3)	22,08 ± 1,62 ^a	-	60,00 %

Keterangan: Perbedaan notasi a, b, c, dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) antar kelompok perlakuan

Hasil rata-rata ekspresi IL-1 pada **Tabel 5.2** menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol negatif (KN) sebesar $24,87 \pm 2,18$ dapat digunakan sebagai nilai standar ekspresi IL-1 pada ovarium tikus dalam keadaan normal. Nilai standar dari KN dapat digunakan sebagai acuan untuk menentukan adanya penurunan atau peningkatan. Pada kelompok normal atau kontrol negatif, IL-1 terakspresikan secara alami dalam jumlah sedikit oleh neutrofil dan sel-sel epitel ovarium. Peran dari sitokin IL-1 pada kontrol negatif didalam tubuh yakni sebagai indikator terhadap respon inflamasi (Ghosh dan Sengupta,2004).

Sitokin IL-1 merupakan kelompok sitokin urutan pertama yang berperan dalam respon imun untuk memperkuat pengaktifan limfosit oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) (Dinarello, 2005). Sel makrofag sebagai sel APC (*Antigen*

Presenting Cell) mempunyai molekul MHC klas II. Melalui MHC klas II, sel B akan menerima antigen kemudian antigen ini dibawa ke permukaan sel untuk mengaktivasi sel T helper lalu sel-sel tersebut akan mensekresikan sitokin. Sitokin diproduksi oleh berbagai sel termasuk sel-sel kekebalan tubuh seperti makrofag, limfosit B, limfosit T dan sel mast, serta sel-sel endotel, fibroblas, dan berbagai sel stroma. Peran dari sitokin ini sebagai mediator dan pengatur imunitas, inflamasi, dan hematopoiesis serta dihasilkan sebagai respon terhadap stimulus sistem imun (Horst,2013).

Hasil rata-rata ekspresi IL-1 pada kelompok kontrol positif (KP) menunjukkan peningkatan sebesar 122,3 % jika dibandingkan dengan kelompok KN. Peningkatan ekspresi IL-1 menunjukkan bahwa induksi DMBA yang diberikan berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi IL-1 pada ovarium tikus. DMBA merupakan zat metabolit aktif sehingga terbentuk DNA *adduct* yang dapat menimbulkan kerusakan DNA dan memicu terjadinya proliferasi yang terus menerus berkembang menjadi sel kanker (Hendris dan Iswahyudi, 2013).

Peningkatan jumlah ekspresi IL-1 pada organ ovarium dalam penelitian ini disebabkan tingginya kebutuhan estrogen oleh sel kanker sehingga memicu ovarium menghasilkan estrogen lebih banyak. Keadaan ini memicu ROS mengaktivasi respon sitokin proinflamatori IL-1 sehingga dapat terekspresikan sel epitel di ovarium menghasilkan IL-1 dalam jumlah tinggi. Akumulasi senyawa ROS (*reactive oxygen species*) pada ovarium sebagai hasil dari proses metabolisme zat karsinogen DMBA, zat aktif DMBA yang terdistribusi melalui aliran darah menyebabkan adanya peningkatan jumlah ROS secara sistemik, sehingga menimbulkan kondisi stress oksidatif tidak hanya terjadi pada mammae,

melainkan juga pada organ disekitar mammae, yaitu ovarium. Kondisi stress oksidatif pada ovarium memicu makrofag untuk mengaktivasi sitokin proinflamatori. Pemberian zat asing melalui induksi subkutan ini akan didistribusi melalui jaringan kulit menuju pembuluh kapiler untuk kemudian diedarkan melalui peredaran darah sistemik dan menuju ke hepar untuk dimetabolisme. Proses metabolisme dari zat DMBA tersebut menghasilkan produk senyawa radikal bebas yaitu ROS yang mudah untuk diikat oleh darah dan masuk ke dalam aliran darah sistemik dan menuju ke ovarium (Gunawan *et al.*, 2005).

Pemberian terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E pada tikus yang telah diinduksi DMBA menunjukkan hasil yang beragam. Kurkumin merupakan senyawa polifenol yang terdapat dalam rimpang kunyit (*Curcuma longa L*) dengan aktivitas biologi sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Antioksidan dari vitamin E akan melindungi dari serangan radikal bebas dan menghentikan reaksi berantai atau oksidasi perusak (Aggarwal *et al.*, 2005, Widjayakusuma, 2005). Akan tetapi, dari hasil kelompok terapi 1 dan 2 masih belum menunjukkan perbedaan signifikan terhadap kontrol positif.

Kelompok terapi 1 (P1) yang diberikan terapi kurkumin 48mg/kg BB dan vitamin E 300 IU/ekor menunjukkan penurunan dibanding dengan KP yaitu sebesar 24,72% dan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($\alpha < 0,05$) yaitu berbeda nyata terhadap kelompok lainnya pada uji *Tukey*.

Kelompok terapi 2 (P2) yang diberikan terapi kurkumin 72mg/kg BB dan vitamin E 200 IU/ekor menunjukkan penurunan dibanding dengan KP yaitu sebesar 45,62% Hasil uji *Tukey* pada P2 menunjukkan perbedaan yang signifikan ($\alpha < 0,05$) yaitu berbeda nyata terhadap kelompok lainnya. Maka dapat dikatakan

dosis kurkumin 72 mg/kgBB dan Vitamin E 200 IU/ekor mampu menurunkan ekspresi IL-1 namun belum mampu menurunkan secara efektif.

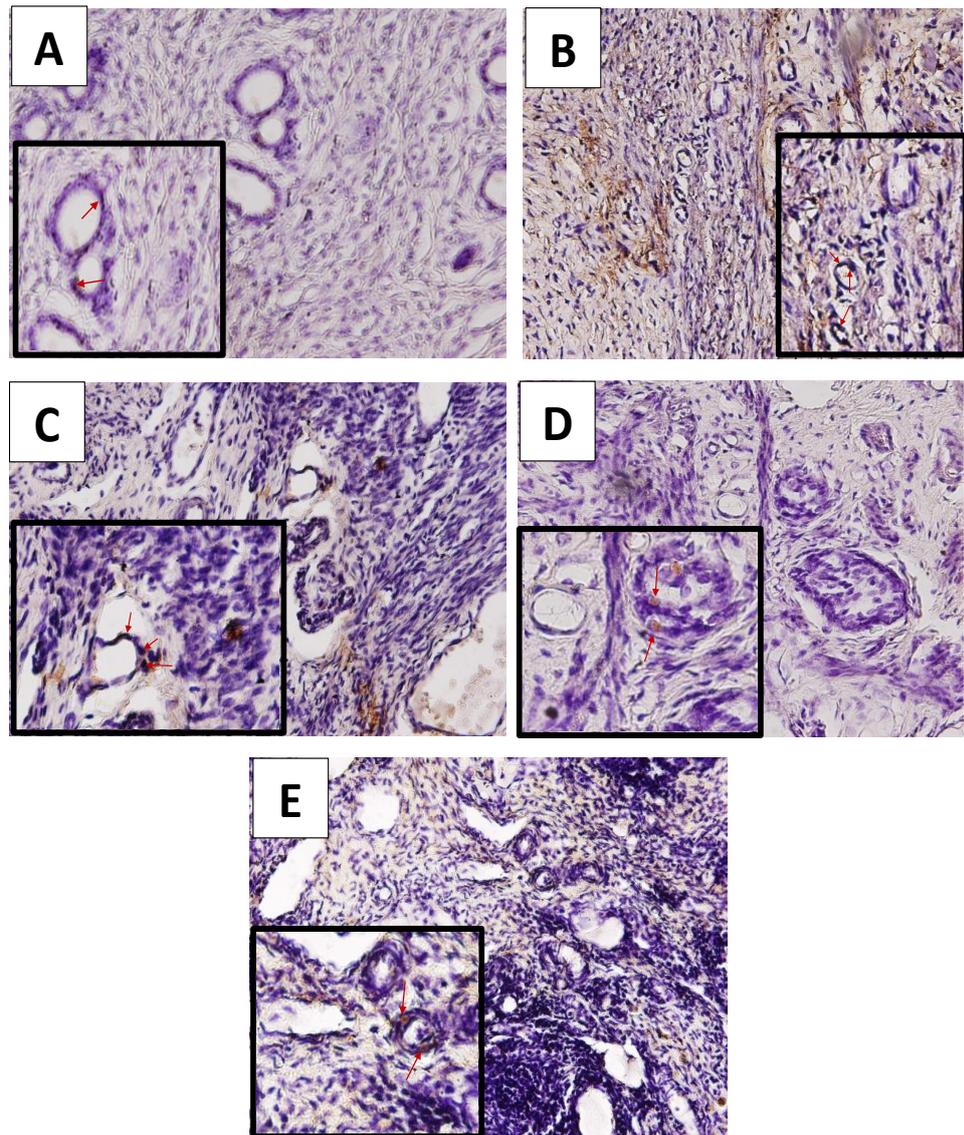
Kelompok terapi 3 (P3) yang diberikan terapi kurkumin 108 mg/kg BB dan vitamin E 100 IU/ekor menunjukkan penurunan dibanding dengan KP yaitu sebesar 60,00%, Kelompok terapi P3 merupakan kelompok terapi yang menunjukkan hasil penurunan yang paling banyak. Pada uji *Tukey* juga menunjukkan hasil tidak berbeda nyata dengan KN yang mana hasil perhitungan rata-rata ekspresi IL-1 P3 paling mendekati dengan KN sehingga dapat dikatakan P3 merupakan dosis terapi paling efektif.

Pemberian terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E mampu menurunkan ekspresi IL-1 pada organ ovarium. Kurkumin merupakan senyawa polifenol yang terdapat dalam rimpang kunyit (*Curcuma longa L*) dengan aktivitas biologi sebagai antioksidan, antiproliferasi, dan antiinflamasi. Mekanisme kurkumin sebagai antioksidan yaitu dengan memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal bebas sehingga radikal bebas tidak lagi bersifat reaktif dan lebih stabil (Trilaksani, 2003). Selain mempunyai aktivitas sebagai antioksidan, kurkumin memiliki aktivitas di sitoplasma yaitu memiliki kemampuan untuk menghambat bioaktivasi karsinogen melalui penekanan enzim sitokrom P450 (Oetari *et al.*, 2006). Vitamin E memiliki kandungan tokoferol yang larut dalam lemak. Fungsi terpenting vitamin E adalah sebagai antioksidan. Sifat antioksidan vitamin E merupakan pertahanan dalam melawan radikal bebas. Radikal bebas akan menyerang pertumbuhan sel termasuk DNA yang nantinya dapat merusak struktur dan fungsi sel membran. Oleh karena itu antioksidan vitamin E dapat bekerja pada membran dan dapat melindungi membran dari oksidasi radikal bebas (Almatsier,

2009). Keseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas ini akan membantu mengurangi pembentukan DNA *adduct* sehingga kerusakan DNA ikut berkurang. Sehingga jumlah ROS dapat turun atau berkurang dan kerja sitokin proinflamatori IL-1 yang dihasilkan oleh makrofag pun ikut berkurang.

5.3 Pengaruh Terapi Kombinasi Kurkumin dan Vitamin E Terhadap Ekspresi Cyclooxygenase-2 (COX-2) pada Ovarium Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Kanker Mammae Hasil Induksi DMBA

Ekspresi COX-2 pada ovarium tikus kanker mammae dapat diamati melalui pewarnaan IHC dengan adanya ekspresi warna coklat pada jaringan. Warna coklat tersebut dihasilkan melalui adanya ikatan antara antigen dan antibodi, dimana antigen dari COX-2 akan berikatan dengan antibodi yang spesifik. Banyaknya ikatan antara antigen dan antibodi menunjukkan ekspresi COX-2 melalui adanya warna coklat yang terlihat pada sel-sel epitel ovarium seperti pada **Gambar 5.3**.



Gambar 5.3 Ekspresi COX-2 pada ovarium tikus dengan perbesaran 400x.
 Keterangan (A): Kontrol Negatif (KN); (B): kelompok kontrol positif (KP); (C):
 kelompok perlakuan dosis 1 (P1); (D) = kelompok perlakuan dosis 2 (P2); (E):
 kelompok perlakuan dosis 3 (P3); (↗): warna coklat ekspresi COX-2.

Perhitungan jumlah ekspresi COX-2 diukur menggunakan software *Immunoratio* dari rata-rata persentase area yang diukur pada 5 lapang pandang. Persentase area ekspresi COX-2 pada ovarium tikus hewan model kanker mammae ditampilkan pada **Tabel 5.3**.

Tabel 5.3 Rata-rata Presentase Area Ekspresi COX-2 pada Ovarium Tikus Hewan Model Kanker Mammae

Kelompok	Rata-rata Ekspresi		
		COX-2 \pm SD (%)	Peningkatan terhadap (K-) / Penurunan terhadap (K+)
Kontrol – (KN)	22,29 \pm 1,76 ^a	-	-
Kontrol + (KP)	44,01 \pm 5,12 ^c	97,42 %	-
Terapi 1 (P1)	34,65 \pm 2,43 ^b	-	21,25 %
Terapi 2 (P2)	26,56 \pm 2,87 ^a	-	39,60 %
Terapi 3 (P3)	24,80 \pm 1,92 ^a	-	43,00 %

Keterangan: Perbedaan notasi a, b, c, dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) antar kelompok perlakuan

Hasil rata-rata ekspresi COX-2 pada **Tabel 5.3** menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol negatif (KN) sebesar $22,29 \pm 1,76$ dapat digunakan sebagai nilai standar ekspresi COX-2 pada ovarium tikus dalam keadaan normal. Nilai standar dari KN dapat digunakan sebagai acuan untuk menentukan adanya penurunan atau peningkatan. Peran dari COX-2 pada kontrol negatif didalam tubuh yakni berperan sebagai sintesis estradiol dalam menghasilkan prostaglandin (Ghosh dan Sengupta,2004).

Hasil rata-rata ekspresi COX-2 pada kelompok kontrol positif (KP) menunjukkan peningkatan sebesar 97,42 % jika dibandingkan dengan kelompok KN. Peningkatan ekspresi COX-2 menunjukkan bahwa induksi DMBA yang diberikan berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi COX-2 pada ovarium tikus. Kelompok tikus yang diterapi menggunakan kurkumin dan vitamin E yang mana terapi 1 (P1), terapi 2 (P2), dan terapi 3 (P3) menunjukkan hasil penurunan

ekspresi COX-2. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji *Tukey*.

Reactive Oxygen Species (ROS) dalam sirkulasi dapat meningkat karena metabolit reaktif DMBA. Selain itu, ROS juga dapat meningkat karena makrofag yang memfagosit sel kanker akan melepas ROS sebagai hasil sampingan dari proses fagositosis. ROS dalam sirkulasi akan mengikuti aliran darah menyebar ke organ lain, termasuk ovarium. ROS menempel pada membran sel sehingga merusak struktur fosfolipid membran sel. Sitokin proinflamasi menyebabkan peningkatan permeabilitas vaskular sehingga meningkatkan suplai sel-sel fagosit ke jaringan ovarium yang rusak oleh ROS.

Tingginya kadar ROS dalam ovarium menyebabkan banyaknya makrofag yang terkumpul di jaringan sehingga kadar asam arakidonat juga tinggi. Asam arakidonat merupakan golongan asam lemak omega-6 bersifat tak jenuh dan termasuk jenis lemak esensial berperan dalam memproduksi prostaglandin dalam tubuh. Peningkatan asam arakidonat juga diikuti oleh peningkatan produksi COX-2. PGE₂ dikatalisis oleh enzim aromatase menjadi E₂ (estradiol). Selanjutnya, estradiol dan VEGF menginduksi COX-2 untuk menghasilkan prostaglandin (Zha *et al.*, 2004). Seiring dengan meningkatnya kadar PGE₂ dalam sirkulasi, angiogenesis ikut meningkat. Peningkatan angiogenesis memungkinkan terjadinya metastase sel-sel kanker ke organ lain termasuk ovarium.

Pemberian terapi kombinasi kurkumin dan vitamin E pada tikus yang telah diinduksi DMBA menunjukkan hasil yang beragam. Kelompok terapi 1 (P1) yang diberikan terapi kurkumin 48mg/kg BB dan vitamin E 300 IU/ekor menunjukkan penurunan dibanding dengan KP yaitu sebesar 21,25% dan menunjukkan

perbedaan yang signifikan ($\alpha < 0,05$) yaitu berbeda nyata terhadap kelompok lainnya pada uji *Tukey*.

Kelompok terapi 2 (P2) yang diberikan terapi kurkumin 72mg/kg BB dan vitamin E 200 IU/ekor menunjukkan penurunan dibanding dengan KP yaitu sebesar 39,60% dan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($\alpha < 0,05$) yaitu berbeda nyata terhadap kelompok lainnya.

Kelompok terapi 3 (P3) yang diberikan terapi kurkumin 108 mg/kg BB dan vitamin E 100 IU/ekor menunjukkan penurunan dibanding dengan KP yaitu sebesar 43,00%. Kelompok terapi P3 merupakan kelompok terapi yang menunjukkan hasil penurunan yang paling banyak. Pada uji *Tukey* juga menunjukkan hasil tidak berbeda nyata dengan KN yang mana hasil perhitungan rata-rata ekspresi COX-2 P3 paling mendekati dengan KN sehingga dapat dikatakan P3 merupakan dosis terapi paling efektif.

Kurkumin yang merupakan senyawa polifenol ini juga mengandung antioksidan, antiproliferasi dan antiinflamasi. Aktivitas antiinflamasi kurkumin dikaitkan dengan ekspresi berlebih (*overexpression*) dari enzim siklooksigenase tipe 2 (COX-2) terutama pada sel kanker paru-paru, kolon, dan kanker mammae (Aggarwal *et al.*, 2005). Dengan adanya penghambatan terhadap enzim COX-2, maka produksi berlebih (*overexpression*) prostanoide dapat dicegah dan inflamasi berkurang serta proliferasi sel kanker juga ikut berkurang sehingga dapat mempercepat proses apoptosis (Nurrochmad, 2004). Antioksidan yang terkandung dalam kurkumin dan vitamin E dapat menangkap radikal bebas dan dapat menghambat metabolit reaktif senyawa DMBA. Hal ini akan membantu mengurangi pembentukan DNA *adduct* dan kerusakan DNA ikut berkurang,

sehingga dapat menekan pelepasan mediator inflamasi COX-2 dan inflamasi menjadi berkurang