



	Hal
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN.....	xvi
INTISARI.....	xix
ABSTRACT	xx
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	6
C. Keaslian dan Kedalaman	7
D. Manfaat Penelitian	9
E. Tujuan	10
Tujuan Umum	10
Tujuan Khusus	11
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Karsinogenesis	12
B. Karsinogenesis pada kanker payudara	15
C. Keterlibatan Enzimatis pada Karsinogenesis... ..	22
D. Aktivitas dan Ekspresi Sitokrom P450	24
E. Aktivitas dan Ekspresi Glutation S-Transferase	27
F. Keterlibatan Genetik pada Kanker Payudara	29
G. Gen p53 sebagai Gen Penekan Tumor	32
H. Gen Ras sebagai onkogen	35
I. <i>Gynura procumbens</i> sebagai anti kanker	37
J. Landasan Teori	41
K. Kerangka Konseptual Penelitian	44
L. Hipotesis	45
BAB III. MATERI DAN METODE	46
A. Materi Penelitian	46
Alat dan Bahan	46
Alat Penelitian	46
Bahan Penelitian	47
B. Metode Penelitian	51
Jenis dan Rancangan Penelitian	51
Tempat Penelitian	52

Definisi Operasional Variabel Penelitian	53
Identifikasi dan Determinasi Tanaman	55
Ekstraksi Tanaman <i>Gynura procumbens</i>	56
Pembuatan Larutan Ekstrak Etanolik <i>Gynura procumbens</i>	56
Pembuatan Larutan DMBA	57
Perlakuan pada Hewan Percobaan.....	57
Pengamatan insidensi tumor dan <i>tumour multiplicity</i>	64
Pengamatan Aktivitas Proliferasi dengan Metode AgNOR	64
Pembuatan Sediaan Histopatologis	65
Uji Imunohistokimia Ekspresi GST dan CYP1A1	67
Uji Imunohistokimia Ekspresi p53 dan H-ras	69
Uji Aktivitas Glutathion S-transferase μ (GST μ)	71
Pemeriksaan Mutasi Gen <i>p53</i> dan <i>H-ras</i>	74
C. Analisis Data	76
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	78
Insidensi Pertumbuhan Nodul Tumor Tikus Setelah Inisiasi DMBA...	78
Efek Ekstrak Etanolik <i>Gynura procumbens</i> pada <i>Tumour Multiplicity</i> Tikus yang Diinduksi DMBA	84
Pengamatan Mikroskopis Kelenjar Mamae dengan Pengecatan HE...	89
Hasil Pengamatan Proliferasi Sel Epitel Kelenjar Mamae	97
Hasil Pengamatan Ekspresi Sitokrom P450 Isoform CYP1A1	101
Hasil Pengamatan Ekspresi Glutathion S-Transferase μ (GST μ)	106
Hasil Pengamatan Aktivitas Glutathion S-Transferase	110
Hasil Pengamatan Ekspresi p53 Mutan	115
Hasil Pengamatan Ekspresi H-Ras Mutan	119
Pengamatan Mutasi Gen <i>p53</i> dan <i>H-ras</i> Kelenjar Mamae Tikus	124
Diskusi Umum.....	127
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	150
A. Kesimpulan	150
B. Saran	151
RINGKASAN	152
SUMMARY.....	166
ABSTRACT PUBLIKASI MAJALAH ILMIAH.....	179
DAFTAR PUSTAKA	182
LAMPIRAN	196

	Hal
Gambar 1. Struktur kimia 7,12-dimetilbenz(a)antrasen	16
Gambar 2. Perubahan histologis struktur epitel kelenjar mammae hiperplasia. Perubahan Menciri : epitel sel multilayer, tidak ada atypia, perubahan fibrosistis seperti fibrosis dan cyst, <i>sclerosing adenosis</i>	17
Gambar 3. Jalur metabolisme 7,12-dimetilbenz(a)antrasen	19
Gambar 4. Epitel duktal mammae. A) epitel <i>single layer</i> duktus lobuli sel positif Ki67 inti coklat dan sel positif ER inti ungu, b) epitel <i>single layer</i> sel positif Ki67 inti coklat dan sel positif PgR inti ungu, c) dan d) sel positif ER inti coklat dan Ki67 inti ungu, e) sel positif ER inti coklat dan positif Ki67 inti ungu tampak mitosis	22
Gambar 5. Tanaman <i>Gynura procumbens</i>	38
Gambar 6. Skema cara penelitian efek ekstrak etanolik daun <i>Gynura procumbens</i> pada karsinogenesis dan mutagenesis.....	63
Gambar 7. Grafik persamaan kurva baku seri larutan baku BSA	73
Gambar 8. Nodul tumor kelenjar mammae pada tikus (minggu ke-19) setelah inisiasi dengan DMBA 20 mg/kg bb. 1 dan 2 : Pertumbuhan nodul tumor pada daerah inguinal dan lateral ; 3 dan 4 : Masa tumor setelah nekropsi	79
Gambar 9. Grafik yang menampilkan persentase insidensi kanker payudara pada setiap kelompok perlakuan	80
Gambar 10. Efek ekstrak etanolik <i>Gynura procumbens</i> terhadap <i>tumour multiplicity</i> pada kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA	86
Gambar 11. Gambaran mikroskopis kelenjar mammae dengan pengecatan H&E (40X10). Tanda panah biru menunjukkan sel epitel kelenjar mammae (dikoleksi pada minggu ke 19 / akhir penelitian). A : Kelompok Kontrol DMBA, B : Perlakuan <i>Gynura procumbens</i> dosis 300 mg/kg BB + DMBA 20 mg/kg bb, C : Perlakuan <i>Gynura procumbens</i> dosis 750 mg/kg BB + DMBA 20 mg/kg bb , C : <i>Base line</i>	91



Gambar 12. Histopatologi kelenjar mammae yang dipakai sebagai penilaian atau *grading*, A = Formasi tubulus dengan skor 1 (lebih dari 75%), B = Formasi tubulus dengan skor 3 (kurang dari 10%), C = Atipia nukleus dengan skor 1, D = Atipia nucleus dengan skor 3, E = Sel epitel tanpa mitosis skor 1, F = Sel epitel dengan mitosis skor 3. (pembesaran 400 x, pewarnaan HE)..... 95

Gambar 13. Histopatologi proliferasi sel epitel kelenjar mammae pada setiap kelompok Perlakuan (pengecatan AgNOR; 1000x). Keterangan : Titik hitam (NOR) dalam sel epitel kelenjar mammae (panah merah) tiap kelompok perlakuan A) DMBA B) Base line, C) *G. procumbens* 300 mg/kg bb + DMBA, D) *Gynura procumbens* 750 mg/kg bb + DMBA, E) *G. procumbens* 300 mg/kg bb dan F) *G. procumbens* 750 mg/kg bb 98

Gambar 14. Grafik *mean* AgNOR dari setiap kelompok perlakuan..... 101

Gambar 15. Pengaruh ekstrak etanol *Gynura procumbens* terhadap ekspresi CYP1A1 pada sel hepar, Gambaran hasil pengecatan imunohistokimia sel hepar tikus. Banyaknya sel yang mengekspresikan protein CYP1A1 ditunjukkan dengan jumlah sel yang berwarna coklat pada sitoplasma (panah merah) dan tidak mengekspresikan CYP1A1 (panah biru). Gambar di atas menunjukkan hepatosit tikus kelompok perlakuan: A) DMBA ; (B) ekstrak 300 mg/kg BB + DMBA; (C) ekstrak dosis 750 mg/kg BB + DMBA; (D) ekstrak dosis 750 mg/kg BB dan (E) base line (perbesaran 400x, Antibodi IgG1 anti CYP1A1) 102

Gambar 16. Grafik ekspresi CYP1A1 pada setiap kelompok perlakuan .. 105

Gambar 17. Pengaruh ekstrak etanol *Gynura procumbens* terhadap ekspresi GST μ pada sel hepar, Gambaran hasil pengecatan imunohistokimia sel hepar tikus. Keterangan: Banyaknya sel yang mengekspresikan protein GST μ ditunjukkan dengan jumlah sel yang berwarna coklat pada sitoplasma (panah merah) dan tidak mengekspresikan GST μ (panah biru). Gambar di atas menunjukkan hepatosit tikus kelompok perlakuan: A) DMBA ; (B) ekstrak 300 mg/kg BB + DMBA; (C) ekstrak dosis 750 mg/kg BB + DMBA; (D) ekstrak dosis 750 mg/kg BB dan (E) base line (pembesaran 400, antibodi IgG1 anti GST μ) 108

Gambar 18. Grafik ekspresi GST μ pada setiap kelompok perlakuan ... 109



- Gambar 20. Grafik Penurunan persentase ekspresi *Mutant-type p53* protein sel epitel kelenjar mammae 117
- Gambar 21. Ekspresi *Mutant-type p53* imunohistokimia, A) Kontrol positif DMBA 20 mg/kg bb, B) Ekstrak 300 mg/kg bb + DMBA, C) Ekstrak 750 mg/kg bb + DMBA, D) Ekstrak 300 mg/kg bb dan E) Ekstrak 750 mg/kg bb dan F) Base line (pembesaran 400 X, antibodi IgG1 anti p53 mutan)..... 118
- Gambar 22. Ekspresi *Mutant H-ras* pada sel epitel kelenjar mammae tikus, ditunjukkan dengan warna coklat gelap pada sitoplasma dan inti sel (panah merah), sedangkan yang tidak mengekspresikan *Mutant H-ras* ditunjukkan warna biru pada sitoplasma dan inti sel gelap (panah hitam). A) Kontrol DMBA 20 mg/kg bb ; B) Ekstrak *G. procumbens* 300 mg/kg bb + DMBA ; C) Ekstrak *G. procumbens* 750 mg/kg bb + DMBA ; D) Ekstrak *G. procumbens* 300 mg/kg bb, E) Ekstrak *G. procumbens* 750 mg/kg bb dan F) Kontrol base line (pembesaran 400x, antibody IgG1 anti H-ras mutan) 122
- Gambar 23. Grafik Penurunan persentase ekspresi *Mutant-type H-ras* protein sel; epitel kelenjar mammae 123
- Gambar 24. Hasil isolasi DNA total dari kelenjar mammae 124
- Gambar 25. Hasil kloning gen *H-ras* dan *p53*. 1-12: amplifikasi dengan primer *H-ras*; 13-24: amplifikasi dengan primer *p53-e6*; M: marker DNA. Tanda panah putus-putus menunjukkan *excess-primer*, tanda panah utuh menunjukkan gen target... 125
- Gambar 26. Agen kemopreventif dan mekanisme kerjanya 130
- Gambar 27. Mekanisme hambatan oleh p53 pada *cell cycle arrest* 132
- Gambar 28. Kemopreventif kanker dengan berbagai bahan fitokimia 134
- Gambar 29. AhR *signaling pathway* (Denison and Nagy, 2003). Keterangan : Ketika ligan menempel pada AhR, XAP2 dilepaskan sehingga kompleks ini akan masuk ke dalam nukleus. Ketika berada di dalam nukleus, Hsp90 memungkinkan kompleks ini menempel dengan ARNT. Kemudian kompleks ini dapat secara langsung maupun tidak langsung berinteraksi dengan DNA melalui sekuen



Gambar 30.	Regulasi metabolisme xenobiotik yang diperankan oleh CYP1A1	140
Gambar 31.	Pengaruh <i>aryl hydrocarbon receptor</i> dan faktor transkripsi Nrf2 terhadap ekspresi enzim metabolisme fase I dan II	141
Gambar 32.	Mekanisme induksi GST. Induksi GST terjadi melalui jalur Nrf2-ARE	143
Gambar 33.	Mekanisme kerja agen kemopreventif pada aktifitas <i>p53</i>	145
Gambar 34.	Mekanisme <i>p53</i> melalui <i>cell cycle arrest</i>	147
Gambar 35.	Aktivitas ras pada beberapa sinyal kaskade	148

	Hal.
Tabel 1. Isoform P450 pada beberapa spesies mamalia	25
Tabel 2. Beberapa senyawa karsinogen yang diaktivasi oleh beberapa enzim P450	27
Tabel 3. Pasangan primer pada sekuen gen <i>p53</i> dan <i>H-ras</i>	50
Tabel 4. Efek ekstrak etanolik <i>G. procumbens</i> terhadap insidensi kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA pada minggu ke 19 (12 minggu setelah inisiasi DMBA terakhir)	81
Tabel 5. Efek ekstrak etanolik <i>Gynura procumbens</i> terhadap rerata jumlah nodul per tikus (<i>tumour multiplicity</i>) dari kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA	85
Tabel 6. Rerata skor gambaran histopatologis kelenjar mammae tikus setiap kelompok perlakuan	93
Tabel 7. Rerata jumlah mAgNOR sel epitel kelenjar mammae pada setiap kelompok perlakuan	100
Tabel 8. Rata-rata dan Simpangan Baku Ekspresi CYP1A1 Setiap Kelompok Perlakuan	104
Tabel 9. Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi GST μ pada setiap kelompok perlakuan	107
Tabel 10. Jumlah protein fraksi sitosol (volume 17,5 μ l) pada setiap kelompok perlakuan	111
Tabel 11. Nilai rerata dan aktivitas GST μ fraksi sitosol hepar tikus setiap kelompok perlakuan	112
Tabel 12. Rerata jumlah sel epitel kelenjar mammae yang mengekspresikan <i>Mutant-type p53</i> pada setiap kelompok perlakuan	116
Tabel 13. Efek ekstrak etanolik <i>Gynura procumbens</i> terhadap peningkatan ekspresi <i>Mutant H-ras</i> pada sel epitel duktus mammae tikus yang diinduksi DMBA	121

	Hal
Lampiran 1. Data Insidensi dan Multiplikasi Nodul Tumor pada Tikus ..	196
Lampiran 2. Analisis Data Insidensi Nodul Tomor dengan <i>Survival Analysis Model</i>	200
Lampiran 3. Analisis Data Multiplisiti dengan <i>Kruskal Wallis Test</i> dilanjutkan dengan <i>Mann-Withney Test</i>	205
Lampiran 4. Data Hasil Pengamatan <i>mean AgNOR</i> pada setiap Kelompok Perlakuan	208
Lampiran 5. Data Hasil Pengamatan Ekspresi CYP1A1 pada Sel Hepar Tikus	212
Lampiran 6. Data Hasil Pengamatan Ekspresi GST μ pada Sel Hepar Tikus	216
Lampiran 7. Data Hasil Pengamatan Aktivitas GST μ Fraksi Sitosol Hepar Tikus	220
Lampiran 8. Data Hasil Pengamatan Ekspresi P53 Mutan pada Sel Kelenjar Mamae Tikus	233
Lampiran 9. Data Hasil Pengamatan Ekspresi H-ras pada Sel Kelenjar Mamae Tikus setiap Kelompok perlakuan	237
Lampiran 10. Hasil Pengamatan Sekuen Mutasi pada Gen p53 (Foword)..	241
Lampiran 11. Hasil Pengamatan Sekuen Mutasi pada Gen p53 (Reverse).	242
Lampiran 12. Perlakuan Pada Hewan Percobaan	243
Lampiran 13 Skema Prosedur Imunohistokimia.....	244
Lampiran 14 Gambar Alat dan Bahan Penelitian.....	245

1. AgNOR = Argyrophilic Nucleolar Organizer Region
2. AhR = Arylhydrocarbon Receptor
3. AP1 = Activator Protein 1
4. ARE = Antioxidant Responsive Element
5. ARF = Alternate Reading Frame
6. ATP = Adenosin Tri Phosphatase
7. b-FGF = basic-Fibroblast Growth Factor
8. BRCA 1 = Breast Cancer Antigen 1
9. CAM = Corio Alantois Membran
10. CDK = Cyclin Dependent Kinase
11. CDKs = Cyclin Dependent Kinase
12. CHK = Checkpoint Kinases
13. CKI = Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
14. CMC Na = Carboxy Methyl Cellulose Natrium
15. Cyc = Cyclins
16. CYP = Cytochrom P450
17. CYP1A1 = Cythochrome P450 isofrm 1A1
18. DAB = Diaminobenzidine tetrahydrochloride
19. DCIS = Ductal Carcinoma in Situ
20. DMBA = 7,12-Dimethylbenz(*a*)anthracene
21. DNA = Deoxyribonucleic Acid

22. D1
23. E2F = Gen menyusun faktor transkripsi untuk regulasi siklus sel
24. ER = Estrogen Receptor
25. Erb-2 = Protein regulasi pada sinyal transduksi untuk aktivitas p53
26. FGF = Fibroblast Growth Factor
27. Fr6 = Flavonoid-rich factor 6
28. *G. procumbens* = *Gynura procumbens* (Lour) Merr
29. GADD45 = Growth Arrest and DNA-Damage inducible
30. GR = Glucocorticoid Reseptor
31. GRE = Glucocorticoid Responsive Element
32. GST = Gluthation S-Transferase
33. GST μ = Gluthation S-Transferase μ
34. H- ras = Harvey ras
35. H&E = Haematoxyllin and Eosin
36. HCT116 = Human Colon carsinoma cell line
37. HE = Hematoxyllin Eosin
38. ICAMs = Intracelluler Adhesion Molecules
39. IHC = Imunohistochemistry
40. IL = Interleukin
41. INK4 = Tumour suppressor protein yang berhubungan dengan gen p16, p14 dan H-ras, sebagai Cdk-

- | | | |
|------------------|---|---|
| 42. LSAB | = | Labeled StreptAvidin Biotin |
| 43. MDM2 | = | Murine Double Minute |
| 44. MFO | = | Mixed Function Oxydation |
| 45. MMP | = | Matrix Metallo Proteinase |
| 46. NMU | = | Nitrosomethylurea |
| 47. Nrf2 | = | NF-E2 p45-related factor |
| 48. p53AIP1 | = | p53 Apoptosis Inducing Protein 1 |
| 49. PAH | = | Polycyclic Aromatic Hidrocarbon |
| 50. PBS | = | Phosphate Buffer Salyne |
| 51. PDGF | = | Platelet Derived Growth Factor |
| 52. PFA | = | Paraformaldehyde |
| 53. PhIP | = | 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo (4-5b)pyridine |
| 54. pRb | = | Protein Retinoblastoma |
| 55. Rb | = | Retinoblastoma |
| 56. RNA | = | Rybonucleid Acid |
| 57. RR | = | Ribonucleotide Reductase |
| 58. Ser46 | = | Serine 46 |
| 59. TNF α | = | Tomour Necrosis Faktor Alpha |
| 60. TPA | = | 12-0-tetradecanoyl phorbol-13-acetate |
| 61. UV | = | Ultra Violet |
| 62. VEGF | = | Vascular Endothelial Growth Factor |
| 63. XRE | = | Xenobiotic Responsive Element |