

**Chemopreventive Effects of Soursop Leaves
(*Annona muricata L.*) Infusion in Ductal Epithelial Breast Tissue in Female
Sprague-Dawley Rats Induced by 7,12 Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)**

Bilqistiputri F, Susantiningsih T, Mustofa S, Windarti I

Faculty of Medicine University of Lampung

Abstract

Breast cancer is the cancer with the highest incidence and mortality on woman in the world, and it tends to increase. The Increase of cancer incidence is a serious issue, which needs to be prevented. Soursop leaves has potency as a chemopreventive agent that is safe and relatively inexpensive. This study is an experimental study with Post Test Only With Control Group Design. 24 female Sprague Dawley rats (*Rattus norvegicus*) were used in this study, and simply randomized were divided into four groups which treated for four weeks orally by sonde. Those four groups were as follow, KI (negative controls, given 1 ml aquadest each day), KII (positive control, induced by DMBA 20mg/kg twice a week), KIII (induced by DMBA twice a week and soursop leaves infusion 0.1 g/1ml each day) and KIV (induced by DMBA twice a week and soursop leaves infusion 0.2 g/2ml each day). The results of epithelial grade showed that KI had normal breast glandular epithelium (0.03), KII showed severe hyperplasia–athypia (2.2), KIII showed mild hyperplasia (0.6) and KIV showed mild–severe hyperplasia (1.03). The results of the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test showed significant differences among all treatments ($p < 0.005$).

Key words : Soursop leaves, DMBA, breast ductal epithelial, infusion

**Efek Kemopreventif Pemberian Infusa Daun Sirsak (*Annona muricata L.*)
pada Epitel Duktus Jaringan Payudara Tikus Putih Betina Galur *Sprague
Dawley* yang Diinduksi Senyawa 7,12 Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)**

Abstrak

Kanker payudara merupakan kanker dengan insidensi dan penyebab mortalitas terbanyak pada wanita di dunia. Berdasarkan data-data dan kejadian tersebut, maka perlu dilakukan tindakan pencegahan untuk menekan angka kejadian kanker payudara. Agen kemopreventif dalam daun sirsak dapat bekerja secara selektif dalam menyerang sel kanker. Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan *Post Test Only With Control Group Design*, menggunakan 24 ekor tikus putih betina galur *Sprague Dawley* yang diacak kedalam 4 kelompok dengan perlakuan 4 minggu menggunakan sonde oral. Kelompok tersebut diantaranya KI (kontrol negatif, diberi aquadest 1 ml setiap hari), KII (kontrol positif, diinduksi DMBA 20 mg/kg BB 2xseminggu), KIII (diinduksi DMBA dan diberi infusa daun sirsak dosis 0,1 gr/ml), KIV (diinduksi DMBA dan diberi infusa daun sirsak dosis 0,2 gr/2ml). Hasil penelitian berdasarkan rerata *grade* epitel duktus menunjukkan KI normal (0,03), KII hiperplasia berat–atipia (2,2), KIII hiperplasia ringan (0,6), KIV hiperplasia ringan–berat (1,03). Hasil uji statistik Kruskal-Wallis dan uji *post hoc* Mann-Whitney didapatkan perbedaaan yang signifikan antarkelompok ($p < 0,005$).

Kata kunci : Daun sirsak, DMBA, epitel duktus payudara, infusa

Pendahuluan

Kanker payudara merupakan kanker dengan insidensi dan mortalitas terbanyak pada wanita di dunia, yaitu sebanyak 1.384.155 kejadian dan 458.503 kematian (IARC, 2013). 70% dari kematian tersebut terdapat di negara miskin dan berkembang. Kematian akibat kanker di seluruh dunia diproyeksikan akan terus meningkat, dengan perkiraan 13,1 juta kematian pada tahun 2030 (WHO, 2013).

Berdasarkan data-data dan kejadian tersebut, maka perlu dilakukan tindakan pencegahan untuk menekan angka kejadian kanker payudara. Mengingat selain penyakit kanker umumnya baru diketahui setelah sampai pada tahap progresi hingga sulit dilakukan terapi, karena pada tahap tersebut, sel-sel pada payudara sudah mengalami kelainan seluler yang majemuk. Oleh karena itu pengembangan terapi kanker perlu dilakukan ke semua tahap untuk mencegah terjadinya perkembangan lanjut dari sel-sel tumor tersebut (Meiyanto *et al.*, 2007).

Menurut Kakizoe (2003) agen kemopreventif lebih menjanjikan dibanding obat antikanker konvensional. Namun agen kemopreventif itu sendiri ada yang konvensional dan adapula yang berasal dari makhluk hidup. Saat ini sudah terdapat banyak agen antikanker konvensional yang umumnya berasal dari bahan sintesis, yang sengaja diproduksi untuk mengobati maupun mencegah penyakit kanker. Namun obat konvensional atau sitostatika ini selain harganya sangat mahal, juga bekerja tidak selektif, bahkan bersifat toksik pada sel normal, sehingga menimbulkan berbagai efek samping yang merugikan. Oleh karena itu perlu pendekatan lain berupa terapi kanker yang relatif aman (Chang & Kinghorn, 2001) dan harganya terjangkau. Oleh karena itu maka penggunaan fitofarmaka sebagai agen kemopreventif dapat menjadi pilihan cara untuk mencegah karsinogenesis.

Pada penelitian sebelumnya oleh Retnani (2011), ekstrak daun sirsak terbukti menghambat proses onkogenesis pada gambaran mikroskopis jaringan payudara tikus. Namun, masyarakat umum di Indonesia biasanya menggunakan daun sirsak sebagai obat dengan proses perebusan, atau dalam hal ini disebut dengan infusa. Selain itu, proses ekstraksi daun sirsak membutuhkan waktu dan biaya yang lebih banyak. Oleh karena itu maka perlu dilihat efek kemopreventif

infusa daun sirsak tersebut pada gambaran mikroskopis jaringan payudara yang mengalami onkogenesis.

Dari latar belakang di atas, maka peneliti bermaksud untuk mengetahui efek kemopreventif dari infusa daun sirsak terhadap gambaran epitel duktus jaringan payudara tikus yang diinduksi oleh 7,12 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA).

Metode

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan *Post Test Only With Control Group Design*. Sampel dalam penelitian ini adalah tikus putih betina galur *Sprague Dawley* yang didapat dari IPB (Institut Pertanian Bogor) dengan berat 100-200 berumur 5-7 minggu. Jumlah sampel adalah 24 ekor yang diacak kedalam 4 kelompok perlakuan.

Waktu penelitian adalah 5 minggu. Satu minggu pertama masing-masing kelompok dilakukan aklimatisasi/pengadaptasian dengan tempat penelitian dan makanan. Empat minggu berikutnya, kelompok I (kontrol negatif) hanya diberi *aquadest* 1 ml setiap hari; kelompok II (kontrol positif) diinduksi DMBA 20 mg/kg BB 2 x seminggu dan diberi *aquadest* 1 ml setiap hari; kelompok III (perlakuan) diinduksi DMBA 20 mg/kg BB 2 x seminggu dan diberi infusa daun sirsak dosis 0,1 gr/1ml sekali sehari; kelompok IV (perlakuan) diinduksi DMBA 20 mg/kg BB 2 x seminggu dan diberi infusa daun sirsak dosis 0,2gr/2ml sekali sehari. Masing-masing perlakuan diberikan dengan menggunakan sonde oral selama 4 minggu.

Setelah minggu keenam, jaringan payudara hewan coba diambil dan kemudian dilakukan pembuatan preparat di Laboratorium Patologi Anatomi FK Unila, lalu dilakukan pengamatan epitel duktus payudara dalam 5 lapang pandang. Kemudian pengamatan dikategorikan sesuai *grade* epitel duktus berdasarkan Ting *et al.* (2007):

Grade 0: normal

Grade 1: *mild hyperplasia* (2-4 lapis epitel mengalami hiperplasia)

Grade 2: *severe hyperplasia* (>4 lapis epitel mengalami hiperplasia)

Grade 3: *atypia*

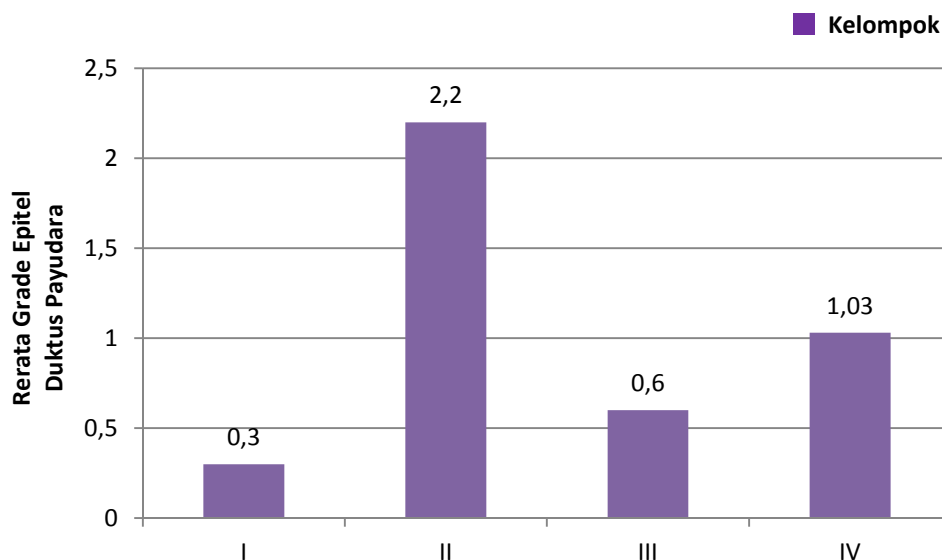
Grade 4: ductal carcinoma in situ

Grade 5: ductal carcinoma invasive

Setelah proses pengamatan, data diuji analisis menggunakan *software* statistik. Uji yang pertama dilakukan adalah uji normalitas (uji Shapiro-Wilk). Apabila sebaran data normal, dilakukan uji *one way* ANOVA. Tetapi bila sebaran data tidak normal atau varians data tidak sama, dilakukan uji alternatif yaitu uji Kruskal-Wallis. Uji ini bertujuan untuk mengetahui paling tidak terdapat perbedaan antara dua kelompok perlakuan. Apabila pada uji tersebut didapatkan hasil bermakna ($p < 0,05$) maka dilakukan uji *post hoc*. Uji *post hoc* untuk *one way* ANOVA adalah LSD sedangkan untuk uji *post hoc* Kruskal-Wallis adalah Mann-Whitney.

Hasil

Rerata *grade* epitel duktus dari tikus yang dihitung pada kelompok I (kontrol negatif) yaitu sebesar $0,03 \pm 0,81$, kelompok II (kontrol positif) sebesar $2,2 \pm 0,21$, kelompok III (perlakuan) sebesar $0,6 \pm 0,12$, dan kelompok IV (perlakuan) sebesar $1,03 \pm 0,15$.



Gambar 1. Grafik perbandingan rerata *grade* epitel duktus payudara

Data ini kemudian diolah dengan menggunakan program komputer. Pertama, dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan uji normalitas Shapiro-Wilk, uji ini dipilih karena jumlah sampel yang digunakan kurang dari 50. Setelah dilakukan uji normalitas, didapatkan hasil bahwa seluruh data tidak memiliki distribusi yang normal dengan $p < 0,05$ sehingga uji analisis yang digunakan untuk data penelitian ini adalah uji alternatif *one way* ANOVA, yaitu Kruskal-Wallis, yang dijelaskan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji Kruskal-Wallis

	Kelompok	N	Mean \pm SD	<i>p</i>
Rerata <i>grade</i> epitel duktus	I	6	0,03 \pm 0,81	0,000
	II	6	2,2 \pm 0,21	
	III	6	0,6 \pm 0,12	
	IV	6	1,03 \pm 0,15	

Setelah dilakukan Kruskal-Wallis diperoleh tingkat signifikansi atau *p* pada ketiga kelompok perlakuan adalah < 0.05 . Hal ini menunjukkan bahwa minimal terdapat dua kelompok yang memiliki perbedaan yang signifikan. Untuk mengetahui pengukuran mana yang berbeda, analisis data kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc*. Hasil uji *post hoc* dijelaskan pada Tabel 2.

Tabel 2. Uji beda antar kelompok

Kelompok	<i>p</i>
Kelompok I vs Kelompok II	0,002
Kelompok I vs Kelompok III	0,002
Kelompok I vs Kelompok IV	0,003
Kelompok II vs Kelompok III	0,003
Kelompok II vs Kelompok IV	0,003
Kelompok III vs Kelompok IV	0,004

Berdasarkan Tabel 2 hasil uji *post-hoc*, diperoleh data bahwa perbedaan yang bermakna terjadi pada semua pengukuran. Terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok I (kontrol negatif) dengan kelompok II (kontrol positif). Perbedaan yang bermakna juga terdapat kelompok III (kontrol positif) dengan kelompok III (perlakuan), dan antara kelompok II (kontrol positif) dengan kelompok IV (perlakuan). Selain itu, perbedaan yang bermakna juga terjadi antara kelompok III (perlakuan) dengan kelompok IV (perlakuan). Besarnya perbedaan pada setiap kelompok menghasilkan nilai $p < 0,005$.

Pembahasan

Dalam penelitian ini, digunakan infusa daun sirsak yang mengandung bahan aktif yaitu *acetogenin, flavonoid, triterpenoid*. Bahan-bahan tersebut diduga dapat menjadi agen kemopreventif alami (Retnani, 2011). Dosis infusa yang dibandingkan pada penelitian ini adalah dosis bertingkat. Menurut Syariefa (2011), dosis optimal infusa daun sirsak untuk pencegahan kanker payudara yang digunakan pada manusia adalah 8 gram daun sirsak dalam 3 gelas air. Dosis inilah yang akan digunakan untuk dikonversikan dari dosis manusia ke dosis tikus. Dengan faktor konversi dosis dari manusia (70 kg) ke tikus (200gr) adalah 0,018, maka dosis yang akan diberikan kepada tikus adalah $70/50 \times 8 \times 0,018 = 0,2$ mg dalam 2 ml.

Pada penelitian ini, didapatkan bahwa daun sirsak memiliki efek kemopreventif dalam mengendalikan perubahan epitel duktus pada jaringan payudara tikus yang diinduksi DMBA. Hal ini terlihat dari pada uji Kruskal-Wallis yang menunjukkan bahwa paling tidak terdapat dua kelompok data yang mempunyai perbedaan rerata yang bermakna. Lalu kemudian dilanjutkan dengan analisis *post hoc* Mann-Whitney. Hasil analisis *post hoc* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara masing-masing kelompok. Hal ini berarti setiap kelompok terdapat perbedaan rerata *grade* epitel duktus yang bermakna.

Pada tabel 1 terlihat hasil rerata *grade* epitel duktus pada gambaran mikroskopis jaringan payudara. Rerata *grade* epitel duktus pada kelompok I (kontrol negatif) adalah 0,03. Persentase ini menunjukkan bahwa dari semua lapang

pandang hanya 1 lapang pandang yang terlihat adanya gambaran hiperplasia, yaitu hiperplasia ringan. Hal ini menunjukkan bahwa epitel jaringan payudara kelompok I normal. Pada kelompok II (kontrol positif), rerata *grade* epitel duktus sebesar 1,86. Dari semua lapang pandang, selalu terlihat adanya hiperplasia, mulai dari hiperplasi ringan hingga hiperplasia berat dengan *atypia*. Kelompok III (perlakuan) mengalami penurunan rerata *grade* epitel duktus sebesar 0,6 sedangkan kelompok III (perlakuan) terjadi penurunan rerata *grade* epitel duktus sebesar 1,03.

Pada kelompok I (kontrol negatif) yaitu tikus yang hanya diberi *aquadest* tanpa perlakuan lain, didapatkan hasil yang normal. Pada gambaran mikroskopisnya, secara umum tidak ditemukan adanya hiperplasia epitel. Hal ini karena *aquadest* yang diberikan bukan merupakan bahan karsinogen yang dapat mempengaruhi gambaran mikroskopis jaringan payudara.

Pada kelompok II (kontrol positif) yang diberi perlakuan DMBA 20 mg/kg BB 2 x seminggu, secara umum ditemukan perubahan gambaran mikroskopis jaringan payudara dengan rerata *grade* epitel duktus $2,2 \pm 0,21$. Dari 6 tikus pada kelompok I di tiap lapang pandang, rata-rata memiliki *grade* 2 dan 3. Dalam pemeriksaan mikroskopis terlihat hiperplasia epitel duktus dan terdapat *atypia*. Perubahan tersebut dikarenakan pemberian DMBA akan menginduksi mutasi pada gen sehingga menyebabkan iniasi onkogenesis, berupa gambaran hiperplasia ringan, hiperplasia berat, dan *atypia*. DMBA merupakan senyawa karsinogen spesifik untuk eksperimental kanker payudara dan kanker kulit pada hewan percobaan, tetapi bukan merupakan karsinogen *direct*. Aktivitas karsinogenik dari DMBA terjadi melalui aktivasi metabolisme (biotransformasi) untuk menghasilkan karsinogenesis. Jalur metabolisme DMBA melalui aktivasi enzim sitokrom P450 membentuk *proximate carcinogen* dan *ultimate carcinogen* (Hatim, 2012).

Sitokrom P-450 dan *microsomal epoxide hydrolase* (mEH) memetabolisme DMBA menjadi dua metabolit yaitu metabolit elektrofilik dan metabolit yang mampu membentuk *DNA adduct* (DNA yang berikatan dengan senyawa karsinogenik). Sitokrom P-450 CYP1B1 mengoksidasi DMBA menjadi 3,4-

epoxides yang diikuti dengan hidrolisis *epoxides* oleh mEH membentuk metabolit *proximate carcinogenic* dan DMBA-3,4-diol. Metabolit ini nantinya dioksidasi oleh CYP1A1 atau CYP1B1 menjadi metabolit *ultimate carcinogenic* (DMBA-3,4-diol-1,2 *epoxide*). Metabolit aktif dari DMBA adalah DMBA-3,4-diol-1,2 *epoxides* yang mampu membentuk DNA *adduct*. Metabolit DMBA yang membentuk DNA *adduct* menentukan mutasi dalam gen dan mampu mengendalikan siklus sel, sehingga mendorong pembelahan sel kanker. Senyawa *epoxide* tersebut nantinya akan berikatan secara kovalen dengan gugus amino eksosiklik deoksiadenosin (dA) atau deoksiguanosin (dG) pada DNA. Interaksi ini (DNA *adduct*) dapat menginduksi mutasi pada gen-gen penting sehingga menyebabkan iniasi kanker (Hakkak, 2005).

Pada kelompok perlakuan yang diberi infusa terdapat penurunan yang bermakna jika dibandingkan dengan kelompok yang hanya diberi DMBA saja. Hal ini disebabkan oleh aktivitas metabolit zat aktif yang dimiliki oleh daun sirsak. *Acetogenin* akan mengakibatkan penurunan produksi ATP yang akan menyebabkan kematian sel kanker, lalu kemudian memicu terjadinya aktivasi jalur apoptosis serta mengaktifkan p53 yang dapat menghentikan siklus sel untuk mencegah terjadinya proliferasi tak terkendali (Chiu *et al.*, 2003). *Flavonoid* akan meningkatkan ekspresi enzim *gluthation S-transferase* yang dapat mendetoksifikasi karsinogen sehingga cepat dieliminasi oleh tubuh (Ren *et al.*, 2003). Senyawa *triterpenoid* menstabilkan benang-benang spindel pada fase mitosis sehingga proses mitosis terhambat. *Triterpenoid* juga menghambat enzim topoisomerase yang akan menginduksi apoptosis dan menghentikan siklus sel (Sugianto *et al.*, 2003).

Simpulan

Infusa daun sirsak memiliki potensi sebagai agen kemopreventif pada perubahan epitel duktus payudara tikus yang diinduksi DMBA.

Daftar Pustaka

- Chang LC dan Kinghorn AD, 2001. Flavonoid as Chemopreventive Agent, Bioactive Compound From Natural Sources, Isolation, Characterization And Biological Properties. New York: Tailor & Friends. pp. 161-168.
- Chiu HF, Chih TT, Hsian YM, Tseng CH, Wu MJ, Wu YC. 2003. Bullatacin, a potent antitumor annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2.2.15 cells. *Biochemical Pharmacology*. 65(3):319-327.
- Hakkak. 2005. Obesity promotes 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor development in female zucker rats. *Breast Canc Res*. 7: 627-633.
- Hatim NB. 2012. Aktivitas antikanker ekstrak etanol daun surian (*Toona sinensis*) pada tikus betina sprague dawley yang diinduksi 7,12-dimetilbenz(a)antrasena. (Skripsi). Departemen Biokimia. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor.
- International Agency Research on Cancer. 2013. Globocan 2008, fast stats. section of cancer information. (Internet). Diunduh dari <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>. Diakses pada tanggal 26 Juli 2013.
- Kakizoe T. 2003. Chemoprevention of cancer focusing on cinical trial. *Japan Journal Clinical Oncol*. 33(9):421-442.
- Meiyanto E, Susilowati S, Tasminatun S, Murwanti R, Sugiyanto. 2007. Efek kemopreventif ekstrak etanolik *Gynura procumbens* (*lour*), *merr* pada karsinogenesis kanker payudara tikus. *Majalah Farmasi Indonesia*. 18(3): 154 -161.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Review*. 23(4):519-534.
- Retnani V. 2011. Pengaruh suplementasi ekstrak daun *Annona muricata* terhadap kejadian displasia epitel kelenjar payudara tikus sprague dawley yang diinduksi 7,12 dimethylbenz[a]anthracene. (Skripsi). Program Pendidikan Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Sugianto SB, Meiyanto E, Nugroho AE, Jenie UA. 2003. Aktivitas antikarsinogenik senyawa yang berasal dari tumbuhan. *Majalah Farmasi Indonesia*. 14(4): 216-225.
- Syariefia E. 2011. Daun sirsak: olah tepat dan dosis aman.. *Trubus*. 2(498):10-27.
- Ting AY, Kimler BF, Fabian CJ, Petroff BK. 2007. Characterization of a preclinical model of simultaneous breast and ovarian cancer progression. *Carcinogenesis*. 28(1):130-135.
- World Health Organization. 2013. Breast cancer: prevention and control. (Internet). Diunduh dari <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>. Diakses pada tanggal 26 Juli 2013.