

Efek Kombinasi Doxorubicin dan Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap Sel Payudara Pada Tikus *Sprague Dawley* yang Diinduksi DMBA (7,12-Dimethylbenzene(a)ntrazena)

Fatma Zuhrotun Nisa¹, Mary Astuti², Sofia Mubarika Haryana³, Agnes Murdiati⁴

¹Bagian Gizi Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Jl. Farmako Sekip Utara, Yogyakarta 55281

^{2,4}Ilmu Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada, Jalan Flora No. 1, Bulaksumur, Yogyakarta, 55281

³Bagian Histologi dan Biologi Sel Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Jl. Farmako Sekip Utara 55281
(Email: fatma.zuhrotun.n@ugm.ac.id)

ABSTRACT

Background: treatment of cancer is currently done by biopsy and chemotherapy. Chemotherapy is a cancer treatment that is costly and toxic effect conferring on normal cells.

Objective: to know the effect of combination chemotherapy with Doxorubicin as agents of papaya leaf extract as an agent against chemo preventive breast cells on rat Sprague Dawley DMBA induced.

Method: this research is experimental research with design post test only with control group. This research uses 60 rats which are divided into 6 groups of placebo groups, groups, groups of DMBA, Doxorubicin, papaya leaf extract groups, group 1 combination (Doxorubicin 50 50 Papaya leaf extract) and group 2 combination (Doxorubicin 25 75 papaya leaf extract). Research time during the 120 days that consists of the first 3 weeks of treatment were given continued grant of DMBA during 5 weeks (twice a week) and continued treatment back to 6 weeks. The analysis was conducted for three times at the end of week 8, the end of the week to 12 and the end of the week to 16. Any analysis will be carried out the killing mice by as much as 3 tails per group. Parameters measured is histopathology breast tissue and breast cancer cell proliferation.

Results: the breast tissue histopathology observations indicate that treatment combination I have the ability to prevent the occurrence of breast cancer and also improve the breast cells underwent karsinogenesis.

Conclusion: the results of staining method with IHC (Immunohistochemistry) Ki-67 shows that treat the combination I have the lowest level of proliferation than the treatment and the combination of papaya leaf extract II.

Keyword: papaya leaves, cancer, breast, Doxorubicin

ABSTRAK

Latar Belakang : Pengobatan kanker saat ini dilakukan dengan biopsi dan kemoterapi. Kemoterapi merupakan pengobatan kanker yang mahal dan berefek toksik pada sel normal.

Tujuan: untuk mengetahui efek kombinasi Doxorubicin sebagai agen kemoterapi dengan ekstrak daun pepaya sebagai agen kemopreventif terhadap sel payudara pada tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi DMBA.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan disain *post test only with control group*. Penelitian ini menggunakan 60 ekor tikus yang dibagi menjadi 6 kelompok yang terdiri dari kelompok placebo, kelompok DMBA, kelompok, Doxorubicin, kelompok ekstrak daun pepaya, kelompok kombinasi 1 (50 % Doxorubicin + 50% Ekstrak Daun Pepaya) dan kelompok kombinasi 2 (25% Doxorubicin + 75% ekstrak daun pepaya). Waktu penelitian selama 120 hari yang terdiri dari 3 minggu pertama diberi perlakuan dilanjutkan pemberian DMBA selama 5 minggu (2 kali dalam seminggu) dan dilanjutkan perlakuan kembali sampai 6 minggu. Analisa dilakukan selama tiga kali yaitu pada akhir minggu ke 8, akhir minggu ke 12 dan akhir minggu ke 16. Setiap analisa akan dilakukan pembunuhan tikus sebanyak 3 ekor per kelompok. Parameter yang diukur adalah histopatologi jaringan payudara dan proliferasi sel kanker payudara.

Hasil: pengamatan histopatologi jaringan payudara menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi I memiliki kemampuan mencegah terjadinya kanker payudara dan juga memperbaiki sel payudara yang mengalami karsinogenesis. **Kesimpulan:** Hasil pewarnaan dengan metode IHC (*Immunohistochemistry*) Ki-67 menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi I memiliki tingkat proliferasi paling rendah dibandingkan perlakuan ekstrak daun pepaya dan kombinasi II.

Kata kunci : daun pepaya, kanker, payudara, Doxorubicin

PENDAHULUAN

Kanker adalah salah satu penyakit degeneratif yang dapat menyebabkan kematian. Kasus kanker diprediksi akan terus meningkat dari 10,3 juta kasus pada tahun 1996 menjadi 14,7 juta pada tahun 2020¹. Berdasarkan data dari SIRS (Sistem Informasi Rumah Sakit) kejadian kanker payudara menempati posisi tertinggi di Indonesia yaitu mencapai 8.227 kasus atau 16,85% kemudian dilanjutkan dengan kanker leher rahim sebanyak 5.786 kasus atau 11,78%. Menurut peneliti Prancis, angka kejadian kanker diperkirakan akan meningkat lebih dari 75% pada tahun 2030 di negara maju, dan lebih dari 90% di negara berkembang.

Tingginya kejadian kanker di dunia khususnya kanker payudara membutuhkan solusi baik pencegahan maupun pengobatan yang aman dan ekonomis. Pengobatan kanker payudara saat ini dilakukan dengan cara operasi dan kemoterapi. Kemoterapi mempunyai kelemahan yaitu harganya yang mahal dan efek samping yang ditimbulkan. Pengobatan kanker menggunakan pangan fungsional. Pengembangan pangan fungsional untuk mencegah dan mengobati kanker masih tergolong baru. Penggunaan pangan fungsional sebagai obat kanker memang tidak seefektif obat kemoterapi. Sehingga pengobatan kemoterapi tetap menjadi pilihan utama khususnya bagi pasien kanker stadium lanjut.

Daun pepaya berasal dari pohon pepaya yang termasuk dalam famili *Caricaceae*. Beberapa spesies dari *Caricaceae* telah digunakan sebagai obat untuk beberapa penyakit². Daun pepaya merupakan daun yang sangat murah dan mudah didapat karena pohon pepaya tumbuh sepanjang tahun dan dapat tumbuh dengan mudah di hampir seluruh wilayah Indonesia. Daun pepaya termasuk dalam makanan golongan sayuran yang dikonsumsi oleh sebagian masyarakat Indonesia khususnya masyarakat Jawa.

Daun pepaya diketahui mengandung senyawa bioaktif yang dapat meningkatkan jumlah antioksidan dalam darah dan menurunkan tingkat peroksidasi lipid. Senyawa tersebut antara lain papain, simopapain, sistatin, α -tokoferol, asam askorbat, flavonoid, sianogenik glukosida dan glukosinolat³. Pada penelitian sebelumnya melaporkan bahwa daun pepaya mengandung komponen yang mempunyai aktivitas anti-kanker antara lain α -tokoferol, likopen dan benzilsotiosianat⁴. Senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun pepaya yaitu *quercetin* dan *kaempferol*⁵. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun pepaya dengan air atau jus daun pepaya dapat menghambat pertumbuhan beberapa sel kanker salah satunya sel kanker payudara secara *in vitro*⁶.

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa ekstrak daun pepaya dapat menghambat proliferasi sel kanker payudara dengan nilai IC_{50} 1.319 μ g/mL sedangkan nilai IC_{50} Doxorubicin 3,78 μ g/mL. Dalam penelitian ini dilakukan uji efek kombinasi Doxorubicin dan ekstrak daun pepaya terhadap sel payudara pada tikus Sprague Dawley yang diinduksi DMBA.

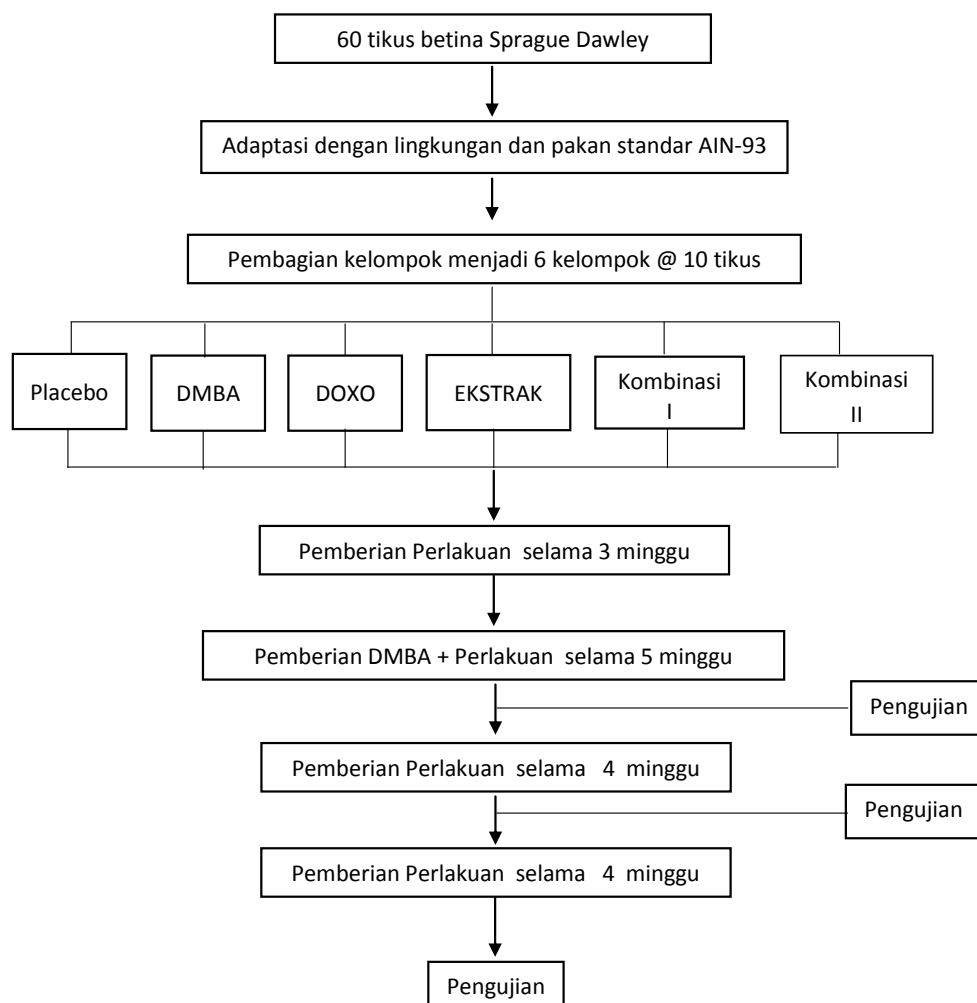
METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan disain *post test only with control group*. Penelitian dilakukan selama 16 minggu dan sebelum masuk waktu penelitian tikus diadaptasikan selama 7 hari dengan menggunakan pakan standar AIN-93. Tikus yang digunakan adalah tikus betina Sprague Dawley sebanyak 60 ekor tikus yang berumur $\pm$ 1 bulan. Tikus dibagi menjadi 6 kelompok yang terdiri dari kelompok placebo yang diberi pakan standar dan air minum, kelompok DMBA yang diberi pakan standar dan DMBA, Kelompok Doxorubicin yang diberi pakan standar, DMBA dan Doxorubicin dengan dosis 3,78 μ g/mL per ekor tikus, kelompok ekstrak daun pepaya yang diberi pakan standar, DMBA dan ekstrak daun pepaya dengan dosis 1.319 μ g/mL, kelompok kombinasi 1 yang diberi pakan standar, DMBA dan Doxorubicin+Ekstrak Daun Pepaya (50:50) dan kelompok kombinasi 2 yang diberi pakan standar, DMBA dan Doxorubicin+Ekstrak daun pepaya (25:75). Induksi DMBA (7,12-dimetilbenz(a)antrasenol) diberikan pada minggu ke 4 selama 5 minggu. Dosis DMBA 20 mg/kg BB diberikan dalam bentuk larutan dalam minyak jagung dengan konsentrasi 4 mg/mL. Analisa dilakukan tiga kali yaitu pada akhir minggu ke 8, akhir minggu ke 12 dan akhir minggu ke 16. Parameter yang diukur pada tahap ini adalah histopatologi jaringan payudara dan proliferasi sel. Sisa pakan ditimbang setiap hari sedangkan pengamatan berat badan, rambut dan feses tikus dilakukan seminggu sekali. Pemberian pakan standar sebanyak 20 gr dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

Sampel penelitian ini adalah ekstrak daun pepaya varietas Grendel. Daun Pepaya Grendel diperoleh dari petani lokal di Bantul Yogyakarta dan diambil pada urutan ke 7 atau 8.

Daun pepaya dikeringkan dalam oven 60°C selama 3 jam sebanyak 3 kali kemudian digiling. 1 gram daun pepaya giling kering dimasukkan ke dalam 20 mililiter pelarut dan diaduk. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol, etanol 70 % dan air. Metode ekstraksi yang digunakan adalah menggunakan *microwave* dengan persentase watt/panas sebesar 50 % dengan pengaturan 4 detik on dan 60 detik off selama tiga kali⁷. Kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring Whatman No 1 dan selanjutnya disimpan dalam refrigerator untuk pengujian lebih lanjut. Hasil ekstraksi kemudian dikeringkan dengan metode *freeze dryer*.

Pengamatan histopatologi dilakukan secara mikroskopis untuk mengamati sifat karsinogenisitas seluler pada jaringan yang diperiksa dengan menggunakan zat warna untuk sedimen histologi Hematoksin & Eosin (HE) yang dilakukan sesuai prosedur standar pengecatan yang dilakukan di Bagian Histologi dan Biologi Sel Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Kemudian dilakukan pemeriksaan histopatologi secara deskriptif kualitatif di bawah mikroskop binokuler (Olympus® DP12



Gambar 1. Disain penelitian efek kombinasi Doxorubicin dan ekstrak daun pepaya

microscope digital camera system, Japan) di laboratorium Histologi dan Biologi Sel Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dengan perbesaran 40x lensa objektif⁸. Blok parafin yang telah berisi jaringan dipotong setebal 3-4 μ m dan diletakkan di atas slide polylin kemudian diinkubasi semalam pada suhu 450°C. Selanjutnya dilakukan deparafinisasi dengan xilen sebanyak 3 kali masing-masing selama 3 menit. Dilanjutkan dengan pencucian dengan phosphate buffer saline (PBS) sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat kemudian direndam dalam 3% hidrogen peroksida dalam metanol selama 20 menit, lalu dicuci dengan akuades dilanjutkan pencucian dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan antigen retrieval dengan melakukan perendaman preparat dalam bufer sitrat pH 6,0 di dalam microwave. Lalu dibiarkan dingin selama 20-30 menit lanjutkan dengan pencucian PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat diinkubasikan dalam normal mouse serum selama 5 menit. Selanjutnya normal mouse serum dibersihkan (tanpa cuci), preparat ditetesi dengan antibodi Ki-67 selama 60 menit atau semalam dalam lemari es (8°C).

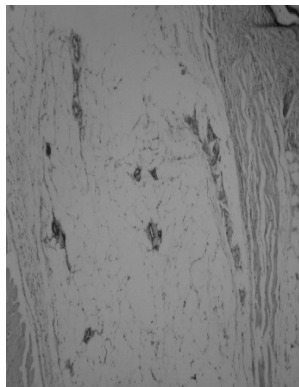
Dicuci dalam PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat diinkubasikan dengan antibodi sekunder terbiotinilasi selama 5 menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Kemudian ditetesi dengan streptavidin-peroksidase selama 5 menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat dicuci dengan air kran selama 10-15 menit, selanjutnya dilakukan counterstain dengan hematoxylin selama 3-4 menit. Preparat dicuci dengan air kran 10-15 menit. Dilanjutkan rehidrasi secara bertingkat dengan etanol absolut, etanol 95%, etanol 80% dan xylol sebanyak 2 kali. Terakhir dilakukan mounting sebelum ditutup dengan *deck glass*. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100 kali. Aktivitas proliferasi sel dihitung dengan melihat jumlah inti sel yang berwarna coklat pada 100 sel. Tiap slide dinilai 4 lapangan pandang dimulai dari atas ke bawah⁹.

Teknik pengecatan Hematoksilin & Eosin (HE) merupakan salah satu metode mikroskopis untuk mengetahui gambaran histopatologi sel.

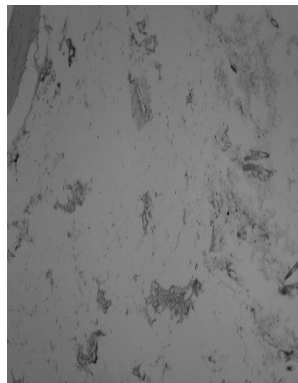
HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis histopatologi yang dilakukan terhadap sel payudara tikus kelompok kontrol DMBA menunjukkan terjadinya *multiple nucleoli* dan perubahan morfologi sel payudara yaitu hiperproliferasi yang mengarah karsinogenesis (Gambar 2a,2b,2c). Hal tersebut berbeda pada kelompok kontrol placebo (Gambar 2d,2e,2f) dan kelompok kontrol Doxorubicin (Gambar 2g,2h,2i) terlihat susunan hepatosit yang masih teratur yaitu inti sel-sel payudara kedua kelompok tampak monokromatis tercat ungu dengan pengecatan Hematoksilin & Eosin (HE),

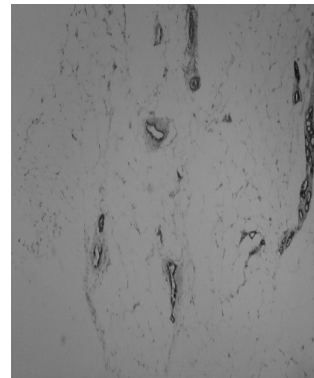
bentuk sel tampak sama (isositosis), dan tidak terdapat kelainan pada sitoplasma. Pada kelompok perlakuan Ekstrak Daun Pepaya kombinasi I (Gambar 2m,2n,2o) mampu memperbaiki keadaan histopatologi sel payudara yang terinduksi DMBA lebih baik dibanding kelompok perlakuan ekstrak daun pepaya (Gambar 2j,2k,2l) dan kombinasi II (Gambar 2p,2q,2r). Terdapat sedikit perbedaan untuk semua kelompok pada minggu ke-8, minggu ke-12 dan minggu ke 16. Untuk menegaskan telah terjadinya karsinogenesis melalui aktivitas proliferasi sel dapat diamati lebih lanjut dengan metode IHC Ki-67.



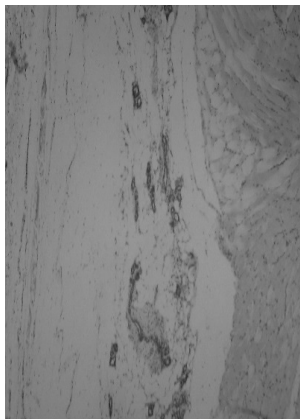
(a) Placebo Minggu Ke-8



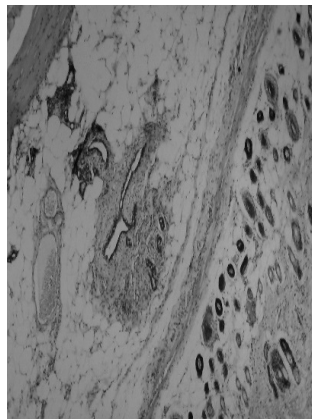
(b) Placebo Minggu Ke-12



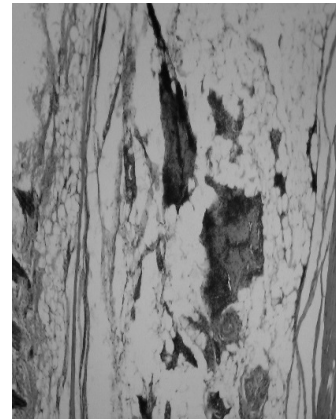
(c) Placebo Minggu Ke-16



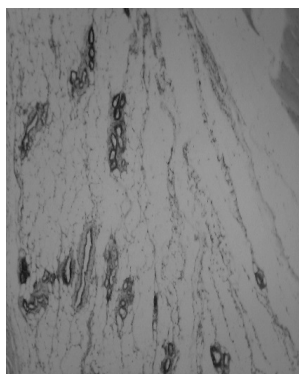
(d) DMBA Minggu Ke-8



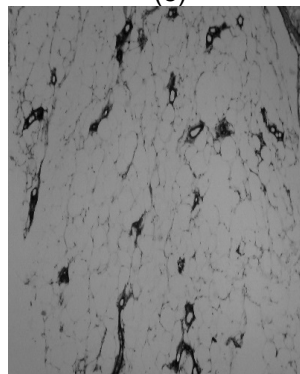
(e) DMBA Minggu Ke-12



(f) DMBA Minggu Ke-16



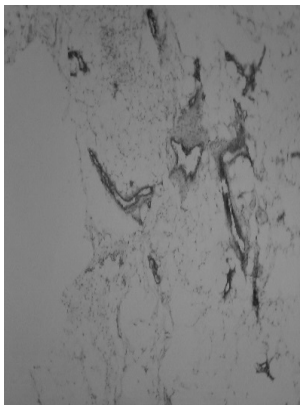
(g) DOXO Minggu Ke-8



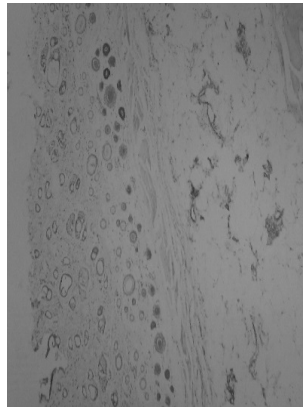
(h) DOXO Minggu Ke-12



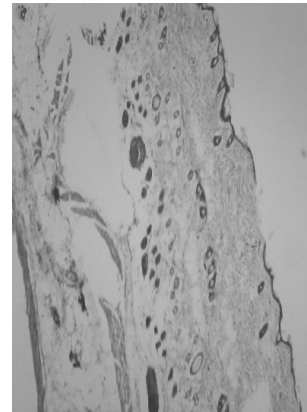
(i) DOXO Minggu Ke-16



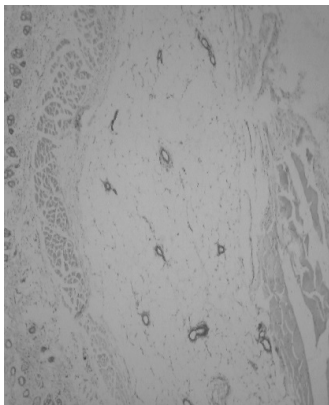
(j) EDP Minggu Ke-8



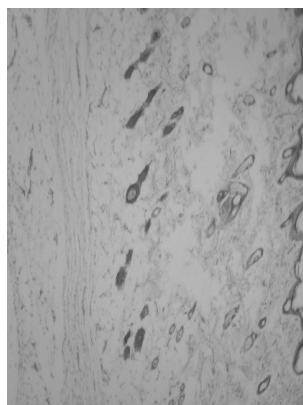
(k) EDP Minggu Ke-12



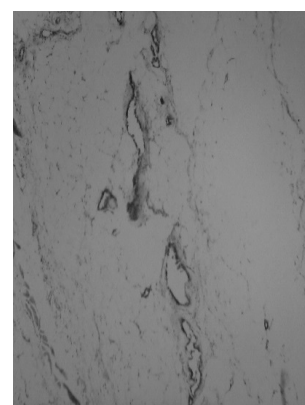
(l) EDP Minggu Ke-16



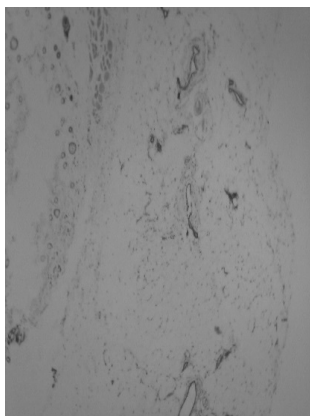
(m) Kombinasi I Minggu Ke-8



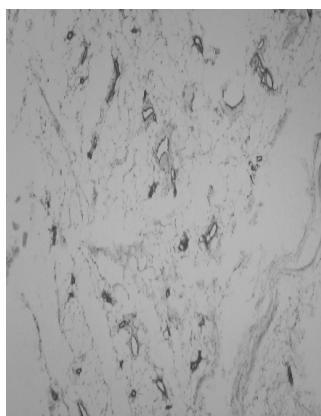
(n) Kombinasi I Minggu Ke-12



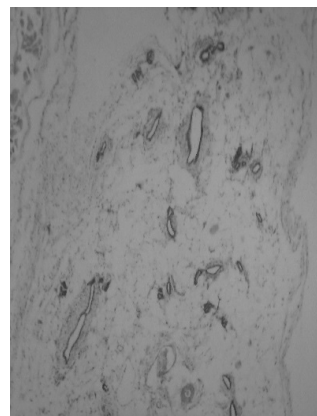
(o) Kombinasi I Minggu Ke-16



(p) Kombinasi II Minggu Ke-8



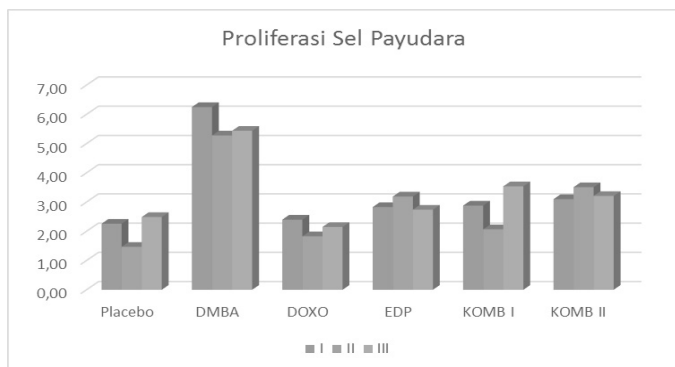
(q) Kombinasi II Minggu Ke-12



(r) Kombinasi II Minggu ke-16

Gambar 2. Histopatologi sel payudara tikus kelompok placebo (a,b,c), DMBA (d,e,f), Doxorubicin (g,h,i), ekstrak daun pepaya (j,k,l), kombinasi I (m,n,o) dan kombinasi II (p,q,r)

Metode IHC Ki-67 digunakan dalam memperkirakan aktivitas pembelahan sel dengan mengkuantifikasi inti sel yang mengindikasikan aktivitas proliferasi sel¹⁰. Imunohistokimia adalah metode untuk mendeteksi keberadaan antigen spesifik di dalam sel suatu jaringan dengan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi (Ab) dan antigen (Ag) pada jaringan hidup. Imunohistokimia bermanfaat untuk identifikasi, lokalisasi, dan karakterisasi suatu antigen tertentu, serta menentukan diagnosis, terapi, dan prognosis kanker. Teknik ini diawali dengan pembuatan irisan jaringan (histologi) untuk diamati dibawah mikroskop. Interaksi antara antigen-antibodi adalah reaksi yang tidak kasap mata. Tempat pengikatan antara antibodi dengan protein spesifik diidentifikasi dengan marker yang biasanya dilekatkan pada antibodi dan bisa divisualisasi secara langsung atau dengan reaksi untuk mengidentifikasi marker. Tingkat proliferasi sel payudara normal maupun sel payudara dengan prognosis menuju kanker diketahui dengan menghitung jumlah inti sel yang berwarna coklat. Adapun jumlah sel yang mengalami proliferasi untuk semua kelompok perlakuan dapat dilihat pada Gambar 3. Tingkat proliferasi sel paling rendah pada kelompok perlakuan kombinasi 1 dibandingkan kelompok perlakuan kombinasi 2 dan kelompok ekstrak daun pepaya.



Gambar 3. Proliferasi sel payudara tikus semua kelompok perlakuan

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa perlakuan kombinasi I memiliki kemampuan mencegah terjadinya kanker payudara dan juga memperbaiki sel payudara yang mengalami karsinogenesis. Perlakuan kombinasi I memiliki tingkat proliferasi paling rendah dibandingkan perlakuan ekstrak daun pepaya dan kombinasi II.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Cancer Research Fund, 2000, American Institute for Cancer Research: *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. Menasha, WI: BANTA Book Group.
2. Mello, V.J., Gomes, M.T., Lemos, F.O., Delfino, J.L., Andrade, S.P., Lopes, M.T., Salas, C.E., 2008. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*, *Phytomedicine*, 15; 237–244.
3. Seigler, D.S., Pauli, G.F., Nahrstedt, A., Leen, R., 2002. Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*. *Phytochemistry*, 60 :873–882.
4. Ching, L.S. dan Mohamed, S., 2001, Alpha-tocopherol content in 62 edible tropical plants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3101-3105.
5. Mian, K.H., Mohamed, S., 2001, Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49; 3106–3112.
6. Otsuki, N., Dang, N.H., Kumagai, E., Kondo, A., Iwata, S., Morimoto, C., 2010. Aqueous Extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effect, *Journal of Ethnopharmacology*, 127; 760-767.
7. Victorio, C.P., Lage, C.L.S., Kuster, R.M., 2009, Flavonoid extraction from *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt et Smith leaves using different techniques and solvents, *Ecl. Quim., Sao Paulo*, 34 (1) ;19-24
8. Fauzi, I. A., Amalia F., Sabila, N., Hermawan, A., Ikawati, M. dan Meiyanto, E., 2011, Aktivitas Antiproliferasi Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) Terhadap Sel Hepar Tikus Betina Galur Sprague Dawley Terinduksi 7,12 Dimetilbenz[a]antrasena, *Majalah Kesehatan PharmaMedika*, 3(1); 194-199.
9. Sukamdi, D.P., Asyhar, A. Febriansah, R., Ashari, R.A., Jenie, R.I. dan Meiyanto, E., 2010, Peningkatan Ekspresi p53 oleh ekstrak etanolik rumput mutiara (*Hedyotis corymbosa*) pada sel hepar tikus *Sprague Dawley* terinduksi 7,12-dimetilbenz(a)antrasena, *PHARMACON*, 11 (1); 1-6.
10. Derenzini M, Trere D, O' Donohue, MF and Ploton D., 2003, Interphase Nucleolar Organizer Regions in Tumor Pathology. Crocker, J and Murray, P.G (editor), *Molecular Biology in Cellular Pathology*. Chichester : John Wiley & Sons Ltd.