

**PENGARUH PEMBERIAN KURKUMIN KADAR TINGGI
TERHADAP FAKTOR ANGIOGENIK VEGF PADA KULTUR
JARINGAN KANKER PAYUDARA MCF-7**

T E S I S

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
MAGISTER BIOMEDIK (M.Biomed)**

**IMELDA ROSALYN SIANIPAR
0606150744**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI MAGISTER BIOMEDIK
KEKHUSUSAN FISILOGI
JAKARTA
JULI 2009**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun
dirujuk telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Imelda Rosalyn Sianipar

NPM : 0606150744

Tanda tangan : 



Tanggal : 15 Juli 2009

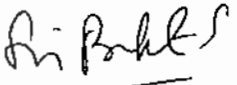
HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Imelda Rosalyn Sianipar
NPM : 0606150744
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Pengaruh Pemberian Kurkumin Kadar Tinggi terhadap Faktor Angiogenik VEGF pada Kultur Jaringan Kanker Payudara MCF-7

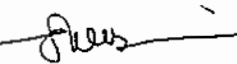
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof.Dr.dr. Sri Bakti Subakir, MS

()

Pembimbing II : dr. Sonar Soni Panigoro, SpB-Onk(K)

()

Penguji I : dr. Dewi Irawati, MS

()

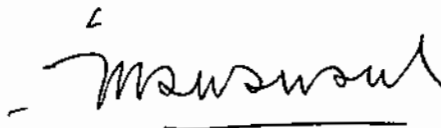
Penguji II : Dra. Ria Kodariah, MS

()

Penguji III : Ahmad R. Utomo, PhD

()

Ditetapkan di : Jakarta
Tanggal : Juli 2009
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik



(Dr.rer.physiol.dr.Septelia Inawati Wanandi)

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur dihadapan Tuhan Yang Maha Kudus, karena hanya dengan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan ini. Tesis ini dilaksanakan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan studi di Program Magister Ilmu Biomedik dalam Tesis yang berjudul Pengaruh pemberian kurkumin kadar tinggi terhadap faktor angiogenik VEGF pada kultur jaringan kanker payudara MCF-7

Dalam kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang setulusnya atas segala bentuk bantuan dan dukungan, baik berupa materi, gagasan, bimbingan maupun koreksi tulisan, karena berkat bantuan beliau, saya bisa menyelesaikan tesis ini terutama kepada

1. Prof.Dr.dr. Sri Bakti Subakir, MS sebagai dosen pembimbing pertama dalam tesis. Terima kasih atas semua saran, bimbingan dan dukungan alat dan bahan penelitian yang diberikan selama penulis melakukan penelitian dan mengerjakan tesis.
2. Dr. Sonar Soni Panigoro, SpB-Onk, yang telah bersedia menjadi pembimbing tesis kedua saya ditengah-tengah kesibukannya di RSCM-FKUI.
3. Dr. Dewi Irawati, MS, Dra. Ria Kodariah, MS, Ahmad R Utomo, PhD sebagai para penguji tesis saya yang telah banyak memberikan masukan dan perbaikan untuk hasil tesis yang lebih baik.
4. Dr.dr.Ratna Sitompul, Sp.M (K) sebagai dekan FKUI dan Prof.dr.Menaldi Rasmin, Sp.P (K), FCCP sebagai Dekan periode 2004-2008 yang menerima saya sebagai mahasiswa biomedik .
5. Dr.rer.physiol.dr.Septelia Inawati W sebagai Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik yang turut membantu saya untuk cepat selesai pendidikan
6. dr.Ermita Ilyas, MS sebagai Kepala Departemen Fisiologi Kedokteran FKUI, yang mendorong saya untuk terus semangat agar pendidikan saya cepat selesai.
7. dr. Nurhadi Ibrahim, PhD sebagai ketua kekhususan Fisiologi Kedokteran FKUI yang mendorong saya untuk cepat selesai juga pendidikannya.

8. Dra. Arleni, MS, Mba Trimiatur, Mba Neneng, Mba Ai dan Mba Yuyun atas bantuan dan bimbingannya selama penelitian saya di Laboratorium Makmal Terpadu FKUI.
9. Seluruh staf pengajar dan karyawan di Departemen Fisiologi Kedokteran FKUI. Terima kasih atas kecerewetannya terhadap saya, sehingga saya dapat tetap semangat menjalani pendidikan S2 sambil menunaikan tugas-tugas pekerjaan di Departemen.
10. drg. Aynie Yunita, yang telah membantu saya dalam tata bahasa penulisan tesis ini dan meluangkan waktu untuk mendengarkan keluh kesah saya ditengah kesibukannya.
11. dr. Sophie Yolanda yang telah membantu saya dalam penulisan.
12. Mamaku tersayang, yang tak henti-hentinya mendoakan saya agar mendapatkan yang terbaik dalam studi S2 ini.
13. Suamiku dan Ayahku tercinta yang sangat berperan dalam dukungan moril maupun materiil dan tak lupa juga dukungan doa dari mereka yang menguatkan saya untuk menyelesaikan studi.
14. Adik-adikku dan seluruh keluarga besarku yang banyak mendorong saya untuk dapat dengan cepat menyelesaikan studi ini.
15. Teman-teman yang tidak bisa disebutkan namanya satu persatu. Dan semua guru yang telah mendidik semenjak kecil hingga sekarang. Serta semua pihak yang telah membantu selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Dengan rendah hati penulis menyadari bahwa tidak ada karya yang sempurna selain Karya-Nya. Oleh karena itu kepada segenap pembaca karya ini, penulis menghaturkan penghargaan dan ucapan terima kasih.

Jakarta, 15 Juli 2009

Imelda Rosalyn Sianipar

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Imelda Rosalyn Sianipar
NPM : 0606150744
Program Studi : Ilmu Biomedik
Departemen : Fisiologi Kedokteran
Fakultas : Kedokteran
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Pengaruh Pemberian Kurkumin Kadar Tinggi terhadap Faktor Angiogenik VEGF pada Kultur Jaringan Kanker Payudara MCF-7

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia / format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya .

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 15 Juli 2009
Yang menyatakan



(Imelda Rosalyn Sianipar)

ABSTRAK

Nama : Imelda Rosalyn Sianipar
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Judul : Pengaruh Pemberian Kurkumin Kadar Tinggi terhadap Faktor Angiogenik VEGF pada Kultur Jaringan Kanker Payudara MCF-7

Latar Belakang: Kanker payudara adalah salah satu kanker yang paling sering terjadi pada wanita. Dalam perkembangannya, sel kanker payudara membutuhkan vaskularisasi baru. Sel kanker mampu menginisiasi pembentukan pembuluh darah baru bagi dirinya sendiri dengan cara mengubah keseimbangan antara faktor proangiogenik dan antiangiogenik. Kurkumin adalah molekul yang pleiotropik, dapat memodulasi berbagai target pada sel kanker, termasuk aktivasi berbagai faktor transkripsi, reseptor, protein kinase, reseptor, sitokin, enzim dan faktor pertumbuhan yang diperlukan dalam pertumbuhan sel kanker payudara.

Tujuan: Untuk mengetahui pengaruh pemberian kurkumin kadar tinggi terhadap kadar VEGF pada kultur jaringan sel kanker payudara MCF-7.

Metode: subkultur jaringan kanker payudara MCF-7 dalam medium RPMI komplet+ FBS 10% sejumlah 9 sampel tiap kelompok perlakuan. Inkubasi 72 jam. Cairan kultur diambil, kadar VEGF diperiksa secara kuantitatif dengan ELISA.

Hasil: kadar VEGF kelompok MCF-7+kurkumin 0,05mM berbeda bermakna dengan kadar VEGF kelompok MCF-7 tanpa kurkumin ($p=0,014$). Kadar VEGF kelompok perlakuan MCF-7+kurkumin 0,1mM juga berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok MCF-7 tanpa kurkumin ($p=0,001$). Namun kadar VEGF kelompok MCF-7+kurkumin 0,05mM jika dibandingkan dengan kelompok MCF-7+kurkumin 0,1mM tidak berbeda bermakna ($p=0,262$).

Kesimpulan: Kurkumin kadar 0,05mM dan 0,1mM dapat menurunkan kadar VEGF pada kultur jaringan kanker payudara MCF-7. Kurkumin kadar 0,05mM dan 0,1mM dapat menghambat proliferasi sel yang diikuti dengan penurunan kadar total VEGF pada kultur jaringan kanker payudara MCF-7.

Kata kunci: kurkumin, kanker payudara, VEGF, angiogenesis.

ABSTRACT

Name : Imelda Rosalyn Sianipar
Study Program: Biomedical Science
Title : The Influence of High Concentration of Curcumin towards VEGF level as and angiogenic factor in tissue culture of breast cancer cell line MCF-7

Background: Breast cancer is one of the most prevalent cancer in women. In order to grow, the tumor cells require new vascularization. New vascularization is initiated by the tumor cells themselves by recruitment of their own blood supply by shifting the balance between proangiogenic and antiangiogenic factors. Curcumin is a pleiotropic factor which can modulate various targets on cancer cells, including activation of transcription factors, receptors, protein kinases, cytokines, enzymes, and growth factors needed for breast cancer cells' growth.

Objective: To identify the influence of high dose curcumin towards VEGF level in breast cancer cell line MCF-7.

Method: In this study, breast cancer cell line MCF-7 was subcultured in complete RPMI medium + FBS 10%, with 9 samples for each treatment group; then incubated for 72 hours. VEGF concentration was measured with ELISA from the supernatant of the cell culture.

Result: The VEGF levels of both MCF-7 + curcumin 0.05 mM treatment group and MCF-7 + curcumin 0.1 mM treatment group are significantly lower than the VEGF level of MCF-7 without curcumin treatment group ($p = 0.014$ and $p = 0.001$). The VEGF level of MCF-7 + curcumin 0.05 mM treatment group is not significantly different from the VEGF level of MCF-7 + curcumin 0.1 mM treatment group ($p = 0.262$).

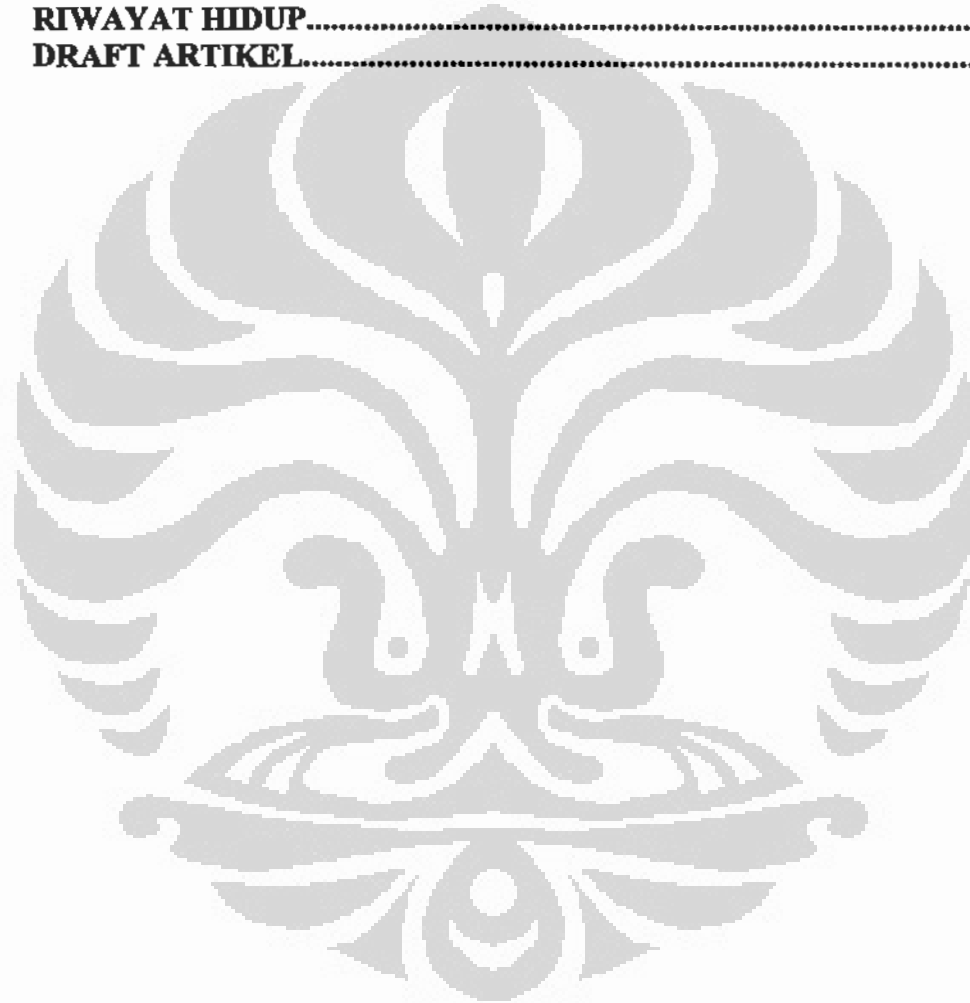
Conclusion: Curcumin dose of 0.05mM and 0.1mM lower the VEGF level in breast cancer cell line MCF-7. Curcumin dose of 0.05 mM and 0.1mM lower the proliferation of breast cancer cell line MCF-7.

Keywords: curcumin, breast cancer, VEGF, angiogenesis

DAFTAR ISI

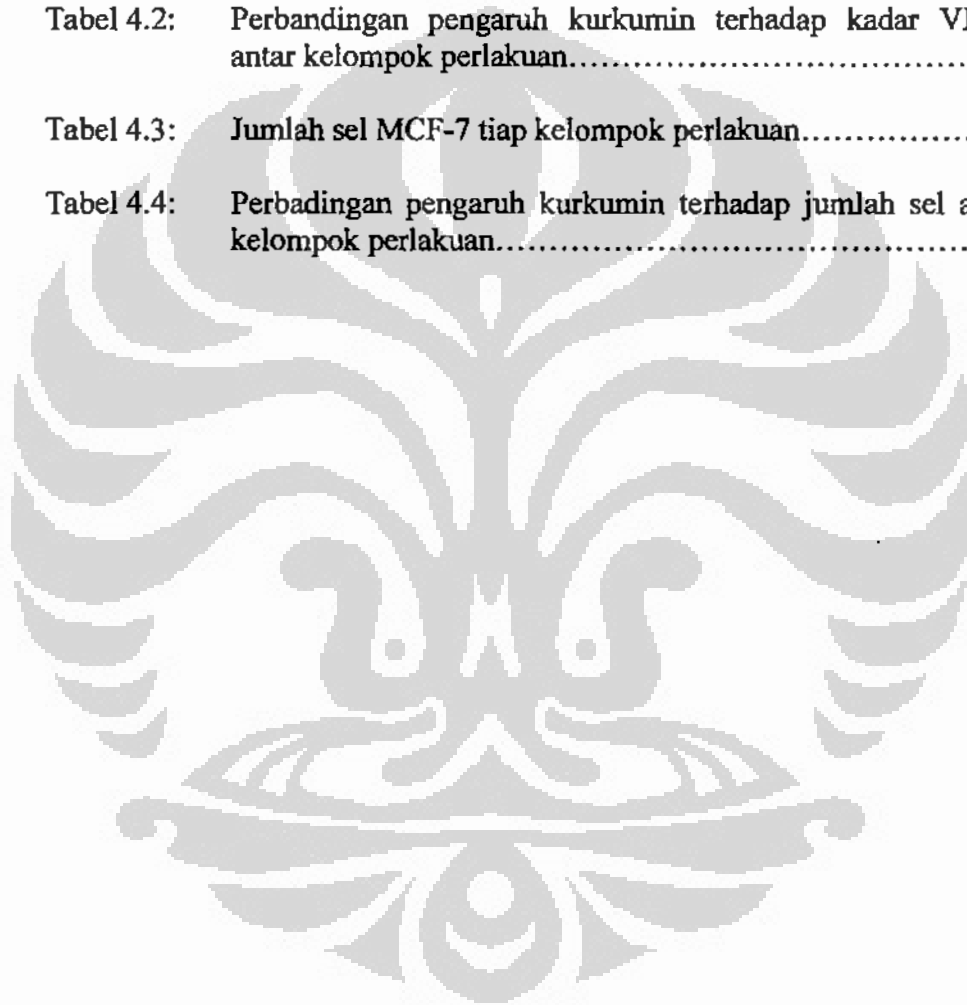
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Pertanyaan Penelitian.....	4
1.3 Hipotesis.....	5
1.4 Tujuan.....	5
1.5 Manfaat.....	5
2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Kanker Payudara.....	6
2.2 Angiogenesis Kanker Payudara.....	7
2.3 <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>	10
2.4 Kurkumin.....	13
2.5 Kurkumin dan Angiogenesis.....	17
METODE PENELITIAN.....	19
3.1 Desain Penelitian.....	19
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	19
3.3 Sampel dan Perhitungan Jumlah Sampel.....	19
3.3.1 Sampel.....	19
3.3.2 Perhitungan Jumlah Sampel.....	19
3.4 Alat dan Bahan.....	19
3.4.1 Alat.....	19
3.4.2 Bahan.....	20
3.5 Cara Kerja.....	21
3.5.1 Pembuatan Medium Kultur.....	21
3.5.2 Pembuatan Larutan Kurkumin.....	21
3.5.3 Kultur jaringan sel kanker payudara galur MCF-7.....	22
3.5.4 Pengambilan cairan kultur.....	23
3.5.5 Pengukuran kadar VEGF.....	23
3.6 Alur Penelitian.....	26

3.7 Analisis Data	26
4 HASIL PENELITIAN.....	28
5 PEMBAHASAN.....	30
6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	35
DAFTAR REFERENSI	36
LAMPIRAN.....	42
RIWAYAT HIDUP.....	55
DRAFT ARTIKEL.....	57



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Karakteristik Protein VEGF.....	12
Tabel 2.2	Reseptor VEGF, Ligan dan fungsinya.....	13
Tabel 4.1:	Kadar VEGF pada serapan 450 nm dengan koreksi 540 nm...	28
Tabel 4.2:	Perbandingan pengaruh kurkumin terhadap kadar VEGF antar kelompok perlakuan.....	29
Tabel 4.3:	Jumlah sel MCF-7 tiap kelompok perlakuan.....	29
Tabel 4.4:	Perbandingan pengaruh kurkumin terhadap jumlah sel antar kelompok perlakuan.....	30



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1:	<i>Angiogenic Switch</i>	8
Gambar 2.2:	Proses angiogenesis sel kanker avaskuler menjadi sel kanker yang vaskuler.....	9
Gambar 2.3:	Struktur Ikatan VEGF dan Reseptor VEGF.....	11
Gambar 2.4:	Tanaman <i>Curcuma Longa</i> (A), Rhizome (akar) (B), Rhizome kering (C).....	14
Gambar 2.5:	Struktur kimia kurkumin dan fraksinya.....	16
Gambar 2.6:	Potensi kurkumin terhadap beberapa jenis kanker.....	16
Gambar 2.7:	Kurkumin sebagai molekul yang <i>multi-target</i>	17
Gambar 2.8:	Regulasi ekspresi protein VEGF.....	18
Gambar 3.1:	Pengenceran larutan Standart ELISA VEGF.....	24
Gambar 3.2:	Alur kerja penelitian.....	26

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1:	Perbandingan Hasil Kadar VEGF antara kelompok perlakuan kontrol dan kelompok perlakuan kurkumin...	42
Lampiran 2:	Histogram kadar VEGF kelompok kontrol dan kelompok kurkumin kadar 0.05mM.....	43
Lampiran 3:	Histogram kadar VEGF kelompok kurkumin kadar 0.1mM..	44
Lampiran 4:	Transformasi data kadar VEGF kelompok perlakuan dengan metode akar kuadrat.....	45
Lampiran 5:	Histogram kadar VEGF kelompok kontrol dan kelompok kurkumin kadar 0.05mM setelah transformasi data.....	46
Lampiran 6:	Histogram kadar VEGF kelompok kurkumin kadar 0.1mM setelah transformasi data.....	47
Lampiran 7:	Normal Q-Q Plots Kadar VEGF kelompok perlakuan...	48
Lampiran 8:	Box Plots Kadar VEGF kelompok perlakuan.....	49
Lampiran 9:	Test Varians.....	50
Lampiran 10:	Uji One-Way ANOVA.....	50
Lampiran 11:	Distribusi data jumlah sel tiap kelompok ($\times 10^4$).....	51
Lampiran 12:	Uji Hipotesis: Tes Kruskal Wallis.....	52
Lampiran 13:	Uji Korelasi antara kelompok perlakuan dengan jumlah sel.....	53
Lampiran 14:	Uji Korelasi antara jumlah sel dan kadar VEGF sel kanker MCF-7.....	54

DAFTAR SINGKATAN

WHO	=	World health organization
SKRT	=	Survei kesehatan rumah tangga
SIRS	=	Sistem informasi rumah sakit
VEGF	=	Vascular endothelial growth factor
FDA	=	Food and drug administration
FGF	=	Fibroblast growth factor
uPA	=	urokinase-type Plasminogen activator
MMPs	=	Matrix metalloproteinase
TNF α	=	Tumor necrotizing factor α
HIF	=	Hypoxia inducible factor
HRE	=	Hypoxia responsive element
VEGFR	=	Vascular endothelial growth factor receptor
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
NRP	=	Neuropilin
PLGF	=	Placental growth factor
NOS	=	Nitrit oksida sintase
Akt	=	protein kinase B
ERK1/2	=	extracellular signal-regulated kinase 1/2
HER-2	=	human epidermal growth factor receptor 2
PI3K	=	Phospatidilinositol-3 Kinase
mRNA	=	messenger Ribonucleicacid
NaCl	=	Natrium Chloride
PBS	=	Phosphate Buffered Saline
TC 25 flask	=	Tissue culture 25 ml flask
RPMI	=	Roswell park memorial institute
EDTA	=	Ethylenediaminotetra-acetic acid
NaOH	=	Natrium hidroksida
HCl	=	Hydrochloric acid
NaHCO ₃	=	Natrium bikarbonat

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker adalah salah satu penyakit yang banyak menimbulkan kesengsaraan dan kematian pada manusia. WHO merilis data pada tahun 2005 yang menyatakan kanker sebagai penyebab kematian tertinggi di dunia.¹ Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT 2001) juga merilis data bahwa kanker menempati urutan ke-5 sebagai penyebab kematian di Indonesia dan terus meningkat secara bermakna.² Dari 58 juta kematian, 7,6 juta (13%) kematian disebabkan oleh kanker. Diperkirakan pada tahun 2015, kematian akibat kanker akan meningkat hingga 9 juta orang. Hasil data WHO tahun 2005, diketahui bahwa lima penyebab kematian terbesar akibat kanker meliputi:

1. Kanker paru (1,3 juta kematian/tahun)
2. Kanker lambung (hampir 1 juta kematian/tahun)
3. Kanker hati (662.000 kematian/tahun)
4. Kanker colon (655.000 kematian/tahun)
5. Kanker payudara (502.000 kematian/tahun)¹

Saat ini, kanker payudara adalah salah satu kanker yang paling sering terjadi pada wanita di negara berkembang.³ Beberapa sumber menyatakan bahwa kanker payudara adalah kanker kedua tersering pada wanita Indonesia setelah kanker serviks.^{4,5,6,7} Berdasarkan Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2001 menyatakan bahwa kanker payudara menempati urutan kedua sebesar 24,97% sebagai kanker yang sering dialami oleh wanita Indonesia, setelah kanker serviks.⁸ Berdasarkan data Globocan, IARC 2002, didapatkan estimasi insidens kanker payudara di Indonesia sebesar 26 per 100.000 perempuan.² Selain itu, Pusat Kanker Nasional Dharmais melaporkan ada 150 kasus baru kanker payudara tiap tahunnya, sedangkan di Asia Pasifik jumlah kasus baru kanker payudara sekitar 200.000 pasien per tahun atau 13% dari keseluruhan kasus baru kanker.⁹ Berbeda dengan data survei lainnya, Profil kesehatan Indonesia tahun 2007 yang dirilis oleh Departemen Kesehatan Republik Indonesia menyatakan bahwa saat ini

kanker payudara adalah kanker tertinggi yang paling sering terjadi pada wanita Indonesia sejak tahun 2004 hingga 2006, diikuti dengan kanker leher rahim (SIRS=Sistem Informasi RS 2007).¹⁰ Terdapat peningkatan jumlah kasus kanker payudara sebesar 6% dari tahun 2005 ke tahun 2006. Berdasarkan data di atas diketahui bahwa telah terjadi peningkatan kanker payudara pada wanita Indonesia.¹⁰

Kanker payudara masih merupakan penyakit yang ditakuti oleh wanita. Hal tersebut terjadi karena adanya kemungkinan perlunya pengangkatan jaringan payudara sebagai salah satu terapi pengobatan. Sehingga, tak jarang wanita yang menjadi tidak percaya diri dan merasa tidak utuh sebagaimana seharusnya wanita normal setelah kehilangan bagian dari ciri kewanitaan itu. Perasaan tersebut dapat menurunkan kemampuan bertahan hidup penderita.⁶

Kanker payudara adalah suatu keganasan yang terjadi pada kelenjar payudara. Dalam perkembangannya, sel kanker payudara membutuhkan vaskularisasi baru (*neovascularization*).^{11,12,13} Jaringan kapiler yang luas dibutuhkan guna memenuhi kebutuhan oksigen dan nutrisi.¹⁴ Aktivitas angiogenesis kanker payudara merupakan faktor penentu perkembangan dan kemampuan bertahan sel kanker tersebut.^{11,15} Selain dari perkembangan dan pertumbuhan sel kanker, angiogenesis juga turut berperan dalam proses metastasis.¹² Hal ini terjadi akibat penetrasi pembuluh darah yang baru kedalam sel tumor (*intratumoral*) merupakan jalan atau tempat masuknya sel kanker ke dalam sirkulasi darah dan bermetastasis ke organ-organ yang jauh.^{14,16}

Sel kanker mampu menginisiasi pembentukan pembuluh darah baru bagi dirinya sendiri dengan cara mengubah keseimbangan antara faktor proangiogenik dan faktor antiangiogenik.¹² Hal ini dikenal dengan istilah *angiogenic switch*. Faktor proangiogenik akan merangsang terjadinya angiogenesis, sedangkan faktor antiangiogenik akan menghambat angiogenesis.¹⁷ Angiogenesis sel kanker merupakan suatu proses yang kompleks yang melibatkan interaksi antar sel dengan berbagai faktor dan komponen matriks ekstraseluler.¹⁴ Sel atau jaringan

yang mengalami hipoksia dan kekurangan nutrisi akan mensekresikan faktor-faktor proangiogenik, yang selanjutnya merangsang terjadinya proses angiogenesis. Angiogenesis tersebut bertujuan meningkatkan vaskularisasi ke sel atau jaringan yang mengalami hipoksia dan kekurangan nutrisi, sehingga sel-sel tersebut akan mendapatkan oksigen dan nutrisi yang cukup.¹⁴ Salah satu faktor yang turut berperan penting dalam proses angiogenesis adalah VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) dan reseptornya.¹² VEGF merupakan suatu mediator yang berperan merangsang proliferasi sel endotel pembuluh darah untuk memulai proses angiogenesis.

Pada tahun 1971, pengobatan kanker dengan cara kemoterapi mulai diperkenalkan dan tahun 1991 juga mulai dikenal terapi dengan target spesifik. Penelitian untuk terapi kanker saat ini banyak menitikberatkan pada anti terhadap faktor proangiogenik yang menekan atau menghambat kerja dari VEGF serta reseptornya. Terapi yang menjadikan VEGF sebagai target molekul, antara lain terapi yang menggunakan molekul antibodi yang dapat menetralkan atau melawan VEGF dan reseptor VEGF, dan juga molekul kecil yang bertindak sebagai inhibitor transduksi sinyal dalam regulasi transkripsi VEGF.¹¹

Perkembangan penelitian terapi kanker dapat dilihat dari banyaknya obat anti kanker yang disetujui oleh U.S FDA (*United States Food and Drug Administration*). Lebih dari 70% obat anti kanker yang disetujui oleh FDA dapat ditelusuri kembali asal obat tersebut yang berasal dari tanaman (produk alam), yang sejak dulu telah digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai penyakit. Pendekatan terapi kanker khususnya kanker payudara saat ini juga sudah mulai melakukan pendekatan terapi menggunakan produk alami yang berbahan dasar dari tanaman atau *herbal medicine*, dan hal ini kerap digeluti oleh para peneliti.¹⁸ Curcumin merupakan salah satu fitokimia yang banyak diteliti kegunaannya sebagai obat anti kanker.

Selama berabad-abad, kurkumin telah digunakan sebagai pewarna kekuningan pada kari dan pemberi rasa pedas pada makanan orang Asia.¹⁹

Kurkumin tersebar luas di negara dengan iklim tropis seperti India, Cina, Indonesia dan negara di benua Asia lainnya. Tanaman ini dikenal dengan nama kunyit di Indonesia. Selain digunakan sebagai bumbu masakan, zat ini juga telah digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai penyakit di berbagai belahan dunia. Pada pengobatan tradisional india (Ayurveda), kurkumin telah digunakan untuk mengobati inflamasi. Selain itu, kurkumin juga digunakan untuk mengobati penyakit antara lain, penyakit hati (jaundice), gangguan pencernaan, penyakit traktus urinarius, artritis rheumatoid dan gigitan binatang.^{19,20,21,22} Kurkumin adalah molekul yang pleiotropik, dapat memodulasi berbagai target pada sel kanker, termasuk aktivasi berbagai faktor transkripsi, reseptor, protein kinase, sitokin, enzim dan faktor pertumbuhan yang diperlukan dalam pertumbuhan sel kanker payudara.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kurkumin efektif dalam menghambat pertumbuhan dan proliferasi sel kanker kolon, kulit, prostat, dan paru.^{19,23} Pada kanker payudara, penelitian Shao dkk (2002) menunjukkan bahwa pemberian kurkumin pada kultur jaringan kanker payudara *MCF-7 cell line* tidak menekan kadar VEGF sebagai faktor angiogenik.²¹ Penelitian tersebut menggunakan kadar kurkumin sebesar 50 μ M. Sedangkan Gururaj dkk menggunakan kadar kurkumin 10 μ M terhadap kultur sel endometrium dan didapatkan efek supresi terhadap kadar VEGF. Berdasarkan beberapa penelitian di atas, kurkumin efektif terhadap berbagai jenis kanker dan kultur sel lainnya serta memiliki karakteristik yang pleiotropik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah kurkumin dengan kadar yang lebih tinggi dapat menekan kadar VEGF.

1.2 Pertanyaan Penelitian

Apakah dengan pemberian kurkumin kadar tinggi akan menurunkan kadar VEGF pada kultur jaringan sel kanker payudara MCF-7 dibandingkan dengan kultur jaringan kanker payudara tanpa pemberian kurkumin?

1.3 Hipotesis Penelitian

Kurkumin kadar tinggi menurunkan kadar VEGF pada kultur jaringan kanker payudara MCF-7 *cell line*

1.4 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui apakah kadar VEGF pada kultur jaringan sel kanker payudara MCF-7 menurun dengan pemberian kurkumin kadar tinggi dibandingkan dengan kultur jaringan sel kanker payudara MCF-7 yang tidak diberi kurkumin.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Memperkaya literatur efek pemberian kurkumin terhadap perkembangan penyakit kanker payudara
2. Memberikan data tambahan untuk penelitian biomedik selanjutnya pada tingkat gen atau molekuler baik secara *in vitro* maupun *in vivo* yang berhubungan dengan efek kurkumin terhadap ekspresi VEGF sebagai salah satu faktor proangiogenik dan korelasinya terhadap aktivitas angiogenesis kultur jaringan kanker payudara
3. Memberikan referensi baru untuk kadar kurkumin efektif yang dapat menurunkan kadar VEGF.
4. Sebagai penelitian dasar untuk penelitian lanjutan penggunaan kurkumin sebagai alternatif terapi terhadap kanker payudara pada pasien secara klinis kelak.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Payudara

Istilah kanker dipakai pertama kali oleh Hippocrates pada abad ke-5 sebelum masehi untuk menggambarkan suatu penyakit dimana terjadi pertumbuhan sel dan penyebaran terus menerus keseluruh tubuh yang akhirnya mematikan tubuh. Berdasarkan tipe sel yang berkembang maka kanker dibagi menjadi tiga kategori besar, (1) Karsinoma, tipe kanker yang paling sering, berkembang dari sel epitel yang menutupi permukaan internal maupun eksternal tubuh. Kanker paru, payudara dan kolon adalah yang paling banyak untuk tipe ini. (2) Sarkoma, tipe kanker yang berkembang dari jaringan mesodermal seperti tulang, tulang rawan, lemak, jaringan penyambung dan otot. (3) Limfoma dan Leukemia, tipe ini berkembang dari sel darah atau jaringan limfatik.²⁴

Pada sel normal, kecepatan pembelahan sel dengan kecepatan diferensiasi sel dan kematian sel berada pada keadaan seimbang. Kanker terjadi akibat hilangnya kontrol pertumbuhan sel normal. Pada kanker, kecepatan pembelahan sel lebih tinggi dibandingkan kecepatan diferensiasi dan kematian sel.²⁴

Kanker payudara adalah suatu neoplasma ganas yang berasal dari parenkim jaringan payudara. Sel kanker payudara dalam perkembangannya membutuhkan vaskularisasi baru (*neovascularization*).^{11,12} Sel kanker yang sedang bertumbuh membutuhkan jaringan kapiler yang luas untuk memenuhi kebutuhan oksigen dan nutrisi.¹⁴ Aktivitas angiogenesis kanker payudara merupakan faktor penentu perkembangan dan kemampuan bertahan sel kanker tersebut.¹¹ Selain dari perkembangan dan pertumbuhan dari sel kanker, angiogenesis juga turut berperan dalam proses metastasis.¹² Hal ini terjadi dikarenakan penetrasi pembuluh darah yang baru kedalam sel tumor (*intratumoral*) merupakan jalan atau tempat masuknya sel kanker ke dalam sirkulasi darah dan bermetastasis ke organ-organ yang jauh.^{14,15,25}

2.2 Angiogenesis Kanker Payudara

Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh kapiler atau venula yang sudah ada sebelumnya yang melibatkan interaksi kompleks antar sel dan berbagai molekul terlarut dan komponen matriks ekstraseluler. Proses ini terjadi pada keadaan fisiologis maupun patologis.^{14,17,26,27}

Angiogenesis diatur oleh keseimbangan antara faktor-faktor proangiogenik dan antiangiogenik. Sekresi faktor-faktor proangiogenik akan merangsang terjadinya angiogenesis, sedangkan faktor-faktor antiangiogenik akan menghambat angiogenesis.¹⁷ Sel atau jaringan yang mengalami hipoksia dan kekurangan nutrisi akan mensekresikan faktor-faktor proangiogenik, yang selanjutnya merangsang terjadinya proses angiogenesis.¹⁴

Proses angiogenesis dapat dibagi dalam empat tahapan besar, yaitu:^{14,28}

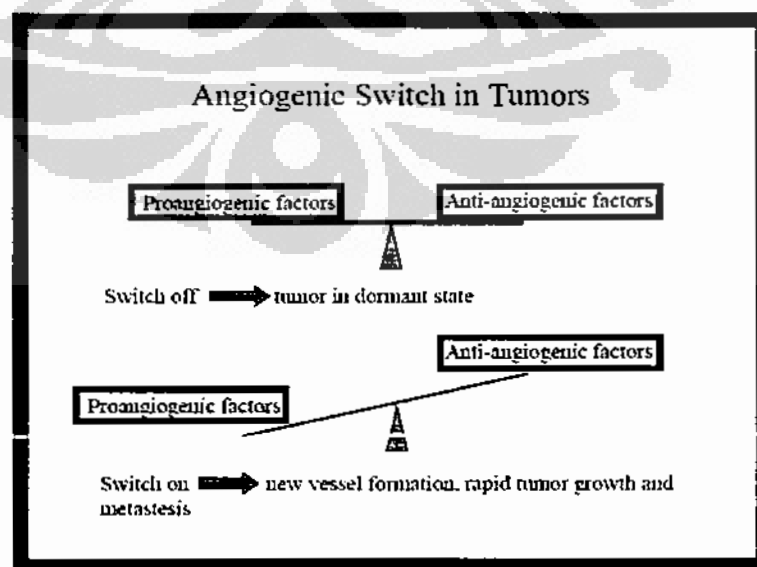
1. Degradasi membran basalis pembuluh darah
2. Proliferasi dan migrasi sel-sel endotel pembuluh darah
3. Interaksi sel endotel dengan sel endotel lainnya, sel dengan matriks
4. Pembentukan kapiler baru dan pematangan pembuluh darah

Proses angiogenesis melibatkan keaktifan sel endotel. Sel endotel pada pembuluh kapiler atau venula yang menerima rangsang angiogenik akan diaktifkan dan memproduksi zat yang melisiskan membran basalis. Ikatan sel endotel akan terlepas dengan sel tetangganya dan bermigrasi menuju rangsang.²⁶ Beberapa faktor angiogenik seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor* (FGF), angiopoietin akan merangsang migrasi dan proliferasi sel endotel. Selain itu, aktivitas enzim-enzim proteolitik yang melibatkan aktivator uPA (*urokinase-type Plasminogen Activator*) dan sistem MMPs (*metalloproteinase*) juga merupakan faktor penting dalam proses angiogenesis. Kemudian, sel endotel akan membentuk lumen calon pembuluh darah, membentuk lengkung pembuluh dan akhirnya pembuluh darah baru yang fungsional melalui peranan molekul adhesi serta perekrutan perisit dan otot polos.^{26,28}

Proses angiogenesis ini bertujuan untuk meningkatkan vaskularisasi ke jaringan yang mengalami hipoksia atau kekurangan nutrisi, sehingga sel-sel tersebut akan mendapatkan oksigen dan nutrisi yang cukup.¹⁴

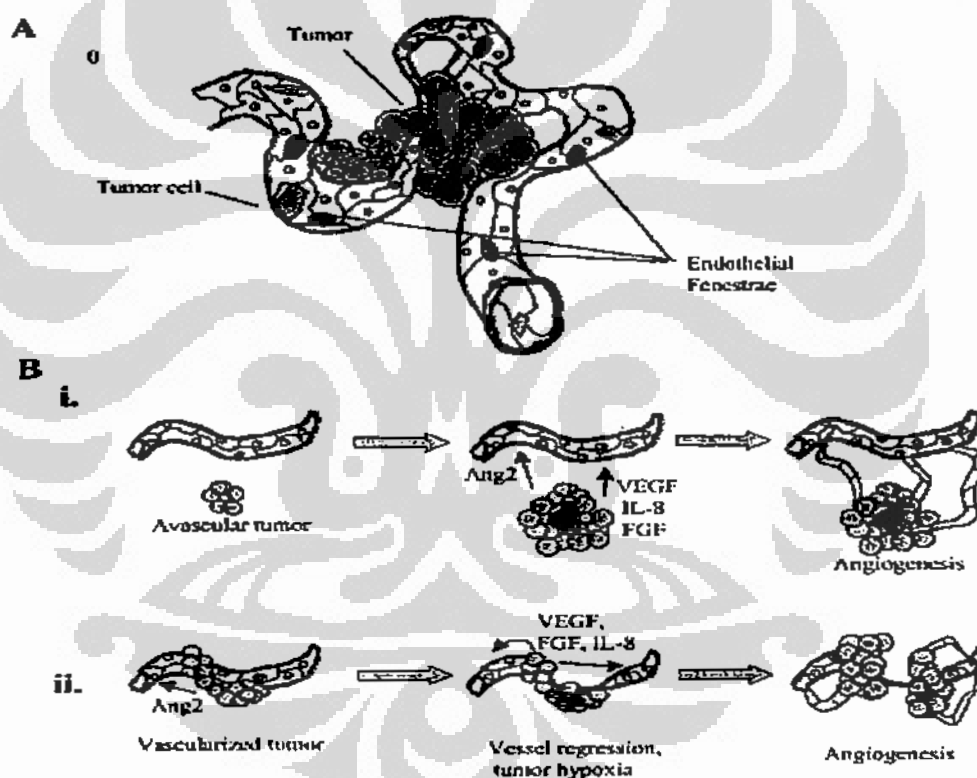
Pertumbuhan sel kanker merupakan proses yang bertahap dan diawali dengan hilangnya kontrol proliferasi sel. Sel kanker akan membelah sangat cepat dan mencapai pertumbuhan sel hingga berukuran kurang lebih 2-3 mm³ (*in situ carcinoma*). Seiring pertumbuhan sel kanker tersebut, maka akan dihasilkan sel-sel kanker yang semakin menjauhi kapiler terdekat. Akhirnya sel kanker berhenti bertumbuh dan mencapai keadaan *steady state*. Restriksi ini diakibatkan karena kurangnya nutrisi dan oksigen.

Sel kanker *in situ* ini bisa menjadi dorman dan tidak terdeteksi dalam waktu beberapa bulan bahkan bertahun-tahun. Setelah beberapa bulan atau tahun, sel kanker *in situ* ini dapat berubah fenotipenya menjadi fenotipe angiogenik melalui proses yang dikenal *angiogenic switch*, yang menginduksi pembentukan kapiler baru dan mulai menginvasi jaringan sekitarnya. Terjadinya *angiogenic switch* terkadang merupakan hasil dari peningkatan ekspresi MMPs. *Angiogenic switch* bergantung pada keseimbangan antara faktor proangiogenik dan antiangiogenik sel kanker. Hal ini terlihat seperti pada gambar 2.1.



Gambar 2.1. Angiogenic Switch

Sel kanker sendiri menghasilkan VEGF, mensekresi protease dan inhibitorynya secara simultan. Keseimbangan sekresi protease dan inhibitorynya meregulasi tingkat proteolisis ekstraseluler yang akhirnya akan meningkatkan atau menurunkan angiogenesis. Sel kanker bukan hanya satu-satunya sumber faktor angiogenik pada kanker. Sel kanker akan merekrut makrofag dan sel mast, kemudian makrofag dan sel mast akan mensekresi faktor angiogenik seperti FGF dan TNF α .²⁹ Pada gambar 2.2 diilustrasikan proses angiogenesis sel kanker yang avaskuler menjadi sel kanker yang vaskuler.



Gambar 2.2. Proses angiogenesis sel kanker avaskuler menjadi sel kanker yang vaskuler

Hipoksia adalah rangsang atau kunci utama yang menginisiasi angiogenesis sel baik secara fisiologis maupun patologis. Konsekuensi patofisiologi terjadinya hipoksia adalah adanya gangguan mikrosirkulasi secara struktural maupun fungsional. Respon sel kanker terhadap kondisi tekanan oksigen yang rendah adalah dengan meningkatkan aktifitas *hypoxia-inducible factor* (HIF). *Hypoxia-inducible factors* (HIF-1 dan HIF-2) adalah faktor

transkripsi yang heterodimer, terdiri dari subunit α dan β . Respons HIF diinduksi oleh faktor transkripsi HIF-1 α dan ekspresi HIF-1 β (juga dikenal dengan *aryl hydrocarbon nuclear translocator*) yang terus menerus.³⁰ Dalam kondisi hipoksia, subunit β selalu diekspresikan, sedangkan subunit α dilindungi dari proses degradasi.

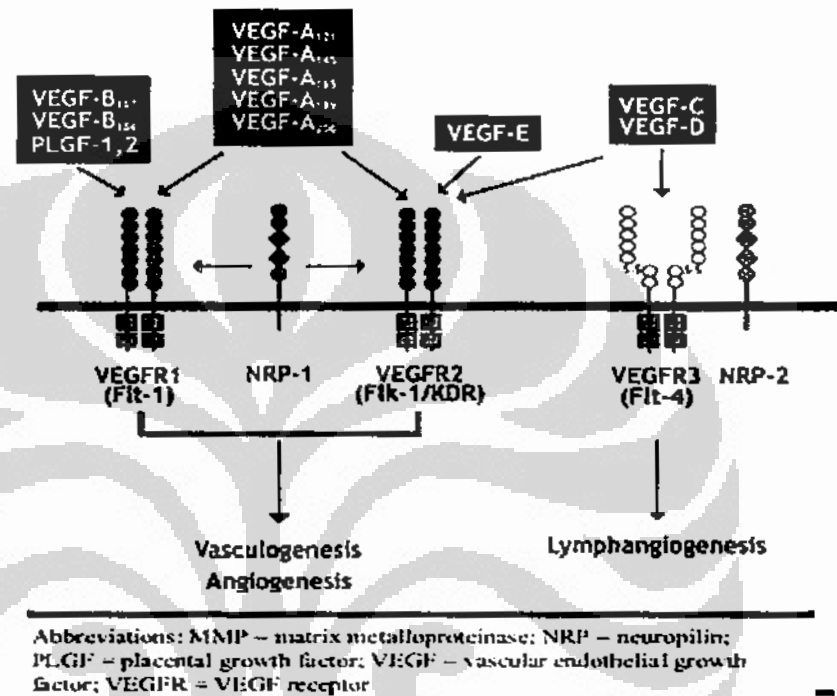
Selama proses karsinogenesis kanker payudara, ekspresi HIF-1 α secara signifikan berkaitan dengan peningkatan ekspresi VEGF.³¹ Hipoksia sel kanker akan merangsang peningkatan aktivitas aktivator transkripsi *Hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1). Aktivator transkripsi HIF-1 di dalam nukleus akan berikatan dengan *Hypoxia responsive element* (HRE) yang selanjutnya akan menginduksi aktivitas transkripsi protein-protein proangiogenik, seperti VEGF. Sel kanker sendiri menghasilkan VEGF dan juga mensekresi protease dan inhibitorynya secara simultan.

2.3 *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)

VEGF dikenal sebagai suatu peptida yang multi-fungsional, mampu menginduksi reseptor untuk proliferasi sel endotel dalam proses angiogenesis baik secara *in vivo* maupun secara *in vitro*.^{12,15,25} VEGF adalah mitogen yang menjadi media utama pada proses angiogenesis.³² VEGF disekresi oleh sel kanker payudara kemudian menstimulasi proses angiogenesis melalui mekanisme parakrin di ekstraseluler sel kanker dan memicu pertumbuhan sel kanker melalui mekanisme autokrin.³³ VEGF merangsang proliferasi sel endotel pembuluh darah untuk memulai proses angiogenesis.³⁴ VEGF bekerja dengan mengikat reseptor spesifik (*tirosin kinase*) pada sel endotel dan mengeluarkan sinyal angiogenik yang merangsang angiogenesis.^{25,35} Protein VEGF terdiri dari sekurangnya tujuh struktur glikoprotein VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE dan *placenta growth factors 1 dan 2*.^{11,12,14,28}

Pada manusia, efek VEGF terhadap sel endotel diperantarai melalui dua reseptor yang berafinitas tinggi, VEGFR-1 dan VEGFR-2. VEGFR-1 dan VEGFR-2 memiliki persamaan identik sebesar 33% pada domain ekstraselularnya

dan 80% pada domain tirosin kinasenya. Ekspresi VEGFR-3 lebih utama berada di pembuluh limfe dan hanya berikatan dengan VEGF-C dan -D₁₁₈. Ikatan antara berbagai isoform protein VEGF dan reseptor VEGF dapat terlihat pada gambar 2.3.^{11,12,14,28}



Hicklin DJ, Ellis LM. *J Clin Oncol*. 2005;23:1011-1027. Reprinted with permission from the American Society of Clinical Oncology

Gambar 2.3. Struktur ikatan VEGF dan reseptor VEGF

VEGFA (biasa dikenal dengan VEGF), adalah glikoprotein homodimerik dan memiliki sekurangnya lima isoform yang berbeda yang terbentuk dari pemisahan alternatif gen VEGF (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ and VEGF₂₀₆). Fungsi VEGFA diperantarai oleh ikatannya dengan reseptor VEGFR1 (*Flt-1*) dan VEGFR2 (*KDR*). Reseptor-reseptor tersebut terdiri dari tujuh domain ekstraseluler serupa immunoglobulin, sebuah domain tunggal transmembran dan consensus domain tirosin kinase. VEGFR2 diperkirakan sebagai media utama terhadap efek proangiogenik dari VEGFA. Walaupun faktanya bahwa VEGFR1 memiliki afinitas yang tinggi terhadap VEGFA, namun diduga bahwa VEGFR1 berfungsi

sebagai reseptor pengalih, memodulasi kemampuan VEGF berikatan dengan VEGFR2. VEGFA juga dapat berikatan dengan neuropilin, sebuah ko-reseptor yang terdapat di sel endotel, sel stroma dan sel tumor, yang meningkatkan ikatan antara VEGF dengan VEGFR2 sekaligus menguatkan sinyal VEGF.^{11,12,14,28}

VEGFB hanya berikatan dan mengaktivasi dengan reseptor VEGFR1, sedangkan VEGFC dan VEGFD berikatan dengan VEGFR2 dan VEGFR3 (*Flt-4*) yang berfungsi sebagai media limfangiogenesis. Keseluruhan karakteristik famili VEGF dan reseptor VEGF meliputi lokasi protein VEGF pada kromosom dan berbagai isoform VEGF berdasarkan ikatan heparin dan ikatan proteoglikan heparin-sulfat dapat dilihat pada tabel 2.1 dan tabel 2.2.^{11,12,28}

Tabel 2.1. Karakteristik protein VEGF.²⁸

Properties of the members of the VEGF family				
VEGF protein	Chromosomal location	Soluble VEGF isoform	Heparin-binding	Heparan-sulphate proteoglycan binding isoform
VEGF (VEGF-A)	6q21.3	VEGF-A ₁₆₅ , VEGFA ₁₄₅ , VEGF-A ₁₂₁	VEGF-A ₁₈₉ , VEGF-A ₂₀₆ , weakly: VEGF-A ₁₂₁ , VEGF A ₁₄₅ , VEGF-A ₁₆₅	VEGF-A ₁₄₅ , VEGF-A ₁₈₉ , VEGF-A ₂₀₆
VEGF-B	11q13	VEGF-B ₁₆₇	VEGF-B ₁₆₇	VEGF-B189
VEGF-C	4q34	No		No
VEGF-D	Xq22.31	Yes	Yes	No
VEGF-E	Orf Virus genome	Yes	No	No
PIGF	14q24	PIGF-1	PIGF-2, PIGF-3	PIGF-1

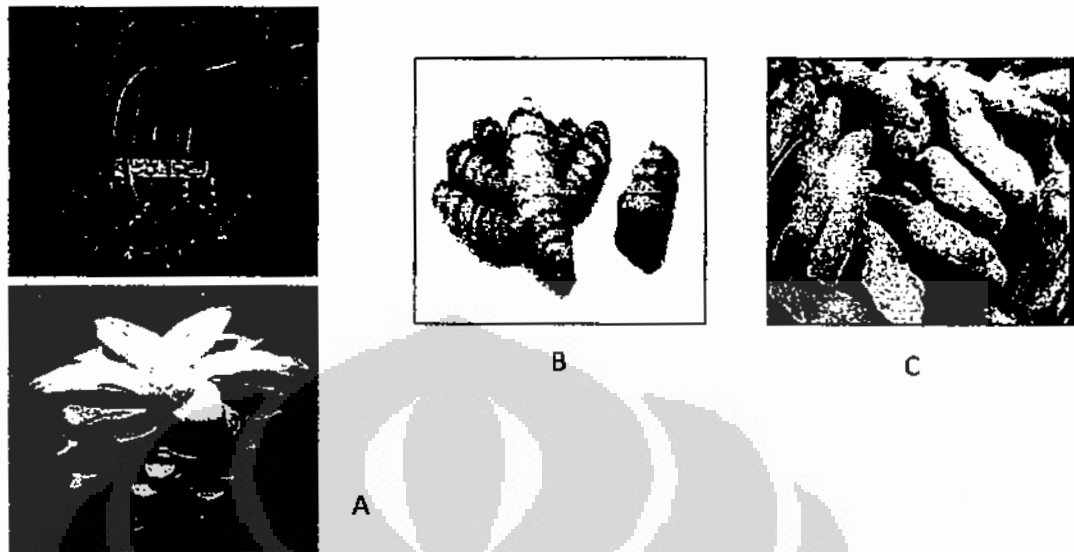
VEGF memberi efek multipel selama proses angiogenesis: VEGF bertindak sebagai faktor mitogen untuk sel endotel vaskuler, juga menstimulasi sekresi dan aktivasi enzim-enzim yang terlibat dalam proses degradasi matriks ekstraseluler seperti uPA dan reseptor uPA (uPAR).^{14,28}

Tabel 2.2. Reseptor VEGF, ligan dan fungsinya²⁸

VEGF receptors		
Receptor	Ligand	Function
VEGFR-1 (Flt-1)	VEGF-A ₁₂₁	Promotion of cell migration
	VEGF-A ₁₆₅	Organization of blood vessels
	VEGF-B PIGF-1	Gene expression of monocytes and macrophages
VEGFR-2 (KDR, Flk-1)	PIGF-2	
	VEGF-A ₁₂₁	Mitogenesis, differentiation of endothelial cells
	VEGF-A ₁₄₅	Promotion of cell migration
	VEGF-A ₁₆₅ VEGF-C	Enhancement of vascular permeability
VEGFR-3 (Flt-4)	VEGF-D	
	VEGF-C	Regulation of growth and maintenance of lymphatic system
	VEGF-D	
Neu-1	VEGF-A ₁₆₅ PIGF-2	Development of cardiovascular system
Neu-2	VEGF-A ₁₆₅	Organization of peripheral nerve fibres Development of vascular networks

2.4 Kurkumin

Kurkumin adalah suatu tanaman herbal dengan bentuk akar yang lonjong dan berwarna kuning hingga kecoklatan berasal dari tanaman turmeric, akar tanaman *Curcuma Longa* Linn (lihat gambar 2.4).^{36,37,38,39} Kurkumin pertama kali diisolasi oleh Vogel pada tahun 1842 dan pada tahun 1910 untuk pertama kali Milobedzka mengidentifikasi struktur kurkumin sebagai 1,6-heptadiene- 3,5-dione-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-(1E,6E) atau diferuloylmethane. Pada tahun 1918, struktur feruloylmethane dari kurkumin disintesis oleh Lampe.⁴⁰ Tinggi tanaman ini dapat mencapai 1 meter. Akar tanaman memiliki dimensi panjang 2-5 cm, dengan tebal 1-1,8 cm. Tanaman ini tersebar luas di negara dengan iklim tropis seperti India, Cina, Indonesia dan negara di benua Asia lainnya. Tanaman ini dikenal dengan nama kunyit di Indonesia.⁴⁰



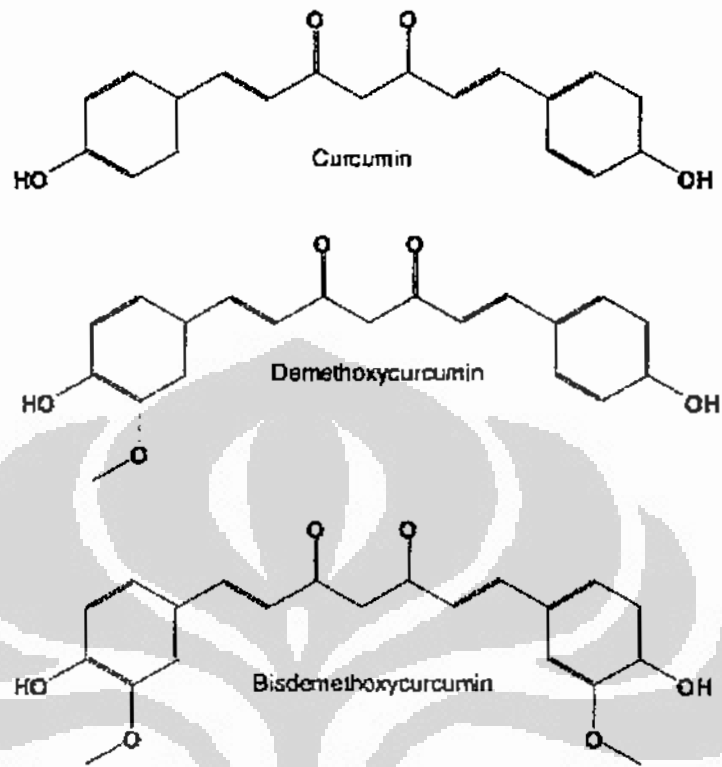
Gambar 2.4. Tanaman *Curcuma Longa* (A), Rhizome (akar) (B), Rhizome kering (C)

Kurkumin adalah suatu polifenol aktif dengan rumus kimia $C_{21}H_{20}O_6$ yang bersifat hidrofobik, berat molekul 368,37 g/mol dan dikenal sebagai kurkuminoid. Secara kimiawi, kurkumin adalah suatu bis- α,β -unsaturated β -diketone (lazim disebut diferuloylmethane) yang memperlihatkan tautomerisme keto-enol, dimana gugus keto predominan dalam larutan asam dan netral, sedangkan gugus enol stabil dalam media alkali. Kurkumin komersial merupakan campuran zat kurkuminoid yang terdiri dari 77% *curcumin* (diferuloylmethane), 18% *demethoxycurcumin* dan 5% *bisdemethoxycurcumin*.^{38,40,41,42} Struktur kimia kurkumin dan fraksinya dapat kita lihat pada gambar 2.5. Dengan menggunakan spektrofotometer, absorpsi maksimum (λ_{max}) kurkumin dalam metanol pada panjang gelombang 430nm dan kurkumin dalam aseton pada panjang gelombang 415-420 nm. Pada kondisi pH 2.5 – 7, kurkumin berwarna kuning terang, sedangkan pada kondisi pH >7 berwarna merah. Stabilitas kurkumin dalam media cair (aqueous) meningkat pada pH tinggi (>11.7), namun pada dasarnya kurkumin kurang larut dalam air dibandingkan dalam DMSO, etanol, metanol atau aseton. Pada kondisi pH asam kurkumin lebih stabil dibandingkan dalam kondisi netral dan pH basa.

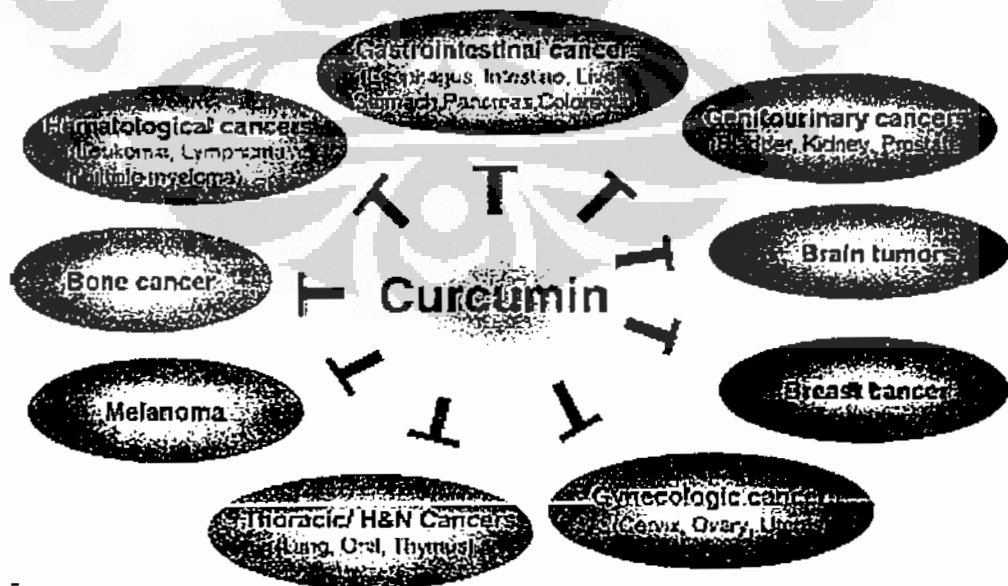
Selama berabad-abad, kurkumin telah digunakan secara tradisional sebagai pewarna kekuningan pada kari dan pemberi rasa pedas pada makanan orang India dan Asia. Tanaman ini telah dikonsumsi oleh jutaan manusia, terlebih di benua Asia. Selain digunakan sebagai bumbu masakan, zat ini juga telah digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai penyakit di berbagai belahan dunia. Pada pengobatan Ayurveda, kurkumin adalah terapi yang sudah tercatat dengan baik untuk mengobati berbagai penyakit saluran pernapasan seperti, asma, hiperaktifitas bronkus dan alergi. Pada pengobatan tradisional india, kurkumin telah digunakan untuk mengobati inflamasi. Selain untuk mengobati inflamasi, kurkumin juga digunakan untuk mengobati penyakit antara lain, penyakit hati (jaundice), gangguan pencernaan penyakit traktus urinarius, artritis reumatoid dan gigitan binatang.⁴⁰

Berdasarkan beberapa studi, kurkumin juga memiliki beberapa efek farmakologik seperti antioksidan, antiinflamasi dan *free radical scavenging*. Selain itu fitokimia ini juga poten sebagai inhibitor *reactive oxygen-generating enzymes* seperti lipooksigenase/siklooksigenase, xantin dehidroksigenase /oksidase, nitrit oksida sintase (NOS), peroksida, anion superoksida dan radikal hidroksil.⁴¹

Pada percobaan *in vitro*, kurkumin menekan pertumbuhan berbagai sel kanker antara lain kanker payudara, kanker kulit, kanker lambung, kanker colon, kanker prostat dan kanker hati.^{37,41,43,44,45,46} Fitokimia ini menekan pertumbuhan sel kanker (antiproliferasi) melalui kemampuannya menghambat angiogenesis dan pertumbuhan serta menginduksi apoptosis (pro apoptosis), pada berbagai sel kanker secara *in vitro* dan *in vivo* dapat menekan karsinogenesis sel kanker payudara dan organ lainnya.^{41,43,47} Pada gambar 2.6 diperlihatkan potensi curcumin sebagai antikanker berbagai jenis kanker secara umum. Sedangkan pada gambar 2.7 diperlihatkan peranan kurkumin sebagai molekul yang *multi-target* dibandingkan dengan beberapa obat-obatan yang sifatnya *mono-target*.



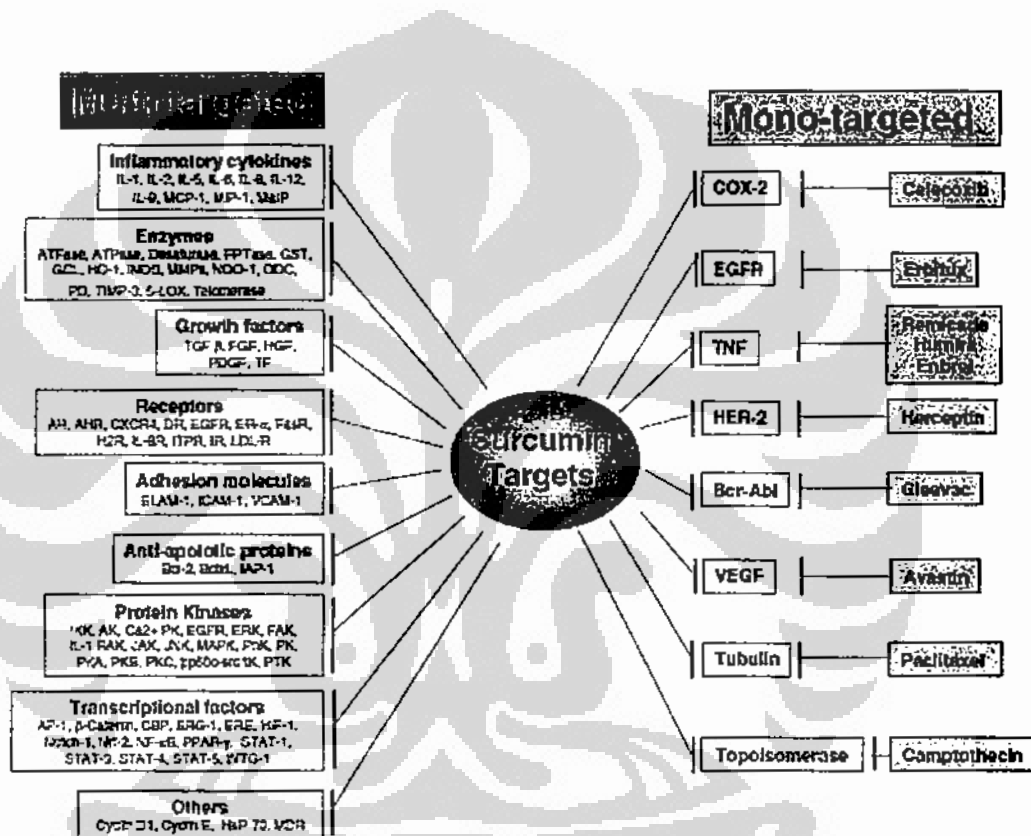
Gambar 2.5. Struktur kimia kurkumin dan fraksinya



Gambar 2.6. Potensi kurkumin terhadap beberapa jenis kanker

2.5 Kurkumin dan Angiogenesis

Kurkumin dapat menghambat aktivasi berbagai faktor transkripsi terutama faktor transkripsi VEGF, antara lain HIF1A, menghambat aktifitas sinyal AP-1, menekan aktifitas ERK1/ERK2 dan p38 dan juga menekan aktifitas HER-2. Hal ini terjadi karena kurkumin mampu berikatan dan berinteraksi dengan molekul-molekul tersebut. (lihat gambar 2.8)⁴²

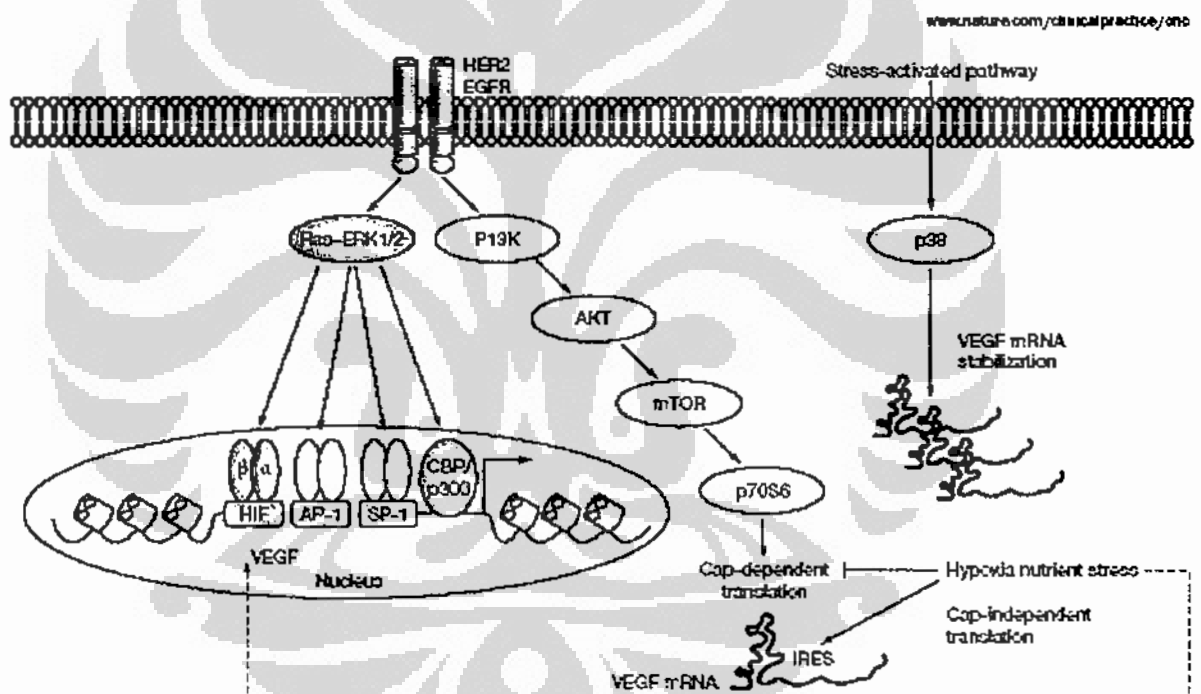


Gambar 2.7. Kurkumin sebagai molekul yang multi-target

Kurkumin mampu menekan ekspresi gen HER2. Pada kanker payudara, peningkatan ekspresi gen HER2 berperan besar pada perkembangan sel kanker payudara dan juga sebagai faktor prognostik.⁴⁸ Jika ekspresi gen HER2 dihambat maka jalur aktivasi sinyal seluler yang menginduksi ekspresi Ras-ERK dan Phospatidilinositol-3 Kinase (PI3K) akan dihambat. Hambatan terhadap ekspresi Ras-ERK 1/2 maka faktor transkripsi SP1 dan *co promotor* CBP p300 tidak dapat mengaktifkan transkripsi VEGF melalui proses fosforilasi.^{40,42} Sedangkan hambatan terhadap PI3K akan menekan aktivasi jalur protein kinase B dan

akhirnya translasi mRNA VEGF tidak akan terjadi, dan VEGF tidak akan dihasilkan. Aktivitas PI3K dan protein kinase B tidak hanya diaktifkan oleh gen HER2, keadaan hipoksia juga mengaktifasi PI3K dan pada akhirnya mengaktifkan jalur protein kinase B. Kurkumin juga secara langsung dapat menghambat aktivasi PI3K dan aktifitas protein kinase B.^{12,38}

Selain hambatan terhadap gen HER2, kurkumin juga menghambat aktifitas HIF1A. Seperti terlihat pada gambar 2.8, jika aktifitas HIF1A dihambat maka proses transkripsi VEGF juga dihambat, pada akhirnya kadar VEGF akan menurun dan angiogenesis terhambat.^{40,42}



Gambar 2.8. Regulasi ekspresi protein VEGF¹²

Kurkumin juga menghambat faktor transkripsi AP-1, AP-2, Egr-1, Sp-1. Jika faktor transkripsi ini tidak diaktifkan, maka reaksi fosforilasi proses transkripsi VEGF tidak dapat berlangsung, dan VEGF tidak akan dihasilkan. Kemampuan dari *stress-activated kinase p38* juga dapat dihambat oleh molekul kurkumin, sehingga proses translasi VEGF tanpa adanya sintesis mRNA VEGF yang baru tidak dapat berlangsung.^{40,42}

3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vitro* pada kultur jaringan.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Makmal, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. Waktu penelitian adalah dari Januari 2009 hingga Mei 2009.

3.3 Sampel dan perhitungan jumlah sampel

3.3.1 Sampel

Sampel penelitian adalah sel kanker payudara galur MCF-7 (*breast cancer cell line MCF7*).

3.3.2 Penentuan besar sampel menggunakan rumus Federer:

$(t-1)(n-1) \geq 15$; $t=3$ (jumlah perlakuan), n = jumlah sampel

$2(n-1) \geq 15$

$2n-2 \geq 15$

$2n \geq 17$

$n \geq 8,5$

Berdasarkan perhitungan dengan rumus diatas, jumlah sampel yang dibutuhkan adalah 9 sampel untuk tiap kelompok (1 kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan), maka jumlah total sampel adalah 27 sampel.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

- Quantikine ELISA *kit* untuk pemeriksaan *Human VEGF*
- Micro pipette* dan *pippete tips*
- Tabung Polypropilene
- ELISA Reader

- e. *Laminar air flow* untuk ruang kerja steril
- f. Tabung kultur (TC 25 *flask*)
- g. Pipet Pasteur steril (3mL)
- h. *Disposable syringe* 5mL dan 10mL
- i. *Disposable sterile filter* dengan pori 0,2 μm untuk sterilisasi larutan
- j. Inkubator (*Forma Scientific*)
- k. Vortex mixer (super vortex) untuk homogenisasi larutan dalam tabung
- l. Tabung sentrifus
- m. Tabung eppendorf 1500 μL
- n. Gelas Beker
- o. Autoklaf untuk sterilisasi alat
- p. Neraca elektronik untuk menimbang bahan kimia
- q. Pengaduk untuk homogenisasi larutan
- r. Ph meter
- s. *Inverted Microscope with phase contrast optics*
- t. *Micro TC well*
- u. *Centrifuge*

3.4.2 Bahan

- a. *MCF-7 breast cancer cell line*
- b. RPMI 1640 (*Roswell park memorial institute*) stok untuk medium kultur sel
- c. FBS (*fetal bovine serum*) untuk suplementasi medium dan menghentikan kerja tripsin
- d. Penisilin-Streptomisin sebagai antibiotika untuk menghambat pertumbuhan kontaminan bakteri gram (-) pada medium kultur
- e. Fungizon untuk menghambat pertumbuhan jamur pada medium kultur
- f. Larutan tripsin 0,025% - EDTA 0,02% untuk memecahkan ikatan sel pada tabung kultur

- g. PBS (*phosphate buffer solution*) untuk pencucian sel dan pelarut bubuk kurkumin
- h. Akuabides steril untuk melarutkan medium RPMI, PBS (*phosphate buffer solution*) dan larutan *wash buffer Quantikine*
- i. NaOH 0,1 N untuk menyesuaikan pH medium kultur dan sebagai pelarut bubuk kurkumin
- j. HCL1M untuk menyesuaikan pH medium kultur

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Pembuatan Medium Kultur

Awalnya dibuat medium stok RPMI 1640 dengan cara melarutkan 8,2 gram bubuk RPMI 1640 ke dalam 500 mL akuabides steril dan anionik dan ditambahkan dengan 1 gram Natrium bikarbonat (NaHCO_3). pH larutan diatur hingga mencapai 7,4. Selanjutnya medium stok ini disaring menggunakan filter steril berpori 0,2 μm . Kedua adalah pembuatan medium RPMI 1640 komplet dengan cara mencampur medium stok RPMI 1640 sebanyak 45 mL, FBS 5mL, Penisilin-Streptomisin 0,4mL, fungizone 0,4mL. Selanjutnya medium komplet ini disaring menggunakan filter steril berpori 0,2 μm dan disimpan dalam tabung TC *flask* 25 steril pada suhu 2-8°C.

3.5.2 Pembuatan larutan kurkumin

Penelitian ini menggunakan bubuk kurkumin (Merck) dengan kemurnian 90%. Untuk mendapatkan kemurnian kurkumin 100% dan konsentrasi larutan 0,05 dan 0,1 mM adalah dengan cara berikut
Konsentrasi larutan 0,05mM:

Dilarutkan 0,004 gram kurkumin ke dalam 1mL NaOH 0,1M diaduk dengan vorteks dan segera ditambahkan dengan PBS hingga 10 mL, aduk kembali dengan vorteks. Setelah larutan homogen, diambil 0.5mL larutan tersebut dan dicampur dengan 9.5mL RPMI 1640 komplet.

Konsentrasi larutan 0,1mM:

Dilarutkan 0.004 gram kurkumin ke dalam 1mL NaOH 0,1M diaduk dengan vorteks dan segera ditambahkan dengan PBS hingga 10 mL, aduk kembali dengan vorteks. Setelah larutan homogen, diambil 1mL larutan tersebut dan dicampur dengan 9mL RPMI 1640 komplet.

3.5.3 Subkultur sel kanker payudara galur MCF-7

1. *Laminar flow* disiapkan. Area kerja dibersihkan dengan alkohol 70%. Seluruh reagen dan material diletakkan pada area kerja.
2. Sel kanker MCF-7 dari LAPTIAB LIPI diobservasi di bawah *inverted microscope phase contrast* dan terlihat sel yang melekat tumbuh menyebar sebagai selapis sel yang melapisi dasar flask (*monolayer*)
3. Supernatan dari flask dibuang di wadah plastik di area kerja *laminar flow*.
4. Sel dicuci dengan PBS
5. Tambahkan trypsin 0,02%-EDTA 0,05% (2ml) dan taruh dalam inkubator 2-3 menit.
6. Ikatan sel dipecah dengan memipet berulang kali
7. 0,5mL FBS dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge dan suspensi sel dimasukkan ke dalam tabung tersebut. FBS dibutuhkan untuk menghentikan kerja trypsin.
8. Tabung sentrifuge dimasukkan ke dalam *centrifuge* dan diputar dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit
9. Supernatan dibuang dan resuspensi pelet dengan 1 mL larutan RPMI, FBS 10%, Pen-Strep dan Fungizone
10. Suspensi dibagi menjadi 3 bagian, lalu dimasukkan masing-masing bagian ke dalam TC flask, diinkubasi selama 72 jam.
11. Lalu langkah 3-9 diulangi lagi.
12. Lalu diambil satu tetes dari 1 ml suspensi sel untuk hitung sel
13. Lalu dimasukkan suspensi sel ke *microwell-4* sebanyak 9 sumur untuk kelompok kontrol, 9 sumur untuk kelompok

perlakuan dengan dosis kurkumin 0,05mM dan 9 sumur untuk kelompok perlakuan dengan dosis kurkumin 0,1mM. Jumlah sel tiap sumur dimasukkan dalam jumlah yang sama agar homogen sebanyak 10×10^4 sel/mL.

14. Inkubasi masing-masing *well* dalam inkubator selama 72 jam.

3.5.4 Pengambilan cairan kultur

Setelah diinkubasi selama 72 jam, cairan dari tiap sumur diaspirasi dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1500 μ L. Semua tabung disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung eppendorf 1500 μ L dan disimpan pada suhu -20°C hingga akan dilakukan pemeriksaan VEGF menggunakan metode ELISA.

3.5.6 Pengukuran kadar VEGF

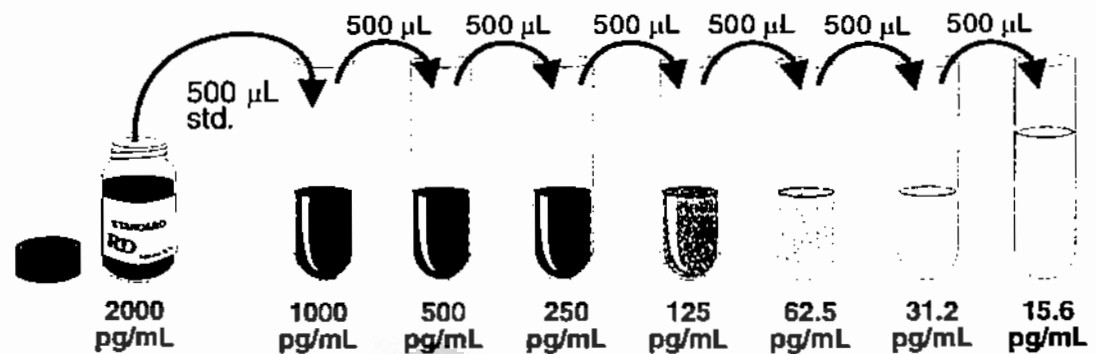
Pengukuran kadar VEGF secara kuantitatif dilakukan sesuai dengan prosedur *Quantikine Human VEGF Immunoassay*, dari *R&D Systems United States of America*. Prinsip dasar pengukuran dengan teknik *quantitative sandwich enzyme immunoassay*. Spesifik antibodi monoklonal untuk VEGF telah dilapis/ditanam pada *microplate*. Larutan standart and supernatan sampel dipipetkan ke dalam sumur dan setiap VEGF yang ada akan diikat oleh antibodi. Setelah pencucian untuk menghilangkan setiap substansi yang tidak terikat, spesifik *enzyme-linked polyclonal antibody* terhadap VEGF ditambahkan ke dalam masing-masing sumur. Lalu dilakukan pencucian untuk membuang setiap reagen antibodi-enzim yang tidak terikat. Setelah pencucian, larutan substrat ditambahkan ke dalam masing-masing sumur dan muncul perubahan warna sesuai dengan proporsi jumlah VEGF yang terikat padatahap inisial. Perubahan warna dihentikan dan intensitas warna diukur dengan ELISA Reader, dengan absorbansi pada panjang gelombang 450nm dengan koreksi pada panjang gelombang 540nm.

Spesifikasi

Sensitivitas	: < 5 pg/mL
Rentang Deteksi	: 0 – 1000 pg/mL
Variasi <i>intra-assay</i>	: $\pm 3,5$ %
Variasi <i>inter-assay</i>	: ± 5 %

Persiapan Reagensia:

1. *Wash Buffer*: 20 mL *wash buffer concentrate* dicampurkan dengan akuabides steril terionisasi hingga mencapai 500mL.
2. *Substrate Solution*: 5mL Reagen warna A dicampur dengan 5mL reagen warna B. Lindungi campuran reagen dari cahaya.
3. *VEGF Standard*: Larutkan VEGF standart dengan 1mL *Calibrator Diluent RD5K* untuk supernatan kultur sel. Dihasilkanlah larutan stok standart 2000pg/mL. Diamkan larutan standart minimum 15 menit dengan divorteks secara halus untuk pencampuran.
4. Mempersiapkan larutan standart:
Larutan standart disiapkan menggunakan tabung polipropilen sebanyak 7 tabung. 500 μ L *Calibrator Diluent RD5K* dimasukkan ke dalam masing-masing tabung. Untuk menghasilkan seri pengenceran, 500 μ L larutan stok standart 2000 pg/mL dimasukkan ke dalam tabung pertama, lalu diaduk hingga tercampur sebelum transfer berikutnya, demikian selanjutnya dilakukan untuk semua tabung. Pengenceran dapat dilihat seperti pada gambar 3.1.



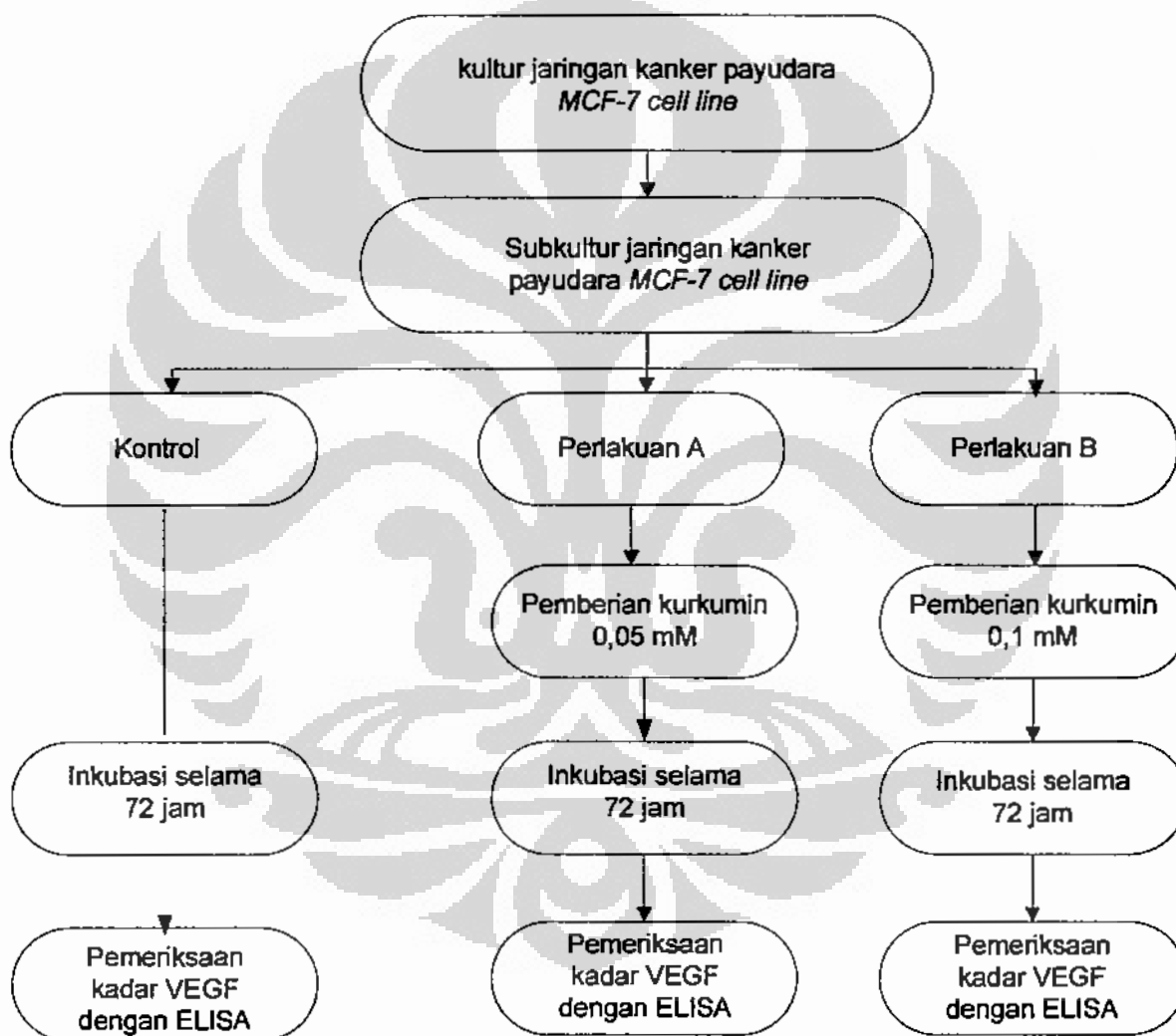
Gambar3.1. Pengenceran Larutan Standart ELISA VEGF

Prosedur pemeriksaan kadar VEGF kuantitatif:

1. Semua Reagen, standart dan sampel dipersiapkan
2. Mikroplate dikeluarkan dari kantongnya dan dimasukkan 50µL Assay Diluent RDIW ke masing-masing sumur
3. Kemudian dimasukkan 200 µL Standart, kontrol dan sampel ke masing-masing sumur
4. Tutup dengan strip pelekat yang disediakan dan inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang
5. Aspirasi masing-masing sumur dan cuci menggunakan *wash buffer* 400 µL. Pencucian diulangi sebanyak 2 kali untuk mendapatkan 3x pencucian.
6. 200µL konjugat VEGF dimasukkan ke masing-masing sumur. *Microplate* ditutup kembali dengan strip perekat. Inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang
7. Aspirasi masing-masing sumur dan cuci menggunakan *wash buffer* 400 µL. Pencucian diulangi sebanyak 2 kali untuk mendapatkan 3x pencucian.
8. 200µL *Substrate Solution* dimasukkan ke masing-masing sumur. Lindungi *microplate* dari cahaya. Inkubasi selama 20 menit pada suhu ruang
9. 50µL *Stop solution* ditambahkan ke masing-masing sumur. *Microplate* diketuk perlahan agar larutan tercampur dengan baik, akan terlihat perubahan warna pada masing-masing sumur.

10. Dalam jangka waktu kurang dari 30 menit, ukur densitas optik tiap sumur dengan *microlate reader* yang diatur pada panjang gelombang 450nm dengan koreksi panjang gelombang pada 540nm.

3.6 Alur Penelitian

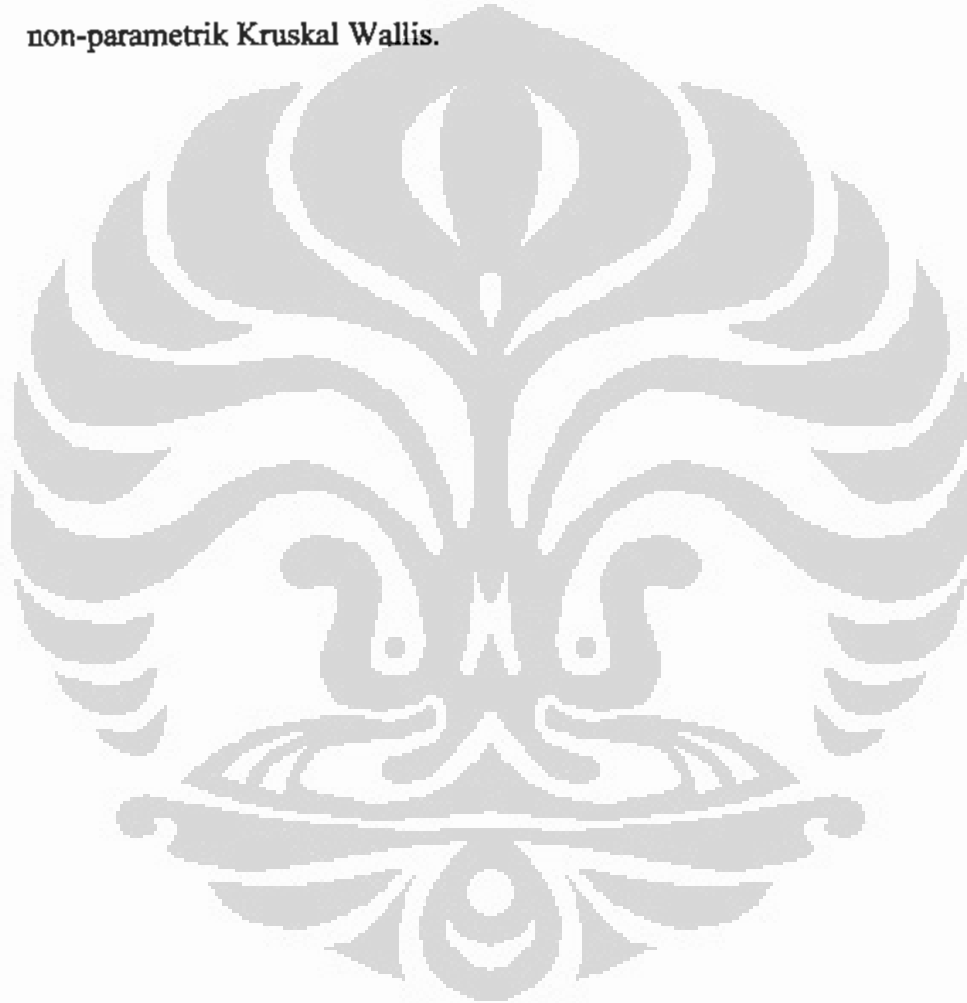


Gambar 3.2. Alur kerja penelitian

3.7 Analisis Data

Hasil yang diperoleh, dipresentasikan dalam bentuk tabulasi dan diuji kemaknaan dengan uji *ONE-WAY ANOVA*. Sebelum dilakukan uji kemaknaan, seluruh data dari tiap kelompok uji dilakukan uji normalitas. Jika didapatkan

bahwa tiap kelompok data memiliki distribusi data yang normal, maka selanjutnya dilakukan uji varians. Jika varians data sama untuk tiap kelompok uji, maka data tersebut memnuhi syarat untuk uji kemaknaan *one way-ANOVA*. Jika distribusi data tidak normal dan atau varians data tidak sama, maka harus dilakukan transformasi data untuk mendapatkan distribusi data yang normal dan varians data yang sama. Jika telah dilakukan transformasi, distribusi data tetap tidak normal dan atau varians data tetap tidak sama, maka dilakukan uji kemaknaan dengan uji non-parametrik Kruskal Wallis.



4. HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian didapatkan berdasarkan hasil pemeriksaan dengan *Quantikine ELISA* untuk VEGF manusia. Pembacaan serapan pada panjang gelombang 450 nm dengan koreksi 540 nm dilakukan terhadap tiga kelompok sampel perlakuan. Kelompok perlakuan pertama adalah MCF-7 yang tidak diberi kurkumin, kelompok kedua adalah MCF-7 yang diberi kurkumin 0,05mM, sedangkan kelompok ketiga adalah MCF-7 yang diberi kurkumin 0,1mM, dan ketiga kelompok sampel tersebut diinkubasi selama 72 jam didalam inkubator.

Kadar VEGF kelompok perlakuan pertama (MCF-7 tanpa kurkumin) adalah $6,47 \pm 1,23$ pg/mL. Kelompok perlakuan kedua (MCF-7 +kurkumin 0,05mM) memiliki kadar VEGF $4,12 \pm 1,66$ pg/mL. Sedangkan kelompok perlakuan yang ketiga memiliki kadar VEGF $4,74 \pm 1,21$ pg/mL. (Lihat Tabel 4.1)

Tabel 4.1. Kadar VEGF pada serapan 450 nm dengan koreksi 540 nm

Sampel	Kadar VEGF pg/mL		
	MCF-7 tanpa kurkumin (kontrol)	MCF-7 + kurkumin 0,05mM	MCF-7 + kurkumin 0,1 mM
1	6,850	2,842	4,468
2	5,476	5,476	5,138
3	5,480	7,9	5,816
4	6,159	3,483	7,198
5	8,254	4,468	3,809
6	8,608	3,809	5,138
7	6,504	2,842	3,809
8	5,816	2,842	3,809
9	5,138	3,483	3,483
X	6,476	4,12	4,74
SD	1,23	1,66	1,21

Berdasarkan analisa data kadar VEGF menggunakan SPSS 16, kadar VEGF pada kelompok perlakuan kedua (MCF-7+kurkumin 0,05mM) memiliki perbedaan bermakna dengan kadar VEGF kelompok perlakuan pertama (MCF-7 tanpa kurkumin) ($p= 0,014$). Kadar VEGF pada kelompok perlakuan ketiga

(MCF-7+kurkumin 0,1mM) juga memiliki perbedaan bermakna jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan pertama (MCF-7 tanpa kurkumin) ($p=0,001$). Namun kadar VEGF pada kelompok perlakuan kedua (MCF-7+kurkumin 0,05mM) jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan ketiga (MCF-7+kurkumin 0,1mM) tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p=0,262$). (Lihat tabel 4.2)

Tabel 4.2 Perbandingan pengaruh kurkumin terhadap kadar VEGF antar kelompok perlakuan

Kelompok	MCF-7 tanpa kurkumin	MCF-7+ kurkumin 0,05mM	MCF-7+kurkumin 0,1mM
MCF-7 tanpa kurkumin		$p = 0,001$	$p = 0,014$
MCF-7+ kurkumin 0,05mM	$p = 0,001$		$p = 0,262$
MCF-7+kurkumin 0,1mM	$p = 0,014$	$p = 0,262$	
	$n = 9$	$n = 9$	$n = 9$

Dari hasil penelitian juga didapatkan jumlah sel tiap sampel untuk kelompok kontrol, kelompok dengan kurkumin kadar 0,05mM dan kelompok dengan kurkumin kadar 0,1mM, dapat dilihat pada tabel 3.3

Tabel 4.3 Jumlah sel MCF-7 tiap kelompok perlakuan

Sampel	Jumlah Sel ($\times 10^4$ sel/ml)		
	MCF-7 tanpa kurkumin (kontrol)	MCF-7 + kurkumin 0,05mM	MCF-7 + kurkumin 0,1 mM
1	26.40	5.80	4.80
2	77.60	2.20	3.40
3	82.80	2.40	3.20
4	15.80	4.60	3.00
5	18.80	1.40	3.40
6	15.00	1.40	3.60
7	22.00	3.00	3.20
8	22.20	2.80	1.60
9	29.20	3.00	2.00
X	34,42	2,95	3,13
SD	26,38	1,43	0,92

Berdasarkan analisis non parametrik untuk jumlah sel tiap kelompok perlakuan dengan uji Kruskal-Wallis, didapatkan hasil yang bermakna ($p=0,000$). Berdasarkan analisa data jumlah sel menggunakan SPSS 16, jumlah sel pada kelompok perlakuan kedua (MCF-7+kurkumin 0,05mM) memiliki perbedaan bermakna dengan jumlah sel pada kelompok perlakuan pertama (MCF-7 tanpa kurkumin) ($p < 0,05$). Jumlah sel pada kelompok perlakuan ketiga (MCF-7+kurkumin 0,1mM) juga memiliki perbedaan bermakna jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan pertama (MCF-7 tanpa kurkumin) ($p < 0,05$). Namun jumlah sel pada kelompok perlakuan kedua (MCF-7+kurkumin 0,05mM) jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan ketiga (MCF-7+kurkumin 0,1mM) tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$). (Lihat tabel 4.4)

Tabel 4.4 Perbandingan pengaruh kurkumin terhadap jumlah sel antar kelompok perlakuan

Kelompok	MCF-7 tanpa kurkumin	MCF-7+ kurkumin 0,05mM	MCF-7+kurkumin 0,1mM
MCF-7 tanpa kurkumin		$p = 0,000$	$p = 0,000$
MCF-7+ kurkumin 0,05mM	$p = 0,000$		$p = 0,268$
MCF-7+kurkumin 0,1mM	$p = 0,000$	$p = 0,268$	
	$n = 9$	$n = 9$	$n = 9$

Berdasarkan data di atas, dilakukan analisis untuk melihat adanya hubungan korelasi antara jumlah sel kanker dengan kadar VEGF. Dikarenakan ada distribusi data yang tidak normal, maka dilakukan uji korelasi dengan tes Spearman dan didapatkan $p=0,029$.

Dari hasil rerata jumlah sel dan kadar VEGF, dihitung perbandingan yang antara jumlah sel dan kadar VEGF yang dihasilkan. Pada kelompok kontrol didapatkan rasio sebesar 5,3 (34,42/6,476), pada kelompok dengan pemberian kurkumin kadar 0,05mM didapatkan rasio sebesar 0,71 (2,95/4,12), dan pada kelompok dengan pemberian kurkumin kadar 0,1mM didapatkan rasio sebesar 0,66 (3,13/4,74).

5. PEMBAHASAN

Penelitian ini mencoba membuktikan bahwa kurkumin kadar 0,1mM dan kadar 0,05mM dapat menekan aktivitas angiogenesis sel kanker payudara MCF-7 dibandingkan dengan kontrol tanpa pemberian kurkumin. Pengukuran aktivitas angiogenesis dapat dilakukan dengan mengukur kadar VEGF yang merupakan salah satu faktor angiogenik. Faktor angiogenesis VEGF dapat dideteksi dari cairan kultur jaringan maupun spesimen darah (serum atau plasma). Pada umumnya kadar VEGF lebih tinggi dideteksi di serum/plasma dibandingkan dengan cairan kultur jaringan. Faktor angiogenik VEGF tidak hanya dapat dihasilkan oleh sel endotel pembuluh darah saja, namun sel kanker juga memiliki kemampuan mensekresi VEGF, oleh karena itu dapat dideteksi pada cairan kultur jaringan kanker payudara. Metode pemeriksaan VEGF yang digunakan pada penelitian ini adalah dengan menggunakan metode pengukuran ELISA. Metode ELISA ini dipilih karena metode ini spesifik terhadap VEGF, mudah pelaksanaannya dan mengukur VEGF yang disekresikan oleh sel di cairan supernatan kultur jaringan kanker payudara, sehingga dapat terlihat kadar VEGF akibat proses sekresi sel bukan VEGF yang berada di dalam sel. Namun pengukuran dengan menggunakan ELISA ini memiliki keterbatasan dalam jumlah sampel yang dapat diperiksa oleh satu perangkat pemeriksaan.

Pada penelitian ini pemberian kurkumin bertujuan menurunkan aktivitas angiogenesis sel kanker payudara dengan menurunkan kadar VEGF. Kadar kurkumin 0,05mM yang diberikan pada penelitian ini merupakan kadar tinggi, hal ini didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Gururaj dkk pada tahun 2002.⁴⁹ Pada penelitiannya, Gururaj dkk menggunakan kurkumin kadar 0,01mM terhadap kultur jaringan sel endometrium EAT, dan kadar tersebut ditetapkan sebagai kadar tinggi, sedangkan kadar rendah dengan kadar 0,001mM. Oleh karena itu, pada penelitian ini kadar yang digunakan yaitu 0,05mM dapat dikatakan sebagai kadar tinggi. Selain itu, pemberian kadar 0,05mM juga didasarkan pada penelitian Shao dkk (2002). Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Shao dkk (2002) membuktikan bahwa kurkumin kadar 0,05mM secara signifikan dapat menurunkan kadar VEGF pada kultur jaringan sel kanker

payudara MDA-MB-231 jika dibandingkan dengan kontrol, namun tidak signifikan untuk sel kanker payudara MCF-7. Penelitian ini berusaha membuktikan hal yang belum didapatkan oleh Shao dkk. Kadar 0,05mM diharapkan dapat menjadi kadar yang sesuai untuk menurunkan kadar VEGF pada kultur jaringan. Kadar kurkumin 0,1mM diberikan sebagai pembanding yang lebih tinggi kadarnya untuk membuktikan hipotesis penelitian ini.

Dari hasil penelitian ini didapatkan bahwa pemberian kurkumin kadar 0,05mM mampu menurunkan kadar VEGF pada kultur jaringan kanker payudara MCF-7 setelah masa inkubasi selama 72 jam jika dibandingkan dengan kontrol tanpa pemberian kurkumin secara signifikan. Hal ini berbeda dengan hasil yang didapatkan oleh Shao dkk (2002). Perbedaan yang terjadi pada hasil penelitian ini dengan penelitian Shao dkk dapat disebabkan oleh metode pemeriksaan yang digunakan dalam penelitian. Shao dkk menggunakan teknik Western Blot sedangkan penelitian ini menggunakan teknik ELISA dalam mengukur kadar VEGF pada kultur jaringan kanker payudara. Perbedaan lainnya terdapat pada media kultur yang digunakan, penelitian ini menggunakan RPMI 1640 komplet + FBS10% sebagai medium kultur, sedangkan pada penelitian Shao, medium kultur yang digunakan adalah DMEM. Masa inkubasi juga berbeda pada kedua penelitian ini, Shao dkk melakukan inkubasi selama 48 jam, sedangkan pada penelitian ini masa inkubasi selama 72 jam. Beberapa perbedaan tersebut di atas memungkinkan terjadinya perbedaan hasil dan kemaknaannya.²¹

Dari hasil penelitian, kelompok sampel dengan pemberian kurkumin kadar 0,1mM pada kultur jaringan kanker payudara MCF-7 memiliki hasil yang bermakna jika dibandingkan dengan kontrol tanpa pemberian kurkumin. Namun, jika kelompok sampel dengan kadar kurkumin 0,1mM ini dibandingkan dengan kelompok sampel dengan pemberian kurkumin kadar 0,05mM, tidak ditemukan perbedaan yang bermakna diantara keduanya. Hal ini diperkuat dengan adanya data jumlah sel dari masing-masing kelompok perlakuan. Pada kelompok perlakuan dengan kurkumin kadar 0,05mM dan kadar 0,1mM memiliki perbedaan bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol. Namun antara kelompok perlakuan dengan kurkumin kadar 0,05mM dan kadar 0,1mM, jumlah sel antar kelompok tersebut tidak didapatkan perbedaan yang bermakna. Berdasarkan data

tersebut di atas, dapat dikatakan bahwa ada hubungan antara jumlah sel dengan kadar VEGF. Kemudian dilakukan analisis menggunakan SPSS 16 untuk melihat korelasi antara jumlah sel dengan kadar VEGF, dan didapatkan hasil yang bermakna dengan $p= 0,029$

Hasil penelitian Shankar dkk (2007) yang menggunakan kurkumin dalam berbagai kadar (0,02 mM, 0,04 mM dan 0,06mM) pada kultur sel kanker prostat PC-3, didapatkan hasil yang bermakna untuk setiap kadar kurkumin yang diberikan. Shankar menggunakan formasi tubular yang dibentuk oleh sel HUVEC untuk melihat aktivitas pembentukan kapiler baru yang bersifat kualitatif, sedangkan penelitian ini menggunakan pengukuran kadar VEGF yang bersifat kuantitatif. Pada prinsipnya dengan pemberian kurkumin baik penelitian ini maupun penelitian Shankar, keduanya memiliki kesamaan dalam hal menekan terjadinya angiogenesis.⁴⁴

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Holy tahun 2002, kurkumin terbukti dapat menekan proliferasi sel kanker payudara MCF-7 pada kultur jaringan melalui mekanisme induksi mikronukleasi dan hambatan pada pembelahan mitosis sel kanker. Hal ini dapat mendukung adanya penurunan jumlah sel kanker payudara MCF-7 pada hasil penelitian ini dibandingkan dengan jumlah sel yang tidak diberikan kurkumin. Sehingga ada kemungkinan penurunan kadar VEGF merupakan efek sekunder dari hambatan proliferasi kurkumin terhadap sel kanker payudara MCF-7.⁵⁰

Namun dilain pihak, selain dalam proses angiogenesis, VEGF juga memiliki efek non-angiogenik pada kanker payudara. Mercurio dkk (2001) mendapatkan bahwa sel kanker payudara ada yang memiliki sifat ketergantungan terhadap VEGF sebagai faktor untuk bertahan hidup. Berdasarkan penelitiannya, reduksi VEGF sebanyak 50%, secara signifikan meningkatkan apoptosis sel, meskipun dengan pemberian serum dengan kadar 10%. Berkaitan dengan penelitian ini, akibat dari hambatan sekresi VEGF oleh kurkumin terhadap sel kanker payudara MCF-7, maka kemampuan bertahan hidup dari sel kanker tersebut akan berkurang, sehingga akan meningkatkan kematian dari sel. Sehingga secara tidak langsung VEGF yang dihasilkan oleh sel kanker mampu

meningkatkan kemampuan sel kanker untuk bertahan hidup dan menjalani siklus kehidupan sel kanker tersebut lebih lanjut.⁵¹

Berdasarkan hasil perhitungan perbandingan antara jumlah sel kanker payudara MCF-7 dengan kadar VEGF yang dihasilkan pada tiap kelompok, dapat disimpulkan bahwa ada penurunan yang bermakna pada rasio jumlah sel dan kadar VEGF antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan kurkumin 0,05mM dan kelompok perlakuan kurkumin 0,1mM. Berdasarkan perhitungan tersebut dapat dikatakan bahwa dengan peningkatan kadar kurkumin yang diberikan, rasio antara jumlah sel dan kadar VEGF yang dihasilkan juga semakin kecil. Ada kemungkinan bahwa semakin besar kadar kurkumin yang diberikan, maka jumlah sel kanker dan kadar VEGF yang dihasilkan oleh sel kanker tersebut juga akan semakin ditekan.

VEGF diproduksi oleh sel tumor ganas maupun sel tumor jinak sebagai respon terhadap hipoksia, inflamasi, faktor pertumbuhan, sitokin dan sel tumor ganas akibat kelainan genetik.³¹ Ekspresi VEGF diregulasi oleh sejumlah stimulus meliputi berbagai faktor pertumbuhan, sitokin, hormon, tidak berfungsinya p53, aktivasi onkogen RAS dan SRC dan pada kanker payudara adalah ekspresi berlebih dari HER2. Gen *HER2*, teramplifikasi sebesar 20% dari kanker payudara. Gen *HER2* mengaktifkan jalur sinyal seluler multipel yang terlibat dalam proliferasi dan waktu hidup sel, dan juga meregulasi VEGF pada tingkat molekuler.¹²

Penurunan kadar VEGF pada kultur jaringan kanker payudara dapat terjadi melalui berbagai mekanisme. Mekanisme yang pertama dapat terjadi melalui proses hambatan terhadap aktifitas gen *HER2*. Pada kanker payudara, peningkatan ekspresi gen *HER2* berperan besar pada perkembangan sel kanker payudara. Ekspresi yang berlebih dari gen *HER2* ini dapat berakibat peningkatan jumlah sel kanker payudara dan memburuknya prognosis. Kurkumin mampu menekan ekspresi gen *HER2*. Jika ekspresi gen *HER2* dihambat maka jalur aktivasi sinyal seluler yang menginduksi ekspresi Ras-ERK dan Phospatidilinositol-3 Kinase (PI3K) akan dihambat. Hambatan terhadap ekspresi Ras-ERK 1 / 2 mengakibatkan faktor transkripsi SP1 dan *co promotor* CBP,p300 tidak dapat

mengaktifkan transkripsi VEGF melalui proses fosforilasi.^{40,42} Sedangkan hambatan terhadap PI3K akan menekan aktivasi jalur protein kinase B sehingga translasi mRNA VEGF tidak terjadi dan VEGF tidak dihasilkan. Aktivitas PI3K dan protein kinase B tidak hanya diaktifkan oleh gen HER2, keadaan hipoksia juga dapat mengaktifkan PI3K dan mengaktifkan jalur protein kinase B. Secara langsung kurkumin juga dapat menghambat aktifitas protein kinase B.

Selain hambatan terhadap gen HER2, kurkumin juga dapat menghambat aktifitas HIF1A. *Hypoxia inducible factor 1 α* (HIF1A) adalah kunci utama terjadinya respon seluler akibat keadaan hipoksia. Hipoksia merupakan salah satu faktor penting yang menginduksi ekspresi mRNA VEGF dan hal ini merupakan karakteristik dari sel kanker payudara. Induksi transkripsi mRNA VEGF akibat hipoksia diperantarai oleh ikatan yang terjadi antara *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) dengan situs pengikatan HIF-1 yang terdapat pada promotor VEGF. HIF1A yang teraktivasi akan bertranslokasi ke dalam inti sel dan berikatan dengan *hypoxia-response element* (HRE) yang memiliki sekuens inti 5'-A/TCGTG-3', sebagai promotor VEGF, akhirnya mengaktifkan proses transkripsi. Namun hal ini dapat dihambat oleh kurkumin^{40,42,12}

Sama halnya dengan situs transkripsi HIF-1, regio promotor VEGF memiliki beberapa faktor transkripsi potensial seperti AP-1, AP-2, Egr-1, Sp-1 dan lainnya yang juga turut terlibat dalam regulasi transkripsi VEGF.^{12,52} Faktor transkripsi Sp1 yang berfungsi pada jalur ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) akan meningkatkan regulasi transkripsi VEGF melalui reaksi fosforilasi. Pengaturan ini tidak terikat dengan keadaan stress akibat hipoksia pada sel kanker. Kurkumin juga mampu menghambat faktor transkripsi AP-1, AP-2, Egr-1, Sp-1. Jika faktor transkripsi ini tidak diaktifkan, maka reaksi fosforilasi proses transkripsi VEGF tidak dapat berlangsung, dan VEGF tidak akan dihasilkan. Kemampuan dari *stress-activated kinase p38* juga dapat dihambat oleh molekul kurkumin, sehingga proses translasi VEGF tanpa adanya sintesis mRNA VEGF yang baru tidak dapat berlangsung.

6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

- 6.1.1 Kurkumin kadar 0,05mM dan kadar 0,1mM menurunkan kadar VEGF pada kultur jaringan kanker payudara MCF-7 cell line
- 6.1.2 Kurkumin kadar 0,05mM dan kadar 0,1mM dapat menghambat proliferasi sel yang diikuti dengan penurunan kadar total VEGF pada kultur jaringan kanker payudara MCF-7 cell line

6.2 Saran

- 6.2.1 Diperlukan penelitian lanjutan dengan metode yang lebih baik dengan jumlah sampel yang lebih besar dan menggunakan hewan coba untuk mengetahui pengaruh pemberian kurkumin kadar tinggi 0,05mM dan beberapa kadar tinggi lainnya terhadap kadar VEGF serum/plasma hewan coba.
- 6.2.2 Disarankan untuk penelitian selanjutnya, sel kanker yang digunakan sebaiknya dikultur terlebih dahulu, lalu setelah itu diberikan perlakuan dengan kurkumin, untuk melihat efek supresi yang lebih jelas.

DAFTAR REFERENSI

1. Factsheet mortality rate. World Health Organization. 2007 [diunduh dari 2007 Oktober 3]. tersedia di <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/index>
2. Deteksi dini kanker serviks dan kanker payudara. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008 [diunduh 2009 Mei 27]. Tersedia di <http://www.depkes.go.id/in/2104ea.html>
3. Freund A, Chauveau C, Brouillet JP, Lucas A, Lacroix M, Licznar A, et al. IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells. *Oncogene* 2003;22(2):256.
4. Singh TT. Breast cancer management: present scenario. *Med J Indones* 2007;16:55-60.
5. Siswono. Kanker Payudara bisa dideteksi sendiri. Kompas 9 Januari 2002.
6. Kanker payudara. diunduh dari <http://www.tempo.co.id/medika/arsip/052002>
7. Tjindarbumi D, Mangunkusumo R. Cancer in Indonesia, present and future. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32(Suppl 1):17.
8. Rahmawati E, Dewoto HR, Wuyung PE. Anticancer activity study of ethanol extract of Mahkota dewa fruit pulp (*phaleria macrocarpa* (Scheff.)Boerl.) in C3H mouse mammary tumor induced by transplantation. *Med J Indones* 2006;15:217-22.
9. Muthalib A, Darwis I, Prayogo N, Sutjipto. First-line chemotherapy of advanced or metastatic breast cancer (MBC) with docetaxel and doxorubicin in Indonesia: results from A phase II trial. *Med J Indones* 2004;14:20-5.
10. Kusumobroto BS, Purwanto H, Hasnawati, Brahim R, Hartono B, et al, editors. Profil kesehatan Indonesia 2007. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2008.

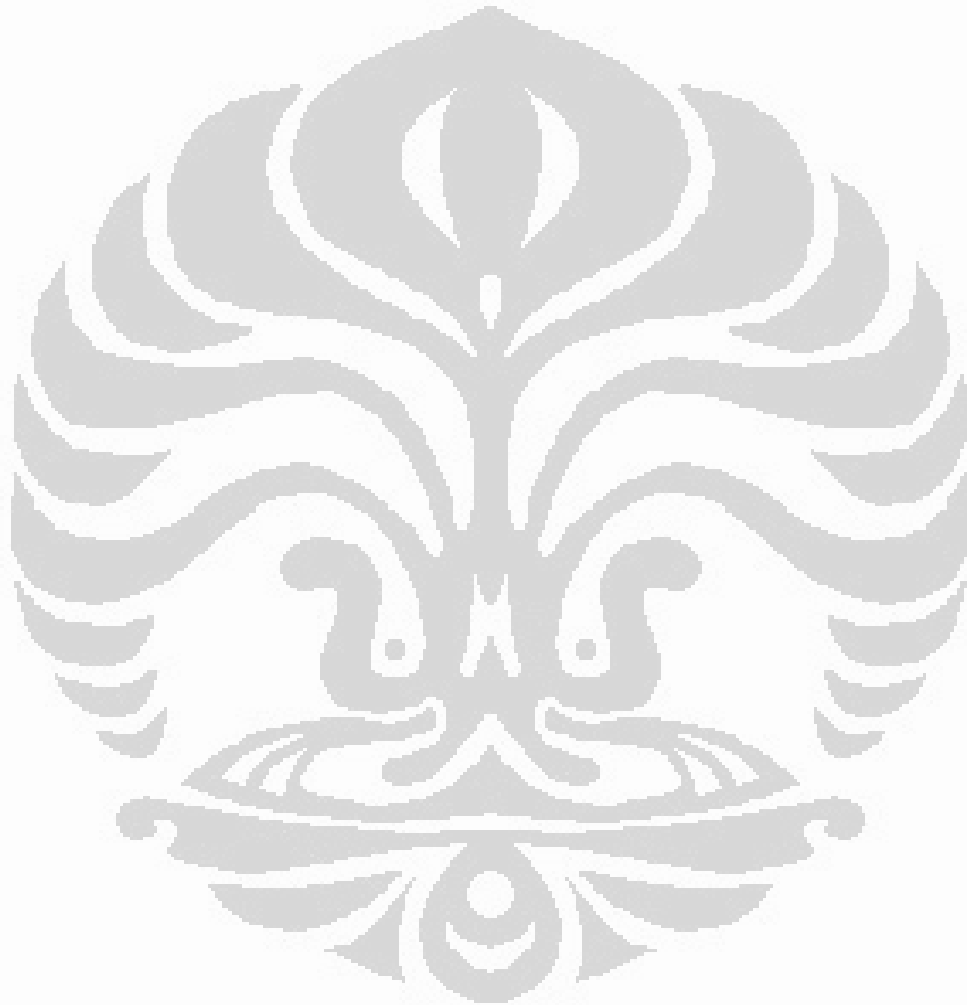
11. Bando H. Vascular endothelial growth factor and Bevacitumab in breast cancer. *Breast Cancer*. 2007;14:163-73.
12. Banarjee S, Dowsett M, Ashworth A, Ann Martin L. Mechanisms of disease: angiogenesis and the management of breast cancer. *Nature* 2007;4:536-50.
13. Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*.
14. Liekens S, Clereq ED, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacology*. 2001;61:253-70.
15. Schindler R, Mentlein R. Flavonoids and vitamin E reduce the release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor from human tumor cells. *J.Nutr* 2006;136:1477-82.
16. Potential angiogenic role of platelet activating factor in human breast cancer. *Am J of Pathology*. 1998;153:1589.
17. Risau, W. Mechanism of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-4.
18. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara A B, Aggarwal B B. Curcumin and cancer: An "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer letters* 2008;267:133-54
19. Binion DG, Otterson MF, Rafiee P. Curcumin inhibits VEGF-mediated angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 and MAPK inhibition. *Gut* 2008;57:1509-16.
20. Adams BK, Ferstl EM, Davis MC, Herold M, Kurtkaya S, Camalier RF, et al. Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents. *Bioorg.Med.Chem* 2004;12:3871-83.
21. Shao Z-M, Shen Z-Z, Liu C-H, Sartippour MR, Go VL, Heber D, Nguyen M. Curcumin exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Int J Cancer* 2002;98:234-40.

22. Somers-Edgar TJ, Scandlyn MJ, Stuart EC, Le Nedelec MJ, Valentine S. The combination of epigallocatechin gallate and curcumin suppresses ER α -breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* 2008;122:1966-71.
23. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology* 2008;75:787-809.
24. Kleinsmith LJ, Kish VM. Principles of Cell and Molecular Biology, 2nd ed. New York: HarperCollins College; 1995. p777-94.
25. Giavazzi R, Sennino B, Coltrini D, Garofalo A, Dossi R, Ronca R, et al. Distinct role of fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor on tumor growth and angiogenesis. *Am J of Pathology* 2003;162(6):1913-15.
26. Subakir SB. Aktivitas angiogenesis plasenta. *Maj. Kedokt Indonesia* 2004;54(11):458-60.
27. Sagar SM, Yance D, Wong RK. Natural health products that inhibits angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer-Part1. *Current Oncology* 2008;13(1):14-26.
28. Felmeden DC, Blann AD, Lip GYH. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *Eur Heart* 2003;24:586-603.
29. Folkman J, Shing Y. Minireview: Angiogenesis. Diunduh dari www.jbc.org pada 25 September 2007
30. Fox SB, Generali DG, Harris AL. Breast tumor angiogenesis. *Breast Cancer Research* 2007;9(6):1-11.
31. Bando H. Vascular endothelial growth factor and Bevacitumab in breast cancer. *Breast Cancer*. 2007;14:163-73.
32. Konecny GE, Meng YG, Untch M, Wang HJ, Bauerfeind I, Epstein M, et al. Association between HER-2/*neu* and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. *Clinical Cancer Research* 2004;10:1706-16.

33. Guo P, Fang Q, Tao HQ, Schafer CA, Fenton BM, Ding I, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor by MCF-7 breast cancer cells promotes estrogen-independent tumor growth in vivo. *Cancer Research* 2003;63:4684-91.
34. Jacobs EJ, Feigelson HS, Bain EB, Brady KA, Rodriguez C, Stevens VL, et al. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and breast cancer in the cancer prevention study II cohort. *Breast Cancer Research* 2006;8(R22):1-6.
35. Subakir SB, Garget C, Arleni, Madjid OA, Rogers P. Produksi *vascular endothelial growth factor* dan aktivitas angiogenik endometrium pemakai kontrasepsi progestin. *Maj Kedokt Indon* 2004;54(1):7-10.
36. Xia Y, Jin L, Zhang B, Xue H, Li Q, Xu Y. The potentiation of curcumin on insulin-like growth factor-1 action in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Life Sciences* 2007;80:2161-69.
37. Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, Leeuwen RV, Huang MT, Fisher C, et al. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Molecular Medicine* 1998;4:376-83.
38. Gaurisankar S, Das T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Division* 2008;3:1-14.
39. Somasundaram S, Edmund NA, Moore DT, Small GW, Shi YY, Orlowski RZ. Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer. *Cancer Research* 2002;62:3868-75.
40. Goel A, Kunnnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology* 2008;75:787-809.
41. Johnson JJ, Mukhtar H. Curcumin for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Letters* 2007;255:170-81.
42. Kunnnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Letters* 2008;269:199-225.

43. Bachmeier BE, Mohrenz IV, Mirisola V, Schleicher E, Romeo F, Hohneke C, et al. Curcumin downregulates the inflammatory cytokines CXCL1 and -2 in breast cancer cells via NF κ B. *Carcinogenesis* 2008;29(4):779-789.
44. Shankar S, Chen Q, Sarva K, Siddiqui I, Srivastava RK. Curcumin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells: molecular mechanisms of apoptosis, migration and angiogenesis. *Journal of Molecular Signaling* 2007;2(10):1-14.
45. Erk MJV, Teuling E, Staal YCM, Huyhers S, Bladeren PJV, AArts JMMJG, et al. Time- and dose-dependent effects of curcumin on gene expression in human colon cancer cells. *Journal of Carcinogenesis* 2004;3(8):1-17.
46. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Chantam C, Suksamrarn A, Patumraj S. Anti cancer and anti-angiogenic effects of curcumin and tetrahydrocurcumin on implanted hepatocellular carcinoma in nude mice. *World J Gastroenterol* 2008;14(13):2003-9.
47. Sagar SM, Yance D, Wong RK. Natural health products that inhibits angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer-Part2. *Current Oncology* 2008;13(3):99-100.
48. Kim YS, Won YS, Park KS, Song BJ, Kim JS, Oh SJ, et al. Prognostic significance of *HER2* gene amplification according to stage of breast cancer. *J Korean Med Sci* 2008;23:414.
49. Gururaj AE, Belakavadi M, Venkatesh DA, Marmé D, Salimath BP. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297(4):934-42
50. Holy JM. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells. *Mutation Research* 2002;518:82.
51. Mercurio AM, Lipscomb EA, Bachelder RE. Non-Angiogenic Functions of VEGF in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*:2005(10):283-90.

52. Lee TH, Seng S, Sekine M, Hinton C, Fu Y, Avraham HK, Avraham S. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *Plos Med* 2007;4(6):1101-14.



Lampiran I:

Perbandingan Hasil Kadar VEGF antara kelompok perlakuan kontrol dan kelompok perlakuan kurkumin

Crosstabs

Case Processing Summary

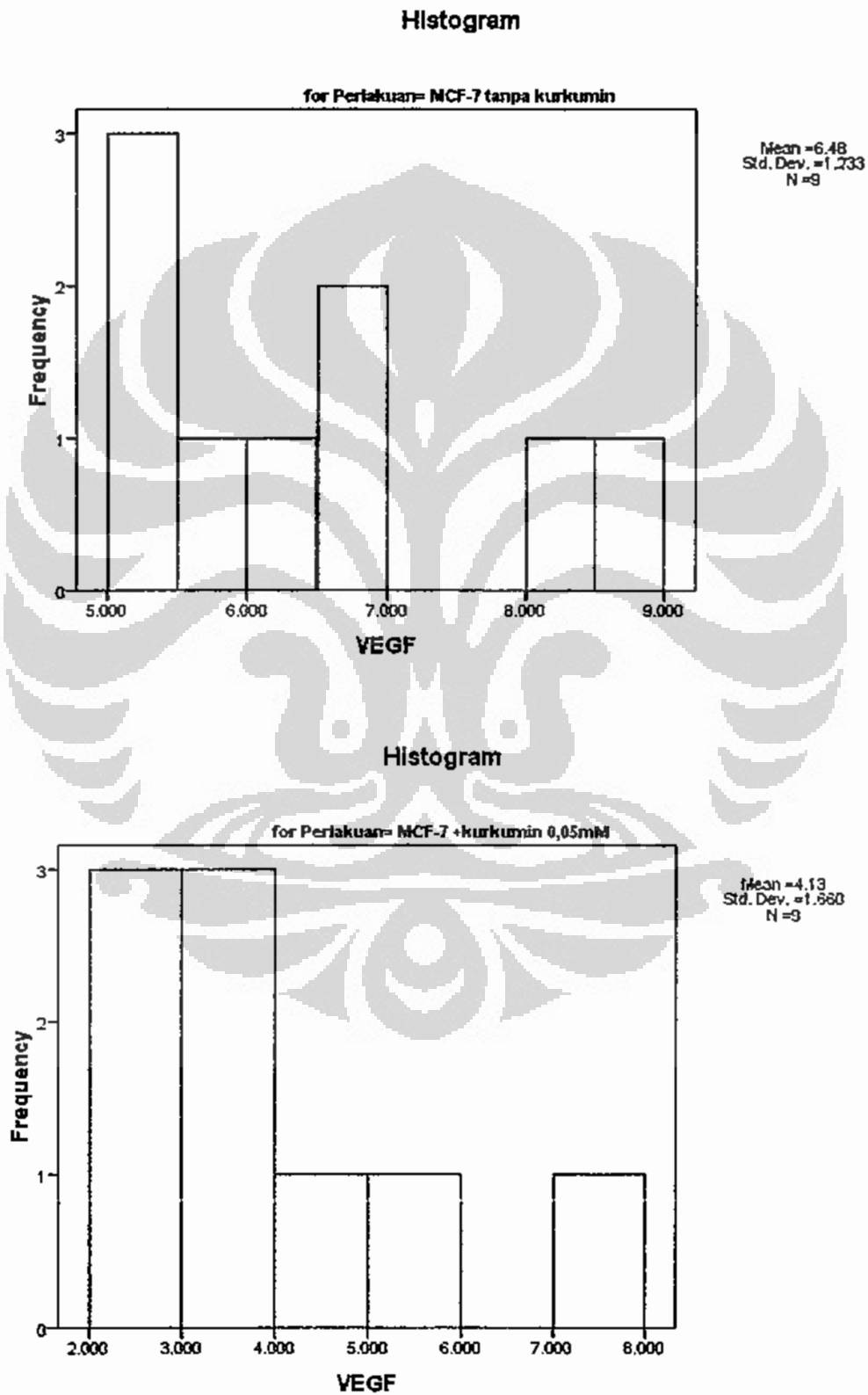
Perlakuan		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
VEGF	MCF-7 tanpa kurkumin	9	100.0%	0	.0%	9	100.0%
	MCF-7 +kurkumin 0,05mM	9	100.0%	0	.0%	9	100.0%
	MCF-7 +kurkumin 0,1mM	9	100.0%	0	.0%	9	100.0%

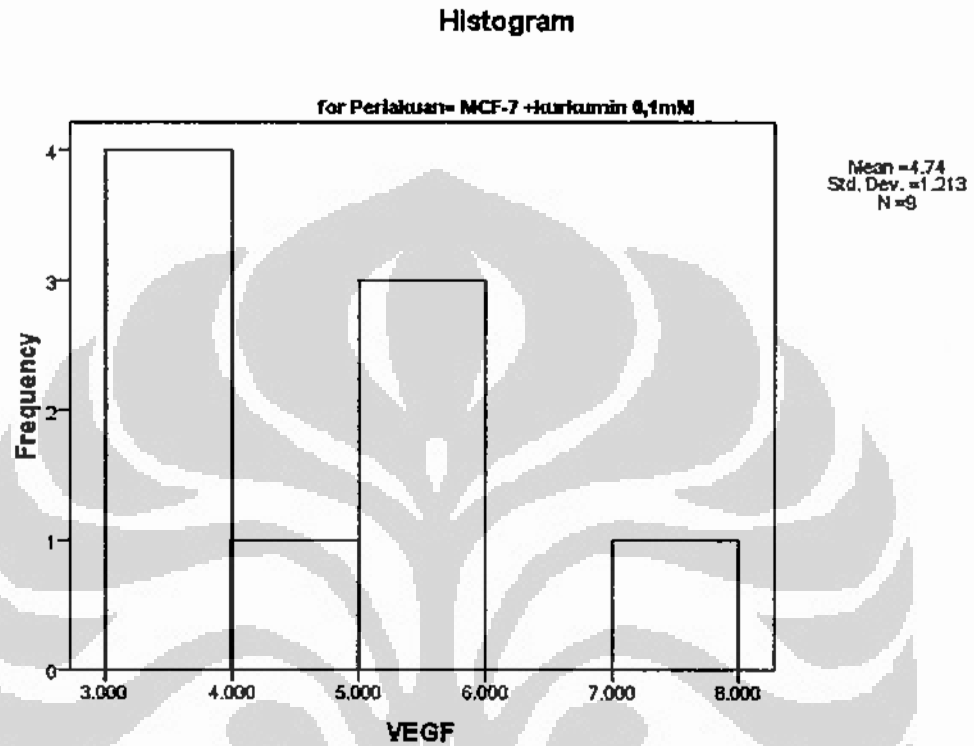
Tests of Normality

Perlakuan		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
VEGF	MCF-7 tanpa kurkumin	.159	9	.200*	.885	9	.175
	MCF-7 +kurkumin 0,05mM	.243	9	.135	.794	9	.017
	MCF-7 +kurkumin 0,1mM	.223	9	.200*	.885	9	.177

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Lampiran 2:**Histogram kadar VEGF kelompok kontrol dan kelompok kurkumin kadar 0,05mM**

Lampiran 3:**Histogram kadar VEGF kelompok kurkumin kadar 0,1mM**

Lampiran 4:

Transformasi data kadar VEGF kelompok perlakuan dengan metode akar kuadrat

Crosstabs

Case Processing Summary

Perlakuan	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
KadarVEGF MCF-7 tanpa kurkumin	9	100.0%	0	.0%	9	100.0%
MCF-7 +kurkumin 0,05mM	9	100.0%	0	.0%	9	100.0%
MCF-7 +kurkumin 0,1mM	9	100.0%	0	.0%	9	100.0%

Tests of Normality

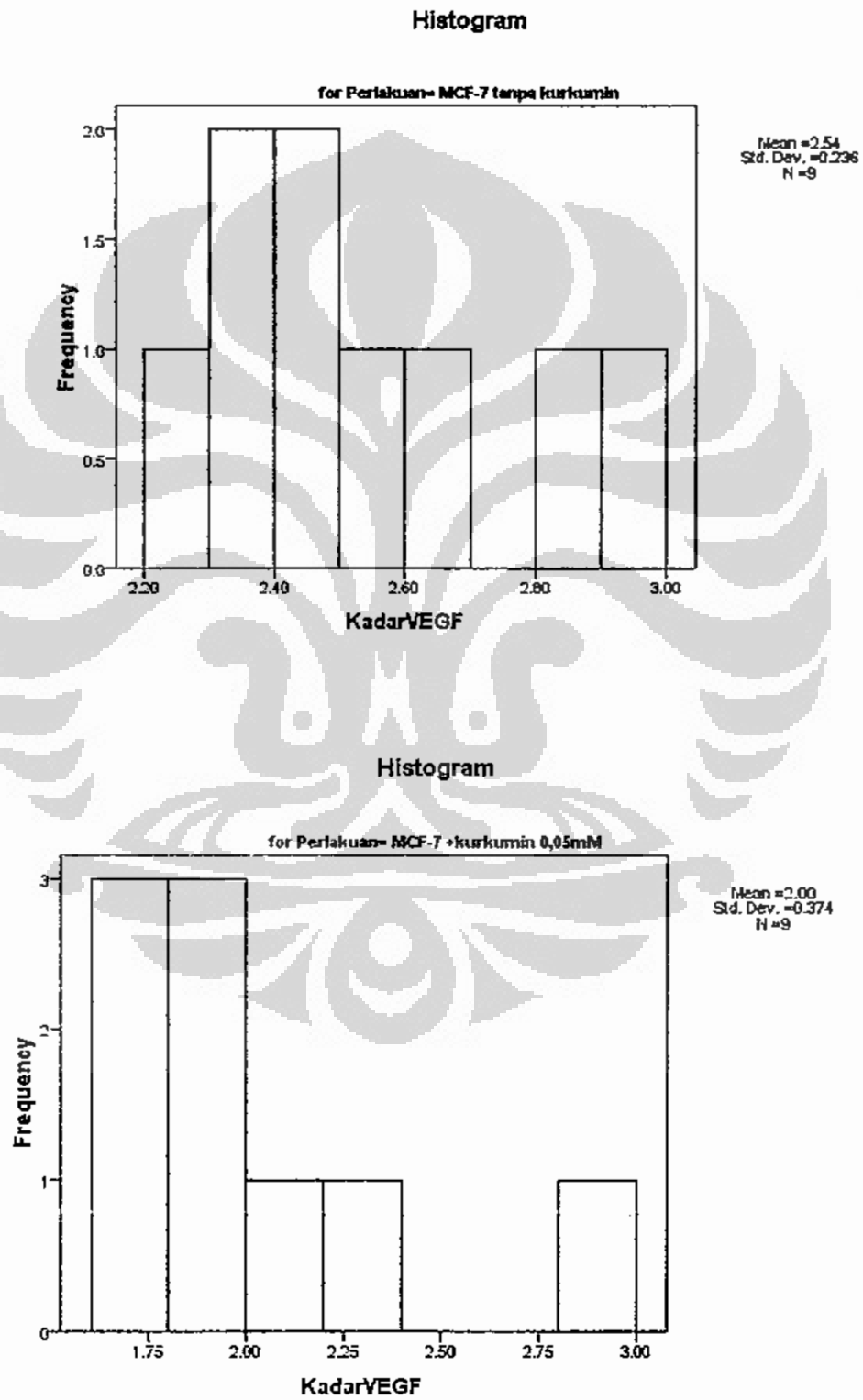
Perlakuan	Kolmogorov-Smimov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
KadarVEGF MCF-7 tanpa kurkumin	.146	9	.200*	.900	9	.251
MCF-7 +kurkumin 0,05mM	.219	9	.200*	.835	9	.051
MCF-7 +kurkumin 0,1mM	.228	9	.195	.902	9	.266

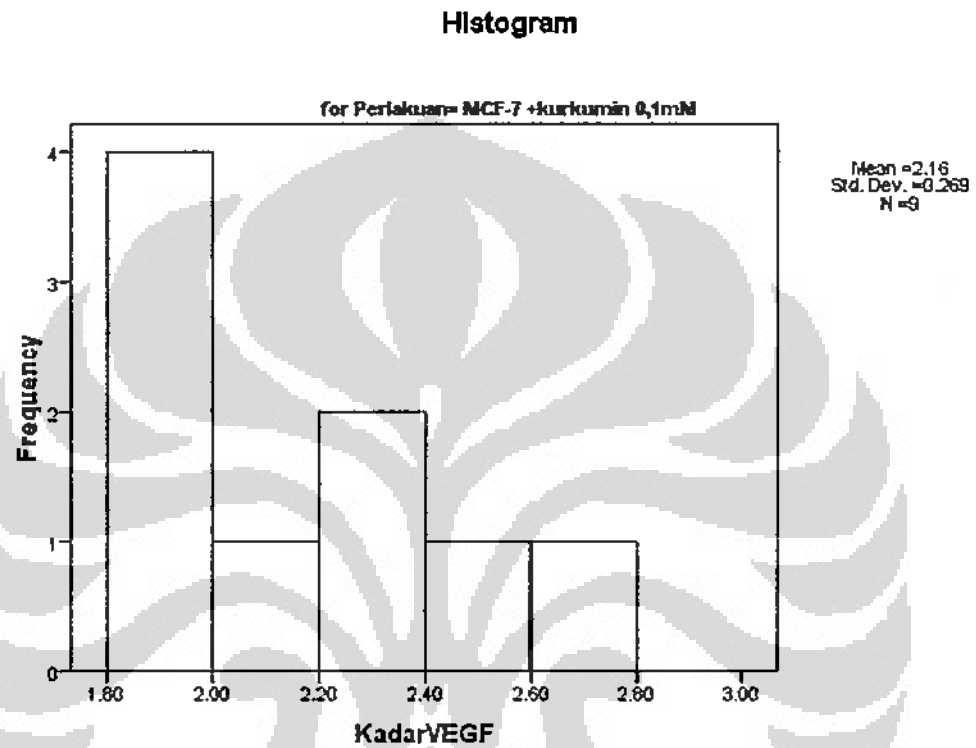
a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Lampiran 5:

Histogram kadar VEGF kelompok kontrol dan kelompok kurkumin kadar 0,05mM setelah transformasi data

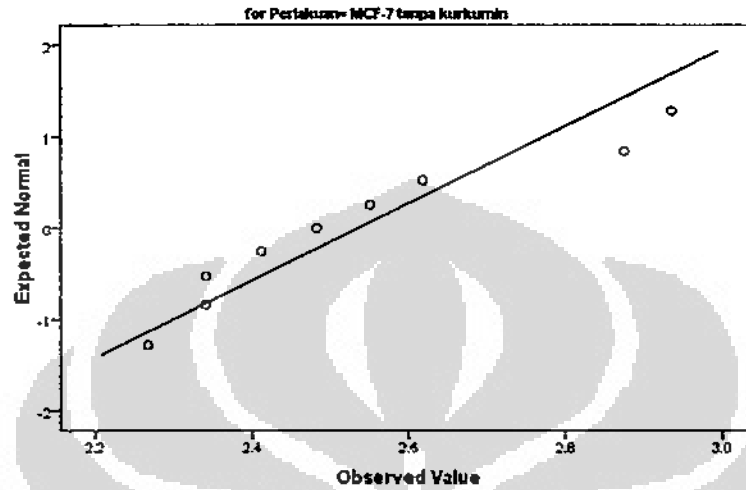


Lampiran 6:**Histogram kadar VEGF kelompok kurkumin kadar 0,1mM setelah transformasi data**

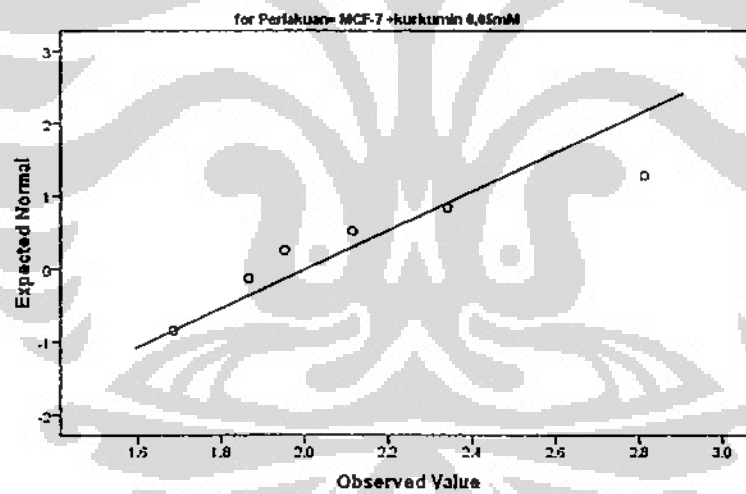
Lampiran 7:

Normal Q-Q Plots Kadar VEGF kelompok perlakuan

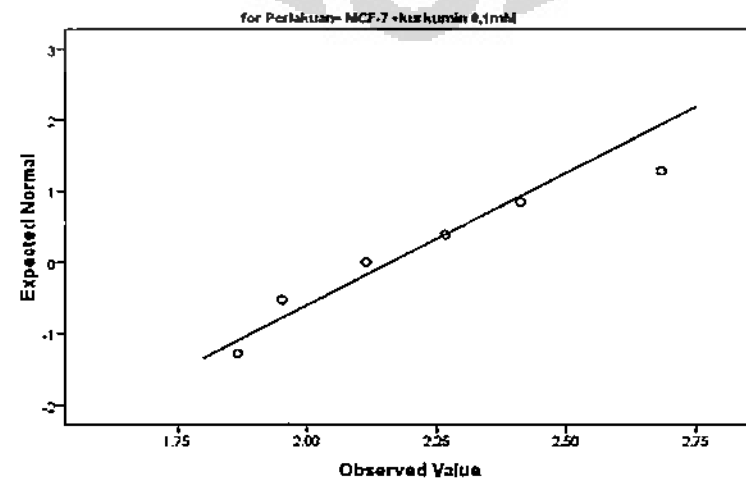
Normal Q-Q Plot of KadarVEGF

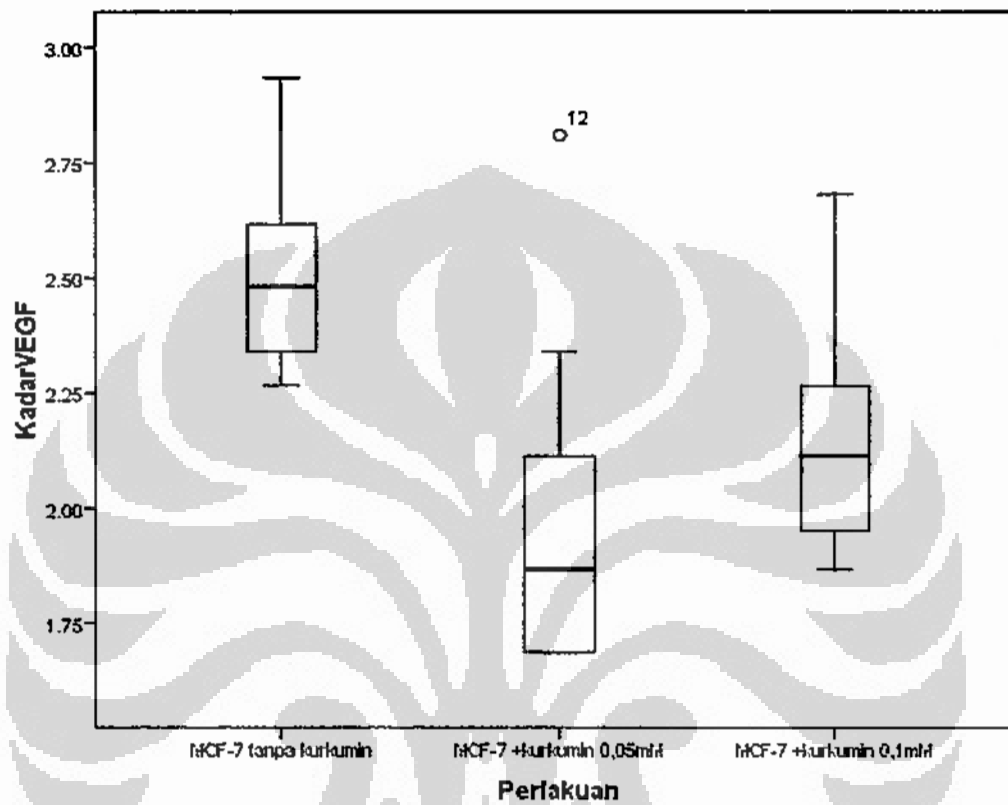


Normal Q-Q Plot of KadarVEGF



Normal Q-Q Plot of KadarVEGF



Lampiran 8:**Box Plots Kadar VEGF kelompok perlakuan**

Lampiran 9:**Test Varians****Test of Homogeneity of Variances**

KadarVEGF

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.722	2	24	.496

Lampiran 10:**Uji One-Way ANOVA****ANOVA**

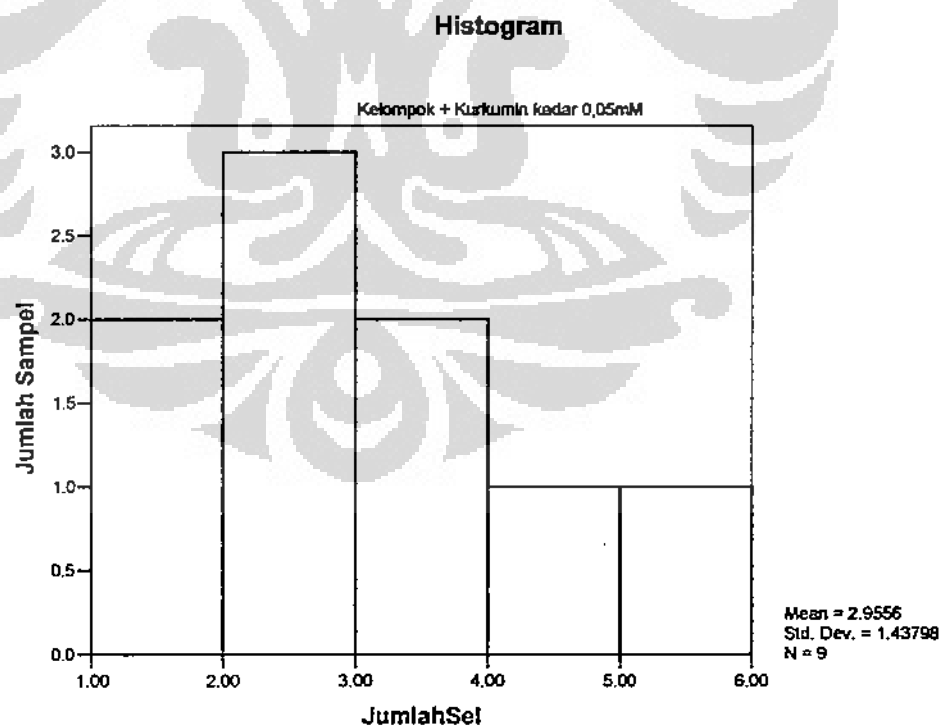
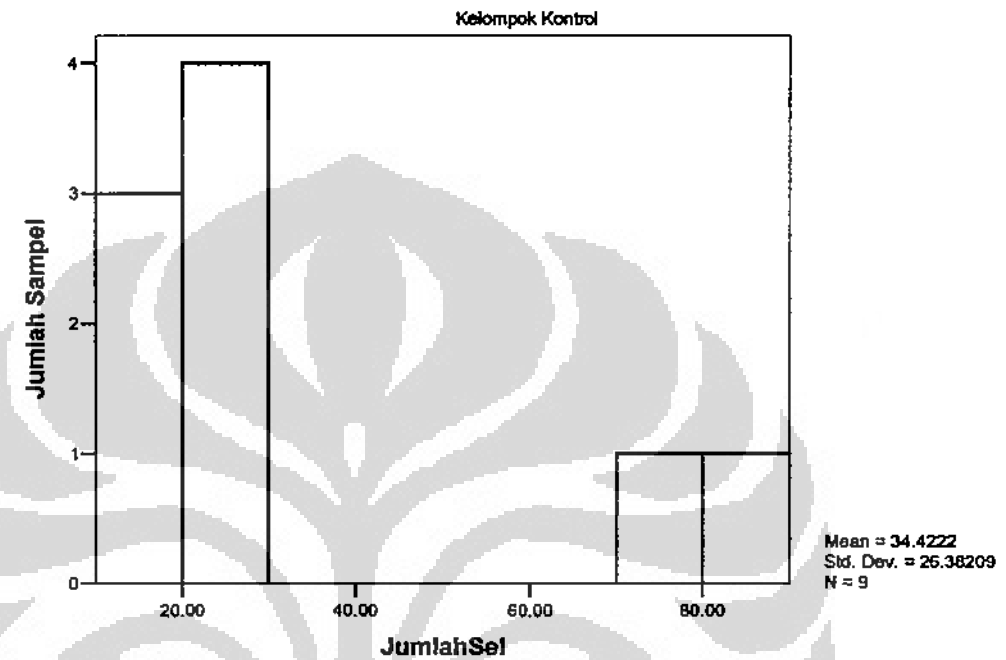
KadarVEGF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.352	2	.676	7.564	.003
Within Groups	2.144	24	.089		
Total	3.496	26			

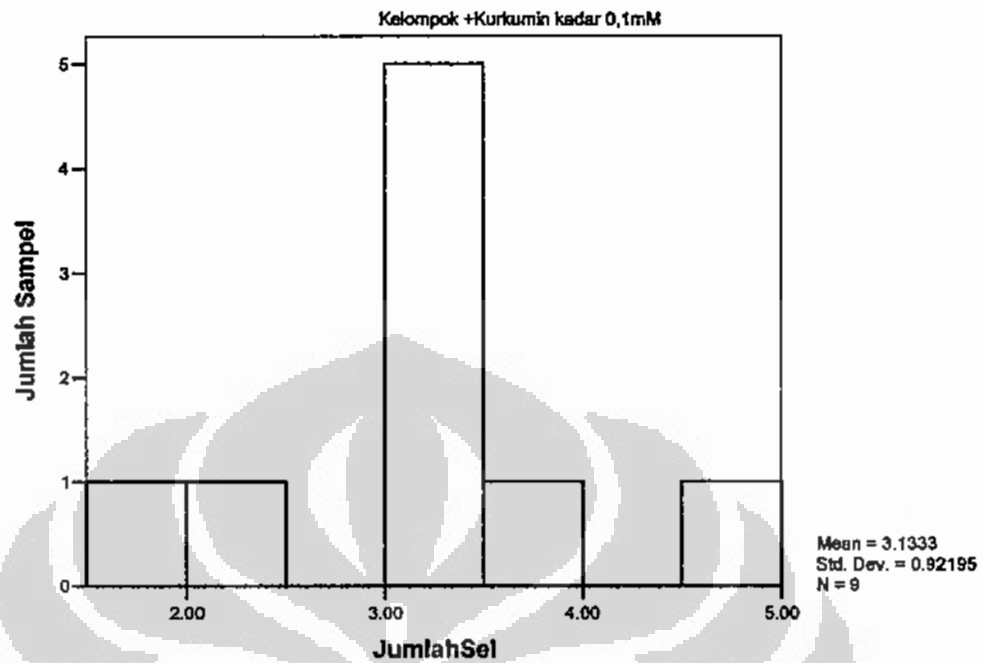
Lampiran 11

Distribusi Data Jumlah sel tiap kelompok ($\times 10^4$)

Histogram



Histogram



Lampiran 12:
Uji Hipotesis: Tes Kruskal-Wallis

Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
JumlahSel	Kontrol	9	23.00
	Kurkumin kadar 0,05mM	9	8.11
	Kurkumin kadar 0,1mM	9	10.89
	Total	27	

Test Statistics^{a,b}

	JumlahSel
Chi-Square	17.947
df	2
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Lampiran 13:**Uji Korelasi antara kelompok perlakuan dengan jumlah sel****3.1 Uji korelasi jumlah sel antara kelompok kontrol dengan kelompok+kurkumin 0,05mM****Tes Mann Whitney****Ranks**

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
JumlahSel Kontrol	9	14.00	126.00
Kurkumin kadar 0,05mM	9	5.00	45.00
Total	18		

Test Statistics^b

	JumlahSel
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-3.580
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

3.2 Uji korelasi jumlah sel antara kelompok kontrol dengan kelompok+kurkumin 0,1mM**Tes Mann Whitney****Ranks**

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
JumlahSel Kontrol	9	14.00	126.00
Kurkumin kadar 0,1mM	9	5.00	45.00
Total	18		

Test Statistics^b

	JumlahSel
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-3.580
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

3.3 Uji korelasi jumlah sel antara kelompok+kurkumin 0,05 & kelompok+kurkumin0,1mM

Tes Mann Whitney

Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
JumlahSel Kurkumin kadar 0,05mM	9	8.11	73.00
Kurkumin kadar 0,1mM	9	10.89	98.00
Total	18		

Test Statistics^b

	JumlahSel
Mann-Whitney U	28.000
Wilcoxon W	73.000
Z	-1.108
Asymp. Sig. (2-tailed)	.268
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.297 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Lampiran 14:

Uji korelasi antara jumlah sel dan kadar VEGF sel kanker MCF-7

Uji Korelasi Non-parametrik

		JumlahSel	KadarVEGF
Speaman's rho	JumlahSel	Correlation Coefficient	1.000
		Sig. (2-tailed)	.029
		N	27
	KadarVEGF	Correlation Coefficient	.420*
		Sig. (2-tailed)	.029
		N	27

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

BIODATA PENULIS

Nama : IMELDA ROSALYN SIANIPAR
Jenis Kelamin/ Status : Perempuan/Menikah
Tempat & Tgl lahir : Jakarta, 27 Agustus 1981
Alamat tinggal : Jl. Percetakan Negara V No: 25,
 Jakarta Pusat
E-mail : imelda.rosalyn@ui.ac.id
Pekerjaan : Staf pengajar Departemen Fisiologi
 Kedokteran FKUI
Nomor pokok Mahasiswa : 0606150744



RIWAYAT PENDIDIKAN

PENDIDIKAN FORMAL

Nama Sekolah	Tahun
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia	1999 – 2005
SMUN 81, Jakarta Timur	1996 – 1999
SMP St. Antonius II, Jakarta Timur	1993 - 1996
SD St. Antonius I, Jakarta Timur	1987 - 1993


PENGALAMAN PENELITIAN

Judul	Tempat	Tahun
Pengetahuan, Sikap, dan Perilaku Kesehatan Reproduksi pada Siswi Kelas Satu SLTP 213 Klender Maret 2004	Jakarta	2004

RIWAYAT PEKERJAAN

Institusi	Status	Tahun
Cipto Mangunkusumo Hospital, Tangerang General Hospital, Persahabatan General Hospital	Ko-Asisten	2002-2005
Kiara Primary Health Care	Ko-Asisten	Aug-Sept 2004
Pulo Gadung Public Health Service	Ko-Asisten	Sept-Oct 2004
Mitra Keluarga Nursery Academy	Pengajar	Sept 05 – now
Divisi Ginjal Hipertensi FKUI-RSCM	Asisten penelitian	Agst 05 –Des 05

Jakarta, 15 Juli 2009


 (Imelda Rosalyn Sianipar)

Pengaruh Pemberian Kurkumin Kadar Tinggi terhadap Faktor Angiogenik VEGF pada Kultur Jaringan Kanker Payudara MCF-7

Sri Bakti Subakir,* Imelda Rosalyn Sianipar,* Sonar Soni Panigoro[^]

*Departemen Fisiologi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

[^]Departemen Bedah – Divisi Bedah Onkologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Kanker payudara adalah salah satu kanker yang paling sering terjadi pada wanita. Dalam perkembangannya, sel kanker payudara membutuhkan vaskularisasi baru. Sel kanker mampu menginisiasi pembentukan pembuluh darah baru bagi dirinya sendiri dengan cara mengubah keseimbangan antara faktor proangiogenik dan antiangiogenik. Kurkumin adalah molekul yang pleiotropik, dapat memodulasi berbagai target pada sel kanker, termasuk aktivasi faktor transkripsi, reseptor, protein kinase, reseptor, sitokin, enzim dan faktor pertumbuhan yang diperlukan dalam pertumbuhan sel kanker payudara. Tujuan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian kurkumin kadar tinggi terhadap kadar VEGF pada kultur jaringan sel kanker payudara MCF-7. Metode yang digunakan dengan subkultur jaringan kanker payudara MCF-7 dalam medium RPMI komplet+FBS 10% sejumlah 9 sampel tiap kelompok perlakuan. Inkubasi 72 jam. Cairan kultur diambil, kadar VEGF diperiksa secara kuantitatif dengan ELISA. Hasil penelitian kadar VEGF kelompok MCF-7+kurkumin 0,05mM berbeda bermakna dengan kadar VEGF kelompok MCF-7 tanpa kurkumin ($p=0,014$). Kadar VEGF kelompok perlakuan MCF-7+kurkumin 0,1mM juga berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok MCF-7 tanpa kurkumin ($p=0,001$). Namun kadar VEGF kelompok MCF-7+kurkumin 0,05mM jika dibandingkan dengan kelompok MCF-7+kurkumin 0,1mM tidak berbeda bermakna ($p=0,262$). Kesimpulan: Kurkumin kadar 0,05mM dan 0,1mM dapat menurunkan kadar VEGF pada kultur jaringan kanker payudara MCF-7. Kurkumin kadar 0,05mM dan 0,1mM dapat menghambat proliferasi sel yang diikuti dengan penurunan kadar total VEGF pada kultur jaringan kanker payudara MCF-7.

Kata kunci: kurkumin, kanker payudara, VEGF, angiogenesis

The Influence of High Concentration of Curcumin towards VEGF level as and angiogenic factor in tissue culture of breast cancer cell line MCF-7

Sri Bakti Subakir,* Imelda Rosalyn Sianipar,* Sonar Soni Panigoro[^]

*Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Indonesia

[^]Surgery Department–Oncology Division Faculty of Medicine, University of Indonesia

Background: Breast cancer is one of the most prevalent cancer in women. In order to grow, the tumor cells require new vascularization. New vascularization is initiated by the tumor cells themselves by recruitment of their own blood supply by shifting the balance between proangiogenic and antiangiogenic factors. Curcumin is a pleiotropic factor which can modulate various targets on cancer cells, including activation of transcription factors, receptors, protein kinases, cytokines, enzymes, and growth factors needed for breast cancer cells' growth. **Objective:** To identify the influence of high concentration of curcumin towards VEGF level in breast cancer cell line MCF-7. **Method:** In this study, breast cancer cell line MCF-7 was subcultured in complete RPMI medium + FBS 10%, with 9 samples for each treatment group; then incubated for 72 hours. VEGF concentration was measured with ELISA from the supernatant of the cell culture. **Result:** The VEGF levels of both MCF-7 + curcumin 0.05 mM treatment group and MCF-7 + curcumin 0.1 mM treatment group are significantly lower than the VEGF level of MCF-7 without curcumin treatment group ($p = 0.014$ and $p = 0.001$). The VEGF level of MCF-7 + curcumin 0.05 mM treatment group is not significantly different from the VEGF level of MCF-7 + curcumin 0.1 mM treatment group ($p = 0.262$). **Conclusion:** Curcumin dose of 0.05mM and 0.1mM lower the VEGF level in breast cancer cell line MCF-7. Curcumin dose of 0.05 mM and 0.1mM lower the proliferation of breast cancer cell line MCF-7.

Keywords: curcumin, breast cancer, VEGF, angiogenesis

Pendahuluan

Kanker adalah salah satu penyakit yang banyak menimbulkan kesengsaraan dan kematian pada manusia. WHO merilis data pada tahun 2005 yang menyatakan kanker sebagai penyebab kematian tertinggi di dunia. Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT 2001) juga merilis data bahwa kanker menempati urutan ke-5 sebagai penyebab kematian di Indonesia dan terus meningkat secara bermakna.^{1,2} Dari 58 juta kematian, 7,6 juta (13%) kematian disebabkan oleh kanker. Diperkirakan pada tahun 2015, kematian akibat kanker akan meningkat hingga 9 juta orang. Saat ini, kanker payudara adalah salah satu kanker yang paling sering terjadi pada wanita di negara berkembang.³ Beberapa sumber menyatakan bahwa kanker payudara adalah kanker kedua tersering pada wanita Indonesia setelah kanker serviks.⁴⁻⁷ Berdasarkan Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2001 menyatakan bahwa kanker payudara menempati urutan kedua sebesar 24,97% sebagai kanker yang sering dialami oleh wanita Indonesia, setelah kanker serviks.⁸ Berdasarkan data Globocan, IARC 2002, didapatkan estimasi insidens kanker payudara di Indonesia sebesar 26 per 100.000 perempuan.² Selain itu, Pusat Kanker Nasional Dharmais melaporkan ada 150 kasus baru kanker payudara tiap tahunnya, sedangkan di Asia Pasifik jumlah kasus baru kanker payudara sekitar 200.000 pasien per tahun atau 13% dari keseluruhan kasus baru kanker.⁹ Berbeda dengan data survei lainnya, Profil kesehatan Indonesia tahun 2007 yang dirilis oleh Departemen Kesehatan Republik Indonesia menyatakan bahwa saat ini kanker payudara adalah kanker tertinggi yang paling sering terjadi pada wanita Indonesia sejak tahun 2004 hingga 2006, diikuti dengan kanker leher rahim (SIRS=Sistem Informasi RS 2007). Terdapat peningkatan jumlah kasus kanker payudara sebesar 6% dari tahun 2005 ke tahun 2006. Berdasarkan data di atas diketahui bahwa telah terjadi peningkatan kanker payudara pada wanita Indonesia.¹⁰

Kanker payudara adalah suatu keganasan yang terjadi pada kelenjar payudara. Dalam perkembangannya, sel kanker payudara membutuhkan vaskularisasi baru (*neovascularization*).¹¹⁻¹³ Jaringan kapiler yang luas dibutuhkan guna memenuhi kebutuhan oksigen dan nutrisi.¹⁴ Aktivitas angiogenesis kanker payudara merupakan faktor penentu perkembangan dan kemampuan bertahan sel kanker tersebut.^{11,15} Selain dari perkembangan dan pertumbuhan sel kanker, angiogenesis juga turut berperan dalam proses metastasis.¹² Hal ini terjadi akibat penetrasi pembuluh darah yang baru kedalam sel tumor (*intratumoral*) merupakan jalan atau tempat masuknya sel kanker ke dalam sirkulasi darah dan bemetastasis ke organ-organ yang jauh.^{14,16}

Sel kanker mampu menginisiasi pembentukan pembuluh darah baru bagi dirinya sendiri dengan cara mengubah keseimbangan antara faktor proangiogenik dan faktor antiangiogenik.¹² Hal ini dikenal dengan istilah *angiogenic switch*. Faktor proangiogenik akan merangsang terjadinya angiogenesis, sedangkan faktor antiangiogenik akan menghambat angiogenesis.¹⁷ Angiogenesis sel kanker merupakan suatu proses yang kompleks yang melibatkan interaksi antar sel dengan berbagai faktor dan komponen matriks ekstraseluler.¹⁴ Sel atau jaringan yang mengalami hipoksia dan kekurangan nutrisi akan mensekresikan faktor-faktor proangiogenik, yang selanjutnya merangsang terjadinya proses angiogenesis. Angiogenesis tersebut bertujuan meningkatkan vaskularisasi ke sel

atau jaringan yang mengalami hipoksia dan kekurangan nutrisi, sehingga sel-sel tersebut akan mendapatkan oksigen dan nutrisi yang cukup.¹⁴ Salah satu faktor yang turut berperan penting dalam proses angiogenesis adalah VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) dan reseptornya.¹² VEGF merupakan suatu mediator yang berperan merangsang proliferasi sel endotel pembuluh darah untuk memulai proses angiogenesis.¹¹⁻¹⁴

Pada tahun 1971, pengobatan kanker dengan cara kemoterapi mulai diperkenalkan dan tahun 1991 juga mulai dikenal terapi dengan target spesifik. Penelitian untuk terapi kanker saat ini banyak menitikberatkan pada anti terhadap faktor proangiogenik yang menekan atau menghambat kerja dari VEGF serta reseptornya. Terapi yang menjadikan VEGF sebagai target molekul, antara lain terapi yang menggunakan molekul antibodi yang dapat menetralkan atau melawan VEGF dan reseptor VEGF, dan juga molekul kecil yang bertindak sebagai inhibitor transduksi sinyal dalam regulasi transkripsi VEGF.¹¹

Perkembangan penelitian terapi kanker dapat dilihat dari banyaknya obat anti kanker yang disetujui oleh U.S FDA (*United States Food and Drug Administration*). Lebih dari 70% obat anti kanker yang disetujui oleh FDA dapat ditelusuri kembali asal obat tersebut yang berasal dari tanaman (produk alam), yang sejak dulu telah digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai penyakit. Pendekatan terapi kanker khususnya kanker payudara saat ini juga sudah mulai melakukan pendekatan terapi menggunakan produk alami yang berbahan dasar dari tanaman atau *herbal medicine*, dan hal ini kerap digeluti oleh para peneliti.¹⁸ Curcumin merupakan salah satu fitokimia yang banyak diteliti kegunaannya sebagai obat anti kanker.

Selama berabad-abad, kurkumin telah digunakan sebagai pewarna kekuningan pada kari dan pemberi rasa pedas pada makanan orang Asia.¹⁹ Kurkumin tersebar luas di negara dengan iklim tropis seperti India, Cina, Indonesia dan negara di benua Asia lainnya. Tanaman ini dikenal dengan nama kunyit di Indonesia. Selain digunakan sebagai bumbu masakan, zat ini juga telah digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai penyakit di berbagai belahan dunia. Pada pengobatan tradisional india (*Ayurveda*), kurkumin telah digunakan untuk mengobati inflamasi. Selain itu, kurkumin juga digunakan untuk mengobati penyakit antara lain, penyakit hati (*jaundice*), gangguan pencernaan, penyakit traktus urinarius, artritis rheumatoid dan gigitan binatang.¹⁹⁻²² Kurkumin adalah molekul yang pleiotropik, dapat memodulasi berbagai target pada sel kanker, termasuk aktivasi berbagai faktor transkripsi, reseptor, protein kinase, sitokin, enzim dan faktor pertumbuhan yang diperlukan dalam pertumbuhan sel kanker payudara.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kurkumin efektif dalam menghambat pertumbuhan dan proliferasi sel kanker kolon, kulit, prostat, dan paru. Pada kanker payudara, penelitian Shao dkk (2002) menunjukkan bahwa pemberian kurkumin pada kultur jaringan kanker payudara *MCF-7 cell line* tidak menekan kadar VEGF sebagai faktor angiogenik.²¹ Penelitian tersebut menggunakan kadar kurkumin sebesar 50µM. Berdasarkan efektifitas kurkumin terhadap berbagai jenis kanker dan karakteristik kurkumin yang pleiotropik, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah kurkumin dengan kadar yang lebih tinggi dapat menekan kadar VEGF.

Bahan dan Cara Kerja

Penelitian merupakan studi ekperimental in vitro pada kultur jaringan yang dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Makmal, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. Waktu penelitian adalah dari Januari 2009 hingga Mei 2009. Sampel yang digunakan sebanyak 27 sampel, dengan tiap kelompok perlakuan sebanyak 9 sampel. Subkultur kanker payudara MCF-7 dalam medium RPMI komplit+FBS 10% dengan masa inkubasi selama 72 jam. Setelah 72 jam, cairan kultur di ambil untuk diukur kadar VEGF dengan menggunakan ELISA.

Hasil

Kadar VEGF kelompok perlakuan pertama (MCF-7 tanpa kurkumin) adalah $6,47 \pm 1,23$ pg/mL. Kelompok perlakuan kedua (MCF-7 +kurkumin 0,05mM) memiliki kadar VEGF $4,12 \pm 1,66$ pg/mL. Sedangkan kelompok perlakuan yang ketiga memiliki kadar VEGF $4,74 \pm 1,21$ pg/mL. Berdasarkan analisa data kadar VEGF menggunakan SPSS 16, kadar VEGF pada kelompok perlakuan kedua (MCF-7+kurkumin 0,05mM) memiliki perbedaan bermakna dengan kadar VEGF kelompok perlakuan pertama (MCF-7 tanpa kurkumin) ($p=0,014$). Kadar VEGF pada kelompok perlakuan ketiga (MCF-7+kurkumin 0,1mM) juga memiliki perbedaan bermakna jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan pertama (MCF-7 tanpa kurkumin) ($p=0,001$). Namun kadar VEGF pada kelompok perlakuan kedua (MCF-7+kurkumin 0,05mM) jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan ketiga (MCF-7+kurkumin 0,1mM) tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p=0,262$).

Berdasarkan hasil jumlah sel tiap kelompok perlakuan, kelompok kontrol memiliki jumlah sel $34,42 \times 10^4$ sel/mL $\pm 26,38$, kelompok perlakuan kedua (MCF-7 +kurkumin 0,05mM) memiliki jumlah sel $2,95 \times 10^4$ sel/mL $\pm 1,43$, dan kelompok perlakuan yang ketiga memiliki jumlah sel $3,13 \times 10^4$ sel/mL $\pm 0,92$. Dari hasil rerata jumlah sel dan kadar VEGF, dihitung perbandingan yang antara jumlah sel dan kadar VEGF yang dihasilkan. Pada kelompok kontrol didapatkan rasio sebesar 5,3 ($34,42/6,476$), pada kelompok dengan pemberian kurkumin kadar 0,05mM didapatkan rasio sebesar 0,71 ($2,95/4,12$), dan pada kelompok dengan pemberian kurkumin kadar 0,1mM didapatkan rasio sebesar 0,66 ($3,13/4,74$).

Diskusi:

Dari hasil penelitian didapatkan bahwa pemberian kurkumin kadar 0,05mM mampu menurunkan kadar VEGF pada kultur jaringan kanker payudara MCF-7 setelah masa inkubasi selama 72 jam jika dibandingkan dengan kontrol tanpa pemberian kurkumin secara signifikan. Hal ini berbeda dengan hasil yang didapatkan oleh Shao dkk (2002).²¹ Perbedaan yang terjadi pada hasil penelitian ini dengan penelitian Shao dkk dapat disebabkan oleh metode pemeriksaan yang digunakan dalam penelitian. Shao dkk menggunakan teknik Western Blot sedangkan penelitian ini menggunakan teknik ELISA dalam mengukur kadar VEGF pada kultur jaringan kanker payudara. Perbedaan lainnya terdapat pada media kultur yang digunakan, penelitian ini menggunakan RPMI 1640 komplit + FBS10% sebagai medium kultur, sedangkan pada penelitian Shao, medium kultur yang digunakan adalah DMEM. Masa inkubasi juga berbeda pada kedua penelitian ini, Shao dkk melakukan inkubasi selama 48 jam, sedangkan pada

penelitian ini masa inkubasi selama 72 jam. Beberapa perbedaan tersebut di atas memungkinkan terjadinya perbedaan hasil dan kemaknaannya.²¹

Dari hasil penelitian, kelompok sampel dengan pemberian kurkumin kadar 0,1mM pada kultur jaringan kanker payudara MCF-7 memiliki hasil yang bermakna jika dibandingkan dengan kontrol tanpa pemberian kurkumin. Namun, jika kelompok sampel dengan kadar kurkumin 0,1mM ini dibandingkan dengan kelompok sampel dengan pemberian kurkumin kadar 0,05mM, tidak ditemukan perbedaan yang bermakna diantara keduanya. Berdasarkan hasil tersebut, maka dengan pemberian kurkumin kadar 0,05 mM pada kultur jaringan kanker payudara MCF-7 sudah mampu menurunkan kadar VEGF secara bermakna.

Shankar dkk pada penelitiannya juga menggunakan kurkumin dalam berbagai kadar (0,02mM, 0,04mM dan 0,06mM) terhadap kultur jaringan sel kanker prostat PC-3, dan ketiga kadar diatas memberikan hasil yang bermakna.²³ Hasil penelitian ini berupa penurunan jumlah sel kanker payudara MCF-7 diperkuat dengan penelitian Holy tahun 2002, dimana kurkumin terbukti menekan proliferasi sel kanker payudara MCF-7 pada kultur jaringan melalui mekanisme induksi mikronukleasi dan hambatan pada pembelahan mitosis sel kanker.²⁴ Namun dilain pihak, selain dalam proses angiogenesis, VEGF juga memiliki efek non-angiogenik pada kanker payudara. Mercurio dkk (2001) mendapatkan bahwa sel kanker payudara ada yang memiliki sifat ketergantungan terhadap VEGF sebagai faktor untuk bertahan hidup. Berdasarkan penelitiannya, reduksi VEGF sebanyak 50%, secara signifikan meningkatkan apoptosis sel, meskipun dengan pemberian serum dengan kadar 10%. Berkaitan dengan penelitian ini, akibat dari hambatan sekresi VEGF oleh kurkumin terhadap sel kanker payudara MCF-7, maka kemampuan bertahan hidup dari sel kanker tersebut akan berkurang, sehingga akan meningkatkan kematian dari sel. Sehingga secara tidak langsung VEGF yang dihasilkan oleh sel kanker mampu meningkatkan kemampuan sel kanker untuk bertahan hidup dan menjalani siklus kehidupan sel kanker tersebut lebih lanjut.²⁵

VEGF diproduksi oleh sel tumor ganas maupun sel tumor jinak sebagai respon terhadap hipoksia, inflamasi, faktor pertumbuhan, sitokin dan sel tumor ganas akibat kelainan genetik.²⁶ Ekspresi VEGF diregulasi oleh sejumlah stimulus meliputi berbagai faktor pertumbuhan, sitokin, hormon, tidak berfungsinya p53, aktivasi onkogen RAS dan SRC dan pada kanker payudara adalah ekspresi berlebih dari HER2.²⁷ Gen *HER2*, teramplifikasi sebesar 20% dari kanker payudara. Gen *HER2* mengaktifkan jalur sinyal seluler multipel yang terlibat dalam proliferasi dan waktu hidup sel, dan juga meregulasi VEGF pada tingkat molekuler.²⁷

Penurunan kadar VEGF pada kultur jaringan kanker payudara dapat terjadi melalui berbagai mekanisme. Mekanisme yang pertama dapat terjadi melalui proses hambatan terhadap aktifitas gen *HER2*. Pada kanker payudara, peningkatan ekspresi gen *HER2* berperan besar pada perkembangan sel kanker payudara. Ekspresi yang berlebih dari gen *HER2* ini dapat berakibat peningkatan jumlah sel kanker payudara dan memburuknya prognosis. Kurkumin mampu menekan ekspresi gen *HER2*. Jika ekspresi gen *HER2* dihambat maka jalur aktivasi sinyal seluler yang menginduksi ekspresi Ras-ERK dan Phospatidilinositol-3 Kinase (PI3K) akan dihambat. Hambatan terhadap ekspresi Ras-ERK 1 / 2

mengakibatkan faktor transkripsi SP1 dan *co promotor* CBP,p300 tidak dapat mengaktifkan transkripsi VEGF melalui proses fosforilasi.^{28,29} Sedangkan hambatan terhadap PI3K akan menekan aktivasi jalur protein kinase B sehingga translasi mRNA VEGF tidak terjadi dan VEGF tidak dihasilkan. Aktivitas PI3K dan protein kinase B tidak hanya diaktifkan oleh gen HER2, keadaan hipoksia juga dapat mengaktifasi PI3K dan mengaktifkan jalur protein kinase B. Secara langsung kurkumin juga dapat menghambat aktifitas protein kinase B.

Selain hambatan terhadap gen HER2, kurkumin juga dapat menghambat aktifitas HIF1A. *Hypoxia inducible factor 1a (HIF1A)* adalah kunci utama terjadinya respon seluler akibat keadaan hipoksia. Hipoksia merupakan salah satu faktor penting yang menginduksi ekspresi mRNA VEGF dan hal ini merupakan karakteristik dari sel kanker payudara. Induksi transkripsi mRNA VEGF akibat hipoksia diperantarai oleh ikatan yang terjadi antara *hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)* dengan situs pengikatan HIF-1 yang terdapat pada promotor VEGF. HIF1A yang teraktivasi akan bertranslokasi ke dalam inti sel dan berikatan dengan *hypoxia-response element (HRE)* yang memiliki sekuens inti 5'-A/TCGTG-3', sebagai promotor VEGF, akhirnya mengaktifasi proses transkripsi. Namun hal ini dapat dihambat oleh kurkumin.^{12,28,29}

Sama halnya dengan situs transkripsi HIF-1, regio promotor VEGF memiliki beberapa faktor transkripsi potensial seperti AP-1, AP-2, Egr-1, Sp-1 dan lainnya yang juga turut terlibat dalam regulasi transkripsi VEGF.^{12,30} Faktor transkripsi Sp1 yang berfungsi pada jalur ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) akan meningkatkan regulasi transkripsi VEGF melalui reaksi fosforilasi. Pengaturan ini tidak terikat dengan keadaan stress akibat hipoksia pada sel kanker. Kurkumin juga mampu menghambat faktor transkripsi AP-1, AP-2, Egr-1, Sp-1. Jika faktor transkripsi ini tidak diaktifkan, maka reaksi fosforilasi proses transkripsi VEGF tidak dapat berlangsung, dan VEGF tidak akan dihasilkan. Kemampuan dari *stress-activated kinase p38* juga dapat dihambat oleh molekul kurkumin, sehingga proses translasi VEGF tanpa adanya sintesis mRNA VEGF yang baru tidak dapat berlangsung.

Kesimpulan

Kurkumin kadar 0,05mM dan 0,1mM dapat menurunkan kadar VEGF pada kultur jaringan kanker payudara MCF-7. Kurkumin kadar 0,05mM dan 0,1mM dapat menghambat proliferasi sel yang diikuti dengan penurunan kadar total VEGF pada kultur jaringan kanker payudara MCF-7.

Daftar Pustaka

1. Factsheet mortality rate. World Health Organization. 2007 [diunduh dari 2007 Oktober 3]. tersedia di <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/index>
2. Deteksi dini kanker serviks dan kanker payudara. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008 [diunduh 2009 Mei 27]. Tersedia di <http://www.depkes.go.id/in/2104ea.html>
3. Freund A, Chauveau C, Brouillet JP, Lucas A, Lacroix M, Licznar A, et al. IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells. *Oncogene* 2003;22(2):256.

4. Singh TT. Breast cancer management: present scenario. *Med J Indones* 2007;16:55-60.
5. Siswono. Kanker Payudara bisa dideteksi sendiri. Kompas 9 Januari 2002.
6. Kanker payudara. diunduh dari <http://www.tempo.co.id/medika/arsip/052002>
7. Tjindarbumi D, Mangunkusumo R. Cancer in Indonesia, present and future. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32(Suppl 1):17.
8. Rahmawati E, Dewoto HR, Wuyung PE. Anticancer activity study of ethanol extract of Mahkota dewa fruit pulp (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.)Boerl.) in C3H mouse mammary tumor induced by transplantation. *Med J Indones* 2006;15:217-22.
9. Muthalib A, Darwis I, Prayogo N, Sutjipto. First-line chemotherapy of advanced or metastatic breast cancer (MBC) with docetaxel and doxorubicin in Indonesia: results from A phase II trial. *Med J Indones* 2004;14:20-5.
10. Kusumobroto BS, Purwanto H, Hasnawati, Brahim R, Hartono B, et al, editors. Profil kesehatan Indonesia 2007. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2008.
11. Bando H. Vascular endothelial growth factor and Bevacitumab in breast cancer. *Breast Cancer*. 2007;14:163-73.
12. Banarjee S, Dowsett M, Ashworth A, Ann Martin L. Mechanisms of disease: angiogenesis and the management of breast cancer. *Nature* 2007;4:536-50.
13. Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*.
14. Liekens S, Clereq ED, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacology*. 2001;61:253-70.
15. Schindler R, Mentlein R. Flavonoids and vitamin E reduce the release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor from human tumor cells. *J.Nutr* 2006;136:1477-82.
16. Potential angiogenic role of platelet activating factor in human breast cancer. *Am J of Pathology*. 1998;153:1589.
17. Risau, W. Mechanism of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-4.
18. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara A B, Aggarwal B B. Curcumin and cancer: An "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer letters* 2008;267:133-54
19. Binion DG, Otterson MF, Rafiee P. Curcumin inhibits VEGF-mediated angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 and MAPK inhibition. *Gut* 2008;57:1509-16.
20. Adams BK, Ferstl EM, Davis MC, Herold M, Kurtkaya S, Camalier RF, et al. Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents. *Bioorg.Med.Chem* 2004;12:3871-83.
21. Shao Z-M, Shen Z-Z, Liu C-H, Sartippour MR, Go VL, Heber D, Nguyen M. Curcumin exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Int J Cancer* 2002;98:234-40.
22. Somers-Edgar TJ, Scandlyn MJ, Stuart EC, Le Nedelec MJ, Valentine S. The combination of epigallocatechin gallate and curcumin suppresses ER α -breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* 2008;122:1966-71.
23. Shankar S, Chen Q, Sarva K, Siddiqui I, Srivastava RK. Curcumin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells: molecular

- mechanisms of apoptosis, migration and angiogenesis. *Journal of Molecular Signaling* 2007;2(10):1-14.
24. Holy JM. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells. *Mutation Research* 2002;518:82.
 25. Mercurio AM, Lipscomb EA, Bachelder RE. Non-Angiogenic Functions of VEGF in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*:2005(10):283-90.
 26. Bando H. Vascular endothelial growth factor and Bevacitumab in breast cancer. *Breast Cancer*. 2007;14:163-73.
 27. Banarjee S, Dowsett M, Ashworth A, Ann Martin L. Mechanisms of disease: angiogenesis and the management of breast cancer. *Nature* 2007;4:536-50.
 28. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology* 2008;75:787-809.
 29. Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Letters* 2008;269:199-225.
 30. Lee TH, Seng S, Sekine M, Hinton C, Fu Y, Avraham HK, Avraham S. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *Plos Med* 2007;4(6):1101-14.

