

LAPORAN AKHIR
Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (M)



**KOMBINASI TERAPI *CURCUMIN* DENGAN VITAMIN E SEBAGAI PRODUK
HERBAL PENUNJANG PENGOBATAN KANKER MAMMAE PADA TIKUS
(*Rattus norvegicus*) MODEL KANKER MAMMAE
Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun**

TIM PENGUSUL

Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc.	0011075807 (Ketua Peneliti)
Dyah Ayu Oktavianie, drh., M. Biotech.	0026108401 (Anggota)
Dr. Dra. Herawati, MP.	0027015809 (Anggota)
drh. Aulia Firmawati, M.Vet.	0006058501 (Anggota)

Dibiayai oleh:
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi,
Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, Melalui DIPA Universitas Brawijaya
Nomor : DIPA-023.04.2.414989/2013, Tanggal 5 Desember 2012, dan berdasarkan
SK Rektor Universitas Brawijaya Nomor : 295/SK/2013 tanggal 12 Juni 2013

UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DESEMBER 2013

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Kombinasi Terapi *Curcumin* Dengan Vitamin E Sebagai Produk Herbal Penunjang Pengobatan Kanker Mammae Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Kanker Mammae

Peneliti / Pelaksana

Nama Lengkap : Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc
NIDN : 0011075807
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Kimia
Nomor HP : 083834791000
Alamat surel (e-mail) : aroos@ub.ac.id

Anggota Peneliti (1)

Nama Lengkap : drh. Dyah Ayu Oktavianie, M.Biotech
NIDN : 0026108401
Perguruan Tinggi Anggota : Universitas Brawjaya

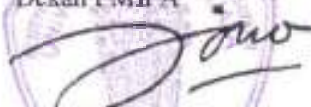
Anggota Peneliti (2)

Nama Lengkap : Dr. Dra. Herawati, MP
NIDN : 0027015809
Perguruan Tinggi Anggota : Universitas Brawjaya

Anggota Peneliti (3)

Nama Lengkap : drh. Aulia Firmawati, M.Vet
NIDN : 0006058501
Perguruan Tinggi : Universitas Brawjaya
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp. 95.000.000,-

Malang, 16 Desember 2013
Ketua,

Mengetahui,
Dekan FMIPA

(Prof. Dr. Marjono, M.Phil)
NIP. 196211164983031004


(Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc.)
NIP. 195807111992032002

Mengetahui,
Bj. Ketua LPPM UB,

(Prof. Dr. Siti Chuzaemi, MS.)
NIP. 19530514 198002 2 001

Biaya Keseluruhan

: Rp. 290.500.000,00

ABSTRAK

Kanker mammae pada hewan peliharaan telah dilaporkan sebagai salah satu dari 3 jenis kanker yang paling sering menyerang kucing, terutama kucing betina. Usaha untuk meminimalisir kanker pada hewan yang secara umum dilakukan adalah dengan memberikan terapi bedah dengan eliminasi nodul kanker. Pengobatan atau pencegahan melalui bahan additif atau suplementasi herbal, masih jarang digunakan dan dilaporkan hasil ilmiahnya. Di sisi lain, pengobatan herbal semakin populer digunakan untuk terapi dikarenakan obat-obatan herbal tidak mempunyai efek samping yang berarti dibandingkan dengan penggunaan obat-obatan. Salah satu obat herbal tradisional yang dapat digunakan untuk mengobati kanker adalah *curcumin* yang merupakan bahan aktif yang diekstraksi dari *Curcuma longa* dengan aktivitas biologi diantaranya sebagai kemopreventif.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi kombinasi *curcumin* dengan vitamin E sebagai alternatif pengobatan herbal untuk kanker pada tikus (*Rattus norvegicus*) model kanker yang diinduksi dengan DMBA, yang dilihat dari kadar VEGF dalam darah, ekspresi marker gen kanker. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar pembuatan produk berbasis kombinasi *curcumin* dengan vitamin E sebagai alternatif pengobatan kanker terutama pada hewan peliharaan.

Metode yang digunakan dalam penelitian tahun pertama ini terdiri dari tiga tahapan, yaitu: (1) Pembuatan hewan model kanker mammae yang diinduksi DMBA, (2) Eksplorasi dosis dan penentuan dosis efektif terapi kombinasi *curcumin* dengan vitamin E pada tikus model kanker mammae, (3) Pengamatan pengaruh terapi kombinasi *curcumin* dengan vitamin E pada tikus model kanker mammae terhadap ekspresi VEGF, p53, BCL-2 dan ICAM-1.

Hasil penelitian menunjukkan induksi DMBA menyebabkan peningkatan kadar estrogen, progesterone dan VEGF pada serum tikus model kanker mammae yang diinduksi DMBA *multiple low dose* sebanyak 10 mg/kg BB. Induksi DMBA akan menyebabkan penurunan ekspresi marker gen p53 dan BCL-2 dan peningkatan ekspresi ICAM-1. Pemberian terapi secara kuratif menggunakan kombinasi *curcumin* dan vitamin E dengan beberapa variasi dosis pada tikus model kanker mammae hasil induksi DMBA 10 mg/kg BB, mampu menurunkan kadar hormone estrogen dan progesteron pada serum, namun belum mampu menurunkan kadar VEGF dalam darah.

Kata kunci : kanker mammae, DMBA, *curcumin*, vitamin E, terapi herbal

ABSTRACT

Mammary cancer in pet animals has been reported as one of three types of cancer which most often affects cats, especially female cat. Efforts to minimize cancer in animals is generally done by providing surgical treatment to eliminate the cancer nodules. Treatment or prevention materials through additive or herbal supplementation, is still rarely used and has not been widely reported. On the other hand, the more popular herbal medicine used for treatment because herbal medicines have no side effects at all compared to the use of synthetic drugs. One of the traditional herbal medicine that can be used for cancer therapy is curcumin, which is the active ingredient of *Curcuma longa* extracted, that has been known to have biological activity such as chemopreventive effects.

This study aims to determine the potency of the combination of curcumin with vitamin E as an alternative herbal treatment for cancer in rats (*Rattus norvegicus*) model of cancer induced by DMBA. The results of the study were analyzed through hormonal levels, the levels of VEGF in the serum and the expression of p53, BCL-2, and ICAM-1, respectively. The results of the study can be used as a basis for the development of herbal therapy products based on a combination of curcumin with vitamin E, as an alternative cancer treatment especially in pets.

This study is conducted in three stages (1) Preparation of animal model of DMBA-induced mammary cancer, (2) Exploration of the therapeutically effective dose of the combination of curcumin with vitamin E in mice models of breast cancer, (3) Observation of the effect of combination therapy of curcumin with vitamin E in mice models of breast cancer on the hormonal and VEGF levels and expression of p53, BCL-2 and ICAM-1.

The results showed that induction of multiple low dose DMBA as much as 10 mg/kg in animal models led to increased levels of estrogen, progesterone and VEGF in serum. DMBA induction will lead to a decrease in the expression of marker genes p53 and BCL-2, and increase expression of ICAM-1. Administration of curative therapy using a combination of curcumin and vitamin E with some variation of dose in animal models of breast cancer induced by DMBA 10 mg/kg, was able to reduce levels of estrogen and progesterone hormones in serum, but have not been able to reduce levels of VEGF in the blood.

Keywords: breast cancer, DMBA, curcumin, vitamin E, herbal therapy

RINGKASAN

Kanker merupakan penyakit degeneratif yang banyak menyerang pada manusia maupun hewan peliharaan, khususnya kucing dan anjing. Kanker mammae pada kucing telah dilaporkan sebagai salah satu dari 3 jenis kanker yang paling sering menyerang kucing, terutama kucing betina dan terus berkembang hingga saat ini (Ferrari *et al.*, 2012). Kejadian kanker, terutama kanker mammae pada hewan peliharaan sering terjadi akibat adanya penggunaan kontrasepsi dan ovariohisterotomi. Pada anjing, tingkat kejadiannya relatif lebih rendah bila dibandingkan dengan kucing. Perkembangan penelitian melaporkan bahwa target gen kanker mammae pada manusia juga ditemukan pada kucing. Beberapa gen yang diketahui merupakan marker gen kanker adalah p53, BCL-2, ICAM-1 dan HER-2. Gen p53 yang merupakan tumor suppressor gen dan BCL-2 yang merupakan gen pengendali apoptosis merupakan elemen pengendali kanker, dimana penurunan ekspresi gen p53 dan BCL-2 berkorelasi dengan perkembangan dan metastasis kanker. Sedangkan overekspresi dari ICAM-1 dan HER-2 dapat menstimulasi peningkatan proliferasi sel yang memicu motilitas, invasi dan metastasis sel kanker. Stimulasi terjadinya kanker juga dapat dilihat dari ekspresi VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) sebagai stimulan proses angiogenesis pada pembentukan kanker. Mutasi pada tingkat genetik pada marker gen kanker diketahui dapat menstimulasi perkembangan terjadinya kanker mammae (Aviva System Biology, 2012).

Usaha untuk meminimalisir kanker pada hewan yang umum dilakukan adalah dengan terapi bedah untuk eliminasi nodul kanker (Ferrari *et al.*, 2012). Pengobatan atau pencegahan melalui bahan additif atau suplementasi herbal masih jarang digunakan dan dilaporkan hasil ilmiahnya. Di sisi lain, pengobatan herbal semakin populer digunakan untuk terapi dikarenakan obat-obatan herbal tidak mempunyai efek samping yang berarti dibandingkan dengan penggunaan obat-obatan. Beberapa penelitian melaporkan bahwa obat herbal mempunyai potensi untuk terapi karsinoma atau kanker (Pari, 2008). Salah satu obat herbal tradisional yang dapat digunakan untuk mengobati kanker adalah *curcumin* yang merupakan bahan aktif yang diekstraksi dari *Curcuma longa*. *Curcumin* merupakan pigmen kuning alami *turmeric*. *Curcumin* merupakan senyawa polifenol yang terdapat dalam rimpang kunyit (*Curcuma longa* L.) dengan aktivitas biologi sebagai antioksidan, antiinflamasi, kemopreventif dan kemoterapi (Pari, 2008). *Curcumin* diketahui memiliki aktivitas sebagai antikanker, antimutagenik, antikoagulan, antifertilitas, antidiabetes, antibakteri, antijamur, antiprotozoa, antivirus, dan antifibrosis (Wiesser *et al.*, 2007). Aktivitas antikanker *curcumin* dilaporkan berhubungan dengan aktivitasnya sebagai antioksidan dan penangkap radikal bebas (*radical scavenger*) (Sandur *et al.*, 2005). Joe *et al.*, (2004), menetapkan *curcumin* sebagai *broad spectrum anti cancer agent* dan menyatakan *curcumin* sebagai bahan yang berpotensi sebagai pencegah dan terapi kanker, dimana dapat menekan inisiasi tumor, promotion, dan metastasis.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi kombinasi *curcumin* dengan vitamin E sebagai alternatif pengobatan herbal untuk kanker pada tikus (*Rattus norvegicus*) model kanker yang diinduksi dengan DMBA, yang dilihat dari kadar VEGF dalam darah, ekspresi marker gen kanker. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar pembuatan produk berbasis kombinasi *curcumin* dengan vitamin E sebagai alternatif pengobatan kanker terutama pada hewan peliharaan.

Metode yang digunakan dalam penelitian tahun pertama ini terdiri dari tiga tahapan, yaitu: (1) Pembuatan hewan model kanker mammae yang diinduksi DMBA, (2) Eksplorasi dosis dan penentuan dosis efektif terapi kombinasi *curcumin* dengan vitamin E pada tikus model kanker mammae, (3) Pengamatan pengaruh terapi kombinasi *curcumin* dengan vitamin E pada tikus model kanker mammae terhadap ekspresi VEGF, p53, BCL-2 dan ICAM-1.

Hasil penelitian menunjukkan induksi DMBA pada hewan model menyebabkan peningkatan kadar estrogen, progesterone dan VEGF pada serum tikus model kanker mammae yang diinduksi DMBA *multiple low dose* sebanyak 10 mg/kg BB. Induksi DMBA akan menyebabkan penurunan ekspresi marker gen p53 dan BCL-2 dan peningkatan ekspresi ICAM-1. Pemberian terapi secara kuratif menggunakan kombinasi *curcumin* dan vitamin E dengan beberapa variasi dosis pada tikus model kanker mammae hasil induksi DMBA 10 mg/kg BB, mampu menurunkan kadar hormone estrogen dan progesteron pada serum, namun belum mampu menurunkan kadar VEGF dalam darah.

SUMMARY

Cancer is a degenerative disease that is common in humans and pets, especially cats and dogs. Mammary cancer in cats has been reported as one of three types of cancer most often affects cats, especially female cats (Ferrari *et al.*, 2012). The incidence of cancer, especially breast cancer in pets is often as the result of contraceptive use and ovariectomy. In dogs, the rate of incidence is relatively lower when compared to cats. The study development reported that the target gene of breast cancer in humans are also found in cats. Several genes that are known as cancer marker genes are p53, BCL-2, ICAM-1 and HER-2. p53 as a tumor suppressor gene and BCL-2 as regulator apoptosis gene are the cancer control element, wherein a decrease in gene expression of p53 and BCL-2 correlates with the progression and metastasis of cancer. Whereas overexpression of ICAM-1 and HER - 2 can stimulate an increase in cell proliferation triggered motility, invasion and metastasis of cancer cells. Stimulation of cancer can also be seen from the expression of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) as a stimulant of angiogenesis process in cancer formation. Mutations at the genetic level in cancer markers gene known to stimulate the growth of breast cancer (Aviva Systems Biology, 2012).

Several efforts to minimize cancer in animals was commonly done with surgical therapy for elimination of cancer nodules (Ferrari *et al.*, 2012). Treatment or prevention through herbal supplementation is rarely used and has not been reported. On the other hand, the more popular herbal medicine used for treatment because herbal medicines have no side effects at all compared to the use of synthetic drugs. Several studies have reported that herbal medicine has the potential to carcinoma or cancer therapy (Pari, 2008). One of the traditional herbal medicine that can be used to treat cancer is curcumin that is the active ingredient of *Curcuma longa* extracted. Curcumin is a natural yellow pigment turmeric. Curcumin is a polyphenolic compound found in turmeric (*Curcuma longa L.*) which has biological activity as an antioxidant, anti-inflammatory, chemopreventive and chemotherapeutic (Pari, 2008). Curcumin was also known to have activity as anticancer, antimutagenic, anticoagulant, antifertility, antidiabetic, antibacterial, antifungal, antiprotozoa, antiviral and antifibrosis (Wiesser *et al.*, 2007). Anticancer activity of curcumin reported to be associated with its activities as an antioxidant and free radical catcher (radical scavenger) (Sandur *et al.*, 2005) . According to Joe *et al.* (2004), curcumin is a broad-spectrum anti-cancer agent and declare curcumin as a potential material for the prevention and treatment of cancer, which can suppress tumor initiation, promotion and metastasis.

This study aims to determine the potency of the combination of curcumin with vitamin E as an alternative herbal treatment for rats (*Rattus norvegicus*) model of cancer induced by DMBA, which is

seen in the levels of estrogen, progesteron and VEGF in the blood and cancer marker genes expression throught immunohistochemistry. The results of this study can be used as a basis for the development of alternative herbal therapy based on a combination of curcumin with vitamin E as an alternative cancer treatment, especially in pets.

This study is conducted in three stages (1) Preparation of animal model of DMBA-induced mammary cancer, (2) Exploration of the therapeutically effective dose of the combination of curcumin with vitamin E in mice models of breast cancer, (3) Observation of the effect of combination therapy of curcumin with vitamin E in mice models of breast cancer on the hormonal and VEGF levels and expression of p53, BCL-2 and ICAM-1.

The results showed that induction of multiple low dose DMBA as much as 10 mg/kg in animal models led to increased levels of estrogen, progesterone and VEGF in serum. DMBA induction will lead to a decrease in the expression of marker genes p53 and BCL-2, and increase expression of ICAM-1. Administration of curative therapy using a combination of curcumin and vitamin E with some variation of dose in animal models of breast cancer induced by DMBA 10 mg/kg, was able to reduce levels of estrogen and progesterone hormones in serum, but have not been able to reduce levels of VEGF in the blood.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, LE, Loscher, W. *Breast Cancer*. Di dalam: Loscher E *et al*, editor. Prosiding Epidemiology Findings. April 1998. The National Institute of Environmental Health Sciences.
- Aviva System Biology. 2012. *Pathways in Cancer*. <http://www.avivasysbio.com> [diakses tanggal 11 Maret 2013]
- Ferrari, A., C. Petterino, A. Ratto, C. Campanella, R. Wurth, S. Thellung, G. Vito, F. Barbieri, and T. Florio. 2012. *CXCR4 Expression in Feline Mammary Carcinoma Cells : Evidence Proliferative Role For The SDF-1/CXCR4 Axis*. BMC Veterinary Research 8:27. <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/27> [diakses tanggal 11 Maret 2013]
- Firdaus, 2011. Model Kanker Mammae. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hahn DB, Payne WA. 2003. *Focus on Health*. New York: Mc-Graww Hill.
- Hakkak. 2005. Obesity promotes 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor development in female zucker rats. *Breast Canc Res* 7: 627-633.
- Jerry DJ. 2007. Roles for estrogen and progesterone in breast cancer prevention. *Breast Canc Res* 9:102.

- Joe B, Vijaykumar M, Lokes RB.2004. *Biological properties of curcumin -cellular and molecular mechanisms of action*.Critical review in food science and nutrition, 44: 97-111.
- Kusminarto. 2005. *Deteksi Sangat Dini Kanker Payudara*.
<http://www.kompas.com/kompascetak/0604/17/ilpeng/2574858.htm> [Maret 2013]
- Lenoir V. 2005. Preventive and curative effect of melatonin on mammary carcinogenesis induced by dimethylbenz[a]anthracene in the female Sprague-Dawley rat. *Breast Canc Res* 7: 470-476.
- Lewis R. 2003. *Human Genetics: Concepts and Application*. New York: McGraw-Hill.
- Medina D and Kittrell FS. 2003. p35 function is required for hormone-mediated protein of mouse mamary tumorigenesis. *Canc Res* 63: 6140-6143.
- Meiyanto E, Susilowati S, Tasminatun S, Murwanti R, Sugiyanto. 2007. Efek kemopreventif ekstrak etanolik *Gynura procumbens* (Lour.), Merr pada karsinogenesis kanker payudara tikus. *Majal Farm Ind* 154–161 (18[3]).
- Motoyama, J. 2008. Hyperthermic treatment of DMBA-induced rat mammary cancer using magnetic nanoparticles. *Bio Mag Res Tech* 6:2.
- Nurrochmad,A. 2004. *Review: Paradigma Baru Curcumin dan Aktifitasnya Sebagai Anti Kanker*. *J.Biofarmasi* 2 (2): 75-80. ISSN: 1693-2242
- Pari, L. 2008. *Role of curcumin in health and disease*.<http://curcumin.tumeric.org>. [diakses tanggal: 13 Maret 2013]
- Sandur SK, Pandey MK, Sung B .2007. *Curcumin , bisdemethoxycurcumin , tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative respons through ROS-independent mechanism*. *Carcinogenesis* vol 28 no.7 pp. 1765-1773.
- Sardjiman., M.R. Samhoedi, L. Hakim, H. van der Goot, H. Timmerman. 1997. 1,5-ipheryl-1-4pentadiene-3-ones and cyclic analogues as antioxidative agents. Synthesis and structureactivity relationships. *In:Pramono, S., U.A. Jenie, S.S. Retno, and G. Didik (eds.). Proceedings of the International Symposiumon Curcumin Pharmacochemistry (ISCP)*, 175-185.
- Sharma R.A, Gescher A.J, Steward W.P. 2005. *Curcumin the story so far*, *European Journal of cancer* 41, 1955-1968.
- Walerych, D., M. Napoli, L. Collavin, and G. De Sal. 2012. The Rebel Angel : Mutant p53 as The Driving Oncogene In Breast Cancer. *Oxford Journal Carcinogenesis Vol 33 (11): 2007 – 2017*.
<http://www.oxfordjournals.com> [diakses tanggal 12 Maret 2013]
- Warren BS et al. 2002. Phytoestrogen and breast cancer. <http://www.envirocancer.cornell.edu> [20 Maret 2013]
- Wieser F, Cohen M, Gaeddert A .2007. *Evolution of medical treatment for endometriosis: back to the roots?*.*Human Reproduction Update*, Vol 13, No.5 pp487-499.
- Wieser F, Vigne J L, Ryan I, Hornung D, Djalali S, Taylor R N.2005.*Sulindac Suppressed Nuclear Factor-κB Activation and RANTES gene and Protein Expression in Endometrial Stromal Cells from Women with Endometriosis*. *The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(12):6441-6447.