

Pengaruh Ekstrak Akar *Taraxacum officinale* (Dandelion) dalam Mengaktifkan Gen Retenoid Acid Reseptor β_2 untuk Menekan Pertumbuhan Kanker Payudara Melalui Proses Demetilasi sehingga Menginduksi Proses Apoptosis

MULIARTHA, WIBI IRAWAN, FITRI ARMENIA, ASNAH

Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Diterima tanggal, 13 Desember 2010, Direview 10 Januari 2011, Disetujui 23 Februari 2011

ABSTRACT

*The breast cancer is the most tumor malignant lead second cause of death among the female. Diagnostic and therapy of the breast cancer are developed. The aim of the research to prove that the pathogenesis of the breast cancer is the epigenetic concept. Design of the research are descriptive survey and true experimental descriptive post test only control group design in vitro. This research use PCR technique, Immunohistochemistry, Chromogenic In Situ Hibridisasi and Tunnel technique. The result and conclusion that on the breast cancer shown lost of band on 1000 Bp until 1900 Bp. Both sample shown DNA metilation promotor RAR β_2 on band 550 bp. To test of containing retinoid acid on root and leave *Taraxacum officinale* used HPLC shown Rf 0,9059; 0,8941. To show the role of extract *Taraxacum officinale* to suppressed breast cancer growth on the both sample shown expression of mRNA RAR β_2 through apoptotic process.*

Keyword : *Taraxacum officinale, Demetilation DNA, Expressi RAR β_2 , breast cancer.*

ABSTRAK

Saat ini, kanker payudara merupakan penyebab kedua kematian tertinggi pada wanita. Diagnostik serta pengobatan penyakit kanker berkembang cepat. Teori diagnostik dan terapi masih menggunakan konsep genetik, teori epigenetik belum banyak diungkap. Tujuan penelitian ini mengungkap peran teori epigenetik pada mekanisme terjadinya kanker payudara, serta alternatif pengobatannya. Desain rancangan penelitian survei deskriptif dan eksperimental murni deskriptif *post test only control group design in vitro*. Penelitian ini menggunakan teknik PCR, Immunohistokimia, Chromogenic In Situ Hibridisasi, dan Tunnel. Hasil dan kesimpulan: penelitian awal menunjukkan pada kanker payudara terjadi hilangnya RAR β_2 pada pita 1000 Bp sampai 1900 Bp pula terjadi proses DNA metilasi promotor RAR β_2 dengan pita sebesar 550 Bp. Uji kandungan retinoid acid akar dan daun *Taraxacum officinale* didapatkan Rf 0,9059; 0,8941. Penambahan ekstrak akar *Taraxacum officinale* pada sel kanker payudara terjadi ekspresi mRNA RAR β_2 pada kedua sampel sebagai proses demetilasi, sehingga terjadi penurunan pertumbuhan kedua sel kanker payudara melalui proses apoptosis.

Kata kunci : *Taraxacum officinale, Demetilasi DNA, Expressi RAR β_2 , kanker payudara.*

KORSPONDENSI:

DR. Dr. I Ketut Muliarta,
Sp PA.

Jl. Danau Ranau 67B
No. 6, Malang.

PENDAHULUAN

Kanker payudara menjadi penyebab kedua kematian pada wanita sampai saat ini. Kemajuan pengobatan dan diagnosis kanker payudara sampai saat ini sangat pesat. Teori tentang peranan gen P 53 dan PRb sudah banyak diungkap, tetapi pendekatan gen reseptor retinoid acid β_2 sebagai tumor supresor gen belum banyak diungkap dan hilangnya aktivitas gen

reseptor retinoid acid β_2 disebabkan oleh banyak faktor, di antaranya adalah modifikasi epigenetik teori dan hilangnya heterogenitas reseptor retinoid acid yang juga disebut sebagai *silence gen supresor*.²²

Penulisan ini bertujuan untuk mengungkap masalah tersebut. Untuk membuktikan hal tersebut, kami merujuk pada penelitian Gote *et. al*, 1998, yang menyatakan mendukung pernyataan bahwa pada kanker payudara terjadi proses metilasi gen RAR β_2 sehingga menyebabkan penurunan tipis ekspresi gen RAR β_2 yang disebut sebagai proses *epigenetic silencing* yang terjadi pada promotor gen RAR β_2 .^{10,19}

Taraxacum officinale atau dandelion, adalah tumbuhan yang sering ditemui di Indonesia, di jalan-jalan, di pinggir kali, di padang rumput, dan mudah tumbuh di seluruh dunia. Tumbuhan ini khususnya tumbuh di daerah terbuka. Khasiat dari tumbuhan ini sangat berguna secara medis karena mempunyai kandungan vitamin A yang sangat tinggi, hampir mencapai 14.000 international unit dalam 100 gram, sedangkan yang lain kandungannya tidak sebesar *Taraxacum officinale*.²

Vitamin A ada 3 bentuk, antara lain Retinol (vitamin A alkohol), retine (vitamin A Aldehyde), dan retinoid acid. Retinoid acid tidak hanya berperan pada proses visual, tetapi lebih banyak berperan pada proses pertumbuhan dan epitelisasi. Namun, hanya sedikit peneliti yang mengungkap masalah ini. Kandungan vitamin A yang sangat tinggi dapat menjadi alternatif pemikiran untuk mempergunakan kandungan retinoid yang ada pada vitamin A untuk mengaktifkan reseptor retinoid β_2 sehingga terjadi peningkatan ekspresi RAR β_2 yang disebabkan oleh proses demetilasi, yaitu ekspresi mRNA RAR β_2 yang berguna untuk terjadinya penghambatan pertumbuhan kanker payudara.^{3, 23}

Adapun maksud dan tujuan penelitian ini adalah membuktikan bahwa pada kanker payudara terjadi penurunan RAR β_2 . Juga untuk membuktikan menurunnya gen RAR β_2 yang disebabkan oleh terjadinya proses metilasi pada gen RAR β_2 promotor. Tulisan ini ingin membuktikan bahwa pemberian ekstrak akar *Taraxacum officinale* dapat menyebabkan terjadinya demetilasi gen RAR β_2 sehingga terjadi aktivasi gen mRNA RAR β_2 dan proses apoptosis yang berakibat pada penurunan pertumbuhan sel kanker payudara.^{2,6}

Diharapkan hasil tulisan ini akan dapat memberikan manfaat dengan membuka peluang penggunaan khasiat Herbal alam Indonesia sebagai terapi dan pencegahan kanker payudara melalui pendekatan epigenetik dengan mengamati terjadinya ekspresi gen RAR β_2 . Tulisan ini secara tidak langsung menghasilkan teori tentang patomekanisme kanker payudara berdasarkan teori epigenetik melalui mekanisme *silencing*.

Konsep Umum Karsinogenesis

Proses karsinogenesis melalui beberapa tahap, yaitu dimulai dari inisiasi, promosi, progresi, sampai terjadi *invasive* dan metastasis. Dalam keadaan normal, pertumbuhan dan diferensiasi sel diatur oleh protoonkogen (*growth promoting gens*) yang berperan dalam berbagai aspek proliferasi dan diferensiasi sel, di antaranya gen ras, myc, c-erb. Di lain pihak, pertumbuhan itu dikendalikan secara ketat oleh antionkogen (*tumor suppressor gens*), P53, dan beberapa gen lain yang berfungsi menghambat pertumbuhan. Selain kontrol protoonkogen dan anti-onkogen, sel dikendalikan pula oleh mekanisme kematian sel terprogram (apoptosis), yaitu bertujuan menyingkirkan sel-sel yang sudah tidak dikehendaki.⁵

Dalam penelitian dalam biologi molekuler, para peneliti telah banyak mengungkapkan bahwa terjadinya mutasi atau aktivitas onkogen secara berlebihan dan atau inaktivasi maupun mutasi gen supresor dapat menyebabkan proliferasi sel secara tak terkendali, satu atau lebih untaian DNA bertambah (*amplifikasi*) atau hilang atau translokasi resiprokal maupun nonresiprokal sehingga terjadi rekombinasi DNA yang salah. Mutasi gen ini menyebabkan sel berfungsi abnormal.^{11,21}

Proses karsinogenesis berlangsung melalui beberapa tahap. Tahap awal adalah proses inisiasi, yaitu proses yang melibatkan sel target oleh rangsangan karsinogen yang menyebabkan pertumbuhan gen yang ireversibel. Sel yang terinisiasi belum dapat dideteksi sebelum terjadi perubahan fenotip. Proses yang kedua adalah proses promosi, misalnya seseorang yang terus menerus merokok atau terjadi infeksi virus kronis. Selanjutnya, proses progresi yaitu dengan terjadinya pengaktifan mutasi dari onkogen atau inaktivasi mutasi dari *tumor suppressor gen*. sedangkan kelompok gen tumor supresor antara lain adalah gen P 53, gen Prb. *Taraxacum officinale* adalah tumbuhan yang sering dijumpai di seluruh dunia, khususnya di padang-padang rumput maupun tanah terbuka. Komposisi yang berguna secara medis dari tumbuhan ini antara lain kandungan *inuulin*, *taraxasterol*, *taraxacin*, kandungan vitamin A yang tinggi (14.000 IU/100g), dan lain sebagainya.^{2,17}

Laporan penelitian Takasaki M. Konoshima T, 1999 mengatakan bahwa ekstrak *Taraxacum (compisitae)* mempunyai efek antitumor yang kuat pada dua stadium karsinogenesis pada tumor kulit mencit yang diinduksi dengan dimethylbenz[a] anthracene (DMBA) sebagai inisiator dan 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) sebagai promotor. Selanjutnya juga dijelaskan bahwa 11 triterpenoids dari akar *taraxacum japonicum* telah diuji efek inhibisinya pada tumor yang diinduksi dengan antigen EBV sebagai promotor pada kultur sel Raji.²⁶

Koo menyatakan hasil penelitiannya dan menyebutkan bahwa *Taraxacum officinale* (TO) mampu menurunkan

viabilitas sel tumor sebesar 26% dan secara bermakna meningkatkan produksi tumor nekrosis factor atau TNF alpha dan interleukin (IL)-alpha.¹⁶ Selain itu juga, TO mampu secara kuat memicu terjadinya apoptosis sel Hep G2. Mengingat masih tingginya angka kematian pada kanker payudara, tingginya biaya pengobatan yang ada sekarang, serta belum banyaknya penelitian di bidang *herbal therapy* dengan menggunakan pendekatan epigenetik di bidang kanker, maka tulisan ini mengungkap masalah tersebut.^{2,12,18}

Retenoat

Retenoat adalah sekelompok bahan yang secara struktural maupun fungsional analog dengan vitamin A. Vitamin A ada 3 bentuk, salah satu bentuk yang masih belum banyak diteliti adalah *retinoid acid*. Retinoid merupakan mediator petanda yang tepat bagi morfogenesis embrional, pertumbuhan, dan diferensiasi sel. Penggunaan retinoid sebagai supresor tumor telah dievaluasi pada beberapa hewan model karsinogenesis. Model tersebut antara lain kanker kulit, kanker payudara, kanker rongga mulut, paru, hati, saluran cerna, prostat, dan kandung kemih. Laporan klinis membuktikan bahwa retinoid dapat menyembuhkan lesi premalignan dan menghambat perkembangan tumor primer.⁶

Dalam mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel normal, sel premalignan atau sel malignan, retinoid merangsang, baik secara langsung maupun tidak langsung, reseptor yang terdapat pada nucleus sehingga timbul gen retinoid ekspresi. Reseptor yang dimaksud antara lain reseptor asam retenoat (RARS) dan Reseptor x Retenoid (RXRS). Reseptor tersebut merupakan faktor transkripsi dan masih termasuk anggota superfamili reseptor hormone steroid. Agar bekerja, reseptor ini harus diaktifkan oleh ligan. Reseptor retinoid terdiri atas tiga sub tipe, yaitu sub tipe α , β , dan χ . Dalam mengaktifkan fungsi transkripsi retenoat, RAR/RAR heterodimer atau RXR homodimer harus berikatan dengan daerah dalam region promoter gen target yang merespons asam retenoat. Salah satu target gen reseptor adalah RAR β_2 yang dipetakakan dalam kromosom 3p24 (paling banyak 45%), yaitu daerah yang paling banyak menghapus heterozigositas (LOH) dari tumor payudara primer.^{8,15}

Dalam *cell line*, tumor payudara RAR β_2 mampu menghambat proliferasi sel yang bersangkutan. Selain itu, telah dilaporkan bahwa RAR β_2 dapat menurunkan atau menekan pertumbuhan sejumlah tumor malignan seperti karsinoma paru, karsinoma sel squamosa pada daerah kepala dan leher, serta kanker payudara. Penemuan ini membuktikan bahwa RAR β_2 mempunyai peran penting dalam menghambat pertumbuhan beberapa jenis sel dan menghilangkan aktivitas pengatur tumorigenesis. Untuk menjawab mengapa RAR β_2 mampu menekan bahkan

menghilangkan tumor maglinan maka usaha keras telah dilakukan untuk mengidentifikasi langsung kemungkinan perubahan yang terjadi akibat kerja promotor RAR β_2 di samping faktor yang mengatur mekanisme tersebut. Laporan terakhir mengemukakan bahwa kanker payudara memperlihatkan adanya metilasi dalam region promoter RAR β_2 .^{15,25}

Gen Reseptor Acid Retinoid β_2

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pengamatan terhadap gen RAR β_2 , yaitu pada mRNA RAR β_2 . Berkurangnya ekspresi RAR β_2 diamati pada beberapa tumor solid seperti karsinoma paru, karsinoma sel squamosa, dan kanker payudara. Bukti-bukti mendukung hipotesis bahwa gen RAR β_2 adalah gen supresor tumor, akan tetapi mekanisme supresor RAR β_2 pada target lain belum diketahui.^{2,23,27}

Promotor gen RAR β_2 , termasuk motif RARE dapat diaktifkan oleh RAR/retinoat X reseptor (R X R) heterodimer. Dalam *cell line* kanker payudara, retinoat tidak mampu menginduksi ekspresi gen RAR β_2 meskipun dalam sel tumor mampu mentransaktifkan RARE β_2 . Kenyataan ini mendukung konsep yang menyatakan bahwa reseptor *endogenous* berisi sejumlah mutasi atau *polymorphism* yang terdeskripsi dalam fungsi. Penelitian lain juga menemukan tidak adanya mutasi dalam regio promotor sel karsinoma cervical hela yang kekurangan RAR β_2 . Jadi, tampaknya region promotor RAR β_2 bukan merupakan target mutasi beberapa kanker sehingga diperkirakan adanya mekanisme lain untuk supresi RAR β_2 perlu dipertimbangkan. *Gote et al*, (1998) pertama kali mengatakan bahwa dalam *cell line* kanker kolon, metilasi mungkin sebagai respons mekanisme akibat kekurangan ekspresi gen RAR β_2 . Data ini menunjukkan bahwa *epigenetic silencing promotor* gen RAR β_2 diduga merupakan kejadian penting dalam kanker payudara dan mekanisme *silencing epigenetic* berkaitan dengan metilasi gen promotor RAR β_2 .^{7,10,23}

Ditemukannya RAR β_2 dan LOH (Lost of Heterogenitas) dalam kromosom 3p24 adalah hal umum dalam kasus kanker payudara. Hal ini seperti pada kanker esophagus yang memperlihatkan korelasi lemah antara ekspresi reseptor β_2 asam retinoat dan LOH yang terletak pada kromosom 3p24.

Penelitian menunjukkan bahwa metilasi region promotor RAR β_2 berhubungan dengan epigenetik *gen silencing* dan mekanisme *silencing* yang menyebabkan inaktivasi biallele gen RAR β_2 dapat diadukan oleh agen demetilasi. Pengetahuan perubahan epigenetik pada RAR β_2 mempunyai implikasi pada terapi dan pencegahan kanker. Usaha spekulasi agen demetilasi mempunyai peranan dalam pencegahan kanker atau seseorang yang berisiko terjadi metilasi promotor RAR β_2 yang

merupakan ciri dari perubahan awal neoplastik. Dengan demikian, status metilasi RAR β_2 dalam kanker payudara primer berguna untuk mengidentifikasi tumor yang merespons terhadap *retinoic acid therapy*.^{9,28}

Tujuan tulisan ini adalah mengungkap manfaat mekanisme kerja RAR β_2 dalam menginaktifkan atau menurunkan fungsi RAR β_2 pada proses terjadinya kanker payudara dengan terjadinya metilasi regio promotor RAR β_2 . Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengungkap bahwa mekanisme pemberian ekstrak akar *Taraxacum officinale* dapat mengaktifkan gen RAR β_2 melalui demetilasi promotor RAR β_2 sehingga terjadi aktivasi atau ekspresi mRNA RAR β_2 yang berperan sebagai tumor supresor gen untuk menekan pertumbuhan sel kanker payudara melalui pengamatan proses apoptosis.⁴

MATERI DAN METODE

Untuk mencapai tujuan penelitian dan memecahkan masalah, digunakan desain survei deskriptif dan eksperimental murni deskriptif, *post test only control group design in vitro*. Langkah-langkah yang dilakukan pada penelitian adalah: Sel kanker yang didapat dari penderita kanker payudara ditumbuhkan dalam kultur jaringan. Dalam kultur jaringan kanker dilakukan pengujian tentang hilangnya heterogenitas pada kromosom 3P₂₄ serta hilangnya RAR β_2 gen dan menganalisis adanya metilasi promotor RAR β_2 . Dari ekstrak *Taraxacum officinale* dapat diisolasi kandungan vitamin A dosis tinggi berupa *retinoid acid* yang dapat berperan sebagai pengaktifan gen reseptor RAR β_2 sehingga terjadi demetilasi promotor RAR β_2 . Untuk mengetahui pengaruh ekstrak *Taraxacum officinale* pada sel kanker payudara dapat dilakukan dengan pemberian ekstrak *Taraxacum officinale* serta mengamati ekspresi mRNA RAR β_2 . Untuk mengamati penurunan pertumbuhan sel kanker payudara dapat dilakukan dengan mengamati proses apoptosis dengan teknik Tunel.⁴

Human female breast cancer cell diperoleh dari Laboratorium Bagian Bedah RSUD Saiful Anwar di Malang. Penelitian yang dilakukan ini berupa penelitian survei deskriptif dan eksperimental murni deskriptif *post test only control group design in vitro* sehingga kami hanya dapat mengumpulkan dua sampel jaringan secara klinis sebagai kanker payudara, dua sampel darah tepi sebagai penderita kanker payudara, dan dua sampel jaringan sitologi kanker payudara. Kriteria sampel berupa wanita umur 45 dan 55 tahun dengan benjolan payudara secara klinis didiagnosis sebagai kanker payudara. Penderita telah pula menandatangani *ethical clearance*. Kemudian sampel tersebut dikumpulkan di laboratorium biomedik FK Unibraw, Malang. Sampel yang diperoleh disimpan dalam ruang bertemperatur -70°C. Untuk menguatkan diagnosis maka sampel diperiksa secara histologis oleh

seorang patologis. Dari pemeriksaan 90% sampel dinyatakan *infiltrating ductal carcinoma mammae grade 3* dan 4. Sebagai sampel kontrol disertakan pula sampel jaringan dan darah orang normal/sehat. Sampel tersebut sudah pula dilakukan pengujian estrogen reseptor ternyata menunjukkan hasil +++ serta Her-2 ++. Seterusnya, sampel tersebut dilakukan pengujian untuk pemeriksaan selanjutnya.

Untuk pengujian pengaruh ekstrak *Taraxacum officinale* pada kultur sel kanker payudara dilakukan pemberian ekstrak *Taraxacum officinale* dengan dosis 0,1; 1; 5 $\mu\text{mol/l}$ pada kultur sel payudara yang telah dituangkan dalam sumuran berisi kultur sel payudara. Hasilnya dibandingkan dengan kontrol berupa pemberian 5AZAdr sesuai dengan dosis di atas. Pengujian ekspresi mRNA RAR β_2 dilakukan dengan teknik CISH.

Pengamatan Selanjutnya Hilangnya RAR β_2 pada Kromosom 3P₂₄

Untuk mengidentifikasi hilangnya atau menurunnya DNA RAR β_2 pada kromosom 3P₂₄ darah serta jaringan penderita kanker payudara, digunakan teknik PCR menggunakan primer RAR β_2 , *forward*, dan *reverse* pada kromosom 3P₂₄ dengan rangkaian primer exon-5 dan sekuen 5'-ATC GAT GCC AAT ACT GTC GA-3' posisi 358034, dilanjutkan dengan elektroforesis dan diperkuat dengan pemeriksaan imunositokimia.^{20,23}

Penentuan DNA Metilasi Promotor RAR β_2

Untuk menentukan adanya metilasi promotor RAR β_2 pada darah dan jaringan penderita kanker payudara digunakan teknik PCR dengan merangkai primer DNA metilasi-F RAR β_2 promotor sekuen 5'-TGC TCA ACG TGA GCC AGG A-3' posisi 358749 dengan primer metilasi R sekuen 5'-AGG CTT GCT CGG CCA ATC CA-3' posisi 358033, dilanjutkan teknik elektroforesis diperkuat dengan pemeriksaan teknik kromogenik insitu hibridisasi menggunakan promotor RAR β_2 .^{20,23}

Ekstraksi Akar dan Daun *Taraxacum officinale*

Bahan dan alat serta cara untuk proses ekstraksi akar *Taraxacum officinale* adalah langkah-langkah sebagai berikut. Tahap awal mengumpulkan akar dan daun *Taraxacum officinale*, kemudian dikeringkan, lalu direndam dalam ethanol 95%. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan filter corong Buchner menggunakan Buchi Heating Rovaporator. Hasil ekstrak akar *Taraxacum officinale* diuji kandungan retinoid acid dengan teknik TLC diperkuat dengan teknik HPLC.²⁰

Penentuan Menghilangnya Metilasi dengan Proses Demetilasi

Proses menghilangnya metilasi dengan mengamati

ekspresi mRNA RAR β_2 menggunakan teknik CISH (*Chromogenic In Situ Hibridisasi*).¹⁴ Untuk mengetahui penekanan pertumbuhan kanker payudara, kami mengamati proses apoptosis menggunakan teknik Tunel.⁴

Hasil Penelitian tanpa Melakukan Analisis Data

Tulisan ini mengungkap teori epigenetik pada kanker payudara serta mengamati pengaruh ekstrak *Taraxacum officinale* pada sel kanker payudara tanpa melakukan analisis data. Oleh karena itu, digunakan desain penelitian survei deskriptif dan eksperimental murni deskriptif *post test only control group design invitro* tanpa analisis statistik dan random sampel tanpa menggunakan *size sampel*. Oleh karena itu, hasil yang diharapkan hanya bersifat ada tidaknya (hilangnya) RAR β_2 pada kanker payudara serta terjadinya proses metilasi. Juga mengamati pengaruh ekstrak *Taraxacum officinale* sebagai perlakuan sehingga terjadi pengaktifan mRNA RAR β_2 melalui proses demetilasi RAR β_2 promotor sehingga terjadi proses apoptosis sebagai pertanda penurunan pertumbuhan kanker payudara tanpa mengamati secara kuantitatif penurunan pertumbuhan kanker payudara.

HASIL

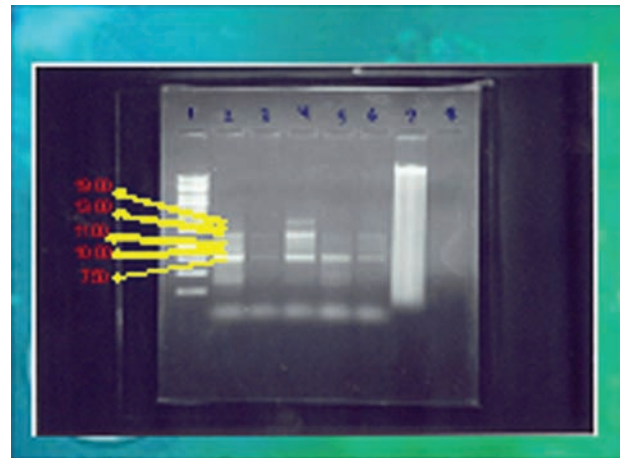
Tulisan ini menjelaskan hasil yang telah dicapai dan didapatkan hasil bahwa dari darah dan jaringan penderita kanker payudara didapat hasil hilangnya RAR β_2 pada kromosom 3P24. Hasil tersebut didapat dengan menggunakan teknik PCR, dilanjutkan dengan elektroforesis pada sel kanker payudara. Tampak pada gambar 1 hasil elektroforesis pada line ke-6 menipis dan pada line ke-8 menghilang. Dengan menggunakan PCR primer 3P24 terjadi penipisan dan hilangnya pita pada darah dan jaringan penderita kanker payudara pada kromosom 3P24, pada posisi 1000 Bp, 1100 Bp, 1300 Bp, dan 1900 Bp (gambar 1).

Diperkuat dengan pemeriksaan immunositokimia. Tampak gambaran penurunan ekspresi RAR β_2 dari *grade III* (gambar 2) dan dibandingkan dengan *grade IV* (gambar 3) pada sitologi sel kanker payudara.

Pada tahap berikutnya, kami mendapatkan hasil ekspresi metilasi DNA promotor RAR β_2 pada darah dan jaringan penderita kanker payudara pada line ke-2 sampai ke-3 dengan band 550 kb pada darah dan jaringan serta jaringan normal terletak pada line ke-4 dan 5. Hasil tersebut dilakukan menggunakan teknik PCR primer 3P24 pada metilasi promotor RAR β_2 . Tampak ekspresi DNA metilasi pada promotor RAR β_2 .

Hasil pemeriksaan darah dan jaringan penderita kanker payudara yang dibandingkan dengan darah dan jaringan normal ditunjukkan oleh gambar 4.

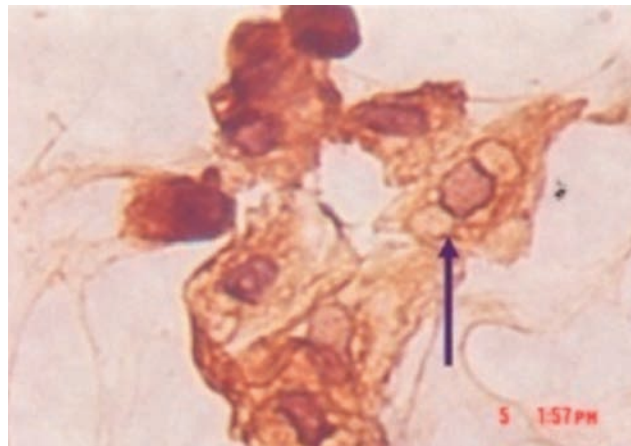
Hasil ini diperkuat dengan pemeriksaan dengan teknik chromogenik insitu hibridisasi menggunakan primer



Gambar 1: Penurunan serta hilangnya pita DNA RAR β_2 pada kromosom 3p24

Keterangan :

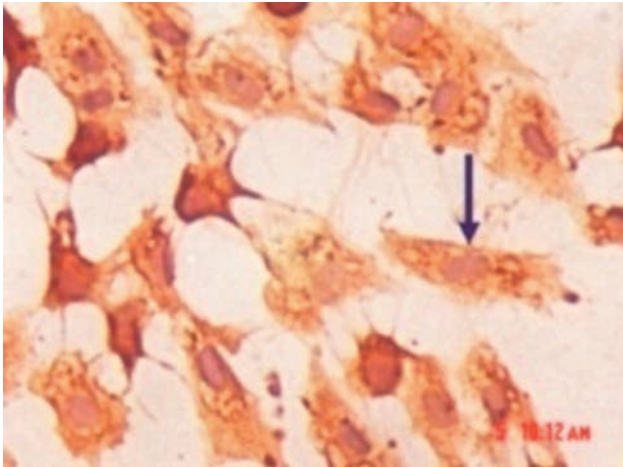
- | | |
|------------------------------------|------------------------------|
| 1. Marker 1 Kb Ladder | 5. PCR TN (jaringan kontrol) |
| 2. PCR BN-A (darah kontrol normal) | 6. PCR TCa (jaringan kanker) |
| 3. PCR BCa-R1 (darah kanker) | 7. DNA TN (jaringan kontrol) |
| 4. PCR BN-D (darah kontrol) | 8. DNA TCa (jaringan kanker) |



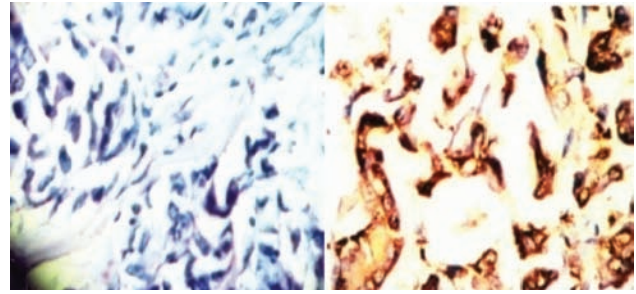
Gambar 2: Penurunan Ekspresi RAR β_2 pada sitologi sel kanker payudara *grade 3* tampak warna coklat menipis dengan pewarnaan immunositokimia (p 900x).

antibodi metilasi promotor RAR β_2 pada sel kanker payudara. Hasilnya ternyata didapatkan ekspresi chromogen DAB dengan warna coklat pada sel kanker payudara yang mengalami metilasi RAR β_2 . Sebagian lagi tampak sel kanker berwarna biru yang tanpa mengalami metilasi RAR β_2 promotor (gambar 5).

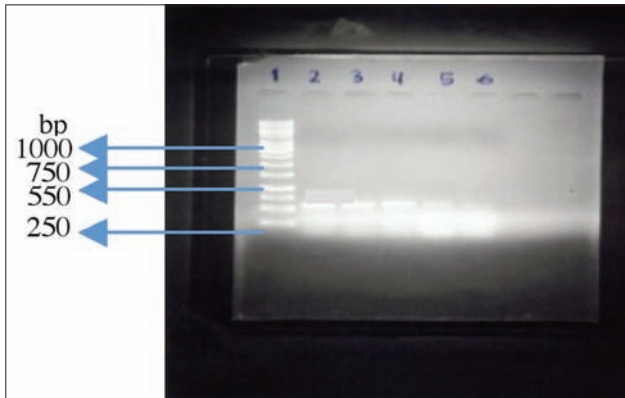
Penelitian tahap berikut, dikumpulkan tanaman dandelion atau *Taraxacum officinale* pada akar dan daun (gambar 6) untuk kemudian dikeringkan, lalu dilakukan perendaman dengan ethanol 95% dan disaring dengan corong Buchner. Kemudian dilakukan pemanasan/penguapan untuk memisahkan filtrat dengan pelarutnya



Gambar 3: Penurunan Ekspresi RAR β_2 pada sitologi sel kanker payudara grade 4 tampak warna coklat lebih tipis dengan pewarnaan immunositokimia (p 900x)



Gambar 5: Hasil pemeriksaan RAR B2 promotor pada kanker payudara *infiltrating ductal carcinoma mammae* dengan teknik CISH.



Gambar 4: Hasil deteksi metilasi DNA darah Promotor Gen RAR β_2 dengan teknik PCR dilanjutkan dengan elektroforesis.

Keterangan:

1. Marker
2. DNA jaringan kanker payudara
3. DNA sel limfosit darah kanker payudara
4. DNA jaringan normal payudara orang normal/sehat
5. DNA darah limfosit normal/sehat

menggunakan *Buchi Heating Rovaporator* (gambar 7). Setelah itu, didapatkan hasil ekstraksi dengan proses yang sama dari akar dan daun *Taraxacum officinale*.

Selanjutnya dilakukan pengujian kandungan *retinoid acid* pada akar *Taraxacum officinale* dengan teknik *Thin Layer Chromatographic/TLC* (lihat gambar 8). Didapatkan hasil Rf akar sebesar 0,9059 dan Rf daun sebesar 0,8941 dibandingkan dengan standar 0,870.

Dilanjutkan dengan pemeriksaan teknik HPLC (lihat gambar 9a dan 9b). Hasil yang diperoleh dari uji kontrol *retinoid acid* adalah 24,794 sedangkan hasil uji ekstrak akar *Taraxacum officinale* mendapatkan hasil 25,651.



Gambar 6: Tanaman Dandelion.



Gambar 7: Rovaporator

Pada tahap akhir, kami melakukan uji pengaruh ekstrak *Taraxacum officinale* pada kultur sel payudara *invitro* dengan dosis 0,1; 1; 5 $\mu\text{mol/L}$ dengan hasil 1 $\mu\text{mol/L}$ terjadi ekspresi mRNA RAR β_2 pada kultur sel



Gambar 8: Hasil kromatografi lapis tipis (TLC) di bawah UV Thin Layer Chromatography.

Keterangan:

1. Standart Retinoid Acid (Sigma)
2. Ekstrak Akar T. Officinale
3. Ekstrak daun T. Officinale

Lingkaran merah menandakan keberadaan retinoid acid

Rf standart 0,8706

Rf akar 0,9059

Rf daun 0,8941

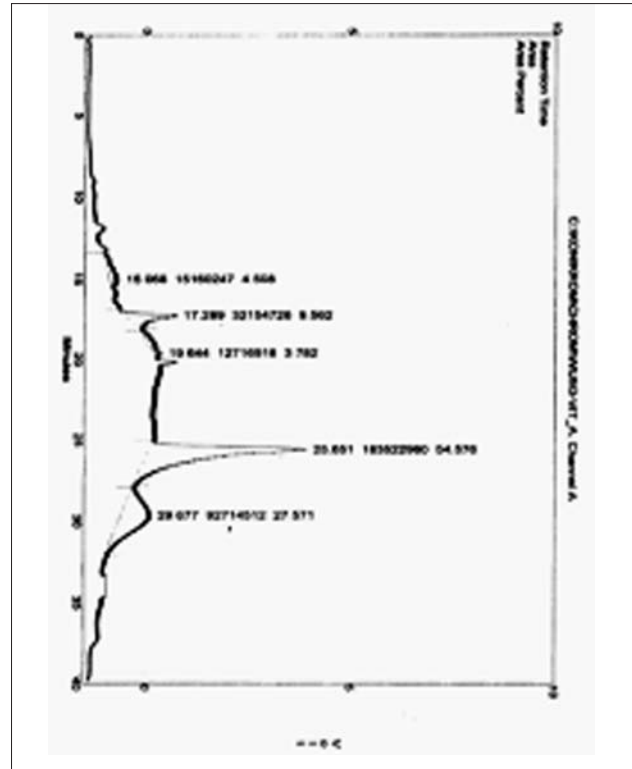
kanker payudara sebagai bukti proses demetilasi sel kanker payudara dengan teknik CISH.

Bukti adanya ekspresi mRNA RAR β_2 dari dua sampel jaringan kanker payudara dengan dosis 1 $\mu\text{mol/L}$. Salah satu kultur sel kanker payudara menunjukkan mRNA RAR β_2 dengan menggunakan teknik CISH (gambar 10).

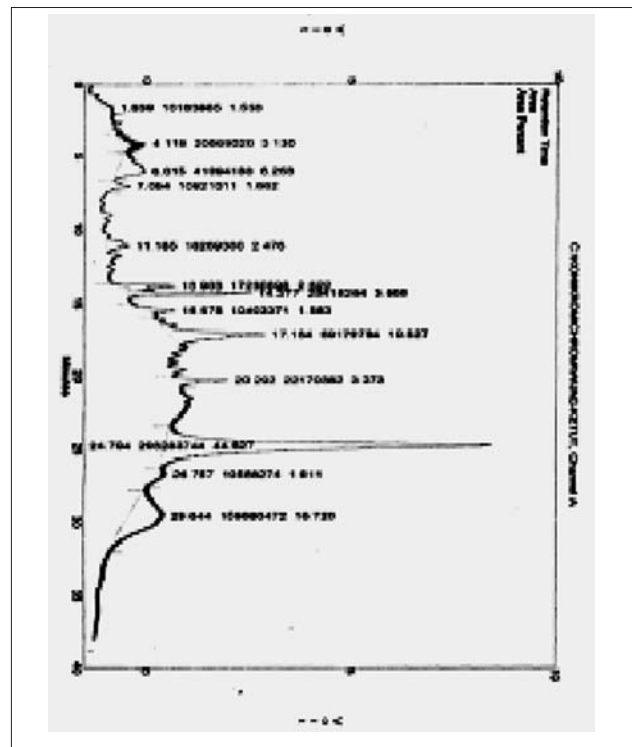
Untuk membuktikan terjadinya penurunan kanker payudara dilakukan pengamatan apoptosis yang terjadi pada kedua sampel sel kanker payudara tersebut tanpa mengamati kuantitatif penurunan pertumbuhan kanker payudara dengan teknik Tunnel (gambar 11).

PEMBAHASAN

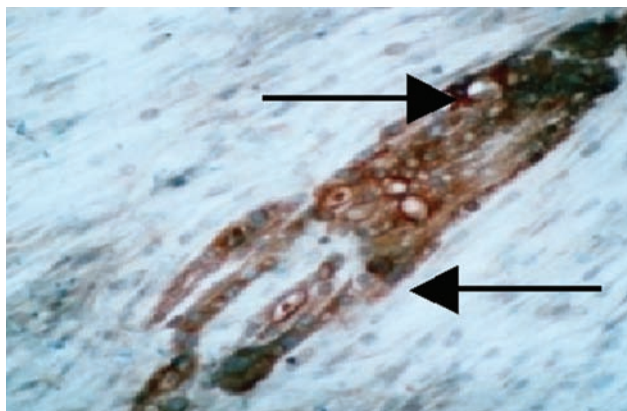
Hasil penelitian tahap I mendapatkan bahwa pada kanker payudara terjadi penurunan serta hilangnya ekspresi retinoid acid reseptor β_2 (RAR β_2) pada kromosom 3P24 pada penderita kanker payudara. Hasil



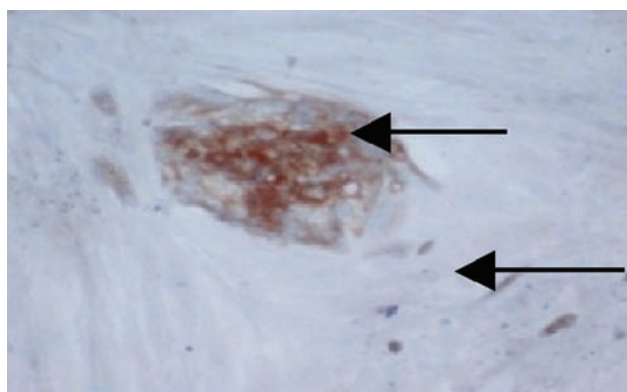
Gambar 9a: Pengujian kadar retinoid acid sebagai standar/kontrol dengan menggunakan teknik HPLC.



Gambar 9b: Pengujian kadar retinoid acid pada ekstrak *Taraxacum officinale* dengan menggunakan teknik HPLC.



Gambar 10: Panah atas → tampak ekspresi warna coklat mRNA pada kultur sel kanker payudara; panah bawah → tampak sel-sel fibroblas di antara sel-sel kanker.



Gambar 11: Panah atas → sel kanker warna coklat mengalami apoptosis; Panah bawah: tampak sel-sel fibroblas di antara sel-sel kanker payudara.

ini sesuai dengan penemuan Hong, 1990, dan P. Card *et al.*, 1999, yang mengatakan bahwa ada peranan RAR β_2 pada pertumbuhan kanker payudara, kanker sel squamous, serta kanker darah dan leher.^{14,23} Penelitian ini juga mendapatkan hasil bahwa RAR β_2 dipetakan pada kromosom 3p₂₄ yang merupakan wilayah pada kromosom yang menunjukkan locus yang paling berperan pada hilangnya heterogenitas dari kanker payudara. Penelitian tahap berikut ini mendapatkan hasil bahwa akar dan daun *Taraxacum officinale* mengandung vitamin A yang analog secara struktur dan fungsional, yaitu retinoid acid.^{2,8}

Retinoid acid berperan sebagai suppresor tumor yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel pre-malignant dan dapat merangsang secara langsung reseptor yang ada di nucleus yang berhubungan dengan gen retinoid acid jenis sub tipe β yang umumnya berikatan dengan region promotor. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada sel kanker payudara, RAR β_2 menghilang atau menurun dari *grade 3* dibandingkan dengan *grade 4* (gambar 2 dan 3).⁶

Pada penelitian tahap berikut, kami juga mendapatkan hasil penelitian bahwa pada darah dan jaringan penderita kanker payudara terjadi proses metilasi promotor RAR β_2 . Hal tersebut dibuktikan dengan adanya ekspresi DNA metilasi pada 550Bp. Hal ini sama dengan hasil yang didapatkan oleh Keene *et al.* Widshwender dan Muliarta dkk., yang mengatakan bahwa proses metilasi regio promotor RAR β_2 menyebabkan terjadinya inaktivasi dari RAR β_2 gen, sehingga fungsi tumor supresor gen menurun dan terjadi proses poliferasi sel kanker.^{15,20,27}

Pada tahap akhir ini, kami telah mendapatkan hasil bahwa kadar Retinoid Acid pada Ekstrak akar *Taraxacum officinale* tinggi, sebesar Rf 0,9059, sesuai dengan penelitian dari Bradshaw pada 2004. Penelitian tahap lanjutan ini juga melakukan pengujian bahwa pemberian retinoid acid, ekstrak *Taraxacum officinale* dapat mengaktifkan ekspresi mRNA RAR β_2 sehingga dapat menekan pertumbuhan kanker payudara melalui proses apoptosis¹⁹, yang juga sesuai dengan penelitian Anita (1998).¹

KESIMPULAN

Hasil penelitian survei deskriptif tahap awal ini menunjukkan bahwa pada sel kanker payudara terjadi hilangnya serta menurunnya RAR β_2 pada kromosom 3P24 band 1000 bp, 1100 bp, 1300 bp, dan 1900 bp. Pengujian dengan teknik imunositokimia terjadi penipisan warna coklat pada sel kanker payudara *grade 3* dibandingkan dengan *grade 4*.

Pada tahap berikutnya didapatkan hasil bahwa akar serta daun *Taraxacum officinale* mengandung *retinoid acid*. Pada akar dengan teknik TLC sebesar Rf 0,9015 dan daun sebesar Rf 0,8941, diperkuat dengan pemeriksaan HPLC. Pada penelitian tahap berikut ini juga didapatkan hasil pada kedua sampel sel kanker payudara terjadi proses metilasi promotor RAR β_2 dengan terjadinya ekspresi DNA metilasi pada 550 Bp. Penelitian tahap akhir adalah penelitian murni *descriptive post test only control group design* dan didapatkan hasil bahwa pemberian ekstrak akar *Taraxacum officinale* yang mengandung retinoid acid dapat terjadi proses demetilasi aktifnya mRNA β_2 reseptor sehingga dapat menekan pertumbuhan sel kanker payudara, yang dibuktikan dengan terjadinya proses apoptosis pada kedua kultur sel kanker payudara.

SARAN

Hasil penelitian ini dapat dikembangkan untuk diagnosis dan alternatif terapi ekstrak akar *Taraxacum officinale* bagi yang mendapatkan risiko kanker payudara dan penderita kanker payudara dengan pendekatan epigenetik. Untuk penyempurnaan penelitian ini diharapkan untuk dapat dilanjutkan dengan menam-

bahkan kriteria sampel, jumlah sampel, dan analisis data yang sesuai untuk penelitian ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tim peneliti menyampaikan ucapan terima kasih kepada kepala proyek program intensif dasar dengan nomor 39/RD/Insentif/PPK/I/2007 yang telah menyetujui dan membiayai penelitian ini. ♦

BIBLIOGRAFI

- Anita L. Sabichi, Denver T. Hendricks, Mary A. Bober, Michael J. Birrer, 1998. Retenoid Acid Receptor β_2 Expression and Growth Inhibition of Gynecologic Cancer cells by the Synthetic Retenoid N-(4-Hydroxyphenil) Retinamide. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:597-605.
- Bradshaw, Chad. 2004. Dandelion. (Online), (<http://www.Geocities.com/chadrx/dande.html>), diakses tanggal 17 November 2004)
- Braunwald T, Fave, Kasper, Havick, Zango, Jameson. 2001. Harrison's Principles of Internal Medicine. 15th edition. Volume I. USA:Mc Graw-Hill Companies. P 471 – 571.
- Charriaut-Marlangue C and Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of TUNEL stain to determine apoptosis. *Neruo Report* 1995; 7:61-64.
- Cotran, Ramzis, Vinay Kumar, Tuccercoln. Breast Cancer, Pathologic Basic of Disease, WB Saunders, International Edition, Four Edition, 1999: 192-200.
- Deng G, Luy Zionikov G, tor AD Smith AS. Loss of heterozygosity a normal tissue adjacert to breast carsinoma, *Science* 1995; 274 20572059
- Doerfler. Denovo Methylation Long Term Promotor Silencing, Methylation Pattern in Human Gen and Concequences of Foreign DNA Insertion DNA Methylation, basic Mechanism. Springer Verlag Berlin Heidenberg 2005: 127-146.
- Evans TRJ, Kayes, B, Retinoids present role and future *BRJ Cancer*, 1999; 80: 1 – 6.
- Ferguson AT, Nass SJ. DNA Methylation and Breast Cancer Current Genomic 2000, Bentharr Science Publisher Ltd. 2001: 48-53.
- Gote S sinrett D Momparier RL. Demmethylation by 5-aza 2 deoxy cytidine at specific 5-methylcytosine s les in the promoter region ct the retinoid acid receptor beta gene in human colon carsinoma cell antitumor. *Drugs* 1998;9: 743 – 750.
- Havieb B Rochette Egij C Bradey WE. Tumor suppressor effect of retinoic acid by human epidermoid in cancer cel Bros Natt Acad Sci USA, 1998; 90: 985-989.
- Heidifiegll, Milinger S., Goebell G., Muller E., Heaznewr, Mark C., Petter W, Laird and Martin, Watchwenter. Breast Canceer DNA Methylation Profile in Cancer cell ant Tumor Stroma, Association with HER2/New Status in Primary Breast Cancer, Cancerest, *American Association for Cancer Research*, 2006: 29-32.
- Hong W, K Lippman SM tr LM, Karp DD, Lee JS, Byers RM Schuntz SS Kramer AM, Lotar Peters LL, Dimery TW, Brown BW Goeptert H, Prevertion of second primary tumors with isotrenoid in squamus cell carcinoma of the head neck and *N. Engl J. Med*, 1990; 323 – 795.
- Jones Lamem. Molecular Pathology an In Situ Hibridization in Histological Technic Theory and adirectly by John D. Bancroft Marlyn Gamble. Fifth Edition. Harcourt Publishers Limited 2002. Churchill Living Storm. 2002: 553-575.
- Kane MF, Loda M, Gaida GM Lipmann J, Mishra, Goldman – fassud JM Kolodner R, 1997, Methylation of the aMLH promoter correates with lack of expression of VLH a sporadic colon tumor and smatch rapa detective humar tumor cell cancer res 57 5556 – 5560 tanggal 15 Desember 2004).
- Koo. 2004. *Taraxacum officinale* induces cytotoxicity through TNF-alpha and IL-1alpha secretion in Hep G2 cells (online) (<http://nebi.nlm.gov/entrez/query.fegi?CMD=search&DB=pubmed>, (diakses tanggal 20 Januari 2005)
- Lotar R, Xu XS Lippman SM ro JY Lee JS Lee JJ Hang WK, Suppression of retinoic acid receptor beta2 in premagligran oral and ist up regu aline by isotreliroir. *N Engl J Med*, 1995; 382 3405 – 1410.
- Makhoul, Issam MD. 2004. Breaast Cancer(online)(<http://www.emedicine.com/med/topic2808.htm>), diakses tanggal 17 November 2004).
- Mikko O. Hitunen, Yla-Hertuala S. DNA Methylation, Smooth Muscle Cells, and Atherogenesis, *Atheroscler Thromb Vasc Bio*. Publication American Heart Association Inc. 2003; 1950-1753.
- Muliartha, Wibi Riawan, Fitri Arrmenia, Asnah. Pengaruh ekstrak akar *Taraxacum officinale* untuk menekan pertumbuhan kanker payudara. Laporan Akhir Penelitian Riset Dasar. Lemlit 2009; 1-20.
- Oregonstate. 2003. Dandelion (online) (<http://oregonstate.Edu>). Diakses 15 Desember 2004.
- P. card E, Segun C monhaven N Rochette Eg, Ciat gobe boreilv J martinel Y Martinel N vignaud JM, Expression of retinoid receptor genes proteins in non small lung cancer C. *Nati Cancer insr* 1999; 91: 059 – 1066.
- Qi Feng, Young, Chiromori, Liangshon, Misanakamura, Nakamura Y, Utsunomia H, Yoshimura G, Sucumo T, Tamati T, Umamura T, Sakukae T, and Kenichi K. Bilalelic in Activation of Retinoid Acid Reseptor β_2 Gen by Epigenetik Chante in Breast Cancer, *American Journal of Pathology*, Further Reproduction Publisher 2001; 158; 299-303.
- Sirchia SM Ferguson AT Sironi E. Subramanyan S Orlandi R sukamar S. Sacchi N, Enviderce of epigenetic changes atctecting the cromatin state of the retinoic acid receptor beta 2 cromoter and breast cancer cell oncogene, 2000; 19: 1556 – 1563.
- Sporn MB Goodman Chemoprevention of cancer with retinoid Fed Proc 1979; 38: 2528 – 2534.
- Takasaki, M, Konoshima T. 1999. Anti Carcinogenic activity of *Taraxacum* plant. 1 (Online) (<http://nebi.nlm.gov/entrez/query.fegi?CMD=search&DB=pubmed>, diakses tanggal 17 November 2004.
- Widshwender M, Berger J Hermann M Mulier HM Amperger A Zeschn g M Widshwender A Abenstein B Zaimet AG Daxenbichler G marth C, Methylation and silencing of the retinoic acid receptor beta 2 bene in breast cancer. *J Natt Cancer Ir st* 2000; 92: 826-532.
- Young X, Young L and Davidson NE. DNA Methylation in Breast Cancer Endocrine Related. *Cancer* 2001: 115-127.