

Pengaruh Pemberian Tepung Tempe Kedelai Terhadap Proliferasi Sel Pada Tumor Kelenjar Mammae Mencit Strain C3H

(The Influence Of Soy Tempeh Flour To The Tumor Cells Proliferation In The Mammae Gland Mice Strain of C3H)

Chintia Dwi Ratna Kusumadewi, Mahrhani, Eva Tyas Utami*)

*)Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember (UNEJ)

Jln. Kalimantan 37, Jember 68121

E-mail: yani_hendro@yahoo.com

Abstrak

Di Indonesia, kanker payudara merupakan salah satu kanker yang sering menyebabkan kematian pada wanita setelah kanker serviks. Kanker payudara umumnya berasal dari sel-sel epitel yang mengalami mutasi genetik yang menyebabkan proliferasi sel kanker tidak terkendali. Penghambatan kanker payudara dapat melalui konsumsi bahan alami yang mengandung isoflavin, salah satunya konsumsi tempe kedelai. Senyawa isoflavin yang berpotensi sebagai antikanker adalah genistein. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian tepung tempe kedelai terhadap proliferasi sel tumor kelenjar mammae pada mencit strain C3H. Salah satu cara pengamatan proliferasi sel tumor dapat dilakukan dengan pengecatan AgNOR dengan membagi mencit strain C3H menjadi 6 kelompok yaitu kelompok K-, K+, kelompok D1, D2, D3, dan D4. Parameter pengamatan diutamakan pada mAgNOR dan pAgNOR. Semua hasil data dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95% dan dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian tepung tempe kedelai pada dosis 0,8 gram sudah dapat menghambat proliferasi sel tumor kelenjar mammae mencit C3H, dengan penghambatan paling tinggi terjadi pada dosis 1,6 gram.

Kata Kunci: Kanker payudara, Tepung tempe kedelai, Pengecatan AgNOR

Abstract

In Indonesia, breast cancer is one of the cancer that often cause death in women after cervical cancer. Breast cancer is generally derived from epithelial cells that undergo a genetic mutation that causes uncontrolled cancer cell proliferation. Breast cancer can be inhibited by the consumption of natural ingredients that contain isoflavones, such as soy tempeh. Isoflavones had potentiation as anticancer is genistein. The aims this researce is determine soy tempeh flour effect against the proliferation of tumor cells in the mammae gland mice strain C3H. Tumor cells proliferation can be observed by painting AgNOR part of tumor mammae gland cells. Mice C3H strain divided into 6 groups: K-, K+, the group D1, D2, D3, and D4. Parameter of observation were mAgNOR and pAgNOR precedence. The results of observation analysis using One Way ANOVA with a 95%, continued with Duncan test. The results of this study demonstrate that administration of soy tempeh flour at a dose of 0.8 grams as able to inhibit the proliferation of tumor cells in the mice mammae gland strain C3H, with the highest inhibition occurred in a dose of 1.6 grams of soy tempeh flour.

Keywords: breast cancer, Soy tempeh flour, AgNOR Staining

PENDAHULUAN

Kanker kelenjar mammae atau kanker payudara merupakan salah satu kanker yang sering menyebabkan kematian pada wanita. Di Indonesia, kanker payudara merupakan kanker yang paling ganas kedua pada wanita setelah kanker serviks [1]. Sampai saat ini upaya pengobatan kanker payudara masih memerlukan banyak biaya dan hasilnya kurang optimal sehingga cara yang lebih baik untuk mengatasi kanker payudara adalah melalui upaya pencegahan [2],[3]. Salah satu upaya pencegahan kanker payudara dapat dilakukan dengan cara konsumsi bahan alami yang mengandung senyawa isoflavin, yaitu tempe kedelai [4].

Tempe kedelai merupakan produk olahan biji kedelai yang diharapkan dapat mencegah kanker payudara karena

kandungan isoflavin yang tinggi [5]. Salah satu senyawa isoflavin pada tempe kedelai yang berpotensi sebagai antikanker adalah genistein [6]. Genistein diduga memiliki efek antiproliferatif pada pertumbuhan sel kanker payudara dan dapat digunakan dalam pencegahan kanker payudara [7]. Pemberian genistein sebesar 100 $\mu\text{M/L}$ terbukti dapat menghambat Protein Tirosin Kinase (PTK) pada sel MCF-7 yang penting dalam mengatur proliferasi sel [8].

Kanker payudara umumnya berasal dari sel-sel epitel yang mengalami mutasi genetik [9]. Mutasi ini diduga sebagai akibat dari infeksi virus, radiasi dan berbagai paparan bahan kimia. Mutasi genetik tersebut menyebabkan adanya ketidakseimbangan antara proliferasi dan apoptosis sel [10]. Proliferasi sel merupakan peningkatan jumlah sel sebagai hasil pertumbuhan dan pembelahan sel. Sel yang mengalami kegagalan apoptosis dapat menyebabkan proliferasi yang tidak terkendali [11].

Proliferasi sel yang tidak terkendali dapat menimbulkan kanker sehingga perlunya dilakukan pengamatan proliferasi sel. Salah satu cara pengamatan proliferasi sel kanker dapat dilakukan dengan pengecatan AgNOR.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Unit 4 dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi, dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan, Universitas Jember yang dilaksanakan pada bulan November 2014 hingga Februari 2015.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat dan papan seksi, cetakan blok paraffin, *tissue processor automatic*, *waterbath*, mikroskop, optilab, cawan petri, inkubator, *freezer*, pipet, mikrotom, mesin grinder, gelas ukur, kaca objek dan kaca penutup, oven, ayakan 70 mesh, kaliper dan timbangan.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tempe kedelai, hewan uji berupa mencit betina dan mencit donor strain C3H yang diperoleh dari LPPT UGM, *chloroform*, larutan buffer formalin 10%, *xylol*, akuades, larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*), alkohol 100%, alkohol 95 %, alkohol 80%, alkohol 70%, paraffin cair, larutan pewarna AgNOR (gelatin 2%, larutan asam formiat 1%, dan larutan perak nitrat 50%), cairan *mounting* LEICA, minyak imersi dan kertas label.

Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pola RAL (Rancangan Acak Lengkap). Sedangkan metode penelitian yang digunakan yaitu metode eksperimental dengan 6 kelompok dan 3 kali ulangan, sebagai berikut kelompok K- (mencit kontrol negatif tanpa tepung tempe kedelai dan tanpa diinokulasikan tumor), kelompok K+ (mencit kontrol positif tanpa diberikan tepung tempe kedelai dan diinokulasikan tumor), kelompok D1 (mencit yang diberikan tepung tempe kedelai dengan total dosis 0,8 gram dan diinokulasikan tumor), kelompok D2 (mencit yang diberikan tepung tempe kedelai dengan total dosis 1,6 gram dan diinokulasikan tumor), kelompok D3 (mencit yang diberikan tepung tempe kedelai dengan total dosis 2,4 gram dan diinokulasikan tumor), dan kelompok D4 (mencit yang diberikan tepung tempe kedelai dengan total dosis 3,2 gram dan diinokulasikan tumor).

Prosedur Penelitian

Pembuatan Tepung Tempe Kedelai

Langkah awal pembuatan tepung tempe yaitu tempe kedelai yang telah difermentasi selama 48 jam dipotong dadu berukuran 0,5 x 0,5 cm². Selanjutnya potongan tempe tersebut dipanaskan dalam oven pada suhu 45°C selama 24 jam, setelah itu dihaluskan menggunakan mesin grinder. Tahap terakhir pembuatan tepung tempe yaitu dilakukan

pengayakan dengan ukuran ayakan 70 mesh sehingga terbentuk tepung tempe.

Aplikasi Perlakuan Dosis

Pemberian dosis tepung tempe yang digunakan pada penelitian ini yaitu 0,8 gram tepung tempe, 1,6 gram tepung tempe, 2,4 gram tepung tempe dan 3,2 gram tepung tempe. Masing-masing dosis, seluruhnya dilarutkan pada akuades hingga volume total 16 ml dan diberikan pada mencit secara *gavage* sebanyak 1 ml/hari selama 16 hari.

Pembuatan dan Inokulasi Bubur Tumor pada Hewan Uji

Inokulasi bubur tumor dilakukan melalui transplantasi jaringan tumor yang berasal dari mencit donor. Transplantasi jaringan tumor dilakukan dengan cara mencit donor dimatikan dengan *chloroform*, kemudian mencit di nekropsi dan diambil jaringan tumornya. Jaringan tumor dibersihkan menggunakan larutan PBS dalam cawan petri yang diletakkan di atas es. Jaringan tumor yang telah bersih ditambah dengan larutan PBS lalu dicacah hingga menjadi bubur tumor yang homogen. Sebanyak 0,2 ml bubur tumor disuntikan dengan jarum trokar secara subkutan di daerah aksila kanan bawah mencit resipien.

Pengecatan *Argyrophilic Nucleolar Organizer Region* (AgNOR)

Setelah mencit diinokulasi tumor, kemudian dipelihara sampai 42 hari. Selanjutnya dilakukan pembedahan untuk mengambil jaringan mammae. Jaringan mammae dipotong secara makroskopis. Potongan jaringan tersebut diproses menggunakan alat *tissue processor automatic*. Tahap pertama *processing* jaringan yaitu proses fiksasi dalam larutan buffer formalin 10% selama 2 jam. Kemudian didehidrasi dengan alkohol bertingkat dengan alkohol 70%, 80%, 95% masing-masing selama 1,5 jam, alkohol 100% I selama 1 jam, alkohol 100% II selama 1,5 jam dan alkohol 100% III selama 2 jam. Selanjutnya diclearing dengan *xylol* I selama 1 jam, *xylol* II selama 1,5 jam, dan *xylol* III selama 1,5 jam. Kemudian diinfiltrasi dengan paraffin cair I selama 1,5 jam dan paraffin cair II selama 2 jam.

Tahap selanjutnya dilakukan pengeblokan jaringan menggunakan paraffin cair, kemudian didiamkan selama ± 20 menit (hingga mengeras). Blok jaringan dipotong menggunakan mikrotom setebal ± 5µ sehingga terbentuk pita jaringan. Pita jaringan tersebut dimasukkan dalam *waterbath* yang bersuhu 50°C. Pengambilan pita jaringan dengan menggunakan *objek glass* kemudian didiamkan selama 5 menit dan diberi label.

Proses pewarnaan diawali dengan deparafinisasi menggunakan *xylol* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit. Kemudian direhidrasi secara bertingkat dengan alkohol 100%, alkohol 95%, alkohol 80% dan alkohol 70% masing-masing 2 menit dan terakhir dengan air mengalir selama satu menit. Kemudian preparat ditempatkan dalam ruangan gelap dan tertutup. Secara cepat, preparat ditetesi dengan larutan pewarna AgNOR yang terdiri dari campuran gelatin 2% dalam larutan asam formiat 1% dengan 50% larutan perak nitrat. Selanjutnya didiamkan selama 20 menit pada suhu

ruang. Sediaan kemudian dicuci dengan air mengalir dan didehidrasi dalam alkohol bertingkat (alkohol 70%, 80%, 95% dan 100%) masing-masing 3 celup. Kemudian diclearing dengan *xylol* sebanyak 3 kali masing-masing 3 celup. Tahap terakhir dilakukan mounting dan ditutup dengan kaca penutup.

Parameter pengamatan

Penelitian ini mengamati aktivitas proliferasi sel melalui penghitungan titik AgNOR yaitu mAgNOR (*mean of AgNOR*) dan pAgNOR (indeks Proliferatif AgNOR). Perhitungan mAgNOR dengan cara menghitung jumlah titik AgNOR pada 100 sel, sedangkan pAgNOR dengan cara menghitung jumlah sel yang memiliki titik AgNOR lebih dari 5. Semua data dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95% dan dilanjutkan dengan uji Duncan.

Hasil Penelitian

Hasil pengamatan jumlah mAgNOR dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah mAgNOR

Perlakuan Tepung Tempe (g)	mAgNOR \pm SD
K-	2.05 \pm 0.06 ^a
K+	3.41 \pm 0.80 ^b
D1 (0,8)	2.01 \pm 0.19 ^a
D2 (1,6)	2.27 \pm 0.21 ^a
D3 (2,4)	2.39 \pm 0.16 ^a
D4 (3,2)	3.34 \pm 0.90 ^b

keterangan: angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda nyata pada $\alpha < 0,05$.

Berdasarkan Tabel 1 diketahui bahwa hasil uji Anova menunjukkan bahwa pemberian tepung tempe kedelai berpengaruh terhadap jumlah mAgNOR. Berdasarkan hasil uji Duncan menunjukkan bahwa pada kontrol negatif dengan kontrol positif terjadi peningkatan jumlah rata-rata titik AgNOR secara nyata. Pada pemberian tepung tempe sebesar 0,8 gram dan 1,6 gram dapat menekan jumlah mAgNOR, sedangkan dengan pemberian tepung tempe sebesar 3,2 gram belum dapat menekan jumlah mAgNOR.

Tabel 2. Jumlah pAgNOR

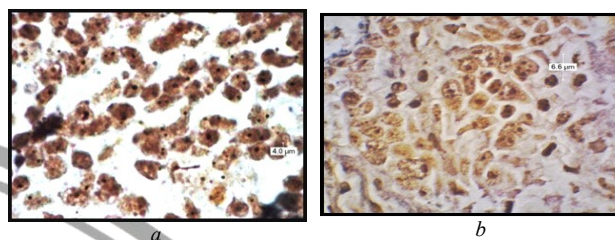
Perlakuan Tepung Tempe (g)	pAgNOR \pm SD
K-	0.00 \pm 0.00 ^a
K+	11.33 \pm 7.02 ^b
D1 (0,8)	1.00 \pm 0.00 ^a
D2 (1,6)	0.67 \pm 1.15 ^a
D3 (2,4)	3.00 \pm 2.00 ^{ab}
D4 (3,2)	11.00 \pm 8.18 ^b

keterangan: angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda nyata pada $\alpha < 0,05$.

Hasil uji Anova menunjukkan bahwa pemberian tepung tempe kedelai berpengaruh terhadap jumlah pAgNOR. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol positif dan dosis

4. Jumlah pAgNOR yang rendah dijumpai pada dosis 1 dan dosis 2, serta terdapat perbedaan nyata dibandingkan dengan kontrol positif dan dosis 4. Pada dosis 3 terjadi peningkatan jumlah pAgNOR namun tidak berbeda nyata dibandingkan dengan dosis 1 dan dosis 2. Peningkatan jumlah pAgNOR terjadi lagi pada dosis 4 namun tidak berbeda nyata terhadap dosis 3.

Pada sel normal (kontrol negatif) tidak tampak aktifitas proliferasi sel yang tinggi. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya sel yang memiliki titik AgNOR lebih dari 5 per nukleus. Gambaran sel kelenjar mammae yang telah dilakukan pengecatan AgNOR dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Sel dengan beberapa titik AgNOR. (a) Sel Normal pada kontrol negatif dengan titik hitam kurang dari 5 AgNOR; (b) Sel Tumor pada dosis 4 dengan titik hitam lebih dari 5 AgNOR

PEMBAHASAN

Berdasarkan tabel 1 dan 2 jumlah rata-rata mAgNOR dan pAgNOR maka dapat diketahui bahwa pada dosis 1 dan dosis 2 dengan perlakuan tepung tempe kedelai sebanyak 0,8 gram dan 1,6 gram telah dapat menghambat proliferasi sel tumor. Penurunan jumlah proliferasi sel tumor pada dosis 1 menunjukkan adanya pengaruh hambatan tumor akibat pemberian tepung tempe kedelai. Tempe kedelai memiliki kandungan isoflavon yang mirip dengan struktur 17 β -estradiol atau estrogen endogen [12],[13]. Isoflavon dapat mencegah kanker payudara melalui pengaturan aktifitas proliferasi sel khususnya isoflavon genistein [14],[8].

Genistein dalam menghambat proliferasi sel kanker diduga melalui penghambatan jalur transduksi sinyal kinase. Salah satunya dapat melalui penghambatan fosforilasi protein kinase dalam jalur transduksi sinyal kinase [15],[8]. Selain itu, genistein yang terdapat dalam tempe kedelai diduga juga dapat meningkatkan ekspresi *tumor suppressor gen* yaitu p53. Apabila terdapat sel yang mengalami kerusakan, maka p53 akan menghentikan siklus sel pada fase G1 dengan cara mengeluarkan inhibitor CDK yaitu p21. Terhentinya siklus sel akan memberikan waktu bagi protein yang dirangsang oleh p53 untuk memperbaiki sel yang rusak tersebut. Apabila sel yang rusak tidak dapat diperbaiki kembali maka p53 akan merangsang sel tersebut untuk mengalami apoptosis [16]. Beberapa laporan telah menunjukkan bahwa genistein dapat menginduksi siklus sel untuk *arrest* dan dapat memodulasi pengaturan protein siklus sel pada konsentrasi 5-200 μ M [17].

Namun pada dosis tinggi yaitu dengan pemberian tepung tempe kedelai sebesar 3,2 gram terjadi peningkatan dalam jumlah mAgNOR dan pAgNOR. Hal ini diduga akibat dari pemberian tepung tempe yang memiliki kandungan genistein dengan dosis yang tinggi dapat memicu perkembangan kanker. Genistein dapat bertindak sebagai

estrogen agonis dan antagonis, sehingga dapat menghambat atau meningkatkan proliferasi sel [18]. Pada konsentrasi tinggi, genistein dapat bertindak sebagai estrogen antagonis yang dapat meningkatkan proliferasi sel tumor. Hal ini sesuai dengan pendapat bahwa genistein dapat menunjukkan aktivitas estrogenik antagonis pada konsentrasi yang lebih tinggi [19].

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa pemberian tepung tempe kedelai sebelum inokulasi bubur tumor sudah dapat menghambat proliferasi sel tumor kelenjar mammae mencit C3H pada dosis 0,8 gram, dengan penghambatan paling besar terjadi pada dosis 1,6 gram. Namun demikian pada pemberian tepung tempe kedelai dengan dosis 3,2 gram cenderung meningkatkan proliferasi sel tumor kelenjar mammae mencit C3H.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek isoflavon yang terkandung dalam tepung tempe kedelai terhadap indeks mitosis dan apoptosis sel pada tumor kelenjar mammae.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Dra. Mahriani, M.Si yang telah membiayai penelitian ini dengan sumber dana Dikti melalui skim Hibah Bersaing.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Rahmawati, E., Dewoto, H.R. dan Wuyung, P.E. 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(4): 217-222.
- [2] Yudissanta, A. dan Ratna, M. Analisis Pemakaian Kemoterapi pada Kasus Kanker Payudara dengan Menggunakan Metode Regresi Logistik Multinomial (Studi Kasus Pasien di Rumah Sakit "X" Surabaya). *Jurnal Sains Dan Seni ITS.* 2012 : 1(1): 112-117.
- [3] McPherson, K., Steel, C. M., dan Dixon. ABC Of Breast Diseases: Breast Cancer- Epidemiology, Risk Factors, And Genetics. *BMJ.* 2000 : 321: 624-628.
- [4] Yan, L., Wei, W., Yi, S., Zhiqiang, E., dan Liqun. Study on the Inhibition of Fermented Soybean to Cancer Cells. *Journal of Northeast Agricultural University.* 2009 : 16(1): 25-28.
- [5] Nakajima, N., Nozaki, N., Ishihara, K., Ishikawa, A. dan Tsuji. Analysis of Isoflavone Content in Tempeh, a Fermented Soybean, and Preparation of a New Isoflavone-Enriched Tempeh. *Journal Of Bioscience and Bioengineering.* 2005 : 100(6) : 685-687.
- [6] Lamartiniere, C. A. Protection Against Breast Cancer With Genistein: A Component Of Soy. *Am J Clin Nutr.* 2000 : 71: 1705-1707.
- [7] Sabatier, C. V., Bignon, Y. dan Bernard-Gallon, D. J. Effects Of The Phytoestrogens Genistein And Daidzein On BRCA2 Tumor Suppressor Gene Expression In Breast Cell Lines. *Nutrition And Cancer.* 2003 : 45(2): 247-255.
- [8] Polkowski, K. dan Mazurek, A.P. Biological Properties Of Genistein. A Review of In Vitro and In Vivo Data. *Drug Research.* 2000 : 57(2): 135-155.
- [9] Hondermarck, H. Breast Cancer: when proteomics challenges biological complexity. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2003 : 2(5): 281-291.
- [10] Kresno, S. B. Ilmu Dasar Onkologi Edisi Kedua. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2011.
- [11] Hyland, K. Cell Proliferation and Its Regulation (Biochemistry/Molecular Biology Lecture). [Internet]. 2014 [Tanggal akses 27 Oktober 2014]. <http://biochemistry.ucsf.edu/programs/ptf/m3%20links/CellProlifLEC.pdf>.
- [12] Mense, S. M., Hei, T. K., Ganju, R. K. dan Bhat. Phytoestrogens and Breast Cancer Prevention: Possible Mechanisms of Action. *Environmental Health Perspectives.* 2008 :116(4): 426-433.
- [13] Sabatier, C. V., Bignon, Y. dan Bernard-Gallon, D. J. Effects Of The Phytoestrogens Genistein And Daidzein On BRCA2 Tumor Suppressor Gene Expression In Breast Cell Lines. *Nutrition And Cancer.* 2003 : 45(2): 247-255.
- [14] Zhang, C., Ho, S. C., Lin, F., Cheng, S., Fu, J. dan Chen, Y. Soy Product and Isoflavone Intake and Breast Cancer Risk Defined by Hormone Receptor Status. *Cancer Science.* 2010 : 101 (2): 501-507.
- [15] Hanahan, D. dan Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000 : 100: 57-70.
- [16] Robbins, S.L., Cotran, R.S., dan Kumar, V. Buku Ajar Patologi Edisi 7 Volume 1. Jakarta: Kedokteran EGC. 2007.
- [17] Pavese, J. M., Farmer, R. L. dan Bergan, R. C. Inhibition of Cancer Cell Invasion and Metastasis by Genistein. *Cancer Metastasis Rev.* 2010 : 29:465-482.
- [18] Wolfe, Brittany. Roles of Resveratrol and Genistein in Invasion and Metastasis of Breast Cancer. College of Science and Health Theses and Disertations. Chicago: DePaul University. 2012.
- [19] Farina, H. G., Pomies, M., Alonso, D. F. dan Gomez, D. E. Antitumor and antiangiogenic activity of soy isoflavone genistein in mouse models of melanoma and breast cancer. *Oncology Reports.* 2006 : 16: 885-891.