

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pada tahun 2012, *International Agency for Research on Cancer, World Health Organization* menemukan bahwa 1,7 juta wanita terdiagnosis kanker payudara dan ada 6,3 juta perempuan hidup yang telah terdiagnosis dengan kanker payudara dalam lima tahun sebelumnya. Sejak tahun 2008, perkiraan kejadian kanker payudara telah meningkat lebih dari 20%, sedangkan angka kematian telah meningkat sebesar 14%. Kanker payudara juga merupakan penyebab paling umum kematian kanker di kalangan perempuan (522.000 kematian pada tahun 2012) dan kanker yang paling sering didiagnosis pada wanita di 140 dari 184 negara di seluruh dunia.¹⁻³

Data statistik di Indonesia belum ada yang akurat, tetapi data yang terkumpul dari rumah sakit menunjukkan bahwa kanker payudara menempati ranking pertama diantara kanker lainnya pada wanita.⁴

Kelainan payudara wanita Indonesia ternyata 96% yang berbentuk tumor justru dikenali oleh penderita itu sendiri sehingga memudahkan dokter untuk mendeteksi kanker payudara. Berbeda dengan di negara barat dimana setiap wanita usia subur diharuskan oleh asuransi kesehatan untuk memeriksakan

payudaranya secara berkala sehingga angka stadium dini kanker payudara ditemukan jauh lebih tinggi daripada di negara berkembang dimana tidak ada keharusan bagi wanita usia subur memeriksakan payudaranya.^{5,6}

Terapi medis kanker payudara sampai saat ini belum memperoleh hasil yang memuaskan. Data WHO 2008, memaparkan bahwa pada masyarakat Asia dan Afrika, 80% menggunakan pengobatan dengan bahan tumbuh-tumbuhan sehingga disebut pengobatan herbal.⁷ Pengobatan herbal yang paling banyak digunakan dan disebarluaskan di dunia adalah pengobatan China.⁸ Beberapa macam obat herbal China telah digunakan secara luas di banyak negara berkembang, dimana pengobatan tersebut mudah diterima dan merupakan terapi yang murah.⁸

Salah satu obat herbal China yang banyak digunakan adalah ekstrak dari akar kering *Salvia miltiorrhizae Bunge*, yang disebut Danshen. Danshen merupakan tumbuhan yang dikatakan asli berasal dari negeri Tirai Bambu, tetapi telah diujicoba menanam tumbuhan ini di lain negara, seperti di Korea, Polandia dan Jepang. Danshen yang tumbuh di luar negeri China, telah diteliti, memiliki jumlah kandungan yang berbeda dengan Danshen yang tumbuh di negeri asalnya sendiri.^{9, 10} Kandungan zat aktif dalam Danshen dengan jumlah yang tertinggi ada pada tanaman *Salvia miltiorrhizae Bunge* yang ditanam di negerinya sendiri, China. Danshen telah masuk dalam daftar obat herbal terstandar di China⁹, dan telah diresepkan di banyak negara di dunia.¹⁰

Penelitian terhadap bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak *Salvia miltiorrhizae Bunge* dalam dunia medis telah banyak dilakukan, seiring dengan

berkembangnya pengetahuan tentang bermacam-macam komposisi kimiawi *Salvia miltiorrhizae Bunge* telah diteliti dan lebih banyak diketahui.^{11,12}

Komposisi ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* terbagi menjadi 2 bagian besar, yaitu zat yang larut lemak (*lipofilik*) dan zat yang larut air (*hidrofilik*). Kandungan ekstrak *Salvia miltiorrhizae Bunge* antara lain adalah *diterpene quinon*, dan derivat asam phenolic, termasuk tanshinone I, IIA, IIB, cryptotanshinone, isocryptotanshinone, miltirone, tanshinol I dan II, dan salviol. Zat-zat aktif yang menyusun ekstrak *Salvia miltiorrhizae Bunge* tersebut, berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, diketahui bahwa Tanshinone I, IIA, IIB, cryptotanshinone, isocryptotanshinone, dan berbagai turunan Tanshinone, menyusun sebanyak kurang lebih 5% dari berat 100mg ekstrak *Salvia miltiorrhizae Bunge*.⁹⁻¹²

Studi eksperimental yang terdahulu, menggunakan dosis 20mg/KgBB Tanshinone i.v., pada penelitian ini akan diajukan dosis 60mg/KgBB peroral perhari, dan 180mg/KgBB per oral perhari, yang berperan pada jalur apoptosis sel ganas.¹³ Salah 1 kandungan Danshen tersebut memiliki efek perlindungan terhadap peroksidasi lipid secara in vitro dan in vivo.¹¹ Tanshinone dan turunannya merupakan komponen zat dalam ekstrak *Salvia miltiorrhizae Bunge* yang aktif berperan dalam mekanisme karsinogenesis, yang telah dibuktikan melalui studi eksperimental secara invivo maupun invitro sebelumnya.¹²

Farmakope di Republik Rakyat Cina menyebutkan bahwa dosis anjuran adalah 9-15 gram per dosis harian dalam bentuk rebusan. Dalam beberapa kasus, dosis tinggi yang diberikan, hingga 20 gram per hari, dalam pengobatan penyakit

inflamasi, termasuk virus hepatitis. Menurut *Materia Medica Cina Langka*, dosis hingga 30-60 gram dapat digunakan dalam kasus-kasus angina dan arthritis. Dosis *Salvia* yang relatif tinggi, dibandingkan dengan kebanyakan ramuan Cina lainnya (rekomendasi dosis khas adalah 3-9 gram untuk banyak herbal) dapat dikaitkan dengan tingkat yang relatif rendah dari konstituen aktif dan kelarutan rendah dalam air.¹³

Pada dosis yang lebih tinggi, *salvia* dapat menyebabkan mulut kering, pusing, kelelahan, mati rasa, sesak napas, dan gejala lain yang biasanya akan menghilang secara spontan tanpa mengganggu pengobatan. *Materia Medica Cina Langka* mencatat bahwa *salvia* tidak cocok untuk pasien yang memiliki kekurangan darah disertai dengan dingin, atau dengan kecenderungan untuk berdarah. Namun, sebagian besar panduan *materia medica* tidak hadir memperingatkan ini. *Salvia* memiliki toksisitas akut sangat rendah, dengan LD50 dengan suntikan dari 40-80 g / kg.¹³

Saran penggunaan *salvia* adalah untuk pengobatan sirkulasi darah yang buruk, tidak dapat digabungkan dengan coumadin (warfarin), karena ada kemungkinan peningkatan efek antikoagulan. Dalam sebuah survei literatur dilakukan melalui Oktober 2000, ditemukan tiga kasus peningkatan aktivitas antikoagulan. Dalam literatur, pada orang mengambil *Salvia* bersama dengan Warfarin. Efek tersebut dapat langka dan cenderung tergantung dosis, sebagai mekanisme tampaknya menjadi efek aditif sederhana aktivitas antikoagulan dari *salvia* bersama dengan yang diproduksi oleh Warfarin. Oleh karena itu, orang yang menggunakan coumadin harus baik hindari menggunakan *salvia*, atau

menggunakannya dalam dosis yang relatif rendah (tidak lebih dari setara 6-9 gram per hari dalam rebusan) dengan memperhatikan tes pembekuan darah yang rutin dilakukan bagi orang-orang mengonsumsi obat.¹³

Dosis toksik ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* belum banyak diketahui. Dosis per oral yang diberikan kepada tikus selama 90 hari pada dosis 400 kali dosis manusia yang dianjurkan (2.500 mg/kg berat badan), dilaporkan menjadi beracun. Dosis mematikan dari ekstrak *Salvia miltiorrhiza Bunge* yang larut dalam air dilaporkan adalah 25 g/kg berat badan pada tikus.¹²

Ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* diketahui memiliki efek yang terutama berkaitan dengan kardiovaskuler, *angina pectoris*, *cerebrovascular*, antiplatelet, antikoagulan dan trombolitik, antibiotik, hepatoprotektif, dan CNS supresan/efek sedatif.¹¹ Data dari *United States Patent Application Publication*, menyatakan bahwa aktifitas farmakologis *Salvia miltiorrhizae Bunge*, seperti disebutkan di atas, juga sebagai anti-neoplastik atau antikanker.¹³ Telah dilakukan studi eksperimental tentang mekanisme antikanker *tanshinone* sebagai salah satu bahan aktif Danshen, terhadap kanker payudara manusia.^{13,14}

Efek sitotoksik, anti-neoplastik dari zat aktif ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* telah pernah diteliti sebelumnya, pada sel-sel keganasan kolon, ovarium, paru, oral, mammae dan leukemia.¹³⁻¹⁷

Penelitian kanker payudara sebagai contoh, diperoleh hasil bahwa *tanshinone* memiliki efek inhibitor lebih kuat dibanding tamoxifen, dimana *tanshinone* efektif menginduksi apoptosis pada sel kanker mammae dengan reseptor estrogen positif dan negatif.^{13,14} Penelitian tersebut menggunakan salah

satu zat aktif saja yang terkandung dalam ekstrak *Salvia miltiorrhizae* Bunge.¹² Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa bentuk sediaan herbal yang lebih kompleks akan lebih baik pengaruhnya dibandingkan dengan hanya zat aktif saja, sehingga pada penelitian ini sangat menarik untuk diteliti ekstrak *Salvia miltiorrhizae* Bunge dalam bentuk sediaan ekstrak kasar, tanpa perlu pemurnian.^{18,19}

Adanya pernyataan bahwa *tanshinone* yang berasal dari ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae* Bunge memiliki efek yang lebih kuat terhadap kanker payudara dibandingkan tamoxifen sebagai obat anti-neoplastik hormonal standar, maka perlu diketahui lebih lanjut efek ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae* Bunge, yaitu bentuk kompleks *compound* pada *living system* sel karsinoma mammae sampai tahap apoptosis.^{13,14,18,19}

Kejadian karsinogenesis melibatkan melibatkan 4 hal, yaitu : 1. Oncogen, 2. Tumor supresor gen, 3. *Dna Mismatch-Repair Genes*, 4. Apoptosis.²⁰

1. Oncogen

Proliferasi pada sel yang normal dikontrol dengan protein-protein yang ada pada membran sel, yang akan mempengaruhi kaskade sinyal biokimia, suatu proses sinyal transduksi. Protein-protein tersebut merupakan faktor pertumbuhan dan sitokin (mediasi protein). Sinyal-sinyal ini mengontrol, gen yang mengatur pertumbuhan dan pembelahan sel. Onkogen yang diubah dalam bentuk gen seluler normal yang disebut proto-onkogen yang terlibat dalam kaskade kejadian ini. Proto-oncogen diprediksi bermutasi secara spontan, melalui interaksi dengan virus, atau dengan cara kimia atau fisik. Ketika proto-onkogen diubah menjadi

onkogen, jalur pertumbuhan sel dan proliferasi menjadi berubah. Hal ini dapat menyebabkan pertumbuhan abnormal sel-sel (transformasi neoplastik). Lebih dari 100 onkogen telah diidentifikasi. Gen adalah sarana dimana sel memproduksi protein, yang masing-masing memiliki peran yang sangat spesifik. Sebuah gen bermutasi dapat menyebabkan kelebihan produksi dari protein, atau rendahnya produksi protein, atau perubahan protein yang mungkin tidak dapat melaksanakan tujuannya. Onkogen biasanya menghasilkan lebih banyak produk protein tertentu ketika bermutasi, sementara gen supresor tumor biasanya menghasilkan lebih sedikit produk protein yang dibutuhkan untuk mensupresi suatu pertumbuhan ketika bermutasi.²⁰

2. Tumor Supressor Gen

Aktivasi onkogen dan inaktivasi gen supresor tumor diperlukan dalam proses terjadinya kanker. Tumor supresor gen biasanya berhubungan dengan pertumbuhan sel dan diferensiasi dan program kematian sel (apoptosis). Lebih dari 12 gen supresor tumor telah diidentifikasi. Protein yang diproduksi oleh gen supresor tumor biasanya menghambat sel berkembang biak atau membelah selama masa ketika pertumbuhan dan tidak seperti selama perbaikan DNA. Tumor supresor gen dianggap sebagai "rem" dari sel. Mutasi yang menonaktifkan gen supresor tumor sebagai contoh adalah mutasi gen P53, merupakan mutasi yang paling umum terlihat pada kanker manusia, ditemukan sekitar 50%. Karsinoma payudara, kolon, abdomen, kandung kemih dan testis, melanoma, dan sarkoma jaringan lunak semua terkait dengan mutasi gen P53. Protein p53 ditemukan dalam inti sel dan mengatur fungsi sel seperti pertumbuhan sel, perbaikan DNA,

dan apoptosis. Peran paling penting bagi p53 adalah untuk menghentikan pertumbuhan sel, memungkinkan waktu sel untuk memperbaiki DNA yang rusak. Jika gen P53 bermutasi, maka gen P53 kehilangan fungsi memperbaiki DNA yang rusak, sehingga apoptosis tidak terjadi, dan hasil pertumbuhan sel yang tidak diatur.²⁰

3. *Dna Mismatch-Repair Genes*

Dna Mismatch-Repair Genes ditemukan berkaitan dengan kerentanan kanker dan ketidakstabilan genetik sel-sel kanker yang memungkinkan untuk beberapa mutasi terjadi. Ketidakstabilan ini mempercepat jalannya kanker. Fungsi normal gen ini adalah untuk memperbaiki kerusakan DNA. Mutasi pada gen mismatch-perbaikan DNA yang paling penting dalam keturunan non-poliposis kanker kolorektal (HNPCC).²⁰

4. Apoptosis

Apoptosis merupakan program kematian sel, atau program bunuh diri sel, dimana program ini mengacu pada kematian sel yang rusak. Hal ini tidak terjadi secara acak, tetapi terjadi pada sel-sel dengan DNA yang rusak. Ketika sel bermutasi dan tidak dapat memperbaiki diri, maka sel tersebut dapat dikorbankan untuk mencegah mutasi yang lebih buruk sehingga diwariskan ke generasi berikutnya dari sel. Penghambatan apoptosis dapat menjadi langkah penting dalam karsinogenesis. Dua gen yang terlibat dalam apoptosis adalah gen tumor supresor P53 gen dan Bcl2 protoonkogen.²⁰

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat perbedaan ekspresi p53 dan Bcl2 adenokarsinoma mammae mencit C3H yang diberi ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* dibandingkan kelompok yang tidak diberi ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Membuktikan peningkatan ekspresi p53 dan penurunan ekspresi Bcl2 adenokarsinoma mammae mencit C3H yang diberi ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* dosis bertingkat.

1.3.2. Tujuan khusus

1. Menilai skor ekspresi p53 pada adenokarsinoma mammae mencit C3H yang diberi ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* pada dosis 0mg, 60mg dan 180mg/kgBB/oral per hari dalam bahan pelarut air minum.
2. Menganalisis perbedaan skor ekspresi p53 antar kelompok perlakuan dosis bertingkat.
3. Menilai skor ekspresi Bcl2 adenokarsinoma mammae mencit C3H yang diberi ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* pada dosis 0mg, 60mg, 180mg/kgBB/oral per hari dalam bahan pelarut air minum.
4. Menganalisis perbedaan skor ekspresi protein Bcl2 antar kelompok perlakuan.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Ranah Pendidikan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi bukti nyata, menambah pengetahuan dan dapat diaplikasikan secara praktis dalam praktek kedokteran praktisi medis, bahwa ada obat selain obat berbahan kimia sintetis yang termasuk fitofarmaka atau herbal yang juga dapat digunakan untuk pengobatan kanker payudara, ataupun sebagai kombinasi.

1.4.2. Ranah Penelitian

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi peran dalam pengembangan ilmu kedokteran di masa yang akan datang sehingga lebih lagi dapat menarik manfaat dari obat fitofarmaka atau herbal.
2. Hasil penelitian ini diharapkan juga dapat menjadi dasar penelitian yang akan datang, dan melengkapi pengetahuan sebelumnya, sehingga akan diperoleh pengetahuan yang lebih lengkap dan benar tentang penggunaan herbal terhadap suatu penyakit.

1.4.3. Ranah Masyarakat

Hasil penelitian ini diharapkan juga dapat menjadi tambahan pengetahuan bagi masyarakat awam, tentang penggunaan fitofarmaka.

1.5. Originalitas Penelitian

Tabel 1. Penelitian terdahulu tentang tanshinone dan kanker payudara

| Peneliti Tahun | Judul | Material and Methode | Hasil |
|---|---|--|--|
| Nizamudinova, et.al. 2008 ¹⁴ | <i>Tanshinone I effectively induces apoptosis in estrogen receptor-positive(MCF-7) and estrogen receptor-negative(MDA-MB-231) breast cancer cells</i> | <ul style="list-style-type: none"> - Tanshinone I kemurnian 99% - Kultur jaringan media RPMI-1640, fetal bovine serum(FBS) - Antibiotika (penicillin/streptomycin) - Anti-Bax dan anti Bcl-2 antibodi - Antibodi caspase-3 - Deteksi Western blotting - Kultur sel - Identifikasi apoptosis dengan Flow cytometry analysis(FACS) - Statistik evaluasi dengan one way ANOVA | <ul style="list-style-type: none"> - Tanshinone I menginduksi sitotoksitas sel lebih efektif pada MDA-MB-231 cells daripada MCF-7 pada dosis rendah dan pada treatment 24jam atau 48jam. - Tanshinone I menginduksi sel apoptosis mati pada kanker payudara melalui downregulation dari Bcl-2/Bax ratio, dan meningkatkan caspase-3 cleavage. - Ditunjukkan oleh analisis FACS efek tanshinone I pada sel MDA-MB-231 lebih signifikan dibanding dengan sel MCF-7 - Ditunjukkan oleh TUNEL assay, meskipun pada konsentrasi yang rendah, tanshinone I, menunjukkan efek induksi apoptosis dan pada dosis tinggi, tanda meningkatnya fraksi apoptotic body oleh tanshinone I. |
| Wang, et al. 2005 ¹⁶ | <i>Potential anticancer activity of tanshinone IIA against human breast cancer</i> | <ul style="list-style-type: none"> - Tanshinone IIA - BrdU(Roche) - Kultur jaringan media RPMI-1640 - In vitro - In vivo : 13 nude mice, usia 6 minggu, betina, xenograft dengan human ER-negative breast IDC F3 orthotopically, dalam 2 minggu tumor mencapai volume 50mm³, nude mice bertumor dirandom, dibagi menjadi 2 kelompok eksperimental. kelompok treatment diinjeksi dengan 30mg/kgBB tanshinone IIA dilarutkan dalam 0.5% carboxymethyl cellulose(CMC) s.c 3kali/minggu selama 10 minggu. kelompok kontrol diinjeksi dengan saline pada volume yang sama. - Volume tumor diukur dengan ukuran 2 perpendicular | <ul style="list-style-type: none"> - Efek inhibisi tergantung dosis dan waktu, IC₅₀ adalah 0.25µg/ml dan inhibisi maximal pertumbuhan sel (>80%) terjadi pada dosis 1.0µg/ml. - Inhibisi dari proliferasi sel secara statistik signifikan (p<0.05) - Change of gene expression profile : 5gen menunjukkan >3-fold upregulation, dan 6 menunjukkan 3-fold downregulation - Inhibisi dari pertumbuhan tumor human breast IDC-xenografted nude mice (ER-negative) : signifikan inhibisi pertumbuhan tumor pada mice yang diterapi dibanding kontrol. –tidak ada bukti toksitas obat yang diidentifikasi pada hewan yang diberi perlakuan, dikomparasikan dengan berat badan yang meningkat, |

| | | | |
|--|---|--|---|
| | | <p>dimentions menggunakan kaliper dan rumus $(axb^2)/2$, dimana a adalah ukuran terlebar dan b adalah dimensi terkecil dari tumor.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Analisis imunohistokimia dari tumor untuk caspase-3 : sampel tumor dari mice difixasi dalam 4% <i>paraformaldehyde</i> selama 24 jam dan diproses secara konvensional. - Dilakukan analisis statistik dengan <i>one way ANOVA</i>, <i>Tukey's test</i> untuk <i>multiple comparisons</i>, <i>Dunnett's test</i> (2 sided) $p < 0.05$ | <p>perubahan histopathologis pada organ mayor dan analisis biokimia darah pada kedua kelompok.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Meningkatnya ekspresi protein caspase-3 pada tumor, yang signifikan lebih tinggi dibanding mice kontrol. |
| <p>Chin Cheng-Su, Yi-Hsiang Lin 2008¹⁷</p> | <p><i>Tanshinone IIA inhibits human breast cancer cells through increase Bax to Bcl-xL ratios</i></p> | <ul style="list-style-type: none"> - Tanshinone IIA - Aprotinin, antipain, sodium deoxycholate, leupeptin, propidium iodide (PI), sodium orthovanadate, Triton X-100, Tris-HCl, ribonuclease-A and MTT[3-(4,5)-dimethylthiazoliazol-2-yl]-3,5-diphenyltetrazolium bromide] - Dimethyl sulfoxide (DMSO), potassium phosphates and TE buffer - L-15 medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA, and glutamine - Human breast cancer cell line (MDA-MB-231). - Effects of tanshinone IIA on the viability of MDA-MB-231 cells. - Cell cycle analysis for MDA-MB-231 cells treated with tanshinone IIA using a flow cytometry assay. - Western blotting for examining the effect of tanshinone IIA on the expression of Bax, Bcl-xL, p21, caspase-8 and β-actin in MDA-MB-231 cells. - Statistical analysis. Values are presented as a mean \pm SD. Student's t-test was used to analyze the statistical | <ul style="list-style-type: none"> - Perubahan morfologi sel <i>human breast cancer MDA-MB-231</i> respon terhadap variasi konsentrasi tanshinone IIA: menurunkan jumlah sel viable sesuai dengan meningkatnya dosis yang digunakan, memberikan perkiraan bahwa tanshinone IIA Menginduksi kematian sel pada sel MDA-MB-231. - Efek tanshinone IIA pada viabilitas dari sel MDA-MB-231 : IC_{50} adalah 34.14 ± 4.55, 11.85 ± 0.29 dan 2.40 ± 0.02 $\mu\text{g/ml}$ <i>respectively</i>, ketika sel MDAMB-231 diterapi dengan tanshinone IIA dengan durasi yang berbeda (24, 48 dan 72 j). Proliferasi sel <i>colo 205</i> tampak dihambat oleh tanshinone IIA pada perlakuan yang tergantung oleh waktu dan dosis pemberian. - Tanshinone IIA menginduksi apoptosis pada sel MDA-MB-231: <i>Western blot analysis</i> menunjukkan efek tanshinone IIA pada protein Bax, Bcl-xL, p21, caspase-8 dan β-actin pada sel MDA-MB-231: tanshinone IIA meningkatkan ekspresi protein Bax, p21 dan caspase-8. Tanshinone IIA |

| | | | |
|--|--|---|--|
| | | significance and $p < 0.05$ was considered significant for all tests. | menurunkan ekspresi protein Bcl-xL |
| Qing Lu, Purong Zhang, Xin Zhang and Jie Chen 2009¹³ | <i>Experimental study of the anti-cancer mechanism of tanshinone IIA against human breast cancer</i> | <ul style="list-style-type: none"> - Cell lines and cultures. Human breast cancer MCF-7 (ERpositive) and MDA-MB-231 (ER-negative) cell lines. - Chemicals and reagents. Tanshinone IIA (Tan IIA) Tamoxifen - Mouse anti-human P53, cerbB-2 and bcl-2 monoclonal antibodies - Cytotoxicity assays (MTT assay). - BrdU incorporation in vitro. - Flow cytometry. - Tumor xenograft study in vivo. 36 nude mice, 5 week old, female, average weight 20 ± 2 g were randomized into two clusters, each containing 18 nude mice. orthotopically xenotransplanted with 0.3 ml human ER-positive breast cancer cells MCF-7 or ER-negative breast cancer cells MDA-MB-231 At 2 weeks, the tumors reached in volume and the tumor-bearing mice in each cluster were randomized into 3 experimental groups. - The treatment group (n=6) of each cluster was injected with 30 mg/kg tanshinone IIA dissolved in 99% ethanol and 1% Tween-20 (tanshinone IIA for a final concentration of 10 mg/ml, ethanol concentration of 10%) s.c. 4 times/week for 4 weeks. The positive control tamoxifen group (n=6) of each cluster was fed tamoxifen (4 mg/kg per day) dissolved in 99% ethanol and 1% Tween-20 also for 4 weeks (tamoxifen at a final concentration of 1 mg/ml, ethanol concentration of 10%). The control group (n=6) of each cluster was injected with the same volume of 99% | <ul style="list-style-type: none"> - Growth inhibitory effect of tanshinone IIA on human breast cancer cells: tamoxifen has no effect on ERnegative breast cancer cells. Compared with the tamoxifen group, tanshinone IIA demonstrated greater inhibitory activity on both MCF-7 and MDA-MB-231 ($P < 0.05$). - Inhibition of cell proliferation. In the tanshinone IIA treated Group significantly lower than those quantified in the untreated controls ($43.9 \pm 5.1\%$) and in the tamoxifen group ($37.9 \pm 3.9\%$) (both $P < 0.0001$). - Induction of apoptosis by tanshinone IIA. in treated groups much higher index than those obtained for the tamoxifen group and the untreated controls In MDA-MB-231 cells, an apoptosis index was observed in the tanshinone IIA-treated groups which was much higher than those obtained for the tamoxifen group and the untreated controls. - <i>Cell apoptosis in vivo</i>: the treated group displayed a significantly higher value than the other groups - <i>P53, cerbB-2 and bcl-2 protein expression in tumors</i>. the expression of P53 and bcl-2 was lower than in the control mice but no significant difference in the expression of cerbB-2 was found between the two groups ($P = 0.19$); |

| | | | |
|--|---|---|--|
| | | <p>ethanol and 1% Tween-20 (ethanol concentration of 10%).</p> <p>Observation and measurement of specimen preparation. by measuring the two perpendicular dimensions using a caliper and the formula $(a \times b^2)/2$, where a is the larger and b is the smaller dimension of the tumor.</p> <p>After 4 weeks of treatment, mice were euthanized and tumors completely removed in 30 min and then dissected from their envelopes; tumors were then weighed and the following calculations were performed:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Immunohistochemical analysis of tumors for P53, cerbB-2, and bcl-2 protein expression. | |
| <p>Chin-Cheng Su, Su-Yu Chien, Shou-Jen Kuo, Yao-Li Chen, Chun-Yuan Cheng, Dar-Ren Chen 2012²⁰</p> | <p><i>Tanshinone IIA inhibits human breast cancer MDA-MB-231 Cells by decreasing LC3-II, Erb-B2 and NF-kBp65.</i></p> | <p>In vivo, 21 ekor nude SCID mencit, usia 3 minggu, xenograft dg MDA-MB231sel kanker payudara manusia, 28 hari diobservasi dalam lingkungan bebas patogen. Dibagi 3 kelompok, masing-masing kelompok diberi 20 dan 60 mg/KgBB Tan-IIA yang dilarutkan dalam minyak jagung. Kontrol diberikan minyak jagung sebanyak 0,1ml/10g BB. Diberikan per oral setiap hari, selama 3 bulan.</p> <p>Terminasi dengan inhalasi CO₂ pada hari ke 97.</p> <p>Monitor perkembangan tumor.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Volume tumor (mm³) = $L \times W^2/2$ L : length W : Width 2. Berat badan ditimbang tiap 2 hari 3. Tumor dipisahkan, ditimbang masing-masing, diukur ekspresi protein NF-kBp65, caspase 3 dan B actin yang diekstraks dg teknik western blotting, | <p>Tan-IIA signifikan mengecilkan ukuran tumor.</p> <p>Pada Tan II-A 60mg/KgBB menurunkan berat tumor secara signifikan dibanding kelompok kontrol.</p> <p>Pada ke 2 dosis, menunjukkan adanya efek inhibisi terhadap pertumbuhan tumor.</p> <p>Pada penelitian lanjutan, tampak bahwa mencit yang memperoleh Tan-IIA mengalami pertumbuhan tumor yang lambat dibanding yang tidak menerima Tan-IIA.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Menaikkan ekspresi protein caspase 3 - Menurunkan ekspresi protein NF-kBp65 - 48jam setelah diberikan Tan-IIA, tampak penurunan ekspresi protein Erb-B2 dan LC3-II, hal ini tidak sesuai dengan penelitian lain yang menunjukkan penurunan ekspresi P53 dan Bcl-2, tapi tidak pada Cerb-2 <p>Studi terbaru menunjukkan bahwa, anti kanker payudara Tan-IIA adalah melalui penurunan ekspresi Erb-B2 dan</p> |

Penelitian ini berbeda dari sebelumnya karena penelitian ini akan menggunakan ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge*, sedangkan penelitian terdahulu hanya menggunakan kandungan aktif saja. Penelitian terdahulu, echinaceae dan katekin, didapatkan hasil bahwa, kondisi komponun akan lebih baik hasilnya dibanding hanya salah satu zat aktif saja.^{18,19}

Penelitian ini menggunakan mencit jenis C3H, dimana diharapkan mencit ini akan lebih kuat bertahan hidup, meskipun menderita tumor payudara. Penelitian sebelumnya menggunakan *nude mice*, yang memiliki kekebalan tubuh paling rentan, diantara semua jenis mencit, sehingga sangat mudah untuk diinokulasikan sel tumor, tetapi juga mudah mati.

Penelitian ini juga menggunakan tumor mammae yang akan dibuktikan pada terminasi 1 ekor mencit di hari ke-14 adaptasi, untuk memastikan tumor yang tumbuh adalah tumor payudara.

Penelitian ini akan menganalisis perbedaan ekspresi p53 dan Bcl2 yang merupakan komponen-komponen protein pada keganasan yang mengalami perubahan secara biologi molekuler, pada proses terjadinya apoptosis karsinoma mammae mencit C3H yang diberi ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* dosis bertingkat dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi.