

**TESIS**

**Studi In Silico dan In Vitro Ekstrak Etanol Daun Prasman  
(Eupatorium triplinerve Vahl) Dalam Menginduksi Jalur Apoptosis  
Sel Kanker Payudara MCF-7**

Disusun dan diajukan oleh

**DESI DWIROSALIA NINGSIH SUPARMAN**

**P062191026**



**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK**

**SEKOLAH PASCASARJANA**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2021**

**Studi In Silico dan In Vitro Ekstrak Etanol Daun Prasman  
(*Eupatorium triplinerve Vahl*) Dalam Menginduksi Jalur Apoptosis  
Sel Kanker Payudara MCF-7**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Ilmu Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

**DESI DWIROSALIA NINGSIH SUPARMAN**

kepada

**SEKOLAH PASCASARJANA**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2021**

**LEMBAR PENGESAHAN TESIS****STUDI IN SILICO DAN IN VITRO EKSTRAK ETANOL DAUN  
PRASMAN (EUPATORIUM TRIPLINERVE VAHL) DALAM  
MENGINDUKSI JALUR APOPTOSIS SEL KANKER PAYUDARA  
MCF-7****DESI DWIROSALIA NINGSIH SUPARMAN****Nomor Pokok P062191026**

Telah dipertahankan dihadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Ilmu Biomedik  
Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin  
pada tanggal 21 September 2021  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

**Menyetujui**

Pembimbing Utama

Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc  
NIP : 1977 0121 2003 12 2003

Pembimbing Pendamping

dr. M. Aryadi Arsyad M.BiomedSc, Ph.D  
NIP : 1976 0820 2002 12 1003

Ketua Program Studi  
Ilmu Biomedik

Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc  
NIP : 1977 0121 2003 12 2003

Dekan Sekolah Pascasarjana  
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc  
NIP : 1967 0308 1990 03 1001

## PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Desi Dwirosalia Ningsih Suparman  
NIM : P062191026  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Jenjang : S2

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul

**Studi In Silico dan In Vitro Ekstrak Etanol Daun Prasman  
(*Eupatorium triplinerve Vahl*) Dalam Menginduksi Jalur Apoptosis  
Sel Kanker Payudara MCF-7**

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain bahwa Tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila di kemudian hari terbukti terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Tesis ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, ..18/OKTOBER/...2021

Yang Membuat Pernyataan,

  
Desi Dwirosalia N.S.

## PRAKATA

Dengan memanjatkan puji dan syukur kepada Allah *Subhaanahu Wata'ala*, atas segala berkat, karunia serta perlindungan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Studi Magister Ilmu Biomedik Konsentrasi Biokimia dan Biologi Molekuler Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar.

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada **Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc** sebagai pembimbing I yang telah memberikan banyak dukungan dan saran serta pengalaman dari awal penyusunan proposal, pelaksanaan penelitian, penyusunan, hingga ujian tesis. Penulis juga menyampaikan terima kasih atas kepada **dr. Muhammad Aryadi Arsyad, M.BiomedSc, Ph.D** selaku pembimbing II atas bimbingan dan ilmu yang telah diberikan selama pelaksanaan tugas akhir ini. Kepada tim penguji **Prof. dr. Rosdiana Natsir, Ph.D Sp.Biok(K), dr. M. Husni Cangara Ph.D, Sp.PA DFM dan Dr.dr. Ilhamjaya Patellongi, M.Kes** atas kritik dan saran yang membangun sehingga membantu penulisan tesis ini menjadi lebih baik.

Penulis juga menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Kedua orang tua, **Ibu Rosita Lumaela Rahimahullahu dan Bapak Junaidi** yang telah memberikan restu dan dukungan untuk penulis melanjutkan pendidikan, disertai dengan doa tulus sehingga penulis

bisa menyelesaikan pendidikan hingga jenjang ini.

2. Suami, **Karismananda**, atas dukungan, pengertian, dan ilmu serta pengalaman yang tak henti diberikan agar penulis bisa menyelesaikan studi dengan baik. Tak lupa ananda tercinta, **Taka Zaki**, yang memberikan kasih sayang dan dukungan setiap harinya secara tak langsung kepada penulis sebagai seorang ibu.
3. Laboran dan staf Laboratorium Hasanuddin University Medical Research Center (HUM-RC) RSPTN UNHAS, Ibu Hijral Aswad, Ibu Handayani, dan Pak Syafri yang membantu dalam melaksanakan prosedur penelitian.
4. Keluarga besar lainnya dan semua pihak yang namanya tidak tercantum namun telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

Semoga tesis ini memberikan manfaat dalam perkembangan ilmu pengetahuan di lingkungan akademisi Universitas Hasanuddin maupun secara luas pada lingkungan akademisi nasional sekarang dan di masa yang akan datang.

Makassar, Agustus 2021

Desi Dwirosalia Ningsih S

## ABSTRAK

**DESI DWIROSALIA NINGSIH S.** *Studi In Silico dan In Vitro Ekstrak Etanol Daun Prasman (Eupatorium triplinerve Vahl) Dalam Menginduksi Jalur Apoptosis Sel Kanker Payudara MCF-7* (dibimbing oleh **Ika Yustisia** dan **M. Aryadi Arsyad**)

Terapi kombinasi dengan fitoterapi adalah salah satu modalitas terapi kanker yang banyak diteliti akhir-akhir ini untuk mendapatkan hasil terapi yang lebih optimal dibandingkan kemoterapi tunggal. Tujuan penelitian ini melakukan uji *in silico* antara senyawa turunan kumarin pada daun Prasman, ayapanin dan ayapin, terhadap protein Bcl-2 dan mengidentifikasi efek sitotoksisitas daun Prasman, efek sinergisitas, serta ekspresi mRNA Bcl-2 dan Bax pada sel MCF-7. Studi *in silico* dilakukan dengan *command* Autodock Vina. Sitotoksisitas terhadap sel MCF-7 menggunakan MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) untuk menilai viabilitas sel. Efek sinergisitas antara ekstrak etanol daun Prasman dan Doxorubicin dihitung dengan Indeks Kombinasi. Uji ekspresi mRNA Bcl-2 dan Bax untuk menilai jalur intrinsik apoptosis menggunakan sampel kultur MCF-7 dengan pemberian ekstrak etanol daun Prasman dosis 100  $\mu\text{g/mL}$  dan 200  $\mu\text{g/mL}$ . Hasil penelitian menunjukkan bahwa afinitas antara senyawa ayapanin dan ayapin terhadap protein anti-apoptosis BCL-2 adalah -6.3 kcal/mol dan -6.9 kcal/mol. Nilai  $\text{IC}_{50}$  ekstrak etanol daun Prasman terhadap MCF-7 adalah 201  $\mu\text{g/mL}$ . Efek sinergisitas dengan Indeks Kombinasi optimum (IK 0,4) adalah pada dosis ekstrak etanol daun Prasman 50  $\mu\text{g/mL}$  dan doxorubicin 0,25  $\mu\text{g/mL}$ . *Real time* PCR mRNA Bcl-2 menunjukkan penurunan nilai ekspresi relatif sedangkan pada mRNA Bax terjadi peningkatan nilai ekspresi relatif dibandingkan kontrol dengan medium kultur. Kesimpulan dari penelitian ini adalah senyawa pada ekstrak etanol daun Prasman menginduksi apoptosis sel MCF-7 melalui interaksi dengan gen Bcl-2 dan Bax.

**Kata kunci :** Kanker Payudara, Sitotoksisitas, Sinergisitas, Prasman, Bcl-2, Bax

## ABSTRACT

**DESI DWIROSALIA NINGSIH S.** *In Silico and In vitro Studies of Ethanol Extract of Eupatorium triplinerve Vahl leaves to Induce Apoptosis Pathway on MCF-7 cell lines* (Supervised by **Ika Yustisia** dan **M. Aryadi Arsyad**)

A combined therapy using phytotherapy become a popular research which intend to establish better outcome of cancer treatment compared with single chemotherapy. This study aims to perform in silico study between coumarine derivatives, ayapanin and ayapin, in Eupatorium triplinerve Vahl (ETV) leaves extract, and Bcl-2 protein, in vitro study of cytotoxic and synergism effect, and Bcl-2 and Bax gene expression in MCF-7 cell lines. In silico study is conducted using command Autodock Vina. Cytotoxic activity of leaves extract is measured by MTT assay at 600 nm. The Synergism effect between ETV leaves extract and Doxorubicin are established using Combination Index (CI). Relative expression of Bcl-2 and Bax are calculated after treated with 100 and 200 µg/mL of leaves extract. The result reveals that the affinity between ayapanin and ayapin to Bcl-2 protein are -6.3 and -6,9 kcal/mol respectively. ETV leaves extract is showed cytotoxic activity on MCF-7 with IC<sub>50</sub> 201 µg/mL. The Synergism effect exhibit an optimum Combination Index (CI 0,4) at dose 50 µg/mL of ETV leaves extract and 0,25 µg/mL of Doxorubicin. Real time PCR result demonstrates a decrease of relative expression level of Bcl-2 mRNA while relative expression of Bax are increase slightly compared with control sample. It can be concluded that compounds in ETV leaves extract could induce apoptosis in MCF-7 through interaction with Bcl-2 and Bax genes.

**Key words :** Breast cancer, Cytotoxic, synergism, Eupatorium triplinerve Vahl, Bcl-2, Bax

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGANTAR .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS .....	iv
PRAKATA .....	v
ABSTRAK .....	vii
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Rumusan Masalah .....	5
C. Tujuan Penelitian .....	5
D. Manfaat Penelitian .....	6
E. Ruang Lingkup Penelitian .....	7
G. Sistematika Penulisan.....	8
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	9
A. Tanaman Prasman .....	9
1. Manfaat dan Kandungan.....	10
B. Kanker Payudara .....	11
1. Prevalensi dan Epidemiologi.....	12

2. Etiologi .....	13
3. Patogenesis Kanker Payudara.....	27
4. Klasifikasi Kanker Payudara .....	14
5. Sel Kanker Payudara MCF-7 .....	21
C. Kematian Sel .....	22
D. Instrumen penelitian .....	24
1. <i>Microplate Reader</i> .....	24
2. <i>Real Time Polimerase Chain Reaction</i> .....	25
3. <i>Moleculer Docking</i> .....	26
E. Kerangka Teori dan Kerangka Konseptual .....	28
F. Hipotesis .....	32
G. Definisi Operasional .....	32
BAB III. METODE PENELITIAN.....	38
A. Rancangan Penelitian.....	38
B. Waktu dan Lokasi Penelitian.....	39
C. Populasi dan Sampel .....	40
D. Teknik Pengumpulan Data .....	41
1. Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Prasman .....	41
2. Pembuatan Ekstrak dengan Metode Maserasi .....	41
3. Uji Penapisan Fitokimia (Kromatografi lapis Tipis).....	42
4. Penumbuhan Sel Kanker MCF-7 .....	43
5. Subkultur Sel Kanker MCF-7 .....	44
6. Uji Sitotoksisitas.....	46

7. Uji Sinergisitas .....	47
8. Isolasi RNA .....	51
9. <i>Real Time</i> PCR .....	53
10. <i>Moleculer Docking</i> .....	55
E. Analisis Data.....	58
BAB IV. HASIL PENELITIAN .....	59
A. Kandungan Fitokimia pada Ekstrak Etanol Daun Prasman.....	59
B. Efek Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Prasman pada Berbagai Konsentrasi terhadap Viabilitas Sel Kanker MCF-7 .....	60
C. Efek Sinergisitas Ekstrak Etanol Daun Prasman dan Doxorubicin Terhadap Kultur Sel Kanker MCF-7 .....	64
D. Ekspresi mRNA Bcl-2 kultur Sel Kanker MCF-7 Akibat Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Prasman.....	66
E. Ekspresi mRNA Bax Kultur Sel Kanker MCF-7 Akibat Perlakuan Ekstrak Etanol Daun Prasman.....	68
F. <i>Moleculer Docking</i> Senyawa Ayapanin dan Ayapin terhadap protein Bcl-2.....	70
BAB V. PEMBAHASAN.....	74
BAB VI. PENUTUP .....	80
1. Rangkuman .....	80
2. Kesimpulan .....	81
3. Saran .....	81

DAFTAR PUSTAKA .....	82
LAMPIRAN.....	87

## DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Faktor Resiko Terjadinya Kanker Payudara .....	14
2. Subtipe Kanker Payudara Secara Histopatologi.....	20
3. Reagen Pereaksi Uji Kromatografi Lapis Tipis untuk Lima Senyawa Metabolit Sekunder.....	44
4. Data Hasil Ekstraksi Daun Tanaman Prasman.....	59
5. Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol Daun Prasman .....	59
6. Hasil Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Prasman Pada Kultur Sel MCF-7 dengan menggunakan MTT assay .....	61
7. Hasil Uji Sitotoksik Doxorubicin Pada Kultur Sel MCF-7 dengan menggunakan MTT assay .....	62
8. Interpretasi Nilai Indeks Kombinasi .....	64
9. Data Uji Sinergisitas Ekstrak Etanol Daun Prasman dan Doxorubicin Pada Berbagai Dosis .....	65
10. Perbandingan Ekspresi mRNA Bcl-2 secara kuantitatif Relatif antara Sampel Pemberian Ekstrak Etanol Daun Prasman, Doxorubicin, dan Medium Kultur.....	67

11. Korelasi antara Ekspresi mRNA Bcl-2 dan Dosis Ekstrak Etanol Daun Prasman serta Doxorubicin .....	68
12. Perbandingan Ekspresi mRNA Bax secara kuantitatif Relatif antara Sampel Pemberian Ekstrak Etanol Daun Prasman, Doxorubicin, dan Medium Kultur .....	68
13. Korelasi antara Ekspresi mRNA Bax dan Dosis Ekstrak Etanol Daun Prasman serta Doxorubicin .....	69
14. Hasil Docking Antara Beberapa Ligan Dengan Protein Bcl-2 .....	73

## DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Tanaman Prasman ( <i>Eupatorium triplinerve Vahl</i> ).....	9
2. Kerangka Teori yang Menggambarkan Hubungan Antara Variabel yang Diteliti dengan Teori.....	29
3. Kerangka Konseptual yang Menggambarkan Hubungan Antara Variabel Bebas, Variabel Antara, dan Variabel Terikat.....	30
4. Diagram Alur Penelitian.....	57
5. Gambar Persentase Viabilitas Sel MCF-7 Setelah 24 Jam Pemberian Ekstrak Etanol Daun Prasman .....	61
6. Gambar Persentase Normalisasi Absorbansi Terhadap Log. Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Prasman.....	62
7. Gambar Persentase Viabilitas Sel MCF-7 Setelah 24 Jam Pemberian Doxorubicin .....	63
8. Gambar Persentase Normalisasi Absorbansi Terhadap Log. Konsentrasi Doxorubicin.....	63
9. Viabilitas Sel MCF-7 Hasil Uji Sinergisitas antara Ekstrak Etanol Daun Prasman dan Doxorubicin Pada berbagai Dosis.....	65
10. Validasi Metode Dengan <i>Redocking</i> Ligan J1H.....	71
11. Struktur 2D Senyawa Ayapanin (A) dan Ayapin (B).....	71

12. Visualisasi 3D Kompleks Interaksi Antara Ligan Ayapanin (A) dan Ayapin (B) Terhadap Protein Bcl-2 Dikantong Hidrofobik yang Sama .....	72
--	----

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. Latar Belakang Masalah**

Kanker payudara merupakan karsinoma yang berasal dari jaringan payudara yang lebih sering ditemukan pada wanita dibandingkan pria. Berdasarkan data GLOBOCAN 2018, kanker paru-paru, kanker payudara, dan kolorektal adalah tiga kanker dengan insidens tinggi dan termasuk lima penyebab kematian tertinggi (IARC, 2018). Di Indonesia sendiri, data GLOBOCAN 2018 menunjukkan kanker payudara menduduki peringkat pertama kanker dengan temuan kasus baru (16.7%) pada pria maupun wanita. Khusus pada kelompok wanita, kanker payudara merupakan kanker dengan temuan kasus baru terbanyak pada 2018, yakni berjumlah 58 256 (30.9%) kasus (World Health Organization, 2019).

Upaya pengobatan terhadap penyakit ini terus berkembang selama empat puluh tahun terakhir, dimulai dari tata laksana bedah, kemudian perlahan mulai bergeser ke arah pengobatan non bedah yang bersifat sistemik, dengan berkembangnya alat – alat diagnostik, yang memudahkan penilaian derajat keganasan tumor (Morrow, 2019). Saat ini tren pengobatan kemoterapi mengalami pergeseran dari penggunaan mono terapi menjadi multi terapi pada metode tatalaksana berbagai jenis kanker, termasuk kanker payudara. Hal ini bertujuan untuk menghambat berbagai jalur pensinyalan pertumbuhan sel kanker. Konsep inilah yang mendasari penerapan fitoterapi dalam terapi kanker, yakni ekstrak tanaman memiliki

berbagai kandungan senyawa bioaktif yang dapat berpotensi menimbulkan efek sinergi pada terapi kanker (Tor *et al.*, 2015).

Salah satu tumbuhan yang dikenal sebagai tumbuhan obat tradisional adalah prasman. Tanaman yang memiliki nama latin *Eupatorium triplinerve V.* tidak hanya dikenal sebagai tanaman obat di Indonesia, tetapi juga digunakan untuk tujuan pengobatan di negara lain seperti Brazil, India, Sri Langka, Bangladesh, Mauritius, dan Peru (Taylor, 2006). Penelitian-penelitian *in vivo* maupun *in vitro* mengenai prasman telah memberikan data bahwa prasman memiliki aktivitas anti inflamasi, anti nosiseptif, anti bakteri, anti jamur, dan anti ulkus (Arung *et al.*, 2012) . Penelitian *in vitro* potensi ekstrak etanol daun prasman terhadap kanker payudara membuktikan bahwa tanaman ini mampu menghambat proliferasi dan menyebabkan apoptosis pada model sel kanker MCF-7 (Hariyanto,2019).

Efektivitas prasman dalam hal pengobatan medis disebabkan karena berbagai fitokimia pada tanaman tersebut. Beberapa hasil eksperimen menyebutkan bahwa daun prasman mengandung minyak esensial, senyawa ayapanin dan ayapin, stigmasterol, metilen eter esculetin, vitamin c serta karoten (Cheriyana,2019) .Penelitian lain mengenai tanaman ini di India menyatakan bahwa ekstrak daun prasman mengandung banyak fitokimia antara lain flavonoid, tannin, steroid, triterpenoid, kumarin, dan minyak volatile (Sugumar, Karthikeyan and Gowdhami, 2014).

Flavonoid, senyawa polifenol pada tanaman, dalam berbagai penelitian dekade terakhir ini menunjukkan potensi untuk mencegah dan mengobati kanker serta berbagai penyakit kronik. Flavonoid memiliki kemampuan untuk memodulasi pensinyalan tumor, mengatasi kemo resistensi, serta re-edukasi lingkungan mikro dari tumor (TME) (Sudhakaran, Sardesai and Dose, 2019). Berkaitan dengan kanker payudara, penelitian membuktikan bahwa flavonoid menunjukkan aktivitas baik pada sel kanker dengan reseptor estrogen (+) maupun reseptor estrogen (-), meskipun penelitian lain menyebutkan bahwa aktivitas ini lebih menjanjikan pada tipe sel kanker yang sensitif terhadap estrogen. (Sak, 2014) Flavonoid dan asam fenolik yang ditemukan pada tanaman memiliki eefektivitas anti kanker dan kemopreventif melalui mekanisme penghentian siklus sel, induksi apoptosis, supresi angiogenesis, aktivitas antioksidan dan memperbaiki resistensi obat (Sak, 2014). Selain senyawa di atas, kumarin yang terdapat pada prasman memiliki potensi sebagai anti tumor dengan berbagai jalur dan telah teruji pada pada penelitian dengan model sel kanker payudara MCF-7 (Klenkar and Molnar, 2015). Penelitian Huong *et al* melaporkan daun Prasman mengeluarkan bau khas kumarin dan ditemukan isolat ayapanin (herniarin, 7-metoksikumarin) dan ayapin (6,7-methylenedioksikumarin) (Huong, Giang and Trang, 2020). Ayapanin dan ayapin dilaporkan bersifat sitotoksik terhadap sel kanker, termasuk sel kanker resisten obat, penghambat aktivitas bakteri, serangga, serta virus,

dan memiliki efek hemostatis dan berperan dalam proses koagulasi darah (Pooten, Oyong and Cruz, 2018).

Salah satu penyebab terjadinya transformasi maligna adalah kemampuan sel untuk menghindari proses fisiologi kematian sel (apoptosis) (Tor *et al.*, 2015). Secara umum, mekanisme ini dapat terjadi karena: 1) gangguan keseimbangan protein apoptosis dan antiapoptosis, 2) penurunan fungsi kaspase, dan 3) kerusakan reseptor pensinyalan apoptosis (Wong, 2011). Protein keluarga Bcl-2 terdiri atas protein-protein pro-apoptosis dan anti-apoptosis yang berperan dalam regulasi apoptosis terutama melalui jalur intrinsik atau yang dikenal juga sebagai jalur mediasi mitokondria (Wong, 2011; Tor *et al.*, 2015). Bcl-2 adalah salah satu anggota protein anti-apoptosis. Sebaliknya, Bax adalah salah satu anggota protein pro-apoptosis. Disregulasi apoptosis terjadi jika terdapat gangguan keseimbangan antara kedua kelompok protein ini. Hal ini mungkin terjadi akibat adanya ekspresi berlebihan dari satu atau lebih protein anti-apoptosis atau penurunan ekspresi dari kelompok protein pro-apoptosis atau bahkan kombinasi antara keduanya (Wong, 2011).

Berdasarkan teori yang telah dipaparkan di atas, maka pada penelitian tesis ini kami mengambil judul **“Studi In Silico dan In Vitro Ekstrak Etanol Daun Prasman (*Eupatorium triplinerve Vahl*) Dalam Menginduksi Jalur Apoptosis Sel Kanker Payudara MCF-7”**

## B. Rumusan Masalah

Adapun yang menjadi rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Apa kandungan fitokimia yang ada pada ekstrak etanol daun Prasman ?
2. Bagaimana efek sitotoksik ekstrak etanol daun Prasman pada berbagai dosis terhadap viabilitas sel kanker payudara MCF-7 ?
3. Bagaimana efek sinergisitas antara ekstrak etanol daun Prasman dan Doxorubicin terhadap viabilitas sel kanker payudara MCF-7 ?
4. Bagaimana ekspresi mRNA Bcl-2 sel kanker payudara MCF-7 akibat perlakuan dengan ekstrak etanol daun Prasman?
5. Bagaimana ekspresi mRNA Bax sel kanker payudara MCF-7 akibat perlakuan dengan ekstrak etanol daun Prasman?
6. Bagaimana interaksi antara turunan senyawa kumarin yang terdapat pada daun *Eupatorium triplinerve* Vahl, yakni ayapanin dan ayapin, terhadap reseptor protein BCL-2 melalui metode *moleculer docking*?

## C. Tujuan Penelitian

### 1. Tujuan Umum

Melakukan uji *in silico* dan mengidentifikasi aktivitas sitotoksik, efek sinergisitas, dan ekspresi mRNA Bcl-2 dan Bax ekstrak etanol daun Prasman (*Eupatorium triplinerve* V.) pada sel kanker payudara MCF-7

### 2. Tujuan Khusus

- a. Mengetahui kandungan fitokimia pada ekstrak daun Prasman.

- b. Mengetahui efek sitotoksik ekstrak etanol daun Prasman pada berbagai dosis terhadap viabilitas sel kanker payudara MCF-7 .
- c. Mengetahui efek sinergisitas antara ekstrak etanol daun Prasman dan Doxorubicin terhadap viabilitas sel kanker payudara MCF-7 .
- d. Mengetahui ekspresi mRNA Bcl-2 sel kanker payudara MCF-7 dengan pemberian ekstrak etanol daun Prasman.
- e. Mengetahui ekspresi mRNA Bax sel kanker payudara MCF-7 dengan pemberian ekstrak etanol daun Prasman.
- f. Mengetahui interaksi antara turunan senyawa kumarin yang terdapat pada daun Prasman (*Eupatorium triplinerve Vah*), yakni ayapanin dan ayapin, terhadap reseptor protein BCL-2 melalui metode *moleculer docking*

#### **D. Manfaat Penelitian**

Manfaat penelitian ini adalah :

##### **1. Manfaat Pengembangan Ilmu Pengetahuan**

Penelitian ini diharapkan dapat menambah khasanah ilmu pengetahuan dan menjadi bahan bacaan tentang potensi sitotoksik, efek sinergisitas, dan ekspresi mRNA Bcl-2 dan Bax ekstrak etanol daun Prasman (*Eupatorium triplinerve V.*) pada sel kanker payudara MCF-7. Selain itu dapat menambah pengetahuan mengenai *moleculer docking* antara molekul protein Bcl-2 dan senyawa ayapanin dan ayapin.

## 2. Manfaat Aplikatif

Penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat aplikatif berupa informasi agen terapi tambahan/kemopreventif pada kanker payudara disamping terapi konservatif yang telah ada saat ini.

### **E. Ruang Lingkup Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian terbatas dalam beberapa aspek. Studi *in silico* dilakukan untuk menilai interaksi antara senyawa Ayapanain dan Ayin terhadap protein Bcl-2 dengan bantuan perangkat lunak Autodock Vina. Untuk tahap penelitian lainnya, daun Prasman yang digunakan adalah tanaman Prasman yang berasal dari area sekolah Pasca Sarjana Universitas Hasanuddin. Daun Prasman kemudian akan diekstraksi dengan pelarut etanol 96%. Beberapa gram hasil ekstraksi digunakan untuk uji fitokimia dan sisanya digunakan untuk uji sitotoksisitas dan efek sinergisitas pada sel MCF-7 dengan menggunakan *microplate reader*. Ekspresi mRNA Bcl-2 dan Bax pada sel kanker payudara MCF-7 yang diberikan ekstrak etanol daun Prasman diisolasi untuk mendapatkan *rinonucleic acid* (RNA), sintesis DNA (cDNA), dan dilanjutkan dengan analisis *real time polymerase chain reaction* (PCR).

## **F. Sistematika Penulisan**

Proposal penelitian ini tersusun dari enam bab. Bab pertama berisi latar belakang masalah, rumusan masalah, tujuan, manfaat, ruang lingkup, dan sistematika penelitian. Pada bab kedua, dibahas mengenai teori-teori untuk mendukung penelitian yang diikuti dengan kerangka konseptual, hipotesis, serta definisi operasional. Bab ketiga membahas mengenai metode penelitian, dimulai dari rancangan penelitian, lokasi dan waktu, populasi dan teknik sampel, instrument pengumpul data, serta analisis data secara statistik. Bab keempat memuat hasil penelitian. Bab kelima yakni pembahasan yang mendefinisikan hasil penelitian secara detail. Bagian terakhir, yakni bab keenam merupakan bab penutup yang berisi kesimpulan dan saran.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Tanaman Prasman (*Eupatorium triplinerve Vahl*)

Prasman (*Eupatorium triplinerve V.*) adalah tanaman ornamental herbal, yang masuk dalam keluarga tanaman Astarecea, yang berumur panjang , memiliki daun aromatik, dan dapat tumbuh hingga mencapai 20 – 30 cm. Asal mula tanaman ini adalah Amerika Selatan dan dapat ditemukan di negara-negara yang masuk pada benua tersebut, seperti Guyana, Peru, Brazil, dan Ekuador. Namun, tanaman yang memiliki tiga nama latin ini (*Ayapana triplinervis*, *Eupatorium ayapana*, dan *Eupatorium triplinerve*) juga dapat ditemukan di negara-negara beriklim tropis, termasuk Indonesia (Taylor, 2006).



Gambar 1. Tanaman Prasman (*Eupatorium triplinerve V.*)

## 1. Manfaat dan Kandungan Tanaman Prasman

Tanaman ini telah lama digunakan sebagai media pengobatan oleh nenek moyang negara-negara Amerika Selatan. Selain berkhasiat untuk meredakan gejala mual-muntah, diare, batuk, dan demam, Prasman dipercaya memiliki efek anti neoplastik dan digunakan dalam pengobatan penyakit kanker. Pada sistem pengobatan herbal Peru, tanaman ini digolongkan dalam tanaman dengan anti kanker (Taylor, 2006).

Prasman juga telah lama digunakan oleh masyarakat Indonesia sebagai tanaman obat tradisional yang secara empiris digunakan untuk mengobati penyakit peluruh kencing, penambah nafsu makan, Pereda demam, penghenti perdarahan, obat batuk, anti tumor dan mioma uterus Dalimartha (1999) . Sedangkan menurut Chairul dan Sutaryo (1996), daun prasman mengandung senyawa polifenol dan flavonoid, dimana kedua senyawa ini disebut sebagai senyawa anti tumor dan telah dibuktikan oleh berbagai penelitian akhir-akhir ini. Penelitian ekstrak daun prasman yang dilakukan di India menunjukkan bahwa pada daun prasman mengandung fito kimia yakni flavonoid, saponin, tannin, glikosid, steroid, koumarin, dan minyak volatil.

Selain flavonoid, Prasman juga dikenal sebagai tanaman yang akan senyawa kimia koumarin. Jenis koumarin yang terdapat pada Prasman adalah hernarin (7-metroksikoumarin), yang memiliki efek anti tumor. Penelitian Watanabe 2005 melaporkan bahwa senyawa ini bersifat toksik pada sel kanker, termasuk sel kanker leukemia, dan sel kanker yang multi

resisten terhadap pengobatan (Taylor, 2006). Kumarin dapat menghambat enzim telomerase, aktivitas protein kinase, dan menghambat ekspresi onkogen atau induksi apoptosis yang dimediasi kaspase-9, menekan proliferasi kanker dengan mengistirahatkan sel pada fase G0/G1, G2/M dan mempengaruhi p-gp dari sel kanker. Penelitian oleh Marshal dkk (1994) menunjukkan bahwa senyawa kumarin dan hidrosikumarin dapat menghambat pertumbuhan sel kanker seperti, A549 (lung), ACHN (renal), H727 (paru-paru MCF7 (mammar) dan HL-60 (leukaemia) (Klenkar and Molnar, 2015).

## **B. Kanker Payudara**

Kanker secara umum dibagi menjadi dua kategori berdasarkan asalnya, yakni karsinoma, berasal dari sel-sel epitel, dan sarkoma, berasal dari tulang dan jaringan lunak. Yang merupakan karsinoma antara lain kanker payudara, prostat, paru – paru, dan kolon, yang memiliki sifat invasif ke jaringan sekitar dan bermetastasis ke limfonodus dan organ tubuh lainnya (Angahar, 2017).

Kanker payudara adalah pertumbuhan abnormal dari sel-sel yang melapisi duktus dan lobulus pada payudara. Klasifikasi kanker payudara didasarkan pada asal sel kanker dari duktus atau lobulus, invasif atau non invasif, dan gambaran mikroskopik kanker tersebut. Dari klasifikasi, kanker payudara ada yang dikelompokkan sebagai non invasive atau *in situ* karsinoma dan invasif atau infiltratif (American Cancer Society, 2006).

Meskipun telah banyak penelitian mengenai kanker payudara, penyebab penyakit ini belum sepenuhnya diketahui. Namun, data epidemiologi menyebutkan bahwa faktor genetik, hormonal, dan lingkungan mungkin sangat berperan dalam menstimulasi pertumbuhan sel kanker payudara (Arafah,2017).

### **1. Prevalensi dan Epidemiologi**

Kanker payudara merupakan kanker yang paling banyak ditemukan pada wanita dan menjadi penyebab kematian utama pada 140 dari 184 negara di dunia. Puncak prevalensi penyakit ini adalah pada wanita usia 40 hingga 59 tahun. Data statistik kanker seluruh dunia menyatakan bahwa ada lebih dari satu juta kasus baru kanker payudara yang terdiagnosis setiap tahun. Kanker ini merupakan kanker terbanyak pada wanita baik pada negara maju dan negara berkembang, dimana 55% kasus ini didapati pada negara berkembang. Di Amerika Serikat, kanker payudara menduduki peringkat kedua setelah kanker paru – paru sebagai kanker penyebab kematian dan merupakan penyebab kematian paling utama pada wanita kelompok usia 40 – 55 tahun. Data lain menyebutkan 2.1 dari delapan wanita di Amerika beresiko terkena kanker payudara sepanjang hidupnya (Angahar, 2017).

Data kanker payudara di Indonesia berdasarkan Riset kesehatan Dasar tahun 2013 menyebutkan bahwa prevalensi kanker payudara di Indonesia mencapai 0.5 per 1000 perempuan. Data dari Sistem Informasi Rumah Sakit tahun 2010, kanker payudara adalah jenis kanker tertinggi yang diderita pasien rawat jalan dan juga rawat inap, yang mencapai 12.014 pasien (Arafah,2017). Data dari GLOBOCAN, *International Agency for Research of Cancer 2018* menyebutkan kanker payudara merupakan kanker yang paling banyak terjadi pada wanita, dengan jumlah kasus baru 58. 256 dan merupakan kanker penyebab kematian utama dengan jumlah kematian 22.692 jiwa (World Health Organization, 2018).

## **2. Etiologi**

Penyebab pasti dari kanker payudara belum sepenuhnya diketahui. Namun, seperti kanker pada umumnya, kanker payudara terjadi akibat berbagai faktor yang tidak sepenuhnya berhubungan, seperti genetik, hormonal, lingkungan, sosiobiologi dan fisiologi yang dapat berkontribusi terhadap pertumbuhan sel kanker (Angahar, 2017).

Tabel 1. Faktor Resiko Terjadinya Kanker Payudara

<b>Faktor keluarga</b>	<b>Paparan hormon endogen dan faktor reproduksi</b>	<b>Paparan hormon eksogen</b>	<b>Gaya hidup</b>
- Genetik	- Menstruasi dini	- Terapi hormonal	- Konsumsi alkohol
- Riwayat keluarga	- Paritas	- Kontrasepsi hormonal	- Merokok
- Riwayat kanker payudara sebelumnya	- Kehamilan		- Aktivitas fisik
	- Menyusui		- Obesitas
	- Menopause usia lanjut		- Radiasi

### 3. Patogenesis Kanker Payudara

Teori yang ada saat ini telah menentukan bahwa sangat banyak faktor yang berperan terhadap transformasi payudara menjadi keganasan, termasuk hormon steroid dan reseptornya, faktor pertumbuhan peptida, onkogen, dan gen supresi tumor. Telah teridentifikasi beberapa petanda yang berperan penting dalam karsinoma payudara, yakni reseptor steroid (reseptor estrogen (ER), reseptor progesterone (PR) dan reseptor asam retinoid (RAR)), anggota reseptor epithelial manusia/ *human epithelial receptor* (HER) / famili *erbB* dan gen supresi tumor tertentu (p53, BRCA1, dan BRCA 2) (Keen and Davidson, 2003).

#### Reseptor steroid

Paparan terhadap siklus estrogen dan progesterone yang berkepanjangan telah diketahui berkontribusi terhadap perkembangan kanker payudara. Hal ini terbukti pada tindak ooforektomi yang

menurunkan resiko kanker payudara. Pada wanita menopause yang memiliki lemak tubuh yang berlebih memiliki tingkat estrogen yang tinggi dan lebih cenderung beresiko menderita kanker payudara. Hal ini disebabkan jaringan lemak memiliki enzim aromatase yang berperan dalam konversi precursor menjadi estrogen (Keen and Davidson, 2003).

Terdapat dua jenis estrogen reseptor yang anggota dari famili reseptor steroid, yakni ER- $\alpha$  dan ER- $\beta$ . Reseptor ini membentuk kompleks inaktif dengan HSP 90. Setelah berikatan dengan ligand dan terpisah dengan HSP 90, reseptor ini mengalami perubahan konformasi, dimerisasi, dan autofosforilasi melalui jalur intrinsik tirosin kinase. Pada bentuk aktif, dimer ER mengikat urutan-urutan rekognisi yang dikenal sebagai elemen respons estrogen (ERE), yang ditemukan di dalam promotor berbagai gen yang mengatur transkripsi gen. Aktivasi ER dapat mengaktifasi jalur mitogen yang teraktivasi protein kinasi (MAPK), yang menyebabkan aktivasi protein AP-1, fos dan jun. Penelitian membuktikan bahwa ER yang berikatan dengan sisi konsensus AP-1 melalui interaksi protein-protein dengan protein AP-1 untuk mengatur proses transkripsi gen (Keen and Davidson, 2003).

Sekitar 70 – 80% dari seluruh kanker payudara memperlihatkan protein ER dan dinamakan kanker payudara positif reseptor estrogen/ positif ER. Jenis tumor ini cenderung berkembang secara lambat, berdiferensiasi baik, dan berkaitan dengan sedikit prognosis yang lebih baik. Sehingga ekspresi ER adalah satu dari beberapa faktor untuk

memperkirakan prognosis, disamping status limfonodus aksiler, ukuran tumor, tingkatan dan sub tipe histologi. Lebih jauh lagi deteksi ER- $\alpha$  pada sel-sel kanker payudara adalah indikator dalam keberhasilan terapi hormonal (Keen and Davidson, 2003).

ER- $\alpha$  dan ER- $\beta$  secara struktural memiliki kesamaan. Homologi DNA di antara keduanya adalah 95% dan homologi sisi ikatan hormonal sebesar 53%.<sup>49</sup> ER- $\beta$  dan ER- $\alpha$  ditunjukkan oleh berbagai jaringan dalam tubuh, seperti glandula mammae, uterus, ovarium, prostat, epididimus, testis, pituitary, ginjal, timus, tulang, dan susunan saraf pusat. Di dalam jaringan mammae, ER- $\beta$  paling tinggi ditunjukkan pada lapisan epitel dan stromal. Penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa ekspresi ER- $\beta$  didapatkan pada karsinoma duktus *in situ* dan karsinoma lobuler, tetapi jumlahnya menurun secara drastis pada tumor stadium terminal. Namun, peran ER- $\beta$  secara umum pada kanker dan kanker payudara secara khusus masih membutuhkan penelitian lebih jauh (Keen and Davidson, 2003).

Gen reseptor progesteron juga merupakan anggota dari keluarga reseptor nucleus. PR memiliki dua isoform yakni PRA dan PRB, dimana keduanya dikode oleh gen yang sama, menggunakan situs awal transkripsi yang berbeda dan menghasilkan protein yang berbeda pada regio terminal aminonya dan aktivitas biologi yang berbeda pula. Konsentrasi protein PRB dilaporkan meningkat pada jaringan kanker payudara, meskipun PRA dan PRB sama-sama ditemukan dalam konsentrasi tinggi pada jaringan normal. Hal ini menyebabkan penurunan rasio PRA:PRB yang dipercaya sebagai

parameter penting untuk mengukur fungsi yang dimediasi progesterone (Keen and Davidson, 2003).

PR juga merupakan prediktor baik dalam keberhasilan terapi kanker. ER + dan PR- dilaporkan bersifat kurang responsive terhadap terapi, di mana hal ini mungkin mengindikasikan bahwa PR mungkin penting untuk mendapatkan hasil positif dalam terapi hormonal. Kemungkinan lain mungkin disebabkan karena ER adalah kunci transkripsi untuk aktivasi PR, hilangnya ekspresi PR pada ER+/PR- dapat juga mengindikasikan jalur respons estrogen tidak berfungsi pada tumor ini (Keen and Davidson, 2003).

Reseptor asam retinoid (RARs) banyak diekspresikan oleh jaringan epitel mammae. RARs memiliki tiga anggota sub tipe, yakni RAR- $\alpha$ , RAR- $\beta$ , dan RAR- $\gamma$ . Ketika teraktivasi, RARs membentuk homodimer atau heterodimer dengan reseptor retinoid X (RXR- $\alpha$ , RXR- $\beta$ , dan RXR- $\gamma$ ). Bentuk ini berfungsi sebagai gen supresi tumor yang menghambat proliferasi dan menekan diferensiasi sel serta apoptosis. Efek antiproliferative dan apoptosis dengan diregulasi dengan inhibisi siklus sel, mengistirahatkan sel pada fase G1-S (Keen and Davidson, 2003).

### **Faktor pertumbuhan peptide**

Beberapa faktor pertumbuhan peptide dan reseptornya berperan dalam pertumbuhan kelenjar mammae normal dan karsinogenesis, yakni HER/erbB, dan faktor pertumbuhan tumor (TGF- $\beta$  dan faktor pertumbuhan mirip insulin (Keen and Davidson, 2003).

Protein HER atau erbB adalah anggota dari sub kelas 1 reseptor tirosin kinase (RTK) . Sub grup dari RTK terdiri dari empat, yakni: reseptor faktor pertumbuhan epidermal/ epidermal growth factor (EGFR/erbB1/HER-1), erbB2/neu/HER-2, erbB3/HER-3, dan erbB4/HER-4. Penelitian *in vivo* dan *in vitro* menunjukkan bahwa HER-1 dan ER-2 berperan dalam transformasi neoplastic. Protein HER-2/neu/erbB2 pada 25% kasus kanker invasive bersifat over ekspresi, di mana hal ini disebabkan karena amplifikasi gen. Pada beberapa studi menyebutkan over ekspresi HER-2 berkaitan dengan prognosis buruk, tetapi tidak berkaitan dengan ukuran tumor, derajat diferensiasi, atau potensi metastasis. Peran HER-3 dan HER-4 pada sel-sel mammae belum jelas hingga saat ini. Namun, ada penelitian yang mendapatkan adanya over ekspresi HER-3 bersama-sama dengan HER-B2 pada kanker payudara. Temuan ini mengindikasikan adanya kemungkinan bahwa dimer HER-2 dan HER-3 berperan dalam tumor payudara (Keen and Davidson, 2003).

### **P53**

Mutasi sel somatik pada fosfoprotein nukleus p53 ditemukan pada sekitar 20 – 30% dari kasus kanker payudara primer. Mayoritas mutase berada pada rentang 200 asam amino yang mengandung 1 dari 4 inti domain yang menghasilkan penurunan afinitas ikatan DNA dan penurunan transaktivasi gen. Tumor dengan p53 mutasi cenderung invasive, diferensiasi buruk, kanker payudara tingkat tinggi. Hipotesis mengenai p53 bahwa mutase p53 menginisiasi pertumbuhan tumor dengan fenotip

malignan dan invasive. Dengan demikian, mutase p53 menjadi penanda resiko karsinogenesis pada payudara (Keen and Davidson, 2003).

### **BRCA1 dan BRCA2**

Kanker payudara herediter dilaporkan hanya didapatkan pada sejumlah kecil kasus kanker payudara. Mutasi pada dua gen rentan kanker payudara, BRCA1 dan BRCA2, diduga karena mekanisme pewarisan autosomal dominan. Tumorigenesis pada wanita yang menderita mutasi BRCA1 dan BRCA2 membutuhkan kehilangan atau inaktivasi dari alel *wild-type* yang tersisa, yang menyebabkan ekspresi dari protein non fungsional dan hilangnya kontrol siklus sel dan mekanisme reparasi DNA. BRCA1 dan BRCA2 berfungsi untuk meregulasi perbaikan DNA dan transkripsi gen dan mempertahankan integritas genom. Wanita dengan mutasi pada salah satu dari gen ini dilaporkan memiliki 60 – 80% resiko terjadinya kanker payudara selama hidupnya (Keen and Davidson, 2003).

### **4. Klasifikasi Kanker Payudara**

Sistem klasifikasi TNM, merupakan klasifikasi klinis yang ditentukan dokter berdasarkan temuan klinis dan pemeriksaan penunjang. Komponen yang diukur pada stadium TNM adalah tumor (T), hubungan dengan limfonodus (N) dan jauhnya metastasis (M), dimana ketiga komponen ini dikombinasikan dan dikelompokkan dan dirujuk pada sistem TNM yang telah ada. Sedangkan stadium patologis ditegakkan berdasarkan temuan spesialis patologi anatomi setelah operasi pengangkatan tumor (American Cancer Society, 2006).

Sub tipe kanker payudara diklasifikasi berdasarkan adanya reseptor estrogen (ER), reseptor progesterone (PR), dan faktor pertumbuhan manusia/ *human growth factor* (HER2). Reseptor estrogen dan reseptor progesterone kemudian bergabung menjadi satu, yakni reseptor hormone (HR) dengan pembagian kategori yakni: HR+ (kasus dengan ER+ atau PR+ atau ER ambang batas atau PR ambang batas) dan status HR yang tidak jelas. HR yang tidak jelas melingkupi ER- dan PR tidak diketahui, PR- dan ER tidak diketahui dan kasus maupun ER tidak diketahui. Kombinasi penilaian antara HR dan HER2 diklasifikasikan ke dalam lima kategori yakni :

Tabel 2. Sub tipe Kanker Payudara Secara Histopatologis

Sub tipe	Petanda molekuler	karakteristik
Luminal A	ER +, PR ±, HER2-, Ki67 rendah	Tipe terbanyak (sekitar 70%), prognosis terbaik
Luminal B	ER +, PR ±, HER2 ±, Ki67 tinggi	10 – 20% kasus Prognosis tidak terlalu baik
HER2	ER-, PR-, HER2 +	5 – 15%
Triple-negative	ER-, PR-, dan HER2 -	15 – 20% kasus, terbanyak pada wanita kulit hitam, pada usia lebih muda Prognosis terburuk

Normal-like	ER +, PR ±, HER2-, Ki67 rendah	Jarang  Ekspresi kluster gen proliferative rendah
-------------	-----------------------------------	--

### 5. Sel Kanker Payudara MCF-7

Suatu penelitian di Cina (Dai *et al.*, 2017) menyebutkan bahwa terdapat 84 kelompok sel kanker payudara yang telah teridentifikasi berdasarkan tiga reseptor penting, yakni reseptor estrogen alfa (ER- $\alpha$ ), reseptor progesterone (PR), dan reseptor epitel manusia 2 (HER2). Salah satu dari kelompok sel ini adalah kelompok sel MCF-7.

MCF-7 berasal dari cairan effusi pleura seorang wanita berusia 69 tahun yang menderita adenokarsinoma mammae. Penamaan sel ini berdasarkan tempat pertama kali isolasi sel ini tumbuh, yakni Michigan Cancer Foundation dan mewakili usaha Soule, peneliti, yang ketujuh yang berhasil menumbuhkan kelompok sel ini. Sebuah laporan mencatat bahwa hingga tahun 2017, telah terdapat sekitar 25.000 penelitian yang dipublikasi dengan memakai sel ini (Dai *et al.*, 2017).

Selain dominan pada ekspresi ER- $\alpha$ , sel ini juga mengekspresikan reseptor androgen dan glukokortikoid. Perlakuan MCF-7 dengan estrogen menunjukkan adanya efek anti-apoptosis, sedangkan perlakuan dengan agen kemoterapi yang bersifat anti-estrogen terbukti mampu menekan pertumbuhan kultur sel dengan cara inhibisi proliferasi dan induksi apoptosis. Hingga saat ini, telah banyak varian MCF-7 yang dikembangkan untuk kepentingan penelitian, termasuk jenis sel yang hipersensitif terhadap

estrogen dengan ER + maupun ER – dan juga beberapa jenis yang bersifat resisten terhadap kemoterapi (Cooper, 2012).

### **C. Kematian Sel**

Pada tahun 1972 Keer, Wylie dan Currie menetapkan istilah apoptosis, yakni sebuah bentuk kematian sel yang muncul selama masa setelah perkembangan yang diatur oleh mekanisme tertentu. Istilah ini menjadi penentu perbedaan kematian sel yang disebabkan oleh toksin maupun kerusakan fisik (nekrosis) (Greene, 2002). Bukti-bukti penelitian berabad-abad kemudian menggolongkan kematian sel menjadi kematian sel yang terprogram (*regulated cell death*), yang terjadi mulai dari organisme multiseluler hingga uniseluler, dan kematian sel akibat kecelakaan (*accidental cell death*), yang diakibatkan karena paparan stress fisik, mekanis, tekanan, suhu maupun senyawa kimia (Pfeffer and Singh, 2018).

Kematian sel bermanifestasi sebagai adanya kerusakan morfologi secara makroskopik. Berdasarkan tipe kerusakan morfologi ini, kematian sel dikelompokkan menjadi tiga bentuk, yakni: (1) kematian sel tipe I atau apoptosis, yang menunjukkan terjadinya penyusutan sitoplasma, fragmentasi nucleus (karioreksis), kondensasi kromatin (piknosis), penggelembungan membrane plasma, dan puncaknya adalah pembentukan tubuh apoptosis yang secara efisien akan diambil alih oleh sel tetangga yang bersifat fagositik dan terdegradasi di dalam lisosom (2)

kematian sel tipe II atau autofagi, bermanifestasi dengan adanya vakuolisasi sitoplasma yang luas dan puncaknya adalah ambilan fagositik sel tetangga dan degradasi lisosom, dan (3) kematian sel tipe III atau nekrosis, tidak menunjukkan fitur khas yang membedakan dari kematian sel tipe I dan II dan diakhiri dengan pembuangan badan sel tanpa keterlibatan fagositik dan lisosomal (Pfeffer and Singh, 2018).

Apoptosis intrinsik adalah salah satu bentuk RCD yang diinisiasi oleh berbagai gangguan lingkungan mikro, seperti kerusakan DNA, retikulum endoplasma, dan adanya radikal oksigen bebas (ROS). Tahap-tahap apoptosis intrinsik di atur oleh keluarga protein apoptosis (BCL2), baik yang bersifat pro-apoptosis maupun anti-apoptosis. Sebagai respon terhadap stimulus apoptosis, MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*) dimediasi oleh BCL2 yang berhubungan dengan X, pengatur apoptosis (BAX), dan/atau antagonis BCL2 (BAK1; lebih dikenal sebagai BAK). BAX, BAK, dan BOK (regulator apoptosis) adalah anggota keluarga BCL2 yang bertanggungjawab membentuk pori yang melewati membran luar mitokondria dan membran intrasel yang lainnya (Pfeffer and Singh, 2018).

Bentuk RCD yang lain adalah necroptosis yang diinisiasi oleh adanya gangguan lingkungan mikro baik yang bersifat intra maupun ekstra seluler yang dideteksi oleh reseptor kematian yang spesifik. Nekroptosis secara umum mirip dengan tipe morfologi nekrosis dan telah diketahui bahwa

sistem ini berfungsi dalam mekanisme adaptasi pada saat terjadi kegagalan respons terhadap stress, program pengamanan perkembangan, serta pemeliharaan homeostasis sel T. Setelah inisiasi nekroptosis oleh TNFR1, RIPK3 diaktivasi oleh RIPK1 melalui mekanisme yang melibatkan interaksi fisik antara domain RIP homotypic interaction motif (RHIM) dan aktivitas katalitik RIPK1. Sehingga, penghambat kimiawi RIPK1 termasuk necrostatin-1 (Nec-1) dan turunannya (Nec-1s) menghambat nekroptosis yang diinduksi TNFR1, baik secara *in vivo* maupun *in vitro* (Pfeffer and Singh, 2018).

#### **D. Instrumen Penelitian**

##### **1. *Microplate Reader***

*Microplate reader* atau yang dikenal dengan *photometric microplate reader* atau *ELISA reader* adalah alat spektrofotometer yang khusus digunakan untuk membaca tes ELISA. Berbeda dengan spektrofotometer standar yang menggunakan sebuah kuvet, alat ini dapat membaca sampel dengan jumlah yang lebih tinggi, yakni sampel dalam 96 *well plate* dalam beberapa detik, atau 384 atau 1536 *well plate* dalam beberapa menit (Aslantürk, 2018).

Salah satu fungsi *microplate reader* yang berkembang dan banyak digunakan saat ini adalah untuk menentukan sitotoksitas dan viabilitas sel. Hal ini disebabkan oleh penggunaannya yang mudah, ekonomis, dan cocok untuk kultur sel melekat (*adherent*) maupun yang melayang

(*suspended*). Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk menentukan viabilitas dan sitotoksitas sel, yakni MTT assay, MTS assay, XTT assay, WST-1 assay, LDH assay, SRB assay, NRU assay dan Crsytal violet assay(Aslantürk, 2018).

Prinsip metode ini adalah mengukur petanda biokimia yang mencerminkan aktivitas metabolisme sel hidup. Reagen yang digunakan akan membentuk warna sebagai tanda adanya viabilitas sel sehingga mampu diukur secara kolorimetrik melalui spektrofotometer. Reagen berwarna dibaca dengan panjang gelombang 450 – 600 nm. Persentase viabilitas sel kemudian dihitung dengan persamaan(Aslantürk, 2018).

$$Viabilitas\ sel\ (\%) = \frac{OD_{sampel}}{OD_{blanko}} \times 100$$

Keterangan : OD : *Optical density*

## **2. Real-time Polymerase Chain reaction**

*Real-time* PCR adalah peningkatan teknik deteksi dan amplifikasi asam nukleat dari PCR konvensional yang telah ada. Pada PCR konvensional, produk amplifikasi atau amplicon dideteksi hanya pada titik akhir analisis dengan analisis DNA pada gel agarose. Namun, pada rt PCR akumulasi produk amplifikasi dapat dideteksi dan diukur sementara reaksi berlangsung, dengan kata lain “saat itu juga” (*real time*). Deteksi *real time* dapat berlangsung dengan adanya reaksi dari molekul *frouescent* yang

melaporkan adanya peningkatan jumlah DNA dengan adanya peningkatan proporsional sinyal *fluorescent* (BioRad, 2006).

Satu siklus PCR terdiri atas tiga tahap khusus yang terjadi pada temperatur yang berbeda. Ketiga siklus tersebut adalah (Reed R, Holmes D, Weyers J, 2016):

- a. Denaturasi dsDNA dengan proses pemanasan pada 94 - 98° C. Dengan suhu tersebut, rantai ganda DNA akan membuka dan terpisah menjadi rantai tunggal.
- b. Perlekatan primer, yang terjadi ketika suhu turun pada 37 - 65°C.
- c. Pemanjangan primer, yang terjadi karena kerja enzim DNA polimerase (contohnya Taq polimerase) pada suhu 72° C. Tahap ini berlangsung lebih cukup lama untuk menghasilkan produk PCR.

Kerja rt PCR dalam amplifikasi sampel, terdiri atas dua fase, yang tergambar dalam kurva amplifikasi, yakni fase eksponensial dan fase plateau. Saat fase eksponensial, jumlah produk PCR akan mengalami penggandaan setiap siklusnya. Hal ini menyebabkan berkurangnya jumlah satu atau dua komponen. Sehingga, pada tahap ini reaksi melambat dan memasuki fase plateau (BioRad, 2006; Reed R, Holmes D, Weyers J, 2016).

Pada fase awal, *fluorescence* berada di limit batas dan peningkatannya belum terdeteksi meskipun produk terakumulasi secara eksponensial. Akhirnya, pada suatu titik akumulasi produk mampu menghasilkan sinyal *fluorescent* yang dapat terdeteksi. Jumlah siklus pada saat hal ini terjadi disebut *threshold cycle* atau  $C_T$ . Nilai  $C_T$  menunjukkan akurasi yang tinggi untuk menghitung jumlah awal template yang ada dalam reaksi karena hanya terhitung pada titik awal eksponensial dimana jumlah reagen tidak terbatas (BioRad, 2006).

### **3. *Molecular docking***

*Molecular docking* adalah metode untuk memprediksi orientasi dari satu molekul terhadap molekul lainnya ketika terjadi berikatan satu sama lain untuk membentuk kompleks ikatan yang stabil. Tujuan dilakukan docking adalah mencari konformasi optimal untuk protein maupun ligan orientasi relatif antara keduanya sehingga energi bebas dari keseluruhan sistem dapat diperkecil (Gaba *et al.*, 2010).

Terdapat tiga jenis *docking*, yakni :

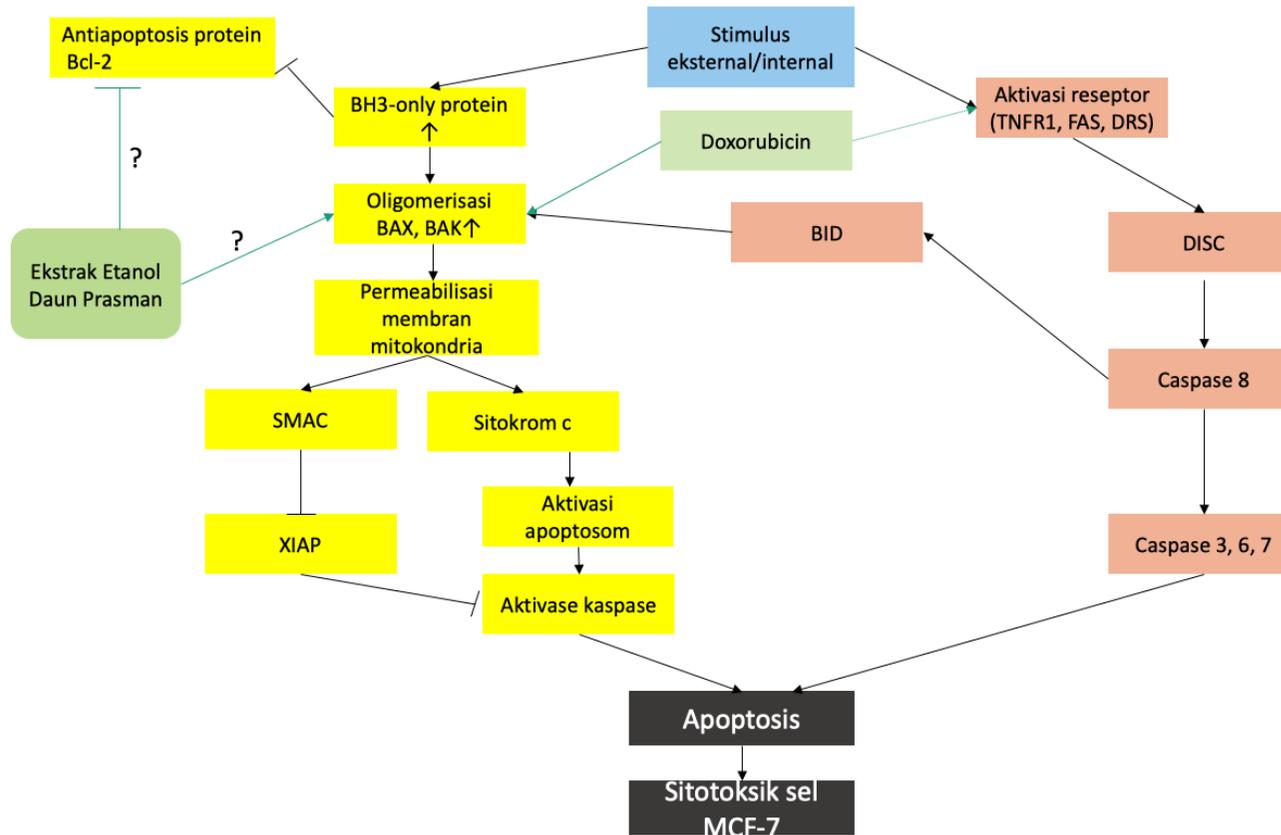
- a. *Rigid body docking*, dimana baik reseptor maupun molekul kecil yang diuji bersifat kaku.
- b. *Flexible ligand docking*, yakni reseptor bersifat kaku (rigid), sedangkan ligan bergerak fleksibel
- c. *Flexible docking*, dimana kedua reseptor dan juga ligan bersifat fleksibel.

Dari ketiga di atas, metode yang paling banyak digunakan adalah *rigid receptor/flexible ligand model*, sedangkan algoritma yang digunakan untuk menjalankan *docking* tersebut adalah Monte Carlo, *genetic algorithm*, *fragment-based* dan *molecular dynamics* (Gaba et al., 2010).

Pengaturan proses molekuler docking membutuhkan struktur target protein, gambaran struktur molekul uji atau database yang berisi senyawa/molekul virtual, dan program komputer yang mampu melakukan docking dan skoring konformasi. Pada umumnya algoritma docking memberlakukan protein dengan sifat kaku/rigid, sedangkan ligan bersifat fleksibel. Selain derajat kebebasan konformasi, pose ikatan pada sisi ikatan protein juga perlu diperhitungkan. Docking dapat dilakukan dengan menempatkan molekul kaku atau fragmen ke dalam sisi aktif protein menggunakan berbagai pendekatan seperti *geometric hashing*, *pose clustering*, atau *clique-search* (Gaba et al., 2010).

## E. Kerangka Teori dan Kerangka Konseptual

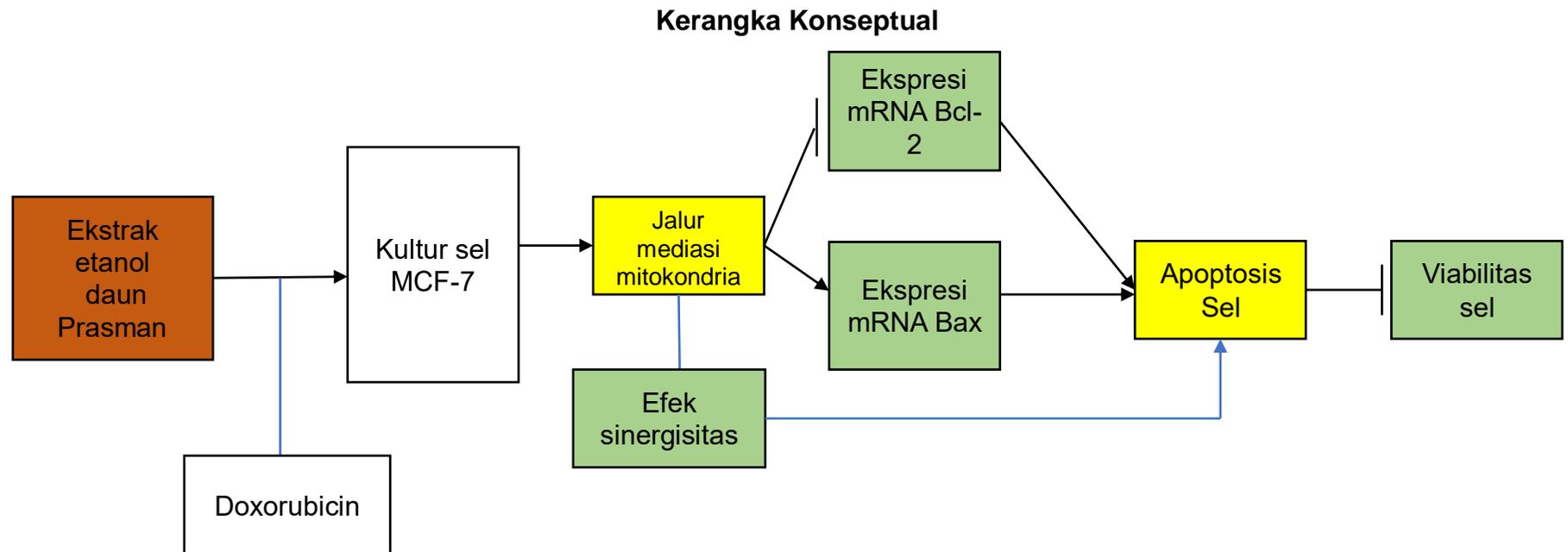
### Kerangka Teori



Gambar 2. Kerangka Teori Yang Menggambarkan Hubungan Variabel Yang Diteliti Dengan Teori.

Keterangan  Jalur intrinsik  Jalur ekstrinsik

*Jalur intrinsik dimulai dengan meningkatnya BH3-only protein akibat adanya stimulus dari luar. BH3-only protein menyebabkan oligomerisasi Bax dan Bak yang mengakibatkan permeabilisasi membran mitokondria. Sitokrom C, SMAC (second mitochondria-derived activator of caspase) dilepaskan dan apoptosome yang terbentuk akan memicu kaspase dan mulai untuk mencerna protein seluler sehingga mengakibatkan kematian sel. Sedangkan jalur ekstrinsik dimulai akibat stimulus pada death receptor yang memicu pengikatan reseptor dan adaptor. DISC (death-inducing signalling pathway) terbentuk dari protein adaptor dan procaspase-8 dan -10. Caspase -8 kemudian teraktivasi dan memicu aktivasi caspase -3, -6, -7 dan BID (BH3 interacting-domain death agonist). Kaspase -3, -6, -7 adalah caspase eksekutor yang menyebabkan apoptosis sel. Tanda panah mewakili aktivasi dan tanda T mewakili inhibisi.*



Gambar 3. Kerangka Konseptual yang Menggambarkan Hubungan Antara Variabel Bebas, Variabel Antara, dan Variabel Terikat.

**Keterangan :**

*: Variabel bebas*



*riabel antara*



*riabel terikat*

#### **D. Hipotesis**

Hipotesis yang disusun dalam penelitian ini adalah:

1. Terdapat hubungan antara pemberian ekstrak etanol daun Prasman terhadap viabilitas sel kanker payudara MCF-7.
2. Terdapat hubungan antara pemberian Ekstrak etanol daun Prasman terhadap ekspresi mRNA Bcl-2 pada sel kanker payudara MCF-7.
3. Terdapat hubungan antara pemberian Ekstrak etanol daun Prasman terhadap ekspresi mRNA Bax pada sel kanker payudara MCF-7.

#### **E. Definisi Operasional**

Definisi operasional dari variabel bebas dan variabel terikat dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

Jenis Variabel	Parameter	Definisi Operasional	Skala Ukur
Variabel bebas	Dosis ekstrak etanol daun Prasman 50 $\mu\text{g/mL}$	Pengenceran ekstrak etanol daun Prasman dari larutan stok dosis 10.000 $\mu\text{g/mL}$ menjadi dosis 50 $\mu\text{g/mL}$ dengan medium kultur <i>ad</i> 400 $\mu\text{L}$	Nominal
	Dosis ekstrak etanol daun Prasman 100 $\mu\text{g/mL}$	Pengenceran ekstrak etanol daun Prasman dari larutan stok dosis 10.000 $\text{mg}/\mu\text{L}$ menjadi dosis 100 $\mu\text{g/mL}$ dengan medium kultur <i>ad</i> 400 $\mu\text{L}$	Nominal
	Dosis ekstrak etanol daun Prasman 200 $\mu\text{g/mL}$	Pengenceran ekstrak etanol daun Prasman dari larutan stok dosis 10.000 $\text{mg}/\mu\text{L}$ menjadi dosis 200 $\mu\text{g/mL}$ dengan medium kultur <i>ad</i> 400 $\mu\text{L}$	Nominal
	Dosis ekstrak etanol daun Prasman 400 $\mu\text{g/mL}$	Pengenceran ekstrak etanol daun Prasman dari larutan stok dosis 10.000 $\text{mg}/\mu\text{L}$ menjadi dosis 400 $\mu\text{g/mL}$ dengan medium kultur <i>ad</i> 400 $\mu\text{L}$	Nominal

	Dosis ekstrak etanol daun Prasman 500 $\mu\text{g/mL}$	Pengenceran ekstrak etanol daun Prasman dari larutan stok dosis 10.000 $\mu\text{g/mL}$ menjadi dosis 500 $\mu\text{g/mL}$ dengan medium kultur <i>ad</i> 400 $\mu\text{L}$	Nominal
	Dosis ekstrak etanol daun Prasman 600 $\mu\text{g/mL}$	Pengenceran ekstrak etanol daun Prasman dari larutan stok dosis 10.000 $\mu\text{g/mL}$ menjadi dosis 600 $\mu\text{g/mL}$ dengan medium kultur <i>ad</i> 400 $\mu\text{L}$	Nominal
	Dosis ekstrak etanol daun Prasman 800 $\mu\text{g/mL}$	Pengenceran ekstrak etanol daun Prasman dari larutan stok dosis 10.000 $\mu\text{g/mL}$ menjadi dosis 800 $\mu\text{g/mL}$ dengan medium kultur <i>ad</i> 400 $\mu\text{L}$	Nominal
Variabel terikat	Viabilitas sel	Jumlah sel MCF-7 yang hidup pada 96- <i>well plate</i> dengan/ tanpa perlakuan larutan uji. Uji viabilitas sel diukur dengan menggunakan metode reduksi tetrazolium pada reagen MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	Nominal

---

Rumus untuk menentukan viabilitas sel adalah

$$\frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{absrobansi kontrol media}} \times 100\%$$

Efek sinergisitas

Efek sitotoksisitas akibat kombinasi ekstrak etanol daun Prasman dosis 25 µg/mL, 50 µg/mL, dan 100 µg/mL dengan Doxorubicin dosis 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, dan 1 µg/mL. Efek sinergisitas akan dikategorikan berdasarkan Indeks Kombinasi (IK)

$$IK = \frac{DK1}{Dx1} + \frac{DK2}{Dx2}$$

Keterangan

Dx1 dan Dx2 : Dosis ekstrak etanol daun Prasman maupun Doxorubicin untuk menghasilkan efek x%

DK1 dan DK2 : Dosis masing-masing ekstrak etanol daun Prasman dan Doxorubicin pada kombinasi untuk menghasilkan efek yang sama

---



---

dilakukan dengan menggunakan reagen TRIzol dan dilanjutkan dengan menggunakan SensiFAST SYBR & Fluorescein Kit untuk prosedur Real Time PCR. Gen *housekeeping* adalah  $\beta$ -actin.

*Forward primer sequence*  $\beta$ -actin:

5'-GATCATTGCTCCTCCTGAGC-3'

Nominal

*Reverse primer sequence*  $\beta$ -actin:

3'-AAAAGCCATGCCAATCTCATC-5'

*Forward primer sequence* Bax :

5'-CCCTTTTGCTTCAGGGTTTC-3'

*Reverse primer sequence* Bax:

3'-ACAAAGTAGAAAAGGGCGACAA-5'

Kultur Sel MCF

Subkultur sel MCF-7 dari T-Flask 25 cm<sup>2</sup> ke 96-*well plate* dengan kepadatan 5000 sel/sumuran dan 100  $\mu$ L menggunakan medium kultur (DMEM, 10% FBS, 1% Amphotericin B, 1% Penicillin-Streptomycin, 1% Gentamycin)

---

---

tiap sumuran. Kultur sel ini digunakan untuk menilai viabilitas sel dan efek sinergisitas.

Subkultur sel MCF-7 dari T-Flask 75 cm<sup>2</sup> ke 12-well plate dengan kepadatan 100.000 sel/sumuran menggunakan 1 mL medium kultur (DMEM, 10% FBS, 1% Amphotericin B, 1% Penicillin-Streptomycin, 1% Gentamycin) tiap sumuran. Kultur sel ini digunakan untuk menilai ekspresi mRNA Bcl-2 dan Bax dengan *Real Time* PCR.

---