

**EFEK PEPTIDA MELITTIN DARI RACUN LEBAH (*Apis mellifera*)  
TERHADAP KADAR p53 DAN 8-OHdG PADA KULTUR SEL  
KANKER PAYUDARA MCF-7**

**MAKKASAU  
P062192025**



**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2022**

**EFEK PEPTIDA MELITTIN DARI RACUN LEBAH (*Apis mellifera*)  
TERHADAP KADAR p53 DAN 8-OHdG PADA KULTUR SEL  
KANKER PAYUDARA MCF-7**

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Ilmu Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

MAKKASAU

P062192025

kepada

**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2022**

*Jusni*

**TESIS**

**EFEK PEPTIDA MELITTIN DARI RACUN LEBAH (*Apis mellifera*)  
TERHADAP KADAR p53 DAN 8-OHdG PADA KULTUR SEL  
KANKER PAYUDARA MCF-7**

Disusun dan diajukan oleh

**MAKKASAU**

**P062192025**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Ilmu Biomedik  
Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin  
Pada tanggal 01 Agustus 2022  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

*J. Rosdiana*

*M. Husni*

Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D., Sp.Biok(K)  
NIP. 19570326 198803 2 001

dr. M Husni Cangara, Ph.D., Sp.PA., DFM  
NIP. 19770409 200212 1 002

Ketua Program Studi  
Ilmu Biomedik

Dekan Sekolah Pascasarjana  
Universitas Hasanuddin

*Ika Yuslisa*

*Budi*

Dr. dr. Ika Yuslisa, M.Sc.  
NIP. 19770121 200312 2 003

Prof. dr. Budi, Ph.D., Sp.M(K), M.Med.Ed  
NIP. 19661231 199503 1 009

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Efek peptida melittin dari racun lebah (*Apis mellifera*) terhadap kadar p53 dan 8-OHdG pada kultur sel kanker payudara (MCF-7)" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing (Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D., Sp.Biok(K) sebagai Pembimbing Utama dan dr. Muhammad Husni Cangara, Ph.D., Sp.PA., DFM sebagai Pembimbing Pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Jurnal (Biomedical and Pharmacology Journal, Vol 15, Hal. 979-983, dan DOI: <https://dx.doi.org/10.13005/bpj/2433>) sebagai artikel dengan judul "Melittin-Induced Cell Death Through p53 and 8-OHdG in Breast Cell Cancer MCF-7".

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 01 Agustus 2022



Nama: Makkasau  
Nim: P062192025

## PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa dengan selesainya tesis ini.

Gagasan yang melatari tajuk permasalahan ini timbul dari hasil pengamatan penulis terhadap adanya pengobatan alternatif sengatan lebah yang digunakan oleh masyarakat untuk berbagai macam penyakit yang digunakan secara tradisional. Penulis bermaksud menyumbangkan beberapa konsep bahwa pengobatan sengatan lebah tidak hanya digunakan sebagai alternatif tetapi juga bisa di patenkan.

Banyak kendala yang dihadapi oleh penulis dalam rangka penyusunan tesis ini, yang hanya berkat bantuan berbagai pihak, maka tesis ini selesai pada waktunya. Dalam kesempatan ini penulis dengan tulus menyampaikan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada:

**Ibu Prof. dr. Hj. Rosdiana Natzir, Ph.D., Sp.Biok(K)** sebagai Pembimbing Utama, yang senantiasa memberikan nasehat dan arahan dalam pengembangan minat topik penelitian serta meluangkan waktu untuk membimbing dan menjadi teman diskusi dalam penyelesaian tesis ini.

**Bapak dr. Muhammad Husni Cangara, Ph.D., Sp.PA., DFM.** sebagai Pembimbing Pendamping atas bantuan yang telah mengarahkan, mendorong, memberi ide, nasehat dan petunjuk serta meluangkan waktunya membimbing dan menjadi teman diskusi sampai penyelesaian tesis ini .

Penghargaan dan terima kasih yang setinggi-tingginya juga penulis sampaikan kepada yang terhormat:

1. Bapak. Prof. Dr. Jamaluddin Jompa, M.Sc. selaku Rektor Universitas Hasanuddin atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Magister.
2. Bapak. Prof. dr. Budu, Ph.D., Sp.M(K)., M.Med.Ed. selaku Dekan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Magister.
3. Bapak. Prof. Dr. Baharuddin Hamzah., ST., M.Arch., Ph.D. selaku wakil Dekan Bidang Akademik, Riset dan Inovasi Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
4. Bapak. Prof. Dr. Darmawansyah., SE., M.Si. selaku wakil Dekan Bidang Administrasi umum dan keuangan Pascasarjana Universitas Hasanuddin
5. Bapak. Dr. Amir Ilyas., SH., MH. selaku wakil Dekan Bidang Kemahasiswaan, Alumni dan Kemitraan Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
6. Ibu. Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc. selaku Ketua Program Studi S-2 Ilmu Biomedik atas segala arahan, bimbingan dan dukungan selama mengikuti pendidikan Program Magister.
7. Bapak. dr. Marhaen Hardjo, M.Biomed., Ph.D. sebagai Ketua Konsentrasi S2 Biokimia dan Biologi Molekuler dan juga selaku

penguji 1 atas segala arahan dan bimbingan selama mengikuti pendidikan Program Magister.

8. Ibu. Dr. dr. Syahrijuita, M.Kes., Sp.THT. selaku penguji yang memberikan arahan dan masukan serta bimbingan selama mengikuti pendidikan di Program Magister.
9. Ibu. dr. Gita Vita Soraya, Ph.D. selaku penguji yang telah banyak memberikan masukan sampai penyelesaian penulisan tesis ni.
10. Bapak Prof. Dr. dr. Syafri Kamsul Arief, SpAn KICKAVK. selaku Direktur Utama RSPTN Unhas atas izin yang diberikan untuk melakukan penelitian serta segala bantuan dan fasilitas yang diberikan kepada kami.
11. Para dosen dan staf Program Studi S2 Ilmu Biomedik Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
12. Para staf Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin atas segala bantuan, fasilitas dan pelayanan yang diberikan selama kami mengikuti pendidikan.
13. Ketua Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Panakkukang Makassar yang telah memberikan izin belajar untuk mengikuti pendidikan Program Magister (S2) di Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin
14. Rekan-rekan Mahasiswa S2 Ilmu Biomedik Konsentrasi Biokimia dan Biologi Molekuler angkatan 2020 (dr.Dian Eka Astari, dr.Nurliana) serta yang tidak bisa kami sebutkan satu persatu namanya yang telah

banyak memberi bantuan dan dukungan sampai penyelesaian tesis ini.

15. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada Bapak Lukman Muslimin, S.Si., Apt, yang telah banyak membantu dalam rangka pelaksanaan penelitian dan publikasi.

Akhirnya teristimewa kepada kedua orang tua tercinta saya **Ayahanda Kamaruddin A. Pallemai** dan **Ibunda Maruwang** yang tak hentihentinya memberikan Doa, perhatian, cinta dan kasih sayang yang tak terbalaskan, serta kepada seluruh keluarga (kakak: **Kasiruddin, Murniati** dan adik **Mudris Afandi**) terima kasih atas dukungan dan doa selama penulis melanjutkan pendidikan.

Menyadari keterbatasan kemampuan, pengetahuan dan pengalaman dalam menyelesaikan tesis ini, saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan sehingga penulisan ini lebih baik dan bermanfaat.

Semoga Tuhan yang Maha Pengasih dan Penyayang senantiasa melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian disertasi ini, dan semoga disertasi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

*Wassalamu Alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh*

Makassar, 01 Agustus 2022

Makkasau



## ABSTRAK


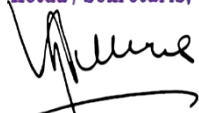
**MAKKASAU.** *Efek Peptida Melittin dari Racun Lebah (Apis mellifera) Terhadap Kadar p53 dan 8-OHdG pada Kultur Sel Kanker Payudara (MCF-7)* (dibimbing oleh **Rosdiana Natzir** dan **Muhammad Husni Cangara**).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek peptida melittin dari racun lebah (*Apis mellifera*) pada kultur sel kanker payudara (MCF-7) dengan menentukan *half maximal inhibitory concentration* (IC<sub>50-24 Jam</sub>), kemampuan menginduksi apoptosis, dan stres oksidatif.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental *in vitro* dengan desain *post-test only-control group* yang dilaksanakan di Laboratorium *Hasanuddin University Medical Research Centre* (HUMRC) RSPTN Unhas. Penelitian ini menggunakan sel MCF-7 sebagai model sel kanker payudara dengan bahan uji melittin dan doxorubisin sebagai kontrol positif. Penentuan IC<sub>50-24 Jam</sub> dengan MTT assay. Induksi apoptosis dan stress oksidatif masing-masing ditentukan dengan mengukur kadar protein p53 dan biomarker 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) menggunakan metode ELISA. Perbedaan antar kelompok uji dianalisis dengan uji *One Way Anova* dengan tingkat kemaknaan  $\alpha=0,05$ .

Hasil penelitian didapatkan nilai IC<sub>50-24 Jam</sub> melittin dan doxorubicin masing-masing sebesar 2.335  $\mu\text{g/mL}$  dan 2.133  $\mu\text{g/mL}$  yang menunjukkan kedua senyawa ini memiliki aktivitas sitotoksik kategori sangat aktif. Melittin dan doxorubisin terbukti mampu menginduksi kadar p53 dengan kadar pada kelompok uji melittin lebih tinggi ( $p \leq 0.001$ ) dibandingkan doxorubicin dan kontrol. Selanjutnya, kelompok uji melittin menunjukkan kadar protein 8-OHdG lebih rendah ( $p \leq 0.001$ ) dibandingkan dengan doxorubisin tetapi lebih tinggi dari kelompok kontrol. Sebagai kesimpulan: melittin dan doxorubisin menunjukkan aktivitas pro-apoptosis melalui peningkatan kadar p53, namun kedua senyawa ini memicu pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang ditunjukkan oleh tingginya kadar 8-OHdG.

**Kata kunci:** *melittin, doxorubisin, p53, 8-OHdG, sel MCF-7*

	
<b>GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS</b>	
Abstrak ini telah diperiksa.	Paraf Ketua / Sekretaris,
Tanggal: <u>30/06/2022</u>	



## ABSTRACT

**MAKKASAU.** *Effect of Melittin Peptide from Bee Venom (Apis mellifera) on p53 and 8-OHdG Levels in Breast Cancer Cell Culture (MCF-7) (Supervised by Rosdiana Natzir and Muhammad Husni Cangara).*

This study aims to determine the effect of the melittin peptide from bee venom (*Apis mellifera*) on breast cancer cell culture (MCF-7) by determining the half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50-24 \text{ hours}}$ ), the ability to induce apoptosis, and oxidative stress.

This study is in vitro experiments with a post-test only–control group design carried out at the Hasanuddin University Medical Research Center (HUMRC) Laboratory of the Unhas Teaching Hospital. This study used MCF-7 cells as a model of breast cancer cells to examine melittin's potential biological activity. Doxorubicin was used as the positive control.  $IC_{50-24\text{Hours}}$  was determined by MTT assay. Apoptotic induction and oxidative stress were determined by measuring protein levels of p53 and the biomarker 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) using the ELISA method. One Way Anova test analyzed differences between test groups with a significance level of 0.05.

The results showed that the  $IC_{50-24 \text{ hours}}$  of melittin and doxorubicin were 2,335 g/mL and 2,133 g/mL, respectively, indicating that these two compounds had very active cytotoxic activity. Furthermore, melittin and doxorubicin were shown to induce p53 levels, with levels in the melittin test group being higher ( $p \leq 0.001$ ) than doxorubicin and negative control. Furthermore, the melittin test group showed lower 8-OHdG levels ( $p \leq 0.001$ ) compared to doxorubicin but higher than the negative control. In conclusion: melittin and doxorubicin showed pro-apoptotic activity indicated by increased p53 levels. However, these two compounds induced the formation of reactive oxygen species (ROS), which was indicated by high levels of 8-OHdG.

**Keywords:** *melittin, doxorubicin, p53, 8-OHdG, MCF-7 cell*

	
<b>GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS</b>	
Abstrak ini telah diperiksa.	Paraf Ketua / Sekretaris,
Tanggal : <u>30/06/2022</u>	
	
M A K K A S A U	

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
Halaman Judul.....	i
Halaman Pengajuan.....	ii
Lembar Pengesahan.....	iii
Pernyataan Keaslian Tesis	iv
Prakata.....	v
Abastrak.....	ix
Abstract.....	x
Daftar Isi.....	xi
Daftar Tabel.....	xiv
Daftar Gambar.....	xv
Daftar Lampiran.....	xvi
Daftar Arti Lambang dan Singkatan.....	xvii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
A. Latar belakang.....	1
B. Rumusan masalah.....	4
C. Tujuan penelitian.....	5
D. Manfaat penelitian.....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
A. Kanker payudara.....	7
1. Definisi kanker payudara.....	7
2. Penyebab kanker payudara.....	7
3. Gejala Kanker payudara.....	10
4. Patogenesis.....	11
5. Pemeriksaan penunjang.....	14
6. Penentuan stadium kanker payudara.....	18
7. Tatalaksana.....	19
8. Sel kultur MCF-7.....	19

9. Kemoprevensi.....	20
10. Kemoterapi kanker dengan doxorubisin	20
B. Tinjauan Mlittin.....	24
1. Pengertian.....	24
2. Struktur protein dari melittin.....	24
3. Mekanisme apoptosis dari melittin.....	25
4. Hasil penelitian dari melittin.....	25
C. Gen p53 pengawal genom.....	27
D. 8-OHdG.....	31
E. Kerangka Teori.....	33
F. Kerangka Konsep.....	34
G. Hipotesis penelitian.....	35
H. Variabel penelitian.....	35
I. Definisi operasional.....	36
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	
A. Jenis penelitian.....	37
B. Desain penelitian.....	37
C. Tempat dan waktu penelitian.....	38
D. Sampel dan teknik sampling penelitian.....	38
E. Bahan, alat dan metode.....	39
1. Bahan.....	39
2. Alat.....	42
3. Metode.....	42
a. Uji Sitotoksik.....	42
b. Uji Enzyme Linked Immunosorbent Assay.....	46
F. Analisa data.....	49
G. Kontrol kualitas.....	50
H. Aspek etika penelitian.....	50
I. Alur Penelitian.....	52
<b>BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN</b>	
A. Hasil.....	53

1. Aktivitas biologis melittin.....	53
a. Aktivitas sitotoksik melittin dan doksorubisin terhadap sel MCF-7.....	53
b. Aktivitas melittin, doksorubisin dan kontrol pada kadar protein p53 dan 8-OHdG terhadap sel MCF-7.....	56
2. Analisis bivariat.....	59
B. Pembahasan.....	63
1. Aktivitas sitotoksik melittin dibandingkan dengan doksorubisin.....	63
2. Aktivitas antiproliferatif melittin, doksorubisin dan kontrol terhadap p53 pada kultur sel kanker payudara MCF-7.....	67
3. Aktivitas oksidatif melittin, doksorubisin dan kontrol terhadap 8-OHdG pada kultur sel kanker payudara MCF-7.....	68
4. Keterbatasan penelitian.....	70
<b>BAB V PENUTUP</b>	
A. Kesimpulan.....	71
B. Saran.....	71
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b>	

## DAFTAR TABEL

<b>nomor</b>		<b>halaman</b>
Tabel 1	Standium kanker payudara.....	18
Tabel 2	Hasil uji sitotoksik MTT Assay pada sel MCF-7 dengan perlakuan melittin dan doksorubisin pada masa inkubasi 1x24 jam.....	54
Tabel 3	Perbedaan kelompok perlakuan dan kontrol pada kadar p53 terhadap sel MCF-7.....	59
Tabel 4	Perbedaan kelompok perlakuan dan kontrol pada kadar 8-OHdG terhadap sel MCF-7.....	61

## DAFTAR GAMBAR

<b>nomor</b>		<b>halaman</b>
1.	Gambar 1. Struktur melittin.....	25
2.	Gambar 2. Mekanisme apoptosis dari melittin.....	25
3.	Gambar 3. Peran p53 dalam mempertahankan integritas genom.....	27
4.	Gambar 4. Bagan Kerangka Teori.....	33
5.	Gambar 5. Bagan Kerangka onsep .....	34
6.	Gambar 6. Bagan Desain Penelitian.....	37
7.	Gambar 7. Bagan Alur Penelitian.....	52
8.	Gambar 8. Kurva efek sitotoksik melittin dan doksorubisin terhadap sel MCF-7 pada masa inkubasi 1x24 jam dengan MTT Assay.....	55
9.	Gambar 9. Grafik hasil analisa kadar protein p53 dari melittin, doksorubisin dan kontrol pada sel MCF-7.....	56
10.	Garafik 10. Garafik hasil analisa kadar protein 8-OHdG dari melittin, doksorubisin dan kontrol pada sel MCF-7.....	56

## DAFTAR LAMPIRAN

1. Lembar surat permohonan komisi etik
2. Lembar persetujuan komisi etik
3. Lembar surat izin penelitian dari institusi
4. Lembar surat rekomendasi izin penelitian dari Diklit RSPTN Unhas
5. Lembar surat selesai melaksanakan penelitian
6. Lampiran table uji sitotoksik
7. Lampiran Gambar hasil uji sitotoksik
8. Lampiran hasil analisis probit
9. Lampiran hasil uji ELISA; p53 dan 8-OHdG
10. Lampiran hasil uji statistik
11. Lampiran Curriculum Vitae



## DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan
AGS	Adenocarcinoma Gastric
Apoptosis	Kematian sel yang terprogram
ATPase	Adenosin triphosphatase
$\alpha$	Alfa
Bcl2	B cell Lymphoma 2
BRCA1	Breast Cancer Gene 1
BRCA2	Breast Cancer Gene 1
$\beta$	Beta
cdks	Cyclin dependent serine/threonine protein kinase
CKIs	Cyclin-dependent kinase inhibitor
CAK	Cdk Activating Kinases
Caspase	Cysteine Aspartyl Specific Protease
CIN	Cervical Intraepithelial Neoplasma
CAM	Cell-cell Adhesion Molecule
DNA	Dinucleic Acid
DES	Diethylstilbestrol
DMPA	Depotmedroxyprogesterone acetate
$\delta$	Delta
E6	Early protein 6
E7	Early protein 7
ER	Estrogen Receptor
FasL	Fas lignin
FNAB)	Fine Needle Aspiration Biopsy,
g	Gram
IC <sub>50</sub>	Inhibition Concentration <sub>50</sub>
LSD	Post Hoc Least Significant Difference

LCIS	Lobular carcinoma in situ
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MTT	3-(4,4-dimethylthyzol-2-yl)-2.5-diphenyltetrazolium bromide
MI	Milliliter
Mg	Milligram
MDR	Multi Drug Resistance
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
NO	Nitric Oxide
p53	protein 53
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PR	Progesterone Receptor
ROS	Reactive Oxygen Species
TNF	Tumor Nekrosis Factor
8-OHdG	8-hydroxy-2-deoxyguanosine
µg	Mikrogram
µl	Mikroliter

---

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. Latar belakang

Kanker adalah salah satu masalah kesehatan terbesar di dunia dan penyebab kematian nomor dua di Amerika Serikat (Rebecca L., et al., 2019). Jumlah kasus sebanyak 348.809 yang terdiri dari payudara: 58.256 (16.7%), serviks: 32.469 (9.3%), paru: 30.023 (8.6%), rektum: 30.017 (8.6%), hati: 18.468 (5.3%), dan kanker lain: 179.576 (51.5%) (Globocon, 2018). Pada tahun 2019 sekitar 268.600 kasus baru kanker payudara dan 48.100 kasus *ductal carcinoma in situ* (DCIS) akan didiagnosis di antara wanita AS, dan 41.760 wanita akan mati karena kanker payudara (Carol E.D., et al., 2019). Di Indonesia kanker payudara adalah nomor satu di antara semua jenis kanker pada wanita (Profil Kesehatan Indonesia, 2019).

Kanker payudara adalah tumor ganas jaringan payudara yang dapat berasal dari epitel duktus atau lobulusnya (ESMO, 2018). Kanker payudara disebabkan oleh mutasi dari gen p53, dan berbagai stressor dapat menginduksi jalur respons p53 seperti ekspresi onkogen yang tidak tepat mengalami anoksia (seperti proto-onkogen MYC), dan integritas DNA berkurang (Kumar V).et al., 2012). Protein p53 penekan tumor mengontrol siklus sel dan berperan penting dalam menjaga integritas DNA

(Mary, B., 2021). Aktivitas p53 yang merupakan tumor suppressor gene, berperan penting secara langsung pada induksi apoptosis akibat kerusakan DNA (S. Kabinejadian, S, F, M, Ramezani, E, Azizi, 2008). Walaupun karsinoma disebabkan oleh multifaktorial, stres oksidatif dan ketidakseimbangan antara *reactive oxygen species* (ROS), dengan aktivitas antioksidan dan enzim perbaikan DNA dianggap memainkan peran penting dalam perkembangan kanker (Huang YL, Sheu JY, Lin TH, 1999) .

Mekanisme yang memperbaiki DNA yang rusak dengan mekanisme base excision repair (BER) dapat melepaskan DNA rusak yang terputus. DNA yang rusak dan terputus oleh BER ditemukan dalam bentuk 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) (Valavanidis et al., 2009). Stres oksidatif yang terjadi dalam tubuh dapat dideteksi dengan kehadiran senyawa biomarker untuk stres oksidatif. Salah satunya adalah 8-hidroksi-2'-deoxyguanosine. 8-OHdG diproduksi di dalam tubuh melalui oksidasi DNA, dari sebuah nukleotida guanin, yang dihasilkan oleh ROS. (Boonla, et al, 2007). Oleh sebab itu, senyawa 8-OHdG dapat digunakan sebagai penanda untuk risiko kanker yang terkait dengan paparan senyawa yang menyebabkan penyakit kanker (Valavanidis et al., 2009).

Farmakoterapi yang menjadi pilihan utama untuk penyakit kanker payudara ialah kemoterapi (Mulyati GD, Nurani LH, dkk., 2017). Penggunaan agen kemoterapi antikanker ditujukan untuk mencegah atau menekan pertumbuhan sel kanker dan menekan infiltrasi dan metastasis

(Prawirohardjo S, 2006). Salah satu derivat kemoterapi yang paling umum dianjurkan untuk mengobati karsinoma payudara yaitu doxorubisin (Smith et al., 2006). Namun, terapi kanker dengan senyawa kemoterapi cenderung menyebabkan resistensi sel kanker, yang bertanggung jawab atas sebagian besar pengobatan kanker yang gagal (Staerk, et al., 2002). Sehingga peneliti terus berupaya untuk potensi senyawa yang mempunyai efek seminimal mungkin. Beberapa jenis senyawa sudah dikembangkan untuk kanker, termasuk senyawa teralkilasi, antimetabolit, radiomimetik, hormon, dan antagonis. Namun, tak satu pun dari senyawa ini mencapai efek yang memuaskan dan tidak memiliki efek samping yang merugikan (Astuti, et al., 2005).

Maka dari itu, senyawa yang terkandung dalam racun lebah madu berpotensi besar sebagai agen antitumor dan antikanker (Tiago. E H, 2011). Senyawa seperti melittin menyebabkan sitotoksik, antitumor, immunomodulator, dan efek apoptosis pada sel-sel tumor yang berbeda secara in vivo atau in vitro. Aplikasi terakhir melittin pada macam-macam kanker dijelaskan secara molekuler akan khasiat antiproliferasi dari racun lebah (Orsolich N, 2012). Protein melittin (C131H229N39O31) merupakan komponen utama dalam racun lebah madu. Merupakan suatu polipeptida yang terdiri dari urutan 26 asam amino : Gly Gly Ile Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp Ile Lys Lys Arg Arg Gln Gln (Terwilliger dkk., 2010). Melittin menginduksi ekspresi p53 dan caspase 3 sebagai penanda apoptosis pada sel HeLa (Plasay, M., et al., 2016).

Olehnya itu melittin mempunyai potensi yang sangat besar untuk dikembangkan berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, sehingga melittin perlu dikembangkan dengan melihat mekanisme melittin terhadap penghambatan proliferasi sel kanker baik yang eksperimen secara in vitro ataupun secara in vivo yang dimediasi oleh protein p53 dan 8-OHdG pada MCF-7 cell line.

Berdasarkan masalah tersebut diatas maka saya ingin melakukan penelitian tentang efek peptida melittin dari racun lebah (*Apis mellifera*) terhadap kadar p53 dan 8-OHdG pada kultur sel kanker payudara MCF-7.

## B. Rumusan Masalah

Dari penjelasan di balik permasalahan di atas, kami menyusun beberapa masalah penelitian sebagai berikut:

1. Berapa nilai  $IC_{10-24 \text{ jam}}$ ,  $IC_{25-24 \text{ jam}}$ ,  $IC_{50-24 \text{ Jam}}$  peptida melittin dari racun lebah (*Apis mellifera*) dan doksorubisin yang mempunyai efek sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7?
2. Apakah ada perbedaan kadar protein p53 melittin dari racun lebah (*Apis mellifera*), doksorubisin dan kontrol pada konsentrasi  $IC_{10-24 \text{ jam}}$ ,  $IC_{25-24 \text{ jam}}$ ,  $IC_{50-24 \text{ Jam}}$  terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7?
3. Apakah ada perbedaan kadar protein 8-OHdG melittin dari racun lebah (*Apis mellifera*), doksorubisin dan kontrol pada konsentrasi  $IC_{10-24 \text{ jam}}$ ,  $IC_{25-24 \text{ jam}}$ ,  $IC_{50-24 \text{ Jam}}$  terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7?

### C. Tujuan Penelitian

#### 1. Tujuan umum

Untuk mengetahui efek peptida melittin dari racun lebah (*Apis mellifera*) pada kultur sel kanker payudara MCF-7 sebagai agen kemoterapi.

#### 2. Tujuan khusus

- a. Diketuainya nilai  $IC_{10-24 \text{ jam}}$ ,  $IC_{25-24 \text{ jam}}$ ,  $IC_{50-24 \text{ Jam}}$  melittin dan doksorubisin terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7.
- b. Diketuainya perbedaan kadar protein p53 dari melittin, doksorubisin dan kontrol pada konsentrasi  $IC_{10-24 \text{ jam}}$ ,  $IC_{25-24 \text{ jam}}$ ,  $IC_{50-24 \text{ Jam}}$  terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7.
- c. Diketuainya perbedaan kadar protein 8-OHdG dari melittin, doksorubisin dan kontrol pada konsentrasi  $IC_{10-24 \text{ jam}}$ ,  $IC_{25-24 \text{ jam}}$ ,  $IC_{50-24 \text{ Jam}}$  terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7.

### D. Manfaat Penelitian

#### 1. Bidang Keilmuan

Memberikan informasi ilmiah/sumbangan ilmiah dibidang Kedokteran farmakologi dan biokimia serta biologi molekuler mengenai efek péptida melittin dari racun lebah (*Apis mellifera*) terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7 melalui mekanisme molekuler protein p53 dan 8-OHdG.

#### 2. Peneliti

Menambah wawasan pengetahuan tentang manfaat, dan karakteristik peptida melittin dari racun lebah (*Apis mellifera*) untuk penghambatan pertumbuhan dalam kultur sel kanker payudara MCF-7 melalui mekanisme molekuler protein p53 dan 8-OHdG.

### 3. Bagi Masyarakat

Memberikan informasi awal mengenai pengobatan yang digunakan oleh masyarakat akan manfaat bee venom sebagai pengobatan alternatif pada penderita kanker yang dapat diterima dan dijelaskan secara ilmiah.



## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Kanker payudara**

##### **1. Pengertian**

Kanker payudara (KPD) merupakan keganasan pada jaringan payudara yang dapat berasal dari epitel duktus maupun lobulusnya (European Society for Medical Oncology, 2018).

##### **2. Penyebab dan faktor risiko**

Beberapa faktor risiko seperti usia dan ras tidak dapat diubah tetapi yang lain, seperti gaya hidup, dapat diubah (American Cancer Society, 2015).

a. Faktor risiko yang tidak dapat diubah pada kanker payudara adalah:

- 1) Jenis Kelamin: Sekitar 100 kali lebih banyak dari wanita mungkin menderita kanker payudara daripada pria. Ini mungkin karena kurangnya jaringan payudara dan hormon estrogen dan progesteron, yang dapat menyebabkan pertumbuhan sel kanker payudara.
- 2) Usia: Risiko meningkat seiring bertambahnya usia. Sekitar seperdelapan dari kanker payudara invasif terjadi pada wanita

di bawah usia 45 tahun, dan sekitar dua pertiga dari kanker payudara invasif terjadi pada wanita di atas usia 55 tahun.

- 3) Gen herediter spesifik: diperkirakan 5-10% kasus karsinoma payudara dianggap herediter, dengan mutasi pada gen BRCA1 dan BRCA2 menjadi penyebab paling umum, biasanya membuat sel tidak terkendali.
- 4) Perubahan pada gen lain: Mutasi pada gen herediter lainnya jarang terjadi dan seringkali tidak meningkatkan risiko kanker payudara. Contoh gen lain ini adalah ATM, TP53, PTEN, dll.
- 5) Riwayat keluarga kanker payudara: Memiliki ibu, saudara kandung, atau anak dengan kanker payudara meningkatkan risiko 2 kali lipat.
- 6) Riwayat Kanker Payudara: Risiko kanker payudara baru pada payudara yang sama atau di bagian lain payudara meningkat pada wanita yang menderita kanker pada satu payudara. Risiko ini lebih tinggi bila kanker payudara terdiagnosis pada usia muda.
- 7) Ras dan etnis: Secara keseluruhan, wanita kulit putih berisiko lebih tinggi daripada wanita Afrika-Amerika.
- 8) Jaringan Payudara padat: Jaringan payudara yang padat mengurangi keakuratan mammogram. Risiko kanker payudara adalah 1,2 hingga 2 kali lipat dari rata-rata jaringan payudara. Beberapa kondisi payudara jinak:

- 9) *Lobular carcinoma in situ* (LCIS): Sel kanker tumbuh di lobulus penghasil susu, tetapi tidak tumbuh melalui dinding lobulus. Risiko terkena kanker invasif meningkat 7 hingga 11 kali lipat.
  - 10) Menstruasi: Wanita yang mengalami menopause pada periode pertama sebelum usia 12 tahun dan atau setelah usia 55 tahun memiliki risiko sedikit lebih tinggi terkena kanker payudara yang mungkin disebabkan oleh paparan jangka panjang terhadap hormon estrogen dan progesterone
  - 11) Riwayat terapi radiasi ke dada: Wanita (anak-anak atau dewasa muda) yang menerima terapi radiasi ke dada untuk mengobati jenis kanker lain (seperti limfoma) berada pada peningkatan risiko kanker payudara. Terapi radiasi setelah remaja 40 tahun tampaknya tidak meningkatkan risiko kanker payudara.
  - 12) Paparan *diethylstilbestrol* (DES): Wanita yang ibunya menjalani DES selama kehamilan juga memiliki risiko kanker payudara yang sedikit lebih tinggi.
- b. Faktor risiko kanker yang dapat diperbaiki meliputi:
- 1) Memiliki anak: Wanita yang tidak memiliki anak atau memiliki anak pertama setelah usia 30 tahun secara keseluruhan memiliki peningkatan risiko terkena kanker payudara.
  - 2) Kontrasepsi: Wanita yang menggunakan kontrasepsi oral memiliki risiko sedikit lebih tinggi terkena kanker payudara. Wanita yang telah berhenti menggunakan kontrasepsi oral

selama lebih dari 10 tahun tidak mengalami peningkatan risiko kanker payudara. Wanita yang menggunakan *Depo-medroxyprogesterone Acetate* (DMPA) memiliki risiko kanker payudara yang relatif tinggi.

- 3) Terapi hormon pasca menopause: Kombinasi terapi hormon pasca menopause meningkatkan risiko terkena kanker payudara.
- 4) Menyusui: Menyusui sedikit mengurangi risiko kanker payudara, terutama jika dilanjutkan selama 1,5 hingga 2 tahun.
- 5) Minum alkohol: Wanita yang minum 2 hingga 5 kali sehari, 1,5 kali lebih berisiko terkena kanker payudara.
- 6) Kegemukan atau obesitas: Banyak jaringan adiposa lebih memungkinkan mengalami.
- 7) Kanker payudara disebabkan oleh peningkatan kadar estrogen.
- 8) Aktivitas fisik: 1,25 hingga 2,5 jam berjalan aktif per minggu mengurangi risiko sebesar 18%.

### **3. Gejala**

Kanker payudara umumnya tidak menimbulkan gejala jika ukurannya masih kecil. Jika kanker payudara sampai teraba, pasien sering hanya mengeluhkan benjolan tidak nyeri. Kanker payudara juga dapat menyebar ke kelenjar getah bening ketiak dan menimbulkan benjolan, bahkan sebelum ukuran tumor payudara primer cukup besar untuk diraba. Gejala lain kanker payudara yang mungkin dijumpai, yaitu

pembengkakan di seluruh atau sebagian payudara, iritasi kulit (dimpling), nyeri payudara atau puting, retraksi puting, kulit payudara atau puting memerah, mengelupas, atau menebal, keluarnya secret dari payudara (selain air susu) (American Cancer Society, 2015).

#### **4. Patogenesis**

Tumorigenesis kanker payudara merupakan proses multi-tahap, tiap tahapnya berkaitan dengan satu mutasi tertentu atau lebih di gen regulator minor atau mayor. Terdapat dua jenis utama pada payudara orang dewasa; sel mioepitel dan sel sekretorik lumen (Sjamsuhidajat R, De Jong, 2010).

Secara klinis dan histopatologi, terdapat berbagai stadium morfologi yang mengarah pada tumor ganas. Hiperplasia duktus, yang ditandai dengan proliferasi sel epitel poliklonal yang tidak merata dengan pola kromatin dan bentuk nukleus yang tumpang tindih serta lumen duktus yang tidak teratur, seringkali merupakan tanda awal dari kecenderungan keganasan. Sel-sel di atas memiliki sitoplasma yang relatif rendah, batas sel tidak jelas, dan secara sitologi jinak. Perubahan dari hiperplasia menjadi hiperplasia duktal atipikal (kloning) memiliki sitoplasma sel yang lebih jelas, inti yang lebih jelas dan tidak tumpang tindih, lumen duktus yang teratur, dan secara klinis meningkatkan risiko kanker payudara (Sjamsuhidajat R, De Jong, 2010).

Setelah hiperplasia duktal atipikal, tahap selanjutnya adalah perkembangan karsinoma in situ, baik karsinoma duktal maupun karsinoma lobular. Karsinoma in situ memiliki proliferasi sel dengan karakteristik sitologi yang konsisten dengan tumor ganas, tetapi proliferasi sel ini tidak menginvasi stroma dan tidak menembus membran basal. Karsinoma lobular in situ biasanya menyebar ke seluruh jaringan payudara (bahkan di kedua sisi), biasanya tidak teraba, dan tidak terlihat pada pencitraan. Sebaliknya, karsinoma duktal in situ adalah lesi duktus segmental yang dapat menjadi kalsifikasi dan menyebabkan berbagai gejala. Setelah sel tumor menembus membran basal dan menginvasi stroma, tumor menjadi invasif, menyebar secara hematogen dan limfatik, dan dapat menyebabkan metastasis (Sjamsuhidajat R, De Jong, 2010).

Untuk wanita dengan risiko tinggi kanker payudara [Riwayat keluarga kanker payudara, mutasi gen BRCA1 atau BRCA2, atau duktal carcinoma in situ (DCIS), lobular carcinoma in situ (LCIS), atau perubahan prakanker ditunjukkan dari hasil biopsi], untuk mengurangi risiko kanker payudara, dapat dilakukan beberapa hal, seperti: (American Cancer Society, 2015).

- a. Pemeriksaan untuk mutasi gen BRCA mahal dan hanya boleh dilakukan jika diduga ada mutasi. Wanita dengan riwayat keluarga kanker payudara, ovarium, tuba fallopi, atau peritoneal dikaitkan

dengan peningkatan risiko mutasi gen BRCA. (National Cancer Institute, 2015).

b. Kemoprevensi kanker payudara

Kemoprevensi adalah penggunaan obat-obatan untuk mengurangi risiko kanker. Meskipun *tamoxifen* dan *raloxifene* dapat membantu mengurangi risiko kanker payudara, *tamoxifen* memiliki beberapa efek samping, jadi penting untuk mempertimbangkan manfaat dan risikonya. Sebuah uji klinis dengan skala besar yang diterbitkan pada tahun 2015 menunjukkan bahwa kemoprevensi *tamoxifen* mengurangi risiko kanker payudara dan efeknya bertahan selama 10 tahun setelah 5 tahun penghentian pengobatan *tamoxifen*. (Cuzick J, Sestak I., 2015).

c. Operasi pencegahan untuk wanita dengan risiko sangat tinggi

- 1) Mastektomi preventif: Reseksi kedua payudara sebelum kanker didiagnosis mengurangi risiko kanker payudara hingga 97%. Pertimbangan untuk operasi ini adalah pemeriksaan genetik dengan mutasi pada gen BRCA, riwayat keluarga kanker payudara, biopsi menunjukkan LCIS, dan kanker payudara pada satu payudara dengan riwayat medis.
- 2) Ovariectomi profilaksis: Ovarium premenopause diangkat pada wanita dengan mutasi BRCA mengurangi risiko kanker payudara hingga lebih dari 50%. Ovarium adalah sumber utama estrogen dalam tubuh (Antonova L, Aronson K., 2011).

## 5. Pemeriksaan penunjang

Untuk mendukung uji klinis, mamografi dan ultrasonografi dapat membantu mendeteksi kanker payudara. Tes diagnostik radiologi untuk staging termasuk rontgen dada, USG abdomen (hepar), dan skintigrafi tulang, dan tes diagnostik radiologi opsional (jika diperlukan) termasuk *magnetic resonance imaging* (MRI), CT scan, PET scan, dan pemeriksaan tulang (Sjamsuhidajat R, De Jong. 2010).

### a. Mammografi

Mammografi membantu mendeteksi perubahan pada payudara sebelum tanda atau gejala muncul. (American Cancer Society, 2016). Dalam tes ini, payudara ditekan di antara kedua lempengan sehingga payudara "rata". Jika hasil mammogram menunjukkan bagian abnormal yang diduga kanker, diperlukan biopsi untuk memastikan diagnosisnya (American Cancer Society, 2016). Jika mammogram tidak menunjukkan adanya tumor, tetapi pasien atau dokter merasakan adanya benjolan, biasanya dilakukan biopsi untuk memastikan bahwa benjolan tersebut bukan kanker, kecuali jika USG menunjukkan bahwa benjolan tersebut adalah kista. (American Cancer Society, 2016). Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa wanita yang menerima mamografi secara teratur memiliki risiko 10-25% lebih rendah meninggal akibat kanker payudara dibandingkan dengan wanita yang tidak (2014).



**b. Ultrasonografi**

Ultrasonografi membantu menentukan ukuran lesi dan membedakan antara kista dan tumor padat, tetapi biopsi aspirasi jarum halus (FNAB), biopsi inti terbuka, atau biopsi simpul sentinel dapat digunakan untuk mendiagnosis kelainan payudara.

**c. *Magnetic resonance imaging (MRI)***

Pencitraan resonansi magnetik digunakan untuk (1) pasien muda karena mamografi payudara wanita muda yang tidak jelas, (2) untuk mendeteksi kekambuhan setelah BCT, dan (3) dilakukan untuk mendeteksi dini terulangnya kanker payudara ganas dengan pemeriksaan fisik dan pemeriksaan lain kurang jelas.

**d. Imnohistokimia**

Studi imunohistokimia telah dilakukan untuk mendukung terapi yang ditargetkan termasuk: ER (reseptor estrogen), PR (reseptor progesteron), c-erbB-2 (HER-2 neu), cathepsin D, Periksa status p53 (tergantung situasinya), Ki<sup>67</sup>, dan Bcl<sub>2</sub>. Seperlima dari kanker payudara memiliki jenis protein pemacu pertumbuhan yang disebut HER2/neu (HER2). Gen HER2/neu diekspresikan secara berlebihan pada pasien dengan kanker payudara HER2 (+). Kanker payudara dengan kondisi ER (-), PR (-), dan HER2/neu (-), disebut triple-negatif, cenderung progresif dan memiliki prognosis yang buruk.

### e. Biopsi

Jika pemeriksaan fisik dan mamografi dicurigai, biopsi harus selalu dilakukan. Jenis biopsi yang dapat dilakukan adalah biopsi jarum halus (*fine needle aspiration biopsy*, FNAB), *core biopsy* (jarum besar), dan biopsi bedah. Sementara FNAB hanya memungkinkan sitologi, biopsi jarum besar dan biopsi bedah dapat menganalisis struktur jaringan payudara, memungkinkan ahli patologi untuk menentukan apakah tumornya invasif (Sjamsuhidajat R, De Jong. 2010).

#### 1) *Fine needle aspiration biopsy* (FNAB)

Sejumlah kecil jaringan disedot dari tumor dengan jarum halus dan diperiksa di bawah mikroskop. Jika lokasi tumor mudah teraba, FNAB dapat dilakukan saat meraba tumor. Namun, jika benjolan tidak teraba dengan jelas, USG dapat digunakan untuk memandu arah jarum.

#### 2) *Core biopsy*

Biopsi ini menggunakan jarum yang ukurannya cukup besar sehingga dapat diperoleh specimen silinder jaringan tumor yang tentu saja lebih bermakna dibanding FNAB. *Core biopsy* dapat dilakukan sambil memfiksasi massa dengan palpasi, ataupun dipandu dengan ultrasonografi, mamografi, ataupun MRI. *Core biopsy* dapat membedakan tumor non invasif dengan yang invasif serta grade tumor, tetapi sekitar 10%

*core biopsy* memberi hasil yang inkoklusif oleh karenanya memerlukan biopsi terbuka untuk memberi diagnosis definitifnya.

3) Biopsi terbuka

Jika mammogram menunjukkan kelainan yang mengindikasikan tumor ganas, dilakukan biopsi terbuka. FNAB atau hasil biopsi inti mencurigakan. Jika mammogram positif tetapi FNAB negatif (hanya sel normal yang terlihat), diperlukan biopsi. Biopsi adalah wajib jika hasil mamografi negatif (tidak ada kelainan yang terlihat) tetapi gejala klinis pasien menunjukkan kanker payudara.

4) Biopsi kelenjar getah bening sentinel

Biopsi ini dilakukan untuk menentukan status keterlibatan kelenjar getah bening aksila dan parasternal (internal mammary chain) menggunakan pemetaan getah bening.

## 6. Penentuan stadium karsinoma payudara

*American Joint Committee on Cancer Staging of Breast Carcinoma*  
(Tabel 1. Stadium karsinoma payudara Dikutip dari Kumar dkk., 2012)

Stadium	Keterangan
Stadium 0	(Termasuk penyakit Paget pada puting) dan LCIS
Stadium I	Kanker infiltrasi dengan kelenjar getah bening negatif dan kurang dari 2 cm
Stadium IIA	Kanker infiltrasi kurang dari 2 cm dengan metastasis kelenjar getah bening, atau lebih dari 2 cm dan kurang dari 5 cm dengan kelenjar getah bening negatif
Stadium IIB	Kanker infiltratif dengan kelenjar getah bening positif dan diameter lebih dari 2 cm dan kurang dari 5 cm atau kanker invasif lebih besar dari 5 cm tanpa metastasis kelenjar getah bening
Stadium IIIA	Kanker invasif dengan ukuran berapa pun dengan kelenjar getah bening tetap (yaitu invasif). Infiltrasi kelenjar getah bening antara kelenjar getah bening atau struktur lain dengan diameter lebih besar dari 5 cm atau metastasis kelenjar getah bening yang tidak terfiksasi
Stadium IIIB	Karsinoma inflamasi, karsinoma yang menembus dinding dada, karsinoma yang menembus kulit, karsinoma dengan nodul kulit satelit, atau karsinoma yang bermetastasis ke kelenjar getah bening payudara internal ipsilateral.
Stadium IV	Metastasis ke tempat jauh

## 7. Tatalaksana

Tatalaksana kanker payudara meliputi tindakan operasi, kemoterapi, radioterapi, terapi hormon, *targeting therapy*, terapi rehabilitasi medik, serta terapi paliatif (Sjamsuhidajat R, De Jong. 2010).

## 8. Kultur sel *Michigan Cancer Foundation-7*

*Michigan Cancer Foundation-7* (MCF-7) adalah sel yang digunakan untuk uji antikanker payudara secara invitro karena bentuknya terbaik dari semua jenis sel kanker payudara manusia dan juga karena sel MCF-7 merupakan model sel kanker yang mudah mengalami resistensi (Mubarok et al., 2008). Sel MCF-7 berasal dari jaringan payudara wanita kaukasia berumur 69 tahun, golongan darah O dan RH positif, dalam bentuk sel yang melekat (*adherent*). Sel MCF-7 menyerupai sel epitel yang tumbuh secara monolayer dan diambil dari tempat efusi pleural metastasis kanker payudara pada penderita kanker payudara. Biakan sel MCF-7 memiliki beberapa karakteristik pada epitel mamari yang berbeda termasuk dalam kemampuannya untuk memproduksi estradiol via reseptor sitoplasma dan kesanggupannya untuk membentuk *dome*. Dalam pertumbuhannya sel ini akan membentuk kultur selapis pada labu kultur dan ditumbuhkan dalam medium DMEM (Widowati dan Mudahar, 2009).

## 9. Kemoprevensi

Kemoprevensi adalah penggunaan obat-obatan alami untuk menghambat pertumbuhan kanker invasif dengan menghambat kerusakan DNA. Oleh karena itu, penggunaan obat ini menghambat karsinogenesis atau menghilangkan proses kerusakan sel prakanker yang sedang berlangsung (Sugiharto, 2006).

Antineoplastik dapat mempengaruhi proses kehidupan sel dalam beberapa tahap:

a. Fase mitosis (M), periode di mana pembelahan aktif terjadi.

Kemudian memiliki dua pilihan:

1) Masuk ke fase G1 dan mulai proses proliferasi.

2) Menuju fase istirahat (G0), pada fase istirahat (G0) kemampuan sel berproliferasi hilang dan sel meninggalkan siklus secara tak terpulihkan.

b. Tahap mitosis akhir (G1), RNA dan sintesis protein terjadi. Sintesis RNA yang optimal terjadi pada akhir fase G1.

c. Pada tahap sintetik (S), terjadi replikasi DNA.

d. Sintesis akhir (G2), yang dimulai ketika sel menjadi tetraploid dan mengandung dua DNA, melanjutkan sintesis RNA, dan kembali ke mitosis.

## 10. Kemoterapi kanker dengan doxorubisin

Doksorubisin adalah antibiotik antrasiklin yang biasa digunakan untuk mengobati berbagai jenis kanker, termasuk leukemia akut,

kanker payudara, kanker tulang, dan kanker ovarium (Childs dkk., 2002). Senyawa ini ditemukan pada tahun 1960-an oleh *Streptomyces peucetius var caesius* dan digunakan secara luas (Minotti dkk., 2004). Hasil penelitian retrospektif menunjukkan bahwa kardiotoxicitas pemberian doxorubisin adalah efek samping yang bergantung pada dosis (Wattanapitayakul dkk., 2005).

Beberapa antibiotik yang berasal dari *Streptomyces* memiliki sifat penghambatan proliferasi sel selain efek antibakteri. Zat-zat ini dapat mengikat DNA dengan cara yang kompleks dan menghentikan sintesisnya. Yang paling penting adalah doxorubicin, daunorubicin dan turunan sintetikanya (epirubicin, idarubicin, mitoxantrone), bleomycin, (d-) actinomycin, (Lyovac, cosmegen) dan mitomycin (mitomycin-C). Obat yang terakhir ini terutama dialkylasi. Zat onkolitik ini terlalu toksik untuk digunakan sebagai antibiotik (Tjay T.H dkk., 2008).

Kemampuan obat-obat ini dengan kerja sitotoksik disebabkan interaksinya dengan DNA, terjadi kerusakan fungsi DNA. Obat-obat ini termasuk golongan spesifik siklus sel (Mycek M.J, Harvey R.A, Champe P.C, 2001). Banyak di antara antibiotik ini terikat pada DNA secara interkalasi antara basa spesifik dan menghambat sintesis RNA dan DNA baru (atau keduanya), menyebabkan rantai DNA terputus dan replikasi sel (Katzung B.G, 1998). Oleh karena itu obat ini menghambat sintesis DNA dan RNA, kemungkinan dengan bekerja pada topoisomerase II (M.J. Neal, 2006).

Antibiotik antrasiklin ini berasal dari *Streptomyces peucetius* var *caesius*, merupakan satu di antara pelbagai obat antikanker yang banyak digunakan. Dua jenis obat yang berasal dari golongan yang sama yaitu doksorubicin dan daunorubicin sudah mendapat persetujuan FDA untuk digunakan. Doksorubicin mempunyai spektrum yang luas terhadap pelbagai jenis kanker (Katzung B.G, 1998).

#### 1) Mekanisme kerja

Tiga cara kerja utama antrasiklin terhadap jaringan dan tumor yaitu (1) afinitas tinggi untuk pengikatan DNA yang dapat disisipkan, yang menghambat sintesis DNA dan RNA, dan pemisahan untai DNA melalui aksi pada topoisomerase II. (2) Perubahan keadaan cairan dan transpor ion karena pengikatan pada membran, dan (3) Radikal oksigen melalui proses reduksi melalui pembentukan radikal semikuinon bebas yang diperantarai enzim. Proses terakhir ini mungkin menjadi penyebab keracunan otot jantung yaitu melalui kerusakan membran karena radikal oksigen (Katzung B.G, 1998).

#### 2) Farmakokinetika

Dalam penggunaan klinik antrasiklin diberikan intravena. Kadar darah puncak menurun 50% dalam 30 menit pertama sesudah suntikan, tetapi kadar yang bermakna bertahan sampai 20 jam. Antrasiklin dimetabolisme oleh hati dengan reduksi dan hidrolisa cincin *substituents*. Bentuk alkohol merupakan metabolit



aktif, sedangkan aglikon tidak aktif. Umumnya obat dan metabolitnya dikeluarkan dalam cairan empedu dan seperenam melalui urin. Beberapa metabolit masih aktif sebagai antitumor. Ekskresi bilier meliputi resirkulasi enterohepatik dari metabolit obat sitotoksik. Pasien dengan bilirubin serum yang meningkat secara bermakna ( $>2,5$  mg/dL) dosis awal antrasiklin harus dikurangi sampai 75% (Katzung B.G, 1998).

### 3) Penggunaan klinik

Doksorubisin merupakan salah satu obat antikanker yang penting dengan pemakaian utama dalam klinik untuk karsinoma payudara, endometrium, ovarium, testis, tiroid, dan paru serta dalam pengobatan pelbagai *sarkoma Ewing*, *osteosarcoma*, dan *rhabdomyosarkom*. Juga digunakan untuk kanker darah seperti leukemia akut, *myeloma multiple*, penyakit *hodgkin*, dan *limfoma non-hodgkin* difus.

### 4) Efek samping

Depresi sumsum tulang dalam jangka pendek dan cepat sembuh. Keracunan antrasiklin yang nyata (doxorubicin dan daunorubicin) dibanding obat-obat yang lain meliputi keracunan yang potensial ireversibel, toksisitas jantung yang bersifat kumulatif dan bergantung dosis. Mekanisme keracunan jantung ini masih dalam penelitian tetapi menyangkut produksi intraseluler radikal bebas dalam miokard oleh doxorubicin. Hal ini jarang

terjadi jika dosis di bawah 500 mg/m<sup>2</sup>. Penggunaan dosis mingguan yang lebih rendah atau infus terusan doxorubicin untuk menghindari konsentrasi puncak pada plasma akan mengurangi frekuensi keracunan jantung dibandingkan dengan pemberian dosis lebih tinggi dijadwal dan intermiten (tiap 3-4 minggu). Keracunan sekunder doxorubicin dan daunorubicin yang bersifat universal adalah alopecia total atau hebat dengan dosis standar.

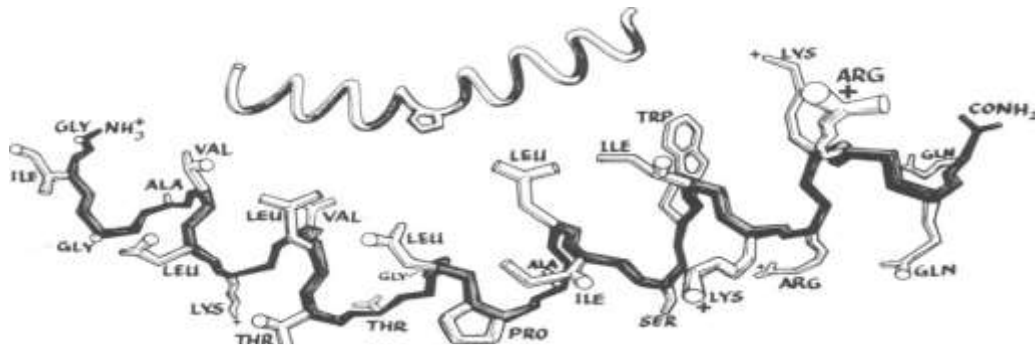
## **B. Tinjauan melittin**

### **1. Pengertian**

Melittin adalah peptida kationik amfipatik. Melittin bekerja pada tingkat membran ekstrasel dengan mengikat molekul lipid atau polimer kationik pada permukaan membran sel (Natzir R, 2009).

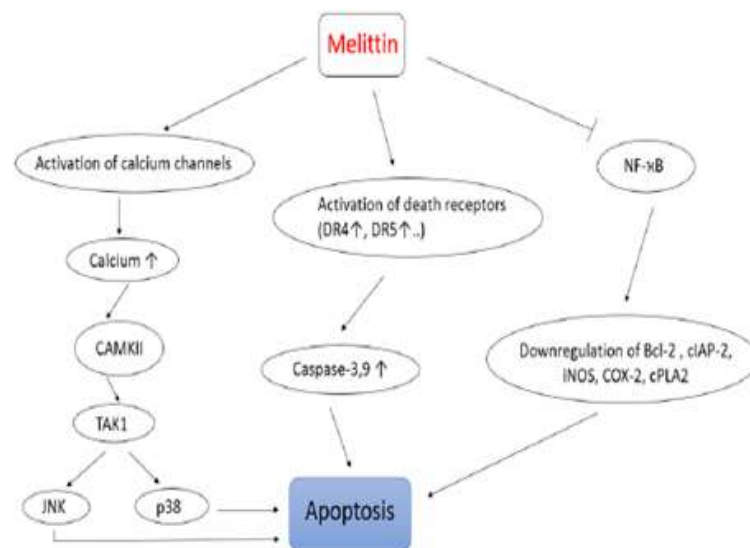
### **2. Struktur protein dari melittin**

Protein melittin (C131H229N39O31) merupakan komponen utama dalam racun lebah madu. Polipeptidanya terdiri dari 26 asam amino, dan struktur utamanya adalah Gly Gly Ile Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Tp Ile Lys Lys Arg Arg Gln Gln (Terwilliger dkk., 2010).



Gambar 1. Struktur Melittin  
(Dikutip dari Thomas C. Terwilliger, Larry Weissman, 1982)

### 3. Mekanisme apoptosis dari melittin



Gambar 2. Diagram skema mekanisme utama aksi melittin sebagai obat antikanker (Dikutip Wehbe R, Frangieh J, dkk., 2019)

### 4. Hasil penelitian dari melittin

Menurut Creighton, H.C. (1974), melittin juga menunjukkan aktivitas antibakteri yang potensial. Misalnya, melittin memiliki efek penghambatan pada bakteri *Borrelia burgdorferi* penyebab penyakit Lyme spirochle (Lubke & Garon, 1997). Melittin juga telah terbukti membunuh ragi *Candida albicans* dan menekan infeksi *Mycoplasma hominis* dan

*Chlamydia trachomatis*.

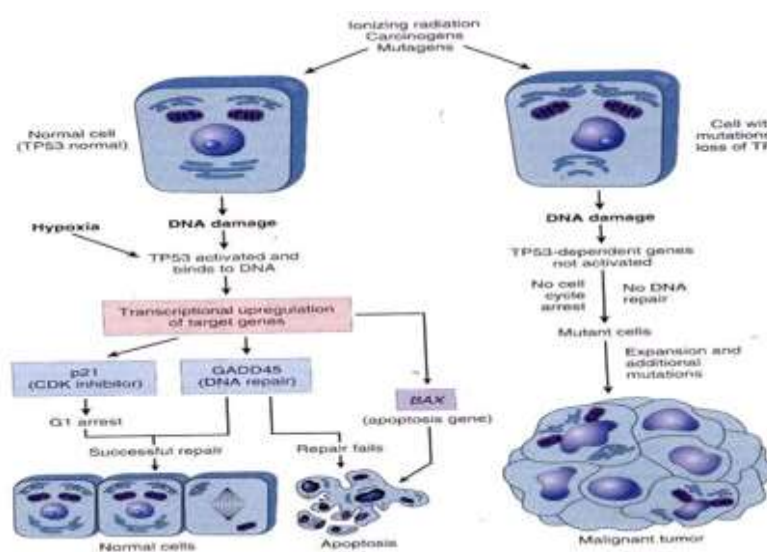
Melittin juga memiliki kemampuan untuk merangsang sistem hipofisis-adrenal untuk menghasilkan kortison. Kemampuan melittin untuk merusak dinding sel membantu membunuh sel kanker tanpa merusak sel normal. Melittin dianggap sebagai pilihan pengobatan kanker yang lebih efektif dibandingkan dengan konsep "*plantsbacteria immunotoxin*" (Natzir R, 2009).

Melittin menunjukkan aktivitas biologis yang baik sebagai anti inflamasi, hasilnya 2 kali lipat mengurangi toksisitas melittin dan signifikan menurunkan produksi *nitric oxide* (NO) (Gafurjon T dkk., 2011). Melittin meningkatkan ekspresi protein p53, proapoptotic Bax, dan caspase-3 serta menghambat protein antiapoptotic Bcl-2. Efek antiproliferatif dari racun lebah dan melittin pada *Vascular Smooth Muscle Cell* mungkin karena menginduksi apoptosis melalui supresi NF-KB dan peningkatan aktivasi Akt melalui jalur proapoptotic (Dong J.S dkk., 2006).

Melittin menghambat metastasis sel tumor melalui penghambatan proliferasi sel dengan induksi migrasi jalur yang bergantung pada Rac1, melittin menunjukkan agen terapi yang potensial untuk HCC (Chen W dkk., 2008). Melittin menekan proliferasi sel dan migrasi garis sel kanker kandung kemih manusia T24 dan 5637 sel line melalui jalur pensinyalan PI3K/Akt dan TNF (Jin, Z., et al., 2018).

### C. Gen protein 53 (*p53*) pengawal genom

Gen penekan tumor *p53* adalah salah satu gen yang paling sering bermutasi pada kanker manusia. Gen ini memiliki banyak fungsi dan, seperti gen lain yang dijelaskan di bagian ini, tidak dapat dengan mudah diklasifikasikan ke dalam kelompok fungsional tertentu. Meskipun *p53* dapat memberikan efek antiproliferatif, tetapi tak kalah penting, gen ini juga mengontrol apoptosis. Pada dasarnya, *p53* dapat dianggap sebagai monitor pusat stres, menginstruksikan sel untuk merespons dengan tepat baik dengan penghentian siklus sel atau apoptosis. Berbagai stresor dapat memicu jalur respons *p53* seperti anoksia, ekspresi onkogen yang tidak sesuai (seperti MYC), dan kerusakan integritas DNA. Dengan mengontrol respon kerusakan DNA, *p53* memainkan peran penting dalam menjaga integritas genom, seperti terlihat pada pembahasan berikut (Kumar V dkk., 2012).



Gambar 3. Peran *p53* dalam menjaga integritas genom.  
(Dikutip; Kumar V dkk., 2012)

Protein 53 normal dalam sel tanpa tekanan memiliki waktu paruh yang pendek (20 menit). Waktu paruh yang pendek ini disebabkan oleh pengikatan pada MDM2, protein yang berusaha menghancurkan p53. p53 mengalami modifikasi pasca-transkripsi untuk menghilangkan MDM2 dan memiliki waktu paruh yang lebih lama. Selama proses pelepasan MDM2, p53 juga aktif sebagai faktor transkripsi. Puluhan gen yang transkripsinya disebabkan oleh p53 telah diidentifikasi. Gen-gen ini dapat dibagi menjadi dua kategori umum: gen yang menyebabkan penghentian siklus sel dan gen yang menyebabkan apoptosis (Kumar V dkk., 2012).

Penghentian siklus sel yang dimediasi oleh *p53* dapat dianggap sebagai respons primordial terhadap kerusakan DNA (**Gambar 3**). Hal ini terjadi pada akhir fase  $G_1$  dan terutama disebabkan oleh transkripsi CDKI yang bergantung p53 *CDKN1A* (*p21*). Gen *CDKN1A*, seperti disebutkan sebelumnya, ini menghambat kompleks cyclin/CDK dan mencegah fosforilasi RB, yang penting bagi sel untuk memasuki fase  $G_1$ . Penghentian siklus sel ini disambut baik karena "memberi napas" bagi sel untuk memperbaiki kerusakan DNA, p53 juga mendukung proses tersebut dengan menginduksi protein spesifik seperti GADD45 (penghambatan pertumbuhan dan kerusakan DNA) yang mendukung perbaikan DNA. Ketika kerusakan DNA diperbaiki, p53 meregulasi transkripsi MDM2 dan kemudian menurunkan regulasi p53, menghilangkan hambatan siklus sel. Jika kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki selama jeda, p53 normal menyebabkan apoptosis dan menginduksi sel ke "kuburan". Protein ini

melakukan ini dengan memicu gen penginduksi apoptosis seperti BAX. Belum sepenuhnya dipahami bagaimana p53 mendeteksi kerusakan DNA dan bagaimana gen menilai kelayakan perbaikan DNA. Salah satu sensor tersebut untuk kerusakan DNA bisa menjadi protein ATM yang bermutasi di ataksia-telangiectasia. Pasien dengan ataksia-telangiectasia tidak dapat memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh sinar-x. Protein ATM dapat mengikat DNA yang rusak dan memfosforilasi p53. Pasien dengan ataksia-telangiectasia mungkin tidak dapat memperbaiki kerusakan DNA karena sensor ATM tidak dapat memicu jalur p53. Selain sensor cedera awal, p53 membutuhkan "teman" yang dapat mengetahui apakah perlu untuk memulai apoptosis. (Kumar V dkk., 2012).

Sederhananya, p53 mendukung perbaikan DNA dengan mendeteksi kerusakan DNA melalui mekanisme yang tidak diketahui, memicu terminasi G, dan memicu gen perbaikan DNA. Sel-sel yang rusak secara ireversibel oleh DNA diarahkan ke apoptosis oleh p53 (Gambar 3). Untuk kegiatan ini, p53 pantas disebut "genome sentinel". Dengan hilangnya homozigositas p53, kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki, mutasi tetap pada sel yang membelah, dan sel mengikuti jalur satu arah menuju transformasi ganas (Kumar V et al., 2012).

Pentingnya p53 dalam pengendalian karsinogenesis dibuktikan dengan fakta bahwa lebih dari 70% kanker manusia memiliki defek pada gen ini dan sisanya memiliki defek pada gen *upstream* atau *downstream* p53. Hilangnya homozigositas untuk gen p53 ditemukan di hampir semua

kanker, termasuk kanker paru-paru, kanker usus besar, dan kanker payudara, yang merupakan tiga penyebab utama kematian akibat kanker. Paling sering, sel somatik memiliki mutasi inaktivasi yang mempengaruhi kedua alel p53. Kurang umum adalah pasien yang mewarisi alel p53 mutan. Seperti gen RB, pewarisan alel mutan merupakan predisposisi tumor ganas karena hanya satu pukulan tambahan yang diperlukan untuk menonaktifkan alel normal kedua. Orang-orang ini, diduga menderita sindrom Li-Fraumeni, 25 kali lebih mungkin mengembangkan tumor ganas pada usia 50 tahun daripada populasi umum. Berbeda dengan pasien yang mewarisi alel RB yang bermutasi, pasien dengan sindrom Li-Fraumeni memiliki rentang tumor yang bervariasi. Jenis tumor yang paling umum adalah sarkoma, kanker payudara, leukemia, tumor otak, dan kanker korteks adrenal. Tumor pada pasien dengan sindrom Li-Fraumeni muncul pada usia yang lebih muda dibandingkan dengan tumor sporadis, dan pasien ini mungkin memiliki beberapa tumor primer (Kumar V et al., 2012).

Protein keluarga p53 seperti p63 dan p73 yang fungsinya cukup luas antara lain berperan dalam menghambat siklus sel, diferensiasi, apoptosis, *senescence*, dan angiogenesis. Efek utama p53 adalah mengemblok siklus sel sehingga DNA yang rusak dapat direparasi. Beberapa gen yang menjadi sasaran p53 adalah gen-gen yang berperan pada apoptosis, mengemblok siklus sel, angiogenesis, dan autoregulasi. Fungsi lain p53 adalah mereparasi kerusakan DNA dan menstimulasi



ekspresi gen dapat menghambat angiogenesis (Macdonald F dkk, dalam Aziz M.F, 2006).

Seperti protein RB, p53 normal dapat dinonaktifkan oleh virus DNA tertentu. Protein yang dikodekan oleh HPV karsinogenik, virus hepatitis B (HBV), dan mungkin virus Epstein-Barr (EBV) dapat mengikat protein p53 normal dan kehilangan fungsi perlingkungannya. Oleh karena itu, DNA virus dapat menghancurkan dua gen supresor tumor yang paling terkenal, RB dan p53 (Kumar et al., 2012).

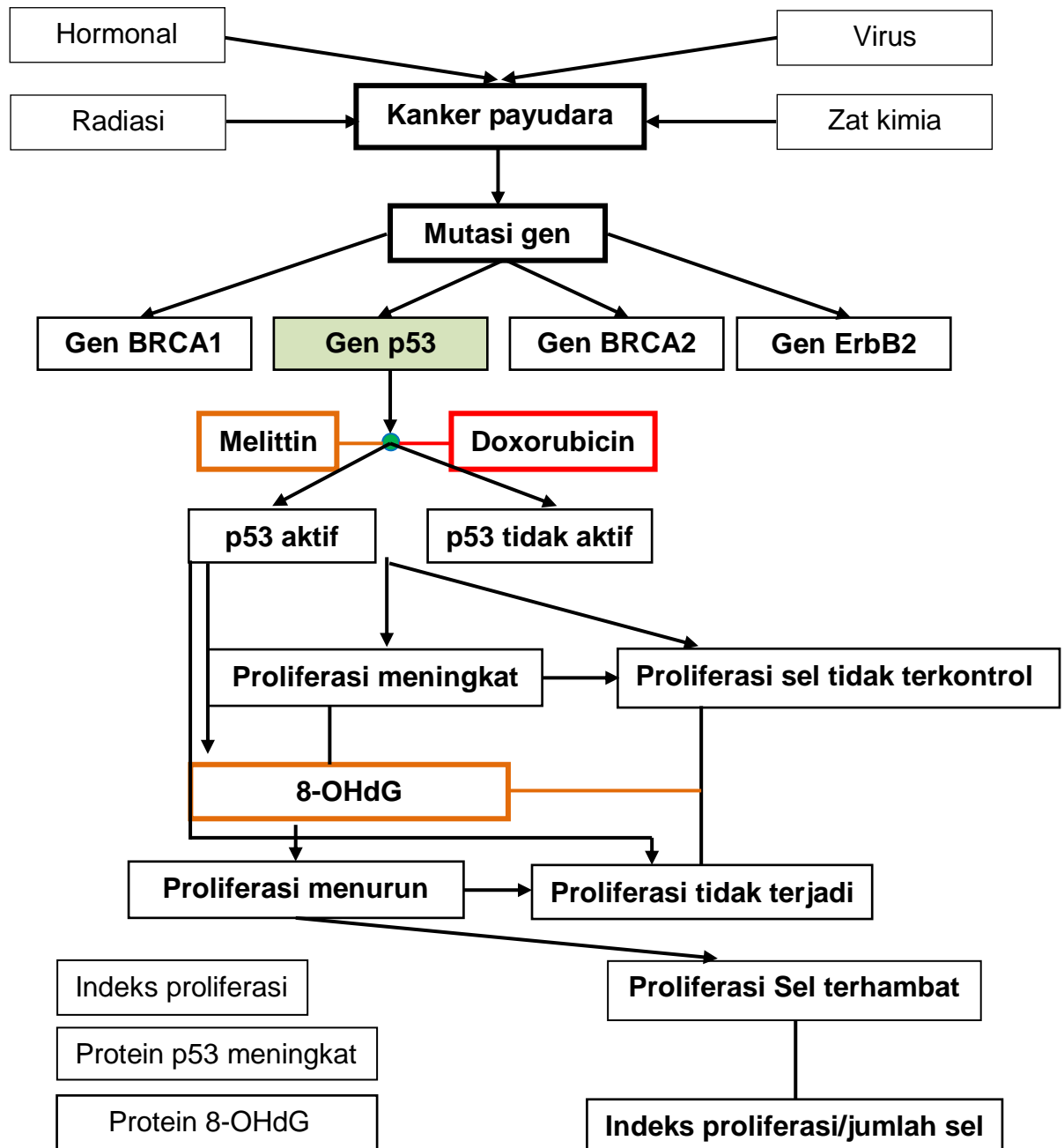
#### **D. Senyawa *8-Hidroxydeoxyguanosine (8-OHdG)***

*8-Hidroxydeoxyguanosine (8-OHdG)* adalah senyawa yang sangat larut dalam air yang diekskresikan langsung dalam urin sebagai penanda kerusakan DNA yang paling dapat dideteksi dalam urin. Oleh karena itu, sering digunakan sebagai penanda stres oksidatif (Boonla, et al, 2004). Terjadinya stres oksidatif dalam tubuh dapat dideteksi dengan adanya senyawa penanda stres oksidatif. Salah satunya adalah 8-OHdG. 8-OHdG dalam tubuh diproduksi oleh oksidasi DNA, sebuah nukleotida guanin, oleh ROS. Hal ini menyebabkan suatu kondisi yang disebut mutasi DNA (Sudjarwo, 2004). 8-OHdG merupakan DNA mutagen yang berasal dari rantai guanin C8 proses oksidasi peroksinitrit melalui proses oksidasi (Huang YZ, Zhang BB, 2011). Guanin (G) dinitrasi pada karbon ke-8 membentuk 8-nitroguanin (8-NitroG) nitrat (Huang YZ, Zhang BB, 2011). DNA yang rusak dan memendek BER ini ditemukan dalam bentuk 8-

OHdG (Valavanidis et al., 2009). Oleh karena itu, 8-OHdG dapat digunakan sebagai biomarker risiko kanker terkait dengan paparan senyawa karsinogenik (Valavanidis et al., 2009).

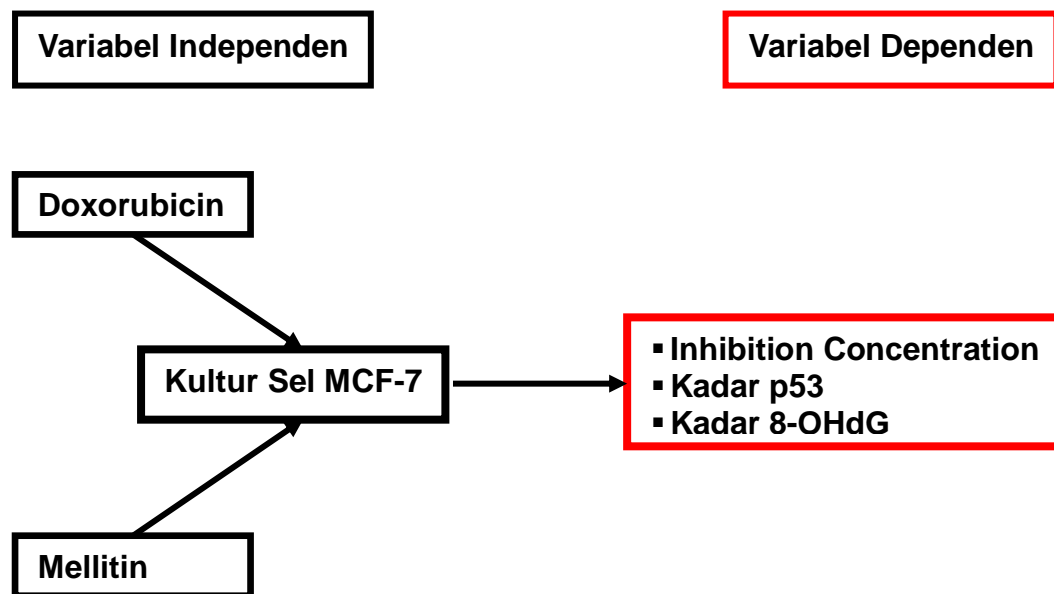
Beberapa penelitian menunjukkan adanya hubungan antara pembentukan senyawa 8-OHdG dengan karsinogenesis *in vivo*. Oksigen yang diubah menjadi anion superoksida sebagai hasil dari pembentukan radikal bebas (ROS) diketahui menginduksi kodon hotspot untuk gen p53 dan Ha-Ras melalui konversi basa GC → TA pada sel kanker. Peningkatan kadar 8-OHdG dan kehilangan basa pada sel tumor jinak dianggap terkait dengan ukuran tumor di dalam sel jinak ini dan potensi tumor jinak untuk berubah menjadi tumor ganas (Olinski et al. 2002). Senyawa yang dihasilkan dengan kerusakan DNA adalah 8-OHdG, yang merupakan bentuk modifikasi dari basa DNA guanin pada posisi C-8 akibat penambahan radikal hidroksil dan dapat digunakan sebagai indikator toksisitas bahan tertentu. Kehadiran 8-OHdG dalam darah atau urin mencerminkan tingkat kerusakan oksidatif pada DNA (Berniyanti T, 2018). Melittin memodulasi ekspresi mRNA dari gen yang terlibat dalam respon kerusakan DNA, stres oksidatif dan apoptosis pada limfosit sel darah tepi manusia (Gajski, G., et al., 2016).

## E. Kerangka Teori



Gambar 4. Bagan Kerangka Teori

## F. Kerangka Konsep



Keterangan:

□ : Variabel independen

□ : Variabel dependen

→ : Hubungan antar variabel

Gambar 5. Bagan Kerangka Konsep

### G. Hipotesis penelitian

Berdasarkan kerangka teoritis dan konseptual di atas, hipotesis sebagai disusun berikut:

1. Melittin dari racun lebah (*Apis mellifera*) hasil uji MTT bersifat sitotoksik dan mempunyai nilai *inhibitor concentration* (IC)  $IC_{10-24 \text{ jam}}$   $IC_{25-24 \text{ jam}}$   $IC_{50-24 \text{ jam}} < 100$
2. Melittin dari racun lebah (*Apis mellifera*) hasil uji ELISA menunjukkan kadar protein p53 lebih tinggi dibandingkan dengan doxorubisin dan kontrol pada  $IC_{10-24 \text{ jam}}$ ,  $IC_{25-24 \text{ jam}}$ ,  $IC_{50-24 \text{ jam}}$  terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7.
3. Melittin dari racun lebah (*Apis mellifera*) hasil uji ELISA menunjukkan kadar protein 8-OHdG lebih rendah dibandingkan dengan doxorubisin dan lebih tinggi dari kontrol pada  $IC_{10-24 \text{ jam}}$ ,  $IC_{25-24 \text{ jam}}$ ,  $IC_{50-24 \text{ jam}}$  untuk kultur sel kanker payudara MCF-7.

### H. Variabel penelitian

1. Variabel dependen  
Indeks proliferasi pada kultur sel kanker payudara (MCF-7): kadar protein p53 dan 8-OHdG.
2. Variabel independen  
Melittin dari racun lebah (*Apis mellifera*) dan doxorubicin yang di uji pada kultur sel kanker payudara (MCF-7).
3. Variabel yang akan diukur

Sel kultur kanker payudara (MCF-7) yang mengalami proliferasi

4. Variabel terkendali
  - a. Sel MCF-7.
  - b. Medium
  - c. Konsentrasi sel MCF-7.
  - d. Waktu, durasi, CO<sub>2</sub>, dan Suhu

### I. Definisi operasional

1. Sel MCF-7 yang digunakan berasal dari laboratorium *Hasanuddin University Medical Research Centre* (HUMRC) yang diambil dari biakan. Sel MCF-7 dikatakan *subconfluent* bila lebih dari 80% tumbuh melekat pada *well microplate*. Sel MCF-7 tidak terkontaminasi apabila pada *well* atau *microplate* hanya tumbuh sel MCF-7 tanpa adanya bakteri, jamur, ataupun mikroorganisme lain. Morfologi sel MCF-7 merupakan *fibroblast like cell* yang berbentuk *polihedral*.
2. Nilai *inhibitor concentration* (IC) IC<sub>10-24 jam</sub> IC<sub>25-24 jam</sub> IC<sub>50-24 jam</sub> <100 adalah (IC) melittin dari racun lebah (*Apis mellifera*) dan doxorubisin diukur dengan uji sitotoksik MTT Assay
3. Protein p53 adalah kadar protein p53 dari melittin, doxorubisin dan kontrol dalam kultur sel MCF-7 yang diukur dengan metode ELISA.
4. 8-OHdG adalah kadar 8-OHdG dari melittin, doxorubisin dan kontrol dalam kultur sel MCF-7 yang diukur dengan metode ELISA.