

**EFEK AFZELIN TERHADAP PENGHAMBATAN MIGRASI DAN
PENINGKATAN APOPTOSIS SEL KANKER PAYUDARA MDA-MB 231,
MELALUI HAMBATAN FAK DAN RAC-1**

DISERTASI

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Doktor



Oleh

EVA RACHMI

NIM. 117070100011051

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
KEKHUSUSAN BIOMEDIK**

**JURUSAN KEDOKTERAN - FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

DISERTASI

EFEK AFZELIN TERHADAP PENGHAMBATAN MIGRASI DAN PENINGKATAN APOPTOSIS SEL KANKER PAYUDARA MDA-MB 231, MELALUI HAMBATAN FAK DAN RAC-1


Oleh:

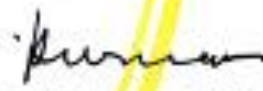
EVA RACHMI

Dipertahankan di depan penguji
Pada Tanggal : 19 Desember 2019
Dan dinyatakan memenuhi syarat

Komisi Pembimbing,

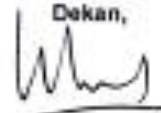

Prof. Dr. dr. Loeki Enggal Fitri, M.Kes., SpParK
Promotor


Agustina Tri Euphanti, S.Si, PhD
Ko-Promotor 1


Dr. dr. Basuki B. Purnomo, SpUJ(K)
Ko-Promotor 2

Malang,

Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,


Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si, Med, Sp.A(K)
NIP197307262005011008

PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah DISERTASI ini tidak terdapat karya ilmiah yang diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.


Apabila ternyata di dalam naskah DISERTASI ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia DISERTASI ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.



IDENTITAS TIM PENGUJI DISERTASI

JUDUL DISERTASI :

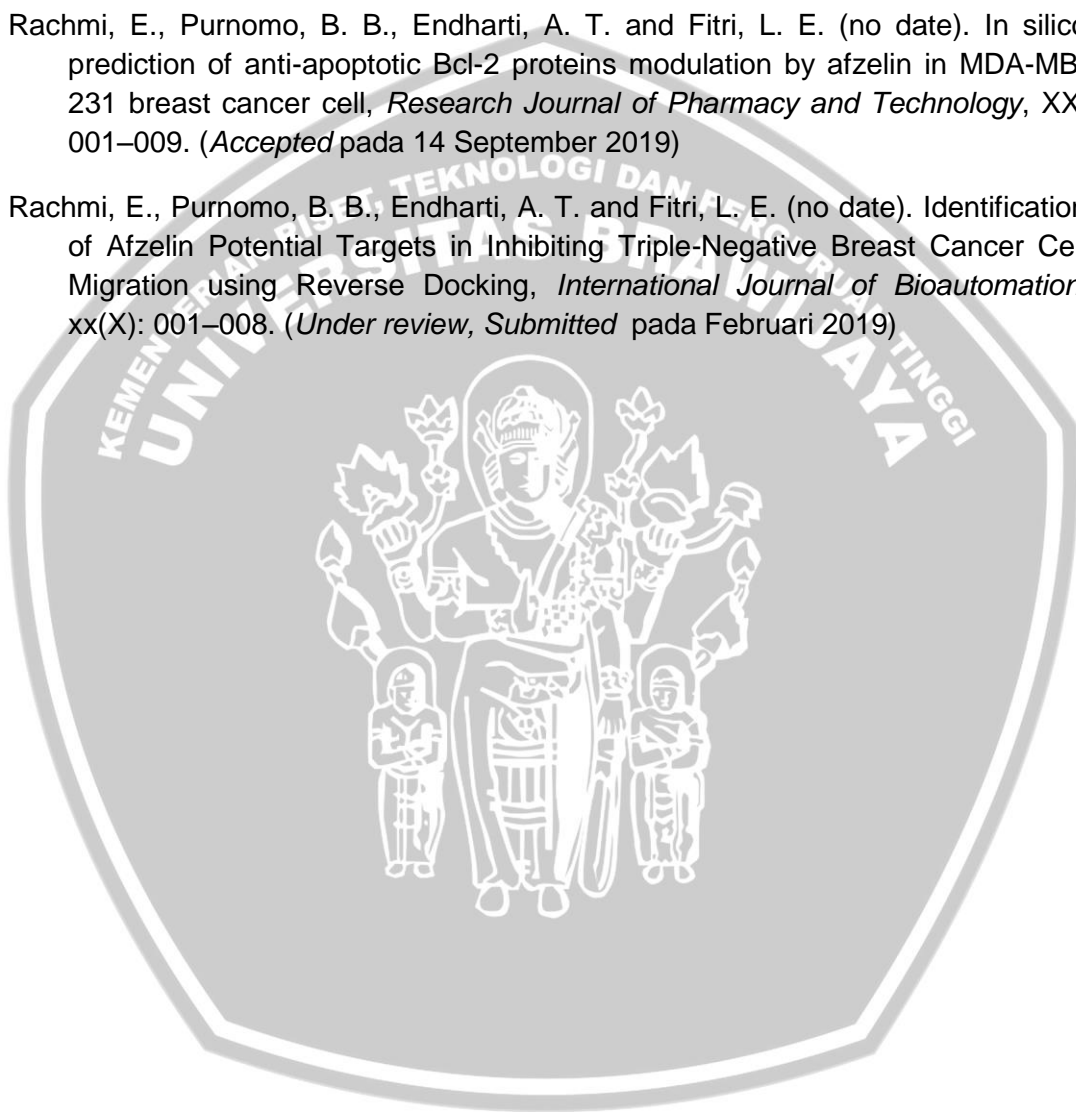
EFEK AFZELIN TERHADAP PENGHAMBATAN MIGRASI DAN PENINGKATAN APOPTOSIS SEL KANKER PAYUDARA MDA-MB 231, MELALUI HAMBATAN FAK DAN RAC-1



Nama : Eva Rachmi
 NIM : 117070100011051
 Program Studi : Ilmu Kedokteran
 Minat : Biomedik
 Komisi Pembimbing
 Promotor : Prof. Dr. dr. Loeki Enggr Fitri, M.Kes., Sp.ParK.
 Ko-promotor 1 : Agustina Tri Endharti, S.Si., PhD.
 Ko-promotor 2 : Dr. dr. Basuki Bambang Purnomo, Sp.U (K).
 Tim Dosen Penguji
 Penguji 1 : Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA.
 Penguji 2 : Dr. dr. Pudji Rahayu, Sp.THT-KL(K).
 Penguji 3 : Prof. Dr.dr. Ambar Mudigdo, Sp.PA(K).
 Ujian kelayakan disertasi : 04 Desember 2019
 Diseminasi disertasi : 19 Desember 2019

KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH

- Rachmi, E., Purnomo, B. B., Endharti, A. T. and Fitri, L. E. (2020). Afzelin inhibits migration of MDA-MB-231 cells by suppressing FAK expression and Rac1 activation, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 10(1): 077–082. doi: 10.7324/JAPS.2020.101010
- Rachmi, E., Purnomo, B. B., Endharti, A. T. and Fitri, L. E. (no date). In silico prediction of anti-apoptotic Bcl-2 proteins modulation by afzelin in MDA-MB-231 breast cancer cell, *Research Journal of Pharmacy and Technology*, XX: 001–009. (Accepted pada 14 September 2019)
- Rachmi, E., Purnomo, B. B., Endharti, A. T. and Fitri, L. E. (no date). Identification of Afzelin Potential Targets in Inhibiting Triple-Negative Breast Cancer Cell Migration using Reverse Docking, *International Journal of Bioautomation*, xx(X): 001–008. (Under review, Submitted pada Februari 2019)





*Karya Ilmiah ini kutujukan untuk mengenang
Nenek tercinta - Hj Fatimah Zuhro
Dan semua penyintas kanker payudara*

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil' aalamin. Puji syukur kehadiran Allah Swt akan limpahan rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan disertasi yang berjudul: Efek afzelin terhadap penghambatan migrasi dan peningkatan apoptosis sel kanker payudara MDA-MB-231, melalui hambatan FAK dan RAC-1.

Penelitian pada disertasi ini didasarkan pada masih tingginya angka kematian penderita kanker payudara karena terjadinya metastasis, sehingga melalui disertasi ini dibuktikan efek kandidat suatu agen *migrastatic* dalam menghambat metastasis kanker yang nantinya diharapkan dapat berkontribusi dalam meningkatkan angka harapan hidup penyintas kanker payudara.

Dengan selesainya penulisan disertasi ini, penulis menyampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Rektor Universitas Brawijaya, Prof Dr Ir Nuhfil Hanani AR., MS., serta mantan Rektor Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS., dan Prof. Dr. Ir. Yogi Sugito atas ijin dan kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran di Universitas Brawijaya.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Dr. dr. Wisnu Barlianto., Msi.Med,Sp.A(K)., serta mantan Dekan Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes., dan Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA., atas kesempatan, dukungan, dan fasilitas yang diberikan dalam penyelesaian pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran di Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.
3. Ketua Program Studi S3 Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Prof. Dr. dr. Kusworini, Mkes, Sp.PK., dan Ketua Program Studi sebelumnya, Prof. dr. M. Aris Widodo., MS.Sp.FK, Ph.D., atas kesempatan dan bimbingannya dalam penyelesaian Program Doktor Ilmu Kedokteran.
4. Rektor Universitas Mulawarman, Prof. Dr. H. Masjaya, M.Si., dan mantan Rektor Prof. Dr. H. Zamruddin Hasid, SE., SU., atas perkenan, kesempatan, dan dukungan dalam penyelesaian pendidikan doktor.
5. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman, dr. Ika Fikriah, M.Kes., dan Dekan sebelumnya dr. Emil Bachtiar Moerad, Sp.P., atas kesempatan dan dukungan moral dan doa selama penyelesaian pendidikan doktor.
6. Prof. Dr. dr. Loeki Enggar Fitri, M.Kes., Sp.ParK.sebagai Promotor, atas inspirasi, kesabaran, dukungan dan semangat, bimbingan dan nasihat, dan wawasan keilmuannya sehingga pendidikan doktor dapat terselesaikan.
7. Agustina Tri Endharti, S.Si., PhD. sebagai Ko-Promotor 1 dan pembimbing mata kuliah penunjang disertasi, atas bimbingan, saran, motivasi, dan wawasan keilmuannya selama penyelesaian pendidikan doktor.
8. Dr. dr. Basuki Bambang Purnomo, Sp.U (K). sebagai Ko-Promotor 2 dan Dosen pembimbing akademik, atas inspirasi, waktu, pendampingan, bimbingan dan saran, motivasi dan semangat yang selalu diberikan selama pelaksanaan pendidikan doktor.
9. Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA. sebagai Penguji disertasi dan evaluator, atas semangat, motivasi, wawasan keilmuan, bimbingan dan sarannya.

10. Dr. dr. Pudji Rahayu, Sp.THT-KL(K). sebagai Penguji disertasi dan pembimbing mata kuliah penunjang disertasi, atas wawasan keilmuan, bimbingan dan saran yang diberikan.
11. Prof. Dr.dr. Ambar Mudigdo, Sp.PA(K). sebagai Penguji disertasi dari Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta, atas kesediaannya meluangkan waktu untuk menguji di Malang, dan juga atas arahan dan saran.
12. Prof Mulyohadi Ali atas masukan dan bimbingannya, terutama sebagai pembimbing dalam penyusunan proposal penelitian, atas wawasan keilmuan, bimbingan dan saran.
13. Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes., sebagai evaluator karya ilmiah, atas semangat, bimbingan dan saran, terutama berkenaan dengan penulisan ilmiah.
14. Edwin Widodo, S.Si., M.Sc. Ph.D. sebagai pembimbing mata kuliah penunjang disertasi, atas wawasan keilmuan dan bimbingannya dalam metode penelitian *in vitro* dan *in silico*.
15. Kepala dan dosen Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman, dr Dr. dr. Danial, M. Kes., atas perkenan dan bantuan yang diberikan selama penyelesaian program doktor.
16. Rekan dan teman sejawat dosen Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman, atas motivasi dan bantuan dalam menjalankan tugas sebagai dosen sehingga memperlancar penyelesaian pendidikan S3.
17. Kepala Laboratorium Dr.rer nat. Triyudani Mardiningraras, Apt dan jajaran manajerial Laboratorium Sentral Biomedik Bunga Prihardina, S.Si., Wahyudha Ngatiril Lady, S.Si, M.Biomed., Ami Maghfironi, S.Si., Suci Megasari, S.Si, M.P, Tarina Widaningrum, S.Si, M.P. dan Rini Indah Kristanti, SE., atas bantuan, asistensi, konsultasi, motivasi, profesionalisme yang memperlancar pelaksanaan penelitian.
18. Direktur Laboratorium Sentral Ilmu Hayati dan tim, khususnya Choirunil Chotimah, S.Si., M.Si., Helly Nurul Karima, S.Pt., MP., Rr. Fitria Dewi Listiani, S.Si., dan Reva Yuliasari, S.Si., M.Si., atas bantuan dan konsultasi dalam pelaksanaan penelitian.
19. Ayahanda, Mochamad Ja'aini dan Ibunda, Maria Ulfah atas semua doa, motivasi, kepercayaan dan kasih sayang, serta nilai-nilai luhur yang ditanamkan sedari kecil yang senantiasa mengiringi langkah dalam hidup, Adik-adik, Syahrul Haqi Rahman, Annisa Nuraini, dan Rosihan Anwar serta keluarga besar atas doa, dukungan, dan kepercayaannya.
20. Rekan sesama mahasiswa S3, terutama tim mahasiswa S3 dari FK-Unmul
21. Seluruh staf administrasi di lingkungan Program Doktor ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Indah Wulandari, SAB., Winarti, S.E., Hadi Santoso, Samsul Arifin, Neny S. A.Md., Yayan Arifin, S.Kom. yang telah membantu melancarkan proses adminstrasi selama menjalani pendidikan.
22. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan disertasi ini.

Sangat disadari dalam perjalanan pendidikan doktor ini banyak kesalahan, kekurangan, dan keterbatasan. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati disampaikan permohonan maaf yang sebesar-besarnya kepada semua pihak. Dan dengan kerendahan hati pula, diharapkan masukan dan saran yang membangun supaya disertasi ini bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan masyarakat.

Malang, 19 Desember 2019

Penulis



RINGKASAN

Eva Rachmi. NIM. 117070100011051. Program Doktor Ilmu Kedokteran. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya. Malang. Efek afzelin terhadap penghambatan migrasi dan peningkatan apoptosis sel kanker payudara MDA-MB-231, melalui hambatan FAK dan RAC1. Komisi pembimbing: Prof. Dr. dr. Loeki Enggar Fitri, M.Kes., Sp.ParK. (ketua); Agustina Tri Endharti, S.Si., PhD. (anggota 1); Dr. dr. Basuki B. Purnomo, SpU.(K).(anggota 2)

Rendahnya angka harapan hidup pasien kanker payudara berhubungan erat dengan metastasis, karena menyebabkan gagalnya fungsi organ vital dan menghasilkan klonal yang resisten dan agresif. Hal ini menunjukkan terapi kanker payudara tidak cukup hanya menargetkan pada tumor primer melalui pendekatan sitotoksik tetapi juga perlu dikembangkan penghambat invasi dan metastasis. Penghambatan metastasis menjadi tantangan karena tiap tahapan dalam *cascade* ini membutuhkan unsur dan kondisi yang berbeda. Pada hampir semua tahapan metastasis terdapat karakteristik yang sama yaitu kemampuan sel metastatik untuk migrasi, yang dapat menjadi target dalam menghambat metastasis.

Tanpa memandang pemicunya, pemegang peran kunci migrasi sel kanker adalah pensinyalan integrin, yang mengaktifkan pembentukan protrusi sel dan *focal adhesion*. *Focal adhesion* dibentuk oleh sekitar 200 protein, dengan salah satu komponen enzimatik kunci yaitu *focal adhesion kinase* (FAK). Protein FAK tersebut meningkat ekspresinya pada kanker payudara, dan berhubungan dengan agresivitas dan prognosis yang buruk. Pembentukan protrusi sel berupa lamellipodia berperan sebagai traksi sel, yang regulasi utamanya diatur oleh *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1). Pada kanker payudara invasif, Rac1 mengalami over ekspresi yang dihubungkan dengan kebutuhan sel kanker untuk migrasi. Selain meningkatkan migrasi, overekspresi FAK dan Rac1 juga berhubungan dengan resistensi apoptosis pada sel kanker. Afzelin (*kaempferol 3-O-rhamnosida*) merupakan salah satu jenis flavonol glikosida. Kemampuan afzelin sebagai anti kanker ditunjukkan dengan kemampuannya menginduksi *caspase cascade* pada kanker prostat dan kanker payudara tipe luminal, serta menghambat proliferasi kanker prostat. Sebagaimana flavonoid, struktur inti afzelin yang mirip adenin menyebabkan afzelin menarik untuk dieksplorasi kemampuannya untuk menghambat fosforilasi protein FAK dan Rac-1, yang berperan dalam migrasi dan apoptosis sel. Oleh karena itu, penelitian ini ditujukan untuk membuktikan potensi afzelin dalam menghambat migrasi dan meningkatkan apoptosis kanker payudara subtipe *triple negative* (TNBC), yang merupakan jenis kanker payudara yang agresif dan metastatik. Sebagai model TNBC dipilih sel kanker payudara *M.D. Anderson - Metastatic Breast-231* (MDA-MB 231).

Pembuktian dilakukan secara *in vitro* dengan rancangan penelitian *post-test only with control group design*. Pengaruh pemberian afzelin pada MDA-MB 231 diukur pada hambatan penutupan zona bebas pada uji migrasi *scratch wound closure*, serta pembentukan adhesi fokal yang diamati melalui pewarnaan imunofluoresen di bawah mikroskop konfokal. Efek afzelin pada apoptosis diukur dengan *flow cytometry* sel yang diwarnai *annexin V/propidium iodide*. Pengaruh afzelin terhadap kadar FAK teraktivasi diklarifikasi menggunakan *Western blotting*, sedangkan kadar Rac1 teraktivasi diamati menggunakan GLISA. Kecuali data *focal adhesion* yang bersifat kualitatif, hasil yang didapat adalah data kuantitatif yang selanjutnya diuji secara statistik melalui uji ANOVA dengan *post hoc* Tukey.

Afzelin terbukti mampu menurunkan viabilitas sel MDA-MB-231 dengan IC50 992 µg/ml. Hasil ini sejalan dengan peningkatan apoptosis yang mengikuti peningkatan konsentrasi afzelin. Pada uji migrasi *scratch wound closure*, afzelin menghambat migrasi dua dimensi, yang dibuktikan dengan penurunan jumlah sel yang migrasi ke area bebas sel maupun penurunan persentase area yang tertutup sel pada jam ke-24 dan ke-48. Mekanisme inhibisi migrasi oleh afzelin dieksplorasi berdasar pembentukan *focal adhesion* yang ditandai oleh perubahan lokasi vinculin di tepi sel. *Focal adhesion* yang terbentuk tampak semakin samar dan kecil seiring dengan peningkatan konsentrasi afzelin, dengan kecenderungan yang sama dengan penurunan migrasi sel dua dimensi. Lebih lanjut, afzelin menurunkan ekspresi FAK dan FAK Tyr397 terfosforilasi secara bermakna dibanding kontrol negatif pada konsentrasi 800 µg/ml, serta menurunkan aktivasi Rac1 mulai konsentrasi yang lebih kecil yaitu 400 µg/ml.

Dalam penelitian ini, peningkatan apoptosis berhubungan dengan penurunan ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397 secara substansial, sehingga FAK dan aktivasinya diduga berperan penting dalam menyebabkan apoptosis. Penghambatan migrasi sel berhubungan secara moderat dengan penurunan ekspresi FAK dan penurunan aktivasi Rac1 tetapi berhubungan lemah dengan p-FAK Tyr397, yang memunculkan dugaan afzelin bekerja pada target lain dalam inhibisi migrasi selain menghambat kerja kinase FAK dalam autofosforilasi residu Tyr397. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa afzelin berpotensi meningkatkan apoptosis dan menghambat migrasi pada TNBC yang memiliki karakteristik seperti sel MDA-MB-231, melalui penurunan p-FAK Tyr397 dan aktivasi Rac1.

Kata Kunci: Afzelin, apoptosis, migrasi, *focal adhesion*, FAK, Rac1

SUMMARY

Eva Rachmi. NIM. 117070100011051. The doctoral program of medical science. Faculty of Medicine. Universitas Brawijaya. Malang. Effects of afzelin on inhibiting migration and increasing apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, through inhibition of FAK and RAC1. Supervising commission: Prof. Dr. dr. Loeki Enggar Fitri, M.Kes., Sp.ParK. (chairman), Agustina Tri Endharti, S.Si., PhD., and Dr. dr. Basuki B. Purnomo, SpU.(K) (members).

The low survival rate of breast cancer patients is closely linked to metastasis, which causes the dysfunction of vital organs and produces resistant and aggressive clonal. This phenomenon shows that breast cancer therapy is not sufficient to just targeting primary tumors through cytotoxic approaches but also in urgent need to develop invasion and metastasis intervention. The inhibition of metastasis is challenging because each stage in this cascade requires different elements and conditions. Nevertheless, the migration ability of metastatic cells is a characteristic that exists in almost all stages, which can be targeted for metastasis inhibition.

Regardless of the stimuli, the central player of cancer cell migration is integrin signaling, which activates the formation of cell protrusions and focal adhesion. Focal adhesion is formed by around 200 proteins, with focal adhesion kinase (FAK) as one of the enzymatic components. FAK and Rac1 also contribute to apoptosis resistance of cancer cells. The protein is overexpressed in breast cancer and associated with aggressiveness and poor prognosis. Cell protrusion formation in the form of lamellipodia provides cell traction, mainly regulated by Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1). Rac1 is overexpressed in invasive breast cancer, which correlates with cell migration requirements.

Afzelin (kaempferol 3-O-rhamnoside) is one of the flavonol glycosides. The potency of afzelin as an anti-cancer was shown by its ability to induce caspase cascade in prostate cancer and luminal breast cancer, as well as inhibiting the proliferation of prostate cancer. Similar to another flavonoid, afzelin has a core structure that mimics adenine, which makes it a good candidate for inhibition of protein phosphorylation, particularly FAK and Rac-1.

The inhibitory effect of afzelin should be observed directly at the protein level, but also need to be demonstrated at the cellular level in the form of apoptosis, migration, and focal adhesion formation. This study aimed to prove afzelin potential in inhibiting the migration of triple-negative breast cancer (TNBC), which is an aggressive and metastatic subtype of breast cancer. Medical doctor Anderson - metastatic breast-231 (MDA-MB-231) breast cancer cells selected as a model of TNBC. The investigation was conducted in vitro through the post-test only control group study design. Effect of afzelin to

MDA-MB 231 cell migration was evaluated on free zone closure during the scratch wound test, as well as focal adhesion formation that evaluated through immunofluorescent staining which observed under confocal microscopy. The effects of afzelin on apoptosis were measured by DNA ladder assay and flow cytometry of annexin V/propidium iodide-tagged cells. Afzelin's influence on activated FAK level was clarified using ELISA, while the levels of the activated Rac1 was observed using the G-LISA. Except focal adhesion formation which qualitatively analyzed, the rest dependent variables were analyzed statistically by ANOVA, followed by Tukey post hoc analysis.

Afzelin reduced the viability of MDA-MB-231 cells with IC₅₀ 992 µg/ml. These results were in line with the increase of apoptosis along with the increase of afzelin concentration. In the scratch wound closure migration test, afzelin inhibits two-dimensional migration, as demonstrated by the decrease of the number of cells in the cell-free areas and the decrease of the percentage of cell-covered areas at 24 and 48 hours. The mechanism of inhibition of migration by afzelin is explored based on the formation of focal adhesion which is characterized by re-location of vinculin at the cell edge. The focal adhesion that is formed appears to be increasingly equivocal and smaller with increasing afzelin concentration. Furthermore, afzelin significantly reduced FAK expression and FAK Tyr397 phosphorylated compared to negative controls at a concentration of 800 µg/ml and decreased Rac1 activation at a lower concentration of 400 µg/ml.

In this study, the increase of apoptosis was substantially associated with the decrease of FAK expression and p-FAK Tyr397, hence FAK and its activation were thought to play an important role in the apoptosis mechanism. Inhibition of cell migration was moderately related to the decrease of FAK expression and the decrease of Rac1 activation but is weakly related to p-FAK Tyr397, which raises the possibility that afzelin acts on other targets in migration inhibition apart from inhibiting the action of FAK kinase in autophosphorylation of the Tyr397 residue. The conclusion of this study was afzelin has the potential to increase apoptosis and inhibit migration in TNBC which has similar characteristics as MDA-MB-231 cells, through the decrease of p-FAK Tyr397 and Rac1 activation.

Keywords: Afzelin, apoptosis, migration, focal adhesion, FAK, Rac1

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
IDENTITAS TIM PENGUJI.....	iv
KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH.....	v
PERUNTUKAN.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
RINGKASAN	x
SUMMARY	xii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
DAFTAR SINGKATAN	xx
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan masalah penelitian	5
1.2.1 Masalah penelitian.....	5
1.2.2 Sub masalah penelitian	5
1.3 Tujuan penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan umum	6
1.3.2 Tujuan khusus.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Kanker Payudara.....	8
2.1.1 Teori klasik <i>multistage theory of cancer</i>	9
2.1.2 Hipotesis terjadinya kanker	10
2.1.3 Variasi pada kanker payudara.....	11
2.1.4 Kanker payudara subtipe <i>triple negative</i>	14
2.2 Tahapan invasi - metastasis pada kanker payudara.....	17
2.3 Migrasi sel kanker payudara pada proses metastasis	29
2.3.1 Tipe migrasi sel kanker payudara.....	29
2.3.2 Komponen migrasi sel kanker	32
2.3.3 Siklus motilitas sel kanker	38
2.3.4 Peran FAK pada migrasi sel kanker payudara	42
2.3.4.1 Aktivasi dan fungsi FAK.....	43
2.3.4.2 <i>Focal adhesion kinase</i> dan kanker payudara.....	46
2.3.5 Peran Rac-1 pada migrasi sel kanker payudara	48
2.3.5.1 Aktivasi dan fungsi Rac-1	48
2.3.5.2 <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate-1 (Rac1)</i> dan kanker payudara.....	52
2.4 Metastasis sebagai target terapi pada kanker payudara.....	52

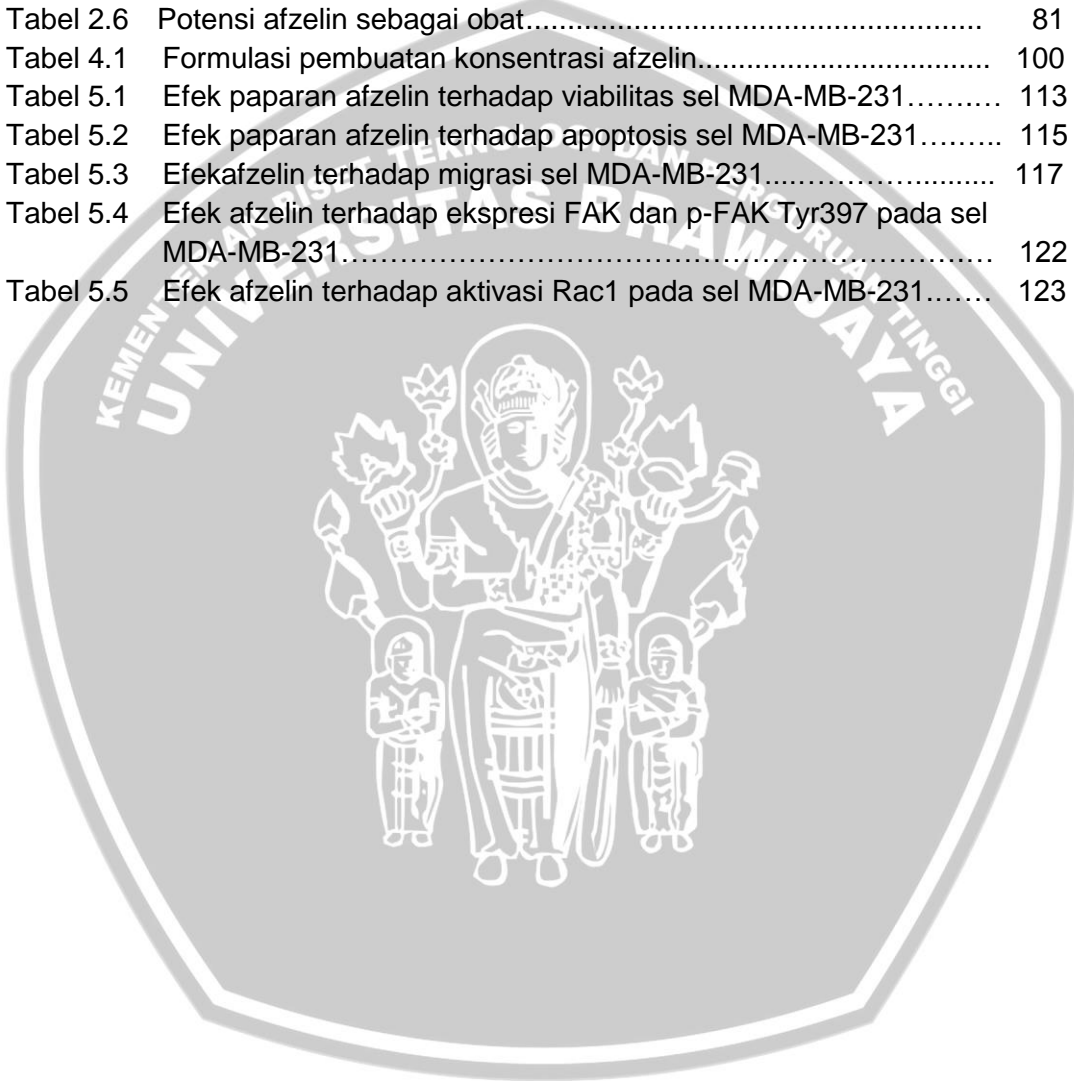


2.5 Apoptosis pada kanker payudara	59
2.5.1 Apoptosis jalur intrinsik.....	60
2.5.2 Apoptosis jalur ekstrinsik.....	62
2.5.3 Apoptosis jalur independen capcase	63
2.5.4 Resistensi terhadap apoptosis pada kanker payudara	64
2.5.5 Peran FAK dan Rac1 dalam apoptosis sel kanker payudara	68
2.6 Flavonoid dan Afzelin	69
2.6.1 Flavonoid	69
2.6.2 Potensi flavonoid.....	71
2.6.3 <i>Structure activity relationship</i> (SAR) flavonoid sebagai anti kanker	72
2.6.4 Metabolisme dan bioavailabilitas flavonoid.....	75
2.6.5 Afzelin	76
2.6.5.1 Struktur dan karakteristik afzelin	77
2.6.5.2 Sumber afzelin.....	78
2.6.5.3 Potensi sebagai obat	78
2.7 Penelitian <i>in vitro</i> kanker payudara.....	83
2.8 Pendekatan dalam mendeteksi protein dan fosfo-protein	85
2.8.1 <i>Western Blot</i>	86
2.8.2 <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	86
2.8.3 <i>Flow Cytometry</i> intrasel dan <i>immunocytochemistry/ immunohistochemistry</i> (ICC/IHC)	87
2.8.4 <i>Mass Spectrometry</i>	88
2.9 Kerangka teori.....	90
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	91
3.1 Penjelasan kerangka konsep	92
3.2 Hipotesis Penelitian.....	93
BAB 4 METODE PENELITIAN	94
4.1 Rancangan penelitian.....	94
4.2 Tempat dan waktu penelitian.....	94
4.3 Subyek penelitian dan besaran sampel	94
4.4 Variabel penelitian	94
4.4.1 Klasifikasi variabel.....	94
4.4.2 Definisi operasional variabel.....	95
4.5 Bahan dan instrumen penelitian	97
4.5.1 Bahan penelitian	97
4.5.2 Alat penelitian	99
4.6 Prosedur Penelitian.....	100
4.6.1 Penyiapan senyawa uji afzelin	100
4.6.2 Penumbuhan sel	100
4.6.3 Pemanenan sel	101
4.6.4 Perlakuan untuk pengamatan migrasi sel.....	101
4.6.5 Pengamatan apoptosis melalui <i>Annexin V/ propidium iodide flow cytometry</i>	102

4.6.6	Perlakuan untuk pengamatan viabilitas sel dengan metode MTT kolorimetrik	102
4.6.7	Perlakuan untuk pengamatan kadar ekspresi FAK dan kadar <i>phospho</i> -FAK dengan metode <i>Western blotting</i>	103
4.6.8	Pengamatan aktivasi Rac1	105
4.6.9	Pengamatan pembentukan <i>focal adhesion</i> dengan pewarnaan imunofluoresen	108
4.7	Alur penelitian	111
4.8	Etik penelitian	111
4.9	Analisis data	112
BAB 5	HASIL PENELITIAN	113
5.1	Efek afzelin terhadap viabilitas sel MDA-MB-231	113
5.2	Efek afzelin terhadap apoptosis sel MDA-MB-231	114
5.3	Efek afzelin terhadap migrasi sel MDA-MB-231	115
5.4	Efek afzelin terhadap pembentukan <i>focal adhesion</i> pada sel MDA-MB-231	120
5.5	Efek afzelin terhadap ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397 pada sel MDA-MB-231	121
5.6	Efek afzelin terhadap aktivasi Rac1-GTPase pada sel MDA-MB-231	122
5.7	Hubungan antara, ekspresi FAK, p-FAK Tyr397, aktivasi Rac1, dan migrasi sel pada paparan afzelin	123
5.8	Hubungan antara ekspresi FAK, p-FAK Tyr397, aktivasi Rac1, dan apoptosis sel pada sel MDA-MB-231 akibat paparan afzelin	126
BAB 6	PEMBAHASAN	127
6.1	Afzelin menurunkan viabilitas sel MDA-MB-231	127
6.2	Afzelin meningkatkan apoptosis pada sel MDA-MB-231	128
6.3	Afzelin menurunkan migrasi sel MDA-MB-231	131
6.4	Afzelin menghambat pembentukan <i>focal adhesion</i> pada sel MDA-MB-231	133
6.5	Afzelin menghambat ekspresi FAK dan bentuk teraktivasinya (p-FAKTyr397) pada sel MDA-MB-231	136
6.6	Afzelin menghambat aktivasi Rac1 pada sel MDA-MB-231	137
6.7	Afzelin menghambat migrasi sel MDA-MB-231 melalui hambatan ekspresi FAK, p-FAK Tyr397 dan aktivasi Rac1	140
6.8	Afzelin meningkatkan apoptosis sel MDA-MB-231 melalui hambatan ekspresi FAK, p-FAK Tyr397 dan aktivasi Rac1	143
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN	150
7.1	Kesimpulan	150
7.1.1	Kesimpulan Khusus	150
7.1.2	Kesimpulan Umum	151
7.2	Saran	152
	DAFTAR PUSTAKA	154
	LAMPIRAN	179

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 2.1 Keterhubungan antar jenis variasi kanker payudara	13
Tabel 2.2 Model dan dinamika migrasi yang diobservasi dengan <i>intravital imaging</i>	32
Tabel 2.3 Jenis protrusi berbasis aktin pada sel.....	34
Tabel 2.4 Domain fungsional dan lokasi fosforilasi FAK	44
Tabel 2.5 Inhibitor migrasi yang dalam pengembangan klinis	59
Tabel 2.6 Potensi afzelin sebagai obat.....	81
Tabel 4.1 Formulasi pembuatan konsentrasi afzelin.....	100
Tabel 5.1 Efek paparan afzelin terhadap viabilitas sel MDA-MB-231	113
Tabel 5.2 Efek paparan afzelin terhadap apoptosis sel MDA-MB-231.....	115
Tabel 5.3 Efek afzelin terhadap migrasi sel MDA-MB-231.....	117
Tabel 5.4 Efek afzelin terhadap ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397 pada sel MDA-MB-231.....	122
Tabel 5.5 Efek afzelin terhadap aktivasi Rac1 pada sel MDA-MB-231.....	123



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Peran lingkungan mikro terhadap tumorigenesis.....	19
Gambar 2.2 Regulasi jaras persinyalan pada intravasasi.....	20
Gambar 2.3 Molekul adhesi dan persinyalan yang berkontribusi pada ekstravasasi sel kanker.....	23
Gambar 2.4 Model evolusi suatu <i>metastatic niche</i> : transisi premetastatik, micrometastatik, dan makrometastik <i>niche</i>	28
Gambar 2.5 Rangkaian proses <i>treadmiling actin</i>	35
Gambar 2.6 Model lima langkah migrasi sel.....	41
Gambar 2.7 Struktur domain FAK dan lokasi fosforilasi.....	43
Gambar 2.8 Mekanisme regulasi aktivitas Rac-1.....	50
Gambar 2.9 Peran Rac-1 dalam reorganisasi sitoskeletal.....	52
Gambar 2.10 Jaras persinyalan apoptosis pada sel kanker payudara.....	68
Gambar 2.11 Struktur flavonoid.....	71
Gambar 2.12 Struktur beberapa jenis flavonoid.....	72
Gambar 2.13 Struktur afzelin.....	78
Gambar 2.14 Bagan kerangka teori.....	90
Gambar 3.1 Bagan kerangka konsep.....	91
Gambar 4.1 Bagan alur penelitian.....	110
Gambar 5.1 Hasil pengujian efek afzelin terhadap viabilitas sel MDA-MB-231.....	113
Gambar 5.2 Efek afzelin terhadap apoptosis sel MDA-MB-231.....	114
Gambar 5.3 Hubungan antara viabilitas sel dan apoptosis sel MDA-MB-231.....	115
Gambar 5.4 Efek afzelin terhadap migrasi sel MDA-MB-231.....	116
Gambar 5.5 Kuantifikasi efek afzelin terhadap migrasi sel MDA-MB-231.....	117
Gambar 5.6 Hubungan antara indeks apoptosis dan viabilitas dengan migrasi jam ke-24.....	118
Gambar 5.7 Efek paparan afzelin terhadap <i>focal adhesion</i> pada sel MDA-MB-231.....	120
Gambar 5.8 Efek paparan afzelin terhadap ekspresi FAK dan FAK Tyr397 terfosforilasi (p-FAK Tyr397) pada sel MDA-MB-231.....	121
Gambar 5.9 Hubungan antara intensitas relatif ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397.....	122
Gambar 5.10 Efek perlakuan afzelin terhadap aktivasi Rac1.....	123
Gambar 5.11 Hubungan antara ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397 dengan migrasi sel.....	124
Gambar 5.12 Hubungan antara sinyal Rac1 dengan migrasi sel.....	124
Gambar 5.13 Hubungan antara ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397 dengan aktivasi Rac1.....	125
Gambar 5.14 Hubungan antara indeks apoptosis dengan ekspresi FAK, p-FAK Tyr397 dan aktivasi Rac1.....	126
Gambar 6.1 Model hubungan antar variabel terikat dalam efek afzelin terhadap sel MDA-MB-231.....	148

DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Lampiran 1 Kelaikan etik	179
Lampiran 2 Keterangan bebas plagiasi.....	180
Lampiran 3 Cara penghitungan jumlah sel migrasi	181
Lampiran 4 Cara penghitungan area tertutup sel	182
Lampiran 5 Cara penghitungan densitas pita <i>Western blotting</i>	183
Lampiran 6 Uji statistik viabilitas sel	184
Lampiran 7 Uji statistik apoptosis	186
Lampiran 8 Uji statistik migrasi- jumlah sel	191
Lampiran 9 Uji statistik migrasi-area tertutup sel	194
Lampiran 10 Uji statistik <i>Western blotting</i> FAK dan p-FAK Tyr397	198
Lampiran 11 Uji statistik aktivasi Rac1	200
Lampiran 12 Uji statistik hubungan antar variabel terikat.....	204



DAFTAR SINGKATAN

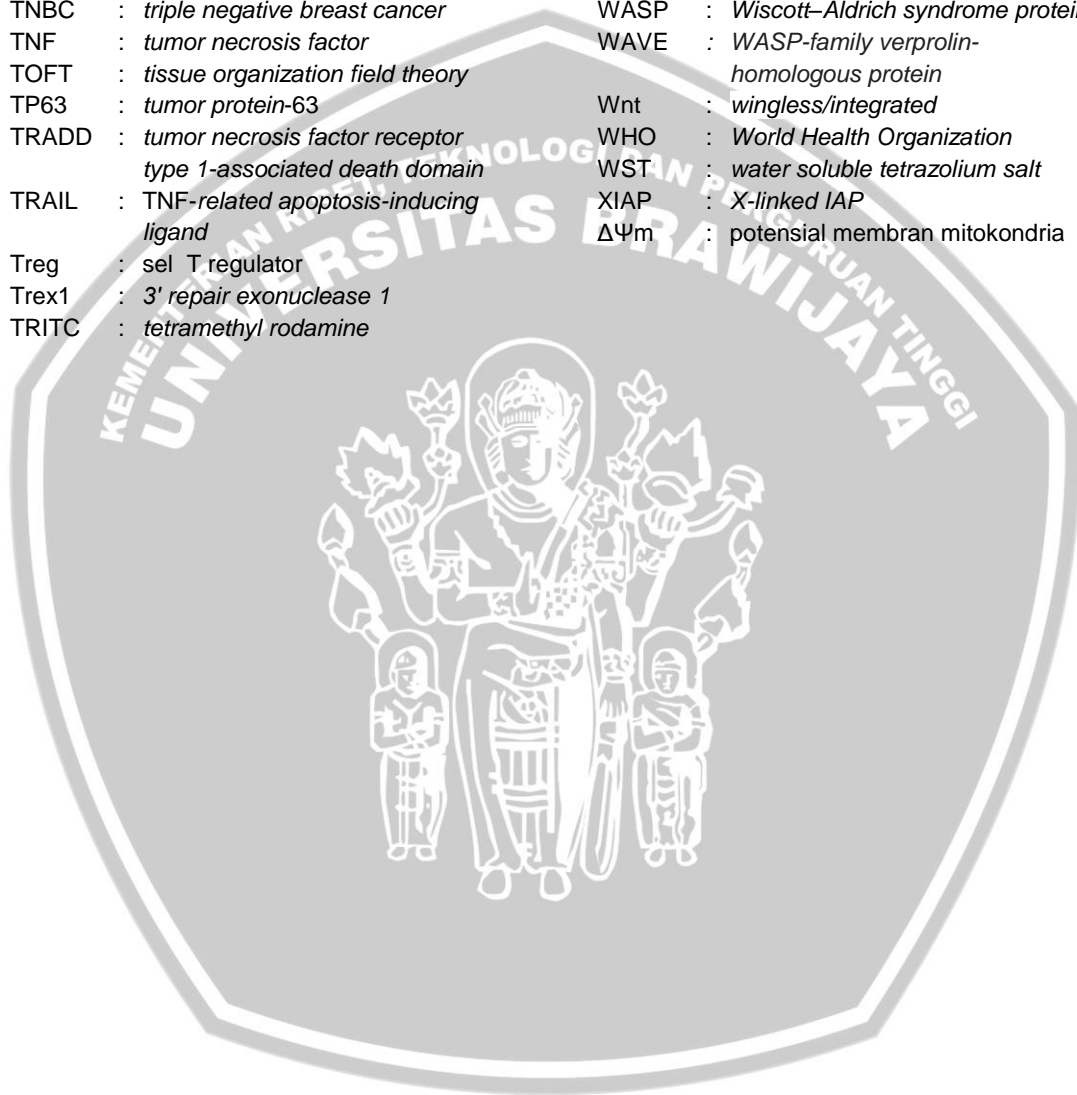


ABC	: ATP-binding cassette	clAP	: cellular inhibitor of apoptosis
ACINUS	: apoptotic chromatin condensation inducer in the nuclease	CKRs	: chemokine receptors
ADAM12	: a disintegrin and metalloproteinase 12	COX	: cyclooxygenase
ADF	: actin depolymerizing factor	Crk	: calcium-dependent protein kinase (CDPK)-related protein kinase
ADP	: adenosine diphosphate	CSC	: cancer stem cell
AIF	: apoptotic inducing factor	CTC	: circulating tumor cells
AF	: adhesi fokal	CX3CL	: chemokine C-X3-C motif ligand
AGPT	: angiopoietin	CXCL	: C-X-C motif chemokine ligand iaa
AGO	: argonaute	CYP	: cytochrome P450
AKT	: AKT8 virus oncogene cellular homolog	DAPI	: diamidino 2-phenylindole
ALK	: anaplastic lymphoma kinase	DC	: dendritic cell
ANGPT	: angiopoietin	DCIS	: ductal carcinoma in situ
ANK	: ankryn repeat,K	DED	: death effector domain
ANOVA	: analysis of variance	DFS	: disease free survival
Apaf-1	: apoptotic protease activating factor 1	DIAPH3	: diaphanous homologue MDIA2
AR	: androgen receptor	DISC	: death-inducing signaling complex
ARHGAP22	: Rho GTPase activating protein-22	DMEM	: Dulbecco's modified eagle's medium
ARP	: actin-related proteinsFA	DMSO	: dimethyl sulfoxide
ASAP1	: ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1	DNA	: deoxyribonucleic acid
ATP	: adenosine triphosphate	DOCK	: dedicator of cytokinesis
BAK	: Bcl-2 homologous antagonist/killer	DPBS	: Dulbecco's phosphate buffered saline
Bax	: Bcl-2-associated X	DTC	: disseminated tumour cells
Bcl-2	: B-cell lymphoma-2	EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
BCL-XL	: BCL-X large	EGF	: epidermal growth factor
BCL-Xs	: BCL-X short	EGFR	: epidermal growth factor receptors
BCR	: breakpoint cluster region protein	EGTA	: ethylene glycol tetraacetic acid
BER	: basic excision repair	ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
BID	: BH3 interacting-domain death agonist	ELMO	: engulfment and cell motility
BL1/2	: basal-like 1/2	EndoG	: endonuclease G
BMDC	: bone marrow-derived cells	ePcs	: endothelial progenitor cells
BRCA1	: breast cancer 1	ErbB2	: erythroblastosis oncogene B2
BCRP	: breast cancer resistance protein	ER	: estrogen receptor
BSA	: bovine serum albumin	ERK1/2	: extracellular regulated kinase
CAD	: caspase-activated DNase	E-selectin	: endothelial selectin
Cadherin	: calcium-dependent cell-cell adhesion glycoprotein	FA	: focal adhesion
CARD	: caspase-recruitment domain	FADD	: Fas-associated death domain
CCL2	: (C-C motif) ligand 2 chemokine	FAK	: focal adhesion kinase
CCRC	: cancer chemoprevention research center	Fas	: fatty acid synthase
CD	: cluster of differentiation	FAT	: focal adhesion targeting
Cdc42	: cell division control protein 42	FBS	: fetal bovine serum
CH-ILKBP	: calponin homology-containing ILK-binding protein	FERM	: four point one (band 4.1), Ezrin, Radixin, Moesin
		FILGAP	: filamin A (FLNa)-binding RhoGTPase-activating protein
		FOS	: FBJ (Finkel-Biskis-Jinkins) murine osteosarcoma virus oncogene

FRET	: fluorescence resonance energy transfer	IRSp53	: I-BAR (Bin/amphipysin/Rvs) domain containing protein-53
FRNK	: FAK-related non-kinase	JAK/STAT	: Janus kinase/signal transducer and activator of transcription
GADD45	: Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45	Jun	: faktor transkripsi Jun (angka 6 dalam bahasa Jepang)
DOCKs	: GTPase-activating proteins	JNK	: c-Jun NH2-terminal.,
GATA4	: faktor transkripsi yang berikatan dengan DNA motif Guanine-Adenin-Thymine-Adenine	KNAPSACK	: A Comprehensive Species-Metabolite Relationship Database
GBD	: GTPase binding domain	LAF	: laminar air flow
G-CSF	: granulocyte-colony stimulating factor	LAR	: luminal androgen receptor
GDP	: guanosine diphosphate	LCIS	: lobular carcinoma in situ
GEFs	: guanine-nucleotide exchange factors	LIM	: Lin-11, Isl-1 and Mec-3 homeodomain
GFRs	: growth factor receptors	LIMK-1	: LIM domain kinase
Graf	: GTPase regulator associated with FAK	LNCap	: lymph node carcinoma of the prostate
Grb	: growth factor receptor bound protein	LOX	: lysyl oxidase
GPCR	: G protein-coupled receptors	M	: mesenchymal
GSK-3 β	: glycogen synthase kinase-3 β	MAPK	: mitogen-activated protein kinase
GTP	: guanosine triphosphate	MCF7	: Michigan Cancer Foundation-7
HACE1	: HECT Domain And Ankyrin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1	MCL-1	: myeloid chronic leukemia – 1
HELI-CARD	: cytosolic helicase-CARD	MDA-MB 231	: M.D. Anderson - Metastatic Breast-231
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-ethane) sulphonic acid	MDCK	: Madin Darbin canine kidney
HER2	: human epidermal receptor 2	mDia2	: mammalian Diaphanous-related formin-2
HGF	: hepatocyte growth factor	Mdm	: Mouse double minute
HGMB2	: high mobility group box 2	MES	: matriks ekstrasel
HPC	: hematopoietic progenitor cells	MET	: mesenchymal epithelial transformation
HRP	: horse radish peroxidase	MLC2	: myosin II light chain
Htr	: high temperature requirement	MLCK	: myosin-light-chain kinase
IAP	: inhibitor of apoptosis protein	MLCP	: myosin-light-chain phosphatase
ICAD	: inhibitor CAD	MME	: membrane metallo-endopeptidase
ICAM	: intercellular adhesion molecule-1	MMP	: matrix metalloproteinase
ICC / HIS	: immunocytochemistry / immunohistochemistry	MOMP	: mitochondrial outer membrane permeabilization
ICNST	: invasive carcinoma of no special type	ROCK α	: myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase α
IDC	: invasive ductal carcinoma	MET	: hepatocyte growth factor receptor
IFNy	: interferon- γ	MRP	: multidrug-resistance-associated proteins
IGF	: insulin growth factor	MS	: mass spectrometry
IGF1R	: insulin-like growth factor 1	MSL	: mesenchymal stem-like
IL	: interleukin	MT1	: membrane type 1
ILC	: invasive lobular carcinoma	mTOR	: mammalian target of rapamycin
ILK	: integrin linked kinase	MTT	: tetrazolium, 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
ILKAP	: integrin-linked kinase-associated serine / threonine phosphatase 2C	MKK3/6	: Mitogen-activated protein kinase kinase 3/6
IM	: immuno modulatory	MUC1	: transmembrane glycoprotein
IPP	: ILK, PINCH, Parvin		

MRP-1	: multidrug-resistance-associated proteins	PKB	: protein kinase B
NADH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide	PKC	: protein kinase C
Nap125	: Nck-associated protein 1	PLC γ	: phospholipase C gamma
NCI	: National Cancer Institute	PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluoride
Nck2	: non-catalytic region of tyrosine kinase 2	PPAR γ	: peroxisome proliferator - activated receptor- γ
NEDD9	: neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	pp32	: phosphoprotein 32
NES	: nuclear export signals	PR	: progesteron receptor
NF κ B	: nuclear factor kappa beta	P-rex	: phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor
NF1	: neurofibromin type 1	PTEN	: phosphatase and tensin homolog
NGF	: neural growth factor	PVDF	: polyvinylidene difluoride
NK	: natural killer	PYK2	: proline-rich tyrosine kinase 2
NLS	: nuclear localization signals	Rac-1	: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
NM23-H1	: non-metastatic protein-23 homolog-1	Rho	: Ras homology gene family
N-Myc	: N-myelocytoma	RIP	: receptor interacting protein
NST	: no special type	RIPA	: radioimmunoprecipitation assay
N-WASP	: neural Wiscott–Aldrich syndrome protein	RNA	: ribonucleic acid
Op-IAP	: baculoviral Orgyia pseudotsugata-inhibitor of apoptosis	ROCK1/2	: Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1/2
OS	: overall survival	ROS	: reactive oxygen species
p130Cas	: Crk-associated substrate;	RSK	: p90 ribosomal S6 kinase
p70S6K1	: p70 ribosomal protein S6 kinase	RTK	: reseptor tirosin kinase
Pak-1	: p21-activated kinase-1	SAR	: structure-activity relationship
PAR1	: protease-activated receptor 1	SATB1	: special AT-rich sequence-binding protein 1
PARP	: poly ADP-ribose polymerase	SDF-1	: stromal cell-derived factor 1
PBS	: phosphate buffer saline	SDS-PAGE	:sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
PC-3	: prostate cancer cell line	SDH	: succinate dehydrogenase
PCR	: pathological complete response	SFK	: Src family of protein tyrosine kinase
PD1	: programmed cell death protein 1	SH2/3	: Src homology 2/3
PDGF	: platelet derived growth factor	Shc	: Src homologous and collagen-like protein
PDL1	: programmed death-ligand 1	SMAC/Diablo	:second mitochondria-derived activator of caspase/Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with Low pl
PEA	: polyomavirus enhancer binding protein	SMT	: somatic mutation theory
PFS	: progression free survival	SPSS	: statistical package for the social sciences
p-FAK Tyr397	:phosphorylated FAK residue tyrosine 397	Src	: sarcoma rous oncogene cellular homolog
PH	: pleckstrin homology	STLR	: signaling toll-like receptor
PI	: phosphoinositide	SUMO	: small ubiquitin-like modifier
PI3K	: phophatidyl inositol 3-kinase	SW-480	: human colon adenocarcinoma
PI45K	: phosphatidylinositol 4,5-kinase	TAM	: tumor-associated macrophage
PIAS3	: protein inhibitor of activated STAT-3	tBID	: truncated BID
PINCH	: particularly interesting cys-his-rich protein	TCD	: tissue culture dish
PIP	: phosphoinositol	TGF	: tumor growth factor
PIR121	: pirin (iron-binding nuclear) protein-121		

Th1/2	: <i>T helper 1/2</i>	Tyr397	: tyrosin 397GRB2
Tiam1	: <i>T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1</i>	UK	: <i>United Kingdom</i>
TIE	: <i>tyrosine kinase with Ig and EGF (epidermal growth factor) homology domains</i>	UPA	: <i>urokinase-type plasminogen activator</i>
TIL	: <i>tumour infiltrating lymphocytes</i>	Vav2	: bukan merupakan singkatan, tetapi huruf ke-enam dari alfabet Yahudi
TLR	: <i>toll-like receptor</i>	VEGF	: <i>vascular endothelial growth factor</i>
TMEM	: <i>tumor microenvironment of metastasis</i>	VEGFR1+	: <i>vascular endothelial growth factor receptor 1-positive</i>
TNBC	: <i>triple negative breast cancer</i>	WASP	: <i>Wiscott–Aldrich syndrome protein</i>
TNF	: <i>tumor necrosis factor</i>	WAVE	: <i>WASP-family verprolin-homologous protein</i>
TOFT	: <i>tissue organization field theory</i>	Wnt	: <i>wingless/integrated</i>
TP63	: <i>tumor protein-63</i>	WHO	: <i>World Health Organization</i>
TRADD	: <i>tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain</i>	WST	: <i>water soluble tetrazolium salt</i>
TRAIL	: <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>	XIAP	: <i>X-linked IAP</i>
Treg	: sel T regulator	$\Delta\Psi_m$: potensial membran mitokondria
Trex1	: <i>3' repair exonuclease 1</i>		
TRITC	: <i>tetramethyl rodamine</i>		



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Kanker payudara mendominasi kanker pada wanita serta menjadi penyebab utama kematian akibat kanker di 135 negara (Bray *et al.*, 2018). Dalam rentang tahun 2002 – 2008, insiden kanker payudara di dunia meningkat 20,17%, dengan peningkatan di negara berkembang jauh lebih tinggi (34,49%) dibanding negara maju (8,83%). Jumlah kematian akibat kanker payudara juga meningkat di negara berkembang (21,67%), sedangkan di negara maju justru mengalami penurunan (0,2%) (Jemal *et al.*, 2011; Bray *et al.*, 2012).

Kemajuan terapi kanker payudara menyebabkan peningkatan angka bertahan hidup 5 tahun pertama setelah diagnosis (*5 year overall survival/OS*) hingga mencapai 89,7% di Amerika Serikat dan 90% di Inggris dan Wales, serta angka kematian per 100.000 wanita akibat kanker payudara pertahun mengalami kecenderungan penurunan secara konsisten, yaitu 31,6 (tahun 1992) menjadi 25,6 (tahun 2002); dan pada tahun 2012 menjadi 21,3. Namun survei yang sama menunjukkan peluang untuk bertahan hidup pada 5 tahun pertama menurun seiring dengan invasi regional (84,9%) dan metastasis jauh (25,9%) dibandingkan kanker payudara terlokalisir (98%) (Cancer Research UK, 2015; Howlader *et al.*, 2016). Angka bertahan hidup juga semakin menurun seiring dengan waktu sejak terdiagnosis yaitu 80% setelah 10 tahun dan 65 % setelah 20 tahun (Cancer Research UK, 2015). Hal ini menunjukkan bahwa untuk mencapai angka bertahan hidup dan masa bebas kanker payudara yang maksimal masih menjadi tantangan.

Dari berbagai subtype kanker payudara, *triple negative breast cancer* (TNBC) mempunyai prognosis yang paling buruk dan cenderung metastatik (Ovcaricek *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2015). TNBC mempunyai kecenderungan

metastasis ke organ viseral dan susunan saraf pusat, dan jarang ke tulang (Anders dan Carey, 2009). Perkembangan saat ini, kemoterapi memberi respon patologis lengkap yang lebih tinggi dibanding subtype reseptor hormon positif. Angka kematian dan rekurensya paling tinggi pada tiga tahun pertama, lalu menurun drastis setelah periode lima tahun sejak terdiagnosis (Pogoda *et al.*, 2013). Tetapi apabila telah terjadi metastasis, maka prognosinya sangat buruk dengan median OS hanya 13 bulan (Bacalbasa dan Ionescu, 2016).

Metastasis merupakan proses yang cukup kompleks, yang melibatkan serangkaian kejadian yang disebut *cascade* invasi-metastasis (Valastyan *et al.*, 2011). Untuk metastasis, sel kanker harus mampu memisahkan diri dari tumor primer (invasi lokal), memasuki aliran darah (intravasasi), bertahan saat transport dalam pembuluh darah, stasis pada organ jauh, keluar dari aliran darah (ekstravasasi), mikrometastasis dan kolonisasi pada organ target (Paňková *et al.*, 2010). Penghambatan metastasis menjadi tantangan karena tiap tahapan dalam *cascade* ini membutuhkan unsur dan kondisi yang berbeda, terjadi pada lokasi yang berbeda, dan pada seorang pasien sulit untuk menetapkan tahapan metastasis mana yang terjadi pada satu waktu. Walaupun demikian, terdapat karakteristik yang sama pada hampir semua tahapan yaitu kemampuan sel metastatik untuk migrasi yang dapat menjadi target dalam menghambat metastasis (Mackay, 2008; Wells *et al.*, 2013a).

Migrasi sel TNBC terjadi melalui siklus migrasi yang terdiri dari pembentukan protrusi membran, pembentukan *focal adhesion*, sekresi protease matrik ekstra seluler (MES), kontraksi *stress fiber*, dan retraksi bagian belakang sel (Friedl dan Wolf, 2003). Siklus ini dapat dipicu oleh faktor pertumbuhan, hipoksia (Nagelkerke *et al.*, 2013) dan MES yang lunak (Gu *et al.*, 2014). Dalam regulasi siklus migrasi ini, *focal adhesion kinase* dan Rac1-GTPase (yang selanjutnya disebut sebagai Rac1) berperan penting. FAK berfungsi sebagai

protein adaptor pembentukan *focal adhesion* dan Rac1 sebagai modulator pengaturan sitoskeletal dalam pembentukan lamellipodia. Hiperaktivasi kedua protein ini sering didapatkan pada berbagai kanker padat (Yoon dan Dehart *et al.*, 2015; Lou *et al.*, 2018), baik karena input hulu abnormal, ekspresi berlebihan, atau kelainan regulasi degradasi (De *et al.*, 2019). Ekspresi berlebihan FAK dan Rac1 berhubungan dengan hambatan apoptosis (Jeong *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2016). Pada TNBC, kelainan regulasi FAK (Golubovskaya *et al.*, 2014) dan Rac1 (Tsai *et al.*, 2015) berhubungan dengan peningkatan invasi, metastasis, dan prognosis buruk. Inhibisi invasi TNBC dapat dicapai melalui penekanan aktivasi FAK (Taliaferro-Smith *et al.*, 2015) atau Rac1 (Morimura dan Takahashi, 2011).

Afzelin merupakan salah satu jenis flavonol glikosida. Berbeda dengan bentuk aglikon-nya yaitu kaempferol, afzelin mempunyai gugus O-rhamnosida pada posisi C3 sehingga disebut juga sebagai kaempferol 3-O-rhamnosida. Menurut basis data KNAPSACK, afzelin terdapat pada setidaknya 56 tumbuhan (Afendi *et al.*, 2012). Di Indonesia, afzelin teridentifikasi pada 6 tumbuhan yaitu *Schima wallichii* (puspa) (Diantini *et al.*, 2012), *Garcinia bancana* (manggis hutan), *Piper umbellatum* (lemba), *Zingiber zerumbet* (lempuyang gajah) (Basis data tanaman obat Indonesia, diakses Oktober 2019), *Moringa oleifera* (kelor) (Lagurin *et al.*, 2017), dan *Pometia pinnata* (matoa) (Utari *et al.*, 2019). Walaupun belum ada pembahasan spesifik tentang afzelin pada bagian tertentu tumbuhan, afzelin mungkin bisa ditemukan pada semua bagian tumbuhan terutama yang berperan pada fotosintesis, sebagaimana halnya flavonoid secara umum (Shashank dan Abhay, 2013).

Afzelin menunjukkan potensi sebagai anti kanker. Pada kultur sel payudara subtipe reseptor estrogen positif, afzelin meningkatkan apoptosis melalui aktivasi *caspase cascade* (Diantini *et al.*, 2012). Kemampuan afzelin mengaktifkan

caspase cascade juga diperlihatkan pada kanker prostat yang sensitif androgen (Halimah *et al.*, 2015). Selain itu, afzelin mampu menghambat proliferasi dan siklus sel kanker prostat baik yang sensitif androgen ataupun tidak. Potensi ini disebabkan oleh hambatan beberapa properti yang berhubungan erat dengan fungsi sitoskeleton aktin, yaitu enzim *LIM (Lin-11, Isl-1 and Mec-3) domain kinase 1* (LIMK 1), *Rho GTPase myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase α* (MRCK α), dan *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase* (ROCK)1 dan ROCK2 (Zhu *et al.*, 2015), sehingga penghentian siklus sel oleh afzelin secara bersamaan juga menghambat motilitas sel. Afzelin mempunyai kesamaan dengan flavonol lain yaitu struktur yang mirip adenin, sehingga diprediksi dapat berkompetisi dengan ATP pada *ATP-binding enzyme*. Adanya tambahan gugus rhamnosida membuat struktur afzelin lebih unik sehingga mungkin dapat menghambat kinase dengan lebih selektif (Smith *et al.*, 2005; Utepergenov *et al.*, 2012).

Penelitian pendahuluan dilakukan secara *in silico* menggunakan piranti lunak *PyRx* yang mengkombinasi *Autodock 4.2* dan *Vina* (Dallakyan dan Olson, 2015). Berdasar hasil pengujian ini, interaksi afzelin dengan beberapa protein yang terlibat dalam pembentukan protrusi sel menunjukkan afinitas yang tinggi terhadap Rac1 (-11 kcal/mol) dan FAK (-9,0 kcal/mol). Afinitas tertinggi afzelin terhadap Rac1 adalah pada 'saku' lokasi ikatan ligand *Vav-guanine nucleotide-exchange factor* (Vav-GEF). Ligand ini berfungsi untuk aktivasi Rac1 melalui substitusi ikatan *guanosine diphosphate* (GDP) dengan *guanosine triphosphate* (GTP) (Fernández-Espartero *et al.*, 2013). Hambatan ikatan Rac1 dengan Vav-GEF oleh afzelin akan menghambat aktivasi Rac1 tersebut. Ikatan afzelin dengan FAK menunjukkan afinitas tertinggi pada domain FERM, yang diduga menjadi penerima sinyal awal aktivasi FAK (Dunty *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2008). Selain itu, afinitas afzelin terhadap residu tirosin ke-397 (Y-397), yang merupakan lokasi

autofosforilasi FAK, juga cukup tinggi (-8,3 kcal/mol). Oleh karena itu, afzelin kemungkinan besar dapat menghambat aktivasi FAK dan Rac1 secara *in vitro*. Namun, tidak menutup kemungkinan afzelin dapat menghambat ekspresi FAK maupun Rac-1. Selain itu, hambatan afzelin terhadap FAK dan Rac1 serta peran kedua protein tersebut dalam resistensi apoptosis pada sel kanker mungkin dapat menjelaskan kemampuan afzelin meningkatkan ekspresi *caspase-3*, -6, dan -9 pada sel kanker prostat dan payudara MCF-7. Oleh karena itu, bila afzelin terbukti dapat menghambat ekspresi atau aktivasi FAK dan aktivasi Rac1 pada sel kultur MDA-MB-231, kemungkinan afzelin juga dapat menginduksi terjadinya apoptosis.

Untuk itu, kemampuan afzelin dalam menghambat migrasi dan meningkatkan apoptosis pada sel kanker payudara tipe TNBC perlu dibuktikan, melalui hambatan aktivasi FAK dan Rac1. Penghambatan ini akan dibuktikan pada sel *M.D. Anderson - Metastatic Breast-231* (MDA-MB-231), sebagai model TNBC yang karakteristiknya telah dieksplorasi secara mendalam dan paling sering digunakan dalam penelitian (Volk-Draper dan Rajput, 2012).

1.2 Rumusan masalah penelitian

1.2.1 Masalah penelitian

Berdasarkan uraian sub bab latar belakang, rumusan masalah yang muncul adalah apakah afzelin memiliki potensi menghambat migrasi dan meningkatkan apoptosis sel kanker payudara MDA-MB-231, melalui penurunan aktivasi FAK dan Rac1?

1.2.2 Sub masalah penelitian

Sub masalah yang diidentifikasi dalam penelitian ini adalah

1. Apakah pemberian afzelin dapat menurunkan viabilitas sel kanker payudara MDA-MB-231?

2. Apakah pemberian afzelin dapat meningkatkan apoptosis sel kanker payudara MDA-MB-231?
3. Apakah pemberian afzelin dapat menurunkan migrasi sel kanker payudara MDA-MB-231?
4. Apakah pemberian afzelin dapat menurunkan pembentukan *focal adhesion* pada sel kanker payudara MDA-MB-231 ?
5. Apakah pemberian afzelin dapat menurunkan aktivasi FAK pada sel kanker payudara MDA-MB-231 ?
6. Apakah pemberian afzelin dapat menurunkan aktivasi Rac-1 pada sel kanker payudara MDA-MB-231 ?
7. Apakah pemberian afzelin dapat menghambat migrasi melalui penurunan aktivasi FAK dan Rac1?
8. Apakah pemberian afzelin dapat meningkatkan apoptosis melalui penurunan aktivasi FAK dan Rac1?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Penelitian ini ditujukan untuk menjelaskan 'potensi afzelin dalam menghambat migrasi dan meningkatkan apoptosis sel kanker payudara MDA-MB-231, melalui penurunan aktivasi FAK dan Rac1.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Untuk membuktikan efek afzelin dalam menurunkan viabilitas sel kanker payudara MDA-MB-231.
2. Untuk membuktikan efek afzelin dalam meningkatkan apoptosis sel kanker payudara MDA-MB-231.

3. Untuk membuktikan efek afzelin dalam menurunkan migrasi sel kanker payudara MDA-MB-231.
4. Untuk membuktikan efek afzelin dalam menurunkan pembentukan *focal adhesion* pada sel kanker payudara MDA-MB-231.
5. Untuk membuktikan efek afzelin dalam menurunkan aktivasi FAK pada sel kanker payudara MDA-MB-231.
6. Untuk membuktikan efek afzelin dalam menurunkan aktivasi Rac1 pada sel kanker payudara MDA-MB-231.
7. Untuk membuktikan efek afzelin dalam menghambat migrasi melalui penurunan aktivasi FAK dan Rac1.
8. Untuk membuktikan efek afzelin dalam meningkatkan apoptosis melalui penurunan aktivasi FAK dan Rac1.

1.4 Manfaat penelitian

1. Penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan afzelin sebagai penghambat metastasis kanker payudara, terutama subtipe TNBC.
2. Penelitian ini memperkaya eksplorasi flavonoid glikosida sebagai salah satu alternatif penghambat metastasis kanker payudara.
3. Penelitian ini menyumbangkan alternatif dalam upaya mengembangkan obat yang dapat digunakan sebagai preventif primer terjadinya metastasis pada kanker payudara subtipe TNBC.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker payudara

Kanker payudara mendominasi kanker pada wanita serta menjadi penyebab utama kematian akibat kanker di 135 negara, dan diprediksi peringkat ini akan tetap bertahan hingga setidaknya tahun 2030 (Bray *et al.*, 2012, 2018). Dalam rentang tahun 2002 – 2008, insiden kanker payudara di dunia meningkat 20,17%, dengan peningkatan di negara berkembang jauh lebih tinggi (34,49%) dibanding negara maju (8,83%). Jumlah kematian akibat kanker payudara juga meningkat di negara berkembang (21,67%), sedangkan di negara maju justru mengalami penurunan (0,2%) (Jemal, *et al.*, 2011; Bray *et al.*, 2012, 2018). Hal ini menunjukkan bahwa di negara maju upaya pencegahan kanker payudara lebih efektif menahan laju pertumbuhan kasus kanker payudara dan upaya untuk memperpanjang harapan hidup bagi pasien mulai menampakkan hasil. Walaupun demikian bila dipandang dari jumlah, kasus baru kanker payudara tahun 2008 di negara maju (692.200 jiwa) sedikit lebih tinggi dibanding negara berkembang (691.300 jiwa) (Jemal, *et al.*, 2011).

Dalam perhitungan statistik tahun 2014, kasus baru kanker payudara di Indonesia mencapai 48.998 (16,37 % dari seluruh kasus kanker), dengan kematian 21,4% dari seluruh jumlah kematian akibat kanker (*World Health Organization*, 2014). Jumlah ini meningkat menjadi 58.256 (16,7% dari seluruh kasus kanker), dengan kematian 11%. Indonesia termasuk negara di Asia Tenggara yang mempunyai insiden kanker payudara ketiga tertinggi (37/100.000 wanita) setelah Singapura (59,9/100.000 wanita) dan Malaysia (37/100.000 wanita) (Kimman *et al.*, 2012). Insiden kanker payudara di Indonesia diprediksi

akan mencapai 74,289 kasus di tahun 2030, yang 75%-nya pada pasien usia kurang dari 65 tahun (Ferlay *et al.*, 2013).

2.1.1 Teori klasik *multistage theory of cancer*

Perkembangan kanker dipahami sebagai proses multi-tahap. Konsep ini pertama kali diajukan oleh Berenblum dan Schubik pada 1948, melalui model inisiator-promotor pada kanker kulit. Model ini dikembangkan lebih lanjut menjadi teori *multistage of cancer* oleh beberapa peneliti, terutama Armitage dan Doll pada 1957. Tahapan dalam karsinogenesis ini diidentifikasi sebagai tiga fase utama yaitu inisiasi, promosi, dan progresi (Weiss, 2004).

a. Inisiasi

Inisiasi neoplasia merupakan perubahan *irreversibel*, yang melibatkan satu atau beberapa perubahan seluler yang stabil baik akibat paparan karsinogen atau secara spontan. Pada tahap ini, gen mengalami mutasi sehingga menghasilkan potensi perkembangan neoplastik (Steen, 2000). Mutasi gen akan mempengaruhi perilaku dan respon seluler, dan mengganggu regulasi gen yang terlibat dalam jalur persinyalan biokimiawi yang berhubungan dengan kontrol proliferasi sel dan/atau gangguan komunikasi, perkembangan, dan diferensiasi seluler. Mutasi awal ini menghasilkan potensi perkembangan pre-neoplastik (Basu, 2018).

b. Promosi

Sel yang telah ditransformasi pada tahap inisiasi bersifat tidak berbahaya, hingga ia distimulasi untuk mengalami proliferasi lebih lanjut dan mengganggu keseimbangan seluler. Perubahan lanjut sel menuju transformasi neoplastik sangat mungkin melibatkan lebih dari satu langkah dan membutuhkan paparan stimulus berulang dan dalam jangka lama. Ekspresi mutasi awal akan tergantung pada interaksi dengan mutasi onkogenik lain, dan juga faktor yang mungkin

mengubah sementara pola ekspresi gen spesifik, misalnya sitokin dan metabolit lipid (Basu, 2018).

c. Progresi

Tahap progresi merupakan proses perubahan yang berturut-turut pada neoplasma, menghasilkan peningkatan sub-populasi sel maligna. Pada tahap ini, proses yang terjadi melibatkan mutasi dan kelainan kromosom. Proses progresi bisa dipercepat oleh paparan berulang stimulus karsinogenik atau tekanan selektif yang menguntungkan derivat klonal otonom. Saat proliferasi sel tumor semakin tinggi, sel dapat mengalami mutasi lebih lanjut dan meningkatkan heterogenitas populasi sel. Proses ini mungkin menghasilkan akuisisi awal mutasi gen spesifik yang menurunkan stabilitas genomik, misalnya mutasi pada p53 (Yue *et al.*, 2017) atau *DNA mismatch repair gene* (Martin *et al.*, 2010). Seiring dengan perkembangan progresi tumor, sel terlepas dari massa tumor dan menginvasi jaringan sekitar, Proses ini dapat berlanjut hingga sel dapat berpindah dan berkembang menjadi tumor sekunder di lokasi baru (Yano *et al.*, 2013).

2.1.2 Hipotesis terjadinya kanker

Arus utama teori terjadinya kanker merujuk pada ulasan dari Hanahan dan Weinberg dalam *Hallmark of cancer* yang dipublikasikan pada tahun 2000, dan direvisi pada tahun 2011 dengan judul *Hallmark of cancer: the next generation* (Hanahan dan Weinberg, 2011). Teori yang dianut pada ulasan ini disebut sebagai teori mutasi somatik (*somatic mutation theory/ SMT*), sebagai lawan dari teori bidang organisasi jaringan (*tissue organization field theory/TOFT*). Inti dari SMT adalah bahwa kanker berasal dari satu sel somatik yang secara berturut-turut mengakumulasi berbagai mutasi DNA, dan mutasi tersebut terutama terjadi pada gen yang mengontrol proliferasi dan siklus sel. Karenanya menurut SMT, lesi neoplastik adalah hasil dari peristiwa di tingkat DNA. Sebaliknya menurut TOFT,

karsinogenesis terutama disebabkan oleh masalah organisasi jaringan. Karsinogen merusak arsitektur jaringan normal sehingga mengganggu sinyal dari sel ke sel dan berdampak pada integritas genetik. Jadi, pada TOFT mutasi DNA adalah efek, dan bukan penyebab, dari peristiwa tingkat jaringan sebagaimana yang dicetuskan oleh Sonnenschein dan Soto pada tahun 1998 (Soto, 2014; Bertolaso, 2016). Selain itu, menurut SMT, kanker adalah satu arah dan *irreversible*, sedangkan menurut TOFT, kanker adalah *reversible* dan dapat diobati (Rosenfeld, 2013).

Hanahan dan Weinberg menyimpulkan bahwa untuk dapat terjadi pertumbuhan malignansi diperlukan karakteristik esensial yang merupakan perubahan fisiologis sel yaitu 1) dapat mencukupi kebutuhan sinyal pertumbuhan secara mandiri (*self sustaining*), 2) mampu berproliferasi secara kronik, 3) mampu mengatasi supresor pertumbuhan, 4) mampu menghindari kematian sel, 5) mampu menginduksi angiogenesis, 6) mampu melakukan invasi dan metastasis, 7) memprogram ulang alokasi kebutuhan energi seluler, 8) menghindari sistem imun. Selain itu terdapat dua faktor pendukung yaitu ketidakstabilan genetik dan terjadinya inflamasi yang memperburuk progresi kanker (Hanahan dan Weinberg, 2011).

2.1.3 Variasi pada kanker payudara

Variasi pada genotip sel kanker payudara juga didapatkan pada fenotip kanker payudara, yang dibuat penggolongannya untuk tujuan klinis. Awalnya, dua tipe kanker payudara pada manusia diklasifikasikan berdasar asal lokasinya pada kelenjar mammae. Pada karsinoma duktal, sel kanker berkembang dari duktus, sedang pada karsinoma lobular, sel berasal dari lobulus yang memproduksi susu. Tetapi, mayoritas karsinoma *mammae* diduga berasal dari *terminal duct lobular unit*, dan istilah '*ductal*' dan '*lobular*' tidak menunjukkan lokasi atau tipe sel asal.

Kedua tipe kanker ini dibagi menjadi sub tipe berdasar apakah tetap in situ atau menginvasi jaringan sekitar. Pada *ductal carcinoma in situ* (DCIS) sel kanker tetap berada di satu area duktus, sedangkan pada *lobular carcinoma in situ* (LCIS) sel kanker berada di satu lobulus, dan pada kedua kasus sel kanker tidak menginvasi membran basalis. DCIS merupakan bentuk paling umum dari kanker payudara non-invasif (80%) (Sewell, 2004). Pada *invasive ductal carcinoma* (IDC) atau disebut juga *invasive carcinoma of no special type/NST*, dan *invasive lobular carcinoma* (ILC) sel kanker menginvasi lebih dari membran basalis menuju ke stroma, jaringan lemak, dan jaringan ikat di sekitarnya. Setelah invasi, sel kanker dapat menyebar lebih jauh ke seluruh tubuh, melalui aliran darah atau sistem limfatik. *Invasive ductal carcinoma* berkontribusi terhadap 4 dari lima kanker payudara invasif, dan ILC lebih jarang (10%) (Zengel *et al.*, 2015; Barroso-SousadanMetzger-Filho, 2016).

Penggolongan secara histologis ini berkembang hingga terdapat 20 jenis tipe histologis kanker payudara menurut *World Health Organization* (WHO). Sub tipe spesifik yang paling umum selain IDC dan ILC, adalah *tubular*, *cribriform*, *metaplastic*, *apocrine*, *mucinous*, *papillary*, dan *micropapillary carcinoma*, juga *carcinoma with medullary*, *neuroendocrine*, dan *salivary gland/skin adnexal type feature* (Sinn dan Kreipe, 2013).

Variasi histologis juga dapat terlihat pada jenis *grading* (*histological grading*) kanker payudara. *Grading* ditentukan secara semi kuantitatif berdasar pada derajat diferensiasi (pembentukan tubulus dan pleomorfisme nukleus), dan aktivitas proliferasi (indeks mitosis). Hasil analisis ketiga aspek tersebut digunakan untuk menetapkan jenis *grading* menjadi *well*, *moderately*, dan *poorly differentiated*. Keragaman karakteristik kanker payudara berdasar kecenderungan metastasis ditetapkan berdasar invasi lokal, metastasis ke limfonodi, dan metastasis jauh ke organ lain, yang disimpulkan sebagai *staging/stadium* (Rakha

et al., 2010). Berbeda dengan *grading*, stadium disepakati merupakan *continuum* yang menunjukkan progresivitas kanker payudara (Singletary, 2002).

Tabel 2.1 Keterhubungan antar jenis variasi kanker payudara

Marker Molekular	Tipe	Grade	Stadium
Luminal ER+, PR+, HER2 (- atau +), Dengan subtype: • Luminal A (ER+, PR +, HER2 -) • Luminal B (ER+, PR +, HER2 +)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Ductal carcinoma insitu</i> • <i>Mucinous</i> • <i>Tubular</i> • <i>Invasive lobular carcinoma</i> (ketiga jenis pertama umumnya luminal A) • <i>Micropapillary</i> • <i>Apocrine</i> • <i>Neuroendokrin</i> • <i>Invasive ductal osteoclastic</i> 	Umumnya well- sampai moderately- differentiated	Metastasis ke limfonodi lebih jarang
HER2-enriched ER-, PR- HER2 +	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Invasive lobular carcinoma</i> • <i>Micropapillary</i> • <i>Apocrine</i> 	Umumnya moderately- sampai poorly- differentiated (41% poorly)	Metastasis ke limfonodi paling banyak (34%)
<i>Molekular apocrine</i> ER-, PR-, HER2(+/-) AR+	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Apocrine</i> • <i>Invasive lobular carcinoma</i> <i>pleiomorfik</i> 	Umumnya moderately- sampai poorly- differentiated (32 % poorly)	Metastasis ke limfonodi banyak (29%)
<i>Triple negatif</i> ER-, PR-, HER2- termasuk jenis <i>basal-like</i> (selain <i>triple negative</i> juga CK5/6 + dan HER1+)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Secretory carcinoma</i> • <i>Adenoid cystic carcinoma</i> • <i>Medullary breast cancer</i> • <i>Metaplastic breast cancer</i> • <i>IDC-NST grade III</i> 	Well – moderately differentiated	
<i>Claudin lob</i> ER-, PR-, HER2-, CLDN (low/-) CLDH1 (low/-)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Medullary</i> • <i>Metaplastik</i> 	Poorly- differentiated	

Sumber : Chen et al., 2010; Weigelt et al., 2010; Hudis dan Gianni, 2011; Caldarella et al., 2013; Rivenbark et al., 2013

Gambaran fenotip kanker payudara semakin berkembang dengan adanya analisis molekular yang membuktikan adanya pola ekspresi gen, terutama berdasarkan ekspresi *estrogen receptor* (ER), *progesteron receptor* (PR) dan *human epidermal receptor 2* (HER2). Berdasar ekspresi tersebut, kanker payudara digolongkan menjadi grup molekular luminal, *HER2-enriched*, *normal breast-like*,

dan *basal-like* (Perou *et al.*, 2000). Pada tahun 2007, sub tipe baru yang diberi nama *claudin low* diidentifikasi dengan karakteristik ER/PR/HER2 negatif dan rendahnya ekspresi protein *tight-junction* claudin 3, 4, dan 7 serta E-cadherin (*calcium-dependent cell-cell adhesion glycoprotein*) (Herschkowitz *et al.*, 2007).

2.1.4 Kanker payudara sub tipe *triple negative*

Triple negative breast cancer (TNBC) digunakan untuk mendefinisikan semua tumor payudara yang tidak mengekspresikan ER, PR, dan HER2. Lebih dari 90% kematian pada kanker payudara terjadi karena metastasis ke organ vital yaitu pada otak, paru, dan hepar, serta sangat jarang terjadi kematian akibat komplikasi dari tumor primer (Anders dan Carey, 2009). Dari berbagai sub tipe kanker payudara, TNBC mempunyai prognosis yang paling buruk dan cenderung metastatik (Ovcaricek *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2015). Di Asia Tenggara, insiden TNBC cukup tinggi, yaitu 30,7% di Thailand (Kongsiang *et al.*, 2014), 12,4 – 17,6% di Malaysia (Kishen *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2009), dan 12 - 25% di Indonesia (Widodo *et al.*, 2014; Kusumadjayanti *et al.*, 2015). TNBC mempunyai *disease free survival* (DFS) dan OS 5 tahun lebih rendah dibanding non-TNBC, yaitu 68,2 - 72,05% dan 74,5 - 88,51%, berturut-turut (Ovcaricek *et al.*, 2011; Eralp *et al.*, 2014; Qiu *et al.*, 2016). Seiring dengan semakin tinggi stadiumnya, OS 2 tahun TNBC semakin rendah yaitu 97% (stadium 1), 93% (stadium 2), 71% (stadium 3), dan 27% (stadium 4) (Bacalbasa dan Ionescu, 2016). TNBC cenderung rekuren pada organ jauh (92%) dan hanya sebagian kecil yang rekuren lokal (7,1%) (Ovcaricek *et al.*, 2011). Angka kematian dan rekurensya paling tinggi pada tiga tahun pertama, lalu menurun drastis setelah periode lima tahun sejak terdiagnosis (Pogoda *et al.*, 2013).

Setiap sub grup histologis memiliki karakteristik dan prognosis yang berbeda beda, tetapi umumnya TNBC memiliki prognosis lebih buruk dibanding

subtipe kanker payudara lain, karena perilaku sel kanker yang lebih agresif dan tidak adanya target terapi spesifik (Bianchini *et al.*, 2016). TNBC tidak hanya lebih sering rekuren lokal, tetapi juga lebih cenderung metastasis ke organ viseral dibanding pada tulang, serta sering ditemukan metastasis serebral (Dent *et al.*, 2008; Tsuda *et al.*, 2000). DFS dan OS TNBC lebih pendek dibanding subtipe lain (Ovcaricek *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2015).

Setelah terjadi rekuren, median durasi survival TNBC lebih pendek dibanding subtipe kanker payudara lain. Dari 3.726 pasien kanker payudara stadium awal, median survival pada subgroup *basal-like* setelah rekuren di organ jauh adalah 0,5 tahun, dibanding 2,2 tahun pada luminal A, dan 0,7 tahun pada HER-2 (Kennecke *et al.*, 2010). Bahkan pada stadium yang sangat awal (T1N0), TNBC mempunyai risiko rekuren yang lebih tinggi dibanding tumor HER-2 positif dengan *hazard ratio* untuk rekuren 6,57 setelah disesuaikan (*adjusted*) dengan faktor prognostik seperti usia, ukuran tumor, dan terapi *adjuvant* (Kaplan *et al.*, 2009).

Secara histologis, mayoritas TNBC termasuk dalam klasifikasi histologis invasif karsinoma mammae tipe non spesifik (95%) dan tidak memiliki karakteristik histologis yang spesifik. Lima persen sisanya adalah *invasive lobular carcinoma* (1–2%), serta jenis yang lebih jarang (<1%) yaitu *metaplastic carcinoma with squamous differentiation*, *spindle-cell metaplastic carcinoma*, *adenoid cystic carcinoma*, *secretory carcinoma*, *typical medullary carcinoma*, *atypical medullary carcinoma*, dan *apocrine carcinoma* (Bianchini *et al.*, 2016).

Lehmann *et al.*, (2011) membagi TNBC menjadi enam subtipe berdasar profil ekspresi gen dan ontologi gen yaitu dua *basal-like-related subgroup* (*basal-like* 1 (BL1) dan 2 (BL2)), dua *mesenchymal-related subgroups* (*mesenchymal* (M) dan *mesenchymal stem-like* (MSL)), satu *immuno modulatory subgroup* (IM) dan satu grup *luminal androgen receptor* (LAR). Pemeriksaan silang dengan

imunohistokimia mengidentifikasi empat kluster yang sama dengan profil gen yaitu BL1, BL2, IM, dan LAR. Walaupun terdapat variasi ekspresi gen, tidak terdapat perbedaan yang bermakna dalam hal *pathological complete response* (pCR) atau *survival* setelah kemoterapi *neoadjuvant* (Prat *et al.*, 2014), dan semuanya memberi respon yang sama terhadap kemoterapi berbasis platinum (Isakoff *et al.*, 2015; Sikof *et al.*, 2015; Tutt *et al.*, 2015).

Ontologi gen pada subtype BL1 ditandai oleh banyak komponen jaras siklus sel dan proliferasi sel (siklus sel, *reactome* replikasi DNA, jaras G_2 *cell-cycle*, *RNA polymerase*, dan G_1 *to S cell cycle*). Subtype BL2 menunjukkan ontologi gen unik yang melibatkan sinyal faktor pertumbuhan (jaras *epidermal growth factor* (EGF), *neural growth factor* (NGF) *mesenchymal to epithelial transition factor* (MET), *wingless/integrated* (Wnt) β -catenin, dan *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF1R)) serta jaras glikolisis dan glukoneogenesis. Subtype ini kemungkinan berasal dari basal/myoepithelial, yang ditandai oleh tingginya ekspresi TP63 dan *membrane metalloendopeptidase* (MME) atau disebut juga *cluster of differentiation 10* (CD10) (Lehman *et al.*, 2011).

Subtype IM mempunyai gambaran ekspresi gen yang dominan pada proses imun, termasuk persinyalan sel imun (jaras Th1/Th2, jaras sel NK, jaras persinyalan reseptor sel B, jaras sel dendritik, dan jaras persinyalan reseptor sel T), jaras sitokin (sitokin, interleukin (IL)-12, dan IL-7), pemrosesan dan presentasi antigen, dan persinyalan melalui jaras transduksi sinyal imun utama (persinyalan *nuclear factor κ B* (NF κ B), *tumor necrosis factor* (TNF), dan *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription* (JAK/STAT)). Subtype M kaya komponen dan jaras yang berhubungan dengan motilitas sel (regulasi aktin oleh Rho), interaksi reseptor MES, dan jaras diferensiasi sel (jaras Wnt, jaras *anaplastic lymphoma kinase* [ALK] dan TGF- β). Subtype MSL mempunyai karakteristik gen yang sama dengan tipe M tetapi MSL mempunyai keunikan pada ekspresi gen

yang berhubungan dengan jalur persinyalan faktor pertumbuhan, termasuk metabolisme inositol phosphate, *epidermal growth factor receptors* (EGFR), *platelet derived growth factor* (PDGF), jalur kalsium, *G-protein coupled receptor*, jalur *extracellular signal-regulated kinase* (ERK1/2), *ATP-binding cassette* (ABC) transporter, dan jalur adipositokin. Ekspresi gen pada sub tipe LAR paling berbeda dibanding sub tipe TNBC lainnya. Sub tipe ini ER negatif tetapi ontologi gennya sangat kaya dengan komponen jalur yang diregulasi hormonal, termasuk sintesis steroid, metabolisme porfirin, metabolisme androgen/ estrogen, dengan ekspresi mRNA *androgen receptor* (AR) yang sembilan kali lebih tinggi dari sub tipe lain (Lehman *et al.*, 2011).

Triple negative breast cancer menjadi tantangan karena walaupun responnya baik terhadap kemoterapi konvensional, tetapi sangat mudah muncul klonal resisten (Carey *et al.*, 2010). Beberapa penelitian klinis mencoba agen selain kemoterapi yang aktif pada TNBC, misalnya inhibitor *poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP) yang aktif pada TNBC dengan disfungsi *breast cancer gene 1* (BRCA1), antibodi terhadap EGFR dan inhibitor EGFR *tyrosine kinase* pada TNBC dengan amplifikasi gen EGFR, dasatinib pada TNBC dengan Src *tyrosine kinase* teraktivasi, serta inhibitor *mammalian target of rapamycin* (mTOR) pada TNBC yang kehilangan supresor tumor PTEN (Anders dan Carey, 2008; Reis-Fiho dan Tutt, 2008 ; Hudis *et al.*, 2011).

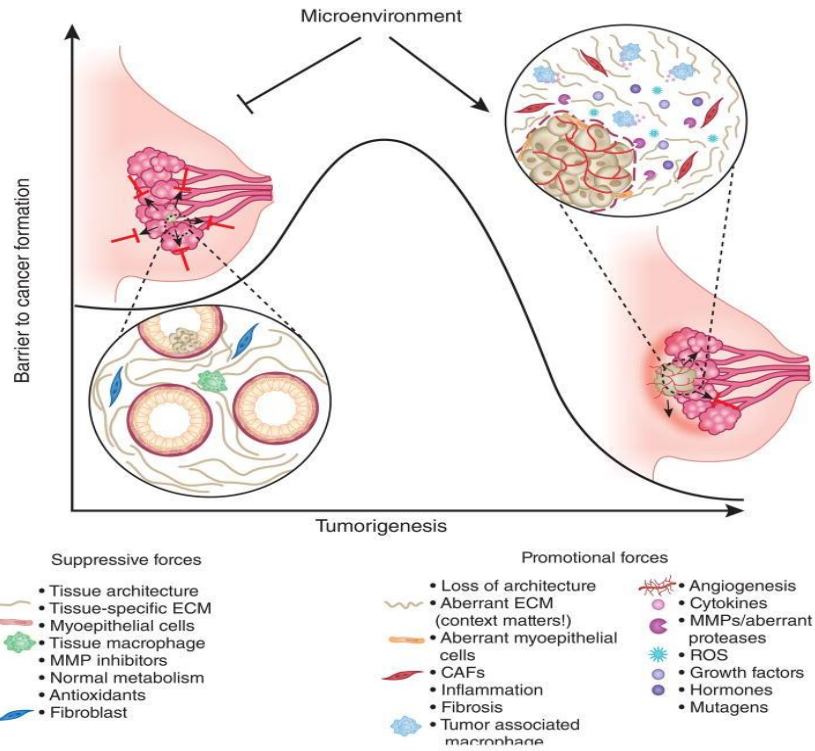
2.2 Tahapan invasi - metastasis pada kanker payudara

Metastasis kanker adalah suatu proses penyebaran sel kanker dari massa tumor primer menuju ke bagian lain tubuh melalui pembuluh darah dan limfatik. Proses terjadinya cukup kompleks, yang melibatkan serangkaian kejadian yang disebut *cascade* invasi-metastasis (Valastyan dan Weinberg, 2011). Singkatnya, untuk dapat metastasis sel tumor harus mampu memisahkan diri dari tumor primer,

memasuki aliran darah, bertahan saat transport dalam pembuluh darah, keluar dari aliran darah, dan kolonisasi pada organ target (Pankova *et al.*, 2010).

a) Invasi lokal

Invasi lokal melibatkan masuknya sel kanker yang semula berada pada tumor primer, ke stroma di sekeliling tumor (*tumor-associated stroma*) dan setelahnya ke jaringan parenkim normal. Untuk dapat menginvasi stroma, sel kanker harus terlebih dulu meretas membran basalis. Selain berfungsi struktural, membran basalis juga menyimpan molekul faktor pertumbuhan yang terlepas bila dilisiskan oleh protease yang disekresi sel kanker. Membran basalis juga berperan penting dalam transduksi sinyal dalam sel kanker melalui jalur yang dicetuskan oleh adhesi sel-matriks yang dimediasi integrin, sehingga terjadi perubahan polaritas sel, proliferasi, invasi, dan *survival* (Bissell dan Hines, 2011). Modulasi kekakuan MES, dicapai dengan mengubah *cross-linking* kolagen, mempengaruhi progresi kanker payudara perubahan sinyal integrin (Levental *et al.*, 2009). Dengan demikian, hilangnya barrier membran basalis, membolehkan invasi langsung sel kanker ke stroma (gambar 2.1). Proteolisis aktif, terutama oleh *matrix metalloproteinase* (MMP) berkontribusi terhadap hilangnya integritas membran basalis dan stroma (Kessenbrock *et al.*, 2010).

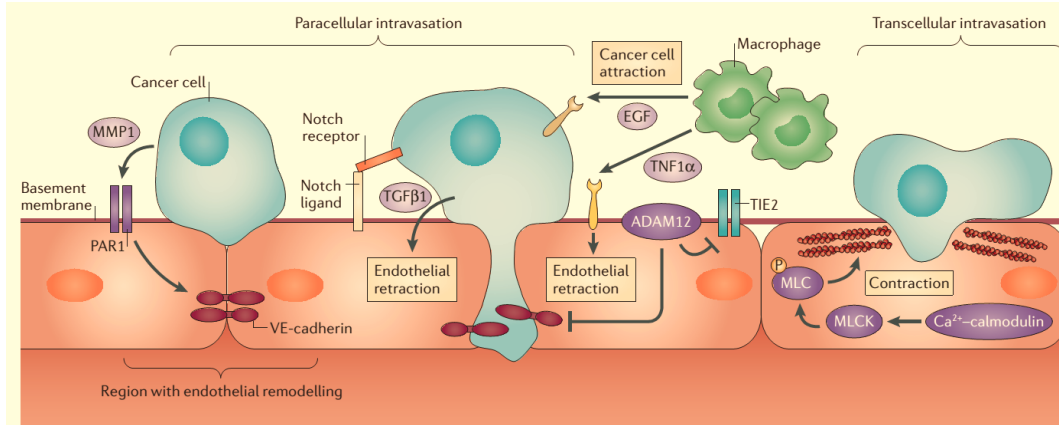


Gambar 2.1 Peran lingkungan mikro terhadap tumorigenesis

Keterangan : Lingkungan mikro pada jaringan normal bertindak sebagai *barrier* terhadap tumorigenesis. Pada kondisi homeostasis jaringan normal, lingkungan mikro menekan sehingga tumor tidak berkembang. Tapi lingkungan mikro juga memiliki kemampuan memfasilitasi pertumbuhan tumor, dan dengan kombinasi mutagen, inflamasi, faktor pertumbuhan dan promotif lainnya sel kanker dapat menembus *barrier* sehingga terbentuk massa kanker (Sumber: Bissel dan Hines, 2011)

b) Intravasasi

Intravasasi adalah peristiwa sel kanker invasif memasuki lumen pembuluh limfatik atau pembuluh darah. Walaupun penyebaran limfatik sel kanker umumnya terjadi pada kanker dan menjadi *marker* prognosis perkembangan kanker, tetapi diseminasi melalui sirkulasi hematogen menjadi mekanisme utama penyebaran sel metastatik (gambar 2.2). Intravasasi difasilitasi oleh perubahan molekuler yang memicu kemampuan sel kanker melewati perisit dan endotel yang membentuk dinding pembuluh darah kecil (Gupta dan Massague´, 2006).



Gambar 2.2 Regulasi jaras persinyalan pada intravasasi.

Keterangan: Untuk intravasasi, sel kanker harus migrasi ke pembuluh darah/ limfe dalam tumor atau dekat tumor. Invasi melalui stroma sampai ke pembuluh dapat difasilitasi oleh TAM. Sel kanker memasuki sirkulasi dengan cara migrasi paraseluler atau transeluler. MMP1 mungkin dibutuhkan untuk intravasasi paraseluler pada regio *endotel junction* yang *remodeling*-nya difasilitasi oleh *protease-activated receptor 1* (PAR1). Alternatif lain a *disintegrin and metalloproteinase 12* (ADAM12) pada sel endotel menginduksi pemecahan *vascular endothelial cadherin* (VE-cadherin) dan *angiopoietin 1 receptor* (TIE2), yang menyebabkan terganggunya *endothelial junction*. Selain itu, makrofag dapat menarik sel kanker ke arah pembuluh darah dengan menyekresi *epidermal growth factor* (EGF) dan *tumour necrosis factor 1α* (TNF1α) yang menginduksi retraksi *endothelial junction*, sehingga terjadi migrasi paraseluler. Model migrasi ini juga difasilitasi oleh ikatan reseptor Notch sel kanker dengan *ligand*-nya di sel endotel, yang memicu sekresi *transforming growth factor β1* (TGFβ1) yang menyebabkan penarikan *endothelial junction*. Pada intravasasi transeluler, Ca^{2+} -*calmodulin complex* pada sel endotel mengaktifasi fosforilasi *myosin light chain* (MLC) *kinase* (MLCK) sehingga terjadi kontraksi *actomyosin*. Akibatnya terjadi *remodeling* sitoskeleton dan membran secara cepat sehingga membentuk struktur mirip pori yang membolehkan sel kanker menembus sel endotel (Sumber: Reymond *et al.*, 2013).

c) Bertahan dalam sirkulasi

Setelah sel kanker berhasil intravasasi ke lumen pembuluh limfe atau darah, ia dapat menyebar ke sirkulasi vena dan arteri, yang saat ini sudah terbukti dengan deteksi adanya *circulating tumor cells* (CTCs) pada pasien kanker (Pantel *et al.*, 2008; Stott *et al.*, 2010). Karena CTCs mewakili fase antara tumor primer dengan lokasi diseminasi maka ia dianggap sebagai *intermediate* metastasis. CTCs dalam aliran darah harus bertahan dari berbagai stres sampai mencapai organ target. CTCs mengalami penurunan adhesi integrin dengan matriks ekstraseluler (MES) yang dibutuhkan untuk *survival* sel. Tanpa adanya perlekatan

ini, normalnya sel epitel mengalami anoikis yaitu suatu bentuk apoptosis yang diperantarai oleh hilangnya perlekatan dengan substratum (Guo dan Giancotti, 2004; Buccheit *et al.*, 2014).

Bila mempertimbangkan diameter sel kanker (20-30 μm) dan diameter luminal kapiler (58 μm), kemungkinan sebagian besar CTCs akan terperangkap pada berbagai kapiler saat putaran pertama sirkulasi, dengan estimasi hitungan menit setelah intravasasi. Karena itu, sel kanker berada di aliran darah hanya dalam waktu singkat, sehingga CTCs dapat melewati sirkulasi sebelum sinyal anoikis teraktifkan. Sel kanker juga harus bertahan terhadap *shear stress* hemodinamik dan survailan sistem imun *innate* terutama sel *natural killer*. Kemampuan lolos dari *stressor* hemodinamik dan imun diduga melalui mekanisme yang memanfaatkan mekanisme koagulasi darah normal. Interaksi sel kanker dengan *platelet* membentuk emboli yang mampu melindungi sel kanker selama dalam sirkulasi dan meningkatkan peluang sel kanker untuk terperangkap dalam kapiler, dengan mediasi faktor jaringan dan/atau L- dan P-selectin (Joyce dan Pollard, 2009).

d) Stasis dalam organ jauh

Kontroversi yang berhubungan dengan mekanisme ini adalah apakah terhentinya CTCs pada mikrovaskular terjadi akibat struktur vaskular dan pembatasan ukuran oleh diameter kapiler, atau kemampuan aktif CTCs untuk berlabuh ke organ spesifik akibat interaksi *ligand-reseptor* antara CTCs dengan dinding kapiler. Beberapa CTCs terperangkap dengan cepat karena plastisitasnya atau kesempatan untuk melewati *arteriovenous shunt*, sehingga dapat terperangkap pada mikrovaskular organ yang jauh (Valastyan dan Weinberg, 2011).

Hipotesis lainnya adalah CTCs mempunyai predileksi untuk terperangkap pada jaringan tertentu. Beberapa sel karsinoma mampu membentuk interaksi

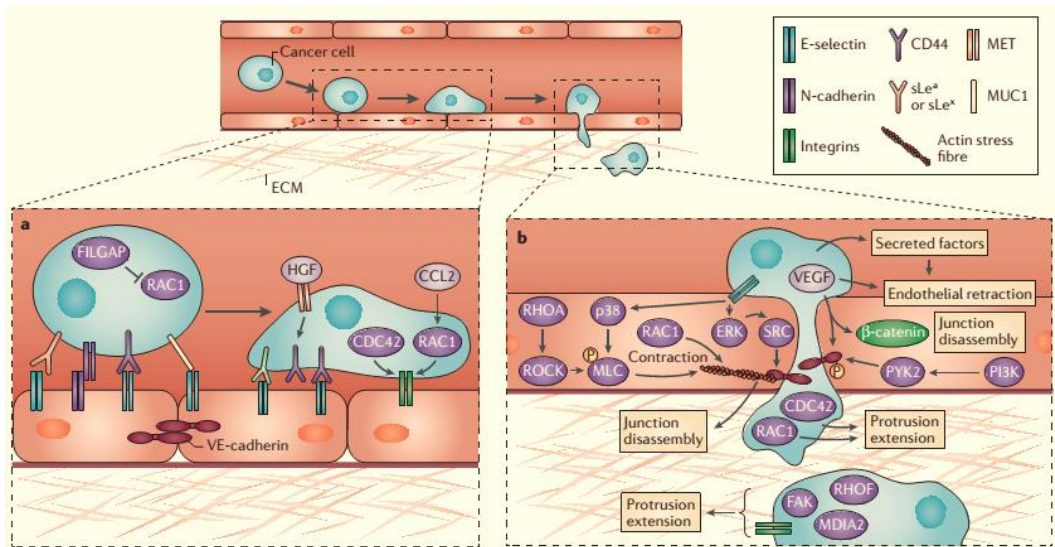
adhesif dengan jaringan tertentu yang memfasilitasinya. Misalnya, adanya ekspresi metadherin pada sel kanker payudara menyebabkan *homing* pada paru melalui fasilitasi ikatan dengan vaskular pulmonal (Brown dan Ruoslahti, 2004). Pada kanker kolorektal dan paru, intravasasi menuju mikrovaskular hepatic memicu rangkaian pro-inflamasi yang menyebabkan sel Kupffer menyekresi kemokin untuk meningkatkan regulasi berbagai reseptor adhesi vaskular, sehingga CTCs dapat adhesi ke mikrovaskular hepar (Auguste *et al.*, 2007).

e) Ekstravasasi

Setelah sel kanker terperangkap pada mikrovaskular organ jauh, CTCs mulai proliferasi intraluminal dan membentuk mikrokoloni yang akhirnya merobek dinding pembuluh darah, sehingga sel tumor langsung kontak dengan parenkim jaringan (Muschel *et al.*, 2000). Alternatif lainnya, sel kanker menyeberangi lumen pembuluh darah menuju parenkim jaringan dengan penetrasi lapisan sel endotel dan perisit, melalui proses yang disebut ekstravasasi (Quail dan Joyce, 2013).

Walaupun sama sama menembus dinding pembuluh darah tetapi proses intravasasi dan ekstravasasi berbeda. Intravasasi didukung oleh TAM yang terdapat di stroma tumor (Wyckoff *et al.*, 2007), sedang pada ekstravasasi kemungkinan kecil didukung oleh TAM, karena populasi makrofag pada tumor primer dan lokasi diseminasi berbeda dalam hal fenotip dan fungsi (Qian dan Pollard, 2010). Selain itu, neovaskular pada tumor primer berliku dan bocor (Carmeliet dan Jain, 2011), sedangkan mikrovaskular di organ tujuan metastasis biasanya dalam kondisi baik sehingga permeabilitasnya rendah. Contohnya, untuk mencapai parenkim otak CTCs harus melewati sawar darah-otak atau melewati mikrovaskular paru untuk mencapai parenkim paru, yang keduanya relatif tidak permeabel. Sedangkan, untuk mencapai hati atau tulang sel kanker menemui

sinusoid yang ber-fenestra sehingga sangat permabel untuk ekstravasasi sel kanker (Nguyen *et al.*, 2009).



Gambar 2.3 Molekul adhesi dan persinyalan yang berkontribusi pada ekstravasasi sel kanker.

Keterangan: a) Perlekatan awal sel kanker ke sel endotel dimediasi oleh interaksi *endothelial selectin* (E-selectin) dengan *ligand*-nya *sialyl Lewis a* (sLea atau sLex) dan CD44, yang semuanya diekspresikan pada sel kanker. b) CDC42 dan RAC1 pada sel kanker mendorong pemanjangan protrusi saat migrasi paraseluler. (Sumber : Reymond *et al.*, 2013)

Perlekatan awal sel kanker ke sel endotel dimediasi oleh interaksi *endothelial selectin* (E-selectin) dengan *ligand*-nya *sialyl Lewis a* (sLea atau sLex) dan CD44, yang semuanya diekspresikan pada sel kanker. Perlekatan ini juga dimediasi oleh interaksi homofilik *neuronal cadherin* (N-cadherin) (gambar 2.3). Pada tahap ini, sel mempertahankan bentuk bundar, disebabkan oleh inhibisi *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (RAC1) oleh *filamin A (FLNa)-binding RhoGTPase-activating protein* (FILGAP) atau disebut juga *Rho GTPase-activating protein 24*. Stabilitas adhesi sel kanker dengan endothel tergantung pada integrin, CD44 dan/atau mucin 1 (MUC1). *Hepatocyte growth factor* (HGF) meningkatkan ekspresi CD44, sedangkan *cell division control protein 42* (CDC42) mengontrol ekspresi $\beta 1$ integrin dan CCL2 menstimulasi aktivitas RAC1. CDC42 dan RAC1 pada sel kanker mendorong pemanjangan protrusi saat migrasi paraseluler.

Pembukaan *endothelial junction* dapat diinduksi oleh berbagai faktor yang disekresi oleh sel kanker dan/atau oleh molekul adhesi, misalnya ikatan integrin $\alpha V\beta 3$ ke *platelet endothelial cell adhesion molecule 1* diperlukan untuk pembukaan *endothelial junction* dan transmigrasi. Sel kanker memicu aktivasi RAC1, RhoA–*Rho-associated protein kinase* (ROCK) dan/atau p38 MAPK pada endotel, yang kemudian meningkatkan fosforilasi *myosin light chain* (MLC), pembentukan *stress fiber* dan *actomyosin-mediated tension* pada *endothelial junction*. Sel kanker juga dapat meningkatkan aktivasi Src yang diinduksi ERK, dan/atau mengaktifasi subunit PI3K, p110 α , yang berfungsi *upstream* dari *proline-rich tyrosine kinase 2* (PYK2). Jalur ini menginduksi fosforilasi dan pembongkaran kompleks VE-cadherin dengan β -catenin, sehingga terjadi pembukaan *endothelial junction*. Protein $\beta 1$ integrin, *focal adhesion kinase* (FAK) RhoF dan *diaphanous homologue mDIA2* (atau DIAPH3) mendorong pembentukan tonjolan seperti filopodium yang penting dalam invasi membran basalis di sekeliling pembuluh darah dan untuk proliferasi dalam jaringan sekelilingnya (Reymond *et al.*, 2013).

f) **Pertahanan awal di lingkungan baru dan pembentukan mikrometastasis**

Untuk dapat membentuk mikrometastasis, sel kanker yang ber-ekstravasasi harus bertahan hidup di lingkungan mikro asing yang jauh berbeda dengan tumor primer. Kemungkinan besar *disseminated tumour cells* (DTCs) awalnya kurang bisa beradaptasi terhadap lingkungan baru karena perbedaan lingkungan mikro, termasuk tipe sel stroma, konstituen MES, ketersediaan faktor pertumbuhan dan sitokin, dan mikro arsitektur jaringan (Valastyan dan Weinberg, 2011).

Beberapa peneliti mengajukan hipotesis bahwa sel kanker dapat mengatasi masalah ketidakcocokan lingkungan mikro di lokasi metastasis, melalui

pembentukan “*premetastatic niche*” (Psaila dan Lyden, 2009). Menurut model ini, tumor primer melepaskan sinyal sistemik, salah satunya *lysyl oxidase* (LOX) (Erler *et al.*, 2009), yang menginduksi peningkatan regulasi *fibronectin* fibroblast. Hal ini menyebabkan mobilisasi sel progenitor hematopoietik *vascular endothelial growth factor* (VEGF) *receptor 1-positive* (VEGFR1⁺) dari sumsum tulang ke lokasi metastasis, melalui interaksi *homing* antara *fibronectin* dan reseptornya yaitu integrin $\alpha 4\beta 1$ yang diekspresikan oleh sel progenitor hematopoietik (Psaila dan Lyden, 2009). *Lysyl oxidase* yang merupakan *amine oxidase* berperan dalam *crosslinking* kolagen dan elastin pada MES untuk menginduksi perubahan sistemik. Pada kondisi hipoksia, sel kanker payudara menyekresi LOX, yang memicu perekrutan sel myeloid CD11b⁺ yang kemudian melekat pada *cross-linked collagen IV* dan memproduksi MMP-2. Lalu MMP-2 memecah kolagen sehingga mempermudah sel derivat sumsum tulang (*bone marrow-derived cells/BMDCs*) dan sel kanker menginvasi lokasi metastasis (Sceneay *et al.*, 2012)

Pembentukan *premetastatic niche* menjadi faktor penentu untuk berkembangnya metastasis dan organotropisme. Contohnya, spektrum organotropisme pada diseminasi kanker paru dapat berubah cukup dengan mengarahkan sel hematopoietik pembentuk *niche* ke organ yang berbeda (Psaila dan Lyden, 2009). Secara umum, sel kanker menjalankan mekanisme kompleks untuk memodifikasi lingkungan mikro di lokasi metastasis untuk dapat *survive* pada awal metastasis dan membentuk mikrometastasis. Di saat yang sama DTCs harus menggunakan program otonom sel untuk beradaptasi terhadap *stressor* di lokasi metastasis. Misalnya aktivasi persinyalan Src memfasilitasi respon sel kanker terhadap SDF-1 dan *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), sehingga dapat bertahan di tulang. Persinyalan Src tidak dapat meningkatkan kemampuan sel kanker payudara untuk bertahan di paru, yang menunjukkan adanya mekanisme yang spesifik organ (Zhang *et al.*, 2009).

g) Kolonisasi metastasis

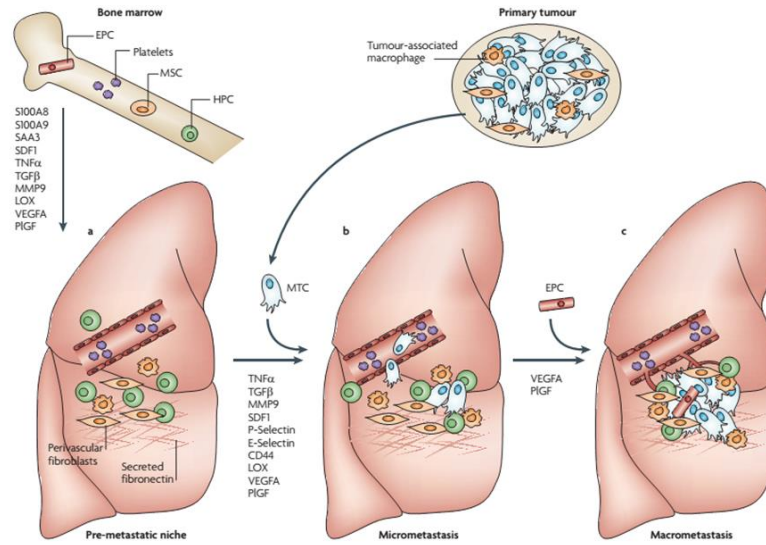
Bila DTCs mampu bertahan setelah kontak awal dengan lingkungan mikro di lokasi metastasis, belum tentu sel tersebut mampu proliferasi dan membentuk koloni. Umumnya DTCs meredup dalam hitungan minggu dan bulan atau bertahan sebagai koloni mikro dalam kondisi dorman, mempertahankan viabilitas sel tetapi tanpa pengurangan atau penambahan jumlah sel. Mikrometastasis ini bertahan melalui dua cara. Mayoritas DTCs mengalami *quiescent* karena kemampuan proliferasi di lokasi metastasis sangat terganggu oleh ketidaksesuaian dengan lingkungan mikro. Cara lain adalah sel kanker pada mikrometastasis terus berproliferasi tetapi peningkatan jumlah sel tidak terjadi karena diimbangi oleh kecepatan apoptosis. Salah satu penyebab tingginya apoptosis diduga karena DTCs tidak berhasil memicu neovaskularisasi (Chambers *et al.*, 2002).

Untuk dapat melakukan kolonisasi, selain terlebih dulu mempersiapkan *premetastatic niche*, DTCs juga memanfaatkan berbagai sel yang terdapat di lingkungan mikro. Secara fungsional DTCs berinteraksi dengan perubahan kuantitas asam hyaluronat, *fibronectin*, *tenascin C*, dan kolagen pada MES. *Remodeling* MES oleh berbagai protease yang diproduksi sel kanker dan lingkungan mikro, mempengaruhi adhesi dan viabilitas tumor. Integrin menjadi mediator utama komunikasi antara sel tumor dan perubahan MES tersebut. Fibroblas yang diaktifkan sel kanker berperan terhadap beberapa aspek kolonisasi, termasuk angiogenesis, inflamasi, imunitas dan potensi pertumbuhan tumor (Steeg, 2016). Interaksi antara sel dengan MES difasilitasi oleh pembentukan plak adhesi panjang yang mengandung integrin $\beta 1$ segera setelah sel kanker melakukan ekstrasvasasi di parenkim paru. Plak ini berlokasi dan terbentuk setelah pembentukan protrusi mirip filopodia yang mengandung banyak integrin $\beta 1$. Pembentukan protrusi ini diregulasi oleh protein regulator sitoskeleton Rif dan mDia2. Aktivasi integrin melalui ikatan dengan MES akan mengaktifkan

Focal Adhesion Kinase (FAK) pada plak dan mengaktifkan persinyalan proliferasi (Shibue *et al.*, 2012).

Sel kanker memanfaatkan imunitas *innate*. BMDCs yang mirip makrofag distimulasi untuk migrasi ke lokasi metastasis oleh TGF β , yang meningkatkan kolonisasi metastatik dengan cara menurunkan produksi arginase, *reactive oxygen species* (ROS), dan interferon- γ (IFN γ), sehingga terjadi penurunan imunitas antitumor yang tergantung sel T. Faktor lain yang dihasilkan tumor, komponen MES, dan hipoksia memobilisasi sel myeloid. Aktivitas sel myeloid diregulasi oleh faktor pertumbuhan, persinyalan *toll-like receptor* (TLR) dan *peroxisome proliferator-activated receptor- γ* (PPAR γ) serta *chemokine* (C-X3-C motif) ligand 1 (CX3CL1) yang berhubungan dengan viabilitasnya. Makrofag dari jaringan inang dan sirkulasi juga memfasilitas kolonisasi melalui *cascade* kemokin. Persinyalan timbal balik antara makrofag dengan sel tumor meningkatkan viabilitas keduanya. Sel NK juga bergabung ke lokasi kolonisasi dan berperan sebagai imunitas *innate* (Steeg, 2016).

Peran imunitas adaptif terhadap perkembangan koloni metastatik dimediasi oleh sel T. Kedatangan dan aktivasi *tumour infiltrating lymphocytes* (TILs) dimediasi oleh kemokin seperti C-X-C motif *chemokine ligand* 16 (CXCL16). Ekspresi *checkpoint* imun yaitu *programmed cell death protein 1* (PD1) meningkat pada CD8⁺ TILs yang berada di lingkungan mikro metastatik. Sebaliknya CD8⁺ TILs menyekresi IFN γ untuk meningkatkan regulasi PD1 *ligand* 1 (PDL1) pada sel metastatik. Ikatan PD1 – PDL1 menyebabkan non-aktifnya limfosit T sitotoksik. Sel tumor juga menghambat respon imun melalui produksi interleukin (ILs) yang menyebabkan *produksi granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF), mobilisasi netrofil dan inaktivasi CTLs. Jejaring kemokin tumor dapat merekrut T *regulatory* (Treg) sehingga memblok aktivitas sel NK (Steeg, 2016).



Gambar 2.4 Model evolusi suatu *metastatic niche*: transisi premetastatik, mikrometastatik, dan makrometastatik *niche*.

Keterangan: A) sebagai respon terhadap peningkatan regulasi faktor pertumbuhan yang disekresikan tumor primer di lokasi premetastatik, termasuk VEGF-A, *placental growth factor* (PIGF), TGFβ, kemokin inflamasi s100 dan serum amyloid A3 (sAA3), terjadi pengumpulan BMDCs (atau *Hematopoietic Progenitor Cells* (HPC)). sDF1 menarik platelet, BMDCs dan CTCs yang positif *c-X-c chemokine receptor 4* (CXCR 4+). Selanjutnya BMDCs menyekresi berbagai faktor pre-metastatik termasuk TNFα, MMP9, dan TGFβ. Fibroblast yang teraktivasi, mungkin berasal dari *mesenchymal stem cells* (MSC), menyekresi protein adhesi fibronectin dan meningkatkan ekspresi LOX sehingga memicu modifikasi MES lokal. B) CTCs (atau *Metastatic Tumor Cells* /MTC) menginfiltrasi *niche* untuk membentuk mikrometastasis. Ekspresi integrin pada endotel seperti P-selectin dan E-selectin mungkin meningkatkan adhesi dan ekstravasasi CTCs, dan interaksi antar sel misalnya CD44 meningkatkan *survival* sel metastatik dan memicu proliferasinya. C) perekrutan *endothelial progenitor cells* (ePcs) pada *niche* metastatik awal memediasi angiogenesis dan progresi makrometastasis (Sumber : Psaila dan Lyden, 2009).

Kolonisasi sel kanker memerlukan suplai nutrisi dan oksigen. Pada kondisi hipoksia, endotel berproliferasi dan migrasi membentuk kapiler baru, Peristiwa ini difasilitasi oleh BMDCs yang mengekspresikan VEGF, dan pembuluh darah yang terbentuk distabilisasi oleh persinyalan angiopoietin (ANGPT) (gambar 2.4). Cara lain untuk mendapatkan suplai darah adalah dengan memanfaatkan pembuluh darah yang telah ada dan mikro vaskulogenik yaitu pembentukan saluran/tabung penyalur darah oleh sel tumor (Steeg, 2016).

2.3 Migrasi sel kanker payudara pada proses metastasis

Dalam pembahasan metastasis sel kanker, sering terjadi kerancuan dalam penggunaan istilah motilitas, migrasi, dan invasi. Migrasi sel merupakan proses perpindahan sel dari satu lokasi ke lokasi lain melalui cara motilitas tertentu, seperti migrasi mesenkimal, amoebid, atau kolektif. Istilah motilitas pada sel sering digunakan sebagai sinonim dari migrasi bila pergerakan sel menghasilkan perpindahan. Tetapi istilah motilitas dapat digunakan untuk menjelaskan pergerakan pada bagian tertentu dari sel, misalnya kontraksi sel otot, perpanjangan axon, pembentukan protrusi permukaan sel, kontriksi pada sel yang membelah saat mitosis. Pergerakan dalam sel yang paling halus seperti pemisahan aktif kromosom, aliran sitosol, dan transport vesikel juga termasuk dalam motilitas sel (Lodish *et al.*, 2000). Secara umum pada kanker, migrasi berhubungan dengan kemampuan sel kanker menginvasi yaitu proses sel bergerak secara terarah melalui MES dalam jaringan atau menginfiltrasi jaringan lain. Menurut Bissel, migrasi dan invasi dapat menghasilkan luaran yang berbeda. Sel kanker tidak dapat menginvasi tanpa melakukan migrasi, tetapi sel kanker dapat migrasi tanpa menginvasi (Blow, 2007). Kemampuan invasi ini dihasilkan oleh migrasi dan sekresi proteinase yang mampu mendegradasi MES (Bozzuto *et al.*, 2010).

2.3.1 Tipe migrasi sel kanker payudara

Berdasar parameter morfologis dan molekuler tertentu, dua pola dasar migrasi dapat dibedakan, yaitu migrasi multiseluler dan migrasi sel individual/tunggal. Tipe pergerakan sel ini sebagian besar dipengaruhi oleh kondisi lingkungan mikro dan tergantung pada perubahan molekuler sel tumor (Krakhmal *et al.*, 2015).

- a) Migrasi multiseluler dapat terjadi melalui dua tipe yaitu migrasi seluler kolektif yaitu sel melakukan migrasi dengan tetap menjaga kontak yang dekat dengan satu sama lain, dan “*streaming*” yaitu sel tidak selalu melakukan kontak langsung (Friedl dan Wolf, 2003; Müller *et al.*, 2001). Tipe yang terakhir ini dilakukan oleh sel saat tahap gastrulasi pada perkembangan embrionik dan pada penyembuhan luka. Dalam kondisi fisiologis, migrasi sel secara kolektif dengan sel saling berikatan lebih sering terjadi dibanding migrasi individual, misalnya saat penyembuhan luka. Sel yang terlibat tetap memiliki sebagian besar karakteristik epitelial-nya, seperti adhesi sel dengan sel, tanpa terjadi transisi epitelial mesenkimal (TEM). Pada semua tipe migrasi kolektif, sel terdepan pada kelompok tersebut berpartisipasi dalam kemotaksis dan degradasi MES untuk membuka jalan. Sel terdepan ini terhubung dengan sel di belakangnya, menyeret mereka melewati MES yang telah di-*remodeling*. Pada migrasi kolektif sel tumor, sel terdepan dapat berupa sel dengan aktivitas proteolitik atau sel stroma di lingkungan mikro tumor. Di antara protein yang paling relevan dengan migrasi sel kolektif adalah integrin $\beta 1$ dan $\beta 3$. Protein ini bertanggung jawab menyediakan adhesi dan kekuatan dinamis yang diperlukan untuk mentransport kelompok sel. Sel pemimpin memiliki kemampuan proteolitik paling besar, dengan memproduksi metalloproteinase yang mampu memotong serabut kolagen dan membentuk jalur migrasi dan ekspansi kelompok sel. Prinsip pergerakan individual juga berlaku pada pergerakan kolektif, tetapi juga melibatkan integrasi sinyal interseluler untuk mengarahkan dan memelihara migrasi dalam sekelompok sel secara kohesif. Integrasi ini meliputi *pre-requisite* intrinsik sel seperti menetapkan polarisasi *leader-follower*, *mechanocoupling* supraseluler, dan stimulus mekanis, kimiawi, dan/atau elektrik untuk mengarahkan pergerakan kolektif (Olson, 2010; Rørth, 2007).

b) Migrasi sel individual. Pergerakan sel pada organisme sangat kompleks dan dikoordinasi dengan ketat. Misalnya, sel hematopoietik menunjukkan pergerakan sel yang sangat individual, dengan sedikit adhesi dan tanpa menyebabkan *remodeling* pada MES. Pergerakan individual ini memiliki variasi berupa ameboid atau mesenkimal, soliter atau serial. Tipe migrasi mesenkimal pada tumor sama seperti motilitas fibroblast, keratinosit dan endotel. Sel dengan pergerakan mesenkimal membentuk tonjolan memanjang. Pada matriks 3D, sel ini terpolarisasi depan belakang, membentuk tepi depan dengan satu atau lebih pseudopodia dan badan sel di bagian belakang. Translokasi sel mesenkimal mengikuti model klasik 5 langkah sebagaimana yang diuraikan pada sub bab siklus motilitas sel, dengan kecepatan gerak rata-rata 0,1 – 0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$. Kecepatan ini lebih lambat dibanding motilitas amoeboid karena diperlukan waktu untuk *turnover focal adhesion* saat translokasi (Paňková *et al.*, 2010). Migrasi amoeboid ditandai oleh siklus ekspansi dan kontraksi badan sel yang dimediasi oleh aktin dan myosin yang terletak di cortical. Pergerakan amoeboid dilakukan oleh leukosit. Pada tumor, model pergerakan amoeboid ditandai oleh bentuk sel yang bulat pada substrat 3D. Peningkatan kontraktilitas pada amoeboid difasilitasi oleh jalur persinyalan Rho/ROCK, yang membuat sel bisa menyelip di sela MES dan mengadaptasikan bentuk badan sel dengan ruang yang ada, atau memberi gaya yang cukup untuk mengubah ruang MES di sekitarnya. Ketegangan yang dipelihara oleh *actomyosin cortical* menyebabkan terbentuknya *bleb* (bentuk seperti gelembung/lepuhan) di membran sel. Pergerakan amoeboid independen terhadap degradasi MES (Wolf *et al.*, 2003). Perlekatan dengan adhesi lemah pada MES sudah cukup untuk pergerakan amoeboid yang cepat, berkisar 2 $\mu\text{m}/\text{menit}$ pada sel melanoma (Paňková, 2010) sampai 25 $\mu\text{m}/\text{menit}$ pada limfosit (Friedl *et al.*, 1994).

Tabel 2.2 Model dan dinamika migrasi yang diobservasi dengan *intravital imaging*

Cell line kanker payudara	Fraksi sel motil	Mode migrasi	Kecepatan
MTLn3 kanker payudara tikus	1,6% Mobile	Individual	
MTLn3 kanker payudara tikus	10 – 20 sel per lapang pandang	30% individual 70% streaming multiseluler	Individual ~0,77 $\mu\text{m}/\text{min}$; Streaming ~2,1 $\mu\text{m}/\text{min}$
MTLn3E kanker payudara tikus	1-5% (0-15% per lapang pandang)	30% individual 55% streaming multiseluler 15% kolektif	Individual ~2,5 $\mu\text{m}/\text{min}$; Streaming ~1 $\mu\text{m}/\text{min}$
MDA-MB 231 kanker payudara manusia	15%	Individual (tanpa bleb atau dengan protrusi invasif); Streaming multiseluler	Individual (tanpa bleb): 0,4 - 4,2 $\mu\text{m}/\text{min}$; Individual (protrusi invasif): 0,03 – 0,25 $\mu\text{m}/\text{min}$
MDA-MB 231 kanker payudara manusia	~ 5% (93% lapang pandang memiliki ≥ 1 sel motil)	44% individual; 56% streaming multiseluler	Sel tunggal ~ 0,7 $\mu\text{m}/\text{min}$; Streaming ~ 1,2 $\mu\text{m}/\text{min}$
TN1 kanker payudara manusia (dari efusi)	~ 5% (66% lapang pandang memiliki ≥ 1 sel motil)	44% individual; 56% streaming multiseluler	Sel tunggal ~ 0,6 $\mu\text{m}/\text{min}$; Streaming ~ 0,9 $\mu\text{m}/\text{min}$
Spontaneous mouse breast tumors (MMTV-PyMT)	80% (bila dekat dengan makrofag)		~3,9 $\mu\text{m}/\text{min}$ (bila dekat makrofag); signifikan lambat bila jauh.
MCF7 kanker payudara manusia		Individual	0,52- 0,55 $\mu\text{m}/\text{min}$ *

Sumber: Clark dan Vignjevic (2015); *Yan dan Irimia (2014)

2.3.2 Komponen migrasi sel kanker

Migrasi sel mempunyai serangkaian komponen proses, yang seringkali diregulasi oleh efektor yang sama tanpa memandang tipe sel dan cara migrasi. Proses ini termasuk polarisasi, protrusi, adhesi, translokasi badan sel, dan retraksi bagian belakang sel.

A. Polarisasi sel

Polarisasi sel merujuk pada kecenderungan sel metastatik memiliki pengaturan bagian depan dan belakang sel yang stabil, dibanding sel epitel yang polarisasinya basal dan luminal. Polarisasi diinduksi dan muncul dalam lingkungan yang menyediakan stimulasi arah. Stimulasi ini dapat berupa kemotaksik

(*chemoattractant* atau *morphogen*), haptotaksik (gradien konsentrasi substrat), mekanotaksik (putusnya kontak antar sel seperti pada luka), elektrotaksik, dan durotaksik (perbedaan sifat kelunakan MES), atau kombinasi beberapa stimulan. Bagian depan sel (*leading edge*) biasanya ditandai oleh polimerisasi aktin secara aktif yang menghasilkan protrusi dan adhesi pada substratum. Bagian belakang sel (*trailing/rear edge*) ditandai oleh bundel aktin yang stabil, serta pelepasan dan penguraian adhesi (Ridley *et al.*, 2003).

B. Protrusi

Protrusi adalah pembentukan penonjolan membran secara *de novo*, searah dengan arah migrasi yaitu pada *leading edge* (Murphy dan Courtneidge, 2011). Pembentukan protrusi erat hubungannya dengan 'pelebaran sel' (*cell spreading*). Sel dapat melebar secara isotropik yaitu memipih pada permukaan, atau secara anisotropik yaitu melalui pembentukan perpanjangan membran secara asimetrik ke berbagai arah. Saat densitas *ligand* menurun, pelebaran secara anisotropik lebih dipilih, sedangkan saat densitas *ligand* mencukupi, pelebaran isotropik lebih dominan. Karena itu, saat sel butuh untuk 'mencari' *ligand* untuk berikatan, sementara *ligand* di media yang dilewatinya jarang, maka sel terpicu untuk membentuk penonjolan (Reinhart-King *et al.*, 2008).

Protrusi memiliki tiga komponen utama berupa ekspansi membran plasma, pembentukan rangka yang mendukung penonjolan membran, dan terbentuknya kontak dengan substratum sehingga menghasilkan traksi untuk perpindahan seluruh badan sel dan menyampaikan sinyal regulator polimerisasi aktin. Protrusi dibentuk oleh polimerisasi lokal aktin. Setidaknya terdapat empat jenis protrusi membran plasma yaitu lamellipodia, filopodia, podosome, dan invadopodia yang secara morfologi dan molekuler karakteristiknya berbeda (Murphy dan Courtneidge, 2011).

Tabel 2.3 Jenis protrusi berbasis aktin pada sel

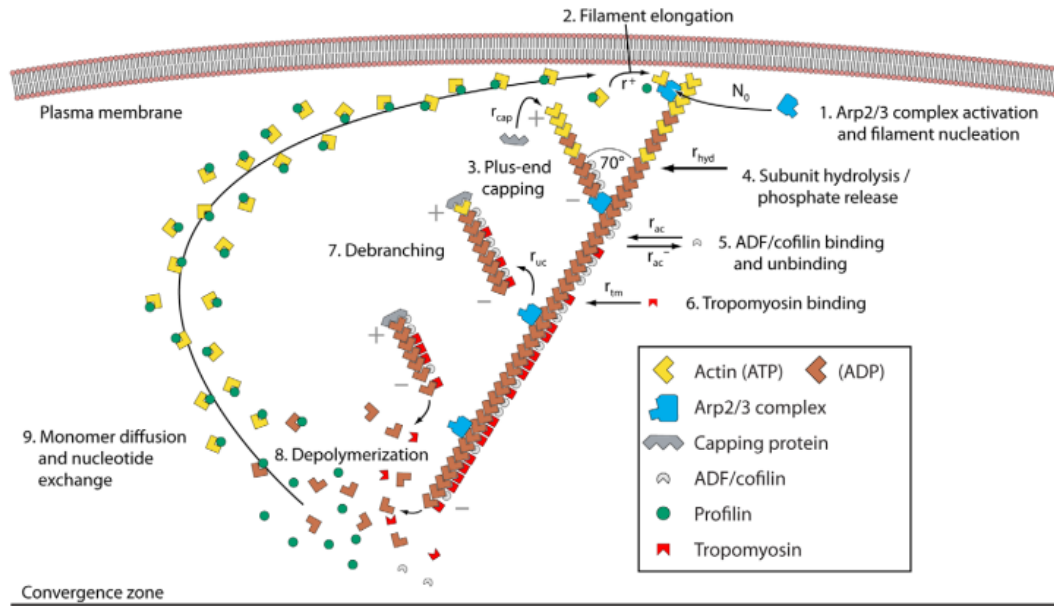
Karakteristik	Lamellipodia	Filopodia	Podosom	Invadopodia
Deskripsi	Tonjolan yang seperti lembaran, melekat di permukaan	Proyeksi seperti jari	Inti kaya aktin yang dikelilingi oleh cincin yang berhubungan dengan aktin dan protein persinyalan	Idem podosom
Lokasi	<i>Leading edge</i> sel	Biasanya di area lamellipodia	Permukaan ventral sel, sering terkumpul di belakang <i>leading edge</i> sel	Permukaan ventral sel, sering berlokasi di bawah nukleus
Dimensi tonjolan	Lebar 0,1 – 0,2 μm	Lebar 0,2 – 0,3 μm Panjang 3 – 10 μm	Lebar 0,5- 2 μm Panjang > 2 μm	Lebar 0,5- 2 μm Panjang > 2 μm
Pengaturan aktin	Filamen aktin yang bercabang	Bundel filamen aktin paralel	Filamen aktin yang bercabang dan tidak bercabang	Filamen aktin bercabang pada permukaan sel dan filamen aktin tidak bercabang sepanjang ujung protrusi
Keterlibatan lipid	PtdIns(4,5)P	PtdIns(4,5)P PtdIns(3,4)P	PtdIns(3,4)P	PtdIns(3,4)P, PtdIns(3)P, <i>Lipid raft</i> (caveolin 1)
Ketergantungan terhadap mikrotubulus	Menginduksi ekstensi lamellipodia	Regulasi densitas filopodium pada area yang kaya lamellipodium	Dibutuhkan untuk elongasi dan/atau pembentukan	Idem podosom
Proteolisis periseluler	Minimal	Tidak	Ya, melalui MTMMP dan UPAR	Ya, melalui MMP2, MMP9, MTMMP1, seprase, UPAR, ADAM12, ADAM15, dan ADAM19
Durasi struktur	Menit	Menit	Menit	Jam
Fungsi	Menyediakan permukaan luas untuk menghasilkan traksi pada migrasi ke depan	Sebagai alat mekanosensoris dan eksplorasi	<i>Remodelling</i> MES terutama melalui protease	

(Sumber : Murphy dan Courtneidge, 2011)

Polimerisasi aktin terjadi melalui nukleasi filamen baru serta kesediaan dan penambahan monomer baru. Komplek *actin-related protein* (Arp) 2/3 merupakan suatu heptamer molekuler yang melekatkan diri pada bagian samping filamen aktin

yang sudah ada dan melakukan nukleasi polimerisasi aktin *de novo* pada sudut tertentu. Hal ini penting untuk pembentukan percabangan pada lamellipodia, dan juga penting pada pembentukan bagian dasar filopodia, podosome, dan invadopodia. Ketersediaan monomer terjadi melalui pemutusan filamen lama oleh cofilin, suatu protein pemutus filamen aktin. Pemanjangan bagian ujung positif (*barbed end*) filamen aktin dilakukan oleh formin dibantu oleh profilin, yang melekat pada ujung positif tersebut dan mempolimerisasi monomer aktin. Pengaturan pemanjangan aktin dilakukan melalui kerja sama berbagai protein seperti NWASP dan cortactin (Friedl dan Wolf, 2003) (gambar 2.5).





Gambar 2.5 Rangkaian proses *treadmiling* aktin.

Keterangan: Filamen aktin dinukleasi oleh kompleks protein Arp2/3 (diaktivasi oleh protein WASP/Scar yang berhubungan dengan membran) sebagai cabang dari filamen yang sudah ada, di dekat membran plasma (1). Hal ini menyebabkan aktin mendorong membran ke depan melalui penambahan monomer aktin pada ujung positifnya (2). Pertumbuhan filamen menurun setelah terjadi *capping* pada ujung positif (3). Filamen menua melalui hidrolisis ATP yang terikat pada tiap subunit dan diikuti pelepasan fosfat, sehingga subunit ATP-F-aktin berubah menjadi ADP-F-aktin (4). ADP/cofilin (5) dan tropomyosin (6) berkompetisi untuk berikatan dengan subunit ADP. Ikatan oleh tropomyosin bersifat *irreversibel*, sedangkan ADP/cofilin dapat lepas bila terdeaktivasi, misalnya oleh LIM kinase. Setelah *debranching* (pelepasan ujung negatif dari kompleks ARP2/3, (7)), filamen mengalami depolimerisasi pada ujung minusnya (8). Filamen aktin yang memanjang hingga ke 'zona konvergen' di bagian belakang mengalami depolimerisasi secara aktif. Monomer aktin menyebar ke *leading edge* (9), dan bertemu dengan profilin yang mengembalikan kemampuan polimerisasi monomer tersebut dengan mengkatalisis pertukaran ADP-ATP (Sumber : Stuhrman *et al.*, 2011)

C. Adhesi

Adhesi terhadap MES terjadi terutama melalui reseptor integrin. Integrin merupakan superfamili reseptor heterodimer yang berikatan dengan *ligand* MES atau reseptor pasangannya pada sel lain. Ikatan integrin dengan *ligand* memicu jaras persinyalan yang mengatur protrusi, serta menghubungkan MES dan sitoskeleton aktin sehingga menyediakan traksi untuk migrasi. Adhesi biasanya terbentuk pada area yang terbatas, berkisar dari bentuk kecil dan seperti titik (*nascent adhesion* atau kompleks fokal) hingga besar dan memanjang (*focal*

adhesion). Bentuk, ukuran, dan fungsi adhesi bervariasi tergantung pada lokasi subseluler dan tipe sel. Adhesi yang dekat dengan *leading edge*, misalnya pada lamellipodia atau pada sel yang bergerak cepat, cenderung berukuran kecil dan secara aktif memicu pembentukan dan polimerisasi aktin dengan cepat. Sedangkan adhesi yang terletak lebih jauh dari *leading edge* cenderung berukuran besar, lebih stabil dan terkait dengan bundel filamen aktin yg besar. Lebih dari 200 molekul berkontribusi pada adhesi. Beberapa adhesi terorganisasi dalam kompleks persinyalan yang mengandung kinase dan protein adaptor yang bekerja dengan cara mengundang komponen persinyalan lain untuk bekerja sama. Paxilin dan FAK adalah dua komponen adhesi yang penting. Keduanya mengatur kerja Rho-GTPase yang merupakan pelaku utama persinyalan dalam migrasi sel (Friedl dan Wolf, 2003).

D. Regulasi dan integrasi

Proses migrasi diregulasi oleh jejaring persinyalan yang diawali terutama oleh integrin. Regulasi terjadi melalui sinyal lokal dan sementara, yang menjaga polaritas sel dan mendorong proses lokal seperti polimerisasi aktin, adhesi, pembentukan bundel *actomyosin*, dan dinamika mikrotubulus. Dalam regulasi ini, pengorganisasian dilakukan melalui rangka persinyalan besar yang melibatkan beberapa protein adaptor multidomain, yang berperan melokalisasi dan mengaktifasi kinase dan fosfatase. Protein adaptor yang paling banyak dipelajari adalah paxillin dan FAK (Devreotes dan Horwitz, 2015).

E. Translokasi badan sel dan retraksi bagian belakang sel

Translokasi badan sel didorong oleh koordinasi kontraksi *actomyosin* yang mekanismenya belum dipahami dengan baik. Myosin II dan motor mikrotubulus (misalnya dynein) juga mengontrol translokasi nukleus. Retraksi bagian belakang sel (*rear end*) membutuhkan koordinasi kontraksi sitoskeleton aktin dan

penguraian adhesi pada belakang sel. Beberapa mekanisme memicu penguraian adhesi yaitu kontraksi *actomyosin* yang menghasilkan daya melawan adhesi sehingga adhesi tercabut, penguraian adhesi yang diinduksi oleh mikrotubulus, endositosis integrin, dan pemecahan proteolitik protein *focal adhesion* yang menghubungkan integrin dengan aktin, oleh calpain (Ananthkrishnan dan Ehrlicher, 2007).

2.3.3 Siklus motilitas sel kanker

Secara umum pergerakan sel pada 2D terjadi dalam model lima langkah yang diajukan oleh Friedl dan Wolf (2003) (gambar 2.6). Saat sel bergerak secara tiga dimensi dalam jaringan, sel melakukan *remodeling* MES dengan menggunakan proteolitik.

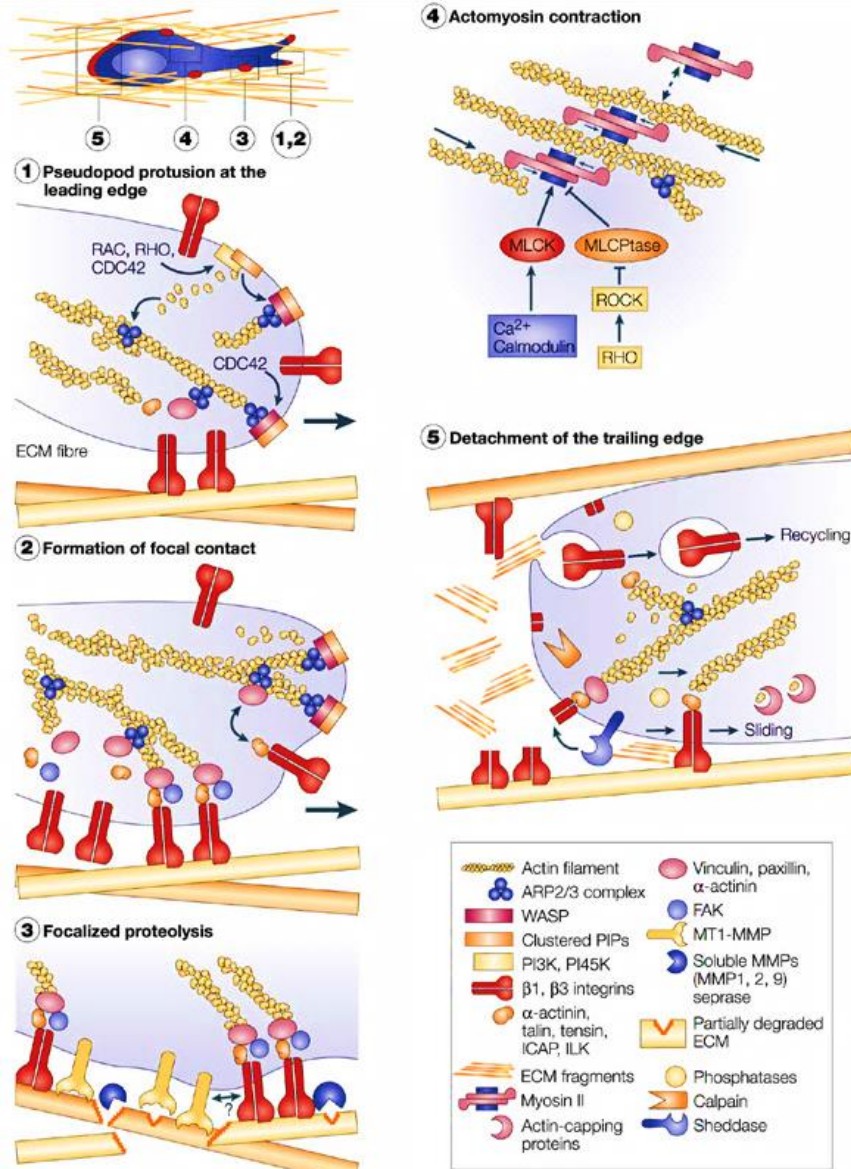
- a) Langkah pertama yaitu protrusi tepi depan (*leading edge*). Filamen aktin yang memanjang terhubung dengan protein adaptor dan mendorong membran sel ke arah luar. Aktin berpolimerisasi dengan berpasangan ke kompleks nukleasi aktin Arp2/3, yang terikat ke *Wiscott–Aldrich syndrome protein* (WASP). Kompleks Arp2/3-WASP terhubung ke bagian dalam membran plasma melalui kluster phosphoinositol (PIPs). Protein Arp2/3 juga berinteraksi di lateral dengan filamen aktin dan menginduksi percabangan dari filamen yang sudah ada ke jejaring aktin. PIP juga berikatan dan mengaktivasi *guanine-nucleotide exchange factors* (GEFs) yang meregulasi aktivitas GTPase Rac, CDC42, dan Rho, serta RAS. Pada satu jalur CDC42 berikatan dengan WASP dan PIPs, yang mengaktifkan WASP dan karenanya menginduksi filopodia dan pemanjangan pseudopodia. Reseptor kemokin dan faktor pertumbuhan mengaktifkan *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) dan *phosphatidylinositol 4,5-kinase*

(PI45K) yang merupakan enzim pemicu sintesis PIPs, dan lebih lanjut mengaktifkan Rac, CDC42, dan Rho.

- b) Interaksi sel-MES dan pembentukan kontak fokal. Integrin melakukan kontak dengan *ligand* pada MES dan mengelompok pada membran sel. Kluster integrin merekrut protein adaptor dan persinyalan melalui domain intraseluler-nya, sehingga terjadi fosforilasi dan defosforilasi ke dalam sel (persinyalan *outside in*). Ujung domain sitoplasmik integrin berinteraksi langsung dengan alpha-aktinin, talin, FAK dan tensin. Semua protein ini dapat berikatan dengan protein adaptor melalui SH2, SH3, atau *proline-rich domain*, untuk kemudian merekrut protein pengikat aktin (vinculin, paxillin, dan alfa aktinin) dan juga molekul regulator (PI3K dan Rho) ke kontak fokal. Hubungan antara kompleks aktin/Arp2/3 dan terbentuknya kontak fokal difasilitasi oleh vinculin. Pembentukan kontak fokal secara langsung dan tidak langsung diinduksi oleh berbagai jalur persinyalan, seperti PI3K aktif, protein kinase C (PKC) dan Rho (persinyalan *inside out*).
- c) Perekrutan protease permukaan sel ke kontak MES dan proteolisis fokal. Protease permukaan menjadi terkonsentrasi di dekat lokasi ikatan substrat. Di dekat permukaan sel, protease memecah komponen MES seperti kolagen, *fibronectin*, dan laminin, serta pro-MMPs, menghasilkan MMPs aktif. MMP1 dan kolagenase lain memecah kolagen dan makromolekul MES lain, menjadi fragmen yang lebih kecil, yang kemudian didegradasi oleh gelatinase (MMP2 dan MMP9) atau serin protease.
- d) Kontraksi sel oleh actomyosin. Perpindahan sel yang sesungguhnya membutuhkan kekuatan tarikan yang berasal dari kontraksi *stress fibers*. Rho-GTPase mengaktifasi ROCK yang kemudian menon-aktifkan *myosin-light-chain phosphatase* (MLCP). MLCP menyebabkan defosforilasi *myosin II light chain* (MLC2). *Myosin-light-chain kinase* (MLCK) mempunyai efek

antagonis yaitu memfosforilasi MLC2 dan ROCK dapat langsung memfosforilasi MLC2. Bila MLC2 terfosforilasi (P-MLC2), aktivitas *myosin II ATPase* meningkat, dan myosin II terlibat lebih efisien dalam interaksinya dengan filamen aktin, dan akhirnya meningkatkan kontraktilitas sel. Cara lain regulasi kontraktilitas sel adalah melalui persinyalan Cdc42, yang bekerja melalui efekturnya, *myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase* (MRCK), yang bekerja menginhibisi MLCP.

- e) Pelepasan perlekatan pada tepi ekor. Pada tepi ekor/belakang, pembongkaran kontak fokal terjadi melalui beberapa mekanisme. Protein pengikat dan pemutus aktin (misalnya gelsolin dan cofilin) menjadi tutup filamen aktin dan menyebabkan aktin terburai, sehingga terjadi *turnover* filamen. Fosfatase membatasi pembentukan protein sitoskeletal. Protease sitoplasmik calpain memotong komponen kontak fokal termasuk talin dan ekor dari integrin $\beta 1$ dan $\beta 3$. Fosforilasi FAK menyebabkan pembongkaran kontak fokal, melalui interaksi dengan Grb2 sehingga terjadi perekrutan dynamin. Defosforilasi dynamin dan ekstensi mikrotubulus ke kontak fokal diperlukan untuk internalisasi integrin sehingga terjadi pembongkaran kontak fokal (Nagano *et al.*, 2012). Kontak fokal diperlemah juga melalui pemecahan proteolitik reseptor adhesi *shedase*, dan akumulasi fragmen kolagen yang terbentuk saat sel bergerak maju. Setelah membongkar kontak fokal, integrin melepaskan diri dari substrat dan diinternalisasi melalui vesikel endositik untuk didaur ulang ke arah tepi depan, atau disimpan di substrat.



Nature Reviews | Cancer

Gambar 2.6 Model lima langkah migrasi sel.

Keterangan : Migrasi sel adalah proses yang terdiri dari beberapa langkah yang menghasilkan translokasi sel yang dikendalikan aktin. Langkah dasarnya berdasarkan migrasi haptokinetik dua dimensi, yang sebenarnya kurang mewakili hambatan fisik pada pergerakan tiga dimensi. Setelah pembentukan protrusi pada *leading-edge* (langkah I) dan pembentukan interaksi dengan substrat yang dimediasi integrin (langkah II), pemecahan MES terfokus pada barrier MES beberapa mikrometer dari *leading edge* (langkah III). Kontraksi sel yang dimediasi aktomyosin (langkah IV) berlanjut dengan kontraksi bagian belakang sel dan pergeseran badan sel dan nukleus ke arah depan (langkah V). (Sumber: Friedl dan Wolf, 2003)

Berbeda dengan migrasi mesenkimal, migrasi amoeboid mengandalkan *actomyosin cortical* untuk menghasilkan kekuatan gerak. Aktin submembran

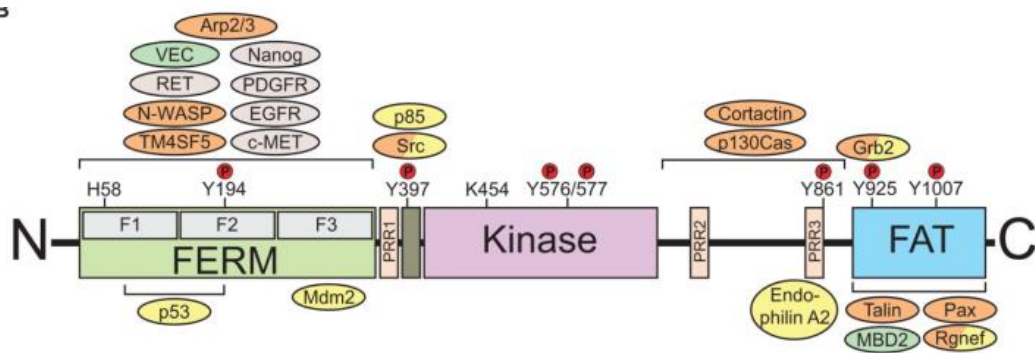
melekat pada membran dengan perantara protein superfamili 4.1 *band* yaitu *ezrin*, *radixin*, dan *moesin*. Sinyal Rho/Rock menjaga kontraktilitas *actomyosin cortical* yang terikat membran, sehingga menjaga ketegangan sel. Tekanan hidrostatis intrasel menyebabkan pelepasan jejaring *actomyosin* dari membran atau ruptur *actomyosin cortical* dan pembentukan herniasi membran berbentuk sferis yang disebut bleb membran (Maugis *et al.*, 2010).

Perbedaan dasar antara pembentukan lamellipodia pada motilitas mesenkimal dan *blebbing membrane* adalah *bleb* dibentuk oleh aliran sitoplasma, sehingga gaya pendorong pembentukannya bukan polimerisasi aktin seperti pada lamellipodia. Peningkatan tekanan hidrostatis disebabkan oleh peningkatan akumulasi *actomyosin* kontraktil di *cortex* posterior atau penurunan *cortex-membrane linking proteins* pada tepi sel dan pembongkaran lokal aktin (Fackler dan Grosse, 2008). Segera setelah bleb terbentuk, *actomyosin* di bawah membran kembali seperti semula dan bleb akan diretraksi atau digunakan untuk translokasi lebih jauh. Pergerakan amoeboid ini tidak memerlukan pembentukan kontak integrin-MES, dan tidak memerlukan proteolitik MES. Peran Rho/ROCK selain untuk menjaga kontraktilitas sel dan perubahan bentuk, juga untuk memberi gaya yang cukup besar sehingga dapat mengubah struktur MES (Wyckoff *et al.*, 2006; Mierkea *et al.*, 2008).

2.3.4 Peran FAK pada migrasi sel kanker payudara

Focal adhesion kinase merupakan tirosin kinase non-reseptor 125 kDa. FAK berfungsi sebagai protein adaptor untuk merekrut protein *focal adhesion* lain dan regulasinya. FAK juga terlibat dalam regulasi sejumlah proses seluler, termasuk pelebaran sel, migrasi, invasi, dan proliferasi. Gen *fak* manusia atau dikenal juga sebagai *ptk2*, diidentifikasi pada kromosom 8q24 (Yoon *et al.*, 2015). FAK mempunyai tiga domain utama yaitu domain N-terminal FERM (*band* 4.1,

ezrin, radixin, moesin homology), domain sentral kinase, dan domain C-terminal yang mengandung *sequence focal adhesion targeting* (FAT) dan dua regio-kaya prolin (Hall *et al.*, 2011) (gambar 2.7).



Gambar 2.7 Struktur domain FAK dan lokasi fosforilasi.

Keterangan: FAK terdiri dari domain FERM kinase, karboksi-terminal yang mengandung rangkaian FAT, dan dua regio prolin yang berikatan dengan domain SH3 pada protein target. FAK memiliki beberapa lokasi fosforilasi termasuk Y397, Y407, Y576/577, Y861, dan Y925 (Sumber: Sulzmaier *et al.*, 2014)

2.3.4.1 Aktivasi dan fungsi FAK

Focal adhesion kinase diaktivasi dan difosforilasi tidak hanya oleh ikatan integrin-MES, tetapi juga melalui respon seluler lain sebagai akibat stimulus ekstrasel, misalnya EGF (Eberwein *et al.*, 2015), IGF (Kongsiang *et al.*, 2001), HGF (Harrison *et al.*, 2013), dan TGF beta (Mandel *et al.*, 2013); sitokin misalnya IL-6 (Huang *et al.*, 2016), TNF alfa (Wu dan Zhou, 2010), NFκB (Smith *et al.*, 2014); hipoksia (Nagelkerke *et al.*, 2013) dan MES yang lunak (Gu *et al.*, 2014). Lokasi Y397 merupakan tempat autofosforilasi pada FAK yang terjadi setelah bertautan dengan integrin. Fosforilasi Y397 juga dibutuhkan untuk interaksi dengan domain SH2 pada berbagai protein, termasuk *Src family of protein tyrosine kinase* (SFK) (Marlowe *et al.*, 2019), pengaturan subunit *phosphoinositide (PI) 3-Kinase*, p85, *Src homologous and collagen-like protein* (Shc), *growth factor receptor bound protein 7* (Grb7), dan *phospholipase C gamma* (PLCγ) (Golubovskaya, 2010).

Perekrutan Src ke FAK yang telah terfosforilasi pada Y-397 akan berlanjut dengan fosforilasi residu tirosin lain pada FAK, oleh Src. Fosforilasi pada Y576 dan Y577 yang berlokasi pada domain kinase, diperlukan untuk aktivitas katalitik FAK (Marlowe *et al.*, 2019). Src juga memfosforilasi Y861 dan Y925 yang berlokasi pada FAK C-terminus. Fosforilasi Y861 memicu ikatan FAK dengan ekor sitoplasmik integrin $\alpha\beta 5$ sebagai respon terhadap stimulasi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Eliceiri *et al.*, 2002). Fosforilasi Y925 membentuk *binding-site* untuk Grb2-SH2 dan selanjutnya mengaktifkan jalur Ras/*mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Mitra *et al.*, 2006). Selain itu, ikatan Grb2 – Y925 juga memicu perekrutan dynamin ke *focal adhesion*, yang diperlukan untuk penguraian *focal adhesion* (Ezratty *et al.*, 2005). Pada FAK juga terdapat lokasi fosforilasi terhadap serine (S732, S840, S843 dan S910) dalam domain C-terminal. Walaupun belum diketahui dengan pasti, terdapat bukti fosforilasi residu serine berhubungan dengan inaktivasi FAK saat mitosis (Ma *et al.*, 2001).

Selain berperan sebagai tirosin kinase, FAK juga berfungsi sebagai protein *scaffolding* atau 'rangka', yang merupakan istilah untuk protein yang mendekatkan dan mengikat beberapa protein lain untuk memfasilitasi interaksi dan fungsi protein-protein tersebut. Fungsi *scaffolding* FAK setelah autofosforilasi pada Y397 dan perekrutan Src adalah Src secara efisien memfosforilasi beberapa molekul sinyal di lokasi lain FAK. Domain C-terminal FAK mempunyai sejumlah lokasi interaksi antar protein, termasuk dua regio kaya prolin, yang berfungsi sebagai lokasi ikatan beberapa protein yang mengandung domain SH3, termasuk protein adaptor p130Cas, Protein spesifik RhoA pengativasi protein *GTPase regulator associated with FAK* (Graf), *ARF-GAP containing SH3, ANK repeats, and PH domain ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1* (ASAP1), dan endophilin A2. Interaksi FAK dengan molekul sinyal yang berbeda ini memicu jalur

persinyalan yang bervariasi, yang meregulasi pelebaran, adhesi, migrasi, invasi, survival, dan proliferasi sel (Luo dan Guan, 2011).

Tabel 2.4 Domain fungsional dan lokasi fosforilasi FAK

Domain	Lokasi fosforilasi	Fungsi	Referensi
FERM	Y397	Kunci autofosforilasi, sebagai respon terhadap adhesi yang dimediasi integrin. Berikatan dengan domain SH2 dari Src, Fyn, dan kinase keluarga Src lain.	(Hanks dan Polte, 1997; Parsons, 2003)
Protein kinase	Y407	Mungkin merekrut protein dengan domain SH2 yang berikatan ke phosphopeptida dengan Pro pada 3 posisi (misal c-CRK, Nck, dan c-Abl). Meregulasi aktivitas FAK secara negatif	(Hanks dan Polte, 1997)
	Y576 Y577	Lokasi utama fosforilasi FAK oleh Src. Berperan penting dalam interaksi dengan <i>Crl-associated substrate</i> (p130Cas)	
Proline-rich	S722	Kompetisi antara GSK3 β dan PPI pada S722 meregulasi FAK saat spreading dan migrasi.	(Bianchi <i>et al.</i> , 2005)
	S732	Diregulasi oleh Cdk5, yang mempengaruhi organisasi mikrotubulus dan pergerakan nukleus pada migrasi neuronal dan sentrosom saat mitosis. Juga difosforilasi oleh <i>Rho-dependent kinase</i> pada sel endotel.	(Xie <i>et al.</i> , 2003; LeBoeuf <i>et al.</i> , 2006; Park <i>et al.</i> , 2009)
	Y861	Mungkin merekrut protein dengan domain SH2 yang berikatan dengan phosphopeptida dengan residu hidrofobik pada posisi +3. Fosforilasinya mungkin meningkatkan fosforilasi pada Y397.	(Hanks dan Polte, 1997; Parsons, 2003)
FAT	Y881	Lokasi ikatan yang potensial untuk c-Abl dan Grb-2.	(Zrihan-Licht <i>et al.</i> , 2004)
	S910	Difosforilasi oleh ERK5 dan defosforilasi oleh PP1 δ .	(Villa-Moruzzi, 2007)
	Y925	Meregulasi <i>turn over/disassembly focal adhesion</i> , peningkatan protrusi sel melalui aktivasi p130CAS/Dock180/Rac1 <i>signaling pathway</i>	(Deramaut <i>et al.</i> , 2011)

Berbagai bukti menunjukkan peran positif FAK dalam migrasi sel melalui beberapa rekan persinyalan. FAK melalui domain FERM dapat berikatan langsung dan mengaktifasi kompleks *actin-related protein 2/3* (Arp2/3), yang kemudian bekerja membentuk percabangan filamen aktin. Penghambatan FAK menyebabkan perubahan bentuk lamellipodia yang merupakan struktur penting

penetapan polaritas, sehingga FAK diduga berhubungan erat dengan regulasi polaritas sel (Serrels *et al.*, 2010). Selain itu, FAK menstimulasi migrasi sel melalui modulasi langsung protein yang terlibat dalam *re-modelling* aktin, termasuk subfamili Rho GTPase dan *Neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein* (N-WASP). Misalnya, FAK berikatan dengan N-WASP dan mengatur fungsinya melalui lokalisasi subseluler. Kemudian N-WASP mengaktifkan kompleks Arp2/3 untuk menginduksi polimerisasi aktin (Wu *et al.*, 2004).

Dalam proses invasi, FAK berperan penting meregulasi ekspresi dan aktivasi matriks metalloproteinase (MMP)2, MMP9, dan *membrane type 1* (MT1) – MMP (Wang dan McNiven, 2012). FAK memicu peningkatan ekspresi MMP9 dan MMP2 melalui jaras sinyal Src/p130Cas/Dock180, yang kemudian menginduksi aktivasi Rac dan *c-Jun NH2-terminal kinase* (JNK). Aktivasi Rac dan JNK memediasi transkripsi beberapa gen, termasuk gen MMP (Hsia *et al.*, 2003). Overekspresi MT1-MMP didapatkan pada berbagai tumor. Walaupun podosome merupakan lokasi utama degradasi MES, tetapi proses ini juga terjadi pada *focal adhesion* yang bersifat *MT1-MMP dependent*. MT1-MMP ditransport ke *focal adhesion* melalui pembentukan kompleks MT1-FAK-p130Cas yang diregulasi oleh fosforilasi MT1 oleh Src (Wang dan McNiven, 2012). Hambatan FAK terhadap invasi juga diduga berhubungan dengan regulasi ekspresi *urokinase-type plasminogen activator* (uPA), yang merupakan serine proteinase plasmin pendegradasi berbagai komponen MES dan protein membran basalis (Mitra *et al.*, 2006).

2.3.4.2 Focal adhesion kinase dan kanker payudara

Kemungkinan hubungan FAK dengan kanker payudara diidentifikasi oleh Owens *et al.*, (1995) melalui analisis *Northern* dan *Western blotting* yang menunjukkan level mRNA dan protein FAK meningkat signifikan pada spesimen

kanker payudara metastatik dibanding jaringan normal. Analisis imunohistokimia menunjukkan ekspresi FAK minimal pada epitel mammae *benign* tetapi ekspresinya meningkat pada DCIS, yang memunculkan dugaan overekspresi FAK tidak hanya pada fenotip invasif tetapi juga pada fase awal karsinogenesis payudara (Oktay *et al.*, 2003). Peningkatan ekspresi dan aktivitas FAK pada kanker payudara berhubungan dengan prognosis buruk dan perkembangan metastasis (Pylayeva *et al.*, 2009).

Mekanisme molekuler yang menyebabkan peningkatan ekspresi FAK pada kanker payudara masih belum jelas. Analisis pada promotor gen fak mengidentifikasi p53 sebagai represor dan NfκB sebagai aktivator promotor, sehingga ekspresi *aberrant* atau mutasi pada p53 mungkin meningkatkan ekspresi FAK pada kanker payudara (Golubovskaya *et al.*, 2008).

Focal adhesion kinase memicu invasi pada sel kanker payudara AU-565 sehingga dapat menerobos satu lapisan endotel, dan menghambat ekspresi FAK oleh siRNA atau hambatan lokalisasi FAK oleh FRNK menghambat migrasi trans-endotelial. Fosforilasi Y397 pada FAK memicu ekstravasasi sel AU-565 (Earley dan Plopper, 2008). Pada CTCs kanker payudara yang sitokeratin positif diidentifikasi FAK terfosforilasi, PI3K terfosforilasi, dan organisasi aktin yang terganggu, yang mendukung aktivasi sinyal FAK pada malignansi dan metastatik sel kanker payudara (Kallergi *et al.*, 2007).

Sel kanker payudara yang defisiensi FAK menunjukkan pembentukan ekstra invadopodia tetapi bentuk *focal adhesion*nya besar dan lebih melekat, sehingga pergerakan sel menjadi lebih lambat (Chan *et al.*, 2009). Selain itu, tanpa adanya FAK, protein yang terfosforilasi pada residu tirosin termasuk Src bergerak menuju invadopodia dan bukan ke *focal adhesion*. Hal ini mendukung FAK sebagai koordinator dinamika antara invadopodia dan *focal adhesion*. Seperti pada beberapa jenis kanker lain, pada kanker payudara FAK berperan menginduksi

MMP2 dan MMP9 melalui persinyalan yang dimediasi integrin $\alpha 5\beta 1$ (Sena *et al.*, 2015; Ganguly *et al.*, 2012).

2.3.5 Peran Rac-1 pada migrasi sel kanker payudara

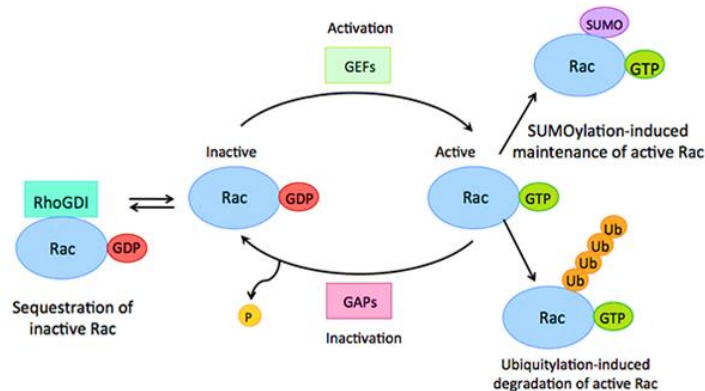
Keluarga *Rho-GTPase* pertama kali teridentifikasi memiliki peran dalam migrasi sel sekitar 20 tahun yang lalu. Berbagai penelitian secara *in vitro* dua dimensi dan tiga dimensi, serta *in vivo* menguatkan bukti peran berbagai jenis *Rho-GTPase* pada migrasi sel. Sampai saat ini teridentifikasi 20 gen *Rho-GTPase*. Kebanyakan *Rho-GTPase* aktif dan menstimulasi target *downstream*-nya saat berikatan dengan GTP, dan tidak aktif saat berikatan dengan GDP. *Rho-GTPase* diaktifkan oleh *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) yang menginduksi pertukaran GDP ke GTP, dan di-nonaktifkan oleh *GTPase-activating proteins* (GAPs) yang mengkatalisis hidrolisis GTP ke GDP (gambar 2.8). Jenis *Rho-GTPase* yang paling dipahami adalah Rho, Rac, dan Cdc42, yang merupakan anggota yang paling tinggi kelestariannya di antara spesies eukariotik. Protein ini berperan dalam migrasi sel pada seluruh model hewan yang diuji (Ridley, 2015).

2.3.5.1 Aktivasi dan fungsi Rac-1

Regulasi dinamika sitoskeleton penting untuk mempertahankan morfologi, polaritas, adhesi dan migrasi seluler (Bustelo *et al.*, 2007). Peran utama Rac adalah mengatur organisasi sitoskeleton, berupa penyusunan aktin yang diperlukan untuk pembentukan lamellipodia dan *membrane ruffle*. Kontrol pengaturan sitoskeleton melalui Rac melibatkan dua mekanisme berbeda. Pertama melalui aktivasi Arp2/3 yang berperan dalam polimerisasi aktin melalui aktivasi WAVE/Scar secara tidak langsung. WAVE dapat diaktifasi melalui penguraian kompleks Rac-Nap1-PIR121 atau aktivasi IRSp53 (Seutsugu *et al.*, 2006). Mekanisme kedua reorganisasi sitoskeleton oleh Rac adalah melalui *p21-*

activated kinase (PAK). PAK memiliki *GTPase binding domain (GBD) N-terminal* yang dapat berikatan dengan Rac-GTP atau Cdc42-GTP, dan domain *serine/threonine kinase C-terminal*. Ikatan Cdc42 atau Rac aktif ke domain GBD PAK melepaskan autoinhibisi dan meningkatkan aktivitas kinase. Pak1 memberi efek ke organisasi sitoskeleton melalui fosforilasi berbagai protein, termasuk *LIM kinase (LIMK)*, *myosin light cain kinase (MLCK)*, *cortactin*, dan subunit Arpc1b dari kompleks Arp2/3 (Vadlamudi *et al.*, 2004).

Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac) juga mengontrol beberapa fungsi tambahan, termasuk regulasi siklus sel, endositosis, dan fagositosis (Thiel *et al.*, 2002). Rac juga terlibat dalam *integrin mediated adhesion*. Rac1 terlibat dalam aktivasi p38, mengaktifkan MKK3/6-p38MAPK, dan memediasi invasi oleh H-Rac pada sel epitelial mamaria (Shin *et al.*, 2008). Rac1 bekerjasama dengan Raf-1 untuk mengaktifkan jaras Erk (Zugasti *et al.*, 2001). Efektor *downstream* Rac1 dapat memodulasi besarnya respon Rac1 melalui mekanisme umpan balik (Zuluaga *et al.*, 2007) (gambar 2.9).



Gambar 2.8 Mekanisme regulasi aktivitas Rac.

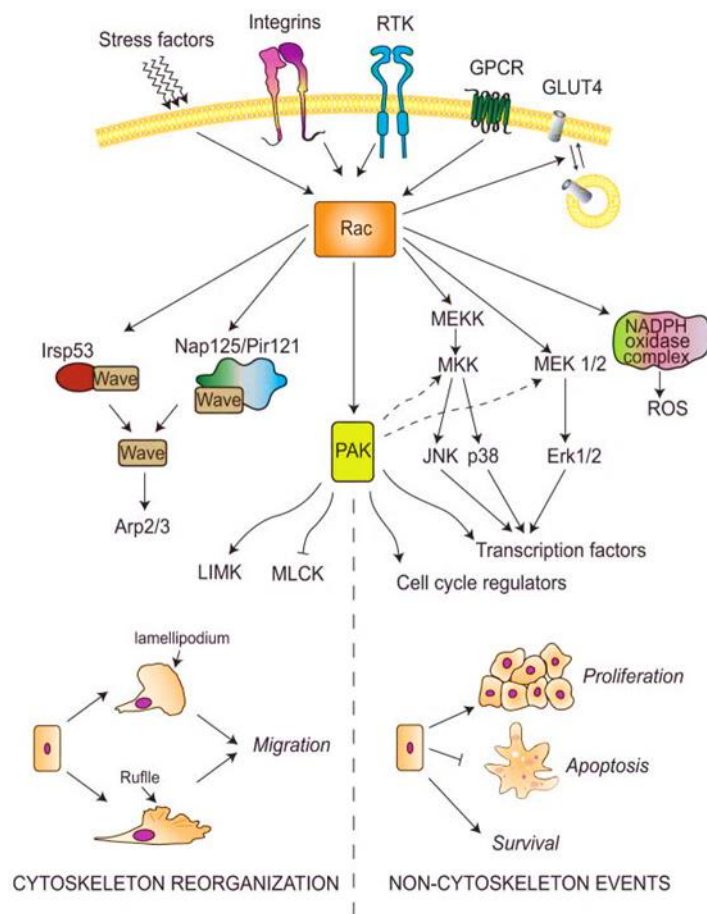
Keterangan: Rac bersiklus antara fase non-aktif (berikatan dengan GDP) dan aktif (berikatan dengan GTP). Aktivasi Rac difasilitasi oleh kerja GEFs (misalnya Tiam1), yang memicu pelepasan GDP dari Rac dan kemudian mengikat GTP. Melalui hubungan dengan GAPs, aktivitas GTPase dari Rac dipercepat sehingga menonaktifkan Rac. Hubungan Rac dengan Rho-GDIs menyebabkan Rac terisolasi dalam kondisi non aktif. Aktivasi Rac juga dapat dihilangkan melalui degradasi yang diinduksi ubiquitylasi (dimediasi oleh HACE1) atau dapat dipertahankan melalui modifikasi oleh SUMO (yang dimediasi PIAS3) (Sumber: Mack *et al.*, 2011).

Selain regulasi Rac dalam hal aktivasi, regulasi spasial aktivitas Rac juga berperan untuk mengontrol migrasi sel. Rac memicu lamellipodia agar terbentuk di *leading edge* dari sel sehingga sel dapat maju ke depan. Cdc42 berperan penting untuk membatasi Rac supaya hanya menginduksi lamellipodia di bagian depan sel. Hambatan aktivitas Cdc42 menyebabkan Rac membentuk lamellipodia di seluruh perifer sel karena hilangnya polaritas depan-belakang sehingga menghambat migrasi sel terarah (Nobes dan Hall, 1999). Penelitian lain menunjukkan peran persinyalan *syndecan-4* melalui PKC alfa untuk melokalisasi aktivitas Rac dan Rac menginduksi protrusi membran hanya di *leading edge* sel fibroblas. Pengaturan spasial ini juga tampak pada distribusi aktivitas Rac yang tinggi di dekat *leading edge* dan *membrane ruffle* (Kraynov *et al.*, 2000).

Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac) berperan dalam regulasi AF, yang harus diatur secara efisien supaya sel bergerak maju. Penyusunan dan penguraian AF yang kontinu dibutuhkan dalam pergerakan sel. Salah satu mekanisme *turn over* AF adalah melalui dinamika mikrotubulus (MT), yang membutuhkan aktivasi Rac untuk dapat bekerja (Rooney *et al.*, 2010).

Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac) dan Rho dapat bekerja secara bergantian untuk sel dapat menggunakan tipe pergerakan mesenkimal atau amoeboid (Parri dan Chiarugi, 2010). Sinyal Rac berperan penting untuk menentukan tipe pergerakan sel melalui regulasi terhadap fosforilasi MLC2 (San Moreno *et al.*, 2008). Hambatan Rac terhadap fosforilasi MLC2 menghambat pergerakan amoeboid tetapi memicu pergerakan mesenkimal. Sinyal dari ROCK mengaktifkan ARHGAP22, yang me-nonaktifkan Rac, sehingga MLC2 dapat terfosforilasi dan terjadi migrasi amoeboid. Selain itu DOCK3 yang merupakan aktivator Rac, membentuk kompleks dengan NEDD9, dan kemudian memicu aktivasi Rac melalui WAVE2. Sinyal ini dibutuhkan untuk menghambat fosforilasi MLC2 sehingga menekan pergerakan amoeboid, dan untuk pembentukan protrusi

membran berbasis aktin sehingga terjadi migrasi mesenkimal. Konsisten dengan hal ini, aktivitas Rac dihubungan dengan sekresi MMP (Parri dan Chiarugi, 2010). Tumor sel membutuhkan kedua jenis migrasi ini agar dapat metastasis secara efisien. Misalnya, migrasi mesenkimal dibutuhkan untuk menginvasi lingkungan yang kaku melalui kemampuan degradasi matrik dan membentuk jalan. Sedangkan migrasi amoeboid lebih cepat, dan mungkin dapat melindungi sel dari *shear stress* selama sirkulasi (San Moreno *et al.*, 2008).



Gambar 2.9 Peran Rac dalam reorganisasi sitoskeletal.

Keterangan : Rac diaktifkan oleh reseptor tirosin kinase (RTK), GPCR, integrin dan stress. Aktivasi Rac memicu perubahan yang berhubungan dengan pengaturan ulang sitoskeleton (kiri) dan respon lain (kanan) melalui berbagai mediator. Rac-GTP menginduksi aktivasi WAVE melalui Irs53 atau kompleks Nap125-PIR121. WAVE mengaktifkan Arp2/3, menghasilkan perubahan sitoskeleton aktin, yang diperlukan untuk pembentukan *ruffle* dan migrasi sel. Rac juga mengaktifkan PAK, yang kemudian mengaktifkan Arp2/3 dan LIMK (Sumber: Mack *et al.*, 2011).

2.3.5.2 *Ras-related C3 botulinum toxin substrate-1 (Rac1)* dan kanker payudara

Pada jaringan kanker payudara Rac1 di-overekspresi-kan atau hiperaktif. Selain itu, efektor Rac yaitu PAK1 juga hiperaktif dan/atau overekspresi pada 50% kanker payudara (Balasenthil *et al.*, 2004), dan ekspresi *kinase-dead PAK1 mutant* menurunkan kemampuan invasi MDA-MB-231 sedangkan mutan PAK aktif memicu migrasi dan invasi sel kanker *Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7)* (Vadlamudi *et al.*, 2000).

Pada kanker payudara ER (+), aktivasi PAK berhubungan dengan *erythroblastosis oncogene B2 (ErbB2)*. Aktivasi Rac-Pak1 oleh ErbB2 meningkatkan proliferasi dan aktivasi Erk, konsisten dengan peran Rac1/PAK1 dan induksi *cyclin D1*. Sebagai respon terhadap TGF- β , aktin dan aktinin direkrut ke ErbB2, yang kemudian ko-lokalisasi dengan GEF Vav2 untuk mengaktifkan Rac1 dan PAK1 pada protrusi sel. Karena ErbB2 sering kali overekspresi pada sejumlah kanker payudara, maka intervensi jaras persinyalan Rac1/PAK1 akan menghambat progresi kanker payudara (Mack *et al.*, 2011).

Ras-related C3 botulinum toxin substrate - guanine-nucleotide exchange factors (Rac-GEF) juga berperan dalam perkembangan kanker payudara. Penelitian awal menunjukkan hubungan antara ekspresi Tiam1 dan tingginya *grading* pada kanker payudara. Selain itu, sel kultur yang sangat metastatik seperti mDA-MB-231 mengekspresikan tingkat Tiam1 tinggi, sedangkan yang kurang invasif seperti MCF-7 dan SK-BR-3 mengekspresikan Tiam1 lebih sedikit. Tiam1 berikatan dengan protein sitoskeletal *ankryn* untuk menstimulasi migrasi dan invasi (Mack *et al.*, 2011).

2.4 Metastasis sebagai target terapi pada kanker payudara

Kanker payudara tergolong sebagai jenis kanker yang sensitif terhadap terapi, tetapi hanya sub grup pasien tertentu yang mencapai respon patologis

lengkap melalui kemoterapi standar yang saat ini tersedia, yang mengindikasikan perlunya mengembangkan pendekatan terapi baru yang lebih personal (Cristofanilli *et al.*, 2005; Caudle *et al.*, 2010). Pemahaman terhadap *cascade* metastasis dapat menjadi penuntun upaya penghambatan metastasis pada kanker payudara dan merupakan target terapi yang sangat potensial. Secara garis besar, Steeg mengategorikan target anti metastatik menjadi inhibisi *seeding*, induksi atau sitostatik sel dorman, dan inhibisi kolonisasi (Steeg, 2016).

Seeding, yang dalam hal ini didefinisikan mulai proses invasi sampai terjadi laten metastasis, membutuhkan karakteristik tertentu dari sel kanker yaitu berubahnya polaritas apikal-basal menjadi depan-belakang, kemampuan migrasi, kemampuan melisis matrik ekstraseluler, dan anoikis. Walaupun hambatan *seeding* pada kanker payudara kontroversial, tetapi bila upaya untuk mengidentifikasi marker metastasis laten dan mikrometastasis berhasil (Manzotti *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2012), kemungkinan untuk prevensi metastasis kanker payudara dapat diterapkan sejak fase inisiasi metastasis. Selain itu karakteristik yang dibutuhkan untuk *seeding* juga dibutuhkan untuk infiltrasi organ target dan *re-seeding* atau *cross seeding*, misalnya kemampuan degradasi MES dan motilitas sel (Gupta dan Massague, 2006; Klein, 2009; Van Zijl, Krupitza dan Mikulits, 2011; Wells *et al.*, 2013).

a) Hambatan transisi epithelial mesenkimal

Untuk mendapatkan sebagian besar dari karakteristik ini umumnya disepakati bahwa transisi epithelial-mesenkimal (TEM) merupakan tahapan awal yang harus dijalani sel kanker. TEM menghasilkan perubahan polaritas sel, kemampuan migrasi dan lisis matrik ekstraseluler. Dalam konteks inhibisi metastasis kanker payudara, TEM dieksplorasi sebagai target untuk dihambat (Wang dan Zhou, 2013). Supresi TEM melalui jaras reseptor tirosin kinase (RTK) seperti EGFR, ErbB dan *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) (Nieto,

2011) atau melalui jalar NOTCH dan Wnt (Liu *et al.*, 2013), dianggap sebagai pendekatan yang tepat. Tetapi efektivitas supresi TEM dalam menghambat metastasis pada kanker masih diperdebatkan karena beberapa alasan. TEM merupakan tahapan sementara dalam invasi dan metastasis. Mesenkim dapat berubah kembali menjadi epitel, diduga setelah melakukan ekstravasasi ke lokasi sekunder yang diistilahkan sebagai transisi mesenkimal epithelial (TME), sehingga mendapatkan kembali kemampuan proliferaatif dan kemampuan membentuk jaringan epitelial di lokasi sekunder (Thiery, 2002). Selain itu, sel kanker mungkin menggunakan mode motilitas lain melalui aktivasi transisi epitelial amoeboid, dan berubah menjadi morfologis sferis yang membolehkan mereka untuk menyelip di antara MES tanpa proteolisis ekstraseluler (Friedl dan Wolf, 2003). Dalam pergerakan kolektif, sel *follower* tetap mempertahankan karakteristik epitelialnya sedangkan sel *leader* tidak sepenuhnya berubah menjadi mesenkim dan mempertahankan marker epitelial dan mesenkimal (Prasad dan Montell, 2007).

Observasi klinis pada kanker payudara menunjukkan mayoritas metastasis kanker payudara mengekspresikan E-cadherin dan mempertahankan morfologi epitelialnya, yang mendukung hipotesis bahwa sel tersebut menyebar tanpa berubah ke fenotip mesenkimal (Tarin, 2005; Thompson dan Newgreen, 2005). Penelitian pada jenis kanker selain kanker payudara, *pancreatic ductal adenocarcinoma* dan kanker kulit menunjukkan bahwa invasi dan metastasis tetap terjadi walaupun TEM dihambat, dan bahkan meningkatkan proliferasi sel kanker (Yang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2015). Kanker payudara juga menunjukkan kecenderungan serupa dan dapat metastasis ke paru tanpa transisi ke mesenkim (Fischer *et al.*, 2015).

b) Hambatan degradasi MES

Inhibisi *seeding* juga dapat dilakukan pada properti sel metastatik dalam mengatasi hambatan motilitas oleh MES. Degradasi MES melibatkan enzim

proteolitik seperti *metallo-*, *aspartic-*, *cysteine-*, *serine-*, dan *threonine proteinase*, karena penyusun MES didominasi protein. Di antara berbagai enzim proteolitik tersebut yang dapat melisiskan kolagen adalah MMP. Pada kanker payudara, MMP-2, -7, -9, -11, dan -14 mengalami peningkatan ekspresi dan berhubungan dengan masa *relaps-free survival* yang lebih pendek dan prognosis buruk (Eiró *et al.*, 2013). Karena itu, logis bila inhibisi MMP menjadi target penghambatan metastasis.

Faktanya pada tahun 1990-an dikembangkan beberapa inhibitor MMP yang sampai uji klinis fase III yaitu *randomized trial* antara inhibitor MMP dengan obat terbaik yang sudah ada untuk menentukan efikasi obat. Hasilnya menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antara pemberian inhibitor MMP dengan obat yang sudah ada serta munculnya efek samping berupa nyeri otot dan inflamasi, sehingga pengembangan inhibitor MMP dihentikan (Coussens, 2002). Kegagalan ini disebabkan oleh inhibitor yang dikembangkan tidak spesifik untuk MMP tertentu padahal terdapat homologi yang erat pada domain katalitik semua jenis MMP, sehingga inhibisi MMP dalam spektrum luas menyebabkan hambatan fungsi positif MMP misalnya *remodeling* MES atau supresi metastasis (MMP-8). Selain itu, penelitian *in vitro* menunjukkan inhibisi total MMP menyebabkan migrasi sel kanker tipe amoeboid menjadi lebih efisien, dengan sel berbentuk bulat dan tanpa polaritas (Friedl dan Wolf, 2003). Pada akhir tahun 2000-an mulai dikembangkan kembali inhibitor MMP di antaranya antibodi monoklonal terhadap domain katalitik pada lokasi yang tidak berinteraksi dengan *chelating zinc* dan molekul kecil yang berikatan dengan domain hemoplexin sehingga menghambat dimerisasi MMP. Keduanya diterapkan untuk menghambat MMP-9 dan MMP-14 (Cathcart *et al.*, 2015). Walaupun demikian, inhibisi MMP mungkin tidak sepenuhnya efektif untuk menghambat invasi dan metastasis mengingat pergerakan sel secara amoeboid tidak membutuhkan lisis MES dan sel

kanker dapat mengubah mode pergerakannya dari mesenkimal ke amoeboid sesuai dengan kondisi lingkungan mikronya (Gialeli *et al.*, 2011). Seiring dengan peningkatan stadium kanker, overekspresi MMP pada seorang pasien kanker payudara mungkin lebih dari satu jenis MMP, sehingga memunculkan pertanyaan apakah dalam inhibisi MMP secara spesifik perlu diberikan sejumlah jenis MMP atau lebih tepat diberi inhibitor spektrum luas dengan resiko efek sampingnya (Smyth, 2003).

c) Hambatan *remodeling* aktin

Migrasi sel membutuhkan integrasi berbagai mekanisme molekuler yang berperan dalam koordinasi membentuk adhesi baru sementara melepaskan adhesi sebelumnya dan secara simultan mengaplikasikan gaya yang dapat memindahkan badan sel. Secara garis besar, migrasi sel memerlukan kemampuan otonom sel, faktor komunikasi terlarut, adhesi antar sel, adhesi sel-matrik, dan integrasi molekul determinan migrasi (Palmer *et al.*, 2012). Intervensi kemampuan otonom migrasi sel ditujukan pada hambatan kemampuan *remodelling* sitoskeleton, terutama aktin.

Polimerisasi, ekstensi, stabilisasi dan depolimerisasi aktin dan mikrotubulin diatur oleh GTPase kecil yaitu Rho, Rac, dan CDC42 (Rodriguez-Hernandez *et al.*, 2016), yang berhubungan dengan kontrol protrusi sel (lamellipodia dan filopodia). Selain itu, protein tirosin kinase non reseptor- Src, meneruskan sinyal *integrin* – *dependent* yang berperan sentral dalam motilitas dan proliferasi sel (Yeatman, 2004; Zhang *et al.*, 2010). Keempat protein tersebut meningkat regulasinya pada sel metastatik sehingga dapat menjadi target inhibisi invasi dan metastasis (Wells *et al.*, 2013; Palmer *et al.*, 2011). Protein non-enzimatik *Wiskott-Aldrich Protein* (WASP) dan famili WAVE memacu *remodeling* aktin melalui aktivasi *Arp*, yang menghasilkan polimerisasi aktin baru dan membentuk protrusi pada bagian depan sel. Target lainnya adalah faktor transkripsi yang mengatur ketersediaan protein

untuk pengaturan ulang sitoskeleton, misalnya Snail, Twist, dan SATB1 (Palmer, 2011).

d) Hambatan komunikasi antara tumor dengan inang/organ target

Mobilisasi sel juga memerlukan komunikasi solubel antara tumor dengan inang/organ target. Faktor terlarut ini bisa dihasilkan oleh tumor dan bertindak sebagai parakrin dan autokrin untuk mobilisasi tumor maupun *host*, misalnya EGF, HGF, dan TGF β . Hospes terutama sel stroma juga dapat menyekresi faktor terlarut yang menginduksi motilitas sel tumor, misalnya EGF, HGF, TGF β , dan CCL5. Interaksi antar sel dan antara sel dengan stroma mengalami perubahan karakteristik pada metastasis. Pada prinsipnya, perubahan adhesi sel yang memfasilitasi migrasi sel tumor pasti meningkatkan risiko terjadinya metastasis. Karena itu, peningkatan ekspresi Ephrin A2 dan IgSF pada interaksi antar sel, ekspresi integrin $\alpha v \beta 3$ dan *hyaluronic acid receptor* CD44 pada interaksi sel-stroma, dan ekspresi isoform tenascin-C dan fibronectin pada *remodeling* stroma, yang memfasilitasi peningkatan motilitas sel pada akhirnya meningkatkan kemampuan invasi dan metastasis (Palmer, 2011).

e) Hambatan molekul atau protein *scaffold*

Target lain dalam penghambatan motilitas sel tumor adalah molekul atau protein *scaffold*, yang umumnya berupa protein adaptor yang mampu berinteraksi secara simultan dengan beberapa protein dan kemudian bersama meregulasi satu proses biologis. Protein adaptor dalam motilitas sel yang inhibitorynya dikembangkan dalam tahap uji klinis adalah *Focal Adhesion Kinase/FAK* (Palmer, 2011).

Protein FAK di-overekspresi-kan pada *ductal carcinoma insitu* (Lightfoot *et al.*, 2004), kanker payudara invasif (Glénisson *et al.*, 2012; Yom *et al.*, 2011; Stickeler *et al.*, 2005; Cance *et al.*, 2000), dan meningkat seiring dengan progresivitas kanker payudara (Ganguly *et al.*, 2012). Peningkatannya pada

kanker payudara primer berhubungan dengan onset usia muda, invasi limfo-vaskular, dan fenotipe TNBC. Peningkatan ekspresi FAK pada jaringan metastatik berhubungan dengan OS dan *progression free survival* (PFS) yang pendek (Golubovskaya *et al.*, 2014).

Tabel 2.5 Inhibitor migrasi yang dalam pengembangan klinis

Obat	Target	Produsen	Fase klinis
Autonom sel			
Saracatinib (AZD0530)	Src	<i>AstraZeneca</i>	II
Bosutinib (SKI-606)	Src	<i>Wyeth</i>	II, III
Dasatinib (BMS-354825)	Src	<i>Bristol-Myers Squibb</i>	I, II
Fasudil	Rho kinase	<i>Asahi Kasei</i>	I, II, III
Interaksi Soluble			
CTCE-9908	SDF-1	<i>Chemokine Therapeutics</i>	I, II
MetMAB (PRO143966)	Met	<i>Roche/Genentech</i>	II
AMG 208	Met	<i>Amgen</i>	I
GC1008	TGF- β family	<i>Genzyme</i>	I, II
Trabedersen (AP 12009)	TGF- β 2	<i>Antisense Pharma</i>	I, II
Infliximab	TNF- α	<i>Centocor</i>	I, II
Herceptin [^] (trastuzumab)	EGFR	<i>Genentech/Roche</i>	I, II, III
Avastin [^]	VEGF	<i>Genentech/Roche</i>	I, II, III
Interaksi antar sel			
IGN-101	EpCAM	<i>Apton</i>	I, II
Exherin (ADH-1)	N-cadherin	<i>Adherex</i>	I, II
Interaksi sel dengan MES			
Cilengitide (EMD121974)	Integrin $\alpha\beta$ dan $\alpha\beta$ 5	<i>EMD/Merck</i>	II, III
Volociximab (M200)	Integrin α 5 β 1	<i>PDL/Biogen</i>	II
Etaracizumab(Abegrin)	Integrin α 3 β 3	<i>MedImmune</i>	I, II
ATN-161	Integrin	<i>Tactic Pharmaceuticals</i>	I, II
BMS-275291	MMPs	<i>Bristol-Myers Squibb</i>	I, II, III
Endostatin	MMPs	<i>Alchemgen Therapeutics</i>	III
Curcumin	MMPs	<i>Sabinsa Corporation</i>	I, II
Tigapotide (PCK3145)	MMP9	<i>Ambrilia Biopharma</i>	II
A6	CD44	<i>Angstrom Pharmaceuticals</i>	II
Mesupron (WX-671)	Ufa	<i>Willex</i>	I, II
ATN-658	Ufa	<i>Tactic Pharmaceuticals</i>	I
Tempostatn (Halofuginone hydrobromide)	Stroma	<i>Collgard Pharmaceuticals</i>	II
PI-88	Heparanase	<i>Progen</i>	I, II, III
Vitaxin	Integrin α 3 β 3	<i>MedImmune</i>	II

(Sumber : Palmer *et al.*, 2012)

Pada migrasi sel, persinyalan FAK berperan dalam pembentukan *focal adhesion* melalui ikatan dengan *Rho guanine nucleotide exchange factor* (ARHGEF28) yang berlanjut pada peningkatan fosforilasi paxilin sehingga terjadi pematangan *focal adhesion*. Pematangan *focal adhesion* menyebabkan ikatan domain FERM pada FAK dengan Arp3, yang menyebabkan aktivasi Arp2/3 pengatur polimerisasi actin pada pembentukan protrusi sel. Selain itu, FAK juga mengatur *turnover focal adhesion* melalui proteolisis protein *focal adhesion* yaitu talin dan cortactin. Karena *focal adhesion* dan pengaturan actin diperlukan sel motil untuk melakukan kontak dengan MES, terutama interim. Oleh karena itu, hambatan terhadap FAK dapat menghambat migrasi sel kanker (Sulzmaier *et al.*, 2014). Inhibisi FAK juga menghasilkan efek lain selain migrasi dan invasi sel kanker karena ikatannya dengan Src, Mdm4, GATA4 dan p53, yang mengatur pertumbuhan, *survival*, dan angiogenesis (Yoon *et al.*, 2015). FAK juga berperan dalam progresi dari mikrometastasis menjadi makrometastasis, melalui pembentukan tonjolan mirip filopodium (Shibue *et al.*, 2012).

2.5. Apoptosis pada kanker payudara

Apoptosis, atau kematian sel terprogram tipe 1, normal terjadi saat siklus hidup organisme untuk menjaga homeostasis populasi sel pada jaringan. Apoptosis dipicu sebagai respon terhadap berbagai stimulus saat perkembangan dan pada saat terjadi stress seluler atau kerusakan berat. Kelainan regulasi mekanisme apoptosis terjadi pada beberapa penyakit, dan defisiensi apoptosis merupakan karakteristik progresi kanker (Hanahan dan Weinberg, 2000). Secara morfologis dengan menggunakan mikroskop elektron, apoptosis dibedakan menjadi dua tahap. Pertama adalah kondensasi nukleus dan kompartemen sitoplasmik. Kemudian kondensasi tersebut pecah menjadi fragmen-fragmen terbungkus membran, diikuti dengan peluruhan badan apoptotik yang difagosit

oleh makrofag, sel parenkim, atau sel neoplastik dan didegradasi dalam fagolisosom (Elmore, 2007).

Apoptosis memiliki dua sub tipe yang sama secara morfologis tetapi persinyalannya melalui rute biokimiawi yang berbeda (gambar 2.10). Jaras ekstrinsik atau *death receptor* menginduksi apoptosis sebagai respon terhadap ikatan *death ligand* dengan *death receptor specific* di permukaan sel. Jaras intrinsik atau mitokondria dipicu oleh stimulus yang dimediasi oleh non-reseptor, yang menghasilkan sinyal intraseluler yang dimediasi mitokondria. Pada akhirnya, kedua jaras ini mengaktifkan *cysteine-aspartic proteases (caspase)* yang menyebabkan proteolitik dan pencernaan nukleus sel. *Caspase* terbagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok *caspase* inisiator hulu (*caspase-9, caspase-2, caspase-8, dan caspase-10*), dan kelompok *caspase* eksekutor hilir (*caspase-3, caspase-6, dan caspase-7*). Aktivasi *caspase* menghasilkan pemecahan substrat di hilir-nya yang berakhir dengan apoptosis (Elmore, 2007).

2.5.1 Apoptosis jalur intrinsik

Proses siklus sel memiliki beberapa *checkpoint*, yang digunakan untuk memutuskan apakah sel akan terus membelah, menjadi *quiescent*, menjadi senescent, atau mengalami apoptosis. Satu kriteria yang harus dipenuhi adalah bahwa untuk siklus sel dapat berlanjut DNA harus utuh (*intact*). Beberapa protein bertugas dalam mendeteksi dan memperbaiki kerusakan DNA dan mengatur protein regulator siklus sel (Albert, 2015). Jalur persinyalan apoptosis intrinsik dipicu oleh stimulus intraseluler yang menginduksi rangkaian sinyal, dengan hasil *mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)* dan kematian sel. Stimulus ini termasuk kerusakan DNA, *reactive oxygen species (ROS)*, radiasi, infeksi virus, hipoksia, dan toksin, serta hilangnya supresor apoptosis dan faktor *survival* sel (Koff *et al.*, 2015).

Stimulus apoptosis mengaktifkan berbagai efektor di hilirnya yang berakhir dengan terbukanya kanal membran luar mitokondria, sehingga melepaskan sitokrom C ke sitoplasma. Hal ini memicu aktivasi *caspase*, hilangnya $\Delta\Psi_m$ (potensial membran mitokondria), penurunan ATP seluler, dan produksi radikal bebas. Pelepasan sitokrom C menstimulasi pembentukan kompleks aktivasi *caspase* yang dikenal sebagai apoptosome (Bouchier-Hayes *et al.*, 2005). Pembentukan apoptosome disebabkan oleh ikatan sitokrom C ke regio *C-terminal apoptotic protease activating factor 1* (Apaf-1), suatu protein sitosolik dengan satu N-terminal *caspase-recruitment domain* (CARD) dan satu *nucleotide-binding domain* (Saelens *et al.*, 2004). Setelah terbentuk, apoptosome dapat berikatan dengan *caspase-9*, yang memecah dan mengaktifasi *caspase-3* (Elmore, 2007).

Aktivasi *caspase* efektor bertanggung jawab terhadap karakteristik kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA pada sel apoptotik. *Caspase-3* dan -7 mengaktifkan *caspase-activated DNase* (CAD) dengan memecah *inhibitor CAD* (ICAD) (Kitazumi dan Tsukahara, 2011). *Caspase-3* juga mengaktifkan kondensasi *apoptotic chromatin condensation inducer in the nuclease* (ACINUS), dan *cytosolic helicase-CARD* (HELI-CARD), yang menyebabkan kondensasi kromatin dan degradasi DNA (Kovacsovic *et al.*, 2002).

Selain sitokrom C, faktor pro-apoptotik lainnya juga dilepaskan dari mitokondria saat MOMP. *Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with Low pI* (Smac/DIABLO) memicu apoptosis dengan menghambat *inhibitor of apoptosis* (IAP), seperti *X-linked IAP* (XIAP), *cellular inhibitor of apoptosis* (cIAP)1 dan 2, survivin, dan baculoviral *Orgyia pseudotsugata-inhibitor of apoptosis* (Op-IAP). Inhibitor of AP menghambat apoptosis melalui interaksi dengan domain *baculoviral IAP repeat* (BIR) dan motif *aminoterminal recognition* pada *caspase*, sehingga secara efektif mengblokir pengaktifan *caspase* dan mencegah rangkaian proteolitik yang

bermuara pada kematian sel. Domain BIR3 pada XIAP dapat berinteraksi secara spesifik dengan *caspase-9*, sedangkan domain BIR2 pada XIAP berinteraksi dengan *caspase-3* dan *-7*. Faktor mitokondrial dan serine protease Omi atau *high temperature requirement (Htr) A2* juga berinteraksi dengan domain BIR2 dan BIR3 dari XIAP untuk memfasilitasi aktivasi *caspase* (van Loo *et al.*, 2002).

Kelompok kedua faktor pro-apoptotik adalah *apoptotic inducing factor* (AIF) dan *endonuclease G* (EndoG) yang dilepaskan dari mitokondria selama MOMP. AIF adalah oksidoreduktase mitokondrial yang ber-translokasi ke nukleus dan menyebabkan fragmentasi DNA dan kondensasi kromatin nukleus (Joza *et al.*, 2001). Endonuclease G adalah *DNA-encoded nuclease* nukleus yang dilepaskan dari ruang mitokondrial dalam setelah MOMP. Setelah dilepaskan, EndoG berpindah ke nukleus dan bekerja memecah DNA (Li *et al.*, 2001).

Jaras perforin *granzyme* adalah subtype apoptosis ketiga, dengan limfosit T sitotoksik (CTLs) sebagai penginduksinya. Setelah pengenalan sel target, CTL menyekresi granula ke celah antar sel, atau dikenal juga sebagai sinaps imunologis. Granula sekretorik berisi molekul perforin yaitu suatu glikoprotein pembentuk pori yang dapat terikat pada fosfolipid membran sel target, serta *granzyme B* yaitu *serine protease* yang memecah protein pada residu aspartate, mengaktifkan pro-*caspase 10*, dan memecah faktor pro-apoptotik seperti ICAD (Rousalova dan Krepela, 2010).

2.5.2 Apoptosis jalur ekstrinsik

Apoptosis jalur ekstrinsik merupakan suatu mekanisme penghantaran sinyal ekstraseluler melalui *death receptor*, untuk mengaktifasi mekanisme apoptosis intraseluler. *Death receptor* yang telah dikenali karakteristiknya dengan baik antara lain TNF- α /TNFR1, *fatty acid synthase (Fas) ligand / Fas receptor* (juga disebut CD95 atau Apo1), Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 - *tumor necrosis factor-related*

apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL 1) dan Apo2L/DR5 (TRAIL R2) (Elmore, 2007). Ikatan ligand dengan reseptor menyebabkan perekrutan protein adapter sitoplasmik, misalnya *Fas-associated death domain* (FADD), *tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain* (TRADD) dan *receptor interacting protein* (RIP). Kemudian protein adaptor berikatan dengan domain N-terminal *caspase* inisiator, *procaspase* -8 atau -10 melalui dimerisasi *death effector domain* (DED). Komplek yang terbentuk dikenal sebagai *death-inducing signaling complex* (DISC), menghasilkan pemecahan autokatalitik dan aktivasi *caspase* inisiator yang dapat secara langsung membelah dan mengaktifkan *caspase*-3 (Koff *et al.*, 2015).

Alternatif lain pada jenis sel yang hanya memproduksi sejumlah kecil *caspase*-8, sinyal apoptotik diperkuat melalui pemecahan *BH3 interacting-domain death agonist* (BID), anggota keluarga Bcl-2, pada fragmen proapoptotik *truncated* BID (tBID). Pecahan tBID ber-translokasi ke mitokondria dan menghasilkan agregasi *Bcl-2-associated X protein* (Bax) dan *Bcl-2 homologous antagonist/killer* (BAK), yang memicu pelepasan sitokrom C yang selanjutnya mestimulasi apoptosom dan berturut-turut mengaktifkan *caspase*-9 dan *caspase*-3 (Ashkenazi dan Dixit, 1998).

2.5.3 Apoptosis jalur independen *caspase*

Pada sel, berbagai ligand dapat menginduksi perubahan potensial membran mitokondria, yang dapat menyebabkan kerusakan mitokondria dan meningkatkan produksi ROS. ROS menjadi faktor utama yang dapat memicu apoptosis yang independen terhadap *caspase*. Faktor lainnya adalah *granzyme* A, AIF, protein virus, obat-obatan, permeabilisasi membran lisosom, dan faktor supresor p53 (Hongmei, 2012).

Granzyme A memicu apoptosis dengan cara merusak transport elektron dan potensial membran mitokondria (Zhu *et al.*, 2006; Martinvalet *et al.*, 2008). Superoksida yang terbentuk akibat kerusakan mitokondria mendorong kompleks respon stress oksidatif yang berhubungan dengan ER (komplek SET) untuk berpindah ke nukleus (Martinvalet *et al.*, 2005). Komplek SET merupakan sekelompok protein yang bekerja untuk perbaikan DNA. *Granzyme A* yang juga berpindah ke nukleus memecah SET, yang mengandung tiga nuklease (*basic excision repair* (BER) *endonuclease Ape1*, *endonuclease non-metastatic protein-23 homolog-1* (NM23-H1), dan *3' repair exonuclease 1* (Trex1)), protein modifikator SET dan *phosphoprotein 32* (pp32), dan protein pengikat DNA yang mengenali DNA yang menyimpang, *high mobility group box 2* (HMGB2) (Lieberman, 2010). Pemecahan SET menyebabkan NM23-H1 memotong DNA, diikuti oleh Trex1 memecah DNA lebih lanjut, sehingga sel target sulit untuk memperbaiki kerusakan tersebut (Chowdury *et al.*, 2004). Pada saat yang sama, *granzyme A* memecah dan menon-aktifkan HMGB2 dan Ape1 pada komplek SET (Fan *et al.*, 2003). Hal ini akan mengganggu BER sehingga menurunkan oksidasi faktor transkripsi, seperti FOS, JUN dan NF- κ B dalam keterlibatannya pada respon perbaikan awal (Lieberman, 2010). Selain itu, *granzyme A* juga mampu memecah histon penghubung H1 dan menghilangkan ekor histon inti, sehingga DNA lebih mudah diakses oleh berbagai nuklease (Zhang *et al.*, 2001), serta merusak membran nukleus melalui pembelahan lamin (Zhang *et al.*, 2001b).

Radical oxygen species (ROS) memfasilitasi aktivasi *poly (ADP-ribose) polymerase-1* (PARP-1) dan aktivasi PARP-1 diperlukan dalam pelepasan AIF dari mitokondria. *Radical oxygen species* tidak hanya terlibat dalam kematian sel yang independen *caspase*, tetapi juga yang tergantung *caspase*, sehingga kemungkinan ROS menjembatani kedua mekanisme ini (Hongmei, 2012).

2.5.4 Resistensi terhadap apoptosis pada kanker payudara

Apoptosis diregulasi secara ketat pada sel eukaryotik, karena apoptosis yang tidak terkendali akan membahayakan keberlangsungan sel. Tetapi, sel kanker mampu mengembangkan mekanisme untuk menghindari apoptosis melalui manipulasi molekul anti-apoptotik atau menon-aktifkan komponen kematian sel pro-apoptotik (Zörnig *et al.*, 2001).

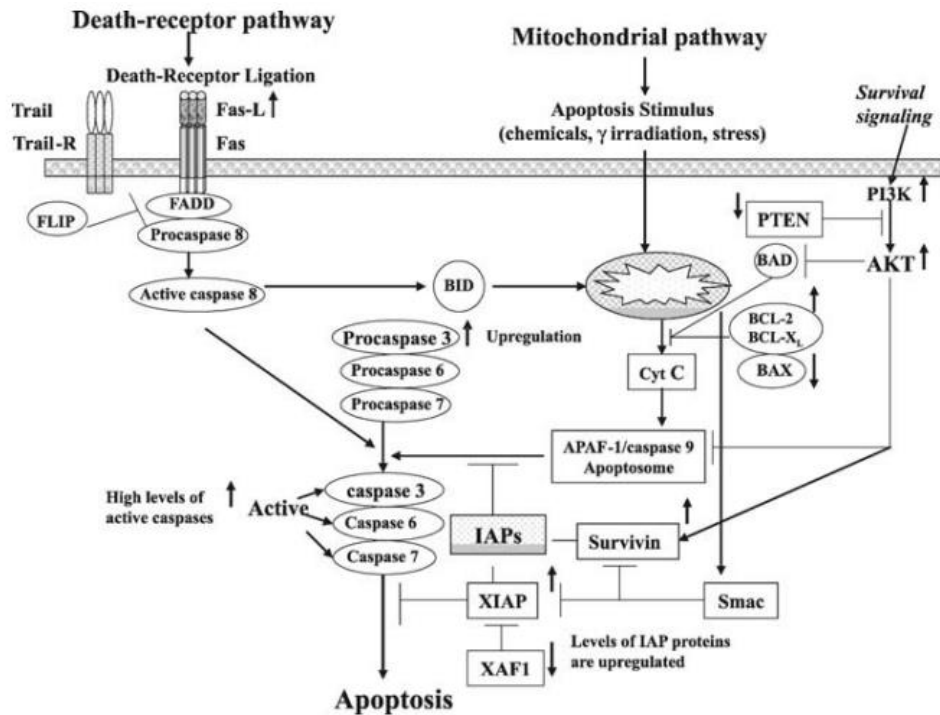
Apoptosis terdeteksi pada berbagai kanker payudara primer dan metastatik, tetapi beberapa penelitian menunjukkan sel kanker payudara resisten terhadap apoptosis yang dimediasi oleh *death receptor*, misalnya induksi oleh ligand Fas-L dan TRAIL walaupun sel kanker payudara mengekspresikan reseptor FAS dan TRAIL (Singh *et al.*, 2003). Hal ini diduga karena penurunan sensitivitas reseptor terhadap ligand, sehingga peningkatan regulasi terhadap ligand dan reseptor apoptotik eksternal tidak menurunkan resistensi apoptotik kanker payudara. Selain itu, peningkatan regulasi Fas-L pada sel kanker payudara mungkin memicu pertumbuhan tumor, melalui hambatan infiltrasi sel imun pada tumor dan/atau memfasilitasi destruksi jaringan sekitar tumor untuk meningkatkan invasi sel tumor (Bebenek *et al.*, 2013).

Jaras apoptosis yang melibatkan mitokondria diregulasi oleh protein keluarga BCL-2, yaitu pro-apoptotik BAX, BAK, BAD, *BH3 interacting-domain death agonist* (BID), dan *BCL-X short* (BCL-Xs), serta anti-apoptotik BCL-2, *BCL-X large* (BCL-XL) BCL-w, dan *myeloid chronic leukemia – 1* (MCL-1) (Deveraux *et al.*, 2001). Peningkatan regulasi BCL-2 menjadi faktor penting dalam tumorigenesis dan resistensi terhadap apoptosis pada beberapa jenis tumor. Ekspresi BCL-2 berhubungan dengan keberadaan reseptor estrogen dan progesteron pada sel kanker payudara. Namun, walaupun fungsi BCL-2 adalah sebagai protein antiapoptotik, ekspresinya berhubungan erat dengan prognosis

yang baik pada pasien kanker. Dan sebaliknya, tingginya jumlah sel apoptotik pada jaringan kanker payudara berhubungan dengan prognosis buruk, termasuk ukuran tumor yang lebih besar, tipe tumor lebih agresif, tingkat proliferasi tinggi, dan metastasis ke limfonodi (Villar *et al.*, 2001). Hal ini diduga karena BCL-2 bukan inhibitor utama apoptosis yang berkontribusi terhadap resistensi apoptosis. Anggota keluarga BCL-2 lainnya, BAX, yang pro-apoptotik, diekspresikan dalam kadar rendah pada sebagian besar jaringan kanker payudara. Bahkan pada sepertiga jaringan kanker payudara, tidak mengekspresikan BAX. Penurunan ekspresi ini berhubungan dengan respon yang buruk terhadap terapi, progresi tumor lebih cepat, dan prognosis buruk (Redondo *et al.*, 2003).

Aktivasi *caspase* melalui cascade reaksi proteolitik merupakan langkah kunci pada respon apoptotik. Penelitian terhadap kadar pro-apoptotik dan *caspase* pada jaringan kanker payudara menunjukkan peningkatan pada sebagian besar jaringan kanker payudara. Misalnya ekspresi *caspase-3* sangat meningkat regulasinya pada 58% DCIS dan 90% kanker payudara invasif, sedangkan pada sel duktal normal tidak ditemukan. Peningkatan ekspresi *caspase -3*, *-6*, dan *-8* berhubungan dengan peningkatan apoptosis dan lesi DCIS *grade* tinggi (Jäger dan Zwacka, 2010). Ekspresi *caspase-3* berkorelasi positif dengan protein XIAP dan survivin, yang mungkin menunjukkan *feedback* negatif pada sel kanker payudara (Parton *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003). Pada perbandingan 18 sel kultur kanker payudara, ekspresi berbagai jenis *caspase* bervariasi pada sel kultur yang berbeda. Misalnya defisiensi *caspase-3* pada MCF-7, sedangkan MDA-MB-231 mengekspresikan *caspase -2*, *-3*, *-4*, *-6*, *-7*, *-9*, dan *-10* dengan defisiensi pada *caspase -10*, dengan pembandingan sel kultur epitel kelenjar mammae normal, MCF10a (Yang *et al.*, 2007). Deteksi *caspase-3* dan *-6* aktif pada kanker payudara mengindikasikan efektor di hulu jaras persinyalan apoptosis tetap fungsional, dan jaras apoptosis teraktifkan pada jaringan kanker payudara. Resistensi terhadap

apoptosis, lebih mungkin disebabkan oleh peningkatan ekspresi IAF yang mampu menggeblok aktivitas *caspase* (Yang, 2007).



Gambar 2.10 Jarak persinyalan apoptosis.

Keterangan : Jarak persinyalan apoptosis dapat diaktivasi secara intrinsik atau ekstrinsik. Ikatan *death receptor* dengan ligand-nya menginduksi aktivasi *caspase-8* yang secara proteolitik mengaktifkan *caspase -3, -6, dan -7*. Beberapa stimulus apoptosis memncu jalur apoptosis intrinsik, dengan pelepasan sitokrom c oleh mitokondria. Di sitoplasma, sitokrom c memfasilitas pembentukan kompleks APAF-1 dan *caspase-9* yang disebut apoptosome, sehingga *caspae-9* teraktivasi. *Caspase -9* teraktivasi kemudian memecah dan mengaktifkan *caspase-3, -6, dan -7* yang merupakan *caspase* efektor/eksekutor dan menginduksi apoptosis. Pada sel kanker payudara, sinyal apoptosis hulu telah teraktivasi, misalnya berupa peningkatan ekspresi FAS-L dan adanya *caspase* aktif. Tetapi, peningkatan XIAP dan survivin menghambat aktivitas *caspase* dan karenanya menggeblok sinyal apoptotik. Sel kanker payudara juga menurunkan regulasi XAF1, protein yang bekerja menetralkan XIAP, sehingga menghambat *caspase* lebih jauh. Selain itu, BCL-2 dan BCL-XL dalam kadar tinggi dan hilangnya ekspresi BAX pada sel kanker menghambat apoptosis yang dimediasi mitokondria. Jarak survival phosphoinisitide-3-kinase (PI3K)/AKT juga meningkat regulasinya pada sel kanker payudara, sehingga menurunkan sensitivitas terhadap apoptosis melalui fosforilasi dan inhibisi proapoptotik Bad dan *caspase -9*, dan meningkatkan kadar protein IAP.

(Sumber: Yang, 2006)

2.5.5 Peran FAK dan Rac1 dalam apoptosis sel kanker payudara

Frisch *et al.* pada tahun 1996 mendemonstrasikan bahwa ekspresi FAK aktif mampu mensupresi anoikis pada *Madin Darbin canine kidney* (MDCK) dan membuat sel epitel keratinosit HaCat immortal (Elmore, 2007b). FAK dihubungkan dengan apoptosis sel kanker, yang dibuktikan dengan hilangnya adhesi dan peningkatan apoptosis sel kanker saat dilakukan inhibisi FAK dengan *anti-sense* oligonukleotida atau dengan FAK dominan negatif. Inhibisi FAK tidak hanya menyebabkan apoptosis pada kanker payudara yang melekat pada MES, tetapi juga yang tidak melekat, yang diduga mekanismenya melibatkan jaras apoptosis *death receptor* dan *caspase-8* (Xu *et al.*, 2000).

Penurunan regulasi FAK oleh siRNA-FAK menurunkan viabilitas MCF-7 dan menghambat pertumbuhan tumor (Golubovskaya *et al.*, 2009). Ikatan antara FAK dengan *death domain kinase receptor interacting protein* (RIP), menyebabkan FAK mampu menghambat fungsi apoptotik RIP (Kurenova *et al.*, 2004). Selain itu, FAK mampu berinteraksi dengan p53 dan menghambat aktivitasnya (Golubovskaya *et al.*, 2005). Domain N-terminus FERM FAK dapat mengalami pemutusan (*cleavage*) dan ditransfer ke nukleus (Beviglia *et al.*, 2003; Lietha *et al.*, 2007). Bukti lain menunjukkan bahwa FAK berpindah ke nukleus secara utuh. Kemampuan ini difasilitasi oleh adanya *nuclear export signals* (NES) pada domain kinase FAK, *nuclear localization signals* (NLS) pada lobus F2 domain FERM, dan SUMOylasi (modifikasi dengan penambahan *small ubiquitin-like modifier* (SUMO)) domain FERM yang memfasilitasi perpindahan bolak-balik FAK dari FA ke nukleus (Zhou *et al.*, 2019). FAK nukleus meregulasi survival sel kanker melalui ikatan langsung dengan Mdm-2, yang memicu ubiquitinisasi dan degradasi p53 (Lim *et al.*, 2008). Fungsi anti-apoptotik FAK juga diduga melalui aktivasi jaras PI3K/Akt dan menstimulasi fungsi NF-kappa B dan IAP (Sonoda *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2015). Mekanisme lain adalah hubungan persinyalan FAK terhadap autofagi, yang

menyebabkan terpisahnya Src aktif dari *focal adhesion* pada sel kanker squamous (Sandilands *et al.*, 2012).

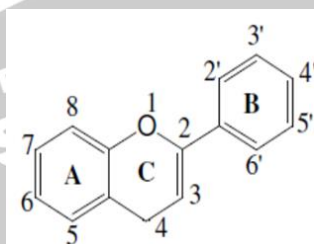
Pada TNBC, penyebab terjadinya kemoresisten adalah autofagi dan senesens sel. Senesens adalah kondisi sel yang kehilangan kemampuan proliferaifnya, tetapi memelihara viabilitas seluler dan aktivitas metabolismenya. Sel ini mampu menyekresi *senescence associated secretory phenotype* (SASP) yang merangsang progresi tumor dengan menstimulasi pertumbuhan dan transformasi sel di sekitarnya (O'Reilly *et al.*, 2015). Aktivasi FAK melalui autofosforilasi pada Tyr 397 dan fosforilasi oleh Src pada Tyr577 meningkat pada sel kanker senesens, yang menunjukkan bahwa aktivasi FAK berperan dalam mekanisme sel kanker menghindari apoptosis melalui senesens (Ryu *et al.*, 2006).

Berbeda dengan FAK, penelitian tentang hubungan Rac-1 dengan apoptosis pada kanker belum banyak. Ekspresi Rac1 menghambat apoptosis pada sel fibroblas yang diinduksi cisplatin (Jeong *et al.*, 2002), sel limfoma (Zhang *et al.*, 2004), dan sel karsinoma hepatoseluler (Zhang *et al.*, 2015). Mekanisme hambatan apoptosis oleh Rac1 diduga melalui kemampuannya mengaktivasi fosforilasi Bad, keluarga pro-apoptotik Bcl-2, dan Rac-1 dapat menjadi partner pengikat Bcl-2 dan menstabilkan aktivitas antiapoptosisnya, yang pembuktiannya masih terbatas pada sel limfoma. Fosforilasi Bad menyebabkan Bad tidak dapat membentuk heterodimer dengan antiapoptotik Bcl-XL dan Bcl-2, sehingga keduanya dapat bekerja menghambat apoptosis (Zhang *et al.*, 2004; Velaithan *et al.*, 2011). Pada sel kultur kanker payudara (MDA MB-231, MCF-7, dan TD47) supresi aktivitas Rac1 mampu menginduksi apoptosis dan *arrest* pada G1, melalui penurunan regulasi cyclin D1, survivin, dan *X-linked inhibitor* (Yoshida *et al.*, 2010).

2.6 Flavonoid dan Afzelin

2.6.1 Flavonoid

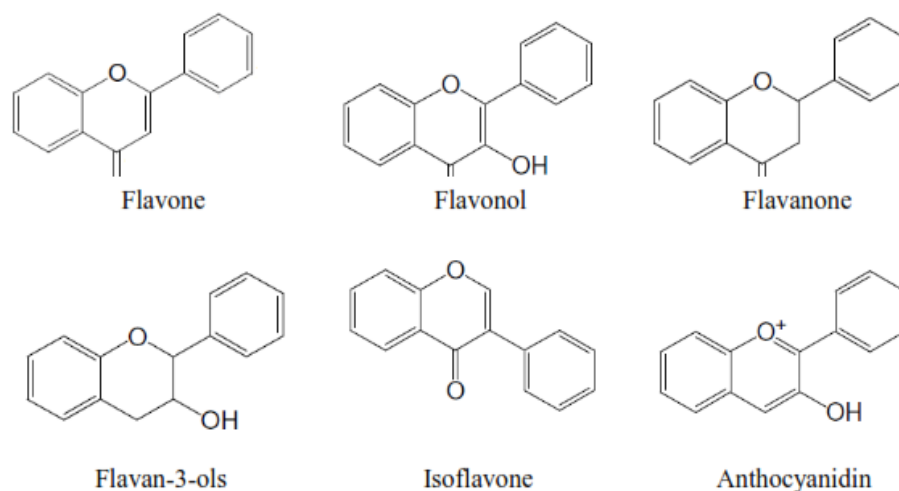
Flavonoid merupakan metabolit sekunder pada tanaman dengan struktur polifenol. Flavonoid disintesis melalui jalur polipraponoid dan komponen awalnya adalah fenilalanin. Semua flavonoid memiliki struktur rangka yang sama, yaitu C₆ - C₃ - C₆, yang terdiri dari dua cincin aromatik C₆ (A dan B) dan satu cincin heterosiklik (C) yang mengandung satu atom oksigen (gambar 2.11).



Gambar 2.11 Struktur Flavonoid

Flavonoid diklasifikasikan menjadi enam subgrup yaitu flavon (luteolin, apigenin, tangeritin); flavonol (quercetin, kaempferol, myricetin, isorhamnetin, pachypodol); flavanon (hesperitin, naringenin, eriodictyol); flavan-3-ol (catechin, epicatechin); isoflavon (genistein, daidzein, glycitein); dan anthocyanidin (cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin, petunidin) (gambar 2.12). Grup flavonoid lainnya adalah aurone, xanthone, dan tannin terkondensasi (Ghamsezadeh dan Ghamsezadeh, 2011). Pada semua sub kelas, cincin B dan C terhubung pada C₂, kecuali isoflavone yang terhubung pada C₃. Flavon, flavonol, dan isoflavon mempunyai ikatan ganda antara C₂ dan C₃, sedangkan flavanon, flavanonol, dan flavanol mengandung rantai tiga karbon tersaturasi. Sub kelas ini berbeda dalam hal adanya atom karbon karbonilik pada C₄ (flavon, flavanon, flavanonol, dan isoflavon) dan grup hidroksil pada C₃ (flavanol, flavanonol, dan flavanol) (Nichenametla *et al.*, 2006). *Anthocyanin* merupakan glikosida, yang bentuk aglikon-nya terkonjugasi dengan glukosa, galaktosa,

rhamnosa, xylose, atau arabinose melalui grup hidroksi C3. Bentuk deglikosilasi atau aglikon dari *anthocyanin* disebut sebagai *anthocyanidin* yang merupakan derivat garam dari kation *2-phenylchromenylium* atau disebut juga kation flavilium. Flavonoid dapat mengalami berbagai modifikasi, misalnya o-glikosilasi, C-glikosilasi, O-asilasi, kondensasi cincin, dan polimerisasi, yang menghasilkan struktur yang sangat beragam dan sangat kompleks (Wang dan Stone, 2008).



Gambar 2.12 Struktur beberapa jenis flavonoid

Di alam, flavonoid terdapat di semua bagian tanaman, dengan struktur yang bervariasi sesuai dengan struktur cincin C, substitusi aglikon oleh grup OH dan O-Me, dan pola glikosidasi dan asilasi. Selain peran biologisnya pada tanaman dan interaksi tanaman dengan serangga, flavonoid juga dieksplorasi efeknya terhadap kesehatan. Flavonoid, terutama jenis flavanol, flavonol, dan *anthocyanin*, terdapat dalam jumlah banyak dalam diet manusia, dan diduga kuat berhubungan dengan prevensi kanker, penyakit kardiovaskular, dan neurodegeneratif. Mekanisme apapun yang mendasari kemampuan tersebut, selalu berhubungan dengan setidaknya dua properti dasar flavonoid yaitu kemampuan reduksi melalui donasi elektron atau atom H, dan kemampuan untuk berinteraksi dengan protein (Dangles dan Dufour, 2006).

2.6.2 Potensi flavonoid

Flavonoid ditemukan di semua jenis tanaman, beberapa jenis hewan, dan sebagian kecil jamur, sehingga flavonoid terlibat dalam berbagai jenis interaksi biologis. Produksi flavonoid pada tanaman mungkin dipengaruhi oleh cahaya, air, suhu, mineral, gula, kerusakan mekanik, patogen, regulator pertumbuhan tanaman, dan faktor lainnya. Flavonoid mungkin berperan sebagai antioksidan, inhibitor enzim, pigmen untuk absorpsi cahaya, dan daya tarik visual untuk polinasi, pelindung cahaya, promotor hambatan pertumbuhan tanaman, regulator pertumbuhan tanaman, sinyal kimiawi pembentukan akar, dan fitoaleksin (Nigg dan Seigler, 2013).

Awalnya, aktivitas biologis polifenol baik pada tanaman ataupun manusia dianggap berasal dari kemampuan antioksidannya dan/atau kecenderungannya untuk membentuk kompleks dengan protein secara non spesifik. Tetapi kemudian banyak bukti yang mendukung bahwa mekanisme polifenol, termasuk flavonoid, dalam proteksi terhadap terjadinya penyakit kardiovaskular, neurodegenerasi, kanker, dan diabetes adalah melalui kemampuannya langsung berikatan dengan protein atau peptida target. Mekanisme aksinya termasuk penghambatan enzim kunci, modulasi reseptor sel atau faktor transkripsi, gangguan agregasi protein (atau peptida), yang dapat meregulasi fungsi sel terkait, misalnya proliferasi, inflamasi, apoptosis, angiogenesis, metastasis, dan respon imun. Enzim yang paling banyak diteliti dalam hubungannya dengan terapi adalah enzim inflamasi seperti COX, LOX, CYP, *xanthin oxidase*, *NADH oxidase*, *thioreduxin reductase*, *adenosine deaminase*, *matrix metalloproteinase*, *telomerase*, *DNA polymerase*, *topoisomerase*, *methyl transferase*, *ATPase/ATP synthase*, *ornithine decarboxylase* dan *urokinase* (Dangles dan Dufour, 2006).

2.6.3 *Structure activity relationship (SAR) flavonoid sebagai anti kanker*

Flavonoid telah banyak dibuktikan sebagai agen anti kanker, yang terlibat dalam berbagai jaras yang berhubungan dengan karsinogenesis dan terapi kanker. Flavonoid dapat bekerja sebagai antimutagenik, antiangiogenik dan anti-invasif, serta menghambat proliferasi dan perkembangan tumor. Walaupun properti antikarsinogenik flavonoid telah banyak dipelajari tetapi informasi mengenai *structure-activity relationship (SAR)* belum banyak diketahui (Sak, 2014).

Potensi flavonoid yang paling banyak dieksplorasi adalah sebagai antioksidan. Pada kanker, kemampuan flavonoid ini dihubungkan dengan preventif terjadinya mutasi gen yang berhubungan dengan radikal bebas (Pourahmad *et al.*, 2016). Mekanisme utama aktivitas flavonoid sebagai antioksidan tergantung pada dua faktor yaitu transfer elektron-proton dan stabilisasi radikal bebas yang terbentuk. Kemampuan aktivitas antioksidan ini ditentukan oleh posisi dan jumlah hidroksil fenol yang terikat pada rangka karbon, properti fisika-kimia dari gugus tambahan lain, dan kemungkinan terbentuknya ikatan hidrogen intramolekul (Scotti *et al.*, 2009).

Pada tahun 2001, Pannala *et al.* menggunakan data farmakokinetik untuk mengevaluasi kapasitas antioksidan derivat flavon dan flavonol. Menurut penelitiannya, kedua subgroup flavonoid tersebut memiliki beberapa determinan struktur yang meningkatkan aktivitas antioksidan, yaitu :

- 1) Posisi grup hidroksil pada cincin B berperan penting pada aktivitas antioksidan dan tidak dapat digantikan. Dalam hal posisinya, posisi para- lebih baik, sedangkan posisi ortho- dan meta- menunjukkan sedikit atau tidak ada aktivitas;
- 2) Keberadaan grup hidroksil kedua pada cincin B;

- 3) Keberadaan dua ortho-dihidroksi pada cincin B, dan ikatan ganda C2-C3 terkonjugasi pada gugus karbonil (C4) pada cincin C (sebagaimana terlihat pada flavon);
- 4) Tambahan satu grup hidroksil pada C3 di cincin C;
- 5) Adanya satu grup hidroksi pada C3 pada flavonoid yang memiliki hidroksilin pada C3, karena konjugasi yang intens (resonansi) (Scotti *et al.*, 2012)

Flavonoid mampu menghambat proliferasi sel tumor, misalnya melanoma B16F10 dan SKOMEL (Benavente-Garcia *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2003), kanker payudara, leukemia, tulang, colon, hepar, paru, oral, esophagus, gaster, pankreas, ovarium, uterus, dan prostat (Sak, 2014). Penentuan SAR yang didapat dari perbandingan flavonoid dalam spektrum luas menunjukkan dua gugus –OH yang berdekatan pada 3' dan 4' cincin B, dan ikatan ganda C2-C3, berperan penting dalam aktivitas antiproliferasi (Sanchez *et al.*, 2001). Adanya OH ketiga pada cincin B di dekat grup katekol juga meningkatkan efek antiproliferasi, sebagaimana ditunjukkan oleh perbandingan myricetin dan quercetin (Benavente-Garcia *et al.*, 2008). Karakteristik yang sama juga dibutuhkan dalam kemampuan flavanon dan flavon dalam menginhibisi *breast cancer resistance protein* (BCRP), suatu transporter membran *efluks* yang termasuk *ABC transporter superfamily* – ABCG2, yang berhubungan dengan *multidrug resisten* pada kanker [Gandhi *et al.*, 2009]

Flavonoid juga dapat berperan sebagai antikanker melalui hambatan angiogenesis. Inhibisi aktivitas VEGF dapat diinduksi oleh flavanon, flavon, atau flavanolol, dengan flavanon memiliki efektivitas paling tinggi (Albini *et al.*, 2005). Peningkatan jumlah gugus OH pada cincin B memperkuat kemampuan inhibisi VEGF. Selain itu, flavonoid terglukosilasi lebih efektif dibanding non-glikosilasi (Benavente-Garcia *et al.*, 2008).

Dalam inhibisi transkripsi MMP-9 pada sel kultur MDA-MB 231, adanya gugus OH pada 3' dan 4' cincin B juga meningkatkan aktivitas flavonol, yang ditunjukkan pada perbandingan antara galangin dengan quercetin. Sedangkan pada flavon, penambahan gugus metil pada 3' cincin B menyebabkan peningkatan hambatan ekspresi MMP-9 hingga dua kali lipat, sebagaimana perbandingan apigenin dengan chrysoeriol (Amrutha *et al.*, 2014).

2.6.4 Metabolisme dan bioavailabilitas flavonoid

Penelitian biokimiawi terhadap flavonoid terutama ditujukan terhadap kemungkinannya dalam menghambat penyakit degeneratif atau potensi sebagai obat. Dalam hal potensi sebagai obat, penelitian hubungan struktur dengan aktivitas mengeksplorasi tidak hanya flavonoid natural tetapi juga analog sintetik. Kemampuan prevensi dan terapi lebih banyak mengeksplorasi flavonoid sebagai diet sehingga model biologis dipengaruhi oleh bioavailabilitasnya, termasuk absorpsi di intestinum dan metabolisme berupa katabolisme mikrobial serta konjugasi di hepar dan enterosit (Scalbert dan Williamson, 2000). Flavonoid terutama dalam bentuk terkonjugasi dapat terakumulasi di dekat protein target dalam konsentrasi yang cukup tinggi untuk dapat menghasilkan interaksi. Efek seluler flavonoid diyakini tidak hanya dihasilkan oleh kemampuan menangkap radikal bebas atau *metal chelating*, tetapi juga berhubungan dengan kemampuan interaksi flavonoid dengan target biologis spesifik, terutama protein (Dangles dan Dufour, 2006).

Sebagian besar flavonoid memasuki gastrointestinal dalam bentuk ester, glikosida, atau polimer, dan tidak mudah diabsorpsi. Peningkatan bioavailabilitas dihasilkan melalui pemecahan konjugat ini menjadi bentuk aglikon, yang lebih mudah berdifusi melalui membran sel (Murota *et al.*, 2000; Viskupicova *et al.*, 2008). Pemecahan ini dapat terjadi pada lingkungan asam di gaster atau oleh

mikroflora di intestinum (Li *et al.*, 2000). Setelah diabsorpsi oleh enterosit, flavonoid mengalami biotransformasi melalui pembentukan produk konjugat, terutama glukoronida selain derivat sulfat dan metilasi, yang terjadi di intestinum dan lalu di hepar. Bentuk konjugat tersebut disekresi ke sistem bilier (Lambert *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2008).

Bersama dengan biotransformasi metabolik dan degradasi oleh mikroflora intestinum dan jalur intestinum-hepar, bioavailabilitas dan akumulasi flavonoid di sel dan jaringan sangat bergantung pada *multidrug-resistance-associated proteins* (MRP-1 dan MRP-2), misalnya *ATP-dependent efflux transporter*. Jalur metabolik ini juga dinamakan metabolisme fase III. MRP-2 yang berlokasi pada membran *apical* sel usus halus, mengekspor flavonol yang sudah di intraseluler ke lumen intestinum, sedangkan MRP-1 yang berlokasi di enterosit sisi vaskular mentransport flavonoid dari dalam sel menuju ke darah (Singh *et al.*, 2008). Karena itu, kemungkinan besar masuknya flavonoid dari lumen intestinum ke darah dan berbagai organ tergantung pada distribusi MRP-1 dan MRP-2 di jaringan, serta afinitas substratnya.

Idealnya, senyawa yang mudah diabsorpsi pada pemberian per oral adalah yang memiliki berat molekul kurang dari 550, mempunyai sifat lipofilik dan hidrofilik sesuai, tidak bermuatan atau bermuatan parsial pada pH 7,4, dan memiliki jumlah tertentu ikatan yang dapat berotasi dan ikatan hidrogen donor atau resipien. Sebenarnya sulit untuk menentukan hubungan antara kelarutan air dengan absorpsi karena proses absorpsi sangat kompleks. Walaupun sebagian besar penelitian *in vivo* dan *in vitro* dilakukan pada medium *aqueous*, tidak ada bukti yang menunjukkan bahwa pendekatan umum dengan menambahkan fase organik 5% pada kultur *in vitro* menyebabkan bias hasil hingga tidak dapat direplikasi *in vivo*, karena kebanyakan pelarut organik yang digunakan tidak diperbolehkan untuk diberikan kepada manusia. Misalnya, pemberian DMSO 1% pada penelitian

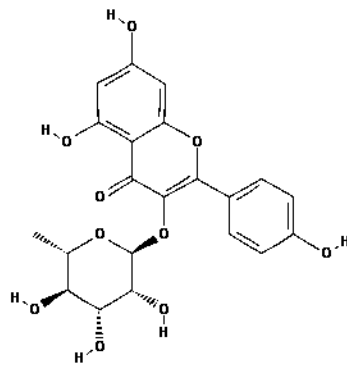
in vitro pada medium kultur. Umumnya kontrol standar pada penelitian *in vitro* adalah media dengan DMSO 1%, walaupun tidak ada bukti yang menunjukkan bahwa DMSO tidak meningkatkan *uptake* senyawa oleh sel (Gao dan HU, 2010).

2.6.5 Afzelin

Afzelin merupakan salah satu jenis flavonol glikosida. Berbeda dengan bentuk aglikon-nya yaitu kaempferol, afzelin mempunyai gugus O-rhamnosida pada posisi C3 sehingga disebut juga sebagai *kaempferol 3-O-rhamnosida* (gambar 2.13). Di dalam tanaman, flavonoid berada dalam bentuk glikosida, terutama flavon O/C-glikosida atau flavonol O-glikosida, dan bekerja tetap dalam bentuk glikosida (Xiao *et al.*, 2014). Adanya tambahan gugus glikosida memberi flavonoid karakteristik farmakokinetik yang berbeda, yaitu absorpsi yang lebih cepat, konsentrasi plasma lebih tinggi, dan bertahan lebih lama di sirkulasi. Dalam aplikasi flavonoid sebagai terapi pada manusia, penelitian flavonoid lebih banyak pada bentuk aglikonnya karena mode pemberian terutama melalui oral yang melibatkan perubahan flavonoid glikosida menjadi bentuk aglikon oleh enzim permukaan enterosit atau flora normal.

2.6.5.1 Struktur dan karakteristik afzelin

Afzelin mempunyai nama lain yaitu *kaempferol 3-O-alpha-rhamnoside*; *kaempferol 3-O-alpha-L-rhamnopyranoside*; atau *kaempferol-3-rhamnoside*, dengan rumus kimia $C_{21}H_{20}O_{10}$. Afzelin memiliki berat molekul 432,381 gram/mol, dengan jumlah ikatan hidrogen donor 6, dan ikatan hidrogen akseptor 10, serta ikatan yang dapat berotasi 3. Afzelin tidak memiliki muatan elektrik (Pubchem-*compound summary for CID5316673*, diakses pada 04 Nopember 2016).



Gambar 2.13 Struktur Afzelin

Sumber : Pubchem Open Chemistry Database. Compound summary for CID5316673. National center of biotechnology information-US. Diakses pada 04 Nopember 2016.

2.6.5.2 Sumber afzelin

Afzelin terdapat pada setidaknya 56 tumbuhan (KNAPSACK, 2016). Walaupun belum ada pembahasan spesifik membahas tentang afzelin pada bagian tertentu tumbuhan, afzelin mungkin bisa ditemukan pada semua bagian tumbuhan terutama yang berperan pada fotosintesis, sebagaimana halnya flavonoid secara umum (Shashank dan Abhay, 2013).

2.6.5.3 Potensi sebagai obat

Pada kultur sel kanker prostat yang sensitif androgen, Afzelin meningkatkan apoptosis melalui aktivasi *caspase cascade* (Halimah *et al.*, 2015). Kemampuan Afzelin menghambat *caspase cascade* juga diperlihatkan pada kanker payudara subtipe reseptor estrogen positif (Diantini *et al.*, 2012). Pada kedua penelitian tersebut, afzelin sebagai metabolit aktif teridentifikasi melalui pengekstrakan bertingkat dari daun *Schima walichii* (pohon puspa) yang sebelumnya menunjukkan fraksi etil asetat memiliki anti proliferasi yang paling kuat. Dosis IC₅₀ afzelin dalam penghambatan proliferasi MCF-7 adalah 227 μ M dan pada LNCaP adalah 218 μ M (Diantini *et al.*, 2012; Halimah *et al.*, 2015;). Efek sitotoksik pada sel normal diujikan pada sel hepatosit normal HC-04, yang

menunjukkan inhibisi proliferasi pada IC50 448 μ M (Diantini *et al.*, 2012). Tetapi pada penelitian Smith *et al.*, (2005), Afzelin tidak mempunyai efek toksik pada sel payudara normal (MCF-10A). Perbedaan ini mungkin dipengaruhi oleh sensitivitas yang berbeda pada sel yang berbeda.

Kemampuan penghambatan kanker oleh Afzelin juga ditunjukkan pada hambatan proliferasi dan siklus sel kanker prostat baik yang sensitif androgen (LNCaP) ataupun tidak (PC-3) (Zhu *et al.*, 2015). Pada penelitian ini digunakan Afzelin standar, dan hambatan proliferasi terjadi pada konsentrasi 1 dan 10 μ g/ml. Penghambatan proliferasi diduga karena hambatan beberapa properti yang berhubungan erat dengan fungsi sitoskeleton aktin, yaitu enzim LIM (*Lin-11, Isl-1 and Mec-3*) domain kinase 1 (LIMK 1), *Rho GTPase myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase α* (MRCK α), dan *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase* (ROCK)1 dan ROCK2 (Zhu *et al.*, 2015), sehingga hambatan siklus sel oleh afzelin secara bersamaan juga menghambat motilitas sel.

Flavonol glikosida yang diisolasi dari *Forstenia refracta* dan diberi nama SL0101, identik dengan afzelin. Isolat ini mampu menghambat secara spesifik kinase jenis *p90 ribosomal S6 kinase* (RSK) (Smith *et al.*, 2005), pada domain N-terminal-nya. SL0101 mampu menghambat proliferasi sel kanker payudara dan prostat, dan tidak menunjukkan hambatan pada sel non kanker (Clark *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005). Penelitian ini menunjukkan bahwa obat anti kanker dapat dikembangkan dari flavonol glikosida.

Tabel 2.6 Potensi afzelin sebagai obat

No.	Jenis	Kemampuan	Indikator	Keterangan
1	Anti kanker	Menghambat proliferasi melalui hambatan <i>caspase cascade pathway</i> , pada LNCaP sel kanker prostat	Meningkatkan regulasi <i>caspase-3, -8, dan -9</i> ; dan protein <i>poly (ADP-ribose) polymerase</i>	Halimah <i>et al.</i> , 2014
2.	Anti kanker	Menghambat proliferasi melalui hambatan <i>caspase cascade pathway</i> , pada MCF7 kanker payudara	Aktivasi <i>caspase-9, caspase-3</i> dan PARP	Diantini <i>et al.</i> , 2012
3.	Anti kanker	Menhambat proliferasi dan siklus sel kanker prostat baik yang sensitif androgen (LNCaP) ataupun tidak (PC-3)	Hambatan beberapa properti yang berhubungan erat dengan fungsi sitoskeleton aktin, yaitu enzim <i>LIM (Lin-11, Isl-1 and Mec-3) domain kinase 1 (LIMK 1)</i> , <i>Rho GTPase myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase α (MRCKα)</i> , dan <i>Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK)1</i> dan ROCK2	Zhu <i>et al.</i> , 2015
4.	Anti kanker	Diistilahkan SL1010 yang diisolasi dari <i>Forstenia refracta</i> . Mampu menghambat proliferasi MCF-7, tetapi tidak mempengaruhi MCF-10A (sel payudara normal).	Melalui hambatan <i>p90 ribosomal S6 kinase (RSK)</i> , yaitu keluarga protein <i>kinase serine/threonine</i> , yang adalah efektor <i>downstream</i> dari <i>mitogen-activated protein kinase (MAPK)</i> .	Smith <i>et al.</i> , 2005
5.	Melano-genesis	Meningkatkan kandungan melanin dan aktivitas tirosinase (melanogenesis).	Mekanismenya melalui peningkatan transkripsi MITF (<i>microphthalmia-associated transcription factor</i>), tirosinase dan <i>tyrosinase-related protein (TRP)-1</i> . Peningkatan MITF melalui fosforilasi <i>p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)</i> yang independen terhadap <i>cyclic adenosine monophosphate (cAMP)</i> -protein kinase A (PKA) persinyalan.	Jung <i>et al.</i> , 2016
6.	Anti UVB	Mempunyai efek fotoprotektif melalui proteksi DNA, anti oksidan, dan anti inflamasi, serta aktivitas absorpsi UV.	Menghambat peningkatan peroksidasi lipid dan pembentukan dimer <i>cyclobutane pyrimidine</i> akibat sinar UVB, menghambat sinyal intrinsik apoptosis, dan menghambat pelepasan mediator pro inflamasi seperti IL-6, TNF alfa, dan prostaglandin E2,	Shin <i>et al.</i> , 2013

			dan mempengaruhi jarak p38.	
7	Hepatoprotektif	Afzelin memperbaiki survival rate dan menurunkan alanine aminotransferase serum dan sitokin pro inflamasi pada tikus yang dipapar GalN/LPS	Afzelin menghambat kerusakan mitokondria, yang ditandai penurunan pembengkakan mitokondria dan aktivitas glutamate dehydrogenase mitokondria. Meningkatkan biogenesis mitokondria yang ditandai oleh peningkatan <i>peroxisome proliferator activated receptor-γ coactivator 1 α</i> , <i>nuclear respiratory factor 1</i> , dan <i>mitochondrial transcription factor A</i> . menurunkan <i>mitophagy-related proteins</i> , Parkin dan <i>PTEN-induced putative kinase 1</i> .	Lee et al., 2016
8	Hepato protektif	Menghambat inflamasi akut pada hepar tikus yang dipapar GalN/LPS	Menurunkan produksi TNF-α dan nitrite/nitrate pada <i>LPS-stimulated RAW264.7 macrophages</i> , menghambat fosforilasi IκBα dan p38MAPK, dan <i>DNA binding activity</i> NF-κB pada sel RAW264.7.	Xie et al., 2014 Utepbergenov dan Derewendra, 2013 Utepbergenov et al., 2012
9.	Antiplasmodial	Menghambat pertumbuhan <i>Plasmodium falciparum</i> yang resisten kloroquin	Menghambat pertumbuhan.	Barliana et al., 2014
10.	Anti leishmania	Membunuh <i>Leishmania</i>	Penurunan jumlah sel makrofag yang terinfeksi <i>Leishmania</i> , <i>in vitro</i>	Muzitano et al., 2006
11	Anti bakteri	Mempunyai kemampuan inhibisi dan bakterisidal, dengan kecenderungan ke arah bakterisida	Mempunyai MIC dan MMC terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Candida albicans</i> . Gugus rhamnosa meningkatkan kemampuan inhibisi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Joel et al., 2012 Lee et al., 2014
12.	Gastroprotektif	Mempunyai efek gastroprotektif terhadap ulkus gaster yang diinduksi oleh ethanol HCl	Penurunan area ulkus, aktivitas myeloperoksidase, aktivitas H ⁺ , K ⁺ - ATPase	De Barros et al., 2016
13.	ACE inhibitor	Mempunyai kemampuan menghambat ACE <i>in vitro</i>	Penurunan aktivitas ACE	Hasen et al., 1996

14	Anti asma	Mengatasi hiperesponsivitas respirasi pada BALB/C yang diinduksi ovalbumin dan allergen inflasi	Penurunan infiltrasi eosinophil, inflamasi saluran napas, hiperesponsivitas saluran napas. Mekanismenya penurunan sitokin Th2, melalui inhibisi faktor transkripsi <i>GATA-binding protein-3</i> yang merupakan sitokin produksi dan diferensiasi Th2.	Zhou dan Nie, 2015
----	-----------	---	---	--------------------

Pemberian afzelin dapat menghasilkan efek stimulasi dan inhibisi terhadap protein yang berbeda. Pada penelitian terhadap LIMK, MRCKa, ROCK1 dan ROCK2, afzelin tidak menurunkan ekspresi protein tersebut, tetapi menghambat aktivasinya yang ditunjukkan oleh penurunan bentuk terfosforilasinya (Zhu *et al.*, 2015). Efek yang berbeda terjadi pada *caspase*, pemberian afzelin menyebabkan peningkatan ekspresi *caspase 3* dan *caspase 9*, disertai dengan peningkatan aktivasi PARP sebagai penanda meningkatnya apoptosis (Halimah *et al.*, 2015; Diantini *et al.*, 2012).

Penelitian ekspresi *caspase 3* dan *caspase 9* dilakukan pada dua kanker yang berbeda yaitu sel kultur MCF7 yang merupakan kanker payudara yang mengekspresikan ER dan PR (Diantini *et al.*, 2012), dan sel kultur LNCaP yang merupakan kanker prostat yang sensitif androgen (Halimah *et al.*, 2015). Klaim penelitian pertama bahwa afzelin meningkatkan ekspresi *caspase-3* perlu dikaji ulang, karena faktanya MCF-7 tidak mengekspresikan *caspase-3* akibat adanya deleksi 47 base pair dalam exon 3 gen *caspase-3* (Janicke *et al.*, 1998). Walaupun mungkin dapat ditingkatkan ekspresinya tetapi yang dihasilkan adalah *caspase 3* mutan dengan berat molekul yang berbeda dengan *caspase-3 wild type* akibat adanya deleksi. Dalam penelitian ini juga disimpulkan bahwa afzelin dapat meningkatkan ekspresi *caspase 9* dan pecahannya (*cleavage*). Peningkatan ekspresi *caspase-9* pada MCF-7 menginduksi apoptosis yang independen terhadap

caspase-3, dan dapat diinduksi oleh stimulus TNF, sitokrom c, Fas, *staurosporin*, atau agen modulator estrogen seperti tamoksifen dan mifepristone (Lu *et al.*, 2004).

Pada LNCaP, dosis tinggi afzelin (218 μ M) meningkatkan ekspresi *caspase-9* (Halimah *et al.*, 2015), yang mungkin diikuti dengan aktivasi berbagai protein *downstream* termasuk salah satunya adalah ROCK-1 (Logue dan Martin, 2008). Pada dosis rendah (1 – 10 μ M), afzelin menyebabkan hambatan proliferasi MCF-7 dan penurunan aktivasi ROCK1 (Zhu *et al.*, 2015). Penelitian Utebbergenov (2012) menunjukkan isoform afzelin, SL0101, mampu menghambat secara spesifik p90 ribosomal S6 kinase (RSK) yang merupakan substrat dari *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)1/2. Inhibisi RSK pada MCF-7 menghambat ekspresi *cyclin D1*, yang selanjutnya menahan sel di fase G1. Stimulasi RSK pada sel hepar menyebabkan hambatan langsung pada *caspase cascade*. Selain itu, subtype RSK2 memediasi peran prometastatik ERK dan RSK1 memediasi p27kip1 untuk inhibisi RHOA dan menurunkan adhesi sel melalui fosforilasi integrin β 4, sehingga inhibisi RSK 1 dan 2 kemungkinan menghambat metastasis (Lara *et al.*, 2013).

Kemampuan afzelin terhadap protein yang bekerja pada regulasi aktin ditunjukkan pada hambatan LIMK, ROCK 1 dan 2, dan MRCK α . Protein LIMK sebagai enzim efektor yang diaktifkan oleh ROCK 1 atau MRCK α . MRCK merupakan efektor dari Cdc42 dan RhoA (Zhu *et al.*, 2015). Ketiganya merupakan enzim *serine threonine kinase* seperti halnya RSK.

2.7 Penelitian *in vitro* kanker payudara

Cancer cell line atau sel kultur kanker telah digunakan secara luas dalam penelitian dan menjadi model yang tepat untuk mempelajari mekanisme biologi kanker (Louzada *et al.*, 2012). Sel kultur kanker digunakan untuk mendapat informasi tentang perubahan regulasi genetik, epigenetik dan jaras sinyal.

pengembangan obat anti kanker (Nakanatsu *et al.*, 2005), dan sebagai alternatif untuk transplan tumor pada hewan (Shoemaker, 2006). Hasil penelitian pada sel kultur kanker biasanya sejalan dengan tumor *in vivo* dan peran pentingnya sebagai model dalam pengujian obat dan penelitian translasional diakui oleh perusahaan biomedis dan farmasi (Gazdar *et al.*, 2010).

Sel kultur kanker mempertahankan kesamaan genomik dengan tumor asalnya, baik dalam hal abnormalitas kromosom, karakteristik morfologis dan molekuler, dan secara umum menjaga “*hallmark of cancer*”, kecuali angiogenesis karena memerlukan adanya jaringan stroma (Gazdar *et al.*, 2010). Selain itu Finlay dan Baguley (1984) mendemonstrasikan sel kultur kanker memberi respon yang sama terhadap obat anti kanker bila dibanding tumor asal.

Model penelitian kanker baik *in vitro* menggunakan sel kultur atau tumor primer, atau *in vivo* pada hewan coba atau manusia, memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing dan tidak ada satu pun yang secara sempurna merepresentasikan fenotip dan genotip tumor. Keuntungan penggunaan sel kultur dalam penelitian adalah mudah ditangani dan dimanipulasi secara genetik dan epigenetik, sangat homogen, mudah direplikasi (Burdall *et al.*, 2003), pada turunan awal sangat mirip dengan tumor asal, kompleksitasnya rendah karena tidak ada lingkungan makro dan mikro (Tomlinson *et al.*, 1998), tersedia banyak variasi sel kultur walaupun karakterisasi-nya rendah (LaCroix dan Leclercq, 2004), dan hasilnya mudah diuji reliabilitasnya pada kondisi yang sama (van Staveren *et al.*, 2009). Kesulitan dalam penggunaan sel kultur terutama disebabkan karena sebagian besar berasal dari kanker progresif dan metastatik yang genomiknya tidak stabil, sehingga cenderung mengalami evolusi seiring semakin lamanya periode kultur, termasuk modifikasi jaras sinyal. Selain itu, sel kultur dapat mengalami kontaminasi oleh sel kultur lain terutama HeLa atau mikoplasma (van Staveren, 2009). Sel kultur juga memiliki keterbatasan berupa lingkungan kultur

sel berbeda dengan tumor asal dan tidak adanya heterogenitas alami pada tumor (Vargo-Gogola dan Rosen, 2007).

Sel kultur lebih berharga sebagai model *in vitro* pada penelitian kanker bila diketahui karakter molekulernya. Pengetahuan ini berguna dalam analisis peristiwa genetik/epigenetik seperti gen kunci dan perubahan metilasi DNA, dan dapat memahami perkembangan evolusi tumor saat *profiling* molekuler dilakukan pada turunan yang berbeda (Louzada *et al.*, 2012), serta mengetahui pola molekuler yang berhubungan dengan resistensi dan sensitivitas terhadap obat anti kanker (Fang *et al.*, 2009). Selain itu, karakter sel kultur yang berhubungan dengan kemampuan perlekatan pada medium penting untuk diketahui, karena menunjukkan potensi migrasi dan invasi yang berguna untuk menentukan gen dan jaras pada metastasis. Karakter amplifikasi DNA juga penting diketahui, karena overekspresi gen dapat berhubungan dengan proses onkogenik, dan dapat menjadi target terapi (Kao *et al.*, 2009).

Setidaknya terdapat 27 sel kultur jenis TNBC yang sering dijadikan model penelitian. Sel kultur TNBC yang paling tua adalah BT20, yang didapat dari efusi pleura di tahun 1950, dan yang paling banyak dipelajari misalnya MDA-MB231, didapat pada tahun 1970-an. Beberapa sel kultur yang layak mewakili TNBC dan sering digunakan adalah HCC38, HCC70, HCC1937, MDA-MB-468, MDA-MB-231, dan HCC1806 (Volk-Draper *et al.*, 2012).

Sel kanker MDA-MB 231 merupakan model TNBC yang paling sering digunakan termasuk dalam subtype basaloid (Neve *et al.*, 2006). Bila dibanding dengan sel kultur TNBC lainnya, MDA-MB 231 paling banyak dipelajari pola pertumbuhannya pada lokasi orthotopik *in vivo*, termasuk penilaian kinetik, beban, dan distribusi organ pada metastasis spontan (Volk-Draper *et al.*, 2012). Berdasar pengamatan imunohistokimia, MDA-MB 231 menunjukkan ekspresi ER/PR/HER2

negatif, ekspresi Ki-67 yang sangat tinggi (100%), dan ekspresi androgen reseptor (AR) yang cukup tinggi (Subik *et al.*, 2010).

2.8 Pendekatan dalam mendeteksi protein dan fosfo-protein

Sekitar 40% protein pada sel eukariotik merupakan subyek fosforilasi. Katalis fosforilasi adalah protein kinase yang mentransfer grup fosfat dari ATP ke residu serine, threonin, atau tirosin pada substrat protein, sehingga secara langsung mempengaruhi aktivitas dan fungsi target. Modifikasi *post-translational* ini mengatur berbagai aktivitas seluler, termasuk siklus, diferensiasi, metabolisme, dan komunikasi sel. Dalam menilai protein dan fosforilasinya, metode yang dipilih tergantung pada berbagai faktor, termasuk pertanyaan penelitian dan ketersediaan alat atau bahan (Sefton *et al.*, 1996).

2.8.1 Western blot

Western blot merupakan metode yang paling sering digunakan untuk menilai kondisi fosforilasi suatu protein. Setelah pemisahan sampel biologis dengan *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dan lalu ditransfer ke membran (biasanya *polyvinylidene fluoride* (PVDF) atau nitroselulosa), suatu antibodi yang spesifik untuk protein atau fosfo-protein dapat digunakan untuk deteksi. Banyak antibodi spesifik fosfo-protein yang cukup sensitif mendeteksi protein terfosforilasi pada sampel, misalnya 10-30 µg ekstrak seluruh sel. Karena jumlah penghitungan fosfo-protein dapat berubah saat perlakuan atau kesalahan *loading*, biasa digunakan antibodi yang mendeteksi seluruh protein tanpa memperhatikan kondisi fosforilasinya (*cognate protein*), untuk penetapan fraksi fosforilasi relatif terhadap fraksi total sekaligus sebagai kontrol *loading internal*.

2.8.2 *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Metode ELISA telah menjadi pilihan metode yang utama untuk mengukur fosforilasi protein. ELISA lebih kuantitatif dibanding *Western blotting*. Format untuk pengujian berbasis *micro-plate* ini biasanya memanfaatkan *capture* antibodi spesifik untuk protein yang diinginkan, tanpa melihat kondisi fosforilasinya. Protein target, baik yang dimurnikan atau komponen dalam sampel heterogen yang kompleks seperti lisat sel, diikat pada *plate* yang telah dilapisi antibodi. Sebuah antibodi deteksi khusus untuk protein atau fosfor-protein target kemudian ditambahkan. Tes ini biasanya dirancang menggunakan deteksi kolorimetri atau fluorometrik. Intensitas sinyal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi terfosforilasi protein dalam sampel.

Teknik ELISA spesifik fosfo-protein memberi beberapa keunggulan dibandingkan *immunoblotting* tradisional dalam pengukuran fosforilasi protein. Pertama, hasilnya mudah diukur dengan memanfaatkan standar kalibrasi. Kedua, spesifisitas tinggi karena penggunaan dua antibodi spesifik untuk protein target yang digunakan bersama-sama dalam format *Sandwich*. Ketiga, sensitivitas yang lebih tinggi karena ELISA memungkinkan untuk volume sampel yang lebih kecil dan deteksi protein konsentrasi rendah.

2.8.3 *Flow Cytometry intrasel* dan *immunocytochemistry/immunohistochemistry (ICC/IHC)*

Teknik tradisional *flow cytometry* intraseluler dan ICC/HIS merupakan metode yang kuat untuk mendeteksi fosfo-protein (Zell *et al.*, 2001; Willinger *et al.*, 2005). *Flow cytometry* menggunakan laser untuk mengeksitasi fluorokrom yang digunakan dalam deteksi antibodi. Seperangkat filter dan fluorokrom dengan spektrum yang tidak overlap harus dipilih dengan seksama untuk dapat menilai berbagai protein dalam sel yang sama (Kruzik *et al.*, 2004). Kelebihan *flow cytometry* adalah cepat, kuantitatif, dan dapat mengamati sel tunggal. Protein

dapat dideteksi dalam tipe sel tertentu pada populasi sel yang heterogen, melalui marker permukaan sel, tanpa perlu memisahkan sel. Dengan cara ini, populasi sel yang sedikit dan jarang dapat dianalisis, tanpa khawatir terlewat atau ekspresi protein berubah saat proses pemilahan.

Metode ICC biasanya merujuk pada deteksi protein menggunakan mikroskop pada sel kultur, sedangkan IHC adalah deteksi protein pada potongan jaringan utuh. Seperti *flow cytometry*, ICC/IHC membolehkan penilaian beberapa protein dalam sel atau jaringan, dengan memperhatikan agar tidak terjadi overlap spektra atau warna fluoresen. Berbeda dengan metode lain, ICC/IHC biasanya ditujukan untuk menetapkan lokalisasi intraseluler protein. *Flow cytometry* maupun ICC/IHC memerlukan antibodi dengan spesifisitas tinggi, langkah *blocking*, kontrol, dan titrasi antibodi untuk menghindari hasil yang rancu akibat ikatan non-spesifik (Krutzik *et al.*, 2004).

Deteksi protein dan fosfo-protein oleh *flow cytometry* dan ICC memerlukan protein yang stabil dan dapat diakses antibodi. Biasanya sel distimulasi dan difiksasi dengan formaldehid atau paraformaldehid untuk menstabilkan protein. Setelah itu, permeabilitas sel ditingkatkan sehingga antibodi dapat masuk ke dalam sel. Untuk peningkatan permeabilitas dapat menggunakan deterjen untuk protein sitoplasmik atau alkohol untuk protein di dalam nukleus (Krutzik *et al.*, 2004).

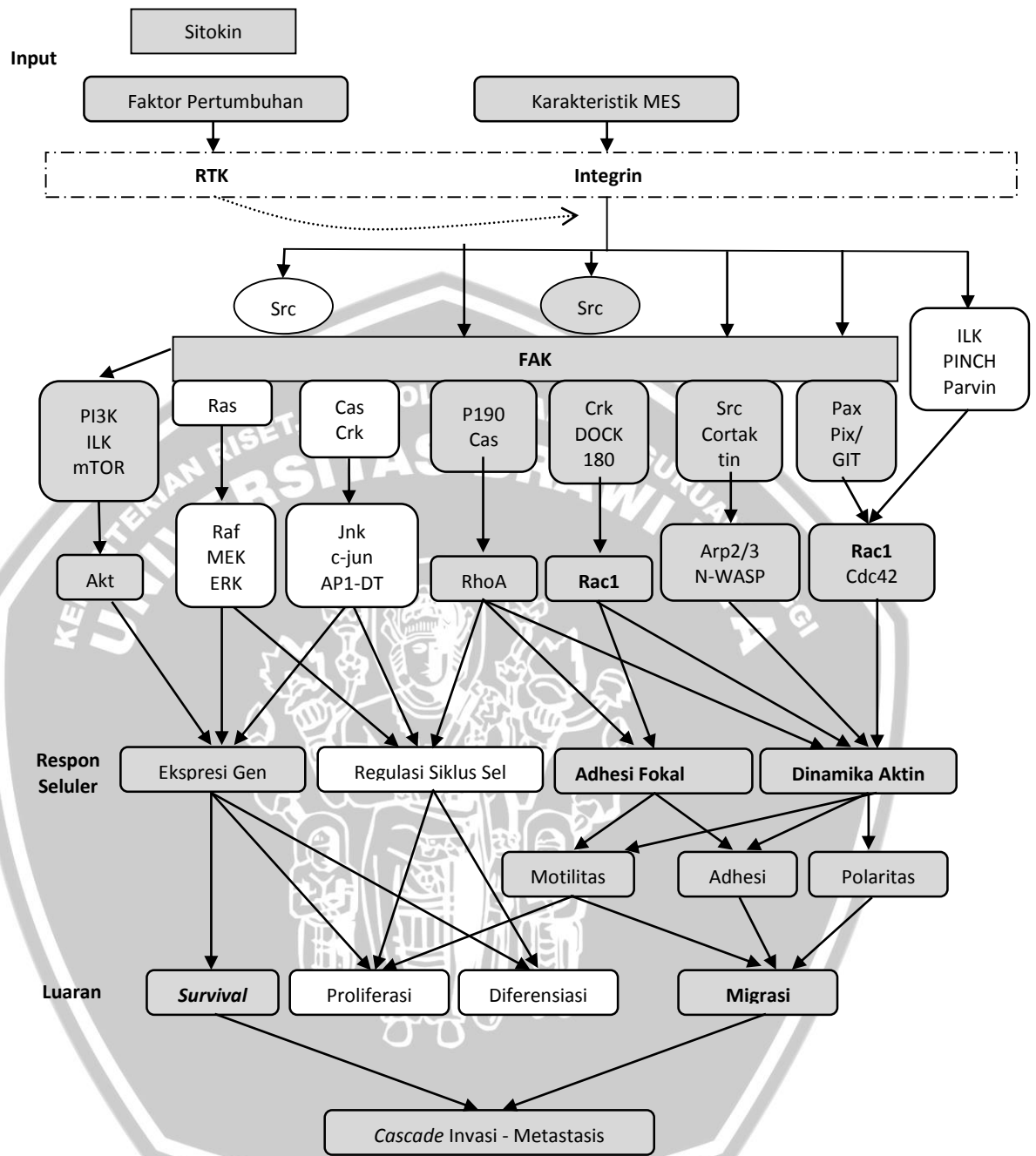
2.8.4 Mass Spectrometry

Penilaian menyeluruh fosforilasi protein dalam sampel biologis, seperti lisat sel, penting untuk memahami jejaring persinyalan. Analisis fosfo-protein skala besar dalam campuran protein kompleks melibatkan identifikasi fosfo-protein, fosfopeptida dan residu terfosforilasi. *Mass spectrometry* (MS) dirancang untuk mengerjakan tugas tersebut, Walaupun MS sensitif mendeteksi protein tunggal,

tetapi kesulitannya adalah sinyal fosfo-protein cenderung lebih lemah karena bermuatan negatif dan kurang dapat diionisasi oleh *elektrospray* MS, yang dijalankan dalam mode positif (Mann *et al.*, 2002). Selain itu, observasi sinyal dari fosfo-protein yang sedikit dengan latar belakang protein non-terfosforilasi yang sangat banyak, lebih sulit (Steen *et al.*, 2002).



2.9 Kerangka Teori

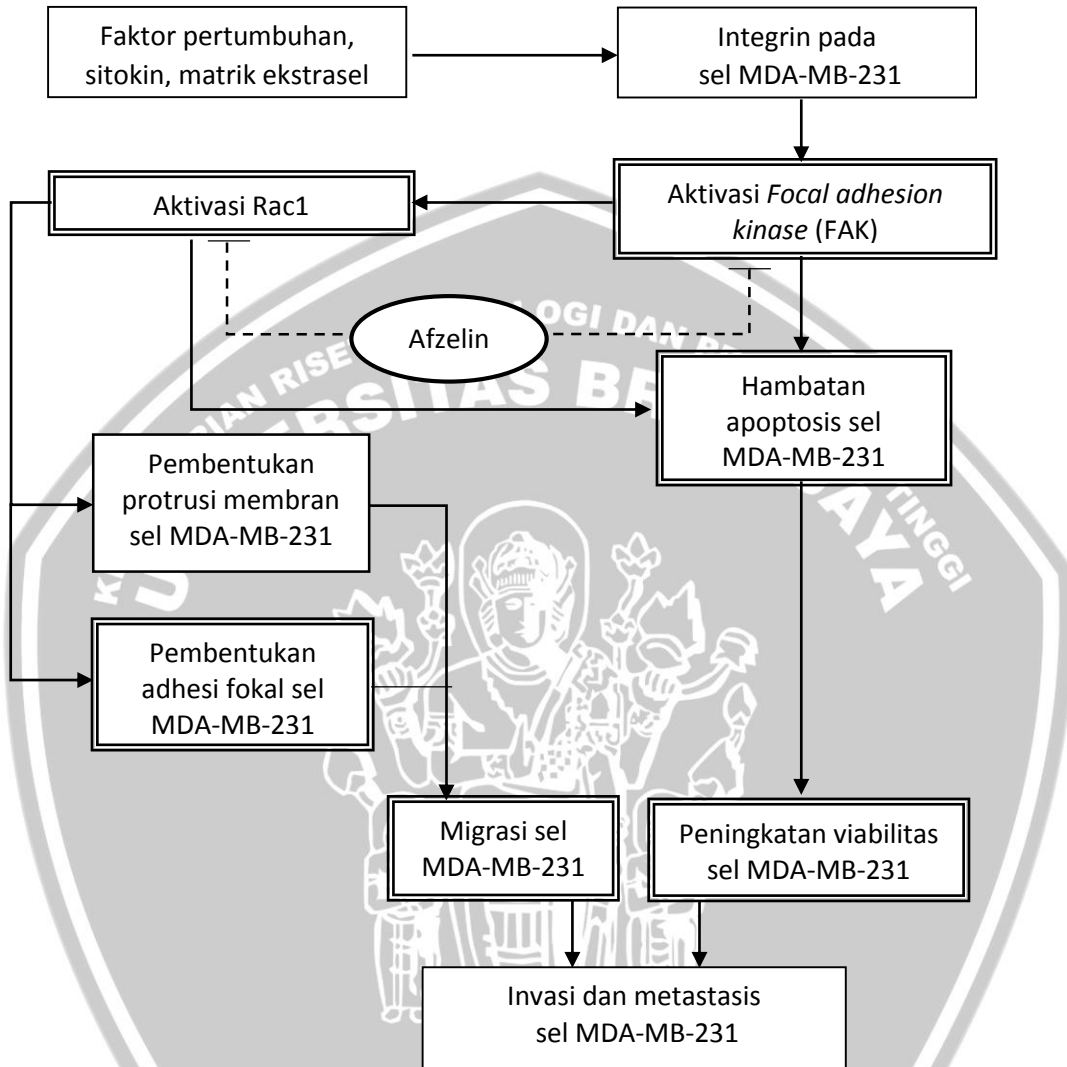


Gambar 2.14 Bagan kerangka teori.

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka konsep



Gambar 3.1 Bagan kerangka konsep.

Bagan ini menjelaskan bahwa stimulan berupa faktor pertumbuhan, sitokin, dan karakteristik matrik ekstrasell memicu migrasi dan *survival* sel MDA-MB-231, sebagai bagian proses invasi dan metastasis. Penghambatan migrasi sel oleh afzelin diprediksi melalui penurunan aktivasi FAK dan Rac1 pada sel MDA-MB-231, yang akan menghambat migrasi sel dan meningkatkan apoptosis sel MDA-MB-231. Dalam penelitian ini, variabel bebas adalah afzelin (○) dan variabel terikat adalah migrasi sel, apoptosis sel, viabilitas sel, pembentukan *focal adhesin*, aktivasi FAK, dan aktivasi Rac1 (□). Variabel terikat utama adalah hambatan migrasi dan peningkatan apoptosis sel MDA-MB-231 yang dikonfirmasi oleh viabilitas sel. Sedangkan aktivasi FAK, aktivasi Rac1, dan pembentukan *focal adhesin* berperan sebagai variabel *intermediate* yang merupakan bagian dari jalar terjadinya migrasi sel MDA-MB-231.

3.1 Penjelasan kerangka konsep

Migrasi sel TNBC distimulasi oleh faktor pertumbuhan misalnya EGF, IGF, HGF, dan TGF beta; sitokin misalnya IL-6, IL-11 dan IL-8, TNF alfa, NFkB; hipoksia dan MES yang lunak. Stimulasi ini mengaktifasi integrin sehingga terjadi perubahan konformasi yang mempengaruhi afinitas terhadap ligand dan peningkatan aviditas karena pembentukan kluster integrin. Integrin teraktivasi menstimulasi kompleks protein untuk membentuk FA, dengan komponen kuncinya yaitu FAK. Aktivasi FAK menginduksi serangkaian sinyal transduksi yang mengaktifasi *Rho-GTPase*, salah satunya adalah Rac1 yang berperan dalam regulasi protrusi membran sel tipe lamellipodia yang berguna untuk pergerakan maju sel secara mesenkimal. Rac1 menginduksi pembentukan adhesi yang stabil, yang mendukung ketegangan sel sehingga kontraktilitas dan tarikan *actomyosin* dapat terjadi dan sel dapat berpindah tempat. FAK juga mengontrol *turn over* FA, melalui mekanisme defosforilasi yang kemudian diikuti proteolisis komponen adhesi lainnya.

Peningkatan ekspresi FAK dan Rac1 tidak hanya berhubungan dengan kemampuan migrasi sel kanker, tetapi juga dengan penurunan apoptosis pada sel kanker. Domain FERM FAK dapat berikatan menstimulasi protein anti-apoptotik dan mengikat protein pro-apoptotik. Ekspresi berlebihan Rac1 juga menghambat apoptosis, diduga melalui kemampuannya memicu fosforilasi protein pro-apoptotik sehingga menghalangi proses apoptosis di mitokondria.

Pemberian afzelin pada sel kultur MDA-MB-231 diprediksi dapat menghambat migrasi dan meningkatkan apoptosis sel melalui hambatan aktivasi FAK yang mengakibatkan hambatan perekrutan dan aktivasi Rac1. Walaupun demikian afzelin diduga mempunyai kemampuan menghambat aktivasi Rac1 secara langsung. Penghambatan afzelin terhadap kedua protein ini dapat diperkuat oleh pengamatan di tingkat seluler berupa pembentukan AF terhambat.

Apabila tahap pembentukan adhesi sel dihambat, maka migrasi sel kultur MDA-MB-231 akan terhambat. Hambatan migrasi sel yang merupakan properti utama dalam *cascade* invasi–metastasis, akan menyebabkan hambatan pada sebagian besar tahapan *cascade* tersebut. Kemampuan afzelin dalam meningkatkan apoptosis akan memperkuat efek hambatan invasi-metastasis sel MDA-MB-231.

3.2 Hipotesis penelitian

Dalam penelitian ini, konsisten dengan rumusan masalah dan tujuan penelitian diajukan enam hipotesis kerja minor (nomor 1-6) dan dua hipotesis kerja (H1) mayor (nomor 7-8) dan yaitu

1. Afzelin menurunkan viabilitas sel kanker payudara MDA-MB-231.
2. Afzelin menurunkan migrasi sel kanker payudara MDA-MB-231.
3. Afzelin meningkatkan apoptosis sel kanker payudara MDA-MB-231.
4. Afzelin menurunkan pembentukan *focal adhesion* pada sel kanker payudara MDA-MB-231.
5. Afzelin menurunkan aktivasi FAK pada sel kanker payudara MDA-MB-231.
6. Afzelin menurunkan aktivasi Rac1 pada sel kanker payudara MDA-MB-231.
7. Afzelin menurunkan migrasi sel kanker payudara MDA-MB-231, melalui penurunan aktivasi FAK dan Rac1.
8. Afzelin meningkatkan apoptosis sel kanker payudara MDA-MB-231, melalui penurunan aktivasi FAK dan Rac1.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental, dengan rancangan penelitian *post test only with control group design*. Penelitian dilakukan pada subyek sel kultur MDA-MB-231 sebagai model TNBC. Pada subyek tersebut diujikan kemampuan afzelin terhadap hambatan migrasi sel dan peningkatan apoptosis.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Sentral Biomedik dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya. Waktu pelaksanaan penelitian adalah Oktober 2018 hingga Agustus 2019, mulai dari penelitian pendahuluan dengan *in silico*, persiapan alat dan bahan hingga pengambilan data.

4.3 Subyek Penelitian

Penelitian menggunakan subyek sel kanker payudara MDA-MB-231 yang merupakan jenis sel kultur TNBC yang paling sering digunakan dalam penelitian. Kelompok perlakuan dibagi dalam 5 kelompok, terdiri dari kelompok kontrol pelarut dan perlakuan 4 (empat) konsentrasi yaitu 100, 200, 400, dan 800 $\mu\text{g/ml}$.

4.4 Variabel penelitian

4.4.1 Klasifikasi variabel

- Variabel bebas : afzelin
- Variabel terikat : migrasi sel, apoptosis sel, viabilitas sel
- Variabel *intermediate*: aktivasi FAK, aktivasi Rac1 dan *focal adhesion*.

4.4.2 Definisi operasional variabel

- a. Afzelin adalah metabolit sekunder *kaempferol 3-O-alpha-L-rhamnoside* dengan kemurnian kandungan $\geq 98\%$ (Chemfaces®, diakses pada Oktober 2019).
- b. Sel MDA-MB-231 adalah sel kultur TNBC yang berasal dari efusi pleura wanita kaukasia (51 tahun) pasien *M. D. Anderson Cancer Center* (1973). Sel ini memiliki morfologi adenokarsinoma dengan diferensiasi *grade 3* dan karakteristik molekuler basal tipe B. Secara *in vitro*, MDA-MB-231 sangat invasif dan aktivitas dalam *assay* kemoinvasi dan kemotaksis dalam ruang Boyden sangat tinggi (Chavez, Garimella and Lipkowitz, 2012).
- c. Konsentrasi (dosis) adalah banyaknya afzelin dalam dimetilsulfoksida (DMSO) yang diberikan pada kultur sel MDA-MB-231, dengan konsentrasi 100, 200, 400, dan 800 $\mu\text{g/ml}$.
- d. Kontrol negatif adalah kelompok dari kultur MDA-MB-231 yang hanya diberikan perlakuan pelarut DMSO (sebagai vehikel dalam penelitian ini) yang digunakan sebagai pembandingan negatif. Pengukuran parameter pada kelompok kontrol ini ditetapkan sebagai 100% (Zhai *et al.*, 2015).

- e. Migrasi sel adalah kemampuan sel berpindah untuk mengisi ruang bebas sel, yang dihitung berdasar persentase area terisi sel dan jumlah sel yang berpindah pada jam ke-24 dan 48 sejak dilakukan goresan dan diberi perlakuan.
- f. Apoptosis sel adalah kematian sel terprogram, yang diukur secara semikuantitatif berdasar perpindahan lokasi fosfatidilserin ke bagian luar membran sel yang di-tag dengan Annexin V/PI melalui pengukuran *flow cytometry*, Hasil yang didapat dalam prosentase. Pengamatan dilakukan pada jam ke-24 setelah paparan dengan afzelin atau vehikel.
- g. Indeks apoptosis Persentase sel yang teramati sebagai annexin v positif dan annexin V/PI positif, yaitu pada kuadran kanan atas dan bawah pada interpretasi *flow cytometry*.
- h. Viabilitas sel Jumlah sel yang viabel setelah perlakuan afzelin atau vehikel, yang direfleksikan oleh aktivitas metabolik sel (enzim *NAD(P)H-dependent cellular oxidoreductase*), diukur melalui MTT kolorimetrik.
- i. Kadar ekspresi FAK adalah kuantitas ekspresi FAK pada sel MDA-MB-231, yang dikumpulkan 24 jam setelah paparan dengan variasi dosis afzelin atau vehikel, diukur melalui metode *Western Blotting* menggunakan antibodi monoklonal anti FAK.

- j. Kadar FAK adalah kuantitas FAK yang telah teraktivasi melalui teraktivasi (p-FAK fosforilasi Tyr397 dalam sel MDA-MB-231 setelah 24 jam paparan dengan variasi dosis afzelin atau vehikel, diukur melalui metode *Western Blotting* menggunakan antibodi poliklonal anti phospho-FAK.
- k. Aktivasi Rac1 adalah kuantitas Rac1 yang mengikat GTP, yang dikumpulkan 24 jam setelah paparan dengan variasi dosis afzelin dan vehikel, diukur melalui metode G-LISA berbasis kolorimetrik menggunakan antibodi anti Rac1, dengan satuan hasil *arbitrary unit*.
- l. *Focal adhesion* adalah kompleks protein yang menghubungkan sitoskeleton dengan MES, yang ditandai oleh kumpulan vinculin pada tepi sel. *Focal adhesion* pada MDA-MB-231 dideteksi secara imunofluoresen menggunakan antibodi primer anti-vinculin, *FITC-conjugated* antibodi sekunder, dan *TRITC-conjugated phalloidin*. Fiksasi dan pewarnaan dilakukan 24 jam setelah paparan dengan variasi dosis afzelin dan vehikel.

4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

- Afzelin diperoleh dari Chemfaces®
- Sel kanker payudara MDA-MB-231 diperoleh dari ATCC®
- Kultur sel MDA-MB-231: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose, Fetal Bovine Serum (FBS)*, L-glutamin, Penisilin, Streptomisin, Amphotericin B, Trypsin-EDTA 0,25% (GIBCO®).

- d. Persiapan senyawa uji : *dimethyl sulfoxide (DMSO)*
- e. Pengamatan migrasi sel kanker : kristal violet.
- f. Pengamatan apoptosis sel kanker: *Fluorescein isothiocyanate (FITC) Annexin V Apoptosis Detection Kit with propidium iodide (PI) (BioLegend)* terdiri dari 1× PBS, *annexin V Binding Buffer (AVBB) annexin V- FITC, propidium iodide (PI) stock solution* dalam PBS.
- g. Pengamatan viabilitas sel: *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)*.
- h. Pengamatan ekspresi FAK dan phospho-FAK : *Standard diluent buffer, antibodi primer monoklonal anti-FAK (BIOSS®), antibodi primer poliklonal anti-phospho-FAK (Tyr397) (BIOSS®), goat anti-mouse IgG-biotin (Abcam®), horseradish peroxidase (Merck®), buffer lisis radio immunoprecipitation assay (RIPA) (G-Biosciences®), phosphatase inhibitor (Medchemexpress®), protease inhibitor (Sigma-Aldrich®), sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel, membran nitroselulosa, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TBM)*.
- i. Pengamatan aktivasi Rac1 : *G-LISA kit (Cytoskeleton Inc®)* terdiri dari: antibodi primer anti-Rac1, antibodi sekunder-HRP, Rac1 protein kontrol, *cell lysis buffer, wash buffer, antigen presenting buffer, antibody dilution buffer, stop solution, HRP diluent, Protease Inhibitor Cocktail*.
- j. Pengamatan pembentukan *focal adhesion*: *FAK100/ Aktin Cytoskeleton / Focal Adhesion Staining Kit (Merck®)* yang terdiri dari *mouse antibody monoclonal vinculin, tetramethyl rodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated phalloidin, dan 4',6-diamidino 2-phenylindole (DAPI). 4% paraformaldehyd, 0.1% Triton X-100, Bovine Serum Albumin (BSA), Tween20 (Sigma®)*.

4.5.2 Alat Penelitian

- a. Kultur sel MDA-MB-231 : tangki nitrogen cair, lemari laminar air flow (LAF), inkubator CO₂, *waterbath*, lemari pendingin, mikroskop *inverted*, mikroskop cahaya, sentrifugator, hemositometer, penyampur, *vortex*, T-75 cm² dan T-25 cm² *polystyrene flask*, *polypropylene conical centrifuge tube*, pipet plastik (1 mL, 10 mL, 25 mL), mikropipet 1000 µl, stiker label/ pulpen marker.
- b. Persiapan senyawa uji: mikropipet 20, 200, dan 1000 µL, eppendorf, rak tabung kecil, *conical tube*, *vortex*, timbangan analitik.
- c. Pengamatan migrasi sel kanker : *24-well plate*, mikroskop *inverted*, mikropipet 10, 200, 1000 µl, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, *yellow tip*.
- d. Pengamatan apoptosis sel kanker: tabung Eppendorf 1,5 ml, sentrifugator, *flow cytometer* (FACS Calibur, BD Biosciences).
- e. Pengamatan viabilitas sel : *96-well plate*, *ELISA reader*
- f. Pengamatan ekspresi FAK dan phospho-FAK: T75 *flask*, mikropipet 1000 µl, *cell scapper*, tabung Eppendorf, sentrifugator, spektrofotometer *UV-VIS* (NanoDrop™, Thermofisher), *semi-dry transblot apparatus* (20 volts; 300 mA)
- g. Pengamatan aktivasi Rac1: *24 well-plate*, *microplate shaker*, mikropipet 200 dan 1000 µl; sentrifugator, spektrofotometer *UV-VIS* (NanoDrop™, Thermofisher), *ELISA reader*.
- h. Pengamatan *focal adhesion* : mikropipet 10 µl, 200 µl, 1,000 µl, pinset, *cover slip* fibronektin, *slide glass*, *24-well plate*, mikroskop konfokal.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Persiapan senyawa uji afzelin

Untuk afzelin berbagai konsentrasi, afzelin terlebih dulu dilarutkan dalam DMSO hingga didapatkan konsentrasi 100 mg/ml. Untuk afzelin 1 mg ditambahkan DMSO 10 µl.

Misalnya untuk pembuatan konsentrasi 100 µg/ml sebanyak 2 ml, maka

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 = (V2 \times M2)/M1$$

$$= (100 \mu\text{g/ml} \times 2 \text{ ml})/10^5 \mu\text{g/ml} = 0.002 \text{ ml} = 2 \mu\text{L}$$

Untuk berbagai konsentrasi afzelin dari larutan induk afzelin dalam DMSO 100 mg/ml dipersiapkan sebagai berikut

Tabel 4.1 Formulasi pembuatan konsentrasi afzelin

Konsentrasi (µg/ml)	Larutan induk (µl)	Medium lengkap (ml)
100	2	2
200	4	2
400	8	2
800	16	2

4.6.2 Penumbuhan sel

Media kultur lengkap dipersiapkan dengan mencampurkan 500 ml DMEM *high glucose* ditambah 56 ml FBS.. Vial sel MDA-MB-231 diangkat dari tangki nitrogen cair. Vial dihangatkan dengan guncangan pelan dalam *water bath* suhu 35 – 37°C, selama 2-3 menit. Kemudian vial ditransfer ke LAF.

Media lengkap dimasukkan dalam *T-25 cm² flask* (yang sudah dilabel) sebanyak 9 ml, kemudian ditambahkan 1 ml suspensi sel dari vial ke *flask* tersebut. Sel di-resuspensi perlahan dengan cara memasukkan dan mengeluarkan dari pipet. Suspensi sel diambil sebanyak 10 µl untuk penghitungan dan pengamatan viabilitas sel. *Flask* ditransfer ke inkubator 37°C ± 1°C dengan CO₂ (ATCC, 2012).

4.6.3 Pemanenan sel

Kultur sel yang telah membentuk monolayer konfluen 80% mulai dapat digunakan untuk pengujian atau disubkultur. *Flask* yang berisi kultur sel MDA-MB-231 diambil dari inkubator. Media kultur lengkap dari *flask* dibuang secara aseptik dan lalu ditambahkan *serum-free* media sebanyak 2 ml untuk membilas sel dengan cara diguncang pelan. Pencucian ini dilakukan dua kali. Larutan 25% (w/v) tripsin – 0,53 mM EDTA ditambahkan ke dalam *flask*, sebanyak 2 ml. *Flask* diinkubasi pada suhu $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sampai sel lepas. Untuk memastikan, pengamatan di bawah mikroskop *inverted* dilakukan tiap 5 menit. Tripsin-EDTA dinetralsir dengan cara menambahkan media kultur lengkap dengan volume sama (2 ml). Sel dipencarkan dengan memipetnya secara pelan. Penghitungan sel total dan pengamatan viabilitas sel dilakukan dengan mengambil 1 μl suspensi sel (ATCC, 2012).

4.6.4 Perlakuan untuk pengamatan migrasi sel

Sel MDA-MB-231 ditumbuhkan dalam *24-well plate* (7×10^4 sel/sumuran) sampai mencapai konfluensi 90%. Pada tiap piringan dibuat satu goresan dengan ujung pipet steril berdiameter 1 mm (p200). Piringan dicuci dua kali dengan *serum-free* media, kemudian diinkubasi dalam *serum-starving media* (FBS 0.5%) ditambah DMSO (*dymethylsulfoxide*) atau 4 konsentrasi afzelin, pada 37°C . Di sisi bawah tiap piringan, dibuat penanda batas tepi goresan, kemudian difoto dengan mikroskop *inverted* pada pembesaran 40x (Nikon Ti-U, Nikon). Migrasi sel MDA-MB-231 yang mengisi area goresan diamati pada periode 24, dan 48 jam (Samri, 2016).

Migrasi sel dinilai dengan mengukur persentase area yang tertutup sel pada zona bebas sel dengan menggunakan makros *MRI wound healing tool* pada *software IMAGEJ*. Rumus yang digunakan adalah % area tertutup sel = {(area bebas sel pada 0 jam – area bebas sel pada 24 jam atau 48 jam)/area bebas sel

pada 0 jam} x 100 %.(Lewis *et al.*, 2019) Untuk meminimalkan subyektivitas, pengamatan dilakukan pada minimal 2 lapangan pandang pada tiap sumuran. Migrasi sel juga dinilai dengan menghitung jumlah sel yang mengisi zona bebas sel pada jam ke-24 atau ke-48 (Tantivejku *et al.*, 2003).

4.6.5 Pengamatan apoptosis melalui AnnexinV/propidium iodide flow cytometry (Biologend, 2018).

Sel MDA-MB-231 ditumbuhkan dalam *plate 24-well* hingga konfluen 90%, menggunakan medium lengkap (*DMEM high glucose, Penstrep 1% (100UI/ml-Penicillin dan 100 µl/ml-streptomycin)*, dan NEAA 1%). Perlakuan 4 konsentrasi afzelin dan vehikel diberikan selama 24 jam. Setelah itu, medium diambil dan sel dicuci dengan *serum-free media* sebanyak 2 kali. Sel dipanen dengan menambahkan tripsin-EDTA 0,25% dan kemudian dicuci dengan PBS tiga kali.

Sel diwarnai dengan *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI* (Biologend ®) sesuai dengan prosedur kit. Sel diresuspensi dengan *Annexin V binding buffer* pada konsentrasi 1.0×10^7 sel/ml. Suspensi sel 100 µl ditransfer ke tabung 5 ml, kemudian ditambahkan 5 µl *FITC Annexin V* dan 10 µl larutan *propidium iodide*. Sel di-*vortex* perlahan dan diinkubasi selama 15 menit dalam ruang gelap, pada suhu ruang (25°C). Selanjutnya *Annexin V Binding Buffer* 400 µl ditambahkan ke tiap tabung, Analisis dilakukan dengan *flow cytometry*. Analisis *scatterplot diagram* digunakan untuk membedakan antara sel viabel (Annexin V-/PI-), sel apoptotik awal (Annexin V+/PI-), sel apoptotik akhir/nekrotik (Annexin V/PI+) dan sel nekrotik akhir (Annexin V- /PI+) berdasarkan kelompok sebarannya.

4.6.6 Perlakuan untuk pengamatan viabilitas sel dengan metode MTT kolorimetrik.

Viabilitas sel diperiksa dengan metode reduksi 3-(4,5-*dimethyl 2-thiazolyl*)-2,5-*diphenyltetrazolium bromide tetrazolium* (MTT). Sel MDA-MB-231 dikultur 96-*well plate* dengan densitas 1×10^4 sel per sumuran selama 48 jam. Setelah itu, sel

diberi perlakuan afzelin konsentrasi 100, 200, 400 dan 800 µg/ml serta vehikel. Setelah semalaman, larutan MTT (0.5 mg/ml) 10 µl ditambahkan ke kultur sel dengan medium baru 90 µl, lalu diinkubasi dalam gelap, selama 4 jam hingga presipitat tampak jelas. Selanjutnya, medium disingkirkan. Kristal formazan yang terbentuk dilarutkan dengan penambahan DMSO 100 µl, dengan inkubasi selama 30 menit sambil digoyangkan. Absorbansi tiap sumuran dibaca dengan *microplate reader* (Bio-Rad Laboratories, USA) pada panjang gelombang 570 nm.

Penghitungan prosentase sel yang hidup dilakukan sesuai dengan rumus dari *Cancer Chemoprevention Research Center*, Fakultas Farmasi – UGM.

$$\text{Prosentase sel hidup} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100\%$$

4.6.7 Perlakuan untuk pengamatan kadar ekspresi FAK dan kadar *phospho*-FAK dengan metode *Western blotting*

a. Penumbuhan dan perlakuan kultur sel

Sel MDA-MB-231 ditumbuhkan pada flask T75 hingga konfluensi 90 %. Selanjutnya sel diberi perlakuan berbagai konsentrasi afzelin atau vehikel selama 24 jam.

b. Pelisisan sel dan penghitungan konsentrasi protein pada lisat

Kultur sel dicuci sekali dengan PBS dan diinkubasi di atas es. *Buffer* lisis RIPA yang mengandung *phosphatase inhibitor* dan *protease inhibitor* (1:100) ditambahkan ke kultur sel. Sel dilepaskan dengan *cell scapper* di atas es. Kemudian lisat ditransfer ke tabung *ependorf* dan disentrifugasi pada 10.000 xg pada suhu 4°C selama 15 menit. Konsentrasi protein diperiksa dengan spektrofotometer UV-VIS (NanoDrop™, Thermofisher).

c. Elektroforesis gel

Elektroforesis dilakukan pada gel 10%, dengan formulasi DD-H₂O (4,1 ml), *bis-acrylamide* (3,3 ml), *buffer* gel (2,5 ml), dan SDS 10% w/v (0,1 ml). Larutan

monomer dipersiapkan dengan komposisi *ammonium persulfat* (APS) dan *N,N,N',N'*-Tetramethyl ethylenediamine (Temed).

- *Separating Gel Buffer* : 50 μ l 10% APS dan 5 μ l Temed
- *Stacking Gel Buffer* : 50 μ l 10% APS dan 10 μ l Temed

Larutan monomer *separating* dituangkan ke dalam *gel cassette* dan didiamkan hingga gel mengeras. Larutan monomer *stacking* dituangkan ke dalam *gel cassette* yang telah berisi larutan monomer *separating*. Untuk menyesuaikan volume, ddH₂O ditambahkan, Cetakan (*comb*) dipasang ke dalam *gel cassette*. Setelah gel mengeras, *gel cassette* dilepas cari cetakan (*gel casting*), lalu dimasukkan ke dalam *chamber* yang berisi *running buffer*.

Sampel yang akan diperiksa ditambah *reducing sample buffer* (RSB) dengan rasio 1:1 dan bisa ditambahkan untuk mendapatkan konsentrasi yang sama. Kemudian, sampel dipanaskan selama 5 menit untuk denaturasi protein. Marker protein (10 μ l) dan sampel (20 μ l) dimasukkan ke dalam sumuran gel. Gel di-running selama 35 menit dengan tegangan 200 volt. Setelah marker dan *tracking dye* sudah mencapai ujung *gel*, proses dihentikan. *Gel* dilepas dari *gel cassette* secara perlahan, lalu dimasukkan ke *chamber* berisi *staining buffer coemasie blue*. Inkubasi dilakukan semalaman dalam *shaker* inkubator. Larutan *staining* diganti dengan larutan *de-staining* dan kembali di-inkubasi hingga pita protein tampak jelas.

d. **Blotting ke membran**

Pita protein dari *gel* SDS-PAGE ditransfer ke membran nitroselulosa dengan menggunakan *Semi Dry Trans Blot Equipment* dengan susunan sebagai berikut (dari bawah ke atas):

- a. kertas saring yang telah dibasahi *buffer* transfer,

- b. membran *Nitrocellulose* yang telah direndam *buffer* transfer selama 30 menit
- c. *gel* SDS-PAGE yang telah direndam *buffer* transfer
- d. kertas saring yang telah dibasahi *buffer* transfer

Proses transfer dilakukan selama 2 jam, dengan dialiri listrik 20 Volt, 300 mA.

e. *Probing* dan deteksi antibodi

Membran nitroselulosa diinkubasi dengan BSA 5% pada suhu 4°C semalaman, untuk mengblokir area yang tidak spesifik. Setelah itu, membran diadaptasikan di suhu ruang dan dicuci dengan larutan TBS-Tween20 0,05%. Antibodi primer (FAK1 monoklonal 1:1000, FAK Tyr397 1:500) ditambahkan dalam pelarut TBS. Larutan antibodi ini ditambahkan ke membran dan diinkubasikan selama 2 jam dalam suhu ruangan. Membran dicuci tiga kali sambil diguncang perlahan. Antibodi sekunder (1:1000) dalam TBS ditambahkan dilanjutkan dengan inkubasi selama 2 jam pada suhu ruangan. Membran kembali dicuci tiga kali, dilanjutkan dengan inkubasi dengan larutan *Streptavidin-Horseradish peroxidase* (SA-HRP) konsentrasi 1:1000 selama 60 menit. Setelah dicuci tiga kali, membran direndam dalam substrat TBM dan diinkubasi sampai muncul pita protein. Reaksi dihentikan dengan penambahan aquades. Membran dikering-anginkan dan setelah itu dipindai. Gambar *scan* pita protein dihitung secara kuantitatif dengan menggunakan piranti lunak ImageJ, menghasilkan data intensitas *pixel* relatif (intensitas relatif) (Patharkar *et al.*, 2017). Hasilnya dikonversi menjadi rasio terhadap kontrol negatif.

4.6.8 Pengamatan aktivasi Rac1

Kit G-LISA menggunakan 50 µl lisat (0,25 – 1 mg/ml konsentrasi protein dalam lisat) per *assay*. Prinsip pemeriksaan ini mirip *sandwich* ELISA, tetapi yang

digunakan untuk *coating* sumuran adalah protein yang berperan sebagai bait. Prosedur pengamatan aktivasi Rac1 ini mengacu pada prosedur dari *Cytoskeleton Inc.*

a. Penumbuhan kultur sel

Sel ditumbuhkan pada *24-well plate* hingga konfluensi 70%. Selama perlakuan untuk menstimulasi Rac1, sel harus dijaga dalam kondisi 'terkontrol' melalui starvasi serum, sehingga aktivitas basal Rac1 rendah. Perlakuan afzelin berbagai konsentrasi dan vehikel diberikan bersamaan dengan medium starvasi (FBS 0,5%), selama semalaman.

b. Pencucian

Plate sel kultur dikeluarkan dari inkubator dan segera diletakkan di atas es. Media diaspirasi dan sel dicuci dengan PBS dingin untuk menghilangkan protein serum. Sisa PBS diaspirasi, sehingga *buffer lysis* tidak terencerkan.

c. Pelisisan sel

Setelah distimulasi dengan EGF 50 ng/ml selama 5 menit (Zhang *et al.*, 2014), protein Rac1 teraktivasi dengan sangat cepat dan sementara (30 detik sampai 30 menit). Rac1-GTP bersifat labil dan ikatannya dengan GTP rentan mengalami hidrolisis selama dan setelah lisis sel, menyebabkan Rac1 non-aktif. Pemrosesan cepat (< 10 menit) di atas es penting untuk hasil yang akurat dan reliabel. Untuk membuat konsentrasi lisat antara 0,25 – 1,0 mg/ml, *buffer lysis* 200 μ l, ditambahkan ke dalam sumuran. Sel dilepaskan dengan *cell scrapping*. Hasilnya ditampung dalam tabung eppendorf dan segera disimpan dalam suhu -80°C sambil menunggu proses berikutnya.

d. Penghitungan konsentrasi protein lisat

Pengukuran konsentrasi protein pada lisat dilakukan dengan spektrofotometer UV-VIS (NanoDrop™, Thermofisher). Jumlah buffer lisis dingin yang ditambahkan ke lisat untuk mendapatkan konsentrasi protein yang identik antara 0,25 – 1,0 mg/dl, diperhitungkan. Bila variasi konsentrasi protein pada tiap sampel kurang dari 10%, tidak perlu diseimbangkan.

Volume yang ditambahkan menggunakan rumus :

$$\frac{A - B}{B} \times (\text{volume A}) = \dots\dots\dots \mu\text{l}$$

Dengan A adalah konsentrasi lisat yang lebih tinggi (mg/ml), dan B adalah konsentrasi sampel yang paling encer (mg/ml).

e. Pengukuran aktivasi Rac1

Penambahan *lysis buffer* 120 μl ke dalam tabung *sentrifuge* dilakukan di atas es, sebagai *buffer blank*. *Rac1 Control Protein* (RCCA) 36 μl ditambahkan ke dalam tabung bersama 84 μl *lysis buffer* dingin. Tabung ini digunakan sebagai kontrol positif. *Strip Rac1* yang dibutuhkan dan dilarutkan dalam 100 μl aquades dingin.

Lisat sel dihangatkan dalam *water bath* suhu ruangan. Segera setelah cair, ditempatkan kembali di atas es. Air dari *mikroplate* dibuang dengan cara disentakkan dengan kuat. Hal ini ditujukan untuk menghindari pembacaan latar yang tinggi. Pada absorbansi 490 nm, sumuran berisi *buffer* saja harus terbaca antara 0,20 – 0,35 dan kontrol positif harus terbaca 0,7 – 1,0 setelah dikurangi *blank*.

Plate segera dikembalikan ke es, dan ditambahkan lisat sel ke sumuran ulangan. Baik *buffer blank* maupun kontrol positif Rac1 ditambahkan 50 μl ke dalam sumuran ulangan. *Plate* segera diletakkan dalam *shaker* dingin (400 rpm) pada 4°C selama 30 menit. Selama inkubasi, antibodi primer anti-Rac1 dilarutkan

1/50 dalam *Antibody Dilution Buffer*. Setelah 30 menit, pelarut dalam sumuran dibuang dan dicuci dua kali dengan 200 μ l *Wash Buffer* dalam suhu ruangan. Penambahan 200 μ l *Antigen Presenting Buffer* pada suhu kamar segera dilakukan selama 2 menit. Setelah *buffer* dibuang, segera dilakukan pencucian sumuran tiga kali menggunakan 200 μ l *Wash Buffer* pada suhu kamar. Selanjutnya, antibodi primer anti Rac1 yang telah diencerkan ditambahkan ke tiap sumuran dan *plate* diletakkan pada *shaker microplate* suhu ruangan selama 45 menit. Selama inkubasi antibodi primer, antibodi sekunder HRP diencerkan 1/100 dalam *Antibody Dilution Buffer*.

Antibodi primer anti-Rac1 dibuang dari sumuran, diikuti dengan tiga kali pencucian dengan 200 μ l *Wash Buffer* suhu ruangan. Antibodi sekunder ditambahkan ke tiap sumuran, lalu diletakkan di atas *microplate shaker* pada suhu ruangan selama 45 menit. Saat antibodi sekunder diinkubasi, *aliquot* reagen pendeteksi HRP A dan B dihangatkan dengan penangas air suhu ruangan. Saat inkubasi antibodi sekunder akan berakhir, reagen deteksi HRP A dan B dicampurkan dalam volume yang sama. Campuran dilindungi dari cahaya.

Setelah inkubasi berakhir, antibodi sekunder dibuang dari sumuran. Kemudian, sumuran dicuci tiga kali menggunakan *Wash Buffer* 200 μ l. Campuran reagen pendeteksi HRP ditambahkan ke tiap sumuran dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 20 menit. Setelah itu, HRP *stop buffer* ditambahkan. Kuantitas Rac1 teraktivasi dihitung berdasar absorbansi pada panjang gelombang 490 nm.

4.6.9 Pengamatan pembentukan *focal adhesion* dengan pewarnaan imunofluoresen

a. Penanaman sel (CCRC, 2014)

Sebelum penanaman, dilakukan panen sesuai prosedur pemanenan sel (sub bab 2.6.2). Selanjutnya dilakukan penghitungan sel sesuai dengan prosedur penghitungan sel (lampiran 3). *Cover slip* yang dilapisi *fibronectin* dipasang dalam

24-well plate untuk persiapan penanaman sel. Sel MDA-MB-231 ditransfer sekitar 50.000 sel/sumuran dalam 500 μ l medium lengkap secara merata dan perlahan, kemudian inkubasi semalaman (15 jam) dalam inkubator agar sel menempel pada *cover slip*. Selanjutnya, medium disingkirkan dan digantikan medium starvasi yang berisi afzelin berbagai konsentrasi atau vehikel sebanyak 500 μ l. Sel diinkubasi kembali selama 24 jam, dilanjutkan dengan pewarnaan imunofluoresen.

b. Persiapan antibodi dan larutan

Phalloidin terkonjugasi dengan TRITC (1 vial, 15 μ g) dilarutkan dalam methanol 250 μ L, untuk selanjutnya disimpan dalam suhu -20° C. Saat digunakan, phalloidin diencerkan dengan PBS 1X dengan konsentrasi 1:500. Antibodi primer anti-vinculin diencerkan dalam larutan *blocking* dengan konsentrasi 1:400. Antibodi sekunder diencerkan dalam PBS 1x dengan konsentrasi 1:1000. DAPI dilarutkan dalam PBS 1x dengan konsentrasi 1:1000. *Wash buffer* dibuat dengan melarutkan 0.05% Tween-20 dalam PBS 1x. Larutan *blocking* merupakan larutan PBS 1X yang mengandung 1% BSA.

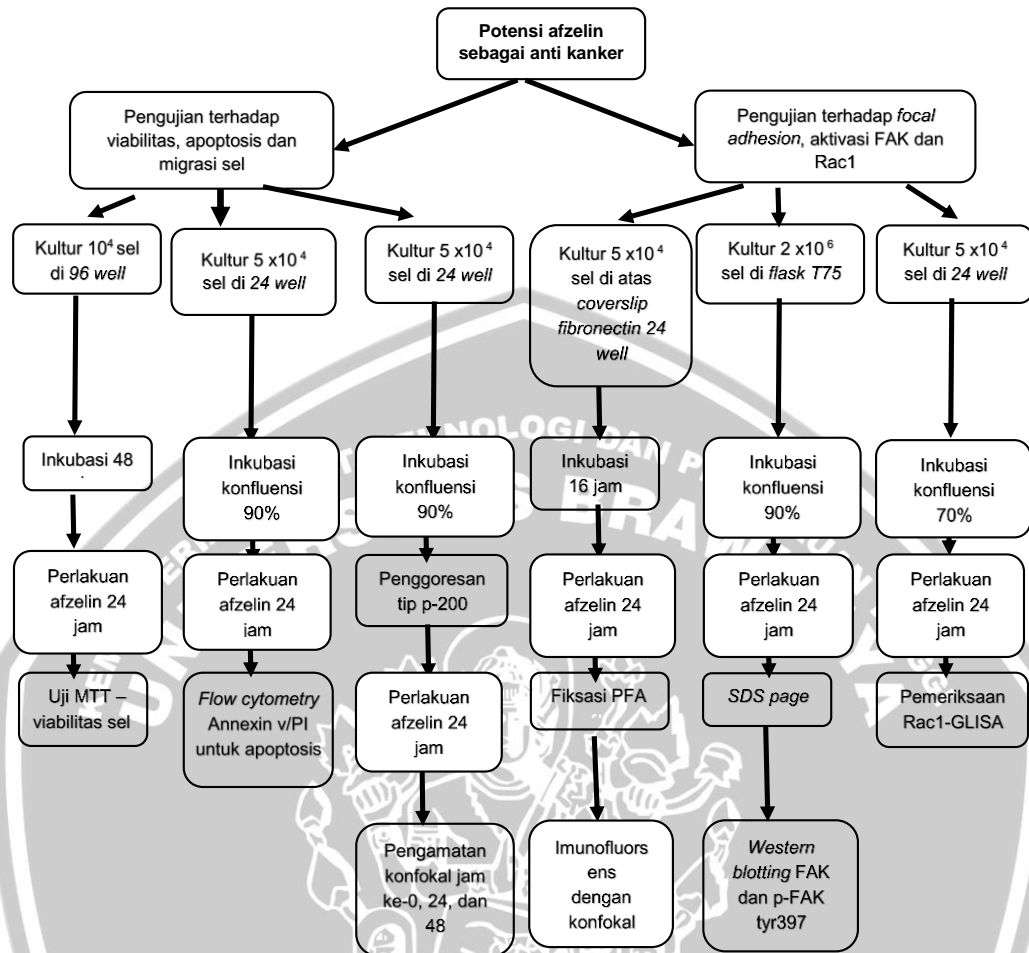
c. Perlakuan imunofluoresen pada sel (FAK100/EMD millipore. 2009; CCRC, 2014)

Sel difiksasi dengan paraformaldehyde 4% dalam PBS selama 1 menit dalam suhu ruangan. Pencucian dilakukan dua kali dengan *wash buffer*, dan kemudian sel di-permeabilisasi dengan 0.1% Triton X-100 dalam PBS selama 1-5 menit pada temperatur ruangan. Sel kembali dicuci dua kali dengan *wash buffer*. Selanjutnya larutan *blocking* diaplikasikan selama 30 menit dalam suhu ruangan. Antibodi primer anti-vinculin ditambahkan ke dalam larutan *blocking*, dan kemudian diinkubasi selama 1 jam dalam temperatur ruangan. Sel dicuci tiga kali (masing-masing 5 – 10 menit) dengan *wash buffer*. Untuk pewarnaan ganda, *TRITC-conjugated phalloidin* diinkubasi bersamaan dengan antibodi sekunder

selama 30 – 60 menit dalam suhu ruangan. Selanjutnya, pencucian dilakukan 3 kali (masing-masing 5-10 menit) dengan *wash buffer*. Untuk pewarnaan nukleus, sel diinkubasi dengan DAPI selama 1-5 menit pada suhu ruangan, diikuti pencucian tiga kali (masing-masing 5 -10 menit) dengan *wash buffer*. *Coverslip* diletakkan di atas gelas obyek, kemudian ditetesi dengan *mounting media*. *Coverslip* ditutup dengan *cover glass*. Hasil *mounting* disimpan dalam wadah gelap, pada suhu 4°C. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop konfokal pemindai laser (*confocal laser scanning microscope*, Olympus FV1000) dengan pembesaran 40x. Data diambil dari minimal 3 lapangan pandang. Penilaian dilakukan secara kualitatif.



4.6.10 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan alur Penelitian.

Penelitian ini menggunakan satu kelompok kontrol dan empat kelompok perlakuan, yaitu

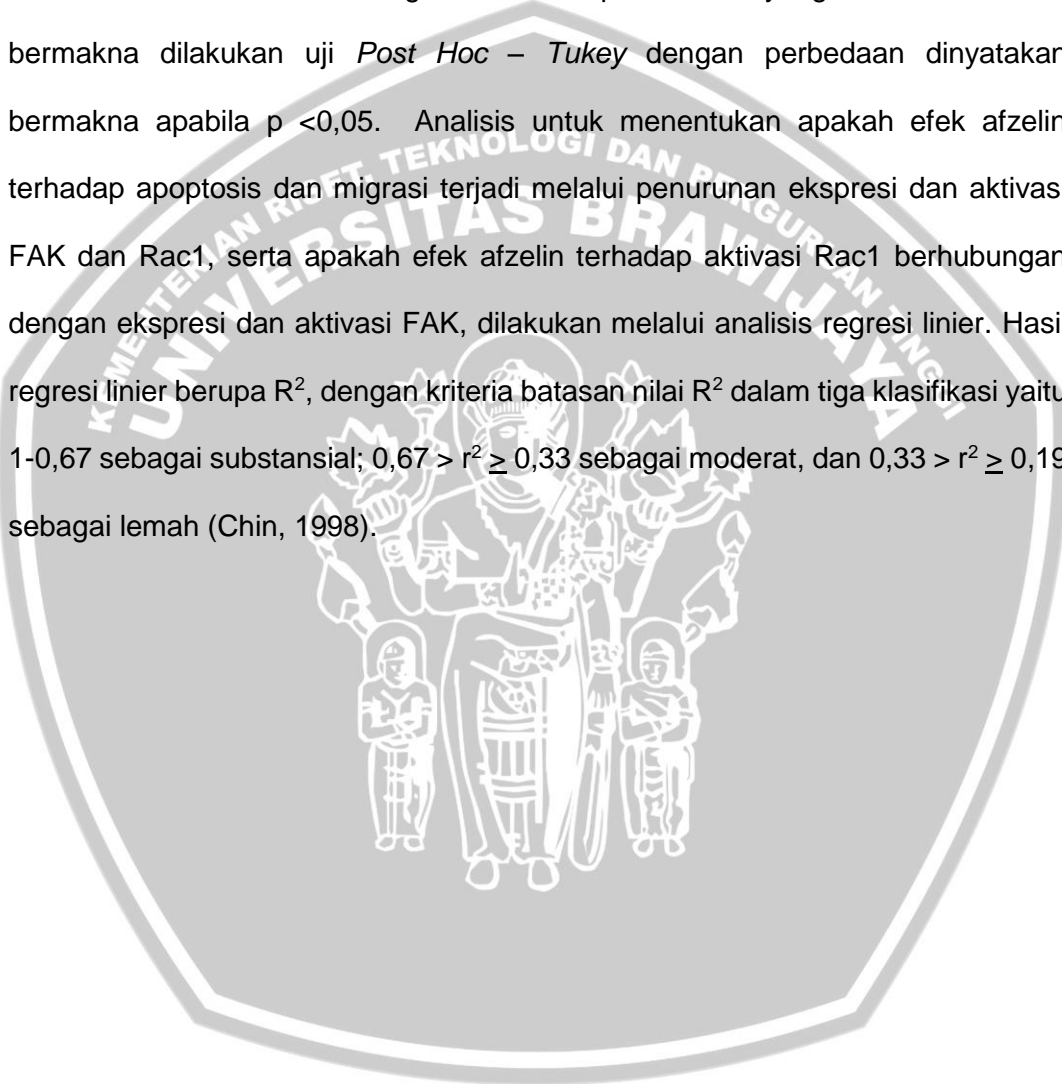
- K1: kelompok kultur MDA-MB-231 dengan diberi pelarut bahan uji DMSO
- K2: kelompok kultur MDA-MB-231 diberi afzelin dalam DMSO, konsentrasi 100 µg/ml
- K3: kelompok kultur MDA-MB-231 diberi afzelin dalam DMSO, konsentrasi 200 µg/ml
- K4: kelompok kultur MDA-MB-231 diberi afzelin dalam DMSO, konsentrasi 400 µg/ml
- K5: kelompok kultur MDA-MB-231 diberi afzelin dalam DMSO, konsentrasi 800 µg/ml

4.6.11 Etik Penelitian

Penelitian ini memperoleh kajian etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.6.12 Analisis Data

Semua data yang diperoleh diulang 3 kali untuk memastikan realibilitas pengamatan. Kemudian dilakukan tes untuk menguji normalitas data. Data penelitian disajikan dalam bentuk tabel yang menjelaskan rata-rata \pm standar deviasi (SD). Selanjutnya dilakukan tes ANOVA *one way* dengan menggunakan *software* SPSS. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna dilakukan uji *Post Hoc – Tukey* dengan perbedaan dinyatakan bermakna apabila $p < 0,05$. Analisis untuk menentukan apakah efek afzelin terhadap apoptosis dan migrasi terjadi melalui penurunan ekspresi dan aktivasi FAK dan Rac1, serta apakah efek afzelin terhadap aktivasi Rac1 berhubungan dengan ekspresi dan aktivasi FAK, dilakukan melalui analisis regresi linier. Hasil regresi linier berupa R^2 , dengan kriteria batasan nilai R^2 dalam tiga klasifikasi yaitu 1-0,67 sebagai substansial; $0,67 > r^2 \geq 0,33$ sebagai moderat, dan $0,33 > r^2 \geq 0,19$ sebagai lemah (Chin, 1998).



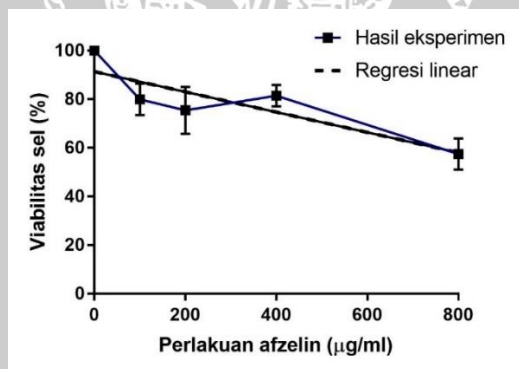
BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Efek afzelin terhadap viabilitas sel MDA-MB-231

Viabilitas sel MDA-B-231 akibat paparan afzelin diukur melalui uji MTT. Kristal formazan yang terbentuk diinterpretasikan dalam *optical density*. Paparan afzelin menyebabkan penurunan viabilitas sel yang dipengaruhi oleh peningkatan konsentrasi afzelin. Dari berbagai konsentrasi afzelin yang diujikan, viabilitas sel menunjukkan penurunan yang bermakna (42,57%) dibanding kontrol negatif pada konsentrasi 800 µg/ml (tabel 5.1).

Nilai IC50 setelah paparan 24 jam diprediksi berdasar garis kecenderungan dan persamaan regresi linier dosis-respon (gambar 5.1). Berdasar persamaan tersebut, dosis afzelin yang diperkirakan akan menyebabkan penurunan viabilitas sel hingga 50% adalah 992.33 µg/ml.



Gambar 5.1 Hasil pengujian efek afzelin terhadap viabilitas sel MDA-MB-231 setelah paparan 24 jam. Kuantitas relatif sel viabel diukur dengan MTT secara kolorimetrik. Persamaan regresi linier adalah $Y = -0,0417X + 91,38$, dengan Y adalah viabilitas sel dan X adalah konsentrasi afzelin Data ditampilkan sebagai *rerata ± SD*

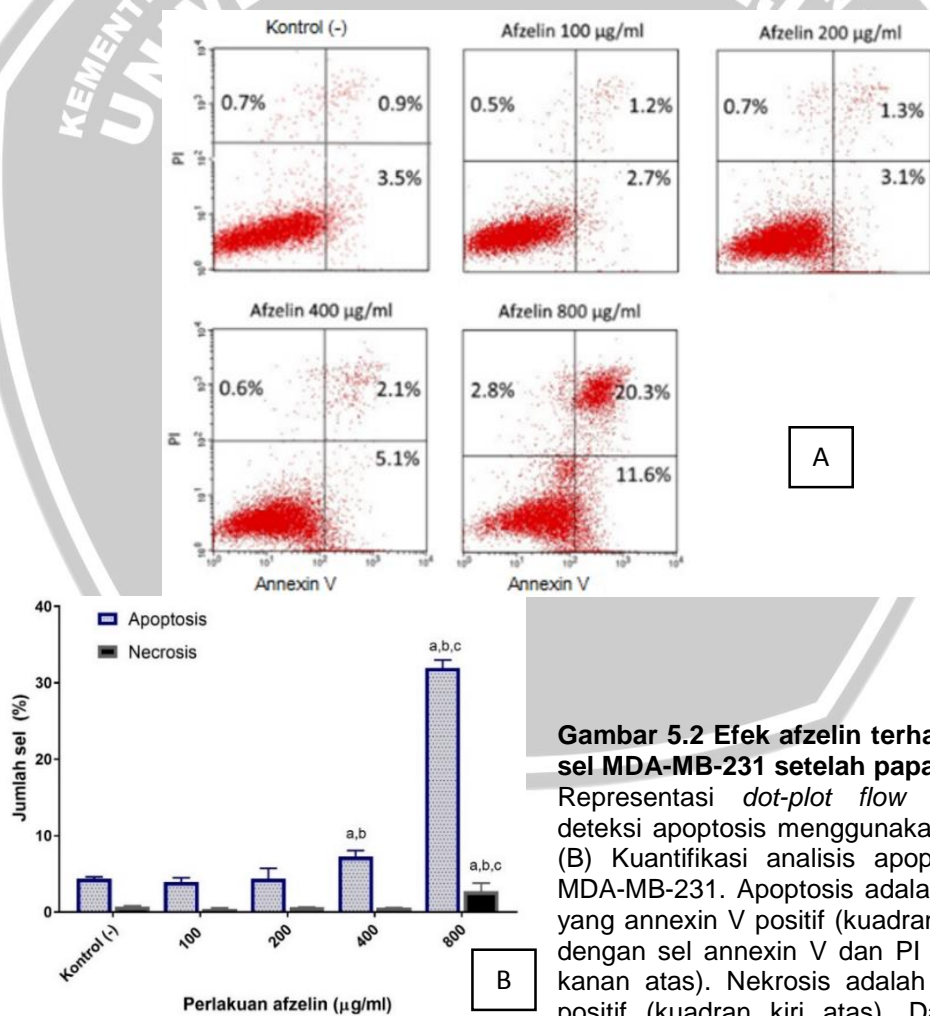
Tabel 5.1 Efek paparan afzelin terhadap viabilitas sel MDA-MB-231

Viabilitas sel (%)	Perlakuan (µg/ml)				
	Kontrol (-)	100	200	400	800
Rerata ± SD	99.880 ± 2.735	79.983 ± 11.241	75.470 ± 16.790	81.487 ± 7.756	57.4427 ± 11.166*

^a p <0,05 terhadap kontrol negatif

5.2 Efek afzelin terhadap apoptosis sel MDA-MB-231

Analisis *flow cytometry* dengan pewarnaan ganda FITC-Annexin V dan PI digunakan untuk mendeteksi perubahan lokasi *phosphatidylserine* akibat paparan berbagai konsentrasi afzelin pada sel MDA-MB-231. Afzelin menginduksi apoptosis seiring dengan peningkatan konsentrasi (gambar 5.2). Persentase sel apoptotik meningkat secara bermakna dibanding dengan kontrol negatif pada perlakuan afzelin 400 $\mu\text{g/ml}$ dan 800 $\mu\text{g/ml}$ (tabel 5.2). Pola yang sama juga terjadi pada persentase sel nekrotik dengan kuantitas yang lebih rendah dibanding sel apoptotik. Hasil ini menunjukkan kematian sel akibat paparan afzelin terjadi terutama melalui apoptosis.



Gambar 5.2 Efek afzelin terhadap apoptosis sel MDA-MB-231 setelah paparan 24 jam. (A) Representasi *dot-plot flow cytometry* dari deteksi apoptosis menggunakan annexin V/PI. (B) Kuantifikasi analisis apoptosis pada sel MDA-MB-231. Apoptosis adalah gabungan sel yang annexin V positif (kuadran kanan bawah) dengan sel annexin V dan PI positif (kuadran kanan atas). Nekrosis adalah sel dengan PI positif (kuadran kiri atas). Data ditampilkan dalam rerata \pm SD.

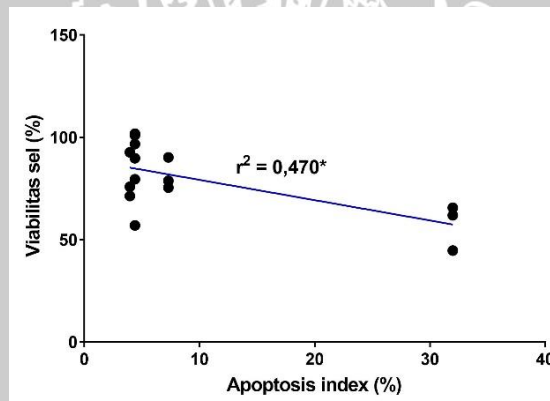
Notasi menunjukkan $p < 0,05$, yaitu terhadap ^akontrol negatif; ^b terhadap afzelin 200; dan ^c terhadap afzelin 400 $\mu\text{g/ml}$.

Tabel 5.2 Efek paparan afzelin terhadap apoptosis sel MDA-MB-231

Kematian sel (%)		Perlakuan (µg/ml)				
		Kontrol (-)	100	200	400	800
Apoptosis	Rerata ±	4,397 ±	3,953 ±	4,387 ±	7,287 ±	31,973 ±
	SD	0.221	0.542	1.346	0.785 ^{ab}	1.026 ^{abc}
Nekrosis	Rerata ±	0,730 ±	0,450 ±	0,663 ±	0,580±	2,757 ±
	SD	0.110	0.125	0.035	0.035	1.056 ^{abc}

Notasi menunjukkan p <0,05 yaitu ^a terhadap kontrol negatif; ^b terhadap afzelin 200; dan ^c terhadap afzelin 400 µg/ml

Pengujian efek paparan afzelin terhadap apoptosis memiliki kecenderungan penurunan yang serupa dengan viabilitas sel. Karena salah satu aspek yang mempengaruhi viabilitas sel adalah apoptosis, maka dilakukan pengkajian lebih lanjut apakah keduanya saling berhubungan. Analisis regresi linear menunjukkan hubungan positif dengan keeratan moderat antara viabilitas sel dengan apoptosis. Kontribusi apoptosis terhadap viabilitas sel diprediksi sebesar 47% (gambar 5.3).

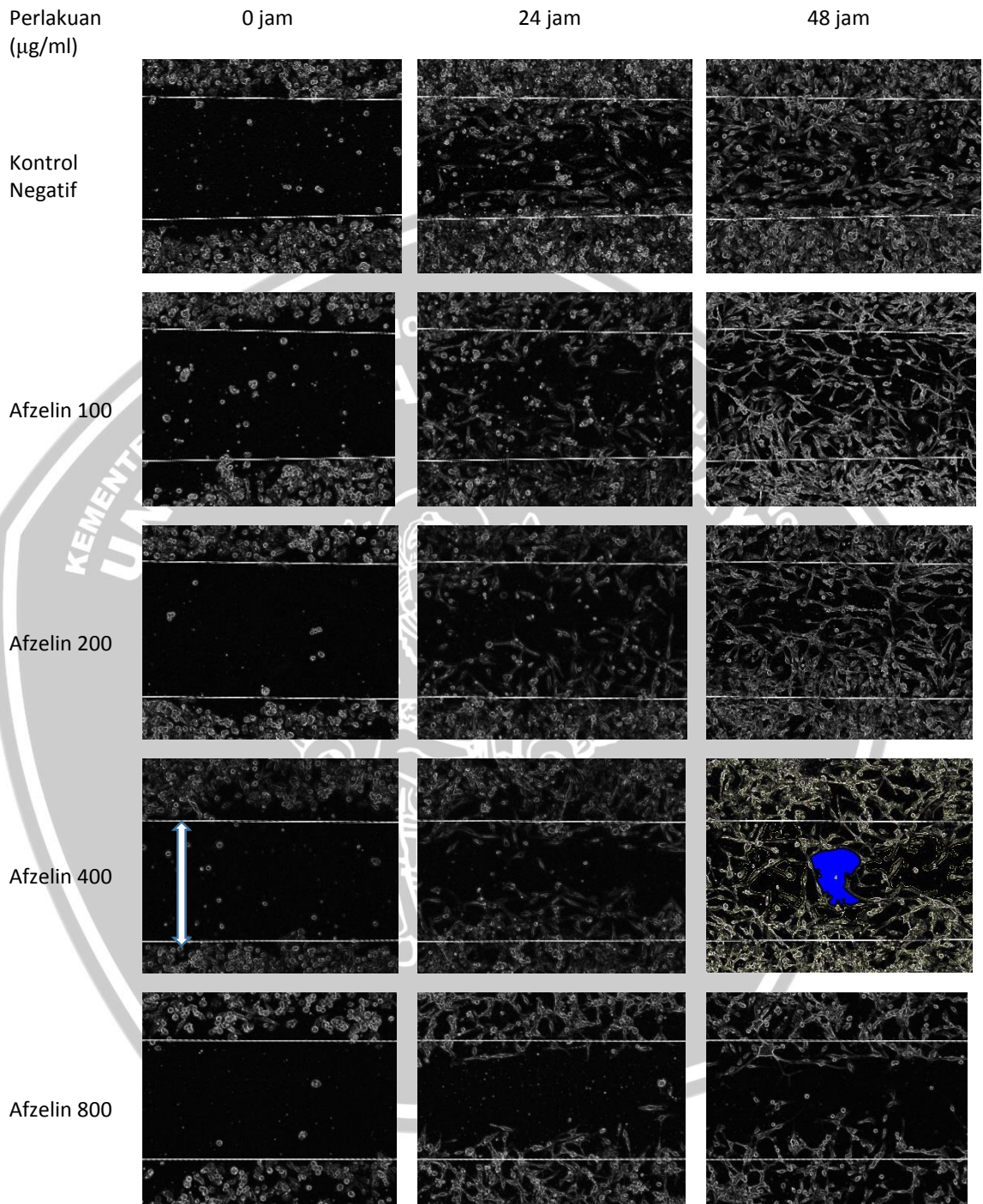


Gambar 5.3 Hubungan antara viabilitas sel dan apoptosis pada sel MDA-MB-231

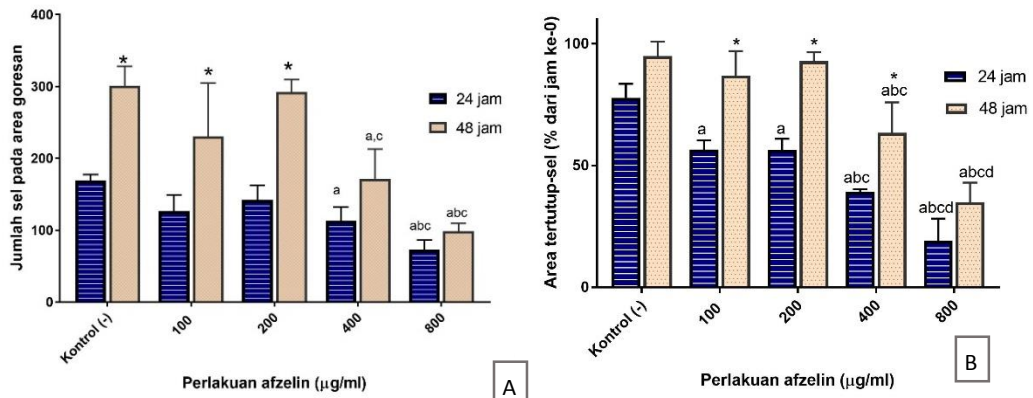
5.3 Efek afzelin terhadap migrasi sel MDA-MB-231

Pada model pengujian *scratch wound healing*, afzelin menghambat migrasi dua dimensi sel MDA-MB-231 (Gambar 5.4). Hambatan migrasi didemonstrasikan melalui penurunan jumlah sel yang berpindah ke area bebas sel seiring dengan peningkatan konsentrasi afzelin. Penekanan migrasi sel terutama terjadi pada konsentrasi 400 dan 800 µg/ml. Hal ini juga didukung oleh jumlah sel yang

berpindah ke area bebas sel pada pengamatan jam ke-48 tidak berbeda bermakna dibanding jam ke-24 (Gambar 5.5).



Gambar 5.4 Efek afzelin terhadap migrasi sel MDA-MB-231. (A) Representasi mikrograf penutupan area bebas sel selama 48 jam paparan afzelin, yang diamati dengan mikroskop *inverted*. Garis horizontal putih menunjukkan area goresan yang masih bebas sel (pada jam ke-0. Area berwarna biru adalah contoh area bebas sel pada area goresan, dengan area tertutup sel yang ada di luarnya.



Notasi menunjukkan $p < 0,05$ yaitu ^a terhadap kontrol negatif; ^b terhadap afzelin 100, ^c afzelin 200 dan ^dafzelin 400 µg/ml, serta * terhadap jam ke-24 pada konsentrasi afzelin yang sama.

Gambar 5.5 Efek afzelin terhadap migrasi sel MDA-MB-231. Kuantifikasi migrasi sel melalui dua pendekatan yaitu (A) berdasar jumlah sel yang mengisi ke area bebas sel dan (B) berdasar persentase area tertutup-sel pada jam ke-24 atau ke- 48 dari area bebas sel pada jam ke-0. Keduanya ditampilkan dalam rerata \pm SD

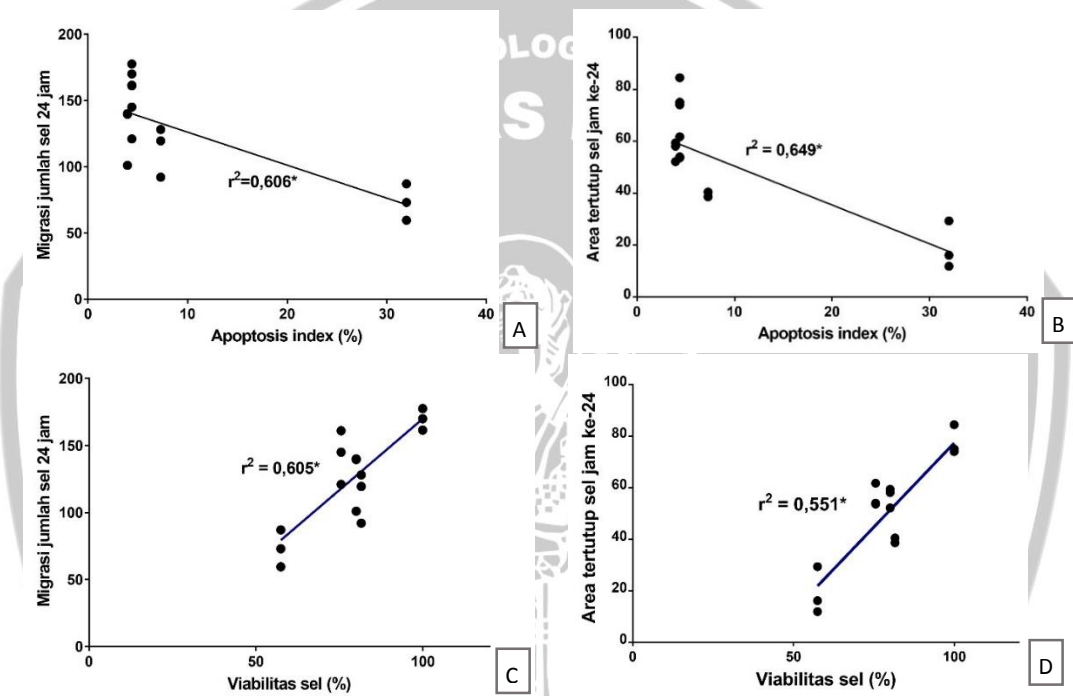
Tabel 5.3 Efek afzelin terhadap migrasi sel MDA-MB-231

Observasi uji migrasi <i>scratch-wound healing</i>		Perlakuan (µg/ml)				
		Kontrol (-)	100	200	400	800
Jumlah sel pada area goresan						
24 jam	Rerata \pm	169,667 \pm	126,833 \pm	142,333 \pm	113,167 \pm	73,167 \pm
	SD	8,005	22,373	20,133	18,817 ^a	13,751 ^{abc}
48 jam	Rerata \pm	300,833 \pm	230,83 \pm	292,667 \pm	171,667 \pm	98,667 \pm
	SD	27,597*	74,240*	17,134*	41,621 ^{ac}	11,094 ^{abc}
Area tertutup-sel (%)						
24 jam	Rerata \pm	77,794 \pm	56,531 \pm	56,423 \pm	39,243 \pm	19,13 \pm
	SD	5,752	3,838 ^a	4,576 ^a	1,063 ^{abc}	9,105 ^{abcd}
48 jam	Rerata \pm	94,937 \pm	87,032 \pm	92,834 \pm	63,429 \pm	34,899 \pm
	SD	5,951	9,938*	3,728*	12,521 ^{abc*}	8,096 ^{abcd}

Notasi menunjukkan $p < 0,05$ yaitu ^a terhadap kontrol negatif; ^b terhadap afzelin 100, ^c afzelin 200 dan ^dafzelin 400 µg/ml, serta * terhadap jam ke-24 pada konsentrasi afzelin yang sama.

Efek afzelin terhadap migrasi sel MDA-MB-231 juga dianalisis berdasar persentase area yang tertutup sel. Hasil analisis menunjukkan penurunan area tertutup-sel akibat paparan afzelin, dengan pola yang sama seperti penurunan jumlah sel migrasi (tabel 5.3). Berbeda dengan pengamatan berdasar jumlah sel migrasi, afzelin konsentrasi 400 µg/ml menunjukkan peningkatan area tertutup-sel yang bermakna pada jam ke-48 dibanding jam ke-24.

Efek afzelin terhadap migrasi sel MDA-MB-231 mempunyai kecenderungan negatif, yaitu seiring dengan peningkatan konsentrasi afzelin terjadi penurunan migrasi sel. Pola yang sama didapatkan pada efek afzelin terhadap viabilitas sel, tetapi berkebalikan dengan kecenderungan positif terhadap apoptosis sel MDA-MB-231 yaitu semakin tinggi konsentrasi afzelin semakin tinggi pula kejadian apoptosis. Hasil ini menarik untuk dikaji apakah penurunan viabilitas sel dan peningkatan apoptosis berhubungan dengan penurunan migrasi sel.



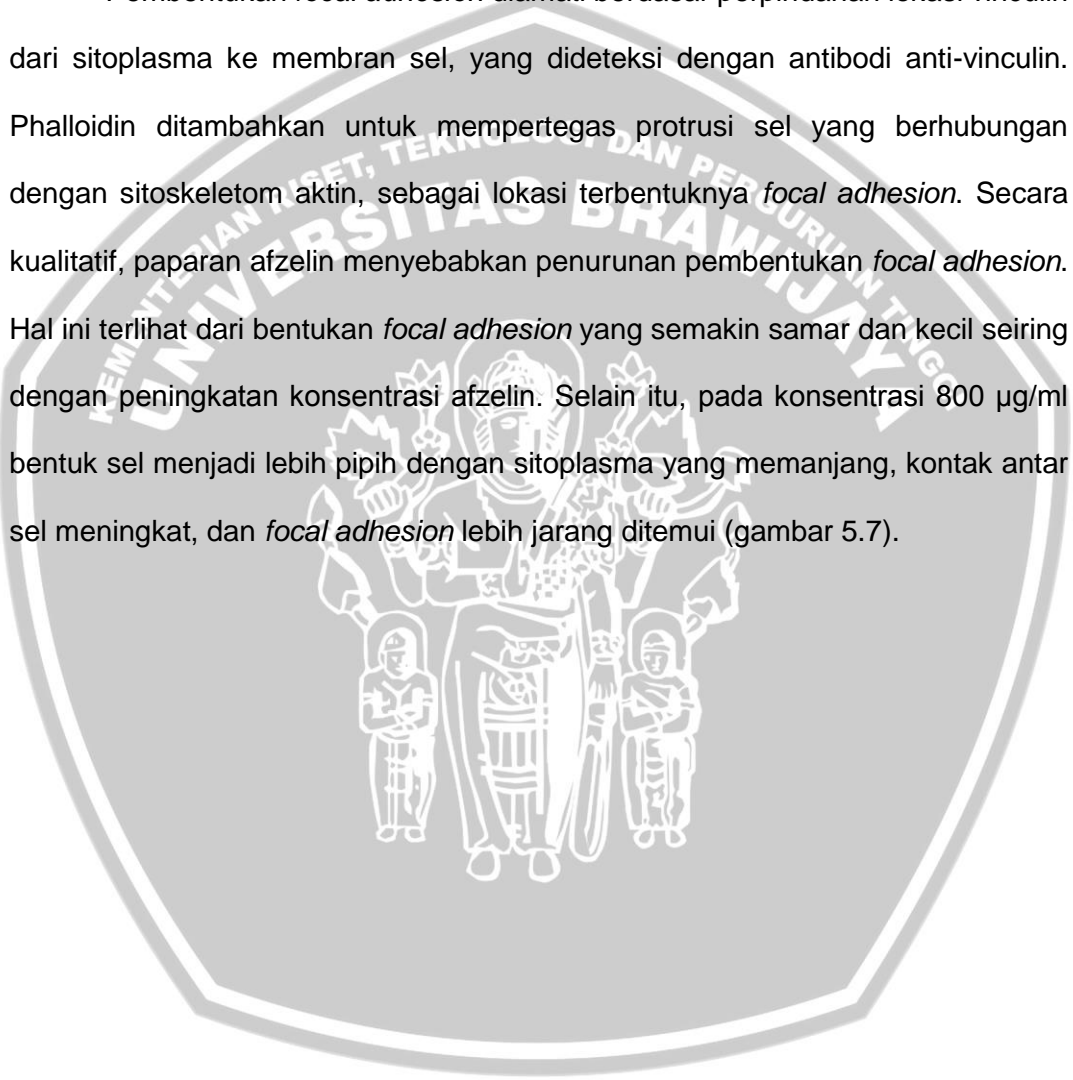
Gambar 5.6 Hubungan antara indeks apoptosis dan viabilitas dengan migrasi jam ke-24. Hubungan indeks apoptosis dengan migrasi ditinjau dari jumlah sel yang mengisi area goresan (A) maupun area tertutup sel (B). Hubungan viabilitas sel dengan migrasi juga ditinjau berdasar jumlah sel yang mengisi area goresan (C) maupun area tertutup sel (D). Tanda * menunjukkan $p < 0,05$. r^2 menunjukkan keeratan hubungan antar variabel terikat. Data disajikan dalam rerata.

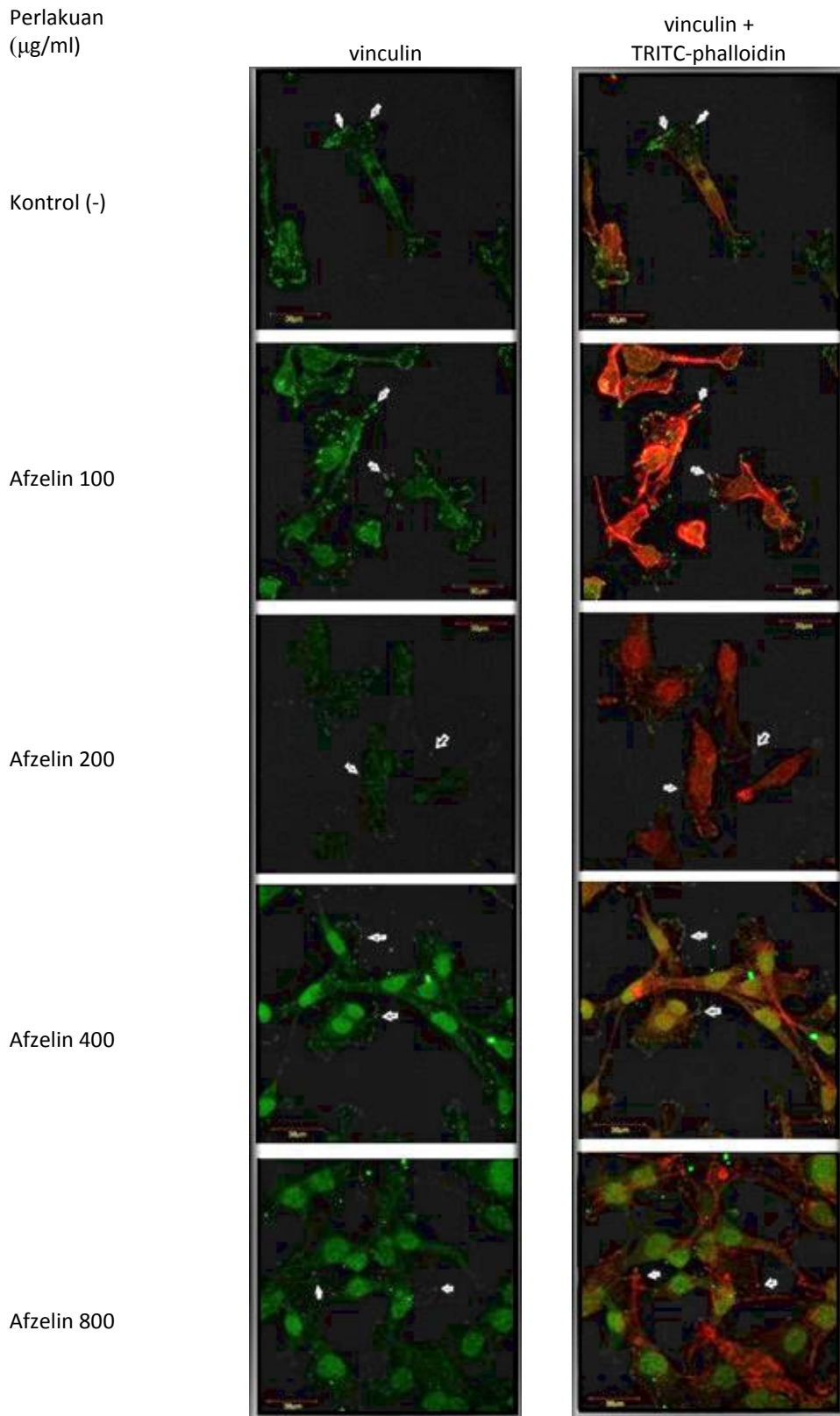
Analisis regresi linier antara migrasi 24 jam dan apoptosis menunjukkan berhubungan positif dengan keeratan yang moderat ($0,66 > r^2 > 0,33$) yang konsisten, baik berdasarkan jumlah sel yang mengisi area goresan dan area tertutup sel (gambar 5.6 A dan B). Analisis antara migrasi 24 jam dan viabilitas sel

juga menunjukkan hasil positif dengan keeratan moderat ($0,66 > r^2 > 0,33$) secara konsisten, berdasar jumlah sel yang mengisi area goresan dan area tertutup sel (gambar 5.6 C dan D).

5.4 Efek afzelin terhadap pembentukan *focal adhesion* pada sel MDA-MB-231

Pembentukan *focal adhesion* diamati berdasar perpindahan lokasi vinculin dari sitoplasma ke membran sel, yang dideteksi dengan antibodi anti-vinculin. Phalloidin ditambahkan untuk mempertegas protrusi sel yang berhubungan dengan sitoskeleton aktin, sebagai lokasi terbentuknya *focal adhesion*. Secara kualitatif, paparan afzelin menyebabkan penurunan pembentukan *focal adhesion*. Hal ini terlihat dari bentuk *focal adhesion* yang semakin samar dan kecil seiring dengan peningkatan konsentrasi afzelin. Selain itu, pada konsentrasi 800 $\mu\text{g/ml}$ bentuk sel menjadi lebih pipih dengan sitoplasma yang memanjang, kontak antar sel meningkat, dan *focal adhesion* lebih jarang ditemui (gambar 5.7).

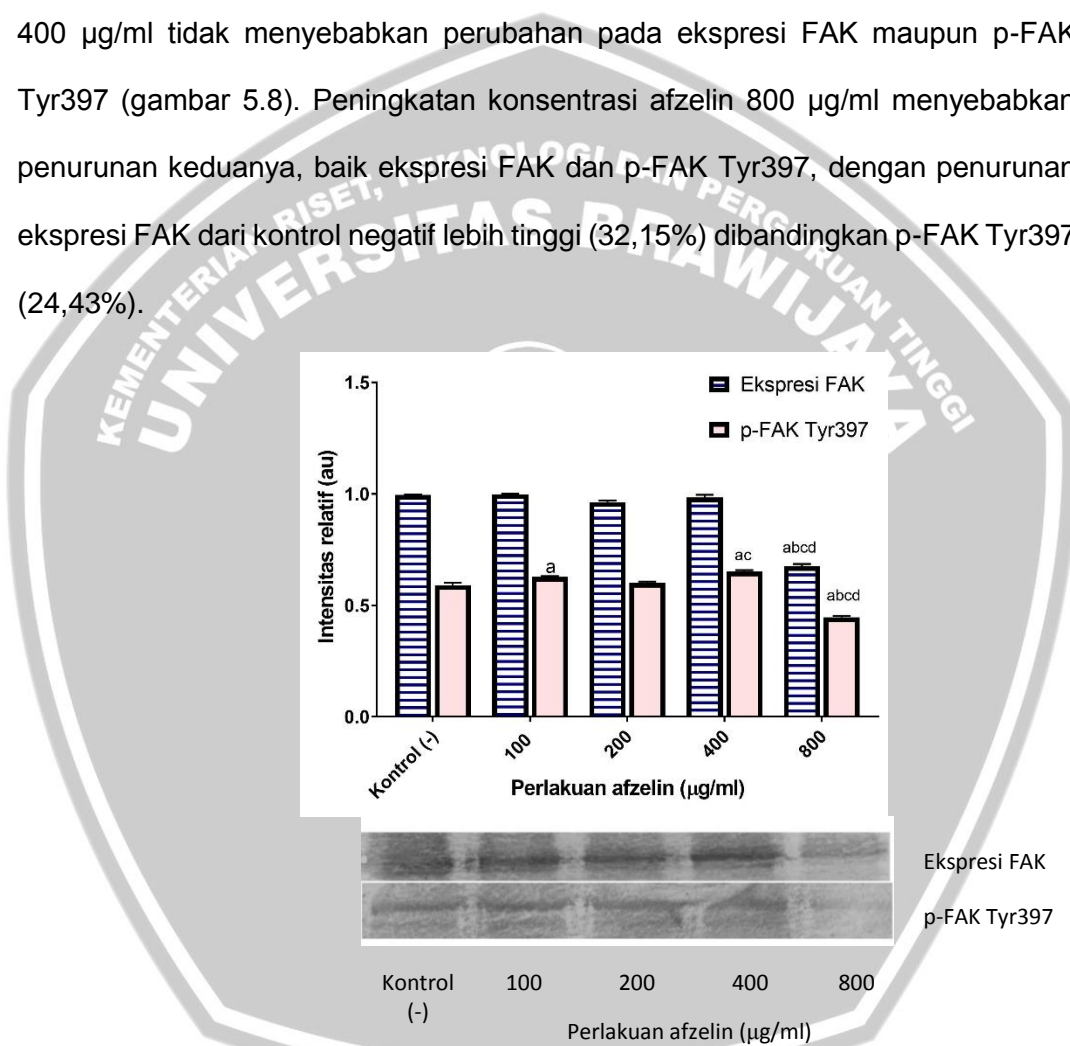




Gambar 5.7 Efek paparan afzelin terhadap *focal adhesion* pada sel MDA-MB-231 setelah paparan 24 jam. Efek paparan afzelin diamati pada jam ke-24. Pewarnaan imunofluoresens menggunakan antibodi anti-vinculin (hijau) dan *TRITC-conjugated phalloidin* (merah). *Focal adhesion* ditunjukkan oleh ujung tanda panah. Skala (kuning) sebanding dengan 30 μm .

5.5 Efek afzelin terhadap ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397 pada sel MDA-MB-231

Pada kontrol negatif, FAK terekspresi dan teraktivasi pada asam amino Tyrosin ke-397 dalam sel MDA-MB-231. Tiap sampel yang di-loading saat tahap SDS-PAGE disesuaikan sehingga konsentrasinya sama (18 µg/ml). Pengamatan melalui *Western blotting* mendemonstrasikan bahwa paparan afzelin hingga dosis 400 µg/ml tidak menyebabkan perubahan pada ekspresi FAK maupun p-FAK Tyr397 (gambar 5.8). Peningkatan konsentrasi afzelin 800 µg/ml menyebabkan penurunan keduanya, baik ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397, dengan penurunan ekspresi FAK dari kontrol negatif lebih tinggi (32,15%) dibandingkan p-FAK Tyr397 (24,43%).



Notasi menunjukkan $p < 0,05$ yaitu ^a terhadap kontrol negatif; ^b terhadap afzelin 100, ^c afzelin 200 dan ^d afzelin 400 µg/ml

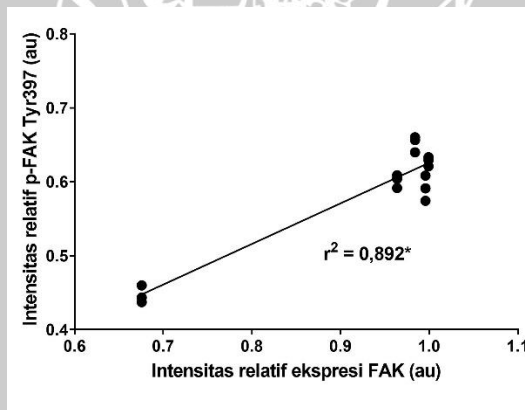
Gambar 5.8 Efek afzelin terhadap ekspresi FAK dan FAK Tyr397 terfosforilasi (p-FAK Tyr397) pada sel MDA-MB-231 setelah paparan 24 jam. Grafik histogram menggambarkan rasio intensitas relatif protein terhadap kontrol negatif. Data ditampilkan dalam rerata ± SEM. Gambar scan hasil *Western blotting* menunjukkan pita protein berwarna gelap.

Tabel 5.4 Efek afzelin terhadap ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397 sel MDA-MB-231

Intensitas relatif (rasio terhadap kontrol negatif, Au)		Perlakuan (µg/ml)				
		Kontrol (-)	100	200	400	800
Ekspresi FAK	Rerata ± SD	0,996 ± 0,043	0,999 ± 0,004	0,964 ± 0,013	0,984 ± 0,002	0,676 ± 0,018 ^{abcd}
p-FAK Tyr397	Rerata ± SD	0,591 ± 0,017	0,628 ± 0,006 ^a	0,602 ± 0,009	0,652 ± 0,108 ^{ac}	0,447 ± 0,075 ^{abcd}

Notasi menunjukkan p < 0,05 yaitu ^a terhadap kontrol negatif; ^b terhadap afzelin 200; dan ^c terhadap afzelin 400 µg/ml.. Angka bergaris bawah menunjukkan peningkatan bermakna (p < 0.05) dibanding kontrol negatif

Berbeda dengan efeknya yang tidak bermakna terhadap ekspresi FAK, paparan afzelin konsentrasi 400 µg/ml menyebabkan peningkatan signifikan kuantitas p-FAK Tyr397 dibanding kontrol negatif (tabel 5.4). Analisis ImageJ hubungan antara intensitas relatif FAK dan p-FAK Tyr397 pada paparan afzelin dilakukan untuk memprediksi apakah penurunan intensitas relatif p-FAK Tyr 397 disebabkan oleh hambatan fosforilasi pada FAK Tyr397 atau karena penekanan ekspresi FAK. Hasil analisis menunjukkan hubungan positif yang substansial ($r^2 > 0,67$) antara jumlah FAK dengan jumlah pFAK Tyr397 (gambar 5.9).

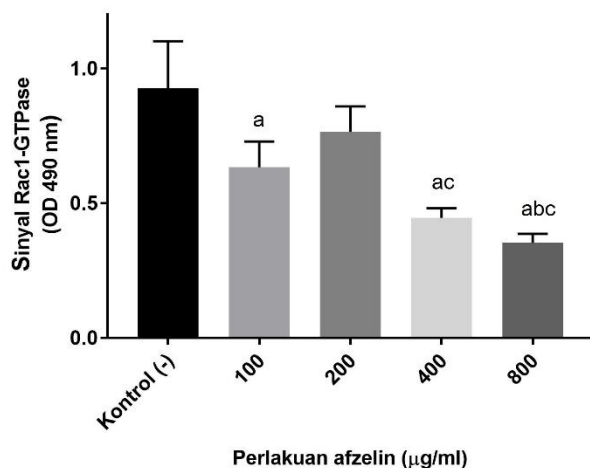


Gambar 5.9 Hubungan antara intensitas relatif ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397. Data disajikan dalam rerata. Tanda * menunjukkan p < 0,05. r^2 menunjukkan keeratan hubungan antar variabel terikat.

5.6 Efek afzelin terhadap aktivasi Rac1-GTPase pada sel MDA-MB-231

Aktivasi Rac1 dihambat oleh pemberian afzelin pada semua konsentrasi (gambar 5.10). Tetapi pada afzelin konsentrasi 200 µg/ml, penghambatan tersebut tidak berbeda bermakna dibandingkan kontrol negatif. Inhibisi aktivasi Rac1 terjadi

secara konsisten pada paparan afzelin konsentrasi 400 µg/ml dan 800 µg/ml, yang menyebabkan penurunan hingga lebih dari 50% dibanding kontrol negatif (tabel 5.5).



Notasi menunjukkan $p < 0,05$ yaitu ^a terhadap kontrol negatif; ^b terhadap afzelin 100, ^c afzelin 200 dan ^dafzelin 400 µg/ml

Gambar 5.10 Efek perlakuan afzelin terhadap aktivasi Rac1 setelah paparan 24 jam. Observasi dilakukan melalui metode G-LISA dengan hasil berupa densitas optik pada pengamatan dengan panjang gelombang 490 nm.

Tabel 5.5 Efek afzelin terhadap aktivasi Rac1 pada sel MDA-MB-231

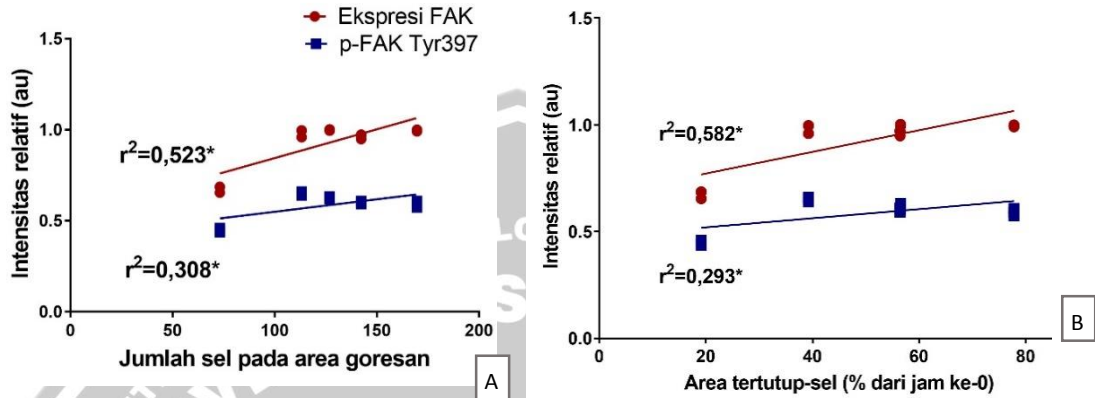
Aktivitas Rac1 (OD)	Perlakuan (µg/ml)				
	Kontrol (-)	100	200	400	800
Rerata ±	0,9267 ±	0,633 ±	0,765 ±	0,446 ±	0,353 ±
SD	0,175	0,095 ^a	0,094	0,036 ^{ac}	0,033 ^{abc}

Notasi menunjukkan $p < 0,05$ yaitu ^a terhadap kontrol negatif; ^b terhadap afzelin 100, ^c afzelin 200 dan ^d afzelin 400 µg/ml

5.7 Hubungan antara, ekspresi FAK, p-FAK Tyr397, aktivasi Rac1, dan migrasi sel pada paparan afzelin

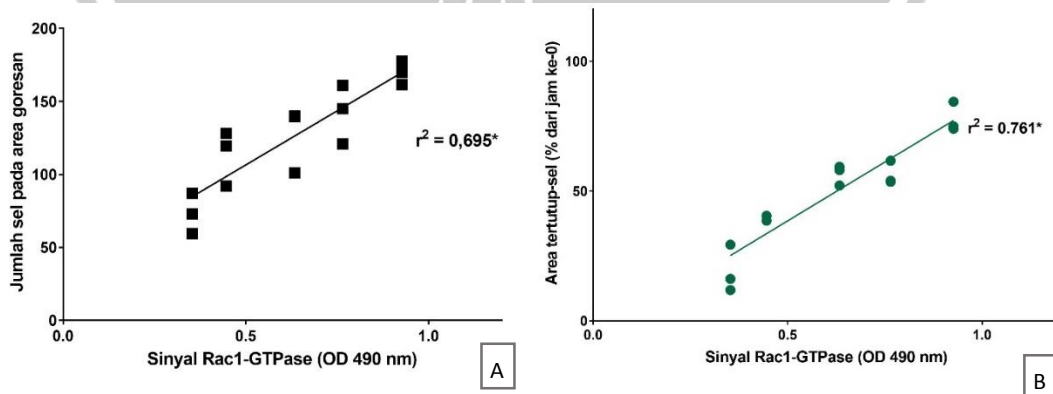
Analisis hubungan antar variabel terikat dilakukan untuk membuktikan apakah mekanisme kerja afzelin sesuai dengan jalur pensinyalan yang menjadi landasan teori. Analisis hubungan dilakukan dengan migrasi 24 jam sesuai dengan lama perlakuan afzelin saat menguji efeknya terhadap ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397. Pengujian hubungan antara ekspresi FAK terhadap migrasi sel menunjukkan hubungan positif yang bermakna dengan keeratan hubungan yang moderat ($0,67 > r^2 > 0,33$). Keeratan hubungan ini terjadi secara konsisten pada

analisis kuantitatif migrasi menurut jumlah sel yang mengisi area goresan maupun area tertutup sel. Sementara hubungan antara p-FAK Tyr397 dengan migrasi sel mempunyai keeratan hubungan yang lemah ($r^2 < 0,33$) (Gambar 5.11).



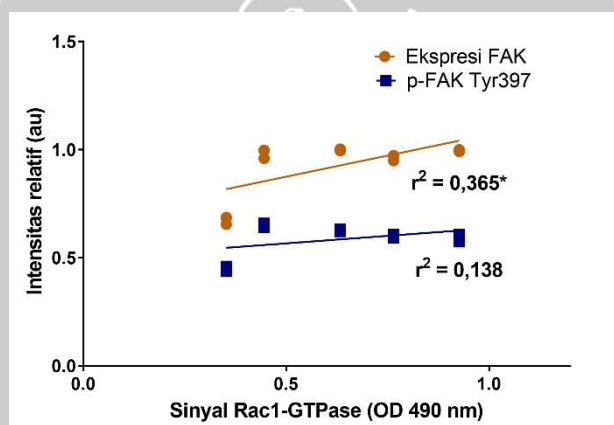
Gambar 5.11 Hubungan antara ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397 dengan migrasi sel akibat paparan afzelin pada sel MDA-MB-231. Analisis dilakukan terhadap hubungan antara ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397 dengan jumlah sel yang mengisi area goresan (A) dan area tertutup sel (B). Data disajikan dalam rerata. Tanda * menunjukkan $p < 0,05$. r^2 menunjukkan keeratan hubungan antar variabel terikat

Aktivasi Rac1 dengan migrasi sel menunjukkan hubungan positif yang bermakna dengan keeratan hubungan yang substansial ($r^2 > 0,67$) (gambar 5.11). Hasil ini konsisten untuk semua pengamatan migrasi berdasar jumlah sel mengisi area goresan dan area tertutup sel, (gambar 5.12).



Gambar 5.12 Hubungan antara sinyal Rac1 dengan jumlah sel pada area goresan (A) dan dengan area tertutup sel (B) pada sel MDA-MB-231 yang dipapar afzelin. Tanda * menunjukkan $p < 0,05$. r^2 menunjukkan keeratan hubungan antar variabel terikat. Data disajikan dalam rerata.

Hubungan positif pada analisis ini menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi FAK dan aktivasi Rac1 berperan dalam peningkatan migrasi sel. Aktivasi FAK dan aktivasi Rac1 terjadi melalui mekanisme yang timbal balik. Pada penelitian ini, pengaruh afzelin terhadap mekanisme tersebut dikonfirmasi dengan analisis hubungan antara ekspresi FAK dengan aktivasi Rac1 serta p-FAK Tyr397 dengan aktivasi Rac1 (gambar 5.13). Ekspresi FAK berhubungan positif secara moderat dengan aktivasi Rac1 ($0,67 > r^2 > 0,33$), tetapi p-FAK Tyr397 tidak berhubungan dengan aktivasi Rac1 ($r^2 < 0,33$). Hal ini menunjukkan penurunan aktivasi Rac1 akibat paparan afzelin tidak sebanding dengan penurunan p-FAK Tyr397.

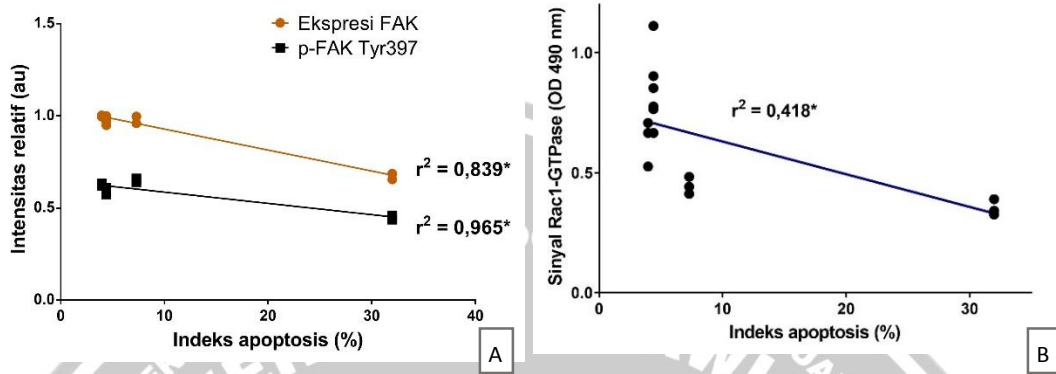


Gambar 5.13 Hubungan antara ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397 dengan aktivasi Rac1. Data disajikan dalam rerata. Tanda * menunjukkan $p < 0,05$. r^2 menunjukkan keeratan hubungan antar variabel terikat.

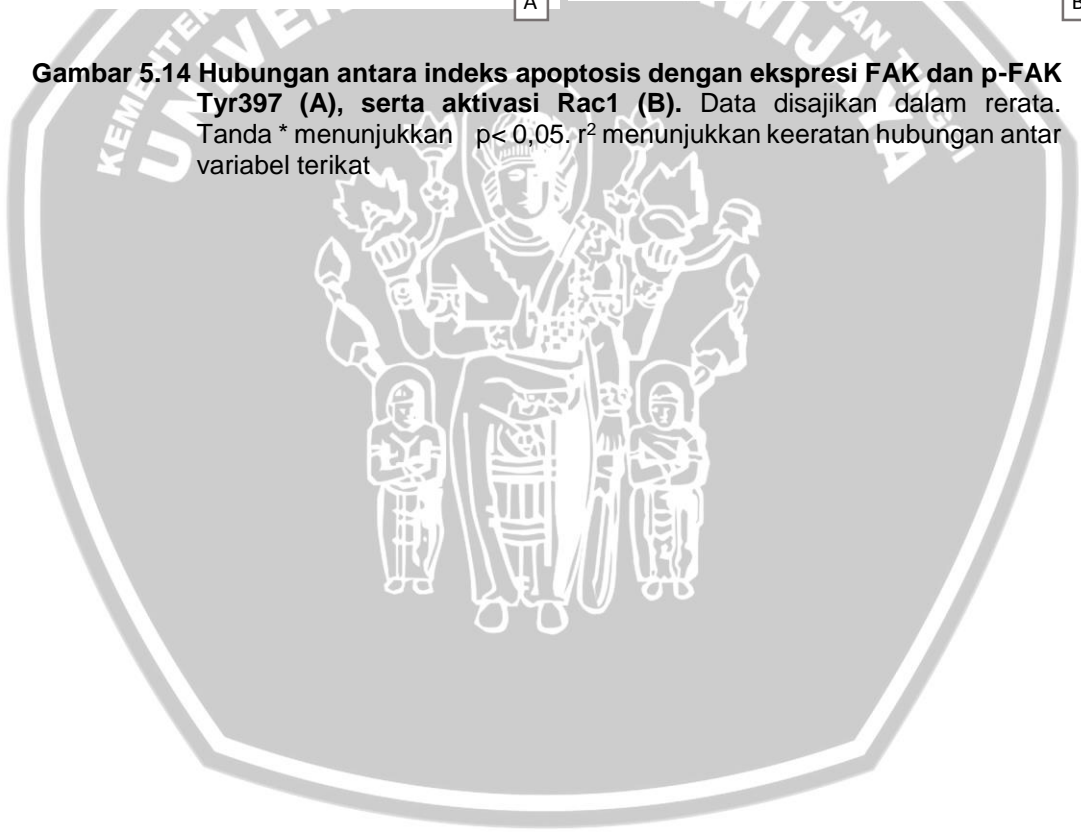
5.8 Hubungan antara ekspresi FAK, p-FAK Tyr397, aktivasi Rac1, dan apoptosis sel pada sel MDA-MB-231 akibat paparan afzelin

Analisis hubungan apoptosis indeks dengan ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397 menunjukkan hubungan negatif yang bermakna, yaitu peningkatan ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397 berhubungan dengan penurunan indeks apoptosis, atau sebaliknya. Berdasarkan nilai r^2 , hubungan ekspresi FAK dan p-

FAK Tyr397 dengan indeks apoptosis termasuk kategori substansial ($r^2 > 0,67$). Hasil serupa juga didapatkan pada analisis hubungan aktivasi Rac1 dengan indeks apoptosis, yaitu menunjukkan hubungan negatif yang bermakna tetapi dengan keeratan hubungan moderat ($0,67 > r^2 > 0,33$) (gambar 5.14).



Gambar 5.14 Hubungan antara indeks apoptosis dengan ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397 (A), serta aktivasi Rac1 (B). Data disajikan dalam rerata. Tanda * menunjukkan $p < 0,05$. r^2 menunjukkan keeratan hubungan antar variabel terikat



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Afzelin menurunkan viabilitas sel MDA-MB-231

Pada penelitian ini, afzelin mampu menurunkan viabilitas sel MDA-MB-231 sesuai dengan hipotesis kerja. Pembuktian yang dilakukan adalah di tingkat mitokondria dengan uji MTT. Pada metode MTT, garam *tetrazolium*, 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) secara aktif diabsorpsi ke dalam sel dan tereduksi menjadi MTT-formazan oleh *succinate dehydrogenase* yang terdapat pada mitokondria. Produk formazan terakumulasi di dalam sel karena tidak dapat melalui membran. Penambahan DMSO mampu melarutkan dan membebaskan formazan sehingga dapat dikuantifikasi secara kolorimetrik. Oleh karena itu, pengujian dengan MTT tergantung pada respirasi mitokondria termasuk integritas dan aktivitas mitokondria dan secara tidak langsung mengukur kapasitas energi seluler suatu sel. Hal ini diinterpretasikan sebagai pengukuran viabilitas sel (Riss *et al.*, 2016).

Kemampuan afzelin dalam menurunkan viabilitas sel juga terbukti pada beberapa jenis sel kanker lain yaitu sel kanker payudara dengan reseptor estrogen positif (MCF-7) (Diantini *et al.*, 2012) yang dibuktikan melalui uji MTT, serta sel kanker prostat yang tergantung androgen (LNCaP) dan tidak tergantung androgen (PC-3) yang dibuktikan melalui uji dengan *water soluble tetrazolium salt* (WST)-1 (Zhu *et al.*, 2015). Kedua pembuktian tersebut (MTT dan WST-1) mempunyai mekanisme dasar yang sama yaitu uji kolorimetrik berdasar pembentukan kristal formazan (Yin *et al.*, 2013). Metode jenis ini menghasilkan interpretasi bahwa penurunan viabilitas sel akibat afzelin dapat merupakan hasil kumulatif dari berbagai efek sitotoksik afzelin terhadap sel kanker. Efek sitotoksik mungkin

menyebabkan kehilangan integritas membran, gangguan aktivitas metabolik membran, gangguan adhesi *monolayer* dan penghentian sel pada berbagai tahap siklus sel (Patravale *et al.*, 2012).

Pada penelitian ini terbukti sel MDA-MB-231 mempunyai sensitivitas sitotoksik yang lebih rendah terhadap afzelin dibandingkan dengan sel kanker lain yang pernah diteliti. Hal ini ditunjukkan oleh perlu paparan afzelin hingga 800 µg/ml untuk menghasilkan penurunan viabilitas sel yang bermakna dibanding kontrol negatif. Selain itu, prediksi IC50 afzelin terhadap viabilitas sel lebih tinggi pada sel MDA-MB-231 (992.33 µg/ml) dibandingkan dengan MCF-7 (98 µg/ml) (Diantini *et al.*, 2012), LNCaP (sekitar 10 µg/ml) dan PC-3 (sekitar 1 µg/ml) (Zhu *et al.*, 2015). Sensitivitas terhadap efek sitotoksik flavonoid pada tipe sel kanker payudara yang berbeda juga dapat menunjukkan perbedaan. Sensitivitas MCF-7 (ER +) terhadap sitotoksitas flavonoid dapat lebih kuat dibanding pada MDA-MB-231, misalnya paparan quercetin (Ranganathan, *et al.*, 2015), kaempferol, 3,4' *dihydroxy flavone*, dan naringenin (Kim *et al.*, 2008). Di sisi lain isorhamnetin, acacetin dan genkwanin menurunkan viabilitas sel lebih baik pada MDA-MB-231 dibanding MCF-7 (Zhang *et al.*, 2018). Oleh karena itu, efek sitotoksik metabolit sekunder sangat mungkin dipengaruhi oleh karakteristik metabolit sekunder tersebut dan karakteristik sel kanker yang menjadi target.

6.2 Afzelin meningkatkan apoptosis pada sel MDA-MB-231

Pemeriksaan *flow cytometry* dengan marker Annexin V dan PI mampu mendemonstrasikan efek afzelin dalam memicu apoptosis pada sel MDA-MB-231, sesuai dengan hipotesis kerja. Kemampuan afzelin ini juga dikonfirmasi pada sel MCF-7 dan LNCaP berdasar peningkatan regulasi protein *caspase* (*caspase-8*, *caspase-9* dan *caspase-3*) dan *poly-(ADP-ribose) polymerase* (PARP) paska 24 jam paparan afzelin (Diantini *et al.*, 2012; Halimah *et al.*, 2015), yang menunjukkan

bahwa induksi apoptosis oleh afzelin melalui mekanisme yang tergantung *caspase*.

Perbandingan efek afzelin terhadap apoptosis dengan viabilitas sel pada MDA-MB-231 menunjukkan kecenderungan serupa dengan sedikit perbedaan, yaitu paparan konsentrasi 400 $\mu\text{g/ml}$ memberi peningkatan apoptosis yang bermakna dibanding kontrol negatif tetapi viabilitas sel baru menurun bermakna pada konsentrasi 800 $\mu\text{g/ml}$. Perbedaan ini berhubungan dengan target pemeriksaan. Pada apoptosis, posisi *phosphatidylserine* berpindah dari bagian dalam ke bagian luar membran sel akibat inaktivasi flipase dan aktivasi *scramblase*, keduanya difasilitasi oleh *caspase* 3 dan 7 (Nagata *et al.*, 2016). Pengujian dengan Annexin V berdasar ikatan protein tersebut dengan *phosphatidylserine* di permukaan sel, dengan kehadiran kalsium. Prinsip ini berbeda dengan pengujian MTT yang berdasar pada reduksi oleh *succinate dehydrogenase* (SDH), yang merupakan enzim kompleks rantai respirasi II pada permukaan dalam membran mitokondria. Awal proses apoptosis ditandai perubahan pH yang menyebabkan disosiasi sub unit SDH-A dan -B dari membran mitokondria, Disosiasi ini tidak mempengaruhi kemampuan kompleks sub-unit SDH-A/B, bahkan aktivitas kompleks sub-unit menjadi tidak terkontrol (Grimm, 2013). Oleh karena itu, walaupun telah terjadi perpindahan *phosphatidylserine*, tetapi mungkin aktivitas SDH masih mampu mereduksi MTT sehingga penurunan viabilitas sel belum menurun secara bermakna.

Paparan afzelin konsentrasi 400 $\mu\text{g/ml}$ mampu meningkatkan apoptosis secara bermakna dibanding kontrol negatif, tanpa peningkatan nekrosis. Sedangkan pemberian afzelin konsentrasi 800 $\mu\text{g/ml}$ mampu meningkatkan apoptosis 4,4 kali lipat dibanding dosis 400 $\mu\text{g/ml}$, namun disertai dengan peningkatan nekrosis 4,8 kali lipat. Hasil ini menuntut interpretasi yang berhati-hati. Pada kultur sel, nekrosis dapat berasal dari nekrosis primer yang merupakan

nekrosis sel *ab initio* (sejak awal) dan/atau nekrosis sekunder yang terjadi saat sel apoptotik tidak difagosit oleh sel *scavenger* sehingga berlanjut ke autolitik (Silva, 2010). Keduanya mempunyai dampak yang berbeda dalam penetapan konsentrasi afzelin dalam konteks penghambatan metastasis sel MDA-MB-231. Bila nekrosis yang terjadi pada paparan afzelin 800 µg/ml didominasi oleh nekrosis sekunder, maka pemberian afzelin pada konsentrasi tersebut mampu menekan pertumbuhan tumor primer selama sel *scavenger in vivo* adekuat. Tetapi bila mayoritas tipe nekrosis primer maka paparan afzelin pada konsentrasi 800 µg/ml akan berkontribusi pada terjadinya infiltrasi sel inflamasi, terutama monosit/makrofag (Su *et al.*, 2015).

Keberadaan monosit pada lingkungan mikro tumor primer sangat mungkin berdiferensiasi menjadi *M2-like macrophage* atau disebut juga *tumor-associated macrophage* (TAM). Makrofag ini menyekresi sitokin anti-inflamatorik yang dapat memprogram ulang lingkungan mikro immunosupresif dan memfasilitasi perkembangan tumor dengan sekresi faktor angiogenik (Yang dan Zhang, 2017). Di samping itu, infiltrasi makrofag di lingkungan mikro tumor meningkatkan risiko terbentuknya struktur mikro-anatomis yang disebut *tumor microenvironment of metastasis* (TMEM) (Chang *et al.*, 2017; Karagiannis *et al.*, 2017). Struktur ini terdiri dari satu sel makrofag dan satu sel kanker di lokasi peri-vaskular (Robinson *et al.*, 2017) yang menjadi lokasi sel kanker memasuki aliran darah (Harney *et al.*, 2017), sehingga meningkatkan risiko intravasasi. Oleh karena itu, pendekatan untuk membedakan nekrosis primer dan sekunder akibat paparan afzelin pada sel MDA-MB-231 perlu diupayakan, misalnya dengan pengukuran aktivitas *caspase* melalui pengamatan *time-lapse* pada sel tunggal dengan *fluorescence resonance energy transfer* (FRET)-based active *caspase detection probe* dan *DsRed fluorescent protein* yang menarget mitokondria (Lekshmi *et al.*, 2017), atau menambahkan stabilisator apoptosis pada sel kultur yang dapat menunda nekrosis

sekunder sehingga apoptosis sempat terdeteksi (Sánchez-Alcázar *et al.*, 2015). Walaupun demikian, induksi apoptosis juga tidak berarti tanpa efek yang tidak diinginkan. Penelitian terakhir menunjukkan kemungkinan kontribusi apoptosis terhadap metastasis melalui peningkatan ekspresi sitokin pro-inflamasi CXCL5 pada sel fagositik yang melakukan eferositosis (*clearance* sel apoptotik) (Jones *et al.*, 2017).

6.3 Afzelin menurunkan migrasi sel MDA-MB-231

Kemampuan afzelin menekan migrasi sel MDA-MB-231 terbukti melalui uji *scratch* yang memodelkan pergerakan sel pada dua dimensi. *Scratch wound healing* digunakan untuk pengamatan interaksi antar sel dan interaksi sel dengan MES (Sullivan *et al.*, 2011), karena dalam prosedur ini dilakukan perlakuan pada sel monolayer yang melekat satu sama lain dan dengan dasar *plate*. Metode ini juga dapat menjadi model migrasi *directional* karena sel membentuk protrusi ke arah area goresan yang selnya telah dihilangkan (Molinie dan Gautreau, 2018). Kemungkinan terjadinya pseudo migrasi sebagai efek proliferasi diminimalkan dengan starvasi serum sebelum dan selama perlakuan dengan afzelin (Grada *et al.*, 2017).

Migrasi sel MDA-MB-231 pada uji *scratch* ini menunjukkan pola migrasi yang hubungan antar sel-nya longgar, seperti halnya pada fibroblast (Liang, *et al.*, 2007). Pengujian migrasi dua dimensi dapat menjadi model pergerakan mesenkimal pada sel MDA-MB-231 yang cenderung migrasi secara individual atau *streaming* multiseluler (sel *non-adherent* yang bergerak melalui jalan yang sama) pada *in vivo* (Clark dan Vignjevic, 2015).

Interpretasi hasil uji *scratch* ini dilakukan melalui dua pendekatan yaitu dengan menghitung jumlah sel yang berpindah ke area goresan (Tantivejkul, *et al.*, 2003) dan mengukur area goresan yang tertutup sel setelah 24 dan 48 jam

perlakuan afzelin (Cormier *et al.*, 2015). Kedua pendekatan ini menunjukkan pola yang serupa. Analisis lebih lanjut terhadap efek tiap konsentrasi afzelin, paparan 400 µg/ml menyebabkan peningkatan persentase area-tertutup sel yang bermakna pada jam ke-48 dibandingkan jam ke-24. Sedangkan bila dianalisis berdasar jumlah sel, konsentrasi tersebut mampu memperlambat migrasi yang ditunjukkan oleh peningkatan yang tidak bermakna pada jam ke -48 dibanding jam ke-24. Hal ini mungkin dapat dijelaskan oleh karena bentuk sel belum berubah tipis dan memanjang seperti pada paparan 800 µg/ml sehingga penambahan sel pada jam ke-48 masih menutupi area yang luasnya bermakna. Inhibisi migrasi sel MDA-MB-231 oleh afzelin yang diamati melalui uji *scratch* mungkin dapat menjadi indikator potensi afzelin sebagai anti-metastatik *in vivo* (Adams *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017).

Potensi afzelin terhadap modulasi migrasi sel baru pertama kali diujikan pada penelitian ini. Tetapi seperti halnya apoptosis, hambatan migrasi oleh afzelin diduga memiliki sensitivitas yang berbeda terhadap sel kanker lain. Pada dosis rendah (20 µmol/L), kaempferol yang merupakan senyawa inti afzelin merupakan inhibitor poten migrasi dan invasi pada sel MDA-MB-231 tetapi efeknya lemah pada non-TNBC (SK-BR-3 dan MCF-7) (Tian *et al.*, 2018).

Analisis hubungan antara migrasi dengan apoptosis akibat paparan afzelin terhadap sel MDA-MB-231 menunjukkan hubungan negatif yang substansial. Walaupun sejumlah penelitian membuktikan berbagai metabolit mampu menghambat migrasi dan meningkatkan apoptosis pada MDA-MB-231, penjelasan tentang kemungkinan hubungan keduanya tidak selalu dibahas (Wang *et al.*, 2013; Majumder *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2019). Keluarga *inhibitors of apoptosis proteins* (IAPs), yaitu *cellular inhibitor of apoptosis protein* (cIAP)-1 dan *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP), mampu meningkatkan migrasi sel kanker (Oberoi-Khanuja *et al.*, 2013), yang menunjukkan keterlibatan protein

penghambat apoptosis pada regulasi peningkatan migrasi sel. Di sisi lain, migrasi sel dapat terhambat melalui peran *caspase* efektor pada konsentrasi rendah, yang mendukung *apoptosis-independent migration* (Gorelick-Ashkenazi et al., 2018). Hambatan terhadap mekanisme pensinyalan Ras juga diduga menjembatani hambatan migrasi dan peningkatan apoptosis (Tian et al., 2018). Pemahaman hubungan apoptosis dan migrasi dapat memprediksi target protein yang berkontribusi pada kemampuan afzelin dalam meningkatkan apoptosis sekaligus menghambat migrasi sel MDA-MB-231, sebagai arah penelitian selanjutnya.

6.4 Afzelin menghambat pembentukan *focal adhesion* pada sel MDA-MB-231

Mekanisme hambatan migrasi sel MDA-MB-231 oleh afzelin dikaji lebih lanjut dalam hal efeknya terhadap pembentukan *focal adhesion* (FA). Imunofluoresens dengan antibodi anti-vinculin dan phalloidin menunjukkan paparan afzelin menghambat pembentukan *focal adhesion* secara kualitatif.

Adhesi berbasis integrin mendukung pergerakan sel melalui hubungan tidak langsung dengan sitoskeleton aktin. Domain ekstrasel integrin berikatan dengan motif *sequence* spesifik pada protein fibronektin yang digunakan sebagai MES pada penelitian ini. Ikatan integrin dengan ligand ekstrasel menginduksi perubahan konformasi yang membuka ekor sitoplasmiknya, yang lalu memicu ikatan dengan sitoskeleton aktin melalui kompleks multiprotein, *adhesome* (Parsons, et al., 2010). *Adhesome* dapat berisi lebih dari 900 protein baik reseptor, pensinyalan, sitoskeletal atau adaptor (Lawson dan Schlaepfer, 2012), dengan inti sekitar 60 protein.

Vinculin yang digunakan sebagai penanda *focal adhesion* pada penelitian ini merupakan *protein linker* bagian dari *adhesome* pada axis pensinyalan talin–vinculin (Horton et al., 2015), yang perubahan konformasinya permanen (Owen et al., 2005). Pada awal protrusi di *leading edge* sel, vinculin bergabung pada *nascent adhesions* dan berikatan dengan kompleks Arp2/3 yang merupakan

nukleator polimersasi aktin yang poten (Bays dan DeMali, 2017). Keberadaan vincullin tetap bertahan saat *nascent adhesion* berubah menjadi bentuk yang lebih matang (Atherton *et al.*, 2016), sehingga dapat menjadi marker *nascent adhesion*, *focal complex*, dan *focal adhesion* matang yang dalam penelitian ini semua jenis adhesi ini disebut sebagai FA.

Pada penelitian ini, pengamatan protrusi sel dan FA terbatas oleh pembesaran mikroskop konfokal (40 x, dibanding ideal 100x) dan pewarnaan immunofluoresens (phalloidin - pewarna actin) yang digunakan dalam pengamatan mikroskop konfokal. Dalam pengamatan tidak bisa ditetapkan batas tegas lamella dan lamellipodia yang menjadi pembeda lokasi tiap tipe kompleks adhesi. *Nascent adhesion* atau FA tipe *dot* (0,2-0,5 μm) terletak pada ujung lamellipodia. Seiring dengan maturasi *nascent adhesion* menjadi *focal complex* (sekitar 1 μm), posisinya bergeser ke perbatasan lamellae - lamellipodia, dan maturasi lanjut menjadi *focal adhesion* matang atau FA tipe *dash* (panjang 2-10 μm dan lebar 0,5 μm) posisinya berada di lamellae (Owen *et al.*, 2005). Selain itu adhesi yang teramati mungkin merupakan kumpulan dari sejumlah FA dan dari tipe FA yang berbeda (Kim dan Wirtz, 2013). Oleh karena itu dalam penelitian ini, FA dideskripsikan secara kualitatif. Semakin tampak jelas area FA sel MDA-MB-231 dalam satu kelompok pengamatan, semakin banyak FA yang terbentuk.

Focal adhesion sel MDA-MB-231 pada kontrol negatif dan paparan afzelin konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ berukuran lebih besar dan cenderung berada pada *leading edge* sel dibandingkan paparan afzelin konsentrasi 400 dan 800 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini sesuai dengan pola hambatan migrasi sel pada konsentrasi 400 dan 800 $\mu\text{g/ml}$. Pengamatan yang menarik terlihat pada paparan 200 $\mu\text{g/ml}$ yaitu menurunnya FA terlihat lebih samar namun pada pengamatan migrasi sedikit lebih tinggi dari konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$. Fenomena ini mungkin dapat dijelaskan hubungan ukuran *focal adhesion* dengan kecepatan migrasi sel yang bifasik. Saat ukuran FA

meningkat, kecepatan migrasi sel lebih tinggi, tapi saat ambang batas kecepatan maksimum terlampaui maka kecepatan migrasi sel menurun seiring peningkatan ukuran FA (Kim dan Wirtz, 2013b). Jadi, kemungkinan kecepatan migrasi sel MDA-MB-231 pada kontrol negatif dan konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ telah melewati ambang batas kecepatan maksimum sedangkan pada 200 $\mu\text{g/ml}$ belum sehingga walaupun ukuran FA lebih kecil tetapi kecepatannya masih mendekati maksimum.

Pada paparan afzelin 400 dan 800 $\mu\text{g/ml}$, hambatan migrasi tidak hanya dipengaruhi oleh hambatan pembentukan FA tapi juga mungkin berhubungan dengan hambatan *disassembly* (pengbongkaran) sehingga sel tertahan di tempat. Afzelin mungkin juga berefek spesifik terhadap deskriptor tertentu *focal adhesion* (ukuran, jumlah, kepadatan permukaan dan bentuk). Penurunan jumlah sel yang migrasi dan area-tertutup sel mungkin disebabkan oleh efek afzelin dalam menurunkan kecepatan migrasi sel yang berhubungan dengan perubahan ukuran dan bentuk *focal adhesion*. Perubahan bentuk *focal adhesion* juga dapat menyebabkan penurunan jarak tempuh akhir dan persistensi migrasi (Kim dan Wirtz, 2013a). Beberapa aspek efek afzelin terhadap *focal adhesion* ini perlu pengamatan lebih lanjut.

6.5 Afzelin menghambat ekspresi FAK dan bentuk teraktivasi (p-FAKTyr397) pada sel MDA-MB-231

Afzelin mampu menekan jumlah ekspresi FAK dan hasil aktivasi kinase-nya (p-FAK Tyr397), yang dibuktikan melalui pemeriksaan *Western blotting* dan diperkuat dengan analisis kuantitatif dengan piranti lunak ImageJ. Potensi afzelin terhadap ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397 pertama kali dibuktikan melalui penelitian ini. Kemungkinan adanya variasi jumlah total protein yang di-*loading* pada tiap sampel diminimalkan dengan uji konsentrasi protein total dengan Nanodrop. Walaupun demikian metode ini memiliki keterbatasan karena belum diikuti dengan konfirmasi dengan pewarnaan protein total (misal dengan *Comassie*

blue) atau protein kontrol (misal aktin, tubulin, dan GAPDH), untuk normalisasi hasil *Western blotting* (Li-cor Biosciences, 2015).

Bila dikaji berdasar fungsinya sebagai adapter protein pada FA, FAK berperan mengintegrasikan sinyal biokimiawi dan mekanik antara bagian luar dan dalam sel, sehingga meregulasi proses proliferasi, motilitas, diferensiasi, dan apoptosis sel (Ciobanasu, *et al.*, 2012). Peran penting FAK ini digunakan oleh sel kanker untuk kepentingan *survival*-nya. Amplifikasi jumlah kopi gen *fak* dan peningkatan berlebihan ekspresi FAK didapati pada pasien TNBC (Cance *et al.*, 2000; Golubovskaya *et al.*, 2014) dan berbagai sel kultur kanker payudara (Taliaferro-Smith *et al.*, 2015). Kelainan regulasi FAK berhubungan dengan invasi limfe-vaskular pada TNBC (Golubovskaya *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2019) dan penekanan FAK dapat menghambat invasi sel TNBC (Taliaferro-Smith *et al.*, 2015). Kemampuan afzelin menurunkan ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397 diprediksi akan menghasilkan hambatan invasi sel TNBC yang memiliki karakteristik serupa sel MDA-MB-231.

Saat tidak terstimulasi, FERM berikatan dengan domain kinase sehingga FAK tidak aktif dan dalam keadaan ter-*autoinhibisi*. Saat terstimulasi oleh sinyal ekstrasel misalnya integrin atau reseptor faktor pertumbuhan, domain FERM berubah konformasinya dan mengekspos domain kinase katalitik sehingga memfasilitasi auto-fosforilasi Tyr397. Residu Tyr397 terfosforilasi (p-Tyr397) merupakan lokasi ikatan domain *Src-homology 2* (SH2) dari Src. Ikatan Src ke FAK pada Tyr397 melepaskan *autoinhibisi* Src sehingga terjadi fosforilasi FAK lebih lanjut pada residu asam amino *downstream* dari Tyr397, sehingga FAK teraktivasi sepenuhnya. Interaksi ini mempertahankan FAK dan Src tetap aktif dan bekerja sebagai kompleks kinase (Wen, 2012). Oleh karena itu, pada penelitian ini

hambatan kerja kinase FAK terhadap Tyr397 oleh afzelin menjadi target, karena dapat menghambat fungsi FAK secara keseluruhan.

Analisis hasil *Western blotting* mengindikasikan bahwa walaupun p-FAK Tyr397 menurun akibat paparan afzelin tetapi kemungkinan disebabkan oleh penurunan ekspresi FAK. Dugaan ini didasari oleh hubungan antara intensitas relatif FAK dan p-FAK Tyr397 yang positif dan substansial, serta pada paparan afzelin konsentrasi 800 $\mu\text{g/ml}$ penurunan ekspresi FAK (terhadap kontrol negatif) lebih tinggi dibanding penurunan p-FAK Tyr397. Sementara bila afzelin menghambat kerja domain kinase melalui kompetisi dengan ATP, maka penurunan p-FAK Tyr397 akan lebih tinggi dibanding penurunan ekspresi FAK dan didukung oleh hubungan antara keduanya yang moderat atau bahkan lemah. Walaupun demikian, hipotesis kerja bahwa afzelin menurunkan aktivasi FAK pada Tyr397 tetap diterima, dengan catatan bahwa mekanismenya mungkin secara tidak langsung melalui hambatan ekspresi FAK.

Hasil penelitian lain yang menarik adalah p-FAK Tyr397 mengalami peningkatan yang bermakna dibanding kontrol negatif pada perlakuan konsentrasi 400 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini memunculkan dugaan bahwa pada konsentrasi ini terjadi hambatan pembongkaran FA, sehingga terdapat p-FAK Tyr397 pada FA yang baru terbentuk dan pada FA yang dihambat pembongkarannya, yang menghasilkan total p-FAK Tyr397 yang lebih tinggi. Sesuai dengan migrasi sel pada konsentrasi 400 $\mu\text{g/ml}$, penekanan migrasi mungkin disebabkan hambatan pembongkaran FA. Peran afzelin pada fenomena ini dapat diobservasi lebih lanjut pada inhibisi fosforilasi FAK Tyr925, yang berperan dalam pembongkaran FA (Deramaudt *et al.*, 2011). Fosforilasi Tyr925 membentuk *binding-site* untuk SH2 pada Grb2 yang memicu perekrutan dynamin ke FA untuk penguraian FA (Ezratty *et al.*, 2005). Selain itu, aktivasi Grb2 menyebabkan aktivasi Ras dan ERK2. Aktivasi ERK2 menyebabkan fosforilasi FAK pada Ser910 yang menyebabkan

penurunan ikatan paxilin dan akhirnya pelepasan FAK dari FA dan terjadi *turn over* (Wendel dan Haier, 2011). Apabila afzelin menyebabkan hambatan jaras *turn over* FA ini maka penurunan aktivasi/fosforilasi berbagai protein yang terlibat dapat menjadi indikator.

6.6 Afzelin menghambat aktivasi Rac1 pada sel MDA-MB-231

Pada penelitian ini, paparan afzelin menyebabkan penekanan aktivasi Rac1 dalam sel MDA-MB-231. Rac1 merupakan salah satu keluarga Rho-GTPase, yang meregulasi re-organisasi actin dan fungsinya dalam proses seluler seperti migrasi, adhesi, polaritas, dan transport membran sel. Seperti halnya GTPase lain, Rac1 mengalami siklus antara dua bentuk konformasi, yaitu satu berikatan dengan GTP (bentuk aktif) dan satu lagi berikatan dengan GDP (bentuk tidak aktif). Dalam konformasi aktif, GTPase mengenali target protein dan menghasilkan respon sampai hidrolisis GTP mengembalikan Rac1 ke kondisi tidak aktif (Etienne-Manneville dan Hall, 2002). Prinsip ini digunakan oleh pengujian efek afzelin terhadap aktivasi Rac1 melalui metode GLISA, yang digunakan dalam penelitian ini. Rac1 yang teraktifkan (Rac1-GTP) akan berikatan dengan protein efektor *p21 activated kinase 1* (PAK), yang selanjutnya dideteksi oleh antibodi primer monoklonal Rac1 dan antibodi sekunder (Cytoskeleton Inc, 2018). Peningkatan konsentrasi afzelin sejalan dengan penurunan absorbansi Rac1-GLISA, dengan interpretasi bahwa jumlah Rac1-GTPase teraktivasi menurun.

Pada TNBC, peningkatan ekspresi Rac1 berhubungan dengan peningkatan invasi mesenkimal, metastasis dan prognosis buruk (Feng *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2015). Inhibisi aktivasi Rac1 dapat menghambat invasi TNBC (Morimura dan Takahashi, 2011). Oleh karena itu, kemampuan afzelin menurunkan aktivasi sel MDA-MB-231 mendukung prediksi kemampuan hambatan invasi.

Efek afzelin dalam menghambat fosforilasi efektor Rho-GTPase yaitu *LIM domain kinase 1* (LIMK1) dan protein pengaktivasi-nya (*myotonic dystrophy*

kinase-related Cdc42-binding kinase- α (MRCK α), serta *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase* (ROCK)) telah dibuktikan pada kanker prostat yang sensitif- (LNCaP) dan independen-androgen (PC-3) (Zhu *et al.*, 2015). Tetapi efek afzelin terhadap Rac1, yang berperan dalam pembentukan protrusi membran plasma dan lamellipodia pada migrasi sel MDA-MB-231 belum pernah dieksplorasi. Sebagaimana efek flavonoid pada viabilitas sel kanker, efek flavonoid terhadap protein migrasi pada tipe sel kanker yang berbeda sangat mungkin dipengaruhi oleh karakteristik sel kanker, sehingga respon sel MDA-MB-231 terhadap afzelin mungkin berbeda sensitivitasnya dibanding sel LNCaP dan PC-3.

Protein Rac1 meregulasi LIMK1 melalui ROCK1 dan *p21 (RAC1) Activated Kinase 1* (Pak1) (Sumi *et al.*, 2001). LIMK teraktivasi akan memfosforilasi cofilin sehingga tidak aktif. Hal ini memfasilitas pemanjangan lamelipodium melalui konversi daya polimerisasi aktin ke pemanjangannya dengan cara menurunkan kecepatan aliran *retrograde* aktin (Ohashi *et al.*, 2011). Hambatan jaras sinyal Rac1/ROCK1/Pak1/LIMK1/ *actin depolymerizing factor* (ADF)/cofilin menyebabkan hambatan migrasi dan invasi pada sel kanker kolorektal (SW480) (Zhou *et al.*, 2013). Bila paparan afzelin pada sel MDA-MB-231 memiliki efek yang mirip dengan pada sel kanker prostat, yaitu menghambat fosforilasi LIMK1, MRCK α , dan ROCK (Zhu *et al.*, 2015), maka mungkin selain menghambat aktivasi Rac1 afzelin dapat menghambat protein migrasi pada *downstream* Rac1. Efek tersebut mungkin dapat menjelaskan hubungan Rac1 dan migrasi sel yang moderat dan faktor lain yang mempengaruhi migrasi sel MDA-MB-231.

Aktivasi Rac1 melibatkan *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) dan dinonaktifkan oleh *GTPase-activating proteins* (GAPs). Hambatan aktivasi Rac1 oleh afzelin mungkin berhubungan dengan hambatan GEF Rac1 baik secara langsung pada protein GEF atau melalui lokasi interaksi Rac1 dengan GEF, misalnya *downstream of CrK* (DOCK180) (Danen, 2013), GEF-H1 (Gao *et al.*,

2001), VAV (De *et al.*, 2019) dan *phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 1* (P-Rex1) (Marei dan Malliri, 2017). Hambatan pada GEF-Rac1 jenis ini akan menekan aktivasi Rac1, sehingga tidak terbentuk kompleks dengan IRSp53 dan *WASP-family verprolin-homologous protein* (WAVE)-2. Sebagai akibatnya Arp2/3 tidak teraktivasi sehingga pemanjangan F-actin pada *leading edge* sel yang dibutuhkan untuk mendorong protrusi membran akan terhambat (Kato *et al.*, 2014).

6.7 Afzelin menghambat migrasi sel MDA-MB-231 melalui hambatan ekspresi FAK, p-FAK Tyr397 dan aktivasi Rac1

Mekanisme translasi rangsangan mekanik menjadi sinyal biokimiawi pada migrasi sel secara dua dimensi berhubungan dengan peran FAK dan Rac1 (Bauer *et al.*, 2019). Pada paparan afzelin, peran ekspresi FAK terhadap migrasi sel dibuktikan pada hasil analisis regresi yang positif dengan keeratan hubungan yang moderat. Hubungan yang hanya moderat ini diduga mencerminkan pentingnya aktivasi FAK untuk dapat terjadi migrasi sel, sehingga penurunan ekspresi FAK tidak selalu sejalan dengan penurunan migrasi. Misalnya pada paparan afzelin mulai 100 $\mu\text{g/ml}$ telah terjadi penurunan migrasi dibanding kontrol negatif baik dalam jumlah sel maupun area tertutup sel, sedangkan ekspresi FAK baru menurun pada konsentrasi 800 $\mu\text{g/ml}$.

Analisis berikutnya menunjukkan p-FAK Tyr397 mempunyai hubungan lemah dengan migrasi sel MDA-MB-231, dengan penurunan kuantitas p-FAK Tyr397 yang tidak sebanding dengan penurunan migrasi sel pada paparan afzelin. Misalnya pada paparan afzelin konsentrasi mulai 400 $\mu\text{g/ml}$ telah terjadi hambatan jumlah sel migrasi dalam 24 jam yang berbeda bermakna dibanding kontrol negatif, bahkan berdasar area tertutup sel hambatan tersebut telah terjadi sejak konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan bila dikaji dari intensitas relatif p-FAK Tyr397, pada afzelin 400 $\mu\text{g/ml}$ terjadi peningkatan yang bermakna dan kemudian pada

800 $\mu\text{g/ml}$ baru terjadi penurunan yang bermakna dibanding kontrol negatif. Fenomena lemahnya hubungan antara migrasi dan p-FAK Tyr397 diduga terjadi melalui beberapa hipotesis yaitu 1) afzelin menghambat pada fosforilasi FAK pada lokasi selain Tyr397, 2) afzelin mempengaruhi mekanisme pembongkaran FA yang berdampak pada hambatan inaktivasi FAK (mekanisme ini telah diuraikan pada sub bab 6.4), 3) afzelin menghambat lokasi *scaffold* melalui mekanisme yang independen fosforilasi, 4) afzelin menghambat protein migrasi yang berada pada *downstream* dari FAK.

Focal adhesion kinase memfasilitasi migrasi sel melalui dua fungsinya yaitu sebagai enzim kinase dan sebagai *scaffold* protein. Afzelin mungkin dapat menghambat migrasi melalui hambatan fungsi enzimatik dari FAK walaupun tidak melalui Tyr397. Hal ini karena setelah autofosforilasi Tyr397 diperlukan interaksi dengan Src dan kemudian kompleks FAK-Src harus memicu serangkaian fosforilasi berikutnya (Tyr 576, Tyr577, Tyr861) sehingga FAK teraktivasi sepenuhnya (Marlowe *et al.*, 2019). FAK memiliki 25 lokasi fosforilasi (15 serin, 5 threonin dan 5 tirosin) dan 10 lokasi telah diketahui fungsinya (Grigera *et al.*, 2005). Oleh karena itu, walaupun afzelin terbukti tidak menghambat fosforilasi Tyr397 tetapi tidak menutup kemungkinan afzelin berkompetisi dengan ATP pada lokasi fosforilasi lain atau menginhibisi lokasi allosterik dalam aktivasi FAK, sehingga menghambat fungsi FAK sebagai enzim.

Afzelin juga mungkin menginhibisi *scaffold* pada FAK melalui mekanisme yang independen fosforilasi. Domain *C-terminal* FAT dan *proline-rich* menyediakan *binding motif* untuk protein yang mempunyai domain SH3, misalnya Cas, GRAF dan ASAP1. Ketiganya berperan dalam pengorganisasian sitoskeleton untuk migrasi sel (Wendel dan Haier, 2011; Zhao dan Guan, 2011). Bila afzelin menghambat lokasi *scaffold* pada FAK, efek yang ditimbulkan dapat berupa hambatan migrasi sel.

Analisis hubungan ekspresi FAK, p-FAK Tyr397, aktivasi Rac1 dengan migrasi sel memunculkan prediksi target kerja afzelin dalam hambatan migrasi pada sel MDA-MB-231. Berdasar hubungan antara migrasi sel dengan ekspresi FAK yang moderat dan dengan p-FAK Tyr397 yang lemah, target kerja afzelin dalam hambatan migrasi diduga pada *upstream* dari ekspresi FAK dan atau *downstream* dari fosforilasi FAK Tyr397. Berdasar hubungan antara Rac1 dengan migrasi sel yang menunjukkan hubungan yang substansial, afzelin mungkin menarget protein *upstream* dari Rac1 atau langsung menarget aktivasi Rac1. Selain itu dari hubungan antara Rac1 dengan ekspresi FAK (moderat rendah) dan p-FAK Tyr397 (lemah) target kerja afzelin patut diduga ada di jaras sinyal aktivasi Rac1 yang independen FAK atau juga langsung pada Rac1 sendiri. Dengan demikian, target kerja afzelin dalam hambatan migrasi sel MDA-MB-231 dapat berada pada *upstream* dari ekspresi FAK dan *downstream* dari aktivasi FAK Tyr397 hingga aktivasi Rac1.

Pada tumor payudara invasif, peningkatan kopi gen FAK sering ditemukan. Tetapi peningkatan kopi gen FAK tidak selalu diikuti dengan peningkatan protein FAK, sehingga diduga ada keterlibatan modulator ekspresi FAK (Yom *et al.*, 2011). Penurunan ekspresi FAK mungkin disebabkan oleh efek afzelin dalam menghambat modulator ekspresi FAK. Regulasi ekspresi FAK belum banyak diketahui. Pada tahap transkripsi, peningkatan ekspresi *argonaute* (AGO)-2, *polyomavirus enhancer binding protein* (PEA)-3, Nanog dan *N-myelocytoma* (N-MYC) memicu ekspresi FAK, melalui perannya sebagai faktor transkripsi yang mengaktifkan promotor FAK (Beierle *et al.*, 2007; Yom *et al.*, 2011; Naser *et al.*, 2018). Kerja p53 dapat dihambat oleh FAK, tapi di sisi lain p53 bersama NF- κ B meregulasi transkripsi FAK (Golubovskaya *et al.*, 2004).

Penekanan aktivasi Rac1 pada hasil penelitian ini juga bisa terjadi bila afzelin mampu menghambat protein yang berada pada sinyal transduksi yang

menghubungkan aktivasi FAK dan aktivasi Rac1. Aktivasi FAK mengaktifkan jaras sinyal PI3K/PIP3/VAV, dengan VAV yang berperan sebagai GEF-Rac1 (Lien *et al.*, 2017). Selain itu, FAK juga mengaktivasi jaras p130Cas/Crk/Dock180/ *engulfment and cell motility* (ELMO1), dengan kompleks DOCK180/ELMO1 bekerja sebagai GEF untuk Rac1 (Danen, 2013).

Penurunan aktivasi Rac1 juga mungkin disebabkan oleh kerja afzelin menghambat jaras pensinyalan aktivasi Rac1 yang independen FAK. Rac1 dapat teraktivasi tanpa melalui FAK. Misalnya pada ligasi ICAM1, aktivasi MUC-1 memicu respon sinyal Src/Crk/Rac1 pro-migrasi (Shen *et al.*, 2008). Jaras sinyal lainnya adalah melalui tiga protein mediator sinyal integrin yaitu *integrin-linked kinase* (ILK), *particularly interesting Cys-His-rich protein* (PINCH) dan parvin yang membentuk kompleks heterotrimerik. β -Parvin berikatan dengan protein α -actinin dan GEF α -PIX yang memicu *spreading* sel yang dependen pada Rac1 (Legate *et al.*, 2006; Lawson dan Burridge, 2014).

6.8 Afzelin meningkatkan apoptosis sel MDA-MB-231 melalui hambatan ekspresi FAK, p-FAK Tyr397 dan aktivasi Rac1

Pada paparan afzelin terhadap sel MDA-MB-231 pada penelitian ini, ekspresi FAK, p-FAK Tyr397 dan aktivasi Rac1 berhubungan negatif dengan keamatan substansial (untuk FAK dan p-FAK Tyr397) dan moderat (untuk Rac1) dengan indeks apoptosis, yaitu peningkatan apoptosis berhubungan dengan penurunan ekspresi FAK, p-FAK Tyr 397 dan aktivasi Rac1. Keamatan hubungan dalam analisis mendukung prediksi bahwa FAK, p-FAK Tyr397 dan aktivasi Rac1 berkontribusi terhadap kejadian apoptosis.

Focal adhesion kinase berperan penting dalam regulasi *survival* sel kanker yang melibatkan kompleks pensinyalan berbagai protein onkogenik, seperti EGFR, HER-2, *hepatocyte growth factor receptor* (MET dikodekan oleh *c-Met*) dan *Src*, dan protein supresor tumor seperti *TP53* dan NF-1 (Cance *et al.*, 2013). Hubungan

FAK dengan apoptosis difasilitasi oleh *scaffold* FAK yang mampu melakukan sequestrasi. Dalam model ini, FAK mengikat dan menon-aktifkan protein pro-apoptotik, termasuk p53, RIP, dan NF-1, sehingga menghambat fungsi induksi apoptosis pada sel kanker (Cance dan Golubovskaya, 2008). Penghambatan p53 oleh FAK juga terjadi di nukleus. Pada nukleus, domain FERM berikatan dengan p53 dan lalu berikatan dengan Mdm2, yang menyebabkan degradasi p53 melalui ubiquitinisasi dan *Mdm2-mediated proteasomal*. Penurunan p53 nukleus menghalangi fungsinya sebagai faktor transkripsi untuk protein survival, misalnya p21, GADD-45, Bax, dan Mdm2 (Wen, 2012).

Pada sel MDA-MB-231, hubungan resistensi terhadap apoptosis dengan ekspresi FAK mungkin tidak melalui kemampuan sequestrasi p53 oleh FAK. Hal ini karena p53 pada sel ini telah mengalami mutasi *missense* pada exon 9 – kodon 280 dan mengalami over ekspresi. Over ekspresi p53 mutan umumnya menyebabkan peningkatan fungsi (*gain of function*), dengan akumulasinya yang tinggi intra nukleus dan perannya sebagai faktor transkripsi protein survival dan tumorigenesis (Gartel *et al.*, 2002; Mirzayans *et al.*, 2012). Ekspresi p53 mutan sebanding dengan ekspresi FAK pada pasien kanker payudara. Pada kondisi *wild type*, p53 dapat berikatan dengan area promotor FAK dan menekan aktivasinya. Sedangkan p53 mutan tidak berikatan dengan promotor FAK sehingga tidak menghambat ekspresi FAK (Golubovskaya *et al.*, 2008, 2009). Oleh karena itu kemampuan afzelin menurunkan ekspresi FAK tidak menyebabkan peningkatan pro-apoptotik p53 mutan.

Hubungan antara FAK dengan apoptosis pada paparan afzelin mungkin dijumpai oleh protein anti-apoptotik *downstream* dari p53. FAK berperan dalam aktivasi jalur survival Akt yang mengaktifasi keluarga IAP (Sonoda *et al.*, 2000) dan dalam aktivasi protein Bcl2 (Matter dan Ruoslahti, 2001). Inhibisi FAK dan PYK2 secara simultan dengan Bcl-XL yang merupakan keluarga Bcl2, dapat

meningkatkan apoptosis (Yoon *et al.*, 2014). Bila afzelin menghambat keluarga protein anti-apoptotik ini, maka afzelin dapat menginduksi apoptosis pada sel dengan mutasi p53.

Fungsi inhibisi FAK selain berhubungan dengan peningkatan akumulasi FAK dalam nukleus, juga akumulasi dalam nukleolus. Pada nukleolus, FAK berikatan dan melindungi nukleostemin, marker *cancer stem cell* (CSC) dari degradasi yang diinduksi stress. Agresivitas tumor berhubungan dengan peningkatan jumlah dan ukuran nukleolus, yang mungkin menjelaskan peran FAK dalam survival sel kanker (Kleinschmidt dan Schlaepf, 2017). Efek afzelin dalam penghambatan ekspresi FAK mungkin menghalangi interaksi FAK dengan p53 dan protein *downstream*-nya sehingga protein pro-apoptotik tersebut dapat menjalankan fungsinya, serta menghambat perlindungan terhadap nukleostemin sehingga sifat *stemness* dari sel MDA-MB-231 dihambat dan resistensi terhadap apoptosis menurun. Kemungkinan lainnya adalah afzelin menduduki lokasi ikatan p-53 atau Mdm2 pada domain FERM FAK, sehingga menghalangi induksi degradasi p53 oleh FAK.

Selain mengatasi hambatan protein apoptotik oleh FAK, afzelin juga mungkin menghalangi kerja sama antara FAK dengan GFR, yang independen terhadap aktivitas kinase FAK dan hanya menggunakan kemampuan *scaffolding* FAK (Kleinschmidt dan Schlaepf, 2017).. Dengan demikian, jaras survival sel melalui ERK dan AKT (disebut juga PI3K) dapat terhambat (Golubovskaya *et al.*, 2002).

Apoptosis sel MDA-MB-231 akibat paparan afzelin juga berhubungan negatif dengan aktivasi Rac1, yaitu seiring peningkatan dosis afzelin apoptosis sel meningkat sedangkan aktivasi Rac1 menurun. Peningkatan ekspresi Rac1 menyebabkan hambatan apoptosis, melalui interaksinya dengan Pak1 yang kemudian mengaktifkan Akt. Sinyal Rac1/Pak1/Akt mengaktifasi fosforilasi Bad,

keluarga anti-apoptotik *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2), *B-cell lymphoma extra large* (Bcl-XL) (serta penurunan *regulasi cyclin D1*, survivin, dan XIAP (Zhang *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2010; De *et al.*, 2019). Oleh karena itu kemampuan afzelin menghambat aktivasi Rac1 akan menekan peran Rac1 dalam resistensi apoptosis.

Hubungan antara FAK, p-FAK Tyr397, dan Rac1 dengan apoptosis pada paparan afzelin, juga dapat terjadi dua arah (Cance *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2015) (gambar 6.1). Walaupun penjelasan dalam sub bab ini didominasi oleh kemungkinan mekanisme FAK, p-FAK Tyr397 dan aktivasi Rac1 mempengaruhi apoptosis tetapi tidak menutup kemungkinan apoptosis menyebabkan penurunan ekspresi FAK, p-FAK Tyr397 dan aktivasi Rac1. Stimulus apoptosis memicu terjadinya MOMP yang memfasilitasi pelepasan sitokrom-c dari ruang intermembran mitokondria ke sitosol. Peristiwa ini menyebabkan pembentukan apoptosome yang mengaktivasi *caspase 9* dan efekturnya yaitu *caspase zymogen*. *Caspase* efektor memecah ratusan substrat yang menyebabkan kematian sel (Elmore, 2007a). *Splicing* pre-mRNA dan ekspor RNA nukleus dihambat, sehingga sintesis protein baru juga terhambat. Peristiwa ini mungkin terjadi melalui perubahan faktor inisiasi translasi, termasuk pemecahan eIF4G dan fosforilasi eIF2 α . Selain itu, pada awal apoptosis terjadi kerusakan mRNA bahkan sebelum *scramble* lipid membran dan fragmentasi DNA. Kerusakan mRNA tergantung pada MOMP dan meningkat seiring dengan aktivasi *caspase* (Thomas *et al.*, 2015). Pada penelitian ini, aktivasi *caspase* dan MOMP dalam proses apoptosis mungkin menyebabkan kerusakan mRNA dan pemecahan FAK dan Rac1 sehingga jumlah FAK, p-FAK Tyr397 dan aktivasi Rac1 menurun, sekaligus menjelaskan hubungan positif antara ketiga protein tersebut dengan apoptosis sel pada paparan afzelin.

Fakta yang menarik dari penelitian ini yaitu pada paparan afzelin konsentrasi tertentu terjadi fluktuasi kuantitas variabel terikat dibandingkan

dengan konsentrasi yang lebih rendah. Paparan afzelin konsentrasi 200 µg/ml menunjukkan peningkatan kembali dibanding konsentrasi 100 µg/ml baik pada migrasi maupun aktivasi Rac1. Hasil lainnya pada dosis 400 µg/ml menunjukkan peningkatan kembali pada viabilitas sel dibanding konsentrasi 100 dan 200 µg/ml. Walaupun demikian dua hasil tersebut tidak berbeda bermakna dan masih lebih rendah dari kontrol negatif. Fenomena serupa dapat dijumpai pada paparan metabolit sekunder tunggal, misalnya pada vitamin C yang pada dosis tinggi menghambat sedangkan pada dosis rendah meningkatkan migrasi dan invasi dua jenis sel TNBC yaitu Bcap37 dan MDA-MB-453. Hal ini diduga karena efek penghambatan memerlukan akumulasi metabolit aktif yang bisa mengatasi kerja *sodium vitamin C transporter 2* (SVCT2) yang membawa vitamin C ke ekstraseluler. Selain kemungkinan mengalami hal yang serupa, fluktuasi pada efek afzelin mungkin menunjukkan bahwa konsentrasi afzelin yang berbeda akan mempengaruhi kuantitas dan jenis protein yang berinteraksi sehingga jumlah dan jenis sinyal transduksi yang dipengaruhi juga berbeda. Hasil ini menunjukkan perlunya eksplorasi dosis efektif yang lebih detil bila afzelin digunakan untuk penghambat migrasi dan atau pemicu apoptosis.



Gambar 6.1 Model hubungan antar variabel terikat dalam efek afzelin terhadap sel MDA-MB-231. Kotak dengan warna tertentu menunjukkan target analisis hubungan. Tanda panah menunjukkan arah analisis hubungan, dengan warna tertentu merujuk pada variabel yang dipengaruhi (sesuai dengan kajian referensi). Tanda dengan dua mata panah menunjukkan hubungan antar variabel mungkin berlaku dua arah. Angka dalam kotak pada tanda panah menunjukkan keeratatan hubungan (r^2) antara dua variabel, angka negatif menunjukkan hubungan yang berkebalikan, dan tanda bintang menunjukkan hubungan bermakna ($p < 0.05$).

Penggunaan afzelin secara *in vivo* memerlukan perhatian khusus untuk memastikan bioavailabilitasnya. Sebagaimana flavonoid glikosida secara umum, afzelin akan dimetabolisme oleh flora normal enterik menjadi bentuk aglikon bila diberikan per oral. Bentuk flavonoid aglikon juga akan dimetabolisme lebih lanjut, berupa pemecahan cincin C (*C-ring fission*) menjadi dua produk fenolik yang lebih kecil (Bruneton, 2013). Oleh karena itu, pengembangan afzelin sebagai terapi anti kanker juga harus diikuti dengan pertimbangan sediaan dan cara pemberian, serta pengembangan derivat afzelin yang stabil pada *in vivo*, dengan tetap

mempertahankan properti pada struktur kimianya yang berperan kunci pada kemampuan hambatan migrasi dan induksi apoptosis.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

7.1.1 Kesimpulan Khusus

Berdasarkan hasil penelitian ini, kesimpulan yang didapat adalah

1. Afzelin menurunkan viabilitas sel kanker payudara MDA-MB-231 dengan IC50 992.33 µg/ml, yang dibuktikan melalui uji MTT.
2. Afzelin meningkatkan apoptosis sel kanker payudara MDA-MB-231, yang dibuktikan melalui *flow cytometry* dengan penanda Annexin V dan PI.
3. Afzelin menurunkan migrasi sel kanker payudara MDA-MB-231, yang dibuktikan dalam uji *scratch wound healing*.
4. Afzelin menurunkan pembentukan *focal adhesion* pada sel kanker payudara MDA-MB-231, yang dibuktikan melalui pewarnaan immunofluoresens dengan antibodi vinculin dan phalloidin.
5. Afzelin menurunkan aktivasi FAK pada sel kanker payudara MDA-MB-231, yang dibuktikan melalui metode *Western blotting*.
6. Afzelin menurunkan aktivasi Rac1 pada sel kanker payudara MDA-MB-231, yang dibuktikan melalui metode Rac1 GLISA.
7. Afzelin menurunkan migrasi sel kanker payudara MDA-MB-231, melalui penurunan aktivasi FAK dan Rac1.
8. Afzelin meningkatkan apoptosis sel kanker payudara MDA-MB-231, melalui penurunan aktivasi FAK dan Rac1.

7.1.2 Kesimpulan Umum

Penghambatan metastasis pada TNBC merupakan suatu tantangan. Penelitian efek afzelin terhadap migrasi dan apoptosis sel MDA-MB-231 ini menjadi upaya untuk mendapatkan kandidat obat dengan spesivitas dan selektivitas dan efek samping minimal yang dapat menjadi pilihan dalam terapi TNBC. Penelitian ini membuktikan untuk pertama kalinya, bahwa afzelin menurunkan viabilitas, menghambat migrasi, dan meningkatkan apoptosis sel MDA-MB-231. Hambatan migrasi yang timbul selain disebabkan oleh efek langsung terhadap mekanisme migrasi, diduga juga terjadi karena kontribusi peningkatan apoptosis dan penurunan viabilitas sel MDA-MB-231.

Afzelin berefek pada hambatan pembentukan *focal adhesion* yang merupakan komponen dari adhesi sel maupun kontraktilitas *stress fiber* dalam mekanisme migrasi. Dugaan bahwa afzelin menyebabkan hambatan aktivasi protein yang berperan kunci dalam modulasi migrasi sel, yaitu Rac1 dan FAK, terbukti dalam penelitian ini. Analisis antara kuantitas ekspresi FAK (FAK total) dan p-FAK Tyr397 tersebut berhubungan secara substansial, yang menimbulkan dugaan bahwa penurunan kuantitas bentuk teraktivasi FAK oleh afzelin disebabkan karena penekanan ekspresi FAK, bukan karena penghambatan aktivitas kinase FAK. Penurunan aktivitas Rac1 menunjukkan hubungan yang lemah dengan penurunan ekspresi FAK dan p-FAK Tyr397, sehingga terdapat kemungkinan target kerja afzelin berada pada lokasi fosforilasi pada FAK selain Tyr397 atau bahkan independen terhadap FAK.

Peningkatan apoptosis oleh afzelin berhubungan kuat dengan penurunan ekspresi FAK, p-FAK-Tyr397 dan aktivasi Rac1. Hubungan ini dapat dianalisis dua arah, yaitu afzelin menghambat kerja FAK dan Rac1 dalam me-nonaktif-kan protein pro-apoptosis dan meningkatkan protein anti-apoptosis, atau peningkatan

apoptosis oleh afzelin menyebabkan pemecahan mRNA dan protein FAK dan Rac1.

Bila dianalisis secara keseluruhan maka afzelin memberikan hambatan migrasi yang lebih kuat (konsentrasi 400 (33,3%) dan 800 (56,876%)) dibandingkan dengan induksi apoptosis (konsentrasi 400 (7,287%) dan 800 (31,973%)). Dari hasil tersebut, afzelin lebih cenderung berpotensi sebagai agen migrastatik, yaitu substansi yang mengintervensi berbagai cara invasi dan metastasis sel kanker.

7.2 Saran

Berdasar analisis hasil penelitian ini, saran untuk langkah selanjutnya adalah

- Penelitian lanjutan terhadap jenis nekrosis yang diinduksi oleh afzelin untuk memberikan informasi dalam penetapan konsentrasi afzelin yang dapat memicu apoptosis dengan risiko induksi invasi dan metastasis yang minimal.
- Eksplorasi terhadap kandidat lain target kerja afzelin yang berperan dalam hambatan migrasi dan apoptosis, yang mungkin terdapat pada lokasi fosforilasi FAK selain Tyr397, sinyal transduksi yang menghubungkan aktivasi FAK Tyr397 hingga aktivasi Rac1, protein yang berperan terhadap ekspresi FAK, dan sinyal transduksi pada hilir aktivasi Rac1.
- Penelitian lanjut juga perlu dilakukan pada sel yang bertahan hidup saat paparan afzelin, terutama untuk mengetahui apakah sel tersebut dorman (reversibel) atau *senescence*, apakah terjadi peningkatan resistensi apoptosis, dan apakah terjadi peningkatan kemampuan migrasi
- Kemungkinan terjadinya efek bifasik pada paparan afzelin juga memerlukan penelitian lebih lanjut, untuk memastikan apakah konsentrasi tertentu menyebabkan kembali peningkatan migrasi atau apoptosis.

Dengan demikian dapat ditetapkan konsentrasi yang digunakan pada penelitian *in vivo*.

- Eksplorasi efek afzelin terhadap jenis TNBC lain dengan karakteristik berbeda dari sel MDA-MB-231, untuk mendapatkan gambaran TNBC yang mendapatkan manfaat terbesar dari paparan afzelin.
- Informasi yang didapat akan lebih lengkap bila afzelin juga diujikan pada hewan coba karena memberi informasi perilaku afzelin dalam lingkungan multi jaringan dan organ.



DAFTAR PUSTAKA

- Abboud, E. R., Coffelt, S. B., Figueroa, Y. G., Zwezdaryk, K. J., Nelson, A. B., Sullivan, D. E., ... Scandurro, A. B. (2007). Integrin-linked kinase: A hypoxia-induced anti-apoptotic factor exploited by cancer cells. *International Journal of Oncology*, 30(1): 113–122.
- Adams, L. S., Phung, S., Yee, N., Seeram, N. P., Li, L. and Chen, S. (2010). Blueberry phytochemicals inhibit growth and metastatic potential of MDA-MB-231 breast cancer cells through modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway, *Cancer Research*, 70(9): 3594–3605.
- Afendi, F. M., Okada, T., Yamazaki, M., Aki-Hirai-Morita, Nakamura, Y., Nakamura, K., Ikeda, S., Takahashi, H., Altaf-UI-Amin, M., Latifah, D., Saito, K. and Kanaya, S. (2012). KNApSACk Family Databases: Integrated Metabolite–Plant Species Databases for Multifaceted Plant Research , *Plant & Cell Physiology*, 53(2):1-12.
- Aguirre-Ghiso, J. A. (2010). On the theory of tumor self-seeding: implications for metastasis progression in humans. *Breast Cancer Research : BCR*, 12(2): 304.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walker, P. (2015). *Molecular biology of the cell*. 6th. New York: Garland Science
- Albini, A., Tosetti, F., Benelli, R., & Noonan, D. M. (2005). Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Research*, 65(23): 10637–10641.
- Amrutha, K., Nanjan, P., Shaji, S. K., Sunilkumar, D., Subhalakshmi, K., Rajakrishna, L., & Banerji, A. (2014). Discovery of lesser known flavones as inhibitors of NF- κ B signaling in MDA-MB-231 breast cancer cells - A SAR study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 24(19): 4735–4742.
- Ananthakrishnan, R., & Ehrlicher, A. (2007). The forces behind cell movement. *International Journal of Biological Sciences*, 3(5): 303–317.
- Anders, C. K. and Carey, L. A (2009). Biology, Metastatic Patterns and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer, *Clinical Breast Cancer*, (Suppl 2): S73–S81.
- Anders, C., & Carey, L. A. (2008). Understanding and Treating Triple Negative Breast Cancer. *Oncology (Williston Park)*, 22(11):1233–1243.
- Atherton, P., Stutchbury, B., Jethwa, D. and Ballestrem, C. (2016). Mechanosensitive components of integrin adhesions: Role of vinculin , *Experimental Cell Research*. Elsevier, 343(1): 21–27.
- Auguste, P., Fallavollita, L., Wang, N., Burnier, J., Bikfalvi, A., & Brodt, P. (2007). The Host Inflammatory Response Promotes Liver Metastasis by Increasing Tumor Cell Arrest and Extravasation. *The American Journal of Pathology*, 170(5): 1781–1792.
- Bacalbasa, N. and Ionescu, O. (2016). Triple negative breast cancer. current therapeutic options in the neoadjuvant setting , *Educatie Medicala Continua*, LXIII(q): 65–68.
- Balaseshthil, S., Sahin, A. a, Barnes, C. J., Wang, R.-A., Pestell, R. G., Vadlamudi, R. K., & Kumar, R. (2004). p21-activated kinase-1 persinyalan mediates cyclin D1 expression in mammary epithelial and cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(2): 1422–1428.
- Barroso-Sousa, R. and Metzger-Filho, O. (2016). Differences between invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast: Results and therapeutic implications , *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 8(4): 261–266.
- Basis Data Tanaman Obat Indonesia. (2011). *Database Senyawa Aktif Tanaman Obat Indonesia*. Departemen Farmasi – Universitas Indonesia

- Basu, A. K. (2018). DNA damage, mutagenesis and cancer, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4): 1-13.
- Bauer, M. S., Baumann, F., Daday, C., Redondo, P., Durner, E., Jobst, M. A., Milles, L. F., Mercadante, D., Pippig, D. A., Gaub, H. E., Gräter, F. and Lietha, D. (2019). Structural and mechanistic insights into mechanoactivation of focal adhesion kinase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(14): 6766–6774.
- Bays, J. L. and DeMali, K. A. (2017). Vinculin in cell–cell and cell–matrix adhesions, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer International Publishing, 74(16): 2999–3009.
- Bebenek, M., Duś, D. and Koźlak, J. (2013). Prognostic value of the Fas/Fas ligand system in breast cancer, *Współczesna Onkologia*, 17(2): 120–122.
- Beierle, E. A., Trujillo, A., Nagaram, A., Kurenova, E. V., Finch, R., Ma, X., Vella, J., Cance, W. G. and Golubovskaya, V. M. (2007). N-MYC regulates focal adhesion kinase expression in human neuroblastoma, *Journal of Biological Chemistry*, 282(17): 12503–12516.
- Benavente-Garcia, O., & Castillo, J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15): 6185–6205.
- Bertolaso, M. (2016). Philosophy of cancer, *Philosophy of Cancer Biology*, 18(2): 157–180.
- Beviglia, L., Golubovskaya, V., Xu, L. H., Yang, X. H., Craven, R. J. and Cance, W. G. (2003). Focal adhesion kinase N-terminus in breast carcinoma cells induces rounding, detachment and apoptosis, *Biochemical Journal*, 373(1): 201–210.
- Bianchi, M., De Lucchini, S., Marin, O., Turner, D. L., Hanks, S. K. and Villa-Moruzzi, E. (2005). Regulation of FAK Ser-722 phosphorylation and kinase activity by GSK3 and PP1 during cell spreading and migration, *Biochemical Journal*, 391(2): 359–370.
- Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E., & Gianni, L. (2016). Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 13(11): 674–690.
- Biolegend (2018). FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BioLegend Inc. San Diego, CA: 1–2. Available at: http://www.loctiteproducts.com/tds/EPXY_GEL_S_tds.pdf.
- Bissel, M. J., & Hines, W. C. (2013). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature Medicine*, 33(3): 122–128.
- Blow, N. (2007). Cell migration: our protruding knowledge. *Nature Methods* – 4: 589 - 594
- Bouchier-Hayes, L. (2005). Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *Journal of Clinical Investigation*, 115(10): 2640–2647.
- Bozzuto, G., Ruggieri, P., & Molinari, A. (2010). Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Ann Ist Super Sanità*, 46(1): 66–80.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6): 394–424
- Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J. and Forman, D. (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008 – 2030): a population-based study, *Lancet Oncology*. Elsevier Ltd, 13(8): 790–801.

- Buchheit, C. L., Weigel, K. J., & Schafer, Z. T. (2014). Cancer cell survival during detachment from the ECM: multiple barriers to tumour progression. *Nature Publishing Group*, 14(9): 632–641.
- Burdall SE, Hanby AM, Lansdown MR, Speirs V. (2003). Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast cancer research : BCR* 2003;5(2): 89-95.
- Bustelo, X. R., Sauzeau, V., & Berenjeno, I. M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*, 29(4): 356–370.
- Bruneton, J. (2013) Principles of herbal pharmacology, In: *Principles and Practice of Phytotherapy*: 19-82.
- Caldarella, A., Buzzoni, C., Crocetti, E., Bianchi, S., Vezzosi, V., Apicella, P., Biancalani, M., Giannini, A., Urso, C., Zolfanelli, F. and Paci, E. (2013). Invasive breast cancer: A significant correlation between histological types and molecular subgroups , *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139(4): 617–623.
- Cance, W. G. and Golubovskaya, V. M. (2008). Focal adhesion kinase versus p53: apoptosis or survival? *Science signaling*, 1(20): 1-12.
- Cance, W. G., Harris, J. E., Iacocca, M. V., Roche, E., Yang, X. H., Chang, J., Simkins, S. and Xu, L. H. (2000). Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: Correlation with preinvasive and invasive phenotypes, *Clinical Cancer Research*, 6(6): 2417–2423.
- Cance, W. G., Kurenova, E., Marlowe, T. and Golubovskaya, V. (2013). Disrupting the scaffold to improve focal adhesion kinase-targeted cancer therapeutics, *Science Signaling*, 6(268): 1-8.
- Cancer Research UK (2015). Breast cancer survival statistics, Cancer Research UK. Available at: http://www.cancerresearchuk.org/sites/default/files/cstream-node/surv_5yr_stage_w_breast_0.pdf%5Cnhttp://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/skin-cancer/survival#heading-Three.
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10(6): 417–427.
- Cathcart, J., Pulkoski-Gross, A., & Cao, J. (2015). Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. *Genes & Diseases*, 2(1): 26–34.
- Caudle, A. S., Gonzalez-Angulo, A. M., Hunt, K. K., Liu, P., Pusztai, L., Symmans, W. F., ... Meric-Bernstam, F. (2010). Predictors of tumor progression during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(11): 1821–1828.
- Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews. Cancer*, 2(8): 563–572.
- Chan, K.T., Cortesio, C.L., Huttenlocher, A. (2009). FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. *The Journal of cell biology*.185:357–370
- Chang, Y. S., Jalgaonkar, S. P., Middleton, J. D. and Hai, T. (2017). Stress-inducible gene Atf3 in the noncancer host cells contributes to chemotherapy-exacerbated breast cancer metastasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(34): E7159–E7168.
- Chavez, K. J., Garimella, S. V and Lipkowitz, S. (2012). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer, *Breast Dis*, 32: 35–48.

- Chen, R., Nishimura, M. C., Bumbaca, S. M., Kharbanda, S..... Phillips, H. S. (2010). A Hierarchy of Self-Renewing Tumor-Initiating Cell Types in Glioblastoma , *Cancer Cell*, 17(4). 362–375.
- Chin, W. (1998). The partial least squares approach to structural equation modeling , in *Modern Methods of Business Research*. 295–336.
- Choi, Y. K., Cho, S. G., Woo, S. M., Yun, Y. J., Park, S., Shin, Y. C. and Ko, S. G. (2014).Herbal extract SH003 suppresses tumor growth and metastasis of MDA-MB-231 breast cancer cells by inhibiting STAT3-IL-6 signaling, *Mediators of Inflammation*, 2014. 1–12.
- Chowdhury, D., Beresford, P. J., Zhu, P., Zhang, D., Sung, J. S., Demple, B., ... Lieberman, J. (2006). The Exonuclease TREX1 Is in the SET Complex and Acts in Concert with NM23-H1 to Degrade DNA during Granzyme A-Mediated Cell Death. *Molecular Cell*, 23(1):133–142.
- Ciobanasu, C., Faivre, B. and Le Clainche, C. (2012). Actin dynamics associated with focal adhesions, *International Journal of Cell Biology*, 2012: 1-9.
- Clark, A. G. and Vignjevic, D. M. (2015). Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment, *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 36: 13–22.
- Clark, E. S., Whigham, A. S., Yarbrough, W. G. and Weaver, A. M. (2007). Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res*. 67: 4227-4235.
- Cormier, N., Yeo, A., Fiorentino, E. and Paxson, J. (2015). Optimization of the Wound Scratch Assay to Detect Changes in Murine Mesenchymal Stromal Cell Migration After Damage by Soluble Cigarette Smoke Extract, *Journal of Visualized Experiments*, 106(e53414): 1-19.
- Coussens, L. M. (2002). Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer--Trials and Tribulations, *Science*, 295(5564): 2387–2392.
- Cristofanilli, M., Gonzalez-Angulo, A., Sneige, N., Kau, S.-W., Broglio, K., Theriault, R. L., ... Hortobagyi, G. N. (2005). Invasive Lobular Carcinoma Classic Type: Response to Primary Chemotherapy and Survival Outcomes. *Journal of Clinical Oncology*, 23(1): 41–48.
- Croucher, D. R., Rickwood, D., Tactacan, C. M., Musgrove, E. A., & Daly, R. J. (2010). Cortactin modulates RhoA activation and expression of Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors to promote cell cycle progression in 11q13-amplified head and neck squamous cell carcinoma cells. *Molecular and Cellular Biology*, 30(21): 5057–70.
- Cytoskeleton Inc (2018).G-LISA Rac1 Activation Assay Biochem Kit Protocol.:1–15.
- Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J. and Shi, B. (2015).Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends, *American journal of cancer research*, 5(10): 2929–43..
- Dallakyan, S. and Arthur J. Olson (2015). Small Molecule Library Screening by Docking with PyRx, *Methods in molecular biology*, 1263: 243–50.
- Danen, E. H. J. (2013). Integrin Persinyalan as a Cancer Drug Target. *ISRN Cell Biology*, 2013: 1–14.
- Dangles, O., & Dufour, C. (2006). Flavonoid–Protein Interactions. In *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*. 45: 443–464. CRC Press. Taylor & Francis Group
- De, P., Aske, J. C. and Dey, N. (2019). RAC1 Takes the Lead in Solid Tumors, *Cells*, 8(382): 1–17.

- Dent, R., Hanna, W. M., Trudeau, M., Rawlinson, E., Sun, P., & Narod, S. A. (2009). Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 115(2): 423–428.
- Departemen Farmasi Universitas Indonesia (2011). Basis data tanaman obat indonesia. Available at: <http://herbaldb.farmasi.ui.ac.id/v3/index.php?v=spesies#>.
- Deramaudt, T. B., Dujardin, D., Hamadi, A., Noulet, F., Kolli, K., De Mey, J., Takeda, K. and Rondé, P. (2011). FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion, *Molecular Biology of the Cell*, 22(7): 964–975.
- Dermardirossian, C., Schnelzer, A., & Bokoch, G. M. (2004). Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase. *Molecular Cell*, 15(1): 117–127.
- Deveraux, Q.L., Schendel, S.L. and Reed, J.C. (2001). Antiapoptotic proteins. The bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. *Cardiol Clin*, 19: 57–74.
- Devreotes, P., & Horwitz, A. R. (2015). Persinyalan networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(a005959): 1-16.
- Diantini, A., Subarnas, A., Lestari, K., Halimah, E., Susilawati, Y., Supriyatna, Abdulah, R. (2012). Kaempferol-3-O-rhamnoside isolated from the leaves of *Schima wallichii* Korth. inhibits MCF-7 breast cancer cell proliferation through activation of the caspase cascade pathway. *Oncology Letters*, 3(5): 1069–1072.
- Dunty, J. M., Gabarra-Niecko, V., King, M. L., Ceccarelli, D. F. J., Eck, M. J. and Schaller, M. D. (2004). FERM domain interaction promotes FAK signaling. *Molecular and cellular biology*, 24(12): 5353–5368.
- Earley S, Plopper GE. (2008). Phosphorylation of focal adhesion kinase promotes extravasation of breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 366:476–482.
- Eberwein, P., Laird, D., Schulz, S., Reinhard, T., Steinberg, T. and Tomakidi, P. (2015). Modulation of focal adhesion constituents and their down-stream events by EGF: On the cross-talk of integrins and growth factor receptors, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 1853(10): 2183–2198.
- Eiró, N., Fernandez-Garcia, B., González, L. and Vizoso, J. (2013). Clinical Relevance of Matrix Metalloproteases and their Inhibitors in Breast Cancer, *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*: S13(004): 1-13.
- Eliceiri, B. P., Puente, X. S., Hood, J. D., Stupack, D. G., Schlaepfer, D. D., Huang, X. Z., Sheppard, D. and Cheresch, D. A. (2002). Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin alpha(v)beta5 in vascular endothelial growth factor persinyalan. *J Cell Biol* 157:149-60.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicol Pathol.*, 35(4): 495–516.
- Eralp, Y., Kılıç, L., Alço, G., Başaran, G., Doğan, M., Dinçol, D., İçli, F. (2014). The Outcome of Patients with Triple Negative Breast Cancer: The Turkish Oncology Group Experience. *Journal of Breast Health*, 10: 209–215.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology, *Nature*, 420(6916): 629–635.
- Fackler, O. T., & Grosse, R. (2008). Cell motility through plasma membrane blebbing. *The Journal of Cell Biology*, 181(6): 879–884.
- Fan, Z., Beresford, P. J., Zhang, D., Xu, Z., Novina, C. D., Yoshida, A., ... Lieberman, J. (2003). Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nature Immunology*, 4(2):145–153.

- Fang Y, Elahi A, Denley RC, Rao PH, Brennan MF, Jhanwar SC.(2009). Molecular characterization of permanent cell lines from primary, metastatic and recurrent malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST). with underlying neurofibromatosis-1. *Anticancer research*. 29(4):1255-1262.
- Feng, M., Bao, Y., Li, Z., Li, J., Gong, M., Lam, S., Wang, J., Marzese, D. M., Donovan, N., Yu Tan, E., Hoon, D. S. B. and Yu, Q. (2014). RASAL2 activates RAC1 to promote triple-negative breast cancer progression, *Journal of Clinical Investigation*, 124(12): 5291–5304.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 10 December 2016.
- Fernández-Espartero, C. H., Ramel, D., Farago, M., Malartre, M., Luque, C. M., Limanovich, S., Katzav, S., Emery, G. and Martín-Bermudo, M. D. (2013). The GEF Vav regulates guided cell migration by coupling guidance receptor signalling to local Rac activation, *Journal of cell science*, 126:2285–2293..
- Fielding, A.B. & Dedhar S. (2009). The mitotic functions of integrin-linked kinase. *Cancer Metastasis Rev*, 28(1-2):99-111.
- Finlay, G.J., Baguley, B.C. (1984). The use of human cancer cell lines as a primary screeningsystem for antineoplastic compounds. *European journal of cancer & clinical oncology*.20(7): 947-954.
- Fischer, K. R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., Schwabe, R. F., Vahdat, L. T., Altorki, N. K., Mittal, V. and Gao, D. (2015). EMT is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance , *Nature*, 527(7579): 472–476.
- Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews. Cancer*, 3(5): 362–374.
- Friedl, P., & Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: A multiscale tuning model. *Journal of Cell Biology*, 188(1): 11–19.
- Gandhi, Y. A., & Morris, M. E. (2009). Structure-activity relationships and quantitative structure-activity relationships for breast cancer resistance protein (ABCG2). *The AAPS Journal*, 11(3): 541–552.
- Ganguly, K. K., Triparna, S., Sekhar, P., Biswas, J., & Chatterjee, A. (2012). Studies on Focal Adhesion Kinase in human breast cancer cell MDA-MB-231. *Advances in Biological Chemistry*, 2 (February): 29–42.
- Gao, S., & Hu, M. (2010). Bioavailability challenges associated with development of anti-cancer phenolics. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 10(6): 550–567.
- Gao, Y., Xing, J., Streuli, M., Leto, T. L. and Zheng, Y. (2001). Trp56 of Rac1 Specifies Interaction with a Subset of Guanine Nucleotide Exchange Factors, *The journal of biological chemistry*, 276(50): 47530–47541.
- García-Castillo, J., Pedersen, K., Angelini, P. D., Bech-Serra, J. J., Colomé, N., Cunningham, M. P., Arribas, J. (2009). HER2 carboxyl-terminal fragments regulate cell migration and cortactin phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37): 25302–25313.
- Gartel, A. L., Feliciano, C. and Tyner, A. L. (2002). A New Method for Determining the Status of p53 in Tumor Cell Lines of Different Origin, *Oncology Research*, 13(6–10): 405–408.

- Gazdar, A.F., Girard, L., Lockwood, W.W., Lam, W.L., Minna, J.D. (2010). Lung cancer cell lines as tools for biomedical discovery and research. *Journal of the National Cancer Institute*;102(17): 1310-1321.
- Gialeli, C., Theocharis, A. D. and Karamanos, N. K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting, *FEBS Journal*, 278(1):16–27.
- Glénisson, M., Vacher, S., Callens, C., Susini, A., Cizeron-Clairac, G., Le Scodan, R., ... Bièche, I. (2012). Identification of new candidate therapeutic target genes in triple-negative breast cancer. *Genes & Cancer*, 3(1): 63–70.
- Golubovskaya, V. M. (2010). Targeting FAK in human cancer: from finding to first clinical trials *Vita, Frontiers in Bioscience*, 19:687–706.
- Golubovskaya, V. M., Conway-Dorsey, K., Edmiston, S. N., Tse, C. K., Lark, A. A., Livasy, C. A., Moore, D., Millikan, R. C. and Cance, W. G. (2009). FAK overexpression and p53 mutations are highly correlated in human breast cancer, *International Journal of Cancer*, 125(7): 1735–1738.
- Golubovskaya, V. M., Finch, R., & Cance, W. G. (2005). Direct interaction of the N-terminal domain of focal adhesion kinase with the N-terminal transactivation domain of p53. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26): 25008–25021.
- Golubovskaya, V. M., Finch, R., Kweh, F., Massoli, N. A., Campbell-Thompson, M., Wallace, M. R. and Cance, W. G. (2008). p53 Regulates FAK expression in human tumor cells, *Molecular Carcinogenesis*, 47(5):373–382.
- Golubovskaya, V. M., Ylagan, L., Miller, A., Hughes, M., Wilson, J., Wang, D., Brese, E., Bshara, W., Edge, S., Morrison, C. and Cance, W. G. (2014). High focal adhesion kinase expression in breast carcinoma is associated with lymphovascular invasion and triple-negative phenotype. *BMC Cancer*, 14(1):1–8
- Golubovskaya, V. M., Zheng, M., Zhang, L., Li, J.-L., & Cance, W. G. (2009). The direct effect of focal adhesion kinase (FAK), dominant-negative FAK, FAK-CD and FAK siRNA on gene expression and human MCF-7 breast cancer cell tumorigenesis. *BMC Cancer*, 9(1): 280.
- Golubovskaya, V.M, Beviglia, L., Xu, L. H., Shelton Earp, H., Craven, R. and Cance, W. (2002). Dual inhibition of focal adhesion kinase and epidermal growth factor receptor pathways cooperatively induces death receptor-mediated apoptosis in human breast cancer cells, *Journal of Biological Chemistry*, 277(41): 38978–38987.
- Golubovskaya, V.M, Kaur, A. and Cance, W. (2004). Cloning and characterization of the promoter region of human focal adhesion kinase gene: Nuclear factor kappa B and p53 binding sites, *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1678(2–3): 111–125.
- Golubovskaya, V.M., Finch, R., Kweh, F., Massoll, N.A., Campbell-Thompson, M., Wallace, M.R., Cance, W.G. (2008). p53 regulates FAK expression in human tumor cells. *Molecular carcinogenesis*;47:373–382.
- Gorelick-Ashkenazi, A., Weiss, R., Sapozhnikov, L., Florentin, A., Tarayrah-Ibraheim, L., Dweik, D., Yacobi-Sharon, K. and Arama, E. (2018). Caspases maintain tissue integrity by an apoptosis-independent inhibition of cell migration and invasion, *Nature Communications*. Springer US: 9(1): 1-15
- Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z. and Falanga, V. (2017). Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay, *Journal of Investigative Dermatology*. The Authors, 137(2): e11–e16.

- Grigera, P. R., Erin D. Jeffery, Martin, K. H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and Parsons, J. T. (2005). FAK phosphorylation sites mapped by mass spectrometry, *Journal of Cell Science*, 118: 4931–4935
- Grimm, S. (2013). Respiratory chain complex II as general sensor for apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier B.V., 1827(5): 565–572.
- Gu, Z., Liu, F., Tonkova, E. A., Lee, S. Y., Tschumperlin, D. J., & Brenner, M. B. (2014). Soft matrix is a natural stimulator for cellular invasiveness. *Molecular Biology of the Cell*, 25(4): 457–69.
- Guo, W., & Giancotti, F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(10): 816–826.
- Gupta, G. P., & Massague, J. (2006). Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*, 127(4): 679–695.
- Halimah, E., Diantini, A., Destiani, D. P., Pradipta, I. S., Sastramihardja, H. S., Lestari, K., Subarnas, A., Abdulah, R. and Koyama, H. (2015). Induction of caspase cascade pathway by kaempferol-3-O-rhamnoside in LNCaP prostate cancer cell lines. , *Biomedical reports*, 3(1):115–117.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5): 646–674.
- Hanks, S. K. and Polte, T. R. (1997). Signaling through focal adhesion kinase , *Bioessays*, 19(2): 137–145.
- Hannigan, G.E., et al., Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature*, 1996. 379(6560): 91-96.
- Harney, A. S., Esther N. Arwert, Entenberg, D., Wang, Y., Guo, P., Qian, B.-Z., Oktay, M. H., Pollard, J. W., Jones, J. G. and Condeelis, J. S. (2017). Real-time imaging reveals local, transient vascular permeability and tumor cell intravasation stimulated by Tie2Hi macrophage- derived VEGFA, *Cancer Discovery*, 5(9): 932–943.
- Harrison, S. M., Knifley, T., Chen, M., & O Connor, K. L. (2013). LPA, HGF, and EGF utilize distinct combinations of persinyalan pathways to promote migration and invasion of MDA-MB-231 breast carcinoma cells. *BMC Cancer*, 13(501): 1-8.
- Hartwell, L. H. and Kastan, M. B. (1994). Cell cycle control and cancer, *Science*, 266, pp. 1821–1828.
- Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J..... Perou, C. M. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors, *Genome Biology*, 8(5): 1–17.
- Hongmei, Z. (2012). Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review Scientist. In *Apoptosis and Medicine*: 3–22.
- Horton, E. R., Byron, A., Askari, J. A., Ng, D. H. J., Millon-Frémillon, A., Robertson, J., Koper, E. J., Paul, N. R., Warwood, S., Knight, D., Humphries, J. D. and Humphries, M. J. (2015). Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly, *Nature Cell Biology*, 17(12):1577–1587.
- Howlader, N., Noone, A., Krapcho, M., Miller, D., Bishop, K., Altekruse, S., Kosary, C., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D., Chen, H., Feuer, E. and Cronin(eds), K. (2016). SEER Cancer Statistics Review 1975-2013 National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1975-2013 National Cancer Institute , SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016:1992–2013.

- Hsia, D. A., Mitra, S. K., Hauck, C. R., Streblov, D. N., Nelson, J. A., Ilic, D., Huang, S., Li, E., Nemerow, G. R., Leng, J. et al., (2003). Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol* 160:753-767.
- Huang, Y. H., Yang, H. Y., Huang, S. W., Ou, G., Hsu, Y. F. and Hsu, M. J. (2016). Interleukin-6 induces vascular endothelial growth factor-C expression via Src-FAK-STAT3 signaling in lymphatic endothelial cells, *PLoS ONE*, 11(7): 1–18.
- Hudis, C. A. and Gianni, L. (2011). Triple-Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need, *The Oncologist*, 16(Supplement 1): 1–11.
- Jackson, J. G., Zhang, X., Yoneda, T., & Yee, D. (2001). Regulation of breast cancer cell motility by insulin receptor substrate- 2 (IRS-2) in metastatic variants of human breast cancer cell lines. *Oncogene*, 20(0950–9232 SB-IM): 7318–7325.
- Jäger, R. and Zwacka, R. M. (2010). The enigmatic roles of caspases in tumor development, *Cancers*, 2(4): 1952–1979.
- Jemal, A., Bray, F. and Ferlay, J. (2011). Global Cancer Statistics, *CA Cancer journal for clinicians* 61(2): 69–90.
- Jeong, H. G., Cho, H. J., Chang, I. Y., Yoon, S. P., Jeon, Y. J., Chung, M. H. and You, H. J. (2002). Rac1 prevents cisplatin-induced apoptosis through down-regulation of p38 activation in NIH3T3 cells, *FEBS Letters*, 518(1–3):129–134.
- Jones, J. D., Daignault-Newton, S., Wilkinson, J. E., Purica, M. C., Roca, H., Wang, Y., Pienta, K. J., Nör, J. E., Weidner, S., Keller, E. T., Shea, L. D., Koh, A. J., McCauley, L. K., Morgan, T. M. and Kuo, R. (2017). Apoptosis-induced CXCL5 accelerates inflammation and growth of prostate tumor metastases in bone, *Journal of Clinical Investigation*, 128(1):248–266.
- Joyce, J. A., & Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, 14(4): 520–529.
- Joza, N., Susin, S. a, Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., ... Penninger, J. M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410(6828): 549–554.
- Kallergi G, Mavroudis D, Georgoulas V, Stouraras C. (2007). Phosphorylation of FAK, PI-3K, and impaired aktin organization in CK-positive micrometastatic breast cancer cells; *Molecular medicine*. Vol. 13. Cambridge Mass:79–88.
- Kao J., Salari K., Bocanegra M., Choi Y.L., Girard L., Gandhi J., Kwei K.A., Hernandez-Boussard T., Wang P. Gazdar A.F.(2009). Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS one*. 4(7): e6146.
- Kaplan, H.G., Malmgren, J.A., Atwood, M. (2009). T1N0 triple negative breast cancer: risk of recurrence and adjuvant chemotherapy. *Breast Journal*. 15(5): 454-60.
- Karagiannis, G. S., Pastoriza, J. M., Wang, Y., Allison, S., Entenberg, D., Pignatelli, J., Sharma, V. P., Xue, E. A., Cheng, E., Alfonso, T. M. D., Jones, J. G., Anampa, J., Thomas, E., Sparano, J. A., Condeelis, J. S. and Oktay, M. H. (2017). Neoadjuvant chemotherapy induces breast cancer metastasis through a TMEM-mediated mechanism, *Science Translational Medicine*, 9(397): 1–30.
- Kato, T., Kawai, K., Egami, Y., Takehi, Y. and Araki, N. (2014). Rac1-dependent lamellipodial motility in prostate cancer PC-3 cells revealed by optogenetic control of Rac1 activity, *PLoS ONE*, 9(5): 1–9.
- Kennecke, H., Yerushalmi, R., Woods, R., Cheang, M. C. U., Voduc, D., Speers, C. H., ... Gelmon, K. (2010). Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, 28(20): 3271–3277.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*, 141(1): 52–67.

- Kim, B. W., Lee, E. R., Min, H., Jeong, H. S., Ahn, J. Y., Kim, J. H., Choi, H. Y., Choi, H., Eun, Y. K., Se, P. P. and Cho, S. G. (2008). Sustained ERK activation is involved in the kaempferol-induced apoptosis of breast cancer cells and is more evident under 3-D culture condition, *Cancer Biology and Therapy*, 7(7): 1080–1089.
- Kim, D. H. and Wirtz, D. (2013a). Focal adhesion size uniquely predicts cell migration, *FASEB Journal*, 27(4):1351–1361
- Kim, D. H. and Wirtz, D. (2013b). Predicting how cells spread and migrate: Focal adhesion size does matter, *Cell Adhesion and Migration*, 7(3): 293–296.
- Kimman, M., Norman, R., Jan, S., Kingston, D., & Woodward, M. (2012). The burden of cancer in member countries of the Association of Southeast Asian Nations (ASEAN). *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 13(2): 411–20.
- Kishen, S., Pillai, K., Tay, A., Nair, S., Leong, C.-O., Kanapathy Pillai, S. K., Leong, C.-O. (2012). Triple-negative breast cancer is associated with EGFR, CK5/6 and c-KIT expression in Malaysian women. *BMC Clinical Pathology*: 12(18): 1-8.
- Kitazumi, I. and Tsukahara, M. (2011). Regulation of DNA fragmentation: The role of caspases and phosphorylation, *FEBS Journal*, 278(3): 427–441.
- Klein, C. A. (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases, *Natural reviews cancer*, 9:1279–1283.
- Kleinschmidt, E. G. and Schlaepf, D. D. (2017). Focal Adhesion Kinase Signaling In Unexpected Places, *Curr Opin Cell Biol*, April(45): 24–30.
- Koff, J. L., Ramachandiran, S., & Bernal-Mizrachi, L. (2015). A time to kill: Targeting apoptosis in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2): 2942–2955.
- Kong, D., Chen, F., & Sima, N. I. (2015). Inhibition of focal adhesion kinase induces apoptosis in bladder cancer cells via Src and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(5):1725–1731.
- Kongsiang, A., Tangvoraphonkchai, V., Jirapornkul, C., Promthet, S., Kamsa-ard, S., & Suwanrungruang, K. (2014). Survival Time and Molecular Subtypes of Breast Cancer after Radiotherapy in Thailand. *Survival and Molecular Subtypes of Breast Cancer after Radiotherapy in Thailand*, 15:10505–10508.
- Kovacsovics, M., Martinon, F., Micheau, O., Bodmer, J. L., Hofmann, K., & Tschopp, J. (2002). Overexpression of Helicard, a CARD-containing helicase cleaved during apoptosis, accelerates DNA degradation. *Current Biology*: 12(10): 838–843.
- Krakhmal, N. V, Zavyalova, M. V, Denisov, E. V, Vtorushin, S. V, & Perelmuter, V. M. (2015). Cancer Invasion : Patterns and Mechanisms. *Acta Naturae*, 7(25):17–28.
- Kraynov, V. S., Chamberlain, C., Bokoch, G. M., Schwartz, M. A., Slabaugh, S., & Hahn, K. M. (2000). Localized Rac Activation Dynamics Visualized in Living Cells. *Science*, 290(5490): 333–337.
- Krutzik, P. O., Irish, J. M., Nolan, G. P., & Perez, O. D. (2004). Analysis of protein phosphorylation and cellular persinyalan events by flow cytometry: Techniques and clinical applications. *Clinical Immunology*, 110(3): 206–221.
- Kurenova, E., Xu, L., Yang, X., Baldwin, A. S., Craven, R. J., Hanks, S. K., ... Cance, W. G. (2004). Focal adhesion kinase suppresses apoptosis by binding to the death domain of receptor-interacting protein. *Molecular and Cellular Biology*, 24(10): 4361–4371.
- Kusumadjayanti, N., Badudu, D. F., & Hernowo, B. S. (2015). Characteristics of Patients with Estrogen Receptor (ER)-Negative, Progesterone Receptor (PR)-Negative, and HER2-Negative Invasive Breast Cancer in Dr. Hasan Sadikin General Hospital, Bandung, Indonesia from 2010 to 2011. *Althea Medical Journal*, 2(3): 391–394.

- Lacroix M, Leclercq G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast cancer research and treatment*, 83(3): 249-289.
- Lagurin, L. G., Galingana, M. O., Magsalin, J. D. J., Escaño, J. E. S. and Dayrit, F. M. (2017). Chemical profiling of Philippine Moringa oleifera leaves, *Acta Horticulturae*, 1158: 257–268.
- Lambert, J.D., Sang, S., Yang, C.S. (2007). Biotransformation of green tea polyphenols and the biological activities of those metabolites. *Mol. Pharm.*, 4: 819-825.
- Lawson, C. and Schlaepfer, D. (2012). Integrin adhesions: Who s on first? What s on second?, *Cell adhesion & migration*, 6(4): 302–306.
- Lawson, C. D. and Burridge, K. (2014). The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases*, 5(1): 37–41.
- Lee, S. J., Park, S., Ahn, H. K., Yi, J. H., Cho, E. Y., Sun, J. M., ... Im, Y. H. (2011). Implications of bone-only metastases in breast cancer: Favorable preference with excellent outcomes of hormone receptor positive breast cancer. *Cancer Research and Treatment*, 43(2): 89–95.
- Legate, K. R., Montañez, E., Kudlacek, O. and Fässler, R. (2006). ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(1): 20–31.
- Lehmann, B. D. B., Bauer, J. J., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, a B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 121(7): 2750–2767.
- Lekshmi, A., Varadarajan, S. N., Lupitha, S. S., Indira, D., Ann Mathew, K., Nair, A. C., Nair, M., Prasad, T., Sekar, H., Gopalakrishnan, A. K., Murali, A. and Santhoshkumar, T. R. (2017). A quantitative real-time approach for discriminating apoptosis and necrosis, *Cell Death Discovery*. Nature Publishing Group, 3(November 2016): 1–10.
- Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Weaver, V. M. (2009). Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Persinyalan. *Cell*, 139(5): 891–906.
- Lewis, K. A., Jordan, H. R. and Tollefsbol, T. O. (2019). Effects of SAHA and EGCG on growth potentiation of triple-negative breast cancer cells , *Cancers*, 11(23):1–22.
- Li, C., Lee, M.J., Sheng, S., Meng, X., Prabhu, S., Winnik, B., Huang, B., Chung, J.Y., Yan, S., Ho, C.T., Yang, C.S. (2000). Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion. *Chem. Res. Toxicol.*, 13: 177-84.
- Li, L. Y., Luo, X., & Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412(6842): 95–99.
- Li, Y., Li, S., Meng, X., Gan, R. Y., Zhang, J. J. and Li, H. Bin (2017). Dietary natural products for prevention and treatment of breast cancer, *Nutrients*, 9(7): 1–38.
- Liang, C. C., Park, A. Y. and Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, *Nat Protoc*, 2(2): 329–333.
- Li-cor Biosciences. (2015). *Western Blot Normalization: Challenges and Considerations for Quantitative Analysis*. LI-COR Biosciences: 1-15.
- Lieberman, J. (2011). Granzyme A activates another way to die. *Immunology Reviews*, 235(1): 93–104.

- Lien, E. C., Dibble, C. C. and Toker, A. (2017). PI3K Signaling in Cancer: Beyond AKT Evan , *Curr Opin Cell Biol.*, 45: 62–71.
- Lietha, D., Cai, X., Ceccarelli, D. F. J., Li, Y., Schaller, M. D. and Eck, M. J. (2007). Structural Basis for the Autoinhibition of Focal Adhesion Kinase, *Cell*, 129(6): 1177–1187.
- Lim, S. T., Chen, X. L., Lim, Y., Hanson, D. A., Vo, T. T., Howerton, K., ... Ilic, D. (2008). Nuclear FAK Promotes Cell Proliferation and Survival through FERM-Enhanced p53 Degradation. *Molecular Cell*, 29(1): 9–22.
- Lim, S. T., Mikolon, D., Stupack, D. G. and Schlaepfer, D. D. (2008). FERM control of FAK function: Implications for cancer therapy, *Cell Cycle*, 7(15): 2306–2314.
- Liu, J., Shen, J. X., Hu, J. L., Dou, X. W. and Zhang, G. J. (2013). Critical review Role of epithelial – mesenchymal transition in invasion and metastasis of breast cancers, *OA Cancer*, 1(2):1–6.
- Liu, X., Huang, H., Remmers, N., & Hollingsworth, M. A. (2014). Loss of E-cadherin and epithelial to mesenchymal transition is not required for cell motility in tissues or for metastasis. *Tissue Barriers*, 2(4): 1 – 6
- Liu, Y., Ma, L., Liu, X. and Wang, L. (2012). Expression of human mammaglobin as a marker of bone marrow micrometastasis in breast cancer, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3(3): 550–554.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.,L, Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000). Chapter 18. Cell Motility and Shape I: Microfilaments. In *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman.
- Lou, S., Wang, P., Yang, J., Ma, J., Liu, C. and Zhou, M. (2018). Prognostic and clinicopathological value of rac1 in cancer survival: Evidence from a meta-analysis , *Journal of Cancer*, 9(14): 2571–2579.
- Louzada, S., Adegas, F., & Chaves, R. (2012). Defining the sister rat mammary tumor cell lines HH-16 cl.2/1 and HH-16.cl.4 as an In Vitro cell model for Erbb2. *PLoS ONE*, 7(1): 1-15
- Lua BL, Low BC. (2005). Cortaktin phosphorylation as a switch for aktin cytoskeletal network and cell dynamics control. *FEBS Lett.* 2005, 579:577-585.
- Ma, A., Richardson, A., Schaefer, E. M. and Parsons, J. T. (2001). Serine phosphorylation of focal adhesion kinase in interphase and mitosis: a possible role in modulating binding to p130(Cas). *Mol Biol Cell* 12: 1-12.
- Mack, N. A., Whalley, H. J., Castillo-Lluva, S., & Malliri, A. (2011). The diverse roles of Rac persinyalan in tumorigenesis. *Cell Cycle*, 10(10): 1571–1581.
- Mackay, C. R. (2008). Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. , *Nature immunology*, 9(9): 988–998.
- Mader, C. C., Oser, M., Magalhaes, M. A., Bravo-Cordero, J. J., Condeelis, J., Koleske, A. J. and Gil-Henn, H. (2011). An EGFR-Src-Arg-cortaktin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion. *Cancer Res.* 71: 1730-1741
- Majumder, M., Debnath, S., Gajbhiye, R. L., Saikia, R., Gogoi, B., Samanta, S. K., Das, D. K., Biswas, K., Jaisankar, P. and Mukhopadhyay, R. (2019). Ricinus communis L. fruit extract inhibits migration/invasion, induces apoptosis in breast cancer cells and arrests tumor progression in vivo , *Scientific reports*. Springer US, 9(14493):1-14
- Mandel, K., Seidl, D., Rades, D., Lehnert, H., Gieseler, F., Hass, R., & Ungefroren, H. (2013). Characterization of spontaneous and TGF- β -induced cell motility of primary human normal and neoplastic mammary cells in vitro using novel real-time technology. *PLoS ONE*, 8(2): 1-10.

- Manzotti, M., Dell'orto, P., Maisonneuve, P., Zurrida, S., Mazzarol, G. and Viale, G. (2001). Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for multiple mRNA markers in the detection of breast cancer, *International Journal of Cancer*, 95(May 2016): 307–312.
- Marei, H. and Malliri, A. (2017). GEFs : Dual regulation of Rac1 signaling, *Small GTPases*. Taylor & Francis, 8(2): 90–99.
- Marlowe, T., Dementiev, A., Figel, S., Rivera, A., Flavin, M. and Cance, W. (2019). High resolution crystal structure of the FAK FERM domain reveals new insights on the Druggability of tyrosine 397 and the Src SH3 binding site, *BMC Molecular and Cell Biology*. *BMC Molecular and Cell Biology*, 20(1):1–9.
- Martin, F. T., Dwyer, R. M., Kelly, J., Khan, S., Murphy, J. M., Curran, C., Miller, N., Hennessy, E., Dockery, P., Barry, F. P., O'Brien, T. and Kerin, M. J. (2010). Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: Stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT), *Breast Cancer Research and Treatment*, 124(2): 317–326.
- Martin, L., Coffey, M., Lawler, M., Hollywood, D., & Marignol, L. (2010). DNA mismatch repair and the transition to hormone independence in breast and prostate cancer. *Cancer Letters*, 291(2):142–149.
- Martínez, C., Yañez, J., Vicente, V., Alcaraz, M., Benavente-García, O., Castillo, J., ... Lozano, J. A. (2003). Effects of several polyhydroxylated flavonoids on the growth of B16F10 melanoma and Melan-a melanocyte cell lines: influence of the sequential oxidation state of the flavonoid skeleton. *Melanoma Research*, 13(1): 3–9.
- Martinez-Quiles N., Ho H.Y., Kirschner M.W., Ramesh N., Geha R.S. (2004). Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-wasp. *Mol. Cell Biol*. 24:5269-5280.
- Martinalet, D., Dykxhoorn, D. M., Ferrini, R., & Lieberman, J. (2008). Granzyme A Cleaves a Mitochondrial Complex I Protein to Initiate Caspase-Independent Cell Death. *Cell*, 133(4): 681–692.
- Martinalet, D., Zhu, P., & Lieberman, J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 22(3): 355–370.
- Matter, M. L. and Ruoslahti, E. (2001). A Signaling Pathway from the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ Integrins that Elevates Bcl-2 Transcription, *Journal of Biological Chemistry*, 276(30): 27757–27763.
- Maugis, B., Brugués, J., Nassoy, P., Guillen, N., Sens, P., & Amblard, F. (2010). Dynamic instability of the intracellular pressure drives bleb-based motility. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 22): 3884–3892.
- Mierke, C. T., Röselb, D., Fabrya, B., & Brábek, J. (2010). Contractile forces in tumor cell migration. *Eur J Cell Biol*, 48(Suppl 2): 1–6.
- Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A. and Murray, D. (2012). New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: Implications for cancer therapy, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012: 1-16.
- Mitra, S. K., Lim, S. T., Chi, A. and Schlaepfer, D. D. (2006). Intrinsic focal adhesion kinase activity controls orthotopic breast carcinoma metastasis via the regulation of urokinase plasminogen activator expression in a syngeneic tumor model. *Oncogene* 25: 4429-4440.
- Mitra, S. K., Mikolon, D., Molina, J. E., Hsia, D. A., Hanson, D. A., Chi, A., Lim, S. T., Bernard-Trifilo, J. A., Ilic, D., Stupack, D. G., Cheresch, D. A. and Schlaepfer, D. D. (2006). Intrinsic FAK activity and Y925 phosphorylation facilitate an angiogenic switch in tumors, *Oncogene*, 25(44): 5969–5984.

- Molinie, N. and Gautreau, A. (2018). Directional Collective Migration in Wound Healing Assays , in *Cell Migration: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, 351–360.
- Morimura, S. and Takahashi, K. (2011). Rac1 and stathmin but not EB1 are required for invasion of breast cancer cells in response to IGF-I , *International Journal of Cell Biology*, 2011: 1–10.
- Mouradov, A., & Spangenberg, G. (2014). Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Front Plant Sci*, 5(November): 5(620):1-16.
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al., (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 410(6824): 50–56.
- Murota, K., Shimizu, S., Chujo, H., Moon, J. H., Terao, J. Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2. *Arch. Biochem.Biophys.* 2000, 384: 391–397.
- Murphy, D. A., & Courtneidge, S. A. (2011). The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(7): 413–426.
- Muschel, R. J., Al-Mehdi, A. B., Tozawa, K., Fisher, A. B., Shientag, L., & Lee, A. (2000). Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nature Medicine*, 6(1):100–102.
- Nagano, M., Hoshino, D., Koshikawa, N., Akizawa, T., & Seiki, M. (2012). Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *International Journal of Cell Biology*. 2012: 1-11.
- Nagata, S., Suzuki, J., Segawa, K. and Fujii, T. (2016). Exposure of phosphatidylserine on the cell surface , *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, 23(6): 952–961.
- Nagelkerke, A., Bussink, J., Mujic, H., Wouters, B. G., Lehmann, S., Sweep, F. C. G. J. and Span, P. N. (2013). Hypoxia stimulates migration of breast cancer cells via the PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response, *Breast cancer research : BCR*. BioMed Central Ltd, 15(1): R2.
- Nakatsu N, Yoshida Y, Yamazaki K, Nakamura T, Dan S, Fukui Y, Yamori T. Chemosensitivity profile of cancer cell lines and identification of genes determining chemosensitivity by an integrated bioinformatical approach using cDNA arrays. *Molecular cancer therapeutics* 2005;4(3): 399-412.
- Naser, R., Aldehaiman, A., Díaz-Galicia, E. and Arold, S. T. (2018). Endogenous control mechanisms of FAK and PYK2 and their relevance to cancer development, *Cancers*, 10(196):1-28.
- National Cancer Institute: Surveillande, Epidemiology, and Ther result Program. SEER Stat Fact Sheets: Female Breast Cancer. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>. Diakses pada Desember 2016.
- Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Frederick, L., Fevr, T., Berkeley, L. (2009). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally. *Cancer Cell*, 10(6): 515–527.
- Nguyen, D. X., Bos, P. D., & Massagué, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews. Cancer*, 9(4); 274–284.
- Nichenametla, S.N., Taruscio, T.G., Barney, D.L., Exon, J.H. A. (2006). Review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46:161-83.
- Nieto, M. A. (2011). The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1): 347–376.

- Nigg, H.N. & Seigler, D. 2013. *Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture*. Springer Science & Business Media: 260.
- Nobes, C. D., & Hall, A. (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *Journal of Cell Biology*, 144(6): 1235–1244.
- Oberoi-Khanuja, T. K., Murali, A. and Rajalingam, K. (2013). IAPs on the move: Role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration, *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group, 4(9): e784-9.
- Ohashi, K., Fujiwara, S., Watanabe, T., Kondo, H., Kiuchi, T., Sato, M. and Mizuno, K. (2011). LIM kinase has a dual role in regulating lamellipodium extension by decelerating the rate of actin retrograde flow and the rate of actin polymerization., *Journal of Biological Chemistry*, 286(42): 36340–36351.
- Oktay, M.H., Oktay, K., Hamele-Bena, D., Buyukm A., Kossm L.G. (2003). Focal adhesion kinase as a marker of malignant phenotype in breast and cervical carcinomas. *Human pathology*; 34:240–245
- Olson, M. F. (2010). Follow the leader: LIM kinases pave the way for collective tumor cell invasion. *Cell Cycle*, 9(22): 4417–4418.
- Oser, M., Yamaguchi, H., Mader, C. C., Bravo-Cordero, J. J., Arias, M., Chen, X., Desmarais, V., van Rheenen, J., Koleske, A. J. and Condeelis, J. (2009). Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. *J. Cell Biol.* 186: 571-587.
- Ovcaricek, T., Frkovic, S. G., Matos, E., Mozina, B., & Borstnar, S. (2011). Triple negative breast cancer – prognostic factors and survival. *Radiology Oncology*, 45(1): 46–52.
- Owen, G. R., Meredith, D., Gwynn, I. and Richards, R. (2005). Focal adhesion quantification - a new assay of material biocompatibility , *European Cells and Materials*, 9: 85–96.
- Palmer. T, Ashby, W., Lewis, J. and Zijlstra, A. (2012). Targeting tumor cell motility to prevent metastasis., *Adv Drug Deliv Rev.*, 63(8): 568–581.
- Pan, M.R., Hou, M.F., Ou-Yang, F., Wu, C.C., Chang, S.J., Hung, W.C., Yip, H.K. and Luo, C.W. (2019). FAK is Required for Tumor Metastasis-Related Fluid Microenvironment in Triple-Negative Breast Cancer, *Journal of Clinical Medicine*, 8(38): 1-17.
- Paňková, K., Rösel, D., Novotný, M. and Brábek, J. (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells., *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(1): 63–71.
- Pantel, K., Brakenhoff, R. H., & Brandt, B. (2008). Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nature Reviews. Cancer*, 8(5): 329–340.
- Park, A. Y. J., Chien, T. L., Chien, S. and Guan, J. L. (2009). Role of focal adhesion kinase Ser-732 phosphorylation in centrosome function during mitosis, *Journal of Biological Chemistry*, 284(14): 9418–9425
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2005). Global cancer statistics 2002, *CA-a cancer journal for clinicians*;55:74–108
- Parri, M., & Chiarugi, P. (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Communication and Signaling*. 8 (23):1-14.
- Parsons, J. T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years, *Journal of cell science*, 116(Pt 8): 1409–1416.

- Parsons, J. T., Horwitz, A. R. and Schwartz, M. A (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension, *Natural review of molecular cell biology*, 11(9): 633–643.
- Parton, M., Krajewski, S., Smith, I., Krajewska, M., Archer, C., Naito, M., Ahern, R., Reed, J. and Dowsett, M. (2002). Coordinate expression of apoptosis-associated proteins in human breast cancer before and during chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 8: 2100–2108.
- Patharkar, O. R., Gassmann, W. and Walker, J. C. (2017). Leaf shedding as an anti-bacterial defense in *Arabidopsis* cauline leaves, *PLOS Genetics*: 1–18.
- Patravale, V., Dandekar, P. and Jain, R. (2012). *Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles*, *Nanoparticulate Drug Delivery*. Woodhead Publishing limited.: 123–155.
- Payne, S. L., Fogelgren, B., Hess, A. R., Seftor, E. A., Wiley, E. L., Fong, S. F. T., ... Kirschmann, D. A. (2005). Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Research*, 65(24): 11429–11436.
- Perou, C. M., Surlie, T., Eisen, M. B., Rijn, M. Van De, Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... Grant, S. (2000). Molecular Portraits Breast Cancer. *Nature*, 406(August): 747–752.
- Perrin, B. J., Amann, K. J., & Huttenlocher, A. (2006). Proteolysis of Cortactin by Calpain Regulates Membrane Protrusion during Cell Migration. *Molecular Biology of the Cell*, 17(2): 239 – 250.
- Pogoda, K., Niwinska, A., Murawska, M. and Pienkowski, T. (2013). Analysis of pattern, time and risk factors influencing recurrence in triple-negative breast cancer patients, *Medical Oncology*, 30(388): 1-8.
- Polte, T. R. and Hanks, S. K. (1997). Complexes of focal adhesion kinase (FAK). and Crk-associated substrate (p130(Cas)). are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs, *Journal of Biological Chemistry*, 272(9): 5501–5509.
- Pourahmad, J., Salimi, A., & Seydi, E. (2016). Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development. In *Free Radicals and Diseases*: 347 – 362.
- Prasad, M. and Montell, D. J. (2007). Cellular and Molecular Mechanisms of Border Cell Migration Analyzed Using Time-Lapse Live-Cell Imaging, *Developmental Cell*, 12(6): 997–1005.
- Prat, A., Lluch, A., Albanell, J., Barry, W. T., Fan, C., Chacn, J. I., ... Alba, E. (2014). Predicting response and survival in chemotherapy-treated triple-negative breast cancer. *British Journal of Cancer*, 111(8): 1532–41.
- Psaila, B., & Lyden, D. (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nature Reviews. Cancer*, 9(4): 285–293.
- Pylayeva, Y., Gillen, K.M., Gerald, W., Beggs, H.E., Reichardt, L.F., Giaccotti, F.G. (2009). Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase persinyalan. *The Journal of clinical investigation*.119:252–266
- Qian, B. Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*, 141(1): 39–51.
- Qian, Y., Zhong, X., Flynn, D. C., Zheng, J. Z., Qiao, M., Wu, C., Jiang, B.-H. (2005). ILK mediates aktin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 persinyalan. *Oncogene*, 24(19): 3154–65.
- Qiu, J., Xue, X., Hu, C., Xu, H., Kou, D., Li, R., & Li, M. (2016). Comparison of clinicopathological features and prognosis in triple-negative and non-triple negative breast cancer. *Journal of Cancer*, 7(2): 167–173.

- Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 19(11): 1423–1437.
- Rakha, E. A., Reis-filho, J. S., Baehner, F., Dabbs, D. J., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Richardson, A. L., Schnitt, S. J., Schmitt, F. C., Tan, P., Tse, G. M., Badve, S. and Ellis, I. O. (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade, *Breast Cancer Research*, 12(207): 1–12.
- Ranganathan, S., Halagowder, D. and Sivasithambaram, N. D. (2015). Quercetin suppresses twist to induce apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS ONE*, 10(10): 1–21.
- Redondo, M., Garcia, J., Rodrigo, I., Villar, E., Gonzalez, C. and Morell, M. (2003). Expression of bax and p53 proteins in the tumorigenesis and progression of breast carcinomas. *Tumour Biol*, 24: 23–31
- Reinhart-King, C. A., Dembo, M., & Hammer, D. A. (2008). Cell-cell mechanical communication through compliant substrates. *Biophys J*, 95(12): 6044–6051.
- Reis-Filho, J. S., & Tutt, A. N. J. (2008). Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*, 52: 108–118.
- Reymond, N., D'Água, B. B., & Ridley, A. J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, 13(12): 858–870.
- Ridley, A. J. (2015). Rho-GTPase signalling in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*, 36: 103–112.
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5651): 1704–1709.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J. and Minor, L. (2016). Cell Viability Assays, in *Assay Guidance Manual*, 1–31.
- Rivenbark, A. G., O Connor, S. M. and Coleman, W. B. (2013). Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: Challenges for personalized medicine, *American Journal of Pathology. American Society for Investigative Pathology*, 183(4): 1113–1124
- Robinson, B. D., Sica, G. L., Liu, Y.-F., Rohan, T. E., Gertler, F. B., Condeelis, J. S. and Jones, J. G. (2017). Tumor Microenvironment of Metastasis in Human Breast Carcinoma: A Potential Prognostic Marker Linked to Hematogenous Dissemination, *PLoS ONE*, 15(7): 2433–2441.
- Rodrigo JP, Garcia LA, Ramos S, Lazo PS, Suarez C. (2000). EMS1 gene amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res.*;6:3177–3182.
- Rodriguez-Hernandez, I., Cantelli, G., Bruce, F., & Sanz-Moreno, V. (2016). Rho, ROCK and actomyosin contractility in metastasis as drug targets. *F1000Research*, 5(0): 783.
- Rooney, C., White, G., Nazgiewicz, A., Woodcock, S., Anderson, K., Ballestrem, C., & Malliri, A. (2010). The Rac activator STEF (Tiam2). regulates cell migration by microtubule-mediated focal adhesion disassembly. *EMBO Reports*, 11(4): 292–298.
- Rørth, P. (2007). Collective guidance of collective cell migration. *Trends in Cell Biology*, 17(12): 575–579.
- Rosenfeld, S. (2013). Are the somatic mutation and tissue organization field theories of carcinogenesis incompatible? *Cancer Informatics*, 12: 221–229.

- Rousalova, I., & Krepela, E. (2010). Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (Review). *International Journal of Oncology*, 37: 1361–1378.
- Ryu, S. J., Cho, K. A., Oh, Y. S., & Park, S. C. (2006). Role of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase for senescence-associated apoptosis resistance. *Apoptosis*, 11(3): 303–313.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G., & Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23(16): 2861–2874.
- Sak, K. (2014). Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacognosy Reviews*, 8(16): 122–46.
- Samri, H. A. M. S. Al. (2016). Anti-Metastatic and Anti-Tumor growth effects of carnosol on breast cancer. United Arab Emirates University.
- Sánchez Alcázar, J. A., Oropesa Ávila, M., Andrade Talavera, Y., Garrido Maraver, J., de Lavera, I., de la Mata, M., Cotán, D., Villanueva Paz, M., Delgado Pavón, A., Alcocer Gómez, E. and Rodríguez Moreno, A. (2015). Stabilization Of Apoptotic Cells: Generation Of Zombie Cells, *Redox biology*, 5: 1-13.
- Sánchez, I., Calderón, J., Ruiz, B., Tellez, J., Calzada, L., & Taboada, J. (2001). In vitro cytotoxicity of flavonoids against MK2 and C6 tumour cells. *Phytotherapy Research*, 15(4): 290–293.
- Sandilands, E., Serrels, B., McEwan, D. G., Morton, J. P., Macagno, J. P., McLeod, K., ... Frame, M. C. (2012). Autophagic targeting of Src promotes cancer cell survival following reduced FAK signalling. *Nature Cell Biology*, 14(1): 51–60.
- Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Marshall, C. J. (2008). Rac Activation and Inactivation Control Plasticity of Tumor Cell Movement. *Cell*, 135(3): 510–523.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Medicinal Food*, 3(2): 121–125.
- Sceneay, J., Chow, M. T., Chen, A., Halse, H. M., Wong, C. S. F., Andrews, D. M., Moller, A. (2012). Primary Tumor Hypoxia Recruits CD11b+/Ly6Cmed/Ly6G+ Immune Suppressor Cells and Compromises NK Cell Cytotoxicity in the Premetastatic Niche. *Cancer Research*, 72(16): 3906–3911.
- Scotti, L., Bezerra Mendonça Junior, F. J., Magalhaes Moreira, D. R., da Silva, M. S., Pitta, I. R., & Scotti, M. T. (2012). SAR, QSAR and docking of anticancer flavonoids and variants: a review. *Curr Top Med Chem*, 12: 2785–809.
- Scotti, L., Scotti, M. T., Pasqualoto, K. F. M., Da Silva Bolzani, V., & Ferreira, E. I. (2009). Molecular physicochemical parameters predicting antioxidant activity of Brazilian natural products. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(4): 908–913.
- Sefton, B.M. & S. Shenolikar (1996). Analysis of Protein Phosphorylation. In Ausubel, F.M. et al., (eds): *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.: 8.1.1-18.1.5
- Sena, T., Ganguly, K.K., Biswas, J., Chatterjee, A. (2015). Focal Adhesion Kinase induces Matrix Metalloproteinase-2 by involving integrin $\alpha 5\beta 1$ -mediated persinyalan in breast cancer cell, MCF-7. *Acta Medica International*, 2(1): 29-30.
- Sewell, C. W. (2004). Pathology of high-risk breast lesions and ductal carcinoma in situ , *Radiologic Clinics of North America*, 42(5): 821–830.
- Shashank, K. and Abhay, K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview , *The Scientif World J*, 4(2): 32–48.
- Shen, Q., Rahn, J. J., Zhang, J., Gunasekera, N., Sun, X., Shaw, A. R. E., Hendzel, M. J., Hoffman, P., Bernier, A. and Hugh, J. C. (2008). MUC1 Initiates Src-CrkL-Rac1 /

- Cdc42 – Mediated Actin Cytoskeletal Protrusive Motility after Ligating Intercellular Adhesion Molecule-1 , 3(April): 555–568.
- Shibue, T., Brooks, M. W., Fatih Inan, M., Reinhardt, F., & Weinberg, R. A. (2012). The outgrowth of micrometastases is enabled by the formation of filopodium-like protrusions. *Cancer Discovery*, 2(8): 706–721
- Shin, I., Kim, S., Song, H., Kim, H. R. C., & Moon, A. (2005). H-Ras-specific activation of Rac-MKK3/6-p38 pathway: Its critical role in invasion and migration of breast epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15): 14675–14683.
- Shoemaker R.H. (2006). The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature reviews Cancer*. 6(10): 813-823.
- Sikov, W. M. et al., (2015). Abstract: impact of intrinsic subtype by PAM50 and other gene signatures on pathologic complete response (pCR) rates in triple- negative breast cancer (TNBC) after neoadjuvant chemotherapy (NACT) +/- carboplatin (Cb) or bevacizumab (Bev): CALGB 40603/150709. *Cancer Res*. 75: S4-05.
- Silva, M. T. (2010). Secondary necrosis: The natural outcome of the complete apoptotic program, *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 584(22): 4491–4499.
- Singh, M., Arseneault, M., Sanderson, T., Murthy, V., Ramassamy, C. (2006). Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer s disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 4855-4873.
- Singh, T.R., Shankar, S., Chen, X., Asim, M. and Srivastava, R.K. (2003). Synergistic interactions of chemotherapeutic drugs and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand on apoptosis and on regression of breast carcinoma in vivo. *Cancer Res*, 63; 5390–5400
- Singletary, S. E. (2002). Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20(17): 3628–3636.
- Singletary, S. E. (2002). Surgical margins in patients with early-stage breast cancer treated with breast conservation therapy , *American Journal of Surgery*, 184(5): 383–393.
- Sinn, H. P. and Kreipe, H. (2013). A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition, *Breast Care*, 8(2):149–154.
- Smith, J. A., Poteet-smith, C. E., Xu, Y., Errington, T. M., Hecht, S. M. and Lannigan, D. A. (2005). Identification of the First Specific Inhibitor of p90 Ribosomal S6 Kinase (RSK) Reveals an Unexpected Role for RSK in Cancer Cell Proliferation, *Cancer Res.*, 65(3): 1027–1034.
- Smith, S. M., Lyu, Y. L., & Cai, L. (2014). NF- κ B affects proliferation and invasiveness of breast cancer cells by regulating CD44 expression. *PLoS ONE*, 9(9).
- Smyth, E. (2003). The trouble with inhibitors, *Signalling Scissors*, *Horizon Symposia*, (October): 1–4.
- Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2013). The aging of the 2000 and 2011 Hallmark of cancer reviews: A critique. *Journal of Bioscience*, 38(3): 651–663.
- Sonoda, Y., Matsumoto, Y., Funakoshi, M., Yamamoto, D., Hanks, S. K., & Kasahara, T. (2000). Anti-apoptotic role of focal adhesion kinase (FAK): Induction of inhibitor-of-apoptosis proteins and apoptosis suppression by the overexpression of FAK in a human leukemic cell line, HL-60. *Journal of Biological Chemistry*, 275(21): 16309–16315.
- Soon, L., Tachtsidis, A., Fok, S., Williams, E.D., Newgreen, D.F., Thompson, E.W. (2011). The continuum of epithelial mesenchymal transition – implication of hybrid states for migration and survival in development and cancer. In: *Cancer*

- metastasis: biological basis and therapeutics. Editor: Lyden, D., Welch, D.R., Psaila, B. Cambridge University Press; 124
- Soto, A. M. (2014). Replacement for the somatic mutation theory, *Bioessays*, 33(5): 332–340.
- Steeg, P. S. (2016). Targeting metastasis, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 16(4): 201–218.
- Steen, H. B. (2000). The origin of oncogenic mutations: where is the primary damage?, *Carcinogenesis*, 21(10): 1773–1776.
- Steen, H., Kuster, B., Fernandez, M., Pandey, A., & Mann, M. (2002). Tyrosine phosphorylation mapping of the epidermal growth factor receptor persinyalan pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(2): 1031–1039
- Stickeler, D. O. Watermann, B. Gabriel, M. Jäger and G. Gitsch Abstract. Specific up-regulation of FAK expression in primary breast cancer as a marker for malignant transformation *Journal of Clinical Oncology*, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings. Vol 23, No 16S (June 1 Supplement), 2005: 9647
- Stott, S. L., Hsu, C.H. C.H., Tsukrov, D. I., Yu, M., Miyamoto, D. T., Waltman, B. A., Toner, M. (2010). Isolation of circulating tumor cells using a. October, 107(35): 18392–7.
- Strachan T, Read AP. (2004). *Human molecular genetics*. New York: Garland Press.
- Streuli, C. H., Akhtar, N., Humphries, J. D., Byron, A., Humphries, M. J., Zaidel-Bar, R., ... Couchman, J. R. (2009). Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *The Biochemical Journal*, 418(3): 491–506.
- Stuhrmann, B., Huber, F., & Käs, J. (2011). Robust organizational principles of protrusive biopolymer networks in migrating living cell. *PLoS ONE*, 6(1): 1-16
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y. and Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis, *Molecular Cancer*, 14(1): 1-16
- Subik, K., Lee, J. F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., ... Tang, P. (2010). The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, KI-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 4(1): 35–41.
- Suetsugu, S., Kurisu, S., Oikawa, T., Yamazaki, D., Oda, A., & Takenawa, T. (2006). Optimization of WAVE2 complex-induced aktin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP3, and Rac. *Journal of Cell Biology*, 173(4): 571–585.
- Sullivan, R., Holden, T., Tremberger, G., Cheung, E., Branch, C., Burrero, J., Surpris, G., Quintana, S., Rameau, a, Gadura, N., Yao, H., Subramaniam, R., Schneider, P., Rotenberg, S. a, Marchese, P., Lieberman, D. and Cheung, T. (2011). Fractal Dimension of Breast Cancer Cell Migration in a Wound Healing Assay, *Life Sciences*, 2(8): 170–175.
- Sulzmaier, F. J., Jean, C., Schlaepfer, D.D., Jolla, L. (2014). FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Natural Reviews Cancer*, 14(9): 598 – 610.
- Sumi, T., Matsumoto, K., Shibuya, A. and Nakamura, T. (2001). Activation of LIM Kinases by Myotonic Dystrophy Kinase-related Cdc42-binding Kinase α , *Journal of Biological Chemistry*, 276(25): 23092–96.
- Taliaferro-Smith, L. T., Oberlick, E., Liu, T., McGlothen, T., Alcaide, T., Tobin, R., Donnelly, S., Commander, R., Kline, E., Nagaraju, G. P., Havel, L., Marcus, A., Nahta, R. and O Regan, R. (2015). FAK activation is required for IGF1R-mediated regulation of EMT, migration, and invasion in mesenchymal triple negative breast cancer cells, *Oncotarget*, 6(7): 4757–72.

- Tan, G. H., Taib, N. A., Choo, W. Y., Teo, S. H., & Yip, C. H. (2009). Clinical Characteristics of Triple-negative Breast Cancer : Experience in an Asian Developing Country. *Asia Pacific Journal of Cancer Prevention*, 10: 395–398.
- Tantivejkul, K., Vucenik, I. and Shamsuddin, A. M. (2003). Inositol Hexaphosphate (IP 6)Inhibits Key Events of Cancer Metastasis: I . In *Vitro Studies of Adhesion , Migration and Invasion of MDA-MB 231 Human Breast Cancer Cells*, *Anticancer Resea*, 23: 3671–3679.
- Tarin, D., Thompson, E.W., Newgreen, D.F. (2005). The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res.*, 65: 5996–6000
- Tavassoliand, F.A., Devilee, P. (2003). WHO classification: Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. 58 (6): 671-672.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6): 442–454.
- Thomas, M. P., Liu, X., Whangbo, J., McCrossan, G., Sanborn, K. B., Basar, E., Walch, M. and Lieberman, J. (2015). Apoptosis Triggers Specific, Rapid, and Global mRNA Decay with 3' Uridylated Intermediates Degraded by DIS3L2. *Cell Reports*, 11(7): 1079–1089.
- Thompson, E. W. and Newgreen, D. F. (2005). Carcinoma invasion and metastasis: A role for epithelial-mesenchymal transition?, *Cancer Research*, 65(14): 5991–5995.
- Thornton, T. M., Rincon, M. (2009). Non-Classical P38 Map Kinase Functions : Cell Cycle Checkpoints and Survival. *International journal of biological sciences*, 5(1): 44–52.
- Tian, D., Li, Y., Li, X. and Tian, Z. (2018). Aloperine inhibits proliferation, migration and invasion and induces apoptosis by blocking the Ras signaling pathway in human breast cancer cells, *Molecular Medicine Reports*, 18(4): 3699–3710.
- Tomlinson, I. P., Novelli, M. R., & Bodmer, W. F. (1996). The mutation rate and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25): 14800–14803.
- Tsai, C. H., Chiu, J. H., Yang, C. W., Wang, J. Y., Tsai, Y. F., Tseng, L. M., Chen, W. S. and Shyr, Y. M. (2015). Molecular characteristics of recurrent triple-negative breast cancer, *Molecular Medicine Reports*, 12(5): 7326–7334.
- Tsuda, H., Takarabe, T., Hasegawa, F., Fukutomi, T., Hirohashi, S. (2000). Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases. *Am J Surg Pathol.*, 24(2):197-202 (Abstrak).
- Tutt, A., Ellis, P., Kilburn, L., Gilett, C., Pinder, S., Abraham, J., ... Bliss, J. (2015). TNT: A randomized phase III trial of carboplatin (C)compared with docetaxel (D)for patients with metastatic or recurrent locally advanced triple negative or BRCA1/2 breast cancer (CRUK/07/012). In: *Proceedings of the Thirty-Seventh Annual CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium: 2014 Dec 9-13; San Antonio, TX. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Research*, 75(9-Suppl): S3–01 (Abstrak).
- Utari, F., Itam, A., Syafrizayanti, S., Putri, W. H., Ninomiya, M. and Koketsu, M. (2019). Isolation of flavonol rhamnosides from *Pometia pinnata* leaves and investigation of α -glucosidase inhibitory activity of flavonol derivatives, 9(08):53–65.
- Uterpbergenov, D., Derewenda, U., Olekhovich, N., Szukalska, G., Banerjee, B., Hilinski, M. K., Derewenda, Z. S. (2012). Insights into the inhibition of the p90 ribosomal S6 kinase (RSK)by the flavonol glycoside SL0101 from the 1.5 crystal structure of the N-terminal domain of RSK2 with bound inhibitor. *Biochemistry*, 51(33): 6499–6510.
- Vadlamudi, R. K., Adam, L., Wang, R. A., Mandal, M., Nguyen, D., Sahin, A., Kumar, R. (2000). Regulatable expression of p21-activated kinase-1 promotes anchorage-

- independent growth and abnormal organization of mitotic spindles in human epithelial breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46): 36238–36244.
- Vadlamudi, R. K., Li, F., Barnes, C. J., Bagheri-Yarmand, R., & Kumar, R. (2004). p41-Arc subunit of human Arp2/3 complex is a p21-activated kinase-1-interacting substrate. *EMBO Reports*, 5(2): 154–160.
- Vakkala, M., Paakko, P. and Soini, Y. (1999). Expression of caspases 3, 6 and 8 is increased in parallel with apoptosis and histological aggressiveness of the breast lesion. *Br J Cancer*, 81: 592–599.
- Valastyan, S., Weinberg, R.A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*;147(2):275–292
- van Loo, G., Saelens, X., van Gorp, M., MacFarlane, M., Martin, S. J., & Vandenabeele, P. (2002). The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death and Differentiation*, 9(10): 1031–1042.
- van Staveren WC, Solis DY, Hebrant A, Detours V, Dumont JE, Maenhaut C. (2009). Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochimica et biophysica acta*;1795(2): 92-103.
- Van Zijl, F., Krupitza, G. and Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration, *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. Elsevier B.V., 728(1–2): 23–34.
- Vargo-Gogola, T., & Rosen, J. M. (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature reviews.Cancer*, 7(9): 659–672.
- Villa-Moruzzi, E. (2007). Targeting of FAK Ser910 by ERK5 and PP1 δ in non-stimulated and phorbol ester-stimulated cells, *Biochemical Journal*, 408(1): 7–18.
- Villar, E., Redondo, M., Rodrigo, I., Garcia, J., Avila, E. and Matilla, A. (2001). bcl-2 Expression and apoptosis in primary and metastatic breast carcinomas. *Tumour Biol*, 22:137–145.
- Volk-Draper, L. and Rajput, S. (2012). Novel Model for Basaloid Triple-negative Breast Cancer: Behavior In Vivo and Response to Therapy. *Neoplasia*. New York, 14(10): 926–942.
- Walker, S., Foster, F., Wood, A., Owens, T., Brennan, K., Streuli, C. H. and Gilmore, A. P. (2016). Oncogenic activation of FAK drives apoptosis suppression in a 3D-culture model of breast cancer initiation, *Oncotarget*, 7(43): 70336–70352.
- Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.*; 14: 927-939.
- Wang, L.S., Stoner, G.D. (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett.*, 269: 281–290.
- Wang, S., Zhong, Z., Wan, J., Tan, W., Wu, G., Chen, M. and Wang, Y. (2013). Oridonin induces apoptosis, inhibits migration and invasion on highly-metastatic human breast cancer cells, *American Journal of Chinese Medicine*, 41(1):177–196.
- Wang, Y. and McNiven, M. A. (2012). Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK-p130Cas complex. *J Cell Biol* 196: 375–385.
- Wang, Y. and Zhou, B. (2013). Epithelial-mesenchymal Transition---A Hallmark of Breast Cancer Metastasis, *Cancer Hallmark*, 1(1): 38–49.
- Weaver, A. M. (2008). Cortaktin in tumor invasiveness. *Cancer Lett*. 265: 157-166.
- Webb, B. A., Jia, L., Eves, R. and Mak, A. S. (2007). Dissecting the functional domain requirements of cortaktin in invadopodia formation. *Eur. J. Cell Biol*. 86: 189-206.

- Weigelt, B., Geyer, F. C. and Reis-filho, J. S. (2010). Histological types of breast cancer : How special are they ? *Molecular Oncology*. Elsevier B.V, 4(3): 192–208.
- Weiss, R. (2004). Multistage carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 91: 1981–1982.
- Wells, A., Grahovac, J., Wheeler, S., Ma, B., & Lauffenburger, D. (2013). Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(5): 283–289.
- Wen, W. M. (2012). Development of Focal Adhesion Kinase Inhibitors in Cancer Therapy , *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 11(7): 638–642.
- Wendel, C. and Haier, J. (2011). Chapter 2437 Focal adhesion kinase , in Schwab M. (eds) *Encyclopedia of Cancer*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Widmaier, M., Rognoni, E., Radovanac, K., Azimifar, S. B., & Fassler, R. (2012). Integrin-linked kinase at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(8): 1839–1843.
- Widodo, I., Dwianingsih, E. K., Triningsih, E., Utoro, T., & Soeripto. (2014). Clinicopathological features of Indonesian breast cancers with different molecular subtypes. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(15): 6109–13.
- Willinger, T., Freeman, T., Hasegawa, H., McMichael, A. J., & Callan, M. F. (2005). T Cell Subsets Central Memory from Effector Memory CD8 Molecular Signatures Distinguish Human Molecular Signatures Distinguish Human Central Memory from Effector Memory CD8 T Cell Subsets 1. *J Immunol*, 175: 5895–5903.
- Wolf, K., Mazo, I., H. Leung, K. Engelke, U.H. von Andrian, E.I. Deryugina, A.Y. Strongin, E.B. Brocker, P. Friedl. (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J. Cell Biol.*, 160: 267–277.
- World Health Organization (2014). *Cancer Country Profile : Indonesia, 2014*: 22–23.
- Wu, H., Reynolds, A. B., Kanner, S. B., Vines, R. R., & Parsons, J. T. (1991). Identification and Characterization of a Novel Cytoskeleton-Associated pp60^{src} Substrate. *Molecular and Cellular Biology*, 11(10): 5113–5124
- Wu, X., Suetsugu, S., Cooper, L. A., Takenawa, T. and Guan, J. L. (2004). Focal adhesion kinase regulation of N-WASP subcellular localization and function. *J Biol Chem* 279: 9565-76.
- Wu, Y., & Zhou, B. P. (2010). TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *British Journal of Cancer*, 102(4): 639–44.
- Wyckoff, J. B., Wang, Y., Lin, E. Y., Li, J. F., Goswami, S., Stanley, E. R., Condeelis, J. (2007). Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Research*, 67(6): 2649–2656.
- Xiao, J., Chen, T., & Cao, H. (2014). Flavonoid glycosylation and biological benefits. *Biotechnology Advances*, 22 May: 1–21.
- Xie, Q., Yang, Z., Huang, X., Zhang, Z., Li, J., Ju, J., Zhang, H. and Ma, J. (2019). Ilamycin C induces apoptosis and inhibits migration and invasion in triple-negative breast cancer by suppressing IL-6/STAT3 pathway, *Journal of Hematology and Oncology*. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1): 1–14.
- Xie, Z., Sanada, K., Samuels, B. A., Shih, H. and Tsai, L.-H. (2003). Serine 732 Phosphorylation of FAK by Cdk5 Is Important for Microtubule Organization, Nuclear Movement, and Neuronal Migration extension and that nucleokinesis is critically dependent on the microtubule network (Lambert de Rouvroit and Goffinet Detailed mo, *Cell*, 114: 469–482.
- Xu, L. H., Yang, X., Bradham, C. A., Brenner, D. A., Baldwin, A. S., Craven, R. J., & Cance, W. G. (2000). The focal adhesion kinase suppresses transformation-associated, anchorage-independent apoptosis in human breast cancer cells: Involvement of

- death receptor-related signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 275(39): 30597–30604.
- Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Developmental Cell*, 14(6): 818–829.
- Yang, L. (2006). Mechanisms of Apoptosis Resistance In Breast Cancer. In *Breast Cancer and Molecular Medicine*: 841 – 858.
- Yang, L. and Zhang, Y. (2017). Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application, *Journal of hematology & oncology. Journal of Hematology & Oncology*, 10(1): 58
- Yang, L., Cao, Z., Yan, H. and Wood, W.C. (2003). Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Res*, 63: 6815–6824.
- Yang, L., Huang, J., Ren, X., Gorska, A. E., Chytil, A., Aakre, M., Carbone, D. P., Matrisian, L. M., Richmond, A., Lin, P. C. and Moses, H. L. (2008). Abrogation of TGF β Signaling in Mammary Myeloid Cells that Promote Metastasis, *Cancer Cell*, 13(January): 23–35.
- Yang, S., Liu, J., Thor, A. D., & Yang, X. (2007). Caspase expression profile and functional activity in a panel of breast cancer cell lines. *Oncology Reports*, 17(5): 1229–1235.
- Yang, Y., Wang, X., Hawkins, C. A., Chen, K., Vaynberg, J., Mao, X., ... Qin, J. (2009). Structural basis of focal adhesion localization of LIM-only adaptor PINCH by integrin-linked kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(9): 5836–5844.
- Yano, K., Imai, K., Shimizu, A., Hanashita, T..... Lipman, D. J. (2013). Molecular Mechanisms of Mismatch Repair Genes in Cancer – A Brief Review, *Journal of Proteomics and Genomics*, 1(1): 1–9.
- Yeatman, T. J. (2004). A renaissance for SRC, *Nature reviews. Cancer*, 4(6): 470–480.
- Yin, L. M., Wei, Y., Wang, Y., Xu, Y. D. and Yang, Y. Q. (2013). Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells, *International Journal of Medical Sciences*, 10(1): 68–72.
- Yom, C. K., Noh, D. Y., Kim, W. H. and Kim, H. S. (2011). Clinical significance of high focal adhesion kinase gene copy number and overexpression in invasive breast cancer, *Breast Cancer Research and Treatment*, 128(3): 647–655.
- Yoon, H., Choi, Y. La, Song, J. Y., Do, I., Kang, S. Y., Ko, Y. H., Song, S. and Kim, B. G. (2014). Targeted inhibition of FAK, PYK2 and BCL-XL synergistically enhances apoptosis in ovarian clear cell carcinoma cell lines, *PLoS ONE*, 9(2): 1–11.
- Yoon, H., Dehart, J. P., Murphy, J. M. and Lim, S.-T. S. (2015). Understanding the roles of FAK in cancer: inhibitors, genetic models, and new insights, *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 63(2): 114–128.
- Yoshida, T., Zhang, Y., Rivera Rosado, L. A, Chen, J., Khan, T., Moon, S. Y. and Zhang, B. (2010). Blockade of Rac1 activity induces G1 cell cycle arrest or apoptosis in breast cancer cells through downregulation of cyclin D1, survivin, and X-linked inhibitor of apoptosis protein, *Molecular cancer therapeutics*, 9(6):1657–1668.
- Yue, X., Zhao, Y., Xu, Y., Zheng, M., Feng, Z. and Hu, W. (2017). Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy, *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 429(11): 1595–1606.
- Zell, T., Khoruts, A., Ingulli, E., Bonnevier, J. L., Mueller, D. L., & Jenkins, M. K. (2001). Single-cell analysis of signal transduction in CD4 T cells stimulated by antigen in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19): 10805–10810.

- Zengel, B., Yararbas, U., Duran, A., Uslu, A., Eliyatkin, N., Demirkiran, M. A., Cengiz, F., Şimşek, C., Postacı, H., Vardar, E. and Durusoy, R. (2015). Comparison of the clinicopathological features of invasive ductal, invasive lobular, and mixed (invasive ductal + invasive lobular) carcinoma of the breast, *Breast Cancer*, 22(4): 374–381.
- Zhai, Z., Qu, X., Li, H., Ouyang, Z., Yan, W., Liu, G., Liu, X., Fan, Q., Tang, T., Dai, K. and Qin, A. (2015). Inhibition of MDA-MB-231 breast cancer cell migration and invasion activity by andrographolide via suppression of nuclear factor- κ B-dependent matrix metalloproteinase-9 expression, *Molecular Medicine Reports*, 11(2): 1139–1145.
- Zhang, B., Zhang, Y. and Shacter, E. (2004). Rac1 inhibits apoptosis in human lymphoma cells by stimulating Bad phosphorylation on Ser-75, *Molecular and cellular biology*, 24(14): 6205–6214.
- Zhang, D., Beresford, P. J., Greenberg, a H., & Lieberman, J. (2001). Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10): 5746–5751.
- Zhang, D., Pasternack, M. S., Beresford, P. J., Wagner, L., Greenberg, A. H., & Lieberman, J. (2001b). Induction of Rapid Histone Degradation by the Cytotoxic T Lymphocyte Protease Granzyme A. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5): 3683–3690.
- Zhang, H. W., Hu, J. J., Fu, R. Q., Liu, X., Zhang, Y. H., Li, J., Liu, L., Li, Y. N., Deng, Q., Luo, Q. S., Ouyang, Q. and Gao, N. (2018). Flavonoids inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy through downregulation of PI3Ky mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K/ULK signaling pathway in human breast cancer cells, *Scientific Reports*, 8(1):1–13.
- Zhang, X. H., Wang, Q., Gerald, W., Hudis, C. a, Smid, M., Foekens, J. a, & Massagué, J. (2010). Latent bone metastasis in breast cancer tied to Src-dependent survival signals. *Cancer Cell*, 16(1): 67–78.
- Zhao, X. and Guan, J. L. (2011). Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(8): 610–615.
- Zheng, X., Carstens, J. L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C., Lebleu, V. S. and Kalluri, R. (2015). EMT Program is Dispensable for Metastasis but Induces Chemoresistance in Pancreatic Cancer, *Nature*, 527(7579): 525–530..
- Zhou, J., Yi, Q. and Tang, L. (2019). The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK).on Cancer: A focused review. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1): 1–11.
- Zhou, Y., Su, J., Shi, L., Liao, Q. and Su, Q. (2013). DADS downregulates the Rac1-ROCK1/PAK1-LIMK1-ADF/cofilin signaling pathway, inhibiting cell migration and invasion. *Oncology Reports*, 29(2): 605–612.
- Zhu, K. C., Sun, J. M., Shen, J. G., Jin, J. Z., Liu, F., Xu, X. L., Chen, L., Liu, L. T. and Lv, J. J. (2015). Afzelin exhibits anti-cancer activity against androgen-sensitive LNCaP and androgen-independent PC-3 prostate cancer cells through the inhibition of LIM domain kinase 1, *Oncology Letters*, 10(4): 2359–2365.
- Zhu, K. C., Sun, J.-M., Shen, J.-G., Jin, J.-Z., Liu, F., Xu, X.-L., Chen, L., Liu, L.-T. and LV, J.-J. (2015). Afzelin exhibits anti-cancer activity against androgen-sensitive LNCaP and androgen-independent PC-3 prostate cancer cells through the inhibition of LIM domain kinase 1, *Oncology Letters*, 10: 2359–2365.
- Zhu, P., Zhang, D., Chowdhury, D., Martinvalet, D., Keefe, D., Shi, L., & Lieberman, J. (2006). Granzyme A, which causes single-stranded DNA damage, targets the double-strand break repair protein Ku70. *EMBO Reports*, 7(4): 431–437.
- Zou L, Cortez D, Elledge SJ. (2002). Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes Dev.*, 16: 198-208

- Zrihan-Licht, S., Avraham, S., Jiang, S., Fu, Y. and Avraham, H. K. (2004). Coupling of RAFTK/Pyk2 kinase with c-Abl and their role in the migration of breast cancer cells. *International journal of oncology*, 24(1): 153–159.
- Zugasti, O., Rul, W., Roux, P., Peyssonnaud, C., Eychene, A., Franke, T. F., Fort, P. and Hibner, U. (2001). Raf-MEK-Erk Cascade in Anoikis Is Controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt, *Molecular and Cellular Biology*, 21(19): 6706–6717.
- Zuluaga, S., Gutiérrez-Uzquiza, A., Bragado, P., Álvarez-Barrientos, A., Benito, M., Nebreda, A. R., & Porras, A. (2007). p38 - MAPK can positively or negatively regulate Rac-1 activity depending on the presence of serum. *FEBS Letters*, 581(20): 3819–3825.



LAMPIRAN 1 :
KETERANGAN KELAIKAN ETIK



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168: 569117: 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 228 / EC / KEPK – S3 / 07/ 2017

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL : Efek Azelin terhadap Penghambatan Migrasi dan Peningkatan Apoptosis Sel kanker Payudara MDA-MB-231 melalui Hambatan FAK dan Rac1.

PENELITI UTAMA : Eva Rachmi

UNIT / LEMBAGA : S3 Kedokteran - Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang.

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang.

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Malang, 17 JUL 2017
Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Prof. Dr.dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS (K), M.Hum
NIK. 160746683

Catatan :
Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan
Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol)

**LAMPIRAN 2 :
KETERANGAN BEBAS PLAGIASI**



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755
<http://www.fk.ub.ac.id> e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

SURAT KETERANGAN

Nomor 628 /UN10.F08.08/PP/2019

Yang bertanda tangan dibawah ini,

nama : Dr.Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes
NIP : 197511252005012001
pangkat dan golongan : Penata Muda, III/a
jabatan : Ketua Badan Penerbitan Jurnal Fakultas Kedokteran

dengan ini menerangkan bahwa,a

nama : dr. Eva Rachmi, M.Kes
nim : 117070100011051
program studi : Doktor Ilmu Kedokteran
judul : Efek Afzelin Terhadap Penghambatan Migrasi Dan Peningkatan Apoptosis Sel Kanker Payudara MDA-MB 231, Melalui Hambatan FAK Dan RAC-1
jenis artikel : Disertasi
jumlah halaman : 171

berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal Fakultas Kedokteran menyatakan bahwa Artikel Ilmiah tersebut diatas memiliki **kemiripan 4 %**

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

04 DEC 2019

Ketua Badan Penerbitan Jurnal,

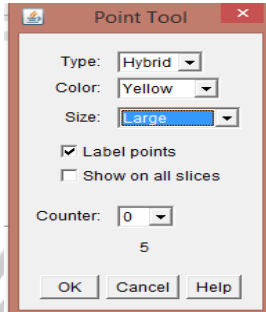


Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes
NIP 19751125 200501 2 001

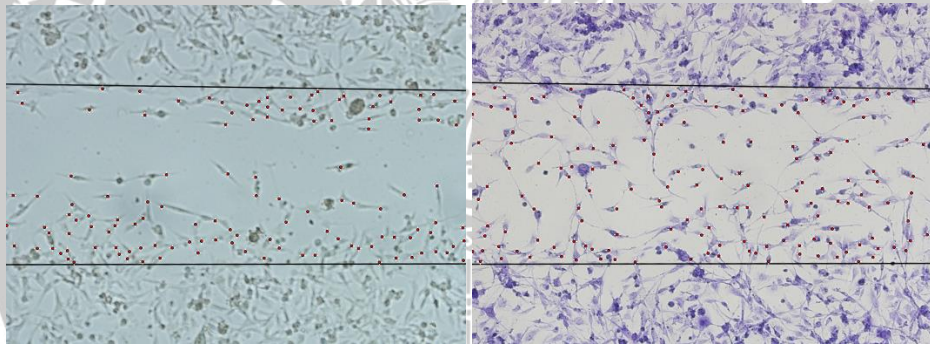
LAMPIRAN 3:

CARA PENGHITUNGAN JUMLAH SEL YANG MIGRASI

1. Menandai tepi area scratch dengan garis hitam (dengan piranti lunak 'paint'),
2. Mengeplot garis yang sama untuk gambar jam ke-24 dan ke-48
3. Buka gambar di piranti lunak ImageJ
4. Klik 'multipoint'
5. Klik 'edit' → 'options' → 'point tools'



6. Klik sel yang teridentifikasi pada gambar. Sel yang terpilih akan ditandai. Jumlah sel yang ditandai akan Tampak pada 'Counter" di Point tools.

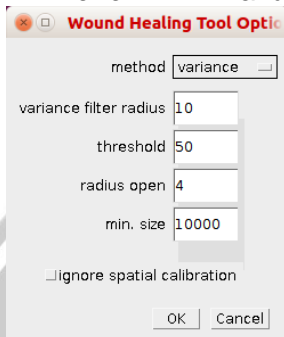


**LAMPIRAN 4:
 CARA PENGHITUNGAN AREA TERTUTUP SEL**

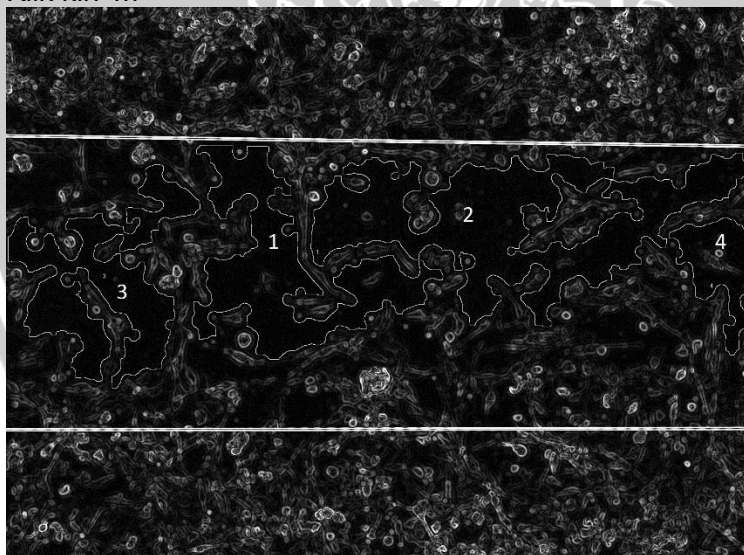
1. Membuka gambar yang akan dianalisis pada ImageJ
2. Ubah menjadi 8-bit, 'image' → 'type' → '8 bit'
3. Klik 'proses' → 'find edges'
4. Klik 'analyze' → 'set measurement' → 'area'



5. MRI wound healing tool
6. Klik kanan 'm' → lakukan pengaturan



7. Klik kiri 'm'



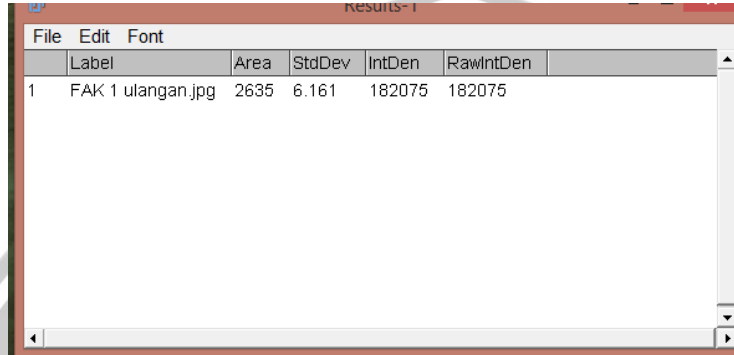
8. Hitung jumlah total area yang teridentifikasi pada area goresan.

File	Edit	Font	Results
	Label		Area
1	Str C1b48w.tif.0001-0508		77222
2	Str C1b48w.tif.0002-0482		131672
3	Str C1b48w.tif.0003-0558		67885
4	Str C1b48w.tif.0004-0578		24949

LAMPIRAN 5:

CARA PENGHITUNGAN DENSITAS PITA WESTERN BLOTTING

1. Gambar scan hasil western blotting dimuat pada ImageJ.
2. Gambar di *inverted* → *Edit* → *invert*
3. Gunakan *tool box*, pilih pita yang akan dikuantifikasi
4. Pilih → *analyze* → *set measurement* → cek *area* dan *integrated density*
5. Pilih → *analyze* → *measure*



The screenshot shows the 'Results' window in ImageJ. The window title is 'Results-1'. It contains a table with the following data:

	Label	Area	StdDev	IntDen	RawIntDen
1	FAK 1 ulangan.jpg	2635	6.161	182075	182075

6. Gunakan box yang sama untuk memilih pita berikutnya (besarnya area harus sama)
7. Data disimpan dalam excel. Intensitas protein tiap band adalah yang tertera pada kolom *IntDen*.
8. Ulangi lagi dari awal untuk band yang sama. Hasil yang didapat adalah tiga kali pengulangan dalam penghitungan *integrated density*.
9. Hasil intersitas protein dikonversi menjadi rasio terhadap kontrol negatif.

LAMPIRAN 6:
UJI STATISTIKA UNTUK HASIL UJI VIABILITAS SEL

1. Data

Kontrol medium	KELOMPOK					
	Kontrol sel	Kontrol pelarut	Afzelin 100 µg/ml	Afzelin 200 µg/ml	Afzelin 400 µg/ml	Afzelin 800 µg/ml
0.08	0.262	0.289	0.2650	0.2990	0.2720	0.1890
	0.406	0.348	0.3060	0.2740	0.2640	0.2310
	0.339	0.362	0.2540	0.2190	0.3000	0.2400
Rata-rata	0.3238	0.3264				
Sel viabel adalah $= (OD \text{ perlakuan} - 0.08) / (0.3238 - 0.08) \times 100\%$						
Sel viabel (%)		85.73	75.88	89.83	78.75	44.71
		109.93	92.70	79.57	75.47	61.94
		115.67	71.37	57.01	90.24	65.63

2. Homogenitas data : Homogen karena $p > 0.05$

Test of Homogeneity of Variances

Viabilitas sel

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.136	4	10	.151

3. Normalitas data : Normal karena $p > 0.05$

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		18
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.0000000
	Std. Deviation	11.28682596
Most Extreme Differences	Absolute	.175
	Positive	.120
	Negative	-.175
Test Statistic		.175
Asymp. Sig. (2-tailed)		.149 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

**LAMPIRAN 7:
UJI STATISTIKA UNTUK HASIL UJI APOPTOSIS**

1. DATA

	An/PI (-) viabel	An(+)/PI(-) Apoptosis awal	An(+)/PI(+) Apoptosis akhir	An(-)/PI(+) Nekrosis
Kontrol negatif;Ka	94.73	3.71	0.94	0.62
Kb	94.97	3.36	0.94	0.73
Kc	94.93	3.40	0.84	0.84
1 a (100)	96.32	2.12	1.21	0.35
1b	95.27	2.98	1.33	0.41
1c	95.37	3.08	1.14	0.59
2a (200)	96.48	1.86	1.00	0.66
2b	94.40	3.53	1.37	0.70
2c	93.97	3.95	1.45	0.63
3a (400)	92.11	5.35	1.92	0.62
3b	91.36	5.48	2.60	0.56
3c	92.93	4.70	1.81	0.56
4a (800)	64.71	12.28	20.62	2.49
4b	65.98	12.37	19.78	1.86
4c	65.21	10.28	20.59	3.92

2. Uji Normalitas Data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	An/PI (-)	An(+)/PI(-)	An(+)/PI(+)	An(-)/PI(+)
N	15	15	15	15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.0000000	.0000000	.0000000
	Std. Deviation	2.16130312	5.28958696	.76868518
Most Extreme Differences	Absolute	.183	.159	.173
	Positive	.183	.159	.173
	Negative	-.141	-.153	-.122
Test Statistic		.183	.159	.173
Asymp. Sig. (2-tailed)		.191 ^c	.200 ^{c,d}	.200 ^{c,d}

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

	400	-3.33333*	.71396	.001	-4.9241	-1.7425
	800	-28.02000*	.71396	.000	-29.6108	-26.4292
200	kontrol	-.01000	.71396	.989	-1.6008	1.5808
	100	.433333	.71396	.557	-1.1575	2.0241
	400	-2.90000*	.71396	.002	-4.4908	-1.3092
	800	-27.58667*	.71396	.000	-29.1775	-25.9959
400	kontrol	2.89000*	.71396	.002	1.2992	4.4808
	100	3.33333*	.71396	.001	1.7425	4.9241
	200	2.90000*	.71396	.002	1.3092	4.4908
	800	-24.68667*	.71396	.000	-26.2775	-23.0959
800	kontrol	27.57667*	.71396	.000	25.9859	29.1675
	100	28.02000*	.71396	.000	26.4292	29.6108
	200	27.58667*	.71396	.000	25.9959	29.1775
	400	24.68667*	.71396	.000	23.0959	26.2775

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



**LAMPIRAN 8:
UJI STATISTIKA UNTUK HASIL UJI MIGRASI BERDASAR JUMLAH SEL**

1. Data

Perlakuan (µg/ml)	Ulangan	Migrasi 24 (sel)	Migrasi 48 (sel)
Kontrol (-)	1	161.5	315.5
	2	170	318
	3	177.5	269
Dosis 100	1	101	162
	2	139.5	221
	3	140	309.5
Dosis 200	1	161	298
	2	121	273.5
	3	145	306.5
Dosis 400	1	92	132
	2	119.5	215
	3	128	168
Dosis 800	1	59.5	89.5
	2	73	95.5
	3	87	111

2. Homogenitas data : homogen ($p > 0.05$)

Test of Homogeneity of Variances				
	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
migrasi24	1.114	4	10	.403
migrasi48	2.249	4	10	.136

3. Normalitas Data : normal ($p > 0.05$)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test			
		Unstandardized Residual	Unstandardized Residual
N		15	15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.0000000	.0000000
	Std. Deviation	19.98195615	53.01398625
Most Extreme Differences	Absolute	.135	.135
	Positive	.113	.119
	Negative	-.135	-.135
Test Statistic		.135	.135
Asymp. Sig. (2-tailed)		.200 ^{c,d}	.200 ^{c,d}

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. Lilliefors Significance Correction.
- d. This is a lower bound of the true significance.

LAMPIRAN 9:

UJI STATISTIKA UNTUK HASIL UJI MIGRASI BERDASAR AREA TERTUTUP SEL

1. Data

Dosis	Ulangan	Area 24 jam (%)	Area 48 jam (%)
Kontrol	1	74.978	88.382
	2	84.412	100
	3	73.993	96.429
100	1	52.16	83.56
	2	58.083	79.295
	3	59.349	98.24
200	1	53.582	88.7
	2	53.985	93.861
	3	61.701	95.94
400	1	38.596	66.258
	2	40.47	49.735
	3	38.663	74.294
800	1	11.88	25.715
	2	16.162	41.005
	3	29.35	37.977

2. Homogenitas data : homogen ($p > 0.05$)

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
area_terisi_sel_migrasi24	3.316	4	10	.057
area_terisi_sel_migrasi48	1.443	4	10	.290

3. Normalitas data :

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual	Unstandardized Residual
N		15	15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.0000000	.0000000
	Std. Deviation	20.76588087	24.70318518
Most Extreme Differences	Absolute	.145	.182
	Positive	.088	.149
	Negative	-.145	-.182
Test Statistic		.145	.182
Asymp. Sig. (2-tailed)		.200 ^{c,d}	.194 ^c

- Test distribution is Normal.
- Calculated from data.
- Lilliefors Significance Correction.
- This is a lower bound of the true significance.

4. Deskriptif

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
area_1	3	77.79433	5.752190	3.321028	63.50510	92.08357	73.993	84.412
terisi_2	3	56.53067	3.837673	2.215682	46.99736	66.06397	52.160	59.349
_sel_3	3	56.42267	4.575610	2.641730	45.05622	67.78911	53.582	61.701
migrasi_4	3	39.24300	1.063141	.613805	36.60201	41.88399	38.596	40.470
5	3	19.13067	9.105491	5.257058	-3.48863	41.74996	11.880	29.350
Total	15	49.82427	20.840007	5.380867	38.28346	61.36508	11.880	84.412
area_1	3	94.93700	5.950969	3.435793	80.15397	109.72003	88.382	100.000
terisi_2	3	87.03167	9.938189	5.737816	62.34384	111.71950	79.295	98.240
_sel_3	3	92.83367	3.727729	2.152205	83.57348	102.09386	88.700	95.940
migrasi_4	3	63.42900	12.521524	7.229305	32.32381	94.53419	49.735	74.294
5	3	34.89900	8.096394	4.674455	14.78644	55.01156	25.715	41.005
Total	15	74.62607	24.706169	6.379105	60.94425	88.30789	25.715	100.000

4. Perbedaan rerata secara umum

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
area_terisi_sel_migrasi24	Between Groups	5774.699	4	1443.675	47.243	.000
	Within Groups	305.584	10	30.558		
	Total	6080.283	14			
area_terisi_sel_migrasi48	Between Groups	7804.691	4	1951.173	26.337	.000
	Within Groups	740.835	10	74.084		
	Total	8545.527	14			

5. Perbedaan rerata antar kelompok

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
area_terisi_sel_migrasi24	1	2	21.263667*	4.513563	.006	6.40916	36.11817
		3	21.371667*	4.513563	.006	6.51716	36.22617
		4	38.551333*	4.513563	.000	23.69683	53.40584
		5	58.663667*	4.513563	.000	43.80916	73.51817
	2	1	-21.263667*	4.513563	.006	-36.11817	-6.40916

	3	.108000	4.513563	1.000	-14.74651	14.96251
	4	17.287667*	4.513563	.022	2.43316	32.14217
	5	37.400000*	4.513563	.000	22.54549	52.25451
3	1	-21.371667*	4.513563	.006	-36.22617	-6.51716
	2	-.108000	4.513563	1.000	-14.96251	14.74651
	4	17.179667*	4.513563	.023	2.32516	32.03417
	5	37.292000*	4.513563	.000	22.43749	52.14651
4	1	-38.551333*	4.513563	.000	-53.40584	-23.69683
	2	-17.287667*	4.513563	.022	-32.14217	-2.43316
	3	-17.179667*	4.513563	.023	-32.03417	-2.32516
	5	20.112333*	4.513563	.008	5.25783	34.96684
5	1	-58.663667*	4.513563	.000	-73.51817	-43.80916
	2	-37.400000*	4.513563	.000	-52.25451	-22.54549
	3	-37.292000*	4.513563	.000	-52.14651	-22.43749
	4	-20.112333*	4.513563	.008	-34.96684	-5.25783
area_terisi_sel _migrasi48	1	7.905333	7.027733	.791	-15.22351	31.03418
	3	2.103333	7.027733	.998	-21.02551	25.23218
	4	31.508000*	7.027733	.008	8.37915	54.63685
	5	60.038000*	7.027733	.000	36.90915	83.16685
2	1	-7.905333	7.027733	.791	-31.03418	15.22351
	3	-5.802000	7.027733	.917	-28.93085	17.32685
	4	23.602667*	7.027733	.045	.47382	46.73151
	5	52.132667*	7.027733	.000	29.00382	75.26151
3	1	-2.103333	7.027733	.998	-25.23218	21.02551
	2	5.802000	7.027733	.917	-17.32685	28.93085
	4	29.404667*	7.027733	.013	6.27582	52.53351
	5	57.934667*	7.027733	.000	34.80582	81.06351
4	1	-31.508000*	7.027733	.008	-54.63685	-8.37915
	2	-23.602667*	7.027733	.045	-46.73151	-.47382
	3	-29.404667*	7.027733	.013	-52.53351	-6.27582
	5	28.530000*	7.027733	.015	5.40115	51.65885
5	1	-60.038000*	7.027733	.000	-83.16685	-36.90915
	2	-52.132667*	7.027733	.000	-75.26151	-29.00382
	3	-57.934667*	7.027733	.000	-81.06351	-34.80582
	4	-28.530000*	7.027733	.015	-51.65885	-5.40115

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

7. Perbedaan area tertutup sel antar lama pengamatan pada konsentrasi yang sama
Multiple Comparisons

Dependent Variable: Area_terisi

LSD

(I) lama pengamatan	(J) lama pengamatan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol negatif - 24	48	-17.142667*	5.905983	.009	-29.46233	-4.82300
100 - 24	48	-30.501000*	5.905983	.000	-42.82067	-18.18133
200 - 24	48	-36.411000*	5.905983	.000	-48.73067	-24.09133
400 - 24	48	-24.186000*	5.905983	.001	-36.50567	-11.86633
800 - 24	48	-15.768333*	5.905983	.015	-28.08800	-3.44867



**LAMPIRAN 10:
UJI STATISTIKA UNTUK HASIL ANALISIS WESTERN BLOTTING
MENGUNAKAN IMAGEJ**

1. Data

Perlakuan	Ulangan analisis	FAK1 area	FAK tyr397 area	FAK1 relative density	FAK tyr397 relative density
Kontrol negatif	1	317790	187895	1	0.591255
	2	315076	182485	0.996041411	0.574231
	3	316532	193300	0.996041411	0.608263
100	1	317802	201228	1.000037761	0.633211
	2	316251	199914	0.995157179	0.629076
	3	318670	197390	1.002769124	0.621133
200	1	309213	193483	0.973010479	0.608839
	2	308033	191969	0.969297335	0.604075
	3	301617	188033	0.949107901	0.591689
400	1	316519	203363	0.996000503	0.639929
	2	316833	208608	0.996988577	0.656433
	3	304862	209814	0.959319047	0.660228
800	1	218224	146130	0.68669247	0.459832
	2	217859	140949	0.685543913	0.443529
	3	208103	138961	0.654844394	0.437273

2. Homogenitas data

Test of Homogeneity of Variances				
	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
FAKtyr_RD	.625	4	10	.655
FAK1_RD	2.087	4	10	.158

3. Normalitas data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test			
		Unstandardized Residual	Unstandardized Residual
N		15	15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.0000000	.0000000
	Std. Deviation	.08707314	.10539611
Most Extreme Differences	Absolute	.136	.149
	Positive	.136	.149
	Negative	-.127	-.148
Test Statistic		.136	.149
Asymp. Sig. (2-tailed)		.200 ^{c,d}	.200 ^{c,d}

a. Test distribution is Normal.

	2	-.0355333	.0114705	.067	-.073284	.002217	
	4	-.0203000	.0114705	.439	-.058050	.017450	
	5	.2881333*	.0114705	.000	.250383	.325884	
4	1	-.0117333	.0114705	.839	-.049484	.026017	
	2	-.0152333	.0114705	.682	-.052984	.022517	
	3	.0203000	.0114705	.439	-.017450	.058050	
	5	.3084333*	.0114705	.000	.270683	.346184	
5	1	-.3201667*	.0114705	.000	-.357917	-.282416	
	2	-.3236667*	.0114705	.000	-.361417	-.285916	
	3	-.2881333*	.0114705	.000	-.325884	-.250383	
	4	-.3084333*	.0114705	.000	-.346184	-.270683	
FAKtyr_RD	1	2	-.0601000*	.0153764	.019	-.110705	-.009495
		3	-.0169000	.0153764	.803	-.067505	.033705
		4	-.1002000*	.0153764	.001	-.150805	-.049595
		5	.2373333*	.0153764	.000	.186728	.287938
	2	1	.0601000*	.0153764	.019	.009495	.110705
		3	.0432000	.0153764	.105	-.007405	.093805
		4	-.0401000	.0153764	.142	-.090705	.010505
		5	.2974333*	.0153764	.000	.246828	.348038
	3	1	.0169000	.0153764	.803	-.033705	.067505
		2	-.0432000	.0153764	.105	-.093805	.007405
		4	-.0833000*	.0153764	.002	-.133905	-.032695
		5	.2542333*	.0153764	.000	.203628	.304838
	4	1	.1002000*	.0153764	.001	.049595	.150805
		2	.0401000	.0153764	.142	-.010505	.090705
		3	.0833000*	.0153764	.002	.032695	.133905
		5	.3375333*	.0153764	.000	.286928	.388138
	5	1	-.2373333*	.0153764	.000	-.287938	-.186728
		2	-.2974333*	.0153764	.000	-.348038	-.246828
		3	-.2542333*	.0153764	.000	-.304838	-.203628
		4	-.3375333*	.0153764	.000	-.388138	-.286928

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

LAMPIRAN 11
UJI STATISTIKA UNTUK HASIL AKTIVITAS RAC1

1. Data

Perlakuan	Pengulangan	Aktivasi Rac-1 (OD)
Starvasi tanpa EGF	1	0.484
	2	0.449
	3	0.414
Kontrol (-)	1	1.112
	2	0.765
	3	0.903
Afzelin 100	1	0.526
	2	0.666
	3	0.708
Afzelin 200	1	0.666
	2	0.776
	3	0.853
Afzelin 400	1	0.412
	2	0.483
	3	0.442
Afzelin 800	1	0.326
	2	0.39
	3	0.342

2. Homogenitas data

Test of Homogeneity of Variances

Rac1

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.323	5	12	.107

3. Normalitas data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		18
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.0000000
	Std. Deviation	.22022140
Most Extreme Differences	Absolute	.185
	Positive	.185
	Negative	-.105
Test Statistic		.185

	200	-.319333*	.076042	.012	-.57475	-.06391
	800	.093000	.076042	.818	-.16242	.34842
	K	-.481000*	.076042	.000	-.73642	-.22558
800	100	-.280667*	.076042	.029	-.53609	-.02525
	200	-.412333*	.076042	.002	-.66775	-.15691
	400	-.093000	.076042	.818	-.34842	.16242
	K	-.574000*	.076042	.000	-.82942	-.31858

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



**LAMPIRAN 12:
UJI STATISTIKA UNTUK MENGUJI HUBUNGAN ANTAR VARIABEL TERIKAT**

1. Hubungan apoptosis dan viabilitas sel

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.685 ^a	.470	.429	12.71708

a. Predictors: (Constant), ApopIndex

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1861.411	1	1861.411	11.510	.005 ^b
	Residual	2102.415	13	161.724		
	Total	3963.825	14			

a. Dependent Variable: Viabilitassel

b. Predictors: (Constant), ApopIndex

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	89.501	4.543		19.701	.000
	ApopIndex	-1.024	.302	-.685	-3.393	.005

a. Dependent Variable: Viabilitassel

2. Hubungan apoptosis dengan migrasi 24 jam berdasar jumlah sel

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.778 ^a	.606	.575	7.33672

a. Predictors: (Constant), migrasi_jumlah24

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1074.472	1	1074.472	19.961	.001 ^b
	Residual	699.758	13	53.828		
	Total	1774.230	14			

a. Dependent Variable: apoptosis

b. Predictors: (Constant), migrasi_jumlah24

- a. Dependent Variable: migrasi_area24
 b. Predictors: (Constant), FAK1

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-63.475	26.896		-2.360	.035
	FAK1	122.652	28.852	.763	4.251	.001

- a. Dependent Variable: migrasi_area24

7. Hubungan FAK1 dengan migrasi jam ke-24 berdasar jumlah sel

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.723 ^a	.523	.486	25.983595

- a. Predictors: (Constant), FAK1

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	9626.320	1	9626.320	14.258	.002 ^b
	Residual	8776.914	13	675.147		
	Total	18403.233	14			

- a. Dependent Variable: migrasi_jumlah24
 b. Predictors: (Constant), FAK1

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-61.897	49.958		-1.239	.237
	FAK1	202.361	53.592	.723	3.776	.002

- a. Dependent Variable: migrasi_jumlah24

8. Hubungan FAK Tyr397 dengan migrasi jam ke-24 berdasar area tertutup sel

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.541 ^a	.293	.239	18.183458

- a. Predictors: (Constant), FAK_tyr397

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1781.987	1	1781.987	5.390	.037 ^b
	Residual	4298.296	13	330.638		
	Total	6080.283	14			

- a. Dependent Variable: migrasi_area24
 b. Predictors: (Constant), FAK_tyr397

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-38.156	38.187		-.999	.336
	FAK_tyr397	91.645	39.476	.541	2.322	.037

a. Dependent Variable: migrasi_area24

9. Hubungan FAK Tyr397 dengan migrasi jam ke-24 berdasar jumlah sel

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.555 ^a	.308	.255	31.300393

a. Predictors: (Constant), FAK_tyr397

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	5666.944	1	5666.944	5.784	.032 ^b
	Residual	12736.289	13	979.715		
	Total	18403.233	14			

a. Dependent Variable: migrasi_jumlah24

b. Predictors: (Constant), FAK_tyr397

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-31.860	65.734		-.485	.636
	FAK_tyr397	163.430	67.953	.555	2.405	.032

a. Dependent Variable: migrasi_jumlah24

10. Hubungan FAK 1 dengan FAK Tyr397

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.944 ^a	.892	.884	.0419864

a. Predictors: (Constant), FAK1

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.189	1	.189	107.357	.000 ^b
	Residual	.023	13	.002		
	Total	.212	14			

a. Dependent Variable: FAK_tyr397

b. Predictors: (Constant), FAK1

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.131	.081		1.625	.128
	FAK1	.897	.087	.944	10.361	.000

a. Dependent Variable: FAK_tyr397

11. Hubungan antara Rac1 dengan apoptosis

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.647 ^a	.418	.374	.183520

a. Predictors: (Constant), apoptosis

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.315	1	.315	9.347	.009 ^b
	Residual	.438	13	.034		
	Total	.753	14			

a. Dependent Variable: Rac1

b. Predictors: (Constant), apoptosis

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.763	.066		11.641	.000
	apoptosis	-.013	.004	-.647	-3.057	.009

a. Dependent Variable: Rac1

12. Hubungan Rac1 dengan migrasi 24 jam berdasar jumlah sel

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.834 ^a	.695	.672	.132808

a. Predictors: (Constant), migrasi_jumlah24

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.523	1	.523	29.671	.000 ^b
	Residual	.229	13	.018		
	Total	.753	14			

a. Dependent Variable: Rac1

b. Predictors: (Constant), migrasi_jumlah24

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-.042	.127		-.331	.746
	migrasi_jumlah24	.005	.001	.834	5.447	.000

a. Dependent Variable: Rac1

13. Hubungan Rac1 dengan migrasi sel berdasar area

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.872 ^a	.761	.743	.117633

a. Predictors: (Constant), migrasi_area24

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.573	1	.573	41.390	.000 ^b
	Residual	.180	13	.014		
	Total	.753	14			

a. Dependent Variable: Rac1

b. Predictors: (Constant), migrasi_area24

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.141	.081		1.740	.105
	migrasi_area24	.010	.002	.872	6.433	.000

a. Dependent Variable: Rac1

14. Hubungan FAK1 dengan Rac1

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.604 ^a	.365	.316	.191786

a. Predictors: (Constant), FAK1

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.274	1	.274	7.462	.017 ^b
	Residual	.478	13	.037		
	Total	.753	14			

a. Dependent Variable: Rac1

b. Predictors: (Constant), FAK1

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-.373	.369		-1.013	.330
	FAK1	1.081	.396	.604	2.732	.017

a. Dependent Variable: Rac1

15. Hubungan FAK Tyr397 dengan Rac1

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.371 ^a	.138	.072	.223403

a. Predictors: (Constant), FAK_tyr397

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.104	1	.104	2.080	.173 ^b
	Residual	.649	13	.050		
	Total	.753	14			

a. Dependent Variable: Rac1

b. Predictors: (Constant), FAK_tyr396

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-.047	.469		-.100	.922
	FAK_tyr397	.699	.485	.371	1.442	.173

a. Dependent Variable: Rac1