

**PENGARUH KOMBINASI MENIRAN (*Phyllanthus  
Urinaria*) DAN KUNYIT (*Curcuma Longa*)  
TERHADAP EKSPRESI CEACAM1 PADA MENCIT  
(BALB/c) MODEL KANKER PAYUDARA**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



**Oleh:**

**Alya Hanifa Puspitoputri**

**185070107111033**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2018**



HALAMAN PERSETUJUAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH KOMBINASI MENIRAN (*Phyllanthus urinaria*) DAN KUNYIT  
(*Curcuma longa*) TERHADAP EKSPRESI CEACAM1 PADA MENCIT  
(BALB/c) MODEL KANKER PAYUDARA**



Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran

Oleh :

**Alya Hanifa Puspitoputri**

**NIM 185070107111033**

Menyetujui untuk diuji,

Pembimbing-I,

Pembimbing-II,

Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes

Dr. dr. Edi Mustamsir, SpOT(K)

NIP. 197511252005012001

NIP. 196412101990021002





HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PENGARUH KOMBINASI MENIRAN (*Phyllanthus urinaria*) DAN KUNYIT (*Curcuma longa*) TERHADAP EKSPRESI CEACAM1 PADA MENCIT (BALB/c) MODEL KANKER PAYUDARA

Oleh :

Alya Hanifa Puspitoputri  
NIM 185070107111033

Telah diuji pada

Hari : Jumat  
Tanggal : 21 Januari 2022  
Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

Dr. dr. Nia Kurnianingsih M. Biomed  
NIK. 2011068404072001

Pembimbing I/Penguji II

Pembimbing II/Penguji III

Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes  
NIP. 197511252005012001

Dr. dr. Edi Mustamsir, SpOT(K)  
NIP. 196412101990021002

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K)  
NIP. 196310221996012001

**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Alya Hanifa Puspitoputri

NIM : 185070107111033

Program Studi : Sarjana Kedokteran

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini adalah hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Bekasi, 15 Januari 2022

Yang membuat pernyataan,



Alya Hanifa Puspitoputri  
NIM: 185070107111033

## KATA PENGANTAR

Puji Syukur penulis panjatkan pada kehadiran Allah SWT, atas segala rahmat- Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas akhir dengan judul

“Pengaruh Kombinasi Meniran (*Phyllanthus Urinaria*) Dan Kunyit (*Curcuma Longa*)

Terhadap Ekspresi CEACAM1 Pada Mencit (BALB/C) Model Kanker Payudara”

untuk memperoleh gelar Sarjana S1 Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya.

Dalam penyusunan tugas akhir ini, tidak terlepas dari bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak, sehingga dalam kesempatan ini penulis menyampaikan terimakasih kepada berbagai pihak, diantaranya :

1. Dr. dr. Wisnu Barlianto, Sp.A, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. dr. Triwahju Astuto, M.Kes, Sp.P(K), selaku Ketua Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes selaku dosen pembimbing pertama, yang telah bersedia meluangkan waktunya dalam membimbing dan mengarahkan saya selama proses pengerjaan tugas akhir ini.
4. Dr. dr. Edi Mustamsir, Sp.OT (K) selaku dosen pembimbing kedua, yang telah bersedia meluangkan waktunya dalam membimbing dan mengarahkan saya selama proses pengerjaan tugas akhir ini.
5. Dr. dr. Nia Kurnianingsih M. Biomed selaku Tim Penguji Ujian Tugas Akhir yang telah memberikan ilmu, masukan, dan nasehat penulis untuk dapat menyempurnakan serta menyelesaikan Tugas Akhir ini.
6. Keluarga saya, yakni ayah saya, Ir. Puspito Budi Winarko; ibu saya, dr. Frida Hariyanti, Sp.PK; kakak-kakak saya Rusdy Hasan Puspitoputra

S.Kom dan Farid Abdurrahim Puspitoputra S.T; serta adik saya Ahsan

Karim Puspitoputra

7. Sahabat-sahabat saya Husnatul Aisyah, Maria Ulinuha, Shafanony

Khansa, Sawitri Aji Ardiyanti, Fauzan Hendrawan, Lintang Nataris, Kakak

Vio Tsamratul Zahrah yang senantiasa memberi motivasi saya, memberi kebahagiaan kepada saya, dan selalu mendukung saya dalam keadaan apapun.

8. Seluruh staff Laboratorium Struktur, Perkembangan dan Fisiologi Hewan,

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,

Universitas Brawijaya atas bantuan dan bimbingannya dalam keberhasilan

penelitian ini.

9. Serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah

mendukung dan membantu dalam menjalankan dan menyelesaikan

penelitian ini.

Penulis berharap penelitian ini dapat memberikan manfaat dalam perkembangan ilmu pengetahuan dalam bidang Kedokteran. Penulis memohon maaf atas segala kekhukarangan dan keterbatasan dalam penelitian ini serta membuka diri untuk menerima segala kritik dan saran yang membangun.

Bekasi, 15 Januari 2022,



Alya Hanifa Puspitoputri

NIM: 185070107111033

## Abstrak

Puspitoputri, Alya Hanifa. 2022. **PENGARUH KOMBINASI MENIRAN (*PHYLLANTHUS URINARIA*) DAN KUNYIT (*CURCUMA LONGA*) TERHADAP EKSPRESI CEACAM1 PADA MENCIT (BALB/C) MODEL KANKER PAYUDARA**. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes., (2) Dr. dr. Edi Mustamsir, Sp.OT (K).

Kanker payudara adalah penyebab terbesar kematian di Indonesia setelah kanker paru. Ekspresi salah satu molekul penanda kanker, CEACAM1, ditemukan pada jaringan bervaskularisasi tinggi yang bermanfaat untuk pertumbuhan kanker payudara. Saat ini terapi konvensional kanker payudara memiliki kekurangan dari segi efek samping yang ditimbulkan, masalah pembiayaan sampai timbulnya bukti resistensi pada terapi hormonal (cisplatin). Penelitian herbal telah lama diadakan guna mencari khasiatnya dalam pengobatan kanker. Senyawa aktif meniran (*Phyllanthus urinaria*) dan kunyit (*Curcuma longa*) diketahui memiliki efek antioksidan yang dapat berfungsi melawan kanker. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh kombinasi meniran (*Phyllanthus urinaria*) dan kunyit (*Curcuma longa*) terhadap ekspresi CEACAM1 pada mencit (BALB/c) model kanker payudara. Penelitian ini diawali dengan menginduksi kanker payudara pada mencit (BALB/c) dengan DMBA lalu dilanjutkan dengan pemberian kombinasi ekstrak meniran (*Phyllanthus urinaria*) dan kunyit (*Curcuma longa*) selama 14 hari dengan dosis 0.1 mg/grBB, 0.3 mg/grBB, 0.9 mg/grBB, 1.8 mg/grBB. Limpa diisolasi untuk analisis ekspresi CEACAM1 pada *flow cytometry* serta jaringan mammae untuk pengamatan histologi. Pada penelitian ini didapatkan histopatologi pada kelompok induksi DMBA menunjukkan infiltrasi sel stroma pada jaringan adiposa yang diidentifikasi sebagai metastasis. Setelah diberikan cisplatin maupun kombinasi herbal, histopatologi kembali membaik sama seperti kontrol negatif. Pada *flow cytometry* menunjukkan penurunan persentase ekspresi CEACAM1 pada kelompok kombinasi *P. urinaria* dan *C. longa* dibandingkan kelompok induksi DMBA dan penurunan secara signifikan terjadi pada dosis 0.3 mg/grBB dan dosis 0.9 mg/grBB.

Kata kunci: Kanker Payudara, 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA), Carcinoembryonic antigen-related adhesion molecule 1 (CEACAM1), *Phyllanthus urinaria*, *Curcuma longa*, Cisplatin.



## Abstract

Puspitoputri, Alya Hanifa. 2022. **THE EFFECT OF MENIRAN (PHYLLANTHUS URINARIA) AND TURMERIC (CURCUMA LONGA) COMBINATION ON CEACAM1 EXPRESSION IN MICE (BALB/C) BREAST CANCER MODEL.** Final Assignment, Medical Doctor Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisor: (1) Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes., (2) Dr. dr. Edi Mustamsir, Sp.OT (K).

Breast cancer is the most common cause of death after lung cancer in Indonesia. One of biomarker expression, CEACAM1, was found in highly vascularized tissue which is beneficial for breast cancer growth. Currently, conventional breast cancer therapy has limitation ranging from side effects, costs and evidence of resistance (cisplatin). Herbal research has been carried out for a long time to find its properties for cancer treatment. The active compounds of meniran (*Phyllanthus urinaria*) and turmeric (*Curcuma longa*) are known to have antioxidant effects that can function as anti-cancer. The purpose of this study was to determine the effect of the combination of meniran (*Phyllanthus urinaria*) and turmeric (*Curcuma longa*) on the expression of CEACAM1 in mice (BALB/c) breast cancer model. This study was initiated by inducing breast cancer in mice (BALB/c) with DMBA and then continued with the administration of a combination of meniran extract (*Phyllanthus urinaria*) and turmeric (*Curcuma longa*) for 14 days at dose of 0.1 mg/grBW, 0.3 mg/grBW, 0.9 mg/gBW, 1.8mg/gBW. The Spleen was isolated for analyzing CEACAM1 expression on flow cytometry and mammary tissue was isolated for histological observation. In this study, the histopathology of DMBA-induced group showed infiltration of stromal cell on adipose tissue that identified as metastatic. After being given treatment with cisplatin or combination of herbs, adipose tissue improved to be similar to the negative control. The results of flow cytometry showed that there was a decrease in the percentage of CEACAM1 expression over the combination of *P. urinaria* and *C. longa* group compared to the DMBA-induced group and a significant decrease of the percentage shown at 0.3 mg/grBW dose and 0.9 mg/grBW dose

Key words: Breast Cancer, 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA), Carcinoembryonic antigen-related adhesion molecule 1 (CEACAM1), *Phyllanthus urinaria*, *Curcuma longa*, Cisplatin.





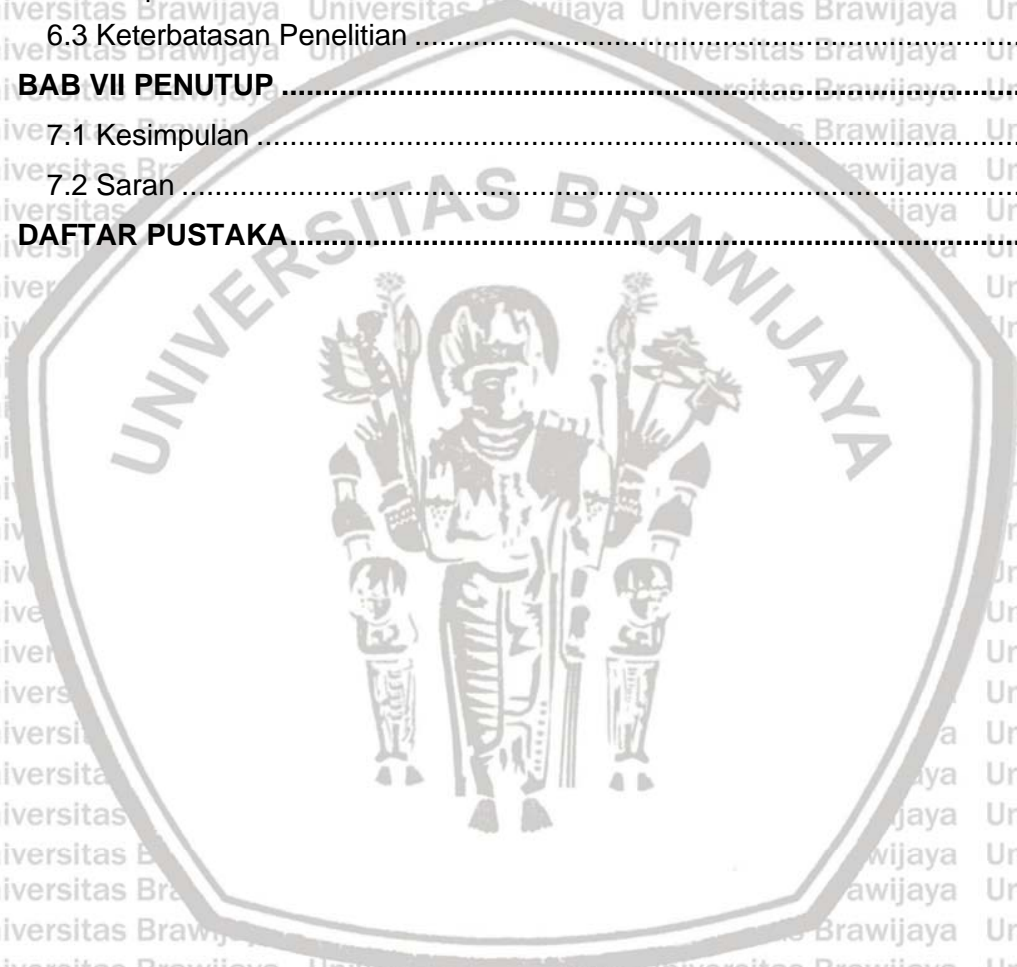
DAFTAR ISI

<b>JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>v</b>
<b>Abstrak</b> .....	<b>vii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	<b>xv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
1.4.1 Manfaat Akademis .....	4
1.4.2 Manfaat Praktis .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Kanker Payudara .....	5
2.1.1 Etiologi .....	5
2.1.2 Epidemiologi .....	5
2.1.3 Patofisiologi .....	6
2.2 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) .....	7
2.3 Terapi Kanker .....	9
2.3.1 Cisplatin .....	9
2.4 Herbal .....	10
2.4.1 Meniran .....	11
2.4.2 Kunyit .....	13
2.5 Respon Imun Terhadap Kanker .....	14
2.6 <i>Carcinoembryonic antigen-related adhesion molecule 1 (CEACAM1)</i> .....	16



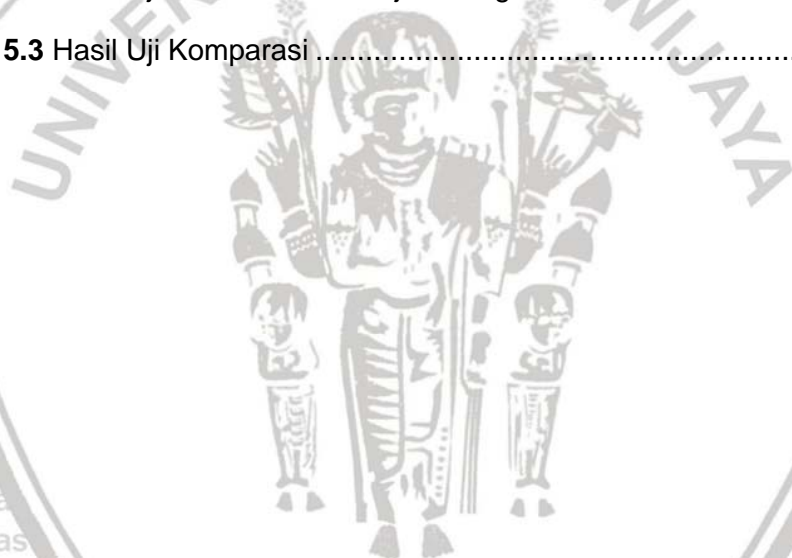
2.7 Mencit BALB/c.....	17
<b>BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....</b>	<b>19</b>
3.1 Kerangka Konsep.....	19
Gambar 3.1 Kerangka Konsep.....	19
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep Penelitian.....	19
3.3 Hipotesa Penelitian.....	20
3.3.1 H0 (Hipotesis Nol).....	20
3.3.2 H1 (Hipotesis Alternatif).....	20
<b>BAB IV METODE PENELITIAN.....</b>	<b>21</b>
4.1 Rancangan Penelitian.....	21
4.2 Populasi dan Sampel/Subjek Penelitian.....	21
4.2.1 Populasi Penelitian.....	21
4.2.2 Sampel Penelitian.....	21
4.3 Variabel Penelitian.....	23
4.3.1 Variabel tergantung.....	23
4.3.2 Variabel bebas.....	23
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	23
4.5 Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian.....	23
4.5.1 Bahan.....	23
4.5.2 Alat.....	24
4.6 Definisi Istilah/ Operasional.....	25
4.7 Prosedur Penelitian.....	27
4.7.1 Induksi Kanker Payudara.....	28
4.7.2 Terapi.....	29
4.7.3 Pengukuran Parameter.....	30
4.8 Analisis Data / Pengolahan Data.....	33
4.9 Jadwal Kegiatan.....	34
4.10 Alur penelitian.....	36
<b>BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....</b>	<b>37</b>
5.1 Hasil Penelitian.....	37
5.1.1 Gambaran Histopatologi Jaringan Mammae.....	37
5.1.2 Hasil Flow Cytometry.....	39
5.2 Analisis Data.....	41
5.2.1 Hasil Uji Normalitas dan Uji Homogenitas.....	41

5.2.2 Hasil Uji Komparasi.....	41
5.2.3 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey</i> .....	42
<b>BAB VI PEMBAHASAN.....</b>	<b>43</b>
6.1 Gambaran Histopatologi Jaringan Mammae .....	43
6.2 Ekspresi CEACAM1 .....	45
6.3 Keterbatasan Penelitian .....	49
<b>BAB VII PENUTUP .....</b>	<b>50</b>
7.1 Kesimpulan .....	50
7.2 Saran .....	50
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>51</b>



DAFTAR TABEL

<b>Tabel 4.1</b> Definisi Operasional.....	25
<b>Tabel 4.2</b> Perlakuan kelompok.....	29
<b>Tabel 4.3</b> Jadwal Kegiatan Oktober.....	34
<b>Tabel 4.4</b> Jadwal Kegiatan November.....	34
<b>Tabel 4.5</b> Jadwal Kegiatan Desember.....	35
<b>Tabel 5.1</b> Rerata presentase ekspresi CEACAM1.....	40
<b>Tabel 5.2</b> Hasil Uji Normalitas dan Uji Homogenitas.....	41
<b>Tabel 5.3</b> Hasil Uji Komparasi.....	42



DAFTAR GAMBAR

**Gambar 2.1** Struktur DMBA.....7

**Gambar 2.2** Struktur Cisplatin.....10

**Gambar 2.3** Meniran (*Phyllanthus urinaria*).....11

**Gambar 2.4** Struktur morfologi rimpang.....13

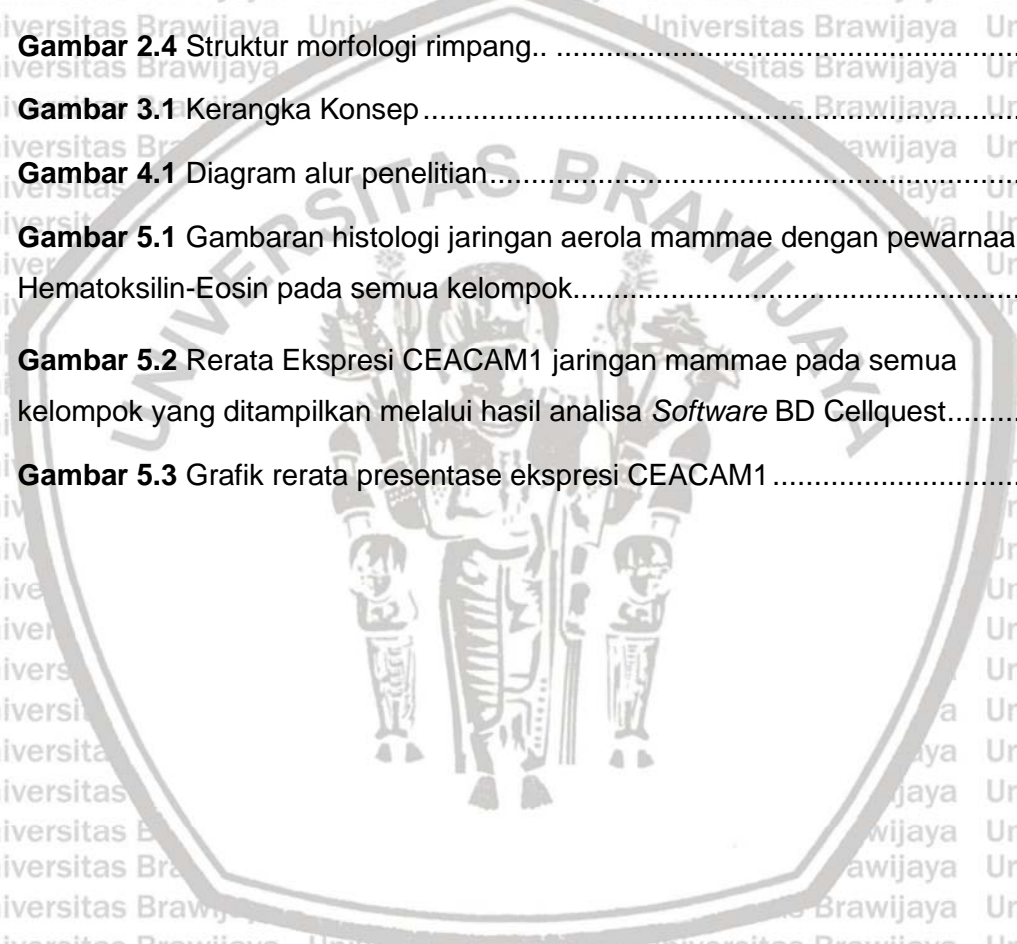
**Gambar 3.1** Kerangka Konsep.....19

**Gambar 4.1** Diagram alur penelitian.....36

**Gambar 5.1** Gambaran histologi jaringan aerola mammae dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin pada semua kelompok.....38

**Gambar 5.2** Rerata Ekspresi CEACAM1 jaringan mammae pada semua kelompok yang ditampilkan melalui hasil analisa *Software* BD Cellquest.....39

**Gambar 5.3** Grafik rerata presentase ekspresi CEACAM1.....40



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi penelitian..... 56

Lampiran 2. Bukti kelayakan etik penelitian..... 58

Lampiran 3. Hasil statistik..... 59



**DAFTAR SINGKATAN**

- CEACAM1 : *Carcinoembryonic antigen-related adhesion molecule-1*
- DMBA : 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene
- BRCA : *Breast cancer associated gene*
- DCIS : *Ductal Carcinoma In Situ*
- LCIS : *Lobular Carcinoma In Situ*
- ER : *Reseptor Estrogen*
- PAH : *Hidrokarbon Aromatik Polisiklik*
- HPG : *Hypothalamo-Pituitary-Gonadal*
- HPA : *Hypothalamo-Pituitary-Adrenal*
- CDK : *Cyclin Dependent Kinase*
- PARP-1 : *Poly (ADP-ribose) polymerase*
- ESR1 : *Estrogen Receptor 1*
- PPAR- $\gamma$  : *Peroxisome proliferator-associated receptor gamma*
- AP-1 $\alpha$  : *Activator Protein 1*
- TNF- $\alpha$  : *Tumor necrosis factor alpha*
- MALT : *Mucosal Associated Lymphoid Tissues*
- MHC : *Major Hystocompatibility Complex*
- CTL : *Cytotoxic T Lymphocyte*
- CD : *Cluster of differentiation*
- APC : *Antigen Presenting Cell*
- ROS : *Reactive Oxygen Spesies*
- PBS : *Phospate-buffered saline*
- FITC : *Fluorescein isothiocyanate*



- HE : Hematoksilin Eosin
- 6DPPX : Distyrene-Tricresyl phosphate-Xylene)
- IL : *Inter-Leukin*
- IFN- $\gamma$  : Interferon Gamma
- ITIMs : *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*
- HO-1 : *Heme oxygenase-1*
- AhR : *Aryl hydrocarbon receptor*
- 7- HMBA : *7-hydroxymethyl-12-methylbezantracene*
- 12-HMBA : *12-hydroxymethyl-7-metilbezantracene*
- HSP90 : *heat-shock protein 90*
- ARNT : *Aryhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*





## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kanker adalah kondisi dimana sel tubuh mengalami pertumbuhan abnormal. Abnormalitas pertumbuhan sel dapat terjadi karena mutasi protein yang mengatur keseimbangan siklus sel. Salah satu gen yang bermutasi pada kanker payudara adalah *BRCA1* yang mengkode protein *Breast cancer type 1 susceptibility protein* (Metcalf et al., 2018). Gen *BRCA1* bersifat supresi pada sel tumor, salah satu mekanismenya adalah menghambat *signalling* dari reseptor estrogen (ER). ER berinteraksi dengan *cyclin D1* untuk koordinasi transisi siklus sel dari fase G1 ke fase S, sehingga ketika terjadi mutasi *BRCA1* menyebabkan pertumbuhan sel yang tidak terkendali (Feng et al., 2018).

Berdasarkan data *International Agency for Research of Cancer* tahun 2018, pada skala global, insiden kanker payudara berjumlah sama dengan kanker paru, yakni sebesar 11.6% dari total kasus 18.078.957 (GLOBOCAN - World Health Organization (WHO), 2018). Di Indonesia, kanker payudara menjadi penyebab kematian terbanyak nomor 2 (11%) setelah kanker paru (12.6%) (WHO, 2018).

Salah satu marker kanker payudara, yakni *Carcinoembryonic antigen-related adhesion molecule 1* (CEACAM1) adalah glikoprotein transmembran tipe-1 yang termasuk kedalam keluarga antigen karsinoembrionik. CEACAM1 dapat dijadikan faktor prognosis kanker karena presentase ekspresinya yang tercatat pada banyak varietas malignansi (Calinescu et al., 2018). Protein CEACAM1 ditemukan dalam cairan tubuh atau berikatan dengan membran sel imun dan merupakan agen immunomodulator yang berfungsi untuk

memperkuat reaksi sel imun. (Yang *et al.*, 2015). Untuk kepentingan penelitian eksperimental antikanker, senyawa kimia 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) diproduksi secara sintesis. Senyawa DMBA termasuk kedalam kelompok hidrokarbon aromatik polisiklik (PAH). Senyawa DMBA dapat menyebabkan mutasi titik serta mutasi substitusi pada sel yang terinduksi sehingga terjadi progresivitas kanker (National Center for Biotechnology Information, 2020).

Menurut Paduan Penatalaksanaan Kanker Payudara, Komite Penanggulangan Kanker Nasional, tatalaksana kanker payudara terdiri dari pembedahan, terapi sistemik, terapi hormonal, terapi target dan radioterapi (Kemenkes, 2015). Efek samping yang dapat terjadi bervariasi karena efek sitostatika pada sel hidup pasien (Nindya and Surarsi, 2016). Saat ini terapi hormonal kanker payudara menunjukkan resistensi akibat mutasi pada gen yang mengkode reseptor estrogen, resistensi tersebut dikenali dengan banyak pasien yang mengalami kekambuhan (Szostakowska *et al.*, 2019). Sehingga dibutuhkan strategi pengobatan baru untuk menunjang keberhasilan terapi kanker payudara.

Pada beberapa tahun ini, penelitian tentang herbal telah menunjukkan banyak kemajuan akan efek terapeutik senyawa alaminya terhadap banyak penyakit, termasuk tumor (Tao, Zhang and Zhang, 2019). Meniran (*Phyllanthus urinaria*) yang sudah terkenal di wilayah asia, memiliki bioaktivitas pada kanker (Puspita and Alhebshi, 2019). Senyawa polifenol pada meniran memiliki peran mencegah progresivitas kanker melalui kemampuannya untuk menginduksi apoptosis sel kanker. Sama seperti meniran, kunyit (*Curcuma*

*longa*) juga memiliki kemampuan induksi apoptosis dan supresi pada proliferasi sel kanker (Tomeh *et al.*, 2019).

Dengan mengkombinasikan herbal dapat meningkatkan efek terapeutik yang diinginkan, hal ini dikarenakan dua bahan aktif yang terkandung dapat bekerja dengan berikatan dalam satu tempat yang sama atau saling menguatkan efek dengan berikatan di tempat yang berbeda (Hu *et al.*, 2016).

Pada penelitian yang lalu, kombinasi antara meniran dan kunyit meningkatkan aktivitas hepatotektif yang optimal dalam mencegah multifokal nekrosis disekitar pembuluh darah (Mada *et al.*, 2014).

Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efektivitas terapi kombinasi herbal kunyit dan meniran pada kanker payudara, sehingga herbal tersebut dapat dipertimbangkan sebagai kombinasi pengobatan bagi penderita kanker payudara.

## 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh Meniran (*Phyllanthus urinaria*) dan kunyit (*Curcuma longa*) terhadap ekspresi CEACAM1 pada mencit (BALB/c) model kanker payudara?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui pengaruh Meniran (*Phyllanthus urinaria*) dan kunyit (*Curcuma longa*) terhadap ekspresi CEACAM1 pada mencit (BALB/c) model kanker payudara.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Akademis

Mengembangkan pola berpikir kritis bagi peneliti serta menyumbang karya bagi ilmu pengetahuan yang dapat dikembangkan untuk penelitian selanjutnya.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

Kombinasi Meniran (*Phyllanthus urinaria*) dan kunyit (*Curcuma longa*) mempengaruhi ekspresi *CEACAM1* pada mencit (BALB/c) model kanker payudara sehingga dapat menjadi terapi tambahan guna meningkatkan keberhasilan terapi yang sudah ada.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Kanker Payudara

##### 2.1.1 Etiologi

Penyebab kanker payudara sangat berkaitan pada tingkat gen. Mekanisme genetik yang terjadi adalah mutasi gen yang diturunkan dari riwayat keluarga. Gen yang paling sering bermutasi pada kanker payudara adalah *BRCA1* dan *BRCA2*. (Feng *et al.*, 2018). *Breast cancer associated gene 1* dan *2 (BRCA1 dan BRCA2)* memiliki fungsi sebagai regulator pada siklus sel, sehingga defisiensi pada gen ini menyebabkan disregulasi tahap pengecekan dalam siklus sel, duplikasi sentrosom yang abnormal serta instabilitas genetik dan apoptosis yang berkelanjutan (Sun *et al.*, 2017).

##### 2.1.2 Epidemiologi

Menurut data dari *International Agency for Research of Cancer* tahun 2018 jumlah kasus kanker payudara sama besarnya dengan jumlah kasus kanker paru-paru yakni sebesar 11.6% dari total kasus 18.078.957 di seluruh dunia (GLOBOCAN - World Health Organization (WHO), 2018). Di Indonesia, kanker payudara merupakan kasus kanker terbanyak pada wanita nomor 1 (30.9%) dan menjadi penyebab kematian terbanyak nomor 2 (11%) setelah kanker paru (12.6%) ((WHO), 2018). Dari rekapitulasi deteksi dini kanker serviks (IVA) menunjukkan hasil positif tumor payudara tertinggi di Indonesia berada pada Jawa Barat dan DKI Jakarta (Kemenkes, 2020). Jenis kanker payudara yang paling terjadi adalah tipe invasif (81%) yang berarti sel kanker telah keluar dari area kelenjar dan menyebar ke sekitar jaringan mammae.

Sedangkan untuk jenis *in situ*, kasus yang sering terjadi adalah subtype *Ductal*

*Carcinoma In Situ* (DCIS) (16%) dibanding subtype *Lobular Carcinoma In Situ* (LCIS). DCIS disebut sebagai prekursor dari jenis invasif, sedangkan LCIS sering disebut sebagai jenis yang lebih jinak (Chopra dan Davies, 2020).

### 2.1.3 Patofisiologi

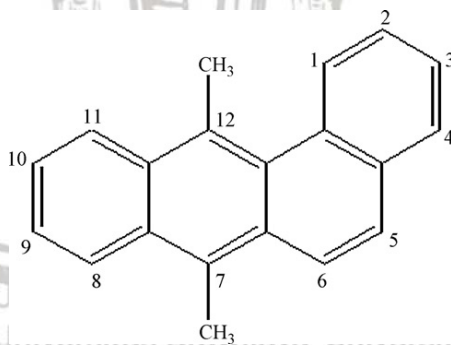
Kanker adalah sebuah kondisi dimana sel mengalami pertumbuhan yang tidak terkendali dengan mempunyai potensi menjadi ganas melalui beberapa karakteristik (Um, 2015). Terdapat tujuh tanda dari kanker diantaranya adalah pertumbuhan selektif dan kemampuan poliferasi, perubahan respon terhadap stress yang memfasilitasi kemampuan survival, vaskularisasi, invasi dan metastasis, metabolisme, lingkungan mikro yang mendukung serta modulasi imun (Fouad and Aanei, 2017).

Beberapa hal yang bisa mejadi faktor resiko dari kanker payudara adalah konsumsi alkohol, aktifitas fisik, obesitas dan riwayat terapi radiasi. Gen yang paling sering bermutasi pada kanker payudara adalah *BRCA1* dan *BRCA2*. Dari 75% kasus kanker payudara, mekanisme mutasi *BRCA1* dan *BRCA2* yang paling sering terjadi disebabkan paparan hormonal, yakni aktivitas reseptor estrogen (ER). ER disebutkan memiliki interaksi dengan cyclin D1 yang berfungsi untuk mengkoordinasikan transisi siklus hidup sel dari fase G1 ke fase S. Interaksi antara ER dan cyclin D1 pada akhirnya akan menyebabkan pertumbuhan sel kanker pada jaringan mammae (Feng *et al.*, 2018). Mutasi tersebut menyebabkan terjadinya hiperpoliferasi pada sel duktus, kemudian duktus berkembang menjadi tumor yang bisa menjadi jinak atau dapat bermetastasis. Metastasis dapat terjadi setelah stimulasi oleh berbagai macam faktor karsinogenik antara lain lingkungan mikro di sekitar tumor. Sel stroma atau makrofag memiliki peran penting pada inisiasi dan

progresifitas kanker payudara. Makrofag memiliki kemampuan mutagenik yakni menginduksi angiogenesis berkelanjutan dan dapat membuat sel menghindari imunitas tubuh (Sun *et al.*, 2017).

### 2.2.7.12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)

7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) (gambar 2.1) adalah senyawa kimia yang termasuk kedalam kelompok hidrokarbon aromatik polisiklik (PAH). DMBA merupakan senyawa yang diproduksi secara sintesis dan tidak terdapat di alam secara bebas. Senyawa DMBA diproduksi untuk kepentingan penelitian eksperimental antikanker. Senyawa DMBA berwujud piringan padat berwarna kuning pucat, tidak berbau dan bersifat tidak larut dalam air (National Center for Biotechnology Information, 2020). Sifat DMBA merupakan molekul lipofilik sehingga membuatnya sangat mudah untuk berkonsentrasi pada lapisan epitel (Kerdelhué *et al.*, 2016).



Gambar 2.1 Struktur DMBA (Yardim *et al.*, 2010).

Mekanisme DMBA dalam menginduksi kanker payudara pada penelitian sebelumnya menjelaskan adanya proses mutasi substitusi dan aktivasi keluarga genetik ras sehingga terdapat gangguan keseimbangan tingkat seluler oksidan-antioksidan yang memiliki peran dalam perkembangan dan progresifitas kanker payudara (National Center for Biotechnology

Information, 2020). Selain itu, DMBA diketahui dapat menginduksi adenokarsinoma melalui gangguan pada mekanisme hormonal, diantaranya disrupsi axis Hypothalamo-Pituitary-Gonadal (HPG), axis Hypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) dan sekresi melatonin selama periode laten (2 bulan) yang meningkatkan kejadian tumor mammae (Kerdelhué *et al.*, 2016). Berdasarkan banyak penelitian yang sudah ada, 1 mg/kg dosis DMBA selama 6 minggu secara intraperitoneal pada mencit BALB/c sudah dapat menginduksi formasi tumor kanker payudara (Khazaei *et al.*, 2018).

Administrasi DMBA akan mengaktifasi *Aryl hydrocarbon receptor* (AhR), sebuah faktor transkripsi yang berperan pada perkembangan dan pengaturan respon hipoksia pada sel normal. Setelah teraktivasi, faktor transkripsi AhR memicu terinduksinya enzim-enzim metabolit seperti sitokrom P450 yang berperan untuk pengonversian senyawa DMBA menjadi senyawa mutagenik. Pada jaringan payudara, senyawa DMBA mutagenik yang dapat ditemukan adalah *7-hydroxymethyl-12-methylbezantracene* (7- HMBA) dan *12-hydroxymethyl-7-metilbezantracene* (12-HMBA), yang selanjutnya dapat menyebabkan aduksi pada untai DNA. Proses masuknya faktor transkripsi AhR menuju nukleus sel diketahui melalui pengikatan dengan *heat-shock protein 90* (HSP90) di ekstraseluler, setelah itu AhR dapat menyebabkan dimerisasi kofaktor *Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* (ARNT) yang berfungsi sebagai regulator pada urutan untai DNA. Pada nukleus, 7-HMBA dan 12-HMBA akan menginduksi ekspresi gen yang mengkode faktor pertumbuhan serta proto-onkogen lainnya yang menimbulkan ketidakseimbangan siklus sel sehingga timbul proses pertumbuhan tumor. (de Oliveira *et al.*, 2015)



## 2.3 Terapi Kanker

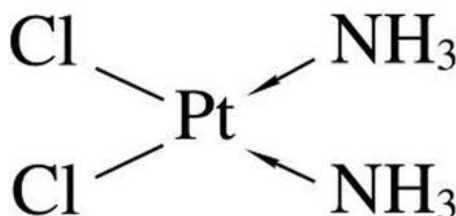
Menurut Paduan Penatalaksanaan Kanker Payudara, Komite Penanggulangan Kanker Nasional, tatalaksana kanker payudara terdiri dari pembedahan, terapi sistemik, terapi hormonal, terapi pada sel target dan radioterapi (Kemenkes, 2015). Terapi pembedahan adalah terapi yang paling dikenal untuk pengobatan kanker payudara, hal ini dikarenakan pembedahan dapat mengontrol penyakit secara lokal sehingga diharapkan tidak terjadi metastasis. Sementara itu terapi sistemik, hormonal, terapi pada sel target dan radioterapi lebih sering digunakan ketika ada resiko relaps metastasis (Sun *et al.*, 2017).

Keseluruhan terapi yang diberikan dapat memberi efek samping yang signifikan. Efek samping tersebut antara lain deteriorasi fungsi tubuh, aktivitas seksual, *body image*, dinamika keluarga, pekerjaan, yang menghasilkan distress psikologi. Pada pasien post mastektomi didapatkan efek body esteem yang merendah (Di *et al.*, 2016). Pada pasien yang menjalani kemoterapi efek samping yang paling sering adalah mual dan muntah. Saat ini terapi hormonal standar dengan jalur inhibisi protein CDK4/6 melalui pengikatan pada reseptor estrogen monomer telah menunjukkan beberapa kasus resistensi, hal ini dibuktikan dengan adanya mutasi pada gen *ESR1* Y537S.

### 2.3.1 Cisplatin

Salah satu terapi sistemik yang digunakan saat ini adalah cisplatin. Cisplatin (gambar 2.2) adalah senyawa berstruktur diamminedichloroplatinum yang artinya dua ligan amine dan dua ligan kloro terkonfigurasi secara cis datar pada ion platinum dibagian tengah. Cisplatin secara luas digunakan untuk terapi malignansi seperti pada tumor otak anak, kanker gaster, leukimia,

kanker anal. Pada kanker payudara, cisplatin sangat bermanfaat untuk meningkatkan rentang hidup pasien (Ghosh, 2019).



**Gambar 2.2** Struktur Cisplatin (Dai *et al.*, 2017).

Cisplatin menghentikan pertumbuhan tumor dengan *cross-linking* pada DNA untai ganda spiral guanin menyebabkan DNA tidak bisa melepaskan gulungan dan berpisah sehingga berefek langsung pada replikasi DNA. Hal ini menyebabkan siklus pertumbuhan sel kanker terganggu dan mengalami kematian. Mekanismenya lainnya adalah menginduksi apoptosis sel kanker melalui aktivasi transduksi sinyal (Dai *et al.*, 2017). Disamping efek positifnya terhadap penghambatan sel kanker, cisplatin memiliki banyak efek samping yang terlihat. Efek samping termasuk mual, muntah, pengurangan sel darah dan produksi platelet pada sumsum tulang dan immunosupresif. Efek lainnya adalah kerusakan ginjal, saraf serta fungsi pendengaran (Aldossary, 2019).

#### 2.4 Herbal

Tumbuhan dan bahan aktif menjadi kontributor besar agen alami sudah banyak digunakan sebagai pencegahan kanker pada pengobatan herbal cina, penelitian tentang kemampuan anti-poliferasi dan efek sitotoksik dikembangkan untuk menjadi dasar herbal sebagai terapi komplementer atau alternatif pada kanker (Jiao *et al.*, 2018). Sinergisme adalah kondisi dimana efek dari dua obat yang diberikan secara bersamaan (kombinasi) lebih besar

dibanding pada saat kedua obat tersebut diberikan secara terpisah. Pada pengobatan kanker, kombinasi dari antikanker meningkatkan kemampuan sitotoksik dan mencegah berkembangnya klon sel kanker yang bersifat resisten pada terapi. Beberapa manfaat dari kombinasi senyawa aktif herbal pada kanker sudah banyak di temukan. Studi *in vivo* dan *in vitro* menunjukkan bahwa kombinasi dari kurkumin dan resveratrol dapat meningkatkan apoptosis pada sel karsinoma, termasuk meningkatkan regulasi pemotongan PARP-1 dan Bax/Bcl2 serta menurunkan regulasi fosforilasi ERK1 dan ERK2, sehingga mekanisme tersebut lebih meningkatkan efek dibanding memberikan kurkumin saja (Hu *et al.* , 2016).

#### 2.4.1 Meniran



**Gambar 2.3** Meniran (*Phyllanthus urinaria*) (Le *et al.* , 2015)

Meniran (*Phyllanthus urinaria*) tumbuh di area lembab dan berbatu, seperti di sekitar saluran air, semak-semak dan tanah rerumputan. Meniran memiliki batang bulat, tulang daunnya menyirip genap, dan pada satu tangkai memiliki daun majemuk berukuran kecil dan lonjong, tinggi tanaman bisa mencapai satu meter lebih dalam kondisi tanah subur (Yuniar, 2020). Meniran memiliki rasa agak pahit dan manis. Meniran sudah terkenal sebagai bahan obat tradisional di wilayah asia dan sampai saat ini sudah terbukti memiliki khasiat pada

hepatitis, anti-inflamasi, demam (antipiretik), melancarkan kencing (diuretik)

(Higea, 2015). Menurut Schoch *et al* (2020) taksonomi dari meniran adalah sebagai berikut

Kingdom : Plantae

Fillum : Tracheophyta

Kelas : Magnoliopsida

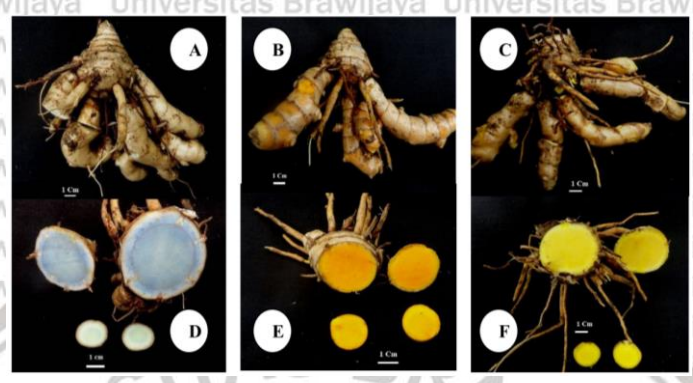
Ordo : Euphorbiales

Genus : *Phyllanthus*

Spesies : *Phyllanthus urinaria* L

Melalui analisa fluoresensi diketahui bahwa herba meniran mengandung senyawa alkaloid, flavonoin, saponin, steroid, tannin, dan fenolik yang berfungsi sebagai antioksidan (Higea, 2015). Salah satu senyawa pada meniran yakni lignan memiliki kemampuan induksi apoptosis melalui inhibisi aktivitas telomerase dan aktivitas c-myc serta kaspase 3. Aktivitas antikanker meniran sudah banyak ditemukan di banyak penelitian. Ekstrak metanol dan aqueous dari meniran menghambat metastasis sel karsinoma payudara melalui jalur kinase terkait sinyal ekstraseluler dan hipoksia. Ekstrak lain disebutkan memiliki efek apoposis pada sel kanker hepatoma, leukimia dan fibrosarkoma (Geethangili and Ding, 2018).

### 2.4.2 Kunyit



**Gambar 2.4** Struktur morfologi rimpang. (A, D) *Curcuma aeruginosa*, (B, E) *C. longa*, dan (C, F) *C. heyneana* (Le *et al.* , 2015).

Kunyit (*Curcuma longa*) merupakan tanaman golongan temu-temuan yang banyak dimanfaatkan sebagai bumbu masakan maupun pewarna makanan. Rimpang tanaman kunyit merupakan bagian yang sering digunakan dalam pengobatan tradisional di masyarakat. Kunyit memiliki morfologi rimpang utama dan rimpang samping (menyimpang), perbedaan rimpang pada setiap jenis terletak pada warna daging rimpang, dimana *Curcuma longa* memiliki rimpang berwarna kuning tua. *Curcuma longa* memiliki warna kulit kuning muda dan berdiameter rimpang utama paling kecil dibanding *C.*

*aeruginosa*, *C. heyneana*. Menurut Schoch *et al* (2020) taksonomi dari *Curcuma longa* (Schoch *et al.* , 2020) adalah sebagai berikut,

- Kingdom : Plantae
- Divisi : Magnoliosida
- Kelas : Liliopsida
- Ordo : Zingiberales
- Famili : Zingiberaceae
- Genus : *Curcuma*
- Spesies : *Curcuma longa* L.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa seluruh ekstrak bagian tanaman kunyit memiliki aktivitas antioksidan seperti karotenoid dan flavonoid (Septiana dan Simanjuntak, 2015). Senyawa kurkumin pada kunyit memiliki interaksi baik secara intraseluler dan ekstraseluler pada sel kanker sehingga menghambat progresifitas kanker. Kurkumin menghambat ekspresi *Activator Protein* (AP-1) yang sangat memiliki peran terhadap stimulasi mutasi, pro-angiogenesis, sinyal anti-apoptosis. Meningkatkan ekspresi *Peroxisome proliferator-associated receptor gamma* (PPAR- $\gamma$ ) yang berfungsi sebagai protein supresor pada sel kanker. Kurkumin juga menghambat sitokin proinflamasi yakni *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan serta inisiasi pada sel tumor (Qadir, Naqvi and Muhammad, 2016). Diketahui bahwa kunyit memiliki kemampuan induksi apoptosis dan supresi pada proliferasi sel kanker melalui berbagai macam jalur sinyal sel (Tomeh, *et al.*, 2019)

## 2.5 Respon Imun Terhadap Kanker

Respon imun tubuh terbagi menjadi dua yakni imunitas bawaan dan imunitas adaptif. Imunitas bawaan adalah pertahanan lini pertama untuk mengeliminasi mikroba terdiri dari molekul-molekul yang selalu ada pada jaringan. Sedangkan imunitas adaptif lebih banyak dimediasi oleh limfosit yang mengalami ekspansi klonal sehingga dapat bereaksi secara spesifik pada antigen yang berbeda. Imunitas adaptif terdiri dari imunitas humoral dan imunitas seluler. Imunitas seluler diperankan oleh limfosit T yang berfungsi untuk mengeradikasi mikroba intraseluler. Imunitas humoral yang diperankan oleh limfosit B mengeluarkan antibodi untuk mengeradikasi mikroba ekstraseluler dan toksin. Sel imun baik limfosit T dan limfosit B mengalami

maturasi pada organ limfoid primer yakni sumsum tulang dan timus, sementara inisiasi dari respon imun adaptif terjadi pada organ limfoid sekunder yakni limfonodus, limpa dan *mucosal associated lymphoid tissues* (MALT) (Abbas, *et al*, 2017).

CD (*Cluster of differentiation*) adalah sebuah protein pada permukaan sel yang berfungsi sebagai penunjang interaksi antar molekul atau sel. Pada limfosit T yang memiliki CD4+ maka disebut sebagai *Helper T-Lymphocyte* yang berikatan spesifik dengan MHC (*Major Hystocompatibility Complex*) kelas 1 sementara limfosit T yang memiliki CD8+ disebut sebagai CTL (*Cytotoxic T Lymphocyte*) dan berikatan spesifik pada MHC kelas 2. Baik CD4+ dan CD8+ memiliki fungsi untuk mengeradikasi antigen, CD4+ mengeradikasi melalui aktivasi makrofag sehingga membunuh mikroba yang sudah terfagosit di dalamnya, sedangkan CD8+ mengeradikasi dengan langsung membunuh sel yang mengekspresikan antigen tersebut (Abbas, *et al*, 2017).

Respon imun terhadap sel kanker banyak diperantarai oleh imunitas adaptif seluler. Antigen pada sel kanker dapat berupa protein seluler pada sel normal namun terekspresi secara abnormal pada sel kanker sehingga menimbulkan reaksi imun. Mekanisme imunitas yang terjadi dimulai dari adanya antigen sel kanker yang mengalir melalui pembuluh darah dan memasuki limpa untuk dikenali oleh CD8+. Setelah itu CD8+ mengalami diferensiasi yang ditingkatkan oleh ko-stimulator APC atau sinyal sekunder yang berasal dari CD4+ dan pada hasil akhir menjadi sel T spesifik tumor yang dapat langsung berikatan dengan sel kanker. Setelah bisa berikatan dengan sel kanker, maka CD8+ akan teraktivasi dan mengeluarkan granul yakni *granzyme* dan *perforin* yang dapat menimbulkan apoptosis pada sel kanker.

Pada hewan coba yang induksi oleh senyawa karsinogenik dapat menimbulkan reaksi imun yang kuat sehingga banyak penelitian yang menjadikan sel imun sebagai parameter untuk mengukur berbagai macam hasil (Abbas, *et al*, 2017).

## 2.6 *Carcinoembryonic antigen-related adhesion molecule 1 (CEACAM1)*

Pada pembahasan sebelumnya dijelaskan bahwa antigen pada sel kanker dapat berupa protein seluler pada sel normal namun terekspresi secara abnormal sehingga menimbulkan reaksi imun. Salah satu antigen yang berekspresi pada sel kanker adalah CEA (*Carcinoembryonic antigen*) atau CD66. Pada tubuh manusia, keluarga antigen karsinoembrionik ini terdiri dari 29 gen dan terbagi menjadi dua subgrup yakni molekul yang berfungsi sebagai adhesi pada sel (CEACAM) dan glikoprotein spesifik masa kehamilan. *Carcinoembryonic antigen-related adhesion molecule 1* (CEACAM1) adalah glikoprotein transmembran tipe-1 yang termasuk ke dalam keluarga antigen karsinoembrionik dan ditemukan sebagai bentuk larut didalam cairan tubuh atau terikat dengan membran permukaan sel (Yang *et al*., 2015). Ekspresi dari CEACAM1 pada fase perkembangan embrio ditemukan pada sel tropoblast, plasenta dan leukosit infiltrat. CEACAM1 juga terekspresi pada sel baik sebagai ekspresi pokok (sel epitel) dan regulasi (sel endotel dan limfosit). Protein CEACAM1 memiliki peran pada morfogenesis, apoptosis, angiogenesis, proliferasi, motilitas sel dan fibrosis (Kim *et al*., 2019).

Penelitian imunohistokimia pada 62 jaringan reseksi pasien kanker payudara ditemukan ekspresi CEACAM1 pada 49 jaringan. Setelah dilakukan penilaian kuantitatif lebih jauh, didapatkan ekspresi CEACAM1 terbanyak



pada jaringan kanker payudara jinak (derajat histologi 1, ukuran tumor T1, dan pada pasien yang tidak mengalami metastasis limfonodi) (Yang *et al.*, 2017). Sementara penelitian lain menyebutkan adanya peningkatan ekspresi CEACAM1 pada beberapa malignansi stadium akhir (melanoma, NSCLC, kandung kemih, tiroid dan gaster). Perbedaan ekspresi tersebut dapat didasari oleh pemotongan alternatif protein yang menghasilkan dua domain terbesar yakni akhiran panjang (-L) dan pendek (-S), sehingga dapat dihipotesiskan bahwa CEACAM1-4S memiliki sifat supresi tumor dan CEACAM1-4L dapat berfungsi sebagai stimulator pada sel tumor (Calinescu *et al.*, 2018).

## 2.7 Mencit BALB/c

BALB/c adalah mencit yang memiliki ciri fisik albino, warna mata merah muda dan memiliki warna rambut yang putih. Secara umum BALB/c sangat sensitif terhadap cahaya dan sangat rentan mengalami stress serta ansietas. Kebanyakan subgalur dari BALB/c memiliki rentang hidup yang panjang sehingga sangat bagus untuk dibudidayakan. Karakteristik lainnya adalah pejantan BALB/c lebih agresif dan dapat berselisih dengan betina jika ditempatkan pada satu kandang (Nakamura, 2013).

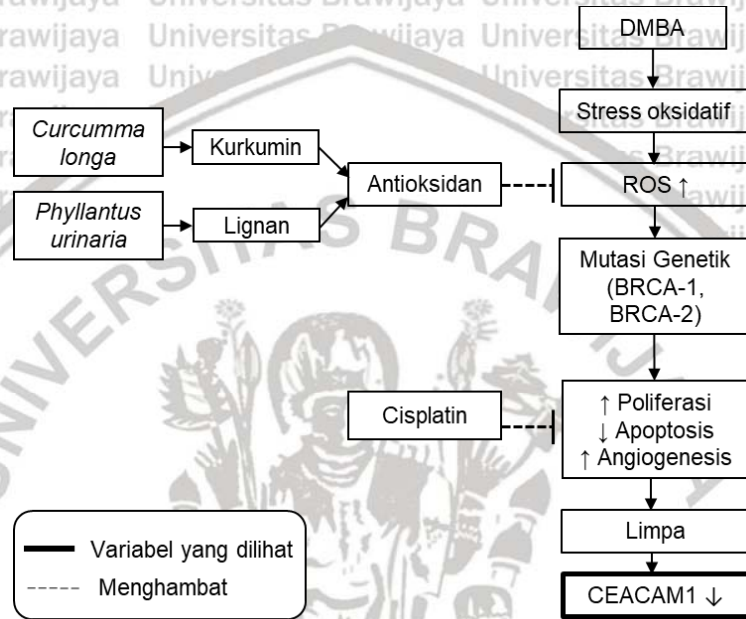
Mencit BALB/c sengaja diberdayakan untuk kepentingan penelitian. Mencit BALB/c dikenal dalam memproduksi plasmositoma hanya dengan injeksi minyak mineral. Tumor ini membentuk dasar produksi antibodi monoklonal, sehingga BALB/c sering digunakan dalam penelitian immunologi. Memiliki angka kejadian tumor payudara yang rendah namun dengan senyawa karsinogen dapat menimbulkan kejadian kanker. Dengan injeksi 7,12-dimethylbenz(a) anthracene (DMBA) saat berusia 4 minggu mencit BALB/c

mengalami tumor uterus dan leukimia. Dengan administrasi methylcholanthrene dapat menimbulkan tumor paru dan induksi methylnitrosourea menyebabkan tumor kulit (Xiao- and Xiang-, 2016).



### BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

#### 3.2 Penjelasan Kerangka Konsep Penelitian

Pemberian DMBA pada hewan coba akan menimbulkan reaksi seluler yakni stress oksidatif pada jaringan dan akhirnya terjadi ketidakseimbangan molekul sel dan mutasi beberapa gen regulasi, pada kanker payudara gen yang paling sering bermutasi adalah BRCA1 dan BRCA2. Mutasi ini kemudian menyebabkan sel kehilangan kemampuan apoptosis, proliferasi yang berkelanjutan serta angiogenesis, sehingga sel yang normal berubah menjadi sel kanker.

Mekanisme penghambatan sel kanker oleh antioksidan diketahui sebagai molekul yang menyeimbangkan jumlah serta bereaksi dengan *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) sehingga menyebabkan molekul menjadi stabil

kembali dan tidak berbahaya. Meniran dan kunyit memiliki senyawa aktif yakni kurkumin dan lignan yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Adapun terapi konvensional kanker payudara saat ini, cisplatin, memiliki peran dalam menginduksi apoptosis.

Untuk mengevaluasi adanya perubahan protein tertentu akibat terapi yang diberikan pada kanker maka dilakukan analisis ekspresi protein CEACAM1 yang diukur melalui *Flow Cytometer*.

### 3.3 Hipotesa Penelitian

#### 3.3.1 H0 (Hipotesis Nol)

Tidak terdapat pengaruh Pengaruh Meniran (*Phyllanthus urinaria*) dan Kunyit (*Curcuma longa*) terhadap ekspresi CEACAM1 pada Mencit (BALB/c) sebagai model kanker payudara yang diinduksi DMBA.

#### 3.3.2 H1 (Hipotesis Alternatif)

Terdapat pengaruh Pengaruh Meniran (*Phyllanthus urinaria*) dan Kunyit (*Curcuma longa*) terhadap ekspresi CEACAM1 pada Mencit (BALB/c) sebagai model kanker payudara yang diinduksi DMBA.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimental murni dengan menggunakan *post test only group design*. Subjek penelitian menggunakan hewan coba *Mus musculus* BALB/c yang diberi injeksi DMBA sampai terkonfirmasi kanker diberikan terapi kombinasi ekstrak Meniran dan Kunyit dengan kelompok kontrol adalah hewan coba sakit kanker diberi terapi cisplatin, hewan coba sakit kanker tanpa terapi serta hewan coba sehat

#### 4.2 Populasi dan Sampel/Subjek Penelitian

##### 4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah mencit BALB/c yang didapat dari Laboratorium Hewan Coba, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim, Malang.

##### 4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah mencit BALB/c yang memenuhi kriteria inklusi, serta tidak memiliki kriteria eksklusi dan drop out.

##### 4.2.2.1 Kriteria Inklusi

1. Mencit betina
2. Umur 6 minggu
3. Berat badan  $\geq 20$  gram
4. Mencit sehat atau aktif

#### 4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

Ada kelainan anatomis

#### 4.2.2.3 Kriteria Drop out

Mencit BALB/c mati saat penelitian dan sebelum tiba waktu pengambilan hasil

#### 4.2.2.4 Jumlah Sampel

Perhitungan jumlah sampel pada penelitian rancangan acak lengkap ini menggunakan rumus sederhana (Federer, 1955)

$$(n-1)(p-1) \geq 15$$

Dengan keterangan bahwa n adalah jumlah sampel per kelompok yang dibutuhkan dan p adalah jumlah perlakuan. Sehingga dengan jumlah 7 perlakuan yang telah ditentukan, didapatkan jumlah sampel sebagai berikut:

$$(n-1)(7-1) \geq 15$$

$$(n-1)(6) \geq 15$$

$$(n-1) \geq 15 / 6$$

$$n - 1 \geq 2,5$$

$$n \geq 3,5 \sim 4$$

Setelah melalui rumus tersebut, diketahui bahwa jumlah sampel yang dibutuhkan adalah 4 mencit pada setiap perlakuan sehingga jika ada 7 perlakuan maka dibutuhkan jumlah sebesar 28 mencit. Untuk menghindari adanya kekurangan sampel saat analisis data yang bisa dikarenakan adanya kriteria drop

out maka jumlah mencit ditambah sebesar 10% dari jumlah mencit pada setiap perlakuan, sehingga jumlah total sampel yang dibutuhkan adalah 35 sampel.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pengukuran kuantitas *CEACAM1* pada *Mus musculus* setiap kelompok melalui analisis data Flow Cytometry serta gambaran histopatologi sel kanker payudara.

#### 4.3.2 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah :

1. Dosis DMBA yang diberikan untuk menginduksi kanker
2. Pemberian terapi kombinasi *C. longa* dan *P. urinaria* dengan dosis berbeda pada kelompok sakit mencit
3. Pemberian terapi Cisplatin pada kelompok kanker

### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Oktober 2020 pada di Laboratorium Struktur, Perkembangan dan Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

### 4.5 Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian

#### 4.5.1 Bahan:

1. Cisplatin (terapi konvensional kanker payudara)
2. Bahan untuk induksi kanker : DMBA (senyawa karsinogenik), Minyak jagung
3. Bahan ekstraksi herbal : Kunyit (bubuk), Meniran (bubuk), aquades

4. Bahan pembuatan pakan hewan coba : Pakan mencit, Tepung, Air
5. Bahan histopatologi : Air, Xylol, Alkohol 70%, Alkohol 95%, HCL 1%, Lithium Carbonat, Pewarna hematoxylin, Pewarna Eosin,
6. Bahan larutan sampel Flow Cytometry: PBS (phosphate-buffered saline), larutan Antibodi, pewarna fluoresens (FITC atau cyanine-5)

#### 4.5.2 Alat

1. *Flow Cytometer software BD Cellquest Pro™*
2. *Software SPSS versi 22.0 for Windows*
3. Sput
4. Alat ekstraksi herbal : Digital magnetic stirrer, Hot plate, Gelas kimia, Erlenmeyer, Corong bucher.
5. Alat pembuatan pakan hewan coba : blender, oven.
6. Alat pembedahan : pisau bedah, handscoen, masker
7. Alat histopatologi : kaca objek, wadah, lempengan pendingin
8. Alat untuk *Flow Cytometer* : Pipet, Tabung Propilen



4.6 Definisi Istilah/ Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Pengukuran	Satuan Ukur	Skala Data
DMBA	Senyawa karsinogenik sebagai induksi kanker payudara. DMBA dilarutkan dengan 0,1 ml minyak jagung lalu diinjeksikan secara subkutan.	Diberikan pada mencit sebanyak 0.045 mg/gr BB sebagai dosis tunggal lalu diobservasi selama 8 minggu.	mg/kg BB	Numerik
Kanker Payudara	Ditentukan berdasarkan histopatologi jaringan mammae dengan ciri-ciri hiperproliferasi duktus, inti sel epitel duktus hiperkromatik maupun infiltrasi stroma diantara jaringan adiposa.	Dilakukan dengan pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan hematoksilin dan eosin perbesaran 100x.	-	Ordinal
Terapi Meniran dan Kunyit	Tiap herbal di proses melalui ekstraksi, maserasi, filtrasi serta <i>freeze-drying</i> sehingga hasil	Dosis dikonversi dari dosis manusia ke dosis mencit (500mg, 1500mg, 450mg, 9000mg).	mg/gr BB	Numerik

	<p>akhir menjadi serbuk. Pemberian pada mencit dilakukan secara sonde yang sebelumnya dilarutkan terlebih dahulu dengan air sesuai dosis pada penelitian.</p>	<p>Rumus konversi :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\frac{dosis}{60\text{ kg}} = a \frac{mg}{kg}</math></li> <li>- <math>a \frac{mg}{kg} \times 0.081 =</math></li> <li><math>x \text{ mg/kg BB (mencit)}</math></li> </ul> <p>sehingga dosis untuk mencit yang dibutuhkan :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 mg/kg BB = 0.1 mg/gr BB</li> <li>- 300 mg/kg BB = 0.3 mg/gr BB</li> <li>- 900 mg/kg BB = 0.9</li> <li>- 1800 mg/kg BB = 1.8 mg/gr BB</li> </ul>		
Cisplastin	<p>Sebagai terapi konvensional kanker payudara yang diinjeksikan secara intraperitoneal.</p>	<p>Dosis pada mencit diadaptasi dari dosis manusia sebesar 75 mg/m<sup>2</sup> yang kemudian dikonversikan menjadi dosis mencit</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>mg/m^2 = K_m \times mg/kg</math></li> <li>- <math>75 \text{ mg/m}^2 = 37 \times mg/kg</math></li> </ul>	mg/gr BB	Numerik



		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dosis mg/kg manusia = 2.02 mg/kg</li> <li>- Konversi ke dosis mencit</li> <li>- 15 mg/kg BB mencit</li> <li>- 0.015 mg/gr BB mencit</li> </ul>		
CEACAM1	Glikoprotein transmembran yang menunjukkan peningkatan pada malignansi.	Merupakan interpretasi grafik hasil analisis CEACAM1 pada Flow Cytometer antar kelompok. Protein CEACAM1 akan terdeteksi peredarannya pada alat karena berkonjugasi dengan <i>Cyanine-5</i> atau <i>Fluorescein isothiocyanate (FITC)</i> sebagai warna fluoresens.	Persen (%)	Numerik

#### 4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur dalam penelitian ini meliputi pemberian injeksi DMBA kepada mencit lalu melakukan observasi. Tahap setelahnya memberikan terapi pada setiap kelompok sesuai dengan yang sudah ditentukan. Setelah observasi selama

2 minggu, maka semua hewan coba dilakukan pembedahan untuk membandingkan rerata *CEACAM1* dari tiap kelompok yang diukur dengan alat flow cytometry.

#### 4.7.1 Induksi Kanker Payudara

*Mus musculus* dikumpulkan sesuai kriteria inklusi. Peralatan Pendukung lainnya yakni kandang, tissue, alkohol, sekam, pakan pelet, minum dipersiapkan sebelumnya, sehingga saat mencit tiba maka dilakukan tahap aklimatisasi. Kandang mencit dibersihkan setiap seminggu sekali, dan pakan diberikan setiap hari. Pakan mencit terbuat dari pelet dan tepung terigu yang dihaluskan dengan blender lalu di panggang dalam bentuk lembaran sedang.

Mencit diinjeksi DMBA untuk menginduksi terbentuknya kanker payudara.

Pembuatan larutan DMBA merupakan larutan campuran antara 7,12-*Dimethylbenz [a] antrasena* (DMBA) dan minyak jagung. Minyak jagung yang digunakan sebagai pelarut yaitu 100  $\mu$ l untuk 1 mencit dan 0,045 mg DMBA untuk 1 mencit (Kerdelhué, Forest and Coumoul, 2016). Serbuk DMBA dan minyak jagung diaduk merata di dalam botol *falcon*, lalu diaduk hingga tidak tersisa butiran dan terlihat larut seluruhnya. Larutan kemudian diambil dengan syringe yang sesuai dengan volume. Injeksi dilakukan sekali (single dose) dan ditunggu sampai 8 minggu. Injeksi dilakukan secara steril dengan terlebih dahulu menyemprot bagian aerola dengan alcohol 70%. Injeksi dilakukan secara subkutan pada lapisan kulit utama kemudian setelah 8 minggu dibutuhkan uji konfirmasi melalui pembuatan preparat histopatologi. Pada preparat histologi kanker payudara maka secara umum bagian duktus akan terdapat sel kanker serta batas antara jaringan tidak dapat terlihat dengan jelas (Utami dkk., 2015).

#### 4.7.2 Terapi

Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 28 sampel dan dibagi menjadi 7 kelompok. Empat kelompok induksi DMBA diberikan terapi kombinasi *C. longa* dan *P. urinaria* dengan dosis berbeda, satu kelompok diberikan injeksi cisplatin sebagai pembandingan terapi konvensional saat ini, satu kelompok sakit tanpa perlakuan terapi dan satu kelompok sehat (tabel 4.2).

**Tabel 4.2** Perlakuan kelompok

Kelompok	Keterangan
Kontrol sehat (K-)	Mencit normal, sehat tanpa DMBA
Kanker Payudara (injeksi DMBA) (K+)	Mencit konfirmasi kanker payudara
Terapi cisplastin (P1)	Mencit konfirmasi kanker payudara + injeksi cisplatin dosis 0,015 mg/gr BB
Terapi kombinasi <i>P. urinaria</i> dan <i>C. longa</i> (P2)	Mencit konfirmasi kanker payudara + injeksi kombinasi dosis 0,1 mg/gr BB
Terapi kombinasi <i>P. urinaria</i> dan <i>C. longa</i> (P3)	Mencit konfirmasi kanker payudara + injeksi kombinasi dosis 0,3 mg/gr BB
Terapi kombinasi <i>P. urinaria</i> dan <i>C. longa</i> (P4)	Mencit konfirmasi kanker payudara + injeksi kombinasi dosis 0,9 mg/gr BB
Terapi kombinasi <i>P. urinaria</i> dan <i>C. longa</i> (P5)	Mencit konfirmasi kanker payudara + injeksi kombinasi dosis 1,8 mg/gr BB

##### 4.7.2.1 Herbal

Serbuk kering kunyit (*Curcuma longa*) dan meniran (*Phyllanthus urinaria*) berasal dari UPT. Materia Medika Batu. Kedua serbuk tersebut kemudian diekstraksi dengan cara maserasi (*digital magnetic stirrer*) menggunakan akuades mendidih dengan rasio 1:10 (berat/volume) selama empat jam. Larutan disaring,

kemudian dilakukan sentrifugasi (4500 rpm selama 5 menit). Hasil filtrasi selanjutnya disaring kembali dengan kertas saring kasar dan Whatman 0.2 um. Hasil filtrasi kemudian dikirm ke laboratorium untuk pengeringan beku (*freeze-drying*). Hasil akhir disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Penelitian ini menggunakan perbandingan 1:1 untuk *Phyllanthus urinaria* dan *Curcuma longa*, yang selanjutnya disebut dengan kombinasi ekstrak (Puspitarini et al., 2019). Volume dihitung sesuai dengan berat badan mencit. Terapi kombinasi *C. longa* dan *P. urinaria* dilakukan dengan cara sonde (oral) yakni dengan cara memasukkan larutan terapi ke dalam organ pencernaan dengan jarum sonde, dosis yang digunakan adalah 0,1 mg/gr BB, 0,3 mg/gr BB, 0,9 mg/gr BB, 1,8 mg/gr BB. Dosis didapatkan berdasarkan perhitungan dosis konversi pada manusia. (Nair and Jacob, 2016).

#### 4.7.2.2 Cisplatin

Cisplatin merupakan agen kemoterapi yang mekanismenya adalah menginduksi apoptosis dan berinterferensi langsung dengan mekanisme replikasi serta transkripsi DNA. Dosis terapi cisplatin di indonesia merujuk pada kemenkes adalah  $75\text{mg}/\text{m}^2$  secara intravena (Kemenkes, 2015). Dengan rumus konversi dosis maka didapatkan dosis untuk 1 mencit adalah 0.015 mg/g BB. Cisplatin diberikan kepada hewan coba secara intraperitoneal dan diinjeksi sebanyak satu kali dalam dua hari selama 2 minggu.

#### 4.7.3 Pengukuran Parameter

Setelah 2 minggu proses terapi, jaringan mammae dan limpa mencit akan dibedah, pengorbanan dilakukan dengan cara mendislokasikan leher dan menarik ekor secara bersamaan serta penekanan pada leher mencit sehingga mencit dalam kondisi telah mati. Sediaan jaringan mammae akan dilanjutkan untuk pengamatan histopatologi sementara jaringan limpa akan di analisis pada *flow*

cytometer. Pembuatan sediaan dilakukan dengan penanaman pada paraffin, dilakukan sebagai berikut :

1. Jaringan mammae dan limpa mencit kemudian dibedah dan direseksi.
2. Jaringan dimasukkan sesegera mungkin (<30 menit) dalam wadah yang berisi buffer formalin 10% dengan volume larutan minimal 5x dari jaringan tersebut.
3. Setelah itu sediaan direndam dalam buffer formalin 10% selama 18 jam.
4. Jaringan yang telah difiksasi dipotong dengan ketebalan 2-3 mm.
5. Potongan tersebut dimasukkan kedalam kaset dan ditutup.
6. Lalu masukkan kembali dalam formalin 10% buffer fosfat.
7. Melakukan proses dehidrasi menggunakan alkohol 70-100%
8. Melakukan proses clearing (dengan cairan xylol)
9. Melakukan tahap impregnansi
10. Melakukan penanaman jaringan pada paraffin dan mendinginkan dengan lempeng pendingin.

#### 4.7.3.1 Histopatologi

Pewarnaan histopatologi menggunakan hematoksilin eosin (H&E) dikarenakan hematoksilin yang bersifat basa akan memberikan warna biru pada kromatin sementara matriks seluler dan sitoplasma akan mengikat eosin yang bersifat asam sehingga hasil akan menampakkan struktur umum dan memudahkan pemeriksa untuk membedakan sel normal dengan sel yang mengalami kelainan (Lau, 2019). Tahap dari pewarnaan histopatologi adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan jaringan paraffin
2. Memotong blok jaringan paraffin dengan microtom
3. Pita paraffin hasil pemotongan dipaparkan pada pemanas air dan memindahkannya ke kaca objek
4. Melakukan deparaffinisasi dan rehidrasi dengan air.
5. Bilas kaca objek dengan air.
6. Memberikan pewarna hematoksilin selama 1 menit
7. Bilas dengan air keran selama 5 detik
8. Bilas dengan larutan *scott's* (sodium bikarbonat 2 g, magnesium sulfat (anhidrosis) 10 g, air 1 liter) selama 5 detik
9. Teteskan eosin selama 20 detik
10. Bilas menggunakan air keran
11. Membilas Ethanol 95% selama 10 detik
12. Membilas Ethanol 100% selama 10 detik
13. Membilas Ethanol 100% selama 10 detik
14. Meneteskan silene selama 20 detik
15. Melakukan *mounting* menggunakan DPX (Distyrene-Tricesyl phosphate-Xylene)
16. Pengamatan dibawah mikroskop

#### 4.7.3.2 Pengukuran CEACAM1 dengan Flow Cytometer

Untuk analisis *CEACAM1* dilakukan dengan alat flow cytometer, dimana tahap persiapan larutan untuk alat terdiri dari 3 tahap, yakni pengumpulan sel, pewarnaan sel dan pencucian sel terakhir. Untuk pengumpulan sel, hasil homogen jaringan setelah pembedahan dimasukan kedalam tabung propilen, kemudian disentrifugasi sampai menjadi pelet dan tampak supernatan dan beri pewarnaan



buffer (biasanya 50  $\mu\text{l}/10^6$  sel). Untuk pewarnaan dilakukan sebanyak dua kali yakni primer dan sekunder. Pewarnaan primer dilakukan dengan cara menambahkan menambahkan antibodi yang sudah dilarutkan dengan 50  $\mu\text{l}$  larutan buffer ke dalam suspensi sel, lalu homogenkan dengan cara menaikan dan menurunkan pipet. Dikarenakan flow cytometer menggunakan prinsip fluoresen maka preparat di inkubasi selama 30-60 menit pada cahaya gelap. Untuk pewarnaan sekunder, ambil 1 ml larutan pewarna buffer dan sentrifugasi pada kecepatan 1000 RPM selama 5 menit. Setelah tampak supernatant, cuci sel dua kali dengan 1-2 ml larutan buffer. Kemudian larutkan kembali pelet dengan 100  $\mu\text{l}$  larutan antibodi kedua dan inkubasi selama 30 menit. Untuk tahap pencucian final, cuci sel dua kali dengan 1-2 ml larutan buffer. Kemudian larutan dipindah ke dalam kuvet dan memasukkannya ke dalam alat flow cytometer (Cossarizza *et al.*, 2019). Hasil dari pengukuran menggunakan flow cytometry merupakan persen dari jumlah sel yang menunjukkan pewarnaan positif dan negatif dari antibodi saat prosedur pewarnaan.

#### 4.8 Analisis Data / Pengolahan Data

Rerata *CEACAM1* tiap kelompok diperoleh dari hasil analisis menggunakan *Flow Cytometer* melalui software *BD Cellquest Pro™* dan dianalisis secara statistik menggunakan software SPSS versi 22.0 for Windows. Setelah itu, semua data dilakukan analisis untuk uji parametrik. Untuk mengetahui data berdistribusi normal, data yang diperoleh dianalisis melalui uji Saphiro-wilk dikarenakan jumlah sampel dibawah 50 dan interpretasi normal jika  $p > 0.05$ , untuk mengetahui data yang homogen menggunakan *levene test* dan dikatakan homogen jika signifikansi  $> 0.05$ , untuk mengetahui tingkat variasi data dengan selang kepercayaan 95% (galat = 5%) dengan uji ANOVA satu arah. Data akan

dianalisis menggunakan uji lanjutan dengan Tukey *Honestly Significant Difference* untuk mengetahui beda nyata antar masing-masing kelompok perlakuan (Muhson, 2006).

**4.9 Jadwal Kegiatan**

Keterangan kegiatan	Oktober 2020			
	Minggu 1	Minggu 2	Minggu 3	Minggu 4
Mencit tiba di laboratorium dan Aklimatisasi				
Injeksi DMBA				
Observasi pasca injeksi DMBA				

**Tabel 4.3** Jadwal Kegiatan Oktober

Keterangan kegiatan	November 2020			
	Minggu 1	Minggu 2	Minggu 3	Minggu 4
Observasi pasca injeksi DMBA				

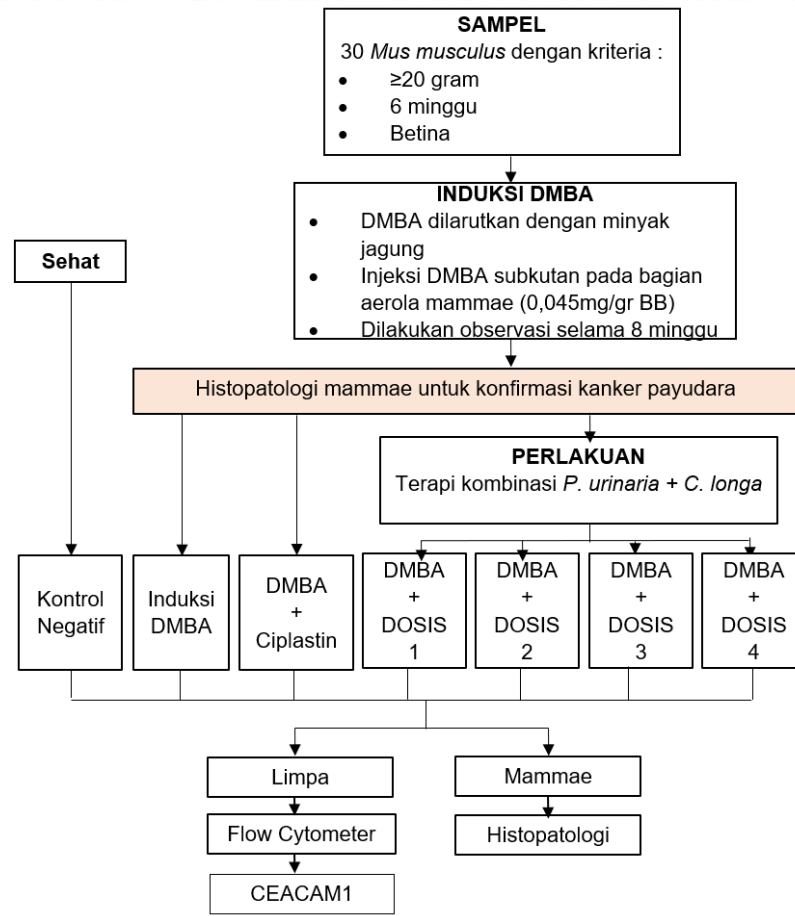
**Tabel 4.4** Jadwal Kegiatan November



Keterangan kegiatan	Desember 2020			
	Minggu 1	Minggu 2	Minggu 3	Minggu 4
Observasi pasca injeksi DMBA				
Pembedahan awal untuk konfirmasi kanker				
Pembuatan ekstrak kombinasi <i>C. longa</i> dan <i>P. urinaria</i>				
Terapi kombinasi dan terapi cisplatin				
Pembedahan akhir untuk histopatologi (jaringan mammae) dan analisis data <i>flow cytometry</i> (limpa)				

Tabel 4.5 Jadwal Kegiatan Desember

4.10 Alur penelitian

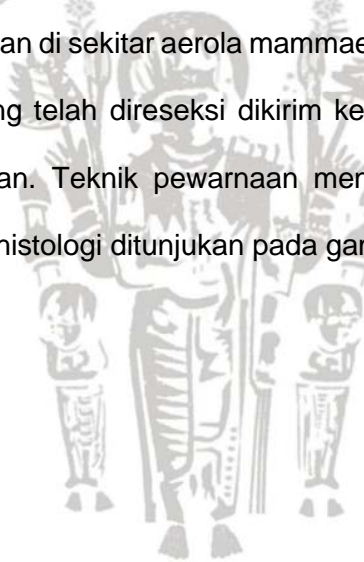


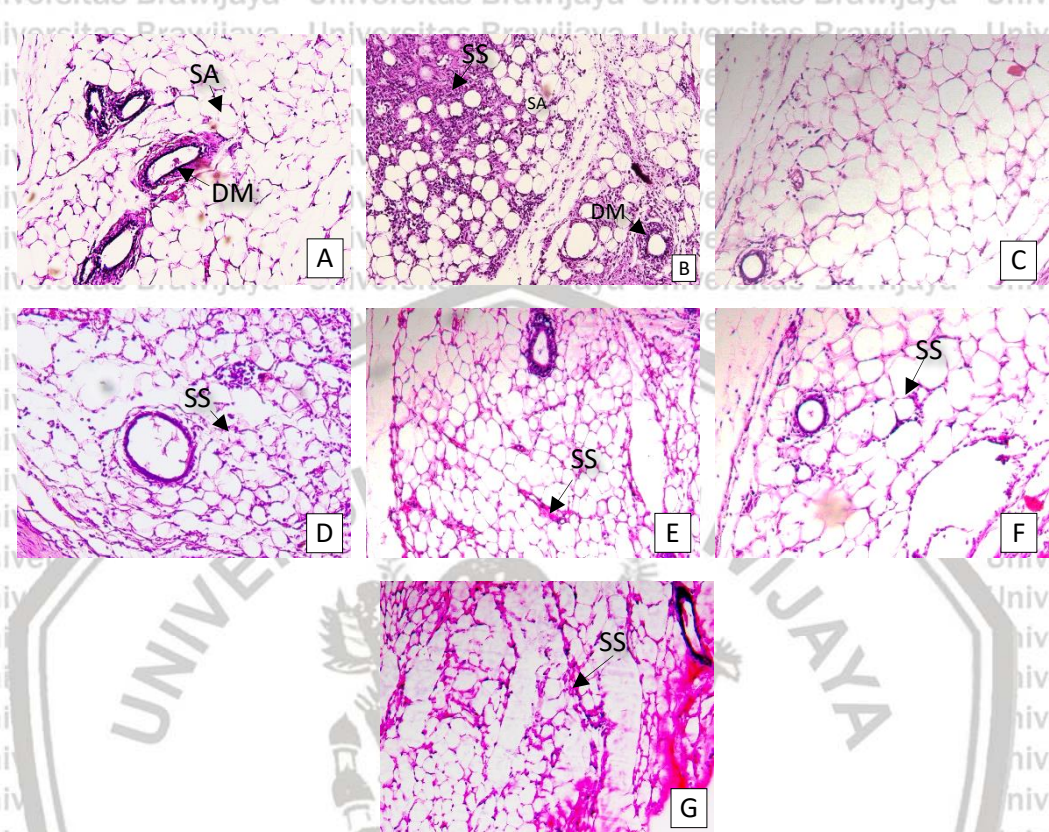
Gambar 4.1 Diagram alur penelitian



**BAB V****HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA****5.1 Hasil Penelitian****5.1.1 Gambaran Histopatologi Jaringan Mammae**

Kelompok hewan coba yang disiapkan untuk preparat histopatologi adalah kelompok sehat dan induksi DMBA. Setelah pemberian injeksi DMBA disekitar aerola mammae, kelompok tersebut dilakukan pengamatan selama 8 minggu sampai terlihat perlukaan di sekitar aerola mammae. Hewan coba lalu dibedah dan jaringan mammae yang telah direseksi dikirim ke Lab Kessima Medika Malang untuk tahap pewarnaan. Teknik pewarnaan menggunakan Hematoksilin-Eosin (H&E). Hasil preparat histologi ditunjukkan pada gambar berikut.





**Gambar 5.1** Gambaran histologi jaringan aerola mammae dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin pada semua kelompok (H&E Perbesaran 100x).

Keterangan : A: Kontrol Negatif; B: Induksi DMBA; C: DMBA+Cisplatin; D: DMBA+D1; E: DMBA+D2; F: DMBA+D3; G: DMBA+D4. DM: Duktus mammae, SS: sel stroma, SA: sel adiposa

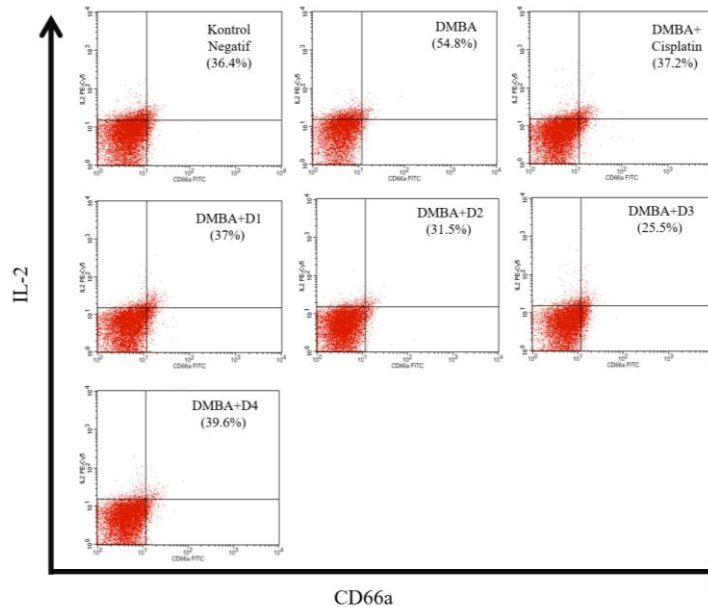
Pada gambar 5.1 kelompok kontrol negatif (gambar A) menunjukkan gambaran duktus yang tampak normal dikelilingi oleh adiposa dengan sedikit jaringan stroma diantaranya. Pada kelompok induksi DMBA (gambar B) ditemukan susunan jaringan adiposa yang merenggang, komposisi stroma lebih mendominasi karena telah diinfiltrasi oleh sel karsinoma. Setelah diberikan terapi baik cisplatin maupun herbal, terjadi perubahan struktur adiposa. Pada kelompok cisplatin susunan adiposa tampak seperti susunan adiposa pada kontrol negatif. Pada kelompok terapi kombinasi herbal (gambar D-G) secara umum menunjukkan pengurangan komposisi stroma jika dibandingkan kelompok DMBA.



### 5.1.2 Hasil *Flow Cytometry*

Setelah hasil histopatologi mencit dikonfirmasi mengarah pada kanker, perlakuan kepada setiap kelompok dilanjutkan. Kelompok DMBA+Cisplatin mendapatkan cisplatin dosis 0.015 mg/bb, kelompok DMBA+kombinasi herbal mendapatkan 4 dosis yang berbeda, yakni 0.1 mg/gr BB, 0.3 mg/gr BB, 0.9 mg/gr BB, 1.8 mg/gr BB, sementara kelompok sehat dan DMBA dilakukan observasi.

Setelah dilakukan perlakuan pada semua kelompok selama 2 minggu, mencit dibedah lalu jaringan spleen direseksi untuk analisa *flow cytometry*.



**Gambar 5.2** Rerata Ekspresi CEACAM1 jaringan mammae pada semua kelompok yang ditampilkan melalui hasil analisa *Software BD Cellquest*. (Hasil pada setiap kelompok terdiri dari 4 kuadran).

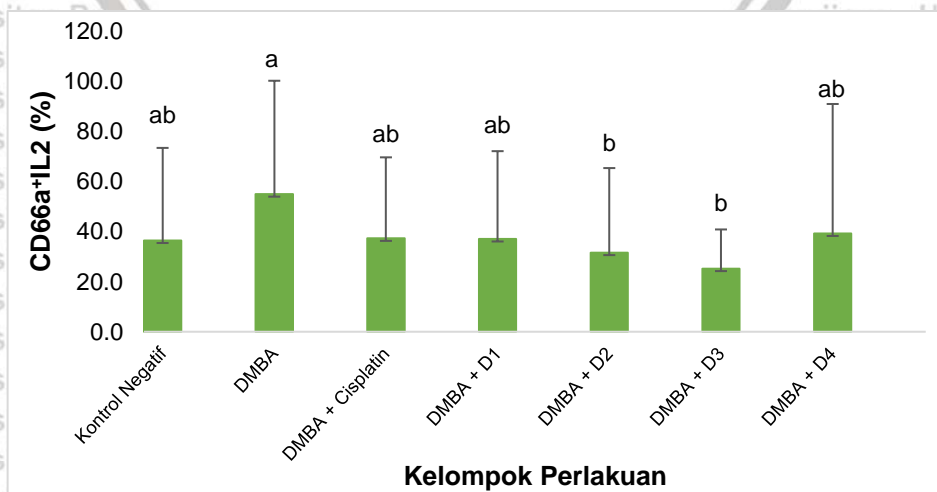
Hasil analisa diperoleh melalui *software BD cellquest* dengan metode *gating* dan bentuk kuadran (Gambar 5.2). Empat kuadran yang ditampilkan *software* terdiri dari kuadran kanan atas, kuadran kanan bawah, kuadran kiri atas dan kuadran kiri bawah. Presentase ekspresi marker diperoleh dari kuadran kanan

atas dan kuadran kanan bawah. Seluruh data kemudian diolah kembali dan ditampilkan menjadi tabel dan bagan sebagai berikut.

**Tabel 5.1** Rerata presentase ekspresi CEACAM1

Perlakuan	Rerata (%) ± SD
Kontrol Negatif	36.4±3.81
DMBA	54.8±8.54
DMBA+Cisplatin	37.2±6.36
DMBA+D1	37±1.95
DMBA+D2	31.5±2.43
DMBA+D3	25.5±11.2
DMBA+D4	39.6±12.65

Gambar 5.3 menunjukkan bahwa presentase rerata ekspresi CEACAM1 (CD66a+IL2) pada kelompok induksi DMBA (54.8±8.54%) lebih tinggi daripada kelompok sehat (36.4±3.81%). Setelah kelompok cisplatin dan kombinasi herbal mengalami perlakuan, rerata presentase ekspresi CEACAM1 (CD66a+IL2) turun lebih rendah menjadi 37.2±6.36% (DMBA+Cisplatin), 37±1.95% (DMBA+D1), 31.5±2.43% (DMBA+D2), 25.5±11.2% (DMBA+D3), 39.6±12.65% (DMBA+D4) dibandingkan kelompok DMBA (54.8±8.54%)



**Gambar 5.3** Grafik rerata presentase ekspresi CEACAM1



## 5.2 Analisis Data

Analisis data menggunakan aplikasi SPSS versi 26.0. Dengan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ), data yang dianalisis adalah rerata presentase ekspresi CEACAM1 pada semua kelompok dari hasil *Flow Cytometry*. Analisa data menggunakan uji normalitas, uji homogenitas, uji komparasi serta uji beda nyata.

### 5.2.1 Hasil Uji Normalitas dan Uji Homogenitas

Uji normalitas bertujuan untuk melihat persebaran data, sementara uji homogenitas bertujuan untuk melihat variansi yang ada pada data. Uji normalitas menggunakan metode *Shapiro-Wilk* karena jumlah data kurang dari 50.

**Tabel 5.2** Hasil Uji Normalitas dan Uji Homogenitas

Perlakuan	Rerata (%) $\pm$ SD	Uji <i>Shapiro-Wilk</i>	Uji Homogenitas
		p - value	p - value
Kontrol Negatif	36.4 $\pm$ 3.81	0.769	0.139
DMBA	54.8 $\pm$ 8.54	0.373	
DMBA+Cisplatin	37.2 $\pm$ 6.36	0.393	
DMBA+D1	37 $\pm$ 1.95	0.972	
DMBA+D2	31.5 $\pm$ 2.43	0.681	
DMBA+D3	25.5 $\pm$ 11.2	0.589	
DMBA+D4	39.6 $\pm$ 12.65	0.943	

Tabel 5.2 menunjukkan persebaran seluruh data normal karena nilai signifikansi memenuhi syarat ( $p > 0,05$ ). Uji homogenitas menunjukkan nilai 0,139 ( $p > 0,05$ ) sehingga seluruh data homogen.

### 5.2.2 Hasil Uji Komparasi

Uji komparasi menggunakan *One-Way Annova*. Uji ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan rerata ekspresi CEACAM1 pada semua kelompok perlakuan. Data dianggap signifikan apabila  $p\text{-value} < 0,05$ .



Tabel 5.3 Hasil Uji Komparasi

Perlakuan	Rerata (%) $\pm$ SD	Uji <i>One-Way Annona</i>
		p – value
Kontrol Negatif	36.4 $\pm$ 3.81	0.014
DMBA	54.8 $\pm$ 8.54	
DMBA+Cisplatin	37.2 $\pm$ 6.36	
DMBA+D1	37 $\pm$ 1.95	
DMBA+D2	31.5 $\pm$ 2.43	
DMBA+D3	25.5 $\pm$ 11.2	
DMBA+D4	39.6 $\pm$ 12.65	

Keterangan Tabel:  $p < 0.05 =$  Signifikan

Tabel 5.3 menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.014 ( $p < 0.05$ ), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada rerata ekspresi CEACAM1 antar kelompok.

### 5.2.3 Hasil Uji *Post Hoc Tukey*

Untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara kelompok tertentu, maka dilanjutkan dengan Uji *Post Hoc Tukey*. Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan hasil yang berbeda nyata di antara kedua perlakuan. Dari gambar 5.3 dapat disimpulkan bahwa rerata ekspresi CEACAM1 pada perlakuan DMBA+D3 dan DMBA+D2 menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan perlakuan DMBA karena memiliki notasi yang sepenuhnya berbeda. Sementara pada perlakuan Kontrol negatif, Dosis 1 (DMBA+D1), Cisplatin (DMBA+Cisplatin) dan Dosis 4 (DMBA+D4) memiliki notasi yang sama sehingga rerata ekspresi CEACAM1 tidak memiliki perbedaan yang signifikan.

## BAB VI

### PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi meniran (*Phyllanthus urinaria*) dan kunyit (*Curcuma longa*) terhadap kanker payudara. Hal-

hal yang dilihat dari penelitian ini adalah histopatologi dan analisis dari rerata ekspresi marker kanker payudara. Ekstrak kombinasi herbal diberikan setelah kelompok induksi DMBA teridentifikasi kanker payudara melalui histopatologi.

Dalam patofisiologi kanker, antioksidan memiliki peran sebagai penangkal radikal bebas. Radikal bebas adalah senyawa yang berkontribusi dalam kerusakan DNA sel, sehingga terjadi inisiasi serta proliferasi sel normal menjadi sel kanker. Pada meniran senyawa antioksidan yang sudah ditemukan antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, tannin, dan fenolik (Higea, 2015), sementara pada kunyit terdapat kurkumin, karotenoid serta flavonoid (Septiana dan Simanjuntak, 2015).

Pada penelitian ini kombinasi *Curcuma longa* dan *Phyllanthus urinaria* diberikan secara sonde (oral) dengan perbandingan herbal tiap dosis adalah 1:1.

Dosis yang digunakan adalah 0,1 mg/grBB, 0,3 mg/grBB, 0,9 mg/grBB, 1,8 mg/grBB. Peneliti menggunakan dosis tersebut karena berdasarkan penelitian sebelumnya rentang dosis tersebut dapat menimbulkan apoptosis terhadap sel kanker payudara (Puspitarini et al., 2019).

#### 6.1 Gambaran Histopatologi Jaringan Mammae

Pada hasil histopatologi, kelompok kontrol negatif memiliki susunan struktur adiposa teratur, sementara pada kelompok induksi DMBA menunjukkan adanya infiltrasi sel karsinoma pada jaringan adiposa sehingga tampak stroma

yang mendominasi. Hasil ini menunjukkan proses invasif yang dilakukan oleh DMBA sehingga terjadi perubahan gambaran umum pada jaringan adiposa. Struktur jaringan mammae terdiri dari epitel dan stroma yang saling terhubung oleh ekstraseluler matriks. Kerusakan pada struktur tersebut dapat menyebabkan inisiasi dari kanker. Stroma mammae terdiri dari adiposa, fibroblast, pembuluh, sel inflamasi dan sel lainnya yang berperan dalam siklus perkembangan jaringan. Meskipun lapisan epitel memiliki potensi tumorigenic paling besar, Stroma mammae juga memiliki peran dalam mendukung pertumbuhan tumor (Conklin and Keely, 2012).

DMBA merupakan senyawa lipofilik sehingga dapat dengan mudah berkonsentrasi pada epitel payudara yang berdampingan dengan jaringan adiposa. Setelah teraktivasi secara metabolik menjadi senyawa karsinogen, DMBA menyebabkan mutasi, substitusi dan adduksi pada rantai DNA sel normal sehingga menyebabkan proses malignansi (Kerdelhué, Forest and Coumoul, 2016). Pada penelitian sebelumnya juga didapatkan perubahan struktur adiposa jaringan payudara menjadi lebih renggang dan terinfiltrasi stroma pasca injeksi DMBA selama 6 minggu pada BALB/c dibandingkan dengan kelompok normal (Tran, 2018).

Setelah diberikan perlakuan cisplatin dan kombinasi herbal, secara umum terlihat pengurangan infiltrasi stroma pada jaringan adiposa. Pada kelompok cisplatin tampak hasil histopatologi yang mirip seperti kelompok negatif, hal ini dikarenakan sebagai terapi konvensional kanker payudara, cisplatin dapat memberikan efek sitotoksik pada sel kanker melalui hambatan pada sintesis DNA (Aldossary, 2019). Pada kelompok perlakuan kombinasi herbal, tampak reduksi dari infiltrasi stroma pada jaringan adiposa dibandingkan kelompok induksi DMBA

dikarenakan aktivitas antikanker pada senyawa aktif masing-masing herbal.

Meniran dapat menghambat metastasis sel karsinoma payudara melalui jalur kinase terkait sinyal ekstraseluler dan hipoksia (Puspita and Alhebshi, 2019).

Sementara senyawa kurkumin pada kunyit dapat menghambat *Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )* yang berfungsi menginisiasi sel tumor (Qadir, Naqvi and Muhammad, 2016). Temuan lain dari histopatologi perlakuan kombinasi herbal adalah terlihat masih adanya infiltrasi stroma maupun fibroblas pada jaringan adiposa dikarenakan senyawa herbal memiliki banyak faktor yang mempengaruhi hasil pengobatan secara farmakokinetik maupun farmakodinamikanya. Baik kurkumin (senyawa aktif kunyit) maupun coraligin (senyawa aktif meniran) memiliki bioavailabilitas yang rendah sehingga dapat mengurangi efikasi pengobatan (Bonam et al., 2018).

## 6.2 Ekspresi CEACAM1

Pada hasil flow cytometry, persentase rerata ekspresi CEACAM1 (CD66a<sup>+</sup>IL2) pada kelompok induksi DMBA (54.8 $\pm$ 8.54%) lebih tinggi daripada kelompok sehat (36.4 $\pm$ 3.81%). Hasil ini menunjukkan adanya reaksi pada sel karena injeksi DMBA menyebabkan inisiasi sel menjadi ganas diikuti dengan kenaikan CEACAM1 yang berada di permukaan sel. Hal ini sejalan dengan penelitian lain yang menunjukkan peningkatan ekspresi CEACAM1 subtipe *long-tail* (CEACAM1-L) pada stadium akhir melanoma, *Non-small cell lung cancer* (NSCLS), kanker kolorektal, tiroid dan gaster (Calinescu et al., 2018). Namun untuk membedakan subtipe CEACAM1 perlu dilakukan pembuktian lebih lanjut dengan melihat hasil isolasi RNA melalui uji *in vitro*. Penelitian ini melihat CEACAM1 sebagai CEACAM1-L dengan sifat *pro-tumor* karena terdapat parameter lain pada penelitian yang menunjukkan kesimpulan sama, yakni terdapat

penurunan pada makrofag yang mensekresikan IL-6 pada kelompok DMBA dibandingkan kontrol negatif. Makrofag yang mensekresikan IL-6 ini berfungsi sebagai anti-tumor, sehingga penurunan jumlah ini akan menunjukkan progresivitas kanker (Chen et al., 2018)

Protein CEACAM1 ditemukan pada epitel normal traktus gastrointestinal, kelenjar prostat, endotel, permukaan sel imun dan jaringan normal lainnya, sehingga peningkatan atau penurunan yang signifikan CEACAM1 ditemukan berkorelasi pada malignansi (Kim et al., 2019). CEACAM1 atau CD66a memiliki peran ganda dalam regulasi tumor. Penyambungan alternatif yang terjadi pada CEACAM1 menghasilkan 2 sub tipe, yakni *Long (-L)* dan *Short (-S) tail* yang memiliki perbedaan pada tipe domain intraseluler. Keduanya memiliki kecenderungan ekspresi yang berkebalikan. CEACAM1-L memiliki lebih banyak *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs* (ITIMs) pada intraseluler yang dapat menghambat aktivasi Sel T dalam fungsinya mengeliminasi sel kanker sehingga CEACAM1-L dapat disebut sebagai *pro-tumor* (Dankner et al., 2017).

Sedangkan pada CEACAM1-S tidak memiliki ITIMs, sehingga memiliki kecenderungan mendukung aktivasi Sel T dalam fungsinya mengeliminasi sel kanker. Peningkatan ekspresi CEACAM1-S ditemukan pada jaringan kanker payudara dengan derajat histologi rendah, ukuran tumor yang kecil dan kelompok yang tidak bermetastasis atau jinak (Yang et al., 2017). Pada penelitian lain, CEACAM1-S dapat mengembalikan morfogenik sel kanker payudara ke fenotip sel normal sehingga dapat disimpulkan CEACAM1-S sebagai anti-tumor (Calinescu et al., 2018)

Setelah kelompok cisplatin dan kombinasi herbal mengalami perlakuan, rerata ekspresi CEACAM1 turun lebih rendah menjadi  $37.2 \pm 6.36\%$

(DMBA+Cisplatin),  $37 \pm 1.95\%$  (DMBA+D1),  $31.5 \pm 2.43\%$  (DMBA+D2),  $25.5 \pm 11.2\%$  (DMBA+D3),  $39.6 \pm 12.65\%$  (DMBA+D4). Hasil ini menunjukkan timbulnya reaksi pada sel kanker akibat aktivitas seluler yang dilakukan oleh tiap perlakuan sehingga terjadi penurunan rerata ekspresi CEACAM1. Pada perlakuan cisplatin (DMBA+Cisplatin) terjadi penurunan rerata ekspresi CEACAM1 dikarenakan cisplatin dapat berikatan dengan DNA genomik (gDNA) dan DNA mitokondria (mtDNA) sehingga menimbulkan lesi DNA, memblokir produksi protein dan hambatan seluler lainnya yang menyebabkan nekrosis dan apoptosis sel (Ghosh, 2019).

Pada perlakuan kombinasi herbal terjadi penurunan rerata ekspresi CEACAM1 dibandingkan kelompok induksi kanker dapat terjadi karena aktivitas senyawa aktif herbal yang berperan sebagai antioksidan terhadap sel kanker (Bonam et al., 2018). Corilagin sebagai salah satu senyawa aktif merisan (*Phyllanthus urinaria*) diketahui mampu menekan pertumbuhan kanker payudara melalui mekanisme apoptosis dan autofagi terkait spesi oksigen reaktif (ROS) (Gupta et al., 2019). Sedangkan kunyit (*Curcuma longa*) mengandung senyawa aktif kurkumin yang menunjukkan efek antiproliferatif melalui penurunan NF- $\kappa$ B (Tomeh, Hadianamrei and Zhao, 2019). Kombinasi dari senyawa aktif pada masing-masing herbal dapat menciptakan efek yang lebih besar daripada diberikan sebagai monoterapi karena tiap senyawa aktif dapat berikatan pada target yang berbeda pada sel kanker sehingga dapat meningkatkan laju pengobatan (kematian sel kanker) (Hu et al., 2016). Hasil yang sama juga ditunjukkan pada penelitian lain yakni adanya peningkatan apoptosis sel T47D (*pro-tumor*) pasca pengobatan kombinasi *Curcuma longa* dan *Phyllanthus urinaria* pada BALB/c yang menjadi model kanker payudara (Puspitarini et al., 2019).

Dalam penelitian lain juga disebutkan bahwa kombinasi kunyit dan meniran dapat mensupresi *TNF- $\alpha$*  dan *IFN- $\gamma$*  yang meningkat sebagai respon imun pada organ limfoid pasca induksi DMBA hewan coba model kanker payudara (Hermanto et al., 2020).

Berdasarkan hasil analisis didapatkan penurunan rerata ekspresi CEACAM1 yang signifikan terjadi pada kombinasi dosis 2 ( $31.5 \pm 2.43\%$ ) dan dosis 3 ( $25.5 \pm 11.2\%$ ) dibandingkan kelompok induksi DMBA ( $54.8 \pm 8.54\%$ ). Sementara pada kelompok dosis pertama ( $37 \pm 1.95\%$ ) dan keempat ( $39.6 \pm 12.65\%$ ) menunjukkan penurunan yang tidak signifikan terhadap kelompok DMBA ( $54.8 \pm 8.54\%$ ). Kondisi dimana terjadi respon pada target pada dosis rendah dan menunjukkan efek inhibisi pada dosis tinggi disebut sebagai hormesis atau respon dosis bifasik. Senyawa aktif herbal yang berfungsi sebagai antioksidan sering menimbulkan respon hormesis dimana terjadi stimulasi respons dan efek yang bermanfaat pada dosis rendah namun menimbulkan efek inhibisi dan toksik pada dosis tinggi. Adapun efek maksimum yang ditimbulkan dari dosis tersebut hanya dapat mencapai 30-60% dibandingkan grup kontrol. Respons yang toksik pada dosis tinggi dapat disebabkan oleh respon adaptif stress yang melibatkan Nrf2/Keap1, NF- $\kappa$ B, sirtuin serta jalur sinyaling protein kinase (Wang et al., 2018).

Sebuah studi tentang kanker menyebutkan bahwa kurkumin pada dosis rendah menunjukkan fungsi sebagai antioksidan yang kuat, dosis intermediet berfungsi sebagai induksi autofagi, dan dosis tinggi menimbulkan kematian sel (Rainey et al., 2015). Sementara studi lainnya menunjukkan bahwa konsentrasi kurkumin 15  $\mu$ M mampu mengaktivasi HO-1 (*Heme oxygenase-1*) yang berfungsi sebagai proteksi pada sel renal sementara dosis lebih tinggi (diatas 30  $\mu$ M) tidak efektif (Moghaddam et al., 2019).



### 6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan penelitian ini adalah terdapat mencit yang mati pada saat penelitian sehingga mengurangi data yang direncanakan saat awal dan mengurangi keberagaman data. Selain itu terdapat faktor pada mencit yang tidak dapat dikontrol seperti pakan sehari-hari mencit tidak selalu habis yang dapat dikarenakan stress lingkungan. Perencanaan awal untuk DMBA adalah 6 minggu, namun pada penelitian ini kejadian kanker baru dapat diidentifikasi setelah 8 minggu, sehingga dapat mempengaruhi keparahan dari penyakit kanker.



## BAB VII

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Terdapat aktivitas antikanker yang ditemukan pada mencit BALB/c kelompok perlakuan cisplatin maupun kelompok kombinasi ekstrak *P. urinaria* dan *C. longa* yang dilihat melalui hasil histopatologi dimana terjadi reduksi dari infiltrasi stroma pada jaringan adiposa dibandingkan dengan kelompok induksi DMBA.
2. Kombinasi ekstrak *P. urinaria* dan *C. longa* dapat menurunkan rerata ekspresi CEACAM1 secara signifikan pada dosis kedua (0.3 mg/grBB) dan dosis ketiga (0.9 mg/grBB) dibandingkan kelompok induksi DMBA. Sementara pada dosis pertama (0.1 mg/grBB) dan dosis keempat (1.8 mg/grBB) penurunan rerata ekspresi CEACAM1 tidak signifikan secara statistik.

#### 7.2 Saran

Saran yang dapat diusulkan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian secara molekuler dalam hal menentukan profil DNA dari CEACAM1 sehingga bisa menentukan sub tipe secara spesifik yang bisa mempengaruhi evaluasi perkembangan penyakit.
2. Perlu dilakukan penelitian tentang uji toksisitas kombinasi ekstrak *P. urinaria* dan *C. longa*
3. Perlu dilakukan penelitian lain mengenai efek dari kombinasi *P. urinaria* dan *C. longa* dengan model kanker selain kanker payudara

## DAFTAR PUSTAKA

- (WHO), G.-W.H.O., 2018. *Indonesian Fact Sheets*. [online] Available at: <<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/360-indonesia-factsheets.pdf>>.
- Abbas, A., Lichtman, A.H. and Pillai, S., 2017. *Cellular and Molecular Immunology 9th Ed. Cellular and Molecular Immunology*.
- Aldossary, S.A., 2019. Review on pharmacology of cisplatin: Clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(1), pp.7–15.
- Bagheri, S.M., Abdian-Asl, A., Moghadam, M.T., Yadegari, M., Mirjalili, A., Zare-Mohazabieh, F. and Momeni, H., 2017. Antitumor effect of Ferula assa foetida oleo gum resin against breast cancer induced by 4T1 cells in BALB/c mice. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, [online] 8(3), pp.152–158. Available at: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaim.2017.02.013>>.
- Calinescu, A., Turcu, G., Nedelcu, R.I., Brinzea, A., Hodorozea, A., Antohe, M., Diaconu, C., Bleotu, C., Pirici, D., Jilaveanu, L.B., Ion, D.A. and Badarau, I.A., 2018. On the dual role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) in human malignancies. *Journal of Immunology Research*, 2018.
- Chopra, S. and Davies, E.L., 2020. Breast cancer. *Medicine (United Kingdom)*, 48(2), pp.113–118.
- Conklin, M.W. and Keely, P.J., 2012. Why the stroma matters in breast cancer: Insights into breast cancer patient outcomes through the examination of stromal biomarkers. *Cell Adhesion and Migration*, 6(3), pp.249–260.
- Cossarizza, A., Chang, H.-D., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S., Agace, W.W., Aghaeepour, N., Akdis, M., Allez, M. and others, 2019. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *European journal of immunology*, 49(10), pp.1457–1973.
- Dai, G., Yu, L., Yang, J., Xia, K., Zhang, Z., Liu, G., Gao, T. and Guo, W., 2017. The synergistic antitumor effect of cinobufagin and cisplatin in human osteosarcoma cell line in vitro and in vivo. *Oncotarget*, 8.
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppapapati, A., Luu, H.H., Haydon, R.C., He, T.C. and Ren, G., 2018. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes and Diseases*, [online] 5(2), pp.77–106. Available at: <<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>>.
- Fouad, Y.A. and Aanei, C., 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research*, 7(5), pp.1016–1036.
- Geethangili, M. and Ding, S.T., 2018. A review of the phytochemistry and pharmacology of *Phyllanthus urinaria* L. *Frontiers in Pharmacology*, Available at: <[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)> [Accessed 1 Dec. 2020].
- Ghosh, S., 2019. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic*

*Chemistry*, [online] 88(April), p.102925. Available at: <<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>>.

GLOBOCAN - World Health Organization (WHO), 2018. Estimated number of new cases in 2018, worldwide, both sexes, all ages. *International Agency for Research on Cancer*, [online] 876, p.1. Available at: <<http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table>>.

Guntari, G.A.S. and Suariyani, N.L.P., 2016. GAMBARAN FISIK DAN PSIKOLOGIS PENDERITA KANKER PAYUDARA POST MASTEKTOMI DI RSUP SANGLAH DENPASAR TAHUN 2014. *Arc. Com. Health*, 3(1), pp.24–35.

Gupta, A., Singh, A.K., Kumar, R., Ganguly, R., Rana, H.K., Pandey, P.K., Sethi, G., Bishayee, A. and Pandey, A.K., 2019. Corilagin in cancer: A critical evaluation of anticancer activities and molecular mechanisms. *Molecules*, 24(18), pp.1–19.

Hermanto, F.E., Soewondo, A., Tsuboi, H., Ibrahim, M. and Rifa'i, M., 2020. The hepatoprotective effect of Cheral as anti-oxidant and anti-inflammation on mice (*Mus musculus*) with breast cancer. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 9(2), pp.153–160.

Higea, J.F., 2015. KARAKTERISASI EKSTRAK HERBA MENIRAN ( *Phyllanthus niruri* Linn ) DENGAN. (December).

Hu, X.-Q., Sun, Y., Lau, E., Zhao, M. and Su, S.-B., 2016. Advances in Synergistic Combinations of Chinese Herbal Medicine for the Treatment of Cancer. *Current Cancer Drug Targets*, [online] 16(4), pp.346–356. Available at: <[pmc/articles/PMC5425653/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34425653/)> [Accessed 9 Dec. 2020].

Jiao, L., Bi, L., Lu, Y., Wang, Q., Gong, Y., Shi, J. and Xu, L., 2018. Cancer chemoprevention and therapy using Chinese herbal medicine. *Biological Procedures Online*, 20(1), pp.1–14.

Kemenkes, 2015. Panduan Penatalaksanaan Kanker Payudara. *Kementerian Kesehatan Republik Indonesia*, [online] pp.1–50. Available at: <<http://kanker.kemkes.go.id/guidelines/PPKPayudara.pdf>>.

Kemenkes, R., 2020. *PROFIL KESEHATAN INDONESIA TAHUN 2019. Short Textbook of Preventive and Social Medicine*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.

Kerdelhué, B., Forest, C. and Coumoul, X., 2016. Dimethyl-Benz(a)anthracene: A mammary carcinogen and a neuroendocrine disruptor. *Biochimie Open*, 3, pp.49–55.

Khazaei, M., Akbari Bazm, M., Naseri, L. and Khazaei, M., 2018. Methods of inducing breast cancer in animal models: A systematic review. *World Cancer Research Journal*, [online] 5(4), pp.1–17. Available at: <<https://www.wcrj.net/wp-content/uploads/sites/5/2018/12/e1182-Methods-of-inducing-breast-cancer-in-animal-models-a-systematic-review-1.pdf>>.

Kim, W.M., Huang, Y.H., Gandhi, A. and Blumberg, R.S., 2019. CEACAM1 structure and function in immunity and its therapeutic implications. *Seminars in Immunology*, [online] 42(April), p.101296. Available at: <<https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101296>>.

Lau, S.K., 2019. *Basic and advanced laboratory techniques in histopathology and*

cytology. *Journal of Histotechnology*, .

Le, T.T., Hoai, H.T., Thao, L.P., Huong, N.T. and Khue, N.M., 2015. First report of *Microidium phyllanthi* causing powdery mildew on chamber bitter in Vietnam. *New Disease Reports*, 32, p.32.

Mada, U.G., Farmakologi, D., Universitas, F. and Mada, G., 2014. Aktivitas Hepatoprotektif Ekstrak Kunyit ( *C. urcuma domestica* Val . ) dan Ekstrak Meniran ( *Phyllanthus niruri* Linn . ) Pada Tikus yang Diinduksi Parasetamol Kajian Histopatologi Liver Hepatoprotective activity of *Curcuma domestica* Extract And *Phyllanthus ni*. 3(1), pp.10–17.

Metcalf, K.A., Lubinski, J., Gronwald, J., Huzarski, T., McCuaig, J., Lynch, H.T., Karlan, B., Foulkes, W.D., Singer, C.F., Neuhausen, S.L., Senter, L., Eisen, A., Sun, P. and Narod, S.A., 2018. The risk of breast cancer in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers without a first-degree relative with breast cancer. *Clinical Genetics*, [online] 93(5), pp.1063–1068. Available at: <<http://doi.wiley.com/10.1111/cge.13191>> [Accessed 26 Oct. 2020].

Moghaddam, N.S.A., Oskouie, M.N., Butler, A.E., Petit, P.X., Barreto, G.E. and Sahebkar, A., 2019. Hormetic effects of curcumin: What is the evidence? *Journal of Cellular Physiology*, 234(7), pp.10060–10071.

Muhson, A., 2006. Teknik analisis kuantitatif. *Universitas Negeri Yogyakarta. Yogyakarta*.

Nair, A. and Jacob, S., 2016. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(2), p.27.

Nakamura, H., 2013. *BALB/c Mouse*. [online] *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, Elsevier Inc. Available at: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00133-9>>.

National Center for Biotechnology Information, 2020. *PubChem Compound Summary for CID 6001, 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene*. [online] Available at: <[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7\\_12-Dimethylbenz\\_a\\_anthracene](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7_12-Dimethylbenz_a_anthracene)> [Accessed 26 Oct. 2020].

Nindya, S. and Surarsi, B., 2016. TERAPI MUAL MUNTAH PASCA KEMOTERAPI. *Jurnal THT - KL*, 9(2), pp.74–83.

de Oliveira, K.D., Avanzo, G.U., Tedardi, M.V., Rangel, M.M.M., Avanzo, J.L., Fukumasu, H., Rao, K.V.K., Sinhorini, I.L. and Dagli, M.L.Z., 2015. Chemical carcinogenesis by DMBA (7,12-dimethylbenzanthracene) in female BALB/c mice: New facts. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 52(2), pp.125–133.

Puspita, N.A. and Alhebshi, H., 2019. The effect of *Phyllanthus niruri* L Extracts on Human Leukemic Cell Proliferation and Apoptosis Induction. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 30(4), pp.241–251.

Puspitarini, S., Widodo, Lestari, N.D. and Rifai, M., 2019. Exploring of Cheral® potential as anticancer agent via apoptosis mechanism. *AIP Conference Proceedings*, 2155, pp.1–7.

Qadir, M.I., Naqvi, S.T.Q. and Muhammad, S.A., 2016. Curcumin: A polyphenol with molecular targets for cancer control. *Asian Pacific Journal of Cancer*

*Prevention*, 17(6), pp.2735–2739.

Rainey, N., Motte, L., Aggarwal, B.B. and Petit, P.X., 2015. Curcumin hormesis mediates a cross-talk between autophagy and cell death. *Cell Death and Disease*, [online] 6(12), pp.e2003-3. Available at: <<http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2015.343>>.

Schoch, C.L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hotton, C.L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J.P., Sun, L., Turner, S. and Karsch-Mizrachi, I., 2020. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database : the journal of biological databases and curation*, 2020.

Septiana, E. and Simanjuntak, P., 2015. AKTIVITAS ANTIMIKROBA DAN ANTIOKSIDAN EKSTRAK BEBERAPA BAGIAN TANAMAN KUNYIT (*Curcuma longa*). *FITOFARMAKA: Jurnal Ilmiah Farmasi*.

Sun, Y.-S., Zhao, Z., Yang, Z.-N., Xu, F., Lu, H.-J., Zhu, Z.-Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P.-P. and Zhu, H.-P., 2017. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int. J. Biol. Sci.*, [online] 13(11), pp.1387–1397. Available at: <<http://www.ijbs.com>> [Accessed 12 Nov. 2020].

Szostakowska, M., Trębińska-Stryjewska, A., Grzybowska, E.A. and Fabisiewicz, A., 2019. Resistance to endocrine therapy in breast cancer: molecular mechanisms and future goals. *Breast Cancer Research and Treatment*, [online] 173(3), pp.489–497. Available at: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10549-018-5023-4>>.

Tao, F., Zhang, Y. and Zhang, Z., 2019. The role of herbal bioactive components in mitochondria function and cancer therapy. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.

Tomeh, M.A., Hadianamrei, R. and Zhao, X., 2019. A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5).

Um, P., 2015. Cancer, Definition. In: S.K. Highlander, F. Rodriguez-Valera and B.A. White, eds. *Encyclopedia of Metagenomics*. [online] Boston, MA: Springer US. pp.65–65. Available at: <[https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7475-4\\_106](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7475-4_106)>.

Wang, D., Calabrese, E.J., Lian, B., Lin, Z. and Calabrese, V., 2018. Hormesis as a mechanistic approach to understanding herbal treatments in traditional Chinese medicine. *Pharmacology and Therapeutics*, [online] 184(November 2017), pp.42–50. Available at: <<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.013>>.

Xiao-, L.I. and Xiang-, Y., 2016. *BALB/C Bagg's Albino*. [online] Envigo. Available at: <[www.envigo.com](http://www.envigo.com)>.

Yang, C., Cao, M., Liu, Y., He, Y., Yang, C., Du, Y., Wang, W., Zhang, G., Wu, M., Zhou, M. and Gao, F., 2017. Inhibition of cell invasion and migration by CEACAM1-4S in breast cancer. *Oncology Letters*, 14(4), pp.4758–4766.

Yang, C., He, P., Liu, Y., He, Y., Yang, C., Du, Y., Zhou, M., Wang, W., Zhang, G., Wu, M. and Gao, F., 2015. Down-regulation of CEACAM1 in breast cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, [online] 47(10), pp.788–794. Available at: <<https://academic.oup.com/abbs/article/47/10/788/1754519>> [Accessed 25 Oct. 2020].

Yardim, Y., Keskin, E., Levent, A., Ozsöz, M. and Senturk, Z., 2010. Voltammetric studies on the potent carcinogen, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene: Adsorptive stripping voltammetric determination in bulk aqueous forms and human urine samples and detection of DNA interaction on pencil graphite electrode. *Talanta*, 80, pp.1347–1355.

Yuniar, E., 2020. Tipe-Tipe Morfologi Tumbuhan Rawa Lebak Di Kelurahan Sei Selayur Kecamatan Kalidoni Sumatera Selatan. *Indobiosains*, 2(1), p.29.

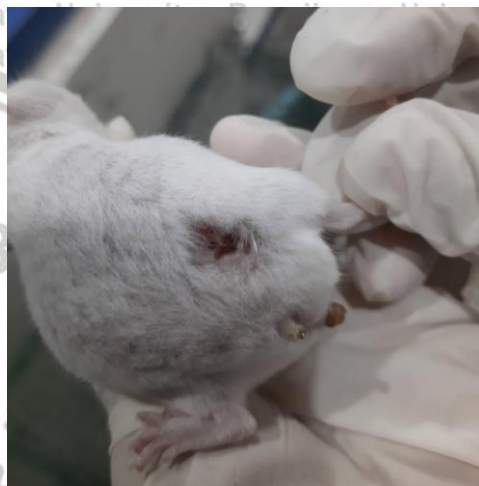


LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi penelitian



Preparasi mencit sebelum dibedah



Luka pada bagian mammae pasca induksi DMBA



Pakan mencit sehari-hari



Kandang mencit





Persiapan jaringan untuk flow cytometry



Lampiran 2. Bukti kelayakan etik penelitian



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 1126-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

**PENELITIAN BERJUDUL : POTENSI CHERAL SEBAGAI AGEN ANTI KANKER  
PADA MENCIT MODEL KANKER PAYUDARA**

**PENELITI : MUHAIMIN RIFA'I**

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**DINYATAKAN : LAIK ETIK**

Malang, 24 April 2019



Ketua, Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya

Dr. drh. Aulanni'am, DES.

NIP. 19600903 198802 2 001



Lampiran 3. Hasil statistik

Deskripsi Data

**Descriptives**

CD66a+IL2

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol Negatif	3	36,3667	3,82797	2,21008	26,8575	45,8759	32,30	39,90
DMBA	3	54,8333	8,50431	4,90997	33,7074	75,9592	45,20	61,30
DMBA+Cisplatin	3	37,2000	6,36946	3,67741	21,3774	53,0226	32,30	44,40
DMBA+D1	3	36,9667	1,95021	1,12596	32,1221	41,8113	35,00	38,90
DMBA+D2	3	31,5333	2,43379	1,40515	25,4875	37,5792	28,90	33,70
DMBA+D3	3	25,1667	11,20907	6,47156	-2,6782	53,0115	15,60	37,50
DMBA+D4	3	39,1667	12,65557	7,30669	7,7285	70,6048	26,30	51,60
Total	21	37,3190	10,77788	2,35193	32,4130	42,2251	15,60	61,30

**a. Uji Normalitas**

**Tests of Normality**

Kelompok_Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CD66a+IL2 Kontrol Negatif	,222	3	.	,985	3	,769
DMBA	,312	3	.	,896	3	,373
DMBA+Cisplatin	,308	3	.	,902	3	,393
DMBA+D1	,177	3	.	1,000	3	,972
DMBA+D2	,243	3	.	,972	3	,681
DMBA+D3	,264	3	.	,954	3	,589
DMBA+D4	,180	3	.	,999	3	,943

a. Lilliefors Significance Correction

**b. Hasil Uji Homogenitas**

**Test of Homogeneity of Variances**

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CD66a+IL2 Based on Mean	1,970	6	14	,139
Based on Median	,867	6	14	,542



Based on Median and with adjusted df	,867	6	8,128	,556
Based on trimmed mean	1,886	6	14	,154

c. Uji One-Way

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1477,092	6	246,182	4,073	,014
Within Groups	846,160	14	60,440		
Total	2323,252	20			

d. Uji Post Hoc Tukey

Perlakuan 1	Perlakuan 2	p-value	$\alpha$	Keterangan
Kontrol Negatif	DMBA	,120	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+Cisplatin	1,000	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D1	1,000	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D2	,985	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D3	,589	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D4	,999	0,05	Tidak signifikan
DMBA	Kontrol Negatif	,120	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+Cisplatin	,149	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D1	,140	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D2	,032	0,05	Signifikan
	DMBA+D3	,005	0,05	Signifikan
	DMBA+D4	,242	0,05	Tidak signifikan
DMBA+Cisplatin	Kontrol Negatif	1,000	0,05	Tidak signifikan
	DMBA	,149	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D1	1,000	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D2	,968	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D3	,513	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D4	1,000	0,05	Tidak signifikan
DMBA+D1	Kontrol Negatif	1,000	0,05	Tidak signifikan
	DMBA	,140	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+Cisplatin	1,000	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D2	,974	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D3	,534	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D4	1,000	0,05	Tidak signifikan

DMBA+D2	Kontrol Negatif	,985	0,05	Tidak signifikan
	<b>DMBA</b>	<b>,032</b>	<b>0,05</b>	<b>Signifikan</b>
	DMBA+Cisplatin	,968	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D1	,974	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D3	,945	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D4	,882	0,05	Tidak signifikan
DMBA+D3	Kontrol Negatif	,589	0,05	Tidak signifikan
	<b>DMBA</b>	<b>,005</b>	<b>0,05</b>	<b>Signifikan</b>
	DMBA+Cisplatin	,513	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D1	,534	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D2	,945	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D4	,351	0,05	Tidak signifikan
DMBA+D4	Kontrol Negatif	,999	0,05	Tidak signifikan
	DMBA	,242	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+Cisplatin	1,000	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D1	1,000	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D2	,882	0,05	Tidak signifikan
	DMBA+D3	,351	0,05	Tidak signifikan

**CD66a+IL2**

Tukey HSD<sup>a</sup>

Kelompok_Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
DMBA+D3	3	25,1667 b	
DMBA+D2	3	31,5333 b	
Kontrol Negatif	3	36,3667 ab	36,3667 ab
DMBA+D1	3	36,9667 ab	36,9667 ab
DMBA+Cisplatin	3	37,2000 ab	37,2000 ab
DMBA+D4	3	39,1667 ab	39,1667 ab
DMBA	3		54,8333 a
Sig.		,351	,120

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



