

**EFEK ANTIPROLIFERASI EKSTRAK DAUN  
*PIPER CROCATUM RUIZ & PAV* PADA  
GALUR SEL KANKER PAYUDARA  
T47D**

**T E S I S**

**ALDRIN NEILWAN PANCAPUTRA**

**0706170904**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
JAKARTA  
2009**

**EFEK ANTIPROLIFERASI EKSTRAK DAUN  
*PIPER CROCATUM RUIZ & PAV* PADA  
GALUR SEL KANKER PAYUDARA  
T47D**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister

ALDRIN NEILWAN PANCAPUTRA

0706170904

UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS KEDOKTERAN

PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK

JAKARTA

2009

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Aldrin Neilwan Pancaputra

NPM : 0706170904

Tanda tangan



Tanggal : 1 Mei 2009

## LEMBAR PENGESAHAN

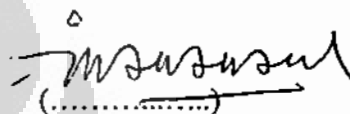
Tesis ini diajukan oleh :

Nama : ALDRIN NEILWAN PANCAPUTRA  
NPM : 0706170904  
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik  
Judul tesis : **Efek Antiproliferasi Ekstrak Daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav pada Galur Sel Kanker Payudara T47D**

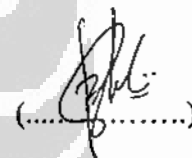
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Biomedik pada Program Studi Magister Ilmu Biomedik Kekhususan Onkologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

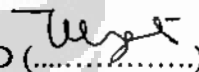
Pembimbing I : Dr. rer physiol, dr, Septelia Inawati Wanandi

  
(.....)

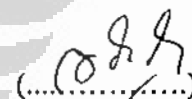
Pembimbing II : Ferry Sandra Ph.D

  
(.....)


Penguji I : dr. Nuryati Chairani Siregar, MS, SpPA(K), Ph.D

  
(.....)

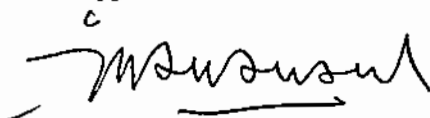
Penguji II : dr. Sri Widia A. Jusman, MS

  
(.....)

Penguji III : Ahmad R. Utomo Ph.D

  
(.....)

Ditetapkan di : Jakarta  
Tanggal : 26 Juni 2009



Dr. rer physiol, dr, Septelia Inawati Wanandi  
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik FKUI

## ABSTRAK

**Latar Belakang :** Kanker merupakan penyebab kematian yang utama didunia. Kanker payudara merupakan kanker yang paling banyak diderita oleh perempuan di dunia , dengan insiden yang terus meningkat dan merupakan penyebab kematian terbanyak pada wanita. Terapi utama kanker payudara adalah pembedahan, namun untuk mencapai kelangsungan hidup yang lebih baik diperlukan modalitas terapi lain. Pemahaman yang semakin mendalam terhadap karsinogenesis kanker payudara memberi dampak terhadap terapi non bedah. Sejak kurang lebih 30 tahun yang lalu , National Cancer Institute melakukan penelitian terhadap penggunaan tumbuhan sebagai obat tradisional untuk menjadi obat anti kanker. Berdasarkan pengalaman ini maka Stem Cell and Cancer Institute melakukan penelitian terhadap tanaman obat tradisional suku dayak untuk dikembangkan menjadi obat antikanker.

**Tujuan :** penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antiproliferasi serta mekanisme kerja dari ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* terhadap galur sel kanker payudara (T47D).

**Metode :** efek antiproliferasi dan mekanisme kerja ekstrak diteliti berdasarkan efeknya terhadap viabilitas sel, gambaran morfologi inti, siklus sel, serta ekspresi dari p44 dan p42 yang terfosforilasi sebagai petanda terjadinya sinyal proliferasisel.

**Hasil :** Berdasarkan hasil yang diperoleh terlihat bahwa terjadi penurunan pertumbuhan sel pada pemberian ekstrak konsentrasi tertentu yang tidak disertai dengan perubahan morfologi inti serta tidak terjadi perubahan gambaran siklus sel pada fase Sub-G1. Pada pemberian ekstrak terjadi penurunan ekspresi dari p44/42 yang terfosforilasi. Penurunan ekspresi p44/42 juga terjadi pada pemberian ekstrak pada medium yang telah diinkubasi dengan insulin. Penurunan ekspresi p44/42 terfosforilasi ini menunjukkan bahwa efek antiproliferasi ekstrak berlangsung melalui jalur aktivasi p44/42.

**Kesimpulan :** berdasarkan data yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak *Piper crocatum Ruiz & Pav* dapat menghambat pertumbuhan galur sel kanker payudara (T47D) melalui penghambatan fosforilasi p44/42

**Kata kunci :** *Piper crocatum Ruiz & Pav*, ekstrak, antiproliferasi, sel T47D

## ABSTRACT

**Background :** Cancer is a leading cause of death in the world. Breast cancer is most common disease in women. Major therapy for breast cancer is surgery, but to achieve a better result needs another modality. Good understanding about breast cancer carcinogenesis will give a better impact for non surgery therapy. Natural products have been the mainstay of cancer chemotherapy for the past 30 years. Inspired by folk medicine — encouraged the National Cancer Institute (NCI) to begin a large-scale screening programme for antitumour agents. Inspired by the National Cancer Institute (NCI).

screening programme for antitumour agent from east Kalimantan Forest.

**Purpose :** We investigate antiproliferative properties of extract *Piper crocatum Ruiz & Pav* leaves and its mode of action human breast cancer (T47D) cells.

**Methods:** Antiproliferative properties and mechanism of extract were evaluated by its effect on cell viability, nuclear morphology, cell cycle progression and the expression of phosphorylated p44/p42 as a marker for cell proliferation.

**Result:** The results showed that there was a reduction of cell viability by the extract in concentration dependent manner and no alteration of nuclear morphology observed. There were negligible changes observed in Sub-G1 phase formation after extract treatment. Expression of phosphorylated p44 / p42 was decreased due to the extract only. Inclusion the extract in the incubation medium decreased insulin - stimulated phosphorylation of p44 / p42 indicating that antiproliferative effect of the extract was via p44 / p42 pathway.

**Conclusion:** All together, the data indicated that *Piper crocatum* extract inhibits the growth of human breast cancer (T47D) cells via inhibition of p44/42 phosphorylation.

**Keywords :** *Piper crocatum Ruiz & Pav*, extract, antiproliferative, T47D cells.

## UCAPAN TERIMA KASIH

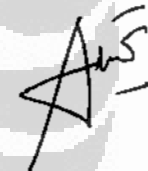
Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan Tesis ini. Penulisan Tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu saya mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr.rer.physiol.dr. Setelia Inawati Wanandi selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini;
2. Ferry Sandra Ph.D selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini;
3. Prof.dr. Siti Boedina Kresno SpPK(K) selaku ketua ketua kekhususan Onkologi
4. Dr.dr. Aida Suriadiredja SpKK(K) selaku sekretaris kekhususan Onkologi
5. Dina Yulia Ph.D, yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini;
6. Enos Tangke Arung PhD, yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini;
7. Britanto Dani Wicaksono Ssi, yang telah banyak membantu dalam usaha memperoleh data yang diperlukan;
8. Yohana Ayupriyanti Handoko Ssi, yang telah banyak membantu dalam usaha memperoleh data yang diperlukan;
9. Irawan Wijaya Kusuma, yang telah banyak meluangkan waktu dalam proses pencarian dan pengumpulan tanaman

10. Direksi Rumah sakit Kanker Dharmais yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Magister Ilmu Biomedik kekhususan Onkologi
11. Pihak SCI yang telah banyak membantu saya dalam menyediakan sarana yang saya perlukan;
12. Istri dan kedua anak saya yang telah banyak memberikan bantuan material dan moral; dan
13. Semua pihak yang telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Akhir kata saya berharap semoga Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Jakarta, 1 Mei 2009



Penulis



**PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK  
KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : ALDRIN NEILWAN PANCAPUTRA

NPM : 0706170904

Program Studi : MAGISTER ILMU BIOMEDIK

Fakultas : KEDOKTERAN

Jenis karya : TESIS

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia

## DAFTAR ISI

|  |      |
|--|------|
| HALAMAN JUDUL.....                           | i    |
| LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS.....          | ii   |
| LEMBAR PENGESAHAN.....                       | iii  |
| ABSTRAK.....                                 | iv   |
| ABSTRACT.....                                | v    |
| UCAPAN TERIMA KASIH.....                     | vi   |
| LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI..... | viii |
| DAFTAR ISI.....                              | ix   |
| DAFTAR GAMBAR.....                           | xii  |
| DAFTAR TABEL.....                            | xiv  |
| DAFTAR GRAFIK.....                           | xv   |
| DAFTAR SINGKATAN.....                        | xvi  |
| DAFTAR LAMPIRAN.....                         | xvii |

### **BAB I PENDAHULUAN**

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| 1. Latar Belakang.....        | 1 |
| 2. Pertanyaan Penelitian..... | 4 |
| 3. Tujuan Penelitian.....     | 4 |
| 4. Manfaat Penelitian.....    | 5 |

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

|   |    |
|---|----|
| 1. Kanker Payudara.....                                   | 7  |
| 2. Alur Penyinalan <i>MAPK</i> .....                      | 8  |
| 3. Siklin D1 dan Kanker Payudara.....                     | 9  |
| 4. Terapi Kanker Payudara.....                            | 12 |
| 5. Galur Sel Kanker Payudara T47D.....                    | 13 |
| 6. <i>Piper crocatum Ruiz &amp; Pav.</i> .....            | 13 |
| 6.1. Deskripsi.....                                       | 13 |
| 6.2. Klasifikasi.....                                     | 15 |
| 6.3. Penggunaan sebagai Tanaman Obat.....                 | 15 |
| 6.4. Penelitian yang Pernah Dilakukan.....                | 16 |
| 6.4.1. Aktivitas Antioksidan.....                         | 16 |
| 6.4.2. Aktivitas Anti Inflamasi.....                      | 19 |
| 6.4.3. Aktivitas Insektisida.....                         | 20 |
| 7. <i>Micro culture Tetrazolium Technique (MTT)</i> ..... | 20 |
| 8. Pemeriksaan DNA Sub-G1 Apoptosis .....                 | 21 |
| 9. Pewarnaan DAPI .....                                   | 21 |
| 10. Western Blot .....                                    | 22 |

### **BAB III METODE PENELITIAN**

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 1. Desain Penelitian.....           | 23 |
| 2. Tempat dan Waktu Penelitian..... | 23 |
| 3. Cara Kerja.....                  | 23 |
| 3.1. Bahan.....                     | 23 |
| 3.2. Prosedur.....                  | 24 |

### **BAB IV HASIL PENELITIAN**

|  |    |
|--|----|
| 1. Pemeriksaan <i>MTT</i> .....          | 39 |
| 2. Pemeriksaan DNA SubG-1 Apoptosis..... | 40 |
| 3. Pemeriksaan Pewarnaan DAPI.....       | 42 |
| 4. Pemeriksaan Western Blot.....         | 43 |

### **BAB V PEMBAHASAN.....**

45

### **BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN**

|                    |    |
|--------------------|----|
| 1. Kesimpulan..... | 49 |
| 2. Saran.....      | 49 |

### **DAFTAR PUSTAKA.....**

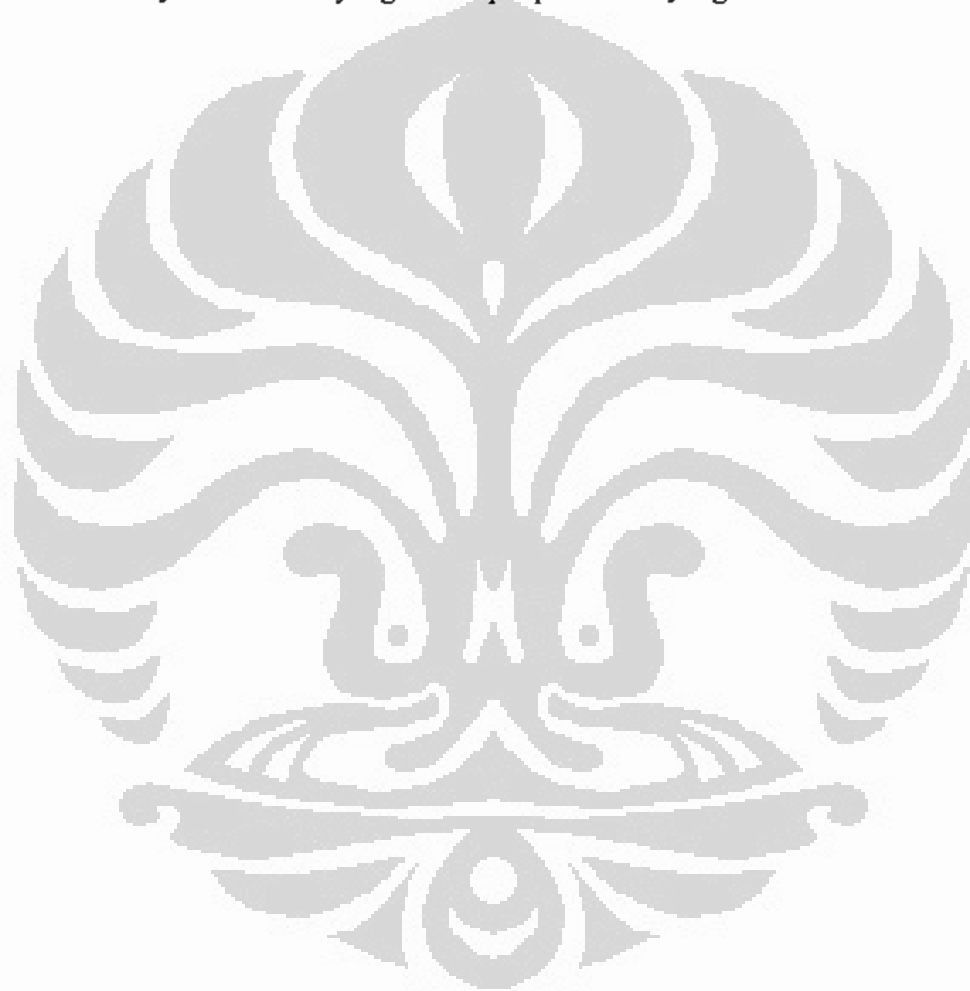
50

## DAFTAR GAMBAR

|  |    |
|--|----|
| Gambar 1 : Alur penyinalan <i>MAPK</i> .....   | 9  |
| Gambar 2 : Hubungan Siklin dengan alur penyinalan mitogenik dan<br>Siklus sel.....   | 10 |
| Gambar 3 : Hubungan Siklin dengan faktor transkripsi dalam siklus sel .....  | 11 |
| Gambar 4 : Daun <i>Piper crocatum Ruiz &amp; Pav</i> .....   | 14 |
| Gambar 5 : Pembentukan kristal Formazan oleh aktivitas enzim<br>Mitokondria reduktase .....  | 21 |
| Gambar 6 : Kondensasi kromosom pada inti sel .....   | 22 |
| Gambar 7 : Alur pemeriksaan <i>MTT</i> .....   | 26 |
| Gambar 8 : Alur pemeriksaan DNA sub-G1 apoptosis .....   | 28 |
| Gambar 9 : Alur pemeriksaan pewarnaan DAPI .....   | 31 |
| Gambar 10: Alur pemeriksaan ekspresi protein p44/p42 terfosforilasi .....  | 38 |
| Gambar 11: Efek ekstrak daun <i>Piper crocatum Ruiz &amp; Pav</i> terhadap<br>galur sel kanker payudara T47D .....                       | 39 |
| Gambar 12: Efek ekstrak daun <i>Piper crocatum Ruiz &amp; Pav</i> terhadap<br>galur sel kanker payudara dengan menggunakan FacsCalibur.. | 40 |

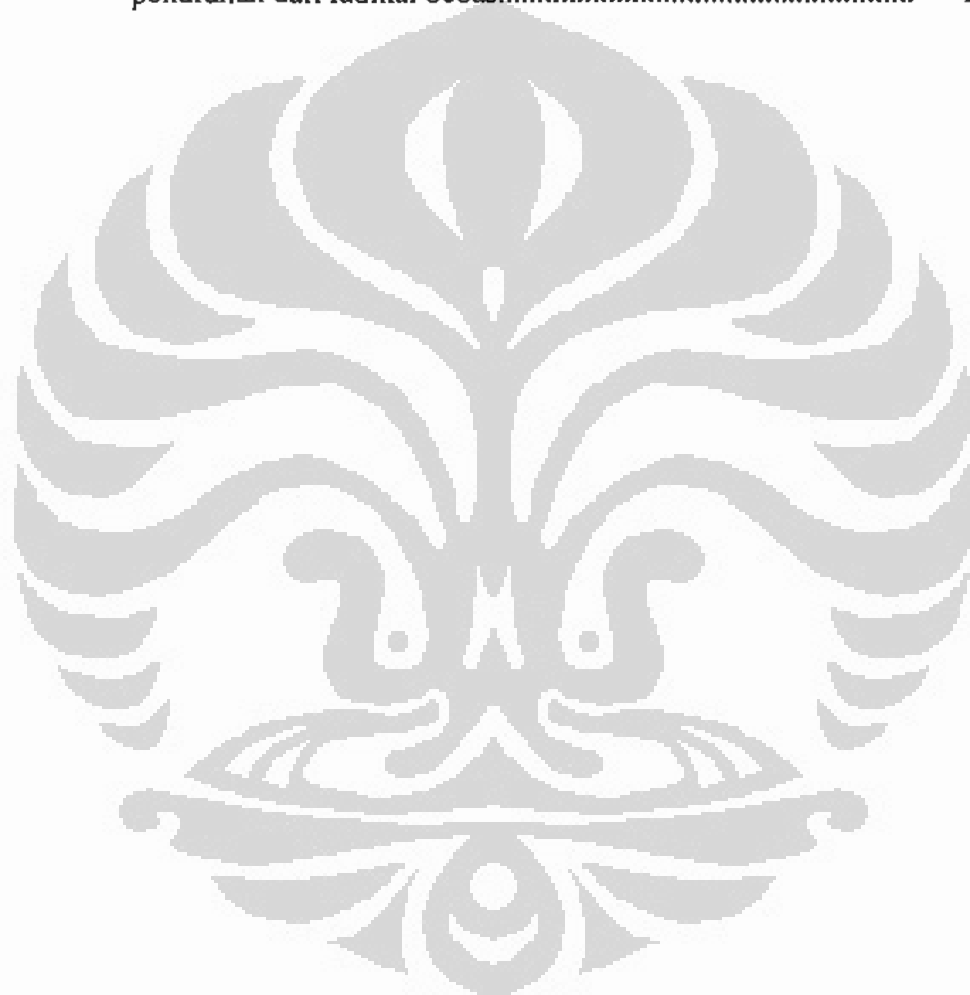
Gambar 13: Hasil pemeriksaan DAPI dengan mikroskop fluoresen dengan  
pembesaran 400x pada galur sel kanker payudara dengan  
perlakuan yang berbeda..... 42

Gambar 14: Hasil pemeriksaan Western Blot pada galur sel kanker  
Payudara T47D yang mendapat perlakuan yang berbeda..... 43



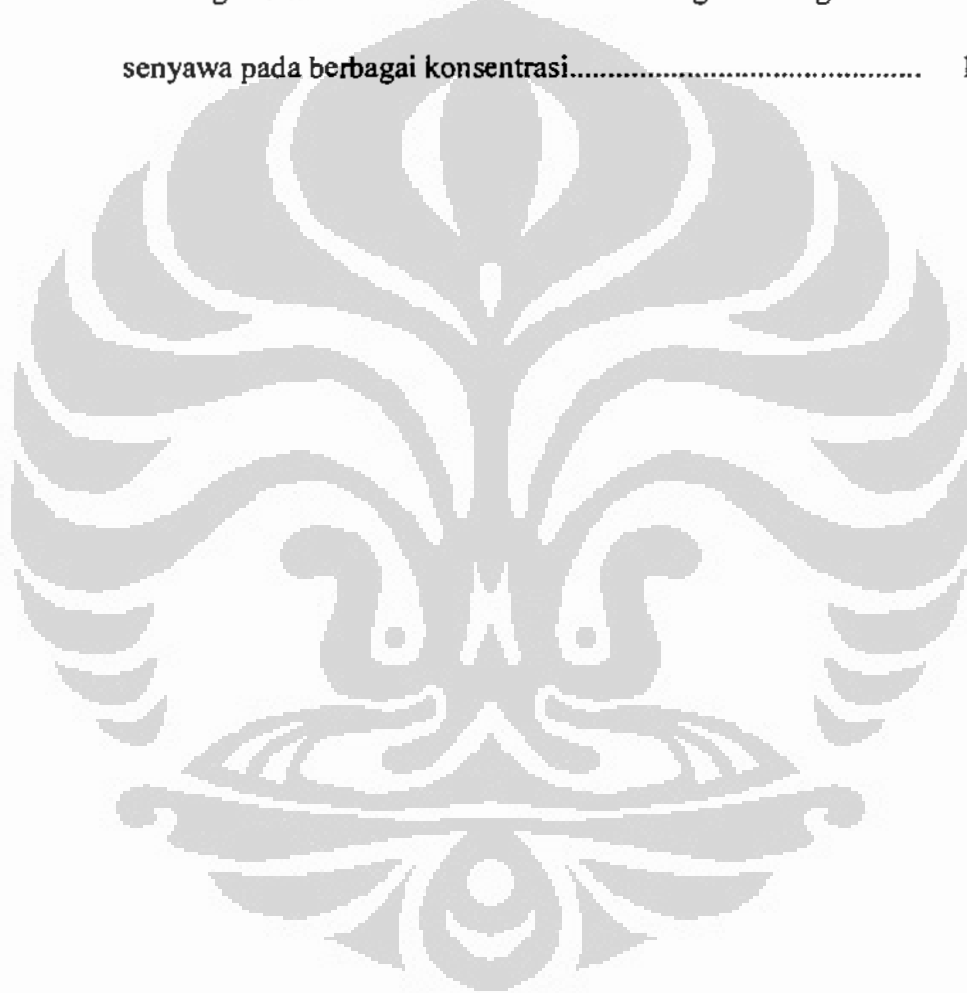
## DAFTAR TABEL

|   |    |
|---|----|
| Tabel 1 : Kemampuan aktivitas antioksidan pada senyawa<br>1-6 hidroquinon dan trolox yang ditentukan berdasarkan<br>penurunan dari radikal bebas..... | 16 |
|---|----|



## DAFTAR GRAFIK

- Grafik 1 : Inhibisi radikal DPPH oleh berbagai konsentrasi  
dari senyawa 1-6 dan Trolox..... 17
- Grafik 2 : Hubungan antara waktu induksi luminesen dengan berbagai  
senyawa pada berbagai konsentrasi..... 17





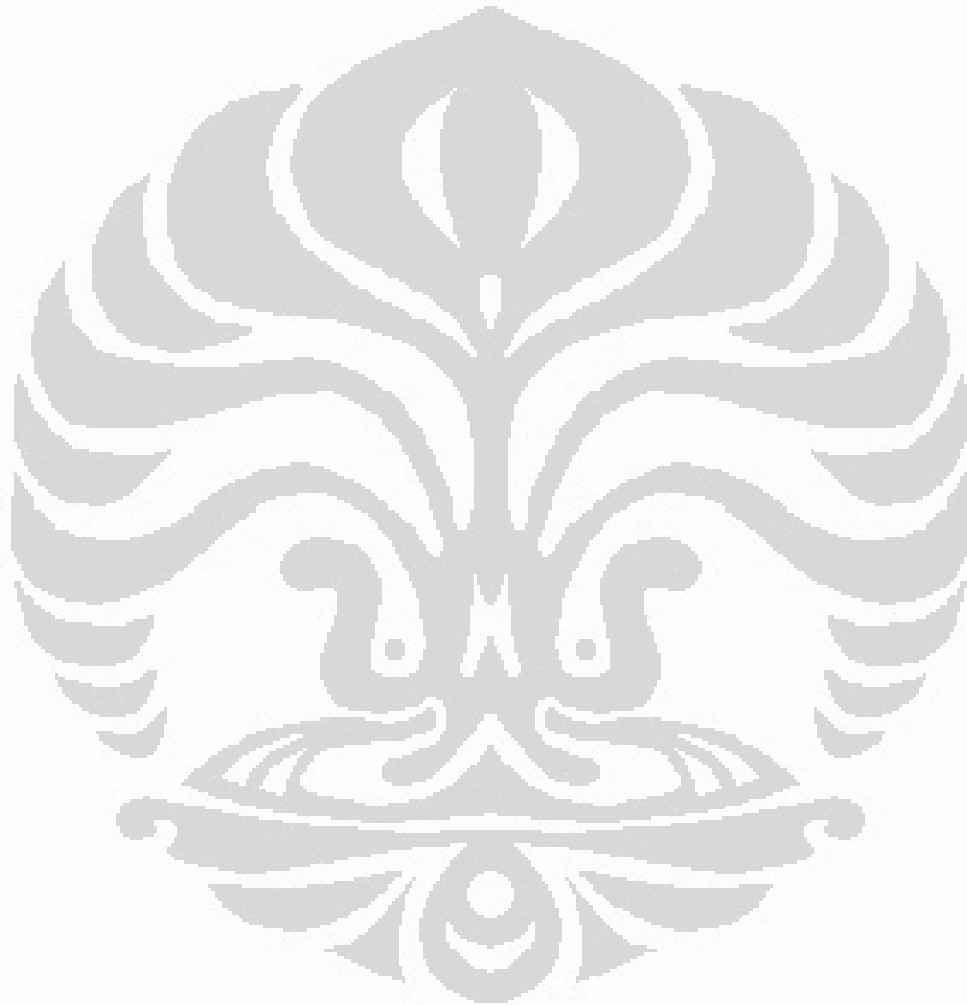
## DAFTAR SINGKATAN

|        |  |
|--------|--|
| ABAP   | 2,2-azo-bis (2-amidinopropane)                 |
| CDK    | <i>Cyclin dependent kinase</i>                 |
| cAMP   | <i>Cyclic adenosin monophosphate</i>           |
| DAPI   | 4',6-diamidino-2-phenylindole                  |
| DMSO   | Dimethyl sulfoxide                             |
| DNA    | <i>Deoxyribo nucleic acid</i>                  |
| DPPH   | 1,1-diphenyl- 2- picryl- hydrazyl              |
| EGF    | <i>Epidermal growth factor</i>                 |
| EGFR   | <i>Epidermal growth factor receptor</i>        |
| ER     | <i>Estrogen receptor</i>                       |
| ERK    | <i>Extracellular signaling response kinase</i> |
| Grb    | <i>Growth factor receptor binding protein</i>  |
| HER    | Human EGF receptor                             |
| IGF    | <i>Insulin-like growth factor</i>              |
| IGF-1R | <i>Insulin-like growth factor-1 receptor</i>   |
| MAPK   | <i>Mitogen-activated protein kinase</i>        |
| MEK    | MAP kinase/ERK kinase                          |
| MTT    | Microculture tetrazolium technique             |
| SH 2   | <i>Src-homology 2</i>                          |
| Sos    | <i>Son of sevenless</i>                        |

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 : Draft artikel

Lamipran 2 : Daftar riwayat hidup



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1. Latar Belakang

Kanker merupakan salah satu masalah kesehatan dan penyebab kematian yang utama tidak hanya di negara maju tetapi juga di Negara yang sedang berkembang. Angka kematian akibat kanker diseluruh dunia mencapai sekitar 72 %.<sup>1</sup> Pada saat ini perkiraan angka kejadian kasus kanker baru sekitar 170-190 kasus per 100.000 penduduk.<sup>2,3</sup> Angka kejadian kanker yang terus meningkat menyebabkan kanker menempati urutan ke 6 dari seluruh kejadian penyakit terbanyak yaitu setelah penyakit infeksi, penyakit gangguan kardiovaskuler, kecelakaan, defisiensi nutrisi dan penyakit bawaan.<sup>2-5</sup>

Kanker payudara merupakan kanker yang paling banyak diderita oleh perempuan di dunia, dengan insiden yang terus meningkat di negara-negara maju dan di Asia serta merupakan penyebab kematian terbanyak pada perempuan.<sup>6</sup> Terdapat lebih dari satu juta penderita baru setiap tahun di seluruh dunia dan sekitar 350.000 diantaranya berada di Asia.<sup>7</sup> Di Indonesia, kanker payudara menempati urutan kedua terbanyak pada perempuan setelah kanker serviks uteri. Berdasarkan data yang terdapat di Rumah Sakit Kanker Dharmais pada tahun 1998-2003 menunjukkan bahwa jumlah penderita kanker payudara hampir sama dengan jumlah penderita kanker serviks. Angka penderita kanker payudara pada periode tahun 2002-2003 sudah melampaui jumlah penderita kanker serviks uteri. Jumlah penderita kanker serviks pada tahun 2002 di Rumah Sakit Kanker Dharmais dibandingkan dengan jumlah seluruh penderita kanker lainnya adalah 114 (13,8%) dan kanker payudara 252 (30,4%) sedangkan pada tahun 2003 jumlah penderita kanker serviks adalah 132 (16,3%) dan kanker payudara sebanyak 169 (20,8%).<sup>8</sup>

Proliferasi sel kanker terjadi oleh karena adanya rangsangan reseptor pada membran sel melalui mekanisme pensinyalan (*signaling pathways*) yang sangat rumit untuk mendapatkan tanggapan (*response*) dari berbagai gen didalam inti sel. Pensinyalan proliferasi ini berkonvergensi pada sistem *mitogen-activated protein kinase (MAPK)*.<sup>9,10,11</sup> sebagai bagian penting sistem pensinyalan reseptor tirosin kinase<sup>12,13,14</sup> yang pada akhirnya akan diterima oleh gen dan ditanggapi berupa respon proliferasi. Proliferasi sel akan terjadi apabila siklus sel menjadi aktif yang diawali dengan ekspresi protein yang pertama kali dibentuk pada siklus sel yaitu Siklin D1.<sup>15</sup>

Saat ini terapi utama kanker payudara adalah melalui pembedahan, namun dalam upaya mencapai tingkat kelangsungan hidup yang lebih baik sering kali diperlukan modalitas terapi lain.<sup>16,17</sup> Dalam upaya pengembangan pengobatan kanker saat ini, banyak dilakukan penelitian terhadap obat anti kanker yang berdasarkan pada mekanisme pertumbuhan sel kanker seperti pengobatan dengan terapi target. Terapi target dianggap lebih spesifik dan aman dibandingkan dengan kemoterapi. Hal ini dapat dilakukan dengan cara menghambat aktivasi proto-onkogen atau dengan cara mengaktivasi protein penekan tumor.

Pemahaman yang semakin mendalam mengenai karsinogenesis kanker payudara membawa dampak terhadap perbaikan terapi non bedah. Beberapa tahun terakhir ini, banyak dilakukan penelitian yang berhubungan dengan protein kinase. Protein kinase dijadikan target karena peranannya yang sangat penting dalam transduksi sinyal yang menyebabkan diferensiasi, pertumbuhan, dan kematian sel. Berdasarkan hal tersebut, maka banyak dilakukan penelitian sehubungan dengan penghambatan sinyal transduksi yang melalui protein kinase sehingga diharapkan akan menyebabkan hambatan proliferasi pada sel kanker.<sup>18</sup>

Tujuan dari terapi target ini adalah penghambatan terhadap kaskade pensinyalan sehingga proses transkripsi tidak dapat terjadi. Terapi target yang dipakai pada terapi kanker payudara adalah :<sup>19</sup>

- Menghambat pembentukan tirosin kinase.
- Memblokir reseptor *Epidermal Growth Factor (EGF)* yang lebih dikenal dengan *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)* atau *Human EGF Receptor (HER)*.
- Memblokir reseptor *Insulin Growth Factor -1 (IGF-1R)*
- Membuat anti-MAPK
- Membuat anti-Siklin D-1

Berdasarkan fungsinya, terapi target pada karsinogenesis payudara dibagi menjadi dua, yaitu (1) hormonal yang berperan dalam diferensiasi dan integritas sel dan (2) non hormonal yang berperan dalam pertumbuhan termasuk pada transduksi sinyal.<sup>20</sup>

Penggunaan bahan tanaman sebagai obat kemoterapi sudah dimulai sejak 30 tahun yang lalu. Suku Indian Amerika telah menggunakan ekstrak yang berasal dari akar *Mayapple (Podophyllum peltatum)* untuk mengobati kanker kulit dan kutil pada genital. *Podophyllum peltatum* yang mengandung podophilotoksin termasuk dalam kelompok anti kanker golongan podophillin termasuk didalamnya adalah Etoposide dan Teniposide. Selain itu tumbuhan *Catharanthus roseus* yang juga dikenal sebagai *Vinca rosea* atau *Rosey periwinkle* yang mengandung *Vinblastine* dan *Vincristine* diketahui memiliki efek sitotoksik. Bahan-bahan alam ini telah terbukti berperan dalam pengobatan beberapa jenis kanker.<sup>21,22</sup>

Penemuan yang diinspirasi dari pengobatan tradisional ini, memprakarsai *The National Cancer Institute* pada tahun 1960 untuk memulai program skrining dalam skala besar terhadap bahan alam yang dapat digunakan sebagai anti tumor. Sejak tahun 1960 sampai dengan tahun 1982 telah dilakukan evaluasi terhadap 35.000 jenis tanaman khususnya efektivitasnya terhadap galur sel leukemia tikus L1210 dan P388. Berdasarkan skrining tersebut didapatkan bahan dengan hasil yang terbaik yaitu *Paclitaxel (Taxol)*, yang diperoleh dari *Taxus brevifolia*. Pada tahun 1885 *The National Cancer Institute* memulai program baru yaitu dengan melakukan skrining

ekstrak baik yang berasal dari tumbuhan, hewan dan mikroorganisme terhadap 60 galur sel kanker pada manusia termasuk tumor solid dan beberapa jenis leukemia.<sup>23,24</sup>

Berdasarkan pengalaman dari National Cancer Institute dalam mengembangkan penelitian terhadap tanaman obat tradisional yang dapat dikembangkan menjadi obat anti kanker, maka *Stem Cell and Cancer Institute* bekerja sama dengan Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman melakukan survei terhadap berbagai jenis tanaman obat yang umum digunakan oleh masyarakat tradisional suku dayak dalam mengobati kanker. Berdasarkan hasil survei yang telah dilakukan, diperoleh 70 jenis tanaman yang selanjutnya akan dianalisa berdasarkan literatur dan tes laboratotrium dalam fungsinya sebagai anti kanker.

## 2. Pertanyaan Penelitian

Berdasarkan latar belakang permasalahan tersebut, maka dapat dirumuskan beberapa pertanyaan penelitian sebagai berikut:

- Apakah ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* memiliki efek antiproliferasi pada galur sel kanker payudara T47D ?
- Bagaimanakah mekanisme kerja ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* sebagai antiproliferasi pada galur sel kanker payudara T47D ?

## 3. Tujuan Penelitian

### 3.1. Tujuan Umum:

Menganalisa potensi antiproliferasi ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* pada galur sel kanker payudara T47D.

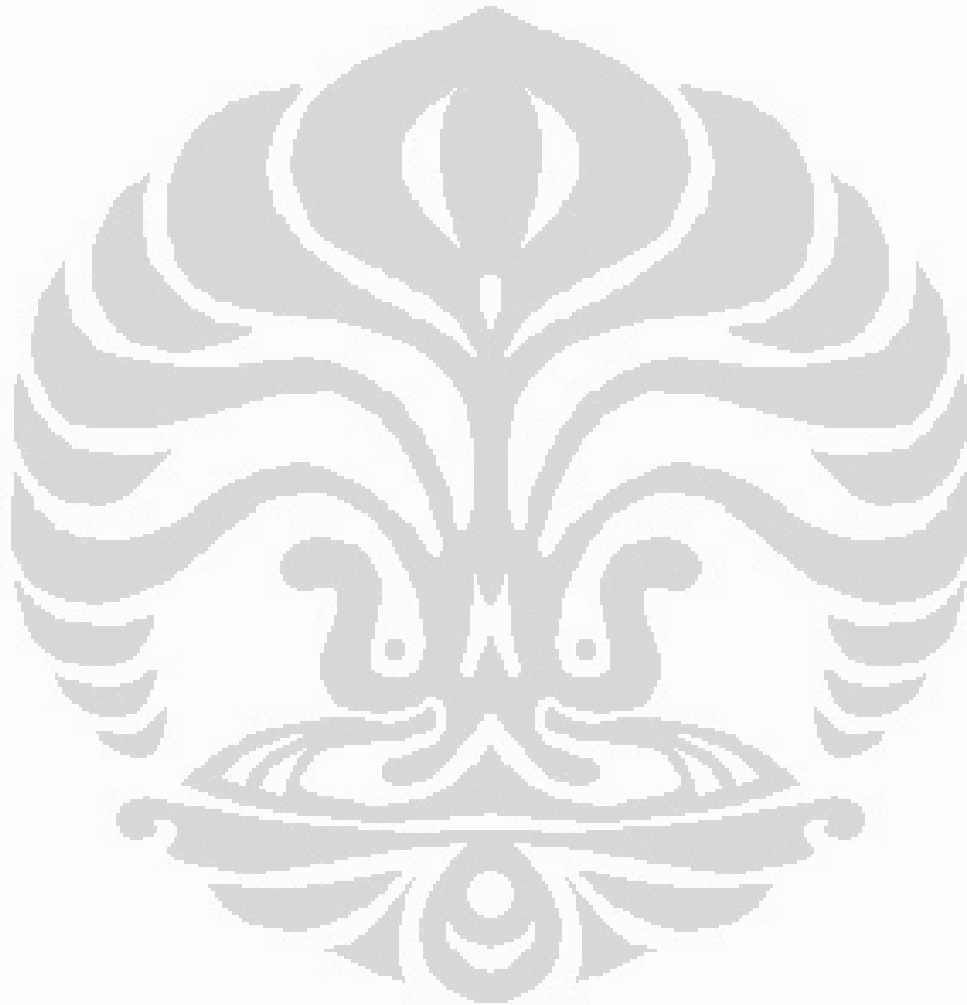
### 3.2. Tujuan Khusus:

- Menganalisa viabilitas sel pada galur sel kanker payudara T47D yang mendapat ekstrak *Piper crocatum Ruiz & Pav* 50 µg/mL dengan menggunakan pemeriksaan *Microculture Tetrazolium Technique (MTT)*.
- Menganalisa adanya apoptosis sel pada galur sel kanker payudara T47D yang mendapat ekstrak *Piper crocatum Ruiz & Pav* 50 µg/mL dengan menggunakan pemeriksaan DNA SubG-1 apoptosis.
- Menganalisa gambaran inti sel pada galur sel kanker payudara T47D yang mendapat ekstrak *Piper crocatum Ruiz & Pav* 50 µg/mL dengan menggunakan pemeriksaan 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).
- Menganalisa ekspresi protein p44, p42 pada galur sel kanker payudara T47D yang mendapat ekstrak *Piper crocatum Ruiz & Pav* 50 µg/mL dengan menggunakan pemeriksaan Western Blot.

### 4. Manfaat Penelitian

- Penelitian ini diharapkan bermanfaat baik bagi institusi pendidikan, profesi maupun institusi kesehatan.
- Bagi institusi pendidikan, penelitian akan membuktikan teori mengenai efek antiproliferasi ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* yang dapat digunakan sebagai terapi komplement pada kanker payudara. Hasil penelitian dapat pula dimanfaatkan sebagai bahan pengajaran pada program magister terutama yang berhubungan dengan pemanfaatan obat bahan alam.
- Bagi kalangan profesi medis, penelitian ini diharapkan bermanfaat dalam membuka wawasan baru pada penggunaan obat bahan alam sebagai terapi komplement pada penderita kanker payudara.

- Bagi intitusi kesehatan, hasil yang didapat dari penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat dalam pengembangan pelayanan komplementer khususnya pengobatan komplementer pada kanker payudara sebagai upaya meningkatkan hasil pengobatan konvensional.





## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 1. Kanker Payudara

Kelenjar payudara mengalami perubahan progresis sejak lahir dan masa kanak-kanak yang memuncak pada saat pubertas. Perkembangan payudara dapat terlihat dari bentuk luar, jumlah dan struktur kelenjar, serta derajat diferensiasi lobus-lobus dan alveoli didalamnya. Saluran-saluran pada kelenjar payudara mengalami elongasi dan percabangan progresif yang dipengaruhi oleh hormon pertumbuhan dan faktor-faktor pertumbuhan.<sup>25</sup>

Saat pubertas, kelenjar mammae mulai menampakkan aktivitas pertumbuhan baik di jaringan glanduler maupun stroma disekelilingnya. Pertumbuhan lobulus pada payudara perempuan terjadi pada 1-2 tahun setelah menstruasi pertama. Setelah itu perkembangan kelenjar payudara terjadi secara bervariasi pada setiap perempuan. Diferensiasi lengkap kelenjar payudara merupakan proses bertahap yang memakan waktu bertahun-tahun dan hanya terjadi pada perempuan yang pernah hamil, terutama yang mencapai kehamilan cukup bulan pada usia muda.<sup>25</sup>

Kanker payudara terjadi secara bertahap mulai dari lesi proliferasif jinak sampai karsinoma dengan perubahan genetik. Perubahan genetik dapat disebabkan oleh zat-zat yang mempengaruhi *Deoxyribo nucleic acid* (DNA) yang dapat bersal dari lingkungan yang selanjutnya disusul dengan terjadinya berbagai defek pada *checkpoints* siklus sel yang menjadi dasar akumulasi kerusakan genetik pada sel epitel payudara yang pada akhirnya dapat membentuk kanker.<sup>26</sup>

Progresivitas sel menjadi maligna berawal dari perubahan lesi proliferasif jinak dan karsinoma insitu menjadi kanker dini (stadium I dan II), kanker lanjut local (stadium III), dan metastasis ke tulang, otak, paru-paru serta organ lainnya (stadium IV). Perubahan dasar yang heterogen terjadi pada sel epitel dan dilanjutkan dengan penekanan apoptosis, disregulasi alur

penyinalan proliferasi, aktivitas onkogen, disregulasi faktor-faktor penghambat pertumbuhan dan hilangnya pengaruh gen-gen penekan tumor.<sup>26</sup>

## 2. Alur Penyinalan *MAPK*

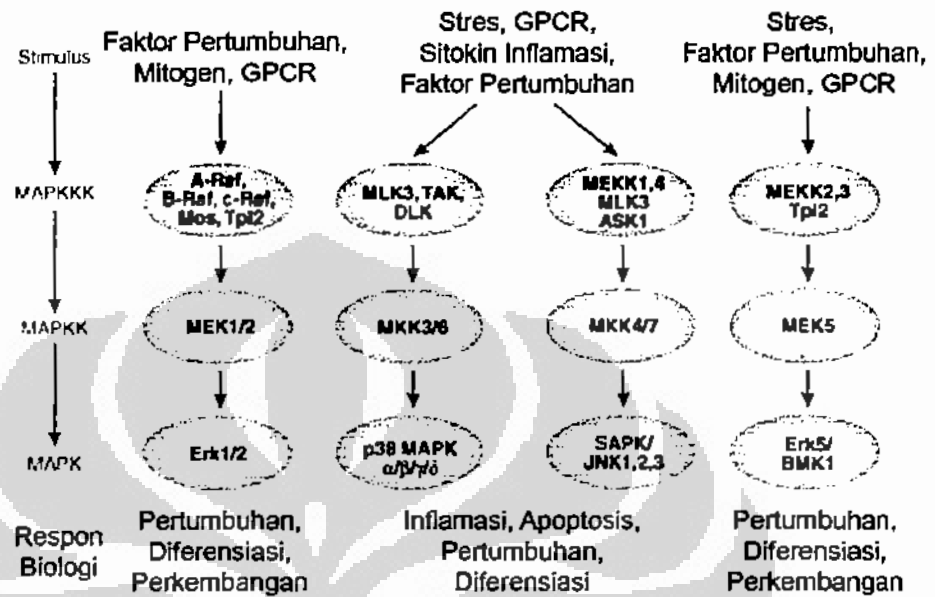
Transduksi sinyal akan menyebabkan inti sel dapat menerima informasi terhadap keadaan lingkungan diluar sel sehingga sel dapat memberikan respon yang sesuai terhadap keadaan lingkungannya. Transduksi sinyal memiliki suatu kaskade kelompok protein yang disebut dengan *mitogen-activated protein kinase (MAPK)*. *MAPK* merupakan komponen yang penting dalam mengatur proses embriogenesis, diferensiasi sel, proliferasi sel serta kematian sel.<sup>27</sup> *p44/p42 (ERK-1/ERK-2)* memiliki peran yang sangat penting dalam alur sinyal kaskade *Ras/MAPK* yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel.<sup>28</sup>

Alur *MAPK* merupakan sistim penyinalan yang berperan dalam berbagai macam tugas pengaturan termasuk dalam mengatur proliferasi sel. Susunan dasarnya merupakan G-protein yang bekerja di hulu sebuah modul inti yang berisi tiga kinase : suatu *MAPK kinase kinase (MAPKKK)* yang memfosforilasi dan mengaktifasi sebuah *MAPK kinase (MAPKK)*, dan kemudian mengaktifasi *MAPK*. Pada alur penyinalan faktor pertumbuhan, modul yang digunakan adalah Ras sebagai G-protein, Raf sebagai *MAPKKK*, MEK sebagai (*MAPK/ERK kinase*) sebagai *MAPKK* dan *Extracellular signaling response kinase (ERK)* sebagai *MAPK*.<sup>29</sup>

Ikatan antara reseptor dengan ligananya akan mengakibatkan dimerisasi reseptor dan autofosforilasi yang menjadikan reseptor dapat berikatan dengan beberapa molekul seperti domain *Src-homology 2 (SH2)*. Ikatan ini akan ditambah dengan *Growth factor receptor binding protein (Grb2)* dan *Son of sevenless (Sos)* yang akan mengaktifkan *Ras*, *Raf*, *MEK*, dan *ERK*. Aktivasi *ERK* akan menginduksi peningkatan transkripsi Siklin D1 yang akan memicu siklus sel.<sup>30</sup>

Penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa terdapat hubungan yang erat antara hipereksresi *MAPK* dengan kanker payudara.<sup>31,32</sup> Beberapa penelitian membuktikan bahwa peningkatan ekspresi *MAPK* aktif terjadi pada proses terjadinya kanker secara *in vivo*.<sup>33</sup>

Berdasarkan pada hasil-hasil penelitian tersebut, menimbulkan pemikiran untuk menggunakan *MAPK* sebagai target terapi pada penderita kanker payudara.

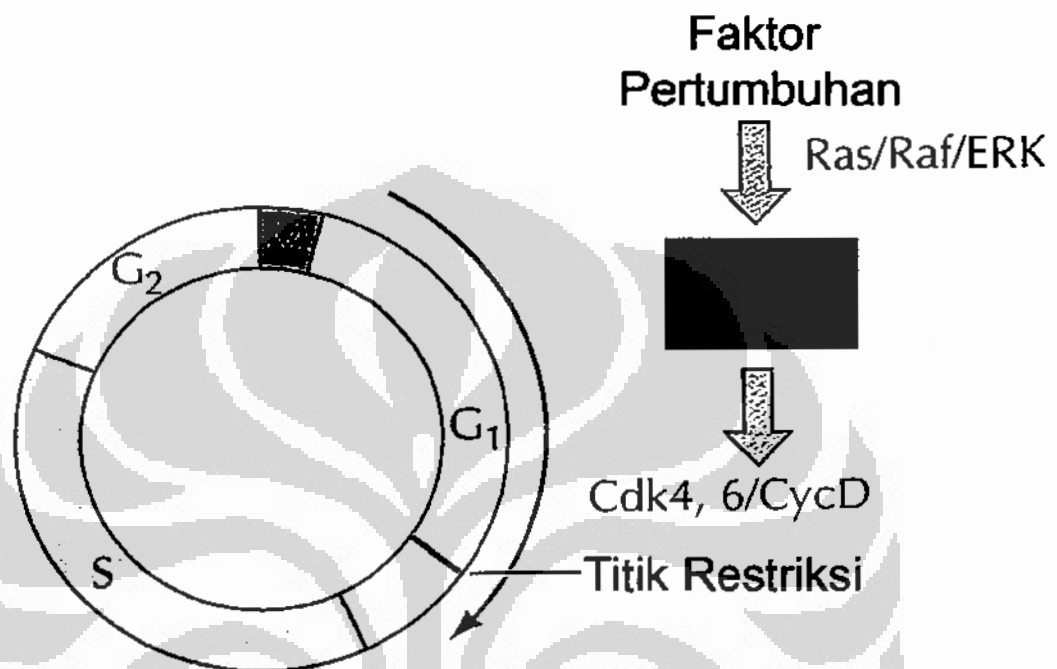


Gambar 1. Alur penyinalan MAPK

### 3. Siklin D1 dan Kanker Payudara

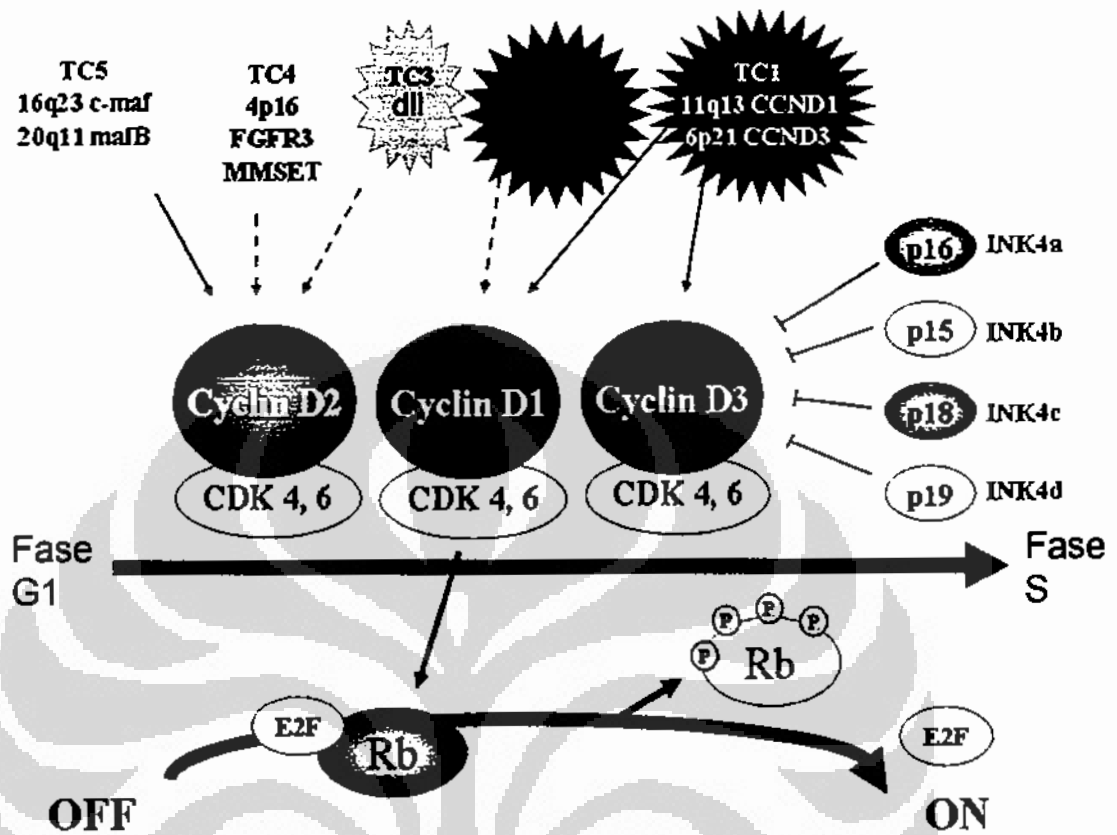
Siklus sel adalah merupakan proses duplikasi sel termasuk materi genetiknya. Protein yang berperan dalam mengatur siklus sel antara lain Siklin dan *Cyclin-dependent kinases* (CDKs). Pembelahan sel bertujuan untuk mereplikasi DNA pada fase S tanpa kesalahan serta membagi dua DNA duplikat sama besar pada kedua sel anaknya pada fase M.<sup>34</sup>

Siklin D merupakan kelompok siklin yang paling dulu muncul pada sel yang kembali memasuki siklus sel setelah diinduksi oleh faktor pertumbuhan. Protein siklin D ini akan memadukan kaskade penyinalan mitogenik dengan siklus sel. Siklin D1 berperan penting pada siklus sel fase G1. Penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa CCND1 yang merupakan gen siklin D1 mengalami amplifikasi pada 20% kanker payudara.<sup>35</sup>



**Gambar 2. Hubungan Siklin D dengan alur pensinyalan mitogenik dan siklus sel**

Siklin D1 akan membentuk kompleks dengan *CDK4* atau *CDK6* yang akan menyebabkan fosforilasi pada produk gen retinoblastoma yang berperan penting didalam mengontrol kemajuan siklus sel. Pada keadaan hipofosforilasi dalam fase G<sub>1</sub> awal, pRB berikatan dengan faktor transkripsi E2F sehingga faktor transkripsi E2F tersebut menjadi inaktif. Faktor transkripsi E2F berperan dalam mentranskripsi gen-gen dalam sintesis DNA. *CDK4* dan *CDK6* yang teraktivasi oleh Siklin D1 akibat stimulasi oleh faktor pertumbuhan, menginduksi fosforilasi pada pRB yang akan menyebabkan terlepasnya ikatan pRB dengan faktor transkripsi E2F. Terlepasnya ikatan antara pRB dengan faktor transkripsi E2F akan menyebabkan faktor transkripsi menjadi aktif sehingga terjadi transkripsi gen-gen yang berperan pada sintesis DNA dalam siklus sel.



**Gambar 3. Hubungan Siklin D dengan faktor transkripsi dalam siklus sel**

Berdasarkan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa Siklin D1 merupakan protein yang berperan pada fase G1 dari siklus sel dan sintesisnya dipengaruhi oleh sinyal dari faktor pertumbuhan, maka penghambatan pada sinyal yang terinduksi oleh faktor pertumbuhan akan menyebabkan penurunan cepat kadar Siklin D1. Penurunan kadar Siklin D1 ini akan menyebabkan siklus sel berhenti pada fase G1.<sup>36</sup>

Siklin D dapat teraktivasi oleh rangsangan mitogenik dari tiga kaskade pensinyalan yaitu faktor pertumbuhan melalui reseptor tirosin kinase, estradiol melalui *Estrogen Receptor* (ER), dan AMP siklik (cAMP) melalui *G-protein-coupled thyrotropin receptors*. Penelitian terdahulu membuktikan bahwa efek mitogenik estradiol berjalan pada alur yang tidak bergantung pada

*MAPK*. Walaupun demikian estradiol juga mengaktivasi alur *MAPK* pada sel yang responsif estrogen (MCF-7), tetapi tidak cukup untuk menghasilkan kadar kinase yang dibutuhkan pada aktivasi pembelahan sel.<sup>37</sup>

#### 4. Terapi Kanker Payudara

Kanker payudara sudah dikenal sejak zaman purba, namun terapi yang berupa operasi baru dimulai sejak abad ke-17 yang dikerjakan oleh ahli bedah Belanda (Adrian Halvetius) berupa lumpektomi dan mastektomi. John Hunter (1728-1793) seorang dokter skotlandia menyatakan bahwa beberapa jenis kanker dapat diobati dengan operasi. William Stewart Halsted pada tahun 1880 dan 1890 an memperkenalkan cara operasi baru pengangkatan payudara yang menghasilkan angka kelangsungan hidup lima tahun sebesar 72% pada pasien tanpa penyebaran ke kelenjar getah bening lokal.<sup>38</sup>

Tindakan pembedahan sampai saat ini masih merupakan modalitas utama pada pengobatan kanker payudara dalam stadium dini. Modalitas pengobatan lain pada kanker payudara dapat berupa radioterapi dan kemoterapi.

Terapi dalam pengobatan kanker payudara yang lain adalah dengan menggunakan obat sitotoksik atau hormon. Terapi ini bersifat sistemik dan memiliki efek samping yang tidak menguntungkan oleh karena obat ini juga berpengaruh terhadap sel yang sehat.

Perkembangan selanjutnya dalam pengobatan kanker adalah penggunaan terapi target dengan tujuan mengurangi jumlah target yang potensial mendapat efek terapi. Terapi target ini bertujuan untuk menghambat aktivasi proto-onkogen sehingga tetap berada dalam keadaan inaktif atau bekerja dengan cara mengunci protein penekan tumor dalam posisi aktif.<sup>39</sup> Terapi target ini bekerja dengan menutup reseptor agar tidak dapat berikatan dengan ligan yang spesifik sehingga menimbulkan hambatan kaskade sinyal dibawahnya yang berakibat tidak terjadinya proses transkripsi.<sup>40</sup>

Pengobatan kanker payudara saat ini diarahkan pada anti reseptor, anti transduksi sinyal, dan anti siklin D1. Terapi target molekuler pada kanker payudara dibagi menjadi dua yaitu

(1) target hormonal, yaitu yang bertanggung jawab dalam mengatur diferensiasi sel dan integritas epitel dan (2) target non hormonal, yaitu yang bertanggung jawab dalam pertumbuhan dan pergerakan sel, transduksi sinyal serta siklus sel. <sup>41</sup>

## 5. Galur Sel Kanker Payudara T47D

Merupakan galur sel kanker payudara yang diambil dari cairan pleura daerah metastasis pada penderita karsinoma duktus kelenjar payudara yang diisolasi oleh Keydar dari seorang wanita yang berumur 54 tahun. Galur sel ini mengekspresikan reseptor androgen, estrogen, progesteron, glukokortikoid, prolaktin, dan kalsitonin. Pemeliharaan sel ini menggunakan medium RPMI 1640 dengan penambahan 0,2 unit/mL insulin *bovin* serta 10% *fetal bovine* serum dan disimpan pada suhu 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. Galur sel T47D memiliki *doubling time* 32 jam. <sup>42</sup>

Sel T47D menunjukkan bentuk/typikal badan apoptotik. Mekanisme apoptosis sel T47D diketahui melibatkan kaspase efektor 3 dan atau kaspase 7, sedangkan prokaspase 6 tidak terdeteksi. Selain itu juga telah diobservasi bahwa pada sel T47D menunjukkan terjadinya penurunan potensial transmembran mitokondria. Terjadi juga pelepasan sitokrom C yang kemudian diikuti translokasi Bax dari sitosol ke mitokondria. <sup>43</sup>

Pada sel ini p53 mengalami *missense mutation* pada residu 194 (dalam *zinc-binding domain*) sehingga p53 kehilangan fungsinya. Sehingga jika p53 kehilangan fungsinya maka tidak dapat berikatan dengan *response element* pada DNA, maka kemampuannya untuk regulasi *cell cycle* dan apoptosis dapat berkurang atau hilang. <sup>44</sup>

## 6. *Piper crocatum Ruiz & Pav*

### 6.1. Deskripsi

*Piper crocatum Ruiz & Pav* atau Sirih Merah merupakan jenis tumbuhan yang berasal dari Amerika Selatan. Tumbuhan ini termasuk golongan famili *Piperaceae* yang tumbuh

merambat dengan bentuk daun menyerupai hati yang bertangkai dan tumbuh berselang seling dari batangnya. *Piper crocatum Ruiz & Pav* / Sirih Merah memiliki daun yang berwarna merah keperakan serta mengkilap. Daun Sirih Merah mengandung alkaloid, saponin, tannin, flavanoid, polifenolat, minyak atsiri. Senyawa flavanoid dan polifenolat merupakan senyawa fenol dan bersifat antioksidan, antidiabetik, anti kanker, antiseptik dan antiinflamasi. Sedangkan senyawa alkaloid mempunyai sifat anti neoplastik dan dapat menghambat pertumbuhan sel kanker. *Piper crocatum Ruiz & Pav* / sirih Merah pada mulanya banyak digunakan sebagai tanaman hias, namun akhir-akhir ini sering digunakan sebagai pengobatan berbagai macam penyakit seperti : diabetes melitus, jantung koroner, hipertensi, asam urat, radang dan luka.<sup>45</sup>



**Gambar 4 : Daun *Piper crocatum Ruiz & Pav***

Daun berwarna merah keperakan serta mengkilap, menyerupai hati yang bertangkai dan tumbuh berselang seling dari batangnya.



## 6.2. Klasifikasi<sup>46</sup>

- Kingdom : *Plantae* (tumbuhan)
- Subkingdom : *Tracheobionta* (Berpembuluh)
- Superdivisio : *Spermatophyta* (berbiji)
- Divisio : *Magnoliophyta* (berbunga)
- Kelas : *Magnoliopsida* (Berkeping dua)
- Subklas : *Magnoliidae*
- Ordo : *Piperales*
- Familia : *Piperaceae* (Sirih-Sirihan)
- Genus : *Piper*
- Spesies : *Piper Crocatum*

## 6.3. Penggunaan sebagai Tanaman Obat Tradisional

Selama ini famili *Piperaceae* sudah sering digunakan baik sebagai tanaman hias, penyedap masakan dan pengobatan terhadap berbagai penyakit. Di Afrika daun serta buah *Guinea pepper* (*P Guineense*) atau yang dalam bahasa setempat dikenal sebagai Ashanty sangat terkenal untuk digunakan sebagai obat batuk dan obat untuk mengatasi nyeri lambung. Hal demikian juga terjadi pada suku Indian di Amerika.<sup>47</sup>

Selain dari pada itu, spesies *Pipperaceae* juga sudah sejak zaman dahulu digunakan masyarakat sebagai antibiotik, racun ikan, diuretik, obat sakit gigi, pelindung terhadap serangga, anti ansietas dan epilepsi. Pada dataran Asia *Pippraceae* digunakan sebagai antibakteri dan obat penurun panas.<sup>48,49,50</sup>

## 6.4. Penelitian yang Pernah Dilakukan

### 6.4.1. Aktivitas Antioksidan

Hidroquinon merupakan produk alamiah yang umum terdapat pada organisme laut seperti *Ascidiaceae (Aplidium sp)* dan Alga coklat serta jarang ditemukan pada organisme lain.<sup>51,52</sup> Isolasi turunan Hidroquinon ini juga dapat diperoleh dari daun *Piper crassinervium*, dimana senyawa tersebut memiliki aktivitas biologis sebagai anti tumor, anti leukemia, serta menghambat proses mitosis.<sup>53,54,55</sup> Lebih jauh Hidroquinon juga telah diketahui memiliki efek sebagai antioksidan.<sup>56</sup> Selain itu pada spesies *Piper* juga telah diketahui mengandung senyawa yang memiliki struktur kimia yang sama dengan asam benzoat yaitu seperti yang terdapat pada *Piper aduncum* dimana senyawa tersebut telah diteliti memiliki aktivitas sebagai anti mikroba dan molluscicidal.<sup>57,58</sup> Selain *Piper aduncum*, diketahui bahwa *Piper arieianum* dan *Piper tabogatum* serta *Piper dilatatum* juga mengandung asam benzoat yang memiliki aktivitas sebagai antifungal.<sup>59,60,61</sup>

Potensial sebagai antioksidan pada senyawa yang berasal dari *Piper crassinervium* telah diuji peranannya terhadap kemampuannya dalam menginhibisi *luminescence* yang berasal dari luminol yang diinduksi dengan 2,2-azo-bis (2-amidinopropane) (ABAP) yang merupakan suatu radikal bebas.<sup>62</sup> Sebagai tambahan, juga telah dilakukan uji terhadap kemampuan untuk mengeliminasi 1,1-diphenyl- 2-picryl- hydrazyl (DPPH) yaitu suatu radikal yang stabil dengan hasil yang baik. Selain itu juga telah dilakukan penelitian terhadap efek perlindungan terhadap lipoperoxidase dengan menggunakan Fe<sup>3+</sup>/ EDTA dan asam askorbat yang akan menginduksi peroksidase pada liposom dari fosfatidilkolin.

DPPH merupakan suatu radikal bebas yang dipakai untuk mengevaluasi kemampuan dari suatu senyawa untuk mengeliminasi radikal bebas. Aktivitas eliminasi dari senyawa-senyawa tersebut dapat terlihat pada tabel 1

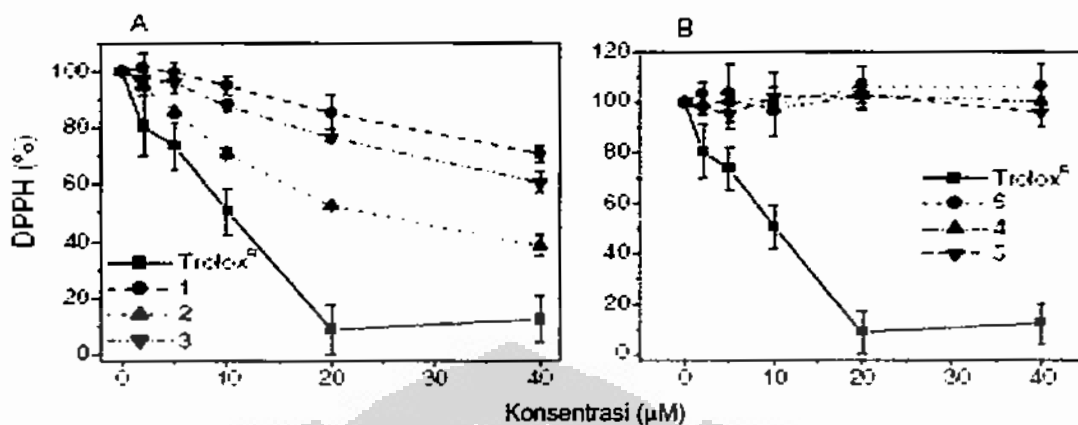
**Tabel 1. Kemampuan aktivitas antioksidan pada senyawa 1-6, hidroquinon, dan trolox yang ditentukan berdasarkan penurunan dari radikal bebas.**

| Senyawa                   | Inhibisi luminen | Radikal DPPH<br>EC <sub>50</sub> (μM) | Inhibisi<br>lipoperoksidasi<br>IC <sub>50</sub> (μM) |
|---------------------------|------------------|---------------------------------------|--|
| 1                         | 2,16 ± 0,04      | > 40,00                               | 14,48 ± 0,38   |
| 2                         | 2,34 ± 0,04      | 22,08 ± 0,34                          | 26,43 ± 0,43   |
| 3                         | 1,15 ± 0,04      | > 40,00                               | 63,11 ± 0,45   |
| 4.                        | 0,09 ± 0,11      | -                                     | 69,54 ± 0,40   |
| 5                         | 0,05 ± 0,15      | -                                     | 81,16 ± 0,39   |
| 6                         | 0,05 ± 0,12      | -                                     | 89,74 ± 0,47   |
| p-as.hidroksi<br>benzoat  | -                | -                                     | -  |
| Hidroquinon               | 2,46 ± 0,06      | 1,20                                  | 45,00 ± 0,51   |
| Diasetoksi<br>Hidroquinon | -                | -                                     | -  |
| Trolox                    | 4,49 ± 0,04      | 10,00 ± 1,93                          | 3,70 ± 0,42  |

\*Mean (±SD); n=3

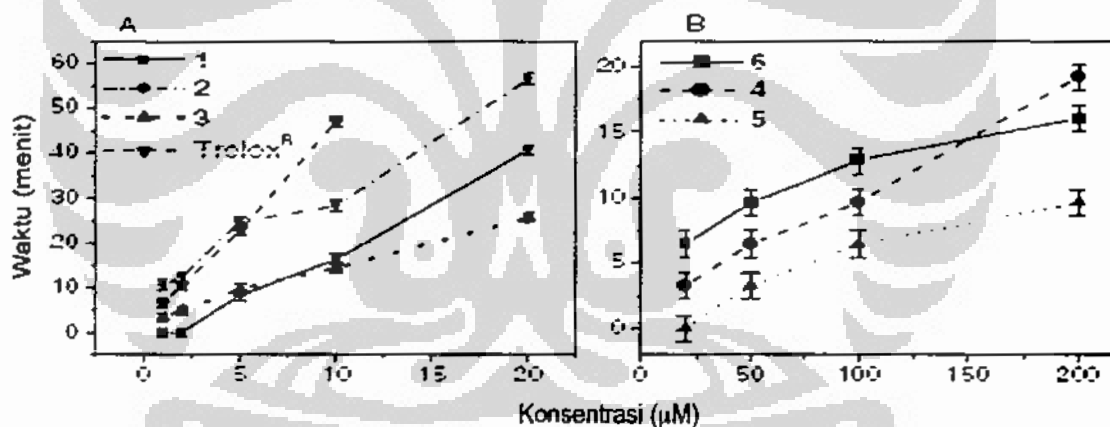
Pada penambahan senyawa 1-3 serta Trolox pada larutan DPPH terlihat bahwa penambahan senyawa tersebut akan menyebabkan penurunan dari konsentrasi radikal bebas yang progresif (grafik 1).

Berdasarkan data yang tergambar baik pada grafik 1 maupun pada tabel 1, terlihat bahwa senyawa no.2 mempunyai kemampuan sebagai antioksidan yang tertinggi dibandingkan dengan ke 5 senyawa lainnya, sedangkan senyawa ke 4-6 yang merupakan derivat dari asam benzoat bahkan asan p-hidroksibenzoat terbukti tidak memiliki kemampuan sebagai antioksidan.



**Grafik 1. Inhibisi radikal DPPH oleh berbagai konsentrasi dari senyawa 1-6 dan trolox**

Pada penelitian lainnya terbukti bahwa penambahan senyawa-senyawa diatas pada campuran larutan luminol dan ABAP akan memperlambat emisi dari luminen. Hubungan antara waktu induksi dengan penambahan antioksidan dapat terlihat pada grafik II.



**Grafik 2. Hubungan antara waktu induksi luminen dengan berbagai senyawa pada berbagai konsentrasi**

Berdasarkan grafik 2 diatas terlihat bahwa senyawa 1-3 mempunyai kemampuan yang lebih potensial dalam menghambat luminen dibandingkan dengan senyawa ke 4-6.

Kemampuan suatu senyawa dalam menekan peroksidase diuji dengan menggunakan Fe+3/EDTA, asam askorbat dalam menginduksi peroksidase pada liposom dari fosfatidilkolin.<sup>63</sup> Konsentrasi antioksidan yang diperlukan untuk menurunkan lipoperoksidase sebesar 50% (IC<sub>50</sub>)

merupakan parameter yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan. Senyawa 1 memiliki konsentrasi IC<sub>50</sub> yang terendah dibandingkan dengan 5 senyawa lainnya tetapi tetap lebih tinggi konsentrasinya bila dibandingkan dengan Trolox.

#### 6.4.2. Aktivitas Antiinflamasi

*Piper ovatum Vahl (Piperaceae)* yaitu suatu tanaman obat yang banyak ditemukan di Brazil dengan nama populer *Joao burandi anestesica* dan digunakan sebagai obat tradisional dalam mengatasi proses inflamasi serta sebagai analgesik.<sup>64</sup> Pada penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa ekstrak dari *Piper nigrum* dan *Piper methysticum* memiliki efek inhibitor yang spesifik terhadap Siklooksigenase-1 yaitu merupakan enzim yang penting dalam pembentukan Prostaglandin yang berperan penting sebagai mediator dalam perkembangan penyakit inflamasi.<sup>65,66</sup> Telah dilaporkan pula bahwa spesies lain dari *Piper* memiliki aktivitas invitro sebagai inhibitor terhadap enzim Siklooksigenase-1 serta enzim 5-Lipoksigenase dimana kedua enzim ini berperan didalam pembentukan Lekotrien yang memainkan peranan penting dalam migrasi Lekosit.<sup>67</sup>

Pada suatu penelitian telah dilakukan penelitian tentang efek ekstrak daun *Piper ovatum* terhadap respon inflamasi. Aktivitas anti inflamasi ditentukan dengan menggunakan carragenan yang akan menginduksi terjadinya pleuritis pada tikus serta dengan menggunakan minyak croton yang akan menginduksi proses edema pada telinga mencit. Pada penelitian tersebut diperoleh data bahwa pemberian ekstrak daun *Piper ovatum* tidak dapat mengurangi volume eksudat pada pleural yang berarti bahwa ekstrak *Piper ovatum* tidak dapat berperan sebagai anti inflamasi. Sedangkan terhadap proses edema telinga yang terjadi sebagai akibat pemberian minyak croton, ekstrak daun *Piper ovatum* dapat menghambat terjadinya proses pembengkakan. Hal ini terjadi sebagai akibat dari penurunan terhadap peningkatan permeabilitas kapiler sebagai akibat dari efek pemberian minyak croton. Mekanisme minyak croton dalam menginduksi inflamasi adalah melalui peningkatan aktivitas Fosfolipase A-2 yang berperan dalam pelepasan asam Arakhidonat serta pembentukan Lekotriens dan Prostaglandin yang juga terlibat dalam jalur Lipooksigenase. Metabolit dari asam Arakhidonat bertindak sebagai mediator respon inflamasi melalui aktivitas

Siklooksigenase dan Lipooksigenase yang kemudian akan menjadi target didalam perkembangan bahan obat. <sup>68-72</sup>

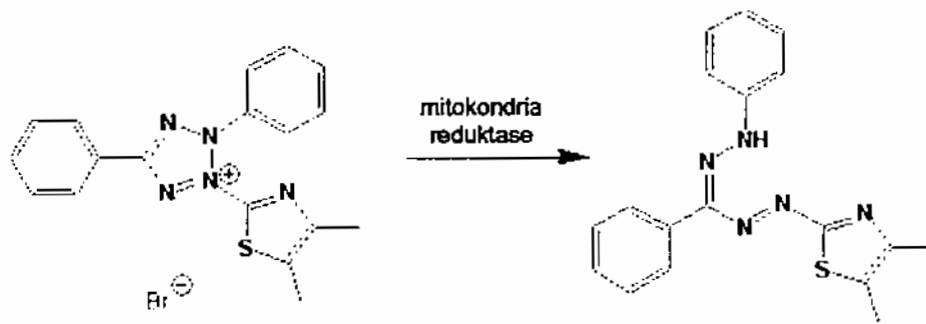
Perbedaan terhadap efek penghambatan proses inflamasi yang terjadi pada kedua perlakuan tersebut terjadi oleh karena beberapa faktor antara lain adanya perbedaan mediator pada suatu proses inflamasi, perbedaan dalam proses absorpsi.

#### 6.4.3. Aktivitas Insektisida

Efektifitas dari ekstrak *Piper* sebagai insektisida pada tanaman berhubungan dengan konsentrasi dari ekstrak piperamid. Banyak jenis komponen yang terdapat pada tanaman piper bersifat sebagai insektisida. <sup>73</sup> Telah diketahui bahwa piperamid bersifat neurotoxin terhadap serangga. Lipid amid diketahui dapat mempengaruhi eksitabilitas akson yaitu dengan mempengaruhi pergerakan sodium.

#### 7. *Micro culture Tetrazolium Technique (MTT)*

*MTT* merupakan pemeriksaan kuantitatif terhadap jumlah sel hidup dengan cara menentukan jumlah kristal Formazan (zat berwarna ungu) yang terbentuk dari perubahan *MTT* sebagai hasil kerja enzim Mitokondria reduktase yang aktif (sel hidup). Oleh karena proses ini metabolisme ini hanya dapat terjadi pada sel yang hidup, maka pemeriksaan ini dipakai sebagai pemeriksaan untuk menentukan viabilitas sel. Pemeriksaan ini merupakan pemeriksaan kolorimetri dengan menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 570 nm. <sup>74</sup>



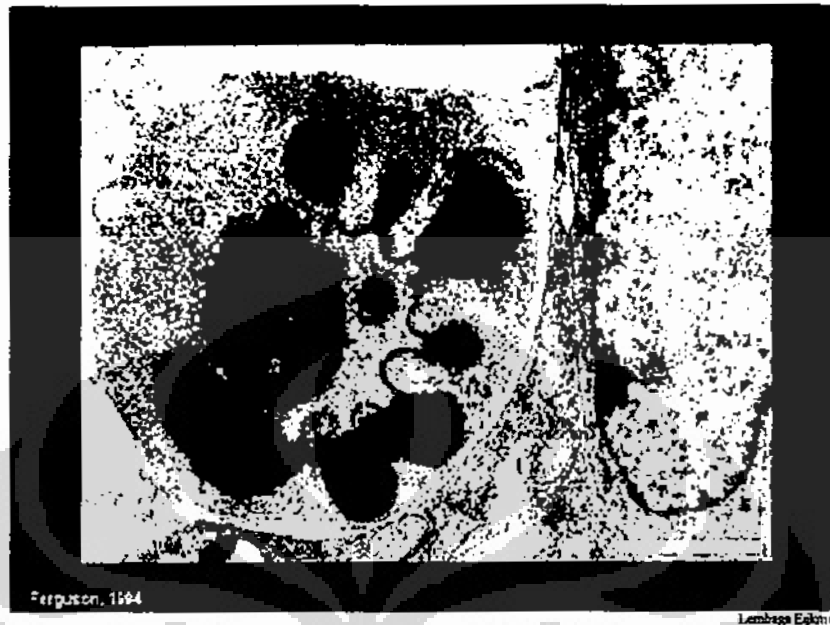
**Gambar 5 : Pembentukan kristal Formazan oleh aktivitas enzim mitokondria reduktase**

### 8. Pemeriksaan DNA Sub-G1 Apoptosis

Pemeriksaan DNA Sub-G1 apoptosis digunakan untuk menentukan terjadinya proses apoptosis pada sel. Propidium Iodida digunakan untuk mewarnai DNA sel. Sel yang mengalami apoptosis akan memiliki kemampuan pewarnaan DNA yang menurun. Sel dengan kemampuan pewarnaan DNA yang rendah dibanding G-1 disebut dengan Sub-G1 dan merupakan pertanda sel yang mengalami apoptosis. Sel dianalisa dengan menggunakan *Flowcytometry* untuk melihat fraksi Sub-G1.<sup>75</sup>

### 9. Pewarnaan DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole)

Merupakan pewarnaan fluoresen yang berikatan kuat dengan DNA. Pewarnaan DAPI akan memperlihatkan gambaran morfologi sel normal yaitu berupa inti sel yang bulat, berbatas tegas dan terwarnai dengan merata, sedangkan sel yang mengalami apoptosis akan memperlihatkan inti sel yang berbatas iregular, konsentrasi kromosom pada inti sel, piknosis serta gambaran inti yang terfragmentasi.<sup>75</sup>



**Gambar 6 : Kondensasi kromatin pada inti sel**

### **9. Western Blot**

Pemeriksaan Western Blot digunakan untuk menentukan target intra seluler dalam menentukan mekanisme kerja antiproliferasi ekstrak pada jalur pensinyalan *MAPK*. Mekanisme efek antiproliferasi diteliti dengan menguji aktivasi ekspresi protein p44/p42. Transmisi sinyal insulin dalam proliferasi sel telah diketahui melalui aktivasi protein p44/p42.



## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vitro* dengan menggunakan Galur sel kanker payudara T47D yang diperoleh dari *Stem Cell and Cancer Intitute*. Galur sel pada penelitian ini diberikan perlakuan penambahan ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* sebagai kelompok perlakuan dan tiga kelompok lainnya sebagai kelompok kontrol yaitu kelompok yang tidak mendapat perlakuan, kelompok yang mendapat perlakuan penambahan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dan kelompok yang mendapat perlakuan penambahan DMSO. Pemeriksaan dilakukan secara *triplicate*. Ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* yang digunakan dalam penelitian ini sudah melalui uji toksistas terhadap sel mononuklear darah tepi.

#### 2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada laboratorium *Stem Cell and Cancer Institute*, jalan Jend. Ahmad Yani No.2 Pulomas, Jakarta 13210. Penelitian berlangsung sekitar 5 bulan.

#### 3. Cara Kerja

##### 3.1. Bahan

##### 3.1.1. Galur sel kanker payudara T47D.

Galur sel kanker payudara T47D yang dipakai sebagai representasi sel kanker payudara diambil dari *American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)* dan dipelihara dalam medium RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) dengan penambahan 0,2 unit/mL insulin bovin, 10% *Fetal Bovin Serum (FBS) (Invitrogen)*, 100 µg/mL Streptomisin dan 100 U/mL Penisilin pada suhu 37°C dengan kelembaban 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.1.2. Ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav*

Daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* yang dipakai berasal dari hutan di Kalimantan Timur pada maret 2008. Tanaman ini telah diidentifikasi oleh Rahardjo, BSc pada laboratorium Dendrologi Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman, Kalimantan.

Sebanyak 10 g daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* yang telah dikeringkan, direndam dalam 250 ml larutan Metanol selama 24 jam. Kemudian campuran tersebut disaring. Ekstrak diperoleh melalui proses evaporasi dengan menggunakan evaporator dan vakum sehingga diperoleh residu sebanyak 1 g. Proses ekstraksi ini dilakukan pada laboratorium kimia Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman, Kalimantan Timur.

### 3.2. Prosedur

#### 3.2.1. Pemeriksaan *MTT*

Viabilitas sel pada galur sel kanker payudara T47D ditentukan dengan *MTT* berdasarkan metode yang digunakan oleh Arung dkk. Pemeriksaan *MTT* merupakan pemeriksaan kolorimetrik untuk melihat aktivitas enzim yang akan mereduksi *MTT* menjadi Formazan yang akan memberikan warna ungu. Reduksi ini hanya dapat dilakukan oleh enzim Mitokondria reduktase yang aktif. Jadi *MTT* merupakan pengukuran secara kuantitatif terhadap viabilitas sel dengan menentukan jumlah kristal Formazan yang dihasilkan oleh metabolisme sel hidup.

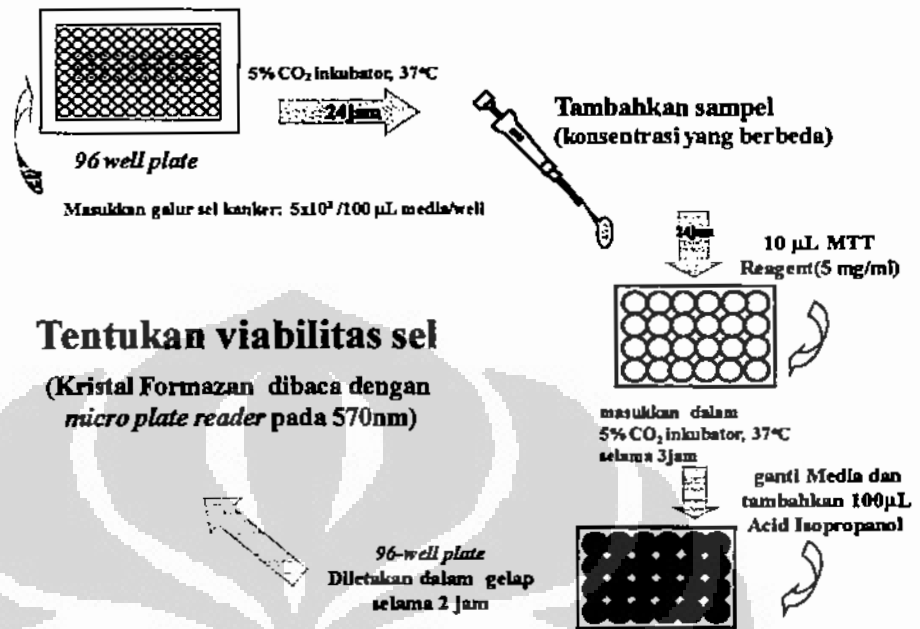
#### a. Alat dan bahan

- *Microplate reader*
- *96 well plate*
- Pipet
- Inkubator

- Sel T47D
- Ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav*
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- DMSO
- RPMI 1640
- *MTT reagen*
- Isopropanol

b. Perlakuan

Sel ( $5 \times 10^3$  sel/sumur) ditanam pada *96 well plate* dan kemudian dilakukan inkubasi dalam inkubator selama 24 jam. Setelah 24 jam inkubasi maka medium lama diganti dengan medium baru. Setelah itu kemudian tambahkan ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* dengan konsentrasi 50 µg/mL, *dimethyl sulfoxide* (DMSO; 1%), hydrogen peroxyde (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0,0014%) dan tanpa diberi tambahan zat apapun (kontrol). Setelah penambahan zat yang akan diuji maka kembali dilakukan inkubasi dalam inkubator selama 24 jam. Setelah itu tambahkan *MTT reagen* (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 10 µL dalam PBS (5mg/mL)) pada tiap *well* dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dan kelembaban 5% CO<sub>2</sub> selama 3 jam. Setelah selesai maka medium diganti dengan 100 µL Isopropanol. Setelah penambahan Isopropanol kemudian diinkubasi pada suhu ruang dalam keadaan gelap selama 2 jam. Setelah semua selesai maka masukan *96 well plate* tersebut kedalam *microplate reader* yang sudah diatur, dan dibaca pada panjang gelombang 570 nm.



Gambar 7 : Alur pemeriksaan *MTT*

### 3.2.2. Pemeriksaan DNA Sub-G1

Terjadinya apoptosis sel pada galur sel kanker payudara T47D ditentukan dengan menggunakan metode pemeriksaan DNA Sub-G1 yang digunakan oleh Sandra dkk. Sel yang mengalami apoptosis akan memiliki kemampuan pewarnaan DNA yang menurun. Sel dengan kemampuan pewarnaan DNA yang lebih rendah dari G1 disebut dengan Sub-G1, dan hal ini digunakan sebagai petanda apoptosis sel. Propidium Iodida yang merupakan pewarna fluoresen DNA digunakan untuk mewarnai DNA. Sel akan dianalisa menggunakan *flowcytometri* untuk melihat fraksi Sub-G1.

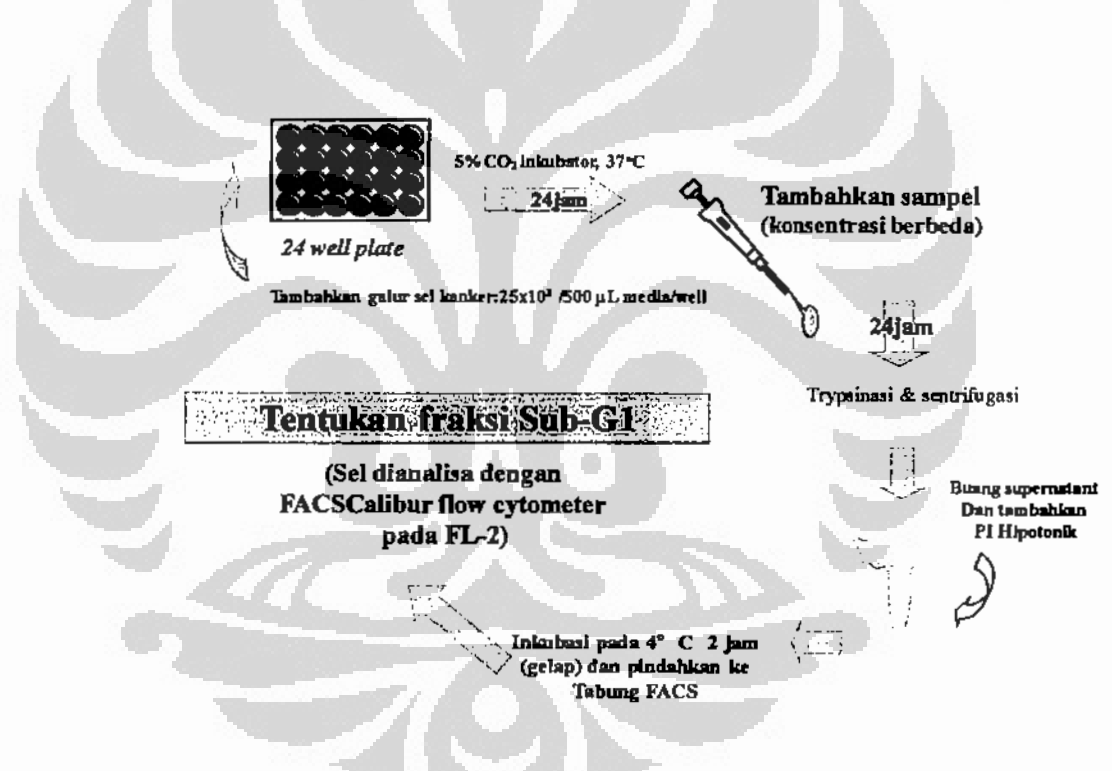
a. Alat dan bahan

- 24 *Well plate*
- Tabung *FACS* 5 mL
- Tabung *microfuge* 1,5 mL
- Media pertumbuhan sel (RPMI 1640), 10% *FBS*, 100 µg/mL Streptomisin dan 100 U/mL Penisilin
- PBS
- Tripsin 0,25%
- Larutan hipotonik Propidium iodida (dalam PBS) : 50 µg/mL propidium iodide, 0,1% Sodium sitrat, 0,1% Triton X-100

b. Perlakuan

Sel sebanyak  $2,5 \times 10^5$  sel/sumur ditanam dalam 500 µL media pada 24 *Well plate* kemudian sel di inkubasi dalam inkubator 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam. Setelah 24 jam media diganti dengan 500µL medium baru dan kemudian ditambahkan ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* dengan konsentrasi 50µg/mL, DMSO 1%, Hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0,0014%) dan tanpa diberi tambahan zat apapun (kontrol). Kemudian di inkubasi kembali dalam suatu inkubator pada suhu 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam. Setelah itu media di transfer ke dalam tabung 1,5 mL (*microfuge tube*) dan sel yang terdapat pada 24 *Well plate* dibilas dengan 500 µL PBS. Setelah itu PBS di transfer ke dalam *microfuge tube*. Sel yang berada dalam 24 *Well plate* di tripsinasi dengan 200 µL Tripsin selama 3 menit pada suhu 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub>. Setelah itu media pada *microfuge tube* dipindahkan ke 24 *Well plate* untuk menginaktifkan pengaruh Tripsin. Kemudian sel yang berada dalam 24 *Well plate* dihomogenisasi secara hati-hati dengan pipet untuk memisahkan

sel satu dengan yang lainnya. Sel dan media yang ada ditransfer kedalam *microfuge tube* sebelumnya dan disentrifugasi selama 5 menit pada 2000 *RPM* dalam suhu ruang. Setelah itu supernatan dibuang, kemudian sel dibilas dengan 500  $\mu\text{L}$  PBS dan disentrifugasi kembali selama 5 menit pada 2000 *RPM* dalam suhu ruang. Kemudian PBS dibuang dan ditambahkan 400  $\mu\text{L}$  larutan hipotonik *Propidium Iodide*. Kemudian diinkubasi selama minimal 1 jam dan maksimal 24 jam dalam pendingin  $4^{\circ}\text{C}$  yang gelap. Sel yang telah terwarnai dengan *Propidium Iodida* ditransfer kedalam tabung FACS, lalu jumlah DNA dan DNA Sub G-1 dianalisis dengan menggunakan *Flow cytometry* pada jalur FL 2.



**Gambar 8 : Alur pemeriksaan DNA Sub-G1 Apoptosis**

### 3.2.3. Pemeriksaan Pewarnaan DAPI

Gambaran inti sel pada galur sel kanker payudara T47D ditentukan dengan teknik pewarnaan DAPI berdasarkan metode yang digunakan oleh Sandra dkk. DAPI merupakan pewarnaan fluoresen yang berikatan kuat dengan DNA. Morfologi inti sel yang normal akan terlihat bulat, berbatas tegas, terwarnai dengan merata, sedangkan pada sel yang mengalami apoptosis akan terlihat inti sel berbentuk ireguler, konsentrasi kromosom pada inti sel, terwarnai lebih gelap, dengan inti yang piknosis dan terjadi fragmentasi inti

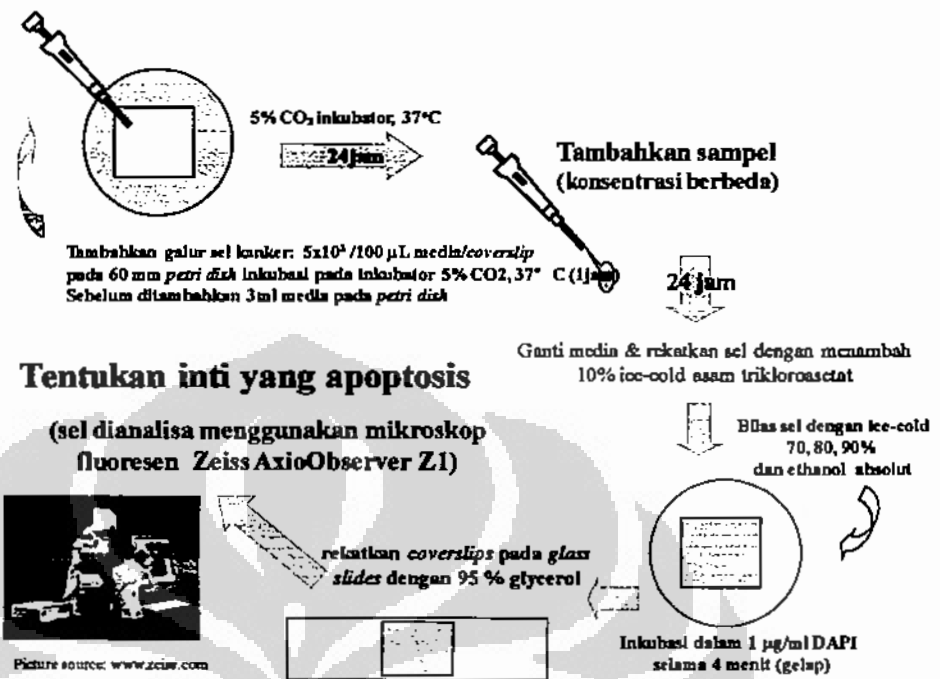
#### a. Alat dan bahan

- *Cover glass*
- Cawan petri 60 mm
- RPMI 1640 dengan 10% *FBS*, Penisilin- Streptomisin
- Sumber api
- Etanol 70%
- Pembersih kuku
- DAPI (1  $\mu\text{g/mL}$ ) dalam PBS
- *Ice cold* 10% TCA dalam PBS
- *Ice cold* 10% Triton X
- *Ice cold* 70%, 80%, 90% dan etanol absolut
- PBS

b. Perlakuan

*Cover glass* dipegang dengan menggunakan penjepit kemudian semprotkan etanol 70% pada *cover glass*. Biarkan sedikit mengering dan kemudian bakar untuk mensterilkan. Setelah itu letakkan *cover glass* tersebut kedalam cawan petri 60 mm. Kemudian tempatkan 10mL *suspense* sel yang mengandung  $5 \times 10^3$  sel pada permukaan atas *cover glass*. Lakukan inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub> selama 1 jam agar sel dapat melekat pada *cover glass*. Setelah selesai maka keluarkan cawan petri dari inkubator dan kemudian tambahkan 3ml media untuk melindungi sel yang tidak melekat kuat pada *cover glass*. Kembali dilakukan inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam sebelum pemberian perlakuan/ uji. Setelah 24 jam, media dihisap dan kemudian ditambahkan media perlakuan pada sel. Kemudian diinkubasi lagi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam sebelum pewarnaan dengan DAPI. Setelah itu media dihisap dan kemudian cuci sel dengan 2 ml PBS sebanyak 3 kali. Setelah selesai dilakukan penambahan 2 ml *ice cold* 10% TCA dan inkubasi dalam suhu ruang selama 2 menit. Kemudian TCA dibuang dan tambahkan secara bergantian 2ml *Ice cold* 70%, 80%, 90% dan Etanol absolut dan setiap pergantian konsentrasi dilakukan inkubasi dalam suhu ruang selama 2 menit. Setelah itu sisa Etanol dibuang dan kemudian tambahkan 2-3 ml Triton X dan diamkan selama 15 detik. Kemudian buang Triton X. Kemudian ditambahkan 4 mL DAPI (1µg/mL) kedalam cawan. Inkubasi dalam suhu ruangan pada tempat yang gelap selama 3 menit. Setelah selesai hasil pewarnaan sel diperiksa dengan menggunakan mikroskop fluoresen. Kemudian siapkan *glass slide* yang permukaannya telah ditetesi 1 atau 2 tetes gliserol. DAPI dibuang dari dish, kemudian *cover glass* dikeluarkan dan diletakan diatas tetesan gliserol. Tepi *cover glass* dibersihkan dari gliserol dan kemudian diperkuat dengan pembersih kuku. *Slide* dianalisa dengan menggunakan mikroskop fluoresen atau disimpan pada suhu -80°C untuk pengamatan selanjutnya.





**Gambar 9 : Alur pemeriksaan pewarnaan DAPI**

### 3.2.4. Pemeriksaan Western Blot

Mekanisme efek antiproliferasi ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* pada galur sel kanker payudara dengan menganalisa ekspresi protein p44, p42 terfosforilasi. Telah diketahui bahwa transmisi sinyal insulin pada proliferasi sel terjadi melalui jalur fosforilasi protein p44, p42.

#### a. Alat dan bahan

- Cawan petri 60 mm
- Tabung 15 ml
- *Cell scraper*
- Tabung eppendorf
- Vortex

- Sentrifugasi
- Cetakan gel *SDS-PAGE*
- Alat elektroforesis
- *Syringe*
- Membran PVDF
- Kertas filter
- *Shaker*
- *G-BOX*
- PBS
- Lisis buffer
- Etanol
- H<sub>2</sub>O
- Tris-HCL 1,5 M pH 8,8
- Tris-HCL 0,5 M pH 6,8
- Poliakrilamid 30%
- SDS 10%
- APS 5%
- TEMED
- Transfer buffer
- Metanol
- Susu skim
- Larutan ECL
- Antibodi

b. Perlakuan panen sel untuk Western Blot

Sel dalam cawan petri 60 mm diberi perlakuan selama 24 jam. Kemudian medium dipindahkan ke dalam tabung 15 ml. Setelah itu sel dicuci dengan 2 ml PBS. Selanjutnya PBS dipindahkan ke dalam tabung yang telah berisi medium tadi. Cawan petri dimiringkan dengan cara meletakkan tutupnya dibawah cawan, untuk membuat sisa PBS mengumpul di bawah. Setelah itu

blower dimatikan untuk mencegah sel menjadi kering. Sisa medium diambil kemudian ditambahkan PBS dan pindahkan kedalam tabung yg berisi medium dan PBS. Tabung tersebut disentrifugasi pada 1500-2000 *RPM* selama 5 menit pada suhu 4 °C. Sambil menunggu sentrifugasi selesai, di masukkan 100 µL lisis buffer ke atas sel pada cawan petri. Kemudian sel-sel dikerik dengan menggunakan *cell scraper*. Apabila proses ini memakan waktu lama, maka cawan-cawan yang telah diberi lisis buffer diletakkan diatas es. Sel-sel yang telah dikerik dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf. Pellet hasil sentrifugasi sebelumnya dipindahkan juga ke tabung Eppendorf tersebut. Sampai sini, protein biasanya disimpan terlebih dahulu di suhu -80 °C. Ketika akan digunakan, keluarkan dari *freezer* dan dimasukkan ke dalam es. Tiap 15 menit divortex selama 2 jam (kurang lebih divortex 10 detik). Setelah itu dilakukan sentrifugasi pada 15000 *RPM* 4 °C selama 15 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung baru (berisi protein). Pellet disimpan pada -80 °C jika untuk diperlukan lagi.

c. Perlakuan membuat gel

Cetakan gel *SDS-PAGE* disiapkan. Meja kerja dibersihkan dengan etanol. Setelah itu kaca dibersihkan dengan Etanol dan Kimwipes. Kemudian kaca dipasang dengan penjepit samping (ratakan bagian bawahnya). Setelah itu karet bagian bawah cetakan dipasang, lalu dudukkan kaca pada penyangga. Penjepit bagian atas dipastikan menjepit dengan sempurna. Apabila ragu akan terjadi kebocoran, maka untuk memastikannya adalah dengan menuang air/Etanol ke cetakan gel. Setelah itu resolving gel dibuat sebanyak 5 mL dengan resep dibawah ini:

**RESOLVING GEL (5 mL)**

| No. | Reagent                  | 7%                      | 10%                       | 12%                     | 15%                     |
|-----|--------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1   | H <sub>2</sub> O         | 2.5 mL<br>(625 µl x 4)  | 2.004 mL<br>(668 µl x 3)  | 1.67 mL<br>(835 µl x 2) | 1.17 mL<br>(585 µl x 2) |
| 2   | Tris-HCl 1.5 M<br>pH 8.8 | 1.25 mL<br>(625 µl x 2) | 1.25 mL<br>(625 µl x 2)   | 1.25 mL<br>(625 µl x 2) | 1.25 mL<br>(625 µl x 2) |
| 3   | Poliakrilamid<br>30%     | 1.17 mL<br>(585 µL x 2) | 1.6664 mL<br>(833 µL x 2) | 2 mL<br>(500 µL x 4)    | 2.5 mL<br>(625 µL x 4)  |
| 4   | SDS 10%                  | 50 µL                   | 50 µL                     | 50 µL                   | 50 µL                   |
| 5   | APS 5%                   | 25 µL                   | 25 µL                     | 25 µL                   | 25 µL                   |
| 6   | TEMED                    | 5 µL                    | 5 µL                      | 5 µL                    | 5 µL                    |

Setelah pemberian TEMED, campuran *resolving gel* dituang pada cetakan hingga mencapai batas warna hijau. Bagian atas gel diratakan dengan menggunakan Etanol 70% hingga cetakan penuh. Setelah *resolving gel* mengeras (pastikan dengan menggoyang etanol), etanol dibuang dan dicuci dengan akuades. Bagian atas *resolving gel* dikeringkan dengan kimwipes dan kertas saring. Campuran *Stacking gel* dibuat dengan resep dibawah

### STACKING GEL (2 mL)

|                       |                                      |
|-----------------------|--------------------------------------|
| H <sub>2</sub> O      | 1.201 mL (601 $\mu$ L + 600 $\mu$ L) |
| Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 | 500 $\mu$ L                          |
| Poliakrilamid 30%     | 267 $\mu$ L                          |
| SDS 10%               | 20 $\mu$ L                           |
| APS 5%                | 10 $\mu$ L                           |
| TEMED                 | 2 $\mu$ L                            |

Setelah memasukkan TEMED ke dalam campuran *Stacking gel*, lalu diratakan dengan menggunakan pipet. Campuran *Stacking gel* dimasukkan ke atas *Resolving gel*. Kemudian dengan *comb* yang telah dibersihkan dengan Etanol, dipasang pada bagian atas cetakan hingga membentuk sumur-sumur pada *Stacking gel*. *Stacking gel* akan mengeras kurang lebih 30 menit. Kemudian tabung dicuci untuk membuat gel agar bisa digunakan kembali.

#### d. Perlakuan elektroforesis protein

Apabila protein belum dipisahkan dari sisa sel (debris), siapkan sentrifugasi 15000 *RPM* pada suhu 4 °C. Sampel protein dikeluarkan dari *freezer* -80 °C, goyang sedikit (Jangan dipegang terlalu lama karena dapat merusak protein) lalu di vortex tiap 15 menit selama dua jam. Setelah itu dilakukan sentrifugasi pada 15000 *RPM*, kemudian supernatan dipisahkan dari pellet. Pellet disimpan pada -80 °C. Supernatan mengandung protein. *Comb* dilepaskan secara perlahan dari cetakan gel. Kemudian sumur gel dicuci dengan air. Gel dalam kaca dilepaskan dari penjepit dan dipasang pada alat elektroforesis protein. Buffer dipasang apabila hanya melakukan elektroforesis untuk 1 gel.

Kemudian *running* buffer dituang ke bagian tengah alat elektroforesis hingga menutup sumur gel serta ke bagian bawah secukupnya. Gunakan *syringe* yang telah dibengkokkan untuk menghilangkan gelembung dari bagian bawah gel. Sampel protein disiapkan untuk dielektroforesis: 20  $\mu\text{L}$  sampel ditambah 5  $\mu\text{L}$  sampel buffer. Kemudian diinkubasi pada suhu 100 °C selama 5 menit. Setelah itu dimasukkan 20  $\mu\text{L}$  campuran tersebut ke dalam sumur gel. Pastikan bahwa jumlah yang dimasukkan tepat 20  $\mu\text{L}$ . Untuk sumur yang tidak diisi sampel, dimasukkan dengan 20  $\mu\text{L}$  campuran dari 5  $\mu\text{L}$  sampel buffer + 20  $\mu\text{L}$  lysis buffer. Demikian juga dengan *pre-stained SDS PAGE Standard* (5  $\mu\text{L}$  *SDS-PAGE Standard* + 5  $\mu\text{L}$  *sample buffer* + 15  $\mu\text{L}$  *lysis buffer*). Digunakan 80V konstan (di awal *running*) untuk elektroforesis (semakin rendah voltase maka separasi akan semakin baik). Setelah *running* melewati stacking gel, kemudian digunakan 150 V konstan. Elektroforesis dibiarkan berjalan hingga mencapai dasar.

e. Perlakuan transfer protein pada membrane

Membran *PVDF* disiapkan seukuran dengan gel. Sudut sebelah kanan atas membran dipotong untuk menentukan posisi atas dari membran. Setelah itu siapkan juga 4 filter paper dengan ukuran yang sama. Keempat *filter paper* direndam kedalam transfer buffer. Kemudian membran direndam kedalam metanol selama 10 detik, cuci sebentar dengan akuades. Membran juga dimasukkan ke dalam transfer buffer. Kemudian *sandwich* dibuat (dari bawah ke atas) yang terdiri atas: 2 kertas filter, membran *PVDF*, Gel dan 2 kertas filter. Posisi gel terhadap membran harus benar, untuk mencegah kesalahan pembacaan standar protein. Setelah itu *sandwich* diposisikan ditengah alat transfer dengan baik (seimbang dan tidak goyang). Setelah itu alat transfer ditutup dengan baik (seimbang dan tidak goyang). Sambungkan ke catu daya yang menggunakan voltase 16 V konstan untuk transfer selama 20 menit. Transfer yang baik ditandai dengan perpindahan warna *pre-stain marker* dari

gel membran. (Sampai sini gel bisa disimpan, apabila tidak sempat memproses lebih lanjut, dengan cara mencuci dlm PBS sekitar 5 menit lalu dibungkus dengan saran wrap dan disimpan dalam -20 °C.)

f. Immunoblotting

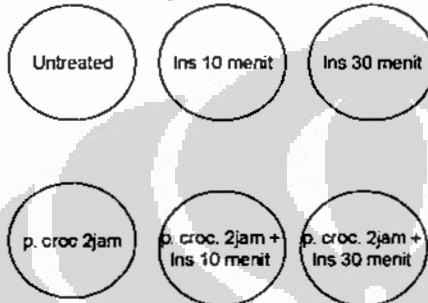
*Blocking* dilakukan dengan susu skim 5% 10 ml PBS 1X + 0,5 g *overnight* yang dilakukan diatas *orbital shaker* selama 30 menit lalu pindahkan ke lemari es 4 °C. Setelah itu susu dibuang, dan cuci membran dengan PBS-T sebanyak 3X @ 5 menit. Kemudian membran dimasukkan ke dalam larutan antibodi primer (dalam PBS, pengenceran 1000X). Inkubasi pada orbital shaker, suhu ruang selama 2 jam. Setelah itu membran diangkat dan dicuci sebanyak 3X dengan PBS-T @ 5 menit. Simpan antibodi primer untuk digunakan kembali. Membran dimasukkan ke dalam larutan antibodi sekunder (dalam PBS, pengenceran 2000X). Inkubasi pada *orbital shaker*, suhu ruang selama 2 jam. Membran diangkat dan dicuci sebanyak 3X dengan PBS-T @ 5 menit. Simpan antibodi sekunder untuk digunakan kembali. Keringkan sedikit, kemudian dimasukkan ke larutan *ECL* ( 1 mL larutan A + 1 mL larutan B) selama 1 menit. Setelah itu keringkan sedikit dari *ECL*, lalu segera baca pada G-BOX menggunakan *setting no light, 2x2 binning*. Gunakan papan warna putih sebagai latar membran.

## Hari I

- $3 \times 10^4$  T47D sel ditanam pada Petri dish 60mm dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^\circ \text{C}$  dan 5%  $\text{CO}_2$ .

## Hari II

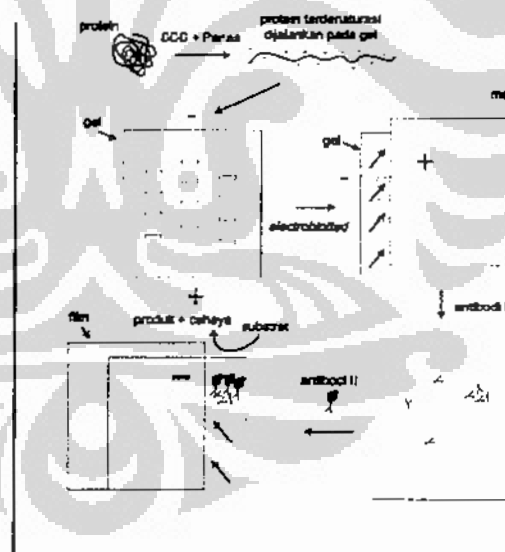
- Tambahkan perlakuan pada tiap dish



- Pindahkan media ke tabung 15 ml, sentrifugasi.
- tambahkan lysis buffer pada sel & skrap serta pindahkan ke tabung *microfuge*
- Pindahkan pellet dari tabung 15 ml ke tabung *microfuge* diatas dengan lysis buffer diambil dari tabung *microfuge*
- Vorteks pada  $4^\circ \text{C}$  selama 2jam & sentrifugasi untuk membuang debris sel.
- Pindahkan supernatan (protein) pada tabung baru.

- Protein diperiksa dengan metode Bradford pada microplate reader

- Deteksi proteins menggunakan ECL<sup>®</sup> and G-BOX<sup>®</sup>

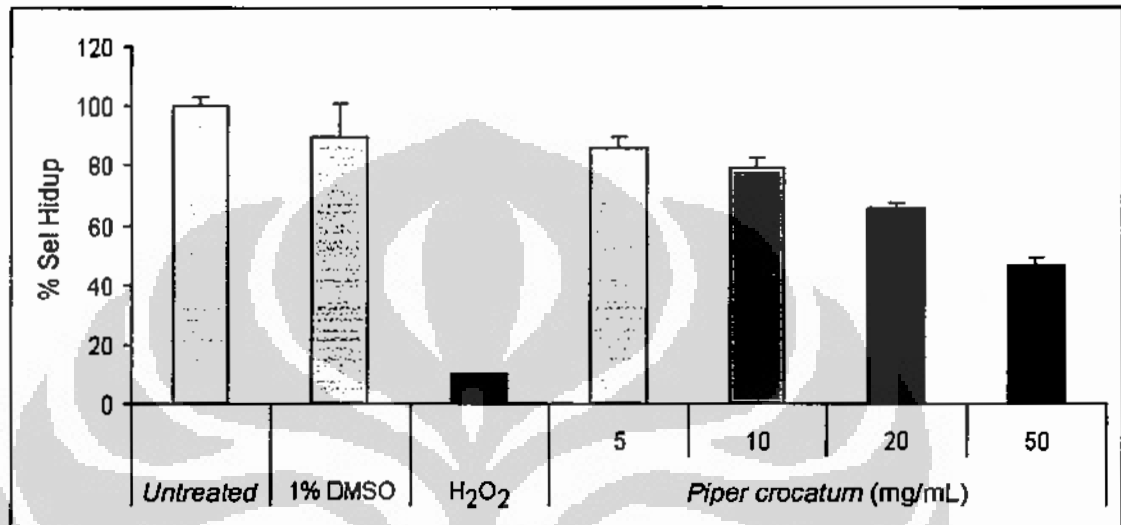


Gambar 10 : Alur pemeriksaan ekspresi protein p44/p42 terfosforilasi



## BAB IV HASIL PENELITIAN

### 4.1. Pemeriksaan *MTT*



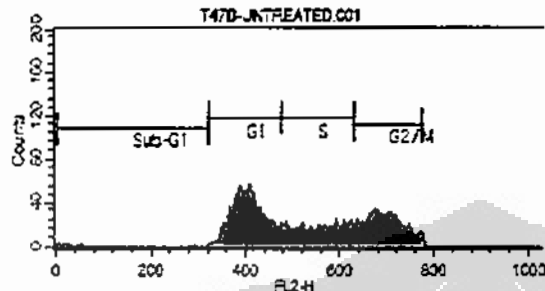
**Gambar 11. Efek ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* terhadap galur sel kanker payudara T47D**

*Untreated*: hanya berisi medium. *DMSO*: pelarut ekstrak. *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*: sitotoksik (kontrol +). *Piper crocatum Ruiz & Pav*: ekstrak dengan konsentrasi yang bertingkat untuk melihat efek hambatan pertumbuhan sel T47D.

Berdasarkan hasil pemeriksaan *MTT* yang terlihat pada gambar 3 diatas, menunjukkan bahwa ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* dapat menghambat pertumbuhan galur sel kanker payudara T47D seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Konsentrasi ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* yang dapat menyebabkan hambatan pertumbuhan pada galur sel kanker payudara T47D sebesar 50% ( $IC_{50}$ ) adalah 50  $\mu$ g/mL. Sedangkan pertumbuhan sel pada galur sel kanker payudara yang tidak mendapat perlakuan dan mendapat perlakuan DMSO tidak menunjukkan terjadi hambatan pertumbuhan sel. Pada pemberian *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* yang berfungsi sebagai kontrol positif, terlihat bahwa *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* sangat efektif dalam menghambat pertumbuhan sel pada galur sel kanker payudara T47D

## 4.2. Pemeriksaan DNA Sub-G1

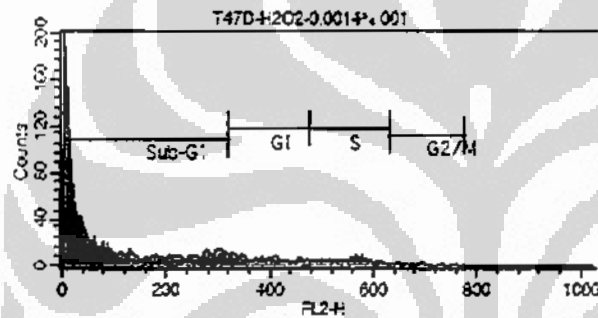
### Kontrol



File: T47D-UNTREATED.001  
Acquisition Date: 13-Aug-08

| Marker | % Gated | % Total |
|--------|---------|---------|
| All    | 100.00  | 85.64   |
| Sub-G1 | 0.49    | 0.42    |
| G1     | 43.53   | 37.28   |
| S      | 24.75   | 21.20   |
| G2/M   | 31.64   | 27.10   |

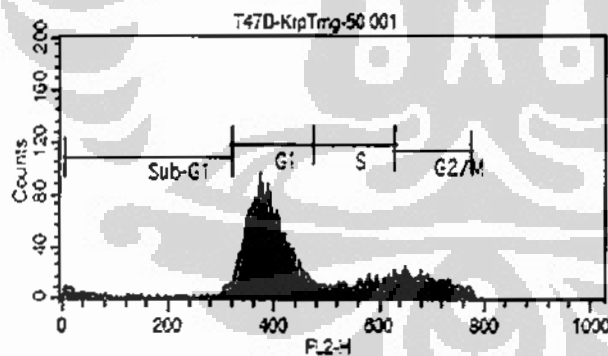
### H2O2



File: T47D-H2O2-0.0014%.001  
Acquisition Date: 13-Aug-08

| Marker | % Gated | % Total |
|--------|---------|---------|
| All    | 100.00  | 62.96   |
| Sub-G1 | 83.04   | 52.28   |
| G1     | 9.56    | 6.02    |
| S      | 6.59    | 4.15    |
| G2/M   | 0.98    | 0.62    |

### Ekstrak daun *Piper crocatum* Ruiz Pav 50µg/mL



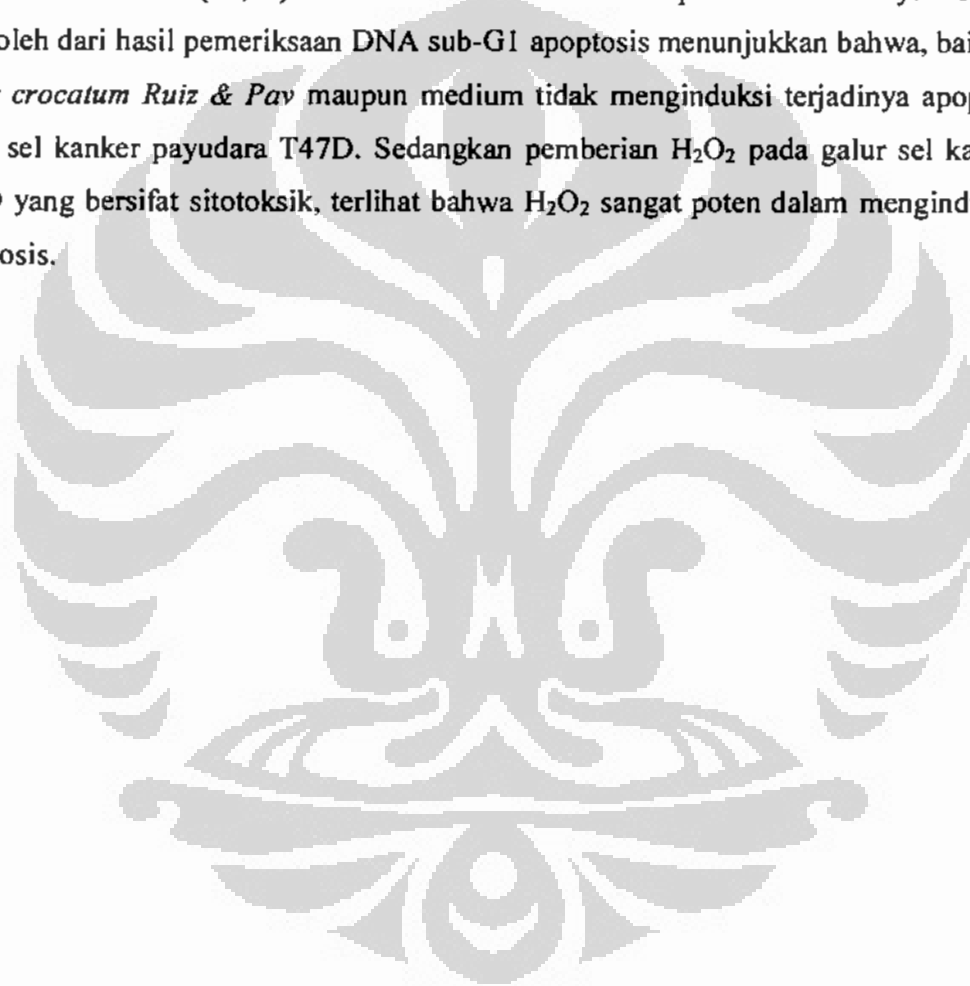
File: T47D-KrpTmg-50.001  
Acquisition Date: 13-Aug-08

| Marker | % Gated | % Total |
|--------|---------|---------|
| All    | 100.00  | 91.79   |
| Sub-G1 | 4.23    | 3.88    |
| G1     | 67.27   | 61.75   |
| S      | 13.01   | 11.94   |
| G2/M   | 15.83   | 14.53   |

**Gambar 12: Efek ekstrak daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav terhadap galur sel kanker payudara T47D dengan menggunakan FACSCalibur.**

Kontrol: hanya berisi medium, sel dalam fase Sub-G1 0,49%, tidak terjadi apoptosis. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: sitotoksik, sel dalam fase Sub-G1 83,04%, menunjukkan efek apoptosis. Ekstrak *Piper crocatum* Ruiz & Pav 50µg/mL: sel dalam fase Sub-G1 4,23%, tidak terjadi apoptosis.

Berdasarkan hasil pemeriksaan Sub-G1 apoptosis dengan menggunakan FacsCalibur terhadap galur sel Kanker payudara T47D yang diperlihatkan oleh gambar 4, terlihat pada bahwa pemberian ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* hanya menyebabkan 4,23% sel berada dalam fase SubG-1 pada siklus sel. Keadaan ini menyerupai hasil yang ditunjukkan oleh sel pada galur sel kanker payudara yang tidak mendapat perlakuan (medium) yaitu sebesar 0,49%. Sedangkan pada perlakuan pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada galur sel kanker payudara T47D menyebabkan hampir seluruh sel (83,04) berada dalam fase sub-G1 pada siklus selnya. Gambaran yang diperoleh dari hasil pemeriksaan DNA sub-G1 apoptosis menunjukkan bahwa, baik ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* maupun medium tidak menginduksi terjadinya apoptosis sel pada galur sel kanker payudara T47D. Sedangkan pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada galur sel kanker payudara T47D yang bersifat sitotoksik, terlihat bahwa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sangat poten dalam menginduksi terjadinya apoptosis.



### 4.3. Pemeriksaan Pewarnaan DAPI

a. Kontrol



b. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



c. Ekstrak Daun *Piper crocatum* Ruiz & Pav 50 µg/mL

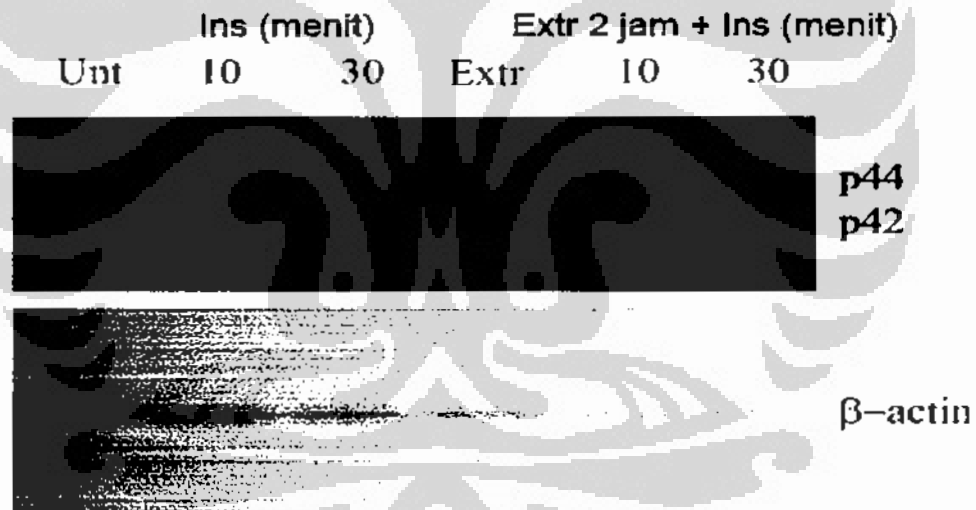


**Gambar 13. Hasil pemeriksaan pewarnaan DAPI dengan mikroskop Fluoresen pembesaran 400x pada galur sel kanker payudara dengan perlakuan yang berbeda.**

(a) Kontrol: hanya mengandung medium, tidak terlihat fragmentasi inti, jumlah sel banyak. (b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: sitotoksik: jumlah sel sedikit, terjadi fragmentasi inti. (c) Ekstrak *Piper crocatum* Ruiz & Pav 50 µg/mL: jumlah sel sedikit, tidak terjadi fragmentasi inti.

Berdasarkan hasil pemeriksaan pewarnaan DAPI pada galur sel kanker payudara yang mendapat perlakuan yang berbeda, terlihat pada gambar 5 diatas, menunjukkan bahwa pada kontrol maupun pada pemberian perlakuan ekstrak *Piper crocatum Ruiz & Pav* 50µg/mL tidak memperlihatkan fragmentasi dari inti sel sebagai tanda terjadinya apoptosis, sedangkan pada kelompok yang mendapat perlakuan pemberian larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> memperlihatkan gambaran fragmentasi dari inti sel. Gambran lain yang dapat terlihat berdasarkan foto yang terlihat pada kelompok yang mendapat perlakuan pemberian larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan kelompok yang mendapat perlakuan pemberian ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* 50µg/mL menunjukkan gambaran jumlah sel yang jaug lebih sedikit dibandingkan dengan jumlah sel yang terdapat pada kelompok kontrol (tidak mendapat perlakuan). Hal ini menunjukkan terjadinya hamabtan pertumbuhan sel.

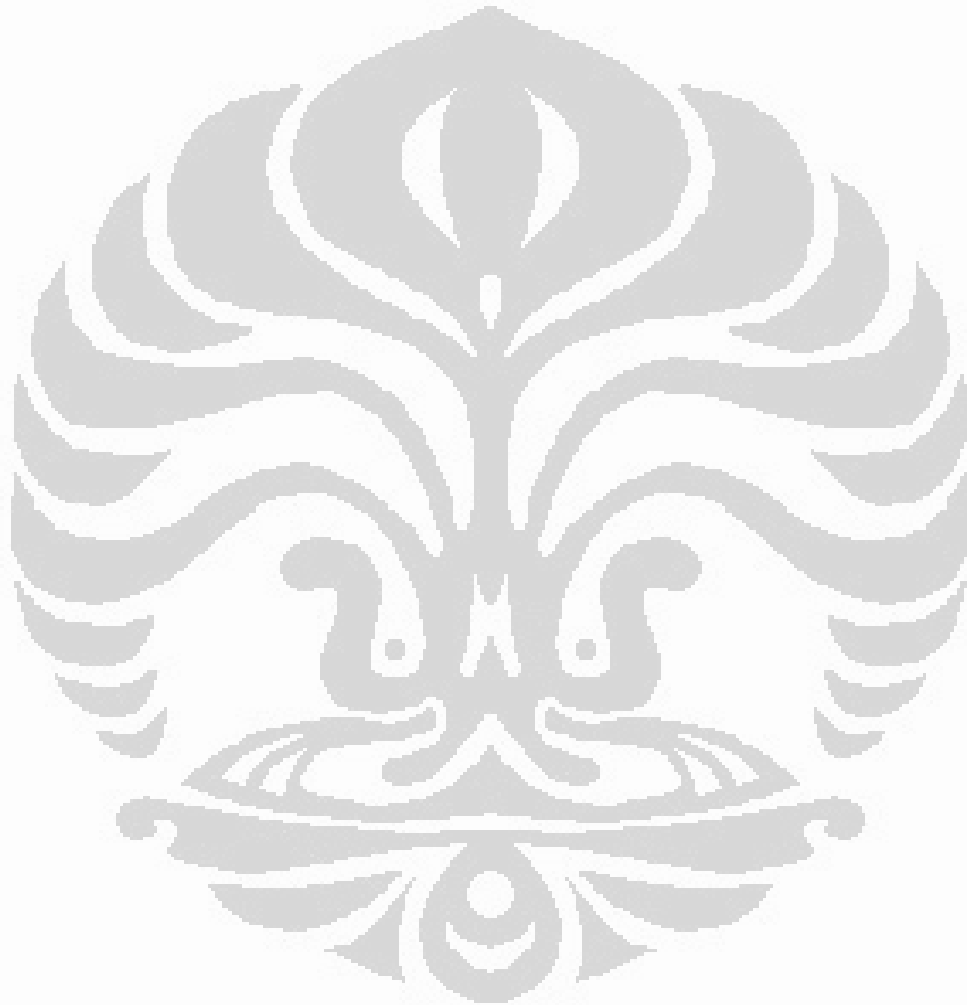
#### 4.4. Pemeriksaan Western Blot



**Gambar 14 : Hasil pemeriksaan Western Blot pada galur sel kanker payudara T47D yang mendapat perlakuan yang berbeda.**

Dari kiri kekanan: ekspresi p44/p42 terfosforilasi pada galur sel kanker payudara T47D: (1) tanpa perlakuan, (2) pemberian insulin setelah 10 menit, (3) Pemberian insulin setelah 30 menit, (4) penambahan ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* setelah 2 jam, (5) penambahan ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* dalam 2 jam dan setelah penambahan insulin pada 10 menit pertama, (6) penambahan ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* dalam 2 jam dan setelah penambahan insulin pada 30 menit pertama.

Berdasarkan hasil dari pemeriksaan Western Blot terhadap galur sel kanker payudara T47D yang mendapat perlakuan yang berbeda-beda, terlihat bahwa terjadi penurunan ekspresi protein p44 dan p42 terfosforilasi pada sel yang mendapat perlakuan penambahan ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav.* Keadaan ini menunjukkan bahwa ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* dapat menghambat fosforilasi dari protein p44/p42.



## BAB V PEMBAHASAN

Kanker merupakan penyebab kematian yang utama pada negara maju dan negara berkembang. Angka kejadian kanker yang terus meningkat menyebabkan kanker saat ini menempati urutan ke 6 dari penyakit yang terbanyak. Kanker payudara merupakan kanker yang paling banyak dan merupakan penyebab kematian terbanyak diderita pada wanita didunia.

Berbagai macam metode pengobatan telah dikembangkan dan diterapkan sebagai upaya meningkatkan kualitas terhadap pengobatan kanker payudara, termasuk penggunaan tanaman sebagai sumber bahan obat. Untuk mendapatkan hasil pengobatan yang baik, diperlukan pemahaman yang mendalam tentang karsinogenesis kanker payudara serta mekanisme kerja obat yang dapat digunakan sebagai anti kanker sehingga dapat diaplikasikan sebagai obat anti kanker yang aman dan efektif pada masa yang akan datang.

Penelitian ini merupakan bagian dari upaya untuk mendapatkan obat anti kanker yang berasal dari tanaman yang umumnya telah digunakan sebagai obat tradisional pada masyarakat tertentu sebagai anti kanker. Penelitian ini memanfaatkan daun yang berasal dari tanaman *Piper crocatum Ruiz & Pav* yang diperoleh dari hutan di Kalimantan Timur dan telah dipakai sebagai obat tradisional untuk mengobati kanker payudara pada suku Dayak. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek antiproliferasi ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz Pav* terhadap galur sel kanker payudara T47D serta mekanisme kerja yang mendasarinya. Untuk dapat membuktikan efek serta mekanisme kerja dari efek tersebut, maka perlu dilakukan beberapa metode pemeriksaan seperti pemeriksaan viabilitas sel dengan metode *MTT*, pemeriksaan fase siklus sel dengan pemeriksaan DNA sub-G1, pemeriksaan pewarnaan inti sel dengan metode DAPI, serta pemeriksaan Western Blot untuk melihat target intra seluler dari ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav*. Konsentrasi ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* yang dipakai dalam penelitian ini sebesar 50 µg/mL ditetapkan berdasarkan hasil yang diperoleh dalam pemeriksaan *MTT* sebelumnya yaitu berdasarkan pada konsentrasi dimana ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* dapat mengurangi jumlah sel hidup lebih dari 50% dibandingkan dengan kontrol.

Konsentrasi sebesar 50 µg/mL ini juga merupakan konsentrasi yang umum digunakan dalam penelitian-penelitian terhadap ekstrak sebelumnya sebagai anti kanker.

Berdasarkan hasil pemeriksaan viabilitas sel dengan menggunakan metode *MTT* membuktikan bahwa Ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* pada konsentrasi tertentu dapat menyebabkan hambatan pertumbuhan sel pada galur sel kanker payudara T47D, sedangkan penggunaan medium dan DMSO saja yang berfungsi sebagai kontrol negatif terbukti bahwa kedua zat tersebut tidak dapat menyebabkan hambatan pertumbuhan sel. Berdasarkan hasil pemeriksaan ini dapat dibuktikan bahwa yang menyebabkan efek antiproliferasi terhadap sel pada galur sel kanker T47D adalah efek dari pemberian ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav*. Pada pemeriksaan *MTT* hanya dapat membuktikan bahwa ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* dapat menyebabkan hambatan pertumbuhan tanpa mengetahui sebab terjadinya hambatan pertumbuhan. Hambatan pertumbuhan yang terjadi akibat pemberian ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* ini dapat disebabkan oleh karena terjadinya induksi apoptosis yang distimulasi oleh ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* atau induksi terhadap hambatan proliferasi sel pada galur sel kanker payudara T47D. Untuk mengetahui mekanisme hambatan pertumbuhan ini, diperlukan pemeriksaan lain yaitu dengan pemeriksaan DNA Sub-G1 untuk melihat proses apoptosis serta pemeriksaan pewarnaan DAPI untuk melihat gambaran ini sel

Berdasarkan pada pemeriksaan inti sel dengan menggunakan metode pewarnaan DAPI terlihat gambaran pada sel yang tidak mendapat perlakuan, jumlah selnya banyak serta tidak terlihat adanya gambaran sel yang mengalami apoptosis. Sedangkan pada sel yang mendapat perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atau pemberian ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* terlihat jumlah sel yang tumbuh sedikit serta terlihat gambaran sel yang mengalami apoptosis pada pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sedangkan pada pemberian ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* tidak ditemukan gambaran sel yang mengalami apoptosis. Pemeriksaan DNA sub-G1 dilakukan terhadap galur sel kanker payudara T47D yang telah mendapat perlakuan selama 24 jam. Keadaan ini dilakukan berdasarkan pengamatan-pengamatan sebelumnya terhadap pertumbuhan galur sel kanker payudara T47D yang terbukti dapat bertumbuh secara cepat dalam waktu 24 jam. Pada pemeriksaan fase siklus sel dengan metode DNA sub-G1 menggunakan *flowcytometri* terhadap galur sel kanker payudara T47D yang mendapat ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav*,



terlihat bahwa baik pada sel yang tidak mendapat perlakuan maupun yang mendapat pemberian ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* hanya sebagian kecil dari siklus selnya berada pada fase sub-G1. Sedangkan pada sel yang mendapat pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebagian besar siklus sel berada dalam fase sub-G1. Gambaran seperti ini juga terjadi pada setiap pengulangan pemeriksaan (*triplicate*). Berdasarkan pada teori bahwa sel yang mengalami apoptosis akan mempunyai kemampuan pewarnaan yang lebih rendah dari sel normal dan akan berada pada fase Sub-G1. Berdasarkan hasil pemeriksaan DNA sub-G1 apoptosis pada siklus sel terlihat bahwa terjadi hambatan pada sel untuk dapat memasuki fase sintesis (S). Keadaan ini menggambarkan adanya hambatan terhadap proliferasi sel. Berdasarkan hasil pemeriksaan DNA Sub-G1 apoptosis ini terbukti bahwa ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* menyebabkan hambatan proliferasi dan tidak menginduksi terjadinya apoptosis.

Berdasarkan pada pemeriksaan terhadap viabilitas sel, serta pewarnaan inti sel dan pemeriksaan terhadap fase siklus sel, dapat dibuktikan bahwa ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* dalam konsentrasi tertentu, memiliki efek antiproliferasi terhadap sel pada galur sel kanker payudara T47D.

Untuk mengetahui lebih jauh tentang mekanisme kerja efek antiproliferasi ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav*, perlu dilakukan pemeriksaan lain yang bertujuan untuk mengetahui target intraseluler dari ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav*. Untuk mengetahui target intraseluler ini perlu dilakukan analisa terhadap aktivitas dari p44/p42 terfosforilasi pada galur sel kanker payudara T47D yang mendapat perlakuan pemberian ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav*. Berdasarkan pemeriksaan dengan menggunakan metode Western Blot terlihat bahwa pemberian ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* 50µg/mL pada galur sel kanker payudara T47D menyebabkan penurunan aktivitas dari p44/p42 terfosforilasi baik tanpa pemberian insulin maupun pada pemberian insulin pada menit ke 10 dan pada menit ke 30 bila dibandingkan dengan sel pada galur sel kanker payudara T47D yang tidak mendapat perlakuan. Sel yang mendapat perlakuan penambahan ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* 50µg/mL dengan penambahan insulin, pada menit ke 30 terlihat ekspresi dari p44/p42 terfosforilasi yang hampir tidak terlihat. Hasil dari pemeriksaan ini membuktikan bahwa ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* 50µg/mL dapat menghambat fosforilasi p44/p42 pada sel kanker payudara T47D. Efek

penurunan terhadap aktivitas p44/p42 terfosforilasi ini, merupakan salah satu mekanisme penghambatan pertumbuhan sel pada galur sel kanker payudara T47D.

Penelitian sebelumnya telah menyebutkan bahwa signal transmisi insulin dalam proliferasi sel adalah melalui jalur aktivasi p44/p42. Pada penelitian ini dapat dibuktikan bahwa insulin dapat menstimulasi aktivasi p44/p42. Berdasarkan hasil pemeriksaan Western Blot ini, dapat membuktikan bahwa ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* 50µg/mL dapat menghambat aktivasi insulin dalam menstimulasi fosforilasi p44/p42.

Berdasarkan pada keempat pemeriksaan diatas, dapat dibuktikan bahwa ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* 50µg/mL dapat menyebabkan hambatan pertumbuhan sel pada galur sel kanker payudara T47D. Hambatan pertumbuhan yang diakibatkan oleh ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* 50µg/mL terhadap sel pada galur sel kanker payudara T47D ini tidak disebabkan oleh karena ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* 50µg/mL dapat menyebabkan induksi apoptosis tetapi sebagai efek dari hambatan pertumbuhan yang terjadi melalui hambatan pada jalur aktivasi p44/p42.

Pada penelitian terdahulu banyak dibuktikan tentang efek antioksidan pada famili *Piperaceae* (sirih-sirihan), tetapi belum ada penelitian yang membuktikan ataupun menghubungkan peran sebagai antioksidan dengan antiproliferasi. Antioksidan dan antiproliferasi merupakan dua hal yang berbeda. Antioksidan berperan dalam mengeliminasi radikal bebas sehingga radikal bebas ini tidak dapat berikatan dengan DNA membentuk DNA *adduct* yang dapat menimbulkan kesalahan pada proses transkripsi gen sehingga akan menyebabkan terjadinya kanker. Berdasarkan mekanisme tersebut antioksidan dapat digunakan sebagai pencegah terjadinya kanker. Sedangkan antiproliferasi berperan dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Dalam suatu pembahasan pada penelitian lain dikatakan bahwa peran sebagai antioksidan dan antiproliferasi berhubungan dengan besar konsentrasi ekstrak. Pada pembahasan tersebut dikatakan bahwa ekstrak yang mempunyai efek antioksidan, pada konsentrasi yang lebih tinggi akan mempunyai efek sebagai antiproliferasi.

## BAB VI

### KESIMPULAN dan SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian yang diperoleh tentang efek ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* terhadap galur sel kanker payudara T47D, membuktikan bahwa penelitian ini telah mencapai tujuan serta dapat dibuat kesimpulan bahwa :

- Ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* memiliki efek antiproliferasi pada galur sel kanker payudara T47D.
- Ekstrak daun *Piper crocatum Ruiz & Pav* tidak menginduksi terjadinya apoptosis pada galur sel kanker payudara.
- Ekstrak daun *Piper crocatum Riz & Pav* dapat menghambat proliferasi sel pada galur sel kanker payudara melalui p44/p42 jalur

#### 6.2. Saran

Penelitian ini diharapkan dapat dilanjutkan sebagai upaya :

- o Mengetahui kandungan zat aktif yang berperan sebagai antiproliferasi
- o Melakukan uji preklinis dan uji klinis untuk melihat efektivitas dan keamanannya.
- o Menjelaskan hubungan antara fungsi antioksidan dengan antiproliferasi

## DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization (2008) Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>. Akses 2 Januari 2009
2. Khanna S. Implementation of cancer management in Indonesia, WHO representative to Indonesia. Presented at the National Seminar on the Implementation of Cancer Management in Indonesia, Ciawi, August 2-6, 1992.
3. wasisto B. The National Control Cancer Programme in Indonesia. Ministry of Health, Republic of Indonesia. Presented at the WHO Meeting on National Cancer Programme, Geneve, Switzerland, November 25-29, 1991.
4. Poorwo Sudarmo S. dan Suhardi: Kecenderungan dan permasalahan penyakit kanker. Litbang Kes. Depkes RI. Diajukan pada Lokakarya Implementasi Penanggulangan Kanker di Indonesia, Ciawi, 2 s/d 6 Agustus 1992.
5. Mulyadi B. Cancer Control Programme in Indonesia. Ministry of Health. Presented at the 4<sup>th</sup> Continuing Medical Education on Early Detection and Prevention of Cancer. Medical Faculty, University of Indonesia, Jakarta, September 23-25, 1998.
6. Mc Pherson K, Steel C, Dixon J. Breast cancer -- epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000; 321: 624-8.
7. Nichols HB, Trentham-Dietz A, Love RR, Hampton JM, Anh PTH, Allred Dc, et al. differences in breast cancer risk factor by tumor marker subtypes among premenopausal Vietnamese and Chinese woman. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 2005; 14: 41-7.
8. Suzanna E. Editor. Registrasi Kanker Berdasarkan Patologi di Rumah Sakit Kanker Dharmais, Jakarta, Indonesia. In: Dharmais PRKRSK, 2004. p. Data belum dipublikasi.
9. Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, Snell L, Watson P, Murphy LC. Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1747-53.
10. Johnson G. Signal transduction abnormalities in cancer. Mitogen-activated protein kinase regulation is altered in brain cancer. *J Clin Invest* 1997; 99: 1463-4.
11. Sivaraman V, Wang H-Y, Nuovo G, Malbon C. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest* 1997; 99: 1478-83.
12. Biscardi J, Ishizawa R, Silvia C, Parsons S. Tyrosine kinase signaling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor and c-Src interaction in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2000; 2: 203-10.
13. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103: 211-25
14. Zhang X, Yee D. Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Insulin-like growth factors and their receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2000; 2: 170-5
15. Donnellan R, Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1998; 51: 1-7
16. Ross J, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, et al. Targeted therapy in breast cancer. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 379-98

17. Hobday TJ, Perez EA. Molecularly targeted therapy for breast cancer. *Cancer Control* 2005; 12: 73-82
18. Traxler P. Tyrosine kinases as targets in cancer therapy – successes and failure. *Expert Opin Ther Targets* 2003; 7: 215-34
19. Brochund M. Selecting the right targets for cancer therapy. In: Brochund M, Foote M, Giaccone G, Olopade, Workman P, editors. *Principles of molecular oncology*. New Jersey: Humana Press; 2004: p 3-49
20. Cristofanili M, Hortobagyi GN. Molecular targets in breast cancer: current status and future direction. *Endocr Relat Cancer* 2002; 9: 249-65
21. Pettit, G. R., Pierson, F. H. & Herald, C. L. *Anticancer Drugs from Animals, Plants and Microorganisms* (Wiley, New York, 1994).
22. Newman, D. J., Cragg, G. M. & Snader, K. M. The influence of natural products on drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* 17, 215–234 (2000).
23. Zubrod, C. G. Origins and development of chemotherapy research at the National Cancer Institute. *Cancer Treat. Rep.* 68, 9–19 (1984).
24. Cragg, G. M. et al. in *Human Medicinal Agents from Plants* (eds Kinghorn, A. D. & Balandrin, M. F.) 80–95 (ACS, Washington, 1993).
25. Russo J, Hu Y-F, Yang X, Russo IH. Chapter 1: Developmental, cellular and molecular basis of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000; 27: 17-37.
26. Dickson RB, Pestell RG, Lipman ME. Cancer of the breast In: De Vita VTJ, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer Principles and Practice of Oncology*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
27. Pearson G, Robinson F, Gibson T, Xu B, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) Kinase pathways: regulation and physiological function. *Endocr Rev* 2001; 22:153-83.
28. Denhart DT. Signaling transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian Cell: the potential for multiplex signaling. *Biochem J*, 1996; 318: 729-47.
29. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/ MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351: 289-305.
30. Kalderon D. Growth factor signaling pathways in cancer. In: Brochund M, Foote M, Giaccone G, Olopade O, Workman P, editors. *Principles of molecular oncology*. New Jersey: Humana Press; 2004: pp267-315.
31. Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, Snell L, Watson P, Murphy LC. Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1747-53.
32. Sivaraman V, Wang H-Y, Nuovo G, Malbon C. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest* 1997; 99: 1478-83.
33. Gaben A, Saucier C, Bedin M, Redeuilh G, Mester J. Mitogenetic activity in human breast cancer cells does not rely on direct induction of mitogen-activated protein kinase/ extracellularly regulated kinase or phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 2700-13.
34. Sherr C. Cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000; 60: 3689-95.

35. Fierson HF Jr, Gaffey MJ, Zukerberg LR, Arnold A, Williams ME. Immunohistochemical detection and gene amplification of cyclin D1 in mammary infiltrating ductal carcinoma. *Mod Pathol* 1996; 9: 725-30.
36. Pestell Rg, Albanese C, Reutens AT, Segall JE, Lee RJ, Arnold A. The cyclin and cyclin dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocr Rev* 1999; 20: 501-34.
37. Lukas J, Bartkova J, Bartek J. Convergence of mitogenic signaling cascade from divers classes of receptor at the cyclin D-cyclin dependent kinase-pRb controlled G1 Checkpoint. *Mol Cel Biol* 1996; 16: 6917-25.
38. Veronesi U, Salvadori B. Chapter 17.3. Breast conservation trial from the Milan National cancer Institute. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S (editors). *Disease of the Breast*. Philadelphia: Lippincot Raven, 1996: pp579-84.
39. Brochund M. Selecting the right targets for cancer therapy. In: Brochund M, Foote M, Giaccone G, Olopade O, Workman P, editors. *Principles of molecular oncology*. New Jersey: Humana Press; 2004: pp 3-49.
40. Martin LA, Farmer I, Johnston SRD, Ali S, Dowsett M. Elevated ERK 1/ERK 2/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling during long-term estrogen deprivation. *Endocr Relat cancer* 2005; 12: S75-S84.
41. Cristofanilli M, Hortobagyi GN. Molecular targets in breast cancer: current status and future directions. *Endocr relat Cancer* 2002; 9: 249-65.
42. Keydar I, et al. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J. Cancer* 15: 659-70, 1979, Pubmed: 228940.
43. Mooney LM, Al-Sakkaf KA, Brown BL, Dobson PRM. Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. *British journal of cancer*. 2002. 87. 909-17.
44. Schafer, J.M., Lee, E.S., O'Regan, R.M., Yao, K., and Jordan, V.C., 2000, Rapid development of tamoxifen-stimulated mutant p53 breast tumors (T47D) in athymic mice, *Clin. Cancer Res.*, 6, 4373-4380
45. Shultes RE, Raffauf RF (1990) *The healing forest. Medicinal and toxic plants of the northwest Amazonia.* Dudley TR (ed) *Historical, ethno-and economic botany series*, vol 2. Dioscorides Press, Portland, OR, p 484
46. Sudewo B. *Basmi penyakit dengan Sirih Merah*. Agro Media Pustaka
47. Iwu MM (ed) (1993). *Handbook of African medicinal plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, p 435
48. Evans PH, Bowers WS, Funk EJ (1984). Identification of fungicidal and nematocidal components in the leaves of Piper betle (Piperaceae). *J Agric Food Chem*; 32: 1254-56
49. Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, Tyagi OD, Prasad AK, Wengel J, Olsen CE, Boll PM (1997) *Phytochemistry of the genus Piper*. *Phytochemistry* 46:597-673
50. Lee S-E, Park B-S, Kim M-K, Choi W-S, Kim H-T, Cho K-Y, Lee S-G, Lee H-S (2001) Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. *Crop Prot* 20:523-528

51. Howard, B.M., Clarkson, K., Bernstein, R.C., 1979. Simple prenylated hydroquinone derivatives from the marine urochordate *Aplidium californicum* natural anticancer and antimutagenic agents. *Tetrahedron Lett.* 46, 4449–4452.
52. Fadli, M., Aracil, J.M., Jeanty, G., Banaigs, B., Francisco, C., Moreau, S., 1991. Mediterranean E – Proposed structure of rearranged meroditerpene from brown-algae, *Cystoseira mediterranea*. *Tetrahedron Lett.* 32, 2477–2480.
53. Danelutte, A.P., Lago, J.H.G., Young, M.C.M., Kato, M.J., 2003. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium*. *Phytochemistry* 64, 555–559.
54. Lago, J.H.G., Ramos, C.S., Casanova, D.C.C., Morandim, A.A., Bergamo, D.C.B., Cavaleiro, A.J., Bolzani, V.S., Furlan, M., Guimaraes, E.F., Young, M.C.M., Kato, M.J., 2004. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *J. Nat. Prod.* 49, 1783–1788.
55. Muller, W.E.G., Maidhof, A., Zahn, R.K., Schoroder, H.C., Gasic, M.J., Heidemann, D., Bernd, A., Kurelec, B., Eich, E., Seibert, G., 1985a. Potent antileukemic activity of the novel cytostatic agent avarone and its analogs in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 45, 4822–4826.
56. Cotele, N., Moreau, S., Bernier, J.S., Catteau, J.P., Henichart, J.P., 1991. Antioxidant properties of natural hydroquinones from the marine colonial tunicate *Aplidium californicum*. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 63–68.
57. Baldoqui, D.C., Kato, M.J., Cavaleiro, A.J., Bolzani, V.D., Young, M.C.M., Furlan, M., 1999. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry* 51, 899–902.
58. Okunade, A.L., Hufford, C.D., Clark, A.M., Lentz, D., 1997. Antimicrobial properties of the constituents of *Piper aduncum*. *Phytother. Res.* 11, 142–144.
59. Green, T.P., Treadwell, E.M., Wiemer, D.F., 1991. Arieianal, a prenylated benzoic acid from *Piper arieianum*. *J. Nat. Prod.* 62, 367–368.
60. Roussis, V., Ampofo, S.A., Wiemer, D.F., 1990. A prenylated benzoic-deoxyribose and other molecules by hydroxyl radicals produced by the acid derivative from the leaves of *Piper taboganum*. *Phytochemistry* 29, Fenton reaction in the presence of ascorbic acid. *Free Rad. Res.* 23, 1787–1788. 229–243.
61. L.F. Yamaguchi et al./*Phytochemistry* 67 (2006) 1838–1843 Orjala, J., Erdelmier, C.A.J., Wright, A.D., Rali, T., Sticher, O., 1993. 5 Terreux, C., Gupta, M.P., Hostettmann, K., 1998. Antifungal New prenylated p-hydroxybenzoic acid-derivatives with antimicrobial benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. *Phytochemistry* 49, and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. *Planta Med.* 59, 461–464. 546–551.
62. Lissi, E., Pascual, C., Del Castillo, M.D., 1992. Luminol luminescence induced by 2,20-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Rad. Res. Commun.* 17, 299–311.
63. Zhao, M.J., Jung, L., 1995. Kinetics of the competitive degradation
64. Correa, M.P., 1984. *Dicionario das Plantas Uteis do Brasil e das Exoticas Cultivadas*, vol. 1. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro.
65. Gleitz, J., Beile, A., Wilkens, P., Ameri, A., Peters, T., 1997. Antithrombotic action of the Kava pyrone (+)-kavain prepared from *Piper methysticum* on human platelets. *Planta Medica* 63, 27–30.
66. Venkateswarlu, V., 1997. Cyclo-oxygenase inhibitors from spices. *Indian Drugs* 34, 427–432.

67. Smith, L.J., 1996. Leukotrienes in asthma: the potential therapeutic role of antileukotriene agents. *Archives of Internal Medicine* 156, 2181–2189.
68. Kondoh, H., Sato, Y., Kanoh, H., 1985. Arachidonic acid metabolism in cultured mouse keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 85, 64–69.
69. McColl, S.R., Hurst, N.P., Cleland, L.G., 1986. Modulation by phorbol myristate acetate of arachidonic acid release and leukotriene synthesis by human polymorphonuclear leukocytes stimulated with A23187. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 141, 399–404.
70. Ashendel, C.L., Boutwell, R.K., 1979. Prostaglandin E and F levels in mouse epidermis are increased by tumor-promoting phorbol esters. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 90, 623–627.
71. Furstenberger, G., Marks, F., 1980. Early prostaglandin E synthesis is an obligatory event in the induction of cell proliferation in mouse epidermis in vivo by phorbol ester TPA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 92, 749–756.
72. Inoue, H., Mori, T., Shibata, S., Koshihara, V., 1989. Modulation by glycyrrhetic acid derivatives of TPA-induced mouse ear edema. *British Journal of Pharmacology* 96, 204–210.
73. Miyakado M, Nakayama I, Ohno N (1989) Insecticidal unsaturated isobutylamides. From natural products to agrochemical leads. In: *Insecticides of plant origin*. Amer Chem Soc Symp Ser 387, Washington, DC, pp 173–187
74. Arung ET, Shimizu K, Ryuichiro K. Inhibitory effect of isoprenoid-substituted flavonoids isolated from *Artocarpus heterophyllus* on Melanin Biosynthesis. *Planta Med*, 2006; 72: 847-850.
75. Sandra F, Matsuda M, Yoshida H, Hirata M. Inositol hexakisphosphate blocks tumor cell growth by activating apoptotic machinery as well as by inhibiting the Akt/NFκB-mediated cell survival pathway. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 2031-2041.



## Lampiran 1

### Antiproliferative Effect of Methanolic Extract from *Piper crocatum*

#### Ruiz & Pav. leaves on Human breast (T47D) cells *in vitro*

Britanto Dani Wicaksono<sup>1</sup>, Aldrin Neilwan P<sup>2</sup>, Yohana Ayupriyanti Handoko<sup>1</sup>, Enos Tangke Arung<sup>1,3</sup>, Irawan Wijaya Kusuma<sup>3</sup>, Dina Yulia<sup>1</sup>, Ferry Sandra<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Stem Cell and Cancer Institute; Jalan Ahmad Yani no. 2 Pulomas, Jakarta, 13210, Indonesia

<sup>2</sup> Dharmais Hospital; Jl. Let Jend S Parman Kav 84-86 Slipi, Jakarta, 11420, Indonesia

<sup>3</sup> Wood Chemistry Laboratory, Forest Product Department, Forestry Faculty, Mulawarman University; Jalan KH. Dewantara, Kampus Gn. Kelua, Samarinda, East Borneo 75123, Indonesia.

#### Abstract

**Purpose:** We investigated anti-cancer properties of methanolic extract from *Piper crocatum* Ruiz & Pav. leaves and its mode of action in human breast cancer (T47D) cells.

**Methods:** Anti-cancer property and mechanism of the extract were evaluated by its effect on cell viability, nuclear morphology, cell cycle progression and the expression of phosphorylated p44/p42 as a marker for cell proliferation.

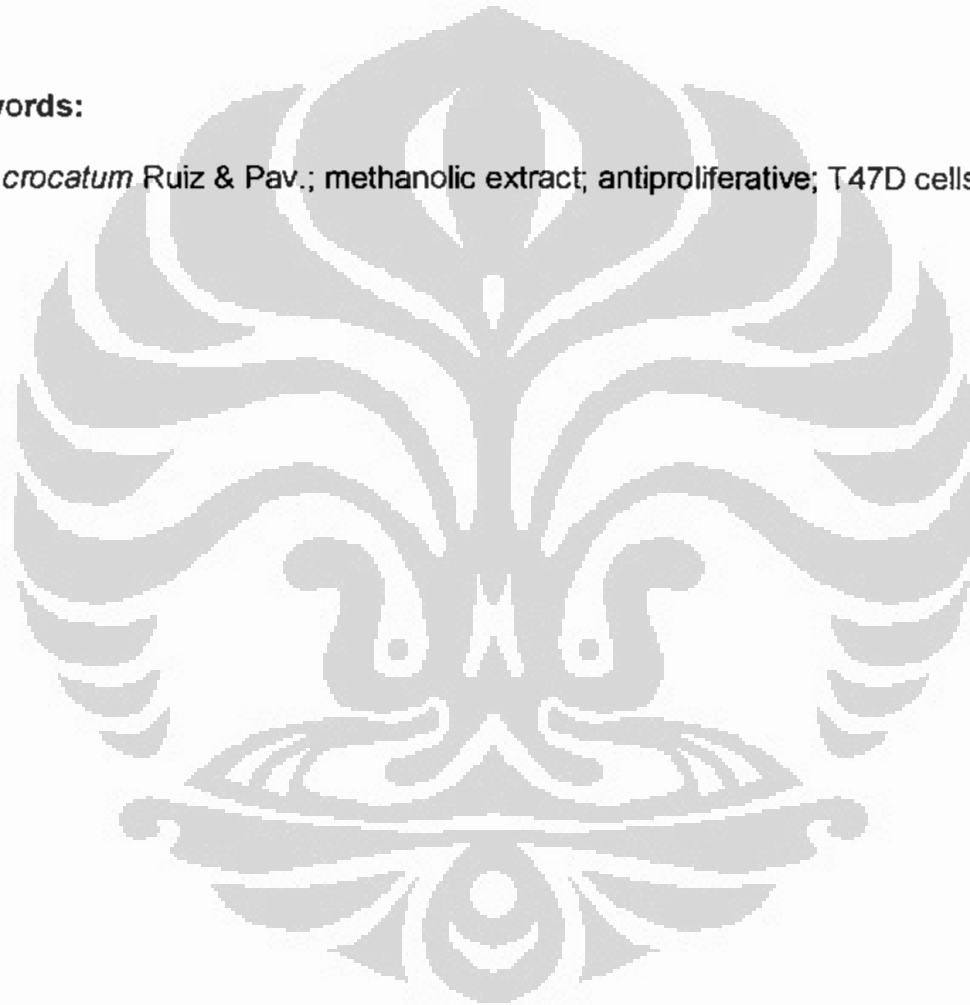
**Results:** The results showed that there was a reduction of cell viability by the extract in concentration dependent manner and no alteration of nuclear morphology observed. There were negligible changes observed in Sub-G1 phase formation after extract treatment. Expression of phosphorylated p44/42 was decreased due to the extract only. Inclusion the extract in the incubation medium decreased insulin-stimulated

phosphorylation of p44/p42 indicating that anti-proliferative effect of the extract was via p44/p42 pathway.

*Conclusion:* All together, the data indicated that *P. crocatum* methanolic extract inhibits the growth of human breast cancer (T47D) cells via inhibition of p44/p42 phosphorylation.

**Keywords:**

*Piper crocatum* Ruiz & Pav.; methanolic extract; antiproliferative; T47D cells



## Introduction

Cancer is a major health problem and a leading cause of death not only in developed countries, but also in developing countries, in where approximately 72% of all cancer death in the world occurred. Among women, breast cancer is the most commonly diagnosed cancer and frequent type of cancer causing death, resulting from metastatic spread of primary tumors<sup>1</sup>. Although common methods for cancer treatment have yielded some advantages, there is an ongoing need for both improvement of current therapeutic strategies and the search for novel agents.

Throughout medical history, nature has long been shown an excellent and reliable source of new drug discovery and development, including anti-cancer agents. Approximately more than 60% of currently used anticancer chemotherapeutics are derived in one way or another from natural sources, including plants<sup>2,3</sup>. In addition, there are more than 85,000 plant species that have been documented for medical use globally. The World Health Organization (WHO) estimates that almost 75% of the world's population has therapeutic experience with herbal remedies<sup>4</sup>. The major categories of plant-derived compounds that have medicinal properties are terpenoids, flavonoids, and alkaloids<sup>5</sup>. Nowadays, several cancer therapies used trace their origin to plants are vincristine and vinblastine from *Catharanthus roseus*<sup>6</sup>, taxol and docetaxel from *Taxus brevifolia*<sup>7</sup>, and camptothecins from *Camptotheca acuminata*<sup>8</sup>.

*Piper crocatum* Ruiz and Pav. is traditionally used by Indonesians for treating various diseases, including breast cancer<sup>9</sup>. In East Borneo, where the specimen was collected for this study, this plant is called Kerapakng Timang and people has empirically used for curing cancer, which is traditionally named a deadly disease. To best of our knowledge, however, there is no scientific evidence currently available

regarding the anti-cancer properties of this plant. This, therefore, prompted us to investigate the anticancer properties of methanolic extract of this plant on human breast cancer (T47D) cells as a model system to study. The biological activity of the extract was investigated *in vitro* by investigating cell viability, cellular and nuclear morphology, and examining sub-G1 portion after treatment with the extract. In addition, study was also conducted to detect changes in the activity level of p44 and p42 mitogen-activated protein kinases (MAPKs; also known as extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 (ERK1/2)) when cells were exposed to extracts. The p44/p42 signaling was investigated since this signaling pathway has been associated with cell growth and represents an important target for anti-cancer therapy<sup>10,11</sup>. Some plant-derived products have also been reported to alter p44/p42 activities<sup>12,13,14</sup>.

## **Experimental**

### ***Plant extracts***

The leaves of *Piper crocatum* Ruiz & Pav. were collected from East Borneo forest by an exploration team from the Wood Chemistry Laboratory, Forestry Faculty, Mulawarman University, Samarinda, East Borneo, Indonesia and Stem Cell and Cancer Institute (SCI) Jakarta, Indonesia on March 2008. The plant was identified by Raharjo, BSc. in the Dendrology Laboratory, Forestry Faculty, Mulawarman University, Indonesia and the voucher specimen was deposited in the Wood Chemistry Laboratory, Forestry Faculty, Mulawarman University, Indonesia.

The air-dried and ground leaves (10 g) were soaked in methanol (250 ml) for 24 h, and then the mixture was filtered to remove particulate matter. The extract was

concentrated using rotary evaporator under vacuum to obtain a final residue (1 g) for further experiment. The extraction was conducted at the Wood Chemistry Laboratory, Forest Product Department, Forestry Faculty, Mulawarman University, Samarinda, East Borneo, Indonesia.

### **Cell culture**

T47D cells were obtained from the Indonesian Institute of Sciences Research Centre for Chemistry, Natural Products, Food and Pharmaceuticals Division, Bandung, Indonesia. The cells were grown and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with L-glutamine supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, sodium bicarbonate, 100 µg/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin at 37°C in humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>.

### **Cell viability assay**

Cell viability was determined by a micro culture tetrazolium technique (MTT) assay performed according to the method described by Arung *et al.*<sup>15</sup>, with minor modifications. The MTT assay provides a quantitative measurement of viable cells by determining the amount of formazan crystals produced by metabolically active cells. Briefly, cells were seeded into a 96-well plate (5 x 10<sup>3</sup> cells per well). After 24 h incubation, the medium was replaced with fresh medium containing leaves extract, dimethyl sulfoxide (DMSO; 1%, v/v), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0.0014%, v/v) or medium alone and the cells were incubated for a further 24 h. DMSO was used as a negative control since this was used to resuspend the extract. MTT reagent [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (10 µl) in PBS (5 mg/ml)] was added to each well. The plate was incubated in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 3

h, and then media was discarded and replaced with 100 µl of acidified isopropanol (containing 1 N HCl) and incubated for 2 h. The absorbance of cells was measured at 570 nm by a microplate reader. Untreated cells were counted with a hemacytometer and used for interpolating the absorbance of MTT assay results. The data was presented as percentage of viable cells (%). The data was analyzed with the two-tailed student's *t*-test against the untreated sample.

### ***Structural analysis and DAPI staining***

DAPI staining was performed as described by Sandra *et al.*<sup>16</sup> to determine the level of apoptosis in the cells. Briefly, the cells ( $5 \times 10^3$ ) were seeded onto sterilized cover slips in 60 mm Petri dish for 24 h and treated with the extract for another 24 h. Untreated cells and cells treated with DMSO (1%, v/v) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.0014%, v/v) were used as controls. Treated cells and controls were rinsed with phosphate buffered saline (PBS), fixed with ice-cold 10% trichloroacetic acid, and further washed with cold 70%, 80%, 90% and absolute ethanol. Cells were permeabilized with Triton-X (10%, v/v) and stained with 1 µg/ml 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 4 min. To reduce the background, the stained cells were washed with PBS and were cover-slipped with 90% glycerol and observed under a fluorescence microscope (Zeiss Axio Observer Z1, Göttingen, Germany).

### ***Sub-G1 apoptosis assay and flow cytometry***

The cells were separated into four treatment groups as mentioned in the cell viability assay section above. The cells were analyzed for sub-G1 apoptosis using the

method described by Sandra *et al.*<sup>16</sup>. Briefly, the cells were seeded into a 24-well plate ( $25 \times 10^3$  cells per well) and incubated for 24 h. The medium was then replaced with fresh medium containing the extract, DMSO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or medium alone. After 24 h, cells were harvested and suspended in 1 ml of hypotonic fluorochrome solution (50 µg/ml propidium iodide in 0.1% sodium citrate containing 0.1% Triton X-100). Cell suspensions were placed at 4°C in the dark for 1-2 h before flow cytometric analysis. The propidium iodide fluorescence of individual nuclei was measured using an FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, California).

### ***Immunoblotting***

Western blot was performed as described by Sandra *et al.*<sup>16</sup>. For immunoblotting, the cells were treated with extract (50 µg/ml) for 2 h, with insulin (1µg/ml) observed at 10 and 30 min after insulin treatment and with extract for 2 hours in addition to insulin (1µg/ml) observed at 10 and 30 min after insulin addition. The untreated and treated cells were lysed with buffer [20 mM HEPES buffer pH 7.2, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 50 mM sodium fluoride, 2mM sodium orthovanadate, 30 mM sodium pyrophosphate and a cocktail of protease inhibitors (containing 10 µM pepstatin A, 10 µM leupeptin and 1 mM *p*-amidinophenyl methanesulfonyl fluoride; Sigma)] and scraped. Protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, CA, USA). Proteins from cells were separated by 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Equal loading of proteins was routinely ascertained by Ponceau S staining. After blocking with 5% skim milk in Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2), the membrane was incubated in 1 : 1,000 diluted rabbit polyclonal anti-

phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204; Cell Signalling Technology, MA, USA), or 1 : 1,000 diluted mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin antibodies (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). The secondary antibody used was 1: 1,000 diluted horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (Cell Signalling Technology, MA, USA) or 1:2000 diluted anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) IgG antibodies. The bound antibodies were visualized by G:Box Syngene system (Beacon House, Cambridge, UK).

### **Statistical analysis**

The  $IC_{50}$  (median inhibition concentration) is the concentration of toxic compound that reduces the biological activity by 50%. The  $IC_{50}$  value was obtained from the MTT assay and calculated using non-linear regression analysis in Microsoft Excel software. Value was given as geometric means. Differences were considered to be statistically significant when  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ .

## **Result**

### ***Cytotoxic effects of leaf extract in T47D cells***

The results of cytotoxic effect of various extract concentrations from *Piper crocatum* leaves (5, 10, 20 and 50  $\mu\text{g/ml}$ ) on T47D cells after 24 exposures as determined by MTT assay are shown in Figure 1. Cells with media only (untreated) and DMSO added were also measured as negative controls, whereas cells treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  was as a positive control. A concentration-dependent decrease in cell viability was observed due to extract treatment, whereas only small decrease ( $< 20\%$ ) of cell viability when cells were treated with DMSO, a solvent used to resuspend the extract.  $IC_{50}$  was reached at a concentration 44, 25  $\mu\text{g/ml}$ .



### ***Cell and nuclear morphology***

Based on the MTT assay results, DAPI staining was conducted to investigate whether the leaf extract reduced cell viability by inducing apoptosis, which is indicated by the appearance of nuclear fragmentation and changes in cell morphology. As seen in Figure 3, the cells with no extract treatment (Figure 2 A) and cells treated with DMSO and the extract (Figures 2 B and D) showed similar the cell and nuclear morphology and apparently there was no indication of apoptosis. Unlike those, cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 2 C) showed nuclear fragmentation and cell morphology changes as an indicative of apoptosis (indicated by arrows). Although there was no apoptosis occurred, it appeared that the extract inhibited the growth of the cells (compare Figure 2 A and B with Figure 2 D).

### ***Sub-G1 apoptosis***

To further verify that the leaf extract did not cause cell apoptosis, flow cytometric analysis of cells stained with propidium iodide was conducted. The results confirmed that there was likely no nuclear fragmentation, as an indicative of apoptosis, in cells showed by negligible changes observed in sub-G1 portion after treatment with the extract. Sub-G1 fraction in the cells without treatment was 0.49 % (Figure 3 A), whereas those treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (as a positive control) was 83.04 % (Figure 3 B). After treatment with 25 and 50 µg/ml of the extract, sub-G1 fractions formed were 1.66 and 4.23 %, respectively (Figures 3 C and D).

### ***Immunoblotting***

Since leaf extract apparently may not cause apoptosis, the mechanism of antiproliferative effect of the extract was investigated by examining the expression of activated p44/p42 proteins. Transmission of insulin signal in cell proliferation was known also via p44/p42 activation (Capeau, 2003), therefore, treatment cells with insulin were also conducted as a control.

Figure 4 showed that T47D cells exposed to 50 µg/ml of the leaf extract appeared to decrease the p44/p42 activities compared to untreated indicated by almost undetected signal intensity present in the treated cells, whereas weak signals appeared in untreated. Treatment cells with insulin at 1 µg/ml caused transient p44/p42 activation, which confirmed the involvement of p44/p42 in transmitting insulin signal (Figure 4). Inclusion of 50 µg/ml of the leaf extract in the incubation medium decreased expression of insulin-stimulated phosphorylation of p44/p42 at 10 and almost no signal was detected at 30 min (Figure 4).

### **Discussion**

Nowadays, cancer is still one of the leading causes of early death all around the globe. Various treatments to cancer patients have currently been undertaken, including the use of natural products from higher plants. An effort to discover an effective, novel and scientifically reliable natural compound, therefore, is indispensable to do. Apart from that, understanding the mechanism of drug as an anti-cancer is also important for future therapeutic application.

This study is part of our effort in discovering new anti-cancer agent from *Piper crocatum*, known locally as Kerapakng Timang in East Borneo, Indonesia, and has been widely used to treat variety of diseases including breast cancer<sup>9</sup>. Although this plant has been commonly used, the scientific knowledge regarding biological activity and active components in *P. crocatum* is poorly defined. This study, therefore, investigated the potential anti-cancer activities of methanolic extract from *P. crocatum* leaves on the growth of human breast cancer (T47D) cells.

The extract reduced cell viability at the concentration-dependent fashion as shown in the MTT studies. Proliferation of T47D cells exposed to the leaf extract was potently inhibited compared to unexposed cells, as determined by light microscope (data not shown) and no cell apoptosis was observed as examined by DAPI staining and sub-G1 apoptosis assay using flow cytometry.

Intracellular target of methanolic extract of *P. crocatum* leaves was further explored by examining the activity level of protein tyrosine kinases, p44/p42. Denhard<sup>10</sup> and Seger and Krebs<sup>11</sup> explained that p44/p42 is a central player in Ras/MAPK cascade that regulate cell growth, differentiation and survival. T47D cells exposed to 50 µg/ml of *P. crocatum* leaf extract decreased p44/p42 activities. This result is similar to that reported by Daniels *et al.*<sup>12</sup> that aqueous and ethanol extract from *Anemopsis californica* at concentration of 50 µg/ml decreased ERK1/2 activities in human MCF-7/AZ breast and HCT8/E11 colon cancer cells. This activity might be responsible for growth inhibitory effect of the extract in the cancer cells tested. Van Slambrouck *et al.*<sup>14</sup> also showed that the cell growth was inhibited and levels of ERK1/2 were decreased when the MCF-7/AZ breast cancer cells were exposed to aqueous extract of *J. communis*. Hollosy and Keni<sup>18</sup>

also reported that many natural protein tyrosine kinases inhibitors have been known derived from plants.

The transmission of insulin signal in cell proliferation was known via p44/p42 activation<sup>17</sup>. This study showed that insulin transiently stimulated p44/p42 activation. This result supported data reported by Pawelczyk *et al.*<sup>19</sup>. They reported that exposure of lymphocytes to insulin produced a transient increase in ERK1/2 phosphorylation indicated by a significant increase of activated ERK1/2 at 1 and 5 min and then decrease at 15 and 30 min.

To investigate whether the *P. crocatum* leaf extract have consistent inhibitory effect to p44/p42 phosphorylation, we examined the response of insulin-stimulated phosphorylation of p44/p42 to extract treatment. The data showed that apparently, the extract inhibited activation of insulin-stimulated phosphorylation of p44/p42, indicated by decreasing phosphorylation of these proteins at 10 and almost no signal was detected at 30 min. This data confirmed that *P. crocatum* leaf extract inhibited proliferation of T47D cells via p44/p42 pathway.

## Conclusions

The results suggested that *Piper crocatum* Ruiz & Pav. leaf extract inhibited proliferation of human breast cancer (T47D) cells. No apoptosis was observed due to *Piper crocatum* leaf extract treatment. Intracellular mechanism examination suggested that the extract inhibited cancer cell growth via p44/p42-dependent way. Components consisted of this extract, therefore, may have promise for use as a cancer chemotherapeutic agent in the future and can be used as scientific evidence to support anti-cancer properties of *Piper crocatum*.

## Acknowledgement

We acknowledge Ms. Tjandrawati Mozef from the Indonesian Institute of Sciences Research Centre for Chemistry, Natural Products, Food and Pharmaceuticals Division, Bandung, Indonesia for her generosity in donating T47D cells.

## References

1. World Health Organisation (2008) Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>. Accessed 2 January 2009.
2. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*, 2005; 100: 72-79.
3. Tan G, Gyllenhaal C, Sorjarto DD. Biodiversity as a source of anticancer drugs. *Curr Drug Targets*, 2006; 7: 265-277.
4. Liu Y, Wang MW. Botanical drugs: Challenges and opportunities contribution to Linnaeus memorial symposium 2007. *Life Sci*, 2008; 82: 445-449
5. Gupta R, Gabrielsen B, Ferguson SM. Nature's medicine: Traditional knowledge and intellectual property management. Case studies from the National Institutes of Health (NIH), USA. *Curr Drug Disc Tech*, 2005; 2: 203-219.
6. Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res*, 1963; 23: 1390-1397.
7. Wani MC, Taylor, HL, Wall ME. Plant antitumor agents. The isolation and structure of taxol, a novel leukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem Soc*, 1971; 93: 2325-2327.
8. Wall ME, Wani MC, Cook CE. Plant antitumor agents. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J Am Chem Soc*, 1966; 88: 3888-3890.
9. Manoi F. Sirih merah sebagai tanaman obat multifungsi. *Warta puslitbangbun*, 2007; 13: 1.
10. Denhart DT. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signaling. *Biochem J*, 1996; 318: 729-747.

11. Seger R and Krebs E . The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, 1995; 9: 726-735.
12. Daniels AL, Van Slambrouck S, Lee RK, Arguello TS, Browning J, Pullin MJ, Komienko A, Steelant WFA. Effects of extracts from two Native American plants on ploniferation of human breast and colon cancer cell lines *in vitro*. *Oncol Rep*, 2006; 15: 1327-1331.
13. Mojzis J, Varinska L, Mojzisova G, Kostova, I, Mirossay, L. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacol Res*, 2008; 57: 259-265.
14. Van Slambrouck S, Daniels AL, Hooten CJ, Brock SL, Jenkins AR, Ogasawara, MA, Baker JM, Adkins G, Elias EM, Agustin VJ, Constantine SR, Pullin MJ, Shors ST, Komienko A, Steelant WFA. Effects of crude aqueous medicinal plant extracts on growth and invasion of breast cancer cells. *Oncol Rep*, 2007; 17: 1487-1492.
15. Arung ET, Shimizu K, Ryuichiro K. Inhibitory effect of isoprenoid-substituted flavonoids isolated from *Artocarpus heterophyllus* on Melanin Biosynthesis. *Planta Med*, 2006; 72: 847-850.
16. Sandra F, Matsuda M, Yoshida H, Hirata M. Inositol hexakisphosphate blocks tumor cell growth by activating apoptotic machinery as well as by inhibiting the Akt/NFkB-mediated cell survival pathway. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 2031-2041.
17. Capeau J. Insulin signaling: mechanism altered in insulin resistance. *Med Sci (Paris)*, 2003; 19: 834-839.
18. Hollosy F and Keri G. Plant-derived protein tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents: current medicinal chemistry. *Anti-cancer Agents*, 2004; 4: 173-197.
19. Pawelczyk T, Sakowicz M, Podgorska M, Szczepanska-Konkel M. Insulin induces expression of adenosine kinase gene in rat lymphocytes by signaling through the mitogen-activated protein kinase pathway. *Exp Cell Res*, 2003; 286: 152-163.

## Illustrations

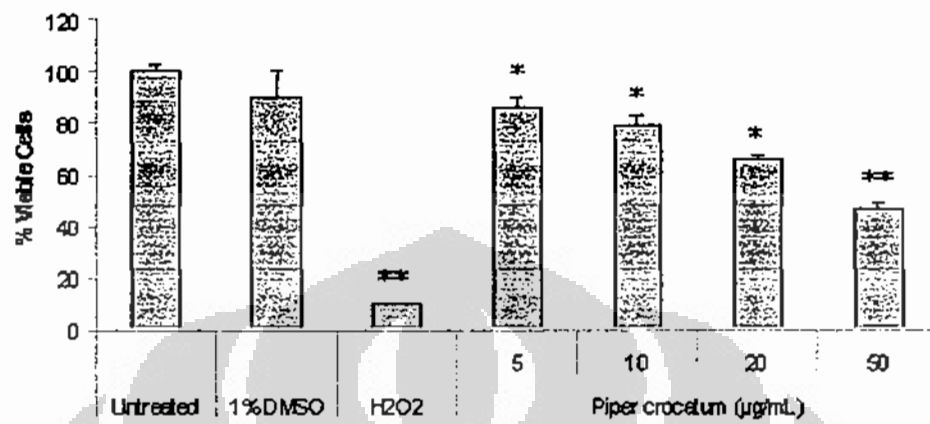


Figure 1. Effect of *Piper crocatum* leaf extract on T47D cell viability.

Treatments significantly different to untreated at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

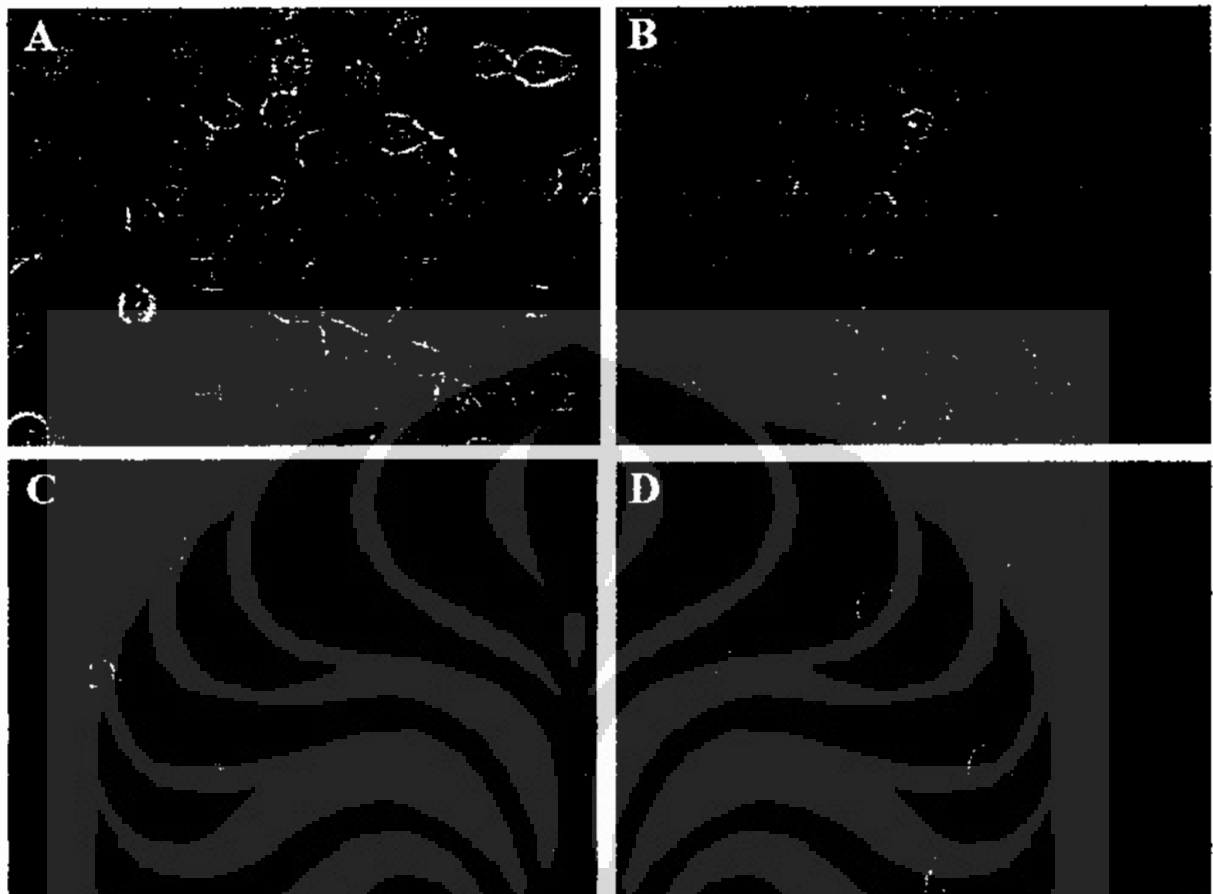


Figure 2. DAPI staining of T47D cells treated with *Piper crocatum* leaf extract.

Untreated T47D cells ( $5 \times 10^3$ ; **A**), cells treated with DMSO (1%, v/v; **B**),  $H_2O_2$  (**C**) and with the leaf extract at concentrations of 25  $\mu\text{g/ml}$  (**D**) are shown. Apoptotic cells are indicated by arrows.



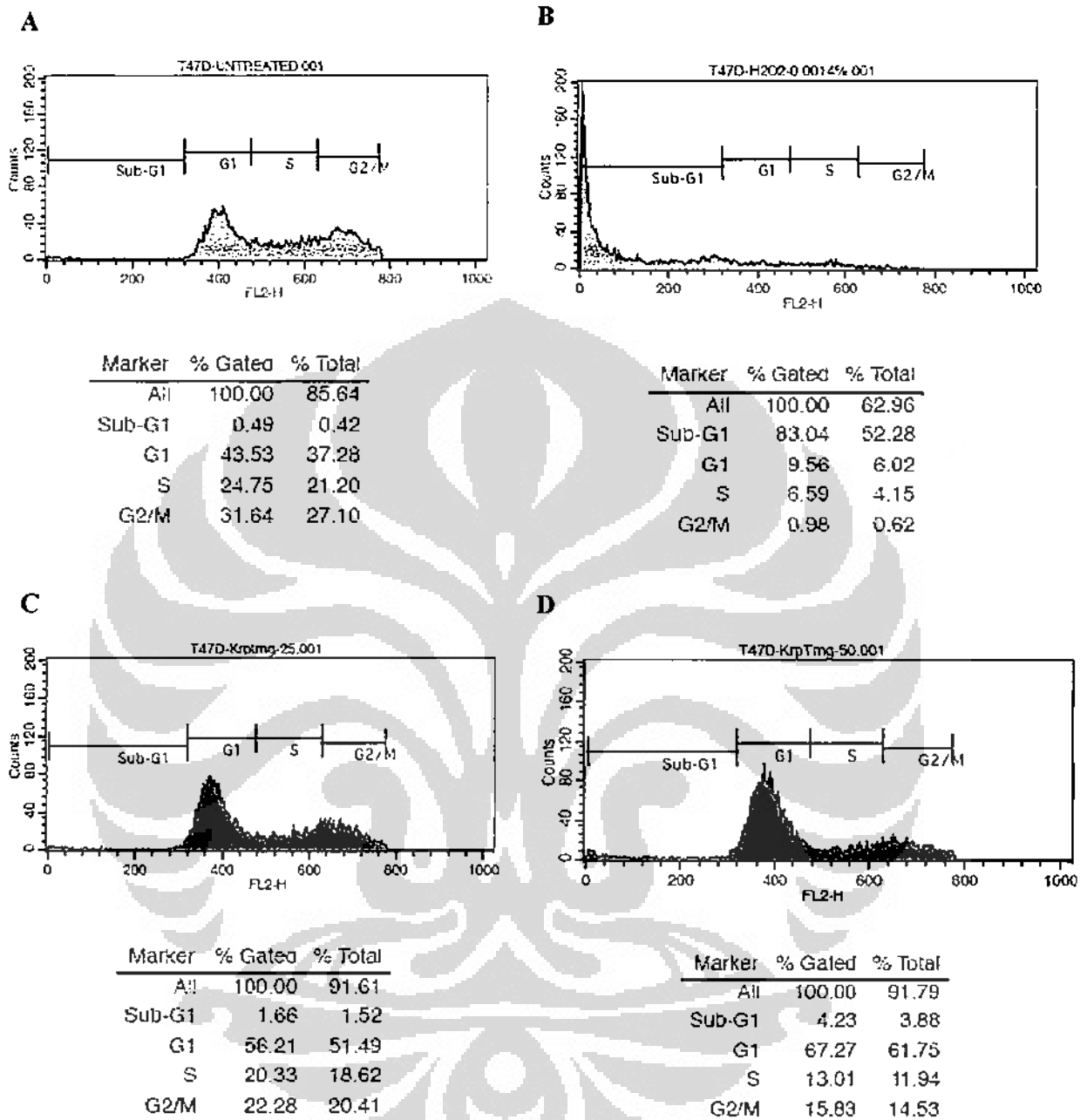


Figure 3. Effect of *Piper crocatum* leaf extract on sub-G1 portion observed using flow cytometry.

Untreated T47D cells ( $25 \times 10^4$ ; A) and cells treated with  $H_2O_2$  (C) and extract at 25 (E) and 50  $\mu\text{g/ml}$  (D) are shown.

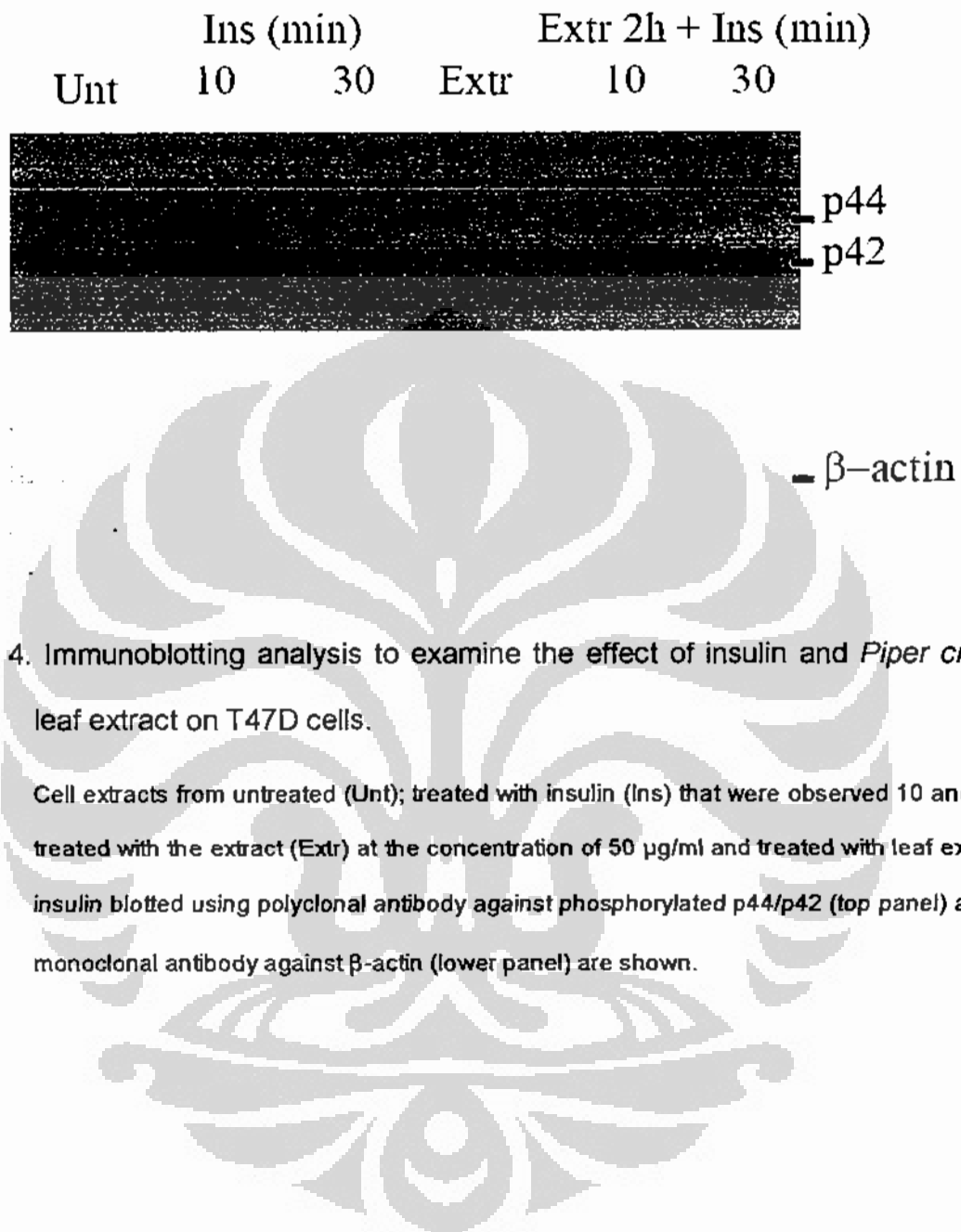



Figure 4. Immunoblotting analysis to examine the effect of insulin and *Piper crocatum* leaf extract on T47D cells.

Cell extracts from untreated (Unt); treated with insulin (Ins) that were observed 10 and 30 min; treated with the extract (Extr) at the concentration of 50 µg/ml and treated with leaf extract and insulin blotted using polyclonal antibody against phosphorylated p44/p42 (top panel) and using monoclonal antibody against β-actin (lower panel) are shown.

**Lampiran 2.****Riwayat Hidup**

Nama lengkap : Aldrin Neilwan Pancaputra  
NPM : 0706170904  
Tempat/tanggal lahir : Medan/20 Juli 1969  
Agama : Islam  
Alamat : Jl. Mesjid Condet no.11. RT 15/ RW 03, Kel. Batu Ampar,  
Jakarta Timur  
Pekerjaan : Dokter  
Jabatan : Kepala SMF. Akupunktur Medik RS. Kanker Dharmais  
Alamat Instansi : Jl. Let.Jend S Parman Kav 84-86 Slipi  
Riwayat pendidikan : SD : SDN Pancoran 01 Pagi Jakarta thn 1976-1982  
SMP : SMPN 43 Jakarta thn 1982-1985  
SMA : SMAN VIII Jakarta thn 1985-1988  
S1 : FK-UKI Jakarta thn 1988-1994  
S2 : FKM-UI Jakarta thn 1996-1999  
Sp : RSCM Jakarta thn 2002-2006  
Riwayat Pekerjaan : - Puskesmas Rawa Bunga dan Cipinang Jakarta  
- RSU FK-UKI Jakarta  
- RS. Mediros Jakarta  
Pengalaman Penelitian : MARS dan Sp. Akupunktur Medik  
Karya Ilmiah : MARS dan Sp. Akupunktur Medik  
Sumber dana Penelitian : Stem Cel and Cancer Institute

Jakarta, 19 Juni 2009

  
(Aldrin Neilwan Pancaputra)

