

EFEK SITOTOKSIK KOMBINASI EKSTRAK KUNYIT (*Curcuma domestica* VAL.) DAN DOKSORUBISIN PADA SEL KANKER

PAYUDARA MCF-7

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



Oleh:
Dian Fitriana

NIM 145070501111001

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	v
Abstract	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Gambar	xi
Daftar Tabel	xii
Daftar Lampiran	xiii
Daftar Singkatan	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kanker Payudara	5
2.1.1 Definisi	5
2.1.2 Epidemiologi	5
2.1.3 Faktor Risiko	6
2.1.4 Patofisiologi	8

2.2	Tanaman	9
2.2.1	Klasifikasi	9
2.2.2	Deskripsi	9
2.2.3	Persebaran	10
2.2.4	Kandungan Kimia dan Manfaat	10
2.3	Dokso rubisin	16
2.4	Sel MCF-7	16
2.5	Combination Index (CI)	18

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1	Kerangka Konsep Penelitian	19
3.2	Hipotesis Penelitian	21

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1	Rancangan Penelitian	22
4.2	Subjek Penelitian	22
4.3	Variabel Penelitian	22
4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian	23
4.5	Bahan dan Alat Penelitian	23
4.5.1	Ekstraksi Rimpang Kunyit	23
4.5.2	Kultur Sel	23
4.5.3	Pemaparan Ekstrak pada Kultur Sel	24
4.5.4	Uji Sitotoksik Tunggal Penentuan IC_{50} menggunakan Uji MTT	24
4.5.5	Uji Sitotoksik Kombinasi Kemoterapi	25
4.6	Definisi Operasional	25

4.7	Prosedur Penelitian.....	27
4.7.1	Skema Prosedur Penelitian.....	27
4.7.2	Ekstraksi Rimpang Kunyit.....	28
4.7.3	Kultur sel MCF-7.....	29
4.7.3.1	Preparasi Media Kultur <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI).....	29
4.7.3.2	Preparasi Media Kultur Lengkap (MK).....	30
4.7.3.3	Preparasi Media Serum Free (SF).....	31
4.7.3.4	<i>Thawing Cell</i>	32
4.7.3.5	Penggantian Media.....	33
4.7.3.6	Pemanenan Sel.....	34
4.7.3.7	Perhitungan Sel.....	36
4.7.3.8	Subkultur Sel.....	38
4.7.3.9	<i>Cryopreservation</i>	38
4.7.3.10	<i>Plating sel</i>	40
4.7.3.11	Preparasi Ekstrak pada Kultur Sel.....	40
4.7.3.12	Preparasi Doksorubisin pada Kultur Sel.....	41
4.7.3.13	Pemaparan Ekstrak dan Doksorubisin pada Uji Sitotoksik Tunggal.....	42
4.7.3.14	Penentuan IC ₅₀ Menggunakan Uji MTT.....	43
4.7.3.15	Uji Sitotoksik Kombinasi Kemoterapi.....	44
4.8	Pengumpulan Data.....	47

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS

5.1	Hasil Ekstraksi <i>Curcuma domestica</i>	49
-----	--	----

5.2 Hasil Uji Sitotoksik Tunggal.....	49
5.2.1 Hasil Uji Sitotoksik Doksorubisin.....	51
5.2.2 Hasil Uji Sitotoksik Ekstrak <i>Curcuma domestica</i>	53
5.3 Hasil Uji Sitotoksik Kombinasi.....	55

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian.....	57
6.1.1 Ekstraksi <i>Curcuma domestica</i>	57
6.1.2 Uji Sitotoksik Tunggal.....	57
6.1.2.1 Uji Sitotoksik Tunggal Doksorubisin.....	58
6.1.2.2 Uji Sitotoksik Tunggal Ekstrak <i>Curcuma domestica</i>	59
6.1.3 Uji Sitotoksik Kombinasi.....	61
6.2 Impilkasi di Bidang Farmasi.....	61
6.3 Keterbatasan Penelitian.....	62

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan.....	63
7.2 Saran.....	63
Daftar Pustaka.....	64

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Patofisiologi Kanker Payudara	8
Gambar 2.2 Struktur Senyawa Fitokimia pada Kunyit	11
Gambar 2.3 Mekanisme Kurkumin dalam Terapi Kanker Payudara	14
Gambar 2.4 Sel MCF-7	17
Gambar 3.1 Kerangka Konsep	19
Gambar 4.1 Skema Prosedur Penelitian	27
Gambar 5.1 Optimasi Jumlah Penanaman dan Waktu Inkubasi Sel MCF-7 saat <i>Platting</i>	50
Gambar 5.2 Pengaruh Pemberian Doksorubisin Terhadap Viabilitas Sel MCF-7	51
Gambar 5.3 Morfologi Sel MCF-7 Normal dan Setelah Terpapar Doksorubisin	52
Gambar 5.4 Pengaruh Pemberian Ekstrak <i>Curcuma domestica</i> terhadap Viabilitas Sel MCF-7	53
Gambar 5.5 Morfologi Sel MCF-7 Normal dan Setelah Terpapar Ekstrak <i>Curcuma domestica</i>	54
Gambar 5.6 Nilai Combination Index (CI) kombinasi ekstrak <i>Curcuma domestica</i> dan doksorubisin pada sel MCF-7	55

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1 Senyawa Fitokimia pada rimpang Kunyit.....	11
Tabel 4.1 Interpretasi Nilai CI.....	47
Tabel 5.1 Hasil CI Kombinasi CD-DOXO.....	56

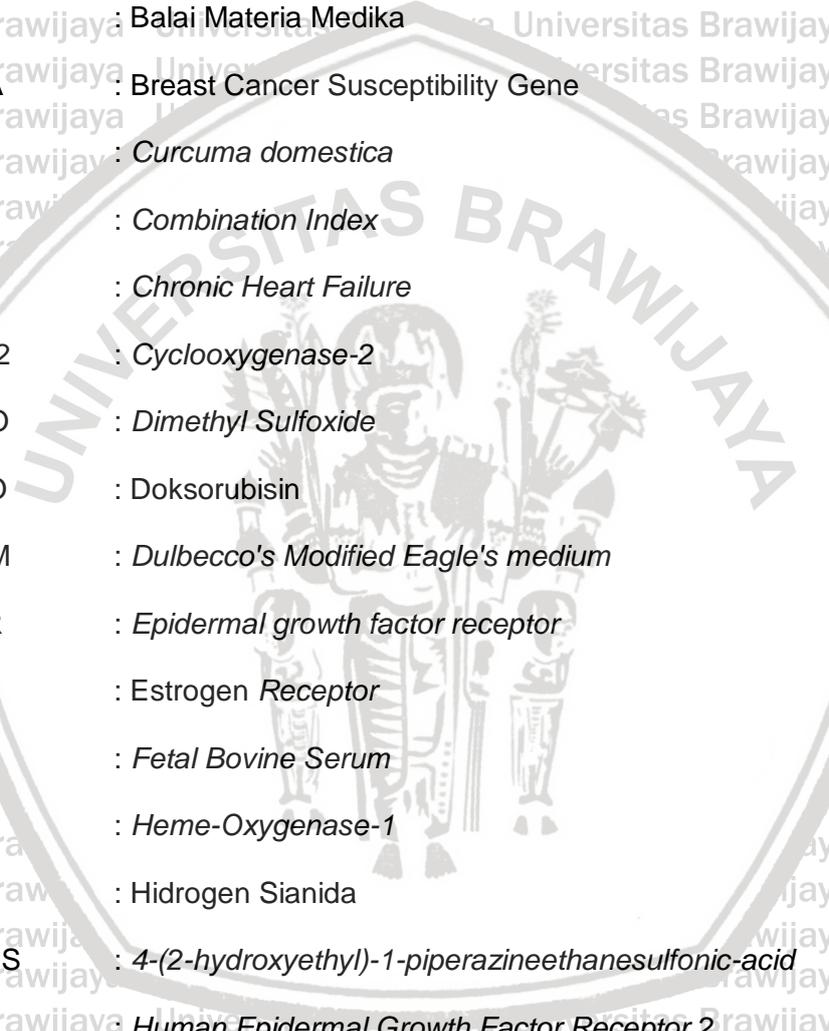


DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat Kelaikan Etik	68
Lampiran 2. <i>Product Sheet</i> Sel MCF-7 HTB-22.....	69
Lampiran 3. Determinasi tanaman <i>Curcuma domestica</i> Val.....	72
Lampiran 4. Perhitungan Preparasi Doksorubisin Uji Sitotoksik Tunggal	73
Lampiran 5. Perhitungan Preparasi Ekstrak <i>Curcuma domestica</i> Uji Sitotoksik Tunggal	74
Lampiran 6. Hasil Perhitungan % Viabilitas Sel MCF-7 terhadap Pemberian Doksorubisin (Replikasi 1).....	75
Lampiran 7. Hasil Perhitungan % Viabilitas Sel MCF-7 terhadap Pemberian Doksorubisin (Replikasi 2).....	76
Lampiran 8. Hasil Perhitungan % Viabilitas Sel MCF-7 terhadap Pemberian Doksorubisin (Replikasi 3).....	77
Lampiran 9. Hasil Perhitungan % Viabilitas sel MCF-7 terhadap Pemberian Ekstrak <i>Curcumae Rhizoma</i> (Replikasi 1).	78
Lampiran 10. Hasil Perhitungan % Viabilitas sel MCF-7 terhadap Pemberian Ekstrak <i>Curcumae Rhizoma</i> (Replikasi 2).	79
Lampiran 11. Hasil Perhitungan % Viabilitas sel MCF-7 terhadap Pemberian Ekstrak <i>Curcumae Rhizoma</i> (Replikasi 3).	80
Lampiran 12. Perhitungan Preparasi Uji Sitotoksik Kombinasi.....	81
Lampiran 13. Hasil Perhitungan % Viabilitas sel MCF-7 terhadap kombinasi Ekstrak <i>Curcumae Rhizoma</i> (CD) dan Doksorubisin (DOXO) (Replikasi 1).....	82

Lampiran 14. Hasil Perhitungan % Viabilitas sel MCF-7 terhadap kombinasi Ekstrak <i>Curcumae Rhizoma</i> (CD) dan Doksorubisin (DOXO) (Replikasi 2).....	83
Lampiran 15. Hasil Perhitungan % Viabilitas sel MCF-7 terhadap kombinasi Ekstrak <i>Curcumae Rhizoma</i> (CD) dan Doksorubisin (DOXO) (Replikasi 3).....	84
Lampiran 16. Hasil Perhitungan CI Kombinasi Ekstrak <i>Curcumae domestica</i> (CD) dan Doksorubisin (DOXO) (Replikasi 1)	85
Lampiran 17. Hasil Perhitungan CI Kombinasi Ekstrak <i>Curcumae domestica</i> (CD) dan Doksorubisin (DOXO) (Replikasi 2)	86
Lampiran 18. Hasil Perhitungan CI Kombinasi Ekstrak <i>Curcumae domestica</i> (CD) dan Doksorubisin (DOXO) (Replikasi 3)	87
Lampiran 19. Hasil Pengamatan Perlakuan Kombinasi Ekstrak <i>Curcumae domestica</i> (CD) dan Doksorubisin (DOXO) Menggunakan Mikroskop <i>Inverted</i>	89
Lampiran 20. Dokumentasi Penelitian.....	90

DAFTAR SINGKATAN



ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i>
BAX	: <i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	: <i>B-cell lymphoma</i>
BMM	: <i>Balai Materia Medika</i>
BRCA	: <i>Breast Cancer Susceptibility Gene</i>
CD	: <i>Curcuma domestica</i>
CI	: <i>Combination Index</i>
CHF	: <i>Chronic Heart Failure</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
DMSO	: <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DOXO	: <i>Doksorubisin</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
EGFR	: <i>Epidermal growth factor receptor</i>
ER	: <i>Estrogen Receptor</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
HO-1	: <i>Heme-Oxygenase-1</i>
HCN	: <i>Hidrogen Sianida</i>
HEPES	: <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic-acid</i>
HER2	: <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
IARC	: <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC ₅₀	: <i>Inhibitory Consentration 50%</i>
IDS NOS	: <i>Invasive Ductal Carcinoma Not Otherwise Specified</i>
ILC	: <i>Invasive Lobular Carcinoma</i>
KLT	: <i>Kromatografi Lapis Tipis</i>

LAF	: <i>Laminar Air Flow</i>
MCF-7	: <i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MK	: <i>Media kultur</i>
MMP	: <i>Matriks Metaloproteinase</i>
MTT	: <i>3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromide</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear Factor-kappaB</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PR	: <i>Progesteron Receptor</i>
p-Akt	: <i>Protein Kinase B</i>
Rac1	: <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	: <i>Ros Park Memorial Institute</i>
SDS	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SF	: <i>Serum Free</i>
TNBC	: <i>Triple Negative Cancer</i>
TNF- α	: <i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

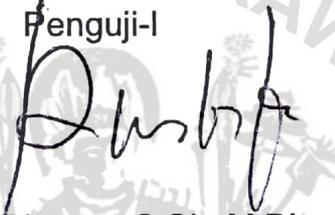
EFEK SITOTOKSIK KOMBINASI EKSTRAK KUNYIT (*Curcuma domestica* VAL.) DAN DOKSORUBISIN PADA SEL KANKER PAYUDARA MCF-7

Oleh:

Dian Fitriana
145070501111001

Telah diuji pada
Hari : Kamis
Tanggal : 7 Juni 2018
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I



Wibi Riawan, S.Si., M.Biomed
NIP. 197701312005011001

Pembimbing-I/Penguji-II,



Oktavia Rahayu A.S.Farm., M.Biomed
NIP. 2016099210192001

Pembimbing-II/Penguji-III,



Ika Putri N.M.Sc., Apt
NIP. 201304890815001



Mengetahui,
Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,



Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., M.Si
NIP. 195408231981032001

ABSTRAK

Fitriana, Dian. 2018. *Efek Sitotoksik Kombinasi Ekstrak Kunyit (Curcuma domestica VAL.) dan Doksorubisin pada Sel Kanker Payudara MCF-7*. Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Oktavia Rahayu A,S.Farm.,M.Biomed (2) Ika Putri N,M.Sc.,Apt.

Kanker payudara adalah jenis kanker yang paling banyak terjadi pada wanita. Doksorubisin merupakan pilihan terapi untuk kanker payudara yang memiliki aktivitas menghambat topoisomerase II ketika sel kanker payudara berproliferasi. Kejadian resistensi pada terapi kanker payudara secara umum terjadi setelah menyelesaikan satu periode siklus kemoterapi. Kunyit (*Curcuma domestica*) mempunyai aktivitas sebagai anti kanker yang dikaitkan dengan adanya kandungan kurkumin. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan jenis interaksi sitotoksik serta dosis kombinasi ekstrak kunyit (*Curcuma domestica*) dan doksorubisin yang mampu memberikan efek sinergis terhadap sel MCF-7 berdasarkan *combination index* (CI). Uji sitotoksik tunggal pada doksorubisin dan ekstrak *Curcuma domestica* dilakukan untuk memperoleh nilai IC_{50} dengan metode *MTT assay*. Uji sitotoksik kombinasi dilakukan menggunakan dosis 1/2, 1/4, 1/8, dan 3/8 IC_{50} dari hasil uji sitotoksik tunggal. Hasil IC_{50} dari uji sitotoksik tunggal doksorubisin yaitu 486 nM dan hasil IC_{50} ekstrak *Curcuma domestica* yaitu 76 $\mu\text{g/ml}$. Hasil uji sitotoksik kombinasi menunjukkan konsentrasi ekstrak kunyit (*Curcuma domestica*) sebesar 10 $\mu\text{g/ml}$ dan 19 $\mu\text{g/ml}$ dengan doksorubisin sebesar 61 nM memiliki efek sitotoksik yang sinergis. Berdasarkan hasil uji sitotoksik kombinasi, dapat disimpulkan bahwa kombinasi ekstrak kunyit (*Curcuma domestica*) dan doksorubisin dapat memberikan efek sitotoksik yang sinergis terhadap sel MCF-7.

Kata kunci: doksorubisin, *Curcuma domestica*, sel MCF-7, IC_{50} , sinergis.

ABSTRACT

Fitriana, Dian. 2018. *The Cytotoxic Effect Combination of Curcuma domestica VAL. Extract and Doxorubicin in Breast Cancer MCF-7 Cell*. Thesis. Pharmacy Program of Medical Faculty Brawijaya University. Adviser: (1) Oktavia Rahayu A,S.Farm.,M.Biomed (2) Ika Putri N,M.Sc.,Apt.

Breast cancer is the most common type of cancer in women. Doxorubicin is a drug of choice for the treatment of breast cancer that inhibits topoisomerase II activity in cancer cells when proliferation cell occurs. The therapy resistance of breast cancer generally occurs after completing one period of chemotherapy cycles. *Curcuma domestica* has an anti-cancer activity associated with the presence of curcumin. This aims of study is to determine the types of cytotoxic interactions and to determine the dosage of combinations *Curcuma domestica* extract and doxorubicin that can give synergism effect on MCF-7 cells based on combination index (CI). Single cytotoxic assay of doxorubicin and *Curcuma domestica* extract was perform to obtain the IC₅₀ value using MTT assay method. Cytotoxic combination assay was performed using dosage 1/2, 1/4, 1/8, and 3/8 IC₅₀ from as a result from the single cytotoxic assay. IC₅₀ values that obtained from single cytotoxic assay *Curcuma domestica* extract and doxorubicin were 76 µg/ml and 486 nM respectively. The results of the cytotoxic combination assay showed that dosage of *Curcuma domestica* extract 10 µg/ml and 19 µg/ml combine with doxorubicin 61 nM have a synergism cytotoxic effect. Based on cytotoxic combination assay, it can be concluded that the combination of *Curcuma domestica* extract and doxorubicin have a synergism cytotoxic effect on MCF-7 cells.

Keyword : doxorubicin, *Curcuma domestica*, MCF-7 cells, IC₅₀, synergism.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker payudara merupakan penyebab kematian kedua akibat kanker pada wanita setelah kanker serviks. Selain itu, kanker payudara adalah jenis kanker yang paling banyak terjadi pada wanita. Kanker payudara memiliki angka kejadian lebih sering pada wanita dengan riwayat keluarga yang sebelumnya pernah mengalami kanker payudara (IARC,2012).

Kanker payudara diketahui bersifat heterogen dalam hal perilaku biologis dan klinisnya. Secara historis kanker payudara diklasifikasikan menurut kelas histologisnya. Subtipe yang paling umum dilaporkan sebagai *invasive ductal carcinoma not otherwise specified* (IDC NOS) dengan prevalensi 75% dan *invasive lobular carcinoma* (ILC) dengan prevalensi 10%. Seiring berkembangnya teknik skrining imunohistologis yang cepat, klasifikasi kanker payudara berdasarkan status reseptor menjadi umum dilakukan. Profil tumor dilihat dari ada atau tidaknya *estrogen receptor* (ER), *progesteron receptor* (PR) dan *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2). Teknik skrining imunohistologis banyak digunakan untuk membantu dalam pengambilan keputusan klinis. Secara umum, tumor yang terjadi karena ER yang tidak terekspresikan memiliki respon paling baik terhadap terapi standar yang diberikan serta memiliki tingkat kelangsungan hidup tertinggi, sedangkan *triple negative breast cancer* (TNBC) karena tidak terekspresikannya ER, PR dan HER2, resisten terhadap pilihan pengobatan saat ini dan memiliki prognosis terburuk (Cridge *et al.*, 2013).

Banyak terapi obat untuk kanker payudara, salah satu obat yang digunakan saat ini adalah doksorubisin. Doksorubisin merupakan obat sitostatika yang memiliki aktivitas untuk menghambat dari perkembangan sel kanker. Terapi awal kanker payudara pada 90% pasien merespon secara aktif, namun hanya 50% pasien yang merespon terapi pada kanker payudara yang telah bermetastase. Kejadian resistensi pada terapi kanker payudara secara umum terjadi setelah menyelesaikan satu periode siklus kemoterapi. Doksorubisin selain itu memiliki efek samping yaitu kardi toksisitas pada penggunaan jangka panjang, sehingga menyebabkan penggunaan doksorubisin secara klinis terbatas. Efek samping yang muncul bersifat ireversibel, termasuk terbentuknya kardiomiopati dan gagal jantung (Han *et al.*, 2008)

Resistensi terhadap terapi kanker payudara dan adanya efek samping yang sering muncul, menjadi alasan mengapa saat ini banyak dikembangkan pengobatan menggunakan obat herbal, termasuk dalam terapi kanker payudara. Penelitian pada manusia telah banyak dilakukan mengenai kunyit (*Curcuma domestica*) yang memiliki aktivitas sebagai antikanker, tetapi belum diketahui secara pasti dosis yang tepat sebagai terapi adjuvan untuk kanker terutama pada kanker payudara. Penelitian ini akan mengkombinasikan ekstrak kunyit (*Curcuma domestica*) dengan doksorubisin. Kandungan dari ekstrak kunyit (*Curcuma domestica*) yaitu kurkumin mampu meningkatkan apoptosis dari sel kanker serta meningkatkan respon sensitivitas terhadap terapi konvensional yaitu doksorubisin (Cridge *et al.*, 2013).

Berdasarkan penjelasan diatas, menjadi alasan untuk melakukan penelitian mengenai dosis kunyit yang sesuai untuk terapi kanker payudara dengan dikombinasikan bersama doksorubisin. Penelitian ini diharapkan

memberikan kombinasi yang akan memiliki efek sinergis yang lebih baik serta meningkatkan sensitivitas dalam terapi kanker payudara. Penelitian akan dilakukan menggunakan sel *michigan cancer foundation-7* (MCF-7) yang merupakan sel dari kanker payudara yang akan dikultur dan ditentukan nilai *inhibitory concentration 50* (IC₅₀) serta *combination index* (CI) dosis yang memberikan efek sinergis terhadap kematian sel kanker payudara.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini yaitu apakah kombinasi ekstrak kunyit (*Curcuma domestica*) dan doksorubisin dapat memberikan efek sitotoksik yang sinergis berdasarkan *combination index* (CI) pada sel MCF-7?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini memiliki tujuan yaitu :

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa kombinasi ekstrak kunyit (*Curcuma domestica*) dan doksorubisin mampu memberikan efek sitotoksik yang sinergis terhadap kultur sel MCF-7.

1.3.2 Tujuan Khusus

Untuk menentukan jenis interaksi sitotoksik serta dosis kombinasi ekstrak kunyit (*Curcuma domestica*) dan doksorubisin yang mampu memberikan efek sinergisme terhadap sel MCF-7 berdasarkan *combination index* (CI).

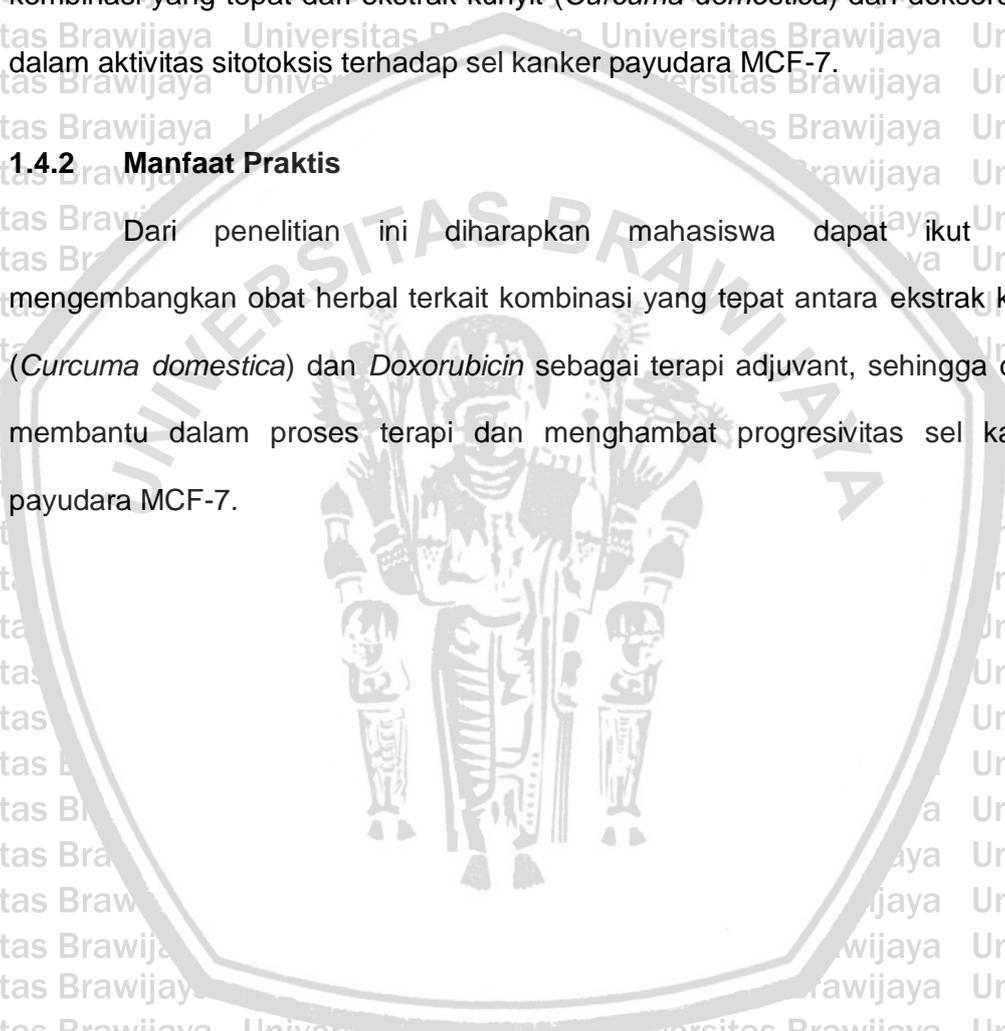
1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Akademik

Dari penelitian ini diharapkan dapat mengembangkan keilmuan dibidang bahan alam dan biomedik mengenai jenis interaksi sitotoksik dan dosis kombinasi yang tepat dari ekstrak kunyit (*Curcuma domestica*) dan doksorubisin dalam aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7.

1.4.2 Manfaat Praktis

Dari penelitian ini diharapkan mahasiswa dapat ikut serta mengembangkan obat herbal terkait kombinasi yang tepat antara ekstrak kunyit (*Curcuma domestica*) dan *Doxorubicin* sebagai terapi adjuvant, sehingga dapat membantu dalam proses terapi dan menghambat progresivitas sel kanker payudara MCF-7.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Payudara

2.1.1 Definisi

Kanker merupakan penyakit dimana sel secara abnormal membelah tidak terkontrol dan dapat menyerang jaringan disekitarnya. Sel kanker dapat menyebar ke bagian tubuh lainnya melalui sistem peredaran darah atau sistem limfatik. Karsinoma merupakan kanker yang dimulai dari jaringan yang melapisi organ dalam (*Nasional Cancer Institute, 2017*).

Kanker payudara merupakan kanker yang terbentuk di jaringan payudara. Jenis kanker payudara yang paling umum adalah karsinoma duktal, yang dimulai di lapisan saluran susu (berbentuk seperti tabung tipis yang membawa susu dari kelenjar susu menuju puting). Tipe lain dari kanker payudara adalah karsinoma lobular, yang dimulai pada kelenjar susu payudara. Kanker payudara invasif merupakan kanker payudara yang telah menyebar mulai di saluran payudara atau kelenjar susu ke jaringan normal di sekitarnya (*Nasional Cancer Institute, 2017*).

2.1.2 Epidemiologi

Prevalensi kanker di Indonesia yaitu sebesar 1,4 per 1.000 penduduk, serta merupakan penyebab kematian nomor 7 (5,7%) dari seluruh penyebab kematian (Soediono, 2015). Jenis kanker tertinggi yang terjadi pada perempuan di dunia adalah kanker payudara (38 dari 100.000 perempuan). Estimasi insiden kanker payudara di Indonesia sebesar 40 dari 100.000 perempuan. Angka ini

meningkat dari tahun 2002, dengan insiden kanker payudara sebesar 26 dari 100.000 perempuan (IARC, 2012).

2.1.3 Faktor Risiko

Penyebab utama dari kanker payudara belum diketahui secara pasti, tetapi terdapat beberapa faktor risiko dari kejadian kanker payudara. Berikut adalah faktor risiko dari kanker payudara :

1. Faktor Endokrin

Faktor endokrin merupakan salah satu dari faktor risiko terjadinya kanker payudara. Faktor endokrin dikaitkan dengan total waktu menstruasi, dimana usia ketika menstruasi pertama kurang dari usia 12 tahun kemudian usia menopause lebih dari 55 tahun meningkatkan risiko terjadinya kanker payudara. Wanita dengan usia menopause diatas 55 tahun memiliki tingkat risiko lebih rendah dari pada wanita dengan menstruasi diawal yaitu usia kurang dari 12 tahun. Faktor endokrin juga dikaitkan dengan penggunaan estrogen pada wanita pasca menopause dimana risiko terjadinya kanker payudara meningkat dibandingkan dengan wanita pasca menopause yang tidak menggunakan estrogen (Hamajima *et al.*, 2012). Sebab lain yang berkaitan dengan faktor endokrin adalah lama penggunaan dari kontrasepsi oral yang berkaitan dengan risiko terjadinya kanker payudara, namun secara umum tidak menunjukkan hubungan yang konsisten antara penggunaan kontrasepsi oral dan risiko kanker payudara (Zhu *et al.*, 2012).

2. Faktor Genetik

Perkiraan empiris dari risiko kanker payudara yang berkaitan dengan riwayat keluarga menunjukkan bahwa, mempunyai kerabat tingkat pertama (ibu,

saudara perempuan atau anak perempuan) dengan kanker payudara meningkatkan risiko kanker payudara wanita sekitar 1,5 sampai 3 kali lipat.

Risiko tersebut meningkat dengan meningkatnya jumlah keluarga tingkat pertama yang terkena kanker payudara. Risiko kanker payudara juga dipengaruhi oleh usia wanita itu sendiri dan usia kerabatnya saat didiagnosis.

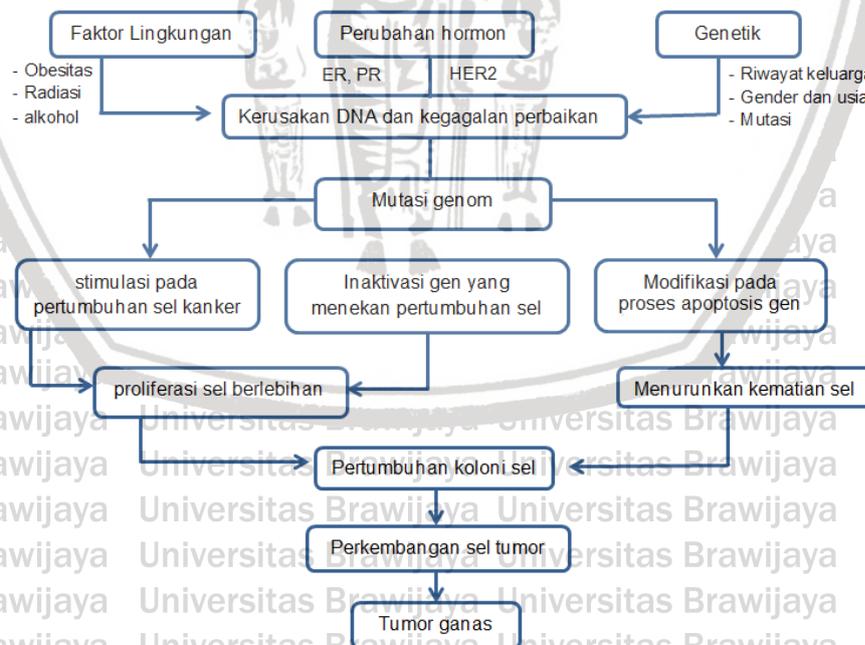
Risiko terkena kanker payudara akan meningkat jika seorang wanita dan saudara perempuannya didiagnosis pada usia dibawah 50 tahun. Riwayat keluarga dengan kanker payudara namun bukan merupakan kerabat tingkat pertama bergantung pada pola riwayat keluarga lainnya, namun risiko kanker payudara umumnya lebih rendah dari pada kerabat tingkat pertama. Anggota keluarga dimana baik keluarga ibu maupun keluarga ayah memiliki riwayat kanker payudara perlu dipertimbangkan untuk melakukan skrining mencegah risiko dimasa depan terkena kanker payudara (Easton, 2002).

3. Faktor Lingkungan dan Gaya Hidup

Diet merupakan faktor risiko lingkungan yang penting dan dapat dimodifikasi. Kemungkinan hubungan antara asupan lemak dan metabolisme hormon steroid telah menyebabkan penumpukan pada lemak sehingga dapat menjadi faktor risiko yang mungkin untuk kanker payudara. Data epidemiologi menunjukkan adanya korelasi positif antara asupan diet lemak yang lebih tinggi dan risiko kanker payudara, dimana risikonya lebih besar pada wanita pasca menopause daripada pada wanita pra menopause. Sebagian besar penelitian pada wanita pasca menopause menunjukkan peningkatan risiko kanker payudara dengan bertambahnya berat badan. Peningkatan index massa tubuh dengan demikian dapat dikaitkan dengan peningkatan risiko kanker payudara bagi wanita pasca menopause (Boyd *et al.*, 2003).

2.1.4 Patofisiologi

Proses terjadinya kanker payudara berkaitan dengan faktor risiko dari masing-masing penyebab kanker payudara. Faktor lingkungan seperti obesitas, rokok, alcohol serta paparan radiasi berkorelasi dengan meningkatnya kerusakan (*breast cancer susceptibility gene-1*) BRCA-1. Faktor lingkungan tersebut meningkatkan tingkat (*reactive oxygen species*) ROS didalam selular, dimana peningkatan ROS secara signifikan dapat menyebabkan defisiensi dari BRCA-1. Defisiensi dari BRCA-1 menyebabkan semakin tingginya kerusakan DNA yang terjadi (Kang *et al.*, 2013). ER,PR, dan HER2 merupakan reseptor yang menjadi penanda khusus pada kanker payudara dimana penilaian positif atau negatif dari reseptor ini berkaitan dengan terapi apa yang akan diterima oleh pasien kanker payudara. Faktor genetic menjadi salah satu penyebab dari kanker payudara, adanya mutasi pada BRCA-1 menyebabkan kerusakan DNA.



Gambar 2.1 Patofisiologi Kanker Payudara. faktor lingkungan, perubahan hormonal, dan genetic berpengaruh pada kerusakan DNA dan kegagalan perbaikan DNA sehingga berlanjut hingga berkembangnya sel kanker (Vp and Kumar, 2017).

Gambar 2.1 terlihat bahwa faktor risiko berkorelasi dengan patofisiologi kanker payudara. setelah terjadi kerusakan DNA dan kegagalan dari perbaikan DNA. Selanjutnya akan menyebabkan terjadi mutasi genom yang kemudian menstimulasi adanya pertumbuhan sel kanker dan inaktivasi gen yang dapat menekan pertumbuhan sel kanker sehingga memicu proliferasi sel yang tidak terkontrol, selain itu adanya modifikasi dari proses apoptosis menyebabkan penurunan pada kematian sel. Pertumbuhan sel secara upnormal ini kemudian berkembang menjadi tumor yang ganas (Vp and Kumar, 2017).

2.2 Tanaman

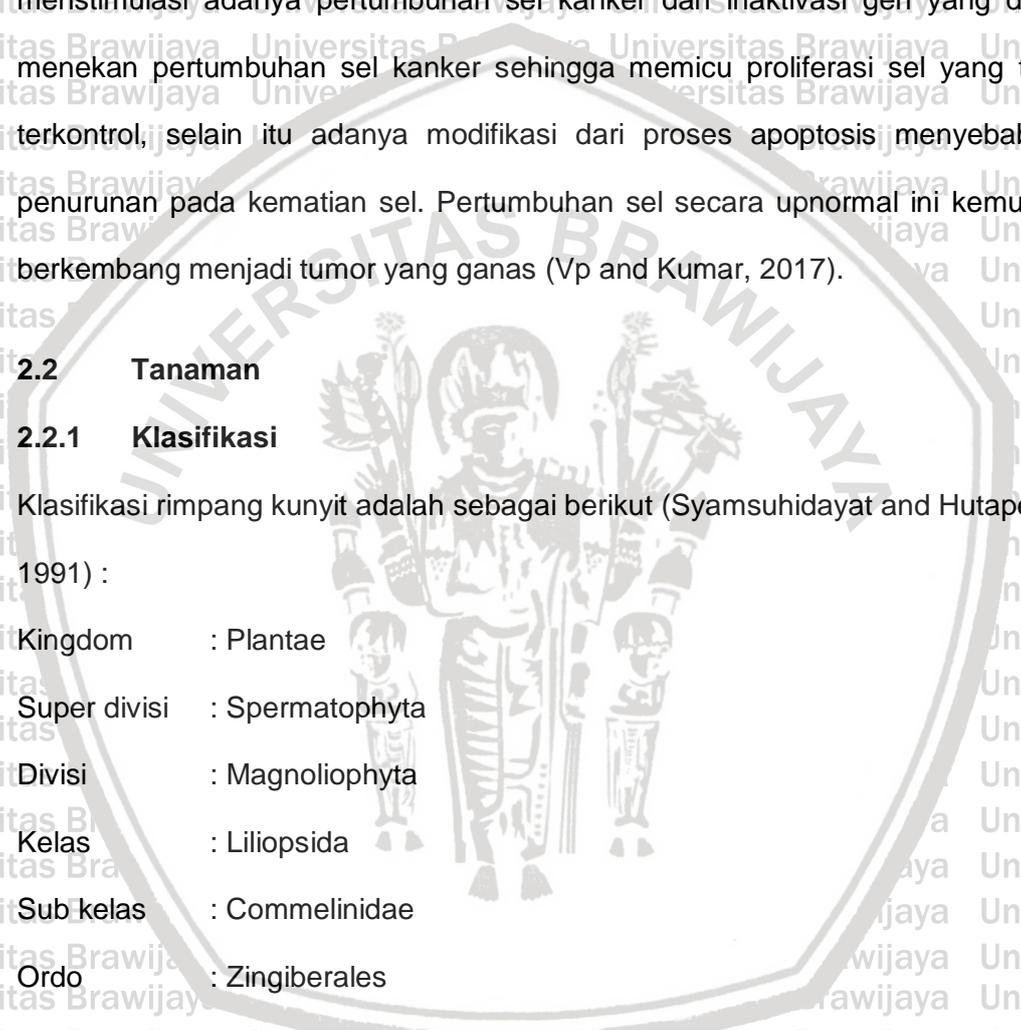
2.2.1 Klasifikasi

Klasifikasi rimpang kunyit adalah sebagai berikut (Syamsuhidayat and Hutapea, 1991) :

- Kingdom : Plantae
- Super divisi : Spermatophyta
- Divisi : Magnoliophyta
- Kelas : Liliopsida
- Sub kelas : Commelinidae
- Ordo : Zingiberales
- Familia : Zingiberaceae
- Genus : Curcuma
- Spesies : *Curcuma domestica*

2.2.2 Deskripsi

Tumbuhan hijau dengan tinggi mencapai 1 meter memiliki batang semu, tegak, bulat, membentuk rimpang, berwarna hijau kekuningan, berdaging, hampir



berbentuk seperti telur berdiameter sekitar 3 cm dan panjangnya 4 cm. Rimpang bercabang memiliki bentuk lebih ramping dan sedikit bengkok berukuran 1- 2 cm.

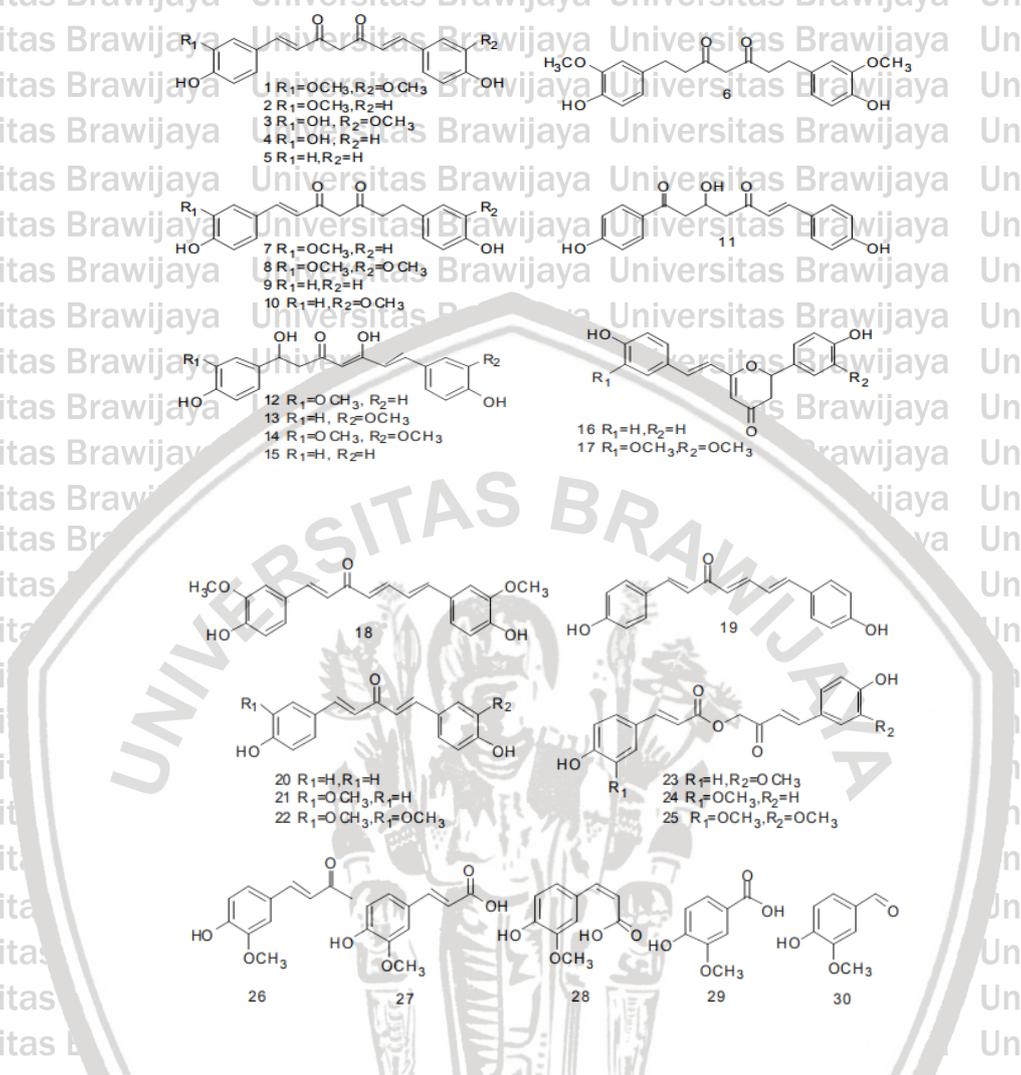
Memiliki daging berwarna orange, daun tunggal dengan bentuk lanset memanjang, memiliki helai daun 3-8, ujung dan pangkalnya meruncing, tepi rata, dengan panjang sekitar 20-40 cm, lebar 8-12,5 cm, tulang daun menyirip berwarna hijau pucat. Bunga majemuk berambut, bersisik, dengan panjang tangkai 16-40 cm, mahkota bunga berukuran kurang lebih 3 cm, lebar sekitar 1,5 cm berwarna kuning, kelopak silindris dan tipis berwarna ungu. Memiliki akar serabut berwarna coklat (Cepae, 1999).

2.2.3 Persebaran

Kunyit banyak ditemui pada beberapa Negara antara lain Kamboja, Cina, India, Indonesia, Republik Demokratik Rakyat Laos, Madagaskar, Malaysia, Filipina, dan Vietnam. Selain itu banyak dibudidayakan di China, India, Indonesia, Thailand dan seluruh daerah tropis, termasuk wilayah tropis yaitu Afrika (Cepae, 1999).

2.2.4 Kandungan kimia dan manfaat

Rimpang kunyit mengandung minyak atsiri berwarna kuning pucat hingga kuning orange sekitar 6% terdiri dari sejumlah monoterpen dan seskuiterpen, termasuk zingiberena, kurkumin, α dan β turmerone. Warna kuning berasal dari kurkuminoid, 50-60% di antaranya adalah campuran kurkumin, monodesmetoksikurkumin dan bisdesmetoksikurkumin (Cepae, 1999). Senyawa fitokimia pada kunyit setidaknya diketahui terdapat 30 jenis struktur dari 3 tipe komponen yang berbeda yaitu tipe diarilheptanoid, fenilpropana, dan fenol yang dapat dilihat dari gambar 2.2 dan tabel 2.1.



Gambar 2.2 Struktur Senyawa Fitokimia pada Kunyit. Terdapat 30 struktur dari senyawa fitokimia pada kunyit. Nomor 1 merupakan struktur dari kurkumin dan nomor 2 merupakan demetoksikurkumin sedangkan bisdesmetoksikurkumin ada pada nomor 5. Senyawa nomor 1 sampai 22 mempunyai tipe komponen yaitu diarilheptanoid, nomor 23 sampai 28 mempunyai tipe komponen penilpropana sedangkan nomor 29 dan 30 mempunyai tipe komponen fenol (Li and Wang, 2011).

Tabel 2.1 Senyawa Fitokimia pada Rimpang Kunyit

No.	Nama Senyawa Fitokimia	Tipe Komponen
1	Kurkumin	Diarilheptanoid
2	Demetoksikurkumin	Diarilheptanoid
3	1-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-7-(3,4dihidroksifenil)-1, 6-heptadin-3, 5-dion	Diarilheptanoid

- 4 1-(4-dihidroksifenil)-7-(3,4-dihidroksifenil)-1,6-heptadin-3,5-dion Diarilheptanoid
- 5 Bisdemetoksikurkumin Diarilheptanoid
- 6 Tetrahidroksikurkumin Diarilheptanoid
- 7 5-hidroksil-1-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-7-(4-hidroksifenil)-4,6-heptadine-3-one Diarilheptanoid
- 8 5-hidroksil-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-4,6-heptadin-3-one Diarilheptanoid
- 9 1,7-bis(4-hidroksifenil)-1-heptena-3,5-dion Diarilheptanoid
- 10 5-hidroksil-7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-(4-hidroksifenil)-4,6-heptadin-3-one Diarilheptanoid
- 11 3-hidroksi-1,7-bis(4-hidroksifenil)-6-heptena-1,5-dion Diarilheptanoid
- 12 1,5-dihidroksi-1-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-7-(4-hidroksifenil)-4,6-heptadien-3-one Diarilheptanoid
- 13 1,5-dihidroksi-1-(4-hidroksifenil)-7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-4,6-heptadien-3-one Diarilheptanoid
- 14 1,5-dihidroksi-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-4,6-heptadien-3-one Diarilheptanoid
- 15 1,5-dihidroksi-1,7-bis(4-hidroksifenil)-4,6-heptadien-3-one Diarilheptanoid
- 16 1,5-epoksi-3-karbonil-1,7-bis(4-hidroksifenil)-4,6-heptadien Diarilheptanoid
- 17 Siklokurkumin Diarilheptanoid
- 18 1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,4,6-heptatrien-3-one Diarilheptanoid
- 19 1,7-bis(4-hidroksifenil)-1,4,6-heptatrien-3-one Diarilheptanoid
- 20 1,5-bis(4-hidroksifenil)-penta-(1E,4E)-1,4-dien-3-one Diarilheptanoid
- 21 1-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-5-(4-hidroksifenil)-1,4-pentadin-3-one Diarilheptanoid
- 22 1,5-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-penta-(1E,4E)-1,4-dien-3-one Diarilheptanoid

23	4"-(4"-hidroksifenil)-2"-oxo-3"-butenil-3-(4"-hidroksifenil -3'-metoksi)-propenoat P	Fenilpropana
24	4"-(4"- hidroksifenil -3-metoksi)-2"-oxo-3"-butenil-3-(4'- hidroksifenil)-propenoat	Fenilpropana
25	Salebin-A	Fenilpropana
26	(E)-4-(4-hidroksi-3- metoksifenil)but-3-en-2 one	Fenilpropana
27	(E)-asam ferulat	Fenilpropana
28	(Z)-asam ferulat	Fenilpropana
29	Asam vanilik	Fenol
30	Vanilin	Fenol

Sumber: Li and Wang, 2011

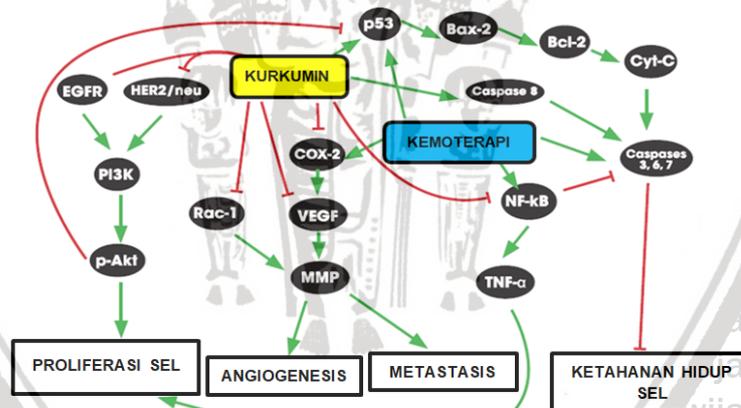
Kunyit memiliki beberapa aktivitas secara farmakologi yaitu sebagai anti inflamasi. Mekanisme anti inflamasi pada kunyit yaitu melalui penghambatan enzim tripsin dan hyaluronidase (Cepae, 1999). Selain itu aktivitas anti kanker dari kunyit dikaitkan dengan adanya kandungan kurkumin.

Kurkumin yang diperoleh dari rimpang tanaman *Curcuma domestica*, bersifat sitotoksik terhadap sel ER dan TNBC. Sebagai contoh, kurkumin menghambat proliferasi sel ER-MDA-MB-468 dan MDA-MB-231, dengan nilai IC₅₀ masing-masing 1 dan 7,6 µM, selain itu kurkumin juga menghambat proliferasi dari lini sel MCF7. Mekanisme kerja kurkumin memiliki banyak jalur.

Kurkumin menginduksi apoptosis pada sebagian besar lini sel kanker payudara yang terjadi melalui apoptosis dengan jalur mitokondria. Apoptosis sel dengan jalur mitokondria dimana kurkumin menginduksi hilangnya potensial membran mitokondria, melepaskan sitokrom C, mengaktifkan caspase-9 dan Caspase-3, yang kemudian mengarah pada fragmentasi DNA dan apoptosis. Kurkumin juga menurunkan regulasi protein anti-apoptosis *B-cell lymphoma* (Bcl-2) dan *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-XL) dan regulasi protein pro-apoptosis yang juga

menyebabkan apoptosis yang diinduksi kurkumin dibanyak sel kanker termasuk kanker payudara (Cridge *et al.*, 2013).

Kurkumin menginduksi proses DNA cek poin pada fase G2/M dan menghambat proliferasi sel dengan menghambat proses pada mikrotubulus, yang selanjutnya mengaktifkan pemeriksaan mitosis pada sel MCF-7 (Liu and Chen, 2013). Kurkumin meningkatkan sensitivitas sel kanker payudara terhadap obat kemoterapi seperti *doxorubicin*, *tamoxifen*, *paclitaxel*, *trichostatin* dan *5-fluorouracil (5-fu)*, dalam penelitian secara *in vitro* dan *in vivo*. Kurkumin dapat mengurangi konsentrasi obat yang diperlukan untuk mencapai efek obat yang setara, selain itu kurkumin juga dapat mengurangi efek samping obat kemoterapi, seperti penurunan berat badan, toksisitas ginjal, dan sitotoksitas (Abdali *et al.*, 2015).



Gambar 2.3 Mekanisme Kurkumin dalam Terapi Kanker Payudara. Kurkumin menurunkan angiogenesis dan metastasis melalui jalur COX-2 dan Rac-1, Proliferasi sel tumor melalui jalur EGFR dan HER2, serta ketahanan hidup sel kanker melalui jalur caspase (Abdali *et al.*, 2015).

Berdasarkan **Gambar 2.3** dapat dilihat efek kurkumin dan kemoterapi pada berbagai molekul yang terlibat dalam kanker. Kurkumin menurunkan angiogenesis, proliferasi sel tumor, metastasis, serta kelangsungan hidup sel

kanker. Aktivasi *nuclear factor-kappaB* (NF- κ B) memfasilitasi kelangsungan hidup sel tumor dengan menurunkan caspase-3, 6, dan 7, yang merupakan faktor integral dari apoptosis seluler. Saat ini, obat kemoterapi sering kali meningkatkan aktivasi NF- κ B, sementara kurkumin menghambat aktivasi NF- κ B.

NF- κ B meregulasi faktor inflamasi *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), yang menyebabkan peningkatan proliferasi seluler. Kurkumin dan obat kemoterapi menghambat Bcl-2 yang merupakan protein penghambat apoptosis dengan mengatur protein penghambat tumor p53. Kemudian, p53 meregulasi ulang protein *Bcl-2-associated X protein* (BAX) yang secara langsung melawan Bcl-2. Rasio BAX terhadap Bcl-2 menentukan apakah sel akan bertahan atau mengalami apoptosis. Kurkumin meningkatkan rasio tersebut sehingga menyebabkan apoptosis (Abdali *et al.*, 2015).

Epidermal growth factor receptor (EGFR) dan (HER2) mengarah pada pengaturan protein kinase B (p-Akt) yang menyebabkan angiogenesis sehingga meningkatkan ketahanan hidup sel kanker. Kurkumin menghambat EGFR dan HER2 sehingga menurunkan angiogenesis dan ketahanan hidup sel.

Cyclooxygenase-2 (COX-2) diregulasi oleh obat kemoterapi yang kemudian juga meregulasi *vascular endothelial growth factor* (VEGF), yang menginduksi angiogenesis. Hal ini terjadi melalui pengaturan matriks metaloproteinase (MMP), yang merupakan proses penting untuk metastasis. MMP juga diaktifkan oleh *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1). Kurkumin menghambat COX-2 dan VEGF, sehingga menekan angiogenesis. Kurkumin juga menurunkan ekspresi protein penyebab *multidrug* resisten, MRP1 dan PGP1, yang mengurangi sensitivitas reseptor terhadap kemoterapi (Abdali *et al.*, 2015).

2.3 Doksorubisin

Antrasiklin adalah salah satu agen paling efektif untuk kanker payudara dini dan lanjut (Xing *et al.*, 2015). Doksorubisin adalah antibiotik antrasiklin sitotoksik yang diisolasi dari kultur *Streptomyces peucetius*. Doksorubisin terdiri dari *naphthacenequinone nucleus* yang dihubungkan melalui ikatan *glycosidic* (FDA, 2003). Doksorubisin digunakan untuk mengobati banyak jenis kanker, termasuk leukemia akut, kanker payudara, kanker ovarium dan kanker tulang (Childs *et al.*, 2002).

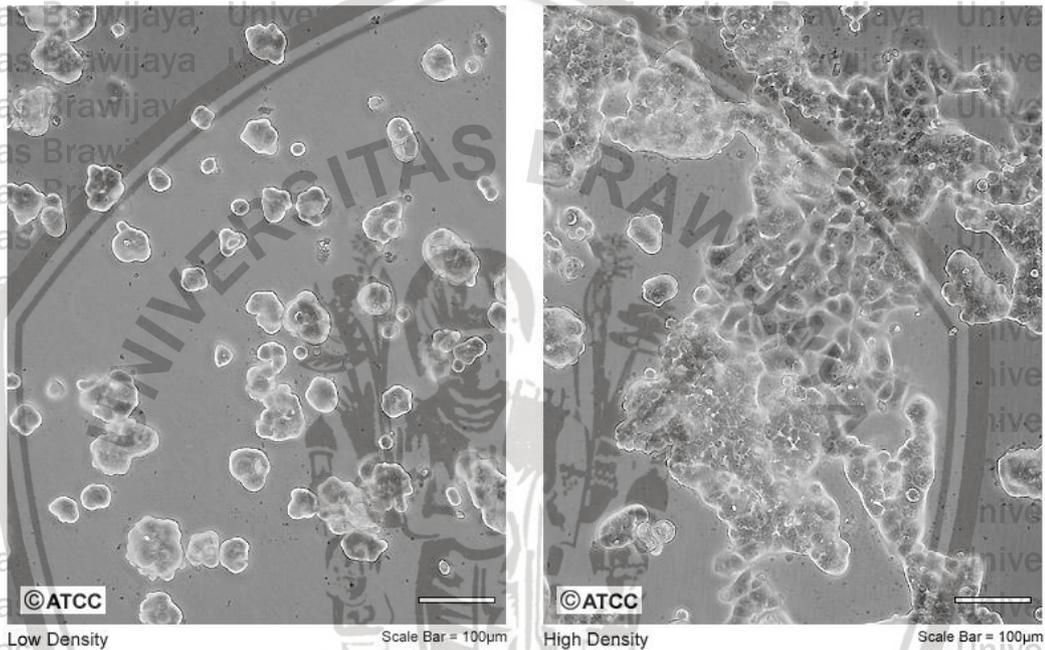
Mekanisme sitotoksik dari doksorubisin pada berbagai organ berkaitan dengan interkalasi nukleotida dan aktivitas pengikatan lipid membran sel dari doksorubisin. Interkalasi menghambat replikasi nukleotida dan proses polimerase DNA dan RNA. Interaksi doksorubisin dengan topoisomerase II untuk membentuk kompleks DNA merupakan mekanisme yang penting dalam aktivitas sitotoksik doksorubisin (FDA, 2003). Topoisomerase memiliki fungsi penting dalam replikasi dan perbaikan DNA. Adanya interaksi antara doksorubisin dan topoisomerase II yang membentuk kompleks menyebabkan hambatan dalam penyambungan kembali rantai DNA pada proses perbaikan DNA, sehingga memacu terjadinya apoptosis (Minotti, 2004).

2.4 Sel MCF-7

Sel MCF-7 merupakan sel yang berasal dari efusi pleura yang diambil dari pasien dengan kanker payudara. MCF-7 berasal dari adenokarsinoma payudara, memiliki karakteristik yang mirip dengan epitel payudara. MCF-7 merupakan salah satu sel kanker payudara yang mengekspresikan alpha reseptor estrogen (ER- α). Sel-sel tersebut juga mengekspresikan reseptor

androgen, progesteron dan glukokortikoid. Sel MCF-7 melalui reseptor estrogen sitoplasma, sel-sel ini memiliki kemampuan untuk memproses estradiol. MCF-7 mampu membentuk kubah dan sel epitel seperti tumbuh di *monolayer*. (Cooper, 2012).

ATCC Number: **HTB-22**
Designation: **MCF-7**



Gambar 2.4 sel MCF-7. Sel MCF-7 pada perbesaran 100µm (ATCC, 2008).

Pertumbuhan sel MCF-7 dapat dihambat dengan TNF alpha dan pengobatan sel kanker MCF-7 dengan anti-estrogen yang memiliki efek penghambatan pertumbuhan sel. meskipun sel MCF-7 mudah diperbanyak, pada umumnya lini sel ini adalah populasi yang tumbuh lambat. Waktu penggandaan MCF-7 sekitar 30-40 jam, dengan ukuran sel biasanya terbentuk berukuran 20-25 mikron.(Cooper, 2012).

2.5 Combination Index

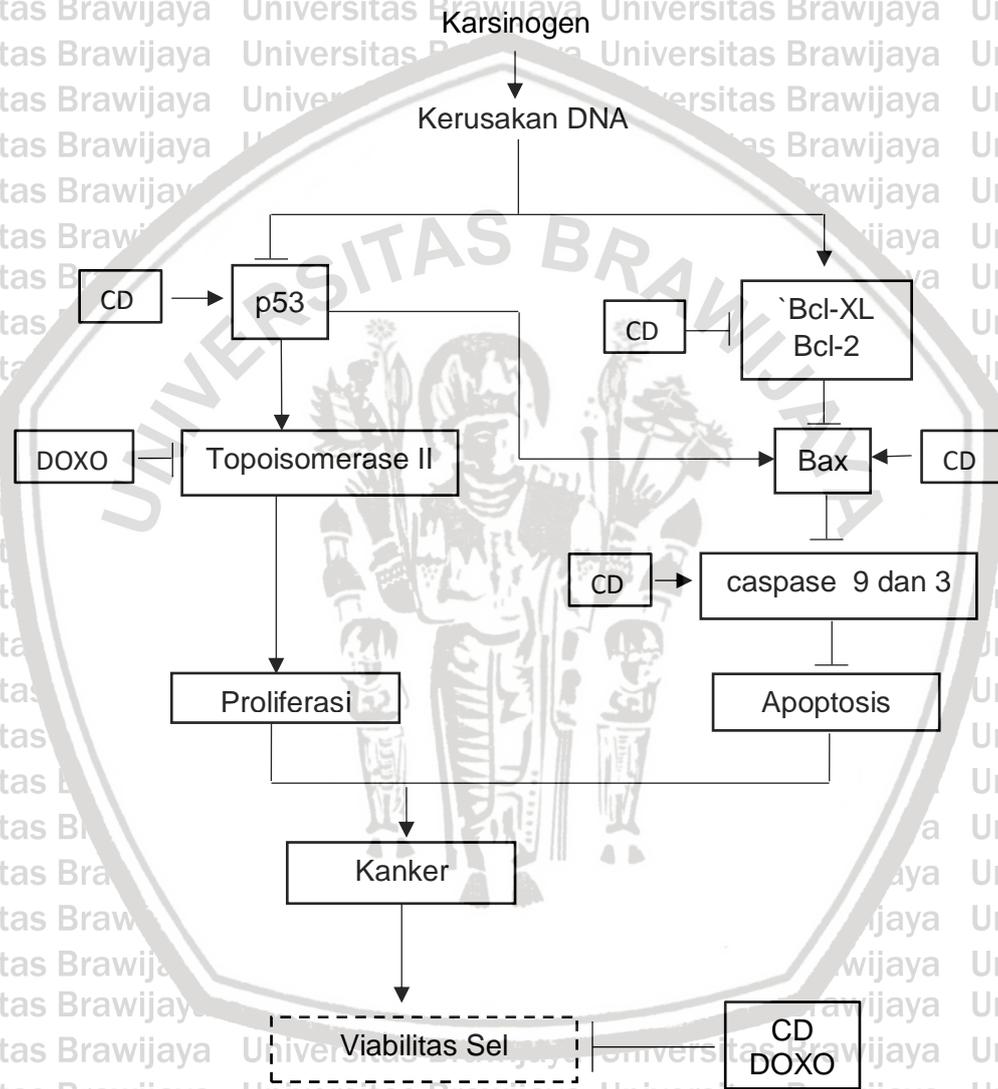
Combination Index (CI) merupakan ukuran standar efek kombinasi yang menunjukkan efek yang lebih besar yaitu $CI < 1$, efek yang lebih rendah atau antagonis ($CI > 1$) dan efek serupa $CI = 1$. CI dapat dihitung menggunakan rumus $CI = \frac{EA+EB}{EAB}$, dimana signifikansi efek positif diberikan oleh nilai P dari uji statistik yang membandingkan kombinasi dengan obat tunggal dengan nilai P tertinggi (Fouquier dan Guedj, 2015).

Pendekatan respon aditif atau bisa disebut sebagai pengaruh interaksi linier menunjukkan bahwa efek kombinasi obat bernilai positif bila efek kombinasi yang diamati (EAB) lebih besar dari pada efek aditif yang diharapkan yang diberikan oleh jumlah efek individual ($EA + EB$). Pendekatan respon aditif dapat muncul sebagai peningkatan alami dari obat tunggal untuk menilai sinergisme, karena membandingkan efek kombinasi yang diamati (EAB) dengan efek yang diharapkan dari aditif dan bukan efek dari obat tunggal. Ketika dimisalkan bahwa obat memiliki kurva efek dosis linier dengan nilai *intershep* 0, yang umumnya tidak terjadi karena kebanyakan kurva efek dosis ditandai dengan bentuk lengkung. Respon adiktif akan menunjukkan sinergisme pada bagian melengkung ke atas dan antagonisme di bagian melengkung ke bawah. Dengan perkiraan secara logika bahwa kombinasi obat yang memiliki fungsi sama dengan dirinya akan memberikan efek secara sinergis (Fouquier dan Guedj, 2015).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:

→ : menginduksi

—| : menghambat

□ : variabel yang tidak diteliti

□ : variabel yang diteliti

Karsinogen merupakan senyawa yang dapat menginduksi kerusakan DNA sehingga menyebabkan peningkatan proliferasi sel dan penurunan apoptosis. Agen kemoterapi yang digunakan untuk terapi kanker payudara salah satunya yaitu doksorubisin. Doksorubisin dapat menurunkan proliferasi sel penghambatan kerja dari enzim topoisomerase II. Topoisomerase memiliki fungsi penting dalam replikasi dan perbaikan DNA. Interaksi doksorubisin dengan enzim topoisomerase II membentuk kompleks yang menyebabkan hambatan dalam penyambungan kembali rantai DNA pada proses perbaikan DNA, sehingga memacu terjadinya apoptosis. *Curcuma domestica* merupakan tanaman yang telah banyak diteliti memiliki efek sitotoksik sebagai antikanker dengan menginduksi protein penekan tumor yaitu p53. Protein p53 memiliki peran penting dalam menjaga homeostasis yaitu dengan menginduksi ekspresi protein p21 yang merupakan regulator pada siklus sel. Mekanisme lain dari *Curcuma domestica* Val. yaitu melalui jalur apoptosis ekstrinsik dengan mengaktifasi caspase 9 dimana caspase 9 ini merupakan caspase inisiator. *Curcuma domestica* Val. juga mengaktifasi caspase eksekutor yaitu caspase 3, selain itu menurunkan protein anti-apoptosis *B-cell lymphoma* (Bcl-2) dan *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-XL) sehingga dapat meningkatkan apoptosis.

Pengobatan kanker saat ini banyak menunjukkan resistensi terhadap agen sitostatika konvensional sehingga dalam penelitian ini, dilakukan kombinasi ekstrak kunyit (*Curcuma domestica*) dan doksorubisin untuk membantu meningkatkan sensitivitas dari agen sitostatika dengan menggunakan beberapa dosis yang berbeda, yaitu $1/2 IC_{50}$, $3/8 IC_{50}$, $1/4 IC_{50}$, dan $1/8 IC_{50}$. Kemudian akan dilakukan perhitungan dari *combination index* (CI) sehingga dapat diketahui jenis interaksi dan dosis kombinasi yang tepat untuk menghasilkan efek

sinergisme pada kombinasi ekstrak *Curcuma domestica* Val. (kunyit) dan doksorubisin.

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah kombinasi ekstrak kunyit (*Curcuma domestica*) dan doksorubisin dapat memberikan efek sitotoksik yang sinergis berdasarkan *combination index* (CI) pada sel MCF-7.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini yaitu menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) yang dilakukan di laboratorium dan dilaksanakan secara *in vitro* dengan *randomized post test only controlled group design* untuk mengetahui jenis interaksi sitotoksik kombinasi antara ekstrak kunyit (*Curcuma domestica*) dan doksorubisin serta dosis yang tepat berdasarkan *Combination Index* (CI) pada kultur sel kanker payudara MCF-7.

4.2 Subjek Penelitian

Subjek yang digunakan pada penelitian ini adalah sel MCF-7, yang merupakan hasil kultur dari lini sel kanker payudara. Sel MCF-7 diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC) yang tersedia di Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Produk data *sheet* sel MCF-7 dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak *Curcuma domestica* dan doksorubisin. Variabel terikat dalam penelitian adalah nilai *combination index* (CI) yang dihitung menggunakan dosis IC_{50} dari hasil uji MTT pada seri konsentrasi ekstrak yang berbeda, yaitu $1/2 IC_{50}$, $3/8 IC_{50}$, $1/4 IC_{50}$, dan $1/8 IC_{50}$. Variabel kontrol dalam penelitian ini yaitu sel MCF-7, waktu inkubasi, kondisi inkubasi yaitu $37^{\circ}C \pm CO_2 5\%$, dan jumlah penanaman sel.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi dari penelitian ini dilakukan di beberapa tempat. Ekstraksi dari simplisia kunyit dilakukan di Laboratorium Farmasi Divisi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Selanjutnya kultur sel kanker payudara MCF-7 dan perlakuan pada kultur sel dilaksanakan di Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Waktu penelitian berlangsung Oktober 2017- Mei 2018 yang terdiri dari tahap persiapan, tahap pelaksanaan dan tahan penyelesaian.

4.5 Bahan dan Alat

4.5.1 Ekstraksi Rimpang Kunyit

Bahan yang digunakan adalah simplisia rimpang kunyit, etanol 80%, dan kertas penyaring. *Curcuma domestica* didapatkan dari Balai Materia Medika (BMM) Kota Batu, Jawa Timur. Hasil dari determinasi sampel tanaman (**Lampiran 3**) diketahui bahwa sampel tanaman yang diidentifikasi adalah *Curcuma domestica* dengan nama spesies *Curcuma domestica* Val. yang termasuk dalam famili *Zingiberaceae*. Kemudian Alat yang dibutuhkan adalah *stirrer*, toples (maserator), cawan, oven, corong *buchner*, dan *rotary evaporator*.

4.5.2 Kultur Sel

Bahan yang digunakan adalah sel MCF-7 (ATCC[®] HTB-22[™], U.S.A), alkohol 70 %, *ros park memorial institute* (RPMI) (#31800022, Gibco, New York, U.S.A), *fetal bovine serum* (FBS) (#26140087, Gibco, New York, U.S.A), 4-(2-*hydroxyethyl*)-1-*piperazineethanesulfonic-acid* (HEPES) (#40820004-5, Bioworld, Dublin, U.S.A), penisilin-streptomisin (#15070063, Gibco, New York, U.S.A), *amphotericin B* (#15290018, Gibco, New York, U.S.A), natrium bikarbonat

(#41900068-1(705724))Bioworld, Dublin, U.S.A), tripsin-EDTA (#25200056, Gibco, New York, U.S.A), HCl 1M, filter membran 0,22 μm (Sartorius, Goettingen, Germany), *conical tube* 15 ml dan 50 ml (Falcon, New Jersey, U.S.A), *flask* dengan luas permukaan 25 cm^2 (Costar, New York, U.S.A), 96 *wellplate* (SPL, Gyeonggi-do, South Korea), *cryo tube* (Costar, New York, U.S.A), kaca penutup, *sput* 10 ml (One Med, Sidoarjo, Indonesia), pipet volume 2 ml (Costar, New York, U.S.A), tip biru dan kuning (One Med, Sidoarjo, Indonesia), botol duran 100 ml, *handschoen*, label, bolpoin, spidol marker, masker dan tissue. Alat yang dibutuhkan adalah pemanas spiritus (Bunsen), inkubator yang dilengkapi tabung gas CO₂ (Innova CO-170, San Diego, U.S.A), *laminar air flow* (LAF) (Faster, Ferrara, Italy), sentrifus (Biosan, Rīga, Latvia), mikropipet, pH meter, vorteks, hemasitometer, *counter*, mikroskop *inverted* (Olympus IX71, Tokyo, Japan) dan timbangan analitik.

4.5.3 Pemaparan Ekstrak pada Sel Kultur

Bahan yang dibutuhkan untuk pemaparan ekstrak yaitu *micro tube*, *conical tube* 15 ml, tip biru dan kuning, media kultur (MK), dan *dimethyl sulfoxide* (DMSO) (Merck, Darmstadt, Germany). Sedangkan alat yang dibutuhkan adalah neraca analitik dan mikropipet.

4.5.4 Uji Sitotoksik Tunggal Penentuan IC₅₀ menggunakan Uji MTT

Bahan yang dibutuhkan untuk uji MTT adalah 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolium bromida (MTT) (#10059, Biotium, U.S.A), larutan ekstrak *Curcuma domestica*, larutan doksorubisin (#0215910105, MP Biomedicals, US), *phosphate buffer saline* (PBS), media RPMI, media *serum free* (SF), tripsin EDTA,

DMSO, *conical tube* 15 ml, *96 wellplate*, dan aluminium foil. Sedangkan alat yang dibutuhkan adalah *microplate reader*.

4.5.5 Uji Sitotoksik Kombinasi Kemoterapi

Bahan yang dibutuhkan untuk uji sitotoksik adalah larutan ekstrak *Curcuma domestica*, larutan doksorubisin, MK, media SF, larutan MTT, DMSO, *96 wellplate*, tip biru dan kuning serta aluminium foil. Sedangkan alat yang dibutuhkan adalah *mikroplate reader*, mikropipet, dan *conical tube*.

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini adalah:

1. Sel MCF-7 merupakan jenis sel kanker payudara yang digunakan sebagai subjek penelitian.
2. Ekstrak *Curcuma domestica* (CD) didapatkan melalui metode maserasi dengan pelarut etanol 80%.
3. Maserasi adalah metode ekstraksi simplisia dengan pelarut tertentu yang kemudian dilakukan pengadukan serta penyaringan berulang kali dalam suhu ruang.
4. Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium merupakan rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup, dimana membentuk kristal formazan berwarna ungu yang tidak larut air. Penambahan *reagen stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal formazan ungu yang kemudian absorbansinya akan diukur menggunakan *microplate*

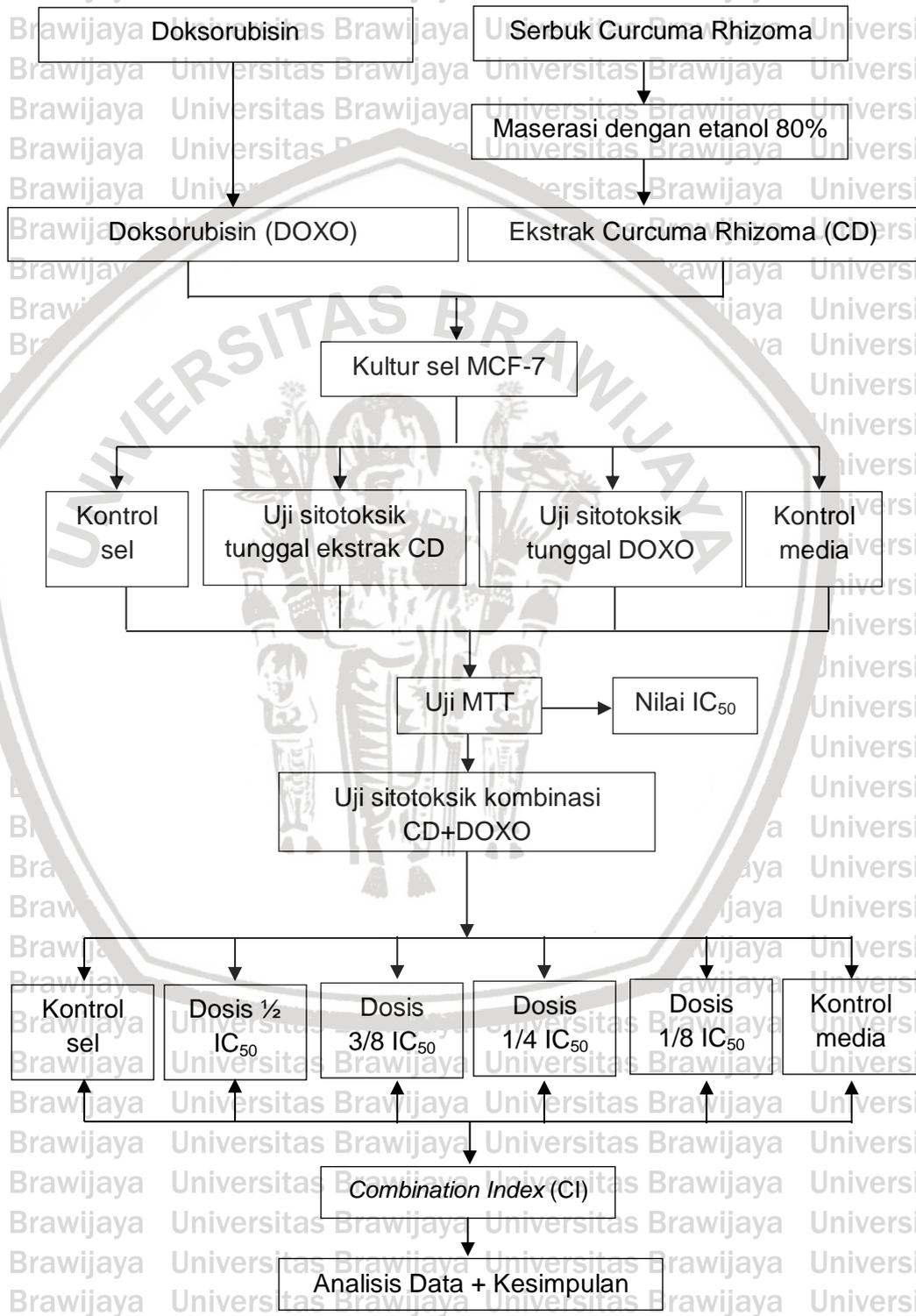
reader. Semakin tinggi intensitas warna ungu, maka jumlah sel yang hidup semakin banyak.

5. IC_{50} adalah dosis ekstrak yang berasal dari pengujian MTT yang mampu menghambat proliferasi sel MCF-7 sebesar 50%.
6. Persentase viabilitas sel adalah presentase dari sel hidup yang terukur dari hasil pembacaan absorbansi pada *microplate reader*.
7. *Combination Index* (CI) adalah indeks yang menunjukkan jenis interaksi dari beberapa kombinasi terapi yang dikombinasikan. Jenis interaksi antagonisme jika nilai CI lebih dari 1, kemudian interaksi sinergisme jika nilai CI kurang 1, dan jenis interaksi adiktif jika nilai CI sama dengan 1.



4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Skema Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Gambar Skema Prosedur Penelitian

4.7.2 Ekstraksi Rimpang Kunyit

Ekstraksi rimpang kunyit (*Curcuma domestica*) dilakukan dengan metode maserasi, dengan tahapan sebagai berikut:

1. Sebanyak 200 g serbuk rimpang kunyit, direndam dalam 1 L etanol 80%, diaduk hingga semua partikel terbasahi.
2. Dilakukan pengadukan selama 30 menit menggunakan *stirrer* dengan kecepatan 500 rpm.
3. Rendaman rimpang kunyit dibiarkan selama 24 jam.
4. Setelah 24 jam, dilakukan penyaringan menggunakan penyaring vakum.
5. Maserat ditampung, dan residu di re-maserasi.
6. Re-maserasi dilakukan sebanyak 2x, masing-masing menggunakan 0,5 L etanol 80%.
7. Maserat dari masing-masing tahapan re-maserasi dijadikan satu dalam satu wadah.
8. Ekstrak cair dipisahkan menggunakan *rotary evaporator*, dengan suhu *waterbath* tidak lebih dari 50°C dengan kecepatan putar 30 rpm.
9. Setelah didapatkan ekstrak pekat, maka dilakukan pengeringan dengan oven (suhu 45°C) sampai terbentuk pasta ± 7 hari.
10. Untuk mengetahui apakah sisa residu etanol masih ada atau tidak, maka dilakukan penimbangan sebanyak 3x pada hari yang berbeda pada ekstrak kering. Jika didapatkan berat yang konstan dengan ± 10%, maka ekstrak bisa digunakan untuk tahapan selanjutnya.

4.7.3 Kultur Sel MCF-7

4.7.3.1 Preparasi Media Kultur *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)

Komposisi media yang digunakan yaitu:

RPMI	2,6 gram
HEPES	0,55 gram
Natrium Bikarbonat (NaHCO_3)	0,5 gram
<i>Water for Injection</i> (WFI)	ad 250 ml

Berikut adalah tahapan dalam pembuatan media RPMI :

1. Ditimbang sejumlah 2.6 gram serbuk RPMI menggunakan neraca analitik.
2. Dimasukkan 2.6 gram serbuk RPMI kedalam botol duran 250 ml.
3. Ditambahkan ± 50 ml WFI kedalam botol duran 250 ml untuk melarutkan serbuk RPMI kemudian botol dikocok hingga larutan RPMI homogen.
4. Ditimbang sejumlah 0,55 gram HEPES menggunakan neraca analitik.
5. Dimasukkan HEPES ke dalam botol duran (3) kemudian dikocok hingga larut dan homogen.
6. Ditimbang sejumlah 0,5 gram serbuk NaHCO_3 menggunakan neraca analitik.
7. Dimasukkan serbuk NaHCO_3 ke dalam botol duran (5) kemudian dikocok hingga larut dan homogen.
8. Ditambahkan WFI sampai 250 ml kedalam botol duran (7) kemudian dikocok hingga homogeny.
9. Diukur nilai pH media RPMI menggunakan pH meter.

10. Dilakukan *adjust* pH dengan penambahan HCl 1 M tetes per tetes dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga pH RPMI berada dalam rentang nilai 7,0 - 7,4.

11. Diambil media RPMI menggunakan *sprit* kemudian difilter menggunakan filter membran 0,22 μ m didalam *laminar air-flow* (LAF).

12. Dimasukkan media RPMI yang telah difilter ke dalam botol duran 250 ml steril.

13. Dibungkus botol duran 250 ml yang berisi media RPMI menggunakan aluminium foil.

14. Diberi label berupa nama media, nama peneliti dan tanggal pembuatan pada botol duran.

15. Disimpan media RPMI didalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

4.7.3.2 Preparasi Media Kultur Lengkap (MK)

Komposisi yang digunakan untuk membuat MK yaitu:

FBS	5 ml (10%)
Penisilin-Streptomisin 100 unit/ml	0,5 ml (1%)
<i>Amphotericin B</i>	0,25 ml (0,5%)
Media RPMI	ad 50 ml

Berikut adalah tahapan dalam pembuatan media RPMI :

1. Diambil media RPMI dari lemari pendingin suhu 4°C dan didiamkan hingga suhu ruang.

2. Diambil FBS, penisilin-streptomisin, dan *amphotericin B* dari dalam freezer -20°C kemudian dikondisikan dalam suhu ruang.

3. Disiapkan conical tube 50 ml, *sprit* 10 ml, dan filter membran 0,22 μ m.

4. Disemprot dengan alcohol 70% semua alat dan bahan yang dimasukkan dalam LAF untuk pembuatan MK.
5. Diambil sejumlah 5 ml FBS menggunakan *sprit* 10 ml.
6. Diambil sejumlah 0,5 ml penisilin-streptomisin menggunakan *sprit* 10 ml (*sprit* yang sama).
7. Diambil sejumlah 0,25 ml *amphotericin B* menggunakan *sprit* 10 ml (*sprit* yang sama).
8. Difilter cairan dalam *sprit* 10 ml menggunakan filter membran 0,22 μ m kemudian dimasukkan ke dalam *conical tube* 50 ml.
9. Diambil media RPMI menggunakan *sprit* 10 ml.
10. Difilter media RPMI menggunakan filter membran 0,22 μ m sampai volume 50 ml kemudian dimasukkan dalam *conical tube* 50 ml.
11. Dikocok *conical tube* 50 ml sampai MK homogen.
12. Diberi label pada *conical tube* yaitu nama media, nama peneliti dan tanggal pembuatan.
13. Disimpan MK dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C.

4.7.3.3 Preparasi Media Serum Free (SF)

Komposisi media SF yang digunakan yaitu:

Penisilin-Streptomisin 100 unit/ml	0,5 ml (1%)
Amphotericin B	0,25 ml (0,5%)
Media RPMI	ad 50 ml

Berikut adalah tahapan dalam pembuatan media SF:

1. Diambil media RPMI dari lemari pendingin suhu 4°C dan didiamkan hingga suhu ruang.

2. Diambil penisilin-streptomisin dan *amphotericin B* dari dalam freezer suhu -20°C dan dikondisikan pada suhu ruang.
3. Disiapkan *conical tube* 50 ml, *sprit* 10 ml, dan filter membran $0,22\ \mu\text{m}$.
4. Disemprot dengan alcohol 70% semua alat dan bahan yang dimasukkan dalam LAF untuk pembuatan media SF.
5. Diambil 0,5 ml penisilin-streptomisin menggunakan *sprit* 10 ml.
6. Diambil 0,25 ml *amphotericin B* menggunakan *sprit* 10 ml (*sprit* yang sama).
7. Difilter cairan dalam *sprit* 10 ml menggunakan filter membran $0,22\ \mu\text{m}$ kemudian dimasukkan dalam *conical tube* 50 ml.
8. Diambil media RPMI menggunakan *sprit* 10 ml.
9. Difilter media RPMI menggunakan filter membran $0,22\ \mu\text{m}$ sampai volume dalam *conical tube* tepat 50 ml.
10. Dikocok *conical tube* 50 ml sampai media SF homogen.
11. Diberi label pada *conical tube* yaitu nama media, nama peneliti dan tanggal pembuatan.
12. Disimpan media SF ke dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C .

4.7.3.4 Thawing Cell

Berikut prosedur penumbuhan sel MCF-7 :

1. Diambil MK dari dalam lemari pendingin suhu 4°C dan didiamkan pada suhu ruang.
2. Diambil *cryo tube* yang berisi sel MCF-7 dari dalam *Mr.Frosty* pada freezer suhu -80°C .
3. Dikondisikan sel dalam *cryo tube* hingga berbentuk cairan dengan cara digosok menggunakan kedua tangan.

4. Disiapkan filter membran 0,22 μm , mikropipet, *sprit* 10 ml, tip kuning, dan *flask*.
5. Disemprot dengan alkohol 70% semua alat dan bahan yang dimasukkan dalam LAF untuk penumbuhan sel.
6. Diambil sejumlah 8 ml MK menggunakan *sprit* 10 ml.
7. Difilter MK menggunakan filter membran 0,22 μm kemudian MK dimasukkan ke dalam *flask*.
8. Diambil sel MCF-7 sejumlah 200 μl dari *cryo tube* menggunakan mikropipet kemudian dimasukkan ke dalam *flask*.
9. Digoyang-goyangkan *flask* sampai MK dan sel homogen.
10. Diamati kondisi sel MCF-7 menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 100 μm .
11. Diberi label pada *flask* berupa nama sel, jumlah pasase, nama peneliti dan tanggal penumbuhan,
12. Disemprot *flask* dengan alkohol 70% sebelum diinkubasi ke dalam inkubator 37°C \pm CO₂ 5%.

4.7.3.5 Penggantian Media

Berikut adalah prosedur penggantian media kultur :

1. Diambil *flask* yang berisi sel dari inkubator 37°C \pm 5%CO₂
2. Diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted* pada perbesaran 100 μm .
3. Diambil media SF dari lemari pendingin suhu 4°C dan didiamkan pada suhu ruang.
4. Disiapkan filter membran 0,22 μm , *sprit* 10 ml, dan wadah pembuangan.

5. Disemprot dengan alcohol 70% semua alat dan bahan yang dimasukkan dalam LAF untuk penggantian media.
6. Dibuang MK lama dalam flask kedalam wadah pembuangan.
7. Diambil media SF sejumlah 2 ml menggunakan *sprit* 10 ml.
8. Difilter media SF menggunakan filter membran 0,22 μm kemudian dimasukkan ke dalam *flask*.
9. Digoyang-goyangkan *flask* untuk membersihkan sel dari hasil metabolitnya.
10. Dibuang media SF dalam flask kedalam wadah pembuangan.
11. Diulangi untuk prosedur (7-10).
12. Diambil MK sejumlah 5 ml menggunakan *sprit* 10 ml
13. Difilter MK menggunakan filter membran 0,22 μm kemudian MK dimasukkan ke dalam *flask*.
14. Dihomogenkan MK dalam *flask* kemudian diamati kondisi sel dan % sel yang menempel pada dinding *flask* secara kualitatif menggunakan mikroskop *inverted*.
13. Disemprot *flask* dengan alcohol 70% sebelum diinkubasi kedalam inkubator 37°C \pm CO₂ 5%.

4.7.3.6 Pemanenan Sel

Berikut adalah prosedur pemanenan sel :

1. Diambil *flask* yang berisi sel dari inkubator 37°C \pm 5%CO₂
2. Diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted* pada perbesaran 100 μm . (Panen sel dilakukan apabila sel konfluen > 80%).
3. Diambil MK, media SF dari lemari pendingin suhu 4°C kemudian didiamkan hingga kondisinya sama dengan suhu ruang.

4. Diambil Tripsin-EDTA dari *freezer* suhu -20°C kemudian didiamkan hingga kondisinya sama dengan suhu ruang.
5. Disiapkan filter membran $0,22\ \mu\text{m}$, *sprit* 10 ml, *conical tube* 15 ml, *accu jet*, pipet ukur 2 ml, dan wadah pembuangan.
6. Disemprot dengan alkohol 70% semua alat dan bahan yang dimasukkan dalam LAF untuk pemanenan sel.
7. Dibuang MK lama dalam *flask* kedalam wadah pembuangan.
8. Diambil media SF sejumlah 2 ml menggunakan *sprit* 10 ml.
9. Difilter media SF menggunakan filter membran $0,22\ \mu\text{m}$ kemudian dimasukkan ke dalam *flask*.
10. Digoyang-goyangkan *flask* untuk membersihkan sel dari hasil metabolitnya.
11. Dibuang media SF dalam *flask* kedalam wadah pembuangan.
12. Diulangi untuk prosedur (8-11).
13. Diambil Tripsin-EDTA (tripsin 0,25%) sejumlah 2 ml menggunakan *sprit* 10 ml.
14. Difilter Tripsin-EDTA menggunakan filter membran $0,22\ \mu\text{m}$ kemudian dimasukkan ke dalam *flask* dan dihomogenkan.
15. Disemprot *flask* dengan alkohol 70% sebelum diinkubasi kedalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$ selama 5 menit.
16. Diamati kondisi sel dengan mikroskop *inverted* (sel terlepas dari dinding *flask*).
17. Diresuspensi sel dalam *flask* dengan teknik *pipetting* menggunakan pipet ukur dan *accu jet* hingga sel yang terlepas dari dinding *flask* tidak menggerombol.

18. Diambil MK sejumlah 5 ml menggunakan *sprit* 10 ml.
19. Difilter MK menggunakan filter membran 0,22 μm kemudian MK dimasukkan dalam *conical tube* 15 ml.
20. Dimasukkan sel dari *flask* kedalam *conical tube* 15 ml (19) dan dihomogenkan.
21. Disentrifugasi sel dalam *conical tube* 15 ml selama 8 menit dengan kecepatan 800 rpm.
22. Dibuang supernatan hasil sentrifugasi kedalam wadah pembuangan.
23. Diambil ± 1 ml MK menggunakan *sprit* 10 ml kemudian difilter menggunakan filter membran 0,22 μm dan dimasukkan MK kedalam *conical tube* ad 1 ml.
24. Diresuspensi pelet berupa sel dengan teknik *pipetting* menggunakan pipet ukur dan *accu jet* hingga homogen.

4.7.3.7 Perhitungan Sel

Berikut prosedur perhitungan sel :

1. Dilakukan pemanenan sel sesuai protokol pemanenan sel.
2. Disiapkan tip kuning, mikropipet, hemasitometer, counter, dan *micro tube*.
3. Disemprot dengan alkohol 70% semua alat dan bahan yang dimasukan dalam LAF untuk perhitungan sel.
4. Diambil 10 μl hasil panen sel dengan mikropipet kemudian dimasukkan dalam *micro tube*.
5. Diambil 10 μl *tripan-blue* dengan mikropipet kemudian dimasukkan dalam *micro tube* dan dihomogenkan.

6. Diambil 10 μ l (5) dengan mikropipet kemudian dipipetkan ke hemasitometer.
7. Dihitung jumlah sel hasil panen menggunakan mikroskop *inverted* dan *counter*. Sel yang mati (berwarna gelap / biru) dan sel yang berada diluar batas sebelah atas dan kanan tidak dihitung sedangkan sel yang berada dibatas kiri dan bawah dihitung.
8. Dijumlahkan hasil perhitungan sel dalam 4 kamar (A,B,C,D) hemasitometer menggunakan rumus dibawah ini:

$$\text{Jumlah sel terhitung/ml} = \frac{\text{Jumlah sel kamar A+B+C+D}}{4} \times 10^4 \times 2$$

9. Dihitung total sel yang dibutuhkan untuk penanaman sel pada 96 *wellplate*.
10. Dihitung jumlah volume panen sel yang dibutuhkan menggunakan rumus dibawah ini.
$$\text{Volume panen sel yang dibutuhkan} = \frac{\text{Jumlah total sel yang dibutuhkan}}{\text{Jumlah sel terhitung/ml}}$$
11. Diambil panen sel sesuai volume yang dibutuhkan dari hasil perhitungan dengan mikropipet kemudian dimasukkan dalam *conical tube* 15 ml.
12. Diambil MK sampai total volume yang dibutuhkan menggunakan *spuit* 10 ml. Perhitungan volume MK yang dibutuhkan yaitu setiap sumuran diisi dengan 100 μ l, sehingga total volume yang dibutuhkan untuk penanaman sel adalah 100 μ l x 100 sumuran = 10 ml. (dibulatkan dari total 96 sumuran).
13. Difilter MK sampai ad 10 ml menggunakan filter membran 0,22 μ m dan dimasukkan kedalam *conical tube* 15 ml dan dihomogenkan.

4.7.3.8 Subkultur Sel

Berikut adalah prosedur subkultur sel:

1. Dilakukan pemanenan sel sesuai protokol pemanenan sel.
2. Diambil MK dari lemari pendingin suhu 4°C dan didiamkan hingga kondisinya sama dengan suhu ruang
3. Disiapkan filter membran 0,22 µm, *sprit* 10 ml, flask, tip kuning, dan mikropipet.
4. Disemprot dengan alkohol 70% semua alat dan bahan yang dimasukkan dalam LAF untuk subkultur sel.
5. Diambil MK sejumlah 5 ml menggunakan *sprit* 10 ml.
6. Difilter MK menggunakan filter membran 0,22 µm kemudian dimasukkan ke dalam *flask*.
7. Diambil 200 µl sel dengan mikropipet kemudian dimasukkan ke dalam *flask*.
8. Dihomogenkan sel dengan MK kemudian diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted*.
9. Diberi label *flask* berupa nama sel, jumlah pasase, nama peneliti, dan tanggal subkultur.
10. Disemprot *flask* dengan alkohol 70% sebelum diinkubasi kedalam inkubator 37°C ± CO2 5%.

4.7.3.9 Cryopreservation

Berikut prosedur *cryopreservation*:

1. Dilakukan pemanenan sel sesuai protokol pemanenan sel.
2. Diambil MK dari lemari pendingin suhu 4°C dan didiamkan hingga kondisinya sama dengan suhu ruang

3. Disiapkan *cryo tube*, filter membran 0,22 μm , *sprit* 10 ml, *conical tube* 15 ml, mikropipet, tip biru, pipet ukur 2 ml, *accu jet*, DMSO, dan wadah pembuangan.
4. Disemprot dengan alkohol 70% semua alat dan bahan yang dimasukkan dalam LAF untuk *cryopreservation*.
5. Diambil DMSO sejumlah 1 ml menggunakan mikropipet.
6. Dimasukkan DMSO ke dalam *conical tube* 15 ml.
7. Diambil 9 ml MK menggunakan *sprit* 10 ml.
8. Difilter MK menggunakan filter membran 0,22 μm kemudian ditambahkan ke dalam *conical tube* 15 ml (6) dan dihomogenkan. (media cryo).
9. Disentrifugasi sel selama 8 menit dengan kecepatan 800 rpm.
10. Dibuang supernatan hasil sentrifugasi ke dalam wadah pembuangan.
11. Diambil 1,5 ml media *cryo* menggunakan *sprit* 10 ml.
12. Difilter media *cryo* menggunakan filter membran 0,22 μm kemudian dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml (10).
13. Diresuspensikan sel dengan teknik *pipetting* menggunakan pipet ukur dan *accu jet* sampai homogen.
14. Dituang sel dari *conical tube* kedalam *cryo tube*.
15. Diberi label *cryo tube* berupa nama sel, jumlah pasase, nama peneliti, dan tanggal *cryopreservation*.
16. Disimpan *cryo tube* dalam *Mr. Frosty* suhu -80°C .

4.7.3.10 Platting Sel

Berikut adalah prosedur *platting* sel :

1. Dilakukan pemanenan sel sesuai dengan protokol panen sel.
2. Dilakukan perhitungan jumlah sel sesuai dengan protokol penghitungan sel.
3. Dibuat pengenceran suspensi sel sehingga konsentrasi sel akhir 8×10^3 sel/100 μ l MK.
4. Ditransfer sel ke dalam sumuran, masing-masing 100 μ l.
5. Disisakan 3 sumuran kosong (tanpa sel) untuk kontrol media
6. Diamati keadaan sel di mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel dan didokumentasikan
7. Disemprot dengan alkohol 70% dan diinkubasi sel di dalam inkubator pada suhu $37^\circ\text{C} \pm \text{CO}_2$ 5% selama \pm 24 jam.

4.7.3.11 Preparasi Ekstrak pada Kultur Sel

Berikut prosedur preparasi ekstrak pada kultur sel:

1. Dibuat 7 seri konsentrasi ekstrak rimpang kunyit 50-200 $\mu\text{g/ml}$ dengan rumus:

$$f = \sqrt[n-1]{(Dt/Dr)}$$

Keterangan:

n = banyaknya seri konsentrasi

Dt = konsentrasi tertinggi

Dr = konsentrasi terendah (**Lampiran 5.**)

2. Ditimbang sejumlah 5 mg ekstrak rimpang kunyit dalam *micro tube* menggunakan neraca analitik.

3. Dilarutkan ekstrak menggunakan DMSO sejumlah 10-20 kali berat ekstrak (50-100 μ l) dengan di *vortex* sampai ekstrak larut.
4. Ditambahkan MK ad 1 ml dalam *mikro tube* (3) kemudian di *vortex* dan dihomogenkan.
5. Difilter ekstrak pada konsentrasi terbesar menggunakan filter membran 0,22 μ m dalam LAF dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml steril.
6. Dilakukan pengenceran 7 seri konsentrasi dalam *conical tube* 15 ml.

4.7.3.12 Preparasi Doksorubisin pada Kultur sel

Berikut prosedur preparasi doksorubisin pada kultur sel:

1. Dibuat 7 seri konsentrasi doksorubisin 1-1000 nM dengan rumus:

$$f = \sqrt[n-1]{(Dt/Dr)}$$

Keterangan:

- n = banyaknya seri konsentrasi
 Dt = konsentrasi tertinggi
 Dr = konsentrasi terendah (**Lampiran 4.**)

2. Ditimbang 0,1 mg serbuk doksorubisin dalam *conical tube* 15 ml menggunakan neraca analitik.
3. Dilarutkan doksorubisin menggunakan WFI ad 10 ml. larutan doksorubisin (17200 nM)
4. Dilakukan pengenceran larutan sub stok doksorubisin 5000 dan 10000 nM.
5. Difilter doksorubisin konsentrasi terbesar menggunakan filter membran 0,22 μ m dalam LAF dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml.

6. Dilbuat pengenceran sejumlah 7 seri kosentrasi doksorubisin dalam *conical tube* 15 ml.
7. Disimpan larutan stok dan substok doksorubisin dalam lemari pendingin suhu 4°C.

4.7.3.13 Pemaparan Ekstrak dan Doksorubisin pada Uji Sitotoksik tunggal

Berikut prosedur Pemaparan Ekstrak dan Doksorubisin:

1. Disiapkan 7 seri konsentration ekstrak atau doksorubisin yang telah dibuat sebelumnya.
2. Dikeluarkan 96 *wellplate* berisi sel dari dalam incubator 37°C±CO₂ 5%
3. Diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted*
4. Dibuang media lama dari 96 *wellplate* berisi sel dengan menggunakan *sprit* ke wadah pembuangan
5. Dimasukkan seri konsentration ekstrak Curcuma Rhizoma (CD) atau doksorubisin (DOXO) ke dalam sumuran yang berisi sel @100 µl dengan replikasi 3 kali (*triplo*).
6. Dihomogenkan *wellplate* dengan diketuk-ketukkan.
7. Diamati kondisi sel setelah pemberian ekstrak atau doksorubisin dengan mikroskop *inverted*.
8. Diinkubasi sel dalam *wellplate* pada inkubator 37°C±CO₂ 5%.

Plate Uji Sitotoksik Tunggal

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KM	KM	KM
B	DOXO K ₁	DOXO K ₁	DOXO K ₁	CD K ₁	CD K ₁	CD K ₁							
C	DOXO K ₂	DOXO K ₂	DOXO K ₂	CD K ₂	CD K ₂	CD K ₂							
D	DOXO K ₃	DOXO K ₃	DOXO K ₃	CD K ₃	CD K ₃	CD K ₃							
E	DOXO K ₄	DOXO K ₄	DOXO K ₄	CD K ₄	CD K ₄	CD K ₄							
F	DOXO K ₅	DOXO K ₅	DOXO K ₅	CD K ₅	CD K ₅	CD K ₅							
G	DOXO K ₆	DOXO K ₆	DOXO K ₆	CD K ₆	CD K ₆	CD K ₆							
H	DOXO K ₇	DOXO K ₇	DOXO K ₇	CD K ₇	CD K ₇	CD K ₇							

4.7.3.14 Penentuan IC₅₀ menggunakan Uji MTT

Berikut prosedur penentuan IC₅₀ menggunakan uji MTT:

1. Ditimbang 50 mg serbuk MTT menggunakan neraca analitik.
2. Dimasukkan serbuk MTT dalam *conical tube* 15 ml.
3. Ditambahkan PBS ad 10 ml ke dalam *conical tube* 15 ml.
4. Ditutup *conical tube* dengan aluminium foil.
5. Dilarutkan dengan cara di vorteks.
6. Difilter larutan stok MTT menggunakan filter membran 0,22 μm dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml steril.
7. Ditutup *conical tube* dengan aluminium foil dan diberi label larutan stok MTT, tanggal pembuatan, dan nama peneliti.
8. Diambil 1 ml larutan stok MTT menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *conical tube* 15 ml.

9. Diambil 9 ml media RPMI menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *conical tube* kemudian dihomogenkan.
10. Diambil media dalam *wellplate* menggunakan *sprit* 10 ml dan dibuang dalam wadah pembuangan.
11. Diambil 100 μ l larutan MTT menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *wellplate*.
12. Disemprot *wellplate* menggunakan alkohol 70% dan diinkubasi selama 4 jam pada inkubator 37°C \pm CO2 5%
13. Diamati sel menggunakan mikroskop *inverted*.
14. Diambil larutan MTT dalam *wellplate* menggunakan *sprit* 10 ml dan dibuang dalam wadah pembuangan.
15. Diambil 100 μ l DMSO menggunakan mikropipet dan dimasukkan kedalam sumuran *wellplate*.
16. Disemprot *wellplate* menggunakan alkohol 70% dan diinkubasi selama 30 menit pada inkubator 37°C \pm CO2 5%
17. Dibaca absorbansi menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm.
18. Dihitung % hambatan proliferasi sel menggunakan rumus dibawah ini.

$$\% \text{ hambatan proliferasi} = \frac{\bar{x} \text{ absorbansi kontrol} - \bar{x} \text{ absorbansi sampel}}{\bar{x} \text{ absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

4.7.3.15 Uji Sitotoksik Kombinasi Kemoterapi

Berikut prosedur uji sitotoksik kombinasi kemoterapi:

1. Diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted*.
2. Disiapkan ekstrak dan doksorubisin sesuai dengan protokol preparasi ekstrak dan doksorubisin (**Lampiran 12.**)
3. Diambil *wellplate* dari inkubator 37°C \pm CO2 5%.

4. Diambil media lama dalam sumuran menggunakan *sprit* 10 ml dan dibuang ke dalam wadah pembuangan.
5. Digunakan desain *wellplate* sebagai berikut.

Plate Uji Sitotoksik Kombinasi



- Untuk kelompok perlakuan tunggal plate kombinasi:

Dimasukkan seri konsentrasi ekstrak Curcuma Rhizoma (CD) atau doksorubisin (DOXO) ke dalam sumuran yang berisi sel @50 µl dan MK @50 µl dengan replikasi 3 kali (triplo).

- Untuk kelompok perlakuan dua kombinasi pada plate kombinasi:

Dimasukkan seri konsentrasi ekstrak Curcuma Rhizoma (CD) ke dalam sumuran yang berisi sel @50 µl dengan replikasi 3 kali (triplo), kemudian ditambahkan seri konsentrasi doksorubisin (DOXO) untuk kombinasi @50 µl.

➤ Untuk kontrol sel:

Ditambahkan MK ke dalam sumuran yang berisi sel @100 μ l dengan replikasi minimal 3 kali (triplo).

➤ Untuk kontrol media:

Ditambahkan MK ke dalam sumuran yang kosong (tanpa sel) @ 100 μ l dengan replikasi minimal 3 kali (triplo).

6. Diamati *wellplate* menggunakan mikroskop *inverted*.

7. Disemprot *wellplate* dengan alkohol 70% dan diinkubasi dalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$ selama 24 jam.

8. Diambil *wellplate* dari dalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$ dan diamati kondisi sel menggunakan mikroskop *inverted*.

9. Diambil larutan perlakuan sebelumnya dalam *wellplate* menggunakan spuit 10 ml dan dibuang ke dalam wadah pembuangan.

10. Diambil 100 μ l larutan MTT menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *wellplate*.

11. Diinkubasi sel selama 4 jam dalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm \text{CO}_2 5\%$

12. Diamati sel menggunakan mikroskop *inverted*.

13. Diambil larutan MTT dalam *wellplate* menggunakan *spuit* 10 ml dan dibuang dalam wadah pembuangan.

14. Diambil 100 μ l DMSO menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *wellplate*.

15. Diinkubasi sel selama 30 menit dalam inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm \text{CO}_2 5\%$

16. Dibaca absorbansi menggunakan *microplate-reader* dengan panjang gelombang 570 nm.

17. Dihitung prosentase sel hidup akibat perlakuan tunggal dan kombinasi ekstrak.

$$18. \% \text{ sel hidup} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

19. Dihitung nilai *combination index* (CI) dan dilakukan interpretasi nilai CI sesuai dengan tabel 4.1

$$CI = \frac{D1}{Dx1} + \frac{D2}{Dx2}$$

Keterangan:

DX: Konsentrasi terapi tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek sebesar efek kombinasi

(D)1,(D)2: Konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama.

Tabel 4.1 Interpretasi Nilai CI

Nilai CI	Interpretasi
< 0,1	efek sinergis sangat kuat
0,1 – 0,3	efek sinergis kuat
0,3 – 0,7	efek sinergis
0,7 – 0,85	efek sinergis sedang
0,85 – 0,9	efek sinergis ringan
0,9 – 1,1	mendekati adiktif
1,1 – 1,2	antagonis ringan
1,2 – 1,45	efek antagonis ringan
1,45 – 3,3	antagonis
3,3 – 10	efek antagonis kuat
>10	efek antaginis sangat kuat

Sumber: (Bijnsdorp *et al.*, 2011)

4.8 Pengumpulan Data

Data hasil penelitian dibagi menjadi dua yaitu data hasil uji sitotoksik tunggal dan data hasil uji sitotoksik kombinasi. Hasil uji sitotoksik tunggal diperoleh dari hasil pembacaan *microplate reader* berupa absorbansi digunakan untuk mencari persentase viabilitas sel. Kemudian, dibuat regresi linear dari hasil perhitungan persentase viabilitas sel untuk memperoleh nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} digunakan untuk menentukan dosis uji sitotoksik kombinasi sehingga diperoleh persentase viabilitas sel pada perlakuan uji sitotoksik kombinasi. Hasil

persentase viabilitas sel uji sitotoksik kombinasi kemudian digunakan untuk menghitung nilai CI dari kombinasi dosis yang digunakan. Setelah diperoleh nilai CI, kemudian dapat dilakukan interpretasi jenis interaksi sitotoksik yang terjadi pada setiap dosis kombinasi CD-DOXO sesuai dengan **Tabel 4.1**.



BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS

5.1 Hasil Ekstraksi *Curcuma domestica*

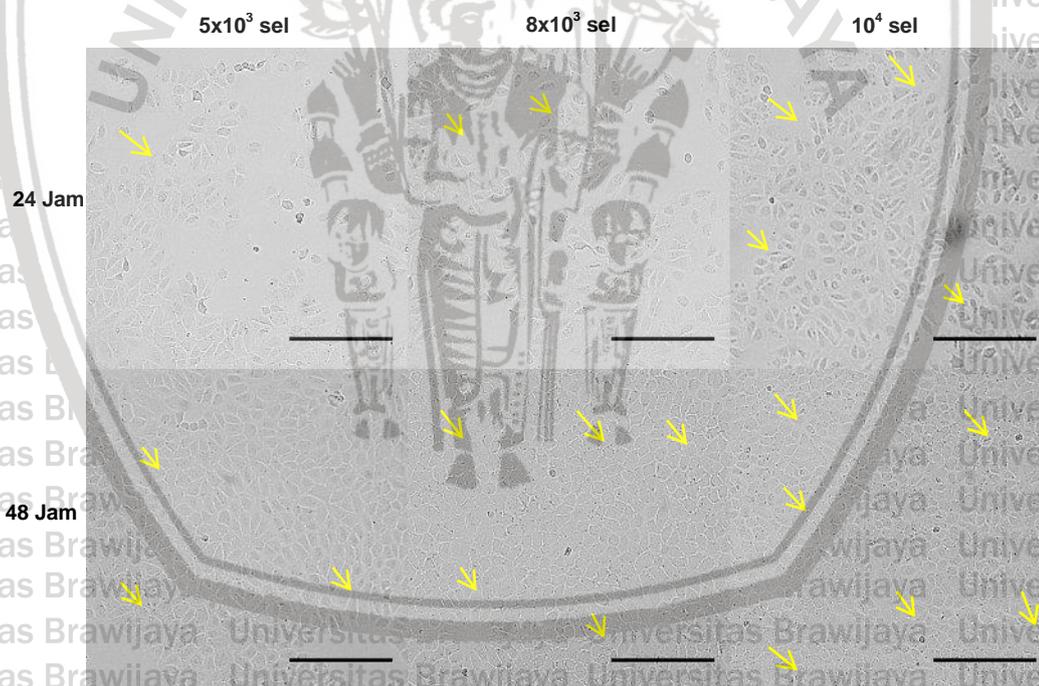
Ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini yaitu menggunakan metode maserasi dengan perendaman ekstrak selama 24 jam dengan pelarut etanol 80%. Metode maserasi dipilih karena ekstraksi dengan metode ini cukup sederhana dan dapat memisahkan komponen senyawa (metabolit sekunder) yang terkandung dari tanaman. Pelarut etanol 80% digunakan karena memiliki dua gugus yang berbeda, yaitu hidroksil yang bersifat polar dan gugus alkil yang bersifat nonpolar, sehingga dapat mengekstraksi senyawa dengan kepolaran berbeda.

Curcuma domestica yang digunakan sebanyak 200 gram dimaserasi dengan volume pelarut 1 L dan dilakukan remaserasi sebanyak dua kali dengan masing-masing volume pelarut 500 ml, kemudian dilakukan pemisahan pelarut dengan ekstrak yang didapat dengan alat *rotary evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak berbentuk pasta. Ekstrak yang telah dipisahkan dengan pelarutnya kemudian dioven selama 4 hari untuk mengurangi sisa etanol yang masih tersisa. Berat ekstrak pekat yang diperoleh adalah 46 gram. Perhitungan hasil rendemen ekstrak *Curcuma domestica* adalah 23%. Ekstrak yang diperoleh dari *Curcuma domestica* memiliki karakteristik berwarna orange kecokelatan dan berbentuk pasta padat serta tidak terlalu lengket (**Lampiran 20**).

5.2 Hasil Uji Sitotoksik Tunggal

Optimasi dilakukan sebelum uji sitotoksik tunggal terhadap metode kultur sel MCF-7 meliputi optimasi jumlah sel yang ditanam (5×10^3 ; 8×10^3 ; 10^4

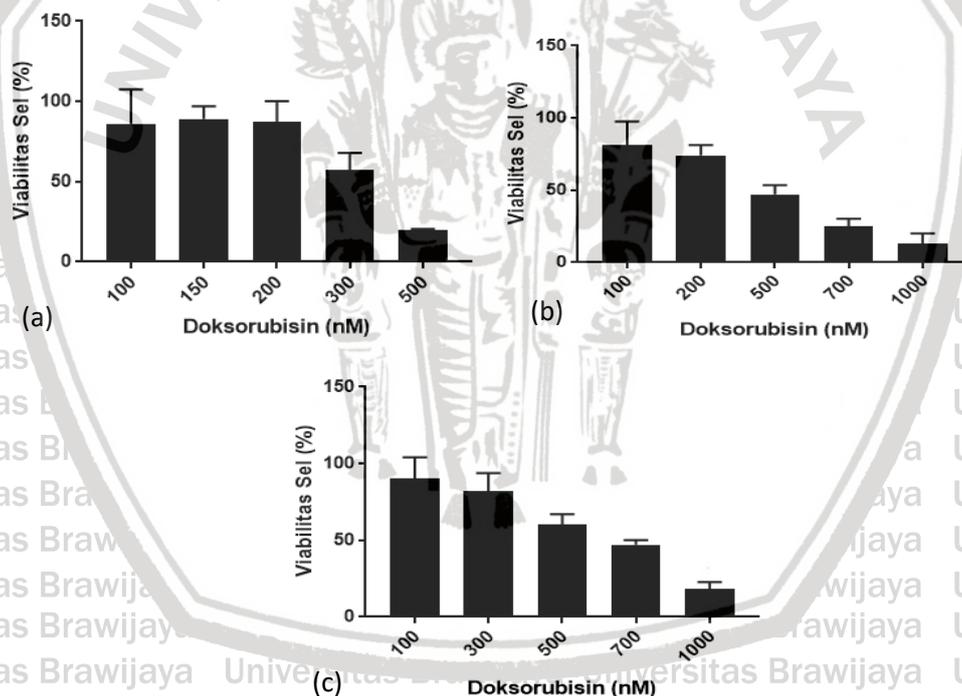
sel) dan waktu inkubasi dari mulai sel ditanam hingga siap diberikan perlakuan (24 dan 48 jam). Hasil optimasi untuk jumlah penanaman sel dan waktu inkubasi yaitu jumlah sel yang ditanam 8×10^3 sel dan waktu inkubasi selama 24 jam. Hasil pengamatan dengan mikroskop *inverted* menunjukkan secara kualitatif bahwa jumlah penanaman 8×10^3 sel dengan inkubasi 24 jam, sel konfluen $\pm 70\%$ (**Gambar 5.1**). Optimasi penanaman 5×10^3 sel dilihat dari pengamatan secara kualitatif yaitu persentase konfluen sel terlalu sedikit, sedangkan untuk penanaman 10^4 sel persentase konfluen sel terlalu banyak, sama halnya dengan waktu inkubasi 48 jam, sel konfluen $>80\%$ sehingga saat pembacaan menggunakan *microplate reader* nilai absorbansinya terlalu tinggi (>0.8).



Gambar 5.1. Optimasi Jumlah Penanaman dan Waktu Inkubasi Sel MCF-7 saat *Plating*. Optimasi jumlah penanaman sel dan waktu inkubasi diteliti dengan menghitung jumlah sel MCF-7 untuk *plating*. Jumlah yang digunakan adalah 5×10^3 , 8×10^3 , dan 10^4 sel serta waktu inkubasi yang digunakan adalah 24 dan 48 jam sebelum sel diberikan perlakuan. Skala garis $10 \mu\text{m}$. Panah kuning: sel yang menempel didinding flask (konfluen).

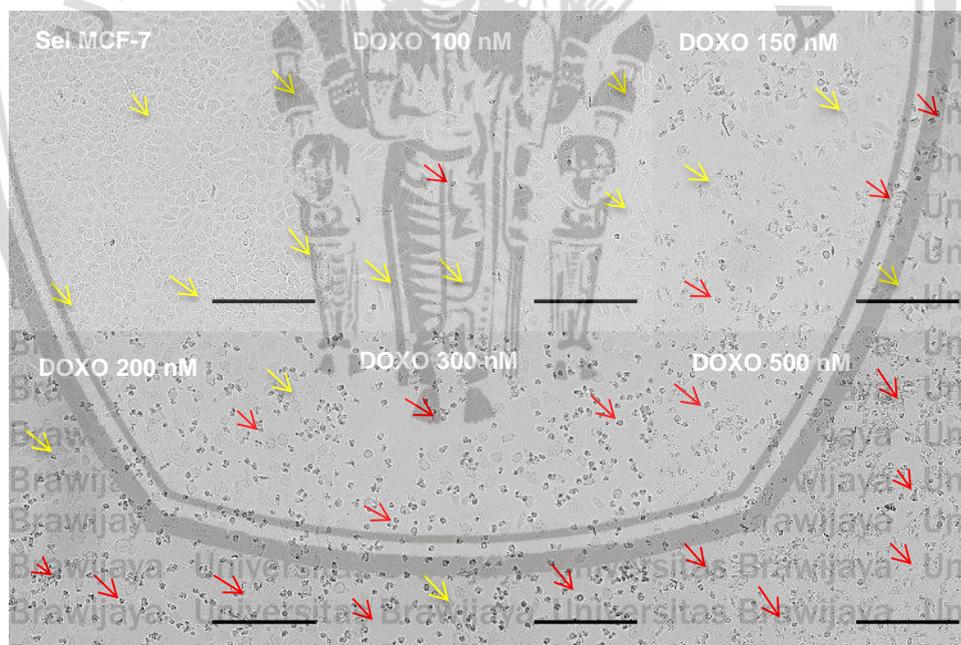
Uji sitotoksik tunggal pada penelitian ini bertujuan mengetahui efek sitotoksik ekstrak *Curcuma domestica* (CD) dan doksorubisin (DOXO) terhadap viabilitas sel MCF-7 yang dilihat dari nilai IC_{50} . Metode yang digunakan yaitu MTT assay. Hasil yang diperoleh dari metode MTT assay yaitu nilai % viabilitas sel yang terukur dari pembacaan absorbansi menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm. Data persen viabilitas sel dapat digunakan untuk mencari regresi linear sehingga akan diperoleh nilai IC_{50} dari ekstrak CD maupun DOXO.

5.2.1 Hasil Uji Sitotoksik Doksorubisin



Gambar 5.2. Pengaruh Pemberian Doksorubisin Terhadap Viabilitas Sel MCF-7. Pengaruh doksorubisin terhadap viabilitas sel MCF-7 diteliti dengan memberikan berbagai konsentrasi doksorubisin dan sel MCF-7 yang ditanam sejumlah 8×10^3 , inkubasi 24 jam, pemberian doksorubisin inkubasi 24 jam serta pemberian MTT, didapatkan persentase viabilitas sel yang dihitung dari hasil MTT assay. Absorbansi diukur pada sebagai *microplate reader* dengan panjang gelombang (λ) 570 nm. Hasil yang diperoleh yaitu sebagai persentase viabilitas sel berdasarkan seri konsentrasi doksorubisin yang digunakan. (a) Replikasi 1; (b) Replikasi 2; (c) Replikasi 3.

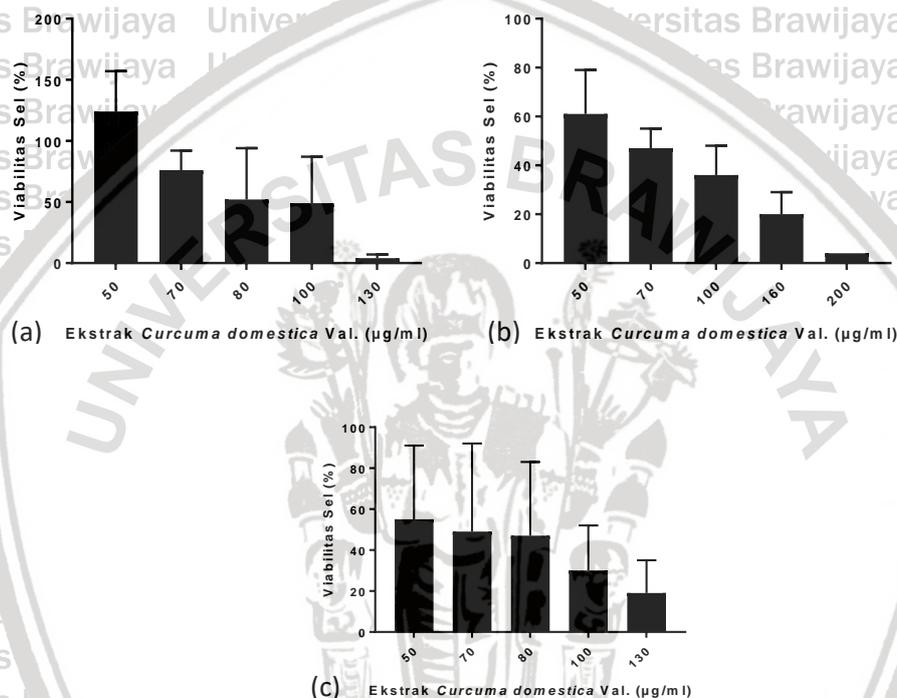
Hasil yang diperoleh dari uji sitotoksik tunggal doksorubisin terhadap sel kanker MCF-7 dari tiga kali replikasi didapatkan nilai IC_{50} yaitu 347 nM; 475 nM; dan 635 nM dan diperoleh rata-rata dari IC_{50} doksorubisin adalah 486 nM (**Lampiran 4, 5 dan 6**). Pemberian doksorubisin pada gambar 5.2 menunjukkan grafik peningkatan konsentrasi yang diberikan sebanding dengan penurunan persentase viabilitas sel sehingga menunjukkan adanya *dose dependent manner*. Hasil pengamatan dari sel MCF-7 menggunakan mikroskop *inverted* terlihat adanya perbedaan morfologi dari sel MCF-7 dan sel MCF-7 setelah dipapar selama 24 jam dengan doksorubisin pada berbagai konsentrasi (rentang konsentrasi 100-1000 nM). Sel yang terpapar DOXO terlihat bagian sel yang lisis dengan bentuk yang tidak beraturan (**Gambar 5.3**).



Gambar 5.3. Morfologi Kultur Sel MCF-7 dan Setelah Terpapar Doksorubisin. Pengaruh pemberian doksorubisin terhadap morfologi sel MCF-7 diteliti dengan memberikan berbagai konsentrasi doksorubisin yang terlihat dari pengamatan menggunakan mikroskop *inverted* skala garis 10 μ m. Panah Kuning: Sel masih menempel; Panah Merah: Sel lisis.

5.2.2 Hasil Uji Sitotoksik Ekstrak *Curcuma domestica*

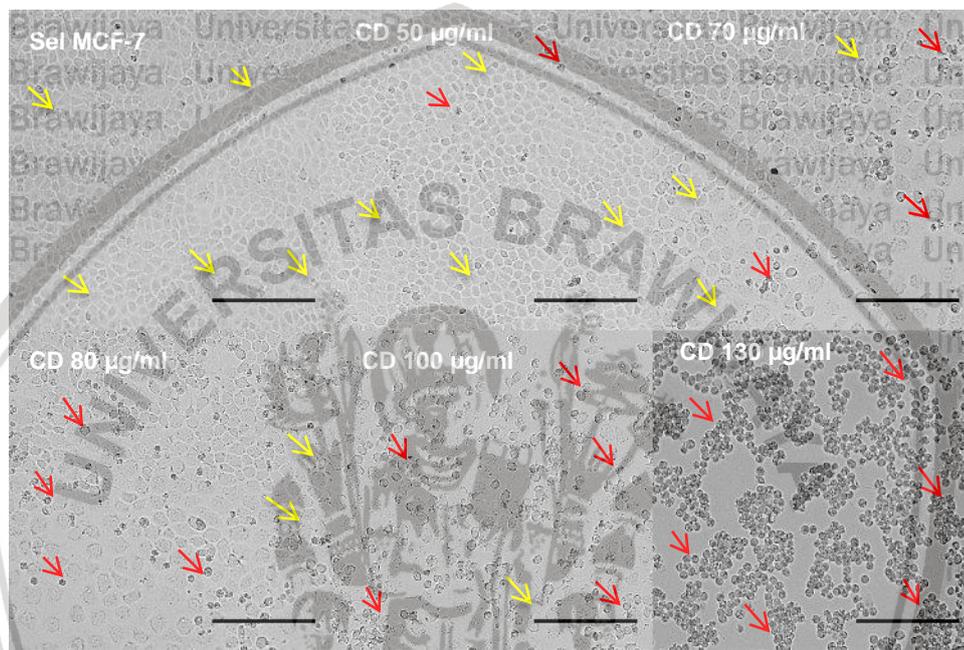
Hasil yang diperoleh dari uji sitotoksik tunggal ekstrak *Curcuma domestica* (CD) terhadap sel kanker MCF-7 dengan 3 kali replikasi yaitu nilai IC_{50} ekstrak CD adalah 94 $\mu\text{g/ml}$; 70 $\mu\text{g/ml}$; dan 65 $\mu\text{g/ml}$ dengan nilai rata-rata IC_{50} sebesar $76 \pm 15,512 \mu\text{g/ml}$ (Lampiran 7, 8 dan 9).



Gambar 5.4. Pengaruh Pemberian Ekstrak *Curcuma domestica* terhadap Viabilitas Sel MCF-7. Pengaruh ekstrak *Curcuma domestica* terhadap viabilitas sel MCF-7 diteliti dengan memberikan berbagai konsentrasi dokсорubin dan penanaman sel MCF-7 sejumlah 8×10^3 , inkubasi 24 jam, pemberian dokсорubin inkubasi 24 jam serta pemberian MTT, didapatkan % viabilitas sel yang dihitung dari hasil MTT assay. Absorbansi diukur pada pembacaan *microplate reader* dengan panjang gelombang (λ) 570 nm. Hasil yang diperoleh yaitu sebagai % viabilitas sel berdasarkan seri konsentrasi dokсорubin yang digunakan. (a) Replikasi 1; (b) Replikasi 2; (c) Replikasi 3. ($P < 0,05$ dibandingkan dengan kontrol).

Pemberian ekstrak CD pada gambar 5.4 terlihat pada grafik bahwa, peningkatan konsentrasi dokсорubin yang diberikan sebanding dengan penurunan persentase viabilitas sel, yang menunjukkan pemberian ekstrak CD juga menunjukkan adanya *dose dependent manner*. Pengamatan sel MCF-7 setelah pemaparan ekstrak selama 24 jam menggunakan mikroskop *inverted*

menunjukkan adanya perbedaan morfologi dari sel MCF-7 dan sel MCF-7 yang telah terpapar ekstrak pada berbagai rentang konsentrasi (konsentrasi 50-200 nM). Terlihat bahwa sel terlepas dari dinding 96 *wellplate* dengan bentuk bulat dan membentuk gerombol pada konsentrasi tertinggi (**Gambar 5.5**).

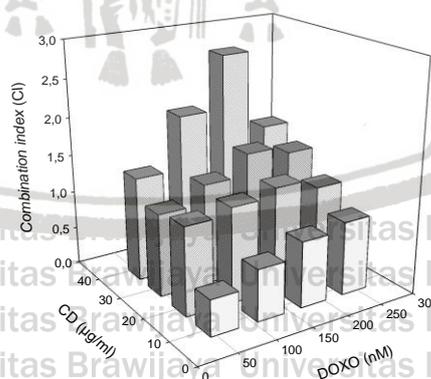


Gambar 5.5. Morfologi Kultur Sel MCF-7 dan Setelah Terpapar Ekstrak *Curcuma domestica*. Pengaruh pemberian ekstrak *Curcuma domestica* terhadap morfologi sel MCF-7 diteliti dengan memberikan berbagai konsentrasi ekstrak *Curcuma domestica* yang terlihat dari pengamatan menggunakan mikroskop *inverted* skala garis 10 μm . Panah merah: sel lisis; panah kuning: sel yang masih menempel.

Berdasarkan data yang diperoleh dari uji sitotoksik tunggal doksorubisin dan ekstrak CD, nilai IC_{50} akan digunakan pada uji sitotoksik kombinasi untuk menentukan konsentrasi yang digunakan. Konsentrasi pada uji sitotoksik kombinasi yang digunakan adalah $1/8 \text{IC}_{50}$, $1/4 \text{IC}_{50}$, $3/8 \text{IC}_{50}$, dan $1/2 \text{IC}_{50}$, sehingga akan diperoleh 16 kelompok perlakuan yang berbeda dari ke empat jenis kombinasi konsentrasi yang digunakan.

5.3 Hasil Uji Sitotoksik Kombinasi

Uji sitotoksik Kombinasi merupakan uji lanjutan dari uji sitotoksik tunggal dimana bertujuan untuk mengetahui konsentrasi dari kombinasi doksorubisin dan ekstrak *Curcuma domestica* yang memiliki efek sinergisme berdasarkan nilai *Combination Index* (CI). Dosis yang diperoleh pada doksorubisin (DOXO) adalah 61; 123; 184; dan 245 nM, sedangkan dosis yang diperoleh untuk ekstrak *Curcuma domestica* (CD) yaitu 10; 19; 29; dan 38 µg/ml. Perhitungan CI didapatkan dari nilai absorbansi dari pembacaan *microplate reader*, yang kemudian akan dilakukan perhitungan untuk memperoleh persen viabilitas sel MCF-7 dari pemberian kombinasi ekstrak CD-DOXO. Hasil dari persen viabilitas sel MCF-7 selanjutnya digunakan untuk mencari konsentrasi terapi tunggal doksorubisin maupun ekstrak CD yang dibutuhkan untuk memberikan efek sebesar efek kombinasi CD-DOXO, selanjutnya melalui perhitungan akan diperoleh nilai CI (**Lampiran 13, 14 dan 15**). Hasil perhitungan CI menunjukkan bahwa dari 16 kelompok perlakuan kombinasi CD-DOXO memiliki efek sinergis hingga efek antagonis kuat (**Gambar 5.6**).



Gambar 5.6 Nilai combination index (CI) kombinasi ekstrak *Curcuma domestica* dan doksorubisin pada sel MCF-7. efek sinergis <0.8; efek adiktif 0.8-1.2; efek antagonis >1.2 (Bijnsdorp et al., 2011). CD, *Curcuma domestica*; DOXO, Doksorubisin.

Kombinasi DOXO 61 nM dengan CD 10 µg/ml dan 19 µg/ml dari semua replikasi memiliki efek sinergis (CI<0.9) sedangkan pada kombinasi DOXO 123 nM, 184 nM, dan 245 nM dengan CD 29 µg/ml, dan 38 µg/ml memiliki efek antagonis sampai antagonis kuat (CI 1.45-3,3) (**Tabel 5.1**). Perubahan morfologi setelah pemberian kombinasi DOXO-CD dari pengamatan menggunakan mikroskop *inverted* terlihat perbedaan sel MCF-7 normal dengan sel MCF-7 yang telah terpapar kombinasi DOXO-CD. Sel MCF-7 yang telah terpapar kombinasi DOXO-CD terlihat mengkerut dan terlepas dari dinding *wellplate* 96 yang digunakan (**Lampiran 16**).

Tabel 5.1 Hasil CI Kombinasi CD-DOXO

CI		DOXO (nM)			
		61	123	184	245
10	R1	0.396	0.903	0.626	0.985
	R2	0.404	1.065	1.365	1.769
	R3	0.626	1.519	1.280	1.358
	Rata-rata	0.475	1.162	1.090	1.371
19	R1	0.495	1.006	0.808	1.349
	R2	0.635	1.094	1.655	2.370
	R3	0.908	1.669	1.546	2.474
	Rata-rata	0.679	1.256	1.336	2.064
29	R1	0.612	0.866	1.024	1.478
	R2	0.795	1.398	1.554	2.431
	R3	1.203	1.836	2.278	4.364
	Rata-rata	0.870	1.367	1.619	2.758
38	R1	0.873	0.846	1.149	1.068
	R2	0.815	1.492	1.400	1.773
	R3	1.218	1.374	2.009	2.320
	Rata-rata	0.969	1.237	1.519	1.720

Keterangan: Interpretasi nilai CI pada tabel adalah efek sinergis kuat (0,1- 0,3); efek sinergis (0,3-0,7); efek sinergis sedang (0,7-0,85); efek sinergis ringan (0,85-0,9); mendekati adiktif (0,9-1,1); efek antagonis ringan (1,1-1,2); efek antagonis sedang (1,2-1,45); efek antagonis (1,45-3,3); efek antagonis (3,3-10), dan efek antagonis sangat kuat (>10) (Bijnsdorp *et al.*, 2011).

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

6.1.1 Ekstraksi *Curcuma domestica*

Rimpang *Curcuma domestica* diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 80%. Pelarut etanol 80% digunakan karena etanol memiliki dua gugus yang berbeda, yaitu hidroksil yang bersifat polar dan gugus alkil yang bersifat nonpolar, sehingga dapat mengekstraksi senyawa dengan kepolaran berbeda. Selain itu dilakukan remaserasi sebanyak dua kali untuk memaksimalkan senyawa yang dapat terekstraksi. Hasil ekstraksi berupa ekstrak pekat dengan warna kuning kecoklatan. *Curcuma domestica* memiliki kandungan minyak atsiri sekitar 6% berwarna kuning pucat hingga kuning orange yang terdiri dari sejumlah seskuiterpen dan monoterpen, termasuk kurkumin, zingiberena, α dan β turmerone. Warna kuning berasal dari senyawa kurkuminoid (Cepae, 1999).

6.1.2 Uji Sitotoksik Tunggal

Uji sitotoksik tunggal pada penelitian ini dilakukan untuk memperoleh nilai IC_{50} ekstrak *Curcuma domestica* dan doksrubisin terhadap sel MCF-7. Metode yang digunakan yaitu MTT assay. Prinsip dari MTT assay adalah reduksi dari garam tetrazolium melalui respirasi mitokondria sel sehingga membentuk kristal formazan ungu yang tidak larut dalam air. Kristal formazan selanjutnya dilarutkan menggunakan suatu reagen *stopper* yaitu DMSO. DMSO dipilih karena dapat melarutkan kristal formazan secara cepat. Kemudian akan dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 570 nm. Semakin tinggi nilai

absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup. Namun, metode MTT assay tidak secara langsung dapat menggambarkan proliferasi sel tetapi melalui hasil metabolisme dari sel (Riss *et al.*, 2016).

6.1.2.1 Uji Sitotoksik Tunggal Doksorubisin

Uji sitotoksik tunggal doksorubisin terhadap sel MCF-7 dilakukan untuk memperoleh nilai IC_{50} . Hasil uji sitotoksik tunggal doksorubisin pada penelitian ini didapatkan nilai IC_{50} yaitu 486 nM. Nilai IC_{50} menggambarkan viabilitas sel menjadi 50% pada konsentrasi 486 nM setelah pemaparan doksorubisin selama 24 jam. Menurut Putri *et al.*, (2011) Terdapat perbedaan IC_{50} antara sel MCF-7 yang masih sensitif terhadap doksorubisin dan yang telah resisten. Nilai IC_{50} doxorubicin pada sel MCF-7 yang sensitif dan sel MCF-7 resisten doksorubisin masing-masing 400 nM dan 700 nM. Pemaparan doksorubisin dilakukan selama 7 hari. Sensitivitas sel MCF-7 yang resisten terhadap doksorubisin menurun hingga 1,5 kali lipat dibandingkan dengan sel MCF-7 yang masih sensitif doksorubisin (Putri *et al.*, 2011). Hasil penelitian lain diperoleh nilai IC_{50} pada sel MCF-7 yang sensitif yaitu 111 ± 16 nM sedangkan pada sel MCF-7 yang resisten yaitu 7.0 ± 0.8 μ M (Aheo *et al.*, 2005). Nilai IC_{50} hasil penelitian dan penelitian Putri *et al.*, (2011) tidak jauh berbeda pada sel MCF-7 yang masih sensitif doksorubisin. Perbedaan nilai IC_{50} dapat terjadi pada setiap penelitian karena adanya perbedaan dari perlakuan terutama pada variabel kontrol seperti misalnya jumlah penanaman sel/*well* atau sumber sel MCF-7 yang digunakan.

Doksorubisin mampu berinterkalasi dengan DNA sehingga mempengaruhi proses transkripsi dan replikasi, melalui penghambatan topoisomerase II. Topoisomerase II merupakan suatu enzim yang memiliki peranan penting dalam replikasi dan perbaikan DNA. Doksorubisin mampu

membentuk kompleks dengan topoisomerase II sehingga menyebabkan penghambatan pada penyambungan kembali rantai DNA. Selain itu doksorubisin dapat mengktivasi ikatan antara protein p53 dengan DNA. Protein p53 memiliki peran penting pada proses apoptosis (Gewirtz, 1999; Minotti, 2004). Peningkatan apoptosis merupakan salah satu penyebab mengapa terjadi penurunan persentase viabilitas dari hasil uji sitotoksik tunggal doksorubisin.

6.1.2.2 Uji Sitotoksik Tunggal Ekstrak *Curcumae Rhizoma*

Hasil yang diperoleh dari uji sitotoksik tunggal ekstrak *Curcuma domestica* yaitu, nilai IC_{50} sebesar 76 $\mu\text{g/ml}$ dengan waktu inkubasi 24 jam.

Menurut penelitian Kirana *et al.*, (2014) ekstrak *Curcuma longa* mempunyai nilai IC_{50} yaitu 31 $\mu\text{g/ml}$ terhadap sel MCF-7. Jumlah sel yang ditanam $2-4 \times 10^4$ sel/ml pada media pertumbuhan *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM) dengan waktu inkubasi ekstrak selama 72 jam (Kirana *et al.*, 2014). Penelitian lain menggunakan standar kurkumin dari uji sitotoksik tunggal terhadap sel MCF-7 diperoleh nilai IC_{50} yaitu pada 24 jam adalah sebesar 79,58 $\mu\text{g/ml}$, 48 jam sebesar 53,18 $\mu\text{g/ml}$ sedangkan untuk 72 jam sebesar 30,78 $\mu\text{g/ml}$. Waktu inkubasi 48 jam keatas menunjukkan penurunan persentase viabilitas sel MCF-7 menurun secara signifikan dengan peningkatan dosis yang lebih besar (Koochpar *et al.*, 2015). Kurkumin sebagai senyawa aktif dalam *Curcuma*

domestica diketahui mempunyai efek *dose dependent manner* terhadap persentase viabilitas sel MCF-7. Konsentrasi 100 μM setelah pemaparan 24 jam dapat menurunkan viabilitas sel hingga 40% (Zhi-dong *et al.*, 2014). Selain itu uji sitotoksik kurkumin dilakukan pada sel melanoma B16-R diketahui nilai IC_{50} kurkumin yaitu 27 μM . Waktu inkubasi yg digunakan adalah 36 jam dengan

jumlah penanaman sel 10^4 sel/well dan waktu inkubasi 12 jam. (Johann *et al.*, 2004).

Penurunan viabilitas sel diduga karena ekstrak *Curcuma domestica* memiliki efek sitotoksik terhadap sel MCF-7 berkaitan dengan kandungan kurkumin sebagai senyawa aktif dari *Curcuma domestica*. Kurkumin menginduksi hilangnya potensial membran mitokondria yang kemudian melepaskan sitokrom C, mengaktifkan caspase-9 dan caspase-3 kemudian mengarah pada fragmentasi DNA dan apoptosis. Mekanisme lain dari kurkumin yaitu menurunkan regulasi protein Bcl-2 dan Bcl-XL yang juga menyebabkan apoptosis (Cridge *et al.*, 2013). Kurkumin juga menginduksi proses DNA cek poin pada fase G2 dan fase M dalam siklus sel dengan menghambat proses pada mikrotubulus sehingga menghambat proliferasi sel (Liu and Chen, 2013). Kurkumin juga memiliki efek kardioprotektif. Sel endotel memiliki peran penting terhadap fungsi dinding pembuluh darah pada jantung. Saat terjadi iskemia dan keadaan stres lainnya, endotel menjadi tidak berfungsi yang memungkinkan terjadinya aktivasi dari faktor proinflamasi dan prokoagulan. Paparan doksorubisin secara akut menyebabkan pelepasan enzim jantung dan akumulasi lipid peroksida di jantung yang berpengaruh terhadap penurunan *glutathione myocardial* dan *glutathione* peroksida. kurkumin memiliki efek stabilisasi membran yang terlihat dari atenuasi dalam perubahan ST pada elektrokardiogram setelah pemberian doksorubisin. stabilisasi membran oleh kurkumin kemungkinan menyebabkan penurunan mobilitas lipid peroksida. Selain itu kurkumin melindungi sel-sel jantung melalui peningkatan dari *heme-oxygenase-1* (HO-1) (Srivastava and Mehta, 2009).

6.1.3 Uji Sitotoksik Kombinasi

Uji sitotoksik kombinasi ekstrak *Curcuma domestica* (CD) dan doksorubisin (DOXO) diperoleh nilai *combination index* (CI) terhadap persentase viabilitas sel MCF-7. Hasil penelitian untuk kombinasi CD dan DOXO menggunakan kombinasi konsentrasi yaitu CD sebesar 10 µg/ml; 19 µg/ml; 29 µg/ml; dan 38 µg/ml dengan DOXO sebesar 61 nM; 123 nM; 184 nM; dan 245 nM. Efek sinergis diperoleh pada konsentrasi DOXO 61 nM dengan CD 10 µg/ml dan 19 µg/ml. Nilai CI DOXO 61 nM dengan CD 10 µg/ml yaitu 0.475 sedangkan nilai CI DOXO 61 nM dengan CD 19 µg/ml yaitu 0.679. Konsentrasi lainnya menunjukkan efek sinergis lemah yaitu pada DOXO konsentrasi 61 nM dengan CD 29 µg/ml sedangkan konsentrasi lainnya memiliki efek adiktif sampai efek antagonis. Nilai CI sinergis (0,3-0,7) menunjukkan bahwa kombinasi tersebut dapat saling mendukung terapi satu sama lain untuk meningkatkan efek terapi. Sebaliknya efek antagonis justru memberikan efek yang bertolak belakang antar kedua terapi sehingga tidak dianjurkan untuk dikombinasikan pada konsentrasi tersebut. Berdasarkan hasil tersebut konsentrasi atau dosis DOXO 61 nM dan CD 10 µg/ml merupakan kombinasi yang dipilih karena memiliki efek sinergis paling kuat dari kombinasi dosis lain yang digunakan.

6.2 Implikasi di Bidang Farmasi

Terapi konvensional terhadap kanker payudara terutama penggunaan doksorubisin sebagai terapi tunggal saat ini telah banyak menunjukkan respon penurunan sensitifitas, selain itu efek samping yang ditimbulkan juga cukup besar seperti kardiotoksik yang bersifat *irreversibel* pada penggunaan doksorubisin dengan akumulasi dosis tertentu. Kombinasi doksorubisin dengan

ekstrak *Curcuma domestica* diharapkan mampu meningkatkan efektifitas terapi dan menurunkan risiko efek samping yang ditimbulkan. Terapi dengan bahan alam juga diharapkan mampu menjadi terapi *adjuvant* untuk terapi konvensional.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Tidak terdapat kontrol sel normal untuk melihat efek sitotoksik ekstrak *Curcuma domestica* terhadap sel normal.
2. Tidak meneliti mekanisme ekstrak *Curcuma domestica* terhadap proliferasi dan apoptosis sel MCF-7.
3. Tidak dilakukan standarisasi terhadap ekstrak *Curcuma domestica* dan pengukuran kadar residu etanol yang digunakan dalam penelitian.
4. Penelitian ini merupakan penelitian *in vitro* yang mana secara profil farmakokinetika belum dapat dijelaskan.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa, kombinasi ekstrak kunyit (*Curcuma domestica* Val.) dan doksorubisin dapat memberikan efek sitotoksik yang sinergis terhadap sel MCF-7 pada dosis kombinasi ekstrak kunyit (*Curcuma domestica* Val.) sebesar 10 µg/ml dan 19 µg/ml dengan doksorubisin sebesar 61 nM berdasarkan *combination index* (CI).

7.2 Saran

Berdasarkan keterbatasan dalam penelitian, saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya:

1. Menambahkan kontrol sel normal untuk melihat efek sitotoksik ekstrak *Curcuma domestica* terhadap sel normal seperti sel *fibroblast* kulit pada uji sitotoksik tunggal maupun kombinasi.
2. Melanjutkan penelitian untuk mengetahui mekanisme ekstrak *Curcuma domestica* terhadap proliferasi dan apoptosis sel MCF-7, misalnya dengan menggunakan Imunohistokimia untuk ekspresi protein p53.
3. Melakukan standarisasi terhadap ekstrak *Curcuma domestica* yang digunakan dalam penelitian, misalnya dengan uji menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) serta pengukuran persentase kadar residu etanol dalam ekstrak.
4. Melanjutkan penelitian setelah menggunakan metode *in vitro* misalnya dengan metode *in vivo* menggunakan hewan coba sehingga dapat dilihat dari segi profil farmakokinetika.

DAFTAR PUSTAKA

Abdali, D., Arora, N., Aslam, D., Panchbhaya, S., Saddik, M. and Saha, T. 2015.

Curcumin as an Adjuvant Therapy to Regular Cancer Therapy. 50–53.

Aheo, K.M., Ibet, S. V, Teghens, J.P.S., Artigeas, C.D., Ehman, L., Ougnoux,

P.B., Ore, J.G. and Herriot, H.E. 2005. Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA : a role for lipoperoxidation. 1–26.

Bijnsdorp, I. V, Giovannetti, E. and Peters, G.J. 2011. Chapter 35 Analysis of Drug Interactions. .

Boyd, N.F., Stone, J., Vogt, K.N., Connelly, B.S., Martin, L.J. and Minkin, S.

2003. Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature. *British Journal of Cancer* 89: 1672–85.

Cepae, B.A. 1999. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants Volume 1*.

WHO Library Cataloguing, Geneva, .

Childs, A.C., Phaneuf, S.L., Dirks, A.J., Phillips, T. and Leeuwenburgh, C. 2002.

Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome c release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Research* 62: 4592–4598.

Cooper, J. 2012. Cell line profile A549. *European Collection of Authenticated Cell*

Cultures 7: 1–2.

Cridge, B.J., Larsen, L. and Rosengren, R.J. 2013. Curcumin and its derivatives

in breast cancer : Current developments and potential for the treatment of drug-resistant cancers. 1–9.

Easton, D.F. 2002. Familial risks of breast cancer. *Breast Cancer Research* 4: 179.

FDA, 2003 (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2003/050467s068lbl.pdf) diakses tanggal 20 juni 2017 (online)

Fouquier, J. and Guedj, M. 2015. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology Research & Perspectives* 3: e00149.

Gewirtz, D.A. 1999. COMMENTARY A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. 57: 727–741.

Hamajima, N., Hirose, K., Tajima, K., *et al.* 2012. Menarche, menopause, and breast cancer risk: Individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet Oncology* 13: 1141–1151.

Han, X., Pan, J., Ren, D., Cheng, Y., Fan, P. and Lou, H. 2008. Naringenin-7-O-glucoside protects against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by induction of endogenous antioxidant enzymes. *Food and Chemical Toxicology* 46: 3140–3146.

IARC,2012 (<http://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases/Globocan-2012-Estimated-Cancer-Incidence-Mortality-And-Prevalence-Worldwide-In-2012-V1-0-2012>) diakses tanggal 20 juni 2017 (online);

Johann, O., Philippe, A., Carlier, A., Tarpin, M., Devy, J. and Madoulet, C. 2004. *In Vitro And In Vivo Anti-Tumoral Effect Of Curcumin Against Melanoma Cells.* 387: 381–387.

Kang, H.J., Hong, Y. Bin, Yi, Y.W., Cho, C.-H., Wang, A. and Bae, I. 2013. Correlations between BRCA1 defect and environmental factors in the risk of breast cancer. *The Journal of Toxicological Sciences* 38: 355–61.

Kirana, C., Kirana, C., Record, I.R., Mcintosh, G.H. and Jones, G.P. 2014.

Screening for antitumor activity of 11 species of Indonesian Zingiberaceae using MCF-7 and HT-29 cancer cells Screening for Antitumor Activity of 11 Species of Indonesian Zingiberaceae Using Human MCF-7 and HT-29 Cancer Cells.

Koohpar, Z.K., Entezari, M., Movafagh, A. and Hashemi, M. 2015. Anticancer

Activity of Curcumin on Human Breast Adenocarcinoma: Role of Mcl-1 Gene. 8.

Li, S. and Wang, P. 2011. Chemical composition and product quality control of turmeric (*Curcuma longa* L.). .

Liu, D. and Chen, Z. 2013. Breast Cancer The Effect of Curcumin on Breast Cancer Cells. 16: 133–137.

Minotti, G. 2004. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews* 56: 185–229.

Nasional Cancer Institute, 2017. (<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=444971>) diakses tanggal 20 juni 2017 (online)

Putri, D.D.P., Febriansah, R., Sarmoko, Endah Puspitasari, N.I. and Fitriyani, A. 2011. MCF-7 Resistant Doxorubicin are Characterized by Lamellapodia , Strong Adhesion on Substrate and P-gp Overexpression. 2: 304–309.

Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Benink, H.A. and Worzella, T.J. 2016. Cell Viability Assays. 1–31.

Soediono, B. 2015. *Riskedas 'Situasi Penyakit Kanker'*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Pusat Data dan Informasi: Jakarta, .

Srivastava, G. and Mehta, J.L. 2009. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics.

Syamsuhidayat dan Hutapea, J.R., 1991, Inventaris Tanaman Obat Indonesia, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta.

Vp, S. and Kumar, M.R. 2017. Breast Cancer Detection : Current Methods and Roadmap to Personalized Medicine. 5: 1–4.

Xing, M., Yan, F., Yu, S. and Shen, P. 2015. Efficacy and Cardiotoxicity of Liposomal Doxorubicin-Based Chemotherapy in Advanced Breast Cancer : A Meta-Analysis of Ten Randomized Controlled Trials. 1–9.

Zhi-dong, Liu, Lv, X., Zhao, W., Dong, Q., Li, F., Wang, H. and Kong, B. 2014. Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. 7: 2818–2824.

Zhu, H., Lei, X., Feng, J. and Wang, Y. 2012. Oral contraceptive use and risk of breast cancer: A meta-analysis of prospective cohort studies. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care* 17: 402–414.