

repository.ub.ac.id

**POTENSI MENIRAN HIJAU (*Phyllanthus niruri* L.) SEBAGAI  
TERAPI ANTI-ANGIOGENESIS KANKER PAYUDARA PADA  
MENCIT (*Mus musculus*) TERINDUKSI DMBA**

**SKRIPSI**

oleh  
**ABU HANIFAH RAMADHANI**  
**155090107111023**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

UNIVERSITAS  
BRAWIJAYA

**POTENSI MENIRAN HIJAU (*Phyllanthus niruri* L.) SEBAGAI  
TERAPI ANTI-ANGIOGENESIS KANKER PAYUDARA PADA  
MENCIT (*Mus musculus*) TERINDUKSI DMBA**

**SKRIPSI**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar  
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi**

**oleh**

**ABU HANIFAH RAMADHANI**

**155090107111023**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

**HALAMAN PENGUSAHAN SKRIPSI**

**POTENSI MENIRAN HIJAU (*Phyllanthus niruri* L.) SEBAGAI  
TERAPI ANTI-ANGIOGENESIS KANKER PAYUDARA PADA  
MENCIT (*Mus musculus*) TERINDUKSI DMBA**

**ABU HANIFAH RAMADHANI**  
**155090107111023**

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 4 Juli 2019  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui,  
Pembimbing

Prof. Muhaimin Rifa'i, Ph.D.Med.Sc  
NIP. 196806261997021001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi S1 Biologi

Rodiyati Azrianingsih, S.Si, M.Sc., Ph.D  
NIP. 197001281994122001

## HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Abu Hanifah Ramadhani

NIM : 155090107111023

Jurusan : Biologi

Penulis Skripsi berjudul : Potensi Meniran Hijau (*Phyllanthus niruri* L.)  
sebagai Terapi Anti-Angiogenesis Kanker  
Payudara pada Mencit (*Mus Musculus*)  
Terinduksi DMBA

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam daftar pustaka skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan atau referensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung segala resiko.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 18 Juli 2019

Yang menyatakan,

Abu Hanifah Ramadhani

155090107111023

## PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



repository.ub.ac.id

# Potensi Meniran Hijau (*Phyllanthus niruri* L.) sebagai Terapi Anti-Angiogenesis Kanker Payudara pada Mencit (*Mus Musculus*) Terinduksi DMBA

Abu H. Ramadhani dan Muhaimin Rifa'i

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Brawijaya  
2019

## ABSTRAK

Angiogenesis dipengaruhi oleh ekspresi protein VEGF-A dan HIF-1 $\alpha$  di sekitar lingkungan tumor. Peristiwa tersebut didukung oleh sitokin terkait inflamasi seperti *interleukin-6* (IL-6), *interleukin-17* (IL-17), dan *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak meniran terhadap ekspresi sitokin IL-6, IL-17, TGF- $\beta$  pada limpa, serta ekspresi protein HIF-1 $\alpha$  dan VEGF-A pada jaringan payudara mencit model kanker payudara. Mencit *strain* BALB/c diinjeksi senyawa DMBA pada daerah subkutan kelenjar payudara dengan dosis 0,015 mg/gram berat badan (BB). Induksi kanker dilakukan selama enam minggu. Desain penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) meliputi kelompok normal, kanker (*untreated*), dan perlakuan ekstrak meniran dengan tiga dosis berbeda (*treated groups*). Analisis *flow-cytometry* digunakan untuk mengukur kadar sitokin IL-6, IL-17, dan TGF- $\beta$  pada limpa. Uji immunohistokimia dilakukan untuk melihat ekspresi HIF-1 $\alpha$  dan VEGF-A pada jaringan payudara. Uji statistik dilakukan dengan menggunakan *one-way* ANOVA dengan nilai signifikansi sebesar 5%. Uji beda nyata dilakukan dengan uji Tukey HSD menggunakan software SPSS 16. Hasil induksi DMBA menunjukkan beberapa karakter yang mengarah pada kanker payudara, yaitu adanya hiperplasia epitelium, infiltrasi sel imun, dan akumulasi jaringan ikat serabut di sekitar jaringan payudara. Induksi tersebut juga menyebabkan kenaikan signifikan pada ekspresi HIF-1 $\alpha$  & VEGF-A, dan sitokin IL-6, TGF- $\beta$ , & IL-17. Ekstrak *Phyllanthus niruri* (EPN) dosis sedang (C-D2) dan tinggi (C-D3) menyebabkan penurunan sitokin inflamasi serta ekspresi protein HIF-1 $\alpha$ . Penelitian ini belum mampu membuktikan pengaruh EPN terhadap VEGF-A.

Kata kunci: Angiogenesis, inflamasi, kanker, *Phyllanthus niruri*

# The Potential of *Phyllanthus niruri* as Anti-Breast Cancer Angiogenesis on DMBA-induced Mice (*Mus musculus*)

Abu H. Ramadhani and Muhaimin Rifa'i

Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Science,  
Brawijaya University  
2019

## ABSTRACT

Angiogenesis are affected by the expression of VEGF-A and HIF- $\alpha$  protein in tumor microenvironment. This process was promoted by inflammatory-related cytokines such as interleukin-6 (IL-6), interleukin-17 (IL-17), and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). This research aims to understand the effect of *P.niruri* extract against inflammatory cytokines in spleen and the expression of VEGF-A and HIF- $\alpha$  in breast tissue. The BALB/c strain mice were injected with DMBA subcutaneously around mammary glands with the dose of 0,015 mg/gr mice weight for 6 weeks. Completely randomized design was used in this research, consisting of normal, untreated, and 3 treated groups with different doses. The *P.niruri* extract were administered orally every day for 14 days. Flow-cytometry analysis were used to measure IL-6, IL-17, and TGF- $\beta$  levels in spleen. Immunohistochemistry were also utilized to observe the expression of HIF- $\alpha$  and VEGF in breast cancer histology. Statistical analysis were done using one-way ANOVA with a significant value of 5%. Tukey honest significant difference were also done using SPSS 16. The induction of DMBA showed several characteristics similar to that of breast cancer, which are hyperplasia epithelium, infiltration of immune cells, and accumulation of fibrous connective tissue. The induction also significantly increase HIF-1 $\alpha$  & VEGF-A protein, and IL-6, TGF- $\beta$ , IL-17 cytokines. The extract of *phyllanthus niruri* in moderate and high dose were shown to decrease several inflammatory-related cytokines, and also the expression of HIF-1 $\alpha$ . The extract did not cause any significant difference of VEGF-A expression.

Keywords: Angiogenesis, cancer, inflammation, *Phyllanthus niruri*

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah Subhanahu Wa Ta'ala, yang telah memberikan Rahmat dan Karunianya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian skripsi, sebagai salah satu syarat kelulusan dari Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

Penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Bapak Prof. Muhaimin Rifa'i, Ph.D.Med.Sc selaku Dosen Pembimbing, yang telah mendampingi dan memberikan pengarahan, serta ilmu yang dan masukan yang berguna bagi penulis.
2. Ibu Dr. Sri Widyarti, M.Si dan Bapak Drs. Aris Soewondo, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak kritik dan saran yang berguna untuk perbaikan penyusunan skripsi.
3. Orang tua penulis yang telah memberikan dukungan moral dan materiil yang tidak terhingga.
4. Widiana, Ghinva, Azula, rekan-rekan Angkatan 2015, teman-teman Himabio UB 2018, serta seluruh civitas akademik Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

Penulisan skripsi ini merupakan upaya terbaik penulis, dalam membantu dan mengembangkan ilmu pengetahuan. Kritik dan saran sangat diperlukan untuk meningkatkan karya tulis ini semakin baik.

Malang, 18 Juli 2019

Penulis



## DAFTAR ISI

|                                                             | Halaman       |
|-------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>ABSTRAK .....</b>                                        | <b>v</b>      |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                       | <b>vi</b>     |
| <b>KATA PENGANTAR .....</b>                                 | <b>vii</b>    |
| <b>DAFTAR ISI .....</b>                                     | <b>ix</b>     |
| <b>DAFTAR TABEL .....</b>                                   | <b>x</b>      |
| <b>DAFTAR GAMBAR .....</b>                                  | <b>xi</b>     |
| <b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>                                | <b>xii</b>    |
| <b>DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN .....</b>                   | <b>xiii</b>   |
| <br><b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>                          | <br><b>1</b>  |
| 1.1. Latar Belakang .....                                   | 1             |
| 1.2. Rumusan Masalah .....                                  | 3             |
| 1.3. Tujuan Penelitian .....                                | 3             |
| 1.4. Manfaat Penelitian .....                               | 3             |
| <br><b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>                    | <br><b>4</b>  |
| 1.1. Histopatologi Kanker Payudara .....                    | 4             |
| 1.2. Hipoksia Kanker Payudara .....                         | 6             |
| 1.3. Peran Inflamasi pada Kanker Payudara .....             | 8             |
| 1.4. Peran IL-6, TGF- $\beta$ , dan IL-17 pada Kanker ..... | 10            |
| 1.5. Meniran Hijau ( <i>Phyllanthus niruri</i> L.) .....    | 14            |
| 1.6. Permodelan Induksi Kanker pada Hewan Coba .....        | 16            |
| <br><b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>                  | <br><b>18</b> |
| 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian .....                      | 18            |
| 3.2. Deskripsi Hewan Coba .....                             | 18            |
| 3.3. Desain Penelitian .....                                | 18            |
| 3.4. Induksi Kanker Payudara.....                           | 19            |
| 3.5. Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Meniran.....           | 19            |
| 3.6. <i>Flow-cytometry</i> .....                            | 19            |
| 3.7. Immunohistokimia.....                                  | 20            |
| 3.8. Analisis Data.....                                     | 21            |
| <br><b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>                | <br><b>22</b> |
| 4.1. Pengaruh DMBA terhadap Jaringan Payudara .....         | 22            |

|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2. Hasil Uji Kuantitatif Immunohistokimia HIF-1 $\alpha$ ..... | 24 |
| 4.3. Hasil Uji Kuantitatif Immunohistokimia VEGF-A .....         | 26 |
| 4.4. Analisis sitokin terkait Inflamasi .....                    | 27 |
| <b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....                          | 31 |
| 5.1. Kesimpulan .....                                            | 31 |
| 5.2. Saran .....                                                 | 31 |
| <b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....                                      | 32 |
| <b>LAMPIRAN</b> .....                                            | 40 |



## DAFTAR TABEL

Nomor

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Kelompok perlakuan penelitian .....                               | 18 |
| 2. Klasifikasi Allred score HIF-1 $\alpha$ .....                     | 25 |
| 3. Klasifikasi Allred score VEGF-A .....                             | 26 |
| 4. Hasil <i>flow-cytometry</i> sitokin beberapa jenis sel imun ..... | 28 |



## DAFTAR GAMBAR

### Nomor

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. LCIS dan DCIS dapat terjadi bersamaan pada TDLU .....                                                                                    | 5  |
| 2. Pewarnaan immunohistokimia HIF-1 $\alpha$ pada preparat <i>ductal carcinoma in situ</i> (DCIS) dan kanker payudara <i>invasive</i> ..... | 7  |
| 3. <i>Ductal carcinoma in situ</i> (DCIS) pada kanker payudara .....                                                                        | 8  |
| 4. Aktivasi IL-6 dapat terjadi dengan <i>classic signaling</i> atau <i>trans-signaling</i> .....                                            | 11 |
| 5. Differensiasi sel Th17 dari sel CD4 <sup>+</sup> <i>naive</i> bergantung pada sitokin IL-6 dan TGF- $\beta$ .....                        | 13 |
| 6. Morfologi seluruh bagian tumbuhan dan struktur daun <i>Phyllanthus niruri</i> L.....                                                     | 14 |
| 7. Skema protokol induksi DMBA pada hewan coba .....                                                                                        | 17 |
| 8. Pewarnaan Hematoxylin & Eosin (HE) menunjukkan dugaan infiltrasi kanker payudara <i>invasive</i> di area <i>lymph node</i> .....         | 22 |
| 9. Hasil pewarnaan immunohistokimia dengan antibodi HIF-1 $\alpha$ dan VEGF-A .....                                                         | 23 |
| 10. Sitokin IL-17 menginduksi fibroblast menghasilkan VEGF dalam <i>inflammatory loop</i> .....                                             | 29 |

## DAFTAR LAMPIRAN

### Nomor

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Surat laik etik penelitian.....                                     | 40 |
| 2. Surat determinasi keaslian spesies meniran hijau.....               | 41 |
| 3. Kontrol immunohistokimia .....                                      | 42 |
| 4. Kalibrasi <i>software</i> ImageJ .....                              | 43 |
| 5. Pengujian <i>proportion score software</i> Immunoratio .....        | 44 |
| 6. <i>Worksheet</i> penghitungan area, OD, dan <i>cell count</i> ..... | 45 |
| 7. <i>Worksheet</i> Allred score .....                                 | 46 |
| 8. Penghitungan kuantitatif immunohistokimia .....                     | 47 |
| 9. Hasil uji ANOVA untuk VEGF-A .....                                  | 48 |
| 10. Hasil uji Tukey HSD untuk VEGF-A .....                             | 49 |
| 11. Hasil Uji ANOVA untuk HIF-1 $\alpha$ .....                         | 51 |
| 12. Hasil uji Tukey HSD untuk HIF-1 $\alpha$ .....                     | 52 |
| 13. Hasil uji ANOVA untuk sitokin inflamasi .....                      | 54 |
| 14. Hasil uji Tukey HSD untuk sitokin inflamasi .....                  | 55 |

## DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

### Simbol/ Singkatan

### Keterangan

|          |                                                           |
|----------|-----------------------------------------------------------|
| ADH      | <i>Atypia Ductal Hyperplasia</i>                          |
| ALH      | <i>Atypia Lobular Hyperplasia</i>                         |
| ANOVA    | <i>Analysis of Variance</i>                               |
| CD       | <i>Cluster of Differentiation</i>                         |
| COX-2    | <i>Cyclooxygenase</i>                                     |
| CXCL     | <i>C-X-C motif ligand</i>                                 |
| DAB      | <i>Diaminobenzidine</i>                                   |
| DAMPs    | <i>Damage Associated Molecular Patterns</i>               |
| DCIS     | <i>Ductal Carcinoma In Situ</i>                           |
| EMT      | <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>                  |
| ER       | <i>Esterogen Receptor</i>                                 |
| ERK1/2   | <i>Extracellular Signal-related Kinase 1/2</i>            |
| GLOBOCAN | <i>Global cancer Incidence, Mortality, and Prevalence</i> |
| GLUT     | <i>Glucose Transporter Type</i>                           |
| gp130    | <i>Glycoprotein 130</i>                                   |
| HE       | <i>Hematoxylin &amp; Eosin</i>                            |
| HIF-1    | <i>Hypoxia-inducible Factor-1</i>                         |
| HRP      | <i>Horseradish Peroxidase</i>                             |
| IDC      | <i>Invasive Ductal Carcinoma</i>                          |
| ILC      | <i>Invasive Lobular Carcinoma</i>                         |
| JAK      | <i>Janus Kinase</i>                                       |
| JNK      | <i>c-Jun N-terminal kinase</i>                            |
| LCIS     | <i>Lobular Carcinoma In Situ</i>                          |
| MDSCs    | <i>Myeloid-derived Suppressor Cells</i>                   |
| MMPs     | <i>Metalloproteins</i>                                    |
| NK       | <i>Natural Killer</i>                                     |
| Nrf2     | <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor</i>          |
| PBS      | <i>Phosphate Buffer Saline</i>                            |
| PHD      | <i>Prolyl Hydroxylase</i>                                 |
| PI3K     | <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>                          |

PLCIS

*Pleomorphic Lobular Carcinoma  
In Situ*

PR

*Progesterone Receptor*

SPSS

*Statistical Package for the Social  
Sciences*

STATs

*Signal Transducer and Activator of  
Transcription*

TAMs

*Tumor-associated Macrophages*

TGF- $\beta$

*Transforming Growth Factor*

Th17

*T helper 17*

TNF- $\alpha$

*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*

VEGF

*Vascular Endothelial Growth  
Factor*

vHL

*Von Hippel-Lindau*



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Data GLOBOCAN menunjukkan sebanyak 18,1 juta penduduk dunia terdiagnosis kanker sepanjang tahun 2018. Jumlah tersebut diperkirakan akan terus meningkat. Prevalensi kanker payudara masih menjadi salah satu yang tertinggi, khususnya pada wanita (Bray dkk., 2018). Permodelan hewan coba model kanker payudara diinduksi menggunakan senyawa karsinogenik. Senyawa 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) merupakan salah satu senyawa karsinogen kuat untuk menginduksi kanker payudara yang diinjeksikan secara subkutan. *Tumorigenesis* merupakan proses terbentuk dan berkembangnya tumor dari sel normal yang terbagi atas 3 tahap; inisiasi, promosi, dan *progression* (Weinberg, 2014). Selama perkembangannya, hipoksia dan inflamasi bekerja sinergis dalam mempertahankan *tumorigenesis*. Hipoksia merupakan kondisi kekurangan oksigen dan menjadi ciri umum pada lingkungan tumor. Semakin jauh letak tumor terhadap pembuluh darah, maka kesempatan terkena hipoksia menjadi lebih tinggi (Chen dkk., 2009). Kondisi stress tersebut menyebabkan sel tumor mengaktifkan faktor transkripsi *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1) yang selanjutnya mengarah pada angiogenesis, yaitu pembentukan atau pemanjangan pembuluh darah yang diinduksi *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Masoud & Li, 2015). Pembuluh darah yang terbentuk tidak hanya memungkinkan sel-sel imun untuk menginfiltrasi lingkungan tumor, namun juga menyediakan oksigen dan nutrisi yang cukup bagi tumor untuk berkembang. Hipoksia pada tumor berkaitan dengan fenotip tumor yang lebih agresif, meningkatkan resiko metastasis, menyebabkan nekrosis sel, serta memicu respon inflamasi di sekitar tumor (D'Ignazio dkk., 2017).

Berdasarkan respon yang diberikan, sitokin dapat berfungsi sebagai pro-tumor dan anti-tumor, bergantung pada tahap mana kanker tersebut sedang berkembang. Beberapa sitokin diketahui memiliki peran anti-tumor pada awal tumbuhnya kanker, namun justru bersifat pro-tumor pada tahap akhir *tumorigenesis* (Ahmad dkk., 2018). Ketika sinyal inflamasi terinduksi, beberapa sel imun



dan sel endotel dapat menyekresikan IL-6 yang mengarah pada proliferasi sel tumor, mencegah apoptosis, serta menginduksi angiogenesis (Gyamfi dkk., 2018). Ekspresi sitokin TGF- $\beta$  juga berperan penting dalam meregulasi siklus sel, menginduksi *epithelial-mesenchymal transition* (EMT), serta membentuk lingkungan yang *immunotolerant* (Principe dkk., 2014). Selain itu, IL-17 juga dapat mengaktivasi *pathway* ERK1/2 untuk mendukung proliferasi sel tumor, angiogenesis, serta meningkatkan *chemoresistance* pada tumor. Sumber utama IL-17 dihasilkan oleh Th17 yang differensiasinya bergantung pada sitokin IL-6 dan TGF- $\beta$  (Murugaiyan & Saha, 2009).

Meniran hijau (*Phyllanthus niruri* L.), disebut juga dukung anak, merupakan tanaman herbal yang banyak dimanfaatkan negara-negara tropis dan subtropis, seperti India, Cina, Brazil, dan Indonesia. Tanaman ini digunakan oleh masyarakat untuk mengobati hepatitis B, hipertensi, hiperlipidemia, malaria, dan batu ginjal (Kaur dkk., 2017). Kini meniran hijau juga diketahui sebagai herbal anti-inflamasi (Eze dkk., 2014) dan menginduksi apoptosis pada sel kanker, sehingga berpotensi sebagai herbal anti-kanker. Pada tingkat *in vitro*, ekstrak *aqueous* meniran hijau menunjukkan efek anti-tumor pada beberapa *cell line*, seperti kanker prostat (PC-3), melanoma (MeWo), kanker paru-paru (A549), kanker kolorektal (HT29), kanker hati (HepG2), serta kanker payudara (MCF-7) (Lee dkk., 2011; Tang dkk., 2010; Júnior dkk., 2012). Tumbuhan ini secara konsisten dapat menurunkan ekspresi hipoksia HIF-1 $\alpha$  dan VEGF *in vitro*, sehingga berpotensi untuk menurunkan respon hipoksia, proliferasi tumor, dan angiogenesis dalam kondisi kanker (Tang dkk., 2013, Lee dkk., 2016). Meniran hijau menjadi pilihan pengobatan yang lebih aman dibandingkan beberapa kemoterapi, seperti *doxorubicin* dan *5-fluorouracil*, karena tidak bersifat toksik pada sel normal (Tang dkk., 2010). Pada tingkat *in vivo*, meniran hijau juga mampu secara signifikan menekan pertumbuhan tumor pada mencit terinduksi DMBA model kanker kulit (*skin carcinogenesis*) tanpa menyebabkan toksisitas pada mencit (Sharma dkk., 2009). Selain itu, senyawa dalam ekstrak meniran hijau mampu menurunkan kadar sitokin IL-6 (Zhao dkk, 2008) dan TGF- $\beta$  (Wang dkk., 2014).

Meskipun beberapa studi terkini menunjukkan efek anti-kanker yang cukup menjanjikan, namun kajian imunoterapi yang meninjau level sitokin inflamasi IL-6, TGF- $\beta$ , dan IL-17 nampaknya masih belum banyak dipublikasi. Selain itu, studi juga konsisten membuktikan meniran dapat menurunkan ekspresi HIF-1 $\alpha$  dan VEGF-A pada sel tumor, tetapi pembuktian secara *in vivo* masih sangat terbatas.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengaruh ekstrak meniran hijau terhadap ekspresi protein HIF-1 $\alpha$  dan VEGF-A pada jaringan payudara mencit terinduksi DMBA?
2. Bagaimana pengaruh ekstrak meniran hijau terhadap jumlah sel imun yang mengekspresikan ekspresi sitokin IL-6, TGF- $\beta$ , dan IL-17 pada limpa mencit terinduksi DMBA?

## 1.3 Tujuan

Tujuan yang ingin dicapai pada penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh ekstrak meniran hijau terhadap ekspresi protein HIF-1 $\alpha$  dan VEGF-A pada jaringan payudara mencit terinduksi DMBA.
2. Mengetahui pengaruh ekstrak meniran hijau terhadap jumlah sel imun yang mengekspresikan ekspresi sitokin IL-6, TGF- $\beta$ , dan IL-17 pada limpa mencit terinduksi DMBA.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Saat ini, meniran hijau tersedia melimpah di Indonesia dan telah banyak digunakan untuk mengatasi berbagai penyakit. Literatur menunjukkan potensi efikasi meniran hijau sebagai herbal anti-tumor. Sayangnya, kajian efek imunoterapi menggunakan model kanker *in vivo* masih sangat terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini diharapkan dapat memperkuat studi imunoterapi dari meniran hijau, dan memberikan manfaat yang lebih luas bagi masyarakat.

## BAB II

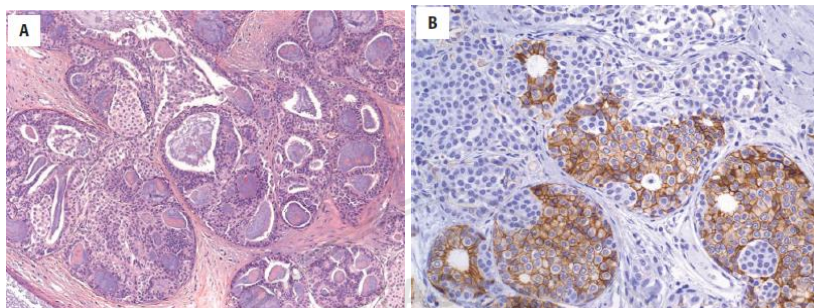
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Histopatologi Kanker Payudara

Sel kanker dideskripsikan sebagai sel yang berproliferasi cepat dan tidak terkontrol akibat mutasi genetik. Pembelahan sel yang cepat sebenarnya bisa terjadi secara fisiologis, seperti pembesaran payudara ketika memasuki pubertas ataupun respon *wound healing* ketika terkena luka. Akan tetapi, sel kanker berproliferasi cepat bukan karena respon fisiologis, melainkan akibat mutasi genetik yang terjadi pada bagian gen yang disebut *oncogene* (Makki, 2015). Sel yang berproliferasi cepat disebut hiperplasia, dan karakteristik ini diwaspadai dapat merubah sel menjadi sel kanker (neoplasia). Sel kanker ditandai oleh ukuran nukleus yang umumnya lebih besar dibandingkan sel normal, sehingga rasio ukuran antara nukleus terhadap sitoplasma menjadi lebih tinggi (Han dkk., 2017). Kromatin dapat beragregat dan *irregular*, serta nukleolus umumnya membesar. Sel normal biasanya memiliki bentuk yang bulat atau oval, namun sel kanker memiliki ukuran dan bentuk yang bervariasi (pleomorfik) (DeVita dkk, 2015). Selanjutnya, suatu populasi kanker dapat dikategorikan menjadi beberapa pola berdasarkan histologinya. Pola tersebut dapat menilai tingkat keparahan kanker menggunakan beberapa metode yang disebut *staging* dan *grading* (O'Malley dkk., 2011).

Berdasarkan asalnya, karsinoma *non-invasive* dapat dibagi menjadi 2 jenis yaitu *ductal carcinoma in situ* (DCIS) dan *lobular carcinoma in situ* (LCIS). DCIS merupakan karsinoma yang berasal dari sistem *duct* payudara, sedangkan LCIS berasal dari sel-sel *lobule*. Keduanya mengalami kelainan genetik dan sel-selnya dikelilingi oleh lapisan *myoepitel* (Kerr dkk., 2016). Prekursor DCIS diperkirakan berasal dari *atypia ductal hyperplasia* (ADH), sedangkan LCIS merupakan jenis *lobular neoplasia* yang secara histologi identik dengan *atypia lobular hyperplasia* (ALH) (Malhotra dkk., 2010). Pola histopatologi DCIS biasanya memengaruhi tahapan *invasive*. *Papillary* DCIS cenderung menjadi *papillary adenocarcinoma*. DCIS *cribriform* dan *solid* dengan *nuclear grade* sedang berubah menjadi *moderately differentiated adenocarcinoma*. DCIS *comedo* dengan

*nuclear grade* tinggi berubah menjadi *poorly differentiated adenocarcinoma* dan umumnya diikuti dengan nekrosis (O'Malley dkk., 2011). Nilai *grading* yang tinggi umumnya berkaitan dengan *estrogen receptor* (ER) negatif, peningkatan ekspresi *human epidermal growth factor receptor-2* (HER2), mutasi p53, dan angiogenesis (Barsky dkk., 2009).



(O'Malley, 2011)

Gambar 1. LCIS dan DCIS dapat terjadi bersamaan pada TDLU: a) Sel LCIS bersifat *non-cohesive*, sedangkan DCIS bersifat *cohesive* dan berpola *cribriform*; b) Sel LCIS memiliki *E-cadherin* negatif (biru) dan DCIS memiliki *E-cadherin* positif (coklat) menggunakan immunohistokimia.

Berbeda dengan tumor jinak (*benign tumor*), tumor *invasive* tidak dilapisi oleh sel myoepitel, sehingga memungkinkan tumor menyebar menuju jaringan lainnya dan menjadi ganas (*malign tumor*). *Invasive lobular carcinoma* (ILC) merupakan tumor *invasive* yang bersifat *non-cohesive*, sel bundar atau oval, nukleus tersebar acak dan berukuran kecil. ILC memiliki beberapa pola, seperti klasik, *tubulo-lobular*, *alveolar*, dan *solid* (Makki, 2015). Disisi lain, IDC memiliki variasi yang jauh lebih banyak lagi dan memiliki marker molekuler yang beragam, seperti *micropapillary* atau *cribriform* carcinoma. Sekitar 70% tipe variasi tumor saat ini belum diketahui dan disebut sebagai *no special type* (NST) tumor (DeVita dkk., 2015). Histopatologi sangat berguna untuk mengklasifikasikan jenis tumor dan menilai tingkat keagresifan melalui *tumor grading* (Rakha dkk., 2017). Analisis molekuler dari kanker payudara memungkinkan klasifikasi menjadi lebih akurat berdasarkan penggunaan biomarker

repository.ub.ac.id

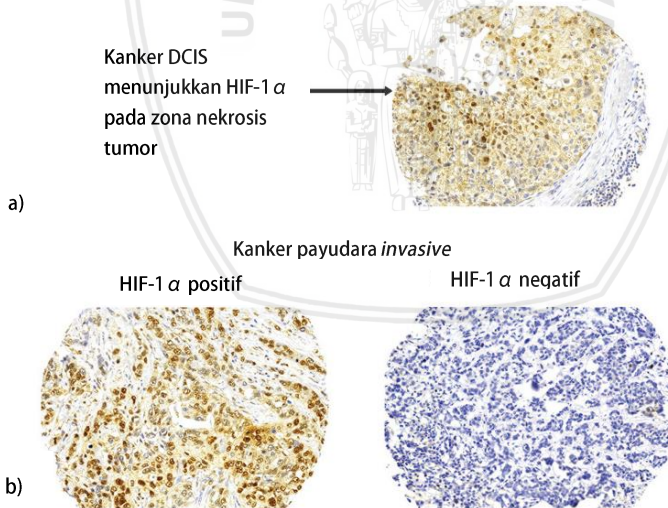
reseptor estrogen alpha (ER), reseptor progesteron (PR), dan reseptor *human epidermal growth factor 2* (HER2) (Badve & Ellis, 2017). ER-positif pada kanker payudara menunjukkan prognosis yang lebih baik, dan pasien dapat diarahkan menggunakan terapi hormon. Tumor ER-positif juga mengekspresikan gen penginduksi PR, dimana kadar PR-negatif menandakan prognosis buruk terhadap pasien. HER2-positif juga menandakan prognosis buruk, tetapi banyak pasien dapat diatasi menggunakan terapi anti-HER2 (Barsky dkk., 2009).

## 2.2 Hipoksia Kanker Payudara

Sekitar 50-60% tumor padat dapat mengalami hipoksia atau *anoxia* dan tersebar secara heterogen dalam suatu massa tumor (Vaupel dkk., 2007). Pada kanker payudara *invasive*, daerah hipoksia dapat mencapai 25-40% (Lundgren dkk., 2007). Studi menggunakan elektroda polarografik menunjukkan bahwa rata-rata tekanan parsial oksigen ( $pO_2$ ) pada jaringan payudara normal adalah 65 mmHg ( $1\text{mmHg}=133.3\text{ Pa}$ ). Sedangkan, rata-rata  $pO_2$  pada jaringan kanker payudara hanya sekitar 10 mmHg (Vaupel dkk., 2007). Hipoksia menyebabkan fenotip tumor yang lebih agresif, memperparah tumor *stage* dan *grading*, serta memudahkan tumor berkembang menuju tahap metastasis (Hoffmann dkk., 2018). Oleh karena itu, hipoksia memiliki implikasi negatif terhadap tingkat kelangsungan hidup pasien dan menunjukkan prognosis yang buruk terhadap kanker payudara (Kumar & Choi, 2014).

Kondisi hipoksia dapat muncul akibat ketidakseimbangan antara ketersediaan dan kebutuhan oksigen. Laju kebutuhan oksigen pada sel-sel neoplasma dan stroma pada lingkungan tumor dapat melebihi laju ketersediaan oksigen yang ada, sehingga kadar oksigen dapat berkurang dengan lebih cepat (Chen dkk., 2009). Kondisi hipoksia dapat direspon oleh sel karena adanya *hypoxia inducible factor* (HIF) yang dapat teraktivasi ketika kadar oksigen berkurang. HIF adalah kompleks heterodimerik yang terbentuk oleh 2 subunit, yaitu *alpha* dan *beta*. HIF-1 $\alpha$  dan HIF-1 $\beta$  diekspresikan secara terus menerus di dalam sel, namun kestabilan HIF-1 $\alpha$  diregulasi oleh molekul *Prolyl Hydroxylase* (PHD) (Lee dkk., 2004). Pada kondisi normal, PHD mengikat gugus OH pada HIF- $\alpha$  yang selanjutnya dikenali oleh

protein *von Hippel-Lindau* (vHL). Protein tersebut adalah bagian komponen molekul E-3 ubiquitin ligase dan akan mengarahkan HIF- $\alpha$  berikatan dengan proteasome untuk didegradasi. Sebaliknya, kadar oksigen rendah menyebabkan PHD menjadi tidak teraktivasi, sehingga memungkinkan HIF-1 $\alpha$  berikatan dengan HIF-1 $\beta$  membentuk faktor transkripsi HIF-1 (D'Ignazio dkk., 2017). Faktor transkripsi HIF-1 yang stabil akan mengaktifkan beberapa *HIF-dependent genes* sebagai upaya untuk beradaptasi terhadap stress oksigen. Salah satu yang diekspresikan adalah VEGF yang selanjutnya mengarah pada angiogenesis, sehingga tumor memperoleh nutrisi serta oksigen yang cukup untuk tumbuh dan berkembang (Liu dkk., 2015). Selain itu, aktivasi HIF-1 $\alpha$  juga mendukung peralihan respirasi aerobik menjadi anaerobik dengan mengekspresikan lebih banyak enzim glikolisis dan transporter gula (GLUT 1 dan GLUT 4) sebagai bentuk adaptasi terhadap stress oksigen. Akibatnya, pH intrasel cenderung menjadi lebih asam (Gatenby & Gillies, 2004). Hipoksia juga menyebabkan produksi reactive oxygen species (ROS), sehingga dapat mengaktifkan faktor transkripsi lain seperti *nuclear factor erythroid 2* (Nrf2) (Kovac dkk., 2015).

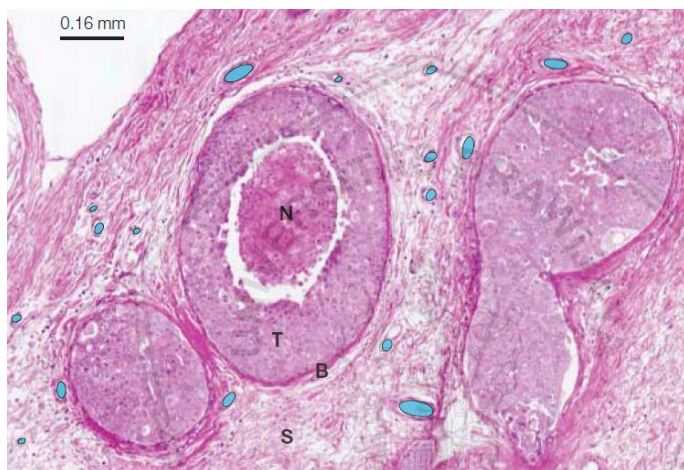


(Lundgren dkk., 2007).

Gambar 2. Pewarnaan immunohistokimia HIF-1 $\alpha$  pada preparat a) ductal carcinoma in situ (DCIS) dan b) kanker payudara *invasive*.



Seiring bertumbuhnya tumor, bagian pusat dari massa tumor dapat mengalami nekrosis akibat akumulasi dari hipoksia. Nekrosis ini dapat pula menginduksi respon inflamasi melalui ekspresi reseptor alarmin atau *damage associated molecular patterns* (DAMPs). Hal tersebut dapat memicu respon sistem imun *innate* (Balamurugan, 2015). Protein HIF-1 juga dapat menginduksi respon inflamasi dengan mengaktifkan beberapa gen yang berkaitan dengan *tumorigenesis*, seperti IL-6, MMP9, CXCR-4, cyclooxygenase 2 (COX 2), serta Bcl-2 (Balamurugan, 2015).



(Gatenby & Gillies, 2004)

Gambar 3. *Ductal carcinoma in situ* (DCIS) pada kanker payudara. Terdapat nekrosis (N) pada bagian pusat tumor (T) yang selanjutnya dapat menginduksi respon inflamasi. Tumor tetap berada pada batas *basement membrane* (B) yang dikelilingi oleh sel stroma (S). Oval berwarna biru menunjukkan pembuluh darah.

### 2.3 Peran Inflamasi pada Kanker Payudara

Disebut juga sebagai '*the intelligent disease*', kanker merupakan penyakit yang sulit diobati karena banyaknya patogenesis serta kemampuannya dalam memanipulasi sistem imun (Jenkins dkk., 2018). Berbeda dengan kemoterapi dan radioterapi yang langsung

‘menyerang’ sel tumor, pendekatan imunoterapi menunjukkan perkembangan yang lebih menjanjikan dalam beberapa dekade terakhir (Olszanski & Zitella, 2017). Sebuah korelasi antara inflamasi dan kanker sebenarnya telah lama diungkapkan oleh peneliti bernama Rudolf Ludwig Carl Virchow pada tahun 1863 yang menduga bahwa inflamasi merupakan syarat berkembangnya kanker. Keterkaitan antara kanker dengan inflamasi yang berkelanjutan memunculkan istilah kanker sebagai ‘*wounds that do not heal*’ (Todoric dkk, 2016). Apabila terjadi luka, maka tubuh akan menghasilkan berbagai jenis senyawa kimia sebagai respon untuk mengobati jaringan yang rusak. Berbagai jenis sel imun akan menginfiltrasi daerah tersebut dan memicu proliferasi sel untuk memperbaiki kondisi jaringan menjadi normal kembali (Korniluk dkk., 2016). Seharusnya proses inflamasi ini akan berhenti ketika patogen penyebab munculnya inflamasi telah dihilangkan (Roxburgh & MacMillan, 2014), namun pada kondisi tertentu inflamasi dapat menjadi tidak teratur sehingga justru membentuk lingkungan yang baik bagi tumor untuk tumbuh dan berkembang. Hal tersebut dapat mengarah pada inflamasi kronis (Landskron dkk., 2014).

Hipoksia merupakan salah satu faktor terjadinya proses inflamasi. Seiring bertumbuhnya tumor, bagian pusat dari massa tumor dapat mengalami nekrosis akibat akumulasi dari hipoksia. Nekrosis ini dapat pula menginduksi respon inflamasi (Nagasaki dkk., 2014). Sedangkan, sel tumor yang berada lebih dekat dengan pembuluh darah dapat mengaktifkan *HIF-1 $\alpha$ -dependent genes* yang mengarah pada metastasis tumor. Respon ini memicu pertumbuhan pembuluh darah yang menginfiltrasi daerah tumor (Kumar & Choi, 2014). Pembuluh darah tidak hanya membantu tumor berkembang menuju fase metastasis, namun juga menyediakan nutrisi dan oksigen sehingga memungkinkan tumor untuk terus tumbuh (D’Ignazio dkk., 2017). Pada dasarnya, angiogenesis diperlukan agar sel-sel imun mampu bergerak menuju lokasi inflamasi dan mengeliminasi patogen. Sebab, sel-sel imun seperti sel T sitotoksik dan *Natural Killer* (NK) tidak hanya mampu mengenali dan menginduksi apoptosis pada sel terinfeksi patogen, melainkan juga pada berbagai jenis kanker (Rakoff-Nahoum, 2006). Biasanya sel sitotoksik tersebut hanya efektif bekerja pada tahap awal *tumorigenesis*, karena seiring waktu tumor akan diuntungkan dengan terbentuknya lingkungan



immunosurveillance (Jenkins dkk., 2018). Inflamasi berperan penting dalam perkembangan kanker. Sebaliknya, kanker juga dapat menimbulkan respon inflamasi, sehingga keduanya saling memengaruhi dan timbal balik (Crusz & Balkwill, 2015).

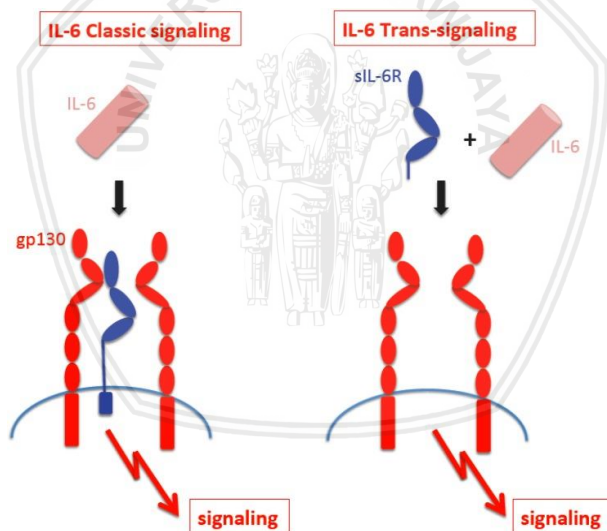
## 2.4 Peran IL-6, TGF- $\beta$ , dan IL-17 pada Kanker

Beberapa subset sel imun menjadi kunci berkembangnya sel neoplasma dalam kanker payudara, seperti *tumor-associated macrophage* (TAM), myeloid derived suppressor cells (MDSC), sel CD4<sup>+</sup>, dan fibroblast. Sel-sel tersebut menyekresikan beberapa sitokin terkait inflamasi, seperti IL-6, TGF- $\beta$ , dan IL-17 (Crusz & Balkwill, 2015). Terlebih lagi, kompleks sitokin tersebut mampu bekerja secara *autocrine* maupun *paracrine* oleh sel tumor dan sel imun, sehingga dapat mempertahankan respon inflamasi secara terus-menerus (*inflammatory loop*) (Murugaiyan & Saha, 2009).

*Interleukin 6* (IL-6) merupakan salah satu sitokin yang penting dalam proses inflamasi. Bahkan dalam kondisi hipoksia, sel tumor dapat mengekspresikan IL-6 sebagai salah satu pemicu faktor inflamasi. IL-6 dihasilkan oleh sel tumor dan sel-sel imun, seperti CD4<sup>+</sup> (Lin dkk., 2015). Aktivasi IL-6 tidak hanya memerlukan IL-6Ra, tetapi harus ada molekul gp130 untuk membentuk dimerisasi dan memicu peristiwa *cascade* dari IL-6. Berbeda dengan gp130 yang hampir diekspresikan oleh semua jenis sel, ekspresi IL-6Ra sebenarnya terbatas pada hepatosit dan beberapa sel imun tertentu saja (Rose-John, 2012). Namun, molekul ini dapat terlepas dari permukaan selnya karena proses enzim proteolitik atau *splicing* mRNA. Reseptor IL-6 yang terlepas tersebut dinamakan *soluble* IL-6Ra (sIL-6Ra). Molekul ini dapat mengikat IL-6 dalam ECM ataupun serum dan membentuk kompleks IL-6/sIL-6Ra. Dengan demikian, IL-6 dapat mengaktivasi sel-sel yang tidak memiliki IL-6Ra melalui *trans-signaling* (Gyamfi dkk., 2018)

Pengikatan IL-6 dengan reseptornya, baik secara *classic* atau *trans-signaling*, akan menginduksi fosforilasi dan aktivasi dari Janus kinase (JNK), JAK1, JAK2, dan Tyk2. Proses downstream tersebut akan mengarah pada aktivasi STAT1, STAT3, SHP2, dan PI3 kinase (Salgado dkk., 2003). Melalui STAT3, IL-6 mendukung pertumbuhan tumor dengan menginduksi molekul anti-apoptosis seperti bcl2, bcl-

XL, dan *survivin* (Abana dkk., 2017) Terlebih lagi, IL-6 diketahui menyebabkan metilasi dan deaktivasi *tumor supressor gene* p53 melalui aktivasi DNA (cytosine'5) methyltransferase 1 (DNMT-1) (Cui dkk., 2018). Peningkatan IL-6 dikatakan berkorelasi dengan peningkatan angiogenesis melalui ekspresi VEGF dan *fibroblast growth factor* (bFGF). Aktivasi STAT3 juga dapat mengaktifasi faktor transkripsi c-myc dan meningkatkan proliferasi tumor (Kumari dkk., 2016). Tidak hanya itu, STAT3 juga mengaktifasi cyclin D1 dan menekan ekspresi protein p21 yang merupakan *checkpoint* dalam siklus sel (Knupfer & Preiß, 2007). Namun terlepas dari sifat pro-tumor IL-6, sitokin ini juga memiliki peran penting dalam *lymph node* khususnya dalam membantu aktivasi sel limfosit naive menuju sel efektor (*lymphocyte trafficking*). Pengikatan L-selectin (CD62L) terhadap *high endothelial venules* (HEV) akan lebih efektif dengan adanya induksi dari trans-signaling IL-6 terhadap sel endotel (Fisher dkk., 2014).



(Rose-John, 2012)

Gambar 4. Aktivasi IL-6 dapat terjadi dengan classic signaling (kiri) atau trans-signaling (kanan).

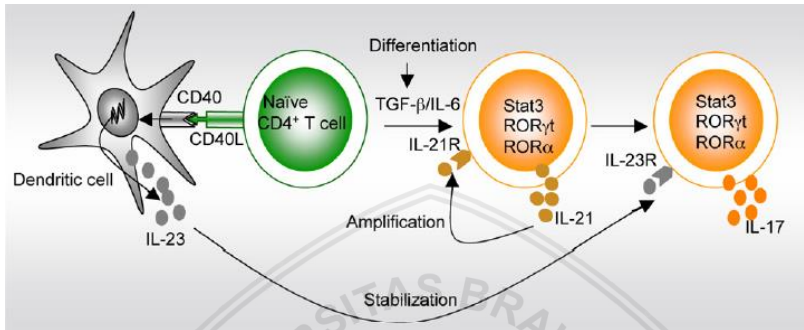
Sitokin TGF- $\beta$  merupakan sitokin pleiotropik yang dapat menekan sistem imun dan bersifat anti-inflamasi. Terdapat tiga jenis

isoform yang telah teridentifikasi, yaitu TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, dan TGF- $\beta$ 3. TGF- $\beta$  berikatan dengan reseptor tipe II (TGF- $\beta$  RII), menginduksi fosforilasi reseptor tipe I (TGF- $\beta$  RI), kemudian membentuk kompleks heterodimer yang mengaktifkan faktor transkripsi SMAD (Colak & Dijke, 2017). TGF- $\beta$  dapat bekerja menggunakan pathway SMAD (SMAD-dependent) ataupun secara independen (SMAD-independent). SMAD-dependent signaling diregulasi oleh pathway MAPK/ERK dan mengatur siklus sel dengan mengontrol ekspresi c-Myc, p21, dan cyclin D. Sedangkan, SMAD-independent signaling mengatur apoptosis melalui pathway JNK. Kedua jalur tersebut bersama-sama berperan dalam mengaktifkan beberapa gen terkait proliferasi, apoptosis, dan *cell survival* (Zhao dkk., 2018)

Pada awal terbentuknya tumor *benign*, TGF- $\beta$  dapat berperan sebagai sitokin anti-tumor. Sitokin TGF- $\beta$  sebenarnya berpotensi untuk menghambat pertumbuhan tumor dengan meningkatkan ekspresi protein p21 dan menekan ekspresi *c-myc*. Namun, tumor yang semakin berkembang justru mengganggu pathway SMAD-dependent, sehingga regulator *checkpoint* untuk proliferasi sel tidak berjalan baik (Principe dkk., 2014). Pada tahap *advanced*, TGF- $\beta$  juga menginduksi terjadinya *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) dengan menghilangkan ekspresi *E-cadherin* dan *cell junction* (Zarzynska, 2014). Beberapa protein degradasi matriks ekstraseluler, seperti vimentin dan MMPs, juga diekspresikan untuk memudahkan tumor menuju tahap metastasis (Sanjabi dkk., 2009). TGF- $\beta$  juga menyebabkan *immunosurveillance* dengan menginduksi diferensiasi sel Th17 (Hatton, 2011) dan sel T regulator (Zheng dkk., 2004) yang kemudian menekan diferensiasi beberapa sel imun.

Sitokin IL-17A, disebut juga CTLA-8, menunjukkan prognosis buruk bagi penderita kanker (Baharlou dkk., 2014). Sitokin ini umumnya disekresikan oleh salah satu subset dari sel T CD4, yaitu T helper 17 (Th17). Namun, sitokin ini dapat juga diproduksi oleh beberapa sel imun lain seperti sel NKT, sel T CD8<sup>+</sup>, dan sel T- $\gamma\delta$ . Reseptor IL-17R tersebar di berbagai sel tubuh, khususnya fibroblast, osteoblast, dan sel epitel (Davami dkk., 2016). Diferensiasi sel Th17 dari sel CD4 naive bergantung pada sitokin IL-6 dan TGF- $\beta$ , kemudian terstabilisasi oleh IL-21 dan IL-23. Sel Th17 berkorelasi terbalik terhadap sel T regulator, karena adanya IL-6 menyebabkan

sel CD4<sup>+</sup> naive cenderung differensiasi menjadi Th17. Sitokin IL-17 dapat mengamplifikasi kembali produksi IL-6 dan TGF- $\beta$  melalui fibroblast, sehingga ketiga sitokin tersebut dapat terus-menerus disekresikan membentuk suatu *inflammatory loop* (Murugaiyan & Saha, 2009).



(Murugaiyan & Saha, 2009)

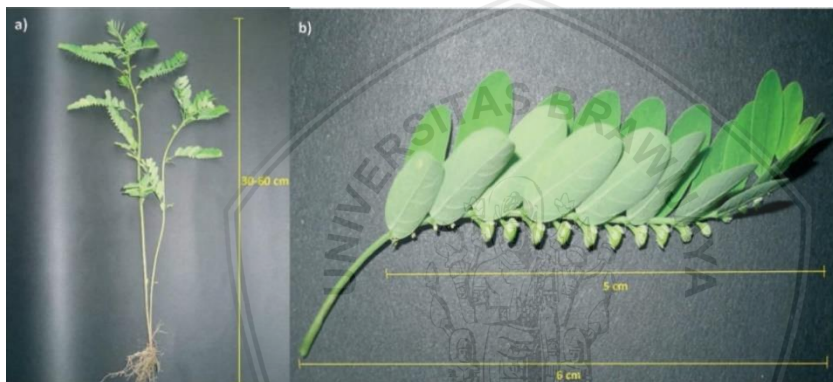
Gambar 5. Differensiasi sel Th17 dari sel CD4<sup>+</sup> naive bergantung pada sitokin IL-6 dan TGF- $\beta$ .

Sitokin IL-17 sempat dianggap memiliki sifat anti-tumor karena mendukung pematangan sel dendritik (DC) dan meningkatkan ekspresi MHC II pada DC. Dengan demikian, diharapkan aktivasi sel T menjadi lebih efektif (Antonyssamy dkk., 1999). Meskipun begitu, studi terkini menunjukkan bahwa IL-17 menimbulkan prognosis yang buruk pada kanker karena berkorelasi terhadap tingkat malignansi tumor, seperti meningkatnya densitas pembuluh darah dan densitas sel imun dalam lingkungan tumor (Yang dkk., 2014). Pada skala *in vitro*, produksi IL-17A berkorelasi dengan tumor grade tinggi, seperti *Triple Negative Breast Cancer* (ER, PR, dan HER2 negatif) (McGeachy dkk., 2007). Sitokin pro-inflamasi ini dapat mengaktivasi pathway ERK1/2 dan menyebabkan proliferasi sel tumor payudara dan memicu resistensi terhadap kemoterapi docetaxel (Cochaud dkk., 2013). IL-17 juga mendukung proses angiogenesis dengan menginduksi VEGF pada sel-sel stroma dan fibroblast, serta menghasilkan beberapa *chemokine* seperti IL8 (CXCL8), CXCL5, CXCL6, dan CXCL1 pada lingkungan tumor (Kim dkk., 2015). Meskipun umumnya IL-17 disekresikan oleh sel CD4, sitokin IL-6

dan TGF- $\beta$  juga dapat menginduksi sel CD8 agar memproduksi IL-17. Sel T CD8 jenis ini disebut Tc17 (Kuwabara dkk., 2017).

## 2.5 Meniran Hijau (*Phyllanthus niruri* L.)

Meniran hijau, disebut juga dukung anak, merupakan tanaman obat yang tumbuh baik di wilayah tropis dan subtropis, bersifat monokotil, dan dapat tumbuh sekitar 30-60 cm (Kaur dkk., 2017). Terdapat dua jenis meniran yang umumnya tumbuh di Indonesia, yaitu meniran hijau (*Phyllanthus niruri* L.) dan meniran merah (*Phyllanthus urinaria* L.). Secara sederhana, keduanya dapat dibedakan berdasarkan warna batangnya (Heming, 1996).



(Kaur dkk., 2017)

Gambar 6. Morfologi a) seluruh bagian tumbuhan dan b) struktur daun *Phyllanthus niruri* L.

Klasifikasi meniran hijau menurut CABI (2018) adalah sebagai berikut:

|          |                                |
|----------|--------------------------------|
| Domain   | : Eukaryota                    |
| Kingdom  | : Plantae                      |
| Filum    | : Spermatophyta                |
| Subfilum | : Angiospermae                 |
| Kelas    | : Dicotyledonae                |
| Genus    | : <i>Phyllanthus</i>           |
| Spesies  | : <i>Phyllanthus niruri</i> L. |

Meniran hijau telah lama digunakan sebagai herbal pengobatan tradisional seperti malaria, hepatitis B, dan diabetes (Kaur dkk., 2017). Tumbuhan ini diketahui memiliki efek antioksidan dan antimikroba (Gami & Kothari, 2011), serta menunjukkan fungsi anti-inflamasi pada beberapa model *in vivo* (Eze dkk., 2014; Putri dkk., 2017). Selain itu, tumbuhan ini juga potensial sebagai anti-kanker. Penelitian tingkat *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak metanol dan *aqueous* dari meniran hijau dapat meningkatkan ekspresi *caspase-3* dan *caspase-7*, serta menginduksi apoptosis pada sel tumor prostat (PC-3) dan melanoma (MeWo) tanpa menunjukkan efek sitotoksik pada *cell line* normal (Tang dkk., 2010). Hal serupa juga kembali dilakukan terhadap sel tumor payudara (MCF-7) dan paru-paru (A549) dan terbukti bahwa ekstrak metanol maupun *aqueous* meniran hijau mampu meningkatkan *caspase-3* dan *caspase-7* dan menginduksi apoptosis pada kedua *cell line* tersebut (Lee dkk., 2011). Ekstrak meniran hijau juga menunjukkan efek sitotoksik pada sel tumor kolorektal (HT-29) dan hepar (HepG2) (Júnior dkk., 2012). Selain menginduksi apoptosis pada sel tumor, ekstrak *P. niruri* secara konsisten dapat menekan pathway hipoksia dan menurunkan ekspresi VEGF, sehingga berpotensi untuk menurunkan respon hipoksia dan angiogenesis dalam kondisi kanker (Tang dkk., 2013; Tang dkk., 2014; Lee dkk., 2016). Potensi meniran hijau dalam menghambat pertumbuhan kanker juga dapat diamati pada tingkat *in vivo*. Ekstrak *aqueous* meniran hijau dosis 1000 mg/kg terbukti secara signifikan menekan pertumbuhan tumor pada mencit terinduksi DMBA model kanker kulit (*skin carcinogenesis*) tanpa menunjukkan efek toksisitas pada mencit (Sharma dkk., 2009). Ekstrak meniran hijau tidak menimbulkan kematian pada mencit pada dosis 500 mg/kg, 1000 mg/kg, 1500 mg/kg, hingga 5000 mg/kg (Sijuade, 2016; Abdulla dkk., 2010).

*Phyllanthin* dan *hypophyllanthin* merupakan senyawa aktif yang khas dari genus *Phyllanthus* dan terbukti menghambat pertumbuhan kanker payudara secara *in vitro* (MCF-7) dan *in vivo* pada mencit (Parvathaneni dkk., 2014). Selain *phyllanthin*, ekstrak *aqueous* dari *Phyllanthus niruri* memiliki beberapa senyawa aktif lainnya, seperti *quercetin glucoside*, *quercetin diglucoside*, *gallic acid*, *geraniin*, *rutin*, *caffeolquinic acid*, *digalloylgluconpyroniside*, dan *corilagin* (Tang dkk., 2010; Lee dkk., 2011). Diantara senyawa tersebut,



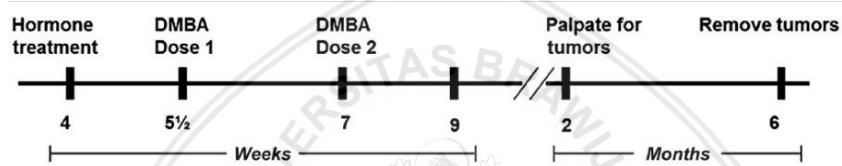
senyawa corilagin berperan penting dalam menekan perkembangan kanker. Studi *in silico* menunjukkan bahwa *corilagin* dari meniran memiliki nilai interaksi yang lebih tinggi terhadap Bcl-2, telomerase, dan MMP-2 dibandingkan cisplatin maupun doxorubicin (Parameshwaran dkk., 2017). Senyawa *corilagin* juga mampu menurunkan kadar sitokin dan protein terkait inflamasi, seperti TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, NO (iNOS) dan COX-2 (Zhao dkk, 2008). Selain itu, *corilagin* menurunkan produksi sitokin TGF- $\beta$  pada tingkat *in vivo* (Wang dkk., 2014).

## 2.6 Permodelan Induksi Kanker pada Hewan Coba

Terdapat beberapa hal yang perlu dipertimbangkan dalam memilih hewan coba untuk model kanker payudara. Selain teknik *grafting* (*xenograft*), metode yang dapat dilakukan untuk membuat permodelan kanker adalah dengan induksi kanker. Ada dua jenis protokol yang biasa digunakan dalam induksi kanker, yaitu menggunakan *mouse mammary tumor virus* (MMTV), atau induksi menggunakan senyawa karsinogen (Callahan & Smith, 2000). Senyawa 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) merupakan salah satu bahan karsinogen yang paling baik dalam memicu perkembangan kanker payudara pada hewan model tikus (*rat*) dan mencit (*mencit*). Umumnya, strain mencit BALB/c, FVB, dan C3H lebih direkomendasikan untuk dipakai karena jenis mencit ini lebih sensitif (*susceptible*) terhadap senyawa karsinogen. Beberapa strain mencit lain, seperti C57BL diketahui lebih resisten terhadap karsinogen. (Medina, 2010). Hal yang dapat diukur adalah waktu terbentuk tumor (*latency*), persentase hewan coba yang terdeteksi tumbuh tumor (*incidence*), jumlah tumor dalam satu hewan coba (*multiplicity*), dan ukuran tumor (volume atau berat). Metode umum yang biasanya dapat dipakai pada tikus adalah melarutkan DMBA dalam minyak kacang, dan diinjeksikan di sekitar kelenjar payudara secara *single dose* ataupun *multiple dose*. Perkembangan tumor dapat dilakukan dalam waktu 2-6 bulan (Welsh, 2013).

Telah diketahui bahwa keberhasilan induksi senyawa karsinogen pada hewan coba bergantung pada strain yang digunakan. Induksi *tumorigenesis* pada mencit atau tikus dengan DMBA saja memiliki persentase *incidence* sekitar 50%, dan metastasis sudah dapat diamati

pada hewan coba. Hal tersebut dapat ditingkatkan dengan pemberian *exogenous hormone*, seperti progesterin, agar mempercepat pertumbuhan tumor. Proses ini juga disebut sebagai *hormonal treatment*. Penambahan progesterin dikatakan dapat meningkatkan *incidence* menjadi 75% dalam kurun waktu yang sama. Progesterin sintetik yang biasanya dipakai adalah *medroxyprogesterone acetate* (MPA) yang dapat diberikan sebelum atau setelah pemberian DMBA. Pada *tumorigenesis*, senyawa DMBA bertanggung jawab dalam tahap *initiation*, karena dapat memicu mutasi. Namun, proses *hormonal treatment* dapat melaksanakan fungsi kedua dari *tumorigenesis* yaitu tahap *promotion*. Pemberian MPA dapat menyingkat waktu berkembangnya tumor secara signifikan (Welsh, 2013).



(Welsh, 2013)

Gambar 7. Skema protokol induksi DMBA *multiple dose* pada hewan coba.

Kehamilan dilaporkan dapat melindungi hewan coba tikus ataupun mencit dari induksi senyawa karsinogen. Tikus yang perawan (*virgin rat*) diinjeksi oleh DMBA berhasil menginduksi kanker pada 70% populasi, sedangkan hewan coba yang hamil (dengan umur yang sama) hanya menginduksi kanker pada 14% populasi. Beberapa faktor yang diduga ikut berperan dalam kasus ini adalah fluktuasi hormon, kematangan kelenjar (*gland maturity*), perubahan dalam populasi *stem cell*, dan perubahan sensitivitas reseptor estrogen (Russo dkk., 2006).



## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2019 sampai Juni 2019. Penelitian dilakukan di Laboratorium Anatomi dan Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

### 3.2 Deskripsi Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit betina (*Mus musculus*) strain BALB/c yang diperoleh dari Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada (LPPT UGM), Yogyakarta. Berat badan mencit berkisar antara 20-30 gram dengan usia 7-8 minggu.

### 3.3 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain rancangan acak lengkap dengan lima perlakuan dan lima kali ulangan. Penelitian ini menggunakan 50 ekor mencit. Dosis optimum ekstrak *Phyllanthus niruri* (EPN) yang diberikan mengacu pada penelitian Sharma dkk. (2009), yaitu sebesar 1000 mg/kg. Dosis rendah mengacu pada penelitian Huang dkk. (2006), yaitu sebesar 500 mg/kg. Dosis tinggi ditetapkan oleh peneliti, yaitu sebesar 2000 mg/kg. Dosis tinggi tidak mengacu pada referensi, namun dosis ini diketahui tidak menyebabkan kematian pada mencit (Abdulla dkk., 2010).

Tabel 1. Kelompok perlakuan penelitian

| Kelompok<br>Perlakuan | Dosis DMBA    | Dosis EPN     |
|-----------------------|---------------|---------------|
| Normal (N)            | -             | -             |
| Kanker (C)            | 0.015mg/kg BB | -             |
| Dosis 1 (C-D1)        | 0.015mg/kg BB | 500 mg/kg BB  |
| Dosis 2 (C-D2)        | 0.015mg/kg BB | 1000 mg/kg BB |
| Dosis 3 (C-D3)        | 0.015mg/kg BB | 2000 mg/kg BB |

### 3.4 Induksi Kanker Payudara

Induksi kanker payudara dilakukan dengan menginjeksi senyawa karsinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) pada daerah subkutan payudara. Injeksi dilakukan setiap minggunya selama minimal 6 minggu. Dosis DMBA yang diinjeksikan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Hermanto (2018), yaitu sebesar 0,015 mg/gram berat badan (BB) mencit. Pelarut yang digunakan adalah minyak jagung.

### 3.5 Pembuatan dan Pemberian Ekstrak Meniran

Simplisia meniran hijau diperoleh dari UPT Materia Medica, Kota Batu, Jawa Timur. EPN yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan seluruh bagian tanaman (*whole extract*). EPN dibuat dengan melarutkan simplisia meniran hijau dengan air sebagai pelarut (rasio 1:10 w/v) (Sharma dkk., 2009). Larutan dibiarkan terendam selama 24 jam dan difiltrasi menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh selanjutnya dievaporasi pada suhu 40°C dan dilakukan *freeze dry* pada suhu dibawah -20 °C (Huang dkk., 2006). Pelarutan EPN dilakukan dengan akuades dan diberikan secara oral berdasarkan dosis yang telah ditentukan. Proses pemberian EPN dilakukan setiap hari selama 14 hari.

### 3.6 Flow-cytometry

Mencit dari masing-masing kelompok didislokasi pada bagian tengkuk sambil menarik bagian ekor. Alkohol 70% dioleskan pada bagian abdomen mencit agar lebih steril. Organ limpa diambil dan dicuci sebanyak dua kali menggunakan PBS. Limpa diletakkan pada cawan yang sudah berisi 5 mL *phosphate buffer saline* (PBS) dan digerus menggunakan ujung tumpul *syringe*. Homogenasi dilakukan secara konsisten searah jarum jam atau sebaliknya. Homogenat limpa dimasukkan ke dalam propilen 15 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 2.500 rpm pada suhu 10 °C selama 5 menit. Pelet ditambahkan dengan 1 ml PBS dan kemudian diresuspensi.

Suspensi sel limpa diambil sebanyak 50 µL dan dipindah ke *microtube* 1.5 mL yang telah berisi 500 µL PBS. Hasil campuran

disentrifugasi dengan kecepatan 2.500 rpm pada suhu 10 ° C selama 5 menit. Pelet yang diperoleh ditambah 50 µL antibodi ekstraseluler (anti-CD4 dan anti-CD68) dan diresuspensi. Sampel diinkubasi selama 20 menit pada suhu 4 °C dalam kondisi gelap. Sampel ditambahkan dengan 50 µl *cytofix*, kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 4 °C dalam kondisi gelap. Campuran ditambahkan lagi dengan 500 µl *washperm* dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 2.500 rpm pada suhu 10 °C selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet ditambahkan dengan antibodi intraseluler (anti-IL-6, anti-TGF-β, dan anti-IL-17) sebanyak 50 µl dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 4 °C dalam kondisi gelap. Sampel ditambahkan dengan 400 µl PBS, setelah itu dipindahkan ke dalam kuvet untuk dianalisis menggunakan *flow cytometry*.

### 3.7 Immunohistokimia

Jaringan payudara mencit yang telah diisolasi dipindahkan dalam botol plakon untuk difiksasi dengan formalin 10%. Setelah 24 jam, larutan formalin diganti dengan alkohol konsentrasi bertingkat 70%, 95%, dan 100% untuk dehidrasi. Alkohol diganti larutan alkohol:xylol, xylol I, xylol II, xylol:parafin, kemudian diisi parafin murni. Proses *embedding* dilakukan dalam kotak *embedding*. Spesimen hasil *embedding* dipotong dengan mikrotom ukuran 5µm dan dilapisi poly-L-lysene pada gelas objek. Slide spesimen dideparafinisasi dengan dipanaskan dalam oven selama 3 hari dan direhidrasi dengan xylol & alkohol konsentrasi bertingkat masing-masing selama 10 menit. Pembukaan epitope (*antigen retrieval*) dilakukan dengan buffer sitrat 10 mM pH 6 selama 15 menit pada suhu 95°C di dalam *microwave*. Setelah itu didinginkan selama 30 menit pada suhu ruang. Inaktivasi peroksidase endogen dilakukan menggunakan hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.3% selama 40 menit. Spesimen diinkubasi 5 menit pada suhu ruang kemudian dicuci dengan PBS. *Blocking* preparat dilakukan dengan 10% *normal goat serum* selama 1 jam dan diinkubasi dengan anti-HIF-1α dan anti-VEGF-A *overnight*. Ditetesi *non-conjugated anti-rabbit igG* selama 60 menit dan ditetesi *horse radish peroxidase* (HRP) selama 40 menit. Selanjutnya preparat ditambahkan *diaminobenzidine* (DAB) *tetrahydrochloride* sebagai substrat kromogen selama 2 menit.

Larutan hematoxylin diberikan sebagai *counterstain* pada preparat. Slide yang telah kering dilakukan *mounting* dengan entellan.

### 3.8 Analisis Data

Analisis data *flow cytometry* dilakukan dengan menggunakan program BD CellQuest Pro<sup>TM</sup>, sehingga diperoleh data kuantitatif dari jumlah relatif populasi yang telah ditentukan. Analisis data immunohistokimia dilakukan secara deskriptif dan kuantitatif. Parameter *area* dan *optical density* dilakukan dengan software Fiji dan ImageJ. Analisis cell count dilakukan dengan software Immunoratio berdasarkan rekomendasi dari Vijayashree dkk. (2015).

#### a) Area

Parameter area merupakan pengukuran persentase luas sel yang mengekspresikan protein. Hal tersebut dilakukan dengan menilai luas area yang berwarna coklat. Software Fiji dilakukan untuk menganalisis *Colour Deconvolution* dari gambar histologi. Software ImageJ digunakan untuk mengkalibrasi pixel menjadi  $\mu\text{m}$ .

#### b) Optical density (OD)

Parameter ini dilakukan untuk mengukur intensitas kecoklatan yang ada di gambar. Semakin coklat maka optical density semakin tinggi. Skala OD memiliki rentang 0 hingga 3.4 yang sebelumnya telah dikalibrasi dari *mean gray value* pada software ImageJ.

#### c) Cell count

Jumlah sel yang positif dapat dinilai dengan menggunakan software Immunoratio. Software ini mengambil persentase sel yang terwarnai terhadap jumlah sel total.

#### d) Allred score

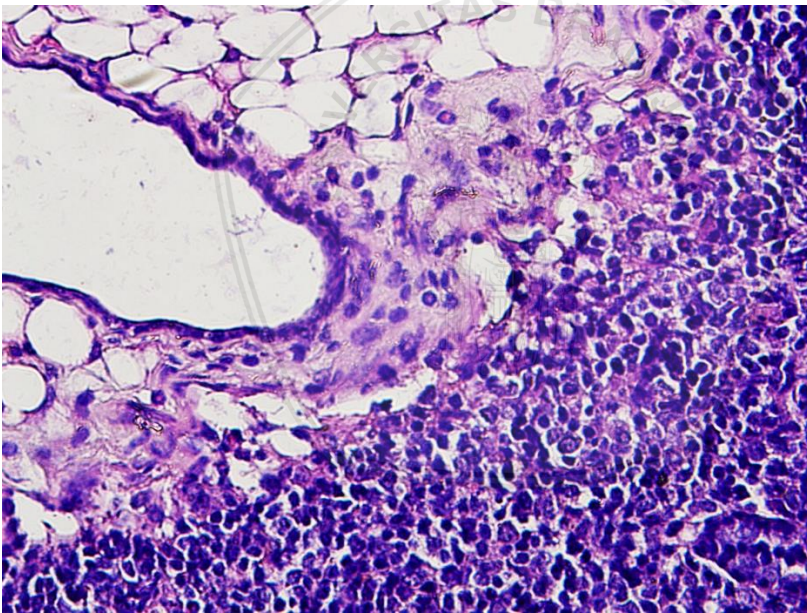
Peningkatan dan penurunan ekspresi protein disimpulkan melalui Allred score. Proportion score diperoleh dari persentase jumlah sel yang sebelumnya telah diperoleh dari Immunoratio. Intensity score diperoleh dari ImageJ dengan skala OD mengikuti referensi dari Vijayashree dkk. (2015)

Uji statistik dilakukan menggunakan *one-way* ANOVA dengan nilai signifikansi sebesar 5%. Uji beda nyata dilakukan dengan uji Tukey HSD (*honest significant difference*) menggunakan software SPSS v22.0.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

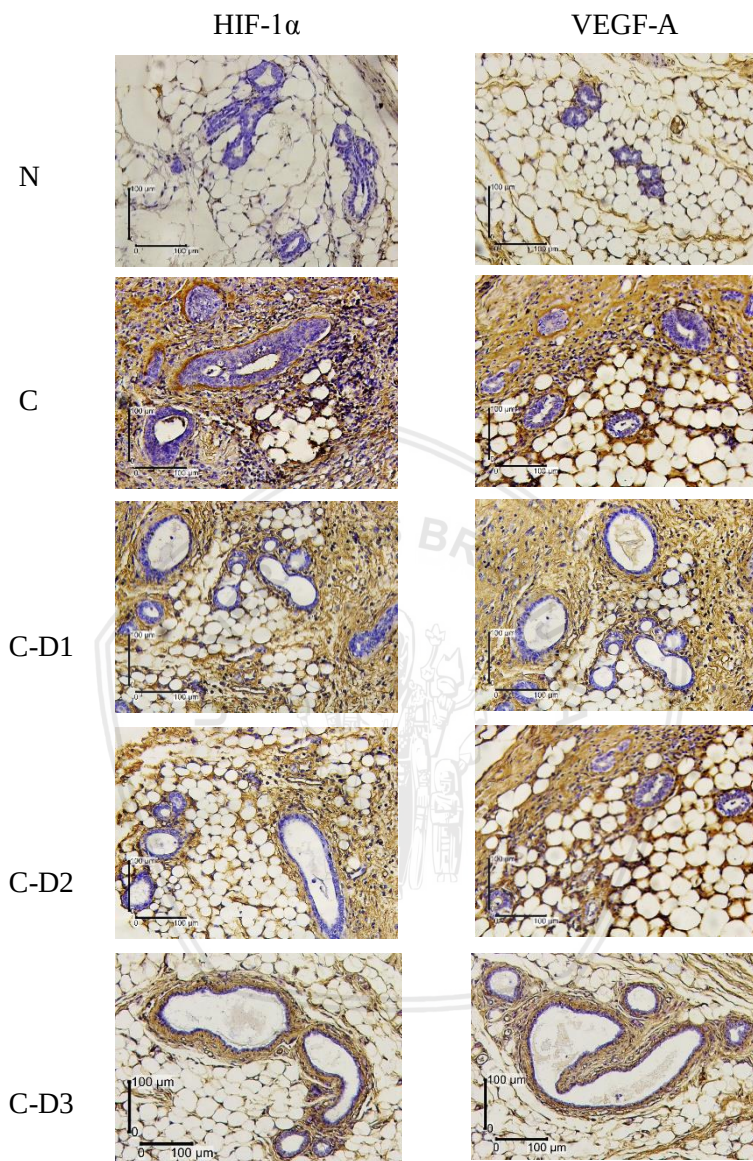
### 4.1 Pengaruh DMBA terhadap Jaringan Payudara

Hasil histologi mencit yang terinduksi DMBA nampak berbeda dengan kelompok normal, yaitu 1) terjadi hiperplasia sel epitel pada *duct/lobule*, 2) terjadi infiltrasi sel-sel imun yang menandakan adanya inflamasi, dan 3) terjadi akumulasi protein serabut secara intensif yang dapat menutupi sebagian sel-sel lemak. Kanker payudara berkembang dari sel-sel epitel, baik itu berasal dari *duct* atau *lobule*. Namun, jaringan payudara tidak didominasi sel epitel, melainkan oleh sel-sel lemak (*adiposa*) yang berbentuk bulat/oval dan berukuran lebih besar dibandingkan dengan sel epitel atau sel imun.



Gambar 8. Pewarnaan Hematoxylin & Eosin (HE) menunjukkan dugaan infiltrasi kanker payudara *invasive* di area *lymph node* (perbesaran x200).





Gambar 9. Hasil pewarnaan immunohistokimia dengan antibodi HIF-1 $\alpha$  dan VEGF-A (perbesaran x200). Sel positif ditandai dengan warna coklat, sedangkan warna biru menunjukkan inti sel.

Hiperplasia sel epitel payudara dapat terjadi akibat beberapa faktor, seperti adanya inflamasi kronis (faktor patogen) atau sekresi hormon estrogen/progesteron sebagai persiapan kehamilan (faktor non-patogen) (Russo dkk., 2006). Namun demikian, hiperplasia dikaitkan sebagai karakter pre-neoplasia, yang berarti sel-sel kanker (neoplasia) cenderung berkembang dari sel hiperplasia. Oleh karena itu, karakteristik ini harus diwaspadai menjadi awal berkembangnya kanker (Gatenby & Gillies, 2004). Karakteristik lain yang berhasil diamati adalah akumulasi protein serabut secara intensif, sehingga jaringan adiposa tampak tertutupi. Protein serabut ini bisa jadi berupa kolagen ataupun protein serabut elastis yang dihasilkan oleh sel jaringan ikat seperti fibroblast. Protein serabut sebetulnya dihasilkan dalam kondisi inflamasi sebagai proses *wound healing* ketika terjadi luka. Protein *fibroblast growth factor* (FGF) banyak disekresi, sehingga memungkinkan fibroblast menjadi lebih aktif dan ikut menghasilkan sitokin inflamasi. Hal ini berdampak pada prognosis yang lebih buruk, karena fibroblast dapat mendukung angiogenesis dengan mensekresikan VEGF (Murugaiyan & Saha, 2009).

Pengamatan hasil induksi DMBA yang dilakukan selama 8 minggu menyebabkan jaringan payudara menjadi hipoksik ditandai dengan ekspresi HIF-1 $\alpha$  yang lebih intensif di sekitar kelenjar payudara. Meski diketahui bahwa protein ini dapat dihasilkan oleh hampir seluruh sel tubuh, gambar immunohistokimia menunjukkan bahwa HIF-1 $\alpha$  tampak terekspresi pada sel jaringan ikat (fibroblast) dan juga sel epitel kelenjar payudara. Lingkungan yang hipoksik ini selanjutnya dapat mengarah pada ekspresi VEGF yang juga dapat diamati pada hasil gambar immunohistokimia. Protein VEGF ini banyak dihasilkan oleh sel epitel kelenjar payudara dan fibroblast (Nagasaki dkk., 2014). Sel-sel imun dapat ditemukan pada jaringan payudara, namun hanya dalam jumlah sedikit sebagai upaya untuk mempertahankan jaringan dari benda asing (patogen). Sel-sel imun dalam jumlah banyak menandakan adanya respon patogenik yang sedang terjadi, dan dapat berkembang menjadi kronis ketika faktor patogen tersebut tidak dapat diatasi. Terlebih lagi, kondisi inflamasi kronis dapat memunculkan berbagai macam sitokin yang menyebabkan respon *tissue repair*. Sel-sel stroma yang tumbuh intensif dimungkinkan terjadi akibat respon tersebut. Telah disebutkan bahwa pada kondisi inflamasi kronis, sel stroma seperti

fibroblast banyak menghasilkan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) untuk menginduksi angiogenesis. Pembuluh darah yang terbentuk memungkinkan kanker berkembang menuju fase metastasis (Landskron, 2014).

## 4.2 Hasil Uji Kuantitatif Immunohistokimia HIF-1 $\alpha$

Hasil immunohistokimia dianalisis secara kuantitatif secara manual menggunakan software ImageJ dan Fiji. Parameter yang dinilai adalah persentase area dan nilai *optical density* (OD) (*intensity score*). Persentase jumlah sel positif (*proportion score*) dilakukan dengan Immunoratio.

Tabel 2. Klasifikasi Allred score HIF-1 $\alpha$ .

| Kelompok | <i>Proportion Score</i> | <i>Intensity score</i> | Allred score |
|----------|-------------------------|------------------------|--------------|
| N        | 2                       | 0                      | 2            |
| C        | 5                       | 2                      | 7            |
| C-D1     | 5                       | 2                      | 7            |
| C-D2     | 5                       | 1                      | 6            |
| C-D3     | 4                       | 1                      | 5            |

Keterangan Allred score: 0-2) negatif, 3-8) positif.

Hasil uji kuantitatif menunjukkan bahwa mencit yang diinduksi oleh DMBA berdampak pada peningkatan *proportion score* dan *intensity score* dari HIF-1 $\alpha$ . Hal tersebut menandakan bahwa sel-sel lingkungan kanker menimbulkan lingkungan yang cenderung hipoksik dengan mengaktifkan protein HIF-1 $\alpha$ . Ekstrak EPN menurunkan *proportion score* pada dosis tinggi (C-D3), sedangkan *intensity score* sudah dapat diturunkan pada dosis sedang (C-D2). Kelompok C dan C-D1 tidak memiliki perbedaan, baik *proportion score* maupun *intensity score*. Hasil uji kuantitatif juga diperkuat dengan penghitungan Allred score agar dapat mengetahui klasifikasi uji kuantitatif dari protein HIF-1 $\alpha$ . Berdasarkan nilai yang diperoleh, kelompok N dikategorikan 2, sehingga dianggap negatif. Kelompok lain dikategorikan positif, karena memiliki rentang nilai 5-7. Kelompok C dan C-D1 dianggap positif dengan intensitas yang



paling kuat. Kelompok C-D2 dan C-D3 memiliki nilai intensitas yang sama, namun kelompok C-D3 memiliki *proportion score* yang lebih rendah. Ekspresi HIF-1 $\alpha$  pada preparat menggambarkan kondisi hipoksia pada jaringan payudara. Pada penelitian ini, peningkatan protein ini kemungkinan akibat dari injeksi DMBA. Protein HIF-1 $\alpha$  merupakan *inducer* kuat agar sel mensekresikan VEGF, dan keduanya terekspresi tinggi dalam perkembangan kanker payudara, khususnya *invasive breast cancer*.

### 4.3 Hasil Uji Kuantitatif Immunohistokimia VEGF-A

Analisis kuantitatif VEGF-A tidak berbeda dengan HIF-1 $\alpha$ , yaitu pengujian secara manual menggunakan software ImageJ, Fiji, dan Immunoratio. Parameter persentase area, nilai *optical density* (OD), dan persentase jumlah sel positif ( $p < 0.05$ ), dilakukan untuk mengetahui kategori skor Allred *scoring* VEGF-A yang diekspresikan.

Tabel 3. Klasifikasi Allred *scoring* VEGF-A.

| Kelompok | <i>Proportion Score</i> | <i>Intensity score</i> | Allred score |
|----------|-------------------------|------------------------|--------------|
| N        | 3                       | 0                      | 3            |
| C        | 5                       | 2                      | 7            |
| C-D1     | 5                       | 2                      | 7            |
| C-D2     | 5                       | 2                      | 7            |
| C-D3     | 5                       | 2                      | 7            |

Keterangan Allred score: 0-2) negatif, 3-8) positif.

Analisis kuantitatif menunjukkan bahwa induksi DMBA pada mencit meningkatkan *proportion score* dan *intensity score* yang dinilai dari VEGF-A. area, *optical density*, dan jumlah sel yang mengeskpresikan VEGF-A. Meski demikian, pemberian EPN tidak menunjukkan adanya perbedaan, baik *proportion score* maupun *intensity score*. Berdasarkan nilai yang diperoleh dari Allred *scoring*, kelompok N dikategorikan 3 yaitu positif tetapi dengan intensitas yang rendah. Kelompok lain dikategorikan 7, yaitu positif dengan intensitas kuat. Hal ini tentu berbeda seperti yang telah diamati pada

HIF-1 $\alpha$ . Meski ekstrak EPN dapat menurunkan ekspresi dari protein HIF-1 $\alpha$ , Allred score yang diperoleh dari VEGF justru tidak dapat membuktikan adanya efek dari EPN. Berbeda dengan HIF-1 $\alpha$  yang kelompok normalnya dinilai negatif, protein VEGF-A justru dinilai positif. Hal tersebut menandakan bahwa VEGF pada payudara disekresikan dalam keadaan fisiologis, terutama ketika embriogenesis, masa pubertas, dan masa kehamilan (Ferrara & Kerbel, 2005). Disisi lain, VEGF juga diperlukan secara fisiologis untuk mempertahankan permeabilitas sel endotel vaskuler (Shibuya, 2013).

Protein VEGF-A merupakan protein yang bertanggung jawab dalam pembentukan dan pemanjangan pembuluh darah. Protein ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yang memicu angiogenesis, seperti hipoksia atau inflamasi kronis. Kanker memiliki laju metabolisme yang tinggi untuk berproliferasi, sehingga dapat menyebabkan keadaan hipoksik pada lingkungan sekitar. Sel tersebut dapat mengaktifkan HIF-1 $\alpha$ -dependent genes yang mengarah pada produksi protein VEGF. Respon ini memicu pertumbuhan pembuluh darah dan menginfiltrasi daerah tumor (Kumar & Choi, 2014). Kondisi ini tidak hanya membantu tumor bermetastasis, melainkan juga menyediakan nutrisi bagi tumor untuk terus tumbuh (D'Ignazio dkk., 2017).

#### 4.4 Analisis Sitokin terkait Inflamasi

Beberapa jenis sel imun, seperti *tumor-associated macrophage* (TAM), myeloid derived suppressor cells (MDSC), sel CD4<sup>+</sup>, dan fibroblast menjadi kunci berkembangnya kanker. Sel-sel tersebut menyekresikan beberapa sitokin terkait inflamasi, seperti IL-6, TGF- $\beta$ , dan IL-17 (Crusz & Balkwill, 2015). Sitokin tersebut diketahui mampu melakukan *autocrine* maupun *paracrine signaling* pada sel tumor dan sel imun, sehingga dapat mempertahankan respon inflamasi secara terus-menerus (*inflammatory loop*) (Murugaiyan & Saha, 2009). Selain itu, sitokin ini juga dapat mendukung pertumbuhan kanker melalui beberapa mekanisme seperti angiogenesis.

Berdasarkan hasil *flow-cytometry*, induksi DMBA menyebabkan sitokin IL-6, TGF- $\beta$ , dan IL-17 meningkat secara signifikan.

Pemberian EPN juga menurunkan sitokin tersebut pada dosis tertentu. Terjadi penurunan jumlah relatif sel CD68 yang menghasilkan IL-6 pada kelompok C-D2 dan C-D3, sehingga mendekati kelompok normal. Penurunan serupa juga terjadi pada sel CD4 yang menghasilkan TGF- $\beta$ , namun terjadi hanya pada kelompok C-D3. Sel CD4 yang menghasilkan IL-17 juga mengalami penurunan pada kelompok C-D2 dan C-D3. Kelompok C-D3 pada parameter ini berhasil ditutunkan hingga secara statistik sama dengan kelompok normal.

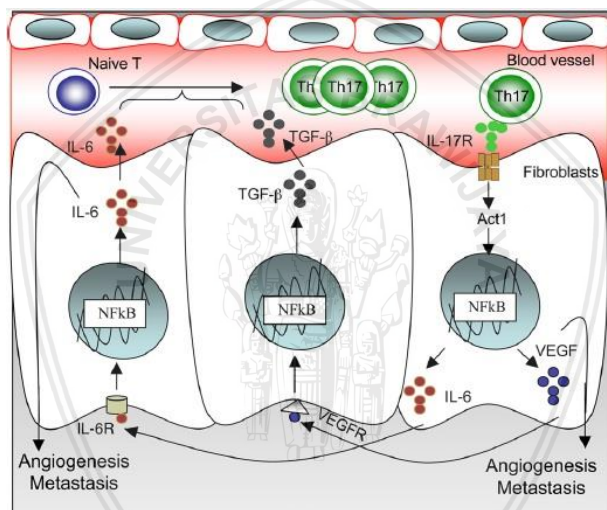
Tabel 4. Jumlah relatif sel imun yang menghasilkan sitokin.

| Kelompok | CD68 <sup>+</sup> IL6 <sup>+</sup> | CD4 <sup>+</sup> TGF $\beta$ <sup>+</sup> | CD4 <sup>+</sup> IL17 <sup>+</sup> |
|----------|------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------|
| N        | 5.148 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>      | 1.116 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>             | 1.056 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>      |
| C        | 7.574 $\pm$ 0.38 <sup>d</sup>      | 2.124 $\pm$ 0.25 <sup>c</sup>             | 2.088 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>      |
| C-D1     | 6.96 $\pm$ 0.27 <sup>cd</sup>      | 2.17 $\pm$ 0.24 <sup>c</sup>              | 1.864 $\pm$ 0.15 <sup>bc</sup>     |
| C-D2     | 6.536 $\pm$ 0.42 <sup>bc</sup>     | 1.928 $\pm$ 0.08 <sup>bc</sup>            | 1.624 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>      |
| C-D3     | 6.108 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>      | 1.682 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>             | 1.248 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>      |

Terdapat perdebatan mengenai peran inflamasi dalam perkembangan kanker. Inflamasi sebenarnya diperlukan untuk mengeliminasi kanker pada tahap awal, sehingga sitokin pro-inflamasi seperti IL-6 penting dalam pencegahan pertumbuhan kanker (Ahmad dkk., 2018). Namun, ketika kanker memasuki tahap *advanced*, sistem imun menjadi tidak efektif akibat adanya *immunosurveillance*, dan inflamasi yang kronis justru membuat kanker lebih berproliferasi lebih cepat dan mampu bermetastasis melalui pembuluh darah yg terbentuk di lingkungan tumor. Penurunan kadar sitokin IL-6 baik untuk mencegah angiogenesis, dan inhibisi sitokin ini terbukti mampu menekan perkembangan tumor (Rossi dkk., 2015).

Sitokin TGF- $\beta$  merupakan sitokin pleiotropik yang terekspresi tinggi pada kanker payudara, khususnya pada tahap *invasive*. Pada awal terbentuknya tumor *benign*, TGF- $\beta$  dapat berperan sebagai sitokin anti-tumor dan menghambat pertumbuhan tumor. Namun, pada tahap *advanced* TGF- $\beta$  justru menginduksi terjadinya *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) dengan menghilangkan ekspresi *E-cadherin* dan beberapa protein *cell junction* lainnya

(Zarzynska, 2014). Beberapa protein degradasi matriks ekstraseluler, seperti vimentin dan MMPs, juga diekspresikan sehingga memudahkan tumor menuju tahap metastasis (Sanjabi dkk, 2009). TGF- $\beta$  bersama dengan IL-6 diperlukan untuk differensiasi sel CD4 *naive* menjadi Th17, yang selanjutnya mensekresikan IL-17. Penurunan TGF- $\beta$  tidak hanya menekan differensiasi Th17, melainkan juga sel Treg. Telah disebutkan bahwa sel Treg meningkat pada kanker tahap *advanced*, sehingga Treg dapat menekan proliferasi sel CD4 dan CD8. Meski demikian, penurunan TGF- $\beta$  terbukti menunjukkan prognosis baik pada kanker, namun penurunan yang terlalu signifikan dapat menyebabkan gangguan sistem imun, seperti autoimun perifer (Colak & Dijke, 2017).



(Murugaiyan & Saha, 2009)

Gambar 10. Sitokin IL-17 menginduksi fibroblast menghasilkan VEGF dalam *inflammatory loop*.

Sitokin IL-17 sangat sedikit dan hampir tidak diekspresikan ketika dalam kondisi normal. Biasanya baru dihasilkan pada kondisi inflamasi kronis atau ketika sistem imun tidak lagi dapat diregulasi (Kim dkk., 2015). Peningkatan IL-17 sering dikaitkan dengan kondisi kanker yang ganas (*invasive*), karena inflamasi kronis menyebabkan akumulasi sitokin dan produksi protein seluler yang mengarah pada

angiogenesis (McGeachy dkk., 2007). Sitokin IL-17 dapat membentuk *inflammatory loop* pada sel-sel fibroblast, karena kemampuannya yang dapat menghasilkan IL-6 dan TGF- $\beta$ . Ketika sel CD4 *naive* berdifferensiasi menjadi Th17, maka sel Th17 dapat mensekresikan IL-17 dan direspon kembali oleh fibroblast. Selanjutnya, fibroblast menghasilkan VEGF untuk mendukung terjadinya angiogenesis (Murugaiyan & Saha, 2009).



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Hasil induksi DMBA menunjukkan beberapa karakter yang mengarah pada kanker payudara, yaitu adanya hiperplasia epitelium *duct/lobule*, terjadi infiltrasi sel imun, dan akumulasi jaringan ikat serabut di sekitar jaringan payudara. Induksi tersebut menyebabkan kenaikan signifikan pada ekspresi HIF-1 $\alpha$  & VEGF-A, dan juga sitokin IL-6, TGF- $\beta$ , & IL-17. Ekstrak *phyllanthus niruri* (EPN) pada dosis rendah (C-D1) secara statistik tidak menyebabkan perubahan pada HIF-1 $\alpha$ , VEGF-A, maupun sitokin inflamasi. Dosis sedang (C-D2) dan tinggi (C-D3) menunjukkan adanya penurunan sitokin inflamasi, tetapi dosis sedang belum mampu menurunkan sitokin TGF- $\beta$ . Kedua dosis tersebut juga mampu menurunkan ekspresi HIF-1 $\alpha$  ditinjau dari Allred score yang telah diperoleh. Akan tetapi, penelitian ini belum bisa membuktikan adanya pengaruh EPN terhadap Allred score pada VEGF-A.

#### 5.2 Saran

Penelitian ini utamanya bertujuan untuk mengetahui efek meniran hijau dalam menghambat angiogenesis pada kanker payudara secara *in vivo*, namun hasil dari penelitian hanya sebatas mengetahui pengaruhnya terhadap faktor penyebab angionesis yang meliputi inflamasi dan hipoksia. Diperlukan penelitian secara kuantitatif terhadap sel-sel endotel vaskuler dengan menggunakan marker tertentu, seperti CD31 dan CD34. Selain itu, preparat histologi kanker juga perlu dikonsultasikan dengan ahli patologi agar dapat mengkonfirmasi adanya perkembangan kanker.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abana, C.O., B.S. Bingham, J.H. Cho, A.J. Graves, T. Koyama, R.T. Pilarski, A.B. Chakravarthy, & F. Xia. 2017. IL-6 variant is associated with metastasis in breast cancer patients. *PLoS ONE*. 12(7): e0181725.
- Abdulla, M.A., K.A. Ahmed, F.H. AL-Bayat, Y. Masood. 2010. Gastroprotective effect of *Phyllanthus niruri* leaf extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *African J Pharm Pharmacol*. 4(5):226-230
- Ahmad, N., A. Ammar, S.J. Storr, A.R. Green, E. Rakha, I.O. Ellis, & S.G. Martin. 2018. IL-6 and IL-10 are associated with good prognosis in early stage invasive breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 67(4): 537–549.
- Antonyasamy, M.A, Fanslow, W.C., Fu, F., Lu, W., Qian, S., Troutt, A.B. 1999. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. *J. Immunol*. 162: 577–584.
- Baharlou, R., A.A. Vasmehjani, A. Dehghani, M.A. Ghobadifar, & M. Khoubyari. 2014. Reduced interleukin-17 and transforming growth factor beta levels in peripheral blood as indicators for following the course of bladder cancer. *Immune Network*. 14(3):156-163.
- Balamurugan, K. 2015. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *Int. J. Cancer*. 138: 1058–1066.
- Barsky, S.H., W.J. Gradishar, A. Recht, & M.M Urist. 2009. **The breast: comprehensive management of benign and malignant disorders**. Saunders Elsevier. Philadelphia
- Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, & A. Jemal. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer J Clin*. 68:394-424.
- CABI. 2018. *Phyllanthus niruri*: Seed-under-the-leaf. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/46049>. Diakses pada tanggal 10 Januari 2019.



- Callahan, R., & G.H. Smith. 2000. MMTV-induced mammary tumorigenesis: gene discovery, progression to malignancy and cellular pathways. *Oncogene*. 19(8):992–1001
- Chen, L., A. Endler, & F. Shibasaki. 2009. Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors. *Exp & Mol Med*. 41(12): 849-857.
- Cochaud, S., J. Giustiniani, C. Thomas, E. Laprevotte, C. Garbar, A.M. Savoye, H. Cure, C. Mascaux, G. Alberici, N. Bonnefoy, J.F. Eliaou, A. Bensussan, & J. Bastid. 2013. IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2. *Sci Rep*. 3:3456.
- Colak, S. & P.T. Dijke. 2017. Targeting TGF- $\beta$  signaling in cancer. *Trends in Cancer*. 3(1): 56-71.
- Crusz, S.M., & F.R. Balkwill. 2015. Inflammation and cancer: advances and new Agents. *Nature Reviews*. 12(10):584-96
- Cui, G., A. Yuan, Z. Sun, W. Zheng, & Z. Pang. 2018. IL-1 $\beta$ /IL-6 network in the tumor microenvironment of human colorectal cancer. *Pathology Res & Prac*. 214 (7): 986-992.
- D'Ignazio, L, M. Batie, & S. Rocha. 2017. Hypoxia and inflammation in cancer, focus on HIF and NF- $\kappa$ B. *Biomedicines*. 5(2): 21.
- Davami, M.H., R. Baharlou, A.A. Vasmehjani, A. Ghanizadeh, M. Keshtkar, I. Dezhkam, & M.R. Atashzar. 2016. Elevated IL-17 and TGF- $\beta$  serum levels: a positive correlation between T-helper 17 cell-related pro-inflammatory responses with major depressive disorder. *Clin Neurosci*. 7(2), 137-142
- Eze, C.O., C.S. Nworu, C.O. Esimone & V.C. Okore. 2014. Immunomodulatory activities of methanol extract of the whole aerial part of *Phyllanthus niruri* L. *J of Pharma & Phyto*. 6(4): 41-46.
- Ferrara N., R.S. Kerbel. 2005. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 438:967-74
- Fisher, D.T., M.M. Appenheimer, & S.S. Evans. 2014. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Seminars in Immunology*. 26: 38–47.

- Gami, B. & I.L. Kothari. 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of in-vivo and in-vitro grown plants of *Phyllanthus niruri* Linn. *Int J Pharma Biol Sci.* 2(2): 78–89.
- Gatenby, R.A., & R.J. Gillies. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nature Reviews.* Vol.4: 891-899.
- Ginter, P.S., & T.M. D'Alfonso. 2017. Current concepts in diagnosis, molecular features, and management of lobular carcinoma in situ of the breast with a discussion of morphologic variants. *Arch Pathol Lab Med.* Vol 141: 1668-1778.
- Gyamfi, J., M. Eom, J.S. Koo & J. Choi. 2018. Multifaceted roles of Interleukin-6 in adipocyte–breast cancer cell interaction. *Tansla Onco.* 11(2): 275–285.
- Han, Z., B. Wei, Y. Zheng, Y. Yin, K. Li & S. Li. 2017. Breast cancer multi-classification from histopathological images with structured deep learning model. *Scientific Reports.* 7:4172
- Hatton, R.D. 2011. TGF-b in Th17 cell development: the truth is out there. *Immunity.* 34(3): 288–290.
- Hembing, W.H.M. 1996. **Tanaman berkhasiat obat di Indonesia.** Edisi keempat. Pustaka Kartini. Jakarta.
- Hermanto, F. 2018. **Efek modulasi ramudan Cheral terhadap stress oksidatif hati dan sitokin proinflamasi limpa pada mencit (*Mus mucus*) model kanker payudara.** Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya. Malang. Skripsi
- Hoffmann, C., X. Mao, J. Brown-Clay, F. Moreau, A.A. Absi, H. Wurzer, B. Sousa, F. Schmitt, G. Berchem, B. Janji & C. Thomas. 2018. Hypoxia promotes breast cancer cell invasion through HIF-1 $\alpha$ -mediated up-regulation of the invadopodial actin bundling protein CSRP2. *Scientific Reports.* 8:10191.
- Huang, S.T., R.C Yang, P.N. Lee, S.H. Yang, S.K. Liao, T.Y. Chen, J.H.S. Pang. 2006. Anti-tumor and anti-angiogenic effects of *Phyllanthus urinaria* in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Int Imp.* 6:870–879
- Jenkins, R.W., D.A.Barbie & K.T. Flaherty. 2018. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *British Journal of Cancer.* Vol 118: 9–16

- Júnior, R.F.D.A., L.A.L. Soares, C.R. da Costa Porto, R.G.F. de Aquino, H.G. Guedes, P.R. Petrovick, T.P. de Souza, A.A. de Araújo, & G.C.B. Guerra. 2012. Growth inhibitory effects of *Phyllanthus niruri* extracts in combination with cisplatin on cancer cell lines. *World J Gastroenterol.* 18(31): 4162-4168.
- Kaur, N., B. Kaur & G. Sirhindi. 2017. Phytochemistry and pharmacology of *Phyllanthus niruri* L.: A review. *Phytother Res.* 31(7):980-1004.
- Kerr, D.J., D.G. Haller, C.J.H. Van de Velde, & M. Baumann. 2016. **Oxford textbook of oncology.** Edisi Ketiga. Oxford University Press. New York.
- Kim, H., Y. Kim, S. Bae, J.M. Kong, J.Choi, M. Jang, J. Choi, J.M Hong, Y. Hwang, J.S. Kang, & W.J. Lee. 2015. Direct interaction of CD40 on tumor cells with CD40L on T cells increases the proliferation of tumor cells by enhancing TGF- $\beta$  production and Th17 differentiation. *PLoS ONE.* 10(5): 0125742
- Knupfer, H., & R. Preiß. 2007. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast Cancer Res Treat.* 102:129–135
- Korniluk, A., O. Koper, H. Kemonia, & V. Dymicka-Piekarska. 2016. From inflammation to cancer. *Ir J Med Sci.* 186:57–62
- Kovac, S., P.R. Angelova, K.M., Holmstr, Y. Zhang, A.T. Dinkova-Kostov & A.Y Abramov. 2015. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta—General Subjects.* 1850(4): 794-801.
- Kumar, H. & D. Choi. 2015. Hypoxia Inducible Factor pathway and physiological adaptation: A cell survival pathway?. *Hindawi Mediators Inflamm.* Vol 2015: 584758.
- Kumari, N., B.S. Dwarakanath, A. Das, & A.N. Bhatt. 2016. Role of Interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumor Biol.* 37(9):11553-11572.
- Kuwabara, T., F. Ishikawa, M. Kondo, & T. Kakiuchi. The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases. *Mediators Inflamm.* 2017: 3908061
- Landskron, G., M. D. Fuente, P. Thuwajit, C. Thuwajit, & M.A. Hermoso. 2014. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. Vol 2014: 149185.

- Lee, J., S. Bae, J. Jeong, S. Kim & K. Kim. 2004. Hypoxia-inducible Factor (HIF-1)  $\alpha$ : Its protein stability and biological functions. *Exp & Mol Med*. 36(1): 1-12.
- Lee, S.H., I.B. Jaganath, N. Atiya, R. Manikam, & S.D. Sekaran. 2016. Suppression of ERK1/2 and hypoxia pathways by four *Phyllanthus* species inhibits metastasis of human breast cancer cells. *J Food Drug Anal*. 24(4): 855-865
- Lee, S.H., I.B. Jaganath, S.M. Wang, & S.D. Sekaran. 2011. Antimetastatic effects of *Phyllanthus* on human lung (A549) and breast (MCF-7) cancer cell lines. *PLoS ONE*. 6(6): 20994.
- Lin, S.C., Z.H. Gan, K. Han, Y. Yao, & D.L. Min. 2015. Interleukin-6 as a prognostic marker for breast cancer: a meta-analysis. *Tumori*. 101(5): 535-541.
- Liu, Z., G.L. Semenza, & H. Zhang. 2015. Hypoxia-inducible Factor 1 and breast cancer metastasis. *Biomed & Biotechnol*. 16(1):32-43.
- Lundgren, K., C. Holm, & G. Landberg. 2007. Hypoxia and breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci*. Vol 64: 3233 – 3247.
- Makki, J. 2015. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clin Med Ins*. Vol 8: 23–31.
- Malhotra, G.K., X. Zhao., H. Band, & V. Band. 2010. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Bio & Ther*. 10:(10): 955-960.
- Masoud, G.N., & W. Li. 2015. HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharma Sinica B*. 5(5):378–389.
- McGeachy, M.J., K.S. Bak-Jensen, Y. Chen, C.M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan & D.J. Cua. 2007. TGF-b and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain Th-17 cell-mediated pathology. *Nature Immunol*. 8(12): 1390-1397.
- Medina, D. 2010. Of mice and women: a short history of mouse mammary cancer research with an emphasis on the paradigms inspired by the transplantation method. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*. 2(10): 004523.

- Murugaiyan, G., & B. Saha. 2009. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol.* 183: 4169–4175.
- Nagasaki, T., M. Hara, K. Shiga, & H. Takeyama. 2014. Relationship between inflammation and cancer progression: review of the recent advances in Interleukin-6 signaling and its blockage in cancer therapy. *Receptor Clin Invest.* Vol 1: 202
- O'Malley, F.P., S.E. Pinder, & A.M. Mulligan. 2011. **Breast Pathology**. Edisi Kedua. Elsevier. Philadelphia.
- Olszanski, A.J. & L.J. Zitella. 2017. Advances in the use of immunotherapy in oncology. *J Adv Pract Oncol.* 8(3): 221–225.
- Parameshwaran, R., R. Shanthi, & S. Anbazhagan. 2017. In silico identification of natural drugs for cancer from the compounds of *Phyllanthus urinaria* Lin. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 45(1):1-5
- Principe, D.R., J.A. Doll, J. Bauer, B. Jung, H.G. Munshi, L. Bartholin, B. Pasche, C. Lee, & P.J. Grippo. 2014. TGF- $\beta$ : Duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 106(2): 369.
- Putri, D.U., N. Rintiswatib, M.H.N.E. Soesatyoc & S.M. Haryanac. 2018. Immune modulation properties of herbal plant leaves: *Phyllanthus niruri* aqueous extract on immune cells of tuberculosis patient - in vitro study. *Natural Prod Res.* 32(4): 463–467.
- Rakha, E.A., J.S. Reis-Filho, F. Baehner, D.J. Dabbs, T. Decker, V. Eusebi, S.B. Fox, S. Ichihara, J. Jacquemier, S.R. Lakhani, J. Palacios, A.L. Richardson, S.J. Schnitt, F.C. Schmitt, P. Tan, G.M. Tse, S. Badve & I.O. Ellis. 2017. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast cancer res.* 12(4):207
- Rakoff-Nahoum, S. 2006. Why cancer and inflammation? *Yale J Bio & Med.* Vol 79:123-130
- Rose-John, S. 2012. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Bio Sci.* 8(9):1237-1247
- Rossi, J.F., Z.Y. Lu, M. Jourdan, B. Klein. 2015. Interleukin-6 as a therapeutic target. *Clin Cancer Res.* 21(6):1248-1257

- Roxburgh, C.S.D., & D.C. McMillan. 2014. Cancer and systemic inflammation: Treat the tumour and treat the host. *British Journal of Cancer*. Vol 110: 1409–1412.
- Russo, J., G.A Balogh, & R. Heulings. 2006. Molecular basis of pregnancy-induced breast cancer protection. *Eur J Cancer Prev*.15(4):306–342.
- Salgado, R., S. Junius, I. Benoy, P.V. Dam, P. Vermeulen, E.V. Marck, P. Huget & L.Y. Dirix. 2003. Circulating Interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int. J Cancer*. 103: 642–646.
- Sanjabi, S., L.A. Zenewicz, M. Kamanaka, & R.A. Flavell. 2009. Anti- and pro-inflammatory roles of TGF- $\beta$ , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol*. 9(4): 447–453.
- Sharma, P., J. Parmar, P. Verma, P. Sharma, & P.K. Goyal. 2009. Anti-tumor activity of *Phyllanthus niruri* (a medicinal plant) on chemical-induced skin carcinogenesis in mice. *Asian Pac J Cancer Prev*. 10(6):1089-94
- Shibuya, M. 2013. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem*. 153:13–19
- Sijuade, A. O. 2016. *In vivo* Evaluation of Analgesic Activities of *Phyllanthus niruri* Leaf Methanol Extract in Experimental Animal Models. *JAMPS*. 8(3): 1-8
- Tang, Y., I.B. Jaganath, R. Manikam & S.D. Sekaran. 2014. Inhibition of MAPKs, Myc/Max, NF $\kappa$ B, and Hypoxia pathways by *Phyllanthus* prevents proliferation, metastasis and angiogenesis in human melanoma (MeWo) cancer cell line. *Int. J. Med. Sci*. 11(6): 564-577.
- Tang, Y.Q., I.B. Jaganath, & S.D. Sekaran. 2010. *Phyllanthus* spp. induces selective growth inhibition of PC-3 and MeWo human cancer cells through modulation of cell cycle and induction of apoptosis. *PLoS ONE*. 5(9): 12644.
- Tang, Y.Q., I.B. Jaganath, R. Manikam, & S.D. Sekaran. 2013. *Phyllanthus* suppresses prostate cancer cell, PC-3, proliferation and induces apoptosis through multiple signalling pathways (MAPKs, PI3K/Akt, NF $\kappa$ B, and

- Hypoxia). *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013: 609581.
- Todoric, J., L. Antonucci, & M. Karin. 2016. Targeting inflammation in cancer prevention and therapy. *Cancer Prev Res.* 9(12):895-905.
- Vaupel, P., M. Höckel, & A. Mayer. 2007. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO<sub>2</sub> histography. *Anti & Redox Sign.* 9(8):1221-1235.
- Vijayashree, R., P. Aruthra & K. Ramesh Rao. 2015. A Comparison of Manual and Automated Methods of Quantitation of Oestrogen/Progesterone Receptor Expression in Breast Carcinoma. *J Clinical Diagnostic Res.* 9(3): EC01-EC05
- Wang, Z., Q.Y. Guo, X.J. Zhang, X. Li, W.T. Li, X.T. Ma & L.J. Ma. 2014. Corilagin attenuates aerosol bleomycin-induced experimental lung injury. *Int J Mol Sci.* 15: 9762-9779.
- Weinberg, R.A. 2014. **The biology of cancer.** Edisi Kedua. Garland Science. New York.
- Welsh, J. 2013. **Animal Models for the Study of Human Disease.** Elsevier. Oregon.
- Yang, B., H. Kang, A. Fung, H. Zhao, T. Wang, & D. Ma. 2014. The role of Interleukin 17 in tumour proliferation, angiogenesis, and metastasis. *Mediators Inflamm.* 2014: 623759
- Zarzynska, J.M. 2014. Two faces of TGF-Beta in breast cancer. *Mediators Inflamm.* 2014: 141747,
- Zhao, L., S.L. Zhang, J.Y. Tao, R. Pang, F. Jin, Y.J. Guo, J.H. Dong, P. Ye, H.Y. Zhao, & G.H. Zheng. 2008. Preliminary exploration on anti-inflammatory mechanism of Corilagin (beta-1-O-galloyl-3,6-(R)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose) in vitro. *Intl Immunopharmaco.* 8(7): 1059–1064.
- Zhao, M., L. Mishra, & Chu-Xia Deng. 2018. The role of TGF- $\beta$ /SMAD4 signaling in cancer. *Intl J Bio Sci.* 14(2): 111-123.
- Zheng, S.J., J.H. Wang, J.D. Gray, H. Soucier, & D.A. Horwitz. 2004. Natural and induced CD4 CD25 cells educate CD4 CD25 cells to develop suppressive activity: The role of IL-2, TGF- $\beta$ , and IL-10. *J Immunol.* 172(9): 5213-5221.



## LAMPIRAN

### LG1. Surat laik etik penelitian



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARENCE"**

No: 1106-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

**PENELITIAN BERJUDUL : MODULASI EKSTRAK MENIRAN HIJAU (*Phyllanthus niruri* L.) TERHADAP SITOKIN TERKAIT INFLAMASI DAN HIPOKSIA PADA MENCIT ( *Mus musculus*) MODEL KANKER PAYUDARA**

**PENELITI : MUHAIMIN RIFA'I**

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

**DINYATAKAN : LAIK ETIK**

Malang, 20 Maret 2019  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Brawijaya



**Prof. Dr. H. Aulanni'am, DES.**  
NIP. 19600903 198802 2 001

## LG2. Surat determinasi keaslian spesies meniran hijau

**PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR**  
**DINAS KESEHATAN**  
**UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICA BATU**  
Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396  
**KOTA BATU 65313**

Nomor : 074/084A/102.7/2019  
Sifat : Biasa  
Perihal : **Determinasi Tanaman Meniran Hijau**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : ABU HANIFAH RAMADHANI  
NIM : 155090107111023  
Fakultas : FAKULTAS MIPA  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanaman meniran

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)  
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)  
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)  
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)  
Kelas : Dicotyledonae  
Bangsa : Geraniales  
Suku : Euphorbiaceae  
Marga : *Phyllanthus*  
Jenis : *Phyllanthus niruri* L.  
Sinonim : *P. alatus* Bl = *P. cantonensis* Hornem. - *P. echinatus* Wall.  
= *P. lepidocarpus* Sieb et Zucc = *P. leprocarpus* Wight.  
Nama Daerah : Child pick a back (Inggris), kilanelli (India), meniran (Jawa), zhen chu cao, ye xia zhu (Cina), gasau madungi (Ternate)

Kunci Determinasi: 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-16b-239a-240b-241b.

2. Morfologi : Habitus: Semak, semusim, tinggi 30-100 m. Batang: Masif, bulat, licin, tak berambut, diameter  $\pm 3$  mm, hijau. Daun: Majemuk, berseling, anak daun 15-24, bulat telur, ujung tumpul, pangkal membulat, panjang  $\pm 1,5$  cm, lebar  $\pm 7$  mm, tepi rata, hijau. Bunga: Tunggal, dekat tangkai anak daun, menggantung, putih, daun kelopak bentuk bintang, benang sari dan putik tidak nampak jelas, mahkota kecil, putih. Biji: Kecil, keras, bentuk ginjal, coklat. Buah: Kotak, bulat, pipih, diameter  $\pm 2$  mm, hijau keunguan. Akar: Tunggang, putih kotor.

3. Nama Simplesia : *Phyllanthi herba* / Herba meniran

4. Kandungan : Mengandung saponin, flavonoid, polifenol, phyllanthin, hipofilantin, kalium, damar, tannin, nirsantin, nirsatralin, linantin, asam linoleat, asam salisilat metal ester, rutin, niruridin, niruretrin, norsecuringin, nirphyllin, isoquercitrin, asam galat, lupeol acetat, asam doktriakontanoat, phyllantenol, cathecin, asam ricinoleat, quercetin, phylletrin, geraniin, asam askorbat, quinon dan alkaloid.

5. Penggunaan : Penelitian.

6. Daftar Pustaka

- Anonim. 2006. *Serial Data Ilmiah Terkini Tumbuhan Obat: Meniran*. BPOM, Jakarta.
- Syamsuhidayat, Sri sugati dan Hutapea, Johny Ria. 1995. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia IV*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 30 Januari 2019  
Kepala UPT Lab. Herbal Materia Medica Batu

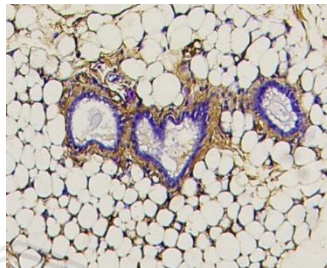
*Mattalene*  
Dr. Husin R.M. Drs. Apt. M.Kes.  
NIP.19611102 199103 1 003

## LG3. Kontrol Immunohistokimia

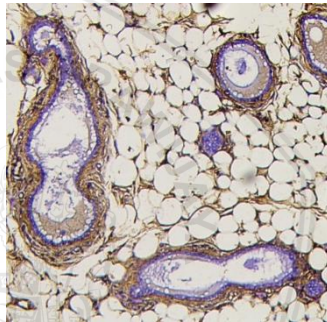
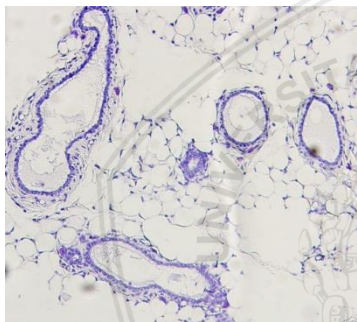
### a) Kontrol Perlakuan

Ab primer (-) Ab sekunder (+)      Ab primer (+) Ab sekunder (+)

HIF-1 $\alpha$



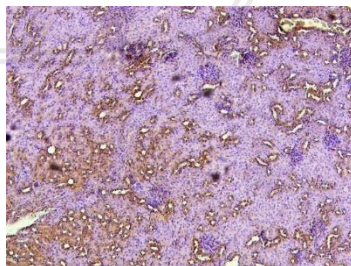
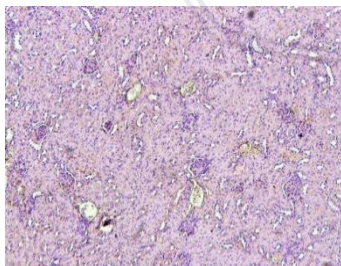
VEGF-A



### b) Kontrol Organ - Ginjal

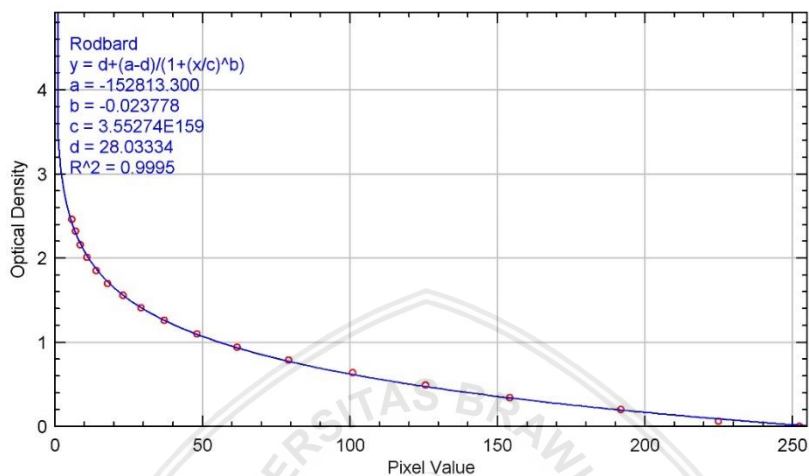
HIF-1 $\alpha$

VEGF-A



## LG4. Kalibrasi Software ImageJ

### a) Kalibrasi *Optical Density* (OD)



### b) Kalibrasi pixel - $\mu\text{m}$

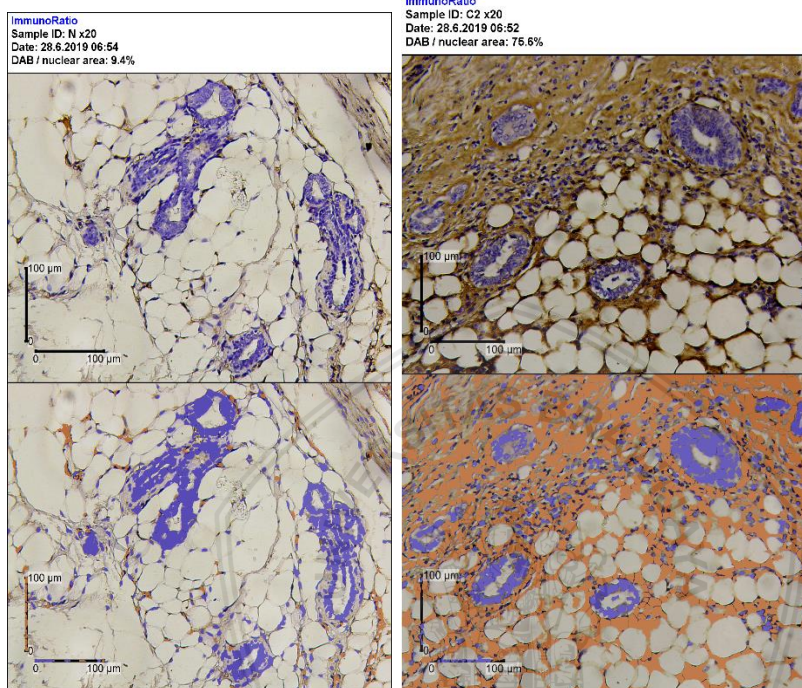
The 'Set Scale' dialog box is shown with the following settings:

- Distance in pixels: 750
- Known distance: 100
- Pixel aspect ratio: 1.0
- Unit of length:  $\mu\text{m}$
- 
- ☒ Global
- Scale: 7.5 pixels/ $\mu\text{m}$
-

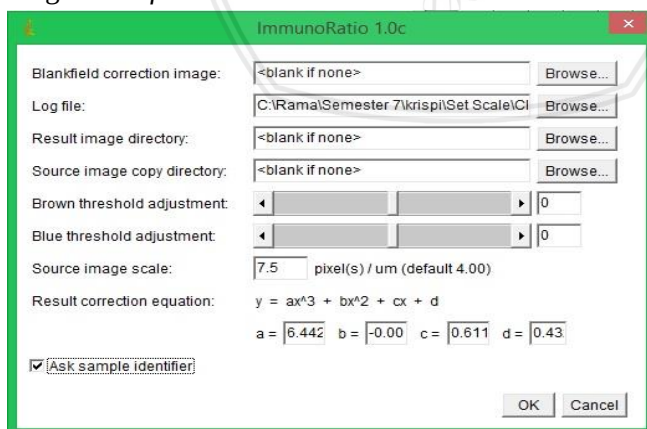


## LG5. Pengujian *proportion score software* Immunoratio.

### a) Hasil skor Immunoratio



### b) Konfigurasi *software* Immunoratio



LT1. Worksheet penghitungan area, OD, dan cell count

a) Area

| No. | Stained area ( $\mu\text{m}^2$ ) | Total area ( $\mu\text{m}^2$ ) | Stained area (%) | Mean | Std. Dev |
|-----|----------------------------------|--------------------------------|------------------|------|----------|
| 1   |                                  |                                |                  |      |          |
| 2   |                                  |                                |                  |      |          |
| 3   |                                  |                                |                  |      |          |

$$\text{Stained area (\%)} = \frac{\text{Stained area } (\mu\text{m}^2)}{\text{Total area } (\mu\text{m}^2)} \times 100$$

b) Optical Density (OD)

| No. | OD Target | OD Background | Final OD | Mean | Std. Dev |
|-----|-----------|---------------|----------|------|----------|
| 1   |           |               |          |      |          |
| 2   |           |               |          |      |          |
| 3   |           |               |          |      |          |

$$\text{Final OD} = \text{OD Target} - \text{OD Background}$$

c) Cell count

| No. | Cell count (%) | Mean | Std. Dev |
|-----|----------------|------|----------|
| 1   |                |      |          |
| 2   |                |      |          |
| 3   |                |      |          |

## LT2. Worksheet Allred score

| <b>Proportion Score</b>   | <b>Intensity score</b>                 | <b>Allred Score</b> | <b>Allred classification</b> |
|---------------------------|----------------------------------------|---------------------|------------------------------|
| 0 = no positive cell      | 0 = <0.762<br>(no color reaction)      | 0-2                 | Negative                     |
| 1 = <1% positive cells    | 1 = 0.762-1.525<br>(mild reaction)     | 3-8                 | Positive                     |
| 2 = 1-10% positive cells  | 2 = 1.525-2.224<br>(moderate reaction) |                     |                              |
| 3 = 11-33% positive cells | 3 = >2.224<br>(intense reaction)       |                     |                              |
| 4 = 34-67% positive cells |                                        |                     |                              |
| 5 = >67% positive cells   |                                        |                     |                              |

Allred score = *Proportion Score* + *Intensity score*



### LT3. Penghitungan Kuantitatif Immunohistokimia

#### a) Uji Kuantitatif HIF-1 $\alpha$

| <b>Kelompok</b> | <b>Area (%)</b>               | <b>Optical Density</b>         | <b>Cell count (%)</b>         |
|-----------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| N               | 11.04 $\pm$ 1.26 <sup>a</sup> | 0.478 $\pm$ 0.042 <sup>a</sup> | 9.64 $\pm$ 2.31 <sup>a</sup>  |
| C               | 49.97 $\pm$ 2.39 <sup>d</sup> | 1.648 $\pm$ 0.047 <sup>c</sup> | 80.66 $\pm$ 4.81 <sup>d</sup> |
| C-D1            | 48.24 $\pm$ 2.98 <sup>d</sup> | 1.586 $\pm$ 0.057 <sup>c</sup> | 78.79 $\pm$ 3.75 <sup>d</sup> |
| C-D2            | 39.06 $\pm$ 1.24 <sup>c</sup> | 1.451 $\pm$ 0.037 <sup>b</sup> | 69.04 $\pm$ 3.92 <sup>c</sup> |
| C-D3            | 35.22 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>  | 1.471 $\pm$ 0.015 <sup>b</sup> | 57.88 $\pm$ 7.76 <sup>b</sup> |

#### b) Uji Kuantitatif VEGF-A

| <b>Kelompok</b> | <b>Area (%)</b>                | <b>Optical Density</b>                      | <b>Cell count (%)</b>         |
|-----------------|--------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------|
| N               | 12.47 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup>  | 0.748 <sup>a</sup> $\pm$ 0.029 <sup>a</sup> | 27.78 $\pm$ 2.52 <sup>a</sup> |
| C               | 54.69 $\pm$ 1.99 <sup>d</sup>  | 1.642 $\pm$ 0.018 <sup>b</sup>              | 81.72 $\pm$ 2.82 <sup>c</sup> |
| C-D1            | 51.96 $\pm$ 2.22 <sup>cd</sup> | 1.631 $\pm$ 0.024 <sup>b</sup>              | 78.9 $\pm$ 2.86 <sup>c</sup>  |
| C-D2            | 46.84 $\pm$ 2.76 <sup>bc</sup> | 1.616 $\pm$ 0.028 <sup>b</sup>              | 72.71 $\pm$ 2.02 <sup>b</sup> |
| C-D3            | 48.59 $\pm$ 2.11 <sup>b</sup>  | 1.63 $\pm$ 0.018 <sup>b</sup>               | 70.88 $\pm$ 2.71 <sup>b</sup> |

#### LT4. Hasil uji ANOVA untuk VEGF-A

**Test of Homogeneity of Variances**

|            | Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------|------------------|-----|-----|------|
| OD         | .452             | 4   | 20  | .770 |
| Area       | 1.226            | 4   | 20  | .331 |
| Cell_Count | .410             | 4   | 20  | .799 |

**ANOVA**

|            |                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|------------|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| OD         | Between Groups | .535           | 4  | .134        | 38.65  | .000 |
|            | Within Groups  | .069           | 20 | .003        |        |      |
|            | Total          | .604           | 24 |             |        |      |
| Area       | Between Groups | 5975.339       | 4  | 1493.835    | 338.43 | .000 |
|            | Within Groups  | 88.280         | 20 | 4.414       |        |      |
|            | Total          | 6063.619       | 24 |             |        |      |
| Cell Count | Between Groups | 9713.747       | 4  | 2428.437    | 358.02 | .000 |
|            | Within Groups  | 135.659        | 20 | 6.783       |        |      |
|            | Total          | 9849.406       | 24 |             |        |      |

LT5. Hasil uji Tukey HSD untuk VEGF-A

**OD**

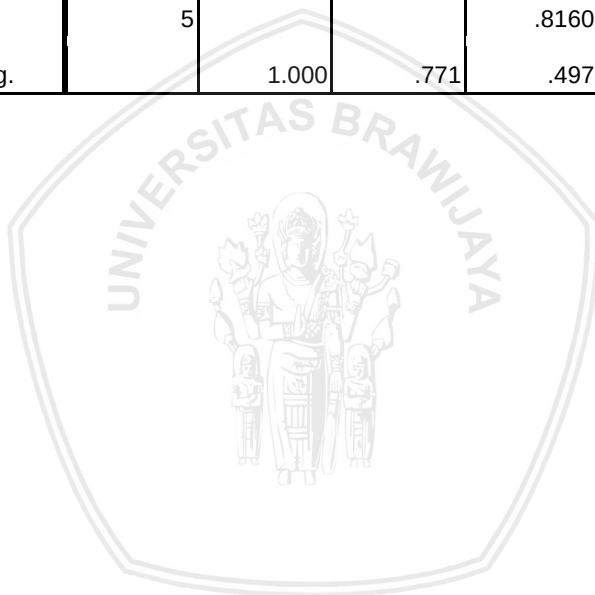
| Perlakuan                | N | Subset for alpha = 0.05 |        |
|--------------------------|---|-------------------------|--------|
|                          |   | 1                       | 2      |
| Tukey HSD <sup>a</sup> N | 5 | .7484                   |        |
| D2                       | 5 |                         | 1.6168 |
| D3                       | 5 |                         | 1.6304 |
| D1                       | 5 |                         | 1.6314 |
| K                        | 5 |                         | 1.6422 |
| Sig.                     |   | 1.000                   | .467   |

**Area**

| Perlakuan                | N | Subset for alpha = 0.05 |       |       |       |
|--------------------------|---|-------------------------|-------|-------|-------|
|                          |   | 1                       | 2     | 3     | 4     |
| Tukey HSD <sup>a</sup> N | 5 | .1240                   |       |       |       |
| D2                       | 5 |                         | .4680 |       |       |
| D3                       | 5 |                         | .4860 | .4860 |       |
| D1                       | 5 |                         |       | .5200 | .5200 |
| K                        | 5 |                         |       |       | .5480 |
| Sig.                     |   | 1.000                   | .703  | .148  | .302  |

Cell\_Count

| Perlakuan              | N  | Subset for alpha = 0.05 |       |       |
|------------------------|----|-------------------------|-------|-------|
|                        |    | 1                       | 2     | 3     |
| Tukey HSD <sup>a</sup> | N  | .2800                   |       |       |
|                        | D3 |                         | .7080 |       |
|                        | D2 |                         | .7280 |       |
|                        | D1 |                         |       | .7880 |
|                        | K  |                         |       | .8160 |
| Sig.                   |    | 1.000                   | .771  | .497  |



LT6. Hasil Uji ANOVA untuk HIF-1 $\alpha$

**Test of Homogeneity of Variances**

|            | Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------|------------------|-----|-----|------|
| OD         | 1.687            | 4   | 20  | .193 |
| Area       | 1.936            | 4   | 20  | .144 |
| Cell_Count | 1.472            | 4   | 20  | .248 |

**ANOVA**

|            |                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|------------|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| OD         | Between Groups | .958           | 4  | .240        | 58.291 | .000 |
|            | Within Groups  | .082           | 20 | .004        |        |      |
|            | Total          | 1.040          | 24 |             |        |      |
| Area       | Between Groups | 4879.489       | 4  | 1219.872    | 331.19 | .000 |
|            | Within Groups  | 73.665         | 20 | 3.683       |        |      |
|            | Total          | 4953.154       | 24 |             |        |      |
| Cell Count | Between Groups | 16997.993      | 4  | 4249.498    | 179.97 | .000 |
|            | Within Groups  | 472.244        | 20 | 23.612      |        |      |
|            | Total          | 17470.236      | 24 |             |        |      |

LT7. Hasil Tukey HSD untuk HIF-1 $\alpha$

OD

| Perlakuan                | N | Subset for alpha = 0.05 |        |        |
|--------------------------|---|-------------------------|--------|--------|
|                          |   | 1                       | 2      | 3      |
| Tukey HSD <sup>a</sup> N | 5 | .4780                   |        |        |
| D2                       | 5 |                         | 1.4510 |        |
| D3                       | 5 |                         | 1.4712 |        |
| D1                       | 5 |                         |        | 1.5860 |
| K                        | 5 |                         |        | 1.6482 |
| Sig.                     |   | 1.000                   | .939   | .172   |

Area

| Perlakuan                | N | Subset for alpha = 0.05 |       |       |       |
|--------------------------|---|-------------------------|-------|-------|-------|
|                          |   | 1                       | 2     | 3     | 4     |
| Tukey HSD <sup>a</sup> N | 5 | .1120                   |       |       |       |
| D3                       | 5 |                         | .3520 |       |       |
| D2                       | 5 |                         |       | .3900 |       |
| D1                       | 5 |                         |       |       | .4820 |
| K                        | 5 |                         |       |       | .5000 |
| Sig.                     |   | 1.000                   | 1.000 | 1.000 | .537  |

Cell count

| Perlakuan                     | N | Subset for alpha = 0.05 |         |         |         |
|-------------------------------|---|-------------------------|---------|---------|---------|
|                               |   | 1                       | 2       | 3       | 4       |
| Tukey HSD <sup>a</sup> Normal | 5 | 9.6560                  |         |         |         |
| CD2                           | 5 |                         | 57.8780 |         |         |
| CD3                           | 5 |                         |         | 69.0400 |         |
| CD1                           | 5 |                         |         |         | 78.7940 |
| C                             | 5 |                         |         |         | 80.6640 |
| Sig.                          |   | 1.000                   | 1.000   | 1.000   | .549    |



LT8. Hasil uji ANOVA untuk sitokin inflamasi

**Test of Homogeneity of Variances**

|      | Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------|------------------|-----|-----|------|
| TGFb | 2.245            | 4   | 20  | .100 |
| IL6  | .265             | 4   | 20  | .897 |
| IL17 | .791             | 4   | 20  | .545 |

**ANOVA**

|                     | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|---------------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| TGFb Between Groups | 3.700          | 4  | .925        | 27.578 | .000 |
| Within Groups       | .671           | 20 | .034        |        |      |
| Total               | 4.371          | 24 |             |        |      |
| IL6 Between Groups  | 16.709         | 4  | 4.177       | 26.269 | .000 |
| Within Groups       | 3.180          | 20 | .159        |        |      |
| Total               | 19.890         | 24 |             |        |      |
| IL17 Between Groups | 3.627          | 4  | .907        | 43.124 | .000 |
| Within Groups       | .421           | 20 | .021        |        |      |
| Total               | 4.047          | 24 |             |        |      |

LT9. Hasil uji Tukey HSD untuk sitokin inflamasi

**TGFb**

| Perlakuan                    | N | Subset for alpha = 0.05 |        |        |
|------------------------------|---|-------------------------|--------|--------|
|                              |   | 1                       | 2      | 3      |
| Tukey HSD <sup>a</sup> Sehat | 5 | 1.1160                  |        |        |
| Dosis 3                      | 5 |                         | 1.6820 |        |
| Dosis 2                      | 5 |                         | 1.9280 | 1.9280 |
| Sakit                        | 5 |                         |        | 2.1240 |
| Dosis 1                      | 5 |                         |        | 2.1700 |
| Sig.                         |   | 1.000                   | .249   | .263   |

**IL6**

| Perlakuan                    | N | Subset for alpha = 0.05 |        |        |        |
|------------------------------|---|-------------------------|--------|--------|--------|
|                              |   | 1                       | 2      | 3      | 4      |
| Tukey HSD <sup>a</sup> Sehat | 5 | 5.1480                  |        |        |        |
| Dosis 3                      | 5 |                         | 6.1080 |        |        |
| Dosis 2                      | 5 |                         | 6.5360 | 6.5360 |        |
| Dosis 1                      | 5 |                         |        | 6.9600 | 6.9600 |
| Sakit                        | 5 |                         |        |        | 7.5740 |
| Sig.                         |   | 1.000                   | .458   | .467   | .147   |

IL17

| Perlakuan                 |         | N | Subset for alpha = 0.05 |        |        |   |   |
|---------------------------|---------|---|-------------------------|--------|--------|---|---|
|                           |         |   | 1                       | 2      | 3      | 4 | 5 |
| Tukey<br>HSD <sup>a</sup> | Sehat   | 5 | 1.0560                  |        |        |   |   |
|                           | Dosis 3 | 5 | 1.2480                  |        |        |   |   |
|                           | Dosis 2 | 5 |                         | 1.6240 |        |   |   |
|                           | Dosis 1 | 5 |                         | 1.8640 | 1.8640 |   |   |
|                           | Sakit   | 5 |                         |        | 2.0880 |   |   |
|                           | Sig.    |   | .261                    | .105   | .145   |   |   |

