



**PENGARUH PEMBERIAN TEPUNG TEMPE KEDELAI TERHADAP
PROLIFERASI SEL PADA TUMOR KELENJAR MAMMAE MENCIT
STRAIN C3H**

SKRIPSI

Oleh
CHINTIA DWI RATNA KUSUMADEWI
NIM 101810401037

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**PENGARUH PEMBERIAN TEPUNG TEMPE KEDELAI TERHADAP
PROLIFERASI SEL PADA TUMOR KELENJAR MAMMAE MENCIT
STRAIN C3H**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (SI)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

CHINTIA DWI RATNA KUSUMADEWI
NIM 101810401037

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang dengan petunjuk, rahmat, ridho, tuntunan serta limpahan kasih-Nya memberikan kemudahan, mengajarku arti dan kekuatan dalam hidup;
2. Papa Hari Kusumahadi, S.E dan Mama Eny Sulistiana, S.Pd tercinta, Beliau berdua segalanya bagiku, terima kasih atas segala dorongan, motivasi, semangat dan doanya;
3. Bapak dan ibu guru di TK Kartini Paiton Probolinggo, SD Sukodadi 02 Paiton Probolinggo, SLTPN 1 Kraksaan, SMA Tunas Luhur Paiton Probolinggo dan Universitas Jember yang telah memberikan ilmu dan membimbing dengan penuh kesabaran;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember semoga skripsi ini bermanfaat.

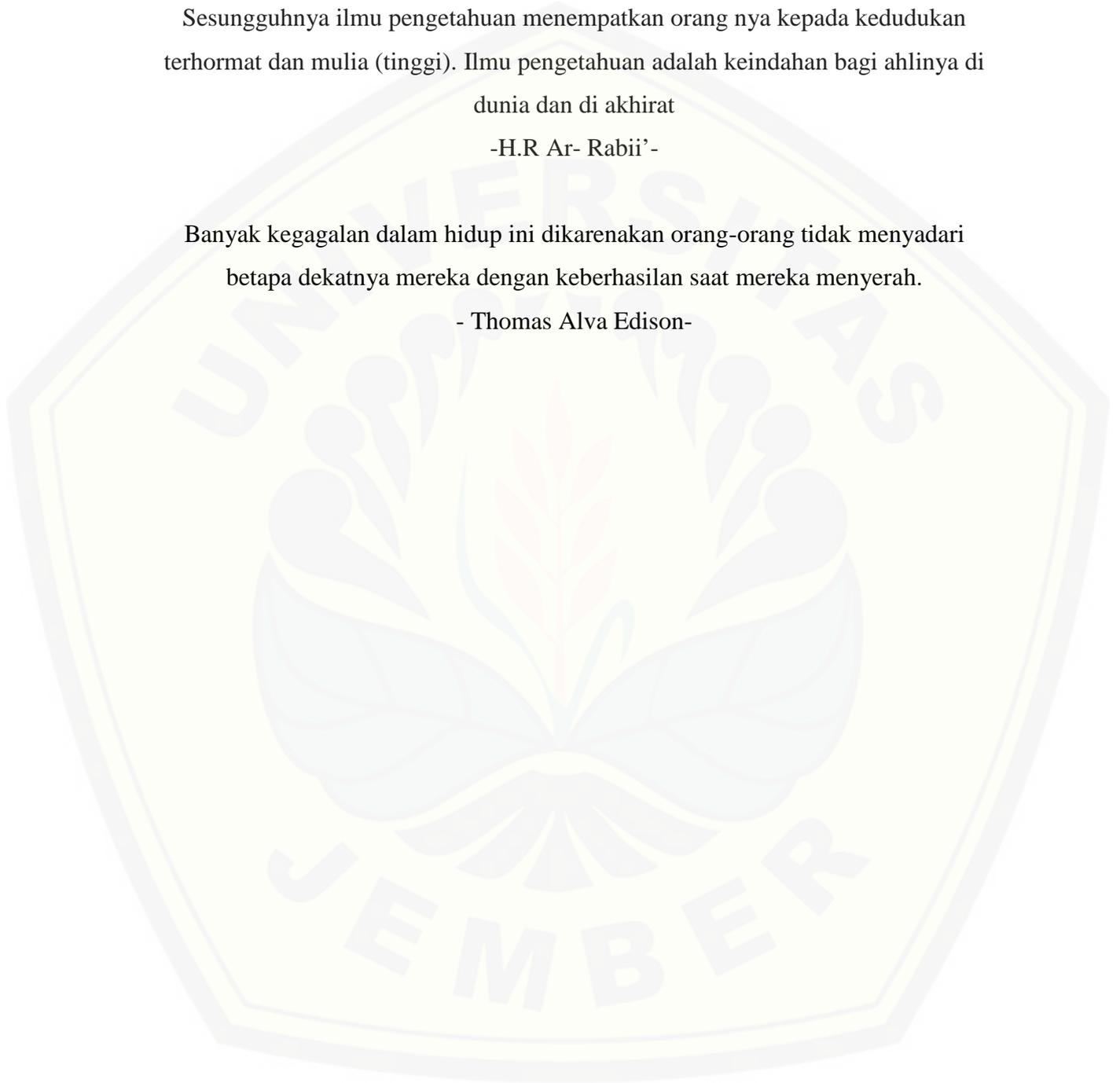
MOTTO

Sesungguhnya ilmu pengetahuan menempatkan orang nya kepada kedudukan terhormat dan mulia (tinggi). Ilmu pengetahuan adalah keindahan bagi ahlinya di dunia dan di akhirat

-H.R Ar- Rabii'-

Banyak kegagalan dalam hidup ini dikarenakan orang-orang tidak menyadari betapa dekatnya mereka dengan keberhasilan saat mereka menyerah.

- Thomas Alva Edison-



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Chintia Dwi Ratna Kusumadewi

Nim : 101810401037

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul : “Pengaruh Pemberian Tepung Tempe Kedelai Terhadap Proliferasi Sel Pada Tumor Kelenjar Mammae Mencit Strain C3H” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi. Penelitian ini dibiayai program Hibah Bersaing atas nama Dra. Mahriani, M.Si.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 30 Juni 2015

Yang menyatakan

Chintia Dwi Ratna Kusumadewi

101810401037

SKRIPSI

**Pengaruh Pemberian Tepung Tempe Kedelai Terhadap Proliferasi Sel
Kanker Kelenjar Mammae Pada Mencit Strain C3H**

Oleh

Chintia Dwi Ratna Kusumadewi

NIM 101810401037

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dra. Mahriani, M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : Eva Tyas Utami, S.Si., M.Si

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Pemberian Tepung Tempe Kedelai Terhadap Proliferasi Sel Pada Tumor Kelenjar Mammae Mencit Strain C3H” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada :

Hari/Tanggal :

Tempat : Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan

Alam Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua,

Sekretaris,

Dra. Mahriani, M.Si
NIP 195703151987022001

Eva Tyas Utami, S.Si.,M.Si
NIP 197306012000032001

Anggota I,

Anggota II,

Dr. Hidayat Teguh W., M.Pd
NIP 195805281988021001

Dra. Susantin Fajariyah, M.Si
NIP 196411051989022001

Mengesahkan,

Dekan,

Prof. Drs. Kusno DEA., Ph. D
NIP 196101081986021001

RINGKASAN

Pengaruh Pemberian Tepung Tempe Kedelai Terhadap Proliferasi Sel Pada Tumor Kelenjar Mammae Mencit Strain C3H; Chintia Dwi Ratna Kusumadewi, 101810401037; 2015; 44 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Kanker kelenjar mammae atau kanker payudara merupakan salah satu kanker yang sering menyebabkan kematian pada wanita. Di Indonesia, kanker payudara merupakan kanker yang paling ganas kedua pada wanita setelah kanker serviks. Sampai saat ini upaya pengobatan kanker payudara masih memerlukan banyak biaya dan hasilnya kurang optimal sehingga cara yang lebih baik untuk mengatasi kanker payudara adalah melalui upaya pencegahan. Salah satu upaya pencegahan kanker payudara dapat dilakukan dengan cara konsumsi bahan alami yang mengandung senyawa isoflavon, yaitu tempe kedelai. Salah satu senyawa isoflavon pada tempe kedelai yang berpotensi sebagai antikanker adalah genistein. Genistein diduga memiliki efek antiproliferatif pada pertumbuhan sel kanker payudara dan dapat digunakan dalam pencegahan kanker payudara. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian tepung tempe kedelai terhadap proliferasi sel kanker kelenjar mammae pada mencit strain C3H.

Salah satu cara pengamatan proliferasi sel kanker dapat dilakukan dengan pengamatan AgNOR. Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu pembuatan tepung tempe kedelai dan pemeliharaan hewan mencit strain C3H sebanyak 18 ekor yang dibagi menjadi 6 kelompok yaitu kelompok K- (mencit kontrol normal tanpa perlakuan tepung tempe dan tanpa inokulasi tumor), K+ (mencit kontrol tanpa perlakuan tepung tempe tetapi diinokulasi tumor), kelompok D1 (0,8 g tepung tempe dan diinokulasi tumor), D2 (1,6 g tepung tempe dan diinokulasi tumor), D3 (2,4 g tepung tempe dan diinokulasi tumor), D4 (3,2 g tepung tempe dan diinokulasi tumor). Pemberian tepung tempe kedelai dilakukan secara *gavage* selama 16 hari sebanyak 1 ml. Pada hari ke-17 dilakukan inokulasi bubuk tumor pada bagian aksila kanan bawah mencit strain C3H. Selanjutnya mencit dipelihara hingga terbentuk tumor kemudian pada hari ke-42 dilakukan

nekropsi mencit dan pengambilan jaringan tumor. Jaringan tumor tersebut kemudian dilakukan pengecatan AgNOR. Parameter pengamatan AgNOR terdiri atas 2 yaitu mAgNOR yang berhubungan dengan transkripsi gen dan pAgNOR yang berhubungan dengan aktifitas proliferasi sel.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian tepung tempe kedelai sebelum inokulasi bubur tumor sudah dapat menghambat proliferasi sel kanker kelenjar mammae mencit C3H pada dosis 0,8 gram, dengan penghambatan paling besar pada dosis 1,6 gram. Namun pada pemberian tepung tempe kedelai dengan dosis 3,2 gram cenderung meningkatkan proliferasi sel kanker kelenjar mammae mencit C3H.

PRAKATA

Syukur Alhamdulillah kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, nikmat dan karunia-Nya, sehingga skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Tepung Tempe Kedelai Terhadap Proliferasi Sel Pada Tumor Kelenjar Mammae Mencit Strain C3H” dapat diselesaikan. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Skripsi ini tidak mungkin terwujud tanpa adanya bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada beberapa pihak, yang membantu terselesaikannya skripsi ini.

1. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, M.Si selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Dra. Mahriani, M.Si selaku Dosen Pembimbing Utama dan Eva Tyas Utami, S.Si.,M.Si selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah bersedia membiayai penelitian ini serta dengan sabar memberikan bimbingan kepada penulis;
3. Dr. Hidayat Teguh W., M.Pd selaku Dosen Penguji I dan Dra. Susantin Fajariyah, M.Si selaku Dosen Penguji II yang telah banyak memberikan saran dan kritik membangun dalam skripsi penulis;
4. Drs. Siswanto, M.Si selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah banyak memberikan saran dan dengan sabar mengarahkan serta memberi masukan dalam aktivitas perkuliahan penulis;
5. Seluruh staf pengajar Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu;
6. dr. Hanggoro dan para teknisi di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada, yang telah membantu selama proses penelitian.

7. Orang tuaku, Papa Hari Kusumahadi, S.E dan Mama Eny Sulistiana, S.Pd terima kasih atas semangat, pengorbanan, dukungan berupa apapun, doa yang tiada henti-hentinya, semoga Allah selalu melindungi, menyayangi dan menyetatkan papa mama;
8. Mbak dan adikku tersayang, Amelia Kusuma Krisnadewi, S.Farm dan Kresna Trikusuma Anggara terima kasih selalu memberikan semangat, kasih sayang dan doanya;
9. Mama Kun dan Papa Totok, terima kasih atas semangat, kasih sayang dan doa yang diberikan kepada penulis;
10. Sahabat-sahabatku Maya, Elisa, dan Ulyc terima kasih buat bantuan, doanya dan dorongan semangatnya;
11. Teman-teman angkatan 2010, terima kasih atas kebaikan, kenangan dan kebersamaan yang kalian berikan;
12. Serta seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu terima kasih atas bantuannya selama ini.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan pada tulisan yang telah disusun sehingga penulis menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini bermanfaat dan Allah senantiasa memberikan berkah kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian tulisan ini.

Jember, 30 Juni 2015

Penulis

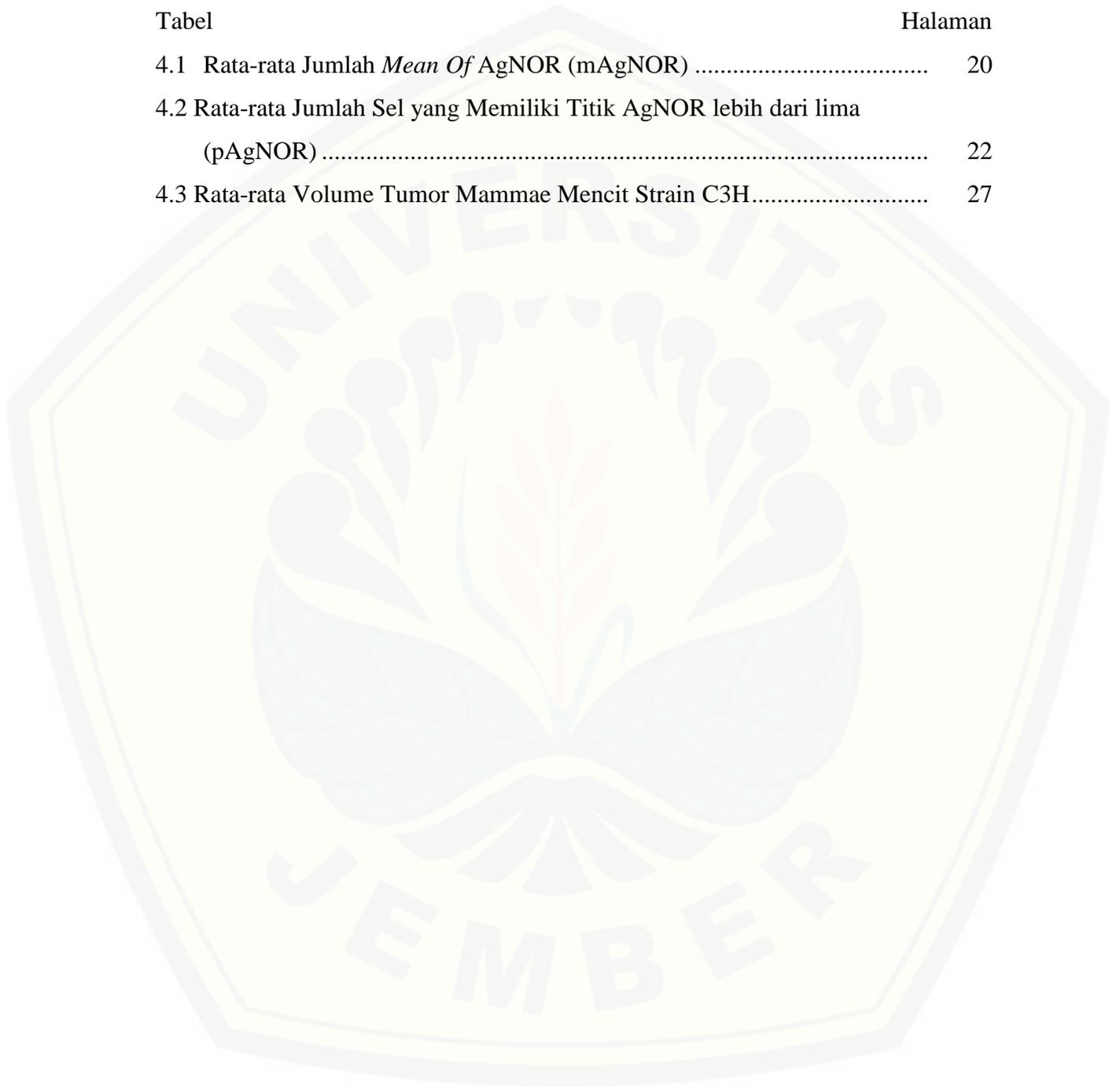
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	ix
DARTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Struktur Kelenjar Mammae	4
2.2 Siklus Sel Normal dan Karsinogenesis.....	5
2.3 Proliferasi Sel Melalui Jalur Transduksi Sinyal.....	8
2.4 Nucleolar Organizer Regions (NORs).....	9
2.5 Kandungan Isoflavon Pada Tempe Kedelai	10
2.6 Pengaruh Isoflavon Terhadap Kanker Payudara	12
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	14
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	14

3.2	Alat dan Bahan	14
3.3	Rancangan Penelitian.....	15
3.4	Prosedur Penelitian	15
	3.4.1 Pemeliharaan Hewan Uji	15
	3.4.2 Pembuatan Tepung Tempe Kedelai	16
	3.4.3 Penentuan Dosis dan Aplikasi Perlakuan.....	16
	3.4.4 Pembuatan dan Inokulasi Bubur Tumor pada Hewan Uji.....	16
	3.4.5 Pengecatan AgNOR	17
	3.4.6 Parameter yang Diamati.....	18
3.5	Analisis Data	19
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	20
4.1	Pengaruh Tepung Tempe Kedelai Terhadap Aktivitas Proliferasi Sel Kanker Kelenjar Mammae.....	20
4.2	Pengaruh Tepung Tempe Kedelai Terhadap Volume Tumor dan Hubungannya dengan Jumlah AgNOR	27
BAB 5.	PENUTUP.....	30
5.1	Kesimpulan	30
5.2	Saran.....	30
DAFTAR PUSTAKA		31
LAMPIRAN		37

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rata-rata Jumlah <i>Mean Of</i> AgNOR (mAgNOR)	20
4.2 Rata-rata Jumlah Sel yang Memiliki Titik AgNOR lebih dari lima (pAgNOR)	22
4.3 Rata-rata Volume Tumor Mammae Mencit Strain C3H.....	27



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur histologis kelenjar mammae pada mamalia.....	5
2.2 Peran Siklin, Kinase Dependen-Siklin (CDK), dan Inhibitor CDK dalam siklus sel.....	6
2.3 Enam ciri utama kanker.....	8
2.4 Struktur kimia Daidzein dan Genistein yang terdapat pada tempe serta struktur kimia Estradiol.....	11
4.1 Rata-rata jumlah mAgNOR.....	21
4.2 Jumlah Sel lebih dari 5 titik AgNOR (pAgNOR).....	22
4.3 Sel kelenjar mammae yang telah diwarnai dengan pewarnaan AgNOR	23
4.4 Volume Tumor Mammae Mencit Strain C3H Antar Perlakuan.....	28
4.5 Grafik Perbandingan Antara Volume Tumor Mammae Mencit Strain C3H Dengan Jumlah pAgNOR	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran A. Penentuan Dosis	37
Lampiran B. Rumus Perhitungan Pengecatan AgNOR	38
Lampiran C. Tabel Data Jumlah <i>Mean Of</i> AgNOR (mAgNOR).....	39
Lampiran D. Hasil uji Statistik <i>Oneway</i> ANOVA Jumlah mAgNOR.....	40
Lampiran E. Tabel Data Jumlah Indeks Proliferatif AgNOR (pAgNOR)	41
Lampiran F. Hasil Uji Statistik <i>Oneway</i> ANOVA Jumlah pAgNOR.....	42
Lampiran G. Tabel Data Volume Tumor Mencit C3H.....	43
Lampiran H. Hasil Uji Statistik <i>Oneway</i> ANOVA Terhadap Volume Tumor	44

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker kelenjar mammae atau kanker payudara merupakan salah satu kanker yang sering menyebabkan kematian pada wanita. Di Indonesia, kanker payudara merupakan kanker yang paling ganas kedua pada wanita setelah kanker serviks (Rahmawati *et al.*, 2006). Menurut hasil pendataan kanker di Jakarta, pada tahun 2005 hingga 2007 kanker payudara menempati urutan pertama yang paling sering terjadi pada wanita dengan kejadian 18,6 per 100.000 (Wahidin *et al.*, 2012).

Kanker payudara umumnya berasal dari sel-sel epitel yang mengalami mutasi genetik (Hondermarck, 2003). Mutasi ini diduga sebagai akibat dari infeksi virus, radiasi dan berbagai paparan bahan kimia. Mutasi genetik tersebut menyebabkan adanya ketidakseimbangan antara proliferasi dan apoptosis sel (Kresno, 2011). Sel yang mengalami kegagalan apoptosis dapat menyebabkan proliferasi yang tidak terkontrol. Proliferasi sel merupakan peningkatan jumlah sel sebagai hasil pertumbuhan dan pembelahan sel (Hyland, 2014). Sel normal dapat berproliferasi apabila terdapat rangsangan seperti faktor pertumbuhan sedangkan proliferasi sel kanker tidak hanya bergantung pada faktor pertumbuhan karena dapat menghasilkan sinyal pertumbuhan sendiri (Kresno, 2011; Robbins *et al.*, 2007). Mutasi pada gen yang mengendalikan siklus sel juga dapat menyebabkan timbulnya kanker (Robbins *et al.*, 2007).

Sampai saat ini upaya pengobatan kanker payudara masih dilakukan secara kuratif seperti pembedahan, kemoterapi, dan radioterapi. Namun cara pengobatan tersebut memerlukan banyak biaya dan hasilnya kurang optimal. Selain itu, cara pengobatan tersebut juga sering menimbulkan efek samping yaitu rusaknya sel-sel normal (Yudissanta dan Ratna, 2012). Oleh karena itu, cara yang lebih baik untuk mengatasi kanker payudara adalah melalui upaya pencegahan (McPherson *et al.*, 2000).

Salah satu upaya penghambatan kanker payudara dapat dilakukan dengan cara konsumsi bahan alami yang mengandung senyawa isoflavon. Menurut *American Institute for Cancer Research* (2013), konsumsi bahan-bahan alami yang mengandung isoflavon dapat mengurangi resiko kanker. Salah satunya dengan konsumsi tempe dari biji kedelai yang banyak mengandung isoflavon (Nakajima *et al.*, 2005). Tempe kedelai merupakan produk olahan biji kedelai yang diharapkan dapat mencegah kanker payudara karena mempunyai kandungan isoflavon yang lebih tinggi dibandingkan dengan biji kedelai (Yan *et al.*, 2009).

Isoflavon termasuk dalam kelompok fitoestrogen yang merupakan senyawa fenolik aktif dari tumbuhan yang secara struktural mirip dengan estrogen pada mamalia, 17 -estradiol (Mense *et al.*, 2008; Sabatier *et al.*, 2003). Salah satu senyawa isoflavon yang berpotensi sebagai antikanker adalah genistein (Lamartiniere, 2000). Genistein memiliki efek antiproliferatif pada pertumbuhan sel kanker payudara dan dapat digunakan dalam pencegahan kanker payudara (Sabatier *et al.*, 2003). Pemberian genistein sebesar 100 $\mu\text{M/L}$ terbukti dapat menghambat Protein Tirosin Kinase (PTK) pada sel MCF-7, khususnya aktivasi reseptor faktor pertumbuhan epidermal yang penting dalam mengatur proliferasi dan apoptosis sel (Duffy *et al.*, 2007; Polkowski dan Mazurek, 2000).

Mekanisme pencegahan kanker payudara oleh genistein pada tempe kedelai salah satunya dapat melalui penghambatan proliferasi sel kanker. Proliferasi sel yang tidak terkendali dapat menimbulkan kanker sehingga perlu dilakukan pengamatan proliferasi sel. Salah satu cara pengamatan proliferasi sel kanker dapat dilakukan dengan pengecatan AgNOR. Berdasarkan uraian latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian tepung tempe kedelai terhadap proliferasi sel kanker kelenjar mammae pada mencit strain C3H.

1.2 Rumusan masalah

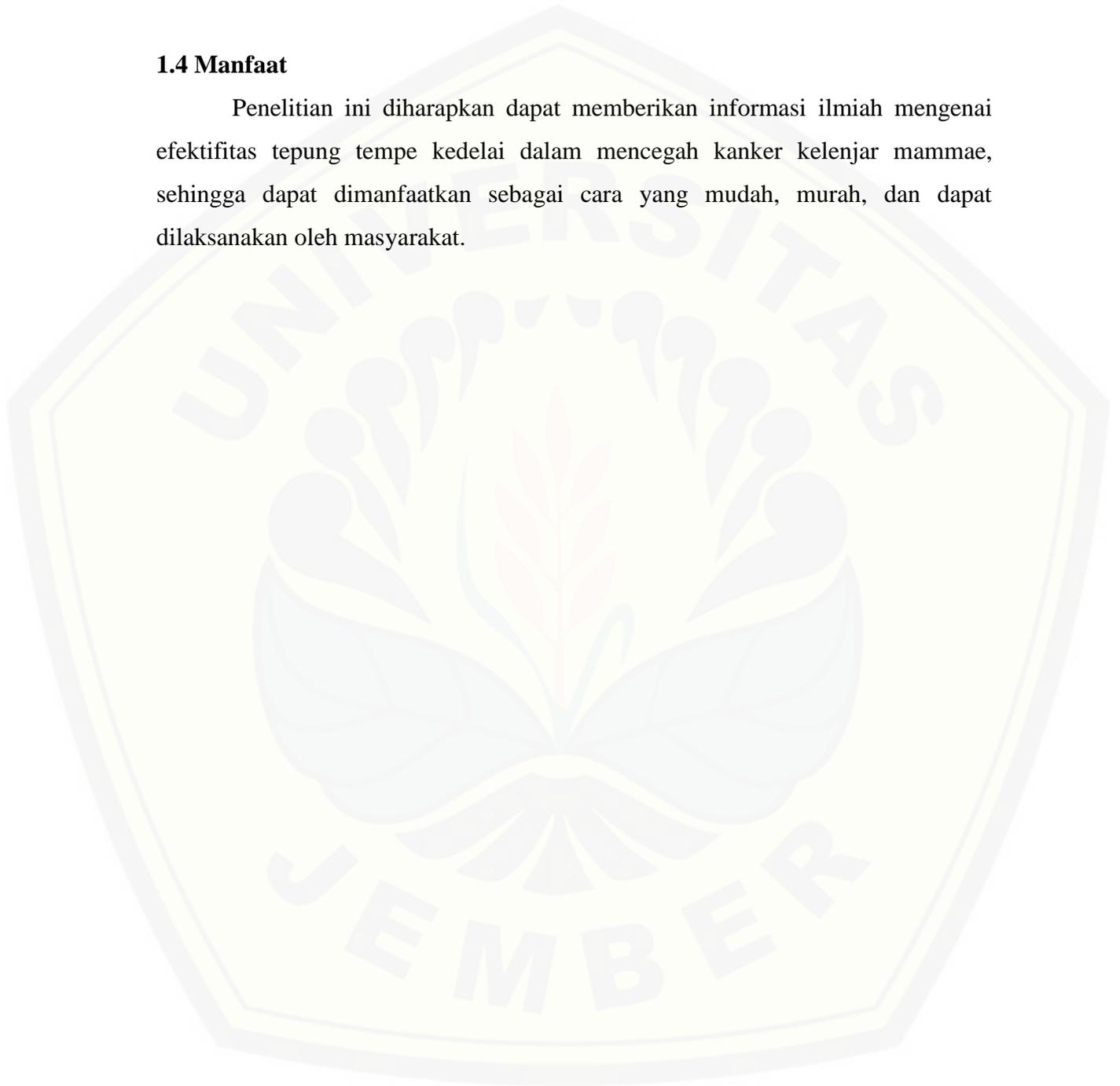
Apakah pemberian tepung tempe kedelai berpengaruh terhadap proliferasi sel pada tumor kelenjar mammae mencit strain C3H?

1.3 Tujuan

Untuk mengetahui pengaruh pemberian tepung tempe kedelai terhadap proliferasi sel pada tumor kelenjar mammae mencit strain C3H.

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai efektifitas tepung tempe kedelai dalam mencegah kanker kelenjar mammae, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai cara yang mudah, murah, dan dapat dilaksanakan oleh masyarakat.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Struktur Kelenjar Mammae

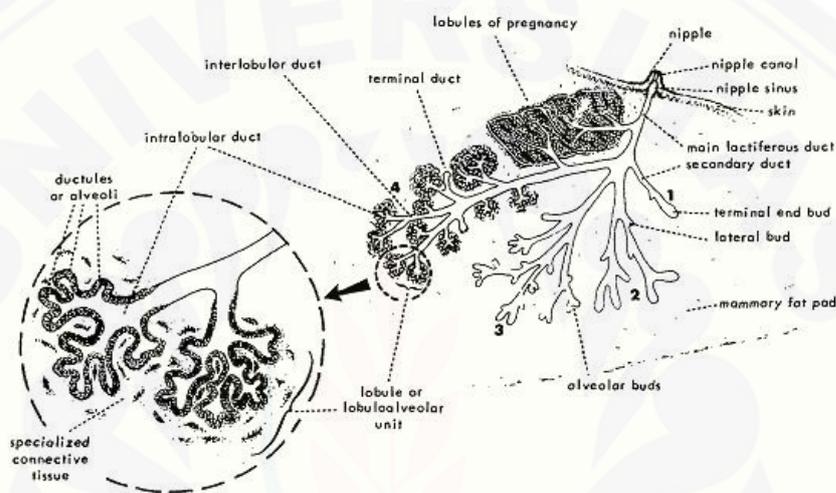
Perkembangan dan struktur kelenjar mammae berkaitan dengan perkembangan kulit di sekitar papilla mamaria. Fungsi utama kelenjar mammae ini adalah mensekresikan air susu. Kelenjar mammae pada laki-laki dan perempuan identik hingga masa pubertas. Sebelum pubertas, kelenjar mammae ini masih belum berkembang (Price dan Wilson, 1995).

Saat pubertas, hormon progesteron dan estrogen di ovarium menginduksi perkembangan lebih lanjut pada kelenjar mammae wanita dengan munculnya terminal duktus dan lobulus. Kelenjar mammae merupakan kelenjar tubuloalveolar yang terdiri atas 15 sampai 20 lobus, pada setiap lobus terdapat bagian yang melebar dari saluran laktiferus, yang dikenal sebagai sinus laktiferus. Sinus laktiferus ini akan berujung pada papilla mamaria (Gartner dan Hiatt, 2011). Papilla mamaria atau puting merupakan tonjolan berpigmen yang dikelilingi oleh areola (Price dan Wilson, 1995).

Sel-sel yang membentuk duktus dan lobulus adalah sel epitel yang berfungsi untuk memproduksi dan mensekresi air susu. Sel-sel epitel ini dikelilingi oleh lapisan sel mioepitel, yang melekat pada membran basal, yang berperan untuk mempertahankan struktur tubular dari duktus dan lobulus. Pada sekitar lobulus dan duktus terdapat jaringan ikat dan lemak yang terdiri dari fibroblast dengan banyak matriks ekstraseluler. Selain itu, juga terdapat pembuluh darah, pembuluh getah bening, dan serabut saraf, terutama sensorik dan simpatik pada kelenjar mammae (Hondermarck, 2003).

Kelenjar mammae pada mamalia dan manusia secara histologis memiliki kemiripan. Pada mamalia, kelenjar mammae diklasifikasikan sebagai kelenjar tubuloalveolar. Di dalam kelenjar mammae terdapat bagian terminal sekretorik berbentuk tidak teratur dan bercabang sebagai tubulus dengan berbagai saluran duktus atau alveoli. Duktus membentuk gugusan kompak berupa saluran kecil,

yaitu saluran terminal intralobular, dan seluruh struktur ini disebut sebagai lobulus atau unit lobuloalveolar. Saluran di antara lobulus adalah saluran interlobular. Saluran interlobular dari banyak lobulus bersatu untuk membentuk saluran yang lebih besar yaitu saluran laktiferus. Lobulus dan saluran duktus dari kelenjar mammae tertanam dalam jaringan adiposa atau jaringan lemak (Zwieten, 1984). Struktur histologis kelenjar mammae pada mamalia dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Struktur histologis kelenjar mammae pada mamalia (Zwieten, 1984)

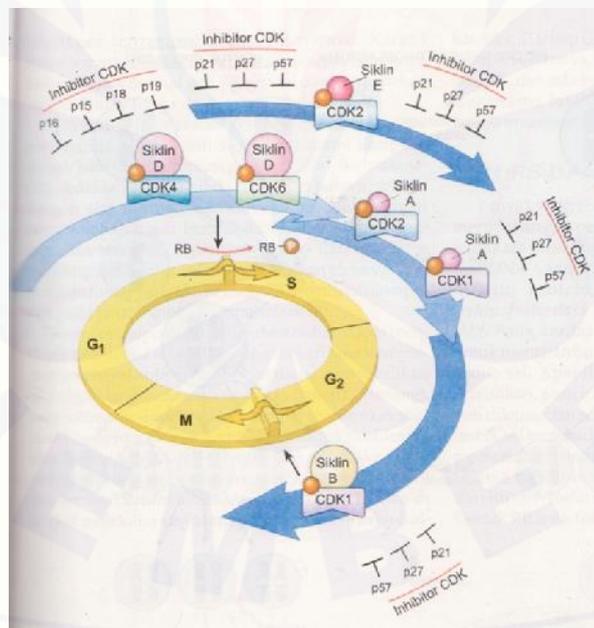
2.2 Siklus Sel Normal dan Karsinogenesis

Siklus sel terdiri atas 4 fase yang terjadi secara berurutan yaitu fase G1 (gap 1), fase S (sintesis DNA), fase G2 (gap 2) dan fase M (mitosis/meiosis). Fase G1 dan G2 merupakan fase pertumbuhan sel yang di dalam fase tersebut terjadi metabolisme sel untuk persiapan pada fase selanjutnya. Sedangkan fase S merupakan tahapan untuk replikasi DNA dan fase M merupakan fase pemisahan kromosom dan pembelahan sel (Kresno, 2011; Satuman dan Fatmawati, 2009).

Siklus sel dipengaruhi oleh faktor intraseluler dan faktor ekstraseluler. Beberapa faktor ekstraseluler yang mempengaruhi siklus sel yaitu faktor pertumbuhan, komunikasi sel dan faktor nutrisi. Sedangkan salah satu faktor intraseluler yang penting dalam siklus sel adalah *Cyclin Dependent Kinase* atau CDK (Kresno, 2011; Satuman dan Fatmawati, 2009). Regulasi siklus sel

dikendalikan oleh CDK melalui ikatan dengan kelompok protein yang disebut siklin. Ikatan antara siklin dan CDK dalam siklus sel menyebabkan fosforilasi berbagai protein sasaran yang penting dalam siklus sel (Robbins *et al.*, 2007).

Apabila terdapat sinyal pertumbuhan, maka akan menyebabkan stimulasi sel untuk memasuki siklus sel pada fase G₁ dan terjadi ekspresi siklin D. Kadar siklin D yang meningkat menyebabkan CDK4 dan CDK6 menjadi aktif. Tahapan ini dipertahankan oleh protein retinoblastoma (pRB). Fosforilasi pRB yang ditimbulkan oleh ikatan siklin-CDK dapat melepaskan faktor transkripsi E2F sehingga sel dapat memasuki fase S dalam siklus sel. Pada fase S sel akan melakukan replikasi DNA dan terjadi ekspresi siklin A. Peningkatan (*upregulation*) siklin A yang berikatan dengan CDK2 dan CDK1 akan melanjutkan sel menuju fase G₂. Kemudian pada fase awal G₂, siklin B membentuk kompleks dengan CDK1. Ikatan siklin B dengan CDK1 menyebabkan sel untuk masuk ke fase M (Satuman dan Fatmawati, 2009). Proses siklus sel normal dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Peran Siklin, Kinase Dependensi-Siklin (CDK), dan Inhibitor CDK dalam siklus sel (Robbins *et al.*, 2007)

Kegagalan keakuratan replikasi DNA akan menyebabkan akumulasi mutasi dan transformasi sel. Apabila gen yang mengendalikan siklus sel

mengalami gangguan pengaturan akibat mutasi, maka dapat menyebabkan timbulnya kanker. Kesalahan pada ekspresi siklin D atau CDK4 diduga lebih sering terjadi pada transformasi neoplastik. Gen siklin D mengalami ekspresi berlebihan di beberapa kanker, khususnya kanker payudara (Robbins *et al.*, 2007).

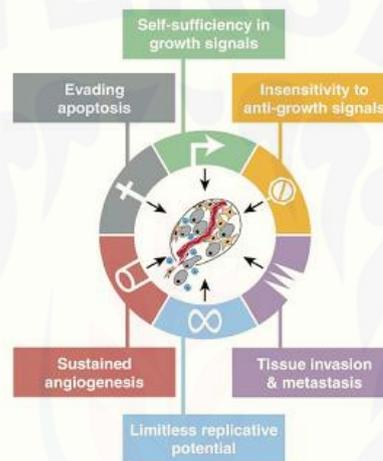
Kanker payudara pada umumnya berasal dari sel-sel epitel yang mengalami mutasi genetik (Hondermarck, 2003). Mutasi ini diduga sebagai akibat dari infeksi virus, radiasi dan berbagai paparan bahan kimia. Terjadinya mutasi gen ini akan menyebabkan ketidakseimbangan antara apoptosis dan proliferasi sel. Proliferasi sel yang tidak terkendali akan menimbulkan kanker. Perkembangan kanker atau karsinogenesis memerlukan serangkaian perubahan yang bertahap hingga berakhir dengan kehilangan kontrol pertumbuhan (Kresno, 2011).

Pada umumnya terdapat dua kelompok gen yang terkait dengan kanker yaitu: proto-onkogen dan gen penekan tumor (*Tumor Suppressor Genes/TSG*). Terjadinya perubahan pada proto-onkogen dan *tumor suppressor gene* dapat menyebabkan terjadinya kanker payudara. Proto-onkogen yaitu gen penghasil protein yang secara normal menstimulir pembelahan sel atau menghambat proses kematian sel normal. Proto-onkogen ini dapat mengalami mutasi dan teraktivasi menjadi onkogen. Terjadinya mutasi pada TSG ini akan menyebabkan hilangnya penghambatan proliferasi sel. Terdapat dua protein yang berfungsi sebagai penekan tumor yaitu p53 dan pRB. Apabila keduanya mengalami mutasi, maka akan menyebabkan proliferasi sel tidak terkontrol dan mengakibatkan timbulnya tumor (Robbins *et al.*, 2007; *International Agency for Research on Cancer*, 2008).

Tahapan pembentukan kanker terbagi menjadi tiga tahap yaitu inisiasi, promosi dan progresi (Devi, 2004). Inisiasi merupakan proses perubahan sel normal menjadi sel yang terinisiasi untuk berubah (*transformed*). Pada tahap inisiasi terjadi mutasi gen pada protoonkogen dan TSG. Pada umumnya sel akan mengalami nekrosis (Robbins *et al.*, 2007). Promosi yaitu proses sel terinisiasi berubah menjadi sel neoplasma. Sel yang mengalami mutasi akan menjadi sel neoplasma sedangkan sel yang tidak mengalami mutasi tidak terpengaruh terhadap tahap promosi. Progresi yaitu proses sel neoplasma menjadi kurang

sensitive terhadap sinyal anti-pertumbuhan dan proliferasi sel tidak hanya bergantung pada faktor pertumbuhan (Kresno, 2011; Devi, 2004).

Terdapat enam ciri-ciri utama sel kanker yaitu dapat menghasilkan sinyal pertumbuhan sendiri, tidak sensitif terhadap sinyal anti-pertumbuhan, dapat melakukan invasi jaringan dan metastatis, mempunyai kemampuan replikasi tanpa batas, angiogenesis berkelanjutan, dan dapat menghindari dari apoptosis sel (Hanahan dan Weinberg, 2000). Enam ciri utama sel kanker tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Enam ciri utama kanker (Hanahan dan Weinberg, 2000)

2.3 Proliferasi Sel melalui Jalur Transduksi Sinyal

Salah satu ciri utama sel kanker yaitu dapat menghasilkan sinyal pertumbuhan sendiri. Mekanisme yang sering digunakan oleh sel kanker untuk menghasilkan sinyal pertumbuhan sendiri adalah dengan mutasi gen pada jalur transduksi sinyal (Robbins *et al.*, 2007). Salah satu jalur transduksi sinyal yang sering menyebabkan kanker adalah jalur Ras-Raf-Map-kinase. Fungsi dari jalur ini adalah untuk meneruskan sinyal ekstraseluler menuju ke nukleus untuk perkembangan sel. Terjadinya disregulasi pada gen di jalur ini dapat mengakibatkan proliferasi sel tidak terkendali (Kresno, 2011).

Proliferasi sel merupakan peningkatan jumlah sel sebagai hasil pertumbuhan dan pembelahan sel (Hyland, 2014). Sel normal dapat berproliferasi

apabila terdapat faktor pertumbuhan. Pada umumnya salah satu faktor pertumbuhan berupa hormon. Ikatan hormon pada reseptornya mengubah reseptor dari keadaan inaktif menjadi aktif (Kresno, 2011).

Pada kanker payudara, hormon estrogen berperan penting dalam perkembangan proliferasi sel. Ikatan estrogen dengan reseptor estrogen akan mengakibatkan aktifnya reseptor tirosin kinase. Reseptor tirosin kinase yang aktif menyebabkan faktor pertumbuhan dapat berikatan dengannya. Faktor pertumbuhan ini terdiri dari *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Insulin Growth Factor* (IGF), *Plateled Derived Growth Factor* (PDGF) yang akan berikatan dengan salah satu dari reseptor tirosin kinase. Ikatan antara faktor pertumbuhan dengan reseptor tirosin kinase akan mengaktifkan jalur utama sinyal transduksi ini yaitu protein RAS. Protein RAS akan aktif apabila terikat dengan GTP. Protein RAS yang aktif ini akan memfosforilasi kinase kaskade (secara berurutan terjadi fosforilasi pada protein RAF (*Rapidly Acceleratet Fibrosarcoma*), *Mitogen Enhanced Kinase* (MEK), dan *Mitogen activated protein kinase* (MAPK)) (Robbins *et al.*, 2007). Aktifnya kinase kaskade ini menyebabkan c-myc (*Chromosom-myeocytomatosis*) meningkat dalam nukleus. Peningkatan c-myc berpengaruh terhadap stimulasi transkripsi siklin. Siklin yang terbentuk akan berikatan dengan *Cyclin Dependent Kinase* (CDK). Ikatan siklin-CDK menyebabkan pRB inaktif melalui fosforilasi sehingga dapat melepaskan faktor transkripsi E2F. E2F merupakan faktor transkripsi yang dapat mempengaruhi sel untuk memasuki fase S dalam siklus sel sehingga sel dapat melakukan replikasi DNA. Pada keadaan aktif, pRB berfungsi menghambat sel untuk memasuki fase selanjutnya dalam siklus sel (Kresno, 2011; Satuman dan Fatmawati, 2009).

2.4 Nucleolar Organizer Regions (NORs)

Aktivitas proliferasi sel dapat ditandai dengan adanya pembelahan sel. Proses pembelahan sel memerlukan sejumlah protein sehingga terjadi sintesis protein, salah satunya adalah sintesis protein RNA ribosomal. Protein ini diekspresikan oleh DNA ribosomal yang mempunyai lengan kromosom

akrosentrik atau disebut dengan *Nucleolar Organizer Regions* (NORs) (Kurnia *et al.*, 2012).

Nukleolus atau anak inti merupakan unit struktural dan fungsional dari inti yang di dalamnya terdapat rangkaian DNA yang mengkode RNA ribosomal. RNA ribosomal ini berperan dalam sintesis protein yang diperlukan untuk pembelahan sel. Nukleolus ini terdiri atas (1) pusat fibrillar, (2) komponen fibrillar padat, (3) komponen granular. Pusat fibrillar merupakan tempat terjadinya transkripsi r-RNA primer yang menghasilkan dan mengandung DNA ribosomal, RNA polimerase I dan topoisomerase I. Komponen fibrillar padat adalah tempat pengolahan awal prekursor rRNA dan pigmen dengan antibodi untuk fibrillarin, protein yang berkaitan dengan ribonukleoprotein nukleolus. Komponen granular terdiri atas partikel prekursor ribosom. Ukuran dan bentuk NOR sangat bervariasi tergantung pada transkripsi nukleolus. NOR sangat berkaitan dengan siklus sel, yang juga berkaitan dengan proliferasi sel (Egan dan Crocker, 1992).

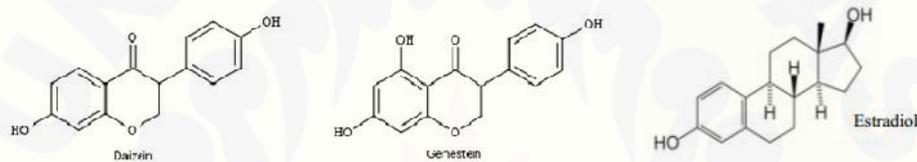
Daerah organizer nukleolus (NOR) adalah loop DNA ribosomal pada lengan pendek kromosom akrosentrik dalam nukleolus sel. Protein argirofil yang terkait dengan NOR (RNA polimerase I, protein B23, protein C23 atau nukleolin), dikode oleh gen yang terletak di NOR, dapat diidentifikasi titik-titik hitam kecil di inti di bawah mikroskop cahaya menggunakan teknik pewarnaan perak (Ag) dengan argirofilik NOR (AgNOR). Jumlah AgNOR per inti telah terbukti berhubungan dengan aktivitas proliferasi sel (Ibnerasa *et al.*, 2005). Pada fase interfase, NOR dapat dilihat di bawah mikroskop cahaya dengan pewarnaan perak. Sifat protein NOR yang argirofilik menyebabkan dapat berikatan dengan pewarna perak (Ag). Pewarnaan NOR dengan perak (Ag) disebut AgNOR (Utami, 2008).

2.5 Kandungan Isoflavon pada Tempe Kedelai

Senyawa isoflavon pada tempe kedelai terdapat dalam beberapa bentuk glikosida salah satunya bentuk aglikon isoflavon (Allred *et al.*, 2004). Aglikon isoflavon terbentuk akibat aktivitas jamur *Rhizopus oligosporus* yang mengubah senyawa isoflavon jenis terikat menjadi senyawa aglikon. Proses fermentasi ini

meningkatkan nilai gizi tempe dengan meningkatkan ketersediaan aglikon isoflavon (Ferreira *et al.*, 2011; Haron *et al.*, 2009). Aglikon terdapat dalam jumlah kecil pada produk kedelai non-fermentasi, sehingga kadar isoflavon tempe jauh lebih tinggi dibandingkan dengan biji kedelai (Utari *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2009).

Genistin, daidzin, dan glisitein yang terdapat pada kedelai dapat dihidrolisis oleh enzim α -glukosidase selama proses perendaman menjadi aglikon isoflavon dan glukosanya, yaitu genestein (5,7,4'-trihidroksiisoflavon) dan glukosa, daidzein (7,4'-dihidroksiisoflavon) dan glukosa, serta glisitein (6-metoksi-7,4'-dihidroksiisoflavon) dan glukosa (Purwoko, 2004).



Gambar 2.4 Struktur kimia Daidzein dan Genistein yang terdapat pada tempe serta struktur kimia Estradiol (Mense *et al.*, 2008)

Struktur isoflavon pada tempe mirip dengan 17 β -estradiol yang merupakan estrogen endogen (Sabatier *et al.*, 2003). Kemiripan struktur kimia dari isoflavon genistein dan daidzein pada tempe dengan estradiol dapat dilihat pada Gambar 2.4. Isoflavon memiliki potensi untuk menimbulkan efek fisiologis karena dapat berikatan dengan reseptor estrogen. Salah satu fungsi utama estrogen endogen adalah untuk proliferasi sel. Isoflavon dapat mencegah kanker payudara melalui anti-proliferasi, anti-angiogenesis, anti-oksidatif dan anti-inflamasi (Zhang *et al.*, 2010).

Dilaporkan bahwa berdasarkan analisis HPLC, kandungan senyawa isoflavon pada tepung tempe sebesar 901,24 mg/kg berat kering, diantaranya berupa genistein sebesar 250,65 mg/kg (Safrida, 2008). Sebagian besar tubuh dapat menyerap isoflavon dalam bentuk aglikon dengan tingkat absorpsi sebesar 20 hingga 55%. Hasil penelitian menyebutkan bahwa seseorang sebaiknya mengonsumsi isoflavon sebesar 30-100 mg per hari (Utari *et al.*, 2010).

Isoflavon yang terdapat dalam kedelai maupun tempe kedelai terbukti mampu menggantikan peran hormon estrogen. Estrogen berikatan dengan reseptor

estrogen menghasilkan serangkaian reaksi biologis. Pada saat kadar hormon estrogen menurun, akan terdapat banyak reseptor estrogen yang tidak terikat dan isoflavon dapat berikatan dengan reseptor estrogen tersebut. Apabila tubuh mendapat asupan isoflavon, misalnya dengan mengonsumsi produk-produk kedelai, maka akan terjadi pengikatan isoflavon dengan reseptor estrogen yang menghasilkan efek menguntungkan. Efek menguntungkan dari isoflavon yaitu dapat menurunkan resiko kanker payudara pada wanita pre-menopause dan dapat mencegah penyakit kardiovaskuler dan osteoporosis pada wanita pre- dan post-menopausal (Koswara, 2006).

2.6 Pengaruh Isoflavon Terhadap Kanker Payudara

Isoflavon utama pada kedelai terdiri dari genistein (4',5',7-trihydroxyisoflavone) dan daidzein (4',7-dihydroxyisoflavone) (Astuti, 2008). Di antara bentuk-bentuk isoflavon tersebut, aktivitas antioksidatif tertinggi ditunjukkan oleh genistein (Purwoko, 2004). Struktur dari isoflavon genistein yang mirip dengan 17 β -estradiol ini mengakibatkan isoflavon dapat berikatan dengan reseptor estrogen. Reseptor estrogen terdiri atas Reseptor Estrogen (RE α) dan Reseptor estrogen (RE β). RE α berperan dalam proliferasi sel tumor, sedangkan RE β berperan dalam menghambat proliferasi sel tumor sebagai supresor tumor (Harahap *et al.*, 2012). Kemampuan isoflavon untuk berikatan dengan RE β 20 kali lebih tinggi dibandingkan dengan RE α . Aktivitas selektif isoflavon ini menguntungkan karena RE α akan menekan proliferasi pada sel-sel kanker yang distimulasi oleh senyawa yang berikatan dengan RE α (Nurfaiziyah *et al.*, 2011). Afinitas genistein untuk mengikat RE β adalah dari 7 sampai 48 kali lipat lebih tinggi daripada RE α sehingga genistein dapat berikatan dengan RE β pada konsentrasi tinggi (Taylor *et al.*, 2009).

Senyawa isoflavon pada tempe kedelai yang berpotensi sebagai antitumor adalah genistein. Genistein memiliki sifat estrogenik dan antiestrogenik, dapat berperan sebagai antioksidan, dapat menghambat topoisomerase II dan angiogenesis, serta untuk menginduksi diferensiasi sel (Lamartiniere, 2000). Genistein merupakan inhibitor selektif tirosin kinase pada sel miometrium

manusia dan tikus. Efek yang sama juga terlihat pada sel kanker ovarium manusia. Meskipun daidzein memiliki struktur yang mirip dengan genistein namun daidzein tidak dapat menghambat aktifitas tirosin kinase (Burton dan Wells, 2002). Genistein telah terbukti menghambat Protein Tyrosine Kinases (PTK), khususnya aktivasi reseptor faktor pertumbuhan epidermal yang penting dalam mengatur apoptosis dan proliferasi sel (Duffy *et al.*, 2007).

Efek hambatan genistein pada proliferasi sel kanker dapat dijelaskan melalui efek hormonal androgen, modulasi DNA oleh topoisomerase II, regulasi siklus sel atau apoptosis, jalur sinyal intraseluler, atau melalui efek tirosin kinase yang menghambat reseptor pertumbuhan (Lazarevic, 2012). Pada penelitian kultur sel kanker payudara MCF-7, kadar genistein sebesar 100 $\mu\text{M/L}$ dapat menghilangkan respons proliferasi terhadap stimulasi fosforilasi intraseluler tirosin. Genistein juga dapat menghambat proliferasi pada sel kanker prostat manusia (Polkowski dan Mazurek, 2000). Pada penelitian terhadap kelenjar mammae tikus prapubertas, dilaporkan bahwa genistein mengatur ekspresi reseptor faktor pertumbuhan epidermal, yang berpengaruh terhadap peningkatan proliferasi sel. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan genistein meningkatkan diferensiasi sel yang menyebabkan faktor pertumbuhan epidermal kurang aktif sehingga terjadi penekanan terhadap perkembangan kanker payudara (Lamartiniere, 2000).

Selain bersifat antiproliferasi, genistein juga berpengaruh terhadap aktivitas apoptosis sel kanker. Berdasarkan hasil penelitian secara *in vitro*, dosis genistein sebesar 208,31 $\mu\text{g/ml}$ dapat menyebabkan kematian sel sebesar 50% (LC_{50}) pada sel MCF-7 (Mahriani dan Utami, 2014). Aktifitas antiangiogenik dari genistein juga terjadi pada tikus yang diinokulasikan sel kanker kandung kemih. Pemberian genistein sebanyak 50 mg/kg berat badan/hari pada tikus dapat menurunkan ukuran tumor dan penurunan jumlah kepadatan pembuluh darah yang terbentuk akibat dari kanker, dibandingkan dengan hewan kontrol (Polkowski dan Mazurek, 2000). Pemberian genistein sebesar 10 mg/kg/hari selama 5 hari juga dapat menghambat angiogenesis tumor pada tikus betina strain Balb/c yang diimplantasi sel tumor (Farina *et al.*, 2006).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Kegiatan penelitian dilaksanakan pada bulan November 2014 hingga Februari 2015. Penelitian ini dilakukan di Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Unit 4 dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta, Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi, dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan, Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kandang plastik berukuran 30x20x15 cm³, alat bedah dan papan seksi, cetakan blok paraffin, autoklaf, *tissue processor automatic*, *waterbath*, mikroskop, optilab, termometer, higrometer, jarum suntik ukuran 18Gx1½”, cawan petri, inkubator, freezer, pipet, mikrotom, mesin grinder, gelas ukur, botol yang telah steril, kaca objek dan kaca penutup, ayakan 70 mesh dan timbangan.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tempe kedelai, hewan uji berupa mencit betina dan mencit donor strain C3H yang diperoleh dari LPPT UGM, pakan mencit berupa pellet AD II yang diperoleh dari LPPT UGM, chloroform, larutan buffer formalin 10%, *xylol*, akuades, larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*), alkohol 100%, alkohol 95 %, alkohol 80%, alkohol 70%, paraffin cair, larutan pewarna AgNOR (gelatin 2%, larutan asam formiat 1%, dan larutan perak nitrat 50%), cairan *mounting* LEICA, minyak imersi, kertas label dan es batu.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pola RAL (Rancangan Acak Lengkap). Sedangkan metode penelitian yang digunakan yaitu metode eksperimental dengan 6 kelompok dan 3 kali ulangan, sebagai berikut:

- Kelompok K-: mencit kontrol negatif tanpa tepung tempe kedelai dan tanpa diinokulasikan tumor
- Kelompok K+: mencit kontrol positif tanpa diberikan tepung tempe kedelai dan diinokulasikan tumor
- Kelompok D1: mencit yang diberikan tepung tempe kedelai dengan total dosis 0,8 gram dan diinokulasikan tumor
- Kelompok D2: mencit yang diberikan tepung tempe kedelai dengan total dosis 1,6 gram dan diinokulasiikan tumor
- Kelompok D3: mencit yang diberikan tepung tempe kedelai dengan total dosis 2,4 gram dan diinokulasikan tumor
- Kelompok D4: mencit yang diberikan tepung tempe kedelai dengan total dosis 3,2 gram dan diinokulasikan tumor

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pemeliharaan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah mencit strain C3H yang khusus digunakan untuk insiden tumor payudara. Mencit C3H memiliki warna tubuh abu-abu tua dan memiliki insidensi yang sangat tinggi terhadap tumor payudara (Harlan, 2008). Induksi tumor payudara pada mencit C3H dapat dilakukan dengan cara memasukkan cairan filtrat yang mengandung sel-sel tumor payudara (Djuanda dan Gunardjono, 1974).

Mencit C3H yang digunakan adalah mencit betina yang berumur 5 minggu, dengan berat sekitar 15 gram. Mencit C3H sebanyak 18 ekor ini dibagi menjadi 6 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 3 mencit sebagai ulangan. Mencit dipelihara dalam kandang yang terbuat dari plastik, dengan atap berupa ram kawat, berukuran 30x20x15 cm³. Kandang mencit diberi alas sekam yang diganti setiap 3 hari sekali. Dalam satu kandang terdapat 3 ekor mencit

sesuai dengan kelompoknya. Mencit dipelihara dengan diberi pakan berupa pellet AD II dan minum berupa air secara *ad libitum*. Pemeliharaan hewan uji dilakukan pada laboratorium dengan suhu 27-30° C dan kelembaban 75-90% serta dilakukan adaptasi terlebih dahulu selama satu minggu.

3.4.2 Pembuatan Tepung Tempe Kedelai

Langkah awal pembuatan tepung tempe yaitu tempe kedelai yang telah difermentasi selama 48 jam dipotong dadu berukuran 0,5 x 0,5 cm². Selanjutnya potongan tempe tersebut dipanaskan dalam oven pada suhu 45°C selama 24 jam, setelah itu dihaluskan menggunakan mesin grinder. Tahap terakhir pembuatan tepung tempe yaitu dilakukan pengayakan dengan ukuran ayakan 70 mesh sehingga terbentuk tepung tempe.

3.4.3 Penentuan dosis dan Aplikasi Perlakuan

Dosis tempe kedelai yang akan diuji diperoleh berdasarkan hasil analisis dosis genistein yang optimum untuk LC₅₀ pada sel MCF-7 secara *in vitro* yaitu sebesar 208,31 µg/ml (Mahriani dan Utami, 2014). Dengan demikian pemberian dosis tepung tempe yang digunakan pada penelitian ini yaitu 0,8 gram tepung tempe, 1,6 gram tepung tempe, 2,4 gram tepung tempe dan 3,2 gram tepung tempe. Masing-masing dosis, seluruhnya dilarutkan pada akuades hingga volume total 16 ml dan diberikan pada mencit secara *gavage* sebanyak 1 ml/hari (Lampiran A). Setelah aplikasi perlakuan, kemudian beberapa kelompok mencit diinokulasi bubur tumor.

3.4.4 Pembuatan dan Inokulasi Bubur Tumor pada Hewan Uji

Inokulasi bubur tumor dilakukan melalui transplantasi jaringan tumor yang berasal dari mencit donor. Transplantasi jaringan tumor dilakukan dengan cara mencit donor dimatikan dengan chloroform, kemudian diletakkan telentang pada papan seksi. Selanjutnya dibuat sayatan tipis menggunakan gunting pada kulit kelenjar mammae dan seluruh jaringan tumor dari mencit donor diambil. Kemudian jaringan tumor dibersihkan menggunakan larutan PBS (*Phosphate*

Buffer Saline) di dalam cawan petri yang diletakkan di atas es. Jaringan tumor yang telah bersih ditambah dengan larutan PBS lalu dicacah hingga menjadi bubuk tumor yang homogen. Sebanyak 0,2 ml bubuk tumor disuntikan dengan jarum trokar secara subkutan di daerah aksila kanan bawah mencit resipien.

3.4.5 Pengecatan AgNOR

Setelah mencit diinokulasi tumor, kemudian dipelihara sampai 42 hari. Selanjutnya dilakukan pembedahan untuk mengambil jaringan mammae. Setelah diambil jaringan tumornya, kemudian dilakukan pengukuran volume tumor. Segera setelah pengambilan jaringan mammae, kemudian jaringan ini dimasukkan dalam botol berisi larutan buffer formalin 10%. Selanjutnya jaringan dipotong secara makroskopis. Irisan jaringan tersebut diproses menggunakan alat *tissue processor automatic*. Tahap pertama *processing* jaringan yaitu proses fiksasi menggunakan larutan buffer formalin 10% selama 2 jam. Kemudian di dehidrasi dengan alkohol bertingkat dengan alkohol 70%, 80%, 95% masing-masing selama 1,5 jam, alkohol 100% I selama 1 jam, alkohol 100% II selama 1,5 jam dan alkohol 100% III selama 2 jam. Selanjutnya di clearing dengan *xylol* I selama 1 jam, *xylol* II selama 1,5 jam, dan *xylol* III selama 1,5 jam. Irisan jaringan tersebut kemudian diinfiltrasi dengan paraffin cair I selama 1,5 jam dan paraffin cair II selama 2 jam.

Irisan jaringan yang telah selesai diproses dikeluarkan dan segera dilakukan pengeblokan paraffin. Irisan jaringan tersebut dimasukkan dalam cetakan blok yang berisi paraffin cair, kemudian didiamkan selama ± 20 menit (hingga mengeras). Selanjutnya didinginkan dalam freezer selama ± 15 menit. Blok yang telah dingin, dipotong menggunakan mikrotom setebal $\pm 5\mu$ sehingga terbentuk pita jaringan. Pita jaringan tersebut dimasukkan dalam *waterbath* yang bersuhu 50°C. Pengambilan pita jaringan dengan menggunakan *object glass* kemudian didiamkan selama 5 menit dan diberi label. Sebelum dilakukan pengecatan AgNOR, preparat diinkubasi terlebih dahulu pada suhu 37°C selama 24 jam.

Proses pewarnaan diawali dengan irisan jaringan dihilangkan paraffinnya atau deparafinisasi menggunakan *xylol* sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit.

Kemudian direhidrasi secara bertingkat dengan alkohol 100%, alkohol 95%, alkohol 80% dan alkohol 70% masing-masing 2 menit dan terakhir dengan air mengalir selama satu menit. Kemudian preparat ditempatkan dalam ruangan gelap dan tertutup. Secara cepat, preparat ditetesi dengan larutan pewarna AgNOR. Bahan dan cara pembuatan pewarna AgNOR dapat dilihat pada lampiran B. Segera setelah dilakukan pengecatan, didiamkan selama 20 menit pada suhu ruang. Sediaan kemudian dicuci dengan air mengalir dan didehidrasi dalam alkohol bertingkat (alkohol 70%, 80%, 95% dan 100%) masing-masing 3 celup. Kemudian diclearing dengan *xylol* sebanyak 3 kali masing-masing 3 celup. Tahap terakhir dilakukan mounting dengan 1 tetesan cairan mounting dan ditutup dengan kaca penutup.

3.4.6 Parameter yang diamati

Parameter yang diamati yaitu volume tumor dan penghitungan AgNOR. Volume tumor diukur menggunakan rumus $V = 4/3 r^3$. Pengukuran volume tumor dilakukan pada hari ke 42 setelah inokulasi bubur tumor menggunakan kaliper. Sedangkan untuk penghitungan AgNOR dilakukan pengamatan preparat dengan perbesaran 1000X dalam minyak imersi. Pada tiap sampel dihitung 100 sel dengan 5 kali pengamatan (5 daerah lapang pandang yang berbeda). AgNOR divisualisasikan sebagai titik coklat hitam dengan ukuran bervariasi yang berada dalam inti sel. Terdapat 2 macam parameter untuk penghitungan AgNOR, yaitu mAgNOR dan pAgNOR. Perhitungan mAgNOR berkorelasi dengan massa DNA atau ploidi sedangkan pAgNOR menunjukkan aktivitas proliferasi sel (Ibnerasa *et al.*, 2005).

- *Mean of AgNOR* (mAgNOR) dilakukan dengan cara menghitung titik hitam yang berada pada 100 sel, kemudian dirata-rata dengan cara membagi jumlah seluruh titik hitam dengan jumlah sel yang teramati.
- Indeks Proliferatif AgNOR (pAgNOR) dilakukan dengan cara menentukan jumlah sel yang memiliki titik hitam lebih dari 5 pada 100 sel (CCRC, 2014).

3.5 Analisis Data

Semua hasil data akan dianalisis menggunakan uji One Way ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% dan dilanjutkan dengan uji Duncan (Sugiyono, 2010).



BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Tepung Tempe Terhadap Aktifitas Proliferasi Sel Kanker Kelenjar Mamme

Aktivitas proliferasi sel dapat dilihat melalui jumlah mAgNOR dan pAgNOR. NOR berkaitan dengan aktivitas transkripsi dan peningkatan jumlah AgNOR berhubungan dengan aktivitas proliferasi sel yang tinggi. Karena ploidi (kandungan DNA) dan aktivitas proliferasi merupakan indikator prognostik, maka perlu dilihat secara terpisah dalam penghitungan AgNOR yaitu mAgNOR dan pAgNOR (Ibnerasa *et al.*, 2005). Hasil pengamatan jumlah mAgNOR sebagai akibat perlakuan pemberian tepung tempe kedelai dapat dilihat pada Tabel 4.1.

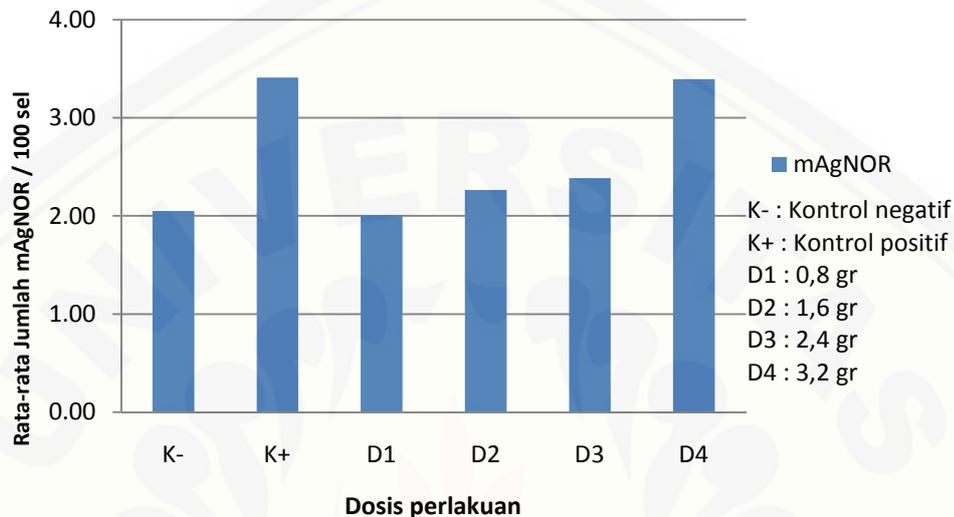
Tabel 4.1 Rata-rata Jumlah *mean of* AgNOR (mAgNOR)

Perlakuan Tepung Tempe (g)	$\bar{x} \pm SD$ (dalam 100 sel)
K-	$2,05 \pm 0,06^a$
K+	$3,41 \pm 0,80^b$
D1 (0,8)	$2,01 \pm 0,19^a$
D2 (1,6)	$2,27 \pm 0,21^a$
D3 (2,4)	$2,39 \pm 0,16^a$
D4 (3,2)	$3,34 \pm 0,90^b$

keterangan: angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda nyata pada $\alpha < 0,05$.
K- : Kontrol negatif (mencit normal), K+ : Kontrol positif (tanpa perlakuan tepung tempe).

Hasil uji Anova menunjukkan bahwa jumlah mAgNOR antar perlakuan terdapat perbedaan nyata ($\alpha = 0,01$). Hal ini berarti pemberian tepung tempe kedelai berpengaruh terhadap jumlah mAgNOR (Lampiran D). Berdasarkan hasil uji Duncan menunjukkan bahwa pada kontrol negatif dengan kontrol positif terjadi peningkatan jumlah rata-rata titik AgNOR secara nyata. Pada dosis 1, dosis 2 dan dosis 3 jumlah rata-rata titik AgNOR berbeda nyata dengan kontrol positif, namun tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif. Pada dosis 1, dosis 2 dan dosis 3 terjadi peningkatan jumlah titik AgNOR tetapi tidak berbeda nyata. Peningkatan

jumlah rata-rata titik AgNOR terjadi pada dosis 4 dan terdapat perbedaan nyata dengan kontrol negatif, dosis 1, dosis 2 dan dosis 3 sedangkan dengan kontrol positif tidak terdapat perbedaan nyata. Grafik rata-rata jumlah mAgNOR dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Rata-rata jumlah mAgNOR

Berdasarkan Tabel 4.1 dapat menunjukkan bahwa pada dosis 1 dengan pemberian tepung tempe kedelai sebesar 0,8 gram telah dapat menghambat aktifitas transkripsi gen. Transkripsi gen bertujuan untuk sintesis protein yang diperlukan dalam pembelahan sel (Kurnia, 2004).

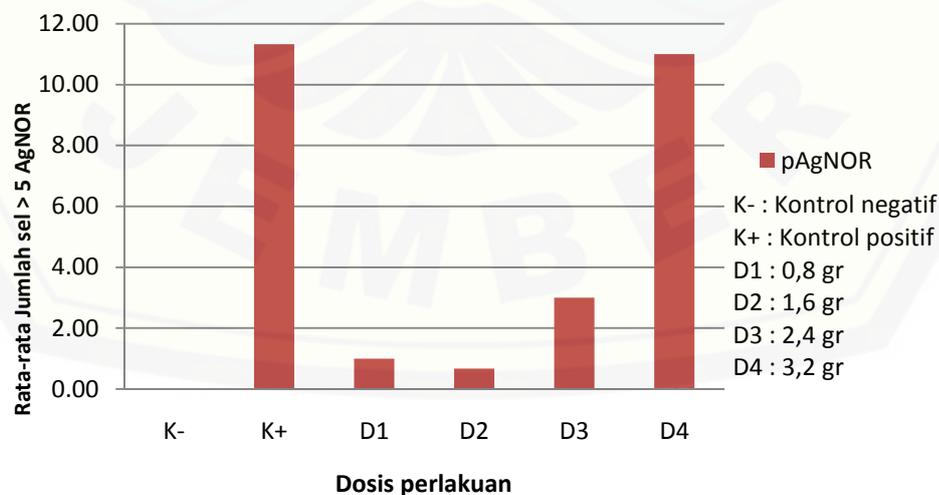
Selain pengamatan mAgNOR, dilakukan juga pengamatan pAgNOR yaitu menghitung sel yang mempunyai titik AgNOR lebih dari lima. pAgNOR sangat berhubungan dengan aktivitas proliferasi sel (Ibnerasa *et al.*, 2005). Hasil pengamatan jumlah rata-rata sel yang memiliki lebih dari lima AgNOR seperti pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Jumlah Rata-rata Sel yang Memiliki Titik AgNOR lebih dari lima (pAgNOR)

Perlakuan Tepung Tempe (g)	$\frac{IOR \text{ sel}}{\bar{x} \pm SG}$
K-	0.00 ± 0.00^a
K+	11.33 ± 7.02^b
D1 (0,8)	1.00 ± 0.00^a
D2 (1,6)	0.67 ± 1.15^a
D3 (2,4)	3.00 ± 2.00^{ab}
D4 (3,2)	11.00 ± 8.18^b

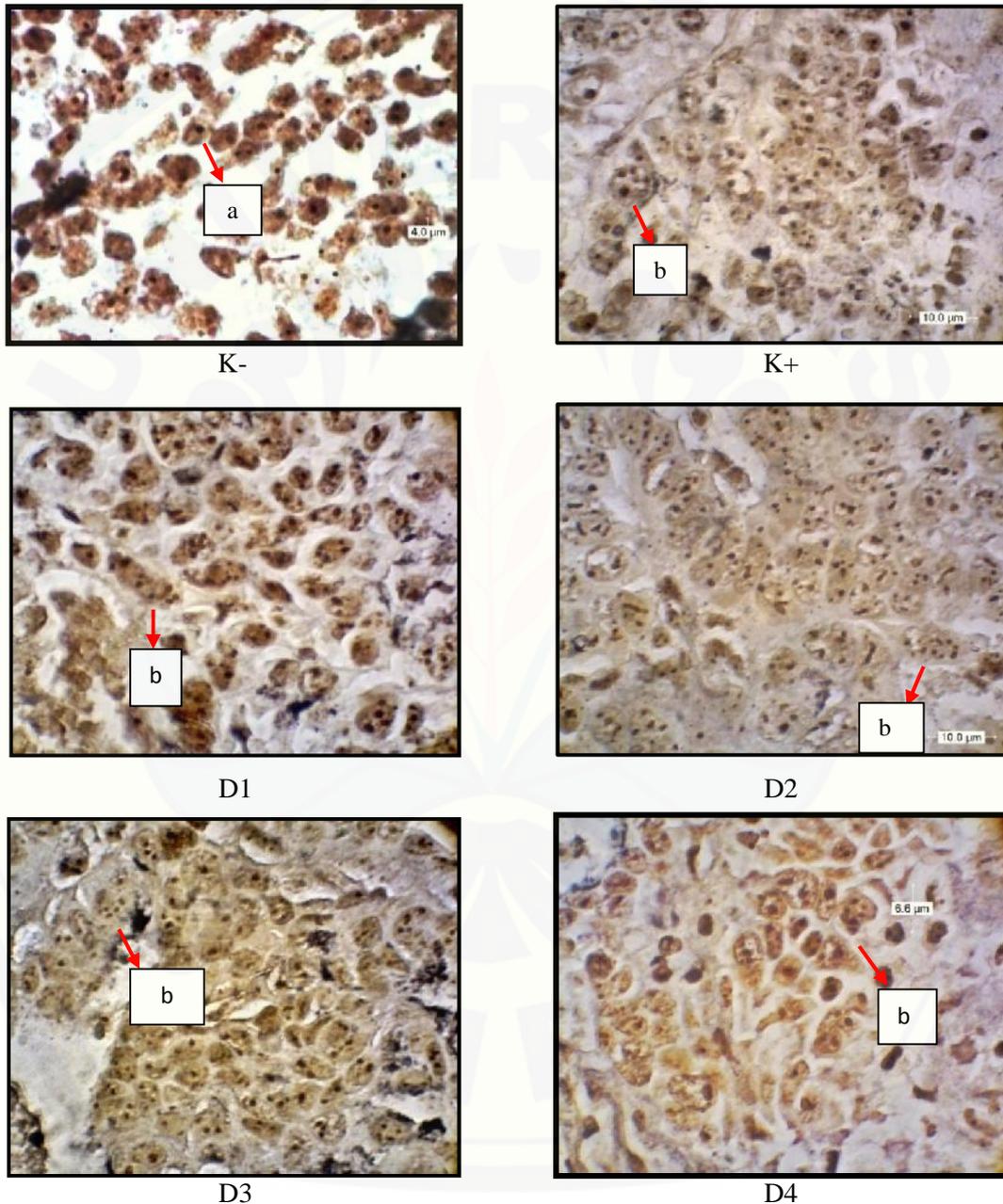
keterangan: angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda nyata pada $\alpha < 0,05$.
 K- : Kontrol negatif (mencit normal), K+ : Kontrol positif (tanpa perlakuan tepung tempe).

Hasil uji Anova menunjukkan bahwa jumlah pAgNOR antarperlakuan terdapat perbedaan nyata ($\alpha = 0,02$). Hal ini berarti pemberian tepung tempe kedelai berpengaruh terhadap jumlah pAgNOR (Lampiran F). Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol positif dan dosis 4. Jumlah pAgNOR yang rendah dijumpai pada dosis 1 dan dosis 2, serta terdapat perbedaan nyata dibandingkan dengan kontrol positif dan dosis 4. Pada dosis 3 terjadi peningkatan jumlah pAgNOR namun tidak berbeda nyata dibandingkan dengan dosis 1 dan dosis 2. Peningkatan jumlah pAgNOR terjadi lagi pada dosis 4 namun tidak berbeda nyata terhadap dosis 3. Gambaran grafik jumlah pAgNOR dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Jumlah sel lebih dari 5 titik AgNOR (pAgNOR)

Pada sel normal (kontrol negatif) tidak tampak aktifitas proliferasi sel yang tinggi. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya sel yang memiliki titik AgNOR lebih dari 5 per nukleus. Gambaran sel kelenjar mammae yang telah diwarnai dengan pewarnaan AgNOR dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Sel kelenjar mammae yang telah diwarnai dengan pewarnaan AgNOR. (a) Sel normal dengan titik AgNOR kurang dari lima; (b) Sel tumor dengan titik AgNOR lebih dari 5 (perbesaran 1000X)

Pada Gambar 4.3 terlihat pada kelompok kontrol negatif (K-) yang merupakan sel normal hanya memiliki satu sampai tiga titik AgNOR. Hal ini sesuai dengan pendapat Koss (1992) bahwa sel normal memiliki satu sampai tiga titik AgNOR (Hartini, 2002). Sedangkan pada kelompok sel yang bertumor yaitu pada kelompok kontrol positif, dosis 1, dosis 2, dosis 3 dan dosis 4 tampak memiliki titik lebih dari lima dalam satu sel. Hal ini menunjukkan adanya aktifitas proliferasi sel yang tinggi.

Berdasarkan Tabel 4.2 maka dapat diketahui bahwa pada dosis 1 dengan pemberian tepung tempe kedelai sebesar 0,8 gram telah menghambat proliferasi sel tumor. Penurunan jumlah proliferasi sel tumor pada dosis 1 menunjukkan adanya pengaruh hambatan tumor akibat pemberian tepung tempe kedelai. Tempe kedelai memiliki kandungan isoflavon yang mirip dengan struktur 17 -estradiol atau estrogen endogen (Sabatier *et al.*, 2003). Isoflavon dapat mencegah kanker payudara melalui pengaturan aktifitas proliferasi sel khususnya isoflavon genistein (Zhang *et al.*, 2010; Polkowski dan Mazurek, 2000).

Pada penelitian ini, penghambatan proliferasi sel tumor diduga melalui pengikatan genistein dengan reseptor estrogen. Reseptor estrogen terdiri atas Reseptor Estrogen (RE α) dan Reseptor estrogen (RE β). RE α berperan dalam proliferasi sel tumor, sedangkan RE β berperan dalam menghambat proliferasi sel tumor sebagai supresor tumor (Harahap *et al.*, 2012). Afinitas genistein untuk berikatan dengan RE β yang sangat tinggi sehingga terjadi penghambatan proliferasi sel tumor (Nurfaiziyah *et al.*, 2011).

Di samping itu genistein dalam menghambat proliferasi sel kanker diduga melalui penghambatan jalur transduksi sinyal kinase. Salah satunya dapat melalui penghambatan fosforilasi protein kinase dalam jalur transduksi sinyal kinase (Hanahan dan Weinberg, 2000; Polkowski dan Mazurek, 2000). Pengikatan ligan ekstraseluler merupakan langkah awal yang memicu perubahan dalam protein reseptor (terjadi autofosforilasi) yang kemudian memperoleh aktivitas protein tirosin kinase. Aktivitas protein tirosin kinase yaitu aktifnya protein RAS yang kemudian akan memfosforilasi kinase kaskade (Raf-Mek-Mapk). Terfosforilasinya kinase kaskade ini menyebabkan c-myc meningkat dalam

nukleus. Peningkatan c-myc berpengaruh terhadap stimulasi transkripsi siklin. Siklin yang aktif ini akan berikatan dengan CDK. Ikatan ini menyebabkan pRB inaktif dan melepaskan faktor transkripsi E2F sehingga sel dapat masuk ke fase selanjutnya dalam siklus sel (Kresno, 2011; Satuman dan Fatmawati, 2009). Oleh karena itu, apabila fosforilasi protein tirosin kinase dihambat maka dapat menghambat aktifitas proliferasi sel.

Genistein diduga juga berperan dalam penghambatan siklin. Siklin merupakan kelompok protein spesifik dalam siklus sel. Salah satu siklin yang sering mengalami mutasi adalah siklin D (Robbins *et al.*, 2007). Siklin D disintesis pada awal fase G1, dan memainkan peran penting dalam fase G1 ke fase S. Siklin D merupakan protein kunci dari transduksi sinyal dalam proliferasi sel. Jika ekspresi siklin D berlebihan maka *check point* dari fase G1 ke S akan kehilangan kendali dalam sinyal proliferasi. Hal ini semakin mempercepat siklus sel dan proliferasi sel, serta menyebabkan perubahan sel normal menjadi sel tumor. Penghambatan ekspresi siklin D pada sel tumor akan membantu memulihkan siklus sel dan mengatur kecepatan proliferasi sel-sel tumor. Menurut Cui *et al.* (2005), genistein menunjukkan penghambatan yang signifikan terhadap ekspresi siklin D pada sel SGC-7901. Penghambatan proliferasi sel tumor oleh genistein diduga dengan cara mengurangi ekspresi siklin D.

Selain itu, isoflavon yang terdapat dalam tempe kedelai diduga juga dapat meningkatkan ekspresi *tumor suppressor gen* yaitu p53. Terjadinya tumor diakibatkan oleh terganggunya keseimbangan antara proliferasi sel dan apoptosis dalam siklus sel. Proliferasi sel tumor yang tidak terkendali dapat terjadi akibat terjadinya mutasi dari gen yang mengatur apoptosis sel tumor yaitu p53. Secara normal, fungsi dari gen p53 yaitu untuk menekan pertumbuhan sel-sel yang rusak dengan cara menghentikan siklus sel dan memperbaiki sel rusak tersebut. Apabila sel yang rusak tidak dapat diperbaiki maka p53 akan merangsang sel tersebut untuk apoptosis (Robbins *et al.*, 2007). Genistein dapat menginduksi siklus sel untuk *arrest* dan dapat memodulasi pengaturan protein siklus sel pada konsentrasi 5-200 μM (Pavese *et al.*, 2010).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada dosis tinggi yaitu 3,2 gram terjadi peningkatan dalam jumlah mAgNOR dan pAgNOR. Hal ini diduga akibat dari pemberian tepung tempe yang mengandung genistein pada dosis yang tinggi dapat memicu perkembangan kanker. Genistein dapat bertindak sebagai estrogen agonis dan antagonis, sehingga dapat menghambat atau meningkatkan proliferasi sel (Wolfe, 2012). Pada konsentrasi tinggi, genistein dapat bertindak sebagai estrogen antagonis yang dapat meningkatkan proliferasi sel tumor. Hal ini sesuai dengan pendapat Farina *et al.* (2006) bahwa genistein dapat memberikan aktivitas estrogenik antagonis pada konsentrasi yang lebih tinggi.

Selain itu, pemberian tepung tempe kedelai dengan dosis yang tinggi diduga juga dapat menyebabkan terjadinya akumulasi kandungan estrogen dalam tubuh. Hal ini menyebabkan konsentrasi estrogen pada tumor mammae lebih tinggi daripada kelenjar mammae normal sehingga dapat meningkatkan proliferasi sel. Menurut Sanchez-Barcelo *et al.* (2005), konsentrasi estrogen pada tumor mammae lebih tinggi daripada di kelenjar mammae yang normal akibat terjadinya akumulasi estrogen. Aktifitas proliferasi sel yang tinggi pada dosis 4 diduga berkaitan dengan Reseptor Estrogen (RE). RE adalah reseptor steroid yang mengatur proses seperti pertumbuhan dan diferensiasi sel target dengan mempengaruhi transkripsi sel. RE juga berperan penting dalam perkembangan kanker payudara (Choi *et al.*, 2014).

4.2 Pengaruh Tepung Tempe Kedelai Terhadap Volume Tumor dan Hubungannya dengan Jumlah AgNOR

Hasil pengamatan pengaruh tepung tempe kedelai terhadap volume tumor pada masing-masing kelompok perlakuan seperti pada Tabel 4.3.

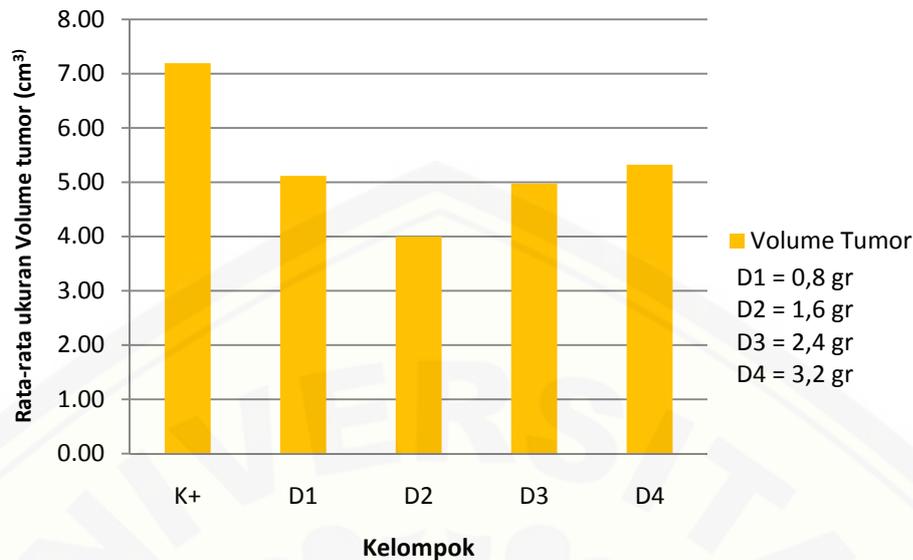
Tabel 4.3 Rata-rata Volume Tumor Mammae Mencit Strain C3H

Kelompok (g)	$\frac{\sum \text{Mean}}{n} \pm \text{SD}$ (cm ³)
K+	7,19 ± 2.09 ^a
D1 (0,8)	5,11 ± 1.93 ^a
D2 (1,6)	3,99 ± 1.16 ^a
D3 (2,4)	4,98 ± 3.79 ^a
D4 (3,2)	5,32 ± 0.72 ^a

keterangan: angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan berbeda nyata pada $p < 0,05$.

K+: Kontrol positif (mencit bertumor tanpa perlakuan tepung tempe kedelai).

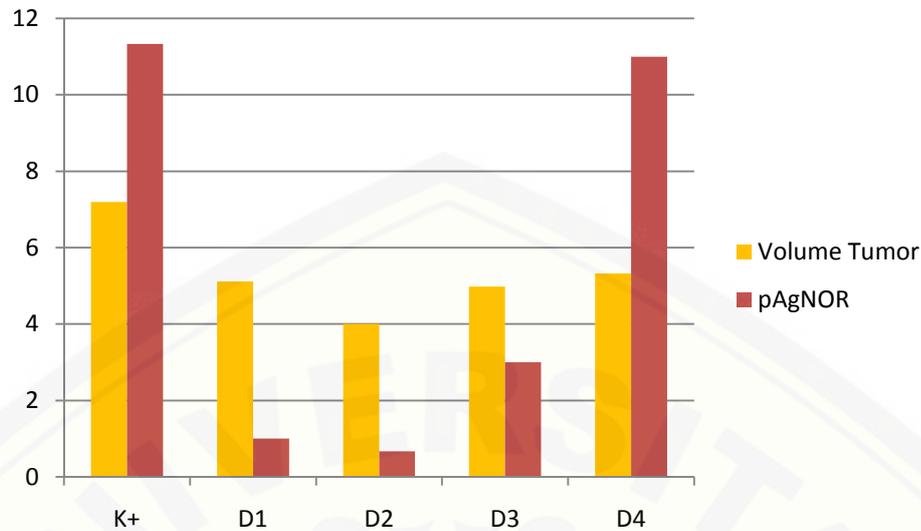
Hasil uji Anova menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan nyata antar perlakuan terhadap volume tumor ($p = 0,53$). Dengan begitu tidak terdapat pengaruh tepung tempe kedelai sebelum inokulasi tumor dengan volume tumor (Lampiran H). Namun dapat dilihat bahwa volume tumor terbesar terdapat pada kontrol positif, kemudian volume tumor menurun pada dosis 1 hingga dosis 2. Pada dosis 3 terjadi peningkatan volume tumor, demikian pula pada dosis 4 juga terjadi peningkatan volume tumor. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian tepung tempe kedelai cenderung dapat menekan pertambahan volume tumor. Meskipun pada dosis yang tinggi ukuran volume tumor cenderung meningkat namun tetap lebih rendah dibandingkan kontrol positif yang tanpa diberi tepung tempe. Grafik rata-rata volume tumor dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Volume tumor mammae mencit strain C3H antar perlakuan

Volume tumor menunjukkan adanya pertumbuhan sel-sel tumor. Salah satu yang mempengaruhi pertumbuhan tumor adalah kadar estrogen. Menurut Robbins *et al.* (2014), laju pertumbuhan tumor ini tergantung pada kadar estrogen, pasokan darah dan kebutuhan oksigen. Pertumbuhan tumor biasanya tumbuh biner secara eksponensial (2^n sel) membentuk kumpulan sel tumor hingga batas tertentu. Pada batas tertentu tersebut, pertumbuhan sel tumor menjadi lambat dengan bertambah besarnya tumor. Hal ini tergantung pada pasokan darah, ruang tempat tumbuh dan daya imunitas tubuh (Sukardja, 2000 dalam Utami, 2008).

Perkembangan tumor dapat ditunjukkan dengan bertambah besarnya volume tumor. Ukuran volume tumor yang bertambah menunjukkan adanya aktivitas proliferasi sel tumor yang dipengaruhi oleh aktifitas mitosis dan apoptosis sel. Aktifitas proliferasi sel pada kelenjar mammae dapat ditunjukkan dengan adanya titik AgNOR, sehingga adanya perubahan volume tumor maka hal ini menunjukkan adanya aktifitas proliferasi sel (Khoiri, 2009). Grafik perbandingan antara volume tumor mammae mencit strain C3H dengan jumlah AgNOR dapat dilihat pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Grafik Perbandingan antara Volume Tumor Kelenjar Mammae Mencit Strain C3H dengan jumlah pAgNOR

Berdasarkan Gambar 4.5 tampak bahwa peningkatan volume tumor sejalan dengan aktifitas proliferasi sel tumor. Hal ini dapat dilihat pada kelompok kontrol positif yang memiliki ukuran volume tumor tertinggi dengan aktifitas proliferasi selnya juga tinggi. Sedangkan pada kelompok dosis 2 yang memiliki ukuran volume tumor terkecil, aktifitas proliferasi selnya juga terendah. Begitu juga pada dosis 3 ukuran volume tumornya yang lebih besar dibandingkan dosis 2 maka aktifitas proliferasi selnya juga lebih tinggi dibandingkan dosis 2. Hubungan antara proliferasi sel dengan volume tumor ini menunjukkan bahwa semakin tinggi proliferasi sel maka semakin besar volume tumornya (Khoiri, 2009; Utami, 2008).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa pemberian tepung tempe kedelai sebelum inokulasi bubur tumor sudah dapat menghambat proliferasi sel kanker kelenjar mammae mencit C3H pada dosis 0,8 gram, dengan penghambatan paling besar pada dosis 1,6 gram. Namun pada pemberian tepung tempe kedelai dengan dosis 3,2 gram cenderung meningkatkan proliferasi sel kanker kelenjar mammae mencit C3H.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek isoflavon yang terkandung dalam tepung tempe kedelai terhadap indeks mitosis dan apoptosis sel kanker kelenjar mammae.

DAFTAR PUSTAKA

- Allred, C.D., Allred, K.F., Ju, Y.H., Goepfing, T.S., Doerge, D.R. dan Helferich, W.G. 2004. Soy Processing Influences Growth Of Estrogen-Dependent Breast Cancer Tumors. *Carcinogenesis* 25 (9): 1649-1657.
- American Institute for Cancer Research. 2013. *Foods That Fight Cancer*. (Online) <http://www.aicr.org/foods-that-fight-cancer/> [Tanggal akses 23 Maret 2014].
- Astuti, S. 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian* 12 (2): 126-136.
- Burton, J.L. dan Wells, M. 2002. The Effect of Phytoestrogens on The Female Genital Tract. *Journal of Clinical Pathology* 55: 410-407.
- Cancer Chemoprevention Research Center. 2014. *Pengecatan AgNOR*. (Online). <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/agnor-laras.pdf> [Tanggal akses 11 Oktober 2014].
- Choi, E. J., Jung, J. Y. and Kim, G. 2014. Genistein inhibits the proliferation and differentiation of MCF-7 and 3T3-L1 cells via the regulation of ER expression and induction of apoptosis. *Experimental And Therapeutic Medicine* 8: 454-458.
- Cui, H., Na, X., Song, D. dan Liu. 2005. Blocking Effects Of Genistein On Cell Proliferation And Possible Mechanism In Human Gastric Carcinoma. *World J Gastroenterol* 11 (1): 69-72.
- Devi, Uma P. 2004. Basics Of Carcinogenesis. *Health Administrator* 17 (1): 16-24.
- Duffy, C., Perez, K., dan Partridge, Ann. 2007. Implications of Phytoestrogen Intake for Breast Cancer. *CA Cancer J Clin.* 57:260-277.
- Djuanda, Dodo dan Gunardjono. 1974. Penelitian Penularan Virus Tumor Mamma (MTV) Pada Mencit C3H. *Bulletin Penelitian Kesehatan* Vol. 11 (1): 25-32.

- Egan, M. J. dan Crocker, J. 1992. Review: Nucleolar Organiser Regions In Pathology. *Br. J. Cancer* 65: 1-7.
- Farina, H. G., Pomies, M., Alonso, D. F. And Gomez, D. E. 2006. Antitumor and antiangiogenic activity of soy isoflavone genistein in mouse models of melanoma and breast cancer. *Oncology Reports* 16: 885-891.
- Ferreira, M.P., Oliveira, Mandarino, Silva, Ida and Panizzi. 2011. Changes in The Isoflavone Profile and in The Chemical Composition of Tempeh During Processing and Refrigeration. *Pesq. agropec. bras.* 46 (11): 1555-1561.
- Gartner, L.P. dan Hiatt, J.L. 2011. *Concise Histology*. Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Hanahan, D. dan Weinberg, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57–70.
- Harahap, A. S., Hardjolukito, E. S. R., Rustamadji, P. dan Siregar N. C. 2012. Reseptor Estrogen b sebagai Penanda Potensi Ganas pada *Atypical Ductal Hyperplasia* Payudara. *J Indon Med Assoc* 62 (12): 462-466.
- Hondermarck, H. 2003. Breast Cancer: when proteomics challenges biological complexity. *Molecular & Cellular Proteomics* 2 (5): 281-291.
- Harlan. 2008. *C3H*. (Online) <http://www.harlan.com/download.axd/c2b5ebad96154a0aac95109fbc87cc5c.pdf?d=c3h> [Tanggal akses 05 Juli 2014].
- Haron, H., Ismail, A., Azlan, A., Shahar, S., dan Peng, L. S. 2009. Daidzein and Genestein Contents In Tempeh and Selected Soy Products. *Food Chemistry* 115: 1350–1356.
- Hartini, P. T. 2002. Hubungan Antara Hitung AgNOR dengan Grading Histologi Pada Karsinoma Duktus Infiltratif Payudara. *Tesis*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Hyland, K. 2014. Cell Proliferation and Its Regulation (Biochemistry/Molecular Biology Lecture). (Online) <http://biochemistry.ucsf.edu/programs/ptf/m3%20links/CellProlifLEC.pdf> [Tanggal akses 27 Oktober 2014].

- Ibnerasa, S. N., Chaudhry, N. A. dan Khan, S. A. 2005. AgNOR Proliferative Index in Malignant Pleural and Peritoneal Effusions. *International Journal of Pathology* 3(2): 86-90.
- International Agency for Research on Cancer. 2013. Global Cancer Burden rises to 14.1 million new cases: marked increase in breast cancers must be addressed. *Press Release*. IARC.
- Khoiri, M. 2009. Aktivitas Anti Tumor Ekstrak Etanol Selaginella Pada Sel Tumor Kelenjar Mamari Mencit (*Mus musculus*) C3H. *Thesis*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Koswara, S. 2006. *Isoflavon, Senyawa Multi-Manfaat Dalam Kedelai*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Kresno, S. B. 2011. *Ilmu Dasar Onkologi Edisi Kedua*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Kurnia, I. 2004. *AgNOR dan Hubungannya dengan Gen p53 dan pRb*. Badan Tenaga Nuklir Nasional: Puslitbang Keselamatan Radiasi dan Biomedika Nuklir.
- Kurnia, I., Bintari, S. H., dan Khaisuntaha, M. 2012. Tingkat Keganasan Kanker Serviks Pasien Pra-Radiasi Melalui Pemeriksaan AgNORs, MIB-1 dan Cas- 3. *Biosaintifika* 4 (2): 54-61.
- Lamartiniere, C. A. 2000. Protection Against Breast Cancer With Genistein: A Component Of Soy. *Am J Clin Nutr.* 71 :1705–1707.
- Lazarevic, B. 2012. *Genistein – A Chemopreventive Factor In Prostate Cancer*. Oslo: University of Oslo.
- Mahriani dan Utami. 2014. Kajian Pemanfaatan Phytoestrogen Dari Biji Kedelai Untuk Pencegahan Kanker Payudara Pada Mencit Strain C3H. *Karya Ilmiah*. Jember: Universitas Jember.
- McPherson, K., Steel, C. M., dan Dixon. 2000. ABC Of Breast Diseases: Breast Cancer- Epidemiology, Risk Factors, And Genetics. *BMJ.* 321: 624-628.

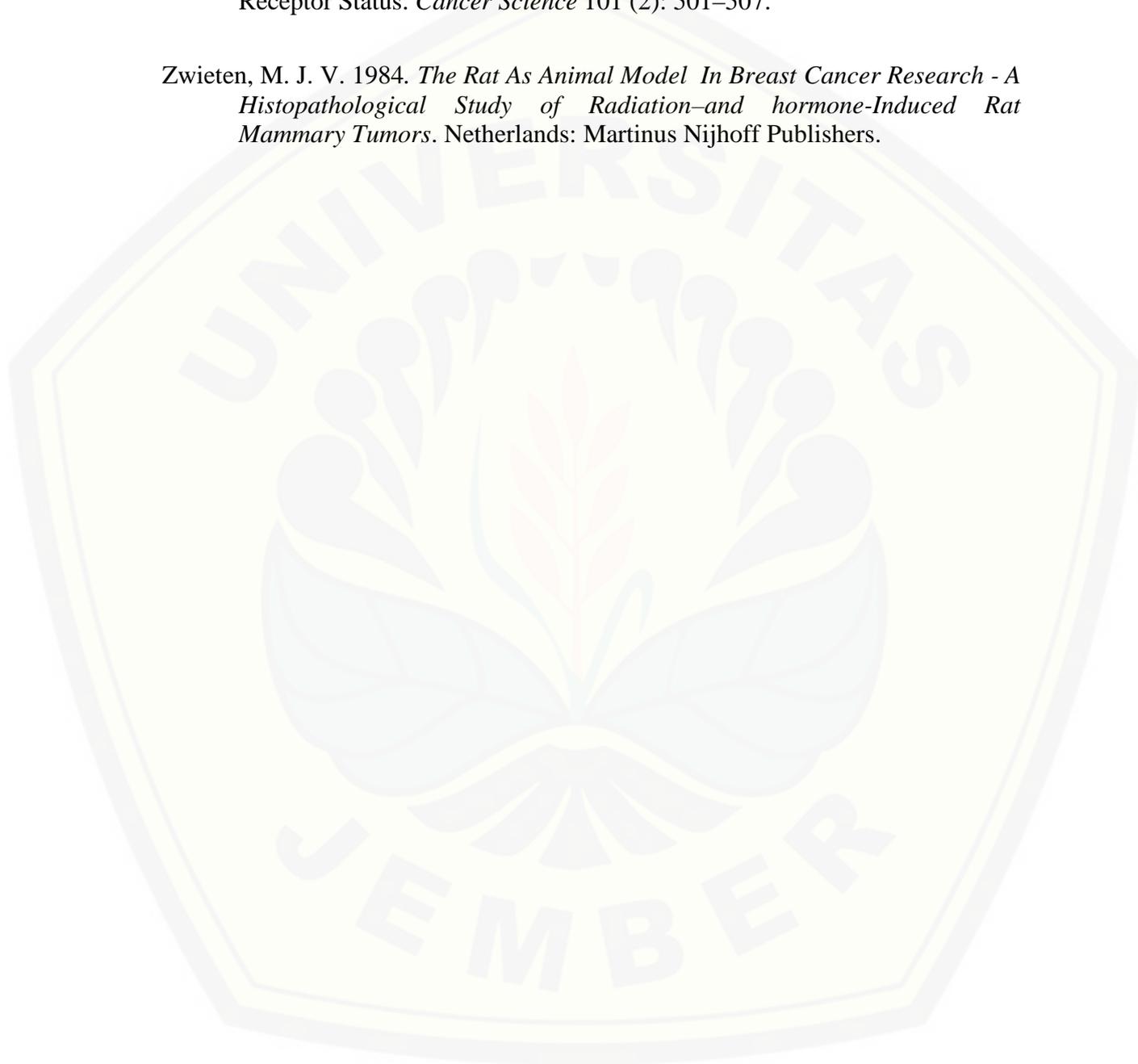
- Mense, S. M., Hei, T. K., Ganju, R. K. dan Bhat. 2008. Phytoestrogens and Breast Cancer Prevention: Possible Mechanisms of Action. *Environmental Health Perspectives* 116 (4):426–433.
- Nakajima, N., Nozaki, N., Ishihara, K., Ishikawa, A. dan Tsuji. 2005. Analysis of Isoflavone Content in Tempeh, a Fermented Soybean, and Preparation of a New Isoflavone-Enriched Tempeh. *Journal Ofbioscience And bioengineering* 100 (6): 685–687.
- Nurfaiziyah, A., Novrial1, D., dan Wijayana, K.A. 2011. Efek Pemberian Ekstrak Tempe Kedelai (*Glycine max*) Terhadap Ekspresi Caspase-3 Mencit Galur C3H Model Karsinogenesis Payudara. *Mandala of Health* 5 (2).
- Pavese, J. M., Farmer, R. L. dan Bergan, R. C. 2010. Inhibition of Cancer Cell Invasion and Metastasis by Genistein. *Cancer Metastasis Rev* 29:465–482.
- Polkowski, K. dan Mazurek, A.P. 2000. Biological Properties Of Genistein. A Review of In Vitro and In Vivo Data. *Drug Research* 57 (2): 135-155.
- Price, S.A. dan Wilson, L.M. 1995. *Patofisiologi Edisi 4*. Jakarta: Kedokteran EGC.
- Purwoko, T. 2004. Kandungan Isoflavon Aglikon pada Tempe Hasil Fermentasi *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*: Pengaruh Perendaman. *BioSMART* 6 (2): 85-87.
- Rahmawati, E., Dewoto, H.R. dan Wuyung, P.E. 2006. Anticancer Activity Study Of Ethanol Extract of Mahkota Dewa Fruit Pulp (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) in C3H Mouse Mammary Tumor Induced by Transplantation. *Med J Indones*. 15 (4): 217-222.
- Robbins, S.L., Cotran, R.S., dan Kumar, V. 2007. *Buku Ajar Patologi Edisi 7 Volume 1*. Jakarta: Kedokteran EGC.
- Sabatier, C. V., Bignon, Y. and Bernard-Gallon, D. J. 2003. Effects Of The Phytoestrogens Genistein And Daidzein On *BRCA2* Tumor Suppressor Gene Expression In Breast Cell Lines. *Nutrition And Cancer* 45(2): 247–255.

- Safrida. 2008. Perubahan Kadar Hormon Estrogen Pada Tikus Yang Diberi Tepung Kedelai Dan Tepung Tempe. *Thesis*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sanchez-Barcelo, Emilio J., Cos, S., Mediavilla, Martinez-Campa, Gonzalez, A. dan Gonzalez, C. A. 2005. Mini Review Melatonin–Estrogen Interactions In Breast Cancer. *J. Pineal Res.* 38:217–222.
- Satuma dan Fatmawati, H. 2009. *Sel Punca Kanker Payudara dan Upaya Pengendaliannya dengan Bahan Alami*. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Sugiyono. 2010. *Statistika untuk Penelitian*. Bandung: Penerbit Alfabeta.
- Taylor, C. K., Levy, R. M., Elliott, J. C. and Burnett, B. P. 2009. The effect of genistein aglycone on cancer and cancer risk: a review of in vitro, preclinical, and clinical studies. *Nutrition Reviews* 67(7):398–415.
- Utami, S. A. 2008. Efek Cyclophosphamid-Transfer Factor Terhadap Proliferasi Sel (AgNOR) Dan Volume Tumor Adeno Ca Mammae Mencit. *Thesis*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Utari, D.M., Rimbawan, Riyadi, H., Muhilal, Purwastyastuti. 2010. Pengaruh Pengolahan Kedelai Menjadi Tempe Dan Pemasakan Tempe Terhadap Kadar Isoflavon. *Penel Gizi Makan* 33 (2): 148-153.
- Wahidin, Noviani, R., Hermawan, S., Andriani, V., Ardian, A. dan Djarir. 2012. Population-Based Cancer Registration in Indonesia. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 13 (4): 1709-1710.
- Wolfe, Brittany. 2012. Roles of Resveratrol and Genistein in Invasion and Metastasis of Breast Cancer. *College of Science and Health Theses and Dissertations*. Chicago: DePaul University.
- Yan, L., Wei, W., Yi, S., Zhiqiang, E., dan Liqun. 2009. Study on the Inhibition of Fermented Soybean to Cancer Cells. *Journal of Northeast Agricultural University* 16(1): 25-28.
- Yudissanta, A. dan Ratna, M. 2012. Analisis Pemakaian Kemoterapi pada Kasus Kanker Payudara dengan Menggunakan Metode Regresi Logistik

Multinomial (Studi Kasus Pasien di Rumah Sakit “X” Surabaya). *Jurnal Sains Dan Seni ITS* 1 (1):112-117.

Zhang, C., Ho, S. C., Lin, F., Cheng, S., Fu, J. dan Chen, Y. 2010. Soy Product and Isoflavone Intake and Breast Cancer Risk Defined by Hormone Receptor Status. *Cancer Science* 101 (2): 501–507.

Zwieten, M. J. V. 1984. *The Rat As Animal Model In Breast Cancer Research - A Histopathological Study of Radiation–and hormone-Induced Rat Mammary Tumors*. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers.



LAMPIRAN

A. Penentuan Dosis

- LC₅₀ pada sel MCF-7 secara in vitro yaitu sebesar 208,31 µg/ml (Mahriani dan Utami, 2013).
- Berdasarkan hasil HPLC pada tepung tempe kedelai terdapat genistein sebesar 250.65 mg/kg berat kering (Safrida, 2007).

$$\text{Setara dengan tepung tempe kedelai} = \frac{0,00020831 \text{ gr/ml}}{0,00025065 \text{ gr/ml}} = 0.8 \text{ gram/ml}$$

- Jadi dosis LC₅₀ pada sel MCF-7 secara in vitro setara dengan 0,8 gram tepung tempe

Tabel pemberian perlakuan tepung tempe pada mencit C3H

LC ₅₀	Dosis	Volume Total	Volume Oral	Lama pemberian
1	0.8 gr	16 ml	1 ml/hari	16 hari
2	1.6 gr	16 ml	1 ml/hari	16 hari
3	2.4 gr	16 ml	1 ml/hari	16 hari
4	3.2 gr	16 ml	1 ml/hari	16 hari

B. Rumus Perhitungan Pengecatan AgNORBahan Pewarna AgNOR:

1 bagian : 2% gelatin dalam 1% asam formiat
2 bagian : 50% perak nitrat

- 2 % gelatin = 2 gram /100 ml Asam Formiat
= 200 mg / 10 ml Asam Formiat
= 100 mg /5 ml Asam Formiat
= 50 mg/2,5 ml Asam Formiat

- 50% AgNO₃ = 50 gram / 100 ml akuades
= 5 gram / 10 ml akuades

Proses Pembuatan Pewarna AgNOR

Tahap pertama untuk pembuatan pewarna AgNOR yaitu 50 mg dilarutkan dalam 2,5 ml Asam formiat. Setelah tercampur kemudian dilanjutkan tahap kedua yaitu 5 gram AgNO₃ dilarutkan dalam 10 ml akuades. Setelah kedua tahap selesai, kemudian larutan gelatin dalam Asam formiat dicampurkan ke larutan AgNO₃ dan terbentuk pewarna AgNOR.

C. Tabel Data Jumlah mean of AgNOR (mAgNOR)

Kelompok	Ulangan	mAgNOR	Rata-rata
Kontrol -	1	2.01	2.05
	2	2.05	
	3	2.09	
Kontrol +	1	4.02	3.41
	2	3.70	
	3	2.50	
Dosis 1	1	2.61	2.56
	2	2.72	
	3	2.35	
Dosis 2	1	2.68	2.74
	2	2.79	
	3	2.74	
Dosis 3	1	2.63	2.62
	2	2.59	
	3	2.63	
Dosis 4	1	4.24	3.39
	2	2.44	
	3	3.50	

D. Hasil Uji Statistik *Oneway* ANOVA mAgNOR**Descriptives**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K-	3	2.0500	.06083	.03512	1.8989	2.2011	1.98	2.09
K+	3	3.4067	.80133	.46265	1.4160	5.3973	2.50	4.02
D1	3	2.0067	.19009	.10975	1.5345	2.4789	1.82	2.20
D2	3	2.2667	.20817	.12019	1.7496	2.7838	2.10	2.50
D3	3	2.3867	.16042	.09262	1.9882	2.7852	2.22	2.54
D4	3	3.3933	.90473	.52235	1.1459	5.6408	2.44	4.24
Total	18	2.5850	.74395	.17535	2.2150	2.9550	1.82	4.24

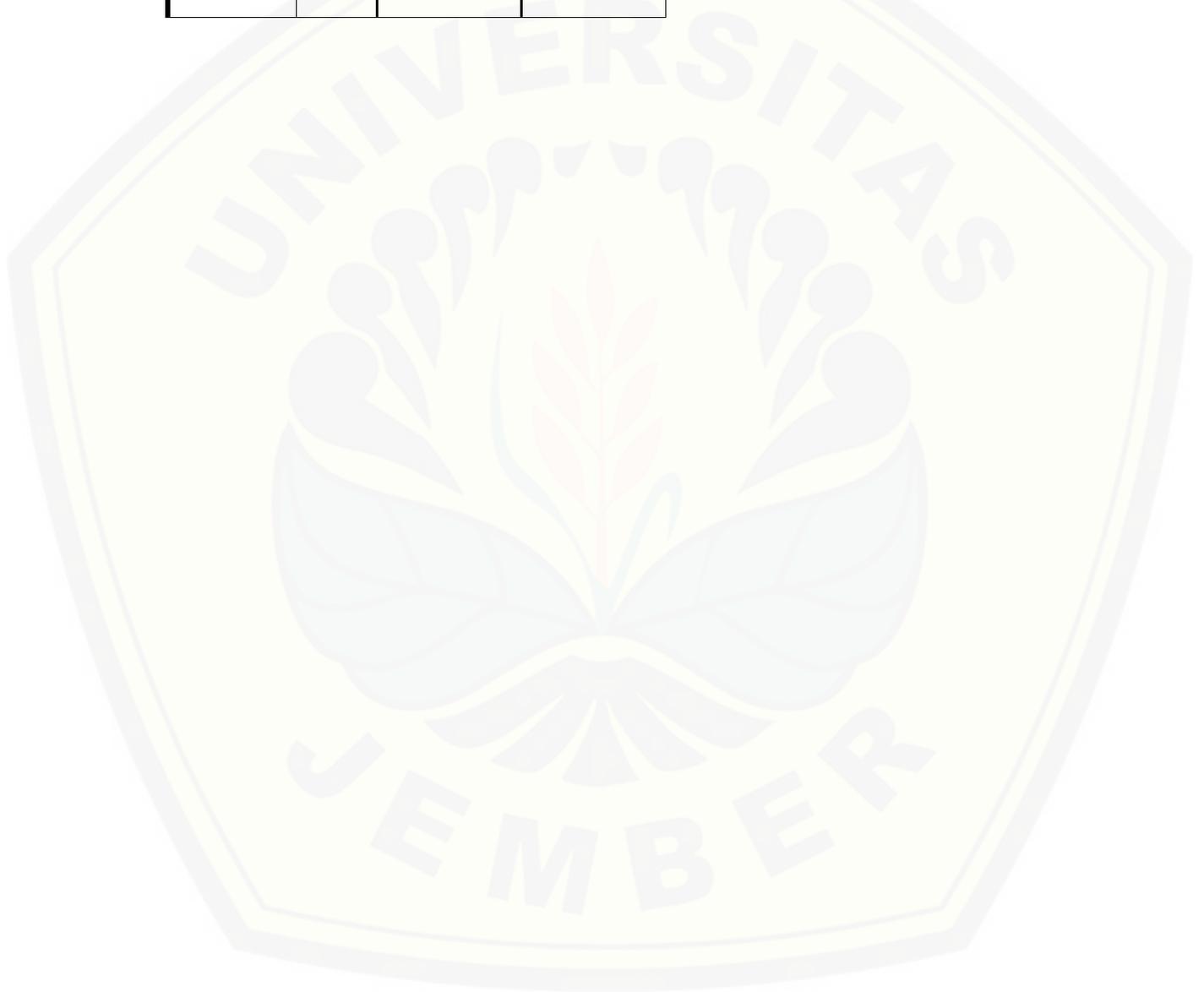
ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.270	5	1.254	4.793	.012
Within Groups	3.139	12	.262		
Total	9.409	17			

Duncan^a

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
D1	3	2.0067 ^a	
K-	3	2.0500 ^a	

D2	3	2.2667 ^a	
D3	3	2.3867 ^a	
D4	3		3.3933 ^b
K+	3		3.4067 ^b
Sig.		.415	.975



E. Tabel Data Jumlah Indeks Proliferatif AgNOR (pAgNOR)

Kelompok	Ulangan	pAgNOR	Rata-rata
Kontrol -	1	0.00	0.00
	2	0.00	
	3	0.00	
Kontrol +	1	18.00	11.33
	2	12.00	
	3	4.00	
Dosis 1	1	1.00	1.00
	2	1.00	
	3	1.00	
Dosis 2	1	0.00	0.67
	2	2.00	
	3	0.00	
Dosis 3	1	1.00	3.00
	2	5.00	
	3	3.00	
Dosis 4	1	20.00	11.00
	2	4.00	
	3	9.00	

F. Hasil Uji Statistik *Oneway* ANOVA Jumlah pAgNOR

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K-	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
K+	3	11.3333	7.02377	4.05518	-6.1147	28.7813	4.00	18.00
D1	3	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
D2	3	.6667	1.15470	.66667	-2.2018	3.5351	.00	2.00
D3	3	3.0000	2.00000	1.15470	-1.9683	7.9683	1.00	5.00
D4	3	11.0000	8.18535	4.72582	-9.3335	31.3335	4.00	20.00
Total	18	4.5000	6.22377	1.46696	1.4050	7.5950	.00	20.00

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	415.167	5	83.033	4.095	.021
Within Groups	243.333	12	20.278		
Total	658.500	17			

pAgNOR

Duncan^a

Kelompok	Subset for alpha = 0.05		
	N	1	2

K-	3	.0000 ^a	
D2	3	.6667 ^a	
D1	3	1.0000 ^a	
D3	3	3.0000 ^a	3.0000 ^b
D4	3		11.0000 ^b
K+	3		11.3333 ^b
Sig.		.464	.051

G. Tabel Data Volume Tumor Mencit C3H

Kelompok	Ulangan	Volume Tumor	Rata-rata
Kontrol +	1	8.23	7.19
	2	8.58	
	3	4.78	
Dosis 1	1	5.42	5.12
	2	6.88	
	3	3.05	
Dosis 2	1	5.13	4.00
	2	4.06	
	3	2.80	
Dosis 3	1	5.96	4.98
	2	8.18	
	3	0.80	
Dosis 4	1	4.51	5.32
	2	5.57	
	3	5.88	

H. Hasil Uji Statistik *Oneway* ANOVA Volume Tumor**Descriptives**

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K+	3	7.1933	2.09905	1.21189	1.9790	12.4077	4.78	8.58
D1	3	5.1177	1.93157	1.11519	.3194	9.9159	3.05	6.88
D2	3	3.9987	1.16329	.67163	1.1089	6.8884	2.81	5.13
D3	3	4.9780	3.78741	2.18666	-4.4305	14.3865	.80	8.18
D4	3	5.3210	.72009	.41575	3.5322	7.1098	4.51	5.88
Total	15	5.3217	2.15383	.55612	4.1290	6.5145	.80	8.58

ANOVA

VolumeTumor

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16.240	4	4.060	.834	.534
Within Groups	48.706	10	4.871		
Total	64.946	14			