

SKRIPSI

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK TEMPE KEDELAI (*GLYCINE MAX*)
TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 MENCIT (*MUS MUSCULUS*)
GALUR C3H MODEL KARSINOGENESIS PAYUDARA**



Oleh:
Ai Nurfaiziyah
G1A007075

**KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN
JURUSAN KEDOKTERAN
PURWOKERTO**

2011

LEMBAR PENGESAHAN

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK TEMPE KEDELAI (*GLYCINE MAX*)
TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 MENCIT (*MUS MUSCULUS*)
GALUR C3H MODEL KARSINOGENESIS PAYUDARA**

**Oleh :
Ai Nurfaiziyah
G1A007075**

SKRIPSI

Untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Sarjana Kedokteran
pada Fakultas Kedokteran dan Ilmu- Ilmu Kesehatan
Universitas Jenderal Soedirman
Purwokerto

Disetujui dan disahkan
Pada tanggal Agustus 2011

Pembimbing I

Pembimbing II

dr. Dody Novrial Sp.PA
NIP. 19781115.200501.1.001

dr. Kamal Sp.B
NIP. 19671217.2006.04.1.001

Mengetahui:

Dekan FKIK Unsoed

Ketua Jurusan Kedokteran Unsoed

dr. Hj. Retno Widiastuti, MS
NIP. 19481015.197602.2.001

dr. Joko Setyono, M.Sc
NIP. 19720719.200212.1.001

Persembahan

*Skripsi ini kupersembahkan teruntuk kedua orangtuaku,
Bapak dan Mamah...*

Renungan

*"Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan,
maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan),
kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain,
dan hanya kepada Tuhan-mulah hendaknya kamu berharap"
(QS. Al-Insyirah : 6-8)*

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK TEMPE KEDELAI (*GLYCINE MAX*)
TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 MENCIT (*MUS MUSCULUS*)
GALUR C3H MODEL KARSINOGENESIS PAYUDARA**

Abstrak

Proses karsinogenesis dipengaruhi oleh penurunan aktivitas apoptosis yang ditandai dengan ekspresi Caspase-3 yang rendah. Tempe kedelai (*Glycine max*) merupakan makanan fermentasi yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat. Kandungan isoflavon dalam tempe memiliki efek proapoptosis pada jaringan kanker. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian ekstrak tempe kedelai terhadap ekspresi Caspase-3 pada mencit (*Mus musculus*) galur C3H model karsinogenesis payudara. Penelitian eksperimental ini menggunakan metode *post test only control group design*. Sampel 24 ekor mencit C3H yang diinokulasi tumor dibagi kedalam 4 kelompok: 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan yang diberi ekstrak tempe dosis 12 mg/20gBB/hari, 24 mg/20gBB/hari, dan 48 mg/20gBB/hari selama 2 minggu, kemudian dilakukan pengecatan imunohistokimia Caspase-3 dan dinilai menggunakan *Allred Score*. Analisis statistika dengan uji *Kruskal-Wallis* dilanjutkan dengan *Post hoc* uji *Mann-Whitney* menggunakan bantuan program SPSS ver.15. Hasil analisis menunjukkan terdapat peningkatan ekspresi caspase-3 secara bermakna ($p=0,046$) dengan perbedaan antara kelompok kontrol dan perlakuan 1 ($p=0,021$), kontrol dan perlakuan 2 ($p=0,009$), kontrol dan perlakuan 3 ($p=0,361$), perlakuan 1 dan perlakuan 2 ($p=0,834$), perlakuan 1 dan perlakuan 3 ($p=0,203$), dan perlakuan 2 dan perlakuan 3 ($p=0,199$). Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak tempe kedelai meningkatkan ekspresi Caspase-3 dengan dosis efektif minimal sebesar 12 mg/KgBB/hari.

Kata kunci: ekstrak tempe kedelai, caspase-3, apoptosis, karsinogenesis payudara.

EFFECT OF SOYBEAN (*GLYCINE MAX*) TEMPE EXTRACT ON CASPASE-3 EXPRESSION OF C3H MICE (*MUS MUSCULUS*) BREAST CARCINOGENESIS MODEL

Abstract

Carcinogenesis process effected by decrease in apoptotic activities marked by low Caspase-3 expression. Soybean (*Glycine max*) tempe is a widely consumed fermented food. Isoflavon content of tempe showed proapoptotic effect on cancer. The aim of this study is to know the effect of soybean tempe extract on Caspase-3 expression of C3H mice (*Mus musculus*) breast carcinogenesis model. This experimental study utilized post test only control group design. Twenty-four C3H mice were inoculated with tumor and divided into four groups: 1 control group and three groups administered by soybean tempe extract dose 12 mg/20gBW/day, 24 mg/20gBW/day, and 48 mg/20gBW/day for two weeks, stained by caspase-3 immunohistochemistry and evaluated by *Allred score*. Statistical analysis *Kruskal-Wallis* continued by *Post hoc* analysis *Mann-Whitney* test used SPSS ver.15. Analysis result showed significant increase of caspase-3 expression ($p=0,046$) with difference between control group and group 1 ($p=0,009$), control and group 2 ($p=0,361$), control and group 3 ($p=0,834$), group 1 and group 2 ($p=0,834$), group 1 and group 3 ($p=0,203$), and group 2 and 3 ($p=0,199$). From the result we can conclude that soybean tempe extract administration increase Caspase-3 expression with minimal effective dose 12 mg/KgBW/day.

Keyword : soybean tempe extract, caspase-3, apoptosis, breast carcinogenesis.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Pemberian Ekstrak Tempe Kedelai (*Glycine max*) terhadap Ekspresi Caspase-3 Mencit (*Mus Musculus*) Galur C3H Model Karsinogenesis Payudara.” Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Sarjana Kedokteran pada Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto tahun 2011.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan serta uluran tangan dari berbagai pihak baik moril, maupun materil. Oleh karena itu, pada kesempatan ini perkenankanlah penulis untuk menyampaikan ucapan terima kasih, penghargaan, serta rasa hormat kepada:

1. dr. Hj. Retno Widiastuti, MS. selaku dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan Unsoed yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian skripsi ini.
2. dr. Joko Setyono, M.Sc selaku Ketua Jurusan Kedokteran Unsoed yang telah berkenan memberikan ijin kepada penulis untuk melakukan penelitian.
3. dr. Dody Novrial Sp.PA selaku pembimbing 1 dan dr. Kamal A Sp.B selaku pembimbing 2 yang senantiasa meluangkan waktu untuk membimbing, mengarahkan, serta mendukung penulis ditengah-tengah kesibukan beliau.
4. dr. Eman Sutrisna M.Kes selaku penelaah dan dr. Zaenuri Syamsu Hidayat,Sp.KF, Msi.Med selaku tim komisi yang telah meluangkan waktunya dan memberikan berbagai masukan yang sangat bermanfaat.

5. Seluruh dosen FKIK Unsoed khususnya Jurusan Kedokteran yang telah mendidik dan membimbing selama penulis menempuh pendidikan.
6. Orang tua penulis tercinta H.A. Muharram Mahmud dan Hj.Sholihah yang senantiasa memberikan doa, dukungan, dan semangatnya. Kakak penulis Wawa Hamidah M Sp.Pd S.Sos dan Cecep Sufyan Atsauri M, Lc serta adik penulis Zein Arsyil Yammi Iskan untuk doa dan dorongannya selama ini.
7. Teman-teman tim penelitian Mu'izza Nur Afifa, Andika Rediputra, dan Aryo Widagdo yang senantiasa menjadi cambuk semangat bagi penulis untuk terus berusaha dalam penyusunan skripsi ini.
8. Teman-teman angkatan 2007 Jurusan Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman yang senantiasa memberikan dorongan semangat selama proses penyusunan skripsi ini.
9. Keluarga besar Kedokteran Unsoed dan semua pihak yang telah membantu penyelesaian skripsi ini.
10. Beasiswa DIKTI yang telah membantu penulis dari mulai persiapan hingga penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak memiliki kekurangan didalamnya. Untuk itu, segala kritik dan saran sangat diharapkan demi kesempurnaan di masa mendatang. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi yang membacanya.

Purwokerto, 16 Agustus 2011

Ai Nurfaiziyah

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah.....	4
C. Tujuan dan Manfaat	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Landasan Teori	6
1. Kanker Payudara (<i>Adenocarcinoma mammae</i>)	6
2. Caspase-3 dan Apoptosis	14
3. Efek Tempe Terhadap Kanker	22
B. Kerangka Pemikiran Penelitian.....	29
C. Kerangka Konsep Penelitian.....	30
D. Hipotesis	30
BAB III METODE PENELITIAN	
A. Materi dan Bahan	31
1. Hewan Coba.....	31
2. Alat dan Bahan.....	31
3. Penentuan Besar Sampel.....	32
B. Metode Penelitian.....	33
C. Rancangan Percobaan.....	33
D. Variabel yang Diukur	34
1. Variabel Independen.....	34
2. Variabel Dependen	34
E. Definisi Operasional Variabel.....	34
1. Variabel Independen.....	34
2. Variabel Dependen	34
F. Cara Mengukur Variabel.....	35
G. Tata Urutan Kerja	36
1. Persiapan Hewan Coba	36
2. Adaptasi <i>Mus musculus</i> C3H	36
3. Persiapan Bahan Penelitian.....	37
4. Perlakuan Hewan Coba	38
5. Pengambilan Jaringan.....	39
6. Pewarnaan Imunohistokimia.....	39
H. Analisis Data.....	41
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil	42

1. Perhitungan Nilai <i>Kappa</i> (<i>k</i>)	42
2. Ekspresi Caspase-3	43
B. Pembahasan	45
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan.....	53
B. Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	59

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Klasifikasi Kanker Payudara Berdasarkan TNM	9
Tabel 2.2. Klasifikasi Derajat Histologi Kombinasi <i>Nottingham</i>	10
Tabel 2.3. Subfamili Caspase	15
Tabel 2.4. Kandungan Zat Gizi Tempe.....	22
Tabel 4.1. Median dan Nilai Minimum-Maksimum <i>Allred score</i>	44
Tabel 4.2. Hasil Uji Beda <i>Allred score</i> Antar Kelompok	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Bagan Alur Skema Sederhana Dasar Molekular Kanker.....	7
Gambar 2.2. Faktor Risiko Kanker Payudara.....	13
Gambar 2.3. Gambaran Skematik Apoptosis	14
Gambar 2.4. Jalur Aktivasi Caspase-8/Caspase-10	17
Gambar 2.5. Jalur Aktivasi Caspase-2	19
Gambar 2.6. Jalur Aktivasi Caspase-9	20
Gambar 2.7. Jalur Apoptosis	21
Gambar 2.8. Kerangka Pemikiran Penelitian	29
Gambar 2.9. Kerangka Konsep Penelitian	31
Gambar 3.1. <i>Allred scoring</i>	36
Gambar 3.2. Alur Pengujian.....	40
Gambar 4.1. Pewarnaan Imunohistokimia Caspase-3ditunjukkan dengan pewarnaan coklat pada sitoplasma	43
Gambar 4.2. Mekanisme apoptosis oleh peptida turunan isoflavon kedelai.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Klasifikasi Kanker Payudara Berdasarkan TNM.....	57
Lampiran 2. Tabel Konversi Perhitungan Dosis Berdasarkan Luas Permukaan Tubuh untuk Berbagai Jenis Hewan dan Manusia.....	60
Lampiran 3. Cara Penentuan Dosis Ekstrak Tempe	61
Lampiran 4. Prosedur Pembuatan Preparat dan Pewarnaan Imunohistokimia Caspase-3.....	63
Lampiran 5. Hasil Pengamatan Berat Badan, Besar Tumor, dan Volume Tumor Selama Penelitian.....	65
Lampiran 6. Uji Normalitas Data	66
Lampiran 7. Uji <i>Kruskal-Wallis</i>	68
Lampiran 8. Uji <i>Mann-Whitney</i>	69
Lampiran 9. Uji Nilai <i>Kappa</i>	72

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kanker merupakan penyebab utama kematian di dunia dengan 7,4 juta atau 13% kematian pada tahun 2004 (WHO, 2009). Berdasarkan data dari *Globocan International Agency for Research on Cancer* (IARC) tahun 2008, kanker payudara menempati urutan pertama dari seluruh jenis kanker pada perempuan di dunia. Angka insidensi kanker payudara sebanyak 22,9% serta angka mortalitas sebesar 13,7% per tahun (Ferlay et al., 2008). Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2002 menunjukkan bahwa kanker merupakan penyebab kematian ketiga di Indonesia setelah penyakit jantung dan stroke. Kanker payudara menempati urutan pertama pasien kanker rawat inap di rumah sakit sejak tahun 2004 hingga tahun 2008. Kasus kanker di Propinsi Jawa Tengah ditemukan sebanyak 22.857 kasus (7,13 per 1000 penduduk) dengan insidensi kanker payudara sebesar 3,45 per 1000 penduduk pada tahun 2006 (Depkes, 2008).

Pada proses karsinogenesis, terdapat empat kelas gen regulatorik normal yang merupakan sasaran utama kerusakan gen, yaitu protoonkogen yang mendorong pertumbuhan, gen penekan tumor yang menghambat pertumbuhan (antionkogen), gen yang mengatur perbaikan DNA yang rusak, dan gen yang mengatur kematian sel terprogram atau apoptosis (Kumar et al., 2010). Pertumbuhan payudara normal dikendalikan oleh keseimbangan antara proliferasi dan apoptosis sel, dan terdapat bukti-bukti kuat yang menunjukkan bahwa pertumbuhan tumor bukan hanya disebabkan oleh proliferasi yang tidak terkontrol namun juga karena berkurangnya apoptosis (Parton, 2001).

Apoptosis adalah proses regulasi kematian sel untuk mengontrol jumlah sel dan menghilangkan sel yang rusak (Parton, 2001). Induksi dan eksekusi apoptosis membutuhkan sejumlah molekul yang bekerjasama meliputi molekul pemberi sinyal, berbagai reseptor, berbagai enzim, dan berbagai protein regulator gen (Fan et al., 2005).

Terdapat dua jalur utama apoptosis, *stress pathway* (intrinsik) dan *death-receptor pathway* (ekstrinsik). Kedua jalur tersebut berakhir pada aktivasi caspase-3, caspase-6, dan caspase-7 yang menyebabkan kematian sel, dan sampai saat ini caspase-3 (bentuk aktif dari procaspase-3) merupakan jenis caspase mamalia yang paling dimengerti spesifisitas dan perannya pada apoptosis (Fan et al., 2005; Croce, 2008; Porter and Janicke, 1999). Meskipun terdapat sekurang-kurangnya 14 jenis *caspase* dalam tubuh manusia, hanya sebagian dari enzim-enzim tersebut dideteksi teraktivasi proteolitik oleh berbagai stimulus kematian sel yang berbeda. Namun, procaspase-3 selalu ada dan mengalami pembelahan autoproteolitik atau pembelahan oleh satu atau lebih protease lain (Porter and Janicke, 1999). Pada sel yang mengalami apoptosis, caspase-3 merupakan eksekutor utama yang dapat diaktivasi oleh kedua jalur baik itu jalur ekstrinsik maupun intrinsik. Diantara 3 jenis caspase eksekutor yaitu caspase-3, -6, dan -7, caspase-3 merupakan jenis yang paling penting untuk menginduksi urutan selanjutnya dalam proses apoptosis (Ghavami et al., 2009). Untuk mendeteksi dan menilai aktivitas apoptosis pada jaringan, caspase-3 terbukti merupakan metode pewarnaan imunohistokimia yang mudah, sensitif, dan dapat diandalkan sehingga

direkomendasikan untuk digunakan pada deteksi dan penilaian apoptosis jaringan (Duan et al., 2003).

Park et al. (2009) dalam penelitiannya mengemukakan bahwa peptida yang terkandung dalam kedelai bersifat sebagai agen kemopreventif dengan menginduksi ekspresi caspase-3 secara *in vivo*, sebagaimana juga dikemukakan oleh Sarkar et al. (2006) bahwa genistein, salah satu jenis isoflavon yang banyak terdapat dalam kedelai, dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker hati dan kanker payudara manusia melalui aktivasi caspase-3. Adapun Jin et al. (2010) membuktikan dalam penelitiannya bahwa daidzein yang juga merupakan salah satu jenis isoflavon yang terdapat dalam kedelai terbukti dapat menginduksi apoptosis sel-sel kanker payudara melalui jalur mitokondria dalam kaskade apoptosis sel.

Konsumsi kedelai di Indonesia cukup tinggi dan Indonesia merupakan negara produsen terbesar di dunia serta menjadi pasar kedelai terbesar di Asia. Sebanyak 50 persen kedelai di Indonesia dikonsumsi dalam bentuk tempe, 40 persen tahu, dan 10 persen dalam bentuk produk lain (tauco, kecap, dan lain-lain). Konsumsi tempe di Indonesia saat ini diduga sekitar 6,45 kg per orang per tahun (Astawan, 2003). Tempe merupakan makanan hasil fermentasi kedelai yang banyak tersedia dan dikonsumsi secara luas oleh penduduk khususnya di Indonesia dan juga di berbagai belahan dunia lain. Akhir-akhir ini konsumsi tempe cukup meningkat, tidak hanya di Indonesia tetapi juga di Amerika Serikat dan Eropa (Kuswanto, 2004). Mayoritas isoflavon yang berasal dari kacang-kacangan memiliki aktifitas hormon alami dan efek anti kanker, meskipun demikian, penelitian yang dilakukan di Nanjing University

mengindikasikan bahwa isoflavon yang berasal dari tempe memiliki aktivitas antitumor lebih kuat dibandingkan dengan isoflavon kedelai karena efek dari fermentasi (Lu et al., 2009).

Berdasarkan uraian di atas maka dalam penelitian ini akan dikaji tentang efek pemberian ekstrak tempe kedelai terhadap ekspresi caspase-3 mencit galur C3H model karsinogenesis payudara. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi untuk dapat meningkatkan penggunaan tempe kedelai sebagai bahan makanan yang berpotensi antikanker dan rekomendasi pemanfaatannya sebagai terapi adjuvan kanker.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah, dapat dirumuskan masalah penelitian yaitu:

1. Bagaimanakah efek pemberian ekstrak tempe kedelai (*Glycine max*) terhadap ekspresi caspase-3 mencit (*Mus musculus*) galur C3H model karsinogenesis payudara?
2. Berapakah dosis efektif minimal ekstrak tempe kedelai (*Glycine max*) yang memberikan efek meningkatkan ekspresi caspase-3 secara bermakna pada mencit (*Mus musculus*) galur C3H model karsinogenesis payudara?

C. Tujuan dan Manfaat

1. Tujuan Penelitian

a. Tujuan Umum

Mengetahui efek pemberian ekstrak tempe kedelai (*Glycine max*) terhadap ekspresi caspase-3 mencit (*Mus musculus*) galur C3H model karsinogenesis payudara.

b. Tujuan Khusus

Mengetahui dosis efektif minimal ekstrak tempe kedelai (*Glycine max*) yang memberikan efek meningkatkan ekspresi caspase-3 secara bermakna pada mencit (*Mus musculus*) galur C3H model karsinogenesis payudara.

2. Manfaat Penelitian

a. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah khasanah ilmu pengetahuan di bidang patologi anatomi khususnya mengenai efek pemberian tempe terhadap ekspresi caspase-3 kanker payudara pada mencit (*Mus musculus*) galur C3H.

b. Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi untuk dapat meningkatkan penggunaan tempe kedelai sebagai bahan makanan yang berpotensi antikanker dan pemanfaatannya sebagai terapi ajuvan kanker.

II. TINJAUAN PUSTAKA

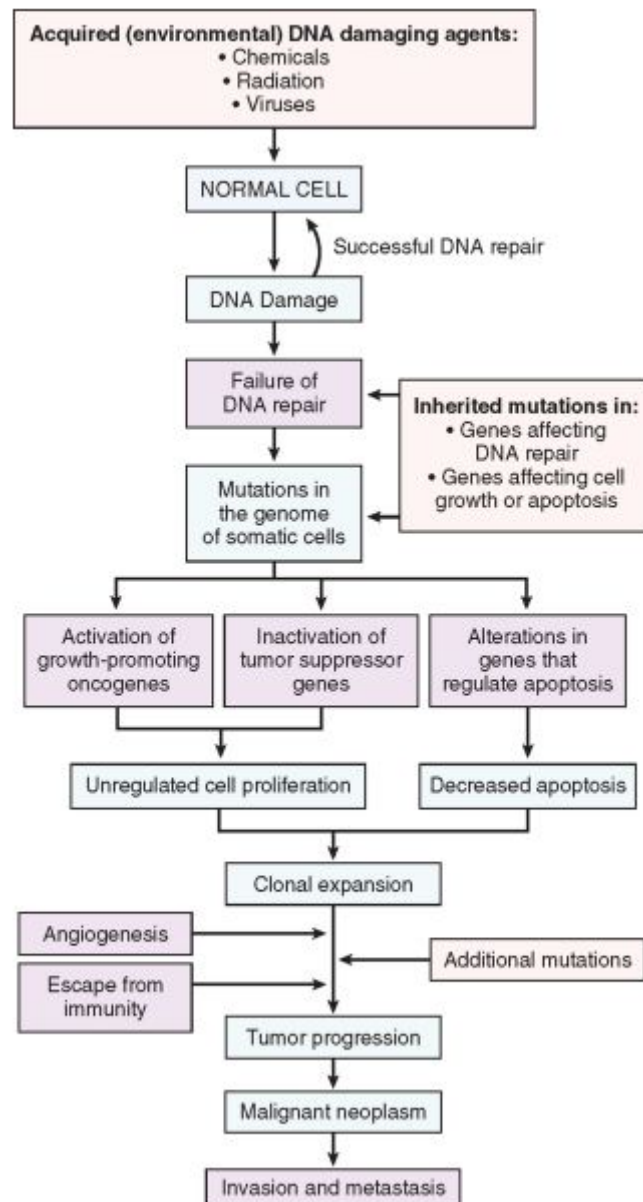
A. Landasan Teori

1. Kanker Payudara (*Adenocarcinoma mammae*)

a. Karsinogenesis

Kanker merupakan penyebab utama kematian di dunia dengan 7,4 juta atau 13% kematian pada tahun 2004 (WHO, 2009). Kanker merupakan pertambahan massa akibat pertumbuhan dan pembelahan sel yang abnormal yang berpotensi menjadi maligna atau bersifat ganas (Martini *et al.*, 2006).

Proses karsinogenesis diawali dari kerusakan gen nonletal yang mungkin didapat dari lingkungan seperti zat kimia, radiasi, dan virus, atau diwariskan. Terdapat empat kelas gen regulatorik normal yang merupakan sasaran utama pada kerusakan gen tersebut, yaitu protoonkogen yang mendorong pertumbuhan, gen penekan tumor yang menghambat pertumbuhan (antionkogen), gen yang mengatur kematian sel terprogram atau apoptosis, dan gen yang mengatur perbaikan DNA yang rusak. Mutasi gen perbaikan DNA tidak secara langsung menyebabkan proliferasi atau apoptosis sel, melainkan mempengaruhi kemampuan organisme untuk memperbaiki kerusakan nonletal pada gen-gen lain, termasuk protoonkogen, gen penekan tumor, dan gen regulator apoptosis. Ketidakmampuan perbaikan DNA menyebabkan mutasi pada gen-gen tersebut berlanjut dan mengakibatkan pertumbuhan kanker (Kumar *et al.*, 2010).



Gambar 2.1. Bagan alur skema sederhana dasar molekular kanker (Kumar et al., 2010).

Setiap gen kanker memiliki fungsi spesifik, yang disregulasinya berperan dalam perkembangan keganasan. Berikut ini terdapat delapan perubahan mendasar fisiologi sel yang menentukan fenotipe keganasan:

- 1) Mampu menghasilkan sinyal pertumbuhan sendiri
- 2) Insensitivitas terhadap sinyal penghambat pertumbuhan
- 3) Dapat menghindari apoptosis
- 4) Memiliki potensi replikasi tanpa batas
- 5) Mampu untuk angiogenesis berkelanjutan
- 6) Kemampuan untuk menginvasi dan metastasis lebih lanjut
- 7) Defek dalam perbaikan DNA
- 8) Lolos dari serangan sistem imun pejamu

(Kumar et al., 2010)

Inisiasi dan progresi tumor tergantung pada fungsi-fungsi spesifik sel-sel kanker pada situasi primer maupun metastasis. Fungsi ini didukung oleh mutasi onkogen dan inaktivasi gen supresor tumor (Chiang dan Massagué, 2008). Inisiasi pada kanker payudara disebabkan oleh transformasi genetik dan epigenetik dalam satu sel yang akan mengalami progresi sebagai akibat dari akumulasi perubahan genetik tambahan dengan ekspansi klonal dan seleksi. Faktor-faktor lokal juga memainkan peranan dalam progresi metastasis (Polyak, 2007).

Duktus kelenjar payudara normal terdiri dari membran basal dan selapis epitel luminal dan sel mioepitel. Kanker payudara tumbuh sebagai tumor solid yang mengandung stroma. Penyusun dari stroma meliputi berbagai jenis leukosit, fibroblast, myofibroblast, dan sel-sel endothelial. Progresi menjadi kanker in situ disebabkan perubahan pada sel dan penurunan jumlah sel mioepitel sehingga mengakibatkan

degradasi membran basal. Pada saat yang sama, jumlah fibroblast, myofibroblast, limfosit, dan sel endotel mengalami peningkatan. Hilangnya sel myoepitel dan membran basal mengakibatkan terjadinya kanker invasif sehingga sel-sel tumor dapat menginvasi jaringan sekitar atau dapat bermigrasi ke organ jauh (Polyak, 2007).

b. Klasifikasi

1) Klasifikasi Anatomis

Tabel 2.1. Klasifikasi Kanker Payudara Berdasarkan TNM

Stadium	T (tumor)	N (limfonodi)	M (metastasis jauh)
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1*	N0	M0
Stadium IB	T0, T1*	N1mi	M0
Stadium IIA	T0, T1*	N1**	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0, T1*, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stadium IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stadium IIIC	T apapun	N3	M0
Stadium IV	T apapun	N apapun	M1

(American Joint Committee of Cancer, 2010)

Keterangan:

*T1 termasuk di dalamnya T1mi

**T0 dan T1 tumor dengan hanya mikrometastasis nodul disingkirkan dari stadium IIA dan diklasifikasikan dalam stadium IB

*M0 termasuk di dalamnya M0(1+)

*pM0 tidak valid, M0 harus klinis

2) Klasifikasi Histologis

a) Tipe Histopatologi

American Joint Committee of Cancer (2010) membagi

tipe histopatologi kanker payudara menjadi dua tipe, yaitu:

i. Karsinoma in situ

Karsinoma in situ dibagi menjadi tipe: 1) tidak spesifik, 2) intraduktal, dan 3) *Paget's disease* dan intraduktal.

ii. Karsinoma invasif

Karsinoma invasif dibagi menjadi tipe: 1) tidak spesifik; 2) duktal; 3) inflamatori; 4) medullar; tidak spesifik; 5) medullar dengan stroma limfoid; 6) mucinous; 7) papillar; 8) tubular; 9) lobular; 10) *Paget's disease* dan infiltrasi; 11) *Undifferentiated*; 12) Sel skuamus; 13) Kistik adenoid; 14) Sekretori; dan 15) Kribriiformis.

b) Klasifikasi Derajat Histologis

Tabel 2.2. Klasifikasi Derajat Histologis Kombinasi Nottingham

Kriteria	Skor
Formasi tubuler	
Mayoritas tumor (> 75%)	1
Derajat sedang (10-75%)	2
Sedikit atau tidak ada (< 10%)	3
Jumlah mitosis	
0-9 mitosis/10 LPB	1
10-19 mitosis/10 LPB	2
> 20 mitosis/10 LPB	3
Pleomorfisme nuklear	
Sel-sel kecil seragam	1
Ukuran nuklear sedang dan bervariasi	2
Nuklear sangat bervariasi	3

(American Joint Committee of Cancer, 2010)

Derajat histologis kanker payudara ditentukan dengan menjumlahkan skor di atas (tabel 2) dan dibagi menjadi beberapa derajat, yaitu: 1) Gx (derajat tidak dapat dinilai); 2) G1, derajat histologi kombinasi rendah (berdiferensiasi baik) jika jumlah skor

3-5; 3) G2, derajat histologi kombinasi sedang (berdiferensiasi sedang) jika jumlah skor 6-7; dan 4) G3, derajat histologi kombinasi tinggi jika jumlah skor 8-9 (American Joint Committee of Cancer, 2010).

c. Penegakan Diagnosis (WHO, 2006)

1. Pemeriksaan Klinis

- a) Gejala yang dikeluhkan meliputi: benjolan pada payudara, nyeri pada payudara, *discharge* dari puting payudara, retraksi kulit atau puting, massa atau nyeri pada aksila, pembengkakan lengan, gejala-gejala yang mungkin timbul akibat metastasis, dan suspek pada hasil mammografi.
- b) Riwayat penyakit dahulu pada payudara
- c) Riwayat keluarga: kanker payudara atau kanker lain yang berhubungan dengan kanker ginekologi
- d) Riwayat obstetri dan ginekologi, meliputi: usia menarche, usia melahirkan pertama kali, jumlah kehamilan, anak, dan abortus, usia saat menopause
- e) Riwayat penggunaan hormonal: pil kontrasepsi (jenis dan durasi), terapi sulih hormon (jenis dan durasi)

2. Pemeriksaan fisik

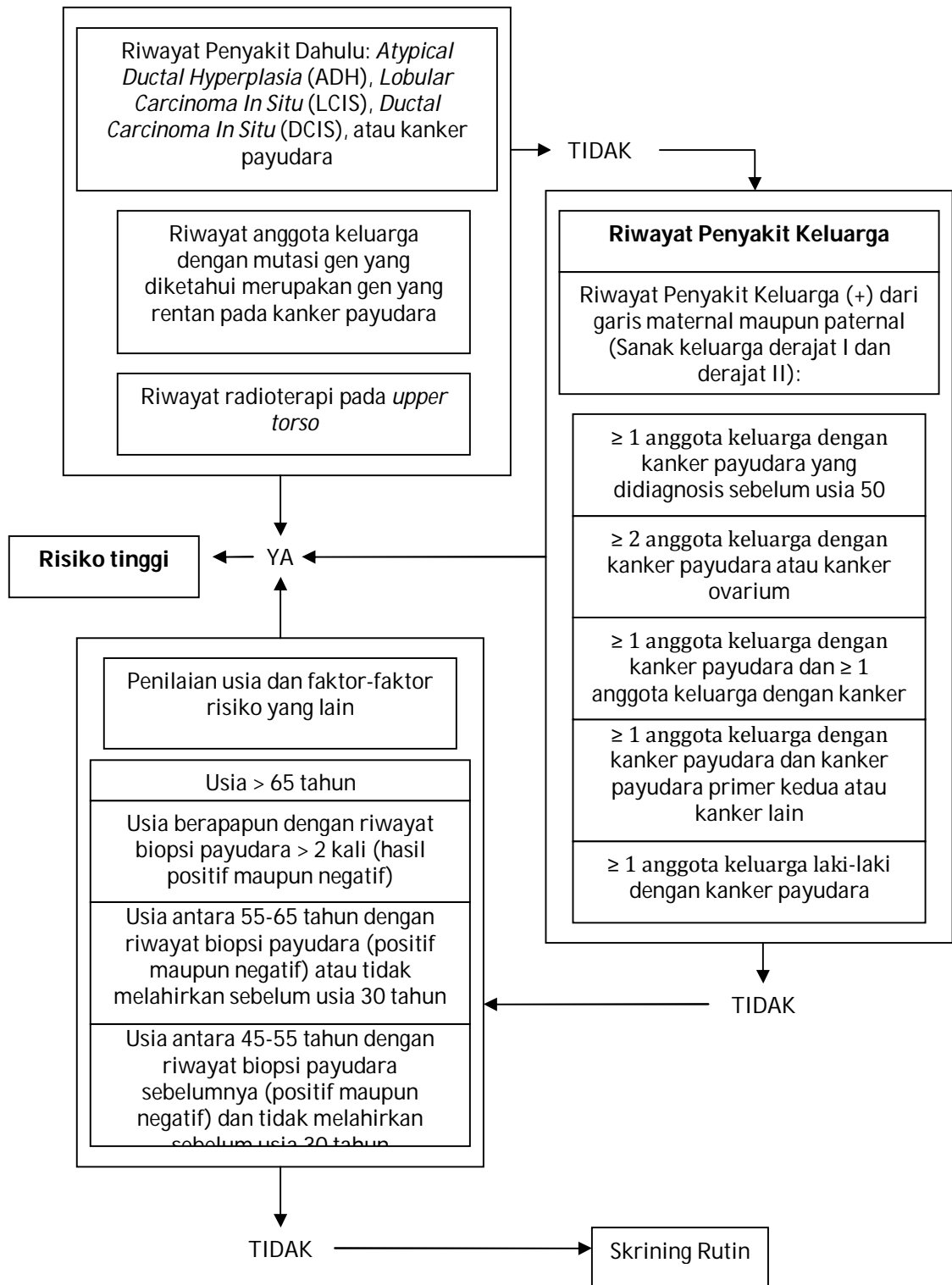
- a) Keadaan umum, meliputi: berat badan, tinggi badan, dan luas permukaan tubuh
- b) Pemeriksaan seluruh sistem

- c) Pemeriksaan status lokalis, meliputi: massa payudara, ukuran, lokasi spesifik (arah jarum jam dan jarak dari aerola mammae), bentuk, konsistensi, fiksasi pada kulit, m.pectoralis, dan dinding dada, jumlah, perubahan kulit, eritema, edema, infiltrasi, ulserasi, perubahan puting payudara: retraksi, eritema, erosi atau ulserasi, *discharge* (spesifikasi)
 - d) Nodul aksila pada kedua sisi (jumlah, ukuran, lokasi, dan fiksasi pada nodul lain struktur lain di bawahnya), nodul supraklavikular
 - e) Pemeriksaan status lokalis metastasis
3. Pemeriksaan laboratorium
- a) Pemeriksaan darah lengkap, profil hepar, dan renal.
 - b) Mammografi dan/ atau USG bilateral
 - c) Pemeriksaan Rontgen dan CT-scan dada jika diperlukan
 - d) USG dan CT-scan pada abdomen
 - e) Scan tulang jika terdapat indikasi
 - f) Elektrokardiogram dan ekokardiogram jika usia lebih dari 60 tahun

4. Diagnosis Patologis

Diagnosis patologi menggunakan *fine needle biopsy* dan dibuat sesuai dengan klasifikasi patologis, analisis semua jaringan meliputi status nodus limfatikus, penentuan *estrogen receptor dependent*, *progesteron receptor*, dan status reseptor Her2.

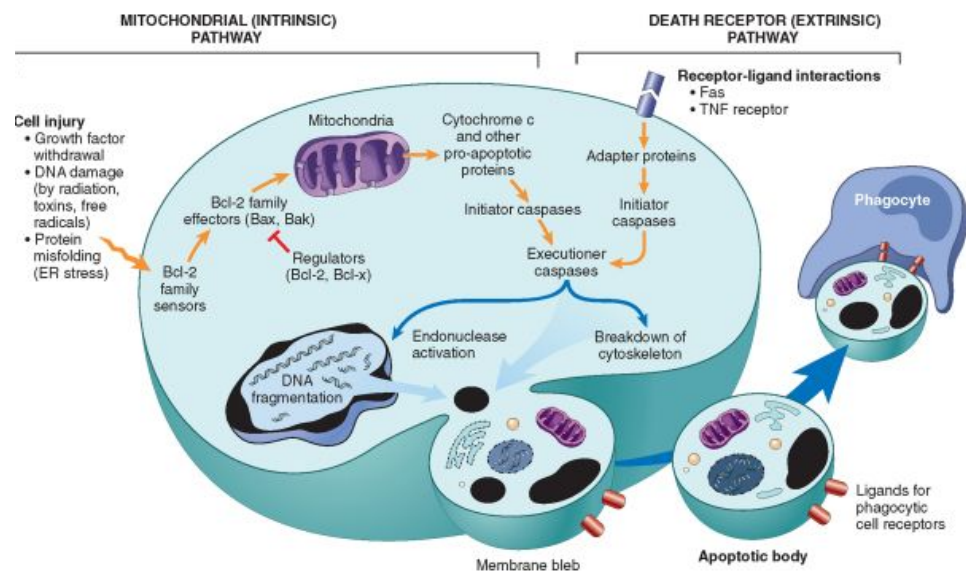
d. Faktor Risiko



Gambar 2.2. Faktor Risiko Kanker Payudara (CDHS, 2005)

2. Caspase 3 dan Apoptosis Sel

Apoptosis merupakan bentuk kematian sel terprogram yang terjadi secara teratur dengan kaskade dalam kondisi tertentu. Apoptosis memainkan peranan yang sangat penting dalam pertumbuhan, perkembangan dan respon imun, serta pengaturan sel-sel abnormal dalam organisme (Fan et al., 2005).



Gambar 2.3. Gambaran Skematik Apoptosis (Kumar et al., 2010)

Induksi dan eksekusi apoptosis membutuhkan sejumlah molekul termasuk penanda, reseptor, enzim, dan gen pengatur protein. Diantara molekul-molekul tersebut, kaskade caspase merupakan suatu proses yang penting pada apoptosis (Fan et al., 2005). Berikut ini urutan perjalanan apoptosis pada sel seperti dikutip dari Kumar et al. (2010):

a. Aktivasi caspase

Terdapat 14 jenis caspase yang sudah berhasil diidentifikasi sejauh ini. Semuanya merupakan *aspartate-specific cysteine protease*

dengan zimogen yang disebut dengan procaspase. Semua jenis caspase mampu melakukan autoaktivasi dan juga mengaktivasi jenis caspase lain (Fan et al., 2005). Berdasarkan homologinya dengan sekuens asam amino, caspase dibagi menjadi 3 subfamili sebagai berikut:

Tabel 2.3. Subfamili *Caspase*

Subfamili	Peran	Anggota
I	Aktivator apoptosis	Caspase-2 Caspase-8 Caspase-9 Caspase-10
II	Eksekutor apoptosis	Caspase-3 Caspase-6 Caspase-7
III	Mediator inflamasi	Caspase-1 Caspase-4 Caspase-5 Caspase-11 Caspase-12 Caspase-13 Caspase-14

(Fan et al., 2005)

b. Pemecahan DNA dan protein

Pemecahan DNA dan protein dilakukan oleh endonuklease tergantung molekul Ca^{2+} dan Mg^{2+} menjadi fragmen-fragmen DNA (Kumar et al., 2010).

c. Perubahan membran dan fagositosis oleh fagosit

Plasma membran pada apoptosis mengalami perubahan sehingga dikenali sebagai sel mati oleh fagosit. Diantara perubahan tersebut adalah fosfolipid (*phosphatidylserine*) dari bagian dalam sampai bagian luar membran sel yang dikenali oleh beberapa reseptor fagosit (Kumar et al., 2010).

Secara umum, terdapat dua jalur utama apoptosis dimana caspase dapat teraktivasi: yang pertama adalah *death signal-induced, death receptor-mediated pathway* (jalur ekstrinsik); dan yang kedua adalah *stress-induced, mitochondrion-mediated pathway* (jalur intrinsik) (Fan et al., 2005). Masing-masing jalur tersebut sama-sama berakhir pada aktivasi proteolitik caspase-3 atau -7. Secara biokimiawi, gambaran apoptosis terdiri atas aktivasi caspase dan fragmentasi DNA (Ghavami et al., 2009).

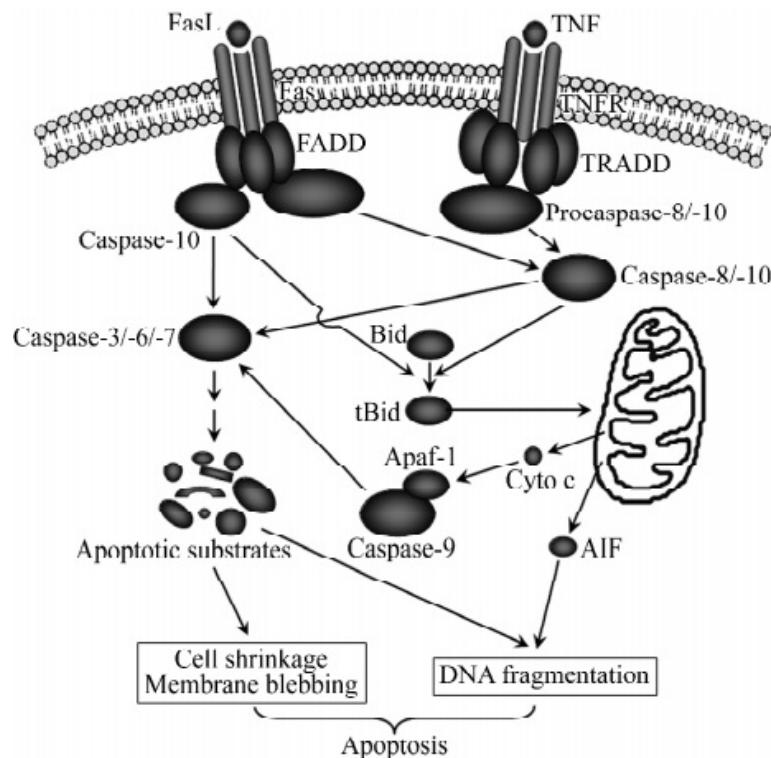
a. *Death receptor-mediated procaspase-activation pathway*

Jalur *death receptor pathway* dapat dibedakan kembali menjadi jalur inisiasi yaitu melalui aktivasi caspase-8/caspase-10, dan melalui caspase-2, seperti dijelaskan sebagai berikut:

1) *Death receptor-dependent procaspase-activation pathway caspase-8/caspase-10.*

Sinyal kematian sel seperti Fasligand (FasL) (*fibroblast associated antigen*, disebut juga Apo-1 atau CD95) dan tumor nekrosis faktor (TNF)-2 dapat dikenali oleh reseptornya yaitu Fas dan atau TNF reseptor (TNFR)-1, pada permukaan sel. Ikatan yang terbentuk akan mengaktivasi reseptor kematian sel. Fas berikatan dengan *Fas-associated death domain* (FADD) (atau *TNFR-associated death domain*, TRADD) dan menyebabkan agregasi FADD dan memunculkan DEDs (*Death effector domains*). DEDs kemudian akan berinteraksi dengan DEDs pada prodomain procaspase-8, sehingga menginduksi oligomerisasi procaspase-8 pada sitosol plasma membran. Setelah itu molekul kompleks yang

dikenal sebagai *death-inducing signal complex* (DISC) terbentuk. Dalam DISC, dua subunit linier procaspase-8 bersatu diikuti dengan autoaktivasi menjadi caspase-8.



Gambar 2.4. Jalur aktivasi caspase-8/caspase-10 (Fan et al., 2005)

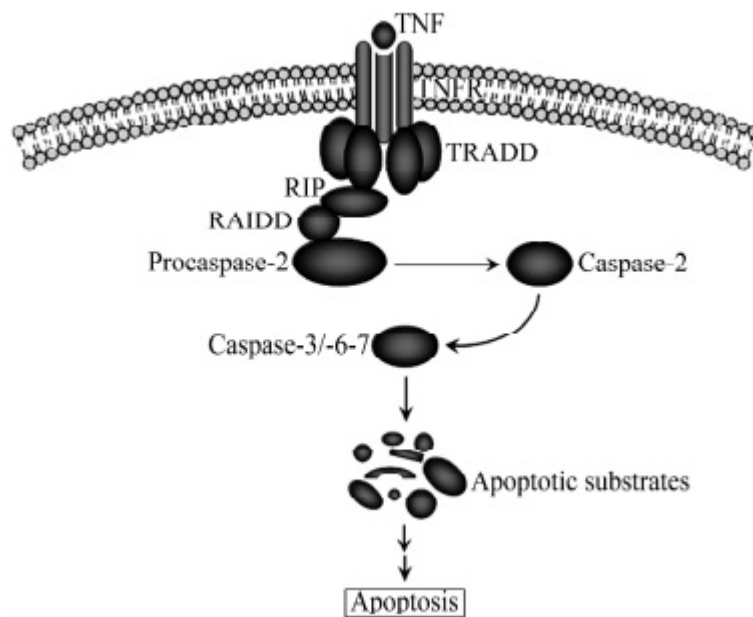
Setelah caspase-8 terbentuk, jalur aktivasi berikutnya dalam kaskade apoptosis berbeda-beda tergantung pada jenis sel terjadinya. Pada sel tipe I (sel-sel limfoid), caspase-8 mengaktivasi secara langsung procaspase berikutnya dalam kaskade. Namun pada sel tipe II (selain sel tipe I), caspase-8 hanya sedikit teraktivasi dan tidak dapat mengaktivasi procaspase-3 secara langsung. Namun, caspase-3 dapat diaktivasi melalui jalur mitokondria melalui *truncating Bid* (tBid), salah satu jenis protein proapoptotik dalam sitosol yang akan mengaktivasi sitokrom c,

AIF, dan molekul lain dari mitokondria sehingga dapat terjadi induksi apoptosis (Fan et al., 2005).

Jalur aktivasi yang dimediasi oleh procaspase-10, dengan prodomain yang mengandung DED, serupa dengan yang dimediasi oleh procaspase-8. Fungsi caspase-10 terutama dalam apoptosis sel-sel limfoid. Caspase-10 dapat berfungsi sendiri dan menginisiasi apoptosis karena Fas dan TNF. Meskipun caspase-8 dan caspase-10 keduanya berinteraksi dengan DED dari FADD dalam *death receptor signaling*, mereka memiliki substrat apoptosis yang berbeda (Fan et al., 2005).

2) *Death receptor-dependent procaspase-activation pathway caspase-2*

Sekali sinyal kematian sel berikatan dengan reseptor kematian sel yang bersangkutan pada plasma membran, reseptor kematian sel akan teraktivasi. Reseptor teraktivasi merekrut procaspase-2 oleh adaptor seperti *receptor-interacting protein* (RIP), *RIP-associated ICH-1/CED-3* holomog protein dengan domain kematian sel dan TRADD yang merupakan prodomain procaspase-2. Hanya sedikit hal yang telah terungkap terkait dengan substrat caspase-2 dalam kaskade berikutnya (Fan et al., 2005).

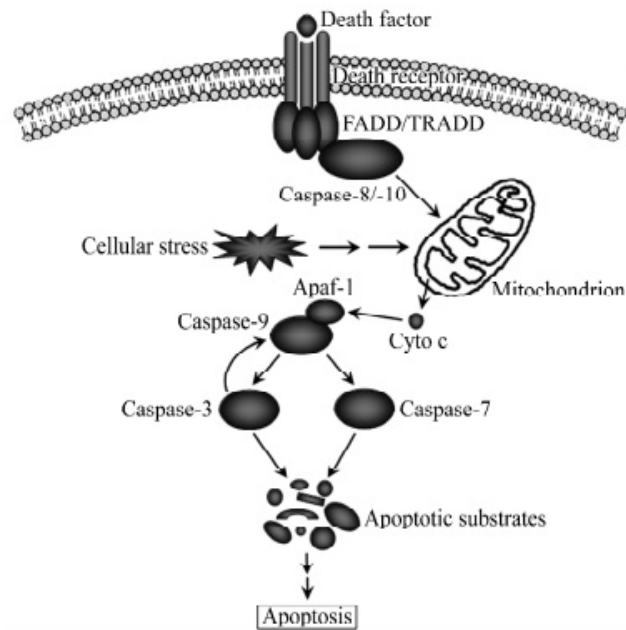


Gambar 2.5. Jalur aktivasi caspase-2 (Fan et al., 2005)

b. *Mitochondrion-mediated procaspase-activation pathway*

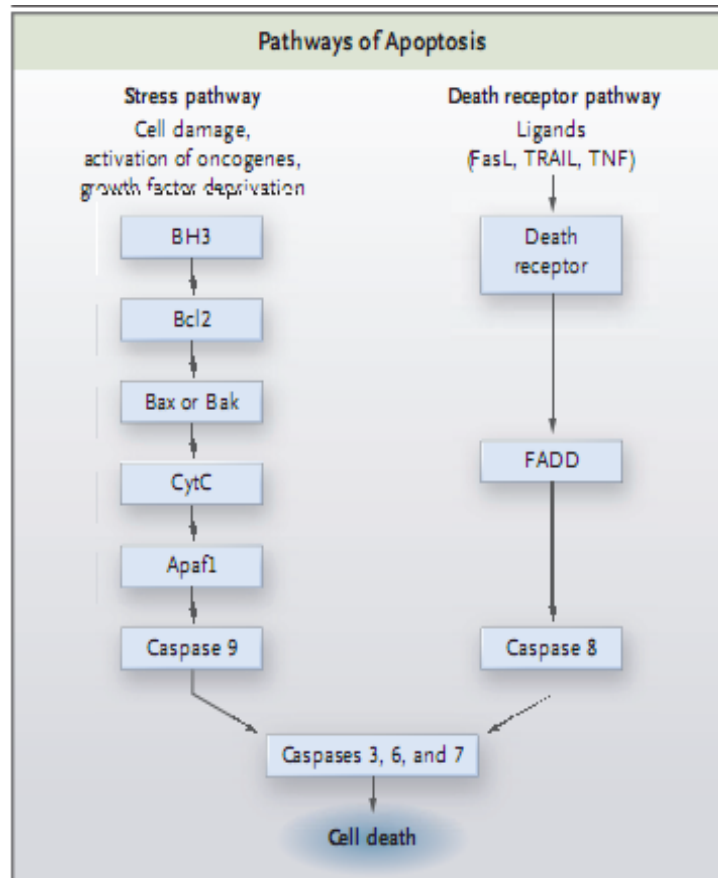
Jalur intrinsik atau *Stress pathway* diaktivasi oleh berbagai stress ekstra dan intraseluler, seperti stres oksidatif, iradiasi, dan pengobatan dengan obat-obatan sitotoksik (Ghavami et al., 2009). Jalur intrinsik ini dipicu oleh protein yang mengandung domain BCL2 homologi 3. Domain ini menginaktivasi BCL2 dan BCL-XL (yang dalam keadaan normal menghambat apoptosis) sehingga mengaktifasi kaskade apoptosis (Croce, 2008). Ketika terjadi stress seluler (contohnya pada kerusakan DNA), protein proapoptosis pada sitosol ini akan teraktivasi, yang akan menginduksi pembukaan pori-pori permeabilitas mitokondria (MPTPs). Sebagai hasilnya, sitokrom c yang terlokalisasi di dalam mitokondria akan dilepaskan ke sitosol. Dengan keberadaan sitosolik dATP atau ATP, *apoptotic protease activation factor-1* (Apaf-1) mengalami oligomerisasi. Sehingga

procaspase-9, dATP dan sitokrom c, Apaf-1 teroligomerasi membentuk kompleks besar bernama apoptosome. Caspase-9 teraktivasi dapat mengaktivasi procaspase-3 dan procaspase-7. Caspase-3 yang teraktivasi akan mengaktivasi procaspase-9 dan membentuk jalur aktivasi *feedback positif* (Fan et al., 2005).



Gambar 2.6. Jalur aktivasi caspase-9 (Fan et al., 2005)

Berikut ini bagan jalur apoptosis baik melalui *stress pathway* maupun melalui *death-receptor pathway* (Croce, 2008):



Gambar 2.7. Jalur Apoptosis (Croce, 2008).

Selama proses karsinogenesis pada jaringan epitel, fenotip sel-sel berubah dari normal menjadi lesi-lesi maligna sampai kanker superfisial dan akhirnya menjadi penyakit yang sangat invasif. Pada masa “pre-maligna”, terdapat perubahan besar dari apoptosis, proliferasi, dan regulasi biomarker/ penanda pada siklus sel. Apoptosis meningkat pada karsinoma duktus in situ dan kanker payudara invasif. Apoptosis tampak berkurang secara relatif terhadap proliferasi pada jaringan epitel “normal” di sekitar jaringan kanker payudara invasif. Peningkatan indeks mitosis dan apoptosis pada lesi hiperplasia payudara dibandingkan dengan karsinoma

duktus in situ, dan peningkatan indeks mitosis tapi penurunan relatif apoptosis pada kanker payudara invasif (Parton, 2001).

3. Efek Tempe Terhadap Kanker

Tempe merupakan makanan fermentasi tradisional masyarakat Indonesia yang terutama berbahan dasar kedelai, tetapi dapat juga berbahan dasar kacang-kacangan atau biji-bijian lainnya. Tempe difermentasi oleh ragi *Rhizopus sp*, terutama *Rhizopus oligosporus*, *R. oryzae*, *R. arhizus*, *R. stolonifer*, dan *R. microsporus*. Tempe berbahan dasar kedelai merupakan tempe yang paling populer di masyarakat, sehingga penggunaan kata ‘tempe’ mengacu kepada tempe kedelai (Astuti et al., 2000; Handajani, 2001).

Tabel 2.4. Kandungan Zat Gizi Tempe

Zat Gizi	satuan	Komposisi zat gizi 100 gram/bdd
Energi	Kal	201
Protein	gram	20,8
Lemak	gram	8,8
Hidrat arang	gram	13,5
Serat	gram	1,4
Abu	gram	1,6
Kalsium	mg	155
Fosfor	mg	326
Besi	mg	4
Karotin	mkg	34
Vitamin A	SI	0

Vitamin B1	mg	0,19
Vitamin C	mg	0
Air	gram	55,3
Bdd (berat yang dapat dimakan)	%	100

Sumber: Komposisi Zat Gizi Pangan Indonesia Depkes RI Dir. Bin. Gizi Masyarakat dan Puslitbang Gizi 1991 dalam Widianarka, 2000.

Tempe sebagai makanan tradisional berpeluang dan berpotensi untuk melawan radikal bebas, sehingga dapat menghambat proses penuaan dan mencegah terjadinya penyakit degeneratif (kanker, osteoporosis, jantung koroner, diabetes mellitus, dan lain-lain). Tempe diketahui mengandung isoflavon yang merupakan antioksidan yang sangat dibutuhkan tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas (Astawan, 2003).

a. Isoflavon

Radikal bebas merupakan molekul yang sangat reaktif dan dapat menyebabkan tumor, kanker, dan penuaan. Terdapat tiga jenis isoflavon yang terdapat pada kedelai yaitu daidzein, glisitein, dan genistein. Data laboratorium menunjukkan bahwa isoflavon memiliki potensi aktivitas biologi yang luas. Isoflavon diketahui memiliki afinitas reseptor estrogen *in vitro*, dapat berperan sebagai antiestrogen dengan cara berkompetisi pada *binding-site* dari reseptor estrogen, dan dapat menghambat aktivitas enzim yang mengkonversi androgen ke estrogen. Selain itu, isoflavon juga memiliki efek antiproliferatif, proapoptosis, anti-angiogenesis, antioksidatif, dan antiinflamasi. Kegunaan isoflavon tersebut mengindikasikan bahwa isoflavon dapat

menjadi agen yang potensial dalam mencegah kanker payudara (Nagata, 2010).

1) Genistein

Kira-kira 0,1% isi dari kedelai adalah genistin, yang merupakan konjugasi glikosilat dari genistein dan 0,07% daidzin yang merupakan glikosilat dari daidzein. Keduanya dimetabolisme oleh bakteri dan enzim pada saluran pencernaan menjadi aglikon genistein dan daidzein. Genistein merupakan *heterosyclic diphenol* dengan tiga grup hidroksil, dan mempunyai berat molekul relatif 270,24. Nama kimia genistein adalah 4,5,7 – *trihydroxil* – *isoflavone*. Genistein merupakan jenis isoflavon yang paling banyak diteliti karena merupakan komponen utama dari efek kedelai yang menguntungkan. Efek yang menguntungkan antara lain genistein mempunyai efek antiestrogen, menghambat aktivitas topoisomerase II, menghambat aktivitas tirosin kinase, memacu kematian sel kanker, menstimulasi apoptosis, dan menekan proses angiogenesis. Efek-efek tersebut menjadikan genistein sebagai senyawa antikanker (Yang et al., 2005).

a) Efek antiestrogen

Genistein memiliki struktur yang mirip dengan estrogen. Diketahui bahwa genistein menunjukkan aktivitasnya menempati reseptor estrogen untuk 17β – *estradiol*. Dengan menempati reseptor estrogen, genistein memblok ikatan estrogen yang berpotensi lebih kuat untuk metabolisme

sehingga secara bersamaan mempengaruhi metabolisme estrogen sehingga mencegah peranan hormon estrogen dalam pertumbuhan kanker. Genistein juga diketahui dapat menghambat pertumbuhan sel dan menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara negatif reseptor estrogen, menunjukkan efek genistein terhadap mekanisme yang baik yang melibatkan reseptor estrogen maupun tidak (Sarkar and Li, 2003).

b) Menghambat tirosin kinase

Sekitar 50% onkogen mengkode protein yang mengkatalis atau menjalankan proses fosforilasi oleh tirosin kinase, dan banyak kasus kanker menunjukkan peningkatan aktivitas tirosin kinase. Mitogen (substansi yang merubah proliferasi sel) mengaktifasi proliferasi kaskade melalui ikatan reseptor transmembran terhadap tirosin kinase. Beberapa studi melaporkan penghambatan tirosin kinase dapat dilakukan oleh genistein *in vitro*. Penghambatan fosforilasi tirosin kinase dapat mencegah ikatan terhadap DNA, sehingga dengan penghambatan tersebut, tidak dapat mengaktifasi transkripsi gen. Tipe dari reseptor tirosin kinase dihubungkan dengan proses metastasis adalah *epidermal growth factor receptor* (EGFR) group (Agarwal, 2000). Selain itu, penghambatan aktivitas kinase menyebabkan penghambatan terhadap jalur

MAPK sehingga menghambat proses transkripsi sel yang berhubungan erat dengan ketahanan sel (Sarkar and Li, 2003).

c) Hambat angiogenesis

Angiogenesis merupakan proses yang penting dalam metastasis sel tumor. Angiogenesis merupakan pembentukan pembuluh darah baru untuk menyediakan akses bagi sel kanker untuk bermetastasis ke bagian tubuh yang lain. peran yang penting dalam angiogenesis adalah *Vascular Endothelial Growth Factor* dengan reseptornya (VEGF dan VEGFR). Genistein dapat menghambat regulasi transkripsi dari VEGF sehingga tidak dapat berikatan dengan reseptornya (VEGFR). Banyak bukti yang menyebutkan bahwa aktivitas genistein dapat menghambat pertumbuhan sel kanker dan penyebaran sel kanker (Chen et al., 2003).

d) Menghambat aktivitas topoisomerase II

Enzim topoisomerase II berfungsi untuk memperbaiki masalah yang timbul dalam topologi DNA selama proses replikasi atau proses yang lain yang membutuhkan perubahan pada struktur heliks. Enzim tersebut mengalami regulasi yang berlebihan pada sel yang berproliferasi seperti sel kanker. Genistein berfungsi untuk menghambat aktivitas topoisomerase, berperan sebagai 'racun' yang merubah enzim topoisomerase sehingga tidak dapat berfungsi untuk memperbaiki DNA sel. Akumulasi yang terjadi pada struktur

DNA sel dapat mengakibatkan apoptosis pada sel (Hengstler et al., 2002).

e) Menginduksi apoptosis

Genistein menginduksi apoptosis diantaranya dengan mengaktivasi caspase-3 dan down-regulasi Bcl-2 (Sarkar and Li, 2003). Genistein mencegah jalur *nuclear factor kappa B* (NFkB) melalui mekanisme Akt. NFkB merupakan faktor transkripsi yang berperan dalam tumorigenesis, yang diaktifkan oleh radikal bebas, inflamasi, karsinogen, dan sitokin. Jika sudah teraktivasi, maka akan menurunkan apoptosis dan menginduksi proliferasi, invasi, metastasis, dan inflamasi (Satih et al, 2008).

2) Daidzein

Daidzein merupakan fitoestrogen yang berikatan dengan reseptor estrogen dan mempunyai dua efek yaitu estrogenik lemah dan antiestrogenik lemah. Daidzein merupakan isoflavon yang dimetabolisme oleh bakteri pencernaan untuk memproduksi equol dan O-DMA yang lebih estrogenik daripada daidzein. Daidzein dapat melewati plasenta dan ditemukan dalam kandungan air susu ibu. Daidzein juga merupakan antioksidan yang memiliki efektivitas lebih kecil dari pada genistein (Barlow et al., 2007). Berdasarkan penelitian Jin et al (2009), daidzein menginduksi apoptosis sel kanker payudara melalui jalur *reactive oxygen species* (ROS) yang mengganggu fungsi mitokondria sehingga

menyebabkan peningkatan permeabilitas mitokondria, pelepasan sitokrom C, dan aktivasi caspase. Hilangnya protein antiapoptosis Bcl-2 mitokondria juga bertanggung jawab atas peningkatan permeabilitas mitokondria (Jin *et al.*, 2009). Selain itu, menurut Pugalendhi *et al.* (2010) efek kombinasi daidzein dan genistein menghasilkan efek sinergis yang akan mengurangi proliferasi sel, angiogenesis, dan menginduksi apoptosis sel kanker payudara secara nyata.

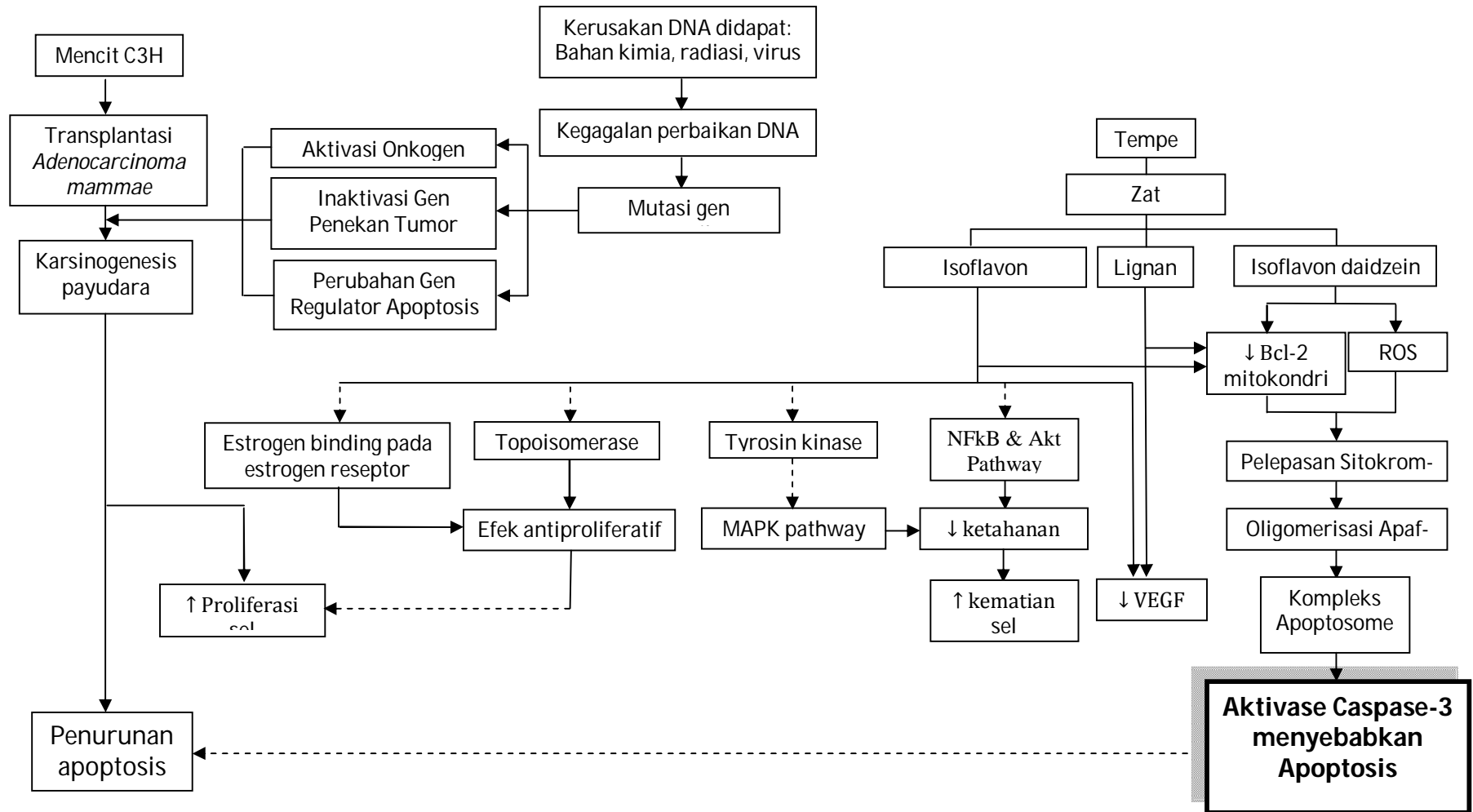
b. Lignan

Fitoestrogen dibagi ke dalam dua kelompok utama, yaitu isoflavon dan lignan. Berbeda dengan isoflavon, sangat sedikit penelitian yang mempelajari efek lignan terhadap kanker payudara dan prostat (Magee and Rowland, 2004). Konsumsi harian tinggi lignan diindikasikan dengan penurunan risiko kanker payudara. Lignan merupakan sumber utama fitoestrogen konsumsi harian dari makanan non-kedelai (Saarinen *et al.*, 2008).

Lignan merupakan komponen difenolik yang terdapat dalam bahan makanan tinggi serat. Aktivitas lignan pada mamalia di antaranya sebagai anti-tumor, antioksidan, estrogenik lemah/ anti-estrogenik, antiangiogenik, dan inhibitor aromatase (Thompson *et al.*, 1996). Berdasarkan penelitian Zhou *et al.* (2009) metabolit lignan memiliki aktivitas antitumor. Aktivitas antitumor dalam metabolit lignan berupa efek sitotoksik dan kemampuan menginduksi apoptosis. Lignan menurunkan rasio Bcl-2/Bax

mitokondria sehingga mengaktivasi jalur caspase. Selain itu, lignan juga memiliki kemampuan menghambat angiogenesis dengan mengeblok sekresi VEGF yang diinduksi estradiol (E2) (Jungeström *et al.*, 2007).

B. Kerangka Pemikiran Penelitian



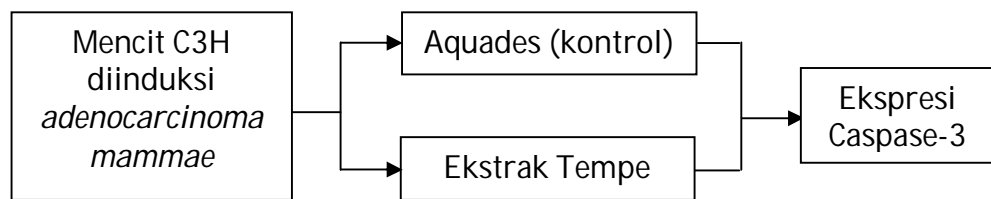
Keterangan:

————→ : Mengaktivasi

- - - - -> : Menghambat

Gambar 8. Kerangka Teori Penelitian

C. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2.9. Kerangka Konsep Penelitian

D. Hipotesis

Pemberian ekstrak tempe meningkatkan ekspresi caspase-3 mencit (*Mus musculus*) galur C3H model karsinogenesis payudara.

III. METODE PENELITIAN

A. Materi dan Bahan

1. Hewan Coba

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur C3H betina. Mencit galur C3H merupakan hewan coba yang biasa digunakan dalam penelitian kanker karena sifatnya yang transplantabel terhadap kanker, terutama *adenocarcinoma mammae* (Drohan *et al.*, 1982). Mencit yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Laboratorium Imunopatologi Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dengan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

a. Kriteria inklusi

- 1) Sehat
- 2) Berat badan 16-24 gram
- 3) Umur 12-16 minggu,

b. Kriteria eksklusi

Mencit yang mengalami penurunan dan peningkatan BB > 10% saat aklimatisasi.

Mencit yang mati selama penelitian berlangsung akan *drop out* dari penelitian.

2. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini meliputi: kandang hewan, blender, alat timbang, alat ukur mikrogram, pompa vakum,

alat dan bahan pembuatan preparat tumor, pisau reseksi, sonde lambung, spuit 3 cc, spuit 1 cc, toples plastik, gelas kimia, mikroskop, *object glass* dan *deck glass*.

b. Bahan

1) Ekstrak tempe

a) Tempe, adalah tempe segar yang diperoleh dari industri rumah tangga Ds. Pliken, Kec. Kembaran Purwokerto.

b) Pelarut ethanol, diproduksi oleh PT. Brata Chemical

Tempe dikeringkan dan dibuat ekstrak menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut ethanol kemudian diberikan kepada mencit per oral, diencerkan dengan akuades sesuai dosis perlakuan tiap kelompok.

2) Preparat jaringan meliputi: mencit donor, mencit resipien, formalin, bahan pembuatan preparat, akuades, blok parafin jaringan, antibodi primer *rabbit polyclonal anti caspase-3*.

3. Penentuan Besar Sampel

a. Cara pengambilan sampel

Semua populasi hewan coba yang memenuhi kriteria sampel akan diikutsertakan sebagai sampel penelitian.

b. Besar sampel

Besar sampel berdasarkan kriteria WHO, yaitu minimal lima ekor untuk setiap kelompok. Untuk mengantisipasi sample yang tereksklusi ataupun *drop out*, peneliti menggunakan 6 sampel

masing-masing kelompok, sehingga besar sampel keseluruhan adalah 24 ekor mencit.

B. Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimental laboratorium terhadap hewan coba mencit galur C3H. Metode eksperimental merupakan salah satu metode penelitian yang dipergunakan untuk mencari hubungan sebab akibat. Metode eksperimental ini digunakan karena dilakukan penelitian pada hewan coba dan pada penelitian eksperimental ini asosiasi sebab dan akibat yang diperoleh lebih tegas dan lebih nyata sehingga simpulan yang diperoleh pun lebih definitif. Penelitian dilakukan selama empat minggu dengan menggunakan *post test only control group design*.

C. Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan rancangan acak lengkap (RAL) dengan menggunakan 4 macam perlakuan terhadap hewan coba. Masing-masing perlakuan tersebut adalah sebagai berikut :

1. Kelompok Kontrol (K), kontrol negatif dengan mencit yang diinduksi sel tumor dan diberi placebo berupa akuades 0,2 ml/20gBB mencit/hari selama 2 minggu.
2. Kelompok Perlakuan 1 (P1), kelompok dengan mencit yang diinduksi sel tumor dan diberi ekstrak tempe dengan dosis 12 mg/20gBBmencit/hari selama 2 minggu.

3. Kelompok Perlakuan 2 (P2), kelompok dengan mencit yang diinduksi sel tumor dan diberi ekstrak tempe dengan dosis 24 mg/20gBBmencit/hari selama 2 minggu.
4. Kelompok Perlakuan 3 (P3), kelompok dengan mencit yang diinduksi sel tumor dan diberi ekstrak tempe dengan dosis 48 mg/20gBBmencit/hari selama 2 minggu.

D. Variabel yang Diukur

1. Variabel Independen

Variable independen pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak tempe.

2. Variabel Dependen

Variabel dependen pada penelitian ini adalah ekspresi caspase-3.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Variabel Independen

Pemberian ekstrak tempe yang dimaksud dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak tempe berbagai dosis selama 2 minggu. Ekstrak dibuat dengan metode maserasi menggunakan ethanol. Skala untuk variabel ini yaitu skala ordinal dengan kriteria tidak diberi ekstrak tempe = 1, diberi ekstrak tempe dosis 12 mg/20gBBmencit/hari = 2, diberi ekstrak tempe dosis 24 mg/20gBBmencit/hari = 3, dan diberi ekstrak tempe dosis 48 mg/20gBBmencit/hari = 4.

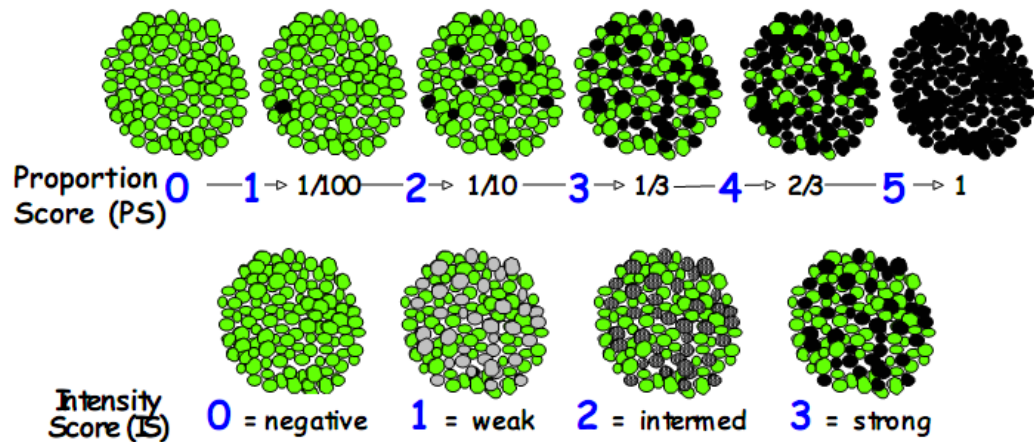
2. Variabel Dependen

Ekspresi Caspase-3 adalah persentase sel apoptosis dari 1000 sel tumor dalam 10 lapang pandang dengan pembesaran 400X. Apoptosis adalah proses regulasi kematian sel untuk mengontrol jumlah sel dan menghilangkan sel yang rusak, yang akan memberikan ekspresi positif berwarna cokelat pada preparat jaringan yang diwarnai dengan metode imunohistokimia menggunakan antibodi primer *rabbit polyclonal anti caspase-3*.

F. Cara Mengukur Variabel

Sebanyak 20 blok parafin dari 24 ekor mencit dilakukan pemeriksaan imunohistokimia untuk menilai marker Caspase-3. Pengecatan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal primer dan sekunder pada potongan kanker payudara mencit dalam blok parafin di atas gelas preparat. Adapun antibodi sekunder yang digunakan untuk pemeriksaan variabel yang diteliti adalah antibodi monoklonal Caspase-3. Ekspresi positif ditandai dengan sel yang berwarna cokelat. Tiap preparat dinilai 10 lapang pandang dengan pembesaran 400X. Dilakukan penilaian persentase sel yang terekspresi positif dan intensitas warnanya, dengan menggunakan *Allred scoring*. Pembacaan preparat dilakukan dengan metode interobserver oleh 2 orang untuk setiap lapang pandang sehingga dilakukan juga pengukuran reliabilitas dan validitas dengan menghitung nilai *kappa*.

Scoring Immunostained Slides



$$\text{Total Score (TS)} = \text{PS} + \text{IS} \text{ (range 0-8)}$$

Gambar 3.1. *Allred scoring* (Allred, 1998)

G. Tata Urutan Kerja

1. Persiapan Hewan Coba

Hewan coba ditimbang berat badannya, dipilih mencit dengan berat antara 16-24 gram kemudian dikelompokkan secara acak menjadi 4 kelompok yaitu kelompok perlakuan A, B, C, D sebanyak masing-masing 6 ekor. Tiap hewan coba pada masing-masing kelompok kemudian diberi nomor urut A, B, C, D.

2. Adaptasi *Mus musculus* C3H

- Kandang yang bersih dan sehat disiapkan
- Mencit dimasukkan dalam kandang yang telah disediakan kurang lebih 7 hari sebelum penelitian dimulai, dengan tujuan supaya mencit dapat beradaptasi.

3. Persiapan Bahan Penelitian

Bahan-bahan perlakuan disimpan dalam bentuk ekstrak yang siap digunakan untuk percobaan. Tempe yang digunakan untuk ekstrak dalam penelitian ini adalah tempe segar yang dibuat oleh industri rumah tangga Desa Pliken, Kecamatan Kembaran. Tempe tersebut berbahan dasar kedelai (*Glycine max*) yang telah mengalami fermentasi selama 48 jam. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Istiani (2010) bahwa kandungan isoflavon pada tempe yang diekstraksi dengan metode maserasi tertinggi terjadi pada fermentasi 2 hari (48 jam). Bahan ekstraksi adalah penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat dengan menggunakan pelarut yang dipilih dimana zat yang diinginkan larut. Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan. Pembuatan sediaan ekstrak dimaksudkan agar zat yang dimaksudkan agar zat yang berkhasiat yang terdapat di simplisia terdapat dalam bentuk yang mempunyai kadar yang tinggi dan hal ini memudahkan zat berkhasiat diatur dosisnya.

Pembuatan ekstrak tempe dengan metode maserasi dan pelarut ethanol. Pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi FKIK, Unsoed. Cara pembuatan ekstrak tempe mengulang langkah yang telah dilakukan oleh Pramana (2008) dengan beberapa modifikasi:

- a. Sebanyak 5 kg tempe segar dipotong kecil dan dikeringkan di bawah matahari selama 2 hari.
- b. Dari hasil penjemuran didapatkan sebanyak 1,57 kg tempe kering yang kemudian dihaluskan menggunakan blender.
- c. Sebanyak 4 liter larutan ethanol 96% destilasi digunakan untuk maserasi pertama selama 24 jam.
- d. Larutan dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring.
- e. Selanjutnya maserasi kedua menggunakan ethanol 96% destilasi sebanyak 3 liter.
- f. Hasil penyaringan dievaporasi menggunakan akuades pada suhu 90° C dengan kecepatan 50 rpm.
- g. Hasil evaporasi dipekatkan dan diperoleh ekstrak tempe kedelai sebesar 8,74 gram.

4. Perlakuan Hewan Coba

Hewan coba yang telah di timbang kemudian dikelompokkan dalam 4 kandang terpisah dan diberi label. Mencit percobaan ditransplantasi dengan bubur kanker payudara dari mencit donor secara subkutan di aksila kiri sebesar 0,2 ml menggunakan jarum trokar. Setelah 7 hari penginduksian kanker, hewan coba kemudian diberikan perlakuan sebagai berikut:

- a. Kelompok Kontrol (K), kontrol negatif dengan mencit yang ditransplantasi bubur tumor dan hanya diberi akuades 0,2 ml/20gBBmencit/hari.

- b. Kelompok Perlakuan 1 (P1), kelompok dengan mencit yang ditransplantasi bubur tumor dan diberi ekstrak tempe dengan dosis 12 mg/20gBBmencit/hari.
- c. Kelompok perlakuan 2 (P2), kelompok dengan mencit yang ditransplantasi bubur tumor dan diberi ekstrak tempe dengan dosis 24 mg/20gBBmencit/hari.
- d. Kelompok perlakuan 3 (P3), kelompok dengan mencit yang ditransplantasi bubur tumor dan diberi ekstrak tempe dengan dosis 48 mg/20gBBmencit/hari.

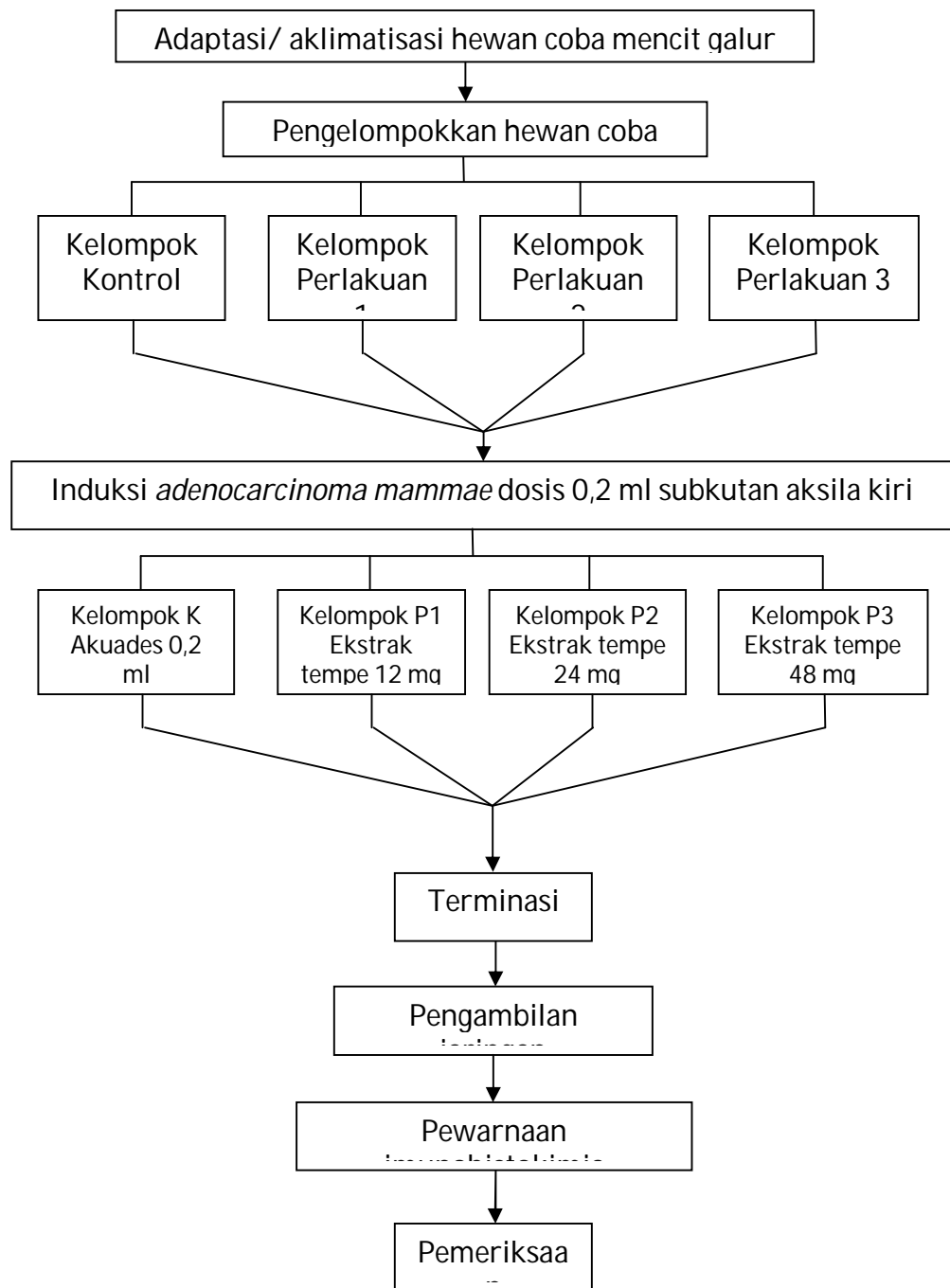
Perlakuan terhadap hewan coba setelah tumbuh tumor dilakukan selama 2 minggu.

5. Pengambilan Jaringan

Pengambilan jaringan tumor payudara dilakukan setelah batas waktu pengamatan berakhir. Kelompok-kelompok mencit yang diberi perlakuan akan diterminasi bersamaan dengan *eter chamber* dan dilakukan reseksi pada jaringan tumornya untuk selanjutnya dilakukan pengukuran volume dan massa jaringan tumor kemudian pembuatan preparat histopatologis dan imunohistokimia.

6. Pewarnaan Imunohistokimia

Pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi primer *rabbit polyclonal anti caspase-3*.



Gambar 3.2. Alur Pengujian

H. Analisis Data

Data hasil penelitian dilakukan pengolahan data dan analisis data dengan bantuan program komputer SPSS ver.15 melalui langkah-langkah berikut ini:

1. Tabulasi ekspresi caspase-3 dilakukan per lapang pandang, sehingga didapatkan 200 data dari 20 preparat caspase-3.

2. Analisis Univariat

Dilakukan analisis deskriptif yang ditampilkan dalam bentuk median dan nilai maksimum dan minimum, dikarenakan hasil uji normalitas data dengan *Kolmogorov-Smirnov* menunjukkan sebaran data yang tidak normal.

3. Analisis Bivariat

Karena data tidak berdistribusi normal, dilakukan transformasi data namun kembali data tidak berdistribusi normal. Untuk itu, analisis yang dilakukan menggunakan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*, yang kemudian dilakukan uji beda antar kelompok menggunakan *Post hoc* uji *Mann-Whitney*. Nilai p bermakna bila $p < 0,05$ dengan tingkat kepercayaan 95%.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

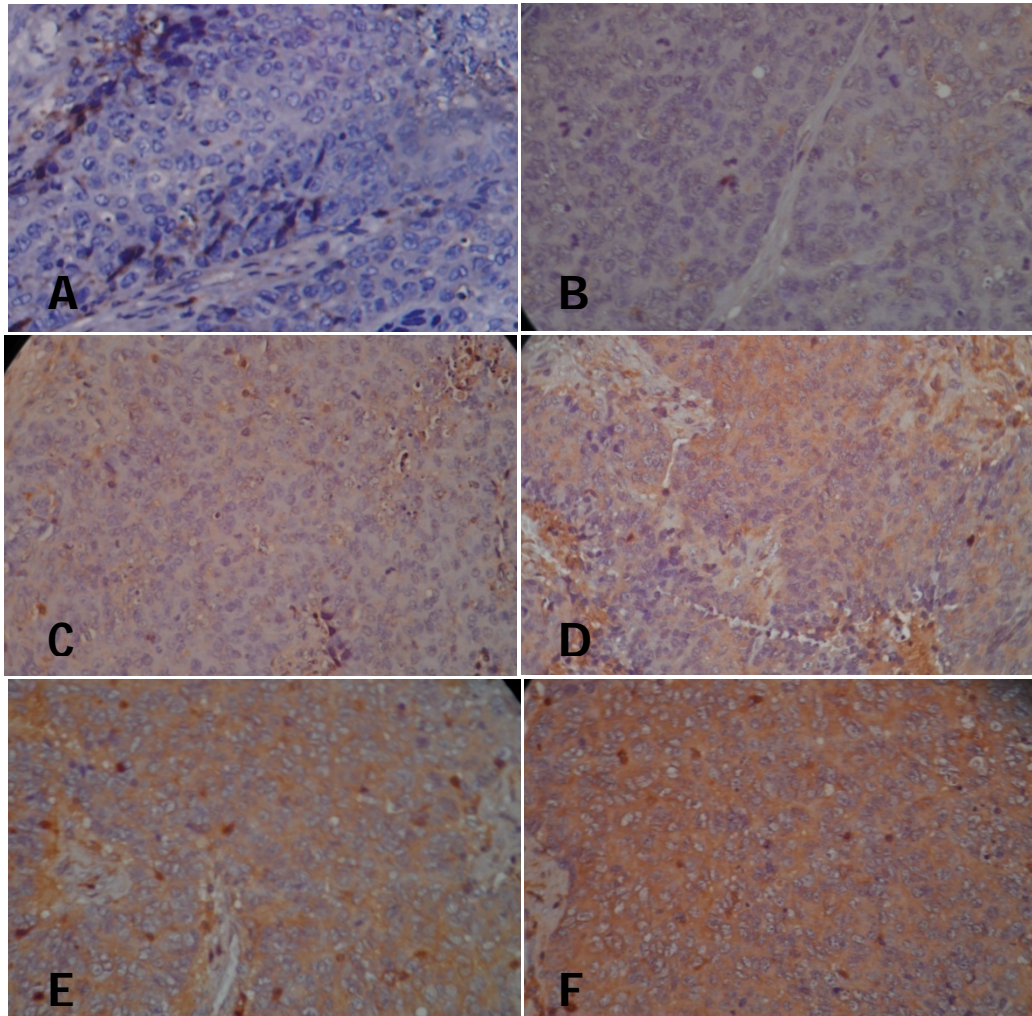
Penelitian ini menggunakan sample penelitian berupa mencit galur C3H sebanyak 24 ekor yang dibagi ke dalam 4 kelompok. Hal ini sesuai dengan ketentuan WHO (1993) yaitu minimal 5 ekor untuk setiap kelompok, yang ditambah dengan faktor eksklusi/ *drop out* sebesar 20% sehingga digunakan 6 ekor untuk masing-masing kelompok. Preparat yang dilakukan pengecatan imunohistokimia caspase-3 adalah sebanyak 20, yaitu mencit nomor 1 sampai 5 untuk masing-masing kelompok.

Data hasil pengamatan pada kelompok kontrol dan ketiga kelompok perlakuan yang masing-masing diberi ekstrak tempe kedelai dosis 12 mg/20gBBmencit/hari, 24mg/20gBBmencit/hari, dan 48 mg/20gBBmencit/hari selama 2 minggu dapat dilihat pada tabel induk (lampiran 5).

1. Perhitungan Nilai *Kappa* (*k*)

Untuk mendapatkan hasil pemeriksaan yang andal (*reliabilitas*) dan sahih (*validitas*), pembacaan preparat dilakukan oleh dua orang (interobserver). Untuk menilai keandalan dan kesahihan kedua data dilakukan perhitungan nilai *Kappa*. Nilai *Kappa* yang didapatkan untuk pembacaan preparat caspase-3 ini adalah 0,884 atau berada di atas nilai 0,80 yang berarti keandalan dan kesahihannya bernilai baik.

2. Ekspresi Caspase-3



Gambar 4.1. Pewarnaan imunohistokimia caspase-3 ditunjukkan dengan pewarnaan coklat pada sitoplasma.

- A. Skor *Allred* (0+0=0)
- B. Skor *Allred* (1+1=2)
- C. Skor *Allred* (2+1=3)
- D. Skor *Allred* (3+1=4)
- E. Skor *Allred* (4+1=5)
- F. Skor *Allred* (4+2=6)

Gambar di atas menunjukkan gambaran preparat dengan pewarnaan imunohistokimia caspase-3. Ditunjukkan beberapa gambar dengan nilai *Allred score* 0 sampai 6. Analisis univariat ditampilkan

dalam median dan nilai maksimum-minimum *Allred score* pada masing-masing kelompok seperti tercantum pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Median dan nilai minimum-maksimum *Allred score* setiap kelompok.

Kelompok	Median	Nilai Minimum	Nilai Maksimum
Kelompok Kontrol	4	0	5
Kelompok Perlakuan 1	5	0	6
Kelompok Perlakuan 2	4	0	6
Kelompok Perlakuan 3	4	0	6

Tabel di atas menunjukkan nilai median dan nilai minimum-maksimum *Allred score* pada kelompok kontrol diperoleh nilai median 4 dan nilai min-mak 0-5, kelompok perlakuan 1 nilai median 5 dan nilai min-max 0-6, kelompok perlakuan 2 dan 3 memiliki nilai yang sama yaitu 4 untuk median dan nilai min-mak 0-6. Hasil uji normalitas data dengan *Kolmogorov-Smirnov* menunjukkan bahwa sebaran data tidak normal (lampiran 6), untuk itu dilakukan transformasi data dengan hasil uji normalitas yang kembali menunjukkan bahwa sebaran data tidak normal. Oleh karena itu, analisis bivariat dilakukan dengan menggunakan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis* dengan $p=0,046$ ($p<0,05$) menunjukkan hasil yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (lampiran 7). Analisis dilanjutkan dengan *Post hoc* uji *Mann-Whitney* (lampiran 8) dengan hasil seperti nampak pada tabel 4.2.

Tabel 4.2. Hasil uji beda *Allred score* antar kelompok .

Antar Kelompok	p
K - P1	0,021
K - P2	0,009
K - P3	0,361
P1 - P2	0,834
P1 - P3	0,203
P2 - P3	0,199

Allred score kelompok perlakuan 1 (P1) adalah lebih tinggi secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol (K) ($p=0,021$), dan pada kelompok P2 dibandingkan K ($p=0,009$). Didapatkan perbedaan tidak bermakna pada kelompok P3 dengan K ($p=0,361$), P2 dengan P1 ($p=0,834$), P3 dengan P1 ($p=0,203$), dan kelompok P3 dengan P2 ($p=0,199$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tempe kedelai dengan dosis 12 mg/20gBBmencit/hari dan dosis 24 mg/20gBBmencit/hari selama 2 minggu setelah transplantasi tumor memacu teraktifasinya ekspresi caspase-3 yang merupakan penanda untuk aktivitas apoptosis pada tumor kelenjar susu mencit C3H.

B. Pembahasan

Rendahnya insidensi kanker payudara di Asia dihubungkan dengan tingginya asupan kedelai. Berbagai penelitian pada hewan coba menunjukkan bahwa konsumsi kedelai memperbaiki kondisi tumor, menurunkan insidensi, metastasis, dan lain-lain. Kedelai mengandung berbagai kandungan yang berpotensi sebagai antikanker (Yang et al., 2006). Makanan berbahan dasar kedelai terbagi menjadi dua kelompok

yaitu makanan hasil fermentasi, dan bukan hasil fermentasi. Diyakini bahwa proses fermentasi pada kedelai meningkatkan bioavailabilitas isoflavon pada kedelai (Nair and Hernandez, 2002). Berdasarkan hal tersebut di atas, dilakukan penelitian untuk melihat efek dari ekstrak kedelai hasil fermentasi yang dalam hal ini adalah tempe terhadap pertumbuhan tumor dengan marker yang digunakan adalah caspase-3 sebagai penanda dari aktivitas apoptosis.

Hasil penelitian efek pemberian ekstrak tempe kedelai terhadap ekspresi caspase-3 yang merupakan marker untuk aktivitas apoptosis ini menunjukkan hasil yang bermakna pada uji *Kruskal-Wallis* dengan nilai $p=0,046$. Hal ini mendukung berbagai penelitian yang mengemukakan bahwa isoflavon kedelai memiliki aktivitas anti kanker dengan menginduksi apoptosis. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa ekstrak tempe kedelai yang memiliki kandungan tinggi isoflavon memiliki efek yang sejalan dengan senyawa isoflavon baik itu genistein maupun daidzein, terhadap efek anti kanker yang ditimbulkan. Ekstrak kedelai keseluruhan, yang mengandung campuran berbagai jenis isoflavon dan kandungan lainnya terbukti memiliki aktivitas antikarsinogen lebih tinggi dibandingkan dengan genistein atau daidzein saja. Seperti dikemukakan oleh penelitian Hsu et al. (2009) yang menunjukkan bahwa ekstrak kedelai menginduksi tingkat apoptosis yang lebih tinggi dibandingkan dengan genistein dan daidzein pada jaringan kanker prostat. Untuk itu, produk makanan yang mengandung kedelai secara keseluruhan diharapkan

memiliki efek anti kanker yang lebih baik dibandingkan senyawa aktif tersendiri.

Selain memiliki aktivitas induksi apoptosis dibandingkan dengan senyawa genistein atau daidzein tersendiri, ekstrak kedelai juga tidak menunjukkan efek sitotoksik pada sel-sel non kanker dibandingkan dengan genistein atau daidzein yang menginduksi apoptosis pada sel-sel BPH-1. Berbagai keunggulan ekstrak kedelai secara keseluruhan dibandingkan dengan senyawa aktif isoflavon seperti genistein dan daidzein seperti nampak di atas ini diperkirakan disebabkan oleh interaksi diantara berbagai bahan fitokimia di dalam kedelai utuh yang bekerja secara sinergis dan memberikan keuntungan lebih. Sebaliknya, interaksi antar senyawa ini juga mungkin mempengaruhi aktivitas biologisnya (Hsu et al., 2010).

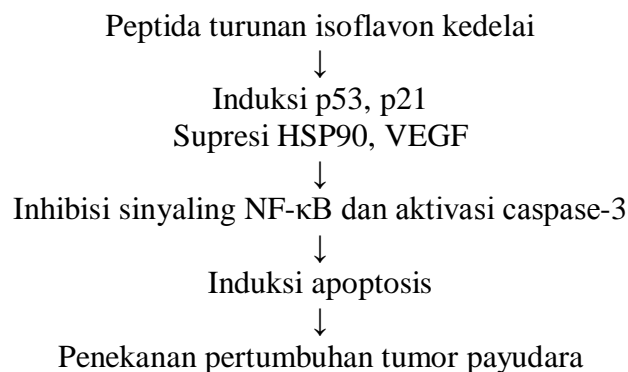
Lebih jauh lagi Lu et al. (2009) melakukan penelitian untuk membandingkan aktivitas anti kanker isoflavone yang diekstrak dari tempe dan isoflavone yang diekstrak dari kedelai. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa isoflavone yang berasal dari tempe memiliki aktivitas antikanker lebih tinggi dibandingkan dengan isoflavone kedelai. Hal ini diindikasikan dikarenakan peningkatan kandungan senyawa selain isoflavon yang memiliki aktivitas antikanker setelah proses fermentasi pada tempe. Keunggulan kandungan tempe lainnya seperti dikemukakan dalam Nout dan Kiers. (2005) adalah adanya *3-hydroxyanthranilic acid* (HAA) yang dibentuk oleh mikroorganisme dalam proses fermentasi tempe. HAA dilaporkan memiliki efek sitosidal dan menginduksi

apoptosis pada sel kanker hati manusia, sedangkan glukolipid yang terdapat di dalam tempe dilaporkan menghambat proliferasi sel tumor pada mencit.

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa isoflavon kedelai seperti genistein dan daidzein memiliki aktivitas pro-apoptosis dengan bukti yang mengarah kepada aktivasi jalur intrinsik. Terganggunya membran mitokondria yang melepaskan faktor penting seperti sitokrom-c merupakan kunci berlangsungnya jalur apoptosis intrinsik. *Reactive oxygen species* (ROS) terdapat di dalam dan disekitar mitokondria dan dikenal sebagai produk sampingan proses oksidatif selular normal. ROS diindikasikan dapat meregulasi inisiasi sinyaling apoptosis. Daidzein menginduksi apoptosis dengan menghasilkan ROS bersamaan dengan gangguan potensial transmembran mitokondria, *down-regulasi* bcl-2, dan *up-regulasi* bax sehingga menyebabkan mitokondria melepaskan sitokrom-c ke dalam sitosol yang mengaktivasi caspase-9 dan caspase-7. Teraktivasinya caspase-9 menimbulkan asumsi bahwa aktivitas apoptosis yang diinduksi daidzein terjadi melalui jalur intrinsik atau jalur mitokondria (Jin et al., 2010).

Penelitian lain yang menguji turunan isoflavon kedelai yaitu 7,12-dimethylbenz[α]anthracene (DMBA) menunjukkan bahwa terbukti dapat menghambat ekspresi HSP90 yang menekan jalur aktivasi NF- κ B, menginduksi ekspresi p21, p53, dan caspase-3, serta menghambat ekspresi VEGF. Penekanan NF- κ B dikenal sebagai aktivitas kemopreventif kanker. Berbagai penelitian menunjukan bahwa *heat shock protein 90* (HSP90)

merupakan suatu molekul yang merupakan salah satu komponen dari kompleks I κ B kinase (IKK) yang berperan penting dalam aktivasi NF- κ B. HSP90 juga menstabilisasi protein-protein penting yang terlibat di dalam kontrol siklus sel dan apoptosis. *Heat shock proteins* (HSPs) meregulasi apoptosis melalui penyusunan dan pembentukan, degradasi, dan translokasi protein. Selama sinyaling NF- κ B, HSP90 membentuk skompleks dengan Cdc37 yang berperan penting dalam translokasi TNF-*dependent*, dan aktivasi dan biosintesis IKB (Park et al., 2009).



Gambar 4.2. Mekanisme apoptosis oleh peptida turunan isoflavon kedelai (Park et al., 2009)

Fitoestrogen memiliki aktivitas estrogenik lemah dan juga aktivitas sebaliknya yaitu anti-estrogenik (Sharma et al., 2010). Berbagai penelitian *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa daidzein menstimulasi pertumbuhan sel kanker payudara yang sensitif terhadap estrogen. Berbagai penelitian epidemiologis menunjukkan bukti-bukti yang berbeda, bebrapa menunjukkan hubungan antara paparan kedelai terhadap penurunan risiko kanker payudara, dan beberapa menunjukkan tidak

adanya hubungan. Struktur fitoestrogen menyebabkan fitoestrogen dapat bertindak sebagai agonis lemah estrogen, agonis parsial, atau antagonis terhadap estrogen endogen seperti estradiol dan xenoestrogen pada reseptor estrogen dalam tubuh manusia dan hewan. Oleh sebab itu, fitoestrogen dapat meniru efek estrogen atau menghambatnya (Barlow et al., 2007). Isoflavon diketahui memiliki aktivitas selektivitas yang baik. Kemampuan isoflavon berikatan dengan ER- β 20 kali lebih tinggi dibandingkan dengan ER- α . Aktivitas selektif isoflavon ini menguntungkan karena senyawa yang berikatan dengan ER- α menstimulasi proliferasi pada sel-sel kanker payudara tapi menekan proliferasi melalui ER- β (Xiao, 2008). Fitoestrogen dapat berefek seperti estrogen pada dosis rendah namun sebaliknya, berlawanan dengan estrogen pada dosis tinggi (Sharma et al., 2010). Dilaporkan dalam Sarkar dan Li (2006) bahwa genistein menginduksi proliferasi sel pada konsentrasi $\leq 1 \mu\text{M}$ dan menghambat pertumbuhan sel kanker pada konsentrasi $\geq 5 \mu\text{M}$.

Allred score kelompok perlakuan 1 (P1) lebih tinggi secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol (K) ($p=0,021$), dan pada kelompok P2 dibandingkan K ($p=0,009$). Didapatkan perbedaan tidak bermakna pada kelompok P3 dengan K ($p=0,361$), P2 dengan P1 ($p=0,834$), P3 dengan P1 ($p=0,203$), dan kelompok P3 dengan P2 ($p=0,199$).

Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tempe kedelai dengan dosis 12 mg/20 g BB mencit/hari dan dosis 24 mg/20 g BB

mencit/hari selama 2 minggu setelah transplantasi tumor meningkatkan ekspresi caspase-3 yang merupakan penanda untuk aktivitas apoptosis pada tumor kelenjar susu mencit C3H dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Uji perbedaan yang menunjukkan hasil yang tidak bermakna antar kelompok yang lain disebabkan oleh aktivitas apoptosis yang tidak terlalu meningkat atau bahkan menurun pada dosis perlakuan yang lebih besar. Hal ini dapat dijelaskan bahwa selama proses karsinogenesis pada jaringan epitelial, terjadi akumulasi mutasi genetik sehingga fungsi-fungsi selular menghilang. Sekilas diperkirakan bahwa apoptosis yang rendah dihubungkan dengan buruknya prognosis, namun ternyata apoptosis mengalami peningkatan pada tumor-tumor ganas. Hal ini lebih tampak pada tumor dengan *grade* tinggi yang diikuti dengan aktivitas proliferasi yang tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa kontrol antara proliferasi dan apoptosis harus diperhatikan. Tingginya apoptosis pada tumor dihubungkan dengan angka *survival* yang buruk. Untuk itulah, dalam mengevaluasi pertumbuhan dan pengurangan massa tumor terhadap respon kemoterapi, radioterapi, dan terapi hormonal diperlukan penilaian apoptosis dan proliferasi (Parton et al., 2001). Diketahui bahwa genistein yang diekstrak dari tempe menunjukkan efek antiproliferatif kuat pada sel endotel pembuluh darah secara *in vitro* (Kiriakidis et al., 2004).

Jadi dapat disimpulkan bahwa, tidak meningkat atau bahkan semakin berkurangnya aktivitas apoptosis setelah perawatan, tidak serta-merta berarti bahwa kondisi tumor semakin memburuk, perlu dilihat lagi

hubungannya dengan aktivitas proliferasi jaringan. Apalagi jika kita lihat dari bentuk makroskopis kelompok P3, tampak bahwa dibandingkan kelompok-kelompok lainnya, P3 mengalami penurunan volume tumor pada akhir perlakuan. Adapun keterbatasan dari penelitian ini yaitu tidak dilakukannya pemeriksaan aktivitas proliferasi jaringan sehingga tidak dapat dibandingkan dengan aktivitas apoptosis untuk melihat perkembangan kondisi tumor yang sebenarnya.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Ekstrak tempe kedelai (*Glycine max*) meningkatkan ekspresi caspase-3 mencit (*Mus musculus*) galur C3H model karsinogenesis payudara pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol.
2. Dosis efektif minimal ekstrak tempe yang memberikan efek meningkatkan ekspresi caspase-3 secara bermakna adalah 12 mg/20gBBmencit/hari.

B. Saran

1. Untuk penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan pengukuran aktivitas proliferasi untuk melihat hubungan antara aktivitas apoptosis melalui ekspresi caspase-3 dan aktivitas proliferasinya.
2. Perlu dikaji lebih lanjut profil senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak tempe pada penelitian yang dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, R. 2000. Cell Signaling and Regulators of Cell Cycle as Molecular Targets for Prostate Cancer Prevention by Dietary Agents. *Biochemical Pharmacology*. 60(8): 1051-1059.
- Allred, D.C. 1998. Scoring immunostained slides. *Modern Pathol*. 11(2):155-168.
- American Joint Committee of Cancer. 2010. Breast. In: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York: Springer New York Dordrecht Heidelberg London. 358-362.
- Astawan, M. 2003. *Tempe: Cegah Penuaan & Kanker Payudara*. (on-line). Kompas. Diperoleh dari: <http://www.kompas.co.id/kesehatan/news/0307/03/092312.htm>. Diakses 23 Juni 2010.
- Astuti, M., A. Meliala., F.S Dalais., and M.L.Wahlqvist. 2000. Tempe, A Nutritious and Healthy Food from Indonesia. *Asia Pacific J Clin Nutr*. 9(4): 322-325.
- Babu, P.D., R. Bhagyaraj., and R. Vidhyalakshmi. 2009. A Low Cost Nutritious Food "Tempeh"- A Review. *World J. Dairy & Food Sci*. 4(1): 22-27.
- Barlow, J., J.A.P. Johnson., L. Scofield. 2007. Early Life Exposure to Phytoestrogen Daidzein and Breast Cancer Risk in Later years. BCERC COTC Fact Sheet.
- California Department of Health Service (CHDS). 2005. *Cancer Screening and Diagnosis*. (on-line). Diperoleh dari: http://qap.sdsu.edu/screening/breastcancer/bda/pdf/Algos_all_2005.pdf. Diakses 26 Juni 2010.
- Chen, W.F. et al.. 2003. Inhibitory Actions of Genistein in Human Breast Cancer (MCF-7) Cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1638: 187-196.
- Chiang, A.C., J. Massagué. 2008. Molecular Basis of Metastasis: A Review. *N Engl J Med*. 359: 2814-2823.
- Croce, C.M. 2008. Oncogenes and Cancer. *N Engl J Med*. 358: 502-511.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. *Profil Kesehatan Indonesia 2008*. (on-line). Diperoleh dari: <http://www.depkes.go.id/>. Diakses 6 November 2010.
- Duan, W.R. et al. 2003. Comparison of Immunohistochemistry for Activated Caspase-3 and Cleaved Cytokeratin 18 with The TUNEL Method for

Quantification of Apoptosis in Histological Sections of PC-3 Subcutaneous Xenografts. *The Journal of Pathology*. 199 (2): 221-228.

Drohan, W.N., L.E. Benade, D.E. Graham, and G.H. Smith. 1982. Mouse mammary Tumor Virus Proviral Sequences Congenital to C3H/Sm Mice are Differentially Hypomethylated in Chemically Induced, Virus Induced, and Spontaneous Mammary Tumors. *Journal of Virology*. 43(3): 876-880.

Fan, T.J., L.H. Han., R.S. Cong., and J. Liang. 2005. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin*. 37(11): 719-727.

Ferlay, J. et al.. 2008. *Globocan 2008 Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10*. (On-line). Diperoleh dari: <http://globocan.iarc.fr>. Diakses 6 November 2010.

Ghavami, G., M. Hashemi., S.R. Ande., B. Yeganeh., W. Xiao., M. Eshraghi., C.J. Bus., K. Kadkhoda., E. Wiechec., A.J. Halayko., M. Los. 2009. Apoptosis and Cancer: Mutations within Caspase Genes. *J Med Genet*. 46: 497-510.

Handajani, S. 2001. Indigenous Mucuna Tempe as Functional Food. *Asia Pasific J Clin Nutr*. 10(3): 222-225.

Hengstler, J.G. et al.. 2002. Dietary Topoisomerase II-Poisons: Contribution of Soy Products to Infant Leukemia. *EXCLI Journal*. 1: 8-14.

Hsu, A., T.M. Bray., W.G. Helferich., D.R. Doerge., E. Ho. 2010. Differential Effects of Whole Soy Extract and Soy Isoflavones on Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Experimental Biology and Medicine*. 235: 90-97.

Instalasi Patologi Anatomi Rumah Sakit Prof. Dr. Margono Soekarjo. 2007. *Laporan Kerja Prosedur Pembuatan Preparat Imunohistokimia di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Gajah Mada Yogyakarta dari Tanggal 15 nop-28 nop 2007*.

Istiani, Y. 2010. Karakteristik Senyawa Bioaktif Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan dan Ekstrak Etanol Tempe Berbahan Baku Koro Pedang (*Canavalis ensiformis*). *Tesis*. Program Studi Biosain. Universitas Surakarta, Surakarta. (Tidak dipublikasikan).

Jin, S., Q.Y. Zhang., X.M. Kang., J.X. Wang., and W.H. Zhao. 2009. Daidzein Induces MCF-7 Breast Cancer Cell Apoptosis Via The Mitochondrial Pathway: Original. *Annals of Oncology* doi:10.1093/annonc/mdp49.

Jungeström, M.B., L.U. Thompson., and C. Dabrosin. 2007. Flaxseed and Its Lignans Inhibit Estradiol-Induced Growth, Angiogenesis, and Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Breast cancer Xenograft In Vivo. *Clin Cancer Res*. 13(3): 1061-1067.

- Kiriakidis, S. et al. 2005. Novel Tempeh (Fermented Soybean) Isoflavones Inhibit *In Vivo* Angiogenesis in The Chicken Chorioallantoic Membrane Assay. *British Journal of Nutrition*. 93: 317-323.
- Kumar, V et al.. 2010. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Kuswanto, K.R. 2004. *The Industry of Fermented Food in Indonesia: Present Status and Developement*. (Online). Diperoleh dari: http://www.cryo.affrc.go.jp/kankobutu/fftc/Oral_Presentations/fftc_or_07/fftc_or_07.html.
- Lu, Y. et al. 2009. Study on The Inhibition of Fermented Soybean to Cancer. *Journal of Northeast Agricultural University*. 16(1): 25-28.
- Magee, P.J., and I.R. Rowland. 2004. Phyto-oestrogens, Their Mechanism of Actio: Current Evidence for a Role in Breast and Prostate Cancer. *British Journal of Nutrition*. 91:513-531.
- Martini, F.H. 2004. *Fundamentals of Anatomy & Physiology*. 6th ed. Benjamin Cummings, San Fransisco. pp.105.
- Maughan, K.L., M.A. Lutterbie., and P.S. Ham. 2010. Treatment of Breast Cancer. *Am Fam Physician*. 81(11): 1339-1346.
- Nagata, C. 2010. Factors to Consider in The Association Between Soy Isoflavone Intake and Breast Cancer Risk. *J Epidemiol*. 20(2): 83-89.
- Nair, V., V. Hernandez. 2002. Fermented Soy: An Aid to Cancer Prevention and Therapy. *Well Being Journal*. 11 (6).
- Nout, M.J.R., J.L. Kiers. 2005. Tempe Fermentation, Innovation and Functionality: Update Into The Third Millenium. *Journal of Applied Microbiology*. 98 (4): 789-805.
- Park, K. et al.. 2009. Isoflavone-Deprived Soy Peptide Suppresses Mammary Tumorigenesis by Inducing Apoptosis. *Experimental and Molecular Medicine*. 41(6): 371-380.
- Parton, M., M. Dowsett., I. Smith. 2001. Studies of Apoptosis in Breast Cancer. *BMJ*. 322: 1528-32.
- Polyak, K. 2007. Breast Cancer: Origins and Evolution. *The Journal of Clinical Investigation*. 117(11): 3155-3163.
- Porter, A.G., and R.U. Janicke. 1999. Emerging Roles of Caspase-3 in Apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 99-104.

- Pramana, D.G. 2008. Efek Pemberian Ekstrak Tempe terhadap Kolesterol Total Dan Profil Darah Kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*). *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor, Bogor. (Tidak dipublikasikan).
- Pugalandhi, P., S. Manoharan., N. Baskaran., M.R. Nirmal. 2010. Effects of genistein and daidzein, in combination, on the expression pattern of biomolecular markers (p53, PCNA, VEGF, iNOS, Bcl-2, and Bax) during 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced mammary carcinogenesis in Sprague-Dawley rats: Original. *Int J Biol Med Re*. 1(4): 264-271.
- Saarinen, N.M. et al.. 2008. Dietary Lariciresinol Attenuates Mammary Tumor Growth and Reduces Blood Vessel Density in Human MCF-7 Breast Cancer Xenografts and Carcinogen-induced Mammary Tumors in Rats. *Int. J. Cancer*. 123: 1196-1204.
- Sarkar, F.H., and Y. Li. 2003. Soy Isoflavones and Cancer Prevention. *Cancer Investigation*. 21(5): 744-757.
- Sarkar, F.H et al.. 2006. The Role of Genistein and Synthetic Derivatives of Isoflavone in Cancer Prevention and Therapy. *Medicine Chemistry*. 6: 401-407.
- Satih, S., N. Rabiau., Y-J Bignon., D.J. Bernard-Gallon. 2008. Phytoestrogens and Breast Cancer Chemoprevention: Molecular Mechanism. *Current Nutrition & Food Science*. 4: 259-264.
- Sharma, A.K. et. al. 2010. Role of Phytoestrogen in Treatment of Cancer: A Review. *International Journal of Pharma Research & Development*. 2 (9).
- Suhenti, R., 2007. Pengaruh Tepung Tempe terhadap Jaringan Kanker Mamma dan Gambaran Mikroanatomi Ginjal Mencit (Mus Musculus) Galur C3H yang Ditransplantasi Sel Kanker. *Skripsi*. Fakultas MIPA. Universitas Negeri Semarang, Semarang. 71 hal.(Tidak dipublikasikan).
- Thompson, L.U., S.E. Rickand., L.J.Orcheson., and M.M. Seidl. 1996. Flaxseed and Its Lignan and Oil Components Reduce Mammary Tumor Growth at Late Stage of Carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 17(6): 1373-1376.
- WHO. 2006. Guidelines for Management of Breast Cancer by WHO Regional Office for The Eastern Mediteranian. EMRO.
- WHO. 2009. (On-line). Diperoleh dari: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Diakses 6 November 2010.
- Widianarka, B. 2000. *Tempe, Makanan Populer dan Bergizi Tinggi*. (On-line). Diperoleh dari:

<http://www.bebas.vlsm.org/v12/artikel/pangan/tipspangan/TEK12.PDF>.
Diakses 15 Maret 2010.

Xiao, C.W. 2008. Health Effects of Soy Protein and Isoflavones in Humans. *J. Nutr.* 138: 1244S-1249S.

Yang, Y., Z.T. Zhou., and J.P. Gie. 2005. Effect of Genistein on DMBA Induced Oral Carcinogenesis in Hamster. *Carcinogenesis*. 27(3): 578-583.

Zhou, Y.J. *et al.*. 2009. Vitexin, Nature-Derived Lignan Coumpounds, Induce Apoptosis and Supress Tumor Growth. *Clin Cancer Res.* 15(16): 5161-5169.

Zlobec, I. *et al.*. 2006. Scoring of p53, VEGF, Bcl-2 and APAF-1 immunohistochemistry and interobserver reliability in colorectal cancer. *Modern Pathology*. 19:1236-1240.

Lampiran 1. Klasifikasi Kanker Payudara Berdasarkan TNM

Klasifikasi	Definisi
Tumor Primer (T)	
Tx	Tumor primer tidak dapat dinilai
T0	Tidak terbukti terdapat tumor primer
Tis	Karsinoma in situ
Tis (DCIS)	Karsinoma duktus in situ
Tis (LCIS)	Karsinoma lobular in situ
Tis (Paget)	<i>Paget's disease</i> tanpa tumor
T1	Tumor berukuran ≤ 20 mm
T1mi	Mikroinvasif ≤ 1 mm
T1a	Tumor berukuran > 1 mm tetapi ≤ 5 mm
T1b	Tumor berukuran > 5 mm tetapi ≤ 10 mm
T1c	Tumor berukuran > 10 mm tetapi ≤ 20 mm
T2	Tumor berukuran > 20 mm tetapi ≤ 50 mm
T3	Tumor berukuran > 50 mm
T4	Tumor berukuran berapapun dengan perlekatan langsung ke kulit atau dinding dada (ulserasi kulit atau nodul kulit)
T4a	Perlekatan ke kulit atau dinding dada, tidak termasuk <i>m.pectoralis</i>
T4b	Ulserasi dan/ atau nodul satelit dan/ atau edema (termasuk <i>peau d'orange</i>) pada kulit, tanpa kriteria karsinoma inflamatori
T4c	T4a dan T4b
T4d	Karsinoma inflamatori
Nodus Limfatikus regional	
Nx	Nodus limfatikus regional tidak dapat dinilai
N0	Tidak terdapat metastasis nodus limfatikus regional
N1	Metastasis tanpa fiksasi pada nodus limfatikus aksila ipsilateral
N2	Metastasis dengan fiksasi pada nodus limfatikus aksila ipsilateral atau secara klinis tampak nodus internal mammae ipsilateral jika tidak terbukti metastasis nodus limfatikus aksila
N2a	Metastasis nodus limfatikus aksila ipsilateral dengan fiksasi struktur lain
N2b	Metastasis hanya pada nodus interna mammae dan tanpa metastasis nodus limfatikus aksila
N3	Metastasis nodus limfatikus infraklavikular ipsilateral atau secara klinis nodus limfatikus interna mammae ipsilateral dan terdapat bukti klinis metastasis nodus limfatikus aksila; atau metastasi nodus limfatikus supraklavikula dengan atau tanpa nodus limfatikus aksila atau interna mammae
N3a	Metastasis nodus limfatikus infraklavikula dan aksila ipsilateral
N3b	Metastasis nodus limfatikus interna mammae dan aksila ipsilateral
N3c	Metastasis nodus limfatikus supraklavikula ipsilateral
Nodus limfatikus regional patologik (pN)	
pNx	Nodus limfatikus regional tidak dapat dinilai
pN0	Tidak terdapat metastasis nodus limfatikus regional secara histologis, tanpa pemeriksaan tambahan pada isolasi tumor
pN0(i-)	Tidak terdapat metastasis nodus limfatikus regional secara histologis, pewarnaan imunohistokimia negatif

pN0(i+)-	Isolasi sel tumor diidentifikasi secara histologis atau dengan pewarnaan imunohistokimia positif, tanpa klaster > 0,2 mm
pN0(mol-)	Tidak terdapat metastasis nodus limfatikus secara histologis, RT-PCR negatif
pN0(mol+)	Tidak terdapat metastasis nodus limfatikus secara histologi, T-PCR positif
pN1	Metastasis pada satu dari tiga nodus limfatikus aksila, dan / atau nodus limfatikus interna mammae dengan penyakit mikroskopis yang dideteksi dengan diseksi nodus limfatikus sentinel tanpa penampakan secara klinis
pNmi	Mikrometastasis (> 0,2 mm)
pN1a	Metastasis pada satu dari tiga nodus limfatikus aksila
pN1b	Metastasis pada nodus limfatikus interna mammae yang dideteksi dengan diseksi nodus limfatikus
pN1c	Metastasis pada satu dari tiga nodus limfatikus aksila dan nodus limfatikus interna mammae yang dideteksi dengan diseksi nodus limfatikus
pN2	Metastasis pada 4-9 nodus limfatikus aksila, atau secara klinis nodus limfatikus interna mammae tanpa metastasis nodus limfatikus aksila
pN2a	Metastasis pada 4-9 nodus limfatikus aksila (sekurang-kurangnya deposit tumor > 2 mm)
pN2b	Metastasis secara klinis nodus limfatikus interna mammae tanpa metastasis nodus limfatikus aksila
	Metastasis pada 10 atau lebih nodus limfatikus aksila, atau nodus limfatikus infraklavikula, atau secara klinis nodus limfatikus interna mammae ipsilateral dengan satu atau lebih nodus limfatikus aksila positif, atau lebih dari tiga nodus limfatikus aksila secara klinis negatif
pN3	Mikroskopis metastasis pada nodus limfatikus interna mammae atau nodus limfatikus supraklavikula ipsilateral
pN3a	Metastasis pada 10 atau lebih nodus limfatikus (sedikitnya satu deposit tumor > 2 mm), atau metastasis ke nodus limfatikus infraklavikula
	Metastasis secara klinis nodus limfatikus interna mammae ipsilateral dengan satu atau lebih nodus limfatikus aksila positif atau lebih dari 3 nodus limfatikus aksila dan nodus limfatikus interna mammae dideteksi dengan diseksi nodus limfatikus
pN3b	Diseksi tetapi secara klinis tidak tampak
pN3c	Metastasis nodus limfatikus supraklavikula ipsilateral
Metastasis jauh (M)	
M0	Tidak ada metastasis jauh secara klinis maupun radiologis
cM0(i+)	Tidak ada metastasis jauh secara klinis maupun radiologis, tetapi terdeteksi secara molekuler maupun mikroskopis adanya deposit sel-sel tumor di darah, sumsum tulang, atau nodus non-regional yang tidak > 0,2 mm pada pasien tanpa tanda dan gejala metastasis
M1	Metastasis jauh yang ditentukan oleh tanda klinis klasik dan pencitraan radiologi dan/ atau secara histologis > 0,2 mm

(American Joint Committee on Cancer, 2010)

Lampiran 2. Tabel Konversi Perhitungan Dosis Berdasarkan Luas Permukaan Tubuh untuk Berbagai Jenis Hewan dan Manusia

	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmot 400 g	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mecit 20 g	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmot 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,1	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

Lampiran 3. Cara Penentuan Dosis Ekstrak Tempe

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan penelitian sebelumnya sebagai penelitian pendahuluan. Berdasarkan penelitian Permana (2008), semua dosis pemberian ekstrak tempe menurunkan kolesterol secara nyata mulai dari pemberian 100 mg/kg BB kelinci, 200 mg/ kg BB kelinci, dan 400 mg/kg BB kelinci. Efek semakin meningkat dengan peningkatan dosis, yaitu efek paling nyata terjadi pada dosis 400 mg/ kg BB kelinci.

$$\text{Dosis ekstrak tempe} = 400 \text{ mg/kg BB kelinci, BB} = 1,5 \text{ kg}$$

$$\text{Jumlah ekstrak tempe} = \text{dosis} \times \text{BB}$$

$$= 400 \times 1,5$$

$$= 600 \text{ mg}$$

$$\text{Konversi ke mencit, BB} = 20 \text{ g}$$

$$\text{Jumlah ekstrak tempe} = 0,04 \times \text{jumlah ekstrak tempe (kelinci)}$$

$$= 0,04 \times 600 \text{ mg}$$

$$= 24 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis ekstrak tempe} = \text{jumlah ekstrak tempe} / \text{BB mencit}$$

$$= 24 \text{ mg} / 20 \text{ g BB mencit}$$

Dosis ekstrak tempe sebesar 24 mg/ 20 g BB berdasarkan perhitungan diatas digunakan sebagai dosis tengah yang diberikan pada kelompok perlakuan III. Untuk dosis terkecil yang diberikan pada kelompok perlakuan II diambil dari perhitungan:

$$\frac{1}{2} \times 24 \text{ mg} = 12 \text{ mg} / 20 \text{ g BB mencit.}$$

Sedangkan untuk dosis terbesar diambil dari perhitungan berikut ini:

$$2 \times 24 \text{ mg} = 48 \text{ mg} / 20 \text{ g BB mencit.}$$

Jadi, didapatkan dosis terendah sebesar 12 mg/ 20 g BB mencit, 24 mg/ 20 g BB mencit sebagai dosis tengah, dan dosis tertinggi sebesar 48 mg/ 20 g BB mencit.

**Lampiran 4. Prosedur Pembuatan Preparat dan Pewarnaan
Imunohistokimia Caspase-3 (Instalasi Patologi Anatomi
RSMS, 2007; Suhenti, 2007)**

1. Sampel blok paraffin dipotong 3-4 mikron, ditempelkan pada objek glas yang dilapisi poly-l-lysin, dikeringkan atau diplak dengan kertas saring basah air hangat, ditaruh di hot plate sebentar
2. Dibiarkan semalam di inkubator pada suhu 45⁰C
3. Diparafinasi menggunakan xylol 2x5 menit, alkohol absolute, 95%, 80%. Kemudian dicuci dengan EDTA pH 8,0
4. Preparat dicuci dengan PBS (Phosphate Buffer Saline) selama 5 menit, dilap tepi-tepinya dengan kain kasa
5. Preparat dimasukkan ke dalam Buffer Citrate dan dipanaskan dalam microwave pada suhu 650 ⁰C, disetel selama 10 menit, biarkan selama 20 detik, pindahkan pada suhu 450 ⁰C, biarkan sampai dingin
6. Preparat dicuci dengan PBS selama 5 menit, dilap tepi-tepinya
7. Preparat ditetesi dengan H₂O₂ 3%, biarkan selama 20 menit, cuci dengan air mengalir 5 menit lap tepi-tepinya.
8. Cuci dengan PBS selama 5 menit
9. Preparat ditetesi Normal Serum (ultra V block) selama 5 menit, dilap tepi-tepinya tidak boleh dicuci lagi
10. Preparat ditetesi dengan antibodi yaitu antibodi Caspase-3, biarkan selama 60 menit pada suhu kamar atau satu malam di lemari es
11. Antibodi dibuang, dicuci dengan PBS selama 5 menit

12. Ditetesi dengan antibodi sekunder biotin (*yellow*) biarkan 5 menit, sambil menunggu kita encerkan DAB 1:50, biarkan selama 20 menit
13. Cuci dengan PBS selama 5 menit
14. Ditetesi dengan streptavidin (*rose*) biarkan selama 5 menit
15. Dicuci dengan PBS harus baru selama 5 menit, PBS dibuang
16. Tetesi dengan Diaminobenzidin (DAB) biarkan selama 15 menit (berubah coklat)
17. Cuci dengan air mengalir selama 5 menit
18. Preparat dicat dengan Hematoksin Eosin (mayer) 3 menit, cuci dengan air mengalir
19. *Mounting* dan ditutup dengan deck glas

Lampiran 5. Hasil Pengamatan Berat Badan, Besar Tumor, dan Volume Tumor Selama Penelitian

No.	Berat Badan Awal (g)	BB Setelah Adaptasi (g)	Tujuh Hari Setelah Inokulasi Tumor			Minggu I Perlakuan			Minggu II Perlakuan		
			BB (g)	Besar Tumor (mm)	Volume (mm ³)	BB (g)	Besar Tumor (mm)	Volume (mm ³)	BB (g)	Besar Tumor (mm)	Volume (mm ³)
Kontrol											
1	17,3	17,8	18	6,50 x 8,13	171,746	20,2	8,38 x 8,32	290,042	20,3	7,67 x 8,95	263,259
2	19,2	19,5	19,7	6,24 x 8,38	163,148	20,8	8,02 x 8,19	263,392	21,4	8,95 x 8,18	299,433
3	19,6	19,8	20	6,33 x 8,97	179,709	21,7	6,00 x 9,27	166,860	22,5	6,14 x 11,44	215,642
4	20,4	20,7	21	5,99 x 9,62	172,583	19,5	8,87 x 7,48	248,140	20,2	10,03 x 9,08	413,468
5	18,5	18,9	19,2	6,00 x 8,51	153,180	17,3	7,25 x 7,65	201,052	18	11,59 x 11,26	734,734
6	17	17,2	17	6,71 x 10,92	245,831	18,5	6,71 x 7,58	170,641	19,5	10,85 x 5,48	162,915
Perlakuan I											
1	19,8	20,6	21	7,13 x 9,78	248,592	19,8	4,09 x 7,51	62,814	19,8	7,47 x 10,21	284,864
2	18,2	18,8	19	6,49 x 8,61	181,327	20	5,78 x 6,62	110,582	20,2	8,55 x 9,64	352,354
3	19	19,6	19,8	7,63 x 12,16	353,958	21,5	7,13 x 6,12	133,525	22,1	7,49 x 8,99	252,169
4	20	20,8	21,2	6,12 x 7,81	146,259	22	4,35 x 4,18	38,003	20	8,21 x 9,93	334,661
5	18	18,8	19,2	3,38 x 8,08	46,154	20,1	5,52 x 6,27	95,525	22	6,28 x 7,59	149,668
6	20	20,7	21	6,57 x 9,07	195,753	20,6	4,17 x 5,42	47,124	20,2	5,92 x 6,40	112,148
Perlakuan II											
1	18	17,6	17	5,09 x 7,62	98,710	16,8	6,46 x 7,41	154,616	18	10,24 x 7,47	285,701
2	17,5	17,3	16,8	4,85 x 7,46	87,739	16	5,57 x 8,05	124,875	16,4	6,44 x 11,22	232,667
3	17	17,2	16,7	4,32 x 8,40	156,764	16,8	4,33 x 5,87	55,028	17,2	5,97 x 6,67	118,862
4	18	18,4	18,2	6,14 x 7,56	142,504	18,4	6,33 x 7,67	153,664	18	8,80 x 8,55	321,651
5	18,2	18	17,5	4,13 x 6,69	59,404	18,2	4,33 x 5,49	51,466	18,4	5,93 x 9,14	160,704
6	17,4	17,2	17	6,56 x 9,92	213,446	17	6,64 x 9,81	216,259	17,1	8,56 x 11,77	428,193
Perlakuan III											
1	18,5	18,9	19,5	5,61 x 7,17	112,827	19,2	4,44 x 6,39	62,985	20	4,39 x 10,92	105,225
2	18	18,5	19	4,41 x 5,05	49,106	19,5	4,45 x 5,60	55,447	19,4	4,12 x 4,37	36,909
3	18,3	18,6	19	4,90 x 7,19	86,316	18,2	3,03 x 5,59	25,661	18	4,10 x 8,17	68,668
4	17	17,5	17,9	3,23 x 7,27	37,923	18	4,67 x 6,12	66,735	18,1	5,59 x 6,70	104,681
5	16,8	17,2	17	5,00 x 4,97	61,752	17,2	4,35 x 5,06	47,874	18,7	4,86 x 6,28	74,165
6	18,7	19	19,2	5,89 x 6,31	109,453	20,3	3,03 x 5,42	24,880	20,1	4,79 x 6,64	76,174

Lampiran 6. Uji Normalitas Data

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Allred Score	,197	200	,000	,890	200	,000

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

Kelompok Perlakuan				Statistic	Std. Error
Allred Score	Kelompok Kontrol	Mean		3,86	,137
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3,58	
			Upper Bound	4,14	
		5% Trimmed Mean		3,93	
		Median		4,00	
		Variance		,939	
		Std. Deviation		,969	
		Minimum		0	
		Maximum		5	
		Range		5	
		Interquartile Range		2	
	Kelompok Perlakuan 1	Skewness		-1,250	,337
		Kurtosis		3,701	
		Mean		4,24	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3,75	
			Upper Bound	4,73	
		5% Trimmed Mean		4,38	
		Median		5,00	
		Variance		3,002	
		Std. Deviation		1,733	
		Minimum		0	
		Maximum		6	
	Kelompok Perlakuan 2	Range		6	,337
		Interquartile Range		3	
		Skewness		-1,098	
		Kurtosis		,699	
		Mean		4,32	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3,93	
			Upper Bound	4,71	
		5% Trimmed Mean		4,44	
		Median		4,00	
		Variance		1,896	
		Std. Deviation		1,377	

Kelompok Perlakuan 3	Minimum		0	
	Maximum		6	
	Range		6	
	Interquartile Range		1	
	Skewness		-1,294	,337
	Kurtosis		2,378	,662
	Mean		4,04	,187
	95% Confidence	Lower Bound	3,66	
	Interval for Mean	Upper Bound	4,42	
	5% Trimmed Mean		4,09	
	Median		4,00	
	Variance		1,753	
	Std. Deviation		1,324	
	Minimum		0	
	Maximum		6	
	Range		6	
	Interquartile Range		2	
	Skewness		-,571	,337
	Kurtosis		,312	,662

Lampiran 7. Uji *Kruskal-Wallis*

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Allred Score	200	4,11	1,379	0	6
Kelompok Perlakuan	200	2,50	1,121	1	4

Kruskal-Wallis Test

Ranks

Kelompok Perlakuan		N	Mean Rank
Allred Score	Kelompok Kontrol	50	84,23
	Kelompok Perlakuan 1	50	111,18
	Kelompok Perlakuan 2	50	110,76
	Kelompok Perlakuan 3	50	95,83
	Total	200	

Test Statistics(a,b)

	Allred Score
Chi-Square	8,022
df	3
Asymp. Sig.	,046

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

Lampiran 8. Uji *Mann-Whitney*

NPART TESTS

/M-W= TS BY Kelompok(1 2)

/MISSING ANALYSIS.

Ranks

Kelompok Perlakuan		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Allred Score	Kelompok Kontrol	50	44,02	2201,00
	Kelompok Perlakuan 1	50	56,98	2849,00
	Total	100		

Test Statistics(a)

	Allred Score
Mann-Whitney U	926,000
Wilcoxon W	2201,000
Z	-2,303
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021

a Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

NPART TESTS

/M-W= TS BY Kelompok(1 3)

/MISSING ANALYSIS.

Ranks

Kelompok Perlakuan		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Allred Score	Kelompok Kontrol	50	43,26	2163,00
	Kelompok Perlakuan 2	50	57,74	2887,00
	Total	100		

Test Statistics(a)

	Allred Score
Mann-Whitney U	888,000
Wilcoxon W	2163,000
Z	-2,612
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009

a Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

NPART TESTS

/M-W= TS BY Kelompok(1 4)

/MISSING ANALYSIS.

Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Allred Score	Kelompok Kontrol	50	47,95	2397,50
	Kelompok Perlakuan 3	50	53,05	2652,50
	Total	100		

Test Statistics(a)

	Allred Score
Mann-Whitney U	1122,500
Wilcoxon W	2397,500
Z	-,913
Asymp. Sig. (2-tailed)	,361

a. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

NPAR TESTS

/M-W= TS BY Kelompok(2 3)

/MISSING ANALYSIS.

Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Allred Score	Kelompok Perlakuan 1	50	51,09	2554,50
	Kelompok Perlakuan 2	50	49,91	2495,50
	Total	100		

Test Statistics(a)

	Allred Score
Mann-Whitney U	1220,500
Wilcoxon W	2495,500
Z	-,209
Asymp. Sig. (2-tailed)	,834

a. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

NPAR TESTS

/M-W= TS BY Kelompok(2 4)

/MISSING ANALYSIS.

Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Allred Score	Kelompok Perlakuan 1	50	54,11	2705,50
	Kelompok Perlakuan 3	50	46,89	2344,50
	Total	100		

Test Statistics(a)

	Allred Score
Mann-Whitney U	1069,500
Wilcoxon W	2344,500
Z	-1,274
Asymp. Sig. (2-tailed)	,203

a. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

NPARTIAL TESTS

/M-W= TS BY Kelompok(3 4)

/MISSING ANALYSIS.

Ranks

	Kelompok Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Allred Score	Kelompok Perlakuan 2	50	54,11	2705,50
	Kelompok Perlakuan 3	50	46,89	2344,50
	Total	100		

Test Statistics(a)

	Allred Score
Mann-Whitney U	1069,500
Wilcoxon W	2344,500
Z	-1,284
Asymp. Sig. (2-tailed)	,199

a. Grouping Variable: Kelompok Perlakuan

Lampiran 8. Uji Nilai Kappa

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Obs1 * Obs2	200	100,0%	0	,0%	200	100,0%

Obs1 * Obs2 Crosstabulation

			Obs2		Total
			1	2	1
Obs1	Negatif	Count	8	0	8
		% of Total	4,0%	,0%	4,0%
	Positif	Count	2	190	192
		% of Total	1,0%	95,0%	96,0%
Total	Count		10	190	200
	% of Total		5,0%	95,0%	100,0%

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,884	,081	12,583	,000
N of Valid Cases		200			

a Not assuming the null hypothesis.

b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama Lengkap : Ai Nurfaiziyah

NIM : G1A007075

Judul Skripsi : Efek Pemberian Ekstrak Tempe Kedelai (*Glycine max*) terhadap Ekspresi Caspase-3 Mencit (*Mus Musculus*) Galur C3h Model Karsinogenesis Payudara.

Pembimbing Skripsi : dr. Dody Novrial Sp.PA.Msi.Med
dr. Kamal Agung Wijayana Sp.B

Menyatakan bahwa :

1. Penelitian ini merupakan hasil penelitian sendiri, bukan hasil plagiasi.
2. Pelaksanaan penelitian ini menggunakan biaya sendiri.
3. Hak kekayaan intelektual penelitian ini menjadi milik institusi dalam hal ini Universitas Jenderal Soedirman, kecuali jika penelitian dilakukan dengan dana dari luar Universitas Jenderal Soedirman.
4. Hak publikasi penelitian ini ada pada peneliti.

Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya tanpa paksaan atau tekanan dari siapapun. Saya bersedia bertanggung jawab secara hukum, apabila terdapat hal-hal yang tidak benar di dalam penelitian ini.

Purwokerto, 16 Agustus 2011

Yang membuat pernyataan,

Ai Nurfaiziyah

BIODATA



Nama lengkap : Ai Nurfaiziyah
Tempat dan tanggal lahir : Bandung/ 30 Desember 1988
Alamat asal : Jalan Cigondewah Kidul No. 7 Rt 01/ 04. Kec.
Bandung Kulon. Bandung 40214.
Judul penelitian : Efek Pemberian Ekstrak Tempe Kedelai (*Glycine max*) terhadap Ekspresi Caspase-3 Mencit (*Mus musculus*) Galur C3H Model Karsinogenesis Payudara

Riwayat pendidikan:
Sekolah Dasar (SD) : SD Atta'zhimiyah
Lulus tahun 2000
Sekolah Menengah Pertama (SMP/MTs*) : MTs. Atta'zhimiyah
Lulus tahun 2003
Pendidikan Menengah Umum (SMU/SMK/MA*) : MAN 1 Bandung
Lulus tahun 2006
Pendidikan Tinggi : Jurusan Kedokteran,
FKIK, UNSOED

Kegiatan Ilmiah yang pernah diikuti:

1. Seminar Nasional “Kedudukan Hukum Dokter Tamu, Dokter Kontrak, Dokter Konsultan, PPDS, dan Mahasiswa Kedokteran di Rumah Sakit, Kaitannya dengan UUPK dan Permenkes No. 512/Menkes/PerIV/2007”, tahun 2007.
2. Seminar “Problema Aborsi dalam Pandangan Medis dan Islam”, tahun 2008.
3. Seminar Nasional “The 5th ANTIBIOTIC Peranan Dokter Muslim dalam Menjawab Tantangan Jaman”, tahun 2009.

4. ANNULUS “Annual Islamic Medical Seminar of Jenderal Soedirman University”, tahun 2010.
5. Seminar Genetika Nasional “Genetika Medik” Unsoed, tahun 2010.

Kegiatan pengembangan diri yang dilakukan:

1. Peserta ESQ Leadership Training, tahun 2007.
2. Peserta TA'ARUF Himpunan Mahasiswa Muslim Kedokteran (HMMK) Unsoed, tahun 2007.
3. Peserta Talkshow Kejournalistikan Faperta Unsoed, tahun 2008.
4. Diklat Kepemimpinan 2 UKKI Unsoed
5. Delegasi Indonesia The FIMA 10th International Camp for Medical Students, Malang, Jawa Timur, tahun 2008.

Penghargaan yang pernah diterima:

1. Library Award, Perpustakaan MAN 1 Bandung, tahun 2003.
2. Lulusan Terbaik 1 Program IPA, MAN 1 Bandung, tahun 2006.
3. Beasiswa Departemen Agama Jawa Barat “Learning Camp Intensive SPMB”, tahun 2006.

Catatan:

***) coret yang tidak diperlukan**