



UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS EKSPRESI *NUCLEAR FACTOR -kappa B* (NF- $\kappa$ B)  
PADA SEL PUNCA KANKER PAYUDARA MANUSIA  
(CD 24-/CD 44+) YANG DIBERI H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> DAN HUBUNGANNYA  
DENGAN STATUS ANTIOKSIDAN DAN VIABILITAS SEL**

TESIS

**HENDRIK KURNIAWAN  
NPM : 1106105852**

**KEKHUSUSAN BOKIMIA  
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA  
JAKARTA  
DESEMBER 2014**

## PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Hendrik Kurniawan

NPM : 1106105852

Tanda tangan :



Tanggal : 29 Desember 2014

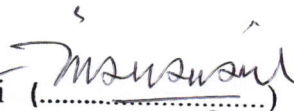
## LEMBAR PENGESAHAN

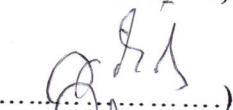
Tesis ini diajukan oleh :

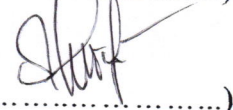
Nama : Hendrik Kurniawan  
NPM : 1106105852  
Program Studi : Biokimia dan Biologi Molekuler  
Judul Tesis : Analisis *Ekspresi Nuclear Factor – kappa B* (NF-kB) Pada Sel Punca Kanker Payudara Manusia (CD 24-/CD 44+) yang Diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan Hubungannya Dengan Status Antioksidan dan Viabilitas Sel

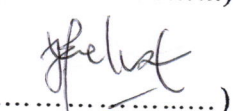
Telah berhasil dipertahankan di hadapan dewan penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister pada program studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI :

Pembimbing I : Dr.rer.physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi (.....)

Pembimbing II: Prof. Dr. dr. Sri Widia A. Jusman, MS (.....)

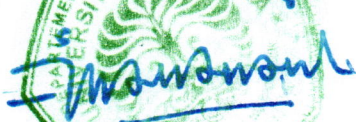
Penguji I : Dr. dr. Novi Silvia Hardiany, M.Biomed (.....)

Penguji II : Dr. Melva Louisa, SSi, MBiomed (.....)

Penguji III : Dra. Arleni, MS (.....)

Ditetapkan di : Jakarta  
Tanggal : 29 Desember 2014

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik :

Dr.rer.physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi (.....)



## KATA PENGANTAR

Terima Kasih kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa sangatlah sulit untuk menyelesaikan tesis ini tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, mulai dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini.

Pada kesempatan kali ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr.rer.physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi, sebagai dosen pembimbing I, Prof. Dr. dr. Sri Widia A. Jusman, MS, sebagai dosen pembimbing II. Terima kasih dan penghargaan atas segala bimbingan, curahan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan tesis ini. Penulis berterima kasih kepada Dr. dr. Ani Retno Prijanti, MS, selaku Ketua Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI, yang telah mengizinkan penulis memakai fasilitas departemen selama penelitian. Penulis juga berterima kasih kepada Go Aulia M.Biomed, yang telah membantu dalam proses persiapan sampel.
2. Seluruh dosen dan karyawan di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler yang telah membantu penulis sejak kuliah dan praktikum di kekhususan Biokimia.
3. Universitas Kristen Krida Wacana Jakarta, Dekan Fakultas Kedokteran UKRIDA Jakarta yang telah memberi izin dan beasiswa selama pendidikan.
4. Teman-teman seperjuangan, Lasma, Uli, Ratna, Ika, Raafqi, Ulfa, Aan, Anggi, Virhan, Andriani, Resda, Lisana, Agus, David yang bekerjasama selama masa perkuliahan dan penelitian.
5. Istri tersayang Lilis Napitupulu, Bianca putri tercinta serta Blanco atas dorongan dan semangat yang membuatku mampu untuk menyelesaikan pendidikan ini. Terima kasih juga kepada mama papa yang selalu mengiringi perjalanan hidup penulis.

Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Jakarta, 29 Desember 2014

Hendrik Kurniawan

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

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

Nama : Hendrik Kurniawan  
NPM : 1106105852  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Departemen : Biokimia dan Biologi Molekuler  
Fakultas : Kedokteran  
Jenis Karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-Exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah yang berjudul :

**Analisis Ekspresi *Nuclear Factor – kappa B* (NF- $\kappa$ B) Pada Sel Punca Kanker Payudara Manusia (CD 24-/CD 44+) yang Diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan Hubungannya Dengan Status Antioksidan Dan Viabilitas Sel.**

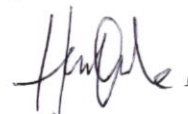
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Tanggal : 29 Desember 2014

Yang menyatakan



(Hendrik Kurniawan)



## ABSTRAK

Nama : Hendrik Kurniawan  
Program Studi : Biokimia dan Biologi Molekuler  
Judul : Analisis Ekspresi *Nuclear Factor - kappa B* (NF-kB) Pada Sel Punca Kanker Payudara Manusia (CD 24-/CD 44+) yang Diinduksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Dan Hubungannya Dengan Status Antioksidan Dan Viabilitas Sel

**Latar Belakang** : Kanker payudara merupakan salah satu penyebab kematian tertinggi akibat kanker pada wanita di Indonesia. Kanker payudara memiliki heterogenitas yang tinggi, salah satunya adalah sel punca kanker (cancer stem cells, CSCs). CSC berperan pada ketahanan hidup sel kanker dan resisten terhadap radioterapi dan kemoterapi. Penelitian terdahulu terhadap CSC payudara membuktikan bahwa CSC tahan terhadap senyawa oksigen reaktif akibat induksi rotenone. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari peran NF-kB dalam ketahanan hidup CSC melalui regulasi terhadap antioksidan dan viabilitas sel.

**Metode** : Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Penelitian dilakukan pada sel punca kanker payudara manusia (CD24-/CD44+) yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi 1.1μM, 11μM, dan 110μM dengan kontrol sel yang tidak diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Penilaian dilakukan terhadap parameter ekspresi mRNA NF-kB, aktivitas spesifik katalase, aktivitas spesifik glutathion peroksidase, dan viabilitas sel. Analisis statistik dilakukan pada tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0.05$ ).

**Hasil** : Pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasi 11μM meningkatkan ekspresi mRNA NFkB CSC secara bermakna dibandingkan dengan non CSC payudara ( $p < 0.05$ ). Pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> berbagai konsentrasi meningkatkan aktivitas spesifik katalase dan GPX tetapi tidak bermakna ( $p > 0.05$ ). Viabilitas sel menurun pada NCSC payudara yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Penurunannya sesuai dengan konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Kesimpulan** : terjadi peningkatan ekspresi mRNA NF-kB CSC payudara, peningkatan aktivitas spesifik katalase dan GPX baik pada CSC dan non CSC payudara, dan tidak menurunkan viabilitas CSC payudara dibandingkan non CSC payudara. Terdapat pola yang sama pada ekspresi mRNA NFkB, aktivitas spesifik katalase, dan aktivitas spesifik GPX.

**Kata kunci** : Sel punca kanker, stres oksidatif, NF-kB, antioksidan

## ABSTRACT

Name : Hendrik Kurniawan  
Study Program : Biomedical Science  
Title : Expression Analysis of Nuclear Factor - kappa B (NF-kB) In Human Breast Cancer Stem Cells (CD 24-/CD 44 +) induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Its Relation to Antioxidant Status and Cell Viability

**Background:** Breast cancer is one of the leading causes of death from cancer in women in Indonesia. Breast cancer has a high heterogeneity, one of which is a stem cell cancer (cancer stem cells, CSCS). CSC plays a role in cancer cell survival and resistance to radiotherapy and chemotherapy. Previous studies of breast CSC CSC prove resistant to reactive oxygen species-induced rotenone. This research aims to study the role of NF-kB in CSC's survival through regulation of antioxidant and cell viability.

**Methods:** This study was an experimental study. Research conducted on human breast cancer stem cells (CD24- / CD44 +) were given the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with 1.1μM, 11μM, and 110μM with control cells that were not given H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Assessment conducted on the parameters of mRNA expression of NF-kB, the specific activity of catalase, glutathione peroxidase specific activity, and cell viability. Statistical analyzes were performed at the 95% confidence level ( $\alpha = 0.05$ ).

**Results:** Giving 11μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration increases mRNA expression was significantly NFkB CSC compare with breast non CSC ( $p < 0.05$ ). Provision of various concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increases the specific activity of catalase and GPX but not significant ( $p > 0.05$ ). Decreased cell viability in breast fed non CSC H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The decrease in accordance with the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Conclusion:** an increase in mRNA expression of NF-kB the CSC breast, an increase the specific activity of catalase and GPX both the CSC and non-CSC breast, and does not reduce the viability of the breast compared to non CSC CSC breast. There is a similar pattern in the mRNA expression of NFkB, the specific activity of catalase, and the specific activity of GPX.

**Keywords:** cancer stem cells, oxidative stress, NF-kB, antioxidants

## DAFTAR ISI

HALAMANJUDUL .....	i
PERNYATAAN ORISINALITAS .....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS .....	v
ABSTRAK .....	vi
ABSTRACT .....	vii
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
DAFTAR SINGKATAN .....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar belakang .....	1
1.2. Pertanyaan penelitian .....	3
1.3. Tujuan penelitian .....	3
1.3.1. Tujuan umum .....	3
1.3.2. Tujuan khusus .....	4
1.4. Manfaat penelitian .....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	5
2.1. Kanker payudara .....	5
2.2. Sel punca kanker payudara .....	8
2.3. ROS dan radikal bebas .....	11
2.4. Stres oksidatif pada CSC payudara .....	13
2.5. <i>Nuclear Factor-kappa B</i> (NF-kB) .....	15
2.5.1. Struktur .....	15
2.5.2. Jalur persinyalan .....	16
2.5.3. NF-kB melindungi sel dari ROS .....	19
2.5.4. Antioksidan sebagai target NF-kB .....	19
2.5.4.1. <i>Mangan Superoxide Dismutase</i> (MnSOD) .....	19
2.5.4.2. Katalase .....	20
2.5.4.3. Glutation peroksidase .....	21
2.6. <i>Real Time PCR</i> .....	21
2.7. Kerangka teori .....	24
2.8. Kerangka konsep .....	25
BAB III. METODE PENELITIAN .....	26
3.1. Desain penelitian .....	26
3.2. Tempat dan waktu penelitian .....	26
3.3. Sampel penelitian .....	26
3.4. Alur penelitian .....	26
3.5. Bahan dan alat penelitian .....	27
3.5.1. Bahan penelitian .....	27
3.5.2. Alat penelitian .....	27



3.6. Cara kerja .....	28
3.6.1. Isolasi RNA total dengan <i>Tripure Isolation Kit</i> ® .....	28
3.6.2. Penghitungan konsentrasi RNA total.....	28
3.6.3. Isolasi protein total dengan <i>Tripure Isolation Kit</i> ®.....	29
3.6.4. Penghitungan konsentrasi protein total.....	30
3.6.5. Pengukuran aktivitas spesifik katalase .....	30
3.6.6. Pengukuran aktivitas spesifik glutathion peroksidase .....	30
3.6.7. Analisis ekspresi mRNA NF-kB dengan <i>Real Time RT-PCR</i> .....	31
3.6.8. Analisis viabilitas sel dengan <i>MTS Assay Promega</i> ® .....	32
3.6.9. Analisis statistik.....	33
BAB IV. HASIL PENELITIAN .....	35
4.1. Analisis aktivitas spesifik katalase.....	35
4.1.1. Optimasi kinetik katalase.....	35
4.1.2. Optimasi sampel .....	35
4.1.3. Optimasi substrat .....	36
4.1.4. Aktivitas spesifik katalase .....	37
4.2. Analisis aktivitas spesifik glutathion peroksidase.....	39
4.3. Analisis efek H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> terhadap viabilitas sel dengan <i>MTS Assay</i> .....	41
4.4. Ekspresi mRNA NF-kB melalui <i>Real-Time RT-PCR</i> .....	42
4.4.1. Konsentrasi RNA total.....	42
4.4.2. Analisis ekspresi mRNA NF-kB dengan <i>Real Time RT-PCR</i> .....	42
4.5. Analisis hubungan ekspresi mRNA NF-kB .....	45
BAB V. PEMBAHASAN .....	47
5.1. Analisis aktivitas spesifik katalase .....	49
5.1.1. Optimasi kinetik katalase.....	49
5.1.2. Optimasi pengenceran sampel .....	50
5.1.3. Optimasi pengenceran substrat (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	50
5.1.4. Aktivitas spesifik katalase .....	50
5.2. Analisis aktivitas spesifik glutathion peroksidase.....	51
5.3. Analisis efek H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> terhadap viabilitas sel dengan <i>MTS Assay</i> .....	52
5.4. Analisis ekspresi mRNA NF-kB melalui <i>Real Time RT-PCR</i> .....	54
5.5. Analisis hubungan ekspresi mRNA NF-kB .....	56
BAB VI. KESIMPULAN dan SARAN .....	57
6.1. Kesimpulan .....	57
6.2. Saran.....	57
DAFTAR PUSTAKA .....	58
Lampiran .....	61
<i>Draft</i> artikel ilmiah .....	
Daftar riwayat hidup .....	90

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. <i>Incidence &amp; mortality</i> kanker payudara di dunia dan Indonesia.....	6
Tabel 4.1. Penguraian H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> oleh blanko dan sampel tiap satuan waktu .....	35
Tabel 4.2. Optimasi sampel.....	36
Tabel 4.3. Optimasi substrat.....	36
Tabel 4.4.A Analisis hubungan ekspresi mRNA NF-kB CSC payudara (CD24- /CD44+) dengan aktivitas spesifik katalase, aktivitas spesifik GPx, dan viabilitas sel, Dan aktivitas spesifik MnSOD.....	45
Tabel 4.4.B Analisis hubungan ekspresi mRNA NF-kB non CSC payudara (CD24- /CD44+) dengan aktivitas spesifik katalase, aktivitas spesifik GPx, dan viabilitas sel, Dan aktivitas spesifik MnSOD.....	46

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 A. <i>Incidence</i> kanker pada wanita di dunia B. <i>Incidence</i> kanker pada wanita di Indonesia. C. <i>Mortality</i> kanker pada wanita di dunia D. <i>Mortality</i> kanker pada wanita di Indonesia. ....	6
Gambar 2.2. Sel punca kanker bisa terjadi pada <i>stem cell</i> , <i>progenitor cell</i> , dan <i>differentiated cell</i> .....	9
Gambar 2.3. CSC sebagai target terapi kanker mengakibatkan pengecilan tumor, terapi target yang tidak spesifik pada CSC mengakibatkan kekambuhan.....	10
Gambar 2.4. Homeostatis redoks( <i>redox regulation</i> ) .....	12
Gambar 2.5. Jalur persinyalan <i>redox-sensitive</i> pada regulasi <i>cell survival</i> .....	13
Gambar 2.6. Gangguan pada homeostatis redoks dan patogenesis penyakit .....	14
Gambar 2.7. A. Anggota-anggota NF-kB B. Anggota-anggota inhibitor NF-kB. C. Anggota-anggota IKK kompleks. ....	16
Gambar 2.8. Jalur klasik dan non klasik NF-kB yang meregulasi transkripsi antioksidan dan prooksidan.....	17
Gambar 2.9. NF-kB menginduksi protein anti-apoptosis yang mencegah apoptosis oleh TNF- $\alpha$ .....	18
Gambar 2.10 Plot Amplifikasi.....	22
Gambar 2.11 Optimasi temperatur <i>annealing</i> .....	23
Gambar 2.12 Kerangka teori.....	24
Gambar 2.13 Kerangka konsep.....	25
Gambar 3.1. Alur Penelitian.....	26
Gambar 3.2. Protokol reaksi <i>Real Time</i> RT-PCR .....	32
Gambar 4.1A Rasio aktivitas spesifik katalase pada CSC payudara CD 24-/CD44+ dan non-CSC payudara CD24-/CD44- terhadap kontrol .....	38
Gambar 4.1BRasio aktivitas spesifik katalase CSC payudara CD 24-/CD44+ terhadap non CSC payudara CD24-/CD44-.....	38
Gambar 4.2A Rasio aktivitas spesifik glutation peroksidase pada CSC payudara CD 24-/CD44+ dan non-CSC payudara CD24-/CD44- terhadap control.....	40
Gambar 4.2B Rasio aktivitas spesifik glutation peroksidase CSC payudara CD 24-/CD44+ terhadap non-CSC payudara CD24-/CD44-.....	40
Gambar 4.3A Viabilitas sel CD24-/CD44+ dan CD24-/CD44- terhadap kontrol .....	41
Gambar 4.3B Rasio Viabilitas sel CD24-/CD44+ terhadap CD24-/CD44-.....	41
Gambar 4.4 Kurva melting curve pada amplifikasi cDNA NF-kB dengan Real Time RT-PCR.....	43
Gambar 4.5 Kurva melting curve pada amplifikasi cDNA 18s rRNA dengan Real Time RT-PCR.....	43
Gambar 4.6A Rasio ekspresi relatif mRNA NF-kB pada CSC payudara CD 24-/44+ dan non CSC payudara CD24-/44- terhadap kontrol.....	44
Gambar 4.6B Rasio ekspresi relatif mRNA NF-kB pada CSC payudara CD24-/44+ terhadap non CSC payudara CD24-/44-.....	45

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Metode Analisis Ekspresi mRNA dengan <i>Real Time</i> RT-PCR.....	61
Lampiran 2. Tabel Pengukuran Aktivitas Spesifik GPx dengan kit RANSEL®.....	62
Lampiran 3. Data Konsentrasi dan Pengenceran RNA Total.....	63
Lampiran 4. Data Analisis Rasio Ekspresi mRNA NF-kB pada CSC Payudara (CD24- /CD44+).....	64
Lampiran 5. Data Analisis Rasio Ekspresi mRNA NF-kB pada non-CSC Payudara (CD24-/CD44-).....	66
Lampiran 6 Kurva Standar BSA dan Tabel Perhitungan Konsentrasi Protein.....	68
Lampiran 7 Data Perhitungan Aktivitas Spesifik Katalase Pada CSC payudara dan non- CSC payudara.....	70
Lampiran 8. Data Konsentrasi Relatif Aktivitas Katalase pada CSC Payudara dan non- CSC Payudara terhadap Kontrol.....	72
Lampiran 9. Data Perhitungan Aktivitas Spesifik GPx Pada CSC Payudara dan non-CSC Payudara.....	74
Lampiran 10 Data Konsentrasi Relatif Aktivitas GPx pada CSC Payudara dan non-CSC Payudara terhadap Kontrol.....	76
Lampiran 11 Data Perhitungan Viabilitas sel dengan MTS Assay Pada CSC Payudara dan non-CSC Payudara.....	78
Lampiran 12 Analisis Statistik Antar Kelompok dengan Uji ANOVA.....	79
Lampiran 13 Analisis Statistik Uji Korelasi.....	87

## DAFTAR SINGKATAN

ER	= <i>estrogen receptors</i>
PR	= <i>progesterone receptors</i>
HER-2	= <i>human epidermal growth factor receptor-2</i>
IARC	= <i>International Agency for Research on Cancer</i>
ROS	= <i>reactive oxygen species</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	= <i>Hidrogen Peroksida</i>
DNA	= <i>deoxyribo nucleic acid</i>
MnSOD	= <i>manganese superoxide dismutase</i>
GPX	= <i>glutation peroksidase</i>
GSH	= <i>glutation</i>
CSC	= <i>cancer stem cell</i>
CD	= <i>cluster of differentiation</i>
NF-κB	= <i>Nuclear Factor-kappa B</i>
MAPK	= <i>mitogen activated protein kinases</i>
SOD	= <i>superoksida dismutase</i>
AP-1	= <i>activating protein 1</i>
TNBC	= <i>triple-negative breast cancer</i>
iPS	= <i>induced pluripotent stem cells</i>
ALDH-1	= <i>Aldehyde dehydrogenases</i>
RNS	= <i>reactive nitrogen species</i>
UV	= <i>ultra violet</i>
NADPH	= <i>Nikotinamida adenina dinukleotida</i>
NOX2	= <i>NADPH 2</i>
RNA	= <i>Ribo Nucleic Acid</i>
GSSG	= <i>glutation disulfida</i>
RT-PCR	= <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
Ct	= <i>cycle threshold</i>
qPCR	= <i>quantitative PCR</i>
NTC	= <i>non template control</i>
HOCl	= <i>hypochlorous acid</i>
PI3K	= <i>phosphatidyl inositol 3-kinase</i>
Nrf2	= <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
Cyt. C	= <i>cytochrome C</i>
LDL	= <i>low density lipoprotein</i>
RHD	= <i>rel homology domain</i>
IκB	= <i>inhibitory IκB</i>
RANK	= <i>Receptor Activator of Nuclear Factor κ B</i>
TNFR	= <i>tumor necrosis factor receptor</i>
LPS	= <i>lipopolisakarida</i>
TLRs	= <i>toll like reseptor family</i>
NEMO	= <i>NF-kappa-B essential modulator</i>
IKK	= <i>I kappa B kinase</i>
BAFF	= <i>B cell-activating factor</i>
NIK	= <i>NF-kappa B-inducing kinase</i>
IAP	= <i>inhibitor of apoptosis</i>
XIAP	= <i>X chromosome-linked IAP</i>



FLICE	= <i>fas-associated death domain-like IL-1<math>\beta</math>-converting enzyme</i>
c-FLIP	= <i>cellular FLICE like inhibitory protein</i>
c-IAPs	= <i>cellular IAPs</i>
TRAF1	= <i>TNF receptor-associated factor 1</i>
DEDs	= <i>death effector domains</i>
FADD	= <i>Fas-associated death domain</i>
JNK	= <i>c-jun N-terminal kinase</i>
MnSOD	= <i>mangan superoxide dismutase</i>
MTS	= <i>[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]</i>
PMS	= <i>phenazine methosulfate</i>
DEPC	= <i>diethyl pyrocarbonate</i>
SDS	= <i>sodium dodecyl sulfate</i>
Pmsf	= <i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
PBS	= <i>phosphate buffer saline</i>
BSA	= <i>bovine serum albumin</i>
DMEM	= <i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DHE	= <i>dihydro ethidium</i>

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar belakang

Kanker adalah sekelompok penyakit dimana sel tidak responsif terhadap pengendalian pertumbuhan yang normal<sup>1</sup>. Kanker payudara adalah keganasan yang bermula dari sel-sel di payudara.<sup>2</sup> Berdasarkan data GLOBOCAN, *International Agency for Research on Cancer* (IARC) 2012, kanker payudara merupakan kanker dengan frekuensi tertinggi pada wanita di dunia dan di Indonesia, kanker payudara masih menjadi penyebab kematian tertinggi pada wanita diantara kanker lainnya.<sup>3</sup>

Pengobatan kanker payudara diantaranya adalah pembedahan, radiasi, kemoterapi, terapi hormon, dan terapi target. Sebelum dilakukan pembedahan biasanya diperlukan pengobatan untuk memperkecil tumor dengan pengobatan kemoterapi atau radiasi. Begitu juga setelah pembedahan dilanjutkan dengan kemoterapi atau radiasi untuk mengeradikasi sel kanker yang masih tersisa setelah pembedahan. Prinsip pengobatan kemoterapi dan radiasi adalah menginduksi kematian sel secara langsung melalui pembentukan senyawa oksigen reaktif (*reactive oxygen species*, ROS), baik berupa anion superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ) maupun hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Tetapi pengobatan kemoterapi dan radiasi masih sering menimbulkan kekambuhan.<sup>2</sup>

Sel kanker terdiri dari populasi heterogen yang sebagian kecil populasinya dikenal sebagai sel punca kanker (*cancer stem cell*, CSC). CSC sendiri berasal dari sel punca normal, yang antara lain memiliki karakteristik mirip dengan sel punca normal, seperti sifat pluripotensi yang ditandai dengan penanda seperti (Oct-4, Notch-1, ALDH-1, Fgfr 1 dan Sox), kemampuan memperbaharui diri, berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel, serta mempunyai ketahanan hidup yang tinggi.<sup>4</sup> CSC berasal dari sel punca somatik atau sel progenitor yang mengalami kelainan genetik yang mengarah pada keganasan.<sup>5</sup> Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa kegagalan radioterapi dan kemoterapi bukan karena kesulitan membunuh populasi massa sel tumor, tetapi karena adanya populasi CSC. Kanker payudara merupakan penyakit dengan tingkat heterogenitas jaringan yang tinggi

yang disebabkan oleh mutasi dini yang terjadi pada tingkat *stem cell*.<sup>6</sup> Subpopulasi kanker payudara mempunyai molekul penanda spesifik permukaan sel, yaitu CD44+, CD24-, ESA+, dan CD133+.<sup>7</sup> CSC diduga sebagai subpopulasi sel kanker yang berperan dalam resistensi terhadap beberapa terapi anti-kanker konvensional, kekambuhan dan metastasis. Oleh karena itu, pendekatan terapi spesifik dengan CSC sebagai target diperlukan untuk mengatasi masalah resistensi terapi kanker saat ini. Prinsip terapi anti-kanker seperti radiasi maupun kemoterapi adalah dengan menginduksi kematian sel kanker melalui pembentukan radikal bebas.<sup>8</sup> Peningkatan jumlah radikal bebas dapat menyebabkan perubahan keseimbangan homeostasis redoks yang mempengaruhi regulasi stres oksidatif di dalam sel kanker termasuk CSC payudara (CD24-/CD44+).<sup>9</sup>

Penelitian terdahulu Wanandi dkk membuktikan bahwa terjadi peningkatan ekspresi mRNA dan aktivitas spesifik MnSOD yang berhubungan erat dengan tingkat pluripotensi CSC payudara (CD24-/CD44+). Penelitian yang dilakukan oleh Aulia dkk pada tahun 2012, dengan menginduksi pembentukan ROS ( $O_2^-$ ) pada CSC payudara (CD24-/CD44+) menggunakan rotenon menunjukkan bahwa pada CSC payudara (CD24-/CD44+) tidak terjadi peningkatan  $O_2^-$ , yang disertai oleh penurunan ekspresi mRNA MnSOD, sedangkan pada non CSC payudara (CD24-/CD44-) terjadi peningkatan pembentukan  $O_2^-$  yang disertai oleh peningkatan ekspresi mRNA MnSOD. Hal ini menunjukkan bahwa CSC payudara (CD24-/CD44+) mempunyai mekanisme pertahanan terhadap peningkatan pembentukan  $O_2^-$  yang menyebabkan resistensi terhadap induksi rotenon, sehingga viabilitas sel dipertahankan. Penelitian paralel yang juga dilakukan oleh Aulia, dengan induksi  $H_2O_2$ , konsentrasi 1,1; 11 dan 110  $\mu M$  menunjukkan bahwa terjadi peningkatan  $H_2O_2$  pada non CSC payudara (CD24-/CD44-) dibandingkan CSC payudara (CD24-/CD44+).<sup>10</sup> Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan rotenon maupun  $H_2O_2$  dapat menyebabkan peningkatan ROS pada non CSC payudara (CD24-/CD44-) yang disertai dengan penurunan aktivitas spesifik MnSOD pada CSC payudara (CD24-/44+) dan non CSC payudara (CD24-/44-).

Pada kanker diketahui bahwa NF- $\kappa B$  berperan dalam memodulasi stres oksidatif melalui regulasi ROS dan antioksidan. Selain itu NF- $\kappa B$  juga berperan

pada proses inflamasi, imunitas, proliferasi dan apoptosis sel melalui jalur klasik dan non klasik (alternatif).<sup>11</sup> Disregulasi NF-kB mengaktivasi kaskade yang dihubungkan dengan patogenesis beberapa penyakit seperti kanker, aterosklerosis, dan *rheumatoid arthritis*.<sup>12</sup> Tumor-tumor dengan aktivitas NF-kB biasanya menunjukkan peningkatan resistensi kemoterapi. Oleh karena itu NF-kB mungkin dapat menjadi target untuk pengembangan obat antikanker dengan meng-inhibisi NF-kB yang dapat meningkatkan perbaikan respon dalam membunuh kanker kolorektal, kanker pankreas, sarkoma, dan kanker payudara.<sup>13</sup>

Pada penelitian ini akan dianalisis ekspresi NF-kB pada CSC payudara (CD24-/CD44+) yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan hubungannya dengan status antioksidan dan viabilitas sel. Apakah pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada CSC payudara (CD24-/CD44+) meningkatkan ekspresi NF-kB serta menyebabkan peningkatan aktivitas spesifik enzim antioksidan katalase (CAT) dan glutathion peroksidase (GPx) serta berpengaruh terhadap viabilitas sel?

## **1.2.Pertanyaan penelitian**

1. Apakah induksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada CSC payudara (CD24-/CD44+) mempengaruhi ekspresi NF-kB?
2. Apakah induksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dapat memodulasi stres oksidatif baik itu kadar ROS maupun aktivitas spesifik CAT dan GPx?
3. Apakah induksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dapat mempengaruhi viabilitas sel.

## **1.3.Tujuan penelitian**

### **1.3.1. Tujuan umum**

Menganalisis ekspresi NF-kB pada CSC payudara (CD24-/CD44+) yang diinduksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan hubungannya dengan antioksidan CAT dan GPx serta viabilitas CSC payudara (CD24-/CD44+).

### **1.3.2. Tujuan khusus**

1. Menganalisis ekspresi mRNA NF-kB pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
2. Menganalisis aktivitas spesifik CAT dan GPx pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
3. Menganalisis viabilitas CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
4. Menganalisis hubungan antara ekspresi mRNA NF-kB dengan aktivitas spesifik CAT, GPx, MnSOD, serta viabilitas sel pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### **1.4. Manfaat penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi tambahan mengenai mekanisme resistensi CSC pada sel kanker payudara terhadap kemoterapi maupun radioterapi.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Kanker payudara

Kanker dimulai ketika sel-sel di bagian tubuh tumbuh secara tidak terkontrol. Pertumbuhan sel kanker berbeda dengan pertumbuhan sel normal. Seharusnya sel kanker mati, tetapi tetap tumbuh dan membentuk sel-sel kanker yang baru. Sel-sel kanker ini dapat tumbuh masuk ke jaringan-jaringan lain yang tidak dapat dilakukan sel-sel normal.<sup>14</sup> Kanker payudara adalah keganasan yang bermula dari sel-sel di payudara. Hal ini terutama menyerang wanita, tetapi tidak menutup kemungkinan terjadi juga pada pria. Payudara wanita terdiri dari kelenjar yang membuat air susu ibu (disebut lobulus), saluran kecil yang membawa susu dari lobulus ke puting (disebut duktus), lemak dan jaringan ikatnya, pembuluh darah, dan kelenjar getah bening. Sebagian besar kanker payudara bermula pada sel-sel yang melapisi duktus (kanker duktal), beberapa bermula di lobulus (kanker lobular), dan sebagian kecil bermula di jaringan.<sup>2</sup>

Kanker payudara merupakan penyakit yang heterogen dimana terdapat banyak jenis klon sel yang membentuk jaringan kanker payudara. Klasifikasi kanker payudara terbaru yaitu berdasarkan taksonomi molekuler yang terbagi menjadi 5 subtype utama, diantaranya luminal-A (ER+, PR+, HER2-), luminal-B (HER2+), *triple-negative breast cancer* (TNBC) (ER-, PR-, HER2-), overekspresi HER2, dan basal-like.<sup>15</sup>

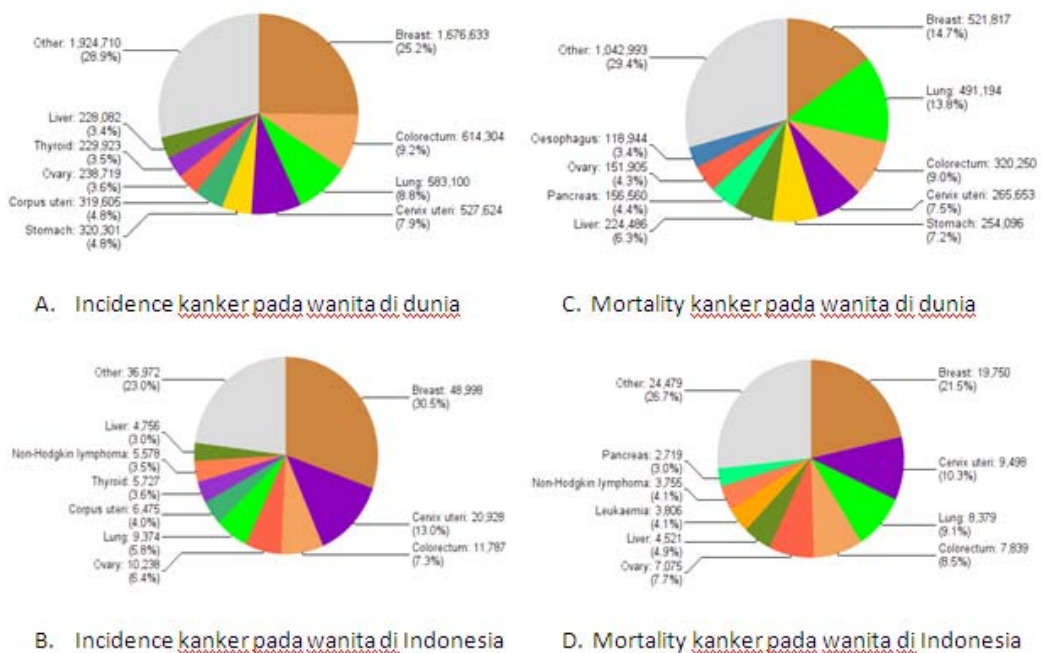
Berdasarkan data GLOBOCAN, *International Agency for Research on Cancer* (IARC) 2012, kanker payudara merupakan kanker dengan frekuensi tertinggi pada wanita di dunia dengan 1,67 juta kasus baru pada tahun 2012 (25,2% dari seluruh kanker) dan meningkat sebanyak 35% atau menjadi 2,59 juta di tahun 2035. Sejalan dengan peningkatan kasus baru di dunia, angka *mortality* juga mengalami peningkatan sebesar 38% dari 521.817 kematian di tahun 2012 menjadi 846.421 kematian di tahun 2035 seperti pada **tabel 2.1** di bawah ini. Hal yang sama juga terjadi di Indonesia, kanker payudara masih menjadi kanker dengan frekuensi tertinggi pada wanita di dunia dan di Indonesia serta menjadi penyebab kematian

tertinggi di dunia dan di Indonesia diantara kanker lainnya seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.1 di bawah ini.<sup>3</sup>

**Tabel 2.1. Incidence & mortality kanker payudara di dunia dan Indonesia.<sup>3</sup>**

	Seluruh Dunia		Kenaikan	Persentase Kenaikan
	2012	2035		
<i>Incidence</i>	1676633	2596280	919647	35%
<i>Mortality</i>	521817	846421	324604	38%

	Indonesia		Kenaikan	Persentase Kenaikan
	2012	2035		
<i>Incidence</i>	48998	80966	31968	39%
<i>Mortality</i>	19750	35573	15823	44%



**Gambar 2.1. A. Incidence kanker pada wanita di dunia B. Incidence kanker pada wanita di Indonesia. C. Mortality kanker pada wanita di dunia D. Mortality kanker pada wanita di Indonesia.<sup>3</sup>**

Ada 5 tipe pengobatan kanker payudara yang dapat dilakukan, diantaranya pembedahan, radiasi, kemoterapi, terapi hormon, dan terapi target. Pembedahan pada kanker payudara merupakan terapi kanker dengan cara mengangkat masa kanker payudara. Pembedahan dapat dilakukan pada pasien dengan kanker

payudara stadium awal. Ada dua jenis pembedahan pada kanker payudara yaitu mastektomi (pengangkatan seluruh payudara) dan lumpektomi (pengangkatan sebagian payudara). Radioterapi adalah pemberian radiasi dengan menggunakan sinar X dan sinar gamma dengan dosis tertentu pada daerah target yang bertujuan mengeradikasi sel kanker yang masih tersisa setelah pembedahan. Prinsip pemberian radioterapi adalah menginduksi kematian sel secara langsung dengan merusak DNA atau tidak langsung melalui pembentukan radikal bebas. Diharapkan dengan pemberian radioterapi dapat meningkatkan ketahanan hidup pasien dengan menekan angka kekambuhan dan metastasis jauh. Kemoterapi adalah pemberian obat antikanker yang bertujuan membunuh sel kanker melalui mekanisme toksisitas. Diharapkan dengan pemberian kemoterapi dapat meningkatkan *survival* pasien.

Ketika seseorang terlihat tidak mempunyai kanker lagi setelah pembedahan, diperlukan pengobatan tambahan yang disebut *adjuvant therapy*. Karena sel-sel kanker dapat tumbuh jauh dari tumor utama dan menyebar melalui aliran darah pada saat stadium awal. Tujuan dari *adjuvant therapy* adalah membunuh sel-sel yang tersembunyi ini. Semua terapi sistemik (seperti kemoterapi, terapi hormon, dan terapi target) dapat digunakan sebagai *adjuvant therapy*. Tetapi tidak semua pasien membutuhkan *adjuvant therapy*. Beberapa orang diberikan pengobatan sistemik atau radiasi sebelum pembedahan untuk mengecilkan tumor, hal ini disebut *neoadjuvant therapy*.<sup>2</sup>

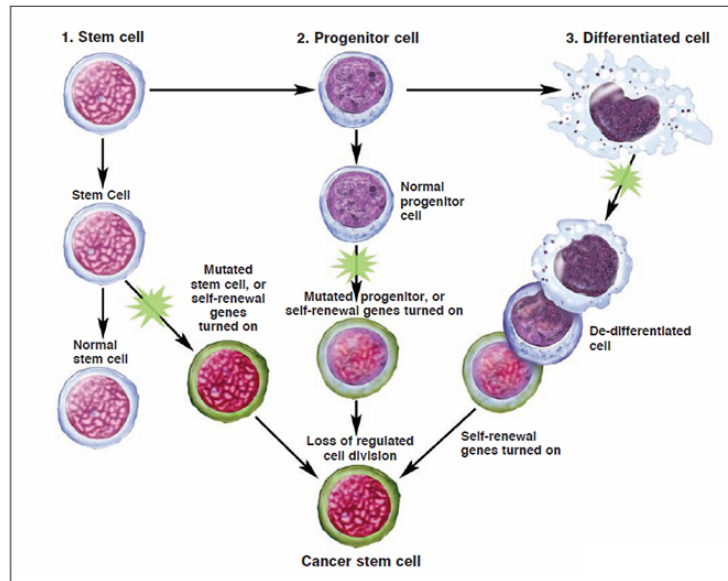
Pengobatan konvensional kanker payudara masih belum maksimal mengobati pasien kanker payudara, meskipun terapi adjuvan telah diberikan. Sekitar 40% dari keseluruhan kanker payudara mengalami kekambuhan dimana 70% merupakan kekambuhan metastasis dan sisanya kekambuhan lokal.<sup>15</sup> Banyak studi terdahulu menduga bahwa kekambuhan lokal dan metastasis diduga karena adanya resistensi terapi konvensional (kemo-radiasi) yang dimiliki oleh sebagian kecil populasi kanker yang tersisa setelah pemberian terapi. Para radiobiologis memperkirakan adanya subpopulasi sel tumor yang resisten terhadap radiasi, dan pada tahun 2003 CSC payudara teridentifikasi dan diduga merupakan subpopulasi

kanker payudara yang berperan dalam terjadinya kekambuhan lokal dan metastasis.<sup>5</sup>

## 2.2. Sel punca kanker payudara

Sel punca adalah sel yang memiliki potensi untuk berkembang menjadi berbagai jenis sel dengan tipe berbeda pada awal kehidupan dan pertumbuhan. Sel punca juga ada di jaringan dewasa, seperti saluran cerna dan sumsum tulang, tempat mereka secara teratur membelah dan menggantikan sel yang rusak. Saat ini, dikenal 3 jenis sel punca, yaitu sel punca embrional (*embryonic stem cells*), sel punca dewasa (*non-embryonic/somatic/adult stem cells*), dan sel punca pluripoten hasil pemberian dari sel somatik (*induced pluripotent stem cells; iPS*).<sup>16</sup> Sel iPS adalah sel dewasa yang mengalami de-diferensiasi atau pemrograman ulang inti sel menjadi sel yang keadaannya mirip sel punca embrional dengan cara mendorong ekspresi gen dan faktor penting yang memberikan ciri pluripotensial. Sel iPS yang dihasilkan memiliki karakteristik sel punca pluripoten, mengekspresikan penanda sel punca, dan dapat membentuk tumor yang mengandung jenis sel yang berasal dari ketiga lapisan embrional (teratoma).<sup>17</sup>

*American Association of Cancer Research* mendefinisikan CSC sebagai "sel di dalam tumor yang memiliki kapasitas untuk memperbaharui diri dan menyebabkan garis keturunan sel kanker yang heterogen."<sup>18</sup> CSC bisa terjadi pada tahap stem cell, progenitor cell maupun differentiated cell karena mutasi.<sup>19</sup>



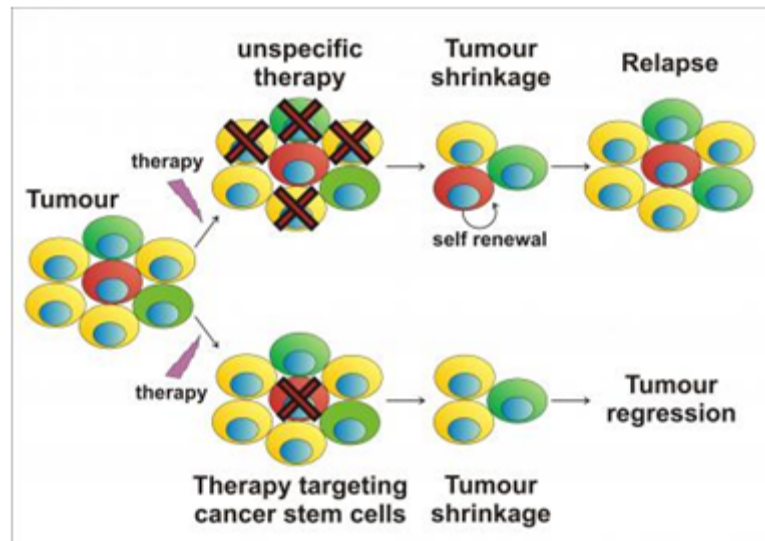
Gambar 2.2. Sel punca kanker bisa terjadi pada *stem cell*, *progenitor cell*, dan *differentiated cell* .<sup>19</sup>

CSC payudara teridentifikasi pada tahun 2003 oleh peneliti di *University of Michigan*.<sup>16</sup> Peneliti di sana menunjukkan bahwa CSC bersifat tumorigenik yang dapat menginisiasi pertumbuhan tumor baru, dan sebagian besar sel kanker yang bukan CSC bersifat non-tumorigenik.<sup>8</sup> CSC dikenal juga dengan istilah “*tumor-initiating cells*” karena sebelum sel punca kanker dihancurkan maka pertumbuhan tumor akan berlangsung terus.<sup>20</sup> Oleh karena itu, CSC diduga bertanggung jawab pada terjadinya resistensi terhadap kemoradiasi, kekambuhan lokal dan metastasis.<sup>8</sup> CSC memiliki karakter stemness seperti sel punca normal, diantaranya: sifat pluripotensi yang ditandai dengan penanda antara lain Oct-4, Notch1, ALDH1, Fgfr1, dan Sox1; kemampuan memperbaharui diri (*self renewal*); kemampuan berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel tumor lainnya; dan memiliki *survival rate* yang tinggi.<sup>21</sup> CSC payudara memiliki karakteristik, beberapa diantaranya adalah: 1) memiliki kemampuan untuk memperbaharui diri (*self-renewal*); 2) memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel-sel ganas yang berbeda morfologi dan karakteristik; 3) memiliki kemampuan berproliferasi yang tidak terbatas; 4) aktivasi telomerase dan jalur anti-apoptosis secara terus-menerus; dan 5) memiliki sifat *anchorage independence* (tidak bergantung pada adhesi dengan sel lain).<sup>15</sup> karakteristik CSC payudara lainnya yaitu petanda permukaan sel yang khas yaitu:



CD44+/CD24-/Lineage-. Penanda inilah yang membedakan subpopulasi CSC payudara dengan subpopulasi lainnya dalam jaringan kanker yang heterogen.<sup>22</sup> CD44+/CD24- merupakan kriteria spesifik yang dipakai untuk mengisolasi CSC payudara dari jaringan kanker payudara.

Sampai saat ini, perkembangan pengobatan kanker telah mengalami kemajuan pesat hingga pada pendekatan molekuler. Studi-studi terakhir berhasil mengembangkan banyak obat anti-kanker baru tetapi masih mengalami masalah dengan adanya kekambuhan dan resistensi.<sup>23</sup> Masalah tersebut diduga karena keberhasilan terapi kanker hanya dinilai berdasarkan pengecilan masa tumor tanpa mempertimbangkan keberadaan CSC. Banyak studi yang mempelajari karakteristik CSC payudara dan memfokuskan CSC payudara sebagai target dalam pengembangan terapi kanker sejak subpopulasi CSC payudara ditemukan.<sup>15</sup> Terapi yang tidak spesifik atau tidak menargetkan CSC sebagai target mengakibatkan pengecilan tumor yang sementara selanjutnya CSC dapat memperbaharui diri lagi atau terjadi kekambuhan. Pada terapi yang menargetkan CSC sebagai target menyebabkan pengecilan tumor dan diikuti dengan regresi tumor.<sup>24</sup>



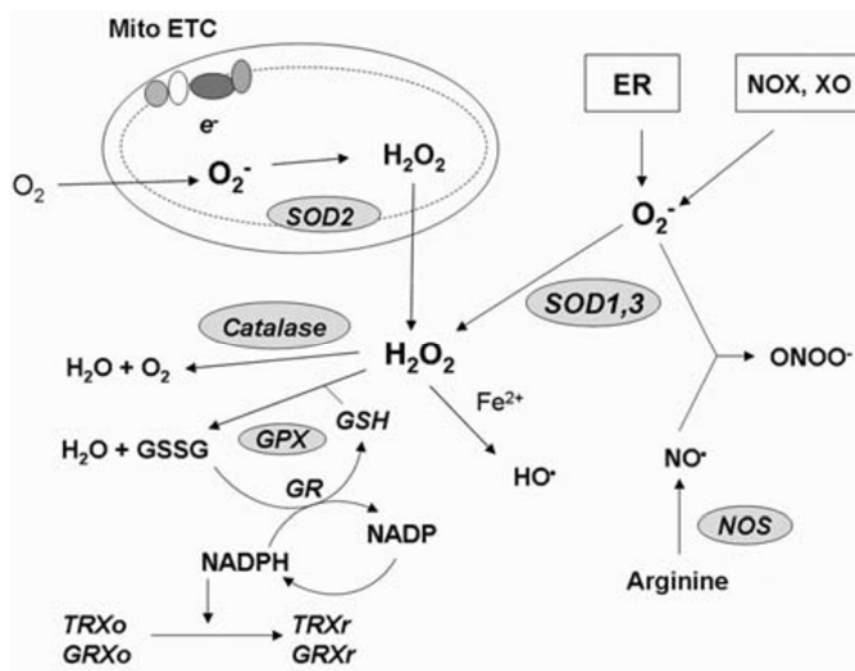
Gambar 2.3. CSC sebagai target terapi kanker mengakibatkan pengecilan tumor, terapi target yang tidak spesifik pada CSC mengakibatkan kekambuhan.<sup>24</sup>

### 2.3. ROS dan radikal bebas

*Reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) berperan penting di dalam regulasi *cell survival*. Pada umumnya level ROS/RNS yang *moderate* mungkin berfungsi sebagai sinyal untuk menaikkan proliferasi sel dan *survival*, pada peningkatan ROS/RNS yang lebih parah lagi dapat menginduksi kematian sel. Pada kondisi fisiologis, keseimbangan antara produksi dan eliminasi ROS/RNS menjaga protein-protein persinyalan yang sensitif redoks berfungsi secara tepat. Secara normal, homeostatis redoks menjamin sel-sel merespon stimulasi dari dalam dan luar sel dengan baik. Ketika homeostatis redoks terganggu, stres oksidatif mungkin membuat kematian sel menyimpang dan berkontribusi pada perkembangan penyakit.

ROS terdiri dari radikal bebas superoksida ( $O_2^{\bullet}$ ), hidroksil ( $OH^{\bullet}$ ) dan bukan radikal bebas seperti hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ).<sup>25</sup> Sumber ROS dari dalam dan luar sel berkontribusi pada formasi ROS di dalam sel. Sumber ROS dari luar diantaranya *irradiation* (seperti, *UV(ultra violet) irradiation, x-ray, gamma-ray*), polutan atmosfer, dan bahan kimia.<sup>26</sup> Sumber ROS di dalam sel dapat dibagi menjadi dua kategori utama. Pertama, proses biologi yang melepas ROS sebagai produk, atau produk limbah dari reaksi lain. Kedua, proses yang menghasilkan ROS dari sintesis atau pemecahan molekuler sebagai bagian jalur transduksi sinyal atau bagian dari mekanisme pertahanan sel. Pada kategori pertama, mitokondria merupakan sumber ROS terbesar dari reaksi fosforilasi oksidatif dimana elektron bocor selama transfer pada kompleks I dan III rantai transport elektron. Elektron ini bereaksi dengan oksigen membentuk ROS. Hal ini membuat ROS menumpuk. Untuk itu diperlukan enzim seperti *superoxide dismutase* (SOD) yang mengubah  $O_2^{\bullet}$  menjadi  $H_2O_2$ , selanjutnya  $H_2O_2$  diubah oleh katalase dan glutathion peroksidase menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$ .<sup>27</sup> Keberadaan *redox-active metals* seperti Fe dan Cu berkontribusi dalam pembentukan ROS dengan mengubah  $H_2O_2$  menjadi  $OH^{\bullet}$  melalui reaksi Fenton atau reaksi Haber-Weiss.<sup>28</sup> Sistem ini tidak hanya memperbaiki kerusakan oksidatif, tapi juga berkontribusi pada respon seluruh sel terhadap ROS dengan berperan sebagai sensor oksidatif pada jalur transduksi sinyal.<sup>29</sup>

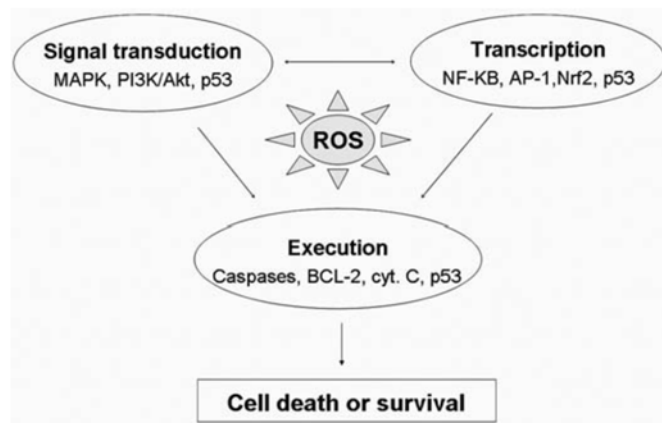
Pada kategori kedua, mikrosom dan peroksisom sebagai sumber ROS, terutama  $H_2O_2$ , dimana sel-sel imun seperti neutrofil dan makrofag mempunyai mekanisme *oxygen-dependent* untuk melawan invasi mikroorganisme. Sumber ROS yang berasal dari enzim yang menghasilkan ROS untuk berbagai tujuan seperti fagositosis *NAD(P)H oxidase*, *cytochrome c oxidase*, dan *xanthine oxidase*. NOX2 (gp91) menggunakan NADPH untuk menurunkan oksigen molekuler dan menghasilkan superoksida.<sup>30</sup> Superoksida ini digunakan sebagai alat pertahanan untuk melawan patogen yang infeksius dan dikonversi oleh *superoxide dismutase* dan *myeloperoxidase* menjadi *hypochlorous acid* (HOCl) di kompartemen fagosomal dimana sebagai senyawa *microbicidal*. Akibatnya, ROS ini sengaja dihasilkan oleh sel untuk berfungsi secara khusus dalam jalur persinyalan.<sup>31</sup> Mitokondria, retikulum endoplasma menghasilkan anion superoksida dan anion superoksida ini dikatalisis oleh SOD menjadi  $H_2O_2$ . Katalase, GPX, dan reaksi fenton mengubah  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$ .<sup>13</sup>



Gambar 2.4. Homeostatis redoks (redox regulation).  $H_2O_2$  berasal dari hasil reaksi  $O_2^{\cdot -}$  oleh SOD di mitokondria, retikulum endoplasma dan dikatalisis oleh katalase, GPX dan  $Fe^{2+}$  <sup>13</sup>

## 2.4. Stres oksidatif pada CSC payudara

Peningkatan konsentrasi ROS di dalam sel menimbulkan respon seluler terhadap stimulus stres untuk membantu mempertahankan diri terhadap stres oksidatif. Dalam menangkal stres oksidatif tersebut, sel mempunyai respon bermacam-macam sesuai dengan tingkat stres oksidatif., diantaranya melalui aktivasi jalur ketahanan hidup atau aktivasi jalur kematian sel. Konsentrasi ROS yang tinggi dapat menginduksi jalur persinyalan sel yang berperan dalam ketahanan hidup sel seperti jalur MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), jalur NF-kB, dan jalur PI3K (*phosphatidyl inositol 3-kinase*)/Akt.<sup>27</sup> Jalur persinyalan tersebut diantaranya mengatur ekspresi gen-gen yang berperan sebagai anti-oksidan, pro-oksidan, perbaikan DNA, regulator siklus sel, pro-apoptosis, anti-apoptosis dan faktor transkripsi seperti p53.<sup>5</sup> ROS juga menimbulkan respon seluler sebagai faktor transkripsi NF-kB, AP-1, Nrf2, p53, transduksi sinyal dari MAPK, PI3K/Akt, p53 melalui caspase, BCL-2, cyt. C.<sup>13</sup>

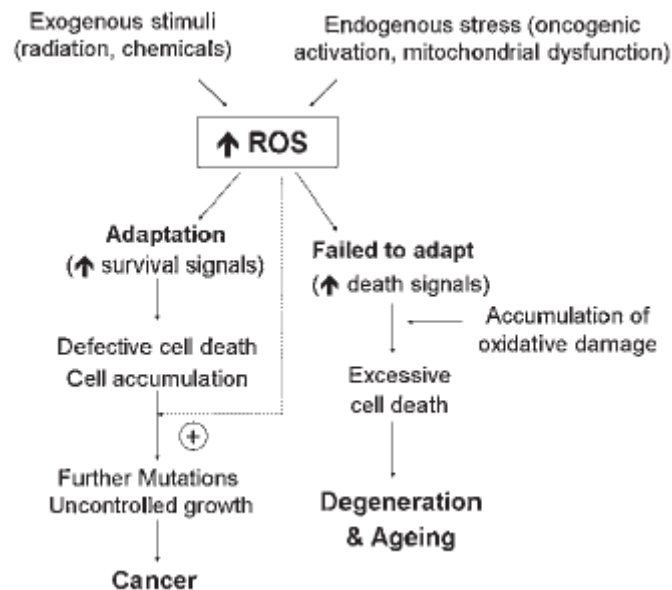


**Gambar 2.5.** Jalur persinyalan ROS pada regulasi *cell survival*. ROS meregulasi transkripsi NF-kB, AP-1, Nrf2, dan p53. ROS meregulasi transduksi sinyal MAPK, PI3K/Akt, dan p53.<sup>13</sup>

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa regulasi jalur persinyalan oleh sistem redoks sebagian besar bergantung pada modifikasi oksidatif langsung sinyal protein sensitif-redoks. Bukti terbaru memberikan pandangan baru tentang peran *novel* pada regulasi redoks dalam remodeling kromatin, yang mempengaruhi sinyal kematian / *survival* pada tingkat transkripsi. Selain itu, modifikasi

*posttranslational protein signaling* seperti fosforilasi baru-baru ini terbukti diatur melalui mekanisme *redox-mediated*.<sup>25</sup>

Stres oksidatif merupakan salah satu mekanisme penting pada sel kanker dan CSC. Pada konsentrasi tinggi, ROS bersifat toksik terhadap sel dan memicu kematian sel (apoptosis atau nekrosis).<sup>28</sup> Tetapi konsentrasi ROS yang rendah mempunyai fungsi fisiologis dalam mengaktifkan atau memodulasi aktivitas faktor transkripsi yang sensitif redoks serta berfungsi dalam regulasi aktivitas enzim mitokondria, sehingga terjadi regulasi pertumbuhan, penuaan dan transformasi sel.<sup>5</sup> Peningkatan konsentrasi ROS karena stimulasi dari dalam dan luar bisa diadaptasi melalui peningkatan sinyal ketahanan hidup, yang membuat sel mati terakumulasi dan menyebabkan mutasi dan pertumbuhan yang tidak terkontrol yang pada akhirnya terjadi kanker. Tetapi adaptasi bisa gagal maka kerusakan oksidatif akan terakumulasi dan menyebabkan degenerasi dan penuaan.<sup>13</sup>



**Gambar 2.6.** Gangguan pada homeostatis redoks (ROS). Gangguan dari stimulasi eksogen dan endogen yang bisa menyebabkan patogenesis penyakit termasuk kanker.<sup>13</sup>

## 2.5. Nuclear Factor-kappa B (NF-kB)

NFkB adalah kompleks protein yang mengontrol proses transkripsi DNA dan berperan mengendalikan sebagian besar proses seluler organisme seperti respon imun dan respon inflamasi, proses perkembangan, pertumbuhan sel dan proses apoptosis. NFkB terlibat dalam respon seluler terhadap berbagai stimuli seperti stress, sitokin, radikal bebas, iradiasi ultraviolet, LDL teroksidasi dan antigen viral atau bacterial. Faktor transkripsi ini juga aktif secara terus menerus dalam beberapa kondisi penyakit seperti kanker, arthritis, inflamasi kronis, asma, penyakit saraf degenerative dan penyakit jantung.<sup>32</sup>

### 2.5.1. Struktur

Faktor transkripsi NF-kB ditemukan pada tahun 1986 sebagai *nuclear factor* yang terikat pada elemen *enhancer* dari *immunoglobulin kappa light-chain of activated B cells*. Total sudah lima anggota keluarga faktor transkripsi yang berhasil diidentifikasi, yaitu NF-kB1, NF-kB2 RelA (p65), RelB, dan c-Rel,. NF-kB1 dan NF-kB2 disintesis sebagai *pro-forms* (p105 dan p100) dan akan mengalami proses proteolitik menjadi p50 dan p52. Kelima anggota protein ini mempunyai *Rel homology domain* (RHD) yang penting untuk dimerisasi serta mengikat elemen DNA yang sama. Pada hampir seluruh sel yang diam dimer-dimer ini terikat pada molekul *inhibitory IκB* (inhibitor NF-kB).<sup>30</sup>



**Gambar 2.7. A. Anggota-anggota NF-κB B. Anggota-anggota inhibitor NF-κB. C. Anggota-anggota IKK kompleks.**<sup>30</sup>

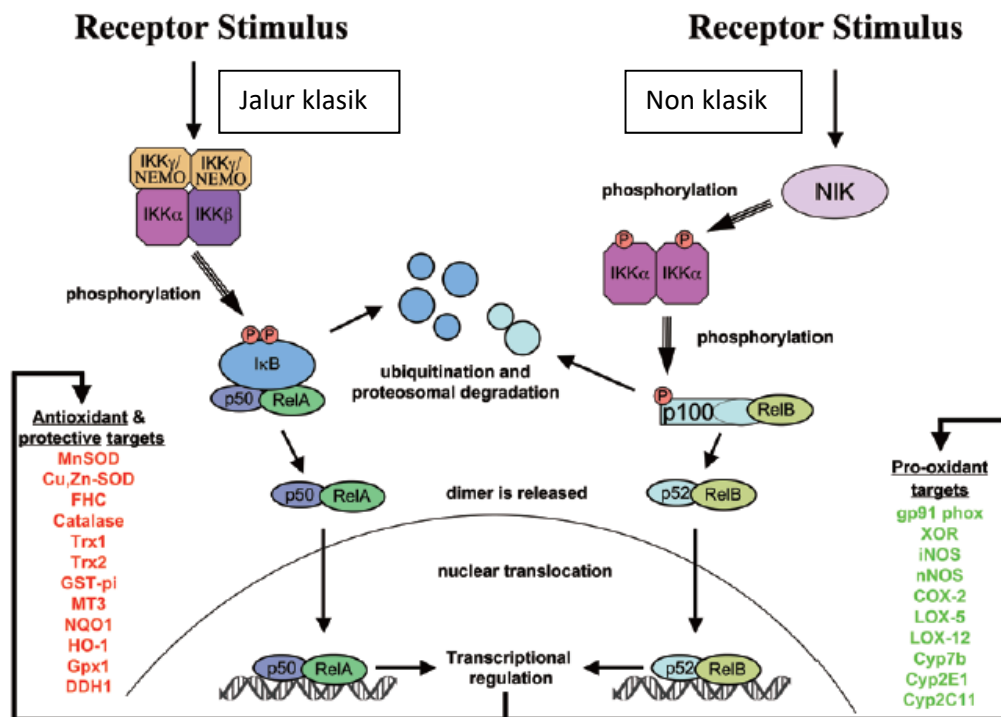
### 2.5.2. Jalur persinyalan

NF-κB termasuk dalam kategori faktor transkripsi primer yang “*rapid acting*”, yaitu faktor transkripsi yang terdapat pada sel-sel dalam keadaan tidak aktif dan tidak memerlukan sintesis protein baru untuk diaktifkan. Hal ini memungkinkan NF-κB bertindak yang pertama merespon rangsangan seluler berbahaya. Stimulasi dari berbagai reseptor permukaan sel seperti RANK, TNFR, secara langsung mengaktifkan NF-κB dan membuat perubahan cepat dalam ekspresi gen. berbagai produk bakteri juga dapat mengaktifkan NF-κB.<sup>30</sup>

Dua jalur persinyalan utama yang mengaktifasi gen NF-κB adalah jalur *canonical* (atau klasik) dan jalur *noncanonical* (atau alternatif). Sub unit utama

yang berperan pada jalur klasik adalah Rel-A yang dapat membentuk dimer dengan p50 maupun p52. Jalur ini diaktivasi sangat cepat dan merupakan respon akut dari berbagai sinyal reseptor proinflamasi, seperti lipopolisakarida (LPS), *TNF Receptor superfamily*, *the Toll-Like receptor family* (TLRs) dan reseptor sitokin (Interleukin). Sinyal reseptor tersebut mengaktifasi IKK yang terdiri atas IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  dan NEMO yang akan memfosforilasi I $\kappa$ B sehingga NF $\kappa$ B akan terlepas dari ikatannya dengan I $\kappa$ B. IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  sendiri akan diaktivasi akibat fosforilasi dan ubiquitinasi dari NEMO yang mengikat dimer IKK tersebut.

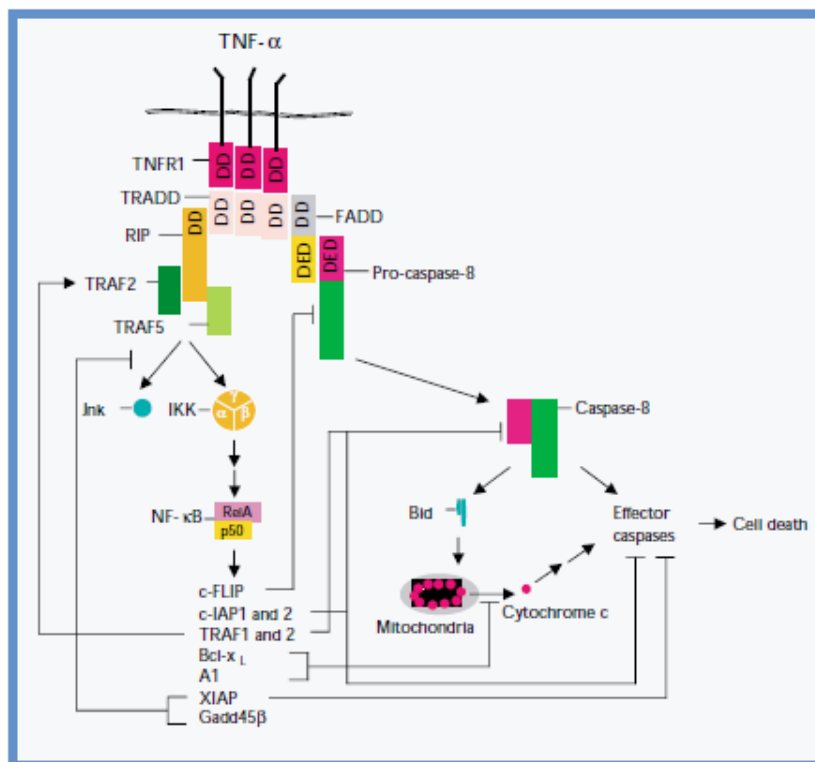
Jalur alternatif melibatkan peran utama dari Rel-B dan p52. Jalur ini diaktivasi oleh beberapa stimuli oleh subfamily TNF-reseptor seperti reseptor limfotoksin, *B cell-activating factor* (BAFF) dan ligand CD40. Aktivasi jalur ini memerlukan waktu yang lama karena p52 tersedia dalam bentuk prekursornya (p100) sehingga diperlukan proses transformasi p100 menjadi p52. Aktivasi jalur ini hanya melibatkan peran IKK $\alpha$  saja yang sebelumnya diaktivasi oleh NIK.<sup>32</sup>



Gambar 2.8. Jalur klasik dan non klasik NF- $\kappa$ B yang meregulasi transkripsi antioksidan dan prooksidan.<sup>13</sup>



Pada kondisi normal NF- $\kappa$ B menghasilkan sinyal pro-survival dengan memodulasi gen anti-apoptotic, dimana produknya dapat menghambat apoptosis, seperti inhibitor of apoptosis-1 dan -2 (IAP-1 dan IAP-2), X chromosome-linked IAP (XIAP), dan the cellular Fas-associated death domain-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme (FLICE)-like inhibitory protein (c-FLIP). Cellular IAPs (C-IAPs) langsung berikatan dan menghambat effector caspases, seperti caspase-3 dan caspase-7, dan berakibat pada pencegahan aktivasi pro-caspase-6 dan pro-caspase-9. Induksi c-IAP1 dan c-IAP2 oleh NF- $\kappa$ B melalui TRAF1 dan TRAF2 dapat menghambat caspase-8. XIAP/hILP menghambat caspase-3 dan caspase-7 dan mencegah aktivasi pro-caspase-9. Inhibitor apoptosis lain yang diregulasi NF- $\kappa$ B adalah c-FLIP. c-FLIP mengandung dua death effector domains (DEDs) dan sebuah catalytically inactive caspase-like-domain yang dapat berinteraksi dengan FADD dan pro-caspase-8. c-FLIP menghambat apoptosis dengan bergabung dengan aktivasi pro-caspase-8.<sup>32</sup>



Gambar 2.9. NF- $\kappa$ B menginduksi protein anti-apoptosis yang mencegah apoptosis oleh TNF- $\alpha$ .<sup>32</sup>

### 2.5.3. NFkB melindungi sel dari ROS

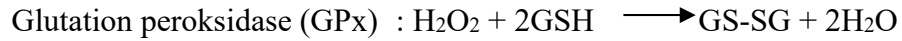
Pada tingkat tertentu ROS toksik di dalam sel, ROS menyebabkan stres oksidatif dan bereaksi dengan protein, lipid, dan asam nukleat. Respon seluler terhadap produksi ROS adalah mencegah kerusakan oksidatif lebih lanjut, dan untuk mempertahankan kelangsungan hidup sel. Namun, jika kerusakan seluler terjadi terlalu banyak, itu bisa menjadi keuntungan dari organisme multiseluler untuk membunuh sel untuk kepentingan sekitar sel. Oleh karena itu, spesies oksigen reaktif dapat memicu baik apoptosis dan kematian sel nekrotik tergantung pada tingkat keparahan stres oksidatif. Meskipun ada beberapa pengecualian di mana NF-kB berkontribusi pada kematian sel, dalam banyak kasus ekspresi target gen NF-kB biasanya mempromosikan kelangsungan hidup sel. Oleh karena itu tidak mengherankan bahwa ROS akan memodulasi respon NF-kB dan bahwa target gen NF-kB akan mengurangi ROS untuk mempromosikan kelangsungan hidup. Salah satu sinyal utama jalur yang bersinggungan dengan NF-kB berkaitan dengan ROS dan kematian sel adalah *crosstalk* yang terjadi antara NF-kB dan JNK. *Crosstalk* dari NF-kB untuk JNK diketahui mencegah aktivasi JNK berkelanjutan dan dengan demikian mencegah kematian sel melalui baik apoptosis dan nekrosis.<sup>13</sup>

### 2.5.4. Antioksidan sebagai target NF-kB.

Salah satu cara yang paling penting untuk mengetahui apakah aktivitas NF-kB mempengaruhi tingkat ROS adalah melalui peningkatan ekspresi protein antioksidan. Di sini akan dibahas beberapa target NF-kB yang mungkin berkontribusi terhadap perlindungan dari ROS.

#### 2.5.4.1. Mangan Superoxide Dismutase (MnSOD)

Banyak penelitian yang telah dilakukan mengenai MnSOD. MnSOD merupakan enzim mitokondria yang melindungi sel-sel dari stres oksidatif dengan mengkonversi anion superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ) menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Hidrogen peroksida selanjutnya didetoksifikasi menjadi air oleh enzim katalase dan glutathion peroksidase. Enzim ini tergolong metaloprotein, mengandung ion logam (Fe, Ni, Cu, Zn, dan Mn) pada situs aktifnya.



Pada sel eukariotik, SOD terdiri atas tiga isoform yaitu SOD1 (Cu/ZnSOD), SOD2 (MnSOD) dan SOD3 (extracellular SOD/EC-SOD). SOD1 terdapat pada sitoplasma sel dengan aktivitas paling tinggi yaitu sekitar 70-80% dari keseluruhan aktivitas SOD di dalam sel. SOD2 atau MnSOD terdapat di mitokondria dengan aktivitas 10%. SOD3 terdapat di dalam cairan ekstraseluler. MnSOD merupakan enzim antioksidan utama dalam menangkal toksisitas radikal superoksida.<sup>13</sup>

#### **2.5.4.2.Katalase**

Katalase (EC 1.11.1.6) merupakan enzim mengandung haem yang mampu menguraikan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> melalui dua mekanisme. Katalase hanya terdapat pada organel peroksisom dan berperan dalam mengeliminasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang diproduksi oleh oksidasi asam lemak rantai panjang. Katalase tidak terdapat pada sitoplasma sel mamalia dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tidak berdifusi ke dalam peroksisom, sehingga enzim glutathion peroksidase yang dapat menetralkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang terdapat pada sitoplasma. Hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) merupakan metabolit normal yang ada di sel. Meski demikian, sel berupaya menyingkirkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karena sifatnya yang merusak dengan mengoksidasi komponen seluler. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> memiliki posisi yang penting terkait karakteristik redoks, potensial difusi dan kemampuannya membentuk radikal bebas yang sangat reaktif. Stres oksidatif ditandai dengan peningkatan spesies oksidan yang menghasilkan berbagai kerusakan pada berbagai tingkatan. Enzim antioksidan SOD dan katalase merupakan salah satu bagian sistem antioksidan yang mempertahankan produk primer reduksi parsial oksigen berada dalam konsentrasi rendah.<sup>13</sup>

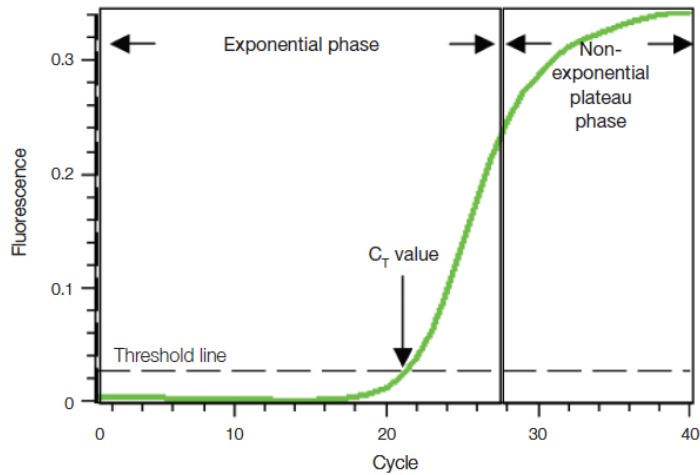
#### **2.5.4.3.Glutathion peroksidase**

GSH (glutation) peroksidase mencegah peroksidasi lipid dengan menggunakan hidrogen peroksida untuk merubah glutation menjadi glutation teroksidasi (GS-SG). Glutation peroksidase mereduksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan menggunakan sifat reduksi glutation (GSH). Gugus *cysteine sulphhydryls* pada GSH diperlukan untuk aktivitas glutation peroksidase untuk mereduksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. GSH S-transferase melakukan pemindahan residu glutation menjadi metabolit elektrofilik reaktif dari *xenobiotic*. Produksi glutation teroksidasi (GSSG) direduksi secara cepat oleh reaksi yang menggunakan NADPH yang dihasilkan dari berbagai sistem intraseluler.<sup>13</sup>

## 2.5. *Real Time PCR*

*Real Time PCR* (qPCR) adalah suatu metoda analisa yang dikembangkan dari reaksi PCR. Dalam ilmu biologi molekular, *Real Time PCR* (juga dikenal sebagai *quantitative real time polymerase chain reaction* (Q-PCR/qPCR) atau *kinetic polymerase chain reaction*), adalah suatu teknik pengerjaan PCR di laboratorium untuk mengamplifikasi (memperbanyak) sekaligus menghitung (kuantifikasi) jumlah target molekul DNA hasil amplifikasi tersebut. *Real Time PCR* memungkinkan dilakukannya deteksi dan kuantifikasi (sebagai nilai absolut dari hasil perbanyakan DNA atau jumlah relatif setelah dinormalisasi terhadap input DNA atau gen-gen normal yang ditambahkan) sekaligus terhadap sekuens spesifik dari sampel DNA yang dianalisa. *Real Time PCR* (qPCR) atau dapat pula disebut kuantitatif PCR real time (qPCR).

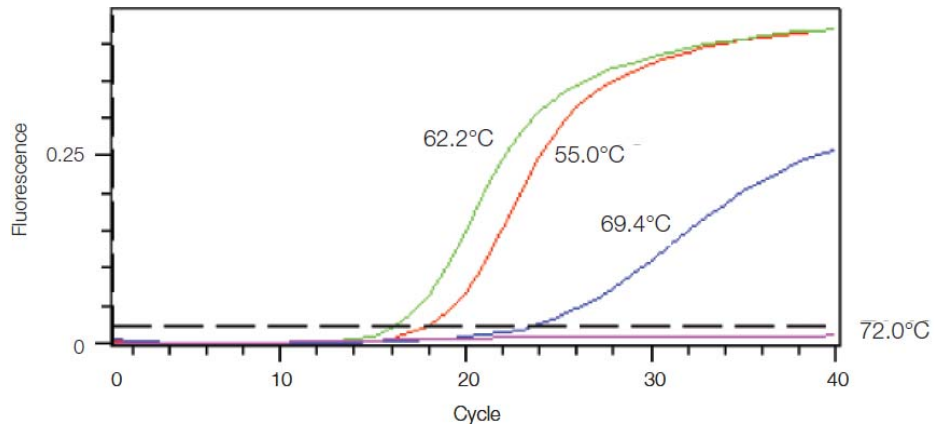
Perbedaan antara teknik PCR konvensional dengan *real-time PCR* adalah hasil amplifikasi pada *real-time PCR* bisa langsung dideteksi dan diukur pada saat reaksi amplifikasi masih berjalan, sedangkan pada PCR konvensional hasil amplifikasi dideteksi dengan melakukan running DNA pada suatu gel agarosa setelah reaksi amplifikasinya selesai. Hasil *real-time PCR* dapat bersifat kualitatif (ada atau tidak adanya sekuens yang teramplifikasi) maupun kuantitatif (jumlah DNA salinan/*copy DNA*). Sedangkan PCR konvensional merupakan teknik PCR yang bersifat semi-kuantitatif.



**Gambar 2.10. Plot Amplifikasi.**<sup>33</sup>

Pada plot di atas, fluoresensi dari reaksi amplifikasi ditunjukkan oleh sumbu y, sedangkan jumlah siklus PCR ditunjukkan oleh sumbu x, dan. Plot amplifikasi menunjukkan dua fase, yaitu fase eksponensial yang kemudian diikuti oleh fase *plateau* yang noneksponensial. Selama fase eksponensial, jumlah produk PCR kurang lebih menjadi dua kali lipat di setiap siklusnya. Memasuki fase *plateau* (siklus ke-28 sampai ke-40) reaksi kemudian melambat. Jumlah siklus pada saat fluoresensi disebut siklus treshold, atau  $C_T$ . Selama nilai  $C_T$  terukur pada fase eksponensial dengan reagen yang cukup, maka *real-time* qPCR dapat digunakan untuk menghitung jumlah *template* yang terdapat dalam reaksi secara akurat. Produk hasil amplifikasi yang cukup diperlukan untuk menghasilkan sinyal fluoresensi yang dapat terukur.

Temperatur *annealing* yang optimum, dapat diperoleh melalui pengujian nilai  $C_T$  beberapa temperatur *annealing* dengan range di atas dan di bawah  $T_m$  primer yang sudah diketahui dari hasil desain primer. Percobaan optimasi temperatur *annealing* dapat dilihat pada gambar berikut :



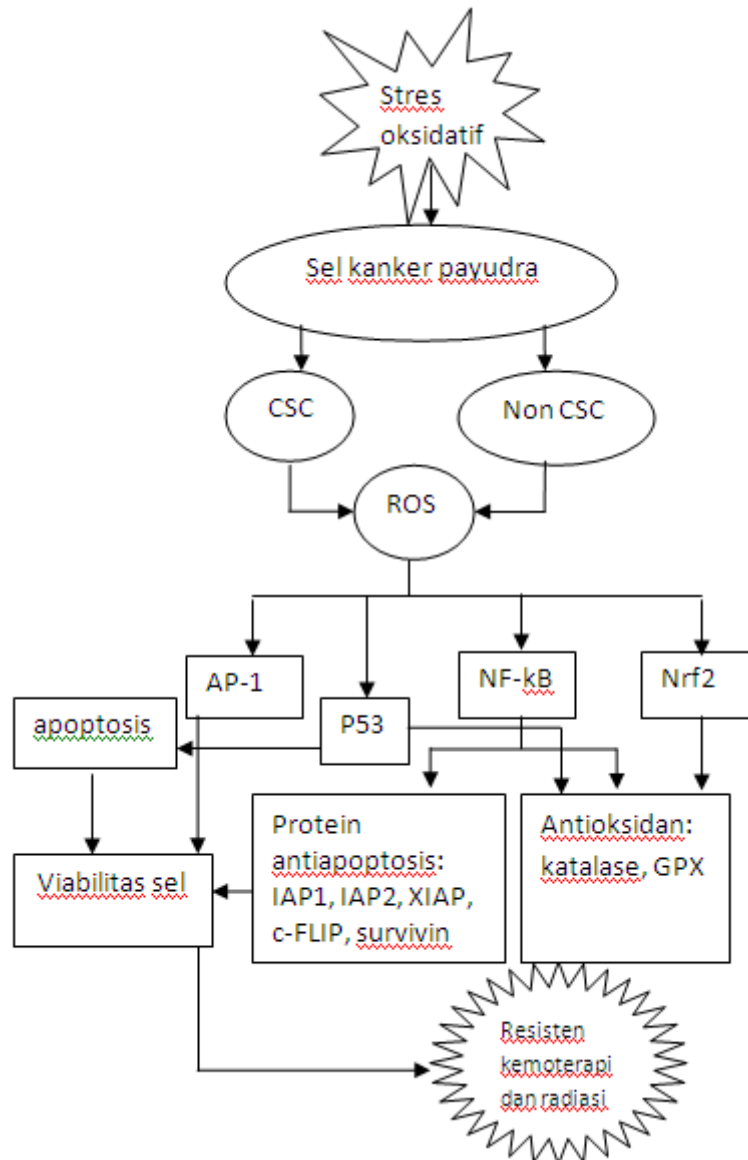
**Gambar. 2.11. Optimasi temperatur *annealing*. Gradien temperatur *annealing* 55°C - 72°C. reaksi PCR pada suhu 62.2°C menunjukkan nilai  $C_T$  terendah dan dipilih sebagai temperatur optimum.<sup>33</sup>**

Ada dua nilai yang didapat dari *real time RT-PCR*, yakni nilai absolut dan nilai relatif. Nilai absolut diperoleh dengan membandingkan nilai  $C_T$  sampel uji terhadap kurva standar. Nilai relatif, diperoleh melalui penentuan konsentrasi ekspresi gen yang dilakukan dengan membandingkan nilai ekspresi gen sampel terhadap ekspresi gen referensi yang berupa *housekeeping genes*. Gen referensi adalah gen yang memiliki konsentrasi ekspresi yang konstan pada semua sampel uji dan ekspresinya tidak dipengaruhi oleh perlakuan eksperimen selama penelitian.

Saat membandingkan sampel yang banyak menggunakan perhitungan relatif, biasanya salah satu sampel dipilih sebagai kalibrator, dan ekspresi gen target pada semua sampel yang lain diekspresikan sebagai ekspresi yang relatif meningkat atau menurun terhadap kalibrator. Sampel yang tidak mendapat perlakuan dipilih sebagai kalibrator.

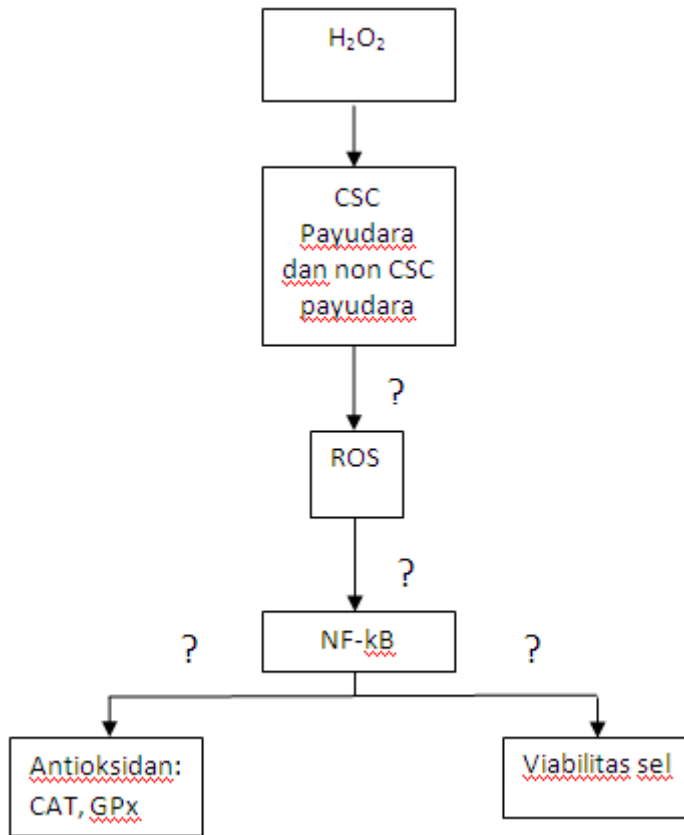
Setelah nilai  $C_T$  diukur, ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi ekspresi gen target pada sampel uji, relatif terhadap sampel kalibrator, diantaranya: 1) metode Livak, juga dikenal sebagai metode 2-DDCT; 2) metode DCT, dan 3) metode Pfaffl.<sup>34</sup>

## 2.6. Kerangka teori



Gambar 2.12. Kerangka teori.

## 2.7. Kerangka konsep



Gambar 2.13. Kerangka konsep.



## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1. Desain penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental *in vitro*.

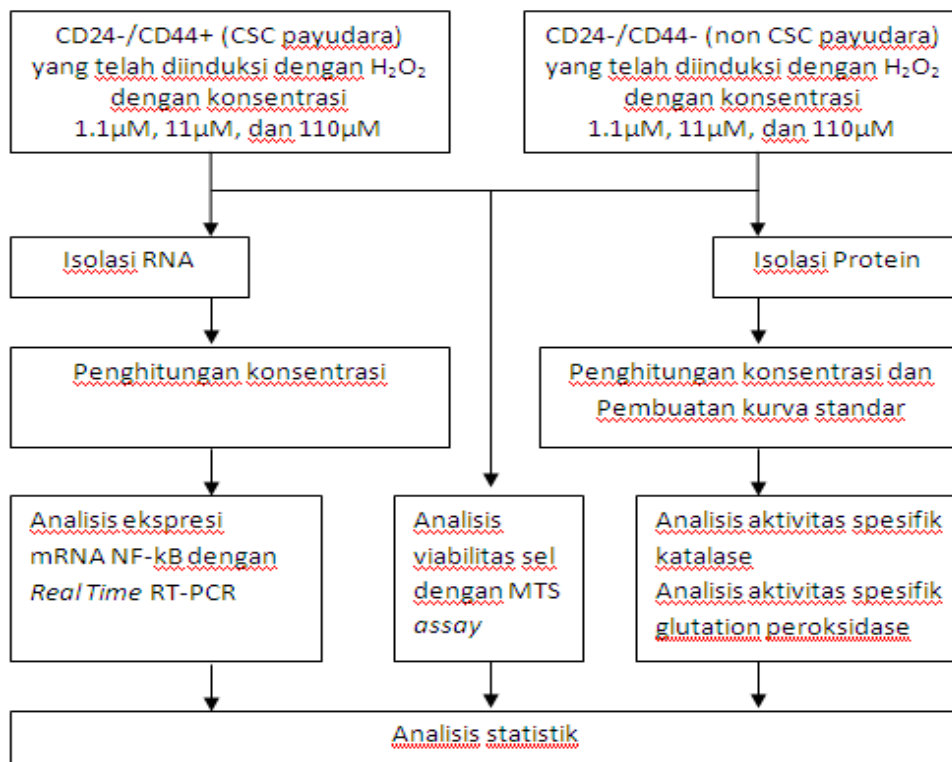
### 3.2. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Januari 2013-Desember 2014.

### 3.3. Sampel penelitian

CSC payudara (CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>) dan non CSC payudara (CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>-</sup>) yang telah dikultur dan telah diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan molaritas 0.11 μM, 1.1 μM, dan 11 μM oleh Aulia. Penelitian ini adalah bagian penelitian besar dari penelitian Aulia tahun 2012.

### 3.4. Alur penelitian



Gambar 3.1. Alur penelitian

### 3.5. Bahan dan alat penelitian

#### 3.5.1. Bahan penelitian

- Reagensia untuk isolasi RNA total dan protein total : *Tripure Isolation Kit*®
- *Aquadest*, *Aquabidest*, Kloroform, Isopropanol, Etanol 75%, Etanol 100%, 0.1M sodium sitrat, 0.3M Guanidine HCl dalam etanol 95%, *Diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated-RNase-free water*, SDS 1%, , *Phenylmethylsulfonyl fluoride (Pmsf)* 1M – inhibitor serin protease
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Phosphate Buffer Saline (PBS)* 0,1 M dengan pH 7, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, *Bovine Serum Albumin (BSA)*
- *One-Step RT-PCR Kit with SYBR KAPA* (KAPA BIOSYSTEMS, Universal, Boston-USA).
- Primer untuk gen NF-kB *Forward* and *Reverse* (PT. Genetika Science, Indonesia)
- Primer untuk gen 18 sRNA *Forward* and *Reverse* (PT. Genetika Science, Indonesia)
- Reagensia untuk pemeriksaan GPX : RANSEL® dari Randox Laboratories Limited
- Kit MTS *assay* Promega®
- Medium kultur (DMEM) plain
- *96 well multiplate*

#### 3.5.2. Alat penelitian

- Timbangan digital (Sartorius)
- *Ultra low temperature freezer -80<sup>0</sup>C* (MDF-U3286S, Sanyo)
- *Quantitative Real-Time RT-PCR*, BioRad CFX Manager 3.0, Laboratories-USA
- Spektrofotometer Thermoscientific
- Sentrifus, vortex, *water bath*
- Varioskan Flash®, *multiplate reader* BioRad®
- Tabung *real time* RT-PCR, tabung mikro
- Pipet mikro dan tips berbagai ukuran

### 3.6. Cara kerja

#### 3.6.1. Isolasi RNA total dengan *Tripure Isolation Kit*®

Sejumlah 100.000 sel kanker payudara yang telah disortir CD24-/CD44- dan CD24-/CD44+ baik dengan atau tanpa perlakuan, disentrifugasi dengan kecepatan 1000rpm selama 10 menit untuk mendapatkan pelet sel. Pelet sel kemudian ditambahkan dengan reagen Tripure 500 µl, dan dipipet berulang kali sampai homogen untuk melisiskan sel. Sampel homogenate kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu 15-25<sup>0</sup>C untuk memastikan disosiasi sempurna kompleks nukleoprotein. Homogenat ditambah 0.2 mL kloroform (CHCl<sub>3</sub>) dan dikocok kuat selama 15 detik, lalu diinkubasi selama 2-15 menit pada suhu 15-25<sup>0</sup>C. Setelah diinkubasi, homogenat disentrifus dengan kecepatan 12,000 g pada suhu 2-8<sup>0</sup>C selama 15 menit. Hasilnya terbentuk cairan 3 fase: fase air tidak berwarna di bagian atas mengandung RNA, interfase dan fase organik berwarna merah di bagian bawah mengandung DNA dan protein.

Fase air tidak berwarna dari tahap di atas dipindahkan secara hati-hati ke dalam tabung mikro baru. Interfase dan fase organik disimpan pada suhu 4<sup>0</sup>C. Sebanyak 0,5 isopropanol ditambahkan ke dalam fase air tidak berwarna, lalu ditutup dan dibalik-balik 15 kali. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 25<sup>0</sup>C selama 10 menit untuk mengendapkan RNA. Selanjutnya, tabung mikro disentrifus dengan kecepatan 12,000 g pada suhu 2<sup>0</sup>C selama 10 menit, kemudian supernatan dibuang.

Endapan dicuci dengan 1 mL etanol 75% dengan cara divorteks, kemudian disentrifus dengan kecepatan 7,500 g pada suhu 2<sup>0</sup>C selama 5 menit dan supernatan dibuang. Selanjutnya endapan dibiarkan setengah kering kemudian diresuspensi dalam 50 µL air bebas nuklease yang mengandung DEPC (*DEPC-treated RNase-free water*). Endapan dilarutkan dengan cara memipet beberapa kali kemudian diinkubasi pada suhu 55-60<sup>0</sup>C selama 15 menit.

#### 3.6.2. Penghitungan konsentrasi RNA total

Suspensi 50µL dari hasil ekstraksi RNA di-*aliquot* ke dalam *tube* yang lain, masing-masing sejumlah 10 µL, 20 µL dan 20 µL. Setiap sampel diukur dengan alat *Varioskan Flash*® sebanyak 2µl.

### **3.6.3 Isolasi protein total dengan *Tripure Isolation Kit*®**

Bagian interfase dan fase organik dikeluarkan dari suhu 2-8°C. kedua fase tersebut kemudian ditambahkan dengan 0.15 ml etanol 100% untuk mengendapkan DNA. Tutup tabung, balikkan beberapa kali untuk mencampur, dan inkubasi selama 2-3 menit pada suhu 15-25°C untuk mempresipitasi DNA. Setelah diinkubasi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2000xg selama 5 menit pada suhu 2-8°C. Supernatan yang mengandung fenol, etanol dan protein dipindahkan ke tabung baru untuk isolasi protein. yang merupakan endapan DNA disimpan pada suhu 2-8°C setelah dicuci 3 kali dengan 0.5ml 0.1M sodium sitrat.

Tabung baru yang berisi fenol, etanol dan protein ditambahkan 0.75ml isopropanol untuk mempresipitasikan protein, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 15-25°C. sampel lalu disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 12000xg pada suhu 2-8°C. yang terbentuk merupakan presipitat protein. Cuci presipitat protein dengan meresuspensi protein dengan 0.5 ml 0.3M guanidine HCl dalam etanol 95% dan tambahkan 1µl 1M pmsf untuk menghambat protein antiprotease. Kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 15-25°C. Lalu disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 7500xg pada suhu 2-8°C dan supernatant dibuang. Untuk kemurnian presipitat protein pencucian diulang 2 kali.

Setelah pencucian, presipitat protein kemudian ditambahkan dengan 1 ml etanol 100%, lalu diinkubasi selama 20 menit pada suhu 15-25°C dan disentrifugasi pada kecepatan 7500xg selama 5 menit pada suhu 2-8°C. Supernatan dibuang dan kelebihan etanol dibiarkan mengering dengan membalikkan tabung di atas kertas saring selama 5-10 menit. Selanjutnya, protein dilarutkan kembali dengan menambahkan 300µl SDS 1% dengan memipet beberapa kali dan diinkubasi 50°C untuk melarutkan dengan sempurna yang disertai vortex. Setelah larut kembali, kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan 10.000xg selama 10 menit pada suhu 2-8°C. Supernatan yang mengandung protein dituang ke tabung baru. Sampel protein disimpan pada suhu -20°C.

### **3.6.4. Penghitungan konsentrasi protein total**

Konsentrasi protein total diperiksa dengan metode Warburg-Christian berdasarkan kurva standar protein menggunakan larutan standar albumin serum (bovin serum albumin/BSA). Serapan sampel dibandingkan dengan serapan standar albumin serum sapi (BSA) dengan konsentrasi 0,2; 0,5; 0,7; 0,8; 0,9; 1 mg/mL. Setiap sampel diukur dengan alat *Varioskan Flash*® sebanyak 2µl baik itu larutan standar maupun sampel.

### **3.6.5. Pengukuran aktivitas spesifik katalase**

Pengukuran aktivitas katalase dilakukan menurut metode Mates et al. (1999) yang dioptimasi kembali sehingga pengukuran optimal pada setiap langkah harus ditentukan terlebih dahulu. Prinsip pengukuran adalah absorbansi reduksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Panjang gelombang maksimal didapat dari optimasi yang dilakukan di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler yaitu panjang gelombang 210 nm. Kemudian setelah didapat panjang gelombang optimal lalu ditentukan pengenceran sampel yang optimal. yaitu dengan mengukur absorbansi sampel yang telah diencerkan pada berbagai pengenceran (10 kali, 20 kali, 50 kali, 100 kali, dan 200 kali) Penentuan absorbansi pengenceran H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang optimal dilakukan dengan berbagai pengenceran (1000 kali, 2000 kali, 4000 kali, 8000 kali, dan 16000 kali.) Setelah hasil optimasi didapat dilakukan pengukuran aktivitas katalase dengan mengukur 50µl sampel yang telah diencerkan (sesuai hasil optimasi) ditambah 950µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang telah diencerkan juga (sesuai hasil optimasi) pada panjang gelombang 210 nm dan dicatat setiap 30 detik selama 2 menit 30 detik.

### **3.6.6. Pengukuran aktivitas spesifik glutathion peroksidase**

Pengukuran aktivitas glutathion peroksidase dilakukan dengan menggunakan RANSEL® kit dari RANDOX. Prinsip pengukuran adalah absorbansi reduksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sampel sebanyak 10µl ditambahkan Reagen (glutathion, glutathion reduktase, dan NADPH) yang telah dilarutkan dengan *buffer* (*Phosphate buffer* dan EDTA) sebanyak 500µl ditambahkan dengan *Cumene Hydroperoxide* sebanyak 20µl. kemudian dibaca pada panjang gelombang 340nm dan dicatat pada menit pertama dan ketiga.

### **3.6.7. Analisis ekspresi mRNA NF-κB dengan *Real Time* RT-PCR**

Primer 18s rRNA yang digunakan yaitu 5'-AAC GGC TAC CAC ATC CAA G -3' untuk *forward* dan 5'-CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA -3' untuk *reverse* (desain dan optimasi oleh Hardiany dkk). Primer NF-kB yang digunakan yaitu 5'-CGC TTA GGA GGG AGA GCC CA -3' untuk *forward* dan 5'-TGG GCC ATC TGT TGG CAG TG -3' untuk *reverse* (desain dan optimasi oleh Arleni)

Analisis tingkat ekspresi NF-kB, digunakan sampel hasil sortir yaitu sel kanker payudara CD24-/CD44+ dan CD24-/CD44-. RNA total yang telah diisolasi dengan *Tripure Isolation Kit® (Roche)* kemudian dilakukan amplifikasi cDNA menggunakan alat *Real Time PCR (CFX Manager 3.0, BioRad)*. Protokol reaksi dengan *One-Step RT-PCR Kit with KAPA SYBR FAST* untuk gen NF-kB adalah sintesis cDNA selama 5 menit pada suhu 42<sup>0</sup>C, inaktivasi enzim *reverse transcriptase* selama 5 menit pada suhu 95<sup>0</sup>C, denaturasi selama 3 detik pada suhu 95<sup>0</sup>C. Terakhir siklus PCR dan deteksi (40 siklus) selama 10 detik pada suhu 95<sup>0</sup>C; 30 detik pada suhu 61.3<sup>0</sup>C; dan 30 detik pada suhu 72<sup>0</sup>C. Analisis *melt curve* selama 1 menit pada suhu 95<sup>0</sup>C, 1 menit pada suhu 55<sup>0</sup>C, 5 detik pada suhu 55<sup>0</sup>C (80 siklus, naik 0,5<sup>0</sup>C per siklus). Protokol reaksi dengan *One-Step RT-PCR Kit with KAPA SYBR FAST* untuk gen 18S rRNA adalah sintesis cDNA selama 5 menit pada suhu 42<sup>0</sup>C, inaktivasi enzim *reverse transcriptase* selama 5 menit pada suhu 95<sup>0</sup>C, denaturasi selama 3 detik pada suhu 95<sup>0</sup>C. Terakhir siklus PCR dan deteksi (40 siklus) selama 10 detik pada suhu 95<sup>0</sup>C; 30 detik pada suhu 58<sup>0</sup>C; dan 30 detik pada suhu 72<sup>0</sup>C. Analisis *melt curve* selama 1 menit pada suhu 95<sup>0</sup>C, 1 menit pada suhu 55<sup>0</sup>C, 5 detik pada suhu 55<sup>0</sup>C (80 siklus, naik 0,5<sup>0</sup>C per siklus).

1	42.0	C for 5:00
2	95.0	C for 5:00
3	95.0	C for 0:10
4	61.3	C for 0:30
5	72.0	C for 0:30
		+ Plate Read
6	GOTO 3	, 39 more times
7	95.0	C for 1:00
8	55.0	C for 1:00
9	Melt Curve 55.0	to 95.0 C, increment 0.5 C, for 0:10 + Plate Read
10	20.0	C for 10:00
		END

**Gambar 3.2. Protokol reaksi *Real Time* RT-PCR**

Jumlah salinan cDNA yang merupakan hasil amplifikasi dapat ditentukan dengan *Real Time* RT-PCR dan hasil amplifikasi tersebut menggambarkan tingkat ekspresi gen NF-kB secara kuantitatif. Gen 18S rRNA sebagai gen referensi diperlakukan dengan kondisi yang sama seperti gen NF-kB. Sebagai kontrol negatif (*NTC: non template control*) digunakan aquabides (*nuclease free water*) sebagai pengganti RNA untuk menyingkirkan hasil positif palsu akibat kontaminasi.

Gen referensi 18S rRNA digunakan sebagai *normalize*, untuk menganalisis ekspresi mRNA NF-kB. Setelah pengukuran nilai CT, tingkat ekspresi gen NF-kB dalam sampel tes (sel dengan atau tanpa perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) relatif terhadap sampel kalibrator (sel kontrol tanpa perlakuan) dapat ditentukan. *Relative quantification* atau konsentrasi relatif mRNA dapat ditentukan dengan metode Livak (Lampiran 1). Normalisasi nilai  $\Delta$ Ct sampel tes CSC payudara (CD24-/CD44+) atau non-CSC payudara (CD24-/CD44-) yang diberi perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> terhadap  $\Delta$ Ct sel yang tidak diberi perlakuan.

Hasil perhitungan dengan metode Livak yaitu rasio relatif ekspresi gen NF-kB pada sampel CD24-/CD44+ dan CD24-/CD44- yang dinormalisasi terhadap sel yang tidak diberi perlakuan.

### **3.6.8. Analisis viabilitas sel dengan MTS Assay Promega®**

Penentuan viabilitas sel kanker payudara CD24-/CD44- dan CD24-/CD44+ dilakukan dengan menggunakan kit MTS *assay* Promega®. Viabilitas sel diukur untuk melihat perbandingan antara sebelum perlakuan dengan sesudah perlakuan dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. MTS *assay* Promega® merupakan metode kolometrik non-radioaktif untuk menentukan jumlah viabilitas atau proliferasi sel. Kit tersebut terdiri atas larutan MTS [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt*] dan PMS (*phenazine methosulfate*) yang merupakan reagen *electron coupling*.

MTS assay bergantung pada reaksi bioreduksi garam tetrazolium oleh mitokondria sel menjadi produk formazan di dalam medium kultur sel hidup. Jika MTS ditambahkan ke dalam kultur sel yang sudah ditambahkan PMS (MTS : PMS = 20 : 1), lalu diinkubasi 1 jam pada kondisi 37°C, CO<sub>2</sub> 5% dan gelap, maka MTS akan direduksi oleh enzim dehydrogenase menjadi produk formazan yang larut

dalam medium kultur. Enzim dehydrogenase hanya terdapat pada sel hidup dengan aktivitas metabolic yang tinggi. Produk formazan, yang merupakan indikasi proses reduksi MTS, berwarna ungu dan absorbansinya dapat diukur pada  $\lambda$  490 nm dengan alat *multiplate reader*. Jumlah produk formazan yang terukur melalui absorbansi  $\lambda$  490 nm sebanding dengan jumlah sel hidup dalam kultur.

Sel hasil sortir, CD24-/CD44+ dan CD24-/CD44-, sejumlah  $10^5$  sel ditanam pada plate 96 well. Sel diadaptasikan 48-72 jam agar sel menempel pada plate kultur. Sebelum memulai assay MTS, sel dapat diberi perlakuan terlebih dahulu (pemberian  $H_2O_2$ ). Campuran MTS dan PMS dibuat dengan perbandingan 20:1 (untuk 1 well dengan medium lain 100  $\mu$ l maka diperlukan 20  $\mu$ l larutan MTS dan 1  $\mu$ l larutan PMS). Medium kultur sel pada plate 96 well dibuang dan cuci sel dengan PBS 1x steril. 20  $\mu$ l campuran MTS/PMS yang telah dilarutkan dengan 100  $\mu$ l medium plain (untuk 1 well) kemudian dimasukkan ke dalam well dan masukkan plate ke dalam inkubator 37°C, gelap selama 1 jam. Perubahan warna dimonitor setiap 30 menit, apabila perubahan warna sudah terlihat jelas dan signifikan, maka pengukuran dapat dilakukan dengan alat *multiplate reader* BioRad® dengan panjang gelombang 490 nm.

### **3.6.9. Analisis statistik**

Data dari fraksi CSC payudara manusia (CD24-/CD44+) dibandingkan dengan non-CSC payudara (CD24-/CD44-) yang masing-masing kelompok diberi dengan  $H_2O_2$  pada berbagai konsentrasi. Perbedaan antara kedua kelompok tersebut dianalisis secara statistik dengan *Anova* (bila berdistribusi normal), bila tidak berdistribusi normal dilakukan uji nonparametrik. Hubungan antara ekspresi mRNA NF-kB dengan aktivitas spesifik katalase, ekspresi mRNA NF-kB dengan aktivitas spesifik glutathion peroksidase, ekspresi mRNA NF-kB dengan viabilitas sel dianalisis secara statistik dengan uji korelasi *Pearson*. Analisis dilakukan pada tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha=0.05$ ).



## BAB IV HASIL PENELITIAN

### 4.1. Analisis aktivitas spesifik katalase

#### 4.1.1. Optimasi kinetik katalase

Sebelum dilakukan pengukuran aktivitas spesifik katalase, diperlukan optimasi waktu. Optimasi dilakukan pada detik ke 30 ( $t_0$ ) sampai menit ke 9:30 ( $t_9$ ) dengan interval satu menit. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 4.1 di bawah ini. Hasilnya menunjukkan menit 00.30 sampai 01.30 ( $t_1$ ) merupakan waktu dengan kinetik terbesar.

**Tabel 4.1. Penguraian  $H_2O_2$  oleh blanko dan sampel tiap satuan waktu**

Waktu	Rata-rata Blanko	Rata-rata Sampel	Delta Abs (B) $t_0-t_n$	Delta Abs (S) $t_0-t_n$	$\Delta S-\Delta B$	Kecepatan reaksi per satuan waktu ( $\Delta S-\Delta B/t_n-t_0$ )
$t_0$	0.421	0.457				
$t_1$	0.421	0.452	0.000	0.005	0.005	0.0050
$t_2$	0.420	0.447	0.001	0.010	0.009	0.0045
$t_3$	0.420	0.443	0.001	0.014	0.013	0.0043
$t_4$	0.419	0.439	0.002	0.018	0.016	0.0040
$t_5$	0.418	0.435	0.003	0.022	0.019	0.0038
$t_6$	0.418	0.432	0.003	0.025	0.022	0.0037
$t_7$	0.417	0.429	0.004	0.028	0.024	0.0034
$t_8$	0.416	0.427	0.005	0.030	0.025	0.0031
$t_9$	0.416	0.426	0.005	0.031	0.026	0.0029

#### 4.1.2. Optimasi sampel

Sebelum dilakukan pengukuran aktivitas spesifik katalase, diperlukan optimasi sampel. Optimasi sampel dilakukan pada pengenceran sampel 10 kali, 20 kali, 50 kali, 100 kali dan 200 kali. Hasil optimasi sampel menunjukkan bahwa pada pengenceran sampel 100 kali menghasilkan nilai delta absorban tertinggi per satuan waktu, seperti diperlihatkan pada **tabel 4.2** di bawah ini.

**Tabel 4.2 Optimasi sampel**

Pengenceran	Waktu	Rata-rata Blanko	Rata-rata Sampel	Delta Abs (B) $t_0-t_2$	Delta Abs (S) $t_0-t_2$	$\Delta S-\Delta B$	Kecepatan reaksi per satuan waktu ( $\Delta S-\Delta B/t_2-t_0$ )
10 kali	$t_0$	0.422	0.459	0.001	0.002	0.001	0.0005
	$t_2$	0.421	0.457				
20 kali	$t_0$	0.422	0.459	0.001	0.002	0.001	0.0005
	$t_2$	0.421	0.457				
50 kali	$t_0$	0.422	0.437	0.001	0.002	0.001	0.0005
	$t_2$	0.421	0.435				
100 kali	$t_0$	0.422	0.445	0.001	0.0035	0.0025	0.00125
	$t_2$	0.421	0.4415				
200 kali	$t_0$	0.422	0.4435	0.001	0.002	0.001	0.0005
	$t_2$	0.421	0.4415				

#### 4.1.3. Optimasi substrat

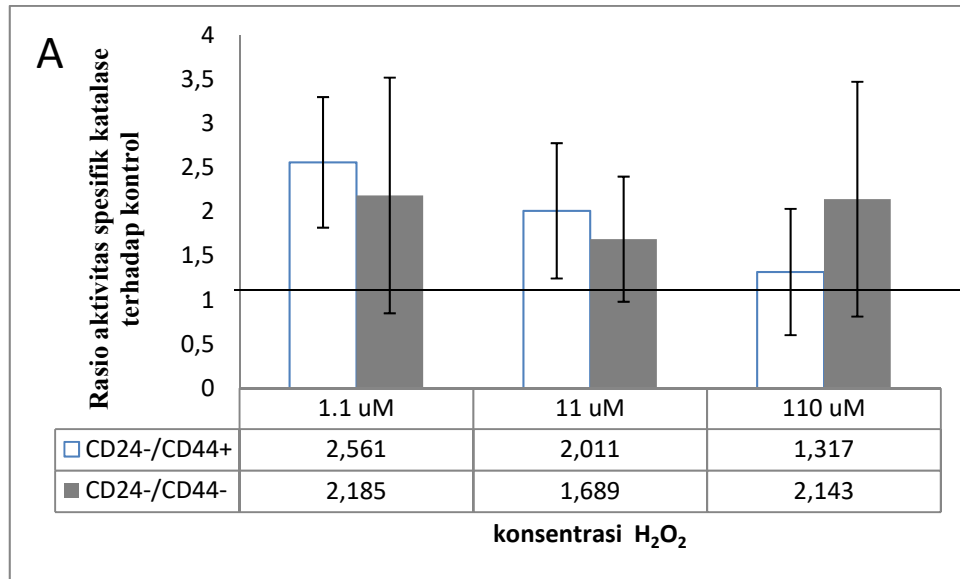
Setelah didapatkan pengenceran sampel yang optimal selanjutnya dilakukan optimasi pengenceran substrat. Optimasi pengenceran substrat dilakukan pada pengenceran substrat 1000 kali 2000 kali 4000 kali 8000 kali dan 16000 kali. Hasil optimasi substrat menunjukkan bahwa pengenceran 4000 kali menghasilkan delta absorban tertinggi, diperlihatkan pada tabel 4.3 di bawah ini.

**Tabel 4.3. Optimasi substrat**

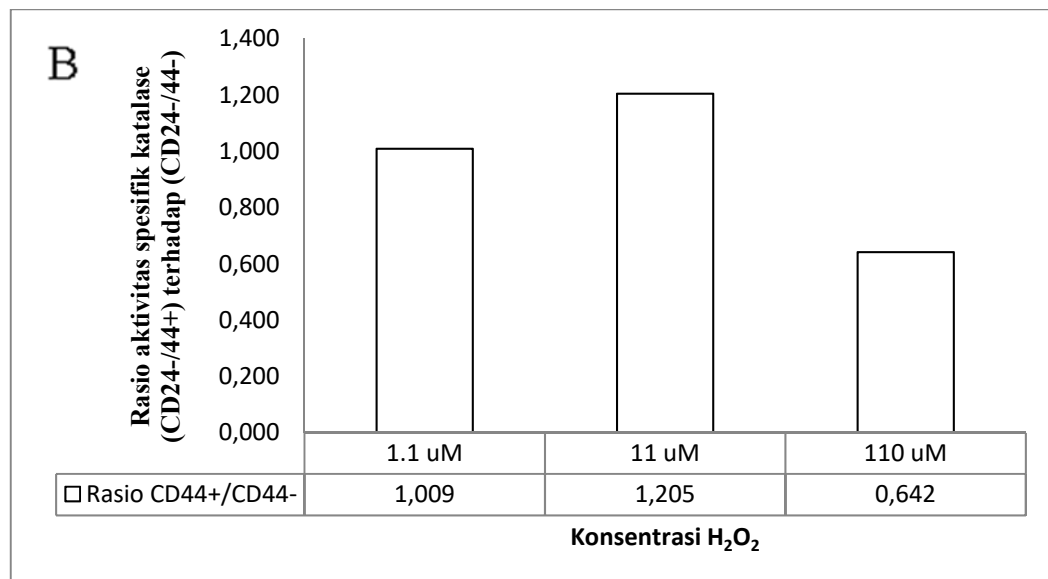
Pengenceran	Waktu	Rata-rata Blanko	Rata-rata Sampel	Delta Abs (B) $t_0-t_2$	Delta Abs (S) $t_0-t_2$	$\Delta S-\Delta B$	Kecepatan reaksi per satuan waktu ( $\Delta S-\Delta B/t_2-t_0$ )
16.000 kali	$t_0$	0.2310	0.2255	0.0030	0.0055	0.003	0.00125
	$t_2$	0.2280	0.2200				
8.000 kali	$t_0$	0.3145	0.3480	0.0035	0.0070	0.0035	0.00175
	$t_2$	0.3110	0.3410				
4.000 kali	$t_0$	0.4660	0.4625	0.0020	0.0080	0.0060	0.00300
	$t_2$	0.4640	0.4545				
2.000 kali	$t_0$	0.8455	0.8050	0.0055	0.0125	0.0070	0.00350
	$t_2$	0.8400	0.7925				
1.000 kali	$t_0$	1.4890	1.4000	0.0060	0.0160	0.0100	0.00500
	$t_2$	1.4830	1.3840				

#### 4.1.4. Aktivitas spesifik katalase

Setelah didapatkan hasil pengenceran sampel dan pengenceran substrat yang optimal, dilakukan pengukuran aktivitas spesifik katalase. Aktivitas spesifik katalase dinyatakan dalam satuan unit/mg protein. Hasil perhitungan aktivitas spesifik katalase dapat dilihat secara lengkap pada **Lampiran 7 dan 8**. Data aktivitas spesifik katalase CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) dinormalisasi terhadap aktivitas spesifik katalase kelompok kontrol (tanpa perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Baik aktivitas spesifik katalase pada CSC payudara (CD24-/CD44+) maupun non CSC payudara (CD24-/CD44-) terdistribusi normal dengan nilai  $p > 0.05$ . Uji homogenitas data aktivitas spesifik katalase pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) menunjukkan data yang tidak homogen ( $p < 0,05$ ;  $p = 0,017$ ). Analisis data aktivitas spesifik katalase pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) dilakukan dengan uji ANOVA, ditampilkan pada **Gambar 4.1.A**. Sedangkan analisis data rasio aktivitas spesifik katalase pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dibandingkan dengan non CSC payudara (CD24-/CD44-) dilakukan dengan uji *Kruskal Wallis* karena distribusi data tidak normal ( $p < 0.05$ ), ditampilkan pada **Gambar 4.1.B**.



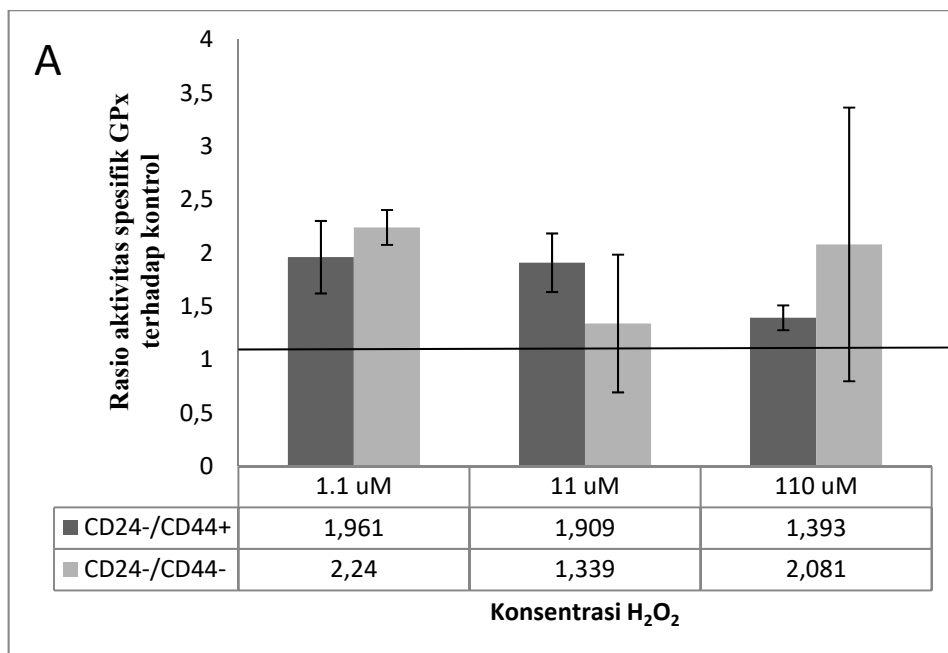
**Gambar 4.1. A. Rasio aktivitas spesifik katalase pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) terhadap kontrol.** Kontrol adalah CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) yang tidak diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tidak terdapat perbedaan bermakna aktivitas spesifik katalase antara kelompok yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi 1,1; 11; 110 µM (ANOVA, p=0,450)



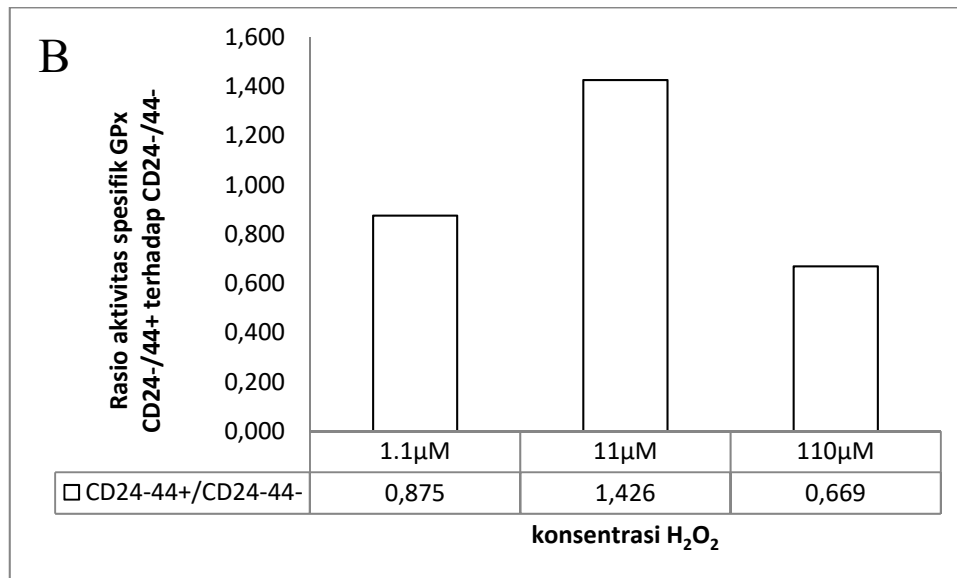
**Gambar 4.1. B. Rasio aktivitas spesifik katalase CSC payudara (CD 24-/CD44+) terhadap non CSC payudara (CD24-/CD44-).** Kontrol adalah CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) yang tidak diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tidak terdapat perbedaan bermakna rasio aktivitas spesifik katalase antara kelompok CSC payudara (CD24-/CD44+) dibandingkan non CSC payudara (CD24-/CD44-) (*Kruskal Wallis*, p=0,894).

#### 4.2. Analisis aktivitas spesifik glutation peroksidase

Aktivitas spesifik glutation peroksidase dinyatakan dalam satuan unit/mg protein. Hasil perhitungan aktivitas spesifik glutation peroksidase dapat dilihat secara lengkap pada **Lampiran 9 dan 10**. Data aktivitas spesifik glutation peroksidase CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) dinormalisasi terhadap aktivitas spesifik glutation peroksidase kelompok kontrol (tanpa perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Baik aktivitas spesifik glutation peroksidase pada CSC payudara (CD24-/CD44+) maupun non CSC payudara (CD24-/CD44-) terdistribusi normal dengan nilai  $p > 0.05$ . Uji homogenitas data aktivitas spesifik glutation peroksidase pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) menunjukkan data yang tidak homogen ( $p < 0,05$ ;  $p = 0,000$ ). Analisis data aktivitas spesifik glutation peroksidase pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) dilakukan dengan uji ANOVA, ditampilkan pada **Gambar 4.2.A**. Sedangkan analisis data rasio aktifitas spesifik glutation peroksidase pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dibandingkan dengan non CSC payudara (CD24-/CD44-) dilakukan dengan uji *Kruskal Wallis* karena distribusi data tidak normal  $p < 0.05$ , ditampilkan pada **Gambar 4.2.B**.



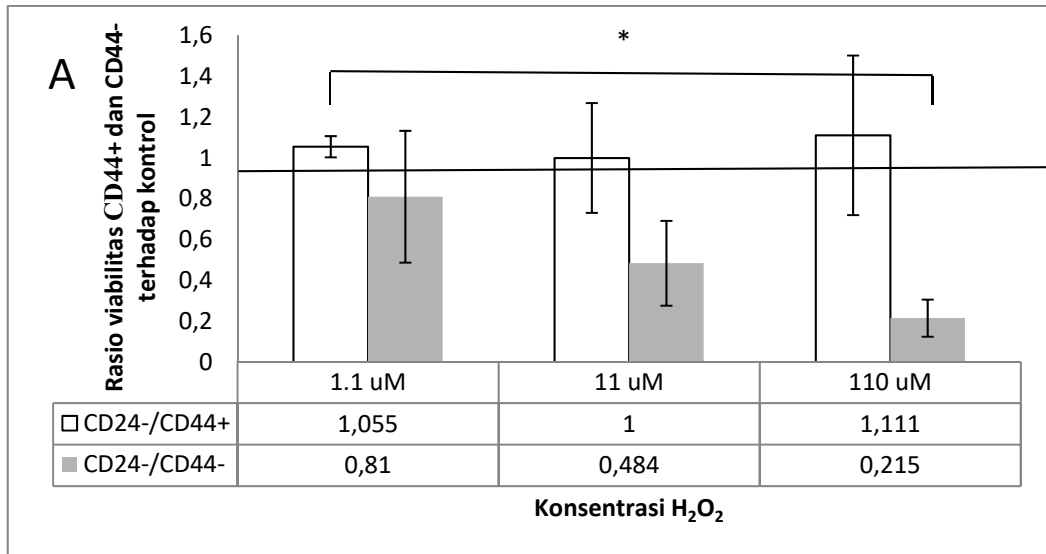
**Gambar 4.2. A. Rasio aktivitas spesifik glutation peroksidase pada CSC payudara (CD 24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) terhadap kontrol.** Kontrol adalah CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) yang tidak diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tidak terdapat perbedaan bermakna aktivitas spesifik GPx antara kelompok yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi 1,1; 11; 110 μM (ANOVA, p=0,086)



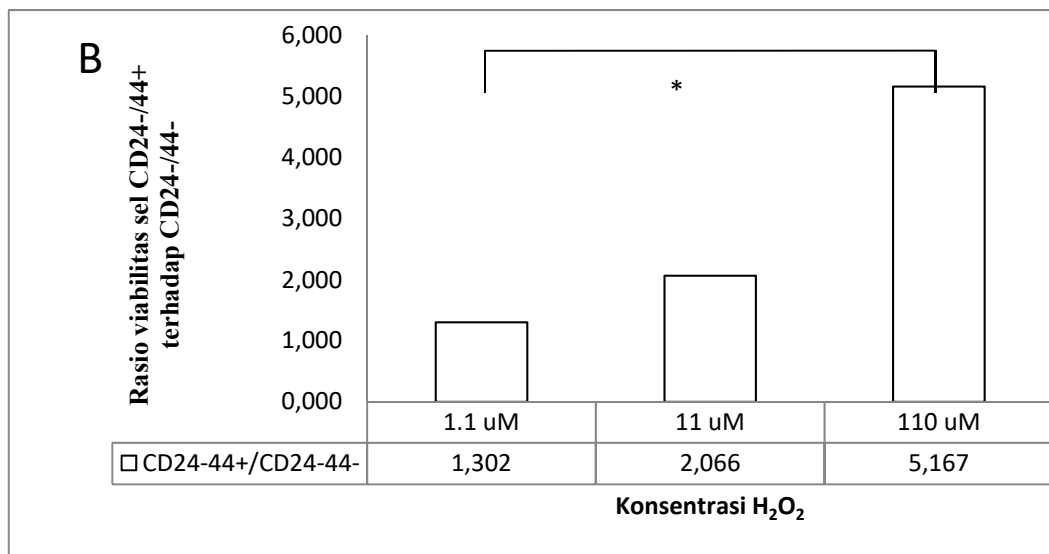
**Gambar 4.2. B. Rasio aktivitas spesifik glutation peroksidase CSC payudara (CD 24-/CD44+) terhadap non CSC payudara (CD24-/CD44-).** Kontrol adalah CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) yang tidak diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok rasio aktivitas spesifik glutation peroksidase CSC payudara dibandingkan non CSC payudara (*Kruskal Wallis*, p=0,073).

### 4.3. Analisis efek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> terhadap viabilitas sel dengan MTS Assay

Data pengukuran viabilitas sel dengan MTS *assay* pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) dapat dilihat pada **Lampiran 11**. Tingkat viabilitas CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) dapat dilihat pada **Gambar 4.6.A** di bawah ini.



**Gambar 4.3 A.** Viabilitas sel CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) terhadap kontrol. Kontrol adalah CSC dan non CSC payudara yang tidak diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Terdapat perbedaan bermakna viabilitas sel antara kelompok yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi 1,1; 11; 110 μM (ANOVA, p=0,003). \* viabilitas sel berbeda bermakna antara kelompok CSC payudara 1.1 μM dengan non CSC payudara 110 μM



**B.** Rasio Viabilitas CSC payudara (CD24-/CD44+) dibandingkan dengan non CSC payudara (CD24-/CD44-). Terdapat perbedaan bermakna rasio viabilitas sel antara kelompok rasio CSC payudara dibandingkan dengan non CSC payudara. \* kelompok rasio viabilitas sel CSC payudara dibandingkan dengan non CSC payudara yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi 1,1 μM dengan yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi 110 μM (ANOVA, p=0,044).

#### 4.4. Ekspresi mRNA NF-kB melalui *Real Time* RT-PCR

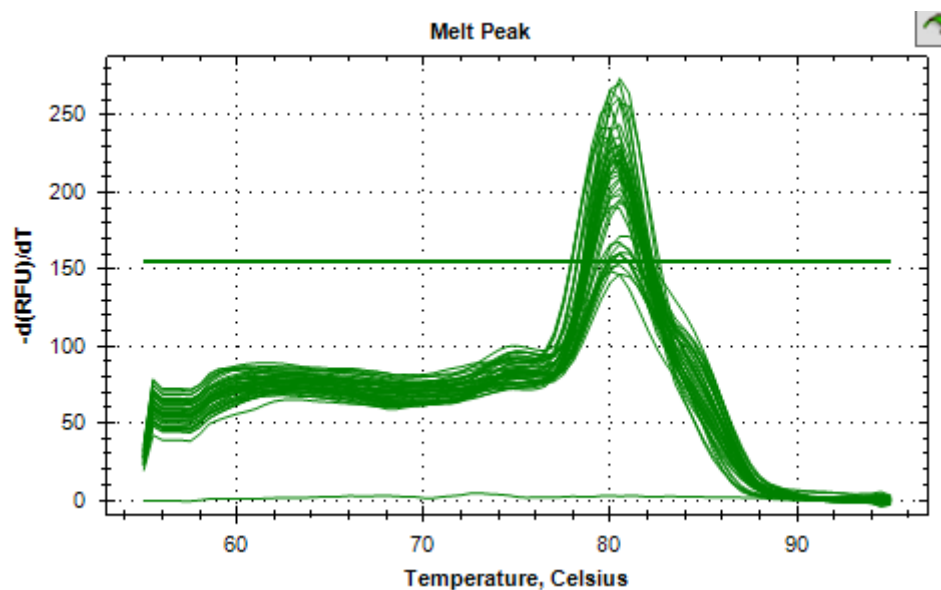
##### 4.4.1. Konsentrasi RNA total

Hasil isolasi RNA total CSC payudara (CD24-/CD44+) dan (CD24-/CD44-) diukur serapan cahayanya dengan sinar UV panjang gelombang 260 nm menggunakan alat *Varioskan Flash*® dari Thermo Scientific. Hasil pengukuran RNA total CSC payudara (CD24-/CD44+) berada pada rentang 78,8-205,5 ng/ $\mu$ l, sedangkan RNA total non CSC payudara (CD24-/CD44-) berada pada rentang 56,7-123,1 hasil selengkapnya dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

#### 4.4.2. Analisis ekspresi mRNA NF-kB dengan *Real Time* RT-PCR

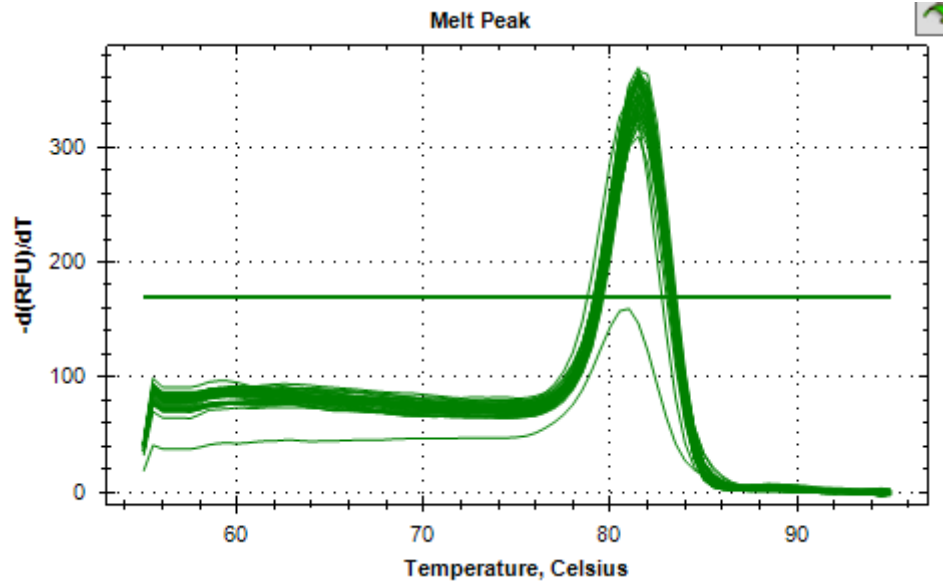
Pemeriksaan ekspresi relatif mRNA NF-kB dilakukan dengan *Real-Time* RT-PCR *Mini Opticon* (BIO-RAD Laboratories) dan *software Bio-Rad CFX Manager* 3.0. Hasil pengukuran kemudian dianalisis dengan metode Livak. Nilai ambang batas pada kurva fluorosensi dapat diatur agar efisiensi yang diperoleh seragam dan semua data dapat dibandingkan. Pada penelitian ini, digunakan gen 18s rRNA sebagai gen referensi (*housekeeping gene*).

Hasil *real time* RT-PCR dideteksi dengan melakukan pengukuran serapan fluorosensi SYBR Green. Besaran yang diukur pada pengukuran ini adalah nilai Ct (*Cycle threshold*). Kurva melting amplifikasi cDNA NF-kB dapat dilihat pada **Gambar 4.4**. Sedangkan Kurva melting amplifikasi cDNA 18S rRNA dapat dilihat pada **Gambar 4.5**.



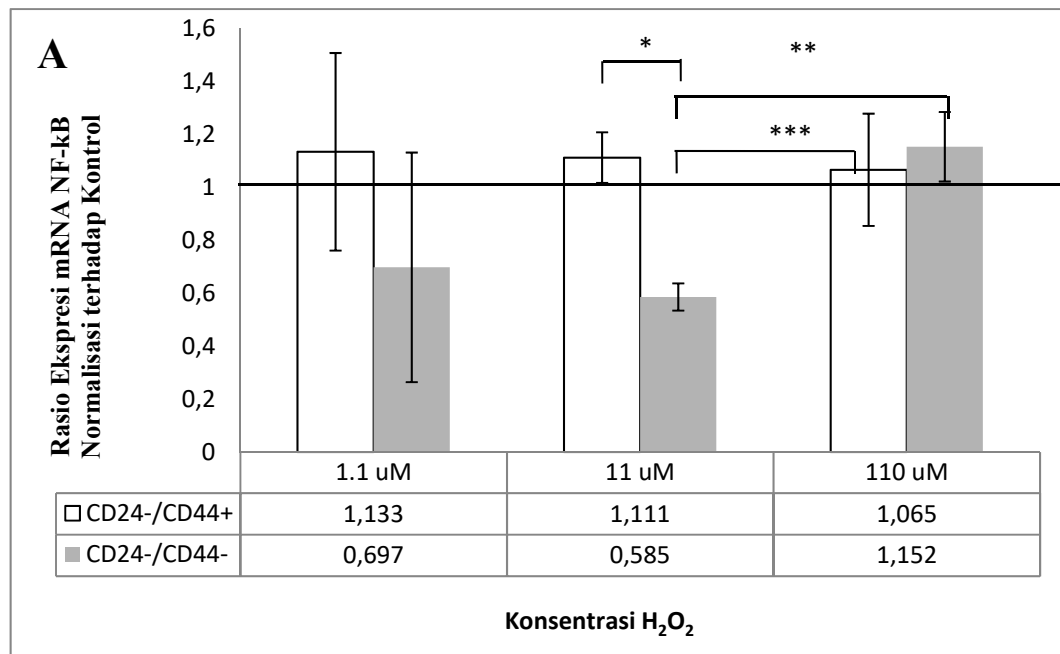
**Gambar 4.4.** Kurva *melting curve* pada amplifikasi cDNA NF-kB dengan *Real Time* RT-PCR



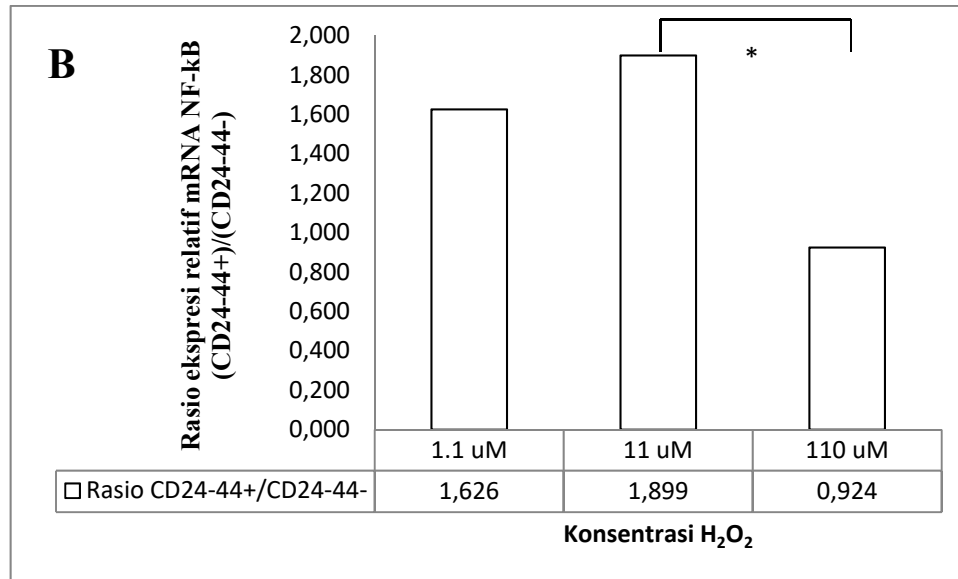


Gambar 4.5. Kurva *melting curve* pada amplifikasi cDNA 18s rRNA dengan *Real Time RT-PCR*

Baik ekspresi mRNA NF-kB pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) terdistribusi normal dengan nilai  $p > 0.05$ . Uji homogenitas data ekspresi mRNA NF-kB pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) menunjukkan data yang tidak homogen ( $p < 0,05$ ;  $p = 0,000$ ). Analisis data ekspresi mRNA NF-kB pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) dilakukan dengan uji ANOVA, ditampilkan pada **Gambar 4.6.A**, sedangkan analisis data rasio ekspresi mRNA NF-kB pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dibandingkan dengan non CSC payudara (CD24-/CD44-) dilakukan dengan uji *Kruskal Wallis* karena distribusi data tidak normal  $p < 0.05$ , ditampilkan pada **Gambar 4.6.B**.



**Gambar 4.6. A. Rasio ekspresi relatif mRNA NF-kB pada CSC payudara (CD 24-/44+) dan non CSC payudara (CD24-/44-) terhadap kontrol. Kontrol adalah CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44) yang tidak diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Terdapat perbedaan bermakna ekspresi mRNA NF-kB antara kelompok yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi 1.1; 11; 110µM (ANOVA,  $p = 0,001$ ). \* ekspresi mRNA NF-kB berbeda bermakna antara kelompok CSC payudara 11µM dengan non CSC payudara 11µM. \*\* ekspresi mRNA NF-kB berbeda bermakna antara kelompok non CSC payudara 11µM dengan non CSC payudara 110µM. \*\*\* ekspresi mRNA NF-kB berbeda bermakna antara kelompok non CSC payudara 11µM dengan CSC payudara 110µM**



**B. Rasio ekspresi relatif mRNA NF-kB pada CSC payudara (CD24-/44+) terhadap non CSC payudara (CD24-/44-).** Terdapat perbedaan bermakna antar kelompok rasio ekspresi mRNA NF-kB CSC payudara (CD24-/CD44+) dibandingkan non CSC payudara (CD24-/CD44-) (*Kruskal Wallis*,  $p=0,016$ ). \* rasio ekspresi mRNA NF-kB CSC payudara (CD24-/CD44+) dibandingkan non CSC payudara (CD24-/CD44-) yang diinduksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasi 11 $\mu$ M dan 110 $\mu$ M berbeda bermakna.

#### 4.5. Analisis hubungan ekspresi NF-kB

Ekspresi mRNA NF-kB CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) dihubungkan dengan aktivitas spesifik katalase, aktivitas spesifik glutation peroksidase, dan viabilitas sel, ditampilkan pada **tabel 4.4.A dan 4.4.B** di bawah ini.

**Tabel 4.4.A. Analisis hubungan ekspresi mRNA NF-kB CSC payudara (CD24-/CD44+) dengan aktivitas spesifik katalase, aktivitas spesifik GPx, dan viabilitas sel, dan aktivitas spesifik MnSOD**

N o	Hubungan ekspresi NF- kB CSC dengan	Nilai p	Nilai Korelas i Pearson	Keterangan
1	Aktivitas spesifik katalase	0.680	-0.104	tidak bermakna
2	Aktivitas spesifik GPx	0.138	0.363	tidak bermakna
3	Viabilitas sel	0.987	-0.006	tidak bermakna
4	Aktivitas spesifikMnSOD	0.740	0.130	tidak bermakna

**Tabel 4.4.B. Analisis hubungan ekspresi mRNA NF-kB non CSC payudara (CD24-/CD44-) dengan aktivitas spesifik katalase, aktivitas spesifik GPx, viabilitas sel, dan aktivitas spesifik MnSOD**

No	Hubungan ekspresi NF-kB non CSC dengan	Nilai p	Nilai Korelasi Pearson	Keterangan
1	Aktivitas spesifik katalase	0.629	-0.122	tidak bermakna
2	Aktivitas spesifik GPx	0.362	0.228	tidak bermakna
3	Viabilitas sel	0.547	-0.233	tidak bermakna
4	Aktivitas spesifik MnSOD	0.314	0.379	tidak bermakna

## **BAB V**

### **PEMBAHASAN**

Penelitian ini mengamati ekspresi mRNA NF- $\kappa$ B, aktivitas spesifik katalase dan aktivitas spesifik glutathion peroksidase pada sampel CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan hubungannya terhadap viabilitas sel. Pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dilakukan terhadap CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) dengan konsentrasi 1.1  $\mu$ M, 11  $\mu$ M dan 110  $\mu$ M dan tanpa pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atau kontrol. Pada penelitian ini, pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dilakukan selama 1 jam. Pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi yang berbeda bertujuan untuk mengetahui berapa dosis H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang berperan dalam persinyalan sel baik itu proliferasi sel ataupun kematian sel.

Penelitian terdahulu telah berhasil mengisolasi dan mengkultur CSC payudara (CD24-/CD44+) yang berasal dari spesimen klinik jaringan kanker payudara CS9K (Wanandi et al.). suspensi sel tunggal yang dibuat dari jaringan payudara CS9K kemudian disortir berdasarkan penanda permukaan sel CD24 dan CD44 sehingga menghasilkan empat fraksi sel yaitu CD24+, CD24-, (CD24-/CD44+) dan (CD24-/CD44-). (CD24-/CD44+) yang telah dikultur dan dipasasi berulang kali menghasilkan galur sel CSC payudara manusia. Galur sel CSC payudara (CD24-/CD44+) dijadikan sampel pada penelitian ini. Fraksi sel (CD24-/CD44-) yang juga telah menjadi galur sel merupakan sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebagai non CSC payudara. Pada penelitian ini, sel dari jaringan payudara normal pasien tidak digunakan sebagai sel kontrol non CSC karena jaringan sekitar kanker yang dianggap normal diduga telah mengalami perubahan atau transformasi sel yang belum terdeteksi dan terdapat CSC payudara yang telah bermikrometastasis.

Penelitian Aulia G et al. menggunakan rotenon untuk menginduksi CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) agar terjadi keadaan stres oksidatif. Rotenon merupakan salah satu agen yang banyak digunakan untuk menginduksi stres oksidatif di dalam sel secara *in vitro*. Rotenon dapat menginduksi kematian sel melalui pembentukan ROS (anion superoksida).

Peningkatan ROS yang berlebih di dalam sel dapat menginduksi terjadinya stres oksidatif dan menginduksi aktivasi jalur kematian sel terutama jalur intrinsik apoptosis. Oleh karena itu, banyak penelitian *in vitro* terdahulu menggunakan rotenon untuk memodulasi stres oksidatif. Ketahanan hidup sel yang diberi dengan rotenon bergantung pada konsentrasi rotenon yang digunakan untuk pemberian, lamanya waktu pemberian dan jenis sel yang diberi.<sup>15</sup>

Pada penelitian ini menggunakan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> untuk diberikan pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44+) supaya terjadi keadaan stres oksidatif. Perbedaan dengan penelitian yang dilakukan Aulia adalah induksi rotenon menghasilkan anion superoksida sedangkan pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menghasilkan hidrogen peroksida. Pada kemoterapi dan radiasi dihasilkan baik itu anion superoksida maupun hidrogen peroksida. Jadi diharapkan pada penelitian ini diketahui mana yang lebih berperan dalam resistensi terapi kemoterapi maupun radioterapi apakah anion superoksida atau hidrogen peroksida. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adalah salah satu ROS yang sengaja dihasilkan oleh sel yang berfungsi spesifik dalam jalur persinyalan. Konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> di dalam sel yang sedikit berperan sebagai *signaling molecules* yang mempromosikan proliferasi sel dan ketahanan sel, konsentrasi yang tinggi sekali dapat menginduksi kematian sel.<sup>6</sup> Ketahanan sel salah satu yang diregulasi oleh NF-κB dengan menginduksi protein anti-apoptosis. Aktivitas NF-κB diregulasi oleh konsentrasi ROS dan konsentrasi ROS juga dipengaruhi NF-κB.

Penelitian yang dilakukan Aulia et al. 2012, menunjukkan bahwa pada non CSC payudara (CD24-/CD44-) yang diinduksi rotenon konsentrasi 0.5μM, 5μM, dan 50μM, konsentrasi ROS meningkat dibandingkan dengan CSC payudara (CD24-/CD44+) sampai 1.6 kali. Hal ini menunjukkan bahwa CSC payudara (CD24-/CD44+) resisten terhadap induksi rotenon dan kemungkinan CSC payudara (CD24-/CD44+) memiliki mekanisme pertahanan untuk mengatasi pembentukan kadar ROS yang disebabkan oleh induksi rotenon melalui mekanisme antioksidan. Aulia juga memodulasi stres oksidatif melalui pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada CSC dan non CSC payudara dengan konsentrasi 1.1 μM, 11 μM dan 110 μM yang menunjukkan bahwa konsentrasi relatif ROS pada CSC payudara (CD24-/CD44+) tidak meningkat dengan pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> berbagai konsentrasi, sedangkan pada non CSC payudara (CD24-/CD44-) konsentrasi relatif ROS meningkat sesuai dengan

peningkatan konsentrasi pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sampai dengan 7 kali. Hal ini dapat disimpulkan bahwa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lebih kuat menyebabkan stres oksidatif bila dibandingkan dengan rotenon.

Penelitian ini melanjutkan penelitian Aulia et al. hanya saja penelitian kali ini menggunakan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> untuk memodulasi stres oksidatif dengan berbagai konsentrasi yang bertujuan melihat aktivitas spesifik katalase dan glutathion peroksidase, viabilitas pada CSC payudara (CD24-/CD44+), dan ekspresi NF-κB, serta apakah aktifitas spesifik katalase dan glutathion peroksidase, viabilitas sel pada CSC payudara (CD24-/CD44+) diregulasi oleh NF-κB.

Konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 110 μM diperoleh dengan mengambil 100 μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ditambahkan dengan aquabides sampai 100 ml, kemudian ambil 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang sudah diencerkan (konsentrasi 110 μl) di atas lalu tambahkan aquabides sampai 100 ml untuk mendapatkan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasi 11 μl. Untuk mendapatkan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasi 1.1 μl, ambil 10 ml larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasi 11 μl tambahkan aquabides sampai dengan 100 ml.

## 5.1. Analisis aktivitas spesifik katalase

### 5.1.1. Optimasi kinetik katalase

Optimasi waktu dilakukan pada detik ke 30 ( $t_0$ ) sampai menit ke 9:30 ( $t_9$ ) dengan interval satu menit sehingga diperoleh  $t_n$  (waktu menit ke  $n$ ;  $t_1$ - $t_9$ ). Dari optimasi waktu didapatkan bahwa penguraian terbaik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oleh sampel dicapai pada  $t_1$  (menit ke 00:30 hingga menit ke 01:30), dengan selisih absorbansi 0.005. Penghitungan kecepatan reaksi tiap satuan waktu didapat dari perbandingan selisih serapan sampel dengan blanko dengan lama waktu pengukuran sejak menit ke 00:30 hingga menit ke 09:30 ( $(\Delta S - \Delta B) / (t_n - t_0)$ ). Hasilnya kecepatan reaksi terbesar adalah pada  $t_1$  dengan kecepatan 0.005/menit. Menit ke 00:30 dijadikan waktu awal ( $t_0$ ) karena penambahan 50 μL sampel ke dalam 950 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dilakukan setelah menit ke 00:00 sehingga pada menit ke 00:30 absorbansi meningkat karena pengaruh absorbansi sampel. Untuk menghitung aktivitas katalase, serapan diukur sejak menit ke 00:30.  $T_1$ , seperti yang ditunjukkan pada **tabel 4.1**.

### 5.1.2. Optimasi pengenceran sampel

Sebelum dilakukan pengukuran aktivitas spesifik katalase, diperlukan optimasi sampel. Optimasi diperlukan karena beberapa hal diantaranya alat spektrofotometer yang digunakan untuk pengukuran aktivitas katalase di setiap penelitian tidaklah sama. Berikutnya adalah jenis sampel yang digunakan juga berbeda, seperti aktivitas katalase di jaringan berbeda dengan aktivitas katalase di sel kultur. Optimasi sampel dilakukan pada pengenceran sampel 10 kali, 20 kali, 50 kali, 100 kali dan 200 kali. Hasil optimasi sampel menunjukkan bahwa pada pengenceran sampel 100 kali menghasilkan nilai kecepatan reaksi per satuan waktu tertinggi yaitu 0.00125/menit, seperti diperlihatkan pada **tabel 4.2**.

### 5.1.3. Optimasi pengenceran substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Setelah didapatkan pengenceran sampel yang optimal selanjutnya dilakukan optimasi pengenceran substrat. Optimasi substrat diperlukan karena karakteristik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang mudah teroksidasi. Optimasi pengenceran substrat dilakukan pada pengenceran substrat 1000 kali 2000 kali 4000 kali 8000 kali dan 16000 kali. Hasil optimasi substrat menunjukkan bahwa pada pengenceran substrat 4000 kali menghasilkan nilai kecepatan reaksi per satuan waktu tertinggi yaitu 0.003 seperti diperlihatkan pada **tabel 4.3**. Pada pengenceran substrat 1000 kali walaupun menghasilkan delta absorban tertinggi tetapi nilai absorbannya 1.4 terletak pada garis plateau atau tidak pada garis linier (persamaan Beer Lambert). Pada garis plateau substrat telah jenuh berikatan dengan enzim sehingga walaupun substrat terus ditambahkan tidak akan menambah ikatan enzim dengan substrat.

### 5.1.4. Aktivitas spesifik katalase

Setelah didapatkan hasil pengenceran sampel dan pengenceran substrat yang optimal, dilakukan pengukuran aktivitas spesifik katalase. Aktivitas spesifik katalase dinyatakan dalam satuan unit/mg protein. Hasil perhitungan aktivitas spesifik katalase dapat dilihat secara lengkap pada **Lampiran 7 dan 8**. Analisis aktivitas spesifik katalase pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC



payudara (CD24-/CD44-) dilakukan dengan menggunakan rasio aktivitas spesifik katalase yang dinormalisasi terhadap sel tanpa perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Rasio aktivitas spesifik katalase pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44+) terhadap kontrol tampak pada **gambar 4.4.A** aktivitas spesifik katalase meningkat pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44+) yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> terhadap kontrol pada berbagai konsentrasi. Analisis statistik kelompok CSC payudara dan kelompok non CSC payudara yang menggunakan ANOVA tidak menunjukkan perbedaan tingkat aktivitas spesifik katalase yang bermakna ( $p > 0.05$ ;  $p = 0.450$ ) pada kelompok yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan semua konsentrasi (1.1  $\mu$ M, 11  $\mu$ M, dan 110  $\mu$ M). Peningkatan aktivitas spesifik katalase dibandingkan dengan kontrol diduga karena kebutuhan katalase yang meningkat untuk mengubah H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menjadi H<sub>2</sub>O dan O<sub>2</sub> yang berasal dari modulasi stress oksidatif oleh H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan reaksi MnSOD yang mengubah superoksida menjadi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Penurunan aktivitas spesifik katalase yang sebanding dengan peningkatan pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diduga karena katalase dipakai untuk mengubah H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menjadi H<sub>2</sub>O dan O<sub>2</sub>, yang meningkat sejalan dengan konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang dihasilkan dari pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pada **gambar 4.4.B** tampak rasio aktivitas spesifik katalase CSC payudara (CD24-/CD44+) terhadap non CSC payudara (CD24-/CD44-) meningkat pada pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasi 11  $\mu$ M hal ini diduga karena rasio ekspresi mRNA NF- $\kappa$ B juga meningkat pada pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasi 11  $\mu$ M dan menurun pada pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasi 110  $\mu$ M seperti penurunan pada rasio mRNA NF- $\kappa$ B pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasi 110  $\mu$ M.

## 5.2. Analisis aktivitas spesifik glutathion peroksidase

Aktivitas spesifik glutathion peroksidase dinyatakan dalam satuan unit/mg protein. Hasil perhitungan aktivitas spesifik glutathion peroksidase dapat dilihat secara lengkap pada **Lampiran 9 dan 10**. Analisis aktivitas spesifik glutathion peroksidase pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) dilakukan dengan menggunakan rasio aktivitas spesifik glutathion peroksidase yang dinormalisasi terhadap sel tanpa perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Pada gambar 4.5.A.** Aktivitas spesifik GPx meningkat pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44+) yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> terhadap kontrol pada berbagai konsentrasi. Analisis statistik kelompok CSC payudara (CD24-/CD44+) dan kelompok non CSC payudara (CD24-/CD44+) yang menggunakan ANOVA tidak menunjukkan perbedaan bermakna tingkat aktivitas spesifik GPx ( $p > 0.05$ ;  $p = 0.086$ ) pada kelompok yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan semua konsentrasi (1.1  $\mu$ M, 11  $\mu$ M, dan 110  $\mu$ M). Peningkatan aktivitas spesifik glutathion peroksidase dibandingkan dengan kontrol diduga karena kebutuhan glutathion peroksidase yang meningkat untuk mengubah H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menjadi H<sub>2</sub>O dan O<sub>2</sub> yang berasal dari modulasi stress oksidatif oleh H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan reaksi MnSOD yang mengubah superoksida menjadi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Penurunan aktivitas spesifik glutathion peroksidase yang sebanding dengan peningkatan pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diduga karena glutathion peroksidase dipakai untuk mengubah H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menjadi H<sub>2</sub>O dan O<sub>2</sub>, yang meningkat sejalan dengan konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang dihasilkan dari pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pada **gambar 4.5.B** tampak rasio aktivitas spesifik glutathion peroksidase CSC payudara (CD24-/CD44+) terhadap non CSC payudara (CD24-/CD44+) meningkat pada pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasi 11  $\mu$ M hal ini diduga karena rasio ekspresi mRNA NF-kB juga meningkat pada pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasi 11  $\mu$ M dan menurun pada pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasi 110  $\mu$ M seperti penurunan pada rasio mRNA NF-kB pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasi 110  $\mu$ M.

### **5.3. Analisis efek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> terhadap viabilitas sel dengan MTS Assay**

Setelah sel diberi dengan berbagai konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, efek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> terhadap viabilitas CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) ditentukan dengan menggunakan MTS assay. Sejumlah  $1 \times 10^5$  sel ditanam pada 96 well plate dan kemudian diberi perlakuan dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pengukuran viabilitas sel dilakukan dengan penambahan 20  $\mu$ l larutan campuran antara MTS dan PMS (20:1). Pengukuran terbentuknya produk formazan yang berwarna ungu dilakukan setelah inkubasi 1 jam sampai terjadi perubahan warna yang signifikan. Data pengukuran MTS pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) dapat dilihat pada **lampiran 11**.

Tampak pada **gambar 4.6.A.** CSC payudara (CD24-/CD44+) dapat mempertahankan viabilitas terhadap pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tingkat viabilitas non CSC

payudara (CD24-/CD44-) yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mengalami penurunan dibandingkan dengan CSC payudara (CD24-/CD44+). Penurunan viabilitas sel non CSC payudara (CD24-/CD44-) sesuai dengan peningkatan konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang diberikan.

Pada **gambar 4.6.B.** menunjukkan bahwa viabilitas CSC payudara (CD24-/CD44+) dibandingkan dengan non CSC payudara (CD24-/CD44-) mengalami peningkatan sejalan dengan peningkatan pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hal ini diduga pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang meningkat membuat non CSC payudara (CD24-/CD44-) menjadi lebih tidak viabel dibandingkan dengan CSC payudara (CD24-/CD44+).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penurunan viabilitas sel bergantung pada besarnya konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang diberikan dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ROS) terbukti mempengaruhi viabilitas sel. CSC payudara (CD24-/CD44+) cenderung lebih *viabel* dibandingkan dengan non CSC payudara (CD24-/CD44-). Seperti yang diduga oleh banyak penelitian, sel punca kanker termasuk CSC payudara (CD24-/CD44+) memiliki *survival rate* (ketahanan) yang lebih tinggi terhadap stres oksidatif. Penelitian ini menunjukkan ketahanan CSC payudara (CD24-/CD44+) yang lebih tinggi dibandingkan dengan non CSC payudara (CD24-/CD44+) pada tingkat viabilitas sel. Penurunan viabilitas sel non CSC payudara diduga karena ekspresi NF-κB yang ditekan pada non CSC payudara. Seperti telah diketahui bahwa NF-κB berperan dalam survival melalui modulasi protein antiapoptosis seperti, *cellular inhibitors of apoptosis* (c-IAPs) termasuk X *chromosome-linked* IAP (XIAP), *caspase-8-c-FLIP* (FLICE inhibitory protein), A1 (Bfl1), TNFR-associated factor 1 (TRAF1) dan TRAF2 sehingga apoptosis tidak terjadi. Hal ini diperkuat dengan penelitian Aulia, 2012 yang membuktikan bahwa ekspresi survivin yang tinggi pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dibandingkan dengan non CSC payudara (CD24-/CD44-) yang membuat CSC payudara (CD24-/CD44+) lebih viabel karena survivin sebagai protein antiapoptosis. Berdasarkan hasil pengukuran konsentrasi ROS dengan DCFH-DA pada penelitian yang dilakukan Aulia, CSC payudara (CD24-/CD44+) mempertahankan konsentrasi ROS yang rendah dibandingkan dengan non CSC payudara (CD24-/CD44+). Karena konsentrasi ROS yang rendah berperan dalam mempertahankan viabilitas sel dimana CSC payudara (CD24-/CD44+) cenderung lebih viabel dibandingkan

non CSC payudara (CD24-/CD44-). Konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang rendah berperan dalam survival sedangkan konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang tinggi dapat menyebabkan kematian sel.

#### 5.4. Analisis ekspresi mRNA NF- $\kappa$ B melalui *Real Time* RT-PCR

Pengukuran konsentrasi RNA total CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-) dengan menggunakan alat *Varioskan Flash*<sup>®</sup> pada sinar UV panjang gelombang 260 nm. Pengukuran ini dilakukan sebelum digunakan sebagai *template* dalam analisis ekspresi gen menggunakan *Real Time* RT-PCR. Konsentrasi RNA total yang akan digunakan menjadi *template* perlu disamakan agar hasil *Real Time* RT-PCR dapat dibandingkan antara seluruh sampel yang diisolasi baik CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-). Jumlah *template* mRNA yang digunakan adalah 100 ng berdasarkan optimasi konsentrasi *template* yang telah dilakukan tim peneliti lain di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler FKUI. Perhitungan volume *template* RNA yang dibutuhkan, dilakukan dengan mengatur pengenceran *template* RNA total yang digunakan pada campuran *Real Time* RT-PCR (**Lampiran 2**).

Pemeriksaan ekspresi relatif mRNA NF- $\kappa$ B dilakukan dengan instrumen berupa *Real-Time* RT-PCR *Mini Opticon* (*BIO-RAD Laboratories*) dan *software Bio-Rad CFX Manager 3.0*. Hasil pengukuran dengan instrument tersebut kemudian dianalisis dengan metode Livak. Pada penelitian ini, digunakan gen 18s rRNA sebagai gen referensi (*housekeeping gene*). Hasil *real time* RT-PCR dideteksi dengan melakukan pengukuran serapan fluoresensi SYBR Green. Besaran yang diukur pada pengukuran ini adalah nilai Ct (*Cycle threshold*). Nilai Ct merupakan perpotongan kurva dengan garis *threshold*, dimana garis *threshold* adalah garis ambang yang menunjukkan konsentrasi minimum fluoresensi yang bisa terdeteksi oleh instrumen *real time* RT-PCR. Diperlukan produk hasil amplifikasi yang cukup untuk menghasilkan sinyal fluoresensi yang dapat terukur.

Ekspresi relatif mRNA NF- $\kappa$ B pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dapat dilihat pada **gambar 4.3.A dan 4.3.B**. Hasil perhitungan ekspresi relatif NF- $\kappa$ B dapat dilihat secara lengkap pada **Lampiran 4,5**.

Pada **gambar 4.3.A** ekspresi mRNA-kB pada CSC payudara (CD24-/CD44+) yang diberi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan berbagai konsentrasi (1.1 μM, 11 μM, dan 110 μM) meningkat sedikit terhadap kontrol. Ekspresi mRNA NF-kB yang meningkat sedikit ini diduga karena konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang tidak adekuat untuk mengaktifkan jalur persinyalan NF-kB yang disebabkan konsumsi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang dimetabolisme cepat oleh sel. Seperti eksperimen yang dilakukan oleh Luisa et al 2013 dengan memberikan single bolus 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada sel MCF-7. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> habis dimetabolisme kurang dari 30 menit. Hal yang sama terjadi pada non CSC payudara, ekspresi NF-kB tidak meningkat atau bahkan menurun, hal ini diduga karena konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang rendah sehingga tidak cukup kuat untuk NF-kB ditranslokasi ke inti sel. Analisis statistik kelompok CSC payudara (CD24-/CD44+) dan kelompok non CSC payudara (CD24-/CD44-) yang menggunakan ANOVA menunjukkan perbedaan ekspresi mRNA NFkB yang bermakna ( $p < 0.05$ ;  $p = 0.001$ ) pada tes Games-Howell kelompok CSC payudara yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 11 μM berbeda bermakna dengan kelompok non CSC payudara yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 11 μM ( $p < 0.05$ ;  $p = 0.000$ ). Kelompok CSC payudara yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 110 μM berbeda bermakna dengan kelompok non CSC payudara yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 11 μM ( $p < 0.05$ ;  $p = 0.015$ ). Kelompok non CSC payudara yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 11 μM berbeda bermakna dengan kelompok non CSC payudara yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 110 μM ( $p < 0.05$ ;  $p = 0.000$ ). **Gambar 4.3.B.** ekspresi NF-kB pada CSC payudara cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan ekspresi mRNA NF-kB pada non CSC payudara yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada konsentrasi 1,1 μM dan 11 μM. sedangkan pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsentrasi 110 μM pada CSC payudara dan non CSC payudara cenderung sama. Hal ini sesuai dengan berbagai literatur yang menyebutkan ekspresi NF-kB meningkat pada beberapa kanker termasuk pada kanker payudara. Rasio ekspresi mRNA NF-kB CSC payudara terhadap non-CSC payudara yang diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi 1.1 uM dan 11 uM lebih tinggi hampir dua kali, sedangkan pada konsentrasi 110 uM relatif sama. Pada penelitian terdahulu menunjukkan bahwa pengobatan kanker payudara banyak yang mengalami kekambuhan yang diduga karena peran CSC yang mempunyai ketahanan hidup yang tinggi. Pada banyak penelitian juga menunjukkan ekspresi NF-kB yang meningkat pada kanker. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi NF-kB pada CSC payudara lebih

tinggi dibandingkan non CSC payudara yang mungkin menyebabkan kekambuhan pada pengobatan kanker karena NF- $\kappa$ B berperan dalam ketahanan hidup.

### **5.5. Analisis Hubungan Ekspresi NF- $\kappa$ B**

Analisis hubungan ekspresi mRNA NF- $\kappa$ B pada CSC payudara dan non payudara dengan aktivitas spesifik katalase, glutathion peroksidase menunjukkan hubungan yang tidak bermakna. Hasil di atas kemungkinan karena MnSOD, katalase, dan glutathion peroksidase tidak hanya di regulasi oleh NF- $\kappa$ B tetapi juga oleh faktor transkripsi Nrf2. P53 juga berperan dalam meregulasi glutathion peroksidase. Nrf2 dan p53 suatu faktor transkripsi yang diregulasi oleh konsentrasi ROS. Bila ROS meningkat hingga terjadi stres oksidatif, Nrf2 akan teraktivasi dan Nrf2 akan meregulasi antioksidan seperti glutathion peroksidase dan SOD.

Analisis hubungan ekspresi mRNA NF- $\kappa$ B dengan viabilitas mempunyai hubungan yang tidak bermakna. Ekspresi mRNA NF- $\kappa$ B pada CSC payudara yang lebih tinggi daripada non CSC payudara mengaktivasi protein antiapoptosis yang menghambat apoptosis sehingga viabilitas CSC payudara lebih tinggi. Selain itu viabilitas juga diregulasi oleh faktor transkripsi AP-1. AP-1 diregulasi oleh konsentrasi ROS. Berdasarkan hasil pengukuran konsentrasi ROS, CSC payudara cenderung mempertahankan konsentrasi ROS yang rendah dibandingkan dengan non CSC payudara. Tingkat konsentrasi ROS yang rendah pada CSC payudara saat diberi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.1  $\mu$ M, 11  $\mu$ M, dan 110  $\mu$ M, berperan dalam mempertahankan viabilitas sel dimana CSC payudara cenderung lebih viabel dibandingkan dengan non CSC payudara. Selain itu pada penelitian Aulia 2012 menunjukkan terjadi peningkatan ekspresi survivin yang bermakna pada CSC payudara (CD24-/CD44+) bila dibandingkan dengan non CSC payudara (CD24-/CD44-) dimana survivin merupakan salah satu protein inhibitor antiapoptosis (IAPs) yang diregulasi oleh NF- $\kappa$ B.

## **BAB VI**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1. Kesimpulan**

- Pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> meningkatkan aktivitas spesifik katalase dan aktivitas spesifik GPX pada CSC payudara (CD24-/CD44+) dan non CSC payudara (CD24-/CD44-). Ekspresi mRNA NF-kB pada CSC payudara (CD24-/CD44+) cenderung tetap tetapi menurun pada non CSC payudara (CD24-/CD44-)
- Pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tidak menurunkan viabilitas CSC payudara (CD24-/CD44+), tetapi menurunkan viabilitas sel non CSC payudara (CD24-/CD44-)
- Ekspresi mRNA NF-kB tidak mempunyai hubungan dengan aktivitas spesifik katalase, aktivitas spesifik GPX, aktivitas spesifik MnSOD, dan viabilitas sel.

## **6.2. Saran**

- Modulasi stres oksidatif dengan pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan dosis lebih tinggi pada CSC payudara (CD24-/CD44+)
- Analisis lebih lanjut mengenai jalur kematian sel baik jalur intrinsik maupun jalur ekstrinsik apoptosis.
- Analisis lebih lanjut mengenai peran prooksidan pada CSC Payudara (CD24-/CD44+).
- Analisis lebih lanjut mengenai proliferasi sel yang merupakan salah satu faktor dalam ketahanan hidup CSC Payudara (CD24-/CD44+).
- Analisis lebih lanjut mengenai faktor transkripsi Nrf2 yang meregulasi enzim antioksidan.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Marks DB, Marks AD, Smith CM. Basic Medical Biochemistry : A Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins, 1996: 255.
2. Breast Cancer Overview 2014. [Internet]. [cited 2014 May 22]. Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003037-pdf.pdf>.
3. Cancer incidence, mortality worldwide (GLOBOCAN) in 2012. [Internet]. [cited 2014 May 22 ]. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/pie\\_pop\\_sel.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/pie_pop_sel.aspx).
4. Shipitsin M, Polyak K. The cancer stem cell hypothesis: in search of definition, markers and relevance. Lab Invest. 2008; 88:459-63.
5. Dayem AA, Choi HY, Kim JH, Cho SG. Role of oxidative stress in stem, cancer and cancer stem cells. Cancers. 2010; 2:859-84.
6. Mannelli G, Gallo O. Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers. Cancer Treatment Reviews. 2012; 38: 515–539.
7. Groner† B, Vafaizadeh V, Brill B, Klemmt P. Stem cells of the breast and cancer therapy. Women's Health. 2010; 6(2): 205–219.
8. Tang C, Ang BT, Pervaiz S. Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. Review. FASEB J. 2007; 21:3777-85.
9. Hu Y, Rosen DG, Zhou Y, Feng L, Yang G, et al. mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarium cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. J Biol Chem. 2005; 280:39485-92.
10. Aulia G, Wanandi SI, Jusman SWA. Modulasi Stres Oksidatif pada Ketahanan Hidup Sel Punca Kanker Payudara (CD24-/CD44+): Tinjauan pada Ekspresi *Manganese Superoxide Dismutase*. Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2012.
11. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. Biochemical pharmacology. 2006; 72:1493–505.
12. Niederberger E, Geisslinger G. Analysis of NF-kB signaling pathways by proteomic approaches. Expert Rev. Proteomics. 2010; 7(2):189-203.



13. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Research*. 2011; 21:103-15.
14. Yu YY, Li Q, Zhu ZG. NF- $\kappa$ B as a molecular target in adjuvant therapy of gastrointestinal carcinomas. *EJSO*. 2005; 31: 386–392.
15. Al-Ejeh F, Smart CE, Morrison BJ, Chenefix TG, Lopez JA, et al. Breast cancer stem cells: treatment resistance and therapeutic opportunities. *Carcinogenesis*. 2011; 32(3):1-27.
16. Stem Cells Basics. National Institute of Health, 2009.
17. Alberio R, Campbell KH, Johnson AD. Reprogramming somatic cells into stem cells. *Reproduction* 2006;132:709-20.
18. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res*. 2006; 66:9339–9344.
19. Goldthwaite CA. Are stem cells involved in cancer? [Internet]. [ cited 2014 May 22 ]. Available from: [http://stemcells.nih.gov/info/Regenerative\\_Medicine/pages/2006chapter9.aspx](http://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/pages/2006chapter9.aspx)
20. Cobaleda C, Cruz JJ, Gonzalez-Sarmiento R, Sanchez-Garcia I, Perez-Losada J. The emerging picture of human breast cancer as a stem cell-based disease. *Stem Cell Rev*. 2008; 4:67-79.
21. Ginestier C. ALDH1 is a marker of normal and malignant breast stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*.2007; 1:555-67.
22. Korkaya H, Paulson A, Iovino F, Wicha MS. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene*. 2008; 27:6120-30.
23. Song LL, Miele L. Cancer stem cells: an old idea that's new again: implications for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2007; 7:431-8.
24. Cancer: a disease of stem cells? [Internet]. [ cited 2014 May 22 ]. Available from: <http://www.eurostemcell.org/factsheet/cancer-disease-stem-cells>
25. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Valle NR, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & redox signaling*. 2008; 10:1343-74.
26. Srinivasan A, Lehmler HJ, Robertson LW, and Ludewig G. Production of DNA strand breaks in vitro and reactive oxygen species in vitro and in HL-60 cells by PCB metabolites. *Toxicol Sci*. 2001; 60:92-102.

27. Rhee SG, Yang KS, Kang SW, Woo HA, Chang TS. Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via posttranslational modification. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7:619-626.
28. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000; 149:43-50.
29. Gilmore TD. "Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives". *Oncogene*. 2006; 51: 6680-4.
30. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*. 2013; 12:86.
31. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. 'Role of oxidant in NF- $\kappa$ B activation and TNF- $\alpha$  gene transcription induced by hypoxia and endotoxin". *J Immunol*. 2000; 165 (2): 1013-21.
32. Karin M, Lin A. NF- $\kappa$ B at the crossroads of life and death. *Nature Immunology* 2002; 3:3.
33. Real-Time PCR Applications Guide. Bio-Rad Laboratories, Inc. All rights reserved. 2006.
34. O' Connel J. Methods in molecular biology : RT PCR protocols. Department of Medicine, National University of Ireland, Cork, Ireland. Humana Press. Totowa, New Jersey. 2002.

## Lampiran 1. Metode Analisis Ekspresi mRNA dengan *Real Time* RT-PCR

Dalam analisis ekspresi mRNA gen target dengan menggunakan gen referens, gen referens digunakan sebagai *normalizer* dan tingkat ekspresi pada gen target dan gen referens diperoleh dari hasil *real time* RT-PCR dalam bentuk nilai  $C_T$  (*cycle Threshold*). *Relative quantification* atau konsentrasi relatif mRNA dapat ditentukan dengan beberapa metode diantaranya metode Livak dan metode Pffaf.

### Metode Livak / Metode $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Metode Livak digunakan apabila gen target dan gen referens yang teramplifikasi memiliki nilai efisiensi mendekati 100% dan berjarak 5% antara satu dengan yang lain. Analisis perbedaan tingkat ekspresi gen target pada beberapa sampel yang menggunakan rumus:

1. Normalisasi nilai  $C_T$  gen target terhadap gen referens pada sampel test dan kalibrator  
$$\Delta C_{T(\text{test})} = C_{T(\text{target, test})} - C_{T(\text{ref, test})}$$
$$\Delta C_{T(\text{calibrator})} = C_{T(\text{target, calibrator})} - C_{T(\text{ref, calibrator})}$$
2. Normalisasi nilai  $\Delta C_T$  sampel tes terhadap  $\Delta C_T$  kalibrator  
$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{test})} - \Delta C_{T(\text{calibrator})}$$
3. Perhitungan rasio ekspresi normalisasi  
Rasio ekspresi normalisasi =  $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Keterangan :

Target : gen target ( NF-kB)

Ref : gen referens ( 18S rRNA)

Sampel *test* : sel yang diberikan perlakuan (  $H_2O_2$ )

Sampel *Calibrator* : sel kontrol ( sel yang tidak diberi perlakuan )

**Lampiran 2. Tabel Pengukuran Aktivitas Spesifik GPx dengan kit RANSEL®**

<b>Reagen</b>	<b>Sampel</b>	<b>Kontrol</b>
Diluted Sample	10 $\mu$ l	-
Diluted Control	-	10 $\mu$ l
Reagent R1	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l
Cumene R2	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Baca dengan spektrofotometer pada $\lambda$ 340 nm menit pertama dan ketiga		

$$\frac{A_{3\text{min}} - A_{1\text{min}}}{2} = \Delta A/\text{menit}$$

2

$$\text{Konsentrasi GPx} = 8412 \times \Delta A/\text{menit}$$

### Lampiran 3. Data Konsentrasi dan Pengenceran RNA Total

#### Konsentrasi RNA Total Sel CD24-/44+ & CD24/44-

SAMPEL	Absorban (A260)	Konsentrasi (ng/μl)	Vol. template RNA untuk real time RT-PCR
CD 24-/44+			
K 1	0.545	97.5	1.02
K 2	0.349	85.6	1.16
K 3	0.266	97.7	1.02
110 μM 1	0.292	87.1	1.14
110 μM 2	0.19	85.8	1.16
110 μM 3	0.225	83.3	1.2
11 μM 1	0.509	101.7	0.98
11 μM 2	0.292	83.3	1.2
11 μM 3	0.235	78.8	1.26
1.1 μM 1	0.531	109.7	0.91
1.1 μM 2	0.662	180.9	0.54
1.1 μM 3	0.692	205.5	0.48
CD 24-/44-			
K 1	0.321	114.6	0.87
K 2	0.203	103.1	0.97
K 3	0.29	119.5	0.83
110 μM 1	0.167	56.7	1.76
110 μM 2	0.177	64.8	1.54
110 μM 3	0.186	76.4	1.31
11 μM 1	0.209	123.1	0.81
11 μM 2	0.207	101.9	0.98
11 μM 3	0.227	128	0.78
1.1 μM 1	0.214	116.6	0.85
1.1 μM 2	0.205	117	0.85
1.1 μM 3	0.29	96.3	1.04

#### Keterangan

Konsentrasi RNA dihitung menggunakan Varioskan Flash® Thermo Scientific

**Lampiran 4. Data Analisis Rasio Ekspresi mRNA NF-kB pada CSC  
Payudara (CD24-/CD44+)**

**Data Analisis Rasio Ekspresi mRNA NF-kB pada CSC Payudara (CD24-/CD44+) terhadap Kontrol**

Gen Target	Kode Sampel	C(t)	$\Delta C_t$ target (Ca)	$\Delta C_t$ cal (N)	Mean $\Delta C_t$ cal (N)	Normalisasi ( $\Delta \Delta C_t$ ) terhadap kontrol	Rasio normalisasi terhadap kontrol	Mean	SD
NF-kB	K1+	27.69		19.325	19.03	0	1	1	
		27.64		19.275		0	1		
NF-kB	K2+	27.86		19.495		0	1		
		26.9		18.535		0	1		
NF-kB	K3+	27.08		18.715		0	1		
		27.2		18.835		0	1		
NF-kB	110 $\mu$ M 1+	27.64	19.039			0.009	0.993781	1.0648	0.2118
		27.91	19.309			0.279	0.824162		
NF-kB	110 $\mu$ M 2+	27.33	18.729			-0.301	1.231998		
		27.15	18.549			-0.481	1.395711		
NF-kB	110 $\mu$ M 3+	27.59	18.989			-0.041	1.028827		
		27.76	19.159			0.129	0.914465		
NF-kB	11 $\mu$ M 1+	27.64	19.047			0.017	0.988286	1.1114	0.0953
		27.52	18.927			-0.103	1.074004		
NF-kB	11 $\mu$ M 2+	27.36	18.767			-0.263	1.199971		
		27.32	18.727			-0.303	1.233707		
NF-kB	11 $\mu$ M 3+	27.57	18.977			-0.053	1.03742		
		27.44	18.847			-0.183	1.135242		
NF-kB	1.1 $\mu$ M 1+	28.5	18.21			-0.82	1.765406	1.133	0.3727
		28.87	18.58			-0.45	1.36604		
NF-kB	1.1 $\mu$ M 2+	29.45	19.16			0.13	0.913831		
		29.75	19.46			0.43	0.742262		
NF-kB	1.1 $\mu$ M 3+	29.23	18.94			-0.09	1.06437		
		29.4	19.11			0.08	0.946058		



Gen Target	Kode Sampel	C(t)	Rata2 Ct target (Ca)
18sRNA	K1+	8.49	8.54
18sRNA	K1+	8.59	
18sRNA	K2+	8.04	8.165
18sRNA	K2+	8.29	
18sRNA	K3+	8.38	8.39
18sRNA	K3+	8.4	
18sRNA	110 $\mu$ M 1+	8.78	8.905
18sRNA	110 $\mu$ M 1+	9.03	
18sRNA	110 $\mu$ M 2+	8.2	8.3
18sRNA	110 $\mu$ M 2+	8.4	
18sRNA	110 $\mu$ M 3+	8.52	8.6
18sRNA	110 $\mu$ M 3+	8.68	
18sRNA	11 $\mu$ M 1+	8.12	8.185
18sRNA	11 $\mu$ M 1+	8.25	
18sRNA	11 $\mu$ M 2+	8.14	8.28
18sRNA	11 $\mu$ M 2+	8.42	
18sRNA	11 $\mu$ M 3+	10.32	9.315
18sRNA	11 $\mu$ M 3+	8.31	
18sRNA	1.1 $\mu$ M 1+	9.7	9.42333
18sRNA	1.1 $\mu$ M 1+	9.47	
18sRNA	1.1 $\mu$ M 1+	9.1	
18sRNA	1.1 $\mu$ M 2+	10.33	10.3433
18sRNA	1.1 $\mu$ M 2+	10.49	
18sRNA	1.1 $\mu$ M 2+	10.21	
18sRNA	1.1 $\mu$ M 3+	9.74	11.1033
18sRNA	1.1 $\mu$ M 3+	10.06	
18sRNA	1.1 $\mu$ M 3+	13.51	



**Lampiran 5. Data Analisis Rasio Ekspresi mRNA NF-kB pada non-CSC Payudara (CD24-/CD44-)**

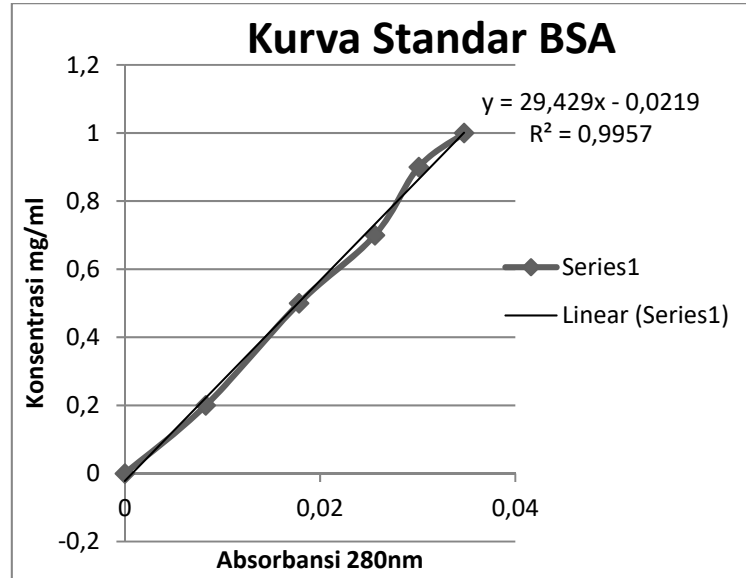
**Data Analisis Rasio Ekspresi mRNA NF-kB pada non-CSC Payudara (CD24-/CD44-) terhadap Kontrol**

Gen Target	Kode Sampel	C(t)	$\Delta C_t$ target (Ca)	$\Delta C_t$ cal (N)	Mean $\Delta C_t$ cal (N)	Normalisasi ( $\Delta \Delta C_t$ ) terhadap kontrol	Rasio normalisasi terhadap kontrol	Mean	SD
NF-kB	K1-	26.75		18.655	18.85	0	1	1	
		27.22		19.125		0			
NF-kB	K2-	26.82		18.725		0	1		
		26.71		18.615		0			
NF-kB	K3-	26.97		18.875		0	1		
		27.2		19.105		0			
NF-kB	110 $\mu$ M 1-	27.92	18.815			-0.035	1.024557	1.1524	0.1312
		27.63	18.525			-0.325	1.252664		
NF-kB	110 $\mu$ M 2-	27.82	18.715			-0.135	1.098093		
		27.97	18.865			0.015	0.989657		
NF-kB	110 $\mu$ M 3-	27.59	18.485			-0.365	1.287882		
		27.62	18.515			-0.335	1.261377		
NF-kB	11 $\mu$ M 1-	27.9	19.802			0.952	0.516915	0.5855	0.0513
		27.82	19.722			0.872	0.546389		
NF-kB	11 $\mu$ M 2-	27.66	19.562			0.712	0.610473		
		27.78	19.682			0.832	0.56175		
NF-kB	11 $\mu$ M 3-	27.58	19.482			0.632	0.645281		
		27.61	19.512			0.662	0.632002		
NF-kB	1.1 $\mu$ M 1-	27.38	18.872			0.022	0.984866	0.697	0.433
		27.27	18.762			-0.088	1.062896		
NF-kB	1.1 $\mu$ M 2-	27.32	18.812			-0.038	1.02669		
		27.68	19.172			0.322	0.79996		
NF-kB	1.1 $\mu$ M 3-	31.04	22.532			3.682	0.077913		
		29.48	20.972			2.122	0.229728		

Gen Target	Kode Sampel	C(t)	Rata2 Ct target (Ca)
18sRNA	K1-	8.03	8.015
18sRNA	K1-	8	
18sRNA	K2-	8.24	8.225
18sRNA	K2-	8.21	
18sRNA	K3-	8.01	8.045
18sRNA	K3-	8.08	
18sRNA	110 $\mu$ M 1-	8.74	8.715
18sRNA	110 $\mu$ M 1-	8.69	
18sRNA	110 $\mu$ M 2-	9.65	9.71
18sRNA	110 $\mu$ M 2-	9.77	
18sRNA	110 $\mu$ M 3-	8.73	8.89
18sRNA	110 $\mu$ M 3-	9.05	
18sRNA	11 $\mu$ M 1-	8.24	8.3
18sRNA	11 $\mu$ M 1-	8.36	
18sRNA	11 $\mu$ M 2-	7.76	7.75
18sRNA	11 $\mu$ M 2-	7.74	
18sRNA	11 $\mu$ M 3-	8.24	8.245
18sRNA	11 $\mu$ M 3-	8.25	
18sRNA	1.1 $\mu$ M 1-	8	7.985
18sRNA	1.1 $\mu$ M 1-	7.97	
18sRNA	1.1 $\mu$ M 2-	8.44	8.34
18sRNA	1.1 $\mu$ M 2-	8.24	
18sRNA	1.1 $\mu$ M 3-	8.13	9.2
18sRNA	1.1 $\mu$ M 3-	10.27	

**Lampiran 6. Kurva Standar BSA dan Tabel Perhitungan Konsentrasi Protein**

**Kurva Standar Protein BSA**



**Tabel Perhitungan Konsentrasi Protein**

SAMPEL	OD 1	OD 2	MEAN OD	Sampel-Blanko	Prot Total (mg/ml)
CD 24- /44+					
K 1	0.067897	0.054837	0.06137	0.02381	0.679
K 2	0.066071	0.053246	0.05966	0.0221	0.628
K 3	0.070621	0.055415	0.06302	0.02546	0.727
110 $\mu$ M 1	0.053531	0.054261	0.05389	0.01633	0.459
110 $\mu$ M 2	0.050573	0.048075	0.04933	0.01177	0.324
110 $\mu$ M 3	0.064297	0.050292	0.05729	0.01973	0.559
11 $\mu$ M 1	0.048904	0.050941	0.04992	0.01236	0.342
11 $\mu$ M 2	0.046145	0.048589	0.04737	0.00981	0.267
11 $\mu$ M 3	0.04495	0.046448	0.04573	0.00817	0.219
1.1 $\mu$ M 1	0.048845	0.050598	0.04972	0.01216	0.336
1.1 $\mu$ M 2	0.048258	0.051605	0.04994	0.01238	0.342
1.1 $\mu$ M 3	0.044109	0.048726	0.04642	0.00886	0.239
CD 24-/44-					
K 1	0.118064	0.115514	0.116	0.07844	2.287
K 2	0.052649	0.057688	0.05517	0.01761	0.496
K 3	0.053039	0.052893	0.05296	0.0154	0.431
110 $\mu$ M 1	0.10028	0.096462	0.098	0.06044	1.757
110 $\mu$ M 2	0.045812	0.042595	0.04609	0.00853	0.229
110 $\mu$ M 3	0.047257	0.046358	0.04681	0.00925	0.25
11 $\mu$ M 1	0.096562	0.088937	0.093	0.05544	1.61
11 $\mu$ M 2	0.053856	0.049678	0.05177	0.01421	0.396
11 $\mu$ M 3	0.055499	0.052267	0.05389	0.01633	0.459
1.1 $\mu$ M 1	0.053021	0.051	0.052	0.01444	0.404
1.1 $\mu$ M 2	0.05014	0.050398	0.05025	0.01269	0.352
1.1 $\mu$ M 3	0.0493	0.05268	0.051	0.01344	0.374

**Lampiran 7. Data Perhitungan Aktivitas Spesifik Katalase Pada CSC**

**Payudara dan non-CSC Payudara**

Kode Sampel	Blanko			Sampel			$\Delta S - \Delta B$	$\frac{\Delta S - \Delta B}{\text{menit}} (t1-t2)$	Aktivitas Katalase (U/mL)	Aktivitas Spesifik Katalase (U/mg)	Rata2 Aktivitas spesifik Katalase (U/mL)
	t1	t2	$\Delta B_{t1-t2}$	t1	t2	$\Delta S_{t1-t2}$					
CD 24- /44+											
K 1	0.326	0.325	0.001	0.322	0.319	0.003	0.002	0.001	0.0735	0.108	0.1205
	0.326	0.325	0.001	0.334	0.33	0.004	0.003	0.0015	0.1103	0.162	
K 2	0.326	0.325	0.001	0.357	0.353	0.004	0.003	0.0015	0.1103	0.176	
	0.326	0.325	0.001	0.372	0.368	0.004	0.003	0.0015	0.1103	0.176	
K 3	0.326	0.325	0.001	0.433	0.431	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.051	
	0.326	0.325	0.001	0.436	0.434	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.051	
110 $\mu$ M 1	0.326	0.325	0.001	0.32	0.316	0.004	0.003	0.0015	0.1103	0.24	0.1588
	0.326	0.325	0.001	0.316	0.312	0.004	0.003	0.0015	0.1103	0.24	
110 $\mu$ M 2	0.326	0.325	0.001	0.356	0.354	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.113	
	0.326	0.325	0.001	0.376	0.373	0.003	0.002	0.001	0.0735	0.227	
110 $\mu$ M 3	0.326	0.325	0.001	0.426	0.424	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.066	
	0.326	0.325	0.001	0.402	0.4	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.066	
11 $\mu$ M 1	0.326	0.325	0.001	0.317	0.314	0.003	0.002	0.001	0.0735	0.215	0.2424
	0.326	0.325	0.001	0.314	0.311	0.003	0.002	0.001	0.0735	0.215	
11 $\mu$ M 2	0.326	0.325	0.001	0.358	0.355	0.003	0.002	0.001	0.0735	0.275	
	0.326	0.325	0.001	0.365	0.361	0.004	0.003	0.0015	0.1103	0.413	
11 $\mu$ M 3	0.326	0.325	0.001	0.388	0.386	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.168	
	0.326	0.325	0.001	0.387	0.385	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.168	
1.1 $\mu$ M 1	0.326	0.325	0.001	0.309	0.306	0.003	0.002	0.001	0.0735	0.219	0.3086
	0.326	0.325	0.001	0.313	0.31	0.003	0.002	0.001	0.0735	0.219	
1.1 $\mu$ M 2	0.326	0.325	0.001	0.366	0.362	0.004	0.003	0.0015	0.1103	0.322	
	0.326	0.325	0.001	0.383	0.379	0.004	0.003	0.0015	0.1103	0.322	
1.1 $\mu$ M 3	0.326	0.325	0.001	0.367	0.364	0.003	0.002	0.001	0.0735	0.308	
	0.326	0.325	0.001	0.375	0.371	0.004	0.003	0.0015	0.1103	0.461	

Kode Sampel	Blanko			Sampel			$\Delta S - \Delta B$	$\Delta S - \Delta B$ /menit (t1-t2)	Aktivitas Katalase (U/mL)	Aktivitas Spesifik Katalase (U/mg)	Rata2 Aktivitas spesifik Katalase (U/mL)
	t1	t2	$\Delta B$ t1-t2	t1	t2	$\Delta S$ t1-t2					
CD 24- /44-											
K 1	0.326	0.325	0.001	0.299	0.297	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.016	0.1012
	0.326	0.325	0.001	0.3	0.298	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.016	
K 2	0.326	0.325	0.001	0.37	0.368	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.074	
	0.326	0.325	0.001	0.37	0.368	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.074	
K 3	0.326	0.325	0.001	0.378	0.375	0.003	0.002	0.001	0.0735	0.171	
	0.326	0.325	0.001	0.386	0.382	0.004	0.003	0.0015	0.1103	0.256	
110 $\mu$ M 1	0.326	0.325	0.001	0.319	0.317	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.021	0.2075
	0.326	0.325	0.001	0.318	0.316	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.021	
110 $\mu$ M 2	0.326	0.325	0.001	0.362	0.36	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.161	
	0.326	0.325	0.001	0.374	0.372	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.161	
110 $\mu$ M 3	0.326	0.325	0.001	0.377	0.373	0.004	0.003	0.0015	0.1103	0.441	
	0.326	0.325	0.001	0.396	0.392	0.004	0.003	0.0015	0.1103	0.441	
11 $\mu$ M 1	0.326	0.325	0.001	0.289	0.286	0.003	0.002	0.001	0.0735	0.046	0.1689
	0.326	0.325	0.001	0.297	0.295	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.023	
11 $\mu$ M 2	0.326	0.325	0.001	0.384	0.38	0.004	0.003	0.0015	0.1103	0.279	
	0.326	0.325	0.001	0.394	0.391	0.003	0.002	0.001	0.0735	0.186	
11 $\mu$ M 3	0.326	0.325	0.001	0.365	0.361	0.004	0.003	0.0015	0.1103	0.24	
	0.326	0.325	0.001	0.376	0.372	0.004	0.003	0.0015	0.1103	0.24	
1.1 $\mu$ M 1	0.326	0.325	0.001	0.324	0.319	0.005	0.004	0.002	0.1471	0.364	0.2569
	0.326	0.325	0.001	0.325	0.322	0.003	0.002	0.001	0.0735	0.182	
1.1 $\mu$ M 2	0.326	0.325	0.001	0.358	0.356	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.104	
	0.326	0.325	0.001	0.323	0.321	0.002	0.001	0.0005	0.0368	0.104	
1.1 $\mu$ M 3	0.326	0.325	0.001	0.366	0.36	0.006	0.005	0.0025	0.1838	0.492	
	0.326	0.325	0.001	0.364	0.36	0.004	0.003	0.0015	0.1103	0.295	

**Lampiran 8. Data Konsentrasi Relatif Aktivitas Katalase pada CSC Payudara dan non-CSC Payudara terhadap Kontrol.**

Kode Sampel	Aktivitas Spesifik Katalase (U/mg)	Mean (U/mg prot)	Rasio terhadap kontrol	Mean Rasio	SD
CD24-/44+					
K 1	0.108	0.121			
	0.162				
K 2	0.176				
	0.176				
K 3	0.051				
	0.051				
110 $\mu$ M 1	0.24		1.994	1.317	0.717
	0.24		1.994		
110 $\mu$ M 2	0.113		0.942		
	0.227		1.883		
110 $\mu$ M 3	0.066		0.546		
	0.066		0.546		
11 $\mu$ M 1	0.215		1.784	2.011	0.768
	0.215		1.784		
11 $\mu$ M 2	0.275		2.285		
	0.413		3.428		
11 $\mu$ M 3	0.168		1.393		
	0.168		1.393		
1.1 $\mu$ M 1	0.219		1.816	2.561	0.741
	0.219		1.816		
1.1 $\mu$ M 2	0.322		2.676		
	0.322		2.676		
1.1 $\mu$ M 3	0.308		2.553		
	0.461		3.83		

Kode Sampel	Aktivitas Spesifik Katalase (U/mg)	Mean (U/mg prot)	Rasio terhadap kontrol	Mean Rasio	SD
CD24-/44-					
K 1	0.01608	0.1012			
	0.01608				
K 2	0.07412				
	0.07412				
K 3	0.1706				
	0.2559				
110 $\mu$ M 1	0.02092		0.207	2.0509	
	0.02092		0.207		
110 $\mu$ M 2	0.16054		1.586		
	0.16054		1.586		
110 $\mu$ M 3	0.44118		4.359		
	0.44118		4.359		1.891665
11 $\mu$ M 1	0.04567		0.451	1.6688	
	0.02284		0.226		
11 $\mu$ M 2	0.27852		2.752		
	0.18568		1.835		
11 $\mu$ M 3	0.24029		2.374		
	0.24029		2.374		1.07351
1.1 $\mu$ M 1	0.36401		3.597	2.5384	
	0.182		1.798		
1.1 $\mu$ M 2	0.10445		1.032		
	0.10445		1.032		
1.1 $\mu$ M 3	0.49151		4.857		
	0.2949		2.914		1.531149



**Lampiran 9. Data Perhitungan Aktivitas Spesifik GPx Pada CSC Payudara dan non-CSC Payudara.**

Kode Sampel	Sampel		$\Delta S$ (T1-T2)	$\Delta S-\Delta B$ /menit	Aktivitas GPx (U/l)	Protein Total (mg)	Aktivitas Spesifik GPx (U/mg)	Rata2 Aktivitas spesifik GPx (U/mg)
	T1 (01.00)	T2 (03.00)						
CD 24- /44+								
K 1	1.244	1.228	0.016	0.008	67.296	0.679	99.11046	130.2589
	1.245	1.229	0.016	0.008	67.296		99.11046	
K 2	1.279	1.251	0.028	0.014	117.768	0.628	187.5287	
	1.279	1.251	0.028	0.014	117.768		187.5287	
K 3	1.297	1.278	0.019	0.0095	79.914	0.727	109.923	
	1.283	1.266	0.017	0.0085	71.502		98.35213	
110 $\mu$ M 1	1.242	1.221	0.021	0.0105	88.326	0.459	192.4314	181.4996
	1.247	1.226	0.021	0.0105	88.326		192.4314	
110 $\mu$ M 2	1.144	1.132	0.012	0.006	50.472	0.324	155.7778	
	1.157	1.142	0.015	0.0075	63.09		194.7222	
110 $\mu$ M 3	1.282	1.259	0.023	0.0115	96.738	0.559	173.0555	
	1.28	1.256	0.024	0.012	100.944		180.5796	
11 $\mu$ M 1	1.251	1.228	0.023	0.0115	96.738	0.342	282.8596	248.7216
	1.255	1.232	0.023	0.0115	96.738		282.8596	
11 $\mu$ M 2	1.18	1.165	0.015	0.0075	63.09	0.267	236.2921	
	1.194	1.177	0.017	0.0085	71.502		267.7978	
11 $\mu$ M 3	1.191	1.181	0.01	0.005	42.06	0.219	192.0548	
	1.204	1.192	0.012	0.006	50.472		230.4658	
1.1 $\mu$ M 1	1.256	1.232	0.024	0.012	100.944	0.336	300.4286	255.4941
	1.256	1.231	0.025	0.0125	105.15		312.9464	
1.1 $\mu$ M 2	1.208	1.189	0.019	0.0095	79.914	0.342	233.6667	
	1.214	1.194	0.02	0.01	84.12		245.9649	
1.1 $\mu$ M 3	1.212	1.201	0.011	0.0055	46.266	0.239	193.5816	
	1.227	1.213	0.014	0.007	58.884		246.3766	



Kode Sampel	Sampel		$\Delta S$ (T1-T2)	Aktivitas GPx (U/l) $\Delta S-\Delta B$ /menit	Aktivitas GPx (U/l)	Protein Total (mg)	Aktivitas Spesifik GPx (U/mg)	Rata2 Aktivitas spesifik GPx (U/mg)
	T1 (01.00)	T2 (03.00)						
CD 24-44-								
K 1	1.263	1.237	0.026	0.013	109.356	2.287	47.81635	132.0103
	1.261	1.235	0.026	0.013	109.356		47.81635	
K 2	1.226	1.205	0.021	0.0105	88.326	0.496	178.0766	
	1.229	1.207	0.022	0.011	92.532		186.5565	
K 3	1.242	1.225	0.017	0.0085	71.502	0.431	165.8979	
	1.25	1.233	0.017	0.0085	71.502		165.8979	
110 $\mu$ M 1	1.267	1.241	0.026	0.013	109.356	1.757	62.24018	274.774
	1.267	1.239	0.028	0.014	117.768		67.02789	
110 $\mu$ M 2	1.238	1.215	0.023	0.0115	96.738	0.229	422.4367	
	1.246	1.222	0.024	0.012	100.944		440.8035	
110 $\mu$ M 3	1.268	1.248	0.02	0.01	84.12	0.25	336.48	
	1.279	1.26	0.019	0.0095	79.914		319.656	
11 $\mu$ M 1	1.271	1.243	0.028	0.014	117.768	1.61	73.14783	176.7935
	1.275	1.247	0.028	0.014	117.768		73.14783	
11 $\mu$ M 2	1.253	1.229	0.024	0.012	100.944	0.396	254.9091	
	1.254	1.229	0.025	0.0125	105.15		265.5303	
11 $\mu$ M 3	1.288	1.267	0.021	0.0105	88.326	0.459	192.4314	
	1.298	1.276	0.022	0.011	92.532		201.5948	
1.1 $\mu$ M 1	1.275	1.244	0.031	0.0155	130.386	0.404	322.7376	295.6422
	1.276	1.247	0.029	0.0145	121.974		301.9158	
1.1 $\mu$ M 2	1.263	1.237	0.026	0.013	109.356	0.352	310.6705	
	1.265	1.24	0.025	0.0125	105.15		298.7216	
1.1 $\mu$ M 3	1.305	1.281	0.024	0.012	100.944	0.374	269.9037	
	1.31	1.286	0.024	0.012	100.944		269.9037	

**Lampiran 10. Data Konsentrasi Relatif Aktivitas GPx pada CSC Payudara dan non-CSC Payudara terhadap Kontrol.**

Kode Sampel	Aktivitas Spesifik GPx (U/mg)	Mean (U/mg prot)	Rasio terhadap kontrol	Mean Rasio	SD
CD24- /CD44+					
K 1	99.11	130.3			
	99.11				
K 2	187.5				
	187.5				
K 3	109.9				
	98.35				
110 $\mu$ M 1	192.4		1.4773	1.3934	0.11631
	192.4		1.4773		
110 $\mu$ M 2	155.8		1.1959		
	194.7		1.4949		
110 $\mu$ M 3	173.1		1.3286		
	180.6		1.3863		
11 $\mu$ M 1	282.9		2.1715	1.9094	0.27452
	282.9		2.1715		
11 $\mu$ M 2	236.3		1.814		
	267.8		2.0559		
11 $\mu$ M 3	192.1		1.4744		
	230.5		1.7693		
1.1 $\mu$ M 1	300.4		2.3064	1.9614	0.33994
	312.9		2.4025		
1.1 $\mu$ M 2	233.7		1.7939		
	246		1.8883		
1.1 $\mu$ M 3	193.6		1.4861		
	246.4		1.8914		

Kode Sampel	Aktivitas Spesifik GPx (U/mg)	Mean (U/mg prot)	Rasio terhadap kontrol	Mean Rasio	SD
K 1	47.8164	132			
	47.8164				
K 2	178.077				
	186.556				
K 3	165.898				
	165.898				
110 $\mu$ M 1	62.2402		0.4715	2.0815	1.28341
	67.0279		0.5077		
110 $\mu$ M 2	422.437		3.2		
	440.803		3.3392		
110 $\mu$ M 3	336.48		2.5489		
	319.656		2.4214		
11 $\mu$ M 1	73.1478		0.5541	1.3392	0.64563
	73.1478		0.5541		
11 $\mu$ M 2	254.909		1.931		
	265.53		2.0114		
11 $\mu$ M 3	192.431		1.4577		
	201.595		1.5271		
1.1 $\mu$ M 1	322.738		2.4448	2.2395	0.16366
	301.916		2.2871		
1.1 $\mu$ M 2	310.67		2.3534		
	298.722		2.2629		
1.1 $\mu$ M 3	269.904		2.0446		
	269.904		2.0446		

**Lampiran 11. Data Perhitungan Viabilitas sel dengan MTS Assay Pada CSC Payudara dan non-CSC Payudara.**

Kode Sampel	Absorbansi Sampel-Blanko (Å) 490 nm	Rata2 Absorbansi Sampel-Blanko (Å) 490 nm	Rasio terhadap kontrol
CD24-/CD44+			
Kontrol 1	0.101	0.090	1.000
Kontrol 2	0.094		
Kontrol 3	0.075		
1.1 µM	0.101	0.095	1.056
1.1 µM	0.102		
1.1 µM	0.082		
11 µM	0.076	0.090	1.000
11 µM	0.121		
11 µM	0.073		
110 µM	0.081	0.100	1.111
110 µM	0.101		
110 µM	0.118		
CD24-/CD44-			
Kontrol 1	0.209	0.202	1.000
Kontrol 2	0.196		
Kontrol 3	0.200		
1.1 µM	0.245	0.163	0.810
1.1 µM	0.113		
1.1 µM	0.132		
11 µM	0.054	0.098	0.484
11 µM	0.130		
11 µM	0.109		
110 µM	0.024	0.043	0.215
110 µM	0.048		
110 µM	0.058		

**Lampiran 12. Analisis Statistik Antar Kelompok dengan uji *Anova one way*,  
*Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney***

Analisis rasio ekspresi mRNA NF-kB, rasio aktivitas spesifik katalase, dan rasio aktivitas spesifik GPX.

Uji Normalitas

Tests of Normality							
	non/CSC 1.1uM	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Rasio Ekspresi NFkB	CSC 1.1uM	.240	6	.200 <sup>*</sup>	.910	6	.439
	CSC 11uM	.157	6	.200 <sup>*</sup>	.961	6	.824
	CSC 110uM	.234	6	.200 <sup>*</sup>	.942	6	.677
	nonCSC 1.1uM	.261	6	.200 <sup>*</sup>	.813	6	.077
	nonCSC 11uM	.187	6	.200 <sup>*</sup>	.934	6	.613
	nonCSC 110uM	.278	6	.164	.859	6	.185
Rasio Aktivitas spesifik katalase	CSC 1.1uM	.272	6	.189	.872	6	.232
	CSC 11uM	.283	6	.145	.824	6	.095
	CSC 110uM	.285	6	.139	.786	6	.044
	nonCSC 1.1uM	.186	6	.200 <sup>*</sup>	.916	6	.480
	nonCSC 11uM	.245	6	.200 <sup>*</sup>	.849	6	.155
	nonCSC 110uM	.264	6	.200 <sup>*</sup>	.822	6	.092
Rasio Aktivitas spesifik GPx	CSC 1.1uM	.248	6	.200 <sup>*</sup>	.931	6	.586
	CSC 11uM	.203	6	.200 <sup>*</sup>	.900	6	.376
	CSC 110uM	.265	6	.200 <sup>*</sup>	.866	6	.211
	nonCSC 1.1uM	.223	6	.200 <sup>*</sup>	.895	6	.344
	nonCSC 11uM	.239	6	.200 <sup>*</sup>	.848	6	.152
	nonCSC 110uM	.271	6	.191	.828	6	.103

Uji varians

**Test of Homogeneity of Variances**

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Rasio Ekspresi NFkB	6.665	5	30	.000
Rasio Aktivitas spesifik katalase	3.321	5	30	.017
Rasio Aktivitas spesifik GPx	10.893	5	30	.000

## Uji Anova one way

### ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Rasio Ekspresi NFkB	Between Groups	1.862	5	.372	5.581	.001
	Within Groups	2.001	30	.067		
	Total	3.863	35			
Rasio Aktivitas spesifik katalase	Between Groups	7.077	5	1.415	.973	.450
	Within Groups	43.640	30	1.455		
	Total	50.717	35			
Rasio Aktivitas spesifik GPx	Between Groups	4.113	5	.823	2.150	.086
	Within Groups	11.476	30	.383		
	Total	15.589	35			

### Post Hoc

#### Multiple Comparisons

Games-Howell

Dependent Variable	(I) non/CSC 1.1 uM	(J) non/CSC 1.1 uM	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Rasio Ekspresi NFkB	CSC 1.1uM	CSC 11uM	.0215561	.1570578	1.000	-.616997	.660109
		CSC 110uM	.0681706	.1750158	.998	-.572847	.709188
		nonCSC 1.1uM	.4359858	.2332573	.470	-.377822	1.249793
		nonCSC 11uM	.5475262	.1535981	.092	-.097777	1.192829
		nonCSC 110uM	-.0193771	.1613151	1.000	-.653605	.614850
	CSC 11uM	CSC 1.1uM	-.0215561	.1570578	1.000	-.660109	.616997
		CSC 110uM	.0466145	.0948161	.995	-.313529	.406758
		nonCSC 1.1uM	.4144297	.1810208	.330	-.329883	1.158743
		nonCSC 11uM	.5259701 <sup>*</sup>	.0441809	.000	.362787	.689154
		nonCSC 110uM	-.0409332	.0661976	.987	-.275344	.193478
	CSC 110uM	CSC 1.1uM	-.0681706	.1750158	.998	-.709188	.572847
		CSC 11uM	-.0466145	.0948161	.995	-.406758	.313529
		nonCSC 1.1uM	.3678152	.1968042	.484	-.370115	1.105745
		nonCSC 11uM	.4793556 <sup>*</sup>	.0889681	.015	.116055	.842656
		nonCSC 110uM	-.0875477	.1017128	.946	-.455299	.280204
	nonCSC 1.1uM	CSC 1.1uM	-.4359858	.2332573	.470	-1.249793	.377822
		CSC 11uM	-.4144297	.1810208	.330	-1.158743	.329883
		CSC 110uM	-.3678152	.1968042	.484	-1.105745	.370115
		nonCSC 11uM	.1115404	.1780274	.984	-.639277	.862358
		nonCSC 110uM	-.4553629	.1847266	.268	-1.194411	.283685
nonCSC 11uM	CSC 1.1uM	-.5475262	.1535981	.092	-1.192829	.097777	
	CSC 11uM	-.5259701 <sup>*</sup>	.0441809	.000	-.689154	-.362787	
	CSC 110uM	-.4793556 <sup>*</sup>	.0889681	.015	-.842656	-.116055	
	nonCSC 1.1uM	-.1115404	.1780274	.984	-.862358	.639277	
	nonCSC 110uM	-.5669033 <sup>†</sup>	.0575095	.000	-.789873	-.343934	
nonCSC 110uM	CSC 1.1uM	.0193771	.1613151	1.000	-.614850	.653605	
	CSC 11uM	.0409332	.0661976	.987	-.193478	.275344	
	CSC 110uM	.0875477	.1017128	.946	-.280204	.455299	
	nonCSC 1.1uM	.4553629	.1847266	.268	-.283685	1.194411	
	nonCSC 11uM	.5669033 <sup>†</sup>	.0575095	.000	.343934	.789873	



Rasio Aktivitas spesifik katalase	CSC 1.1uM	CSC 11uM	.5499047	.4357345	.798	-.963931	2.063740
		CSC 110uM	1.2438040	.4208821	.109	-.218385	2.705993
		nonCSC 1.1uM	.0228887	.6944594	1.000	-2.585287	2.631065
		nonCSC 11uM	.8924882	.5325489	.576	-1.004791	2.789767
		nonCSC 110uM	.5104055	.8294199	.986	-2.704452	3.725263
	CSC 11uM	CSC 1.1uM	-.5499047	.4357345	.798	-2.063740	.963931
		CSC 110uM	.6938993	.4288713	.606	-.797146	2.184944
		nonCSC 1.1uM	-.5270160	.6993302	.968	-3.138808	2.084777
		nonCSC 11uM	.3425835	.5388852	.985	-1.568951	2.254118
		nonCSC 110uM	-.0394992	.8335024	1.000	-3.253884	3.174886
	CSC 110uM	CSC 1.1uM	-1.2438040	.4208821	.109	-2.705993	.218385
		CSC 11uM	-.6938993	.4288713	.606	-2.184944	.797146
		nonCSC 1.1uM	-1.2209153	.6901738	.534	-3.826537	1.384706
		nonCSC 11uM	-.3513158	.5269482	.981	-2.236784	1.534153
		nonCSC 110uM	-.7333985	.8258349	.937	-3.949140	2.482343
	nonCSC 1.1uM	CSC 1.1uM	-.0228887	.6944594	1.000	-2.631065	2.585287
		CSC 11uM	.5270160	.6993302	.968	-2.084777	3.138808
		CSC 110uM	1.2209153	.6901738	.534	-1.384706	3.826537
		nonCSC 11uM	.8695995	.7634177	.854	-1.844977	3.584176
		nonCSC 110uM	.4875168	.9935469	.995	-2.993743	3.968776
	nonCSC 11uM	CSC 1.1uM	-.8924882	.5325489	.576	-2.789767	1.004791
		CSC 11uM	-.3425835	.5388852	.985	-2.254118	1.568951
		CSC 110uM	.3513158	.5269482	.981	-1.534153	2.236784
		nonCSC 1.1uM	-.8695995	.7634177	.854	-3.584176	1.844977
nonCSC 110uM		-.3820827	.8879583	.997	-3.635016	2.870851	
nonCSC 110uM	CSC 1.1uM	-.5104055	.8294199	.986	-3.725263	2.704452	
	CSC 11uM	.0394992	.8335024	1.000	-3.174886	3.253884	
	CSC 110uM	.7333985	.8258349	.937	-2.482343	3.949140	
	nonCSC 1.1uM	-.4875168	.9935469	.995	-3.968776	2.993743	
	nonCSC 11uM	.3820827	.8879583	.997	-2.870851	3.635016	
Rasio Aktivitas spesifik GPx	CSC 1.1uM	CSC 11uM	.0519926	.1783814	1.000	-.573148	.677133
		CSC 110uM	.5680571	.1466760	.054	-.010655	1.146769
		nonCSC 1.1uM	-.2781059	.1540238	.515	-.857054	.300842
		nonCSC 11uM	.6221925	.2978803	.380	-.481875	1.726260
		nonCSC 110uM	-.1200264	.5420172	1.000	-2.317007	2.076954
	CSC 11uM	CSC 1.1uM	-.0519926	.1783814	1.000	-.677133	.573148
		CSC 110uM	.5160645	.1217174	.031	.049556	.982573
		nonCSC 1.1uM	-.3300985	.1304783	.219	-.804526	.144329
		nonCSC 11uM	.5701999	.2864157	.431	-.526964	1.667364
		nonCSC 110uM	-.1720190	.5358021	.999	-2.379168	2.035130
	CSC 110uM	CSC 1.1uM	-.5680571	.1466760	.054	-1.146769	.010655
		CSC 11uM	-.5160645	.1217174	.031	-.982573	-.049556
		nonCSC 1.1uM	-.8461630	.0819667	.000	-1.137148	-.555179
		nonCSC 11uM	.0541354	.2678206	1.000	-1.059638	1.167908
		nonCSC 110uM	-.6880835	.5260968	.773	-2.917222	1.541055
	nonCSC 1.1uM	CSC 1.1uM	.2781059	.1540238	.515	-.300842	.857054
		CSC 11uM	.3300985	.1304783	.219	-.144329	.804526
		CSC 110uM	.8461630	.0819667	.000	.555179	1.137148
		nonCSC 11uM	.9002984	.2719143	.110	-.206016	2.006613
		nonCSC 110uM	.1580796	.5281925	.999	-2.065628	2.381787
	nonCSC 11uM	CSC 1.1uM	-.6221925	.2978803	.380	-1.726260	.481875
		CSC 11uM	-.5701999	.2864157	.431	-1.667364	.526964
		CSC 110uM	-.0541354	.2678206	1.000	-1.167908	1.059638
		nonCSC 1.1uM	-.9002984	.2719143	.110	-2.006613	.206016
nonCSC 110uM		-.7422189	.5865123	.795	-2.931699	1.447262	
nonCSC 110uM	CSC 1.1uM	.1200264	.5420172	1.000	-2.076954	2.317007	
	CSC 11uM	.1720190	.5358021	.999	-2.035130	2.379168	
	CSC 110uM	.6880835	.5260968	.773	-1.541055	2.917222	
	nonCSC 1.1uM	-.1580796	.5281925	.999	-2.381787	2.065628	
	nonCSC 11uM	.7422189	.5865123	.795	-1.447262	2.931699	

**ANOVA**

Rasio viabilitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.003	5	.401	6.267	.004
Within Groups	.767	12	.064		
Total	2.770	17			

Rasio viabilitas  
Games-Howell

(I) non/CSC	(J) non/CSC	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
CSC1.1uM	CSC11uM	.0551324	.1579910	.998	-1.155259	1.265523
	CSC110uM	-.0904473	.2278064	.997	-1.907958	1.727064
	NCSC1.1uM	.2565534	.1886013	.755	-1.222101	1.735207
	NCSC11uM	.5706004	.1238505	.130	-.335000	1.476201
	NCSC110uM	.8429031	.0603953	.003	.512854	1.172953
CSC11uM	CSC1.1uM	-.0551324	.1579910	.998	-1.265523	1.155259
	CSC110uM	-.1455797	.2740013	.991	-1.538055	1.246895
	NCSC1.1uM	.2014211	.2423869	.946	-.968256	1.371098
	NCSC11uM	.5154680	.1962649	.278	-.446909	1.477845
	NCSC110uM	.7877707	.1637942	.105	-.311658	1.887200
CSC110uM	CSC1.1uM	.0904473	.2278064	.997	-1.727064	1.907958
	CSC11uM	.1455797	.2740013	.991	-1.246895	1.538055
	NCSC1.1uM	.3470007	.2927217	.826	-1.068373	1.762375
	NCSC11uM	.6610477	.2558408	.318	-.775870	2.097965
	NCSC110uM	.9333504	.2318688	.171	-.785605	2.652306
NCSC1.1uM	CSC1.1uM	-.2565534	.1886013	.755	-1.735207	1.222101
	CSC11uM	-.2014211	.2423869	.946	-1.371098	.968256
	CSC110uM	-.3470007	.2927217	.826	-1.762375	1.068373
	NCSC11uM	.3140470	.2216510	.724	-.837621	1.465715
	NCSC110uM	.5863496	.1934886	.276	-.785202	1.957902
NCSC11uM	CSC1.1uM	-.5706004	.1238505	.130	-1.476201	.335000
	CSC11uM	-.5154680	.1962649	.278	-1.477845	.446909
	CSC110uM	-.6610477	.2558408	.318	-2.097965	.775870
	NCSC1.1uM	-.3140470	.2216510	.724	-1.465715	.837621
	NCSC110uM	.2723027	.1311729	.473	-.528180	1.072785
NCSC110uM	CSC1.1uM	-.8429031	.0603953	.003	-1.172953	-.512854
	CSC11uM	-.7877707	.1637942	.105	-1.887200	.311658
	CSC110uM	-.9333504	.2318688	.171	-2.652306	.785605
	NCSC1.1uM	-.5863496	.1934886	.276	-1.957902	.785202
	NCSC11uM	-.2723027	.1311729	.473	-1.072785	.528180

Analisis rasio CSC payudara (CD24-/CD44+) terhadap non CSC payudara (CD24-/CD44-) pada rasio ekspresi mRNA NF-kB, rasio aktivitas spesifik katalase, rasio aktivitas spesifik GPX, dan rasio aktivitas spesifik MnSOD

**Tests of Normality**

rasio CD44+/44-	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
eksp NFkB CSC/nonCSC	1.1uM	.321	6	.052	.673	6	.003
	11uM	.216	6	.200'	.964	6	.851
	110uM	.200	6	.200'	.930	6	.578
aktv spes CAT CSC/nonCSC	1.1uM	.223	6	.200'	.832	6	.112
	11uM	.270	6	.198	.790	6	.047
	110uM	.358	6	.016	.698	6	.006
aktv spes GPX CSC/nonCSC	1.1uM	.163	6	.200'	.959	6	.814
	11uM	.379	6	.007	.676	6	.003
	110uM	.383	6	.006	.704	6	.007

**Transformasi**

**Tests of Normality**

rasio CD44+/44-	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
trans_rasio_eksp_NFkB	1.1uM	.240	6	.200'	.864	6	.202
	11uM	.203	6	.200'	.958	6	.806
	110uM	.181	6	.200'	.960	6	.817
trans_rasio_aktv_spes_CAT	1.1uM	.200	6	.200'	.877	6	.254
	11uM	.228	6	.200'	.890	6	.318
	110uM	.209	6	.200'	.864	6	.203
trans_rasio_aktv_spes_GPX	1.1uM	.180	6	.200'	.961	6	.824
	11uM	.348	6	.022	.714	6	.009
	110uM	.337	6	.032	.770	6	.031

**Kruskal-Wallis**

**Ranks**

rasio	N	Mean Rank	
eksp NFkB CSC/nonCSC	1.1uM	6	10.50
	11uM	6	13.33
	110uM	6	4.67
	Total	18	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	eksp NFkB CSC/nonCSC
Chi-Square	8.222
df	2
Asymp. Sig.	.016

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: rasio CD44+/44-

## Mann-Whitney

Ranks

	rasio...	N	Mean Rank	Sum of Ranks
eksp NFkB CSC/nonCSC	1.1uM	6	5.67	34.00
	11uM	6	7.33	44.00
	Total	12		

Test Statistics<sup>b</sup>

	eksp NFkB CSC/nonCSC
Mann-Whitney U	13.000
Wilcoxon W	34.000
Z	-.801
Asymp. Sig. (2-tailed)	.423
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.485 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: rasio CD44+/44-

## Mann-Whitney

Ranks

	rasio...	N	Mean Rank	Sum of Ranks
eksp NFkB CSC/nonCSC	1.1uM	6	8.33	50.00
	110uM	6	4.67	28.00
	Total	12		

Test Statistics<sup>b</sup>

	eksp NFkB CSC/nonCSC
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-1.761
Asymp. Sig. (2-tailed)	.078
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.093 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: rasio CD44+/44-

## Mann-Whitney

Ranks

	rasio...	N	Mean Rank	Sum of Ranks
eksp NFkB CSC/nonCSC	11uM	6	9.50	57.00
	110uM	6	3.50	21.00
	Total	12		

Test Statistics<sup>b</sup>

	eksp NFkB CSC/nonCSC
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: rasio CD44+/44-

## Kruskal-Wallis

Ranks

	rasio...	N	Mean Rank
aktv spes CAT CSC/nonCSC	1.1uM	6	9.00
	11uM	6	10.33
	110uM	6	9.17
	Total	18	

Test Statistics<sup>a,b</sup>

	aktv spes CAT CSC/nonCSC
Chi-Square	.223
df	2
Asymp. Sig.	.894

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: rasio CD44+/44-

## Kruskal-Wallis

Ranks

	rasi...	N	Mean Rank
aktv spes GPX	1.1uM	6	8.17
CSC/nonCSC	11uM	6	13.50
	110uM	6	6.83
	Total	18	

Test Statistics<sup>a,b</sup>

	aktv spes GPX CSC/nonCSC
Chi-Square	5.245
df	2
Asymp. Sig.	.073

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: rasio CD44+/44-

## Mann-Whitney

Ranks

	rasi...	N	Mean Rank	Sum of Ranks
aktv spes GPX	1.1uM	6	4.17	25.00
CSC/nonCSC	11uM	6	8.83	53.00
	Total	12		

Test Statistics<sup>b</sup>

	aktv spes GPX CSC/nonCSC
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-2.246
Asymp. Sig. (2-tailed)	.025
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: rasio CD44+/44-

### Lampiran 13. Analisis Statistik Uji Korelasi

1. Uji korelasi antara Ekspresi mRNA NF-kB dengan Aktivitas Spesifik Katalase pada CSC Payudara.

**Correlations**

		rasio eks NFkB CSC	rasio akt spe kat CSC
rasio eks NFkB CSC	Pearson Correlation	1	-.104
	Sig. (2-tailed)		.680
	N	18	18
rasio akt spe kat CSC	Pearson Correlation	-.104	1
	Sig. (2-tailed)	.680	
	N	18	18

2. Uji korelasi antara Ekspresi mRNA NF-kB dengan Aktivitas Spesifik Katalase pada NCSC Payudara.

**Correlations**

		rasio eks NFkB NCSC	rasio akt spe kat NCSC
rasio eks NFkB NCSC	Pearson Correlation	1	-.122
	Sig. (2-tailed)		.629
	N	18	18
rasio akt spe kat NCSC	Pearson Correlation	-.122	1
	Sig. (2-tailed)	.629	
	N	18	18

3. Uji korelasi antara Ekspresi mRNA NF-kB dengan Aktivitas Spesifik GPx pada CSC Payudara.

**Correlations**

		rasio eks NFkB CSC	rasio akt spe GPX CSC
rasio eks NFkB CSC	Pearson Correlation	1	.363
	Sig. (2-tailed)		.138
	N	18	18
rasio akt spe GPX CSC	Pearson Correlation	.363	1
	Sig. (2-tailed)	.138	
	N	18	18

4. Uji korelasi antara Ekspresi mRNA NF-kB dengan Aktivitas Spesifik GPx pada NCSC Payudara.

**Correlations**

		rasio eks NFkB NCSC	rasio akt spe GPX NCSC
rasio eks NFkB NCSC	Pearson Correlation	1	.228
	Sig. (2-tailed)		.362
	N	18	18
rasio akt spe GPX NCSC	Pearson Correlation	.228	1
	Sig. (2-tailed)	.362	
	N	18	18

5. Uji korelasi antara Ekspresi mRNA NF-kB dengan Viabilitas pada CSC Payudara.

**Correlations**

		rasio eks CSC	rasio viab CSC
rasio eks CSC	Pearson Correlation	1	-.006
	Sig. (2-tailed)		.987
	N	9	9
rasio viab CSC	Pearson Correlation	-.006	1
	Sig. (2-tailed)	.987	
	N	9	9

6. Uji korelasi antara Ekspresi mRNA NF-kB dengan Viabilitas pada NCSC Payudara.

**Correlations**

		rasio eks NCSC	rasio viab NCSC
rasio eks NCSC	Pearson Correlation	1	-.233
	Sig. (2-tailed)		.547
	N	9	9
rasio viab NCSC	Pearson Correlation	-.233	1
	Sig. (2-tailed)	.547	
	N	9	9



7. Uji korelasi antara Ekspresi mRNA NF-kB dengan aktivitas spesifik MnSOD pada CSC Payudara.

**Correlations**

		rasio eksp NFkB CSC	rasio aktv spe MnSOD CSC
rasio eksp NFkB CSC	Pearson Correlation	1	.130
	Sig. (2-tailed)		.740
	N	9	9
rasio aktv spe MnSOD CSC	Pearson Correlation	.130	1
	Sig. (2-tailed)	.740	
	N	9	9

8. Uji korelasi antara Ekspresi mRNA NF-kB dengan aktivitas spesifik MnSOD pada non CSC Payudara.

**Correlations**

		rasio eksp NFkB nonCSC	rasio aktv spe MnSOD nonCSC
rasio eksp NFkB nonCSC	Pearson Correlation	1	.379
	Sig. (2-tailed)		.314
	N	9	9
rasio aktv spe MnSOD nonCSC	Pearson Correlation	.379	1
	Sig. (2-tailed)	.314	
	N	9	9

## BIODATA PENULIS



Nama : Hendrik Kurniawan  
Tempat/Tanggal Lahir : Kebumen, 11 Maret 1982  
Alamat : Jl Taman Margasatwa Rt 09 Rw 05  
No.34 Pasar Minggu – 12540  
Pekerjaan : Staf Pengajar FK UKRIDA Jakarta  
Riwayat Pendidikan : Kedokteran Umum UKRIDA Jakarta  
(2000-2007)  
SMUN 28 Jakarta Selatan  
(1997-2000)  
SMPN 41 Jakarta Selatan  
(1994-1997)  
SDN 01 Ragunan  
(1988-1994)  
Penelitian S2 : Analisis Ekspresi *Nuclear Factor – kappa B* (NF-  
kB) Pada Sel Punca Kanker Payudara Manusia (CD  
24-/CD 44+) Yang Diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Dan  
Hubungannya Dengan Status Antioksidan dan  
viabilitas sel.

Jakarta, Desember 2014

Penulis,

(Hendrik Kurniawan)