

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI (PTUPT)
TAHUN KE-2**



**PENGEMBANGAN POTENSI EKSTRAK BERAS
HITAM (*Oryza sativa L.indica*) SEBAGAI
ALTERNATIF ANTIKANKER**

TIM PEELITI

Dr. Ir. Fadjar Kurnia Hartati, MP. (Ketua/NIDN : 0711116601)
Ir. Arlin Besari Djauhari, MP. (Anggota / NIDN : 0719075902)
Ir. Restu Tjiptaningdyah, Mkes (Anggota / NIDN : 0010046101)

**Dibiayai Oleh
Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jendral Penguatan Riset
dan Pengembangan Kementerian Riset , Teknologi dan Pendidikan Tinggi Sesuai
Dengan Kontrak Penelitian Tahun Anggaran 2020 Nomor
187/SP2H/AMD/LT/DRPM/2020 tanggal 20 Mei 2020**

**UNIVERSITAS DR. SOETOMO
SURABAYA
2020**

HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI (PTUPT)

Judul Penelitian :

Pengembangan Potensi Ekstrak Beras Hitam (*Oryza sativa* L. sativa) Sebagai Alternatif Antikanker

Peneliti / Pelaksana :

Ketua Peneliti :

a. Nama Lengkap : Dr. Ir. Fadjar Kurnia Hartati, MP.
b. NIDN : 07 111166 01
c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
d. Program Studi : Teknologi Pangan
e. Nomor HP : 081217028747
f. Alamat surel (e-mail) : fadjar.kurnia@unitomo.ac.id

Anggota Peneliti (1) :

a. Nama Lengkap : Ir. Arlin Besari Djauhari, MP.
b. NIDN : 07 190759 02
c. Perguruan Tinggi : Universitas Dr. Soetomo Surabaya

Anggota Peneliti (2) :

a. Nama Lengkap : Ir. Restu Tjiptaningdyah, MKes.
b. NIDN : 0010046101
c. Perguruan Tinggi : Universitas Dr. Soetomo Surabaya

Mahasiswa yang terlibat :

a. Rachmia Seftin Triyanto (NIM. 2016110015)
b. Frista Izzatun Nasuha (NIM. 20161100022)

Institusi Mitra :

Nama Institusi Mitra : Dinas Kesehatan UPT Akademi Gizi Surabaya
Alamat : Jl. Bendul Merisi No. 126 Surabaya 60239
Penanggung Jawab : Dr. Andriyanto, SH, MKes.
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke-2 (dua) dari rencana 2 (dua) tahun
Biaya Tahun Ke-2 : Rp. 211.468.000,- (Dua Ratus Sebelas Juta Empat Ratus Enam Puluh Delapan Ribu Rupiah)
Biaya Penelitian Keseluruhan : Rp. 452.000.000,00

Surabaya, 25 Nopember 2020

Ketua Peneliti,



Dr. Ir. Fadjar Kurnia Hartati, MP.
NPP. 95.01.1.198

Mengetahui,
Dekan Fakultas Pertanian

Ir. A. Kusyairi, MSi.
NPP. 90.01.1.074

Menyetujui
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Dr. Soetomo

Dr. Ir. Fadjar Kurnia Hartati, MP.
NPP. 95.01.1.198

PROTEKSI ISI LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Dilarang menyalin, menyimpan, memperbanyak sebagian atau seluruh isi laporan ini dalam bentuk apapun kecuali oleh peneliti dan pengelola administrasi penelitian

LAPORAN AKHIR PENELITIAN MULTI TAHUN

ID Proposal: 05794738-38a2-4395-a520-07aede5560a4
Laporan Akhir Penelitian: tahun ke-2 dari 2 tahun

1. IDENTITAS PENELITIAN

A. JUDUL PENELITIAN

Pengembangan Potensi Ekstrak Beras Hitam (*Oryza sativa* L. indica) Sebagai Alternatif Antikanker

B. BIDANG, TEMA, TOPIK, DAN RUMPUN BIDANG ILMU

Bidang Fokus RIRN / Bidang Unggulan Perguruan Tinggi	Tema	Topik (jika ada)	Rumpun Bidang Ilmu
Ketahanan dan Keamanan Pangan	-	14. Memberdayakan masyarakat agar mampu mengembangkan unit usaha ekonomi berbasis pangan, termasuk pengelolaan cadangan pangan masyarakat/keho mpok;	Teknologi Pertanian

C. KATEGORI, SKEMA, SBK, TARGET TKT DAN LAMA PENELITIAN

Kategori (Kompetitif Nasional/ Desentralisasi/ Penugasan)	Skema Penelitian	Strata (Dasar/ Terapan/ Pengembangan)	SBK (Dasar, Terapan, Pengembangan)	Target Akhir TKT	Lama Penelitian (Tahun)
Penelitian Desentralisasi	Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi	SBK Riset Terapan	SBK Riset Terapan	6	2

2. IDENTITAS PENGUSUL

Nama, Peran	Perguruan Tinggi/ Institusi	Program Studi/ Bagian	Bidang Tugas	ID Sinta	H-Index
FADJAR KURNIA HARTATI Ketua Pengusul	Universitas Dr Soetomo	Teknologi Pangan		6015266	1
Ir ARLIN BESARI DJAUHARI Anggota Pengusul 1	Universitas Dr Soetomo	Teknologi Pangan	Pengawas uji proliferasi dan membantu analisa data	6030994	0
Ir RESTU TJIPTANINGDYAH	Universitas Dr Soetomo	Teknologi Pangan	Pengawas uji sitotoksik dan	6098645	0

Anggota Pengusul 2			membantu menyusun laporan		
-----------------------	--	--	---------------------------------	--	--

3. MITRA KERJASAMA PENELITIAN (JIKA ADA)

Pelaksanaan penelitian dapat melibatkan mitra kerjasama, yaitu mitra kerjasama dalam melaksanakan penelitian, mitra sebagai calon pengguna hasil penelitian, atau mitra investor

Mitra	Nama Mitra
Mitra Pelaksana Penelitian	Dr. Andriyanto, SH. MKes.
Mitra Calon Pengguna	Dr. Andriyanto, SH., MKes.

4. LUARAN DAN TARGET CAPAIAN

Luaran Wajib

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian (<i>accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya</i>)	Keterangan (<i>url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya</i>)
2	Dokumentasi hasil uji coba produk	Ada	-

Luaran Tambahan

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian (<i>accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya</i>)	Keterangan (<i>url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya</i>)
2	Keikutsertaan dalam Seminar Nasional	sudah dilaksanakan	
2	Publikasi Ilmiah Jurnal Nasional Tidak Terakreditasi	accepted/published	Heuristic

5. ANGGARAN

Rencana anggaran biaya penelitian mengacu pada PMK yang berlaku dengan besaran minimum dan maksimum sebagaimana diatur pada buku Panduan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Edisi 12.

Total RAB 2 Tahun Rp. 211,468,000

Tahun 1 Total Rp. 0

Tahun 2 Total Rp. 211,468,000

Jenis Pembelanjaan	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
Analisis Data	HR Pengolah Data	P (penelitian)	1	1,540,000	1,540,000
Analisis Data	HR Sekretariat/Administrasi Peneliti	OB	2	300,000	600,000
Analisis Data	Biaya konsumsi rapat	OH	5	44,000	220,000
Analisis Data	Biaya analisis sampel	Unit	10	1,502,490	15,024,900
Analisis Data	Uang Harian	OH	12	250,000	3,000,000

Jenis Pembelanjaan	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
Analisis Data	Transport Lokal	OK (kali)	12	150,000	1,800,000
Bahan	ATK	Paket	1	3,274,550	3,274,550
Bahan	Bahan Penelitian (Habis Pakai)	Unit	1	106,365,550	106,365,550
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya seminar nasional	Paket	1	400,000	400,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya Publikasi artikel di Jurnal Nasional	Paket	1	500,000	500,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Publikasi artikel di Jurnal Internasional	Paket	1	10,000,000	10,000,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Luaran KI (paten, hak cipta dll)	Paket	1	7,500,000	7,500,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya pembuatan dokumen uji produk	Paket	1	5,000,000	5,000,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	HR Sekretariat/Administrasi Peneliti	OB	3	300,000	900,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Uang harian rapat di dalam kantor	OH	9	250,000	2,250,000
Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan	Biaya konsumsi rapat	OH	9	44,000	396,000
Pengumpulan Data	FGD persiapan penelitian	Paket	1	982,000	982,000
Pengumpulan Data	HR Sekretariat/Administrasi Peneliti	OB	8	300,000	2,400,000
Pengumpulan Data	Transport	OK (kali)	8	194,000	1,552,000
Pengumpulan Data	Uang harian rapat di dalam kantor	OH	9	250,000	2,250,000
Pengumpulan Data	Biaya konsumsi	OH	9	44,000	396,000
Pengumpulan Data	Uang Harian	OH	10	410,000	4,100,000
Pengumpulan Data	HR Pembantu Lapangan	OH	72	80,000	5,760,000
Pengumpulan Data	HR Pembantu Peneliti	OJ	520	25,000	13,000,000
Sewa Peralatan	Ruang penunjang penelitian	Unit	1	4,080,000	4,080,000
Sewa Peralatan	Peralatan penelitian	Unit	5	3,335,400	16,677,000
Sewa Peralatan	Transport penelitian	OK (kali)	10	150,000	1,500,000

6. HASIL PENELITIAN

A. RINGKASAN: Tuliskan secara ringkas latar belakang penelitian, tujuan dan tahapan metode penelitian, luaran

Fakta menunjukkan bahwa tingkat kematian akibat kanker terus meningkat, sedangkan terapi yang biasa digunakan membutuhkan biaya sangat tinggi dan menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan. Pendekatan yang sering dilakukan untuk mengatasi permasalahan ini adalah penggunaan bahan alam (termasuk bahan makanan) sebagai alternatif bahan antikanker. Salah satu bahan pangan lokal yang berpotensi sebagai antikanker adalah beras hitam karena beras hitam mengandung komponen polifenol seperti antosianin, flavon dan flavonol, karoten serta oryzanol. Beras hitam sudah terbukti mampu menurunkan kolesterol, mempunyai aktivitas antioksidan, imunomodulator dan ekstrak beras hitam mempunyai kemampuan sebagai anti-inflamasi pada mencit model DM.

Tujuan khusus penelitian ini adalah "Mencari alternatif bahan pangan lokal yang dapat berfungsi sebagai antikanker tanpa efek samping". Sedangkan target akhir penelitian ini adalah "Pengembangan potensi beras hitam sebagai bahan antikanker secara in vitro, in vivo dan in silico". Metode penelitian yang digunakan dalam kegiatan tahun ke-1 (in vitro) dan tahun ke-2 (in vivo) adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), sedangkan metode yang digunakan pada uji in silico adalah metode docking.

Hasil penelitian tahun ke-1 telah dipaparkan pada Seminar Nasional tentang "Jalur Baru Biosains Menuju Kesejahteraan Masyarakat" dan Hak Cipta. Hasil penelitian secara in vitro pada tahun ke-1, sampel terbaik mengandung kadar total fenol sebesar 38,843 mg GAE/g ekstrak, flavonoid sebesar 36,539 mg QE/g ekstrak, dan aktivitas antioksidan dengan nilai IC50 = 27,224 g/ml. Dari ketiga jenis sel kanker yang digunakan yaitu sel kanker serviks (HeLa), payudara (T47D) dan sel kanker tulang ganas (U2OS), yang memberikan respon penghambatan pertumbuhan dan apoptosis terbaik yaitu pada sel kanker payudara (T47D), sehingga pada uji lanjut secara in vivo dilakukan pada model mencit kanker payudara.

Hasil kegiatan penelitian tahun ke-2 dilakukan secara in silico dan in vivo. Hasil analisis uji in silico telah terbit pada jurnal Internasional terindex Scopus dengan SJR 0,16 yaitu Biointerface Research in Applied Chemistry, telah dipaparkan pada Seminar Nasional tentang "Optimalisasi Pembangunan Pertanian Berkelanjutan Dalam Perspektif Teknologi, Sosial dan Ekonomi" dan Dokumentasi Uji Coba. Hasil uji in silico menunjukkan bahwa dari 15 senyawa bioaktif yang terdapat pada beras hitam yang paling berpotensi sebagai obat kanker adalah senyawa campesterol, yang memiliki mekanisme dengan cara berikatan dengan ligan binding site pada mortalin sehingga dapat menghambat terjadinya kompleks mortalin-p53.

Hasil kegiatan penelitian pada tahap in vivo adalah profil sel imun pada mencit model kanker payudara yaitu 1) melakukan uji Histologi untuk memastikan terjadinya kanker pada mencit model, 2) Pemberian serbuk instan beras hitam mampu meningkatkan sel T CD4+ yang teraktivasi secara signifikan ($p < 0.05$) pada dosis 0.3 g/kg, 0.4 g/kg, dan 0.5 g/kg; Aktivasi sel T CD8+ (CD8+62L-) terendah ditunjukkan oleh kelompok K- dengan persentase 8.22% dan tertinggi ditunjukkan oleh kelompok D2 (13.10%), D3 (12.86%); produksi IL-2 pada kelompok K- cukup rendah (3.72%) dan mengalami peningkatan yang signifikan setelah diberikan ekstrak beras hitam dengan dosis 0.2 g/kg (D1) dan 0.3 g/kg (D2) ($p < 0.05$); penurunan produksi IL-17 (dapat mempromosikan kanker) yang signifikan pada kelompok kanker setelah pemberian serbuk instan beras hitam memberikan efek yang menjanjikan; 3) dosis terbaik sampel sebagai antikanker secara in vivo adalah 0.3 g/kg.

serbuk instan; beras hitam; antikanker; in silico; in vivo

Pengisian poin C sampai dengan poin H mengikuti template berikut dan tidak dibatasi jumlah kata atau halaman namun disarankan ringkas mungkin. Dilarang menghapus/modifikasi template ataupun menghapus penjelasan di setiap poin.

C. HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN: Tuliskan secara ringkas hasil pelaksanaan penelitian yang telah dicapai sesuai tahun pelaksanaan penelitian. Penyajian dapat berupa data, hasil analisis, dan capaian luaran (wajib dan atau tambahan). Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. Penyajian data dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya, serta analisis didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.

Pengisian poin C sampai dengan poin H mengikuti template berikut dan tidak dibatasi jumlah kata atau halaman namun disarankan ringkas mungkin. Dilarang menghapus/memodifikasi template ataupun menghapus penjelasan di setiap poin.

C. **HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN:** Tuliskan secara ringkas hasil pelaksanaan penelitian yang telah dicapai sesuai tahun pelaksanaan penelitian. Penyajian dapat berupa data, hasil analisis, dan capaian luaran (wajib dan atau tambahan). Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. Penyajian data dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya, serta analisis didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.

.....Hasil yang diteliti dicapai pada kegiatan penelitian tahun ke-2 ini adalah hasil analisis antikanker secara *in silico* dan hasil pengamatan uji antikanker serbuk instan beras hitam secara *in vivo*. Parameter yang diamati pada uji antikanker secara *in vivo* adalah CD4, CD8, CD62L, TNF, IFN, CD11b, IL6, IL17, IL1b, NFkB, TGFB dan IL10. Keseluruhan aktivitas pada kegiatan tahun ke-1 dan tahun ke-2 diantaranya:

- I. Pengembangan potensi antikanker ekstrak beras hitam secara *in vitro*. Kegiatan tahun ke-1 terdiri dari 2 tahap yaitu
 - a. Karena pada penelitian sebelumnya ekstrak air beras hitam tidak bisa kering maka agar sampel lebih ringan, mudah dibawa dan lebih awet maka pada tahap 1 diawali dengan mencari sampel terbaik yaitu sampel dengan konsentrasi penambahan maltodekstrin terendah. Serbuk instan dapat diperoleh dengan penambahan maltodekstrin 4%. Parameter uji yang diamati meliputi parameter kadar total phenol, kadar total flavonoid dan aktivitas antioksidan.
 - b. Sampel terbaik dari tahap ke-1 diuji antikanker secara *in vitro* menggunakan 3 sel kanker yaitu sel kanker payudara (T47D), sel kanker serviks (HeLa) dan sel kanker tulang ganas (U2OS). Adapun parameter yang diamati yaitu viabilitas/proliferasi sel, siklus sel dan apoptosis. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa akumulasi pertumbuhan sel kanker HeLa dan sel U2OS terjadi pada tahap G2/M, sedangkan pada sel T47D akumulasi terjadi pada tahap S. Apoptosis tertinggi terjadi pada sel kanker HeLa yaitu sebesar 74,99%. Hal ini berarti serbuk instan beras hitam berpotensi menghambat siklus sel kanker HeLa, T47D dan U2OS, dengan dosis optimal pada 300 µg/ml.
- II. Pada tahun ke-2 ini, kegiatan penelitian terdiri dari 2 tahap yaitu uji *in silico* dan uji *in vivo*:

2.1 Uji *in silico*

Dikarenakan terjadi pandemi covid-19 yang berakibat tidak ada Laboratorium yang bisa melakukan aktivitas/lockdown maka kegiatan diawali dengan melakukan analisis secara *in silico*, yang bisa dilakukan dimana saja dengan ketentuan ada koneksi internet yang

memadai. Baru setelah ada pidato Menteri Pendidikan dan Kebudayaan yang memperbolehkan laboratorium beraktifitas maka serta merta kegiatan penelitian yang dilaksanakan di Laboratorium bisa di mulai. Adapun hasil analisis antikanker secara *in silico* ini dilakukan dengan tujuan untuk menganalisis aktivitas masing-masing senyawa bioaktif yang dikandung beras hitam sebagai antikanker.

Menurut [1], apoptosis bisa terjadi melalui reseptor TNFR1 dan TNFR2. Berdasarkan hal tersebut maka pada molekular docking disini menggunakan TNFR1 (P19438). Ligan yang digunakan adalah lima belas senyawa bioaktif yang terdapat pada beras hitam [2], seperti nampak pada Tabel 1.

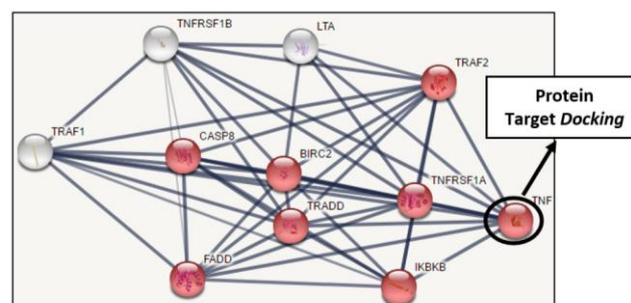
Tabel 1. Senyawa bioaktif beras hitam sebagai ligan

No.	Nama Senyawa	Pubchem CID	Struktur Kimia	Berat Molekul g/mol
1	β -Karatene	5280489	C40H56	536,888
2	Campesterol ferulat	173183	C28H48O	400,691
3	Cyanidin-3,5-diglukosida	44256812	C31H33O19+	709,586
4	Cyanidin-3-O-arabinosa	91810602	C20H19ClO10	454,812
5	Cyanidin-3-O-glukosida	441667	C21H21O11+	441,667
6	Cycloartenol ferulat	56840602	C40H58O4	602,900
7	Isorhamnetin-3-O-glukosida	5318645	C22H22O12	478,406
8	Lutein	5281243	C40H56O2	568,886
9	Lycopene	446925	C40H56	536,888
10	24-Methylenecycloartenol ferulat	637308	C18H18O5	314,337
11	Pelargonidin-3-O-glukosida	443648	C21H21O10+	433,389
12	Peonidin-3-O-glukosida	14311151	C22H23O11+	463,415
13	Quercetin-3-O-glukosida	5748594	C21H20O12	464,379
14	Quercetin-3-O-rutinosida	5280805	C27H30O16	610,521
15	Zeaxanthin	5280899	C40H56O2	568,886

Sumber: [2]

Tahapan yang dilakukan dalam metode docking ini adalah

- a. Memastikan bahwa TNFR1 adalah reseptor yang terkait dengan anti-kanker maka perlu dilakukan tinjauan pada <http://www.string-db.org>. Adapun prediksi pathway TNFR1 pada aplikasi STRING (Gambar 1) dan pada KEGG (Gambar 2)

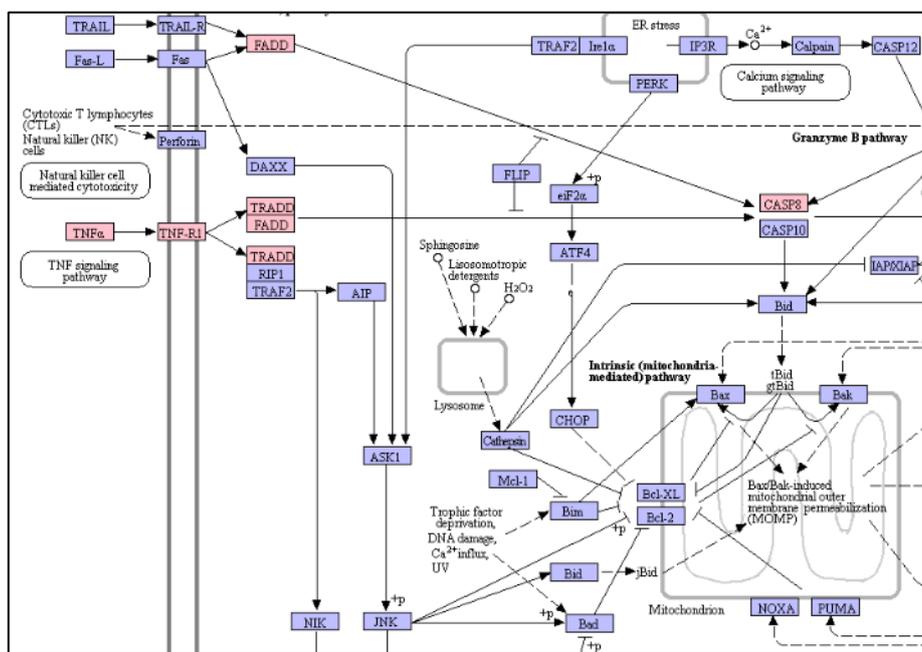


Gambar 1. Prediksi pathway TNFR1 dengan aplikasi STRING

KEGG Pathways			
pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
04668	TNF signaling pathway	11	1.22e-23
04064	NF-kappa B signaling pathway	8	1.32e-15
04210	Apoptosis	8	1.32e-15

Gambar 2. Prediksi pathway TNFR1 dengan aplikasi KEGG (Keterangan: Nilai confidence 0,400 (medium confidence) dan Jumlah protein interaktor adalah 8 protein)

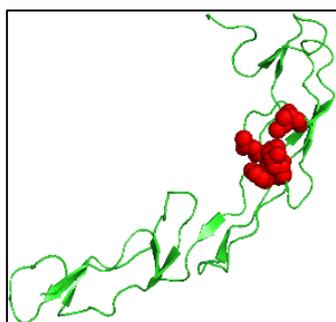
Langkah selanjutnya adalah memastikan pathwaynya pada KEGG, maka diperoleh pathway seperti pada Gambar 3. Hasil analisis STRING mempertegas hasil analisis KEGG yang menunjukkan bahwa TNFR1 merupakan reseptor yang berperan pada proses apoptosis. Hal ini sesuai dengan pendapat [3] yang menyatakan bahwa TNF merupakan sitokin yang berperan dalam apoptosis sel.



Gambar 3. Pathway TNF-R1 pada KEGG menginduksi mekanisme apoptosis melalui aktivasi caspase 8

b. Prediksi sisi aktif

Sisi Aktif TNFR1 (ID 04210) menggunakan fasilitas COFACTOR server pada Zhanglab [4][5].



Keterangan:
 1.Sisi aktif TNFR1:
Phe60, Thr61, Ala62, Leu67, Leu71
 2.Daerah sisi aktif ditunjukkan pada struktur sphere berwarna merah |

Template proteins with similar binding site:

Click to view	Rank	Cscore ^{LB}	PDB Hit	TM-score	RMSD ^a	IDEN ^a	Cov.	BS-score	Lig. Name	Download Complex	Predicted binding site residues
<input checked="" type="radio"/>	1	0.52	1ft4A	1.000	0.00	1.000	1.000	1.94	703	Download	60,61,62,67,71
<input type="radio"/>	2	0.49	1tnr1	0.834	2.31	0.978	0.957	1.98	111	Download	69,70,71,72,75,77,78,79,80
<input type="radio"/>	3	0.12	1ext0	0.749	2.55	0.816	0.907	1.24	111	Download	15,16,17,21,60,69,71,72,77,104,106,107,110
<input type="radio"/>	4	0.05	2aw21	0.596	2.26	0.270	0.714	1.34	111	Download	16,17,18,28,29,31,32,34,37,40,45,46,47,48,49,50,51,52,54,64
<input type="radio"/>	5	0.05	1jma0	0.570	2.75	0.273	0.700	1.32	111	Download	31,32,34,35,36,37,40,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,89,90,91
<input type="radio"/>	6	0.01	2bgrA	0.428	5.23	0.078	0.829	0.82	UUU	Download	55,59,69,71,72,73

Click on the radio buttons to visualize predicted binding site and residues.

(a) Cscore^{LB} is the confidence score of predicted binding site. Cscore^{LB} values range in between [0-1]; where a higher score indicates a more reliable ligand-binding site prediction.

(b) BS-score is a measure of local similarity (sequence & structure) between template binding site and predicted binding site in the query structure. Based on large scale benchmarking analysis, we have observed that a BS-score >1 reflects a significant local match between the predicted and template binding site.

(c) TM-score is a measure of global structural similarity between query and template protein.

(d) RMSD^a the RMSD between residues that are structurally aligned by TM-align.

(e) IDEN^a is the percentage sequence identity in the structurally aligned region.

(f) Cov. represents the coverage of global structural alignment and is equal to the number of structurally aligned residues divided by length of the query protein.

Gambar 4. Prediksi sisi aktif TNFR1

c. Analisis Docking (Sitasi *software* menurut [6].

Pengaturan posisi *grid* :

Vina search space

Center X: 17.2356 Y: 7.9714 Z: 25.0432

Dimension (Angstrom) X: 16.0327 Y: 25.0 Z: 24.3484

Hasil analisis docking dapat dilihat pada Tabel 2

Tabel 2. Data Hasil *Docking* TNFR1

No	Nama Senyawa	Nilai <i>Binding Affinity</i> (kcal/mol)
1	B-KAROTENE	-6.6
2	CAMPESTEROL FERULATE	-6.0
3	CYA-3,5-DIGLU	-6.1
4	CYA-3-O-ARAB	-5.4
5	CYA-3-O-GLU	-5.9
6	CYCLO	-6.5
7	ISHOR-3-O-GLU	-5.6
8	LUTEIN	-5.9
9	LYCOPENE	-4.0
10	METHYLENE FERULATE	-4.9
11	PELAR-3-GLU	-5.8
12	PEON-3-O-GLU	-5.6
13	QUER-3-O-GLU	-5.8
14	QUER-3-O-RUTEIN	-6.1
15	ZEAXANTHIN	-5.7
16	Topotecan (Kontrol)	-6.2

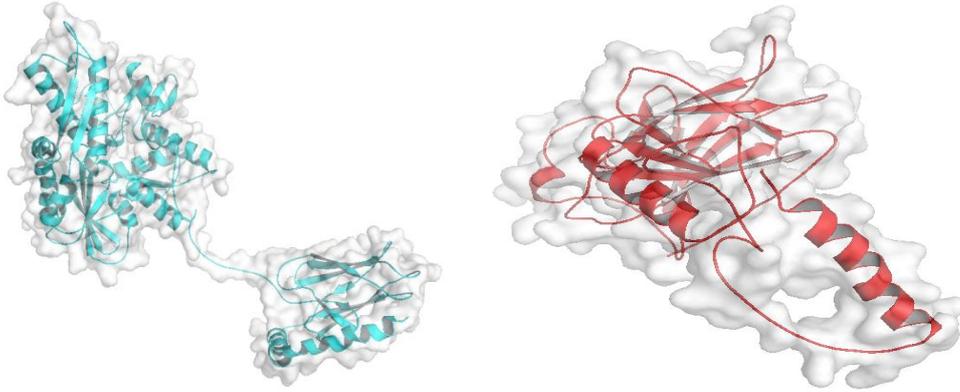
... Keterangan:

- Senyawa yang memiliki nilai *binding affinity* lebih rendah dari kontrol.
- Senyawa kontrol.

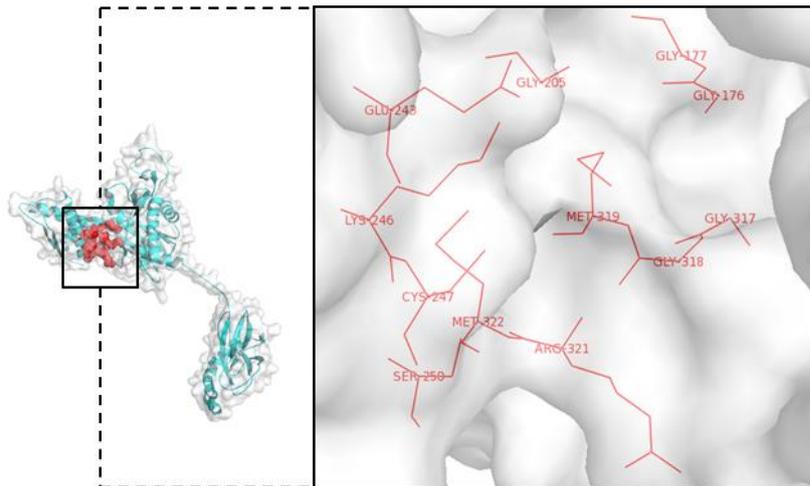
Tabel 2 menunjukkan bahwa *binding affinity* dari 15 senyawa bioaktif yang terdapat pada beras hitam dengan reseptor TNFR1 berkisar antara (-4,0) – (-6,6) kkl/mol. Senyawa bioaktif yang mempunyai *binding affinity* lebih kecil dari kontrol adalah β-karotene dan cycloartenol ferulat

dengan *binding affinity* berturut-turut yaitu sebesar -6,6 dan -6,5 kkl/mol. Menurut [7], *binding affinity* menunjukkan kekuatan berikatan antara reseptor dan ligan dimana semakin kecil nilainya maka semakin kuat ikatannya

d. Visualisasi hasil *docking*



Gambar 5. Struktur 3D protein mortalin dan p53 hasil *homology modeling*. Visualisasi pewarnaan *chain* dalam bentuk struktur *surface* transparan berisi *cartoon* yang berwarna *cyans* (mortalin) dan merah (p53) pada software PyMol.



Gambar 6. Visualisasi *ligand binding site*. Domain *ligand binding site* pada mortalin ditampilkan dengan struktur *spheres* dan residu asam amino penyusun domain berupa struktur *lines* yang masing-masing berwarna merah

Setelah *ligand binding site* pada protein mortalin diketahui, maka dilakukan analisis *virtual screening* berupa *small molecule docking* yang bertujuan untuk mengetahui besar kecilnya *binding affinity* senyawa *query* yang berasal dari beras hitam (*black rice*) ketika berinteraksi dengan mortalin. Sebagian besar metode *molecular docking* digunakan untuk mendesain obat secara komputasi, berdasarkan tujuannya untuk *screening* potensi suatu

senyawa, metode ini juga dibagi menjadi 2 yaitu *reverse docking* dan *inverse docking*. *Reverse docking* merupakan *docking* yang dilakukan dengan tujuan untuk mencari posisi pengikatan atau *binding site* pada senyawa *query* yang mempunyai skor energi paling rendah ketika berikatan dengan domain protein target, oleh software dilakukan *clustering* untuk menemukan posisi pengikatan dengan energi yang rendah [8]. *Binding affinity* yang berarti energi pengikatan antara ligan dan protein, semakin negatif energinya maka semakin pula memungkinkan terbentuknya kompleks protein ligan, dan menunjukkan semakin berpotensi suatu ligan mempengaruhi fisiologi suatu protein target [9]. Jumlah dari *binding affinity* merupakan indikator dari kemampuan yang dimiliki oleh senyawa aktif pada protein target. Hal itu termasuk proses spontan, ikatan antara protein dan ligan terjadi karena perubahan energi bebas Gibbs (ΔG) pada sistem yang negatif saat mencapai keadaan setimbang pada tekanan dan temperatur yang konstan, karena asosiasi antara protein dan ligan menentukan nilai ΔG yang negatif, hal tersebut dapat dipertimbangkan untuk menetapkan ΔG dapat memberikan kesetabilan pada kompleks protein-ligan [10].

Penelitian ini menggunakan software PyRx untuk mensimulasikan *molecular docking* [11], *grid docking* diarahkan pada posisi koordinat *center* x: 102,41(Å), y: 61,08(Å), z: 2,73(Å) dan *dimensions* x: 20,83(Å), y: 23,50(Å), z: 20,46(Å). Hasil *small molecule docking* (Tabel 3), menunjukkan bahwa campesterol memiliki *binding affinity* paling rendah dibandingkan dari lima belas senyawa lainnya hal tersebut menunjukkan bahwa campesterol berpotensi dapat membentuk kompleks ligan protein dengan mortalin dan senyawa tersebut dapat mempengaruhi *biological activity* pada protein target [12].

Tabel 3. Skor hasil *docking*

Ligand	Target Protein	<i>Binding affinity</i> (kcal/mol)
CAMPESTEROL	Mortalin	-6,5
CYA-3-O-ARAB	Mortalin	-6,2
CYA-3,5-DIGLU	Mortalin	-6,2
QUER-3-O-RUTEIN	Mortalin	-6,1
CYCLO	Mortalin	-5,9
CYA-3-O-GLU	Mortalin	-5,8
PEON-3-O-GLU	Mortalin	-5,8
QUER-3-O-GLU	Mortalin	-5,8
BETA-KAROTENE	Mortalin	-5,6
ISHOR-3-O-GLU	Mortalin	-5,6
PELAR-3-GLU	Mortalin	-5,6
ZEAXANTHIN	Mortalin	-5,4
OMARIGLIPTIN	Mortalin	-5,3
LUTEIN	Mortalin	-5,0
LYCOPENE	Mortalin	-4,0
METHYLENE-FERULATE	Mortalin	-3,8

... Setelah diketahui nilai *binding affinity* masing-masing suatu senyawa *query* maka tahap analisis lanjutan yaitu interaksi protein dan ligan, dalam penelitian ini menggunakan software LigPlus. LigPlus umumnya sering digunakan untuk menganalisis jenis interaksi ikatan kimia dan posisi residu asam amino yang berinteraksi dengan ligan target secara komputasi. Interaksi ikatan kimia yang terbentuk yaitu interaksi hidrofobik dan ikatan hydrogen [13]. Penelitian ini menggunakan software LigPlus bertujuan untuk mengetahui kemungkinan senyawa *query* dapat berinteraksi dengan *ligand binding site* yang sebelumnya telah diprediksi. Hasil dari analisis LigPlot menunjukkan bahwa hampir semua senyawa *query* mampu berinteraksi dengan *ligand binding site* kecuali senyawa omarigliptin, karena senyawa tersebut tertambat tidak pada posisi residu asam amino yang diharapkan. Senyawa yang memiliki nilai *binding affinity* terendah yaitu campesterol berinteraksi dengan *ligand binding site* dengan interaksi hidrofobik yaitu pada residu asam amino Cys247, Gly318, dan Arg321 (Gambar 7).

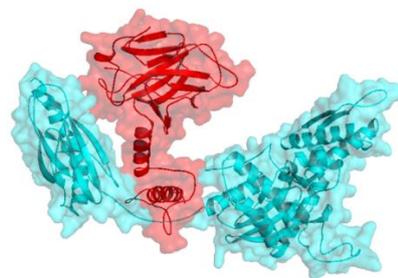
Tabel 4. Hasil analisis interaksi protein dan ligan

Ligand	Interactions
CAMPESTEROL	Hydrophobic : Cys247, Lys36, Met33, Thr16, Ala14, Gly318 , Asp344, Asn342, Arg321 Hydrogen : Arg15, Ser250
CYA-3-O-ARAB	Hydrophobic : Cys247, Pro343, Arg15, Pro18, Asn342 Hydrogen : Arg321 , Lys36, Met33, Arg239
CYA-3,5-DIGLU	Hydrophobic : Ser250 , Glu345, Arg15, Glu243 , Met319 Hydrogen : Gly318 , Arg321
QUER-3-O-RUTEIN	Hydrophobic : Met33, Thr16, Pro18, Met319 , Ala14, Asp344, Gly177 Hydrogen : Arg239, Glu206, Glu243
CYCLO	Hydrophobic : Pro18, Thr16, Glu206, Met33, Met319 , Lys36, Arg37, Glu243 , Glu204 Hydrogen : -
CYA-3-O-GLU	Hydrophobic : Cys247, Glu248, Met319 , Arg321, Gly318 Hydrogen : Ser250 , Ser251, Asp344
PEON-3-O-GLU	Hydrophobic : Arg37, Met33, Glu206, Arg239, Glu240 Hydrogen : Lys36, Glu243 , Gln236
QUER-3-O-GLU	Hydrophobic : Gly205, Lys36, Met319 , Met33, Pro18, Thr16 Hydrogen : Lys246 , Glu243 , Glu206, Gly177 , Asp344
BETA-KAROTENE	Hydrophobic : Glu243 , Lys36, Arg239, Glu240, Lys244, Glu248, Ser252, Ser251 Hydrogen : -
ISHOR-3-O-GLU	Hydrophobic : Gly318, Met319, Cys247, Ser250 , Arg321 , Glu248 Hydrogen : Asp344, Ser251, Asn342
PELAR-3-GLU	Hydrophobic : Cys247, Glu248, Arg321 , Gly318, Met319 Hydrogen : Ser251, Ser250 , Asp344
ZEAXANTHIN	Hydrophobic : Glu248, Glu243 , Ser252, Glu240, Lys244, Cys247, Gln236, Arg37 Hydrogen : Lys36
OMARIGLIPTIN	Hydrophobic : Asp344, Thr16, Met33, Pro18, Lys36 Hydrogen : Arg15
LUTEIN	Hydrophobic : Met33, Lys36, Arg37, Glu243 , Lys244, Glu248, Ser251 Hydrogen : Ser252
LYCOPENE	Hydrophobic : Pro18, Glu243 , Met33, Glu240, Arg239, Gln236, Lys36, Arg37 Hydrogen : -
METHYLENE-FERULATE	Hydrophobic : Met33, Glu243 , Pro18, Ala14 Hydrogen : Arg239, Glu206, Lys36
Predicted Binding Site	Gly177 , Gly176 , Gly205 , Glu243 , Lys246 , Cys247 , Ser250 , Met322 , Arg321 , Met319 , Gly318 , Gly317

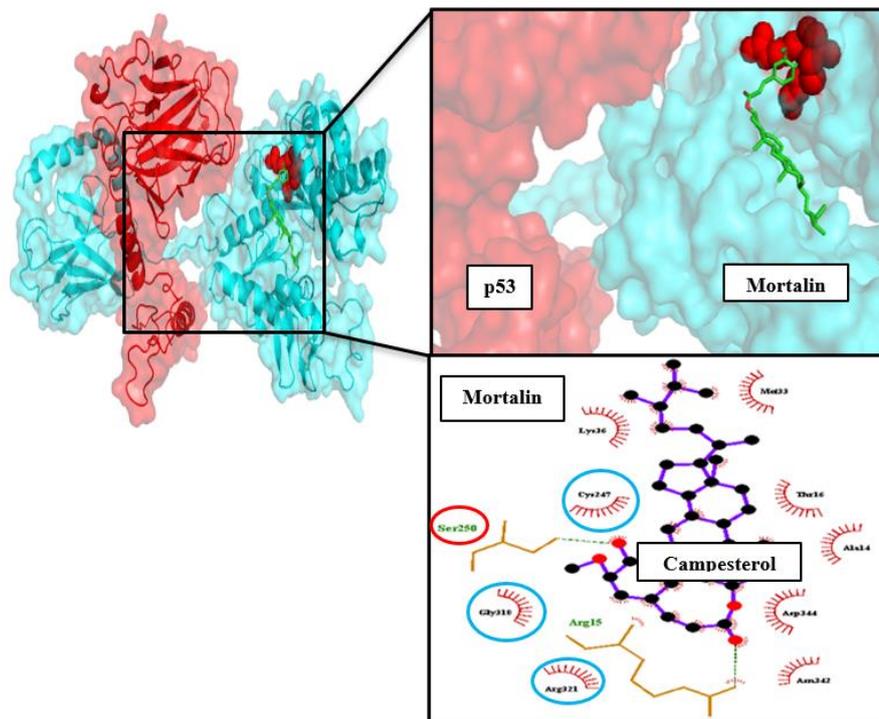
Senyawa aktif yang diprediksi memiliki ikatan yang kuat pada reseptor atau protein target, jika dapat berikatan melalui interaksi ikatan hidrogen dan dapat berikatan pada posisi

residu asam amino yang sama pada *ligand binding site* [14]. Jadi senyawa senyawa yang diprediksi memiliki kemampuan yang kuat untuk menghambat suatu reseptor atau protein yaitu jika terdapat beberapa posisi residu asam amino yang similar dengan *predicted binding site* atau kontrol. Ikatan hidrogen merupakan interaksi elektrostatik antara atom hidrogen yang berikatan dengan atom yang bersifat elektronegatif dengan atom lainnya. Kekuatan ikatan hidrogen berada dibawah ikatan kovalen, namun kehadirannya sangatlah penting karena menyangkut struktur dan karakteristik dari suatu molekul. Dalam kedokteran, ikatan hidrogen digunakan untuk mempelajari desain dan interaksi antara molekul obat serta sistem metabolisme [15]. Hasil analisis interaksi protein ligan menunjukkan bahwa senyawa campesterol memiliki ikatan hidrogen dengan *ligand binding site* pada residu asam amino Ser250 (Gambar 7), hal tersebut dapat diasumsikan bahwa senyawa tersebut dapat menjadi inhibitor protein mortalin.

Saat kondisi kanker protein mortalin akan berinteraksi dengan p53 dengan cara *direct binding* [16]. Penelitian ini menggunakan webserver PatchDock dan FireDock untuk mensimulasikan kondisi dimana protein mortalin berinteraksi dengan p53 ketika belum dan sudah terdapat inhibitor dari senyawa *query* yang terkandung dalam beras hitam yang *binding* dengan *ligand binding site* pada protein mortalin. Hasil analisis protein docking yaitu berupa energi ikatan (kcal/mol) menunjukkan bahwa ketika terbentuknya kompleks mortalin-p53 dalam kondisi tidak terdapat inhibitor (Gambar 7) maka besarnya energi *attractive* Van der Waals sebesar -37,26 kcal/mol dan +46,68 kcal/mol untuk *repulsive*. Namun setelah terdapat ligan campesterol yang *binding* pada *ligand binding site* pada mortalin terjadi perubahan energi *attractive* dan *repulsive* Van der Waals yaitu masing-masing sebesar -18,90 kcal/mol dan +165,90 kcal/mol pada kompleks mortalin-p53 (Gambar 8). Gaya Van der Waals yang terdiri atas *attractive* dan *repulsive* berkontribusi dalam terbentuknya nilai *binding affinity* dan kestabilan kompleks yang terbentuk pada suatu molekul ketika berinteraksi dengan molekul lainnya [17].



Gambar 7. Visualisasi kompleks p53 dengan mortalin tanpa senyawa bioaktif, struktur protein mortalin ditampilkan dalam bentuk *surface* transparan dan struktur *cartoon* dengan warna *cyans* sedangkan protein p53 berwarna merah.



Gambar 8. Visualisasi kompleks p53-mortalin-campesterol. *Ligand binding site* ditampilkan dalam struktur *spheres* berwarna merah dan ligan berwarna hijau dalam struktur *sticks*. Lingkaran berwarna *cyans* dan merah pada hasil analisis interaksi protein ligan menunjukkan posisi residu asam amino *ligand binding site* pada mortalin yang berinteraksi dengan senyawa campesterol.

Jadi berdasarkan dari hasil penelitian yang diperoleh, senyawa campesterol yang terkandung dalam beras hitam berpotensi sebagai obat kanker yang memiliki mekanisme yaitu dengan cara berikatan dengan *ligand binding site* pada mortalin sehingga dapat menghambat terjadinya kompleks mortalin-p53. Ikatan senyawa campesterol pada mortalin mengakibatkan ketidakstabilan kompleks mortalin p53 yang ditandai dengan penambahan nilai energi *attractive* dan *repulsive* Van der Waals sehingga kompleks tersebut cenderung positif atau bersifat tolak-menolak.

2.2 Uji *in vivo*

Uji *in vivo* dilaksanakan dengan eksperimental desain sebagai berikut:

Sebanyak 50 ekor mencit Balb/c betina berumur 6 minggu dibagi menjadi 6 kelompok [18] sebagaimana berikut;

- N = Kontrol normal;
- K- = Mencit diinjeksi DMBA;

K+ = Mencit diinjeksi DMBA dan ditreatment Cisplatin (5 mg/kg);
BM1 = Mencit diinjeksi DMBA dan ditreatment serbuk instan beras hitam (0,5 g/kg);
BM2 = Mencit diinjeksi DMBA dan ditreatment serbuk instan beras hitam (0,4 g/kg);
BM3 = Mencit diinjeksi DMBA dan ditreatment serbuk instan beras hitam (0,3 g/kg);
BM4 = Mencit diinjeksi DMBA dan ditreatment serbuk instan beras hitam (0,2 g/kg).

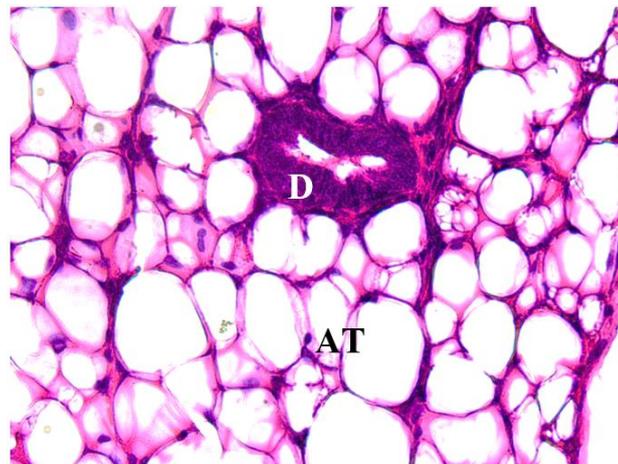
Induksi DMBA dilakukan tiap minggu selama 5 minggu melalui injeksi subkutan dengan dosis 15 mg/kg BB mencit. Pada minggu ke-5 dan ke-10, sebagian mencit yang diinduksi DMBA dibedah untuk diisolasi jaringan mammae dan dibuat preparat histologi dengan pewarnaan HE yang bertujuan untuk melakukan konfirmasi permodelan mencit kanker payudara [19]. Setelah mencit terkonfirmasi kanker, mencit ditreatment dengan serbuk instan beras hitam selama dua minggu [20]. Setelah itu, semua mencit dibedah untuk diisolasi jaringan mammae, hepar, dan spleen untuk analisis histologi dan *flow cytometry*.

2.2.1 Histologi jaringan mammae pada mencit model kanker payudara

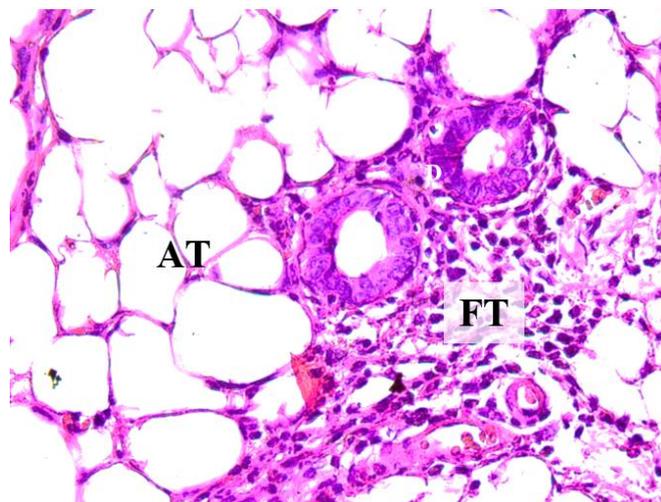
2.2.1.1 Evaluasi dan konfirmasi histologi mammae model mencit kanker pada minggu ke-10

Penggunaan senyawa kimia karsinogen banyak digunakan dalam pembuatan model kanker pada rodensia. Salah satu senyawa karsinogen yang paling umum digunakan adalah *7,12-dimethylbenz(a)anthracene* (DMBA) yang memiliki sifat baik karsinogen maupun efek immunosupresif telah diketahui berhasil menginduksi pembentukan tumor mammae pada model rodensia [21]. Pengamatan histologi jaringan mammae mencit normal (yang tidak diinduksi DMBA) dianalisis sebagai pembanding (Gambar 9). Histologi pada mammae normal menunjukkan adanya duktus yang dikelilingi dengan jaringan adiposa yang kompak. Histologi jaringan mammae mencit yang sudah diinduksi DMBA pada minggu ke 4 (Gambar 10) belum menunjukkan adanya abnormalitas jaringan. Duktus pada kelompok tersebut dikelilingi oleh stroma yang dibentuk oleh jaringan adiposa dan jaringan ikat fibrosa. Namun, setelah mencit diinjeksi sebanyak 5 kali dan dibedah pada minggu ke 10, ditemukan adanya abnormalitas atau neoplasia pada jaringan (Gambar 11) dan mikroinvasi menuju sel stroma (Gambar 12). Gambar 3 menunjukkan jaringan epitel luminal penyusun duktus telah mengalami neoplasia. Sel abnormal menunjukkan karakteristik bentuk pleomorfik atau memiliki variasi bentuk sel maupun nukleusnya. Sel-sel tersebut masih terlokalisasi di area duktus, berproliferasi hingga menutupi lumen. Sel-sel abnormal yang memenuhi area duktus dapat mengalami mikroinvasi yang mengakibatkan sel tumor tersebut menginfiltrasi jaringan stroma (panah putih) (Gambar 12). Kondisi ini merupakan awal peralihan dari karsinoma *in-situ* menjadi karsinoma invasive. Mikroinvasi yang ditunjukkan pada Gambar 12 sejalan dengan penelitian Schulze-Garg dkk

(2000) yang menunjukkan adanya invasive focal pada membrane basal oleh sel-sel neoplastik pada mencit transgenik WAP-TNP8 yang ditunjukkan pada Gambar 13.



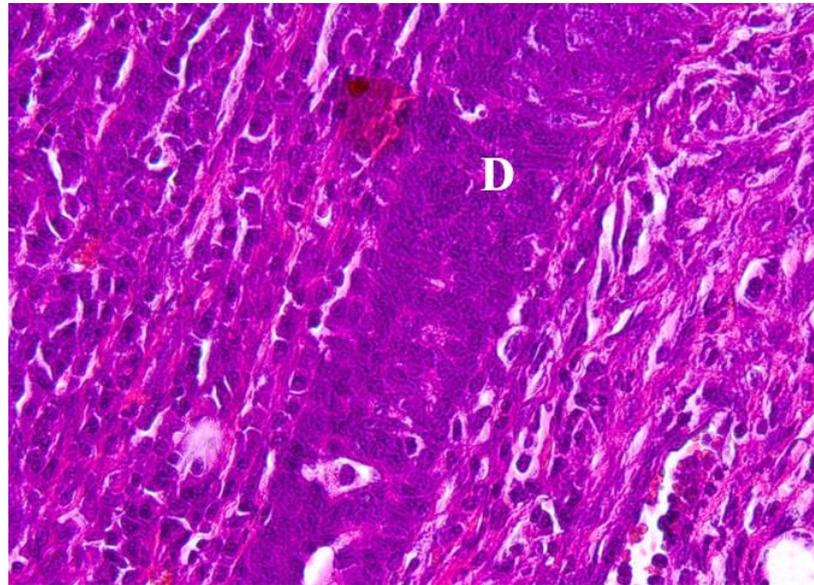
Gambar 9. Histologi jaringan mammae mencit normal. Histologi menunjukkan adanya duktus (D) yang tersusun atas epitel bilayer melingkar. Epitel terdalam yang berbentuk kuboid disebut bagian luminal, sementara yang terluar yaitu mioepitel berbentuk spindel. Jaringan epitel tersebut dikelilingi oleh stroma berupa jaringan adiposa (AT) (M: 400x).



Gambar 10. Histologi jaringan mammae mencit yang diinduksi DMBA pada minggu ke-4. Jaringan payudara masih terdiri atas duktus yang dikelilingi oleh stroma. Stroma selain dibentuk oleh jaringan adiposa juga terdapat jaringan ikat fibrosa (FT) di beberapa lokasi (M: 400x)

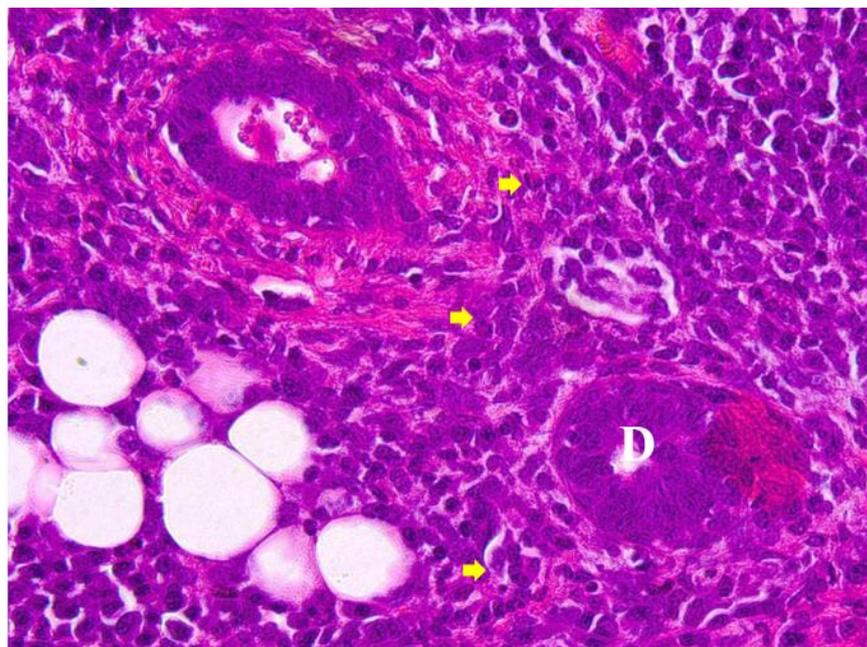
Histologi pada mammae normal menunjukkan adanya duktus yang dikelilingi dengan jaringan adiposa yang kompak. Histologi jaringan mammae mencit yang sudah diinduksi DMBA pada minggu ke 4 (Gambar 10) belum menunjukkan adanya abnormalitas jaringan. Duktus pada kelompok tersebut dikelilingi oleh stroma yang dibentuk oleh jaringan adiposa dan jaringan ikat fibrosa. Namun, setelah mencit

diinjeksi sebanyak 5 kali dan dibedah pada minggu ke 10, ditemukan adanya abnormalitas atau neoplasia pada jaringan (Gambar 11) dan mikroinvasi menuju sel stroma (Gambar 12).



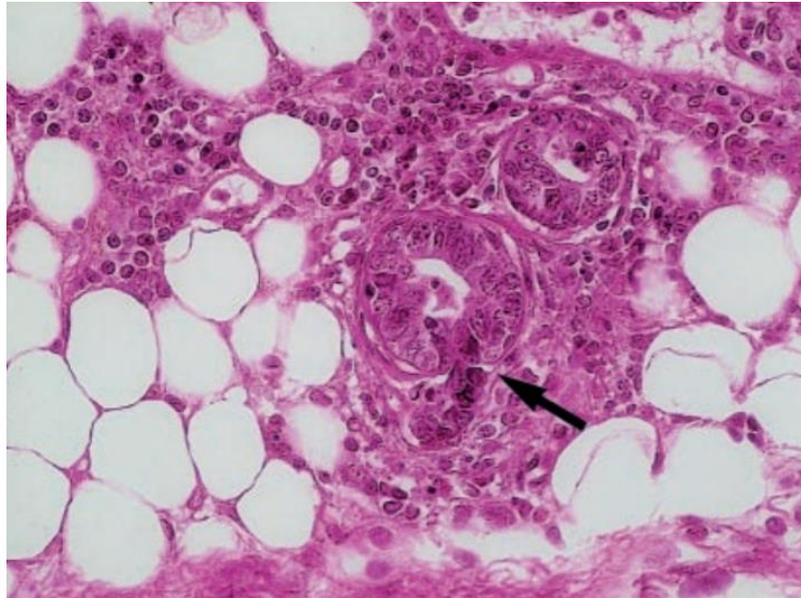
Gambar 11. Histologi jaringan mammae mencit yang diinduksi DMBA pada minggu ke-10. Duktus (D) mengalami neoplasia dan lumen duktus dipenuhi oleh sel-sel abnormal (M: 400x).

Gambar 11 menunjukkan jaringan epitel luminal penyusun duktus telah mengalami neoplasia. Sel abnormal menunjukkan karakteristik bentuk pleomorfik atau memiliki variasi bentuk sel maupun nukleusnya.



Gambar 12. Histologi jaringan mammae mencit yang diinduksi DMBA pada minggu ke-10. Sel-sel kanker mengalami mikroinvasi dan berinfiltrasi menuju stroma (panah putih) (M: 400x).

Sel-sel tersebut masih terlokalisasi di area duktus, berproliferasi hingga menutupi lumen. Sel-sel abnormal yang memenuhi area duktus dapat mengalami mikroinvasi yang mengakibatkan sel tumor tersebut menginfiltrasi jaringan stroma (panah kuning) (Gambar 12).



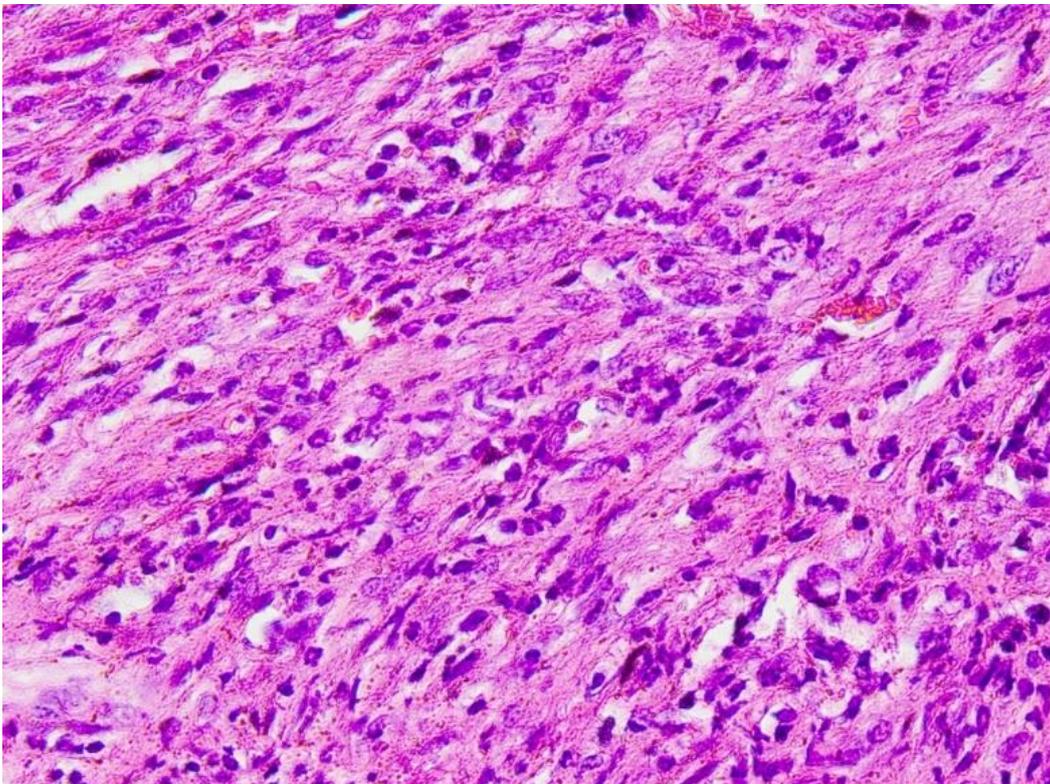
Gambar 13. Mikroinvasi ductal carcinoma pada mencit transgenik WAP-T-TN8. Tanda panah menunjukkan invasi focal.

Kondisi ini merupakan awal peralihan dari karsinoma *in-situ* menjadi karsinoma invasive. Mikroinvasi yang ditunjukkan pada Gambar 7 sejalan dengan penelitian [13] yang menunjukkan adanya invasive focal pada membrane basal oleh sel-sel neoplastik pada mencit transgenik WAP-TNP8 yang ditunjukkan pada Gambar 13.

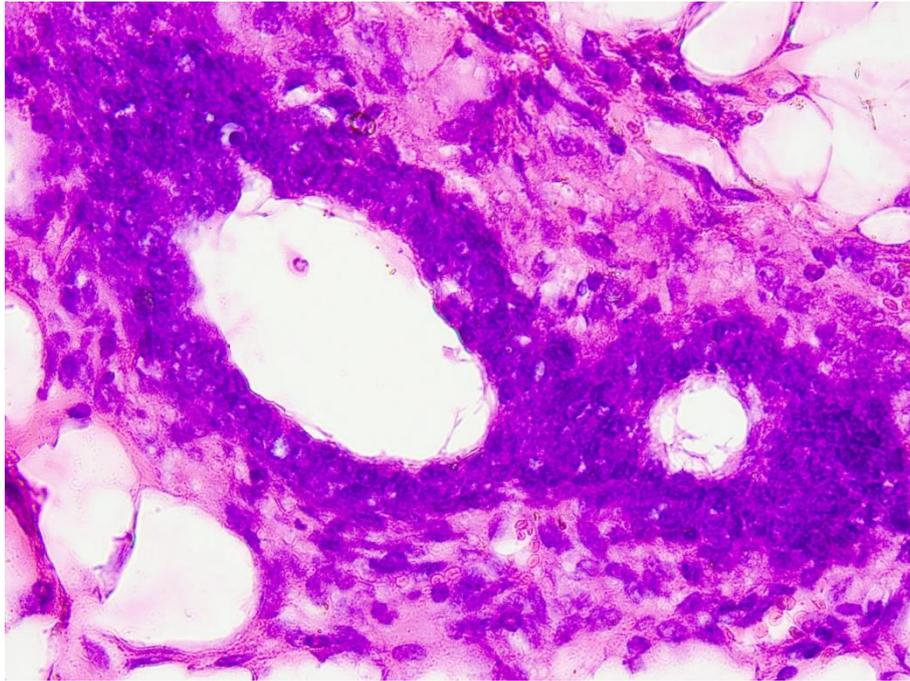
2.2.1.2 Pengaruh pemberian serbuk instan beras hitam terhadap histologi kanker payudara pada mencit model

Jaringan *mammae* yang diambil dari mencit hasil induksi DMBA setelah masuk minggu ke-12 tanpa perlakuan obat menunjukkan banyak sel abnormal (ditunjuk oleh panah hitam) yang menginfiltrasi stroma secara tidak beraturan. Struktur duktus sudah tidak tampak karena mioepitel sepenuhnya sudah rusak (Gambar 14). Kondisi berkurangnya mioepitel akan membuat struktur jaringan semakin rapuh. Kondisi ini akan mempermudah sel kanker menerobos mioepitel kemudian menyebar ke jaringan stroma. Kanker pada fase ini disebut sebagai karsinoma invasif, dapat berupa *invasive ductal carcinoma* atau *invasive lobular carcinoma* [23]. Sementara itu, mencit kanker yang diberi injeksi intratumoral menggunakan

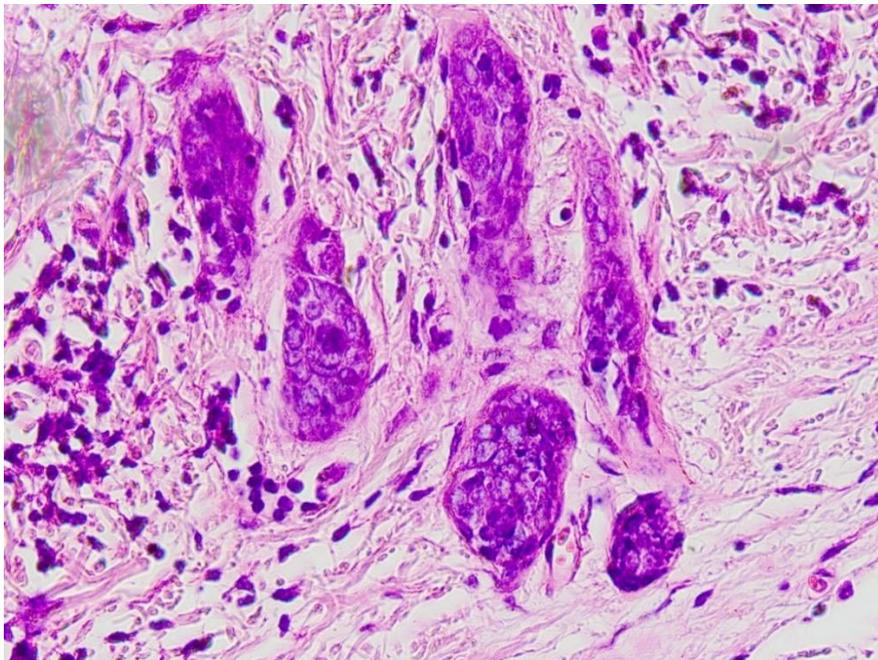
cisplatin 5 mg/kg BB memiliki histologi *mammae* yang lebih baik, di mana sel neoplastik masih berada pada duktus dengan dijumpai mikroinvasi yang ditunjuk panah putih (Gambar 15). Mencit kanker yang diberi perlakuan serbuk instan beras hitam secara oral menunjukkan histologi dengan progresivitas kanker yang bervariasi tiap dosis. Dosis 1 (0,2 g/kg BB) dan dosis 2 (0,3 g/kg BB) sama-sama memiliki histologi karsinoma invasif namun dengan struktur jaringan yang berbeda. Mencit dosis 1 menunjukkan infiltrasi sel neoplastik yang menyusun *tubule formation* (Gambar 16). *Tubule formation* merupakan kondisi histopatologi di mana beberapa klaster sel kanker invasif membentuk struktur menyerupai saluran yang lama-kelamaan menutup (Gambar 17).



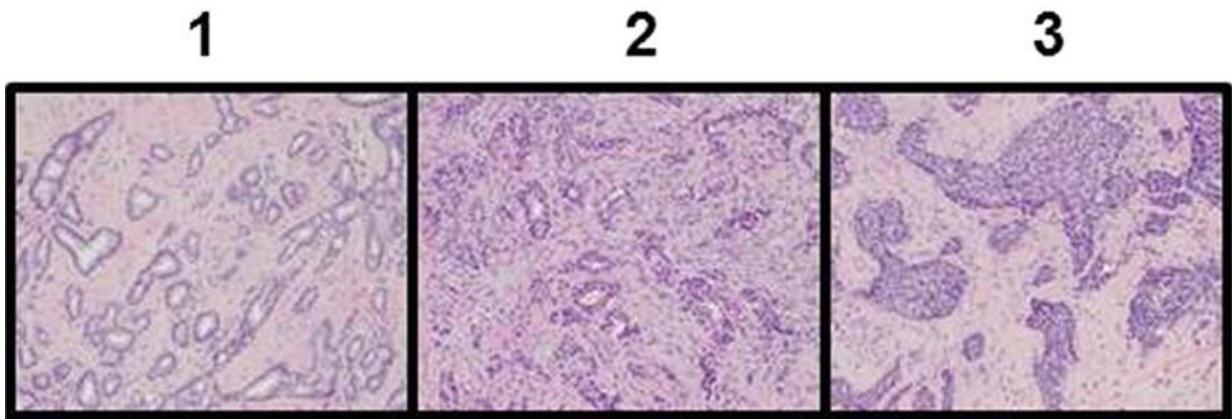
Gambar 19. Histologi jaringan mammae mencit yang diinduksi DMBA pada minggu ke-12. Sel tumor telah menginfiltrasi stroma (panah hitam) sehingga memasuki tahap karsinoma invasif (M: 400x).



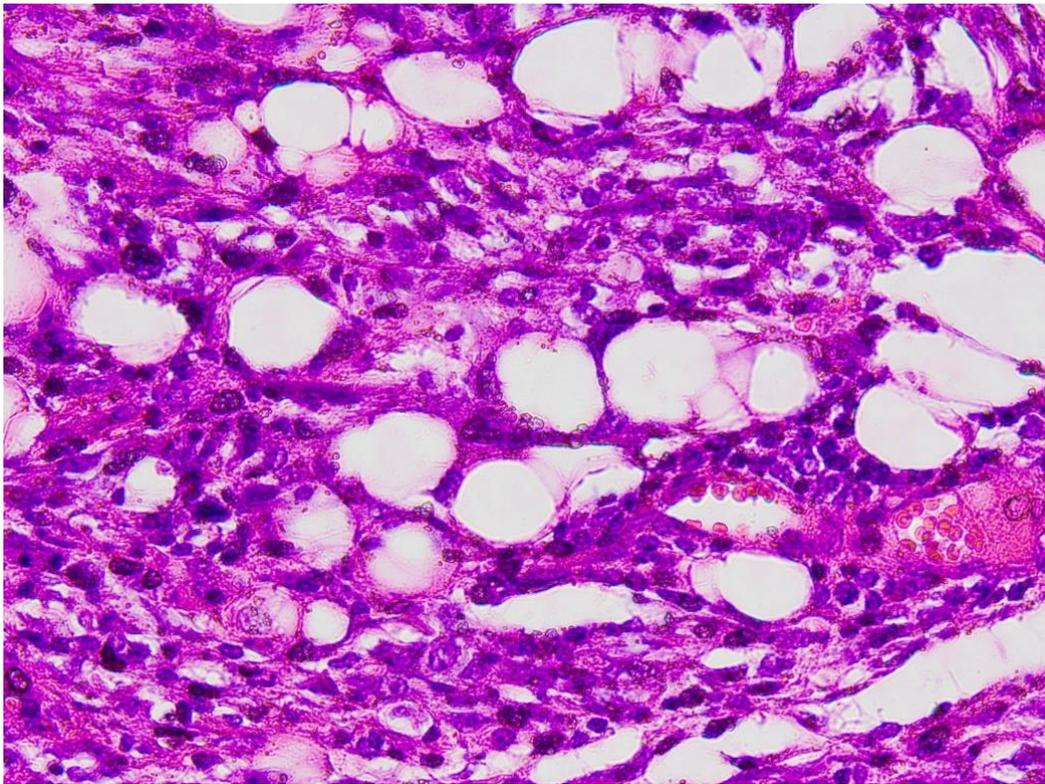
Gambar 20. Histologi mammae mencit kanker yang diberi cisplatin 5 mg/kg BB. Pertumbuhan kanker pada duktus sampai pada mikroinvasi/infiltrasi menuju stroma (panah putih) (M: 400x).



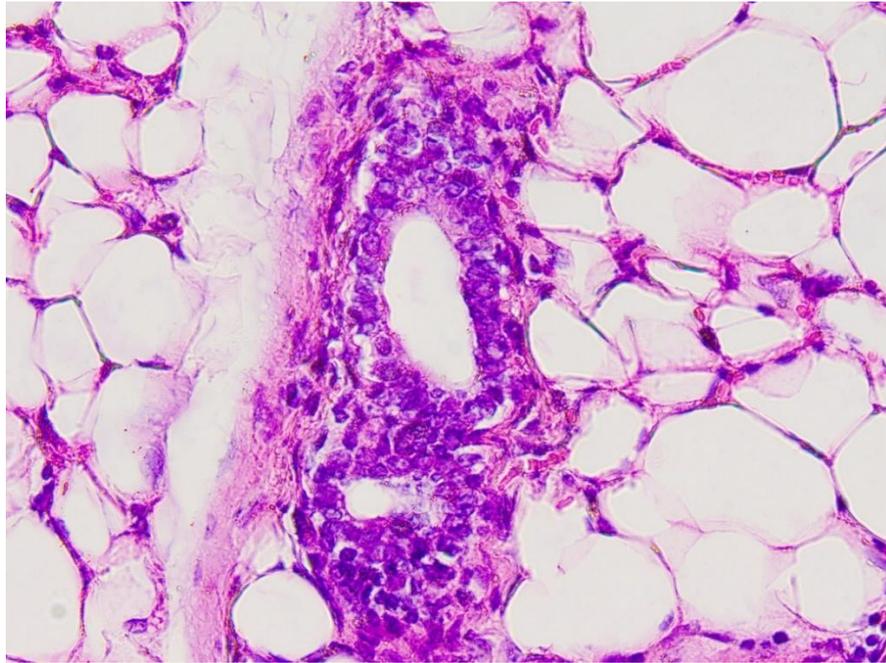
Gambar 21. Histologi mammae mencit kanker yang diberi serbuk instan beras merah 0,2 g/kg BB. Sel-sel tumor yang menginfiltrasi stroma membentuk *tubule formation* (panah putih) (M: 400x).



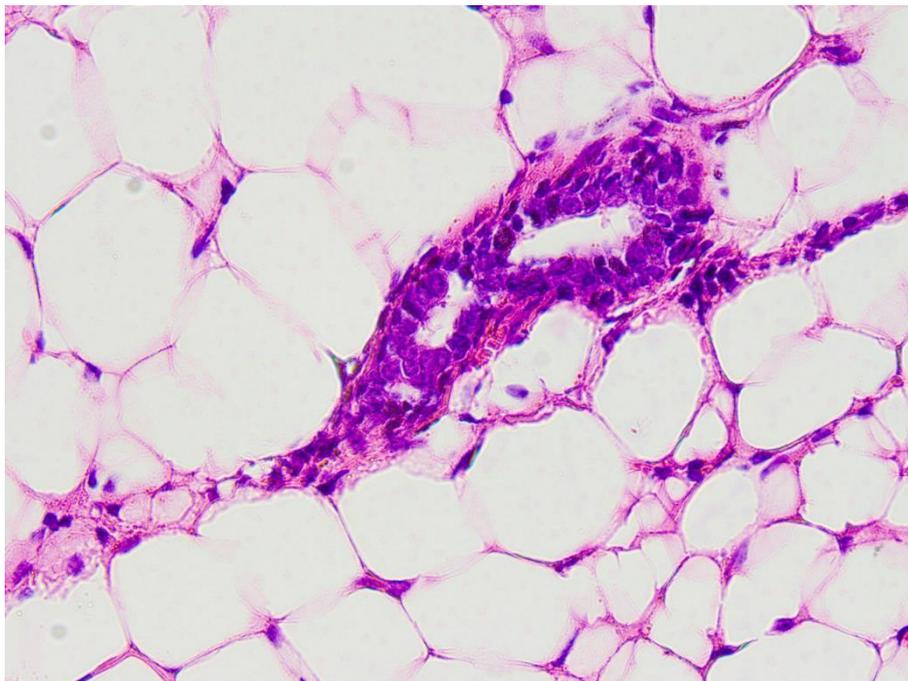
Gambar 22. *Tubule formation* pada karsinoma invasive [24].



Gambar 23. Histologi mammae mencit kanker yang diberi serbuk instan beras merah 0,3 g/kg BB. Tampak beberapa sel kanker (panah putih) telah menginfiltrasi stroma berupa jaringan adiposit (M: 400x).



Gambar 24. Histologi mammae mencit kanker yang diberi serbuk instan beras merah 0,4 mg/kg BB. Tampak sel neoplastik berkembang dari area duktus dan mulai menginfiltrasi stroma (panah putih) (M: 400x).



Gambar 25. Histologi mammae mencit kanker yang diberi serbuk instan beras merah 0,5 mg/kg BB. Tampak beberapa sel abnormal pada bagian duktus yang masih dikelilingi oleh mioepitel (M: 400x).

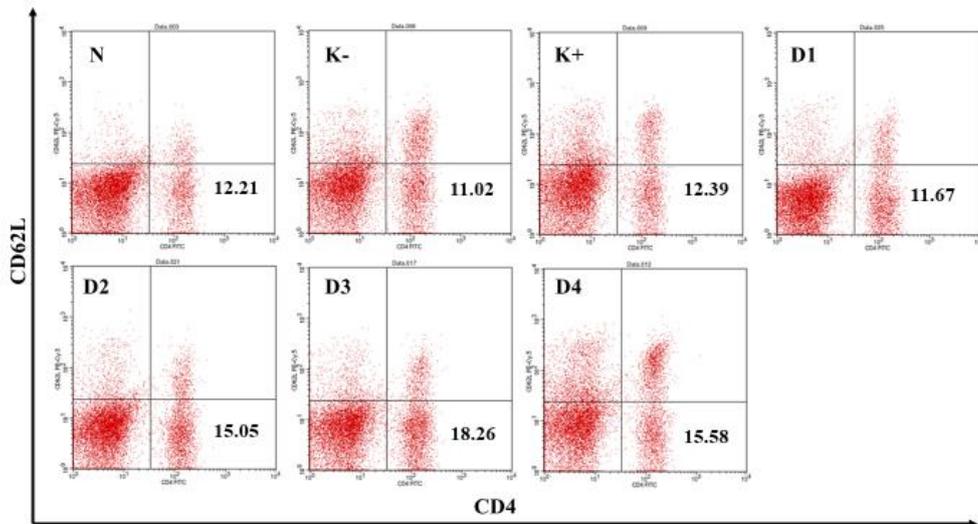
Karakteristik ini menjadi salah satu indikator yang diamati saat *grading* kanker payudara menurut aturan Nottingham [24]. Sementara itu, mencit dosis 2 menunjukkan infiltrasi sel kanker dengan sebaran tidak beraturan tidak jauh berbeda dengan tanpa *treatment* (Gambar 18). Mencit dengan *treatment* dosis 3 (0,4 g/kg BB) struktur histologinya tidak jauh berbeda dengan menggunakan cisplatin yaitu serupa *ductal carcinoma in situ* dengan mikroinvasi ditunjukkan panah putih (Gambar 19). Kondisi jaringan yang relatif lebih baik ditunjukkan oleh mencit kanker yang dengan *treatment* dosis 4 (0,5 g/kg BB) dikarenakan pertumbuhan sel tumor tampak sedikit hanya sebatas di daerah duktus tanpa adanya mikroinvasi (Gambar 20).

2.2.2 Profil imunologi mencit kanker

2.2.2.1 Peningkatan aktivasi sel T CD4 dan CD8 setelah diberikan serbuk instan beras hitam

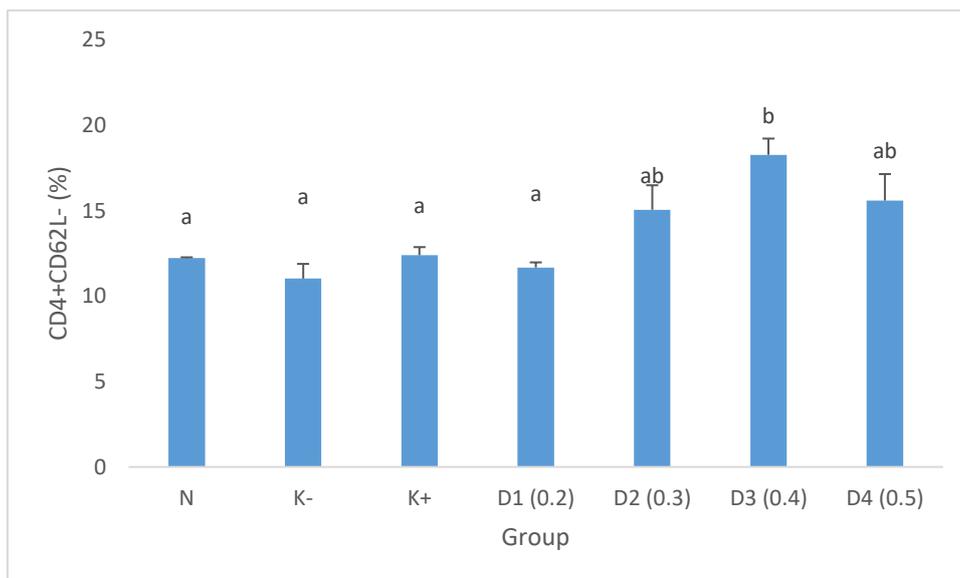
Keterlibatan sistem imun dalam mengeliminasi sel kanker menjadi pengaruh yang sangat signifikan dalam keberhasilan terapi penyakit kanker. Telah dibuktikan bahwa keterlibatan sel T CD4⁺ dan CD8⁺ memberikan respon imun anti-tumor yang efektif (Bui & Schreiber, 2007). Sel T CD4⁺ sangat penting sebagai priming spesifik sel T CD8⁺ dan ekspansi sekunder dan memori CD8⁺. Sedangkan sel T CD8⁺ dapat mengeliminasi sel kanker melalui molekul sitotoksik seperti granzyme dan perforin [25]. Namun permasalahan yang sering ditemukan pada pasien kanker adalah adanya infiltrasi sel Treg yang dapat menginduksi immunosupresif pada lingkungan kanker sehingga menekan aktivasi sel T CD4⁺ dan CD8⁺ [26]. Selain itu, penghambatan aktivasi, proliferasi, dan eliminasi oleh sel T dapat terjadi karena adanya ikatan antara molekul PD-L1 pada sel kanker dengan molekul PD-1 pada sel T [25].

Berdasarkan hasil analisis flow cytometry sel T CD4 (Gambar 26), adanya mekanisme supresi dan penghambatan sel T pada kanker sesuai dengan hasil penelitian ini, yaitu rendahnya sel T CD4⁺ yang teraktivasi (CD4⁺CD62L⁻) pada kelompok mencit yang diinduksi DMBA (K⁻, 11%; K⁺, 12.39%; D1, 11.67%) (Gambar 27). Pemberian serbuk instan beras hitam mampu meningkatkan sel T CD4⁺ yang teraktivasi secara signifikan ($p < 0.05$) pada dosis 0.3 g/kg, 0.4 g/kg, dan 0.5 g/kg (Gambar 27). Pemberian serbuk instan beras hitam dengan dosis 0.2 g/kg belum mampu meningkatkan aktivasi sel T CD4⁺.



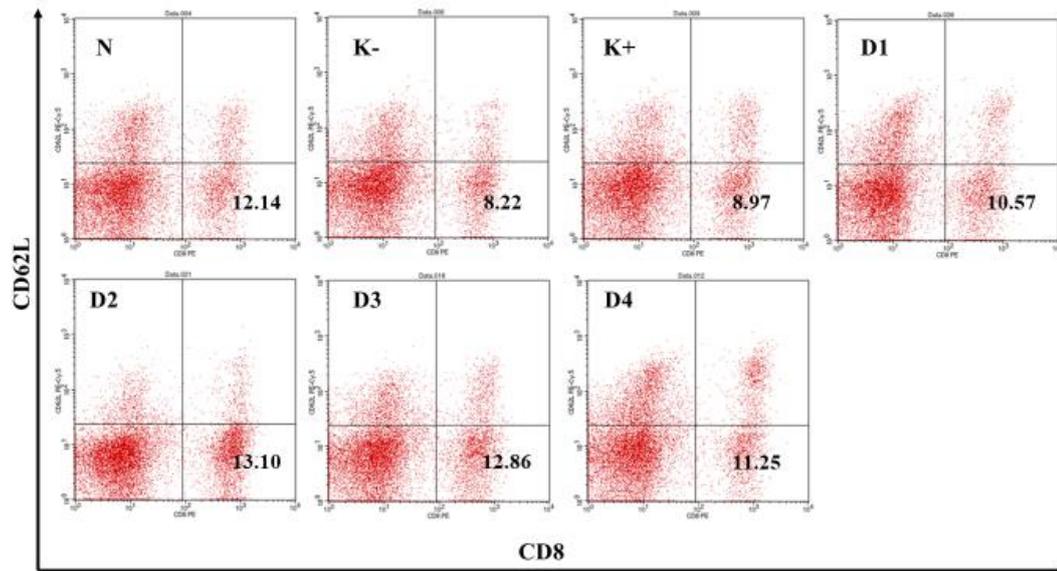
Gambar 26. Hasil analisis flow cytometry aktivasi sel T CD4

Berdasarkan [23], pemberian ekstrak dedak beras hitam pada mencit yang diinduksi *cyclophosphamide*, agen kemoterapi yang dapat mensupresi sistem imun, dapat meningkatkan aktivitas sel Natural Killer (NK) dan Cytotoxic T Lymphocyte (TCL). Kemampuan tersebut disebabkan karena adanya kandungan senyawa fungsional pada dedak beras hitam seperti senyawa fenolik yaitu tocoferol dan memiliki aktivitas antioksidan. Selain itu, kandungan senyawa penting yang terkandung pada beras hitam adalah antosianin, seperti cyanidin-3-glucoside and peonidin-3-glucoside.

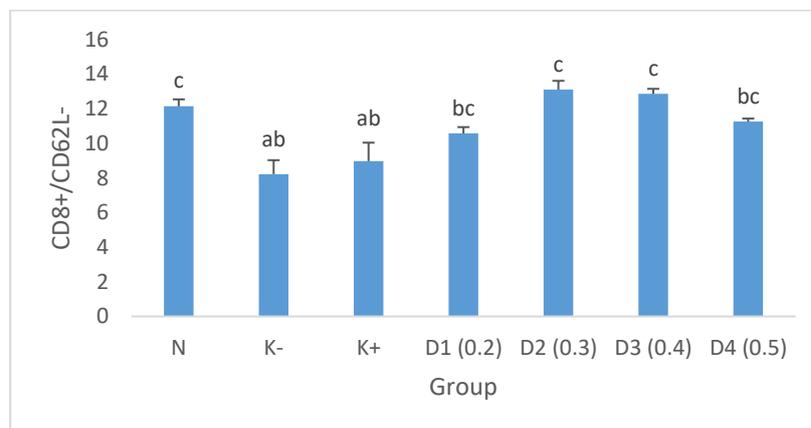


Gambar 27. Aktivitas sel T CD4⁺ (CD4⁺CD62L⁻)

Hasil penelitian ini juga menunjukkan adanya aktivitas sel T CD8⁺ yang rendah pada kelompok mencit yang diinduksi DMBA dan mengalami peningkatan yang signifikan setelah diberikan serbuk instan beras hitam ($p < 0.05$) (Gambar 28 & 29). Aktivasi sel T CD8⁺ (CD8⁺62L⁻) terendah ditunjukkan oleh kelompok K- dengan persentase 8.22% dan tertinggi ditunjukkan oleh kelompok D2 (13.10%), D3 (12.86%) (Gambar 28 & 29).



Gambar 28. Hasil analisis flow cytometry sel T CD8

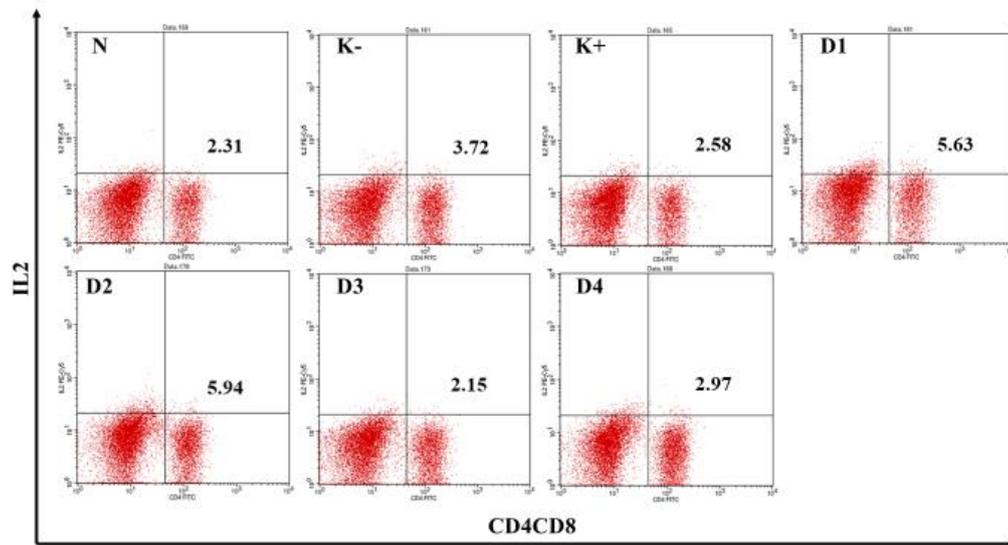


Gambar 29. Aktivasi Sel T CD8⁺

2.2.2.2 Pengaruh pemberian serbuk instan beras hitam terhadap produksi IL-2

Sitokin merupakan suatu biomolekul yang memiliki property biologis sebagai peran kunci pada infeksi, hematopoiesis, hemostasis dan tumorigenesis. Interleukin merupakan secretory immunomodulatory protein yang termasuk dalam family sitokin dan berperan dalam fungsi imunologikal yang kompleks. Interleukin-2 (IL-2) merupakan jenis interleukin yang

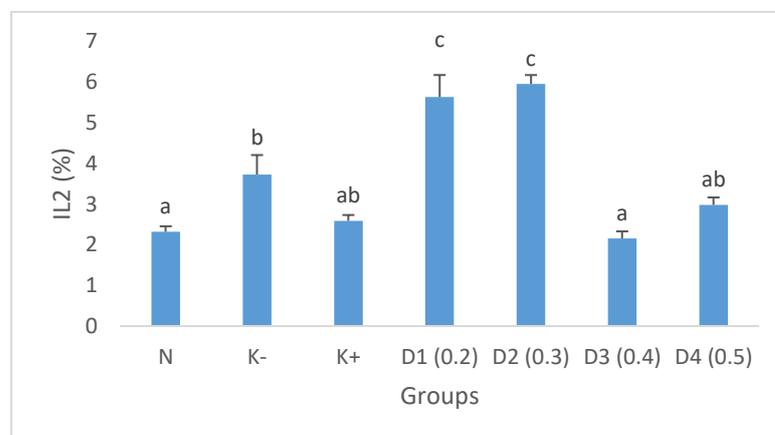
disekresikan oleh sel T(helper) dan berfungsi sebagai sitokin imunomodulator, dapat mengaktivasi sel NK dan monosit, dan sebagai faktor pertumbuhan untuk sel limfosit B dan T [19].



Gambar 30. Hasil analisis flow cytometry produksi IL2

Pada penelitian ini, produksi IL-2 pada kelompok K- cukup rendah (3.72%) dan mengalami peningkatan yang signifikan setelah diberikan ekstrak beras hitam dengan dosis 0.2 g/kg (D1) dan 0.3 g/kg (D2) ($p < 0.05$) (Gambar 11). Level produksi IL-2 menurun pada kelompok K+, D3, dan D4 (Gambar 30 & 31).

Peningkatan produksi IL2 yang signifikan setelah diberikan serbuk instan beras hitam dengan dosis 0.2 g/kg (D2) dan 0.3 g/kg (D3) menunjukkan potensi dan manfaat dari penggunaan serbuk instan beras hitam. Dimana, ekstrak ini mampu meningkatkan produksi IL-2 yang berperan dalam aktivasi NK dan monist, serta sebagai faktor pertumbuhan untuk sel limfosit B dan T.

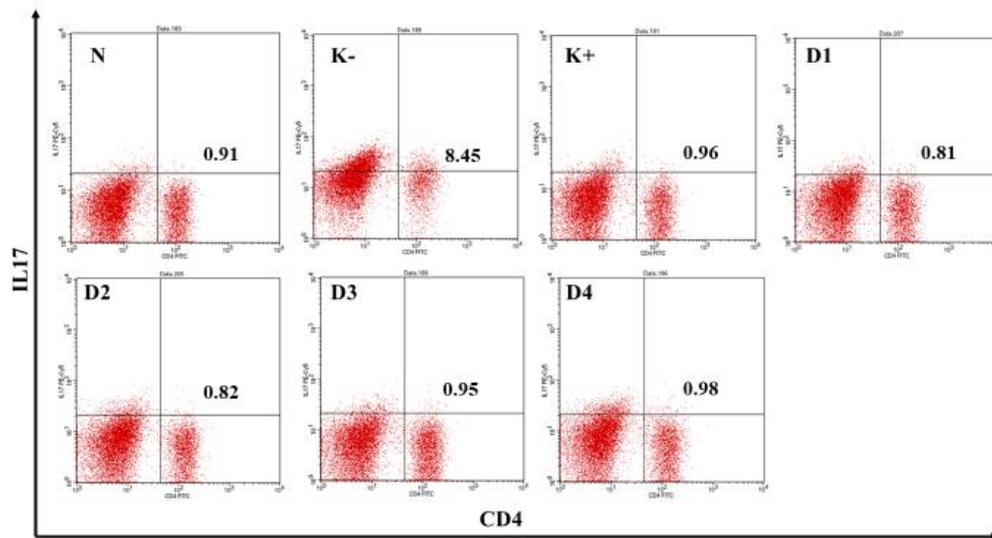


Gambar 31. Produksi IL-2 dari sel limfosit T

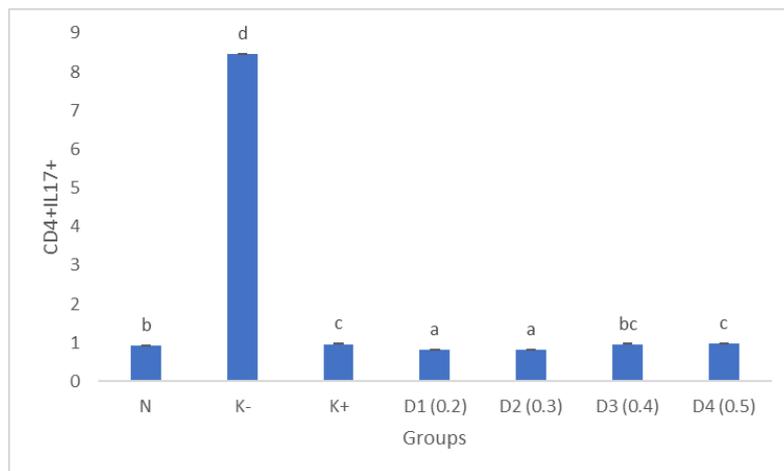
2.2.2.3 Penurunan level IL-17 dari CD4+ akibat pemberian serbuk instan beras hitam

Interleukin-17 merupakan salah satu jenis interleukin yang krusial dalam perkembangan kanker. Berdasarkan Welte & Zhang (2015), IL-17 banyak ditemukan pada solid tumor dan keberadaannya berbanding lurus dengan tingkatan/*grade* histologi tumor.

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan produksi IL-17 pada kelompok K- dari normal (Gambar 32 & 33), IL-17 pada kelompok N adalah 0.91% sedangkan pada kelompok K- 8.45% ($p < 0.05$). Produksi IL-17 yang kemudian dapat berikatan dengan IL-17 reseptor pada permukaan sel tumor mampu mendukung pertumbuhan dan perkembangan sel melalui beberapa cara, (1) menekan apoptosis sel mammary carcinoma, aktivasi jalur MAPK, JNK, dan persinyalan STAT-3 melalui aktivasi tumor progression locus 2 (TPL2) [26].



Gambar 32. Hasil analisis flow cytometri produksi IL-17 oleh CD4+



Gambar 33. Produksi IL-17 oleh sel T CD4+

Sehingga penurunan produksi IL-17 yang signifikan pada kelompok kanker setelah pemberian serbuk instan beras hitam memberikan efek yang menjanjikan. Penurunan produksi IL-17 juga terjadi pada kelompok K+ sebagaimana pada kelompok mencit yang mendapat treatment serbuk instan beras hitam (Gambar 33).

Interleukin-17 juga disebutkan dapat mempromosikan kanker melalui tumor angiogenesis via induksi kemokin CXCL8, MMP2, MMP9, dan VEGF. Kejadian metastasis, yaitu tersebarnya sel kanker keluar organ lain, juga disebutkan karena adanya pengaruh dari IL-17. Metastasis kanker payudara menuju tulang dapat dimediasi oleh persinyalan IL-17B/IL-17BR [28].

2.2.3. Kesimpulan

Hasil uji *in silico* menunjukkan bahwa dari 15 senyawa bioaktif yang terdapat pada beras hitam yang paling berpotensi sebagai obat kanker adalah senyawa campesterol, yang memiliki mekanisme dengan cara berikatan dengan *ligan binding site* pada mortalin sehingga dapat menghambat terjadinya kompleks mortalin-p53. Adapun hasil analisis antikanker secara *in vivo* menunjukkan bahwa serbuk instan beras hitam memberikan efek yang menjanjikan dan dosis terbaik sampel sebagai antikanker adalah 0.3 g/kg.

D. **STATUS LUARAN:** Tuliskan jenis, identitas dan status ketercapaian setiap luaran wajib dan luaran tambahan (jika ada) yang dijanjikan pada tahun pelaksanaan penelitian. Jenis luaran dapat berupa publikasi, perolehan kekayaan intelektual, hasil pengujian atau luaran lainnya yang telah dijanjikan pada proposal. Uraian status luaran harus didukung dengan bukti kemajuan ketercapaian luaran sesuai dengan luaran yang dijanjikan. Lengkapi isian jenis luaran yang dijanjikan serta unggah bukti dokumen ketercapaian luaran wajib dan luaran tambahan melalui Simlitabmas mengikuti format sebagaimana terlihat pada bagian isian luaran

LUARAN WAJIB

Tahun luaran	Jenis luaran	Status target luaran (<i>Accepted, publisher, terdaftar atau granted, atau status lainnya</i>)	Keterangan (url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan jenis lainnya)
1	Hak Cipta	Granted	No. Pendaftaran: EC00201970618 Granted 000153750 11 September 2019 https://e-hakcipta.dgip.go.id/index.php/c?code=STMG%2FAK6%2BygfHIO%2F%2FIHZIF71IHxLOKuQIEISVnNOBj0%3D
2	Dokumentasi hasil uji coba produk	Ada	https://drive.google.com/file/d/1F0-Pn_gr4G3xRSbhZV_bNNrUH2ytO9-2/view?usp=sharing

LUARAN TAMBAHAN

Tahun luaran	Jenis luaran	Status target luaran (<i>Accepted, publisher, terdaftar atau granted, atau status lainnya</i>)	Keterangan (url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan jenis lainnya)
1	Publikasi Ilmiah Jurnal Internasional	submitted	Medical Journal Indonesia https://mji.ui.ac.id/journal/index.php/mji
1	Keikutsertaan dalam Seminar Nasional	Sudah dilaksanakan	Seminar Nasional “Jalur Baru Biosains Menuju Kesejahteraan Masyarakat” Vol. 1(1) 30 Agustus 2019 ISBN 978-602-5793-53-0 FMIPA Universitas PGRI Adi Buana Surabaya http://semnasbio.unipasby.ac.id/index.php/semnasbio/issue/view/1/1
2	Publikasi Ilmiah Jurnal Nasional Tidak Terakreditasi	Accepted/ publish	Jurnal Teknik Industri HEURISTIC ISSN 1693-8232 Vol. 9 Nomor 1 awal 2021 http://jurnal.untag-sby.ac.id/index.php/HEURISTIC
2	Keikutsertaan dalam Seminar Nasional	Sudah dilaksanakan	Seminar Nasional tentang Pembangunan Pertanian Berkelanjutan dalam Perspektif Teknologi, Sosial, dan Ekonomi, yang dilaksanakan oleh FP Unmuh Purwokerto Kamis, 27 Agustus 2020 Proceding ISBN: 978-602-6697-58-5 http://digital.library.ump.ac.id/972/

.....

E. PERAN MITRA: Tuliskan realisasi kerjasama dan kontribusi Mitra baik *in-kind* maupun *in-cash* (jika ada). Bukti pendukung realisasi kerjasama dan realisasi kontribusi mitra dilaporkan sesuai dengan kondisi yang sebenarnya. Bukti dokumen realisasi kerjasama dengan Mitra diunggah melalui Simlitabmas mengikuti format sebagaimana terlihat pada bagian isian mitra

Mitra dalam penelitian ini adalah Akademi Gizi Surabaya yang secara kelembagaan di bawah naungan Dinas Kesehatan Kota Surabaya dimana selain proses pembelajaran yang wajib dilaksanakan sebagai Lembaga Pendidikan, salah satu kegiatan yang diadakan secara rutin adalah memberikan pendampingan, pengarahan, pelatihan dan lain-lain kepada Pusat Kesehatan Masyarakat (Puskesmas) yang ada diseluruh wilayah Kota Surabaya.

Mengingat masyarakat belum banyak yang mengetahui keberadaan beras hitam, karena selama ini beras hitam disebut sebagai *forbidden rice*, hanya boleh dikonsumsi oleh keluarga kerajaan; juga tentang manfaat konsumsi beras hitam terhadap kesehatan. maka sangat diperlukan sosialisasi tentang semua yang terkait dengan beras hitam termasuk potensinya sebagai antikanker. Sehubungan dengan

hal tersebut maka peran Mitra sangat besar dalam upaya menyebarluaskan hasil penelitian ini ke masyarakat luas melalui Puskesmas-Puskesmas se Kota Surabaya. Diharapkan dengan tersosialisasinya informasi ini berdampak pada peningkatan kesehatan masyarakat yang merupakan hak semua orang.

Jadi berdasarkan hal tersebut maka peran Mitra dalam penelitian ini adalah

1. Media sosialisasi yang sangat efektif dan efisien
2. Memberikan fasilitas baik waktu, ruang, audien dan konsumsi selama pelaksanaan sosialisasi.

Berikut dokumentasi kegiatan Mitra dalam mensosialisasikan hasil penelitian ini ke beberapa PUSKESMAS binaan yang ada di seluruh wilayah Kota Surabaya.







.....
.....

F. KENDALA PELAKSANAAN PENELITIAN: Tuliskan kesulitan atau hambatan yang dihadapi selama melakukan penelitian dan mencapai luaran yang dijanjikan, termasuk penjelasan jika pelaksanaan penelitian dan luaran penelitian tidak sesuai dengan yang direncanakan atau dijanjikan.

Tidak ada

.....
.....

G. RENCANA TINDAK LANJUT PENELITIAN: Tuliskan dan uraikan rencana tindak lanjut penelitian selanjutnya dengan melihat hasil penelitian yang telah diperoleh. Jika ada target yang belum diselesaikan pada akhir tahun pelaksanaan penelitian, pada bagian ini dapat dituliskan rencana penyelesaian target yang belum tercapai tersebut.

Penelitian tahun terakhir

.....
.....

H. DAFTAR PUSTAKA: Penyusunan Daftar Pustaka berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan. Hanya pustaka yang disitasi pada laporan akhir yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka.

DAFTAR PUSTAKA

1. CCRC. 2016. Mekanisme dan Regulasi Apoptosis. <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id>. Diakses tanggal 15 Oktober 2016
2. Caro, G.P., S. Watanabe, A. Crozier, T. Fujimura dan T. Yokota. 2013. Phytochemical Profile of a Japanese Black-purple Rice. *Food Chemistry*, 141 (7): 2821-2827
3. Hendarto H, Prabowo P, Moeloek FA and Soetjipto S. Growth differentiation factor-9

- concentration in the follicular fluid of infertile women with endometriosis. *Fertility and Sterility*. 2010; 94(2):758-60
4. Faustman, D. dan M. Davis. 2010. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nature*. 9
 5. Wang, Q., M. Xia, C. Liu, H. Guo, Q. Hu, Y. Zhang, M. Hou, H. Zhu, J. Ma and W. Ling. 2007. Cyanidin-3-O- β -glucoside Inhibits iNOS and COX-2 Expression by Inducing Liver X Receptor Alpha Activation in THP-1 Macrophages. *Life Science*, 83 (9); 176-184
 6. Singh, I., & Mishra, S. (2018). Molecular docking analysis of Pyrimethamine derivatives with Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase. *Bioinformation*, 14(5), 232.
 7. Zhao, W., Long He, Xiang, T., and Tang, Y. (2020). "Discover 4b-NH-(6-aminoindole)-4-desoxy-podophyllotoxin with nanomolar-potency antitumor activity by improving the tubulin binding affinity on the basis of a potential binding site nearby colchicine domain". *European Journal of Medicinal Chemistry*. 170: 73-86
 8. Bielytskyi, P., Gräsing, D., Zahn, S., Mote, K. R., A. Alia, P.K. Madhu, and Matysik, J. (2019). "Assignment of NMR resonances of protons covalently bound to photochemically active cofactors in photosynthetic reaction centers by ^{13}C - ^1H photo-CIDNP MAS-J-HMQC experiment". *Journal of Magnetic Resonance*. 298: 64-76.
 9. Pru $^{\circ}$ sa, V., K. R. Rajagopal, and Tuma, K. (2020). "Gibbs free energy based representation formula within the context of implicit constitutive relations for elastic solids". *International Journal of Non-Linear Mechanics*. 121: 103433
 10. Tang, B., Wang, Y., Peng, X., Zhang, L., Chun-Sheng Jia. (2020). "Efficient predictions of Gibbs free energy for the gases CO, BF, and gaseous BBr". *Journal of Molecular Structure*. 1199: 1-5
 11. Gao, Y., Guo, X., Yu Liu, Zhang M., Zhang, R., Abbasi, A. M., Lijun You, Tong Li, Liu, R. H. (2018). "Comparative assessment of phytochemical profile, antioxidant capacity and antiproliferative activity in different varieties of brown rice (*Oryza sativa* L.)". *LWT - Food Science and Technology*. 96: 19-25
 12. Sengupta, S., Krishnanb, M. A., Pandita, A., Dudhea, P., Sharmac, R., Chelvam, V. (2019). "Tyrosine-based asymmetric urea ligand for prostate carcinoma: Tuning biological efficacy through in silico studies". *Bioorganic Chemistry*. 91 (103154).
 13. Ahmed, M. B., Zhou, J. L., Huu H. Ngo, Johir, A.H., Sun, L., Asadullah, M., Belhaj, D. (2019). "Sorption of hydrophobic organic contaminants on functionalized biochar: protagonist role of - electron-donor-acceptor interactions and hydrogen bonds". *Journal of Hazardous Materials*. 360: 270-278
 14. Zhu, J., Li, K., Wu, H., Li, W., Sun, Q. (2020). "Multi-spectroscopic, conformational, and computational atomic-level insights into the interaction of β -lactoglobulin with apigenin at different pH levels". *Food Hydrocolloid*. 105 (105810)
 15. Fotorana, W. L., Müntefering, T., Kleiber, N., Beatriz, N.M. Mirandaf, Liebau, E., Irvine,

- D. J., Wunderlich, G. (2019). "A multilamellar nanoliposome stabilized by interlayer hydrogen bonds 6 increases antimalarial drug efficacy". *Nanomedicine*. 22 (102099)
16. Mori, S., Rushang, D. Patel, Ahmad, S., Varela, J., Smith, T., Altoos, R., Qi Shen, Goldstein, S.C., Persky, D. O. (2018). "Aggressive Leukemic Non-Nodal Mantle Cell Lymphoma With P53 Gene Rearrangement/ Mutation is Highly Responsive to Rituximab/ Ibrutinib Combination Therapy". *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2018.11.007>
 17. Cho, S. H., Seung, B.J., Kim, S. H., Lim, H.Y. and J. H. Sur. (2019). "Overexpression and Mutation of p53 Exons 4e8 in Canine Intestinal Adenocarcinoma ". *J. Comp. Path.* 175: 79-84. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2019.12.008>
 18. Bui, J.D. and Schreiber, R.D. (2007). "Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes". *Current opinion in immunology*, 19(2), pp.203-208
 19. Fasoulakis, Z., Kolios, G., Papamanolis, V. and Kontomanolis, E.N. (2018). "Interleukins associated with breast cancer". *Cureus*, 10(11).
 20. Huang, Y., Ma, C., Zhang, Q., Ye, J., Wang, F., Zhang, Y., Hunborg, P., Varvares, M.A., Hoft, D.F., Hsueh, E.C. and Peng, G. (2015). "CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome". *Oncotarget*, 6(19), p.17462.
 21. Karimi, B., Ashrafi, M., Shomali, T. and Yektaseresht, A. (2019). "Therapeutic effect of simvastatin on DMBA-induced breast cancer in mice". *Fundamental & clinical pharmacology*, 33(1), pp.84-93.
 22. Makki, J. (2015). "Diversity of breast carcinoma: histological subtypes and clinical relevance". *Clinical Medicine Insights: Pathology*, 8, pp.CPath-S31563.
 23. Park, Y.M., Lee, H.Y., Shin, D.Y., Lee, Y.H., Yang, Y.J., Lee, H.S., Lee, J.O., Choi, K.S., Kang, J.H., Cho, Y.H. and Kim, M.G. (2020). "Immunostimulatory Activity of Black Rice Bran in Cyclophosphamide-Induced Immunosuppressed Rats". *Natural Product Communications*, 15(7), p.1934578X20934919.
 24. Ping, Z., Xia, Y., Shen, T., Parekh, V., Siegal, G.P., Eltoum, I.E., He, J., Chen, D., Deng, M., Xi, R. and Shen, D. (2016). "A microscopic landscape of the invasive breast cancer genome". *Scientific reports*, 6(1), pp.1-10.
 25. Schulze-Garg, C., LoÈhler, J., Gocht, A. and Deppert, W. (2000). "A transgenic mouse model for the ductal carcinoma in situ (DCIS) of the mammary gland". *Oncogene*, 19(8), pp.1028-1037.
 26. Shikanov, A., Shikanov, S., Vaisman, B., Golenser, J. and Domb, A.J. (2011). "Cisplatin tumor biodistribution and efficacy after intratumoral injection of a biodegradable extended release implant". *Chemotherapy research and practice*.
 27. Tsukumo, S.I. and Yasutomo, K. (2018). "Regulation of CD8+ T cells and antitumor immunity by Notch signaling". *Frontiers in Immunology*, 9, p.101.

28. Vareki, S.M., Garrigós, C. and Duran, I. (2017). “Biomarkers of response to PD-1/PD-L1 inhibition”. *Critical reviews in oncology/hematology*, 116, pp.116-124.
29.
30.
31. dst.

Dokumen pendukung luaran Wajib #1

Luaran dijanjikan: Dokumentasi hasil uji coba produk

Target: Ada

Dicapai: Tersedia

Dokumen wajib diunggah:

1. Dokumentasi (foto) Pengujian Produk
2. Dokumen Deskripsi dan Spesifikasi Produk
3. Dokumen Hasil Uji Coba Produk

Dokumen sudah diunggah:

1. Dokumentasi (foto) Pengujian Produk
2. Dokumen Deskripsi dan Spesifikasi Produk
3. Dokumen Hasil Uji Coba Produk

Dokumen belum diunggah:

- Sudah lengkap

Nama Produk: serbuk instan beras hitam

Tgl. Pengujian: 19 Oktober 2020

Link Dokumentasi: https://drive.google.com/file/d/1F0-Pn_gr4G3xRSbhzV_bNNrUH2ytQ9-2/view?usp=sharing

DESKRIPSI DAN SPESIFIKASI PRODUK

SERBUK INSTAN BERAS HITAM

1. Deskripsi Produk

Serbuk instan adalah produk pangan berbentuk butir-butiran serbuk yang dalam penggunaannya mudah larut dalam air dingin atau air panas, sehingga dalam invensi ini metode membuat serbuk instan beras hitam memiliki pengertian membuat atau memproses air beras hitam dengan cara diekstrak dan hasil ekstraksinya ditambahkan bahan tertentu agar mudah menjadi kering sehingga menghasilkan serbuk kering halus yang digunakan sebagai bahan antikanker.

Invensi ini dapat memberi manfaat yang besar walaupun hanya sedikit mengkonsumsi namun dapat memperoleh manfaat yang besar, lebih ringan, lebih tahan lama, lebih praktis dalam mengkonsumsi, lebih praktis dibawa kemana-mana, dan bisa diaplikasikan menjadi bentuk lain seperti tablet, kaplet, kapsul dan lain-lain. Sedangkan invensi terdahulu (*prior art*) adalah pembuatan produk dengan hanya menjadikan beras hitam sebagai bahan baku, artinya beras hitam yang ditambahkan hanya sedikit karena dicampur bahan lain, sehingga manfaatnya juga sangat sedikit.

Perlu diketahui bahwa selama proses pengolahan produk invensi terdahulu (*prior art*) pasti menggunakan panas, padahal panas dapat merusak aktivitas antikanker sehingga manfaat yang diharapkan menjadi berkurang atau bahkan hilang. Hal lain yang menjadi pertimbangan yaitu invensi terdahulu (*prior art*) dengan bahan baku beras hitam tidak praktis dibawa kemana-mana, bahkan harus diolah/dimasak terlebih dahulu sebelum dikonsumsi sehingga senyawa bioaktif yang mempunyai aktivitas antikanker yang ada didalam beras hitam dapat mengalami kerusakan karena panas selama pemasakan.

Uraian Singkat Invensi

Tujuan utama dari invensi ini adalah untuk mendapatkan manfaat yang sebesar-besarnya dari beras hitam dengan hanya sedikit mengkonsumsi serbuk instan beras hitam.

Tujuan selanjutnya adalah mengenalkan pada masyarakat bahwa kekayaan hayati berupa beras hitam berpotensi digunakan sebagai bahan antikanker. Selain itu untuk meningkatkan kesadaran masyarakat tentang pentingnya menjaga kesehatan dengan mengkonsumsi bahan makanan fungsional.

Tujuan lebih lanjut adalah sebagai upaya meningkatkan kesehatan dan kesejahteraan masyarakat, melalui perbaikan gizi dan penyediaan makanan sehat bagi penduduk.

Uraian Singkat gambar

Gambar 1, Pelaksanaan proses ekstraksi beras hitam dimana memiliki tahapan sebagai berikut sesuai dengan invensi ini :

- Proses Sortasi atau mensortir batu dan kotoran yang terdapat pada bahan baku beras hitam (1.1);
- Proses pengecilan ukuran beras hitam yang sudah disortir, diperkecil menggunakan grinder kering, lalu beras hitam dimaserasi/direndam dengan aquadest dengan komposisi 200 gram beras hitam dan 600 ml aquadest, proses maserasi/perendaman dilakukan pada suhu 25⁰C, dengan durasi waktu 1jam (1.2);
- Proses penyaringan hasil maserasi/perendaman beras hitam dan aquadest (1.3);
- Hasil penyaringan berupa filtrat/air(1.4);
- Ampas hasil penyaringan (1.5);
- Penambahan maltodekstrin 4% dari filtrat/air (1.6);
- Proses penguapan filtrat/air dengan menggunakan *freeze dry*/alat penguap dengan suhu -40⁰C (1.7);
- Hasil berupa Serbuk Instan Beras Hitam (1.8)

Uraian Lengkap Invensi

Dalam uraian lengkap invensi ini inventor menjelaskan bagaimana fungsi, sistem pada proses pembuatan serbuk instan beras hitam, serta pengungkapan hasil serbuk instan beras hitam, dimana serbuk instan beras hitam tersebut mengandung bahan aktif yang digunakan sebagai bahan antikanker.

Invensi ini didasari atas semakin banyaknya penderita penyakit degeneratif seperti obesitas, diabetes melitus, bahkan kanker, yang mana penyakit-penyakit ini dipicu oleh radikal bebas. Serangan radikal bebas ini juga dapat mengakibatkan perkembangan sel/siklus sel tidak terkendali, proliferasi tidak terkendali dan sel tidak mengenal apoptosis (kematian sel yang terprogram). Akibatnya sel membelah dengan sangat cepat dan tak terkendali yang merupakan ciri-ciri sel kanker.

Menurut Wicaksono dkk (2014, flavonoid/polifenol mempunyai aktivitas antiproliferasi; Meiyanto dkk (2008) dan Watuguly dkk, (2012) bahan yang mengandung

flavonoid/polifenol dapat menyebabkan apoptosis sel kanker. Matic et al (2013) mengatakan bahwa sifat bahan antikanker yang baik adalah dapat menekan proliferasi sel kanker dan tidak mengganggu proliferasi sel normal. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang membuktikan bahwa serbuk instan beras hitam menekan proliferasi sel kanker, sebagaimana digambarkan pada tabel dibawah ini :

Tabel 1 Kadar Total Fenol dan Flavonoid Serbuk Beras Hitam

Ekstrak air dengan penambahan	Kadar Total Fenol (mg GAE/g ekstrak)	Kadar Total Flavonoid (mg QE/g ekstrak)
Malto 2%	59,769	48,635
	59,678	48,635
	59,349	48,618
Rata-rata	59,599	48,629
Malto 4 %	39,071	36,211
	38,812	37,194
	38.647	36,211
Rata-rata	38,843	36,539
Malto 6%	26,071	29,211
	26,812	29,194
	26.647	29,211
Rata-rata	26,510	29,205

Tabel 1 menunjukkan serbuk instan beras mempunyai kadar total fenol dan flavonoid yang tinggi. Dengan lama dan suhu pengeringan menggunakan Freez dry yang sama, pada penambahan maltodekstrin 2% belum didapatkan sampel yang kering, sampel sudah bisa kering dengan penambahan maltodekstrin 4%. Adapun rerata aktivitas antioksidan serbuk instan beras hitam dengan standar quercetin menggunakan metode DPPH, yang dinyatakan dengan IC_{50} sebagai indikator kemampuan hambatan sebesar 50% dari sampel, dapat dilihat pada Tabel 32

Tabel 2. Nilai IC_{50} Ekstrak Etanol, Air Beras Hitam dan Standart Quercetin dengan Metode DPPH

Perlakuan	Kode Perlakuan	Nilai IC_{50} (ppm)
Standart Quercetin	S	12,010 ^d
Maltodekstrin 2%	M1	26,449 ^c
Maltodekstrin 4%	M2	27,224 ^b
Maltodekstrin 6%	M3	36,802 ^a

Keterangan : Berbeda nyata bila angka diikuti huruf yang berbeda (Tukey 5%)

Tabel 2 di atas menunjukkan bahwa IC_{50} serbuk instan beras hitam sebesar kurang dari 50 ppm, artinya serbuk instan beras hitam mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi. Hal

ini sesuai dengan pendapat Molyneux(2004) yang berpendapat bahwa suatu bahan mempunyai aktivitas antoksidan yang tinggi bila mempunyai IC50 lebih rendah dari 200 ppm.

Rasa beras hitam tidak se enak beras pada umumnya sehingga kurang disukai maka perlu dilakukan ekstraksi dan mengeringkannya menjadi serbuk instan sehingga dengan sedikit mengkonsumsi beras hitam, dapat memperoleh manfaat yang sebesar-besarnya. Hal ini sesuai dengan berkembangnya pemahaman tentang kembali ke alam untuk mendapatkan manfaat kesehatan dari bahan pangan, agar konsumsi obat-obatan sintetis dapat ditekan karena penggunaan dalam jangka panjang akan berdampak negatif pada kesehatan.

Di sisi lain, tingkat kematian akibat kanker di dunia cukup tinggi dan ada kecenderungan terus meningkat. Beberapa faktor penyebab kanker dapat berasal dari agen fisika, kimia, dan biologi, termasuk senyawa radikal bebas. Secara genetis, perkembangan kanker terjadinya akibat adanya mutasi pada gen-gen supresor tumor, *DNA repair*, dan protoonkogen (Annenberg Foundation, 2015) dan umumnya terjadinya mutasi gen disebabkan oleh radikal bebas. Radikal bebas paling banyak ditemui dalam bentuk radikal oksigen atau biasa dikenal sebagai ROS (*reactive oxygen species*). Peningkatan ROS dalam tubuh akan menyebabkan stres oksidatif (Hansen, 2011) dan memainkan peran penting dalam perkembangan penyakit manusia termasuk kanker.

Senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas dan melindungi tubuh dari radikal bebas dengan menjaga keseimbangan redoks disebut dengan senyawa antioksidan (Valko et al. 2007; Pham et al. 2008), fenol dan flavonoid merupakan senyawa antioksidan yang mampu melawan stres oksidatif dan penyakit degeneratif, termasuk kanker (Manian et al, 2008).

Beras hitam mengandung antosianin, flavon, karoten dan oryzanol (Caro, et al. 2013). Senyawa kelompok polifenol/flavonoid ini memiliki aktivitas antioksidan dan mencegah kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas (Dwijayanti, dkk. (2016).

Beras hitam memiliki jumlah senyawa fenolik yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan beras putih sedangkan jumlah senyawa fenolik sangat berhubungan dengan aktivitas antioksidan. Hasil uji fitokimia pada serbuk instan beras hitam dan ekstrak beras hitam positif mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid, tanin, 9 kuinon dan antosiain. Pigmen beras hitam memiliki peran yang paling baik diantara beras dengan warna lainnya. Flavonoid yang terdapat pada beras hitam kadarnya lima kali lipat lebih banyak daripada beras putih. Senyawa tersebut dapat mendonorkan ion hidrogen, menangkap radikal bebas secara langsung, memperbaiki DNA, memperbaiki kerusakan sel dan menekan proliferasi sel kanker.

Untuk menghasilkan serbuk instan beras hitam yang mengandung senyawa bioaktif seperti yang diharapkan maka perlu dilakukan tahap-tahap sebagai berikut:

1. Hancurkan beras hitam menjadi simplisia/bubuk (mesh 60);
2. Rendam dengan aquadest pada suhu 25°C, dengan komposisi simplisia/bubuk beras hitam 200 gram dan aquades 600 ml;
3. Aduk secara merata setiap 15 menit selama 3 menit untuk memberi kesempatan senyawa bioaktif terlarut dalam larutan;
4. Lakukan langkah 3 di atas selama 1 jam, biarkan mengendap dan saring;
5. Filtrat/cairan yang diperoleh diukur volumenya dan ditambahkan Maltodekstrin sebanyak 4% dari volume filtrat/cairan yang diperoleh;
6. Filtrat/cairan yang diperoleh di Langkah 5 diuapkan menggunakan freeze dry pada suhu -40°C sampai kering(serbuk);
7. Serbuk inilah yang disebut dengan serbuk instan beras hitam.

Perlu diketahui bahwa uraian lengkap di atas diberikan untuk memberikan ilustrasi perwujudan, cara kerja dan kelebihan dari invensi ini, bukan untuk membatasi invensi ini. Setelah membaca uraian tersebut di atas, orang yang ahli di bidang ini dapat dengan mudah melakukan modifikasi atau perubahan atas perwujudan ilustratif yang disebutkan di atas. Sebagai contoh, komposisi dan metode berupa proses serbuk instan beras hitam sesuai invensi ini dapat dimodifikasi atau dirubah tanpa keluar dari ruang lingkup invensi ini. Oleh karena itu, ruang lingkup dan batasan dari invensi ini hendaknya ditafsirkan berdasarkan klaim berikut.

2. SPESIFIKASI PRODUK

Spesifikasi produk serbuk instan beras hitam yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Bahan baku produk	: Beras hitam varietas Wojalaka
Bahasa latin bahan baku	: <i>Oryza sativa</i> L. indica
Asal bahan baku	: Kepanjen, Malang, Jawa Timur
Bentuk Produk	: Serbuk Instan
Warna	: Hitam
Kondisi	: Kering

Untuk menghasilkan serbuk instan beras hitam yang mengandung senyawa bioaktif seperti yang diharapkan maka perlu dilakukan tahap-tahap sebagai berikut:

1. Hancurkan beras hitam menjadi simplisia/bubuk (mesh 60);
2. Rendam dengan aquadest pada suhu 25°C, dengan komposisi simplisia/bubuk beras hitam 200 gram dan aquades 600 ml;
3. Aduk secara merata setiap 15 menit selama 3 menit untuk memberi kesempatan senyawa bioaktif terlarut dalam larutan;
4. Lakukan langkah 3 di atas selama 1 jam, biarkan mengendap dan saring;
5. Filtrat/cairan yang diperoleh diukur volumenya dan ditambahkan Maltodekstrin sebanyak 4% dari volume filtrat/cairan yang diperoleh;
6. Filtrat/cairan yang diperoleh di Langkah 5 diuapkan menggunakan freeze dry pada suhu -40°C sampai kering(serbuk);
7. Serbuk inilah yang disebut dengan serbuk instan beras hitam.

Perlu diketahui bahwa uraian lengkap di atas diberikan untuk memberikan ilustrasi perwujudan, cara kerja dan kelebihan dari invensi ini, bukan untuk membatasi invensi ini. Setelah membaca uraian tersebut di atas, orang yang ahli di bidang ini dapat dengan mudah melakukan modifikasi atau perubahan atas perwujudan ilustratif yang disebutkan di atas. Sebagai contoh, komposisi dan metode berupa proses serbuk instan beras hitam sesuai invensi ini dapat dimodifikasi atau dirubah tanpa keluar dari ruang lingkup invensi ini. Oleh karena itu, ruang lingkup dan batasan dari invensi ini hendaknya ditafsirkan berdasarkan klaim berikut.

UJI COBA PRODUK
PENGEMBANGAN POTENSI EKSTRAK BERAS HITAM
(*Oryza sativa* L.) SEBAGAI ALTERNATIF ANTIKANKER



TIM PENGUSUL

Dr. Ir. Fadjar Kurnia Hartati, MP. (Ketua/NIDN : 0711116601)
Ir. Arlin Besari Djauhari, MP. (Anggota / NIDN : 0719075902)
Ir. Restu Tjiptaningdyah, Mkes (Anggota / NIDN : 0010046101)

Dibiayai Oleh
Direktorat Riset dan Pengabdian Pada Masyarakat Deputy Bidang Penguatan Riset
dan Pengembangan Kementerian Riset dan Teknologi/Badan Riset dan Inovasi
Nasional Nomor 8/E1/KPT/2020 tanggal 10 Maret 2020

UNIVERSITAS DR. SOETOMO SURABAYA
NOPEMBER 2019

BERITA ACARA
UJI COBA HASIL PENELITIAN

Pada hari ini Jum'at tanggal satu bulan November Dua Ribu Sembilan Belas (01-11-2019) telah dilakukan uji coba hasil penelitian yang yang berjudul "PENGEMBANGAN POTENSI ANTIKANKER EKSTRAK BERAS HITAM (*Oryza sativa* L. indica). Saya yang bertanggung jawab pada uji coba ini:

N a m a : Prof. Muhaimin Rifa'I, SSi.,Ph.D.Med.Sc.
NIP / NIDN : 196806261997021001 / 0026066803
Jabatan : Ketua Jurusan Biologi FMIPA Univ. Brawijaya Malang
Bidang kcahlian : Imunologi

MENYATAKAN

Hasil uji coba menunjukkan bahwa ekstrak beras hitam yang berupa bubuk instan mempunyai potensi sebagai antikanker secara *in vitro*, khususnya pada sel kanker serviks (HeLa) dan sel kanker payudara (T47D). Bukti hasil uji coba seperti terlampir.

Demikian berita acara ini dibuat sebagaimana mestinya, sesuai metode pengujian dan kaidah ilmiah yang berlaku.

Malang, 01 Novemver 2019



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

Lampiran Berita Acara Uji Coba Penelitian

Uji coba potensi bubuk instan beras hitam (*Oryza sativa* L. indica) sebagai antikanker dilakukan secara *in vitro* pada sel kanker serviks (HeLa) dan sel kanker payudara (T47D) yang meliputi uji coba proliferasi/viabilitas sel, siklus sel dan apoptosis. Metode dan alat yang digunakan dalam uji coba ini dapat dilihat pada Tabel 1 di bawah ini.

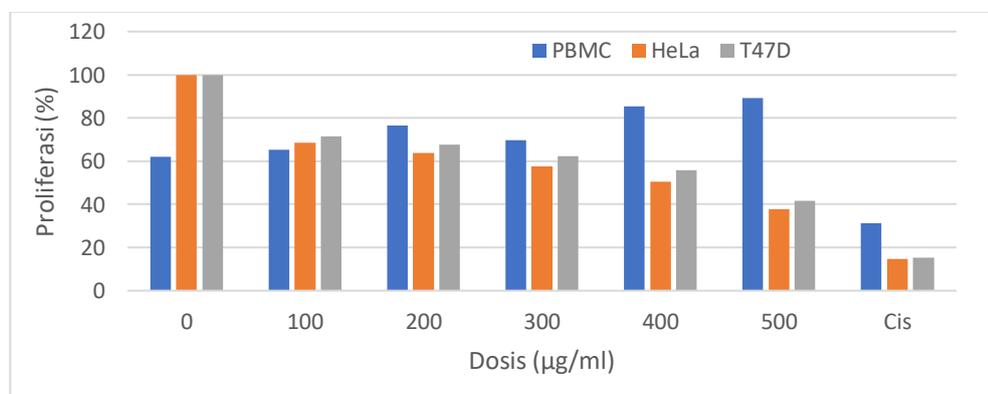
Tabel 1. Metode dan alat yang digunakan dalam uji coba hasil penelitian

No.	Uji coba	Metode	Alat	Keterangan
1.	Proliferasi / viabilitas	Mengacu pada Fritz (2007) dan Roche (2011)	<i>ELISA-READER</i> pada gelombang 450 nm	Menggunakan Reagen WST-1
2.	Siklus sel	Mengacu pada Panda dan Ravindran (2013)	<i>Flow cytometer software</i> CellQuestPro	pewarna PI (Propidium Iodida).
3.	Apoptosis	Mengacu pada CCRC (2015)	<i>Flow cytometer software</i> CellQuestPro	pewarna AnnexinV/PI

Hasil uji coba adalah sebagai berikut:

1. Proliferasi sel:

Tujuan uji coba ini adalah untuk mengetahui sifat antikanker suatu agen / bahan. Bahan kemoterapi yang baik adalah bahan antikanker yang dapat menekan proliferasi sel kanker namun tidak menghambat proliferasi sel sehat. Hasil uji coba sampel (bubuk instan beras hitam) terhadap proliferasi sel sehat (PBMC) dan sel kanker dapat dilihat pada Gambar 1 berikut:



Gambar 1. Proliferasi (%) sel PBMC, HeLa dan T47D pada dosis yang berbeda

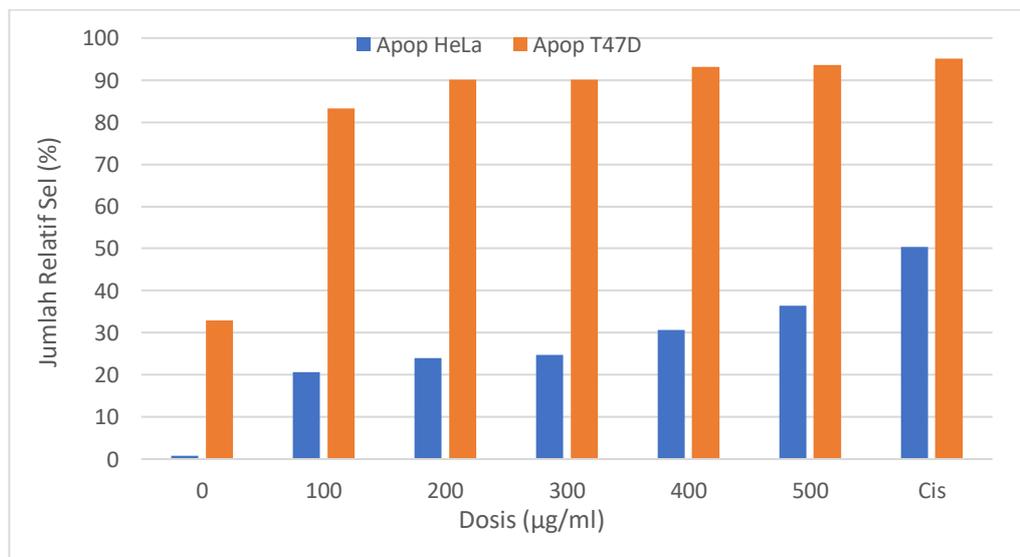
Gambar 1 menunjukkan bahwa sampel tidak mempengaruhi proliferasi sel sehat (PBMC), namun dapat menekan proliferasi sel kanker, baik kanker serviks (HeLa) maupun pada sel kanker payudara (T47D). Semakin tinggi dosis yang digunakan maka semakin rendah proliferasi sel kanker.

2. Siklus sel

Siklus sel merupakan proses vital dalam kehidupan organisme yang secara normal menghasilkan pembelahan sel. Tujuan dilakukan uji coba siklus sel adalah untuk mengetahui tahap-tahap perkembangan sel kanker setelah diberi perlakuan sampel pada dosis yang berbeda, dengan perlakuan control negative (tanpa perlakuan) dan control positif (Obat/cisplatin dosis 1,5 $\mu\text{g/ml}$). Hasil coba siklus sel adalah sebagai berikut:

3. Apoptosis

Uji apoptosis ini dilakukan untuk mengetahui penyebab kematian sel, apakah terjadi melalui proses apoptosis atau nekrosis. Sel-sel yang masih hidup akan berada pada *lower left quadrant* (Annexin-V⁻/PI⁻), sel-sel yang mengalami tahap awal apoptosis berada pada *lower right quadrant* (Annexin-V⁺/PI⁻), sel-sel yang mengalami tahap akhir apoptosis berada pada *upper right quadrant* (Annexin-V⁺/PI⁺), sedangkan sel-sel yang mengalami nekrosis berada pada *upper left quadrant* (Annexin-V⁻/PI⁺). Hasil uji coba apoptosis dapat dilihat pada Gambar 3 berikut:



Gambar 2. Jumlah relative sel (%) yang mengalami apoptosis

Gambar 2 menunjukkan bahwa sampel berpotensi mengakibatkan apoptosis pada sel kanker HeLa maupun sel kanker T47D.

UJI COBA PRODUK
PENGEMBANGAN POTENSI EKSTRAK BERAS HITAM
(*Oryza sativa* L.) SEBAGAI ALTERNATIF ANTIKANKER



TIM PENGUSUL

Dr. Ir. Fadjar Kurnia Hartati, MP. (Ketua/NIDN : 0711116601)
Ir. Arlin Besari Djauhari, MP. (Anggota / NIDN : 0719075902)
Ir. Restu Tjiptaningdyah, Mkes (Anggota / NIDN : 0010046101)

Dibiayai Oleh
Direktorat Riset dan Pengabdian Pada Masyarakat Deputy Bidang Penguatan Riset
dan Pengembangan Kementerian Riset dan Teknologi/Badan Riset dan Inovasi
Nasional Nomor 8/E1/KPT/2020 tanggal 10 Maret 2020

UNIVERSITAS DR. SOETOMO SURABAYA
DESEMBER 2020

BERITA ACARA
UJI COBA HASIL PENELITIAN

Pada hari ini Senin tanggal Sembilan Belas bulan Oktober Dua Ribu Dua Puluh (19-10-2020) telah dilakukan uji coba hasil penelitian yang berjudul “PENGEMBANGAN POTENSI ANTIKANKER EKSTRAK BERAS HITAM (*Oryza sativa* L. indica).

Hasil uji coba menunjukkan bahwa serbuk beras hitam mempunyai potensi sebagai antikanker secara *in vivo* khususnya pada sel kanker serviks (HeLa), sel kanker tulang ganas (U2OS) dan sel kanker payudara (T47D). Bukti hasil uji coba seperti terlampir.

Demikian berita acara ini dibuat sebagaimana mestinya, sesuai metode pengujian dan kaidah ilmiah yang berlaku.

Malang, 19 Oktober 2020



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

Lampiran Berita Acara Uji Coba Penelitian

Uji coba potensi serbuk instan beras hitam (*Oryza sativa* L. indica) sebagai antikanker dilakukan secara *in vivo* pada mencit model kanker payudara yang meliputi uji Histologi dan profil sel imun CD4, CD8, CD62L, IL2, dan IL17.

Uji coba antikanker secara *in vivo* menggunakan sebanyak 50 ekor mencit Balb/c betina berumur 6 minggu dibagi menjadi 6 kelompok sebagaimana berikut;

N = Kontrol normal;

K- = Mencit diinjeksi DMBA;

K+ = Mencit diinjeksi DMBA dan ditreatment Cisplatin (5mg/kg (Shikanov dkk, 2011));

D1 = Mencit diinjeksi DMBA dan ditreatment serbuk instan beras hitam (0,2 g/kg);

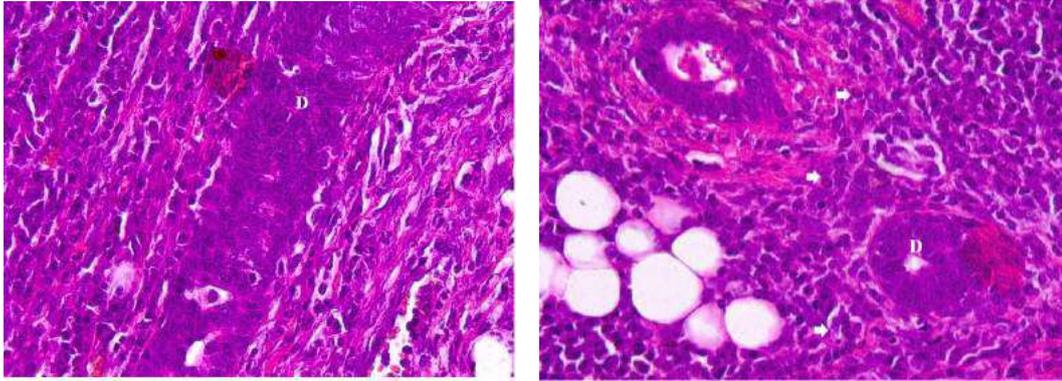
D2 = Mencit diinjeksi DMBA dan ditreatment serbuk instan hitam (0,3 g/kg);

D3 = Mencit diinjeksi DMBA dan ditreatment serbuk instan hitam (0,4 g/kg);

D4 = Mencit diinjeksi DMBA dan ditreatment serbuk instan hitam (0,5 g/kg).

Induksi DMBA dilakukan tiap minggu selama 5 minggu melalui injeksi subkutan dengan dosis 15 mg/kg BB mencit. Pada minggu ke-5 dan ke-10, sebagian mencit yang diinduksi DMBA dibedah untuk diisolasi jaringan mammae dan dibuat preparat histologi dengan pewarnaan HE yang bertujuan untuk melakukan konfirmasi permodelan mencit kanker payudara. Setelah mencit terkonfirmasi kanker, mencit ditreatment dengan ekstrak beras hitam selama dua minggu. Setelah itu, semua mencit dibedah untuk diisolasi jaringan mammae, hepar, dan spleen untuk analisis histologi dan *flow cytometry*.

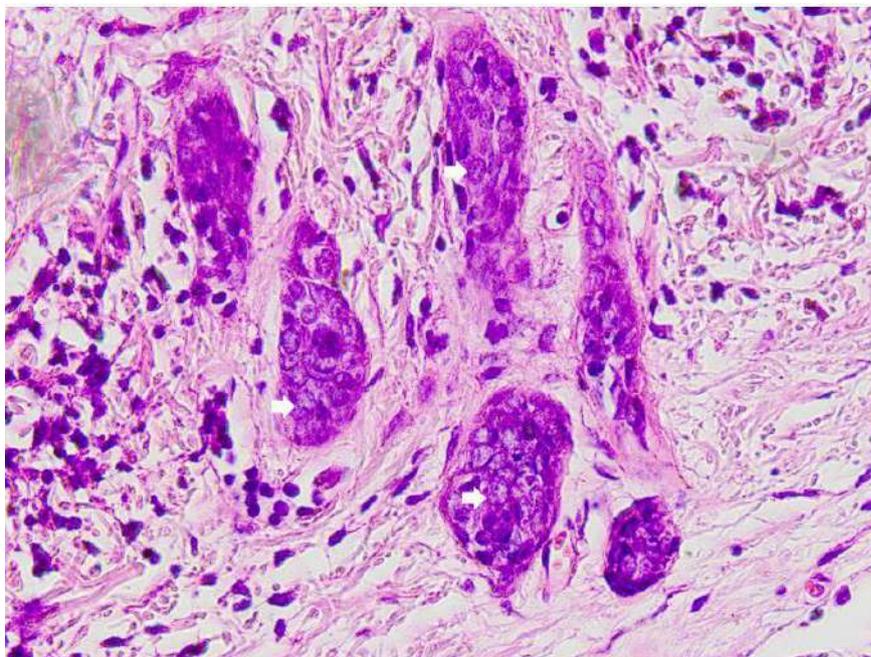
1.1 Histologi jaringan mammae pada mencit model kanker payudara



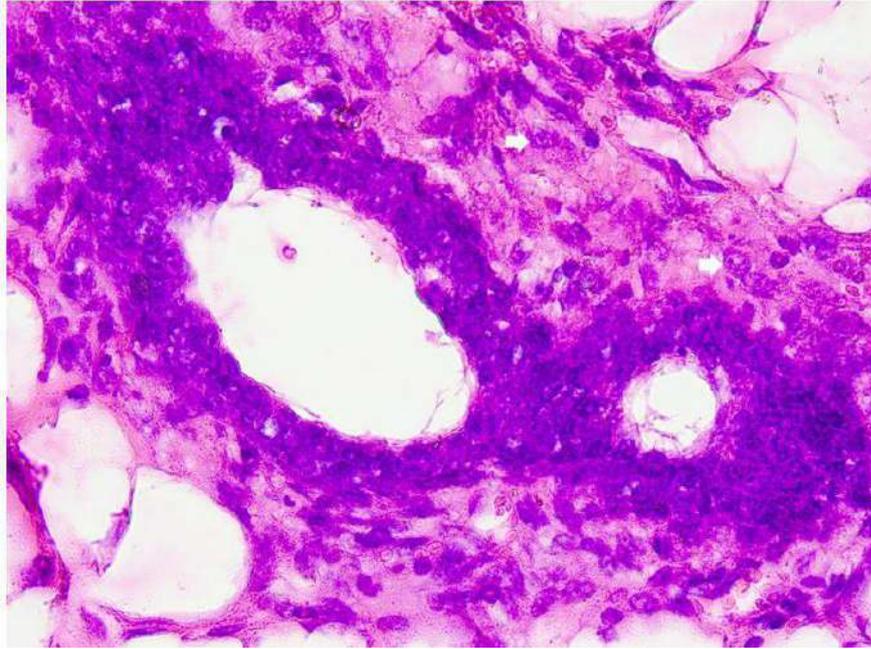
Gambar 4. Histologi jaringan mammae mencit yang diinduksi DMBA pada minggu ke-10. Sel-sel kanker mengalami mikroinvasi dan berinfiltrasi menuju stroma (panah putih) (M: 400x).

1.2 Pengaruh pemberian serbuk instan beras hitam terhadap histologi kanker payudara pada mencit model

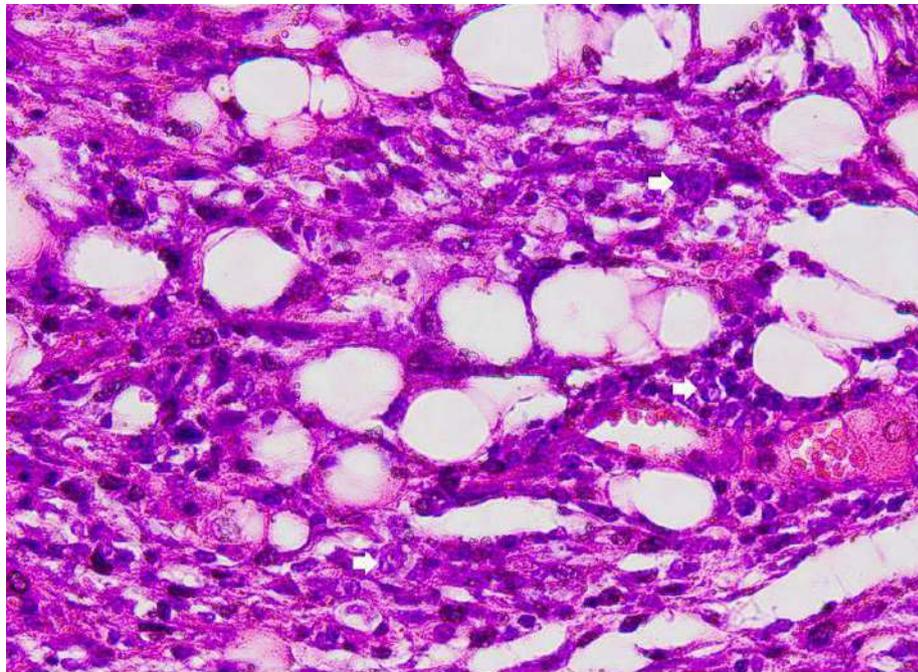
Hasil pengamatan histologi kanker payudara pada mencit model kanker setelah pemberian serbuk instan beras hitam dapat dilihat pada Gambar 5 di bawah ini.



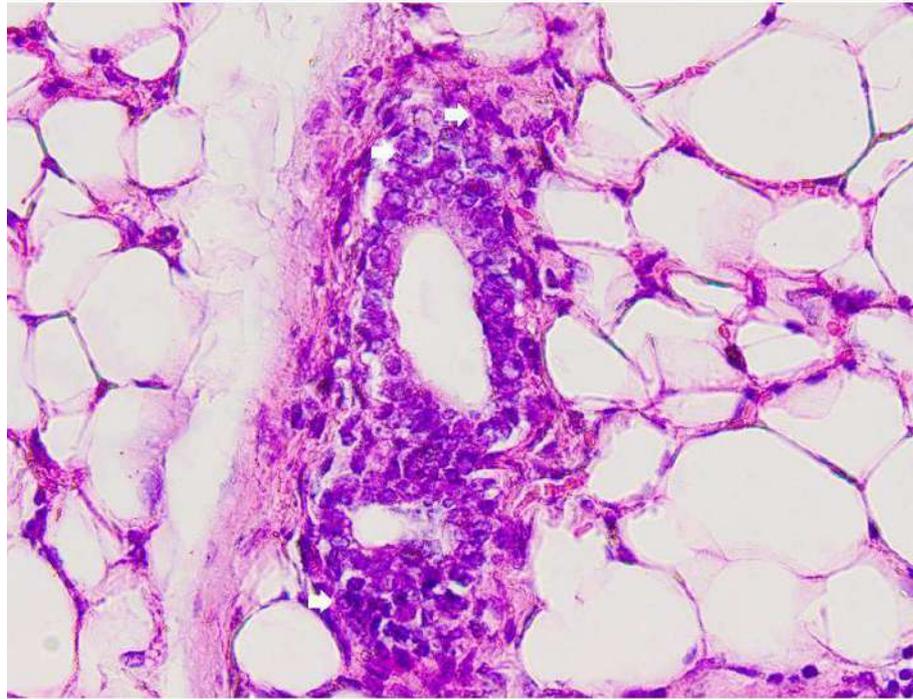
Gambar 5. Histologi mammae mencit kanker yang diberi serbuk instan beras hitam 0,2 g/kg BB. Sel-sel tumor yang menginfiltrasi stroma membentuk *tubule formation* (panah putih) (M: 400x).



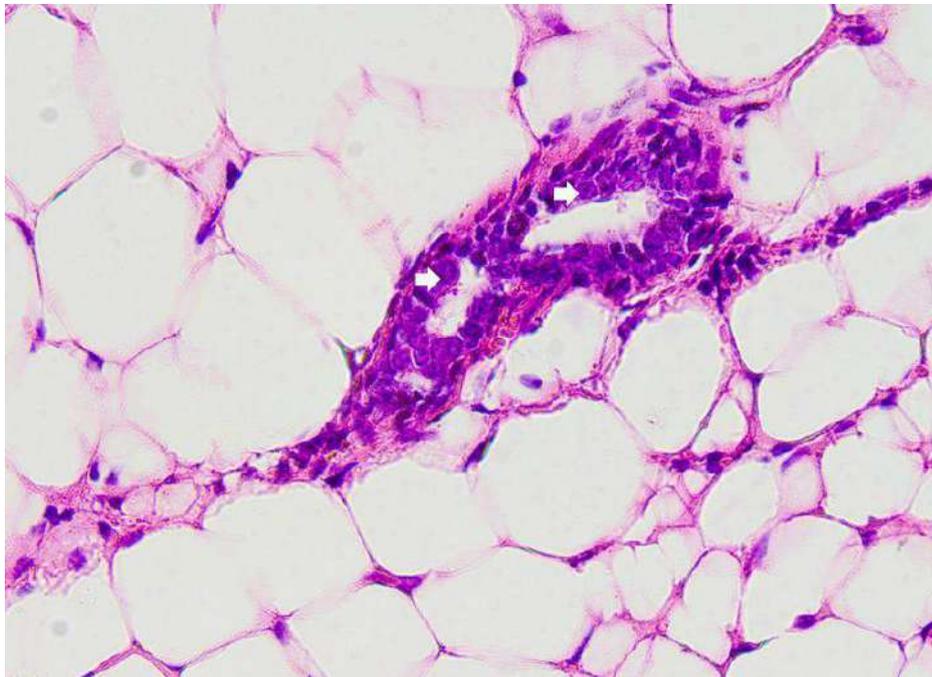
Gambar 6. Histologi mammae mencit kanker yang diberi cisplatin 5 mg/kg BB. Pertumbuhan kanker pada duktus sampai pada mikroinvasi/infiltrasi menuju stroma (panah putih) (M: 400x).



Gambar 7. Histologi mammae mencit kanker yang diberi serbuk instan beras hitam 0,3 g/kg BB. Tampak beberapa sel kanker (panah putih) telah menginfiltrasi stroma berupa jaringan adiposit (M: 400x).



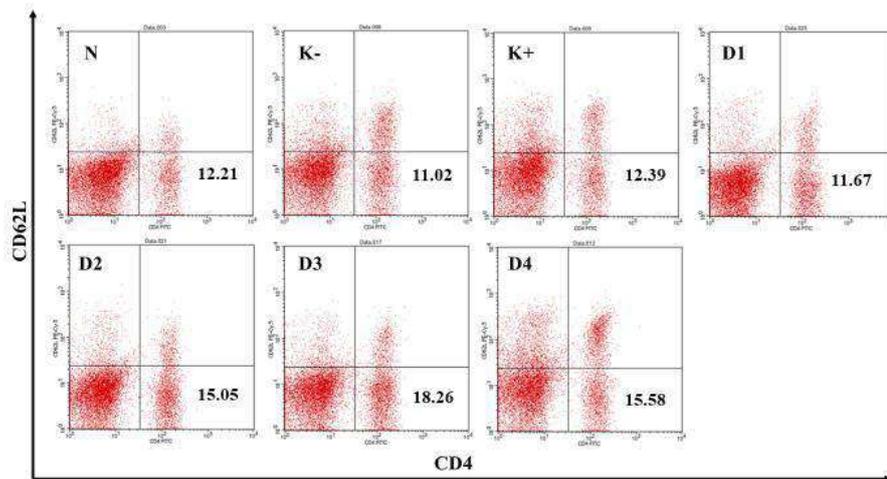
Gambar 8. Histologi mammae mencit kanker yang diberi serbuk instan beras hitam 0,4 mg/kg BB. Tampak sel neoplastik berkembang dari area duktus dan mulai menginfiltrasi stroma (panah putih) (M: 400x).



Gambar 9. Histologi mammae mencit kanker yang diberi serbuk instan beras hitam 0,5 mg/kg BB. Tampak beberapa sel abnormal pada bagian duktus yang masih dikelilingi oleh mioepitel (M: 400x).

2.3 Profil imunologi mencit kanker

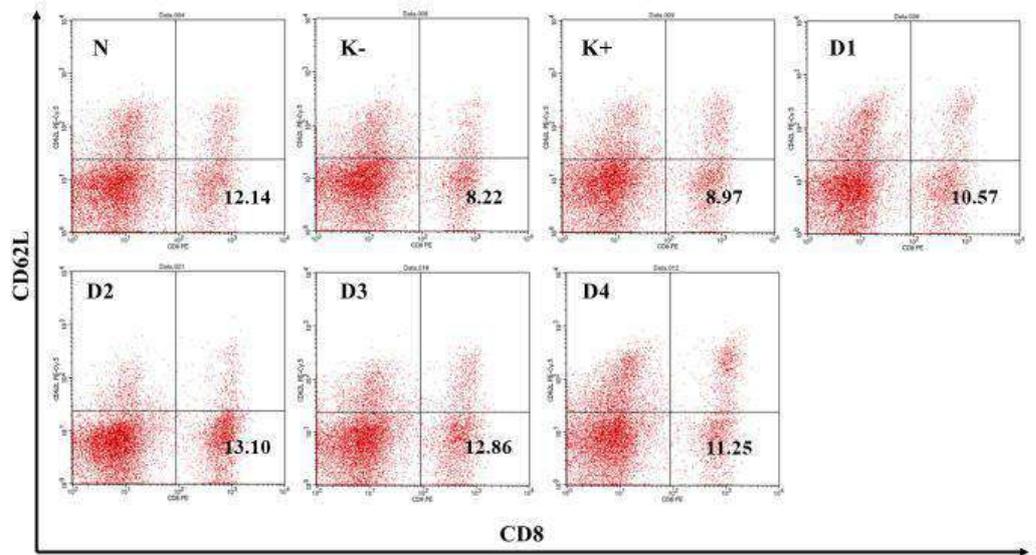
2.3.1 Peningkatan aktivasi sel T CD4 dan CD8 setelah diberikan serbuk instan beras hitam



Gambar 10. Hasil analisis flow cytometry aktivasi sel T CD4

Berdasarkan hasil analisis flow cytometry sel T CD4 (Gambar 10), adanya mekanisme supresi dan penghambatan sel T pada kanker sesuai dengan hasil penelitian ini, yaitu rendahnya sel T CD4⁺ yang teraktivasi (CD4⁺CD62L⁺) pada kelompok mencit yang diinduksi DMBA (K⁻, 11%; K⁺, 12.39%; D1, 11.67%) (Gambar 10). Pemberian ekstrak beras hitam mampu meningkatkan sel T CD4⁺ yang teraktivasi secara signifikan ($p < 0.05$) pada dosis 0.3 g/kg, 0.4 g/kg, dan 0.5 g/kg. Pemberian serbuk instan beras hitam dengan dosis 0.2 g/kg belum mampu meningkatkan aktivasi sel T CD4⁺.

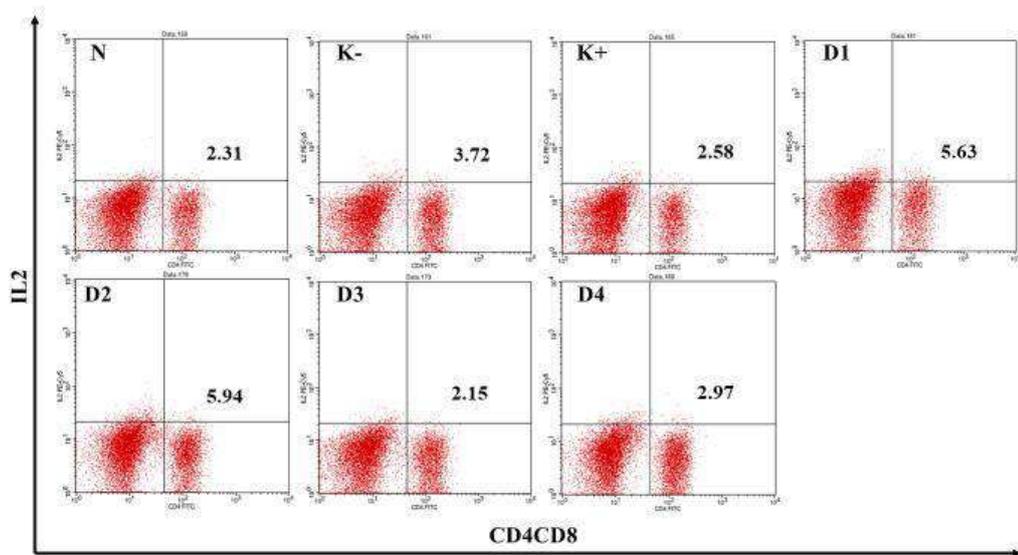
Hasil penelitian ini juga menunjukkan adanya aktivitas sel T CD8⁺ yang rendah pada kelompok mencit yang diinduksi DMBA dan mengalami peningkatan yang signifikan setelah diberikan ekstrak beras hitam ($p < 0.05$) (Gambar 11). Aktivasi sel T CD8⁺ (CD8⁺62L⁺) terendah ditunjukkan oleh kelompok K⁻ dengan persentase 8.22% dan tertinggi ditunjukkan oleh kelompok D2 (13.10%), D3 (12.86%) (Gambar 11).



Gambar 11. Hasil analisis flow cytometry sel T CD8

2.2.2 Pengaruh pemberian ekstrak beras hitam terhadap produksi IL-2

Pada penelitian ini, produksi IL-2 pada kelompok K- cukup rendah (3.72%) dan mengalami peningkatan yang signifikan setelah diberikan ekstrak beras hitam dengan dosis 0.2 g/kg (D1) dan 0.3 g/kg (D2) ($p < 0.05$) (Gambar 12). Level produksi IL-2 menurun pada kelompok K+, D3, dan D4 (Gambar 12).

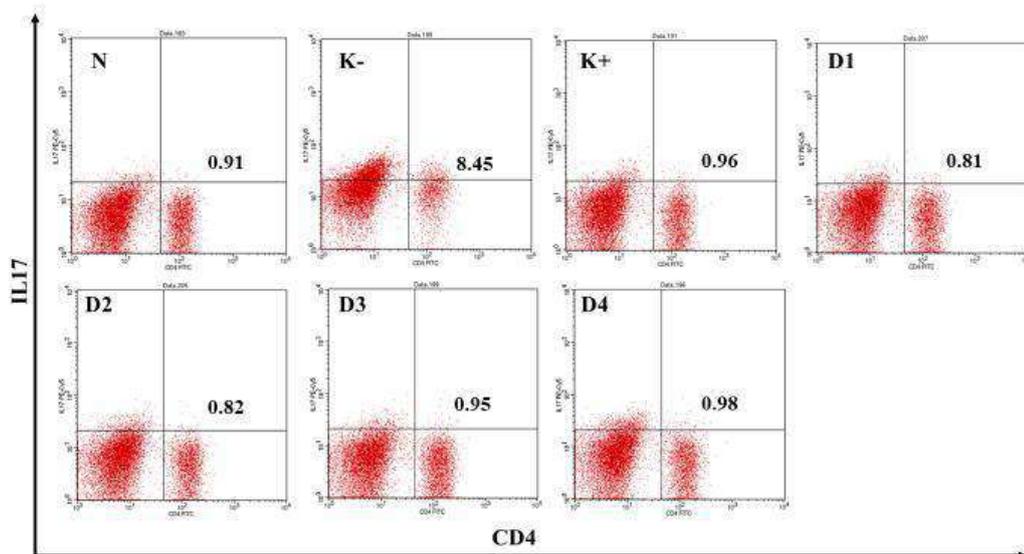


Gambar 12. Hasil analisis flow cytometry produksi IL2

Peningkatan produksi IL2 yang signifikan setelah diberikan serbuk instan beras hitam dengan dosis 0.2 g/kg (D2) dan 0.3 g/kg (D3) menunjukkan potensi dan manfaat dari penggunaan ekstrak beras hitam. Dimana, ekstrak ini mampu meningkatkan produksi IL-2 yang berperan dalam aktivasi NK dan monist, serta sebagai faktor pertumbuhan untuk sel limfosit B dan T.

2.2.3 Penurunan level IL-17 dari CD4+ akibat pemberian serbuk instan beras hitam

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan produksi IL-17 pada kelompok K- dari normal (Gambar 13), IL-17 pada kelompok N adalah 0.91% sedangkan pada kelompok K- 8.45% ($p < 0.05$). Produksi IL-17 yang kemudian dapat berikatan dengan IL-17 reseptor pada permukaan sel tumor mampu mendukung pertumbuhan dan perkembangan sel melalui beberapa cara, (1) menekan apoptosis sel mammary carcinoma, aktivasi jalur MAPK, JNK, dan persinyalan STAT-3 melalui aktivasi tumor progression locus 2 (TPL2) (Welte & Zhang, 2015). Sehingga penurunan produksi IL-17 yang signifikan pada kelompok kanker setelah pemberian ekstrak beras hitam memberikan efek yang menjanjikan. Penurunan produksi IL-17 juga terjadi pada kelompok K+ sebagaimana pada kelompok mencit yang mendapat treatment ekstrak beras hitam (Gambar 13).



Gambar 13. Hasil analisis flow cytometri produksi IL-17 oleh CD4+

Interleukin-17 juga disebutkan dapat mempromosikan kanker melalui tumor angiogenesis via induksi kemokin CXCL8, MMP2, MMP9, dan VEGF. Kejadian metastasis, yaitu tersebarnya sel kanker keluar organ lain, juga disebutkan karena adanya pengaruh dari IL-17. Metastasis kanker payudara menuju tulang dapat dimediasi oleh persinyalan IL-17B/IL-17BR (Welte & Zhang, 2015).

Malang, 18 Oktober 2020



Dr. Fadjar KH, MP.
NIDN. 0711116601



Prof. Muhaimin Rifa'i, SSi., PhD.Med.Sc.
NIP. 196806261997021001

FOTO-FOTO KEGIATAN PENELITIAN

1. PREPARASI SAMPEL



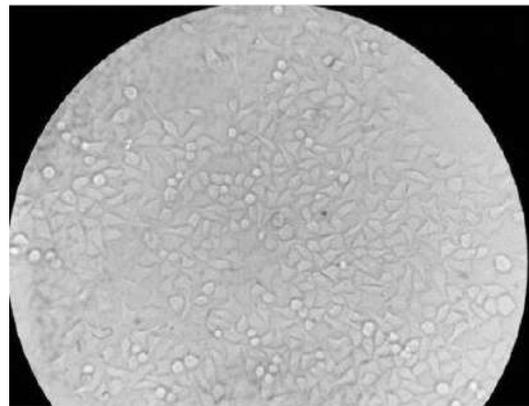


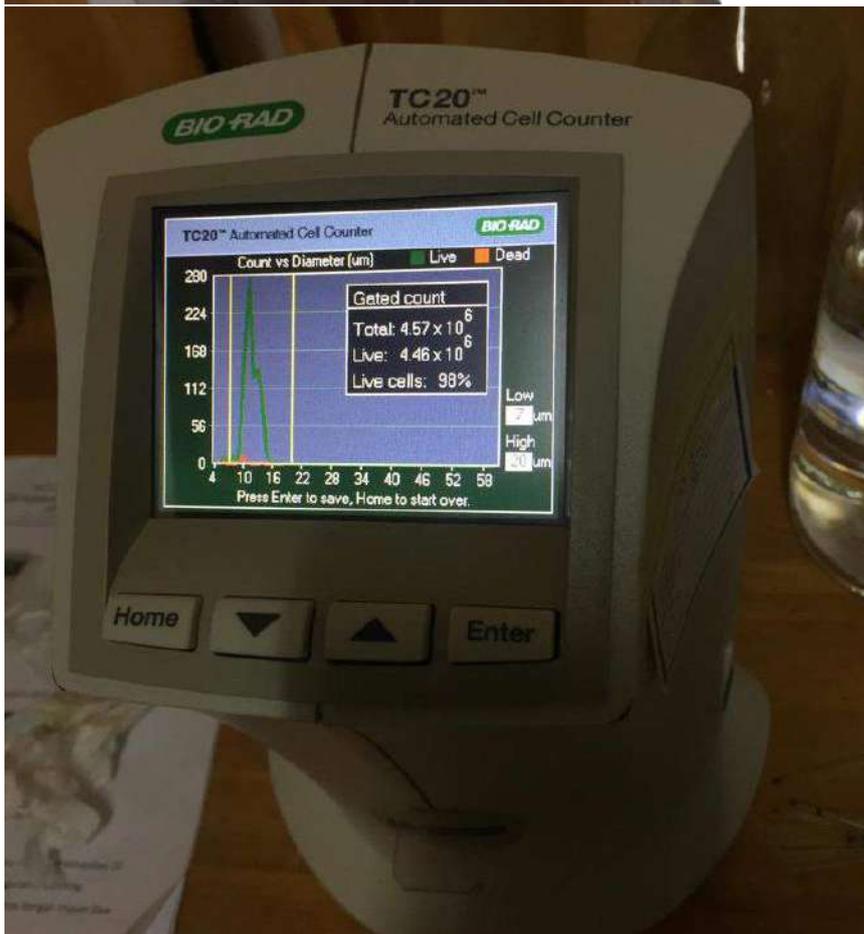
2. UJI KADAR TOTAL FENOL, FLAVONOID DAN ANTIOKSIDAN

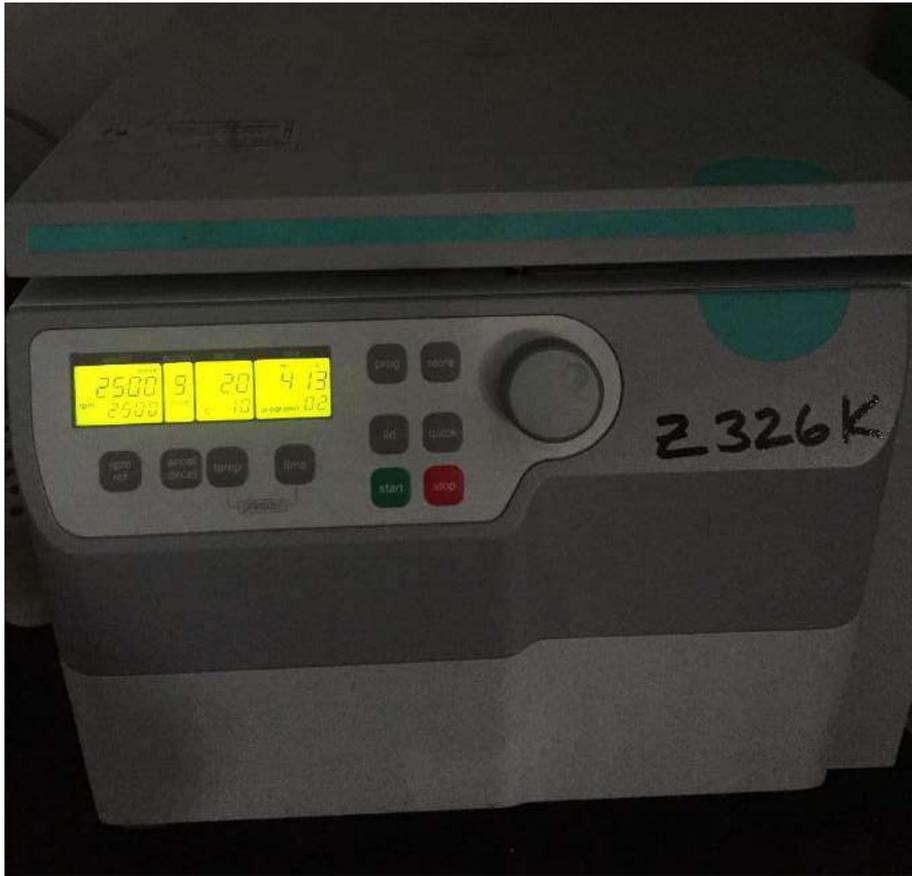




3. UJI ANTIKANKER SECARA *IN VITRO*





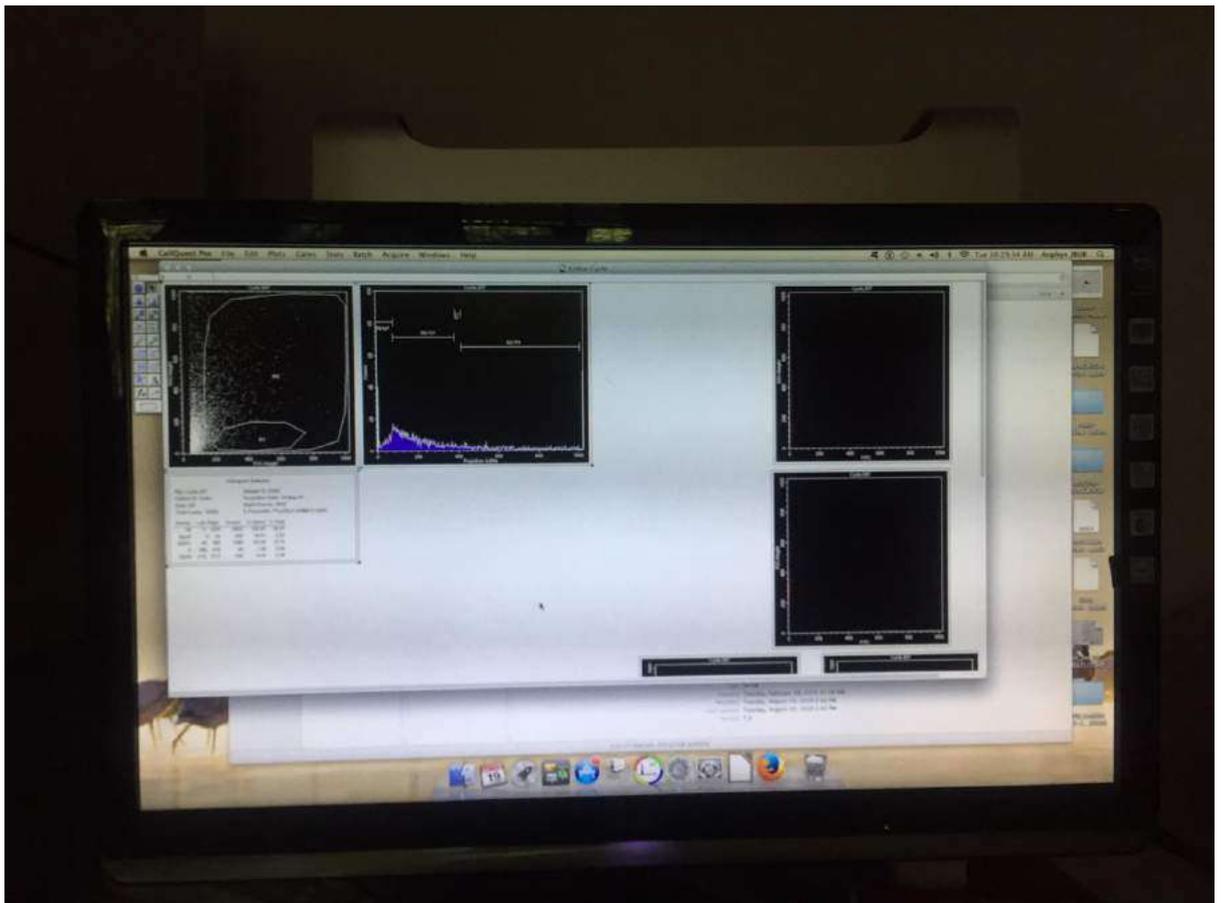






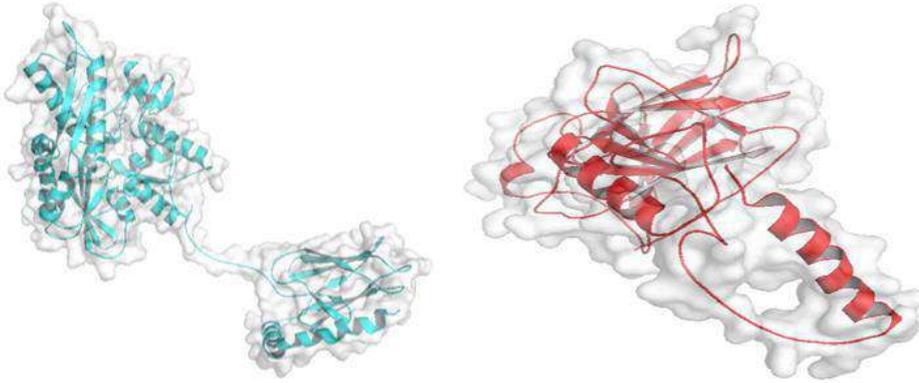




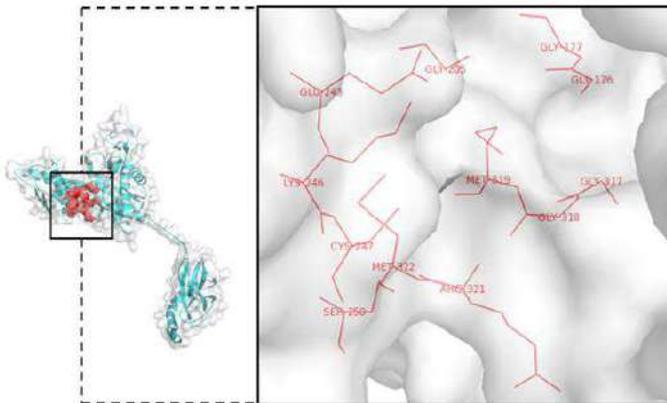


4. UJI ANTIKANKER SECARA *in silico*

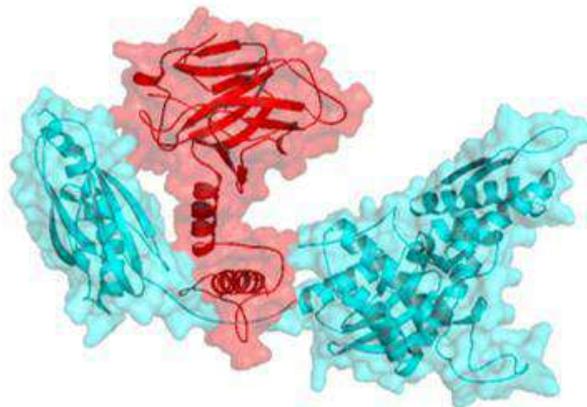
1. Visualisasi struktur 3D protein target dan control obat



2. Melakukan visualisasi untuk mengetahui sisi aktif antara protein target dengan obat/mortalin

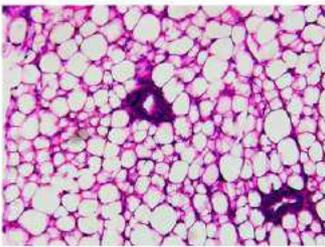


4. Mengetahui visualisasi p53 sebagai protein target

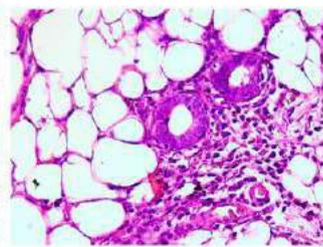




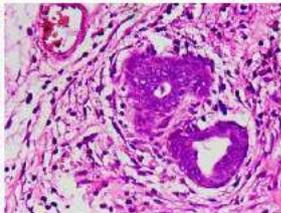
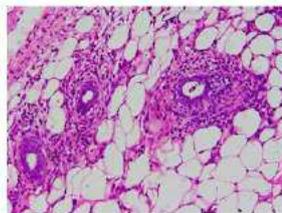
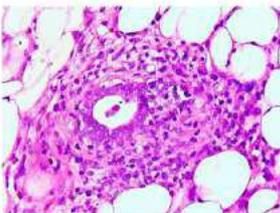
Hasil Histopatologi 1 :



Histologi jaringan normal

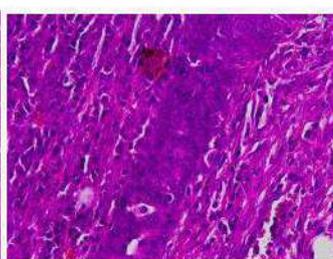
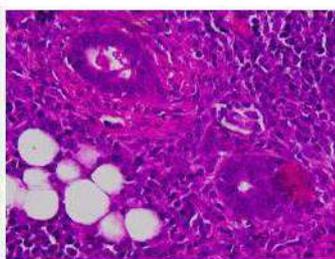
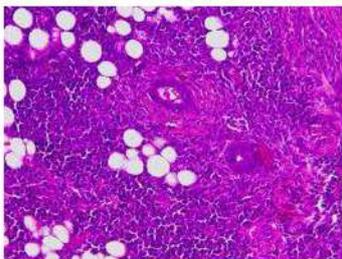


Histologi jaringan kanker ulangan1

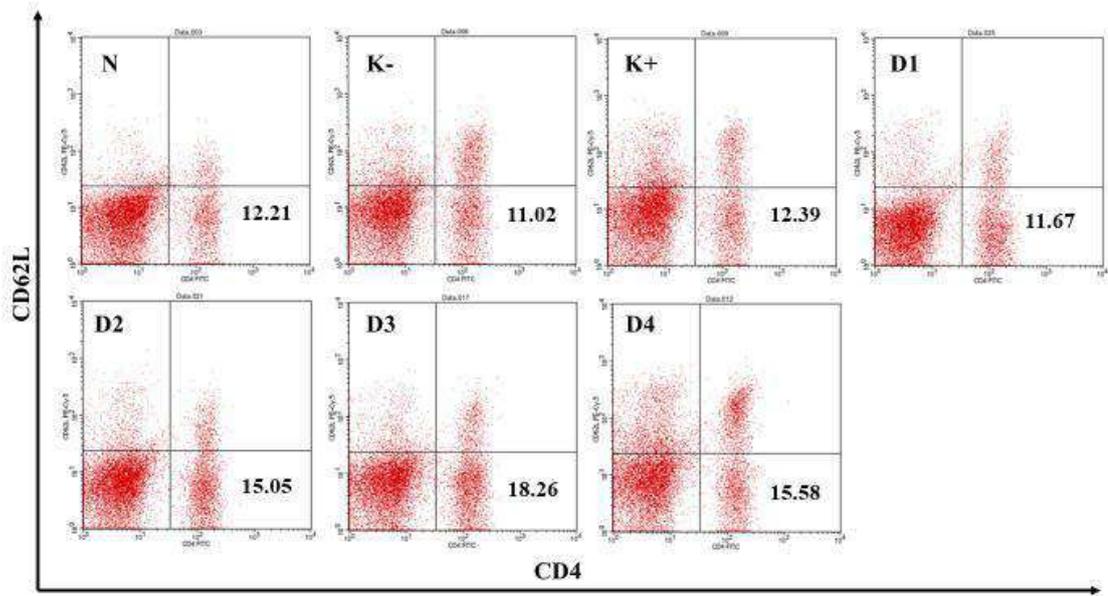


Histologi jaringan kanker ulangan 2, 3 dan 4

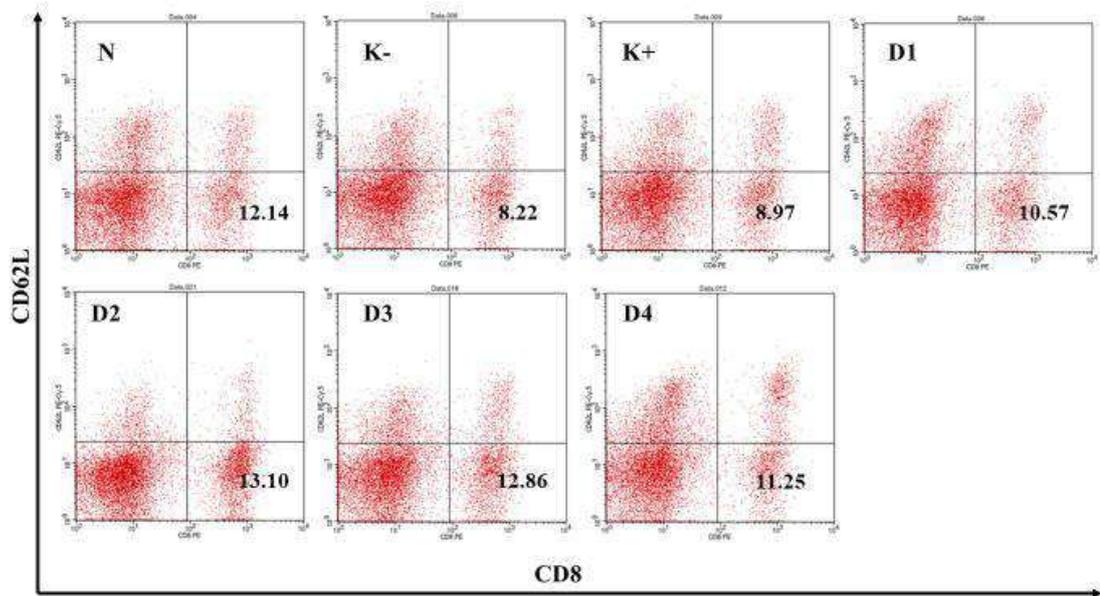
Hasil Histopatologi 2 :



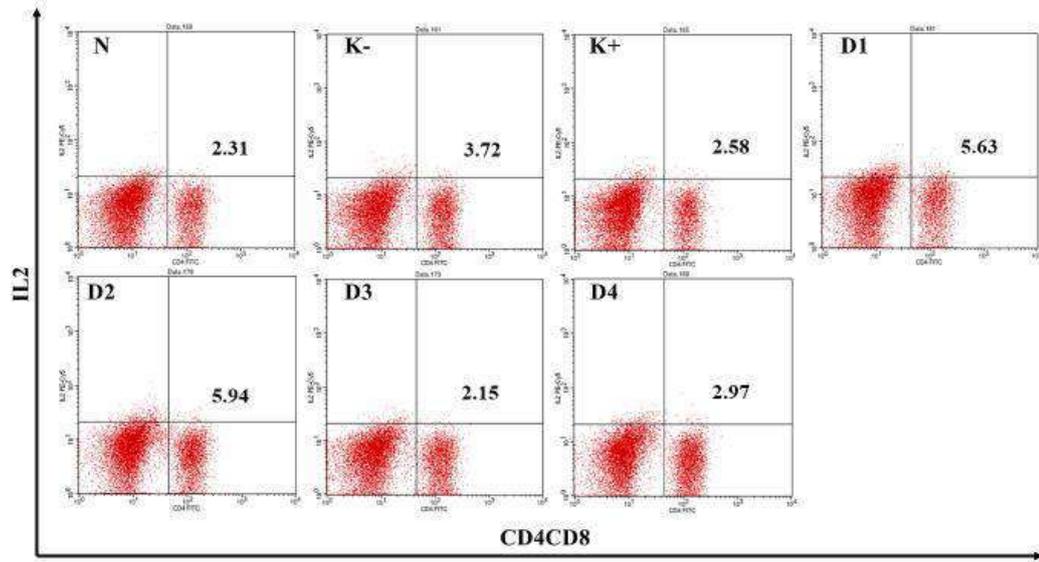
Uji Histologi jaringan kanker



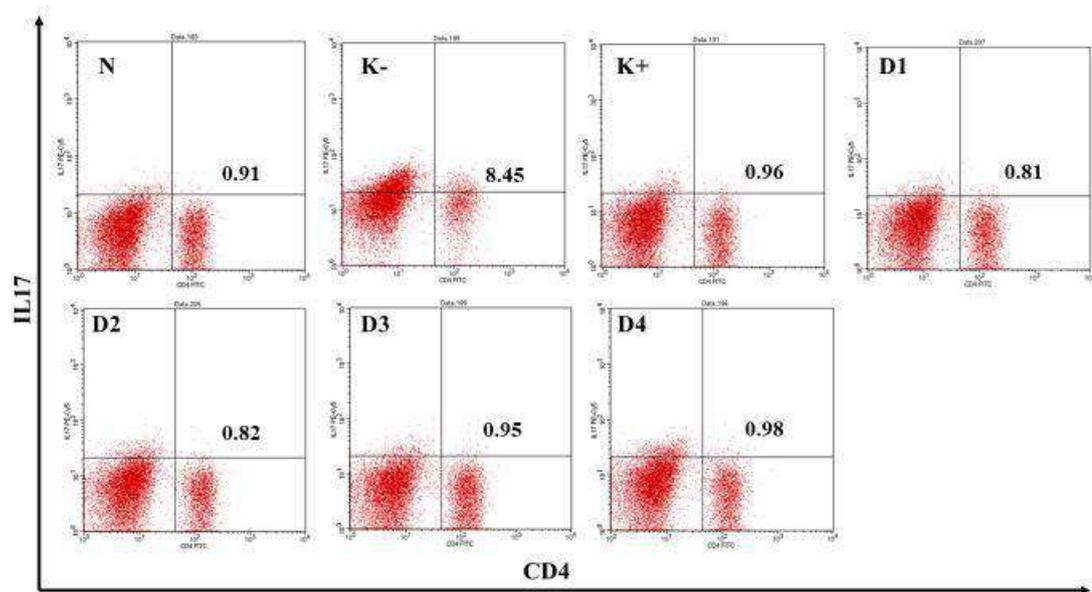
Gambar Hasil analisis flow cytometry aktivasi sel T CD4



Gambar Hasil analisis flow cytometry sel T CD8



Gambar Hasil analisis flow cytometry produksi IL2



Gambar Hasil analisis flow cytometri produksi IL-17 oleh CD4+

Dokumen pendukung luaran Tambahan #1

Luaran dijanjikan: Publikasi Ilmiah Jurnal Nasional Tidak Terakreditasi

Target: accepted/published

Dicapai: Published

Dokumen wajib diunggah:

1.

Dokumen sudah diunggah:

1. Artikel yang terbit

Dokumen belum diunggah:

-

Nama jurnal: Jurnal Teknik Industri Heuristic

Peran penulis: first author | EISSN: 1693-8232

Nama Lembaga Pengindek: Google Scholar

URL jurnal: <http://jurnal.untag-sby.ac.id/index.php/HEURISTIC>

Judul artikel: Profil Histopatologi Pada Mencit Model Kanker Payudara Dengan Pemberian Serbuk Instan Beras Hitam (*Oryza sativa* L.)

Tahun: 2020 | Volume: 19 | Nomor: 1

Halaman awal: 1 | akhir: 12

URL artikel: <http://jurnal.untag-sby.ac.id/index.php/HEURISTIC>

DOI: <http://jurnal.untag-sby.ac.id/index.php/HEURISTIC>



ISSN 1693-8232

JURNAL TEKNIK INDUSTRI HEURISTIC

PRODI TEKNIK INDUSTRI – UNIVERSITAS 17 AGUSTUS 1945 SURABAYA
Jl. Semolowaru 45 Surabaya 60118. Hand Phone: 0856 4554 9644 Fax. 031-5947145

No. : 121/ Heuristic/TI/12/2020
Perihal : Penerimaan Artikel Ilmiah
Lampiran : -

Kepada Yth.: Dr. Fadjar Kurnia Hartati
Universitas Dr. Soetomo
Surabaya

Dengan hormat,

Bersama ini kami beritahukan bahwa artikel saudara yang berjudul:

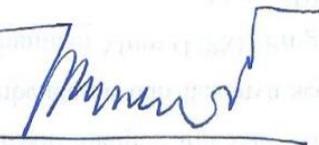
**PROFIL HISTOPATOLOGI PADA MENCIT MODEL KANKER
PAYUDARA DENGAN PEMBERIAN SERBUK INSTAN
BERAS HITAM (*Oryza sativa* L.)**

Telah kami terima dan setelah kami periksa dengan seksama, maka dengan ini kami **nyatakan layak untuk dipublikasi** pada jurnal HEURISTIC. Insyallah publikasi pada volume 19 nomor 1 pada awal tahun 2021. Hingga saat ini masih pada tahap pengaturan tata letak dengan naskah-naskah yang lainnya. Harap sabra menunggu.

Akhirnya diucapkan terima kasih atas kontribusi artikelnya dan kami masih berharap kontribusi artikel-artikel berikutnya.

Surabaya, 5 Desember 2020
Ketua Penyunting,




Asmungi

PROFIL HISTOPATOLOGI PADA MENCIT MODEL KANKER PAYUDARA DENGAN PEMBERIAN SERBUK INSTAN BERAS HITAM (*Oryza sativa* L.)

Fadjar Kurnia Hartati¹, Arlin Besari Djauhari¹, Restu Tjiptaningdyah¹

Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian, Unibversitas Dr. Soetomo
fadjar.kurnia@unitomo.ac.id

ABSTRAK

Kanker merupakan salah satu penyebab kematian yang terus meningkat dari tahun ketahun. Jenis kanker yang paling sering menyebabkan kematian pada wanita antara lain kanker payudara. Sedangkan terapi yang biasa diberikan kepada penderita kanker, biayanya besar dan mempunyai dampak negative. Salah satu upaya untuk menghadapi permasalahan di atas adalah dengan terpai menggunakan bahan alam seperti beras hitam. Pada saat melakukan *uji in vivo*, harus diawali dengan uji histopatologi pada mencit model kanker untuk memastikan kanker telah terbentuk pada hewan coba. Tujuan dilakukan uji histopatologi adalah untuk mengetahui terbentuknya infasi kanker pada hewan coba (mencit Balb/c). metode yang digunakan adalah metode standar uji histopatologi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian serbuk instan beras hitam dapat menurunkan infasi kanker pada hewan coba.

Kata Kunci: serbuk beras hitam, infasi, histopatologi, hewan coba, kanker

ABSTRACT

Cancer was one of the causes of death which continues to increase from year to year. The types of cancer that most often cause death in women include breast cancer. Meanwhile, the therapy that is usually given to cancer patients is very expensive and has a negative impact. One of the efforts to deal with the above problems is by using natural ingredients such as black rice. When doing the in vivo test, it must be preceded by a histopathological test on cancer model mice to ensure cancer has formed in experimental animals. The aim of the histopathological test was to determine the formation of cancer infection in experimental animals (Balb / c mice). the method used is the standard method of histopathological test. The results showed that giving black rice instant powder could reduce cancer infection in experimental animals.

Keywords: black rice powder, infasi, histopathology, experimental animals, cancer

PENDAHULUAN

Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) tahun 2004, menyatakan bahwa 5 besar kanker di dunia adalah kanker paru-paru, kanker payudara, kanker usus besar, kanker lambung, dan kanker hati. WHO mengestimasi bahwa 84 juta orang meninggal akibat kanker dalam rentang waktu 2005-2015. Survei yang dilakukan WHO menyatakan 8-9 persen wanita mengalami kanker payudara. Hal itu membuat kanker payudara sebagai jenis kanker yang paling banyak ditemui pada wanita setelah kanker leher rahim. Kanker payudara merupakan masalah besar di Indonesia maupun di negara lain. Jumlah kasus baru di Amerika Serikat pada tahun 2003 mencapai 211.300 orang dan 39.800 pasien meninggal akibat kanker payudara pada tahun yang sama. Kanker payudara di Indonesia berada di urutan kedua sebagai kanker yang paling sering ditemukan pada perempuan, setelah kanker mulut rahim. Penelitian di Jakarta Breast Cancer pada April 2001 sampai April 2003 menunjukkan bahwa dari 2.834 orang memeriksakan benjolan di payudaranya, 2.229 diantaranya (78%) merupakan tumor jinak, 368 orang (13%) terdiagnosis kanker payudara dan sisanya merupakan infeksi dan kelainan bawaan payudara (Djoerban, 2003).

Berdasarkan Profil Kesehatan Republik Indonesia tahun 2008, 10 peringkat utama penyakit neoplasma ganas atau kanker pasien rawat inap di rumah sakit sejak tahun 2004-2008 tidak banyak berubah. Tiga peringkat utama adalah neoplasma ganas payudara disusul neoplasma ganas serviks uterus dan neoplasma ganas hati dan saluran intra hepatic. Kanker payudara terus meningkat selama 4 tahun tersebut dengan kejadian 5.297 kasus di tahun 2004, 7.850 kasus di tahun 2005, 8.328 kasus di tahun 2006, dan 8.277 kasus di tahun 2007 (Depkes RI, 2008).

Histologi adalah ilmu yang mempelajari tentang struktur jaringan secara detail menggunakan mikroskop pada sediaan jaringan yang dipotong tipis, salah satu dari cabang-cabang biologi. Histologi dapat juga disebut sebagai ilmu anatomi mikroskopis.

Histologi amat berguna dalam mempelajari fungsi fisiologi sel-sel dalam tubuh, baik manusia, hewan, serta tumbuhan, dan dalam bentuk histopatologi ia berguna dalam penegakan diagnosis penyakit yang melibatkan perubahan fungsi fisiologi dan deformasi organ. Sebagai contoh, di bidang kedokteran, kehadiran tumor memerlukan hasil pemeriksaan contoh (sampel) jaringan. Di bidang pertanian, pemeriksaan kondisi jaringan pengangkut dapat mendukung diagnosis serangan hawar daun tembakau.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan mencit sebanyak 50 ekor mencit Balb/c betina berumur 6 minggu dibagi menjadi 6 kelompok sebagaimana berikut;

N = Kontrol normal;

K- = Mencit diinjeksi DMBA;

K+ = Mencit diinjeksi DMBA dan ditreatment Cisplatin (5mg/kg (Shikanov dkk, 2011));

D1 = Mencit diinjeksi DMBA dan ditreatment ekstrak beras hitam (0,2 g/kg);

D2 = Mencit diinjeksi DMBA dan ditreatment ekstrak beras hitam (0,3 g/kg);

D3 = Mencit diinjeksi DMBA dan ditreatment ekstrak beras hitam (0,4 g/kg);
D4 = Mencit diinjeksi DMBA dan ditreatment ekstrak beras hitam (0,5 g/kg).

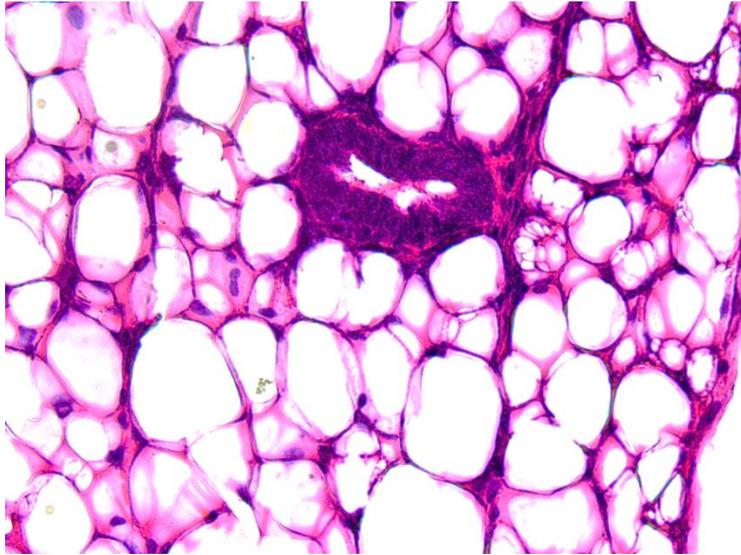
Induksi DMBA dilakukan tiap minggu selama 5 minggu melalui injeksi subkutan dengan dosis 15 mg/kg BB mencit. Pada minggu ke-5 dan ke-10, sebagian mencit yang diinduksi DMBA dibedah untuk diisolasi jaringan mammae dan dibuat preparat histologi dengan pewarnaan HE yang bertujuan untuk melakukan konfirmasi permodelan mencit kanker payudara. Setelah mencit terkonfirmasi kanker, mencit ditreatment dengan ekstrak beras hitam selama dua minggu. Setelah itu, semua mencit dibedah untuk diisolasi jaringan mammae, hepar, dan spleen untuk analisis histologi dan *flow cytometry*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

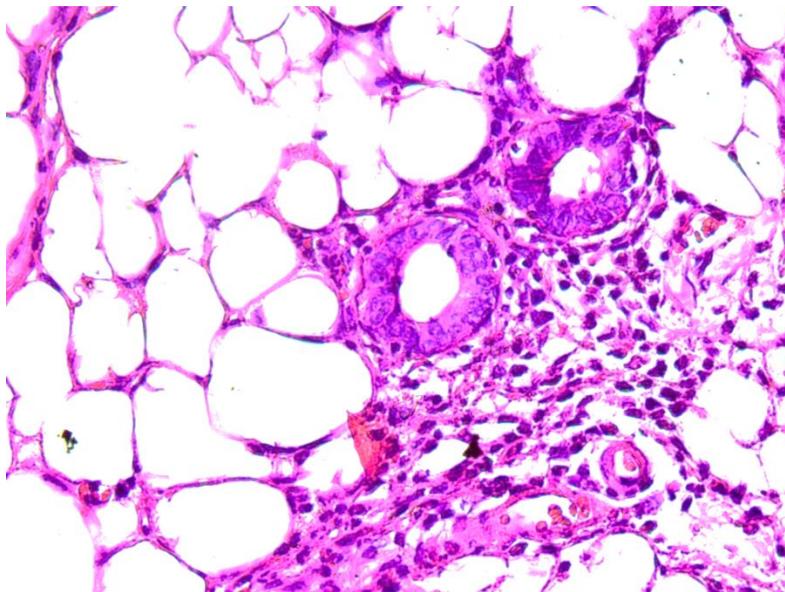
Histologi jaringan mammae pada mencit model kanker payudara

Evaluasi dan konfirmasi histologi mammae model mencit kanker pada minggu ke-10

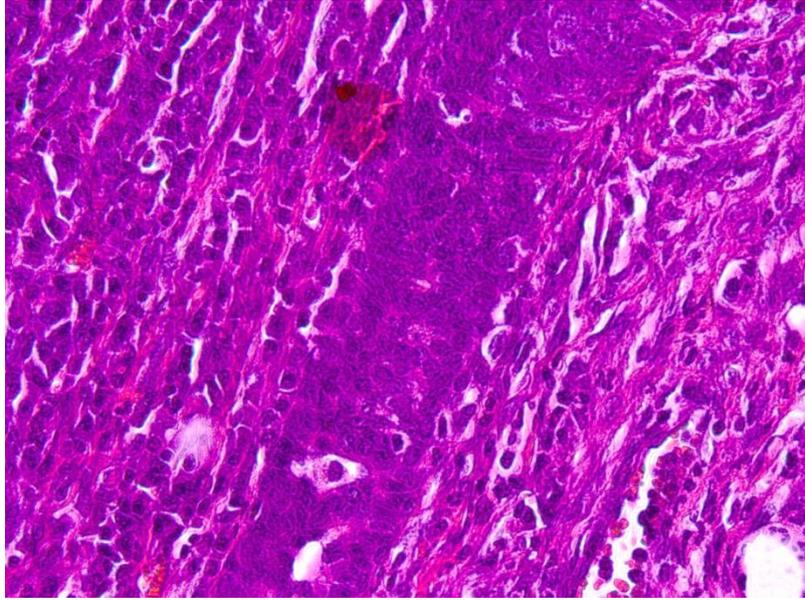
Penggunaan senyawa kimia karsinogen banyak digunakan dalam pembuatan model kanker pada rodensia. Salah satu senyawa karsinogen yang paling umum digunakan adalah *7,12-dimethylbenz(a)anthracene* (DMBA) yang memiliki sifat baik karsinogen maupun efek immunosupresif telah diketahui berhasil menginduksi pembentukan tumor mammae pada model rodensia (Karimi dkk, 2019). Pengamatan histologi jaringan mammae mencit normal (yang tidak diinduksi DMBA) dianalisis sebagai pembandingan (Gambar 1). Histologi pada mammae normal menunjukkan adanya duktus yang dikelilingi dengan jaringan adiposa yang kompak. Histologi jaringan mammae mencit yang sudah diinduksi DMBA pada minggu ke 4 (Gambar 2) belum menunjukkan adanya abnormalitas jaringan. Duktus pada kelompok tersebut dikelilingi oleh stroma yang dibentuk oleh jaringan adiposa dan jaringan ikat fibrosa. Namun, setelah mencit diinjeksi sebanyak 5 kali dan dibedah pada minggu ke 10, ditemukan adanya abnormalitas atau neoplasia pada jaringan (Gambar 3) dan mikroinvasi menuju sel stroma (Gambar 4). Gambar 3 menunjukkan jaringan epitel luminal penyusun duktus telah mengalami neoplasia. Sel abnormal menunjukkan karakteristik bentuk pleomorfik atau memiliki variasi bentuk sel maupun nukleusnya. Sel-sel tersebut masih terlokalisasi di area duktus, berproliferasi hingga menutupi lumen. Sel-sel abnormal yang memenuhi area duktus dapat mengalami mikroinvasi yang mengakibatkan sel tumor tersebut menginfiltrasi jaringan stroma (panah putih) (Gambar 4). Kondisi ini merupakan awal peralihan dari karsinoma *in-situ* menjadi karsinoma invasive. Mikroinvasi yang ditunjukkan pada Gambar 4 sejalan dengan penelitian Schulze-Garg dkk (2000) yang menunjukkan adanya invasive focal pada membrane basal oleh sel-sel neoplastik pada mencit transgenik WAP-TNP8 yang ditunjukkan pada Gambar 5.



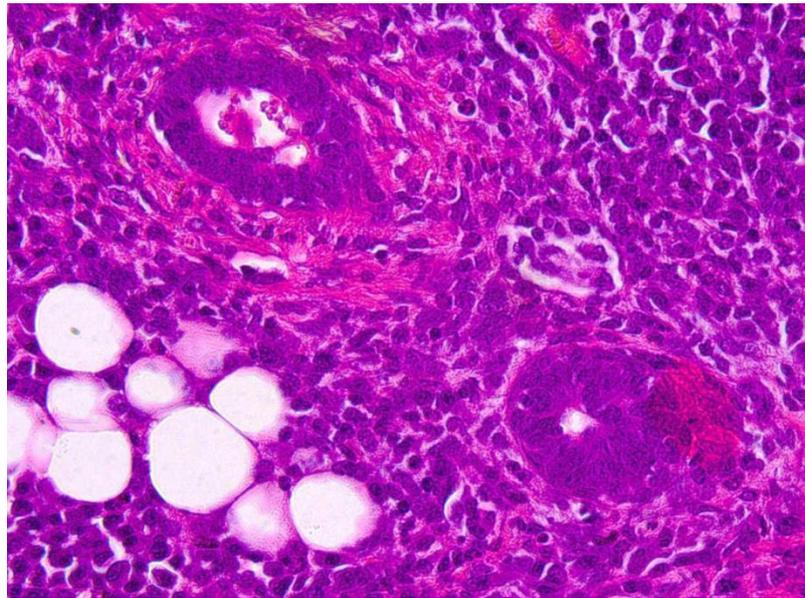
Gambar 1. Histologi jaringan mammae mencit normal. Histologi menunjukkan adanya duktus (D) yang tersusun atas epitel bilayer melingkar. Epitel terdalam yang berbentuk kuboid disebut bagian luminal, sementara yang terluar yaitu mioepitel berbentuk spindel. Jaringan epitel tersebut dikelilingi oleh stroma berupa jaringan adiposa (AT) (M: 400x).



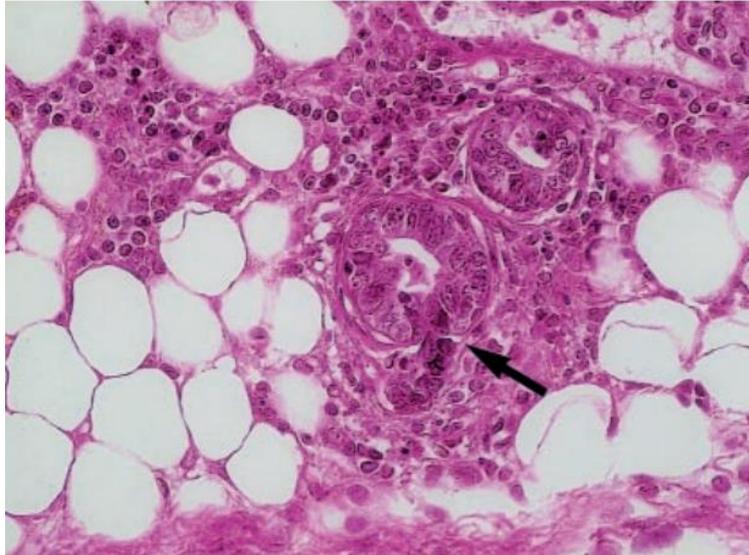
Gambar 2. Histologi jaringan mammae mencit yang diinduksi DMBA pada minggu ke-4. Jaringan payudara masih terdiri atas duktus yang dikelilingi oleh stroma. Stroma selain dibentuk oleh jaringan adiposa juga terdapat jaringan ikat fibrosa (FT) di beberapa lokasi (M: 400x)



Gambar 3. Histologi jaringan mammae mencit yang diinduksi DMBA pada minggu ke-10. Duktus (D) mengalami neoplasia dan lumen duktus dipenuhi oleh sel-sel abnormal (M: 400x).



Gambar 4. Histologi jaringan mammae mencit yang diinduksi DMBA pada minggu ke-10. Sel-sel kanker mengalami mikroinvasi dan berinfiltrasi menuju stroma (panah putih) (M: 400x).

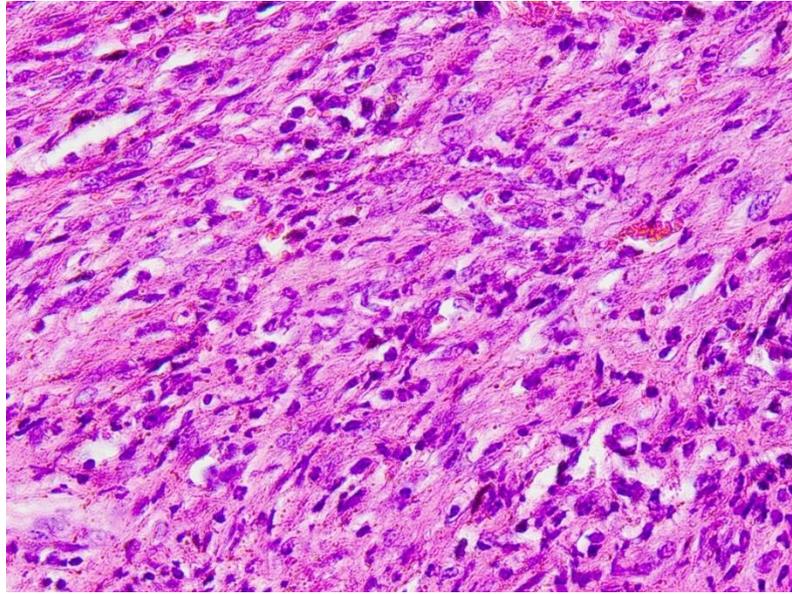


Gambar 5. Mikroinvasi ductal caricinoma pada mencit transgenik WAP-T-TN8. Tanda panah menunjukkan invasi focal.

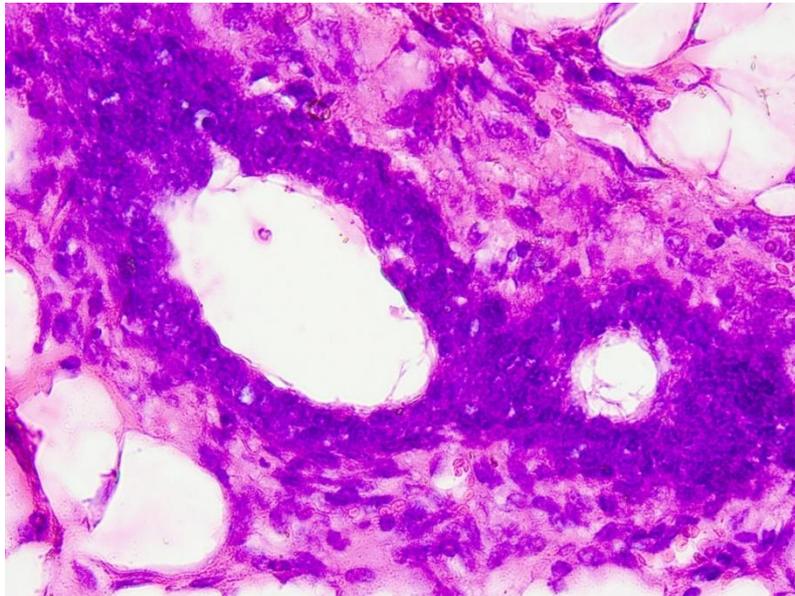
Pengaruh pemberian ekstrak beras hitam terhadap histologi kanker payudara pada mencit model

Jaringan *mammae* yang diambil dari mencit hasil induksi DMBA setelah masuk minggu ke-12 tanpa perlakuan obat menunjukkan banyak sel abnormal (ditunjuk oleh panah hitam) yang menginfiltrasi stroma secara tidak beraturan. Struktur duktus sudah tidak tampak karena mioepitel sepenuhnya sudah rusak (Gambar 6). Kondisi berkurangnya mioepitel akan membuat struktur jaringan semakin rapuh. Kondisi ini akan mempermudah sel kanker menerobos mioepitel kemudian menyebar ke jaringan stroma. Kanker pada fase ini disebut sebagai karsinoma invasif, dapat berupa *invasive ductal carcinoma* atau *invasive lobular carcinoma* (Makki, 2015). Sementara itu, mencit kanker yang diberi injeksi intratumoral menggunakan cisplatin 5 mg/kg BB memiliki histologi *mammae* yang lebih baik, di mana sel neoplastik masih berada pada duktus dengan dijumpai mikroinvasi yang ditunjuk panah putih (Gambar 7). Mencit kanker yang diberi perlakuan ekstrak beras hitam secara oral menunjukkan histologi dengan progresivitas kanker yang bervariasi tiap dosis. Dosis 1 (0,2 g/kg BB) dan dosis 2 (0,3 g/kg BB) sama-sama memiliki histologi karsinoma invasif namun dengan struktur jaringan yang berbeda. Mencit dosis 1 menunjukkan infiltrasi sel neoplastik yang menyusun *tubule formation* (Gambar 8). *Tubule formation* merupakan kondisi histopatologi di mana beberapa klaster sel kanker invasif membentuk struktur menyerupai saluran yang lama-kelamaan menutup (Gambar 9). Karakteristik ini menjadi salah satu indikator yang diamati saat *grading* kanker payudara menurut aturan Nottingham (Ping dkk., 2016). Sementara itu, mencit dosis 2 menunjukkan infiltrasi sel kanker dengan sebaran tidak beraturan tidak jauh berbeda dengan tanpa *treatment* (Gambar 10). Mencit dengan *treatment* dosis 3 (0,4 g/kg BB) struktur histologinya tidak jauh berbeda dengan menggunakan cisplatin yaitu serupa

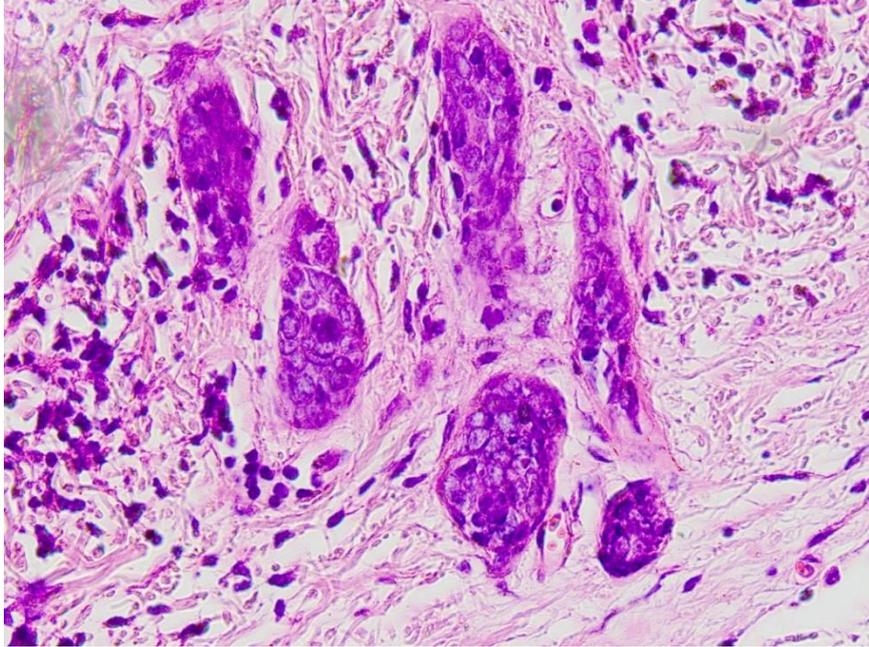
ductal carcinoma in situ dengan mikroinvasi ditunjukkan panah putih (Gambar 11). Kondisi jaringan yang relatif lebih baik ditunjukkan oleh mencit kanker yang dengan *treatment* dosis 4 (0,5 g/kg BB) dikarenakan pertumbuhan sel tumor tampak sedikit hanya sebatas di daerah duktus tanpa adanya mikroinvasi (Gambar 12).



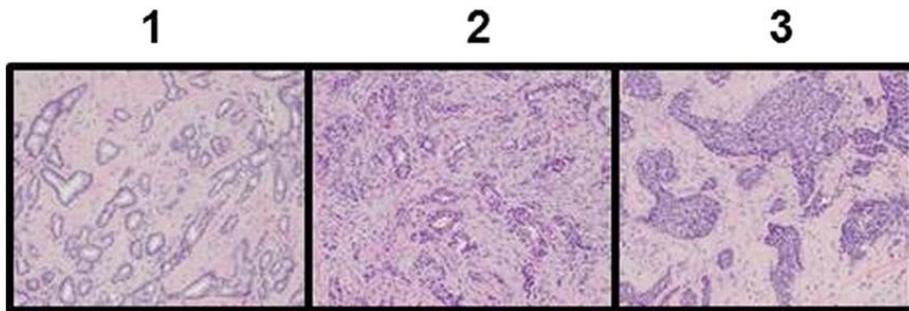
Gambar 6. Histologi jaringan mammae mencit yang diinduksi DMBA pada minggu ke-12. Sel tumor telah menginfiltrasi stroma (panah hitam) sehingga memasuki tahap karsinoma invasif (M: 400x).



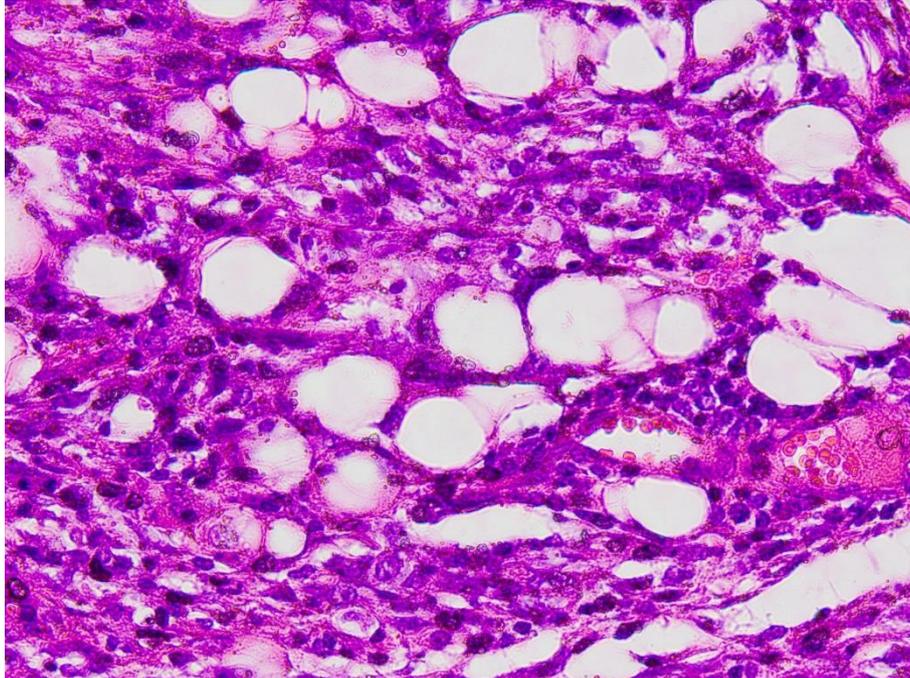
Gambar 7. Histologi mammae mencit kanker yang diberi cisplatin 5 mg/kg BB. Pertumbuhan kanker pada duktus sampai pada mikroinvasi/infiltrasi menuju stroma (panah putih) (M: 400x).



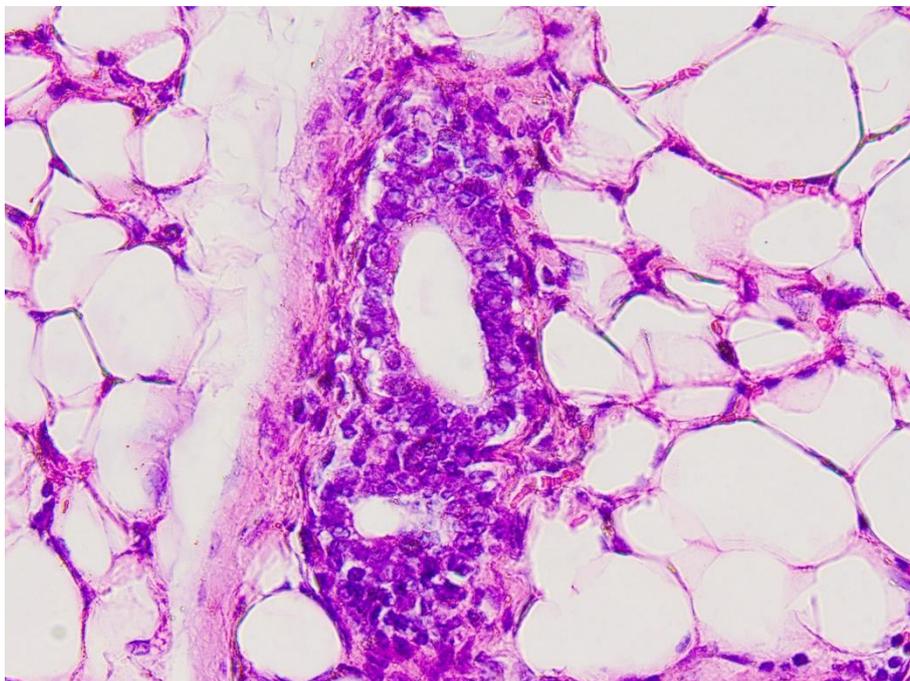
Gambar 8. Histologi mammae mencit kanker yang diberi ekstrak beras merah 0,2 g/kg BB. Sel-sel tumor yang menginfiltrasi stroma membentuk *tubule formation* (panah putih) (M: 400x).



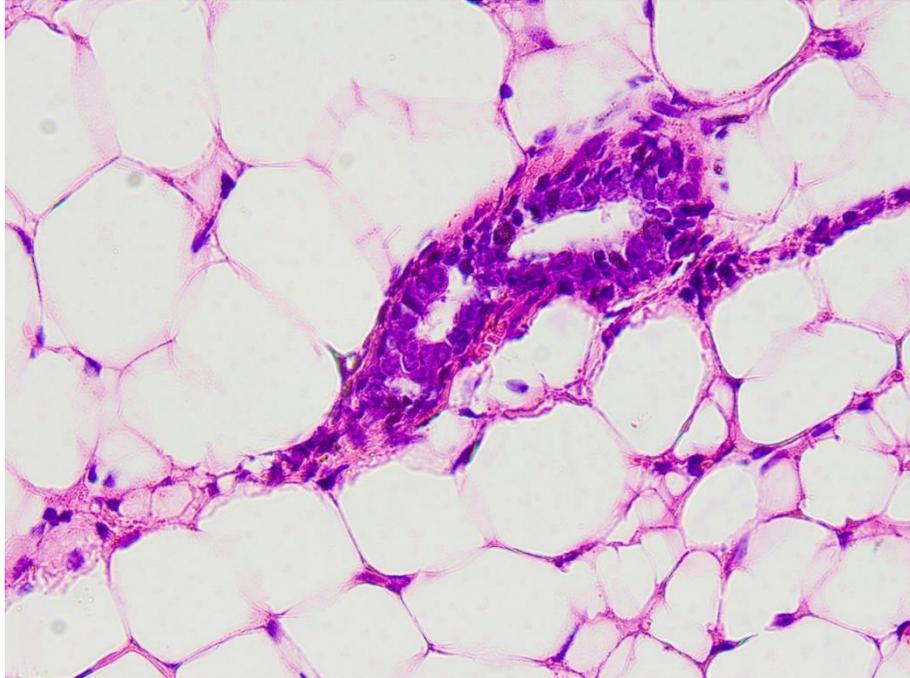
Gambar 9. *Tubule formation* pada karsinoma invasive (Ping dkk., 2016)



Gambar 10. Histologi mammae mencit kanker yang diberi ekstrak beras merah 0,3 g/kg BB. Tampak beberapa sel kanker (panah putih) telah menginfiltrasi stroma berupa jaringan adiposit (M: 400x).



Gambar 11. Histologi mammae mencit kanker yang diberi ekstrak beras merah 0,4 mg/kg BB. Tampak sel neoplastik berkembang dari area duktus dan mulai menginfiltrasi stroma (panah putih) (M: 400x).



Gambar 12. Histologi mammae mencit kanker yang diberi ekstrak beras merah 0,5 mg/kg BB. Tampak beberapa sel abnormal pada bagian duktus yang masih dikelilingi oleh mioepitel (M: 400x).

KESIMPULAN

Pemberian serbuk instan beras hitam dapat mempengaruhi profil histopatologi pada mencit model kanker payudara. Pada pemberian serbuk instan dengan dosis 0,3 g/kg BB, tampak beberapa sel kanker (panah putih) telah menginfiltrasi stroma berupa jaringan adiposit.

DAFTAR PUSTAKA

- Bui, J.D. and Schreiber, R.D. (2007). Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes?. *Current opinion in immunology*, 19(2), pp.203-208.
- Fasoulakis, Z., Kolios, G., Papamanolis, V. and Kontomanolis, E.N. (2018). Interleukins associated with breast cancer. *Cureus*, 10(11).
- Huang, Y., Ma, C., Zhang, Q., Ye, J., Wang, F., Zhang, Y., Hunborg, P., Varvares, M.A., Hoft, D.F., Hsueh, E.C. and Peng, G. (2015). CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*, 6(19), p.17462.

- Karimi, B., Ashrafi, M., Shomali, T. and Yektaseresht, A. (2019). Therapeutic effect of simvastatin on DMBA-induced breast cancer in mice. *Fundamental & clinical pharmacology*, 33(1), pp.84-93.
- Makki, J. (2015). Diversity of breast carcinoma: histological subtypes and clinical relevance. *Clinical Medicine Insights: Pathology*, 8, pp.CPath-S31563.
- Park, Y.M., Lee, H.Y., Shin, D.Y., Lee, Y.H., Yang, Y.J., Lee, H.S., Lee, J.O., Choi, K.S., Kang, J.H., Cho, Y.H. and Kim, M.G. (2020). Immunostimulatory Activity of Black Rice Bran in Cyclophosphamide-Induced Immunosuppressed Rats. *Natural Product Communications*, 15(7), p.1934578X20934919.
- Ping, Z., Xia, Y., Shen, T., Parekh, V., Siegal, G.P., Eltoun, I.E., He, J., Chen, D., Deng, M., Xi, R. and Shen, D. (2016). A microscopic landscape of the invasive breast cancer genome. *Scientific reports*, 6(1), pp.1-10.
- Schulze-Garg, C., LoÈhler, J., Gocht, A. and Deppert, W. (2000). A transgenic mouse model for the ductal carcinoma in situ (DCIS) of the mammary gland. *Oncogene*, 19(8), pp.1028-1037.
- Shikanov, A., Shikanov, S., Vaisman, B., Golenser, J. and Domb, A.J. (2011). Cisplatin tumor biodistribution and efficacy after intratumoral injection of a biodegradable extended release implant. *Chemotherapy research and practice*, 2011.
- Tsukumo, S.I. and Yasutomo, K. (2018). Regulation of CD8+ T cells and antitumor immunity by Notch signaling. *Frontiers in Immunology*, 9, p.101.
- Vareki, S.M., Garrigós, C. and Duran, I. (2017). Biomarkers of response to PD-1/PD-L1 inhibition. *Critical reviews in oncology/hematology*, 116, pp.116-124.
- Welte, T. and Zhang, X.H.F. (2015). Interleukin-17 could promote breast cancer progression at several stages of the disease. *Mediators of inflammation*, 2015.

Dokumen pendukung luaran Tambahan #2

Luaran dijanjikan: Keikutsertaan dalam Seminar Nasional

Target: sudah dilaksanakan

Dicapai: Published

Dokumen wajib diunggah:

1. Artikel yang terbit

Dokumen sudah diunggah:

1. Artikel yang terbit

Dokumen belum diunggah:

-

Peran penulis: first author

Nama Konferensi/Seminar: Seminar Nasional tentang Pembangunan Pertanian Berkelanjutan dalam Perspektif Teknologi, Sosial, dan Ekonomi

Lembaga penyelenggara: FP Unmuh Purwokerto

Tempat penyelenggara: Fakultas Pertanian

Tgl penyelenggaraan mulai: 27 Agustus 2020 | Tgl selesai: 28 Agustus 2020

ISBN/ISSN: 978-602-6697-58-5

Lembaga pengindeks: ISBN

URL website: <http://digital.library.ump.ac.id/972/>

Judul artikel: Analisis TNFR1 Sebagai Protein Target Pada Uji Antikanker Beras Hitam (*Oryza sativa* L.) Secara in silico

ANALISIS TNFR1 SEBAGAI PROTEIN TARGET PADA UJI ANTIKANKER BERAS HITAM (*Oryza sativa* L.) SECARA *IN SILICO*

Fadjar Kurnia Hartati dan Arlin Besari Djauhari

Program Studi Teknologi Pangan Fakultas Pertanian

Universitas Dr. Soetomo

e-mail: fadjar.kurnia@unitomo.ac.id

ABSTRACT

This study aims to determine the prediction of TNFR1 as a target protein in the in silico anticancer test of black rice. The research method uses the PDP website, KEGG, STRING and COFACTOR server. The results showed that TNFR1 is a receptor / target protein that induces cell apoptosis by means of several pathways such as IKBKB, TNFRSF, TRAF and others. TNFR1 will bind with ligands to the amino acids Phe60, Thr61, Ala62, Leu67, Leu71. The active site has a bond strength of 0.52, which means that the bond is very strong because the bond between the target protein and the ligand is said to be strong if it has a value between 0-1. The BS (Binding Site) value is greater than 1.94 which means it has a high degree of accuracy. The TM (modeling template) value is 1, and the RMSD (Root Mean Square Deviation) value is 0.

Key words: target protein, anti cancer, TNFR1, black rice, in silico

ABSTRAK

Penelitian ini mempunyai tujuan untuk mengetahui prediksi TNFR1 sebagai protein target pada uji antikanker beras hitam secara in silico. Metode penelitian menggunakan website PDP, KEGG, STRING dan COFACTOR server. Hasil penelitian menunjukkan bahwa TNFR1 merupakan reseptor/protein target yang meninduksi apoptosis sel dengan pathway melalui beberapa jalur seperti IKBKB, TNFRSF, TRAF dan lain-lain. TNFR1 akan berikatan dengan ligan pada asam amino-asam amino Phe60, Thr61, Ala62, Leu67, Leu71. Sisi aktif tersebut mempunyai kekuatan ikatan dengan ligan sebesar 0,52 berarti ikatannya sangat kuat karena ikatan antara protein target-ligan dikatakan kuat apabila mempunyai nilai antara 0-1. Nilai BS (Binding Site) lebih besar dari 1,94 yang berarti mempunyai tingkat akurasi tinggi. Nilai TM (template modelling) sebesar 1, dan nilai RMSD (Root Mean Square Deviation) sebesar 0.

Kata kunci: protein target, antikanker, TNFR1, beras hitam, in silico

A. PENDAHULUAN

Beras hitam dikenal sebagai *forbidden rice* sehingga belum banyak dikonsumsi oleh masyarakat umum. Padahal Indonesia memiliki beberapa varietas yang tersebar di seluruh wilayah yang ada di Indonesia, misal di sekitar Jawa Tengah adalah varietas Cempo Ireng dan Melik, varietas Cibeusi di Jawa Barat, varietas Joko Bolot di Malang Jawa Timur, varietas Manggarai dari Nusa Tenggara Timur, varietas Wojalaka dari Toraja, dan di Bali terdapat varietas beras hitam yang lebih pulen (BBPADI, 2020). Senyawa bioaktif yang dikandung oleh beras hitam cyanidin-3-O-arabidoside, cyanidin-3,5-diglucoside, pelargonidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, campesterol ferulate, cycloartenol ferulate, 24-methylenecycloartenol ferulate, quercetin-3-O-glucoside, isorhamnetin-3-O-glucoside, lycopene, zeaxanthin, lutein, β -carotene, quercetin-3-O-rutinoside (Caro *et al*, 2013).

Ekstrak antosianin beras hitam dilaporkan dapat menghambat sel kanker liver (Chen *et al.*, 2012). Menurut Kim (2005); Xia *et al.*, (2006); Wang *et al.*, (2007) dan Zawistowski *et al.* (2009), antosianin beras hitam dapat menurunkan kadar kolesterol, trigliserida, LDL (*Low Density Lipoprotein*) dan meningkatkan HDL (*High Density Lipoprotein*) dan sangat potensi untuk terapi kardiovaskuler. Antosianin beras hitam juga dapat meningkatkan fungsi limpa, liver, lambung dan usus, juga sebagai agen *hematopoietic* dibidang farmasi (Yang *et al.*, 2011), mencegah arterosklerosis (Lu dan Foo, 2008), anti-inflamatori (Min *et al.*, 2010). Lebih lanjut Nontasan *et al.*, (2012) memanfaatkan dedak beras hitam sebagai pewarna alami dan Hou *et al.*, (2013) mengamati pengaruh ekstrak dedak beras hitam sebagai antioksidan dan hepatoprotektif. Hartati *et al* (2017^a) menunjukkan bahwa beras hitam mempunyai aktivitas antioksidan dan imunomodulator; juga telah membuktikan bahwa ekstrak beras hitam mampu menghambat sitokin-sitokin pro-inflamasi yang diproduksi oleh sel imunokompeten dari mencit model diabetes mellitus/DM (Hartati *et al.* 2017^a).

Berdasarkan hal tersebut diatas maka beras hitam sangat berpotensi sebagai bahan antikanker. Uji aktivitas antikanker dapat dilakukan dengan berbagai metode, salah satu metode yang sangat sesuai pada masa pandemic covid-19 seperti saat ini adalah metode *in silico* dengan menggunakan metode pemodelan molekul atau *Molecular Docking* (MD) antara sel target yang dipilih dengan molekul yang akan diprediksi aktivitasnya (Singh dan Mishra, 2018). Metode ini mampu mengeksplorasi interaksi dua molekul seperti interaksi antara kandidat obat dan suatu protein target yang saling berikatan satu dengan yang lain. Program *docking* ini dapat mengidentifikasi interaksi kompleks molekul bioaktif/ligan-protein target dan afinitas ikatan mereka dievaluasi menggunakan simulasi energi bebas (Fatmawati *et al*, 2015).

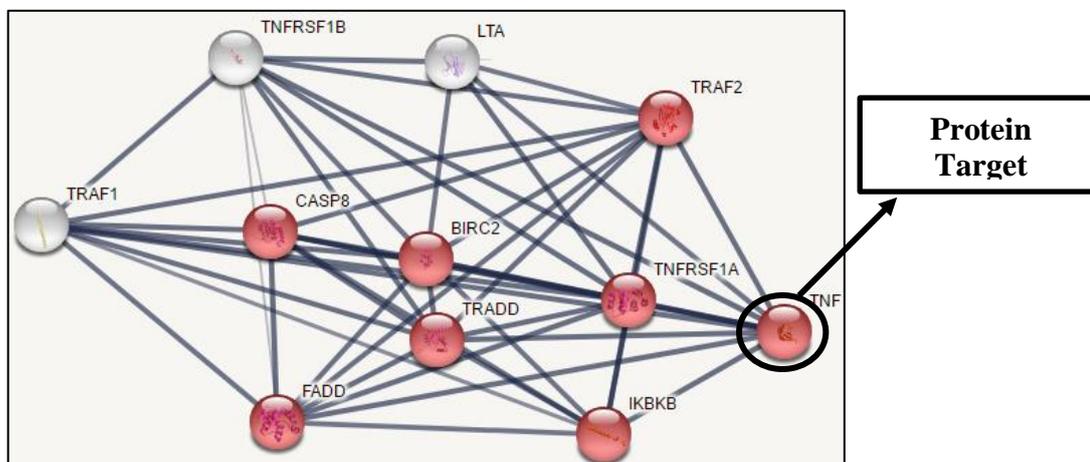
Proses *docking* hanya bisa dilakukan dengan menggunakan sampel 3 dimensi, yaitu sampel dari protein target dan sampel 3D ligan (senyawa bioaktif). Sampel 3D *ligan* dapat didownload langsung dari database *PubChem*, sedangkan 3D protein target bisa diambil melalui website PDB (Protein Data Base) yang merupakan database yang mengkoleksi struktur 3D protein hasil eksperimen (X-kristalografi, NMR, dan lain-lain). Protein target yang digunakan pada uji *in silico* ini adalah TNFR1, karena apoptosis bisa terjadi melalui reseptor TNFR1 dan TNFR2 (Faustman dan Davis (2010). Reseptor kematian terletak di permukaan sel adalah famili reseptor TNF (*Tumor Necrosis Factor*), meliputi TNF-R1, CD 95 (Fas), dan TNF-Related Apoptosis Inducing Ligan (TRAIL)-R1 dan R2. Jalur instrinsik terjadi dalam mitokondria yang mengalami stres, misalnya adanya ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) yang berlebih. Mitokondria akan melepaskan sitokrom C dan mengaktifkan caspase untuk menginduksi apoptosis (CCRC, 2016).

B. METODE

Alat yang digunakan dalam analisis protein target dan interaksinya adalah computer. Langkah awal dalam analisis protein target adalah menemukan struktur 3D nya di PDB melalui <http://www.rcsb.org>, selanjutnya mencari sequence asam amino, motif, domain, fungsi, mutase bahkan informasi struktur 3D protein target di <http://www.uniprot.org>. berikutnya adalah melakukan tinjauan pada <http://www.string-db.org> dan KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) di <http://www.genome.jp/kegg/> untuk mengetahui prediksi pathway TNFR1 sebagai antikanker.

C. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pencarian struktur 3D protein target, dapat diketahui bahwa protein target TNFR1 mempunyai kode P19438. Langkah selanjutnya adalah mengetahui prediksi patway TNFR1 sebagai antikanker, dapat dilihat pada Gambar 1.



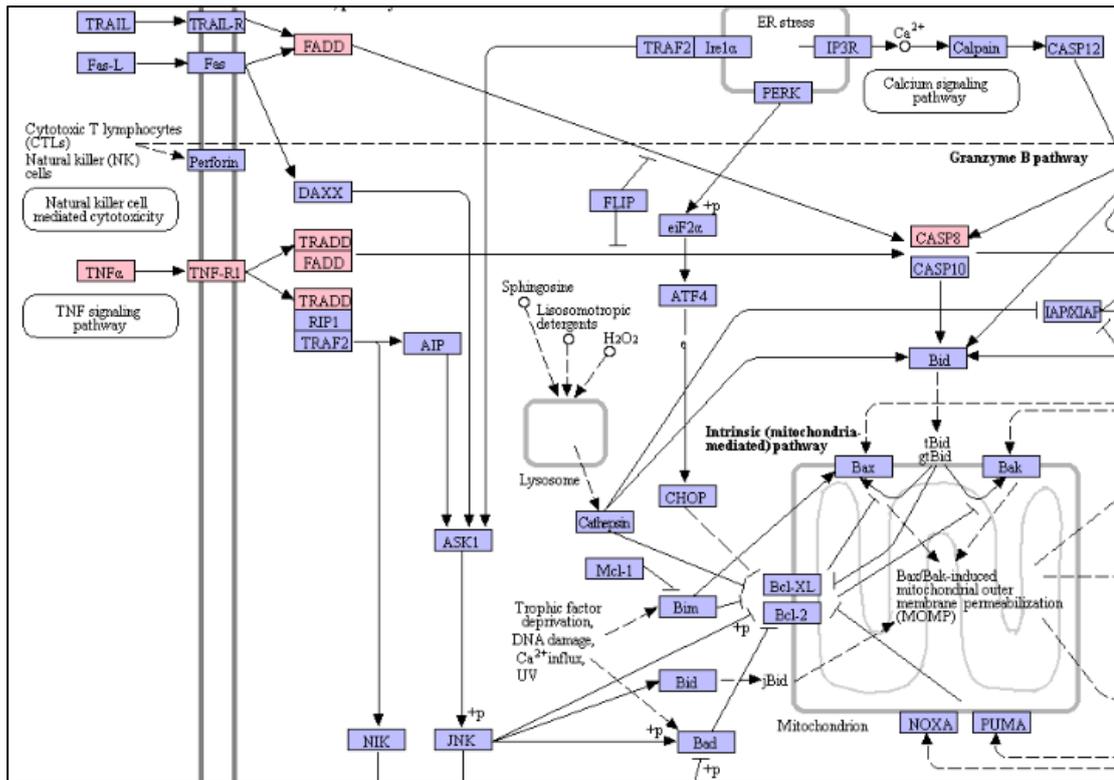
Gambar 1. Prediksi Pathway TNFR1

Gambar 1. menunjukkan bahwa pathway TNF dapat melalui beberapa pathway seperti IKKKB, TRAF2, TNFRSF1A. Hal ini sesuai dengan pendapat Wajant dan Siegmund (2019) bahwa TNF merupakan yang terdiri dari TNFR1 dan TNFR2 merupakan reseptor yang berperan dalam mengendalikan kehidupan dan kematian sel, yang berintegrasi dengan IKKKB dan TNFRSF. Penjelasan ini diperkuat dengan hasil analisis di KEGG (Gambar 2).

KEGG Pathways			
pathway ID	pathway description	count in gene set	false discovery rate
04668	TNF signaling pathway	11	1.22e-23
04064	NF-kappa B signaling pathway	8	1.32e-15
04210	Apoptosis	8	1.32e-15

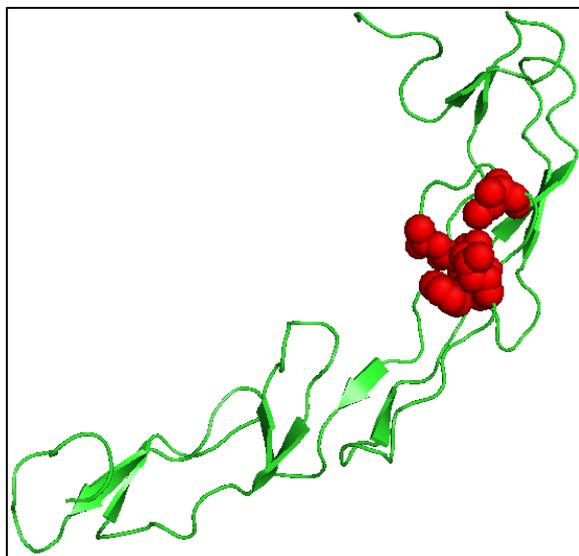
Gambar 2. Prediksi *Pathway* TNFR1 Hasil Analisis STRING (Keterangan: Nilai confidence 0,400 (medium confidence) dan Jumlah protein interaktor adalah 8 protein)

Hasil analisis STRING mempertegas hasil analisis KEGG yang menunjukkan bahwa TNFR1 merupakan reseptor yang berperan pada proses apoptosis. Hal ini sesuai dengan pendapat Hendarto *et al* (2010) yang menyatakan bahwa TNF merupakan sitokin yang berperan dalam apoptosis sel.



Gambar 3. *Pathway* TNF-R1 pada KEGG Menginduksi Mekanisme Apoptosis Melalui Aktivasi Caspase 8.

Setelah dipastikan bahwa TNFR merupakan protein target yang sesuai untuk uji antikanker maka selanjutnya perlu dilakukan analisis untuk mengetahui sisi aktif TNFR1 (ID 04210) yaitu untuk mengetahui asam amino-asam amino yang berikatan dengan ligan (senyawa bioaktif). Tahap ini dilakukan dengan menggunakan fasilitas *COFACTOR server* pada Zhanglab (Roy *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017)



- Keterangan:
- 1.Sisi aktif TNFR1:
Phe60, Thr61, Ala62, Leu67, Leu71
 - 2.Daerah sisi aktif ditunjukkan pada struktur sphere berwarna **merah**

Template proteins with similar binding site:

Click to view	Rank	Cscore ^{LB}	PDB Hit	TM-score	RMSD ^a	IDEN ^a	Cov.	BS-score	Lig. Name	Download Complex	Predicted binding site residues
<input checked="" type="radio"/>	1	0.52	1ft4A	1.000	0.00	1.000	1.000	1.94	7ø3	Download	60,61,62,67,71
<input type="radio"/>	2	0.49	1tnr1	0.834	2.31	0.978	0.957	1.98	111	Download	69,70,71,72,75,77,78,79,80
<input type="radio"/>	3	0.12	1extø	0.749	2.55	0.816	0.907	1.24	111	Download	15,16,17,21,60,69,71,72,77,104,106,107,110
<input type="radio"/>	4	0.05	2aw21	0.596	2.26	0.270	0.714	1.34	111	Download	16,17,18,28,29,31,32,34,37,40,45,46,47,48,49,50,51,52,54,64
<input type="radio"/>	5	0.05	1jmaø	0.570	2.75	0.273	0.700	1.32	111	Download	31,32,34,35,36,37,40,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,89,90,91
<input type="radio"/>	6	0.01	2bgrA	0.428	5.23	0.078	0.829	0.82	UUU	Download	55,59,69,71,72,73

Click on the radio buttons to visualize predicted binding site and residues.

(a) Cscore^{LB} is the confidence score of predicted binding site. Cscore^{LB} values range in between [0-1]; where a higher score indicates a more reliable ligand-binding site prediction.

(b) BS-score is a measure of local similarity (sequence & structure) between template binding site and predicted binding site in the query structure. Based on large scale benchmarking analysis, we have observed that a BS-score >1 reflects a significant local match between the predicted and template binding site.

(c) TM-score is a measure of global structural similarity between query and template protein.

(d) RMSD^a the RMSD between residues that are structurally aligned by TM-align.

(e) IDEN^a is the percentage sequence identity in the structurally aligned region.

(f) Cov. represents the coverage of global structural alignment and is equal to the number of structurally aligned residues divided by length of the query protein.

Gambar 4. Prediksi Sisi Aktif TNFR1

Gambar 4 diatas menunjukkan bahwa sisi aktif dari TNFR1 terletak pada asam amino Phe60, Thr61, Ala62, Leu67, Leu71. Kekuatan ikatan dengan ligan sebesar 0,52 berarti ikatannya sangat kuat karena ikatan antara protein target-ligan dikatakan kuat apabila mempunyai nilai antara 0-1. Nilai BS (Binding Site) lebih besar dari 1,94 yang berarti mempunyai tingkat akurasi tinggi. Nilai TM (template modelling) sebesar 1, nilai RMSD (Root Mean Square Deviation) sebesar 0 dan secara structural teridentifikasi secara jelas. Hal ini sesuai pendapat Wilks (2010) yang menyatakan bahwa protein target dan ligan akan berikatan kuat apabila mempunyai nilai CS antara 0-1, nilai BS lebih besar dari 1, nilai TM lebih besar dari 0,5. RMSD adalah parameter yang digunakan untuk melihat kemiripan antara ligan hasil docking dengan hasil kristalografi. Validasi metode docking dilakukan dengan DOCK6 menggunakan dua metode interaksi yaitu metode fleksibel dan metode rigid. Menurut Sigal *et al.*, 2015, Semakin kecil nilai RMSD menunjukkan bahwa posisi ligan yang diperkirakan semakin baik karena semakin mendekati konformasi asal (Dany *et al.*, 2013).

D. KESIMPULAN

Penentuan protein target merupakan salah satu tahap penting dalam uji *in silico*, selain struktur 3D senyawa bioaktif/ligan. Oleh karena itu harus dilakukan beberapa tahap uji untuk memastikan bahwa protein target yang digunakan benar-benar memenuhi syarat dan ketentuan yang berlaku yaitu nilai CS antara 0-1, nilai BS lebih besar dari 1, nilai TM lebih besar dari 0,5 dan nilai RMSD kecil. TNFR1 sebagai protein target telah memenuhi syarat dan ketentuan yaitu nilai CS sebesar 0,52, nilai BS lebih besar dari 1,94, nilai TM sebesar 1, dan nilai RMSD sebesar 0.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih yang tak terhingga kami sampaikan kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Pada Masyarakat (DRPM) atas kesempatan dan dukungan materiil yang telah diberikan kepada tim peneliti kami.

DAFTAR PUSTAKA

- BBPADI (Balai Besar Penelitian tanaman Padi). 2020. *Padi Hitam Kaya Manfaat*. <http://bbpadi.litbang.pertanian.go.id/index.php/info-berita/info-teknologi/padi-hitam-jeliteng-kaya-manfaat> diakses tanggal 18 Agustus 2020.
- CCRC. 2016. *Mekanisme dan Regulasi Apoptosis*. <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id>. Diakses tanggal 15 Oktober 2016.
- Caro, G.P., S. Watanabe, A. Crozier, T. Fujimura dan T. Yokota. 2013. Phytochemical Profile of a Japanese Black-purple Rice. *Food Chemistry*. Vol.141 (7): 2821-2827
- Chen, X.Q., N. Nagao, T. Itani dan K. Irifune. 2012. Anti-oxidative Analysis, and Identification and Quantification of Anthocyanin Pigments in Different Coloured Rice. *Food Chemistry*. Vol.135 (6): 2783-2788.
- Faustman, D. dan M. Davis. 2010. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nature*. Vol.9.
- Kim, O.S., 2005, Radical Scavenging Capacity and Antioxidant Activity of The Vitamin Fraction In rice bran. *J Food Sci.* (3): 208-213.
- Xia, X., W. Ling, J. Ma, M. Xia, M. Hou and Q. Wang. 2006. An Anthocyanin-rich Extract from Black Rice Enhances Atherosclerotic Plaque Stabilization in Apolipoprotein E Deficient Mice. *The Journal of Nutrition*. Vol.136 (6): 2220-2225.
- Wang, Q., M. Xia, C. Liu, H. Guo, Q. Hu, Y. Zhang, M. Hou, H. Zhu, J. Ma and W. Ling. 2007. Cyanidin-3-O- β -glucoside Inhibits iNOS and COX-2 Expression by Inducing Liver X Receptor Alpha Activation in THP-1 Macrophages. *Life Science*. Vol.83 (9); 176-184.
- Zawistowski, J., A. Kopec dan D.D. Kitts. 2009. Effect of a Black Rice Extract (*Oryza sativa* L.) on Cholesterol Levels and Plasma Lipid Parameters in Wistar Kyoto Rats. *Journal of Functional Foods*. Vol.I (7): 50-56.
- Yang, Y., M.C. Andrews, Y. Hu, D. Wang, Y. Qin dan Y. Zhu. 2011. Anthocyanin Extract from Black Rice Significantly Ameliorates Platelet hyperactivity and Hypertriglyceridemia in Dyslipidemic Rats Induced by High Fat Diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol.59 (5): 6759-6764.
- Lu, Y. dan L.Y. Foo. 2008. Polyphenolic Constituents of Black Rice Seed Residue. *Food Chemistry*. Vol.80 (5): 71-76.
- Min, S., S. Ryu dan D. Kim. 2010. Anti-inflammatory Effect of Black Rice, Cyanidin-3-O- β -glycoside, and Its Metabolites, Cyanidin and Protocatechuic Acid. *International Immunopharmacology*. Vol.10 (7): 959-966.
- Nontasan, S., A. Moongngarm and S. Deeseenthum. 2012. Application Of Functional Colorant Prepared from Black Rice Bran in Yogurt. *Asia-Pacific Chemical, Biological & Environmental Engineering Society*. Vol.2 (6): 62.

- Hendarto H, Prabowo P, Moeloek FA and Soetjipto S. 2010. Growth differentiation factor-9 concentration in the follicular fluid of infertile women with endometriosis. *Fertility and Sterility*. Vol. 94(2):758-60.
- Hou, Z., P. Qin, Y. Zhang, S. Cui and G. Ren. 2013. Identification of Anthocyanins Isolated from Black Rice (*Oryza sativa* L.) and Their degradation Kinetics. *Food Research International*. Vol.50 (8): 691-697.
- Hartati, F.K., Simon, B.W., Tri Dewanti, M., dan M. Rifa'I (2017). Antioxidant Activity And Immunomodulator Of Indonesia Black Rice (*Oryza sativa* L. *indica*) Extract. *Journal of Global Pharma Technology*. Vol. 8(9):176-182.
- Hartati, F.K., Simon, B.W., Tri Dewanti, M., dan M. Rifa'I (2017). Anti-Inflammatory Evaluation of Black Rice against TNF- α , IFN- γ and IL-6 Cytokines Produced by Immunocompetent Cells. *Food and Agricultural Immunology*. Vol.28(6): 1116-1125.
- Singh, I., & Mishra, S. (2018). Molecular docking analysis of Pyrimethamine derivatives with Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase. *Bioinformation*. Vol.14(5), 232.
- Wilks, D. S. (2010). "Sampling distributions of the Brier score and Brier skill score under serial dependence". *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*. Vol.136 (1): 2109–2118. [doi:10.1002/qj.709](https://doi.org/10.1002/qj.709).