

**PENGARUH EKSTRAK BATANG BENALU MANGGA (*Dendrophthoe
pentandra*) TERHADAP PENINGKATAN JUMLAH SEL KANKER
SERVIKS (SEL HELA) YANG MENGANDUNG
PROTEIN CASPASE-3 AKTIF**

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum



Oleh :

Zakiya Zulaifah
NIM 0910710140

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
2013**



LEMBAR PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PENGARUH EKSTRAK BATANG BENALU MANGGA (*Dendrophthoe pentandra*) TERHADAP PENINGKATAN JUMLAH SEL KANKER SERVIKS (SEL HELA) YANG MENGANDUNG PROTEIN CASPASE-3 AKTIF

Oleh :

Zakiya Zulaifah

NIM 0910710140

Telah diuji pada:

Hari :

Tanggal : 20 Februari 2013

Dan dinyatakan LULUS oleh:

Penguji I

Dr. dr. I Ketut Gede Muliarta, Sp.PA

NIK 090347226

Penguji II/ Pembimbing I

Penguji III /Pembimbing II

Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS
NIP 19500525 198002 1 001

Dr. Drg. Nur Permatasari, MS
NIP 19601005 199103 2 001

Mengetahui:

Ketua Jurusan Kedokteran

Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu S., DTM&H., MSc., Sp.Park(K)
NIP. 195204101980021001

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Puji dan syukur kami panjatkan kepada Allah *Subhanahu wa Ta'ala* yang telah memberikan kemudahan sehingga tugas akhir yang berjudul “ Pengaruh Ekstrak Batang Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) Terhadap Peningkatan Jumlah Sel Kanker Serviks (Sel Hela) yang Mengandung Protein Caspase-3 Aktif” ini dapat diselesaikan dengan baik.

Penulis juga mengucapkan terima kasih banyak kepada segenap pihak yang telah membantu penulis dalam pengerjaan penelitian dan penyusunan tugas akhir ini:

1. Dr. dr. Karyono M, SpPA, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu S., DTM&H., MSc., Sp.Park(K) selaku Ketua Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS selaku dosen pembimbing pertama atas segala masukan, bimbingan, dan bantuan yang diberikan selama penulisan tugas akhir ini.
4. Dr. drg. Nur Permatasari, MS selaku dosen pembimbing kedua atas segala masukan, bimbingan, dan bantuan yang diberikan selama penulisan tugas akhir ini.
5. Dr. dr. I Ketut Gede Muliarta, Sp.PA selaku penguji ujian tugas akhir atas bimbingan, masukan, dan bantuan selama penulisan tugas akhir ini.
6. Ayah saya Samsudin dan ibu saya Riyastiti karena selalu memberi *support* hingga saat ini.

7. Kakak tingkat saya Efriko Septananda S., Nur Hidayati Azhar, dan Gamal yang telah memberikan ide judul untuk tugas akhir ini.

8. Mbak Fitri yang dengan sabar membantu dalam setiap proses pengerjaan penelitian ini, Pak Satuman atas antibodi caspase-3 nya, Pak Wibi dan Mbak Ami atas bimbingan dan bantuannya ketika di laboratorium biokimia, Mas Mijan atas bantuannya dalam pengambilan foto sel, serta semua staf biomedik dan biokimia yang telah membantu saya.

9. Teman seperjuangan saya, Aprillia Eka Very Rachmawati atas segala bantuan dan dukungannya dalam mengerjakan tugas akhir ini dari awal hingga akhir.

10. Semua teman – teman dan berbagai pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan dalam mengerjakan tugas akhir ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu, penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun.

Akhirnya, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan, Amin.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Malang, 20 Februari 2013

Penulis

ABSTRAK

Zulaifah, Zakiya. 2013. **Pengaruh Ekstrak Batang Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) terhadap Peningkatan Jumlah Sel Kanker Serviks (Sel HeLa) yang mengandung Protein Caspase-3 Aktif**. Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1). Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS., (2) Dr. drg. Nur Permatasari, MS.

Latar belakang: Kanker serviks merupakan jenis kanker paling umum kedua serta penyebab kematian urutan keempat dari seluruh kasus kanker pada wanita. Terapi kanker serviks yang telah dilakukan selama ini seperti pembedahan, kemoterapi, dan radioterapi masih banyak menimbulkan efek samping. Benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) memiliki kandungan kuersetin sebesar 39,8 mg/g. Berbagai penelitian telah melaporkan bahwa kuersetin memiliki berbagai macam efek antitumor. Kuersetin mampu menginduksi apoptosis pada berbagai macam sel kanker. Kuersetin dapat menginduksi apoptosis melalui peningkatan ekspresi protein pro apoptosis Bax, menurunkan level protein anti apoptosis Bcl-2, serta meningkatkan level caspase-3 aktif. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak batang benalu mangga terhadap protein caspase-3 aktif, protein yang bertindak sebagai eksekutor apoptosis, pada sel kanker serviks. **Alat bahan dan cara kerja:** Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel HeLa, *cell line* kanker serviks. Sel HeLa dibagi menjadi 4 kelompok dan diberi perlakuan berbeda, yaitu kontrol, dosis 50 µg/ml, 100 µg/ml, dan 200 µg/ml, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Pengecatan imunohistokimia dilakukan untuk mengobservasi adanya caspase-3 aktif di dalam sel. Antibodi yang digunakan adalah antibodi caspase-3 aktif, yang mengenali subunit 27 hasil dari pemecahan caspase-3. Pengecatan dilakukan dalam dua hari. Pada hari pertama sel di-*blocking* dengan campuran *fetal bovine serum* (FBS), 0.25% *Triton X-100*, dan *phosphate buffer saline* (PBS). Kemudian diberi antibodi primer dan diinkubasi selama semalam. Keesokan harinya sel di-*blocking* dengan H_2O_2 , diberi antibodi sekunder, kemudian dilakukan *counterstaining* dan diberi 3,3'-*Diaminobenzidine* (DAB). Setelah itu sel didehidrasi, dibersihkan, dan dilakukan mounting. Sel HeLa diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x sebanyak 5 lapang pandang. Sel yang mengandung caspase-3 aktif, yaitu yang berwarna kecokelatan, dihitung dan dilakukan analisa data. **Hasil:** terdapat korelasi positif antara paparan ekstrak batang benalu mangga terhadap jumlah sel HeLa yang mengandung caspase-3 aktif. **Kesimpulan:** ekstrak batang benalu mangga dapat meningkatkan jumlah sel HeLa yang mengandung caspase-3 aktif.

Kata kunci: *benalu mangga, kanker serviks, sel HeLa, caspase-3 aktif*

ABSTRACT

Zulaifah, Zakiya. 2013. **The Effect of Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) Stem Extract on the Increase of the Number of Cervical Cancer Cell (Hela Cell) containing Activated Caspase-3.** Final Assignment, Medicine Faculty, UB. Supervisor: (1). Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS., (2) Dr. drg. Nur Permatasari, MS.

Background: Cervical cancer is the second most common type of cancer and the fourth leading cause of death from all cancers in women. Treatments of cervical cancer that has been done so far include surgical therapy, chemotherapy, radiotherapy and palliative therapy. However, these therapies often cause a lot of side effects. Benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) contains 39.8 mg/g quercetin. Various studies have reported that quercetin has a wide range of antitumor effects. Quercetin increases apoptosis in various cancer cell types. Quercetin can induce apoptosis by increasing the expression of pro-apoptotic Bax protein, lowering levels of anti-apoptotic protein Bcl-2, and increasing the level of activated caspase-3. The purpose of this study was to determine the effect of the benalu mangga stem extract on the activated caspase-3 protein, a protein that acts as an executor of apoptosis, in cervical cancer cells. **Materials and methods:** Subjects used in this study were HeLa cells, cervical cancer *cell line*. HeLa cells were divided into 4 groups and given different treatments, namely control, dose 50 µg/ml, 100 µg/ml, and 200 µg/ml. Immunohistochemical staining performed to observe the presence of active caspase-3. Antibodies used was activated caspase-3 antibody, which recognizes subunit 17 results from the cleavage of caspase-3. Staining was done in two days. On the first day the cells were blocked with a mixture of *fetal bovine serum* (FBS), 0.25% *Triton X-100*, and *phosphate buffered saline* (PBS). Then given primary antibody and incubated overnight. The next day the cells were blocked with H₂O₂, given the secondary antibody, and counterstaining was performed with *mayer hematoxilen*. After that the cells were given 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) and then dehydrated, cleaned, and mounted. HeLa cells were observed using a microscope with a magnification of 400x in 5 field of view. Cells containing activated caspase-3, which were colored brown, were calculated and analyzed. **Result:** There was a positive correlation between exposure of benalu mangga stem extract on the number of HeLa cells containing activated caspase-3. **Conclusion:** Benalu mangga stem extract can increase the number of HeLa cells containing activated caspase-3.

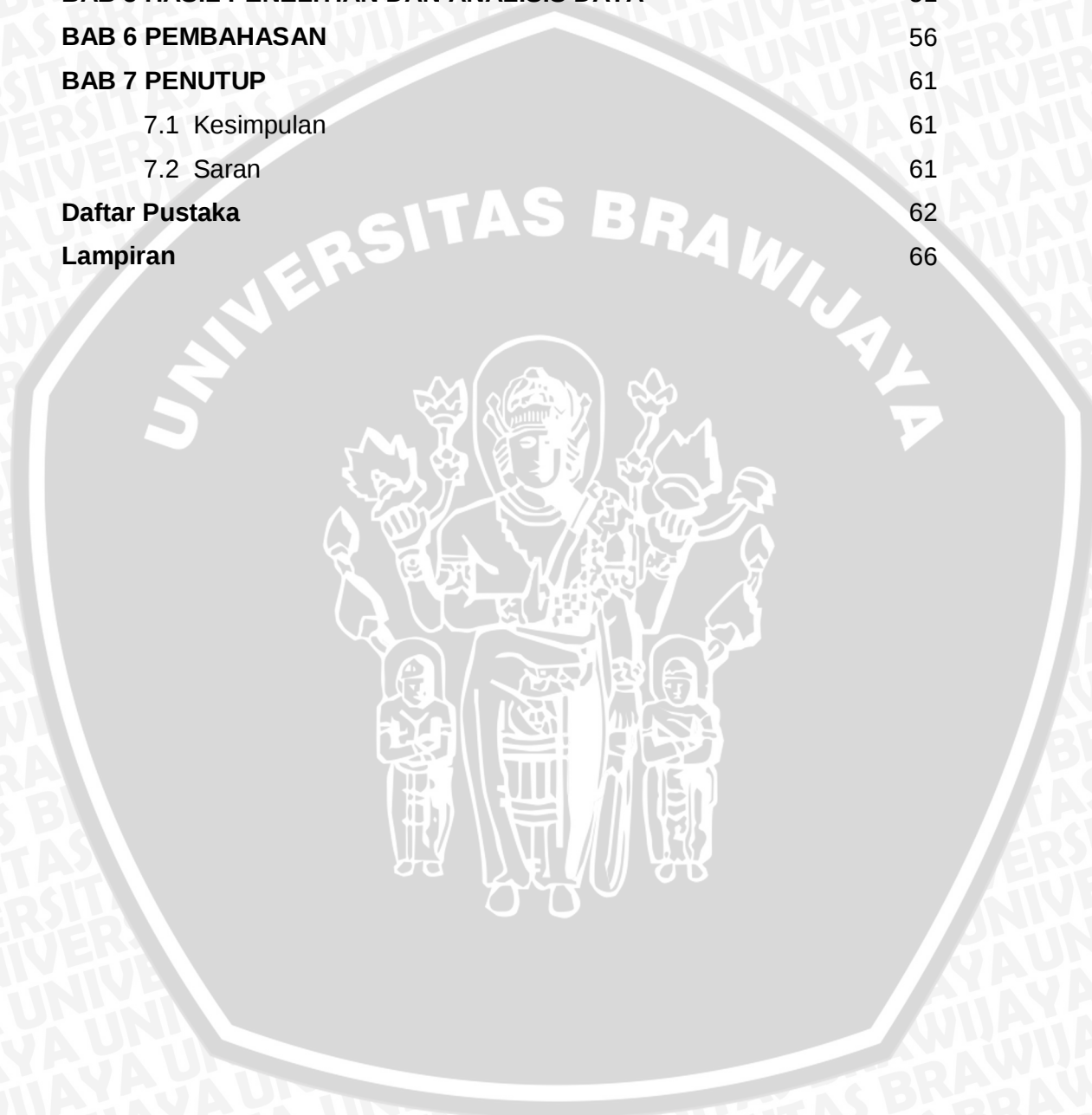
Keywords: *benalu mangga, cervical cancer, HeLa cells, activated caspase-3*

DAFTAR ISI

Judul	i
Lembar Pengesahan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	v
Daftar Isi	vii
Daftar Tabel	x
Daftar Gambar	xi
Daftar Lampiran	xii
Daftar Singkatan	xiii
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1. Latar Belakang	4
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3. 1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	 6
2.1. Kanker	6
2.1.1 Definisi Kanker	6
2.1.2 Jenis Kanker	6
2.1.3 Karsinogenesis	7
2.1.4 Metastasis	9
2.1.5 Angiogenesis	9
2.2. Kanker serviks	10
2.2.1 Definisi	10
2.2.2 Etiologi	10
2.2.3 Faktor Risiko	11
2.2.4 Patogenesis	12
2.2.5 Patofisiologi	15

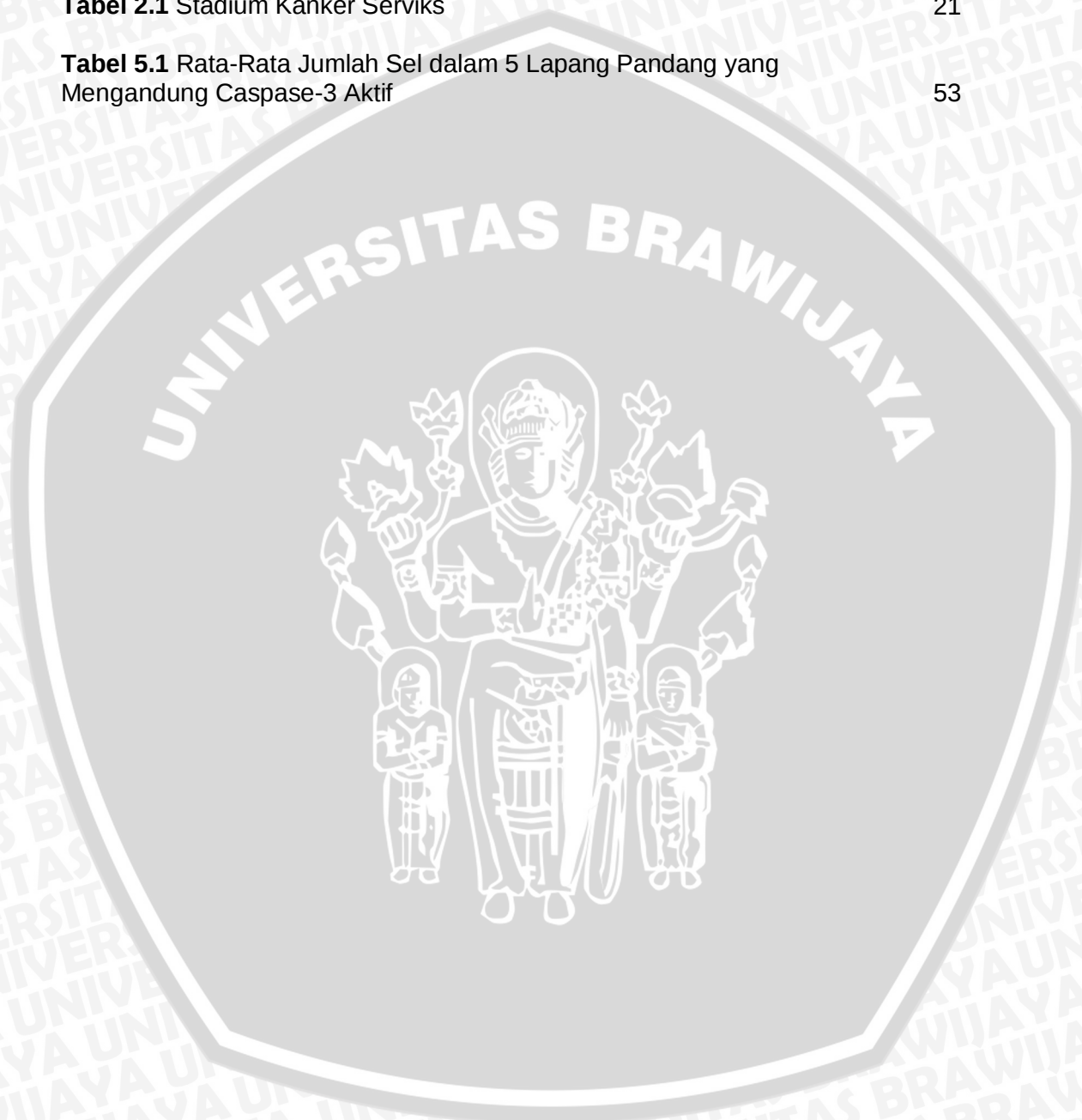
2.2.6 Manifestasi Klinis	16
2.2.7 Diagnosis	16
2.2.8 Stadium Kanker Serviks	18
2.2.9 Terapi	21
2.2.10 Pencegahan	23
2.3. Apoptosis	23
2.4. Caspase-3	26
2.5. Benalu Mangga (<i>Dendrophthoe pentandra</i>) L.Miq	29
2.5.1 Klasifikasi dan Karakterisasi Benalu Mangga	29
2.5.2 Kandungan Senyawa Benalu Mangga	31
2.6. Kuersetin	31
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	35
3.1. Kerangka Konsep	35
3.2. Hipotesis Penelitian	37
BAB 4 METODE PENELITIAN	38
4.1. Desain Penelitian	38
4.2. Subjek dan Sampel Penelitian	38
4.3. Variabel dan Definisi Operasional	39
4.3.1 Variabel penelitian	39
4.3.2 Definisi Operasional	39
4.4. Waktu dan Tempat Penelitian	41
4.5. Alat dan Bahan	41
4.5.1 Peralatan dan Bahan Kultur Sel HeLa	41
4.5.2 Peralatan dan Bahan Ekstrak Etanol Batang Benalu Mangga	41
4.5.3 Peralatan dan Bahan Imunohistokimia	41
4.6 Cara Kerja	42
4.6.1 Kultur Sel HeLa	42
4.6.2 Ekstrak Etanol 80 % Batang Benalu Mangga	44
4.6.3 Pembuatan Sediaan Benalu Mangga	45
4.6.4 Perlakuan dan Kontrol	46

4.6.5 Pengecatan Imunohistokimia	47
4.7 Analisa Data	49
4.8 Alur Penelitian	50
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	51
BAB 6 PEMBAHASAN	56
BAB 7 PENUTUP	61
7.1 Kesimpulan	61
7.2 Saran	61
Daftar Pustaka	62
Lampiran	66



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Stadium Kanker Serviks	21
Tabel 5.1 Rata-Rata Jumlah Sel dalam 5 Lapang Pandang yang Mengandung Caspase-3 Aktif	53



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Mikroanatomi Displasia	15
Gambar 2.2. Jalur Apoptosis	26
Gambar 2.3 Caspase-3	26
Gambar 2.4 Tanaman Benalu Mangga (<i>Dendrophthoe pentandra</i>)	29
Gambar 2.5 Senyawa Kuersetin	31
Gambar 2.6 Siklus Sel	33
Gambar 4.1 Kultur Sel HeLa	40
Gambar 5.1. Pengecatan Imunohistokimia pada Sel HeLa Setelah Perlakuan	52
Gambar 5.2 Diagram Rata-Rata Jumlah Sel dalam 5 Lapang Pandang yang Mengandung Caspase-3 Aktif	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil perhitungan sel	66
Lampiran 2 Uji normalitas <i>Shapiro-wilk</i>	67
Lampiran 3 Uji homogenitas varians	68
Lampiran 4 Uji <i>One-way Anova</i>	69
Lampiran 5 Uji <i>Post Hoc Multiple comparison (Tukey HSD)</i>	70
Lampiran 6 Uji korelasi <i>Pearson</i>	71
Lampiran 7 Uji homogenitas subset	72
Lampiran 8 Keterangan Identifikasi	73
Lampiran 9 Pernyataan Keaslian Tulisan	74



DAFTAR SINGKATAN

APAF-1	: Apoptotic protease activating factor-1
Bax	: Bcl-2 Antagonist X
Caspase-3	: CysteinyI aspartate-specific protease
DAB	: 3,3'-diaminobenzidine
FBS	: Fetal bovine serum
PBS	: Phosphate buffer saline
RPMI	: Roswell park memorial institute
SA-HRP	: Streptavidin-horseradish peroxidase



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker menjadi penyebab utama kematian di seluruh dunia. WHO memperkirakan bahwa terdapat 84 juta orang akan meninggal antara tahun 2005 sampai 2015 karena kanker. Kanker serviks merupakan jenis kanker tersering kedua dan penyebab kematian urutan keempat dari seluruh kasus kanker pada wanita. Pada tahun 2008, terdapat 7493 kematian disebabkan kanker serviks (WHO, 2010). Sekitar 86% kasus kanker serviks terjadi di negara berkembang. Di Indonesia, kanker serviks menjadi penyebab kanker ketiga terbanyak setelah kanker payudara dan kanker kolorektal.

Kanker serviks merupakan kanker yang dipicu oleh infeksi dari *human papilloma virus* (HPV). Onkoprotein E6 dan E7 dari HPV meregulasi siklus pertumbuhan sel hospes dengan mengikat protein p53 dan Retinoblastoma (Rb) (Gómez and Santos, 2007). Jalur P53 sangat penting dalam menjaga kestabilan genom sel, karena merupakan penjaga gerbang program *senescence* dan apoptosis. P53 menginduksi apoptosis pada sel yang mengalami kerusakan genetik melalui peningkatan transkripsi dari anggota pro apoptosis famili Bcl-2, Bax (Feng *et al.*, 2007; Dewson and Cluck, 2010).

Ikatan E6 menyebabkan mutasi gen pengekspresi protein P53 sehingga aktivitas normal P53 yang memerintahkan sel untuk masuk ke dalam fase G1 *arrest*, perbaikan DNA, dan apoptosis dihambat (Gómez and Santos, 2007). Mutasi P53 berakibat pada peningkatan kecepatan proliferasi dan ketidakstabilan

genom. Konsekuensinya, sel hospes mengakumulasi lebih banyak kerusakan DNA yang tidak dapat diperbaiki, yang dapat berubah menjadi sel kanker.

Terapi kanker serviks selama ini berupa terapi bedah, kemoterapi, radioterapi dan terapi paliatif. Seringkali terapi tersebut banyak menimbulkan efek samping, misal kemoterapi menyebabkan mual, muntah, rambut rontok dan radioterapi bahkan dapat menghasilkan kanker baru karena efek mutasinya terhadap sel-sel lain (Martin-Hirsch dan Wood, 2011). Selain itu, biaya yang besar juga harus dikeluarkan untuk melakukan terapi (Tim Kanker-Serviks.net, 2010). Di Indonesia dan di dunia, kemoterapi golongan sisplatin telah menjadi terapi standar pada kanker serviks uteri stadium lanjut lokal, namun pemberiannya sangat tergantung pada fungsi ginjal. Pengamatan di klinik menunjukkan bahwa banyak pasien kanker serviks stadium lanjut lokal yang mendapat terapi, terhenti pada 1-3 siklus dari 5 siklus yang direncanakan, akibat penurunan fungsi ginjal (Sekarumuti, 2010). Oleh karena itu, masih dibutuhkan pengobatan yang tepat untuk mengurangi morbiditas dan mortalitas akibat kanker serviks.

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa kuersetin merupakan salah satu golongan flavonoid yang memiliki efek antiproliferatif dan mampu menginduksi kematian sel melalui mekanisme apoptosis pada berbagai macam kanker. Kuerstin dapat menurunkan ekspresi protein P53 mutan dan meningkatkan ekspresi protein P53 normal (Avila *et al.*, 1994; Kuo, 2004). Kuersetin juga dapat meningkatkan ekspresi protein pro apoptosis Bax, mengurangi protein anti apoptosis Bcl-2, meningkatkan ekspresi caspase-3 aktif dan caspase-9, melepaskan sitokrom c, mengeblok siklus sel, serta

mengakibatkan fragmentasi DNA pada berbagai jenis sel kanker (Ting-xiu *et al.*, 2006; Granado-Serrano, *et al.*, 2006).

Avila *et al* (1994) melaporkan kuersetin tampak hanya mengintervensi sel secara spesifik pada jalur protein P53 mutan, bukan mengganggu sintesis protein secara umum. Beberapa penelitian juga menyebutkan bahwa selama *human clinical trial* dilakukan, tidak terdapat efek samping yang signifikan hingga mencapai dosis 1000 mg per hari dengan pemberian secara peroral (Gibellini *et al.*, 2011).

Di Indonesia ada berbagai jenis spesies benalu. Masyarakat pada umumnya hanya menganggap benalu sebagai tumbuhan inang yang tumbuh pada beberapa tanaman, seperti teh, duku, mangga, belimbing, benalu dan lain-lain. Benalu merupakan tumbuhan parasit yang belum banyak dimanfaatkan oleh masyarakat umum. Di sisi lain, benalu kaya akan senyawa flavonoid, tannin dan asam amino (Ikawati, 2008). Kuersetin merupakan golongan flavonoid yang paling banyak diisolasi dari benalu, terutama spesies *Dendrophthoe pentandra*, yaitu sebesar 39,8 mg/g (Rosidah, 1999). Penelitian yang dilakukan oleh Saifillah (2010) menunjukkan bahwa ekstrak batang benalu randhu, benalu yang merupakan satu spesies yang sama dengan benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) namun berbeda inang, dapat menurunkan ekspresi protein P53 mutan pada sel kanker serviks (sel HeLa). Ekstrak benalu, baik dari kepel, kedondong, srikaya, dan teh, tidak bersifat toksik karena semua mempunyai $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ (Artanti dkk., 2009). Oleh sebab itu, ekstrak benalu cenderung bersifat aman untuk dikonsumsi.

Berdasarkan hal diatas, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak batang benalu mangga terhadap caspase-3 aktif, protein

eksekutor apoptosis, pada sel kanker serviks (sel HeLa). Dengan demikian, diharapkan penelitian ini nantinya mampu mengusulkan modalitas terapi kanker serviks yang efektif dan murah dengan memanfaatkan bahan dari alam yang sebelumnya dianggap tidak berguna.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak batang benalu mangga mampu meningkatkan jumlah sel HeLa yang mengandung protein caspase-3 aktif?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak batang benalu mangga terhadap peningkatan jumlah sel HeLa yang mengandung protein caspase-3 aktif.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menghitung dan membandingkan jumlah sel yang mengandung caspase-3 aktif dan tidak pada empat perlakuan yang berbeda.
2. Mengetahui hubungan antara dosis ekstrak batang benalu mangga dengan jumlah sel HeLa yang mengandung caspase-3 aktif.

1.4 Manfaat penelitian

1. Meningkatkan khasanah ilmu pengetahuan dalam pemanfaatan batang benalu mangga dalam bentuk ekstrak sebagai modalitas terapi kanker serviks berbasis alam yang lebih terjangkau.

2. Memberikan informasi di kalangan perindustrian obat tentang ekstrak batang benalu mangga sebagai modalitas terapi kanker serviks berbasis alam yang mungkin di masa mendatang dapat meningkatkan ragam produksi obat regenerasi yang alami.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker

2.1.1 Definisi Kanker

Kanker adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal. Sel-sel kanker akan berkembang dengan cepat, tidak terkendali, dan akan terus membelah diri, selanjutnya menyusup ke jaringan sekitarnya (*invasive*) dan terus menyebar melalui jaringan ikat, darah, dan menyerang organ-organ penting serta syaraf tulang belakang. Dalam keadaan normal, sel hanya akan membelah diri jika ada penggantian sel-sel yang telah mati dan rusak. Sebaliknya sel kanker akan membelah terus meskipun tubuh tidak memerlukannya, sehingga akan terjadi penumpukan sel baru yang disebut tumor ganas. Penumpukan sel tersebut mendesak dan merusak jaringan normal, sehingga mengganggu organ yang ditempatinya. Kanker dapat terjadi diberbagai jaringan dalam berbagai organ di setiap tubuh, mulai dari kaki sampai kepala (Tadjoedin, 2011). Tumor berbeda dengan kanker. Dalam onkologi, tumor dibagi menjadi dua yaitu tumor jinak dan tumor ganas. Tumor ganas inilah yang disebut dengan kanker. Kanker dapat menyebar ke tempat yang jauh sedangkan tumor jinak tidak dapat (Robbins, 2007).

2.1.2 Jenis Kanker

Jenis-jenis kanker yang telah dikenal saat ini yaitu :

1. Karsinoma : Yaitu jenis kanker yang berasal dari sel yang melapisi permukaan tubuh atau permukaan saluran tubuh, misalnya jaringan

seperti sel kulit, testis, ovarium, kelenjar mucus, sel melanin, payudara, leher rahim, kolon, rectum, lambung, pancreas, dan esofagus.

2. Limfoma : Yaitu jenis kanker yang berasal dari jaringan yang membentuk darah, misalnya jaringan limfe, lacteal, limfa, berbagai kelenjar limfe, timus, dan sumsum tulang. Limfoma spesifik antara lain adalah penyakit Hodgkin (kanker kelenjar limfe dan limfa).
 3. Leukemia : Kanker jenis ini tidak membentuk massa tumor, tetapi memenuhi pembuluh darah dan mengganggu fungsi sel darah normal.
 4. Sarkoma : Yaitu jenis kanker dimana jaringan penunjang yang berada dipermukaan tubuh seperti jaringan ikat, termasuk sel - sel yang ditemukan di otot dan tulang.
 5. Glioma : Yaitu kanker susunan syaraf, misalnya sel-sel glia (jaringan penunjang) di susunan saraf pusat.
 6. Karsinoma in situ : Yaitu istilah yang digunakan untuk menjelaskan sel epitel abnormal yang masih terbatas di daerah tertentu sehingga masih dianggap lesi prainvasif (kelainan/luka yang belum menyebar).
- (Tadjoedin, 2011)

2.1.3 Karsinogenesis

Perkembangan kanker telah dijelaskan menjadi proses multistep. Konsep multistep pertamakali diperkenalkan oleh Berenblum dan Schubik pada tahun 1948. Sedangkan pada tahun 2000 , secara onkologi, karsinogenesis dibagi menjadi tiga tahap :

1. Inisiasi : Inisiasi neoplasia (tumor) merupakan perubahan sel yang ireversibel. Istilah yang paling mudah, inisiasi melibatkan perubahan

seluler dengan stabil satu atau lebih yang diinduksi oleh pajanan karsinogen. Tahap inilah yang dianggap sebagai tahap awal karsinogenesis, saat genom sel mengalami mutasi sehingga menyebabkan perkembangan neoplasia (UNSCEAR, 1993; Cox, 1994). *Sequence* DNA yang bertanggung jawab untuk transformasi disebut *oncogen*. Setiap *oncogen* berhubungan dekat dengan *sequence* DNA di dalam genom seluler, *proto-oncogen* (UNSCEAR, 2000).

2. Promosi : Sel inisiasi yang telah mengalami transformasi dapat tidak berbahaya untuk sementara waktu, hingga suatu saat sel distimulasi untuk berproliferasi sehingga mengganggu keseimbangan seluler. Perubahan sel inisiasi yang berkelanjutan yang menyebabkan transformasi neoplasia dapat melibatkan lebih dari satu tahap dan membutuhkan pajanan yang berulang kali dan berkepanjangan terhadap promosi stimulus. Perkembangan neoplasia dipengaruhi oleh lingkungan intraseluler dan ekstraseluler. Ekspresi mutasi awal tidak hanya tergantung pada interaksi dengan mutasi *oncogenic* lain tapi juga pada faktor yang dapat mengubah pola ekspresi gen spesifik, seperti sitokin, metabolit lemak dan phorbol ester tertentu (UNSCEAR, 1993).
3. Progresi : merupakan perubahan sukses dalam neoplasma sehingga mencapai keganasan. Mekanisme molekuler dari progresi tumor tidak sepenuhnya dapat dijelaskan, namun mutasi dan perubahan kromosom mungkin dapat terlibat. Proliferasi sel inisiasi meningkatkan pertumbuhan dari ukuran tumor. Karena ukuran tumor yang terus

tumbuh, sel mengalami mutasi berkelanjutan, mengakibatkan bertambahnya heterogenitas populasi sel (Devi, 2001).

2.1.4 Metastasis

Karena progresi semakin meningkat, sel kehilangan properti perlekatan sehingga terlepas dari massa tumor dan menginvasi jaringan sekitarnya. Sel yang terlepas juga memasuki aliran darah dan limfa dan ditranspor ke organ atau jaringan yang jauh dari tumor primer sehingga berkembang menjadi tumor sekunder di lokasi baru. Metastasis jauh menginisiasi penyebaran kanker semakin meluas. Metastasis kanker terdiri dari sejumlah tahap; tahap utama adalah umum untuk semua kanker. Perkembangan penyakit neoplasia tergantung pada perubahan yang memfasilitasi : (a) invasi jaringan lokal yang normal, (b) masuknya dan lewatnya sel neoplasia di dalam sistem vaskular dan limfatik., dan (c) pertumbuhan lebih lanjut dari pertumbuhan tumor sekunder (Hart and Saini,1992; Takeichi, 1993).

2.1.5 Angiogenesis

Pertumbuhan tumor bergantung pada suplai faktor pertumbuhan dan efisiensi hilangnya molekul toksik yang berasal dari suplai darah yang adekuat. Pada tumor solid, efisiensi difusi oksigen dari kapiler terjadi pada radius 150-200 μ m sehingga mengakibatkan sel menjadi toksik dan mati. Oleh karena itu, peningkatan massa tumor lebih dari 1-2 mm akan tergantung pada suplai darah yang adekuat melalui perkembangan kapiler darah (angiogenesis). Schubik adalah yang pertama kali memperkenalkan bentuk 'tumor angiogenesis'. Meskipun pembuluh darah yang menyediakan perkembangan tumor didapatkan

dari vaskularisasi murni, karakteristik pembuluh darah tersebut berbeda dari pembuluh darah jaringan normal. Pembuluh darah tumor sering dilatasi, berbentuk *saccus*, berbelit-belit dan berisi sel tumor yang terdapat di endotel pembuluh darah (Devi, 2001).

2.2 Kanker Serviks

2.2.1 Definisi

Kanker serviks merupakan penyakit di mana sel kanker tumbuh pada serviks, serviks merupakan bagian bawah uterus yang sempit yang menghubungkan uterus dengan vagina. Ia merupakan pintu keluar uterus di mana darah menstruasi dan bayi dilahirkan. Apabila sel terus menerus membelah secara tidak beraturan, akan terbentuk sebuah massa jaringan. Massa ini bernama tumor. Tumor dapat bersifat jinak maupun ganas. Kanker dapat muncul pada sel pipih (karsinoma sel skuamosa) yang melapisi permukaan luar serviks, atau pada sel glandular yang ditemukan pada saluran yang menghubungkannya ke akhir dari rahim (ThirdAge.com, 2012).

2.2.2 Etiologi

Infeksi HPV telah terbukti merupakan proses penting pada terjadinya kanker serviks. Human papillomavirus (HPV) merupakan DNA berantai ganda yang termasuk dalam family Papillomaviridae (Steben and Duarte-Franco, 2007). HPV merupakan virus yang tidak memiliki *envelope* dengan diameter 55nm. HPV memiliki kapsid ikosahedral terdiri dari 72 kapsomer. Genom HPV secara fungsional terbagi menjadi tiga regio. Regio pertama adalah *noncoding upstream regulatory region (URR)*. Regio kedua ialah '*early region*', mencakup gen E1, E2,

E3, E4, E5, E6, E7 dan E8. Regio ini terlibat dalam replikasi virus dan onkogenesis. Ekspresi produk *early gene* menentukan apakah infeksi HPV berupa infeksi aktif atau laten, atau menuju pada transformasi maligna. Regio ketiga ialah '*late region*', yang mengkode protein struktural L1 dan L2 untuk membentuk kapsid virus (Gómez and Santos, 2007).

Lebih dari 100 genotip HPV berbeda telah diisolasi, dan lebih dari 40 dari tipe tersebut dapat menginfeksi epitel dan mukosa pada traktus anogenital serta area lain. Strain HPV dapat diklasifikasikan berdasarkan risiko untuk menyebabkan kanker serviks, yaitu tipe berisiko rendah (seperti HPV-6 dan -11) dan berisiko tinggi (seperti HPV-16 dan -18) (Steben and Duarte-Franco, 2007).

Infeksi HPV saja tidak cukup untuk menimbulkan kanker serviks. Faktor lain tetap harus ada. Masih belum diketahui dengan jelas mengapa infeksi HPV dapat sembuh pada individu tertentu dan berakibat neoplasia serviks intraepitelial pada yang lain. Namun, beberapa faktor telah diduga berperan, meliputi individual susceptibility, status imunitas dan nutrisi, hormon endogen dan eksogen, asap rokok, melahirkan, ko-infeksi dengan agen yang ditularkan secara seksual seperti HIV, herpes simpleks (Steben and Duarte-Franco, 2007).

2.2.3 Faktor risiko

1. Aktivitas seksual
2. Memiliki banyak partner seksual
3. Paparan penyakit menular seksual
4. Hasil pap smear sebelumnya yang abnormal
5. Merokok

6. Ibu atau saudara perempuan dengan kanker serviks
7. Imunosupresi: HIV, pemakaian kortikosteroid jangka panjang
(Blumenthal and McIntosh, 2005).

2.2.4 Patogenesis

Transmisi HPV terjadi melalui kontak kulit – ke - kulit. Jenis sel yang dapat diinfeksi oleh HPV adalah sel basal dari epitel pipih bertingkat, sedangkan sel tipe lain relatif resisten. Replikasi HPV berawal dari masuknya virus ke dalam sel basal epitel. Sekali memasuki sel hospes, HPV DNA bereplikasi hingga mencapai ke permukaan epitel. Pada lapisan basal, replikasi virus kurang produktif, dan virus membentuk dirinya sendiri sebagai sejumlah kecil salinan episom menggunakan mesin replikasi DNA host untuk mensintesis DNA sekitar sekali per siklus sel. Di dalam keratinosit yang telah berdiferensiasi pada lapisan suprabasal epitel, replikasi DNA virus berubah menjadi mode *rolling-circle*, memperbanyak DNA menjadi sejumlah besar salinan, menyintesis protein kapsid, sehingga menghasilkan suatu koloni virus (Gómez and Santos, 2007).

Onkoprotein E6 dan E7 dari HPV berisiko tinggi meregulasi siklus pertumbuhan sel hospes dengan mengikat dan mengaktivasi dua protein supresor tumor, protein p53 dan Retinoblastoma (Rb) (Gómez and Santos, 2007). Jalur p53 dan Rb adalah penjaga gerbang dalam menjaga program *senescence*. Jalur P53 menginduksi *senescence* melalui aktivasi CDKI, p21. *Senescence* merupakan keadaan berhentinya sel untuk melanjutkan pertumbuhan. *Senescence* merupakan mekanisme molekular dasar di mana sel dengan akumulasi mutasi somatik dicegah untuk berkembang menjadi kanker (Feng et al, 2007).

Hal terpenting dari protein P53 ialah kemampuannya dalam menginduksi apoptosis pada sel dengan kerusakan DNA yang tidak dapat diperbaiki dalam fase *checkpoint*. Gangguan pada proses apoptosis dapat menyebabkan sel mengalami progresi tumor dan kemoresisten (Fridwan and Lowe, 2003).

P53 dapat menginduksi apoptosis baik melalui jalur ekstrinsik maupun jalur intrinsik. Famili Bcl-2 merupakan regulator dari apoptosis jalur intrinsik, atau disebut juga jalur mitokondria. P53 mampu mengontrol transkripsi dari anggota proapoptosis famili Bcl-2, Bax (Bcl-2 antagonis x). Bax akan mengalami perubahan konformasi dan asosiasi menjadi oligomer besar yang mampu meningkatkan permeabilitas membran mitokondria dengan membentuk *proteinaceous pore*. Peningkatan permeabilitas membran mitokondria menyebabkan protein proapoptosis sitokrom c dilepaskan dari mitokondria ke sitoplasma. Pada akhirnya sitokrom c mengaktifasi kaskade caspase dan mengakibatkan kematian sel. Protein Bcl-2 merupakan anggota protein anti apoptosis famili Bcl-2. Bcl-2 terletak pada membran mitokondria. Bcl-2 melindungi sel dari apoptosis dengan menjaga integritas membran mitokondria melalui hambatan terhadap homo-oligomerisasi Bax. Perbandingan ekspresi anggota famili Bcl-2 akan menentukan apakah sel akan bertahan atau mengalami apoptosis (Dewson and Cluck, 2010). Ekspresi berlebihan dari Bcl-2 dapat memperpanjang survival dari sel kanker dan membiarkannya mengalami transformasi maligna (Fridwan and Lowe, 2003; Feng *et al.*, 2007).

Selain mengontrol faktor yang berperan pada mitokondria, P53 juga dapat mentransaktivasi beberapa komponen pada *apoptotic effector machinery*. Salah satunya adalah gen yang mengkode Apaf-1 (Kannan *et al.*, 2001; Moroni *et al.*, 2001; Robles *et al.*, 2001 dalam Fridwan and Lowe, 2003), yang berperan

sebagai koaktivator caspase-9 dan membantu menginisiasi kaskade caspase. Hal ini akan mempotensiasi kematian sel yang terjadi melalui jalur intrinsik. P53 juga dapat meningkatkan ekspresi caspase-6, salah satu caspase eksekutor, menyebabkan peningkatan kemosisensitivitas berbagai tipe sel kanker (MacLachlan *et al.*, 2002 dalam Fridwan and Lowe, 2003).

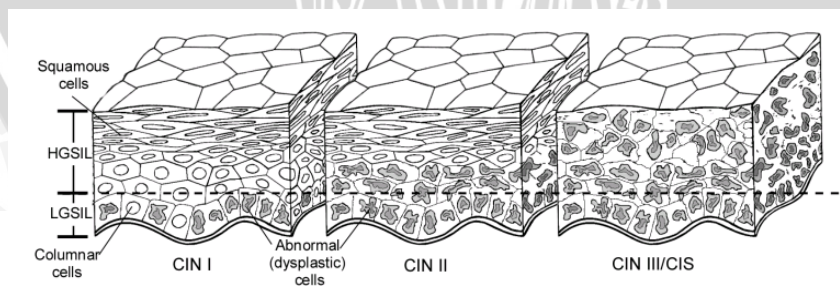
Ikatan dan inaktivasi P53 oleh E6 menyebabkan aktivitas normal P53 yang memerintahkan sel untuk masuk ke dalam fase G1 *arrest*, perbaikan DNA, dan apoptosis dihambat. Sedangkan ikatan onkoprotein E7 dengan Rb mengganggu kompleks antara Rb dan faktor transkripsi selular E2F-1, mengakibatkan pembebasan E2F-1, yang menyebabkan transkripsi gen yang produknya dibutuhkan sel untuk memasuki fase sintesis pada siklus sel. Onkoprotein E7 juga berhubungan dengan protein lain yang berpengaruh pada mitosis sel, seperti siklin. Hasilnya adalah stimulasi sintesis DNA seluler dan proliferasi sel (Gómez and Santos, 2007).

Inaktivasi protein P53 dan Rb berakibat pada peningkatan kecepatan proliferasi dan ketidakstabilan genom. Konsekuensinya, sel hospes mengakumulasi lebih banyak kerusakan DNA yang tidak dapat diperbaiki, yang dapat berkembang menjadi kanker. Selain efek dari onkogen yang teraktivasi dan ketidakstabilan kromosom, mekanisme potensial yang berkontribusi dalam transformasi menjadi sel kanker meliputi metilasi dari DNA virus dan seluler, aktivasi telomer, serta faktor hormonal dan imunogenetik (Gómez and Santos, 2007).

2.2.5 Patofisiologi

Infeksi HPV harus ada dalam terjadinya kanker serviks. Infeksi HPV terjadi pada sejumlah besar wanita yang aktif secara seksual. Namun, 90% dari infeksi HPV akan sembuh dengan sendirinya dalam bulan atau tahun tanpa meninggalkan sisa. Rata-rata, hanya 5% dari infeksi HPV yang berakibat pada perkembangan lesi CIN derajat II atau III (lesi prekursor kanker) dalam 3 tahun infeksi. Hanya 20% dari lesi CIN III yang berkembang menjadi kanker serviks invasif dalam kurun waktu 5 tahun, dan hanya 40% dari lesi CIN III yang berkembang menjadi kanker serviks invasif dalam kurun waktu 30 tahun (Boardman, 2012).

Eksoserviks pada serviks normal dilapisi oleh epitel pipih. Endoserviks yang dilapisi oleh epitel selapis silindris, berada di kanalis serviks dan terlihat pada ostium serviks. Lesi intraepitelial skuamosa berderajat rendah (LGSIL) atau CIN I, memiliki gambaran hampir sepertiga dari epitelnya merupakan sel displasia. Lesi intraepitelial skuamosa berderajat tinggi (HGSIL) atau CIN II dan CIN III/CIS, memiliki gambaran lebih dari sepertiga lapisan epitelnya terdiri dari sel displasia (Blumenthal and McIntosh, 2005).



Gambar 2.1 Mikroanatomi Displasia (Blumenthal and McIntosh, 2005)

Karena hanya sebagian kecil dari infeksi HPV yang berkembang menjadi kanker, faktor lain harus terlibat dalam proses karsinogenesis. Berikut ini merupakan faktor yang mempengaruhi perkembangan lesi CIN III:

- Tipe dan durasi infeksi virus, dengan HPV tipe risiko tinggi dan infeksi persisten memprediksikan risiko yang lebih besar mengalami progresi, HPV tipe risiko rendah tidak menyebabkan kanker serviks
- Kondisi hospes yang memiliki imunitas rendah, seperti status nutrisi yang rendah atau infeksi HIV.
- Faktor lingkungan, seperti merokok dan defisiensi vitamin
- Kesulitan akses skrining sitologi rutin

(Boardman, 2012).

2.2.6 Manifestasi klinis

Manifestasi klinis yang paling sering dan paling penting dari kanker serviks adalah perdarahan vagina ireguler. Manifestasi klinis penting lain meliputi perdarahan saat beraktivitas seksual, meningkatnya sekret vagina, serta nyeri punggung bawah. Pada penyakit yang lebih lanjut, perdarahan terkadang menjadi sangat berat, dan transfusi darah biasanya dilakukan. Perdarahan berat dapat menyebabkan kematian pada pasien usia lanjut (Yoshida *et al.*, 2012).

2.2.7 Diagnosis

Apabila seseorang dicurigai menderita kanker serviks, maka perlu dilakukan pap smear sebagai tes skrining bukan sebagai tes diagnostik. Jika memang dalam pap smear menunjukkan hasil yang abnormal maka harus dilakukan biopsi serviks (American Cancer Society, 2012).

Beberapa tipe biopsi digunakan untuk diagnosis prekanker serviks atau kanker serviks. Tipe biopsi tersebut adalah sebagai berikut (American Cancer Society, 2012) :

1. Biopsi colposcopic : Untuk biopsi jenis ini, awalnya serviks diperiksa menggunakan colposcop untuk menemukan area abnormal. Dengan forcep biopsi, area abnormal sekitar 1/8-inch pada permukaan serviks akan dihilangkan. Prosedur biopsi mungkin dapat menyebabkan kram ringan, nyeri dan sedikit perdarahan. Lokal anastesi biasanya digunakan sebelum biopsi dilakukan.
2. *Endocervical sraping* : Terkadang zona transformasi (area yang berisiko terkena infeksi HPV dan prekanker) tidak terlihat dengan colposcope. Pada situasi ini, cara lain harus dilakukan untuk memastikan area kanker. Oleh sebab itu, endocervical sraping harus dikerjakan. *Endocervical scraping* menggunakan alat yang sempit yang dimasukkan ke dalam kanal endoserviks (disebut *curette*). *Curette* digunakan untuk mengambil beberapa jaringan kanal serviks yang selanjutnya dikirim ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan. Setelah prosedur ini, mungkin dapat menimbulkan kram, nyeri dan sedikit perdarahan.
3. Biopsi *cone*: Prosedur ini juga disebut dengan *conization*. Dasar *cone* dibentuk oleh eksoserviks (bagian luar serviks), dan apeks *cone* berasal dari kanal endoserviks. Zona transformasi (batas antara eksoserviks dan endoserviks) merupakan area serviks yang seringkali menjadi awal terbentuknya prekanker dan kanker, dan termasuk dalam spesimen *cone*. Biopsi *cone* juga dapat digunakan sebagai pengobatan untuk menghilangkan beberapa prekanker dan stadium awal kanker. Biopsi

cone tidak akan pernah mencegah kehamilan pada wanita, tapi jika sejumlah besar jaringan telah dihilangkan, wanita berisiko tinggi melahirkan bayi prematur. Terdapat dua metode yang biasanya digunakan untuk biopsi cone yaitu *loop electrogica excisionl procedure* (LEEP) dan biopsi *cone cold knife*.

Untuk mengetahui stadium pasti dan metastasis dari kanker serviks, butuh dilakukan beberapa pemeriksaan penunjang lainnya. Pemeriksaan tersebut berupa (American Cancer Society, 2012) :

1. *Cystoscopy dan prostoscopy*
2. *Chest X-Ray*
3. *CT Scan*
4. *Magnetic Resonance Imaging (MRI)*
5. *Intravenous urography*
6. *Position emission tomography*

2.2.8 Stadium Kanker Serviks

Stadium kanker serviks berdasarkan *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) edisi 7.

Definisi

Tumor primer (T)

Stadium TNM	Stadium FIGO
TX	Tumor tidak dapat dinilai
T0	Tidak ada bukti tumor primer
Tis*	Karsinoma in situ (karsinoma preinvasif)

T1	I	Karsinoma serviks mencapai uterus
T1a**	IA	Karsinoma invasif terdiagnosa hanya secara mikroskopis. Invasi stroma dengan kedalaman maksimum 5 mm yang diukur dari dasar epitel dan menyebar secara horizontal selebar 7 mm atau kurang, keterlibatan vascular, vena, limfatik tidak mempengaruhi klasifikasi
T1a1	IA1	invasi stroma dengan kedalam ≤ 3 mm dan menyebar secara horizontal ≤ 7 mm
T1a1	IA2	Invasi stroma > 3 mm dan < 5 mm dengan penyebaran secara horizontal ≤ 7 mm
T1b	IB	Secara klinis lesi terlihat pada serviks dan lesi secara mikroskopis . T1a/IA2
T1b1	IB1	Secara klinis lesi terlihat ≤ 4 cm
T1b2	IB2	Secara klinis lesi terlihat > 4 cm
T2	II	Karsinoma serviks menginvasi hingga uterus tapi tidak pada dinding pelvis atau sepertiga bawah vagina
T2a1	IIA1	Secara klinis lesi terlihat ≤ 4 cm
T2a2	IIA2	Secara klinis lesi terlihat > 4 cm
T2b	IIB	Tumor dengan invasi parametrial
T3	III	Tumor menyebar ke dinding pelvis dan/atau melibatkan sepertiga bagian

T3a

IIIA

bawah vagina, dan/atau menyebabkan hidronefrosis atau ginjal tak berfungsi

Tumor melibatkan sepertiga bawah vagina, tidak menyebar ke dinding pelvis

T3b

IIIB

Tumor menyebar ke dinding pelvis dan/atau menyebabkan hidronefrosis atau ginjal tak berfungsi

T4

IVA

Tumor menginvasi mukosa kandung kemih atau rectum, dan/atau menyebar ke *true pelvis* (edema bulosa tidak cukup untuk mengklasifikasikan tumor sebagai T4)

Limfonodus regional (N)

Stadium TNM

Stadium FIGO

NX

Limfonodus regional tidak dapat dinilai

N0

Tidak ada metastasis ke limfonodus regional

N1

IIIB

Metastasis ke limfonodus regional

Metastasis jauh (M)

Stadium TNM

Stadium FIGO

M0

Tidak terdapat metastasis jauh

M1

IVB

Metastasis jauh (meliputi penyebaran ke peritoneum, melibatkan supraclavicular,

mediastenal, atau limfonodus paraaorta, paru, hati, atau tulang)

Tabel 2.1 Stadium Kanker Serviks

ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS (FIGO 2008)			
Stage 0*	Tis	NO	MO
Stage I	T1	NO	MO
Stage IA	T1a	NO	MO
Stage IA1	T1a1	NO	MO
Stage IA2	T1a2	NO	MO
Stage IB	T1b	NO	MO
Stage IB1	T1b1	NO	MO
Stage IB2	T1b2	NO	MO
Stage II	T2	NO	MO
Stage IIA	T2a	NO	MO
Stage IIA1	T2a1	NO	MO
Stage IIA2	T2a2	NO	MO
Stage IIB	T2b	NO	MO
Stage III	T3	NO	MO
Stage IIIA	T3a	NO	MO
Stage IIIB	T3b	Any N	MO
	T1-3	N1	MO
Stage IVA	T4	Any N	MO
Stage IVB	Any T	Any N	M1

(JNCC, 2010)

2.2.9 Terapi

1. Pembedahan

Untuk penyakit tahap awal, pembedahan dapat memperpanjang waktu ovarium untuk berfungsi sehingga menghindarkan dari menopause muda. Pemendekan dan fibrosis vagina yang lebih ringan terjadi dibandingkan pada radioterapi radikal yang memberikan hasil residu yang lebih baik pada fungsi seksual. Pembedahan juga membuat status nodus limfatikus dapat dinilai secara

akurat. Pembedahan merupakan opsi terapi yang lebih baik pada wanita muda yang tidak memiliki kontraindikasi.

a. Histerektomi radikal

Histerektomi radikal (RH) meliputi pengangkatan uterus, serviks, jaringan parametrial, dan vagina atas. RH biasanya dikombinasi dengan limfadenektomi pelvis. Luasnya jaringan parametrial yang diangkat menentukan apakah itu RH kelas II atau kelas III.

b. Histerektomi radikal vagina - laparoskopi

Histerektomi radikal vagina – laparoskopi (IVRH) untuk terapi

FIGO IB1 merupakan alternatif terapi yang aman dan efektif dibandingkan dengan histerektomi radikal abdomen. Lamanya rawat inap pada pasien dengan LVRH lebih singkat dibandingkan dengan setelah RH.

c. *Total pelvic exenteration*

2. Terapi non pembedahan

a. Kemoradioterapi *concurrent*

Concurrent kemoradioterapi lebih baik daripada radiasi saja untuk pengobatan pasien dengan kanker serviks yang telah dipertimbangkan cocok untuk menerima radioterapi radikal. Presentasi survival meningkat dari 40% menjadi 52%. Kemoradiasi untuk terapi kanker serviks berhubungan dengan peningkatan toksisitas hematologi dan gastrointestinal akut.

b. Kemoradioterapi / radioterapi ajuvan

Radioterapi ajuvan mengurangi kekambuhan lokal pada pasien dengan karsinoma serviks setelah yang telah dilakukan pembedahan.

c. Brakiterapi

Brakiterapi merupakan radioterapi gelombang pendek yang dihantarkan dengan insersi aplikator menuju uterus melalui vagina.

d. Kemoterapi neoajuvan

e. Pengobatan kanker stadium IVB

f. Pengobatan anemia

g. Pengobatan komplikasi yang diinduksi radiasi

h. Terapi penggantian hormon / hormone replacement therapy

HRT direkomendasikan bagi wanita yang kehilangan fungsi ovarium akibat pengobatan kanker serviks (NHS, 2008).

2.2.10 Pencegahan

Vaksinasi melawan patologi HPV terlihat efektif menjadi strategi pencegahan kanker serviks. Vaksin terbuat dari partikel inaktivasi virus yang tidak infeksi tetapi bersifat sangat imunogenik. Administrasi vaksin kuadrivalen HPV melawan tipe 16, 18, 6 dan 11. Karena tidak semua kanker serviks hanya disebabkan oleh tipe 16, 18, 6 dan 11, wanita tetap bisa menderita kanker serviks (Fauci *et al.*, 2008)

2.3 Apoptosis

Apoptosis adalah proses fisiologis untuk perkembangan organ, jaringan homeostasis dan mengeliminasi sel-sel yang berpotensi rusak dalam organisme yang kompleks. Apoptosis dapat dinisiasi oleh bermacam-macam stimulus, yang mengaktifkan sel untuk melakukan program bunuh diri (Barkett and Girmole, 1999).

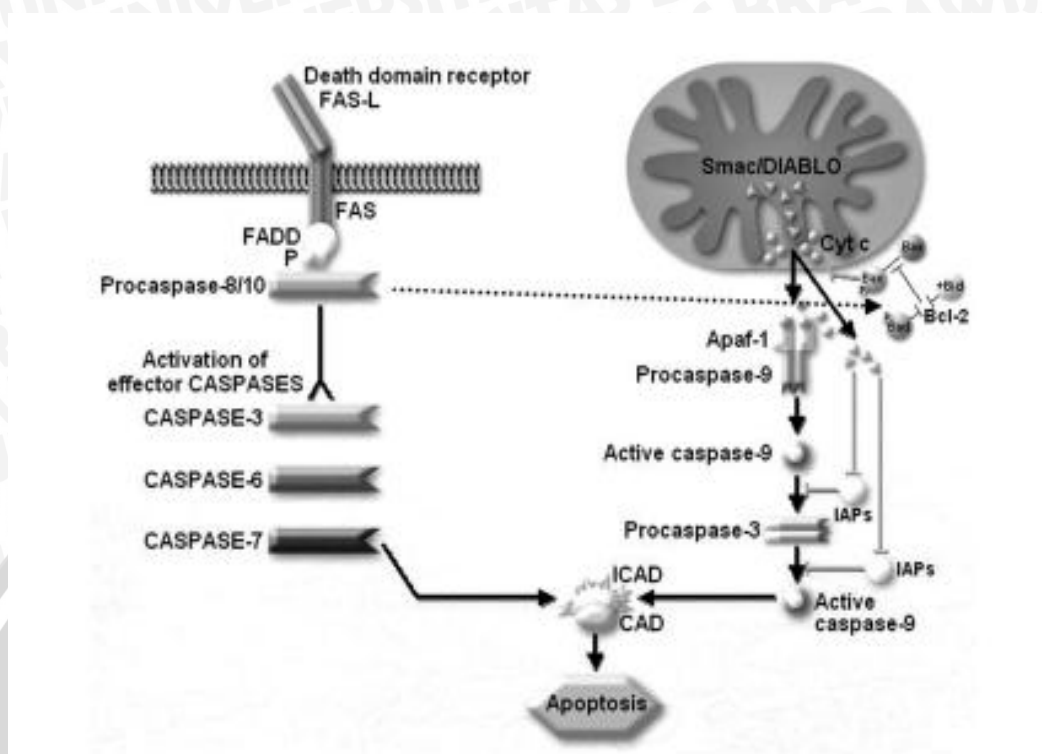
Apoptosis atau program kematian sel merupakan mekanisme sel mengalami kematian untuk mengontrol proliferasi sel atau dalam merespon kerusakan DNA. Apoptosis juga penting dalam menghilangkan limfosit *self-reactive* dan limfosit yang tesusun kembali dari nonproduktif melalui reseptor antigen. Bereberapa tipe kanker, seperti *B-cell chronic lymphocytic leukemia* (CLL), follikuler lymphoma, dan tumor yang terinfeksi *human T cell leukima*, dikarakteriskan dengan gagal apoptosis dan menjadi sel yang immortal. Keganasan lain mempunyai kerusakan jalur regulator apoptosis, seperti p53, nuclear factor kappa B (NFkB), atau PI3K/Akt sehingga menyebabkan gagal apoptosis (Ghobrial *et al*, 2005).

Apoptosis terjadi melalui dua jalur utama. Jalur tersebut adalah jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik. Jalur ekstrinsik atau sitoplasmik dipicu melalui *Fas death receptor*, anggota reseptor *Tumor Necrosis Factor* (TNF) . Sedangkan jalur intrinsik atau mitokondria distimulasi oleh keluarnya sitokrom c mitokondria dan mengaktifkan sinyal kematian. Kedua jalur apoptosis bertemu pada jalur akhir yang melibatkan kaskade protease atau caspase (Ghobrial *et al*, 2005).

Jalur ekstrinsik teraktivasi karena ligasi reseptor permukaan sel yang disebut death receptor (DRs). Fas yang merupakan anggota TNF disebut juga Apo-1 atau CD95. Reseptor TNF yang lain meliputi TNF R1, DR3 (Apo 2), DR4 (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1* [TRAIL R1]), DR 5 (TRAIL 2), dan DR 6. Sistem Fas ligand (Fas L)- Fas dikenali sebagai fungsi kematian sel, tapi sistem tersebut juga terlibat dalam beberapa proliferasi dan jalur signal inflamasi yang tidak bisa dijelaskan dengan baik. Ketika stimulus kematian memicu jalur ekstrinsik, Fas L berinteraksi dengan kompleks Fas yang nonaktif sehingga membentuk singnal kompleks kematian. Sistem FAs L-Fas yang

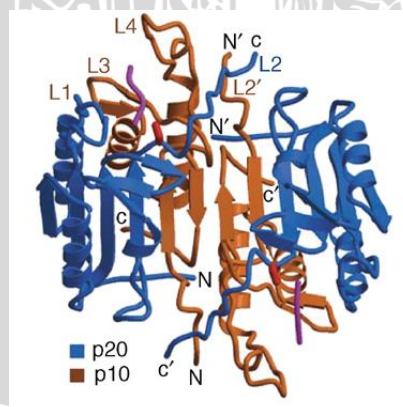
menginduksi kematian mempunyai adaptor *protein Fas-associated death domain protein*, caspase 8 dan caspase 10. Hal tersebut akan mengaktifkan caspase 8, kemudian dapat mengaktifkan caspase lain yang istirahat (caspase 3, caspase 6 dan caspase 7) dan akhirnya membuat sel apoptosis (Ghobrial *et al.*, 2005).

Salah satu regulator yang terpenting dalam jalur intrinsik adalah protein famili Bcl-2. Famili Bcl-2 terdiri atas anggota proapoptosis, seperti, Bax, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, dan Hrk dan anggota antiapoptosis, seperti Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bfl-1 dan Mcl-1. Ketika terdapat stimulus apoptosis, terjadi peningkatan ekspresi protein pro apoptosis seperti Bax. Bax akan mengalami perubahan konformasi dan asosiasi menjadi oligomer besar yang mampu meningkatkan permeabilitas membran mitokondria dengan membentuk *proteinaceous pore*. Membran yang permeabel menyebabkan terjadi pelepasan sitokrom-c. Sitokrom-c yang keluar menuju sitosol berinteraksi dengan Apaf-1, memicu aktivasi proenzim caspase-9. Caspase-9 yang aktif kemudian memecah caspase-3 menjadi caspase-3 aktif yang terdiri dari subunit p17 dan p12 yang selanjutnya memecah berbagai macam substrat baik sitoplasmik maupun nuclear (Brauns *et al.*, 2005). Pemecahan ini menyebabkan terjadinya perubahan morfologis pada sel yang mengalami apoptosis yaitu penyusutan sel, blebbing, kondensasi kromatin, dan fragmentasi DNA (Porter and Janicke, 1999). Di sisi lain, anggota antiapoptosis famili Bcl-2 akan menekan apoptosis dengan menghambat oligomerisasi Bax sehingga memblok pengeluaran sitokrom-c (Ghobrial *et al.*, 2005; Dewson and Cluck, 2010).



Gambar 2.2. Jalur Apoptosis (Ghobrial et al., 2005)

2.4 Caspase-3



Gambar 2.3 Caspase-3 (Degterev et al., 2003)

Cysteiny aspartate-specific protease, atau caspase, merupakan famili dari enzim sistein protease yang memiliki peran penting dalam regulasi

apoptosis. Caspase dapat diklasifikasikan berdasarkan fungsinya pada proses apoptosis. Proses apoptosis dipicu oleh berbagai macam sinyal, baik ekstra maupun intraselular. Sinyal tersebut kemudian diteruskan menjadi jalur yang kompleks yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel. Caspase yang berperan pada awal terjadinya apoptosis disebut caspase inisiator. Caspase yang termasuk dalam caspase inisiator adalah caspase-1, -2, -5, -8, -9, -10, -11, dan -12. Di sisi lain, terdapat caspase yang berperan dalam eksekusi apoptosis dengan memecah multipel substrat seluler. Caspase ini diproses dan diaktivasi oleh caspase inisiator. Caspase yang termasuk dalam caspase eksekutor adalah caspase -3, -6, dan -7 (Degterev *et al.*, 2003).

Jalur signaling apoptosis yang menyebabkan aktivasi caspase dapat dibagi menjadi dua kategori: jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik. Jalur ekstrinsik terstimuli dalam respon terhadap sinyal ekstraseluler yang mengindikasikan eksistensi sel tidak lagi dibutuhkan untuk kelangsungan hidup organisme. Jalur ini diinisiasi oleh adanya ikatan ligand dengan reseptor permukaan sel yang memediasi kematian sel. Salah satu caspase yang teraktivasi pada jalur ini ialah caspase-8. Sedangkan jalur intrinsik diaktivasi oleh stimuli intraseluler seperti kerusakan DNA dan obat sitotoksik. Jalur ini menyebabkan membran mitokondria menjadi permeabel dan mengeluarkan sitokrom c. Sitokrom c kemudian membentuk apoptosom dan mengaktivasi caspase-9 (Degterev *et al.*, 2003).

Baik jalur ekstrinsik maupun intrinsik akan berakhir pada fase eksekusi, yang disebut juga jalur final apoptosis. Jalur final ini dimulai dengan aktivasi caspase eksekutor. Caspase eksekutor mengaktivasi endonuklease sitoplasmik yang mendegradasi material nukleus, dan mengaktivasi protease yang mendegradasi protein nukleus dan sitoskeletal. Caspase eksekutor memecah

berbagai macam substrat meliputi sitokeratin, PARP, protein sitoskeletal membran plasma alfa fodrin, protein nuclear NuMA dan lainnya, yang akhirnya menyebabkan perubahan morfologis dan biokimia seperti yang terlihat pada sel apoptosis (Slee *et al.*, 2001).

Caspase-3 merupakan caspase eksekutor yang terpenting. Caspase-3 disintesis sebagai zimogen inaktif di sitoplasma yang harus mengalami aktivasi proteolitik. Caspase-3 diaktivasi oleh semua caspase inisiator, salah satunya caspase-9. Aktivasi ini terjadi ketika pro caspase-3 yang merupakan protein prekursor 32-kDa dipecah sehingga menghasilkan dua subunit, yaitu subunit p17 yang mengandung domain katalitik dan subunit p12. Bersama-sama, subunit p17 dan p12 membentuk caspase-3 matur yang berbentuk heterotetramer (Han *et al.*, 1997; Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1998). Caspase-3 akan memecah berbagai macam substrat baik sitoplasmik maupun nuklear, seperti *poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)* dan *endonuklease CAD*. Pada sel yang berproliferasi, CAD membentuk kompleks dengan inhibitorynya, ICAD. Pada sel yang mengalami apoptosis, caspase-3 aktif memecah ICAD menyebabkan terlepasnya CAD. CAD kemudian mendegradasi DNA kromosomal dalam nukleus dan menyebabkan kondensasi kromatin (Brauns *et al.*, 2005; Elmore, 2007). Perubahan morfologis lain pada sel yang mengalami apoptosis adalah penyusutan sel dan blebbing (Porter and Janicke, 1999).

2.5 Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) L. Miq

2.5.1 Klasifikasi dan Karakterisasi Benalu Mangga



Gambar 2.4 Tanaman Benalu Mangga (Sunaryo dan Erlin, 2007)

Klasifikasi benalu mangga

Divisio	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisio	: <i>Angiospermae</i>
Classis	: <i>Dicotyledoneae</i>
Ordo	: <i>Santalales</i>
Familia	: <i>Loranthaceae</i>
Genus	: <i>Dendrophthoe</i>
Spesies	: <i>Dendrophthoe pentandra</i> (Becker, 1965)

D. pentandra memiliki berbagai macam karakteristik : berupa tumbuhan perdu, bersifat hemiparasit, agak tegar, bercabang banyak, tinggi 0,5–1,5 m. Batang tersebar atau sedikit berhadapan, menjorong, panjang 6–13 cm dan lebar 1,5–8 cm, pangkal menirus–membaji, ujung tumpul–runcing, panjang tangkai batang 5–20 mm. Perbungaan tandan dengan 6–12 bunga, panjang sumbu perbungaan 10–35 mm. Bunga dengan 1 braktea di pangkal, biseksual, diklamid, kelopak mereduksi; mahkota bunga terdiri atas 5-6 cuping, di bagian bawah saling berpautan, agak menggelendut, panjang 13–26 mm, menyempit

membentuk leher, bagian ujung mengganda, mula-mula hijau kemudian hijau kekuningan sampai kuning orange atau merah orange, panjang tabung 6–12 mm dan menggenta; benang sari 5, panjang kepala sari 2–5 mm dan tumpul serta melekat pada bagian pangkal (basifik); putik dengan kepala putik membintul. Buah berbentuk bulat telur, panjang mencapai 10 mm dengan lebar 6 mm, bila masak kuning jingga. Berbiji 1, biji ditutupi lapisan lengket (Sunaryo, 2008).

D. pentandra ditemukan di daerah hutan hujan atau di hutan yang terbuka, di perkebunan, di taman-taman kota, hingga di sekitar pemukiman penduduk. Penyebarannya terjadi melalui burung-burung pemakan bijinya. Kemampuan benalu ini tidak hanya menyerang jenis tumbuhan inang tertentu melainkan dapat memarasit berbagai jenis tumbuhan inang, baik berupa semak ataupun pohon, selama beberapa tahun. *D. pentandra* dapat hidup pada jenis-jenis tumbuhan yang beragam serta rentang sebaran ekologis yang cukup luas meliputi India sampai Indo Cina, Semenanjung Malaya, Sumatera, Jawa, Kalimantan, Nusa Tenggara dan Filipina (Sunaryo, 2008).

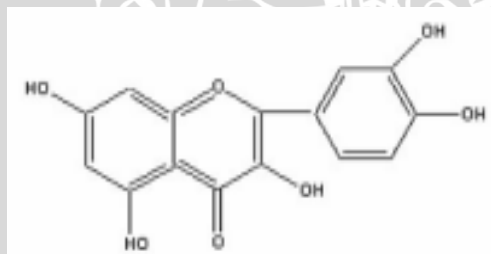
Sebagai jenis tumbuhan parasit keberadaan benalu *D. pentandra* sering mengindikasikan terjadinya gangguan ataupun kerusakan tumbuh-tumbuhan inang yang diparasitinya, apalagi bila keberadaannya dalam jumlah yang banyak. Di lain pihak, masyarakat umum seringkali menggunakan *D. pentandra* dalam bentuk bubur untuk mengobati luka atau infeksi pada kulit. Air rebusan dari semua bagian tumbuhan *D. pentandra* diminum untuk mengobati hipertensi dan apabila dicampur minuman teh digunakan untuk obat batuk (Sunaryo, 2008). Benalu randhu yang merupakan satu spesies yang sama dengan benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) namun berbeda inang, terbukti berkhasiat melawan sel kanker. Penelitian yang dilakukan oleh Saifillah (2010) menunjukkan bahwa

ekstrak batang benalu randhu dapat menurunkan ekspresi protein P53 mutan pada sel kanker serviks (sel HeLa).

2.5.2 Kandungan Senyawa Benalu Mangga

Senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman benalu secara umum baik yang berasal dari genus *Dendrophthoe*, maupun yang berasal dari genus *Macrosolen*, *Loranthus*, maupun *Scurulla* antara lain adalah lektin, 2-galaktosida, senyawa siklik monoterpene glukosida, syringin, coniferin, katekin, epikatekin, kuersetin, tannin, kuersitrin (Darmawan dan Artanti, 2006). Sedangkan pada penelitian Rosidah, 1999 menyebutkan bahwa kuersetin merupakan golongan flavonoid yang paling banyak terisolasi dari benalu, terutama *Dendrophthoe pentandra*, yaitu sebesar 39,8 mg/g (Rosidah, 1999).

2.6 Kuersetin



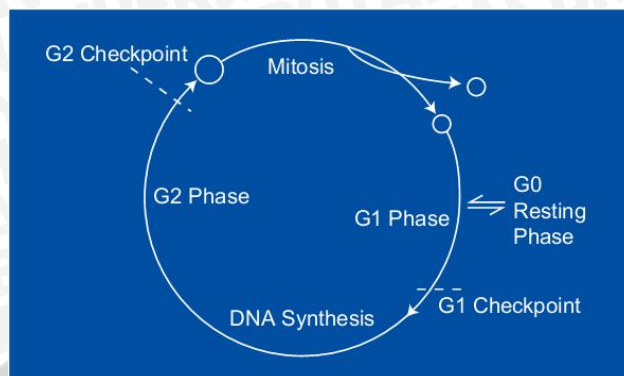
Gambar 2.5 Senyawa Kuersetin (Ekawati dkk., 2008)

Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) merupakan senyawa polifenol yang dapat ditemukan pada berbagai macam makanan (Vargas and Burd, 2010). Kuersetin seringkali terdapat sebagai glikosida (derivat gula), seperti rutin yang hidrogen dari grup R-4 digantikan oleh disakarida. Kuersetin diistilahkan sebagai aglikon, atau bentuk tanpa gula dari rutin (Baghel *et al.*, 2012).

Kuersetin dikenal sebagai antiviral, anti inflamasi, antibakteri, serta pelemas otot, serta antioksidan (Jan *et al.*, 2010). Kuersetin memiliki berbagai macam aksi yang menjadikannya agen anti kanker potensial.(Lamson and Brignall, 2000). Sifat anti kankernya telah terbukti baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Banyak penelitian menunjukkan bahwa kuersetin memiliki peran signifikan dalam menghambat sel kanker payudara, kolon, prostat, ovarium, endometrium, dan paru- paru (Baghel *et al.*, 2012).

Mutasi pada sel tumor ganas disebabkan tereksposnya sel oleh *reactive oxygen species* (ROS). Kuersetin dapat bereaksi dengan ROS dan ion logam penghasil ROS, keduanya akan mengurangi kerusakan DNA oksidatif. Pencegahan kerusakan DNA ini dipercaya merupakan mekanisme umum dari kuersetin sehingga dapat mencegah tumorigenesis (Vargas and Burd, 2010).

Protein P53 berfungsi sebagai penjaga program *senescence* dan apoptosis. Mutasi pada gen P53 merupakan abnormalitas yang paling sering ditemukan pada kanker. Mutasi gen P53 menyebabkan sel yang mengalami kerusakan DNA tidak mengalami *cell cycle arrest* maupun apoptosis sehingga sel dapat berkembang menjadi ganas. Kuersetin (248 micromM) terbukti dapat menekan ekspresi protein P53 mutan hingga pada level yang tidak terdeteksi pada *cell line* kanker payudara (Lamson and Brignall, 2000). Hambatan protein P53 mutan terjadi pada proses translasi mRNA. Level mRNA P53 tidak berubah pada paparan kuersetin, akan tetapi terjadi penurunan akumulasi protein P53 mutan yang baru disintesis. Kuersetin tampak hanya mengintervensi sel secara spesifik pada jalur protein P53 mutan, bukan mengganggu sintesis protein secara umum. (Avila *et al.*, 1994).



Gambar 2.6 Siklus Sel (Lamson and Brignall, 2000)

Penelitian yang dilakukan oleh Kuo (2004) menunjukkan terjadi peningkatan ekspresi protein P53 pada sel karsinoma paru yang dipaparkan kuersetin. Vidya *et al.* (2010) melaporkan bahwa kuersetin mampu menekan viabilitas sel HeLa dengan menginduksi *G2/M phase cell cycle arrest* dan apoptosis mitokondria melalui mekanisme *p53-dependent*. Hal ini meliputi perubahan pada morfologi nuklear, eksternalisasi fosfatidilserin, depolarisasi membran mitokondria, modulasi protein regulator siklus sel dan anggota famili NF- κ B, upregulasi protein proapoptosis anggota famili Bcl-2, sitokrom c, Apaf-1 dan caspase, serta downregulasi protein antiapoptosis Bcl-2 dan survivin. Kuersetin meningkatkan ekspresi protein pro apoptosis, menurunkan ekspresi protein anti apoptosis anggota famili bcl-2 serta meningkatkan level dan aktivitas caspase-3 dan caspase-9 pada berbagai macam sel kanker (Ting-xiu *et al.*, 2006; Granado-Serrano *et al.*, 2006; Jaganathan and Mandal, 2009; Chien *et al.*, 2009; Niu *et al.*, 2010).

Kuersetin terbukti menekan sel T leukemia manusia dan sel kanker lambung pada fase akhir G1. *G1 checkpoint* yang dikontrol oleh gen P53 merupakan target kontrol utama proliferasi sel. Kuersetin ditemukan dapat

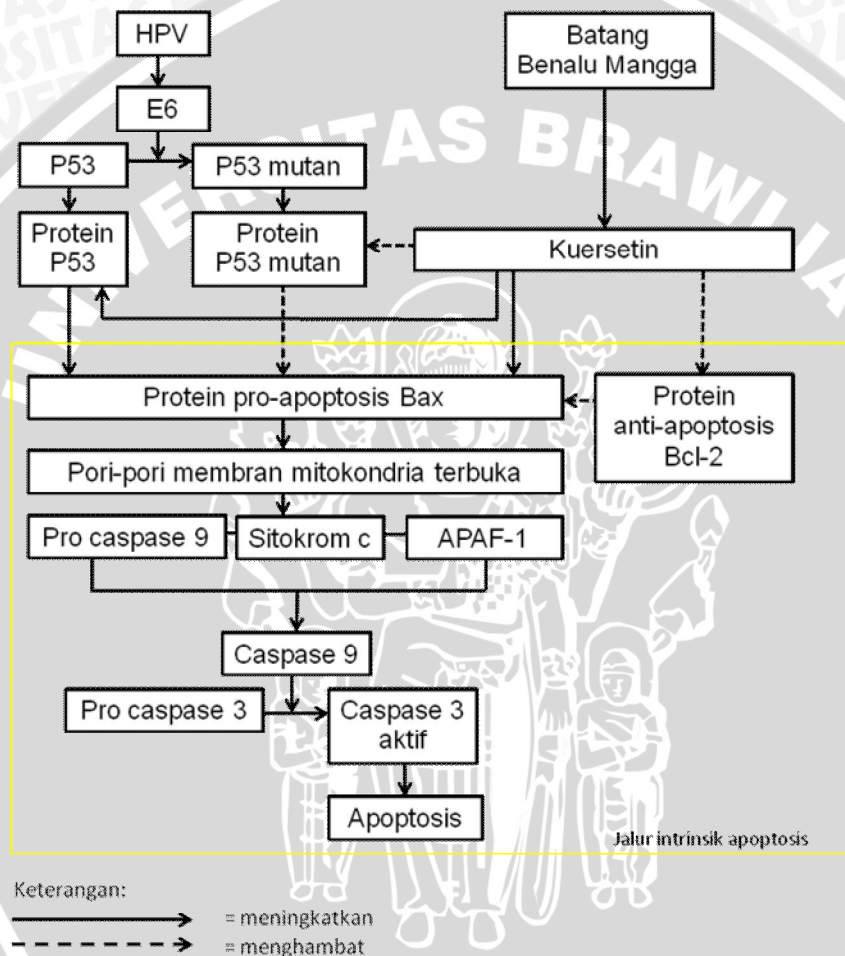
menghambat produksi protein *heat shock* pada beberapa *cell line* ganas, meliputi kanker payudara, leukemia, dan kanker kolon. Protein *heat shock* membentuk kompleks dengan P53 mutan, yang membuat sel tumor dapat menghindari mekanisme normal *cell cycle arrest*. Ekspresi tirosin kinase juga dapat dihambat oleh kuersetin. Tirosin kinase dianggap terlibat dalam onkogenesis melalui kemampuannya untuk mencegah pengaturan kontrol pertumbuhan (Lamson and Brignall, 2000).

Selain memiliki berbagai macam aksi anti kanker, kuersetin juga dapat mengurangi efek samping dari radioterapi. Penelitian pada manusia menunjukkan bahwa administrasi secara oral dan topikal dapat mengurangi kerusakan kulit selama radioterapi pada pasien dengan kanker kepala dan leher. Kuersetin memiliki toksisitas yang rendah pada administrasi secara oral maupun intravena). Dosis tunggal kuersetin hingga 4 gram tidak berhubungan dengan efek samping pada manusia. Bolus intravena dengan dosis 100 mg juga dapat ditoleransi dengan baik (Lamson and Brignall, 2000).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Human Papilloma Virus yang menginvasi sel epitel seviks menyebabkan integrasi onkogen E6 dan E7 ke dalam DNA sel. Onkoprotein E6 bekerja dengan menyebabkan mutasi gen pengeksprei protein P53. P53 merupakan protein yang memiliki peran sangat penting dalam mengatur stabilitas genom sel. P53 berfungsi menginduksi program *senescence*, program yang membuat sel memasuki fase *checkpoint*, serta memicu apoptosis dengan meningkatkan

ekspresi Bax (*Bcl-2 Antagonist X*), suatu protein pro apoptosis anggota famili Bcl-2. *Senescence* dan apoptosis dilakukan pada sel yang mengalami kerusakan genetik agar sel tersebut tidak terus membelah dan berkembang menjadi ganas (Fridwan and Lowe, 2003; (Dewson and Cluck, 2010).

Kuersetin dalam benalu mangga memodulasi sejumlah target kunci pada jalur transduksi sinyal seluler yang berhubungan dengan apoptosis sel. Kuersetin meningkatkan ekspresi protein pro apoptosis Bax dan menurunkan ekspresi protein anti apoptosis Bcl-2 anggota famili Bcl-2 (Ting-xiu *et al.*, 2006; Granado-Serrano *et al.*, 2006; Jaganathan and Mandal, 2009; Chien *et al.*, 2009, Niu *et al.*, 2010). Efek ini tampaknya berhubungan dengan efek penurunan ekspresi protein P53 mutan dan peningkatan ekspresi protein P53 normal oleh kuersetin, karena protein P53 dapat meregulasi apoptosis jalur intrinsik dengan meningkatkan ekspresi protein Bax (Avila *et al.*, 1994; Kuo, 2004).

Peningkatan rasio protein pro apoptosis terhadap protein anti apoptosis memicu terjadinya apoptosis melalui jalur intrinsik atau mitokondria. Membran mitokondria menjadi permeabel dan sitokrom-c keluar dari mitokondria menuju sitoplasma yang kemudian berikatan dengan APAF-1 (*apoptotic protease activating-factor 1*) dan pro caspase-9 membentuk apoptosom. Caspase-9 yang teraktivasi akibat dimerisasi dalam apoptosom akan mengaktivasi *caspase signaling cascade*. Caspase-9 memecah caspase-3 sehingga menjadi caspase-3 aktif yang terdiri dari subunit p17 yang mengandung domain katalitik dan subunit p12 (Brauns *et al.*, 2005). Caspase-3 aktif kemudian memecah berbagai substrat baik sitoplasmik maupun nuklear sehingga menyebabkan perubahan morfologis pada sel yang mengalami apoptosis yaitu penyusutan sel, blebbing, kondensasi kromatin, dan fragmentasi DNA (Porter and Janicke, 1999).

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak batang benalu mangga meningkatkan jumlah sel HeLa yang mengandung protein caspase-3 aktif.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental*) yang dikerjakan di laboratorium secara *in vitro* dengan memakai rancangan percobaan *Randomized Group Post Test Only Design*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak batang benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) terhadap peningkatan jumlah sel HeLa yang mengandung protein caspase-3 aktif. Penelitian ini menggunakan variabel terikat caspase-3 sebagai penanda apoptosis karena caspase-3 merupakan protein eksekutor apoptosis.

4.2 Subjek dan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sel HeLa, *cell line* kanker serviks, yang dikultur. Sel HeLa diperoleh dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Brawijaya, Malang.

Menurut Supranto (2000), untuk penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, acak kelompok, atau faktorial, secara sederhana dapat dirumuskan sebagai berikut:

$$(t-1)(r-1) > 15$$

dimana : t = banyaknya kelompok perlakuan

r = jumlah replikasi / pengulangan

Pada penelitian ini $t = 4$ sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$(4-1)(r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15:3$$

$$r = 5 + 1 = 6$$

Dibesarkan menjadi 6 pengulangan

4.3 Variabel dan Definisi Operasional

4.3.1 Variabel penelitian

Variabel dalam penelitian ini dibagi menjadi 2 variabel, yaitu :

a. Variabel bebas

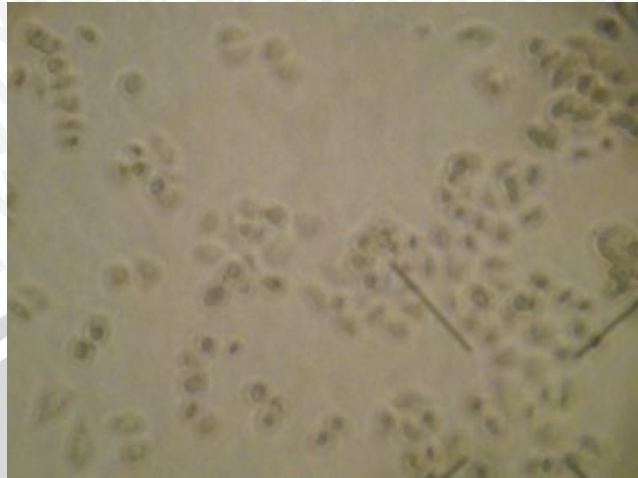
Ekstrak batang benalu mangga

a. Variabel terikat

Caspase-3 aktif

4.3.2 Definisi Operasional

- Sel HeLa merupakan *continuous cell line* yang diturunkan dari sel epitel kanker serviks penderita kanker serviks yang telah dimodifikasi sehingga menjadi sel yang immortal. Sel dibeli dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dalam keadaan beku di dalam kemasan *cryovial*. Sel kemudian di-*thawing* dan dikultur ke dalam sumuran. Sel HeLa yang dipakai adalah sel HeLa yang sehat dan berkualitas baik. Sel HeLa yang berkualitas baik berbentuk poligonal dan tumbuh melekat pada dasar sumuran. Sedangkan sel yang berkualitas buruk adalah sel yang mengalami granulasi sekitar inti, terlepas dari dasar sumuran, atau mengalami vakuolasi pada sitoplasmanya. (Invitrogen, 2013).



Gambar 4.1 Kultur sel HeLa. Tampak sel melekat di dasar sumuran. Morfologi sel baik, membran sel rata dan tidak terdapat abnormalitas seperti granulasi atau vakuolasi. Tidak terlihat adanya kontaminasi pada kultur sel. Sel dilihat menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

- Tanaman benalu mangga diperoleh dari daerah Dau, Malang. Uji taksonomi dilakukan di Laboratorium Taksonomi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya untuk memastikan bahwa tanaman tersebut benar – benar *Dendrophthoe pentandra*. Setelah mendapatkan sertifikasi, dilakukan ekstraksi etanol 80% batang benalu mangga di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya.
- Caspase-3 aktif merupakan caspase-3 yang telah mengalami pemecahan menjadi subunit p17 dan p12. Antibodi yang dipakai pada pengecatan imunohistokimia merupakan antibodi caspase-3 aktif yang mengenali subunit p17, subunit yang mengandung domain katalitik. Pada pengecatan imunohistokimia, sel HeLa yang mengandung caspase-3 aktif akan berwarna kecokelatan. Data yang diambil ialah jumlah sel HeLa yang berwarna kecokelatan pada 5 lapang pandang. Sel HeLa diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x.

4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juni –November tahun 2012, di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Peralatan dan Bahan Kultur Sel HeLa

Mikropipet 1 ml, botol duran 100 ml, stiker label, pipet *disposable*, inkubator CO₂, flask kultur t 25 cm², 24 well plate culture, conical tube 45 ml, lampu spiritus, mikroskop cahaya, hemacytometer, counter, laminar air flow, mikroskop inverted, penisilin-streptomisin 1%, fetal bovine serum (FBS) qualified 10%, Roswell Park Memorial Institute (RPMI), Tripsin-EDTA, phosphate buffer saline (PBS), natrium bikarbonat (Nabic).

4.5.2 Peralatan dan Bahan Ekstrak Etanol Batang Benalu Mangga

Oven, timbangan, gelas erlenmeyer, corong gelas, kertas saring, labu evaporator, labu penampung etanol, evaporator, rotatory evaporator, selang water pump, water pump, water bath, vacum pump, batang benalu mangga, etanol 80%, akuades.

4.5.3 Peralatan dan Bahan Imunohistokimia

Pipet, mikroskop, cover glass, blue tip, yellow tip, object glass, air, streptavidin horse radish peroxidase (SA-HRP), 0,25% triton X-100, PBS, FBS, antibodi caspase-3 aktif, 3,3'-diaminobenzidine (DAB), meyer hematoksilen.

4.6 Cara Kerja

4.6.1 Kultur Sel HeLa

Metode kultur sel HeLa yang digunakan dalam penelitian ini merujuk pada protokol kultur Laboraturim Biomedik Universitas Brawijaya.

a) *Thawing* Sel

1. *Cryovial* yang berisi sel beku diambil dari nitrogen cair dan segera diletakkan dalam air dengan suhu 37°C (*heatshock*).
2. Sel dicairkan dengan cepat (<1 menit) dengan memutar vial dengan lembut dalam air 37°C hingga hanya sedikit es tertinggal di vial.
3. Sel yang berada di dalam vial dipindah ke dalam *falcon tube*. Sebelum membuka, bagian luar vial diusap dengan etanol 80%.
4. Media *serum free* dibuat dengan mencampur *RPMI*, 1% penisilin streptomisin dan 0,2% natrium bikarbonat.
5. Sejumlah medium komplit (media *serum free* + 10% FBS) yang telah dihangatkan dimasukkan secukupnya ke dalam *falcon tube*.
6. Suspensi sel disentrifugasi kurang lebih 1000 rpm selama 5 menit.
7. Setelah disentrifugasi, kejernihan supernatant dan pellet komplit dicek. Supernatant dibuang tanpa mengganggu pellet sel.
8. Sel diresuspensi dengan lembut ke dalam medium pertumbuhan komplit, dipindahkan ke dalam flask kultur T 25 cm², dan diinkubasi dalam suhu 37°C, 5% CO₂.

b) *Panen* Sel

1. Flask kultur diambil dari inkubator dan kondisi sel diamati.
2. Medium komplit akan mengganggu aktivitas tripsin-EDTA. Medium komplit dibuang menggunakan mikropipet.

3. Sel dicuci sel dua kali dengan PBS.
4. Tripsin-EDTA diberikan secara merata ke dalam flask kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 3 menit.
5. Setelah 3 menit flask dikeluarkan dari inkubator. Ditambahkan medium untuk menginaktivasi tripsin-EDTA. Sel diresuspensi dengan pipet sampai terlepas satu persatu (tidak menggerombol).

c) Subkultur Sel

1. Sel dipanen sesuai protokol panen sel.
2. Suspensi sel diresuspensi di dalam *conical tube*.
3. Kerapatan sel dihitung, kemudian diencerkan sampai 10^6 sel/ml.
4. Sel dituangkan ke dalam 24 *well plate culture* dengan kerapatan sel 10^6 sel/ml/well.
5. Sel diamati di bawah mikroskop.

d) Penghitungan Sel

1. Sel dipanen dengan tripsin EDTA, kemudian dipindah dalam *conical tube* 15 ml.
3. *Conical tube* yang berisi sel disentrifugasi 1000 rpm selama 8 menit.
4. Supernatant yang telah terpisah dibuang, kemudian ditambahkan media komplit 1 ml.
5. Diambil 20 μ l, ditambahkan media sampai 1000 μ l (pengenceran 50 x).
6. Diambil 10 μ l, ditambahkan *trypan blue* 0,05% 10 μ l.
7. Sel yang telah diwarnai dengan *trypan blue* tersebut dihitung dengan hemositometer pada bilik leukosit.
8. Jumlah sel/ml dihitung dengan rumus jumlah sel $\times 10^4 \times fp$.

4.6.3 Ekstrak Etanol 80 % Batang Benalu Mangga

Metode ekstrak batang benalu mangga diadopsi dari Saifillah, 2010.

a) Proses pengeringan

1. Batang benalu mangga (sampel basah) yang akan dikeringkan dicuci bersih dan dipotong kecil-kecil.
2. Setelah menjadi potongan-potongan kecil, batang benalu dioven dengan suhu 80°C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air).

b) Proses ekstraksi

1. Setelah kering, batang benalu dihaluskan dengan blender sampai halus.
2. Ditimbang sebanyak 50 gram (sampel kering).
3. Dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter.
4. Direndam dengan etanol.
5. Dikocok sampai benar-benar tercampur (± 30 menit).
6. Didiamkan 1 malam sampai mengendap.

c) Proses evaporasi

1. Lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif diambil dan dimasukkan ke dalam labu evaporasi 1 liter
2. Labu evaporasi dipasang pada evaporator.
3. Water bath diisi dengan air sampai penuh.
4. Semua rangkaian alat dipasang, termasuk *rotary evaporator* dan pemanas *water bath* (atur sampai suhu 90 °C). Setelah itu disambungkan dengan aliran listrik.
5. Larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah dalam labu.

6. Aliran etanol ditunggu hingga berhenti menetes pada labu penampung ($\pm$ 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu).
7. Hasil yang diperoleh kira-kira $\frac{1}{3}$ dari bahan alam kering.
8. Hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol plastik.
10. Disimpan dalam *freezer* (Laboratorium Farmakologi FKUB).

4.6.3 Pembuatan Sediaan Benalu Mangga

1. Ekstrak batang benalu mangga diambil secukupnya dan ditaruh dalam eppendorf, kemudian ditimbang. Didapatkan ekstrak sebanyak 11 mg.
2. Ekstrak dilarutkan dalam 1 ml media sehingga konsentrasinya menjadi 11.000 $\mu\text{g/ml}$.
3. Konsentrasi yang sangat pekat akan mempersulit pengambilan menggunakan mikropipet, sehingga ekstrak diencerkan menjadi 5000 $\mu\text{g/ml}$.

$$\begin{aligned} V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ x \cdot 11.000 \mu\text{g/ml} &= 1000 \mu\text{l} \cdot 5000 \mu\text{g/ml} \\ x &= 455 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Sehingga untuk membuat sediaan konsentrasi 5000 $\mu\text{g/ml}$ sebanyak 1000 μl diperlukan 455 μl dari stok konsentrasi 11.000 $\mu\text{g/ml}$ yang ditambah media 544 μl .

4. Membuat sediaan konsentrasi 50, 100, dan 200 $\mu\text{g/ml}$

Untuk imunohistokimia, masing – masing sumuran membutuhkan 500 μl media. Karena terdapat 6 kali ulangan dibutuhkan 3000 μl media.

- a) Konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$

$$\begin{aligned} V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ x \cdot 5000 \mu\text{g/ml} &= 3000 \mu\text{l} \cdot 50 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

$$x = 30 \mu\text{l}$$

Sehingga untuk membuat sediaan konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$ sebanyak 3000 μl diperlukan 30 μl dari stok konsentrasi 5000 $\mu\text{g/ml}$ yang ditambah media sampai dengan 3000 μl .

b) Konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$

$$\begin{aligned} V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ x \cdot 5000 \mu\text{g/ml} &= 3000 \mu\text{l} \cdot 100 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

$$x = 60 \mu\text{l}$$

Sehingga untuk membuat sediaan konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ sebanyak 3000 μl diperlukan 60 μl dari stok konsentrasi 5000 $\mu\text{g/ml}$ yang ditambah media sampai dengan 3000 μl .

c) Konsentrasi 200 $\mu\text{g/ml}$

$$\begin{aligned} V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ x \cdot 5000 \mu\text{g/ml} &= 3000 \mu\text{l} \cdot 200 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

$$x = 120 \mu\text{l}$$

Sehingga untuk membuat sediaan konsentrasi 200 $\mu\text{g/ml}$ sebanyak 3000 μl diperlukan 120 μl dari stok konsentrasi 5000 $\mu\text{g/ml}$ yang ditambah media sampai dengan 3000 μl .

4.6.4 Perlakuan dan Kontrol

- Enam sumuran berisi kultur sel HeLa saja tanpa dipapar ekstrak batang benalu mangga sebagai kontrol positif. Diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C, 5% CO₂.

- b. Enam sumuran yang berisi sel HeLa dipapar ekstrak etanol batang benalu mangga dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$. Diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C , 5% CO_2 .
- c. Enam sumuran yang berisi sel HeLa dipapar ekstrak etanol batang benalu mangga dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$. Diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C , 5% CO_2 .
- d. Enam sumuran yang berisi sel HeLa dipapar ekstrak etanol batang benalu mangga dengan konsentrasi 200 $\mu\text{g/ml}$. Diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C , 5% CO_2 .

4.6.5 Pengecatan Imunohistokimia

Pengecatan imunohistokimia dilakukan untuk membedakan antara sel HeLa yang mengandung caspase-3 aktif dengan yang tidak. Pengecatan ini juga digunakan untuk membandingkan jumlah sel HeLa yang mengandung protein caspase-3 aktif pada variasi dosis yang berbeda sehingga perbedaan efektifitas antar dosis dapat diamati. Imunohistokimia dilakukan berdasarkan protokol dari Laboraturium Biokimia Universitas Brawijaya.

Hari pertama :

1. Setelah dilakukan paparan dan diinkubasi, sel yang berada dalam sumuran dicuci dengan cara diberi larutan PBS hingga terendam selama 5 menit kemudian dibuang. Pencucian dilakukan sebanyak tiga kali.
2. Sel di-*blocking* dengan campuran FBS 1%, Triton X-100 0,25%, serta PBS selama 1 jam.

3. Sel dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3 kali, masing- masing 5 menit.
4. Sel diberi antibodi primer (antibodi caspase-3 aktif) yang diencerkan dalam PBS dan FBS 1%.
5. Sel diinkubasi semalam pada suhu 4 ° C

Hari kedua:

6. Sel dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali, masing- masing 5 menit.
7. Sel di-*blocking* dengan H₂O₂ 3%
8. Sel dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali, masing- masing 5 menit
9. Sel diberi antibodi sekunder yang dilarutkan dalam PBS dengan perbandingan 1:500. Didiamkan selama 20 menit.
10. Sel dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali, masing- masing 5 menit
11. Sel diberi SA-HRP, didiamkan selama 40 menit.
12. Sel dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali, masing- masing 5 menit
13. Sel dicuci dengan akuades selama 3 menit. Akuades berfungsi agar DAB dapat bekerja dengan lebih optimal.
14. Sel diberi DAB, didiamkan selama 20 menit.
15. Sel dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali, masing- masing 5 menit
16. Dilakukan *counterstaining* menggunakan *mayer hematoxilen* dan diinkubasi selama 10 menit. Kemudian dicuci menggunakan air keran.
17. Dil

akukan dehidrasi, dibersihkan dan dilakukan mounting. Pengamatan dan penghitungan sel dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Sel yang dihitung adalah sel yang mengandung caspase-3 aktif yaitu yang tampak berwarna kecoklatan.

4.7 Analisa Data

Untuk menentukan uji analisa data yang akan digunakan, dilakukan uji normalitas dan homogenitas data. Apabila data bersifat parametrik serta sebaran data normal dan homogen, analisa data statistika dilakukan dengan menggunakan uji *One way Anova* dan uji korelasi *Pearson*.

1. Uji *One way Anova*

Uji *One way Anova* adalah analisis varian untuk satu variabel independen. Analisis varian satu variabel independen digunakan untuk menentukan apakah rata-rata dua atau lebih kelompok berbeda secara nyata.

2. Uji korelasi *Pearson*

Uji korelasi *Pearson* digunakan untuk mengetahui adanya hubungan yang bermakna antara peningkatan konsentrasi ekstrak batang benalu mangga dengan jumlah sel HeLa yang mengandung protein caspase-3 aktif. Arah dan besarnya hubungan tersebut dapat dilihat pada nilai *pearson correlation*.

Rumus uji korelasi *pearson* adalah:

$$r = \frac{n \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{(n \sum (X)^2 - (\sum X)^2) (n \sum (Y)^2 - (\sum Y)^2)}}$$

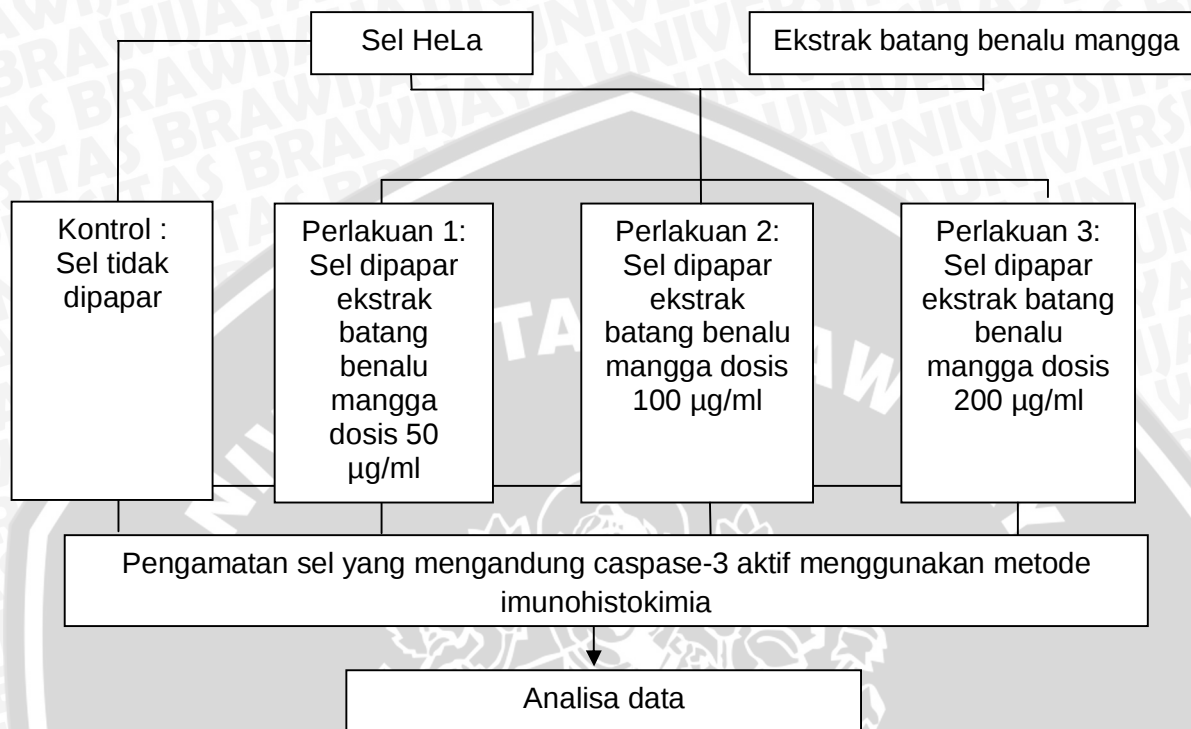
Keterangan:

r = koefisien korelasi

x = nilai variabel pertama

y = nilai variabel kedua (Ardra.biz, 2013).

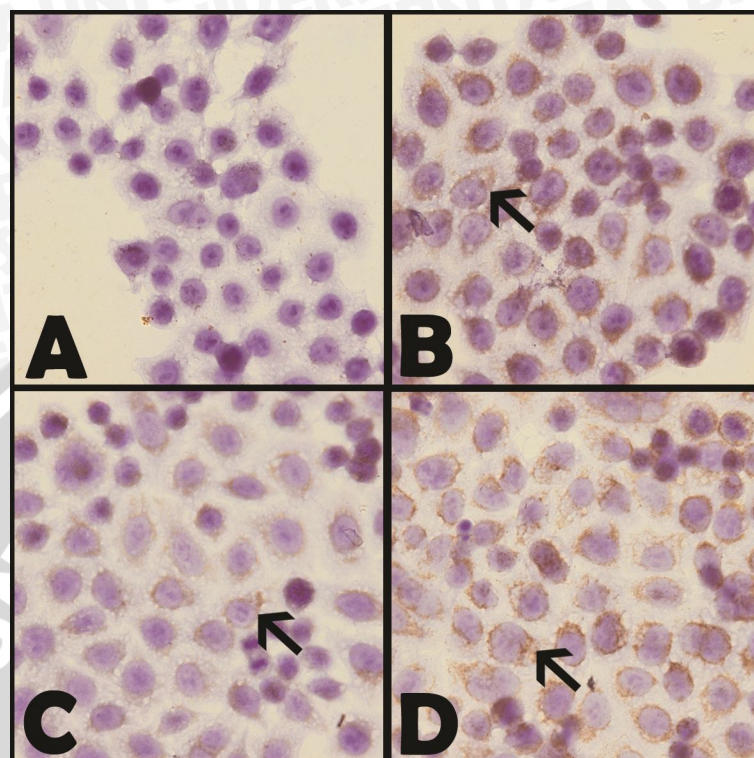
4.8 Alur Penelitian



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian ini menggunakan sel HeLa dari Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya yang disubkultur ke dalam 24 *well plate*. Sel dibagi dalam empat kelompok dimana masing-masing terdiri atas enam pengulangan. Pada kelompok kontrol, sel HeLa tidak diberi perlakuan. Sedangkan pada kelompok perlakuan diberikan ekstrak batang benalu mangga dalam tiga konsentrasi yang berbeda, yaitu 50 µg/ml, 100 µg/ml, dan 200 µg/ml. Penentuan dosis didasarkan pada penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh peneliti. Setelah diberi perlakuan, kultur sel diinkubasi dalam inkubator dalam suhu 37°C, 5% CO₂ selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan imunohistokimia untuk mengamati dan menghitung sel HeLa yang mengandung protein caspase-3 aktif. Imunohistokimia dilakukan dengan menggunakan antibodi caspase-3 aktif.



Gambar 5.1. Pengecatan Imunohistokimia pada sel HeLa setelah perlakuan. (A) Kontrol, yaitu sel HeLa tanpa perlakuan (B) Sel HeLa dengan ekstrak konsentrasi 50 µg/ml. Panah hitam menunjukkan warna kecokelatan pada sel, mengindikasikan adanya caspase-3 aktif di dalam sel HeLa. Jumlah sel yang berwarna kecokelatan terlihat cukup banyak (C) Sel HeLa dengan ekstrak konsentrasi 100 µg/ml. Pada dosis ini juga terdapat sel yang berwarna kecokelatan, namun tidak sebanyak gambar B dan D (D) Sel HeLa dengan ekstrak konsentrasi 200 µg/ml. Terlihat hampir seluruh sel berwarna kecokelatan. Foto diambil menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

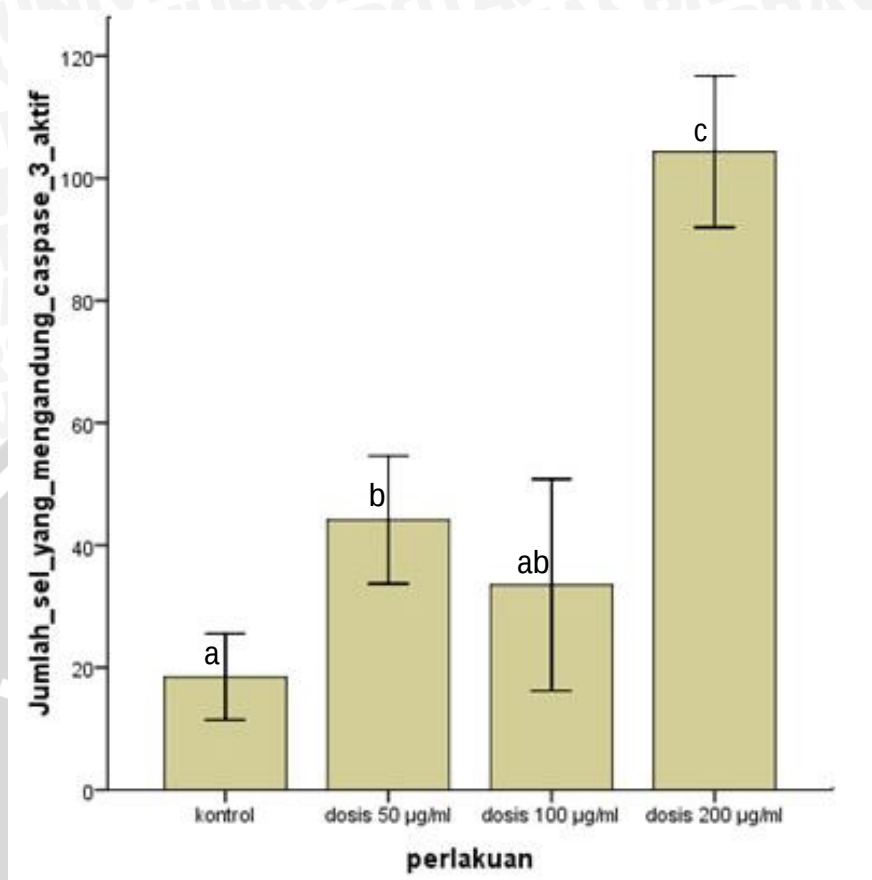
Penghitungan dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel HeLa yang mengandung caspase-3 aktif pada setiap lapang pandang. Caspase-3 aktif dapat dilihat dari warna sel yang kecoklatan. Setiap perlakuan dihitung sebanyak 5x lapang pandang dengan pembesaran 400x. Hasil penghitungan dari 6 pengulangan dapat dilihat pada tabel 5.1.

**Tabel 5.1 Rata-Rata Jumlah Sel HeLa dalam 5 Lapang Pandang
yang Mengandung Caspase-3 Aktif**

Kelompok Perlakuan	Rerata $\pm$ SD
Kontrol	21.83 $\pm$ 6.080
Ekstrak batang benalu mangga dosis 50 μ g/ml	37.33 $\pm$ 7.090
Ekstrak batang benalu mangga dosis 100 μ g/ml	25.33 $\pm$ 9.730
Ekstrak batang benalu mangga dosis 200 μ g/ml	111.67 $\pm$ 11.325

Hasil penghitungan tersebut dapat digambarkan dalam diagram batang pada gambar 5.2.





Gambar 5.2 Diagram Rata-Rata Jumlah Sel HeLa dalam 5 Lapang Pandang yang Mengandung Caspase-3 Aktif. Abjad a, b, dan ab merujuk pada uji homogenitas subset (lampiran 7) dengan nilai $\alpha = 0,05$. Notasi yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan.

Dari diagram pada gambar 5.2, terlihat adanya pengaruh dari pemberian ekstrak batang benalu mangga terhadap jumlah sel HeLa yang mengandung protein caspase-3 aktif. Jumlah sel dengan protein caspase-3 aktif mengalami peningkatan pada semua kelompok perlakuan.

Analisis *one-way Anova* menggunakan program *SPSS 16 for Windows* dilakukan untuk mengetahui perbedaan peningkatan jumlah sel HeLa yang mengandung caspase-3 aktif antara kelompok perlakuan. Analisis *one-way Anova* (lampiran 4) menunjukkan bahwa pada dosis 50 µg/ml terjadi peningkatan

signifikan jumlah sel yang mengandung caspase-3 aktif. Pada dosis 100 $\mu\text{g/ml}$, walaupun meningkat dibandingkan kontrol namun mengalami penurunan dibandingkan dosis 50 $\mu\text{g/ml}$ sehingga nilai yang didapat tidak signifikan. Peningkatan jumlah sel yang sangat tajam dan signifikan didapatkan pada kelompok perlakuan dosis 200 $\mu\text{g/ml}$. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak batang benalu mangga dapat meningkatkan jumlah sel HeLa yang mengandung protein caspase-3 aktif pada dosis 50 $\mu\text{g/ml}$ dan dapat meningkatkan dengan tajam pada dosis 200 $\mu\text{g/ml}$.

Uji korelasi Pearson digunakan untuk mengetahui apakah terdapat hubungan antara pemberian ekstrak batang benalu mangga terhadap jumlah sel HeLa yang mengandung protein caspase-3 aktif. Dari uji korelasi Pearson (lampiran 6) didapatkan nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,01$) yang menunjukkan terdapat korelasi bermakna antara perlakuan dan jumlah sel HeLa yang mengandung protein caspase-3 aktif. Nilai korelasi sebesar 0,752 menunjukkan terdapat korelasi positif dengan kekuatan korelasi yang kuat.

BAB VI

PEMBAHASAN

Kanker serviks merupakan kanker yang dipicu oleh infeksi dari *human papilloma virus* (HPV). Onkoprotein E6 dan E7 dari HPV meregulasi siklus pertumbuhan sel hospes dengan mengikat protein p53 dan Retinoblastoma (Rb) (Gómez and Santos, 2007). Jalur p53 sangat penting dalam menjaga stabilitas sel karena merupakan penjaga gerbang program *senescence* serta dapat menginduksi apoptosis. P53 dapat menginduksi apoptosis dengan meningkatkan ekspresi dan translokasi Bax menuju membran mitokondria (Feng *et al*, 2007). Gangguan pada proses apoptosis dapat menyebabkan sel mengalami progresi tumor dan kemoresisten (Fridwan and Lowe, 2003; Feng *et al.*, 2007).

Ikatan E6 menyebabkan mutasi gen pengekspresi protein P53 sehingga aktivitas normal P53 yang memerintahkan sel yang mengalami kerusakan genetik untuk masuk ke dalam fase G1 *arrest*, perbaikan DNA, dan apoptosis dihambat (Gómez and Santos, 2007). Mutasi P53 berakibat pada peningkatan kecepatan poliferasi dan ketidakstabilan genom. Konsekuensinya, sel hospes mengakumulasi lebih banyak kerusakan DNA yang tidak dapat diperbaiki, yang dapat berubah menjadi sel kanker.

Penelitian kami lakukan untuk membuktikan apakah ekstrak batang benalu mangga yang mengandung kuersetin dalam jumlah tinggi dapat menyebabkan apoptosis sel HeLa yang ditandai dengan adanya caspase-3 aktif, suatu protein eksekutor apoptosis. Hasil perhitungan pada tabel 5.1 memperlihatkan bahwa terbukti terdapat peningkatan jumlah sel HeLa yang

mengandung caspase-3 aktif pada paparan ekstrak batang benalu mangga. Peningkatan tersebut lebih jelas terlihat pada diagram batang yang terdapat pada gambar 5.2.

Berbagai penelitian telah membuktikan bahwa kuersetin memiliki efek menginduksi apoptosis pada berbagai jenis sel kanker. Kuersetin mampu meregulasi ekspresi protein anggota famili Bcl-2, protein yang berperan penting dalam apoptosis jalur intrinsik. Kuersetin meningkatkan ekspresi protein pro apoptosis Bax, menurunkan ekspresi protein anti apoptosis Bcl-2, serta meningkatkan level dan aktivitas caspase-3 dan caspase-9 pada berbagai macam sel kanker (Ting-xiu *et al* 2006; Granado-Serrano *et al*, 2006; Jaganathan and Mandal, 2009; Chien *et al*, 2009, Niu *et al*, 2010).

Mekanisme regulasi protein anggota famili Bcl-2 oleh kuersetin tampaknya dimediasi oleh efek kuersetin terhadap ekspresi protein P53. Penelitian yang dilakukan pada sel kanker payudara yang dipapar kuersetin menunjukkan bahwa terdapat hambatan proses translasi mRNA protein P53 mutan. Kuersetin tampak hanya mengintervensi sel secara spesifik pada jalur protein P53 mutan, bukan mengganggu sintesis protein secara umum (Avila *et al*, 1994). Di sisi lain, kuersetin menginduksi peningkatan ekspresi protein P53 normal. Penelitian yang dilakukan oleh Kuo (2004) menunjukkan terjadi peningkatan ekspresi P53 pada sel karsinoma paru yang dipapar kuersetin. Penurunan ekspresi protein P53 mutan dan peningkatan ekspresi protein P53 normal dapat menginduksi apoptosis melalui peningkatan ekspresi Bax. Seperti diketahui, P53 mampu mengontrol transkripsi dari Bax, anggota protein proapoptosis famili Bcl-2. (Dewson and Cluck, 2010).

Peningkatan rasio protein pro apoptosis terhadap protein anti apoptosis anggota famili Bcl-2 memicu terjadinya apoptosis melalui jalur intrinsik atau mitokondria. Protein pro apoptosis Bax akan mengalami perubahan konformasi dan asosiasi menjadi oligomer besar yang mampu meningkatkan permeabilitas membran mitokondria dengan membentuk *proteinaceous pore*. Kadar protein Bcl-2 yang lebih rendah dibandingkan Bax mengakibatkan Bcl-2 kurang sufisien dalam menghambat oligomerisasi Bax. Peningkatan permeabilitas membran mitokondria menyebabkan protein pro apoptosis sitokrom c dilepaskan dari mitokondria ke sitoplasma. Sitokrom c berinteraksi dengan Apaf-1 dan proenzim caspase-9. Caspase-9 yang teraktivasi akibat dimerisasi dalam apoptosom kemudian memecah caspase-3 sehingga terjadi peningkatan kadar caspase-3 aktif yang terdiri dari subunit p17 dan p12. Caspase-3 aktif selanjutnya memecah berbagai macam substrat baik sitoplasmik maupun nuklear (Brauns *et al.*, 2005). Pemecahan ini menyebabkan terjadinya perubahan morfologis pada sel yang mengalami apoptosis yaitu penyusutan sel, blebbing, kondensasi kromatin, dan fragmentasi DNA (Porter and Janicke, 1999).

Pada dosis 100 µg/ml peningkatan jumlah sel yang mengandung caspase-3 aktif sedikit menurun dibandingkan dengan dosis 50 µg/ml. Yang menarik, pola penurunan ini mirip dengan penelitian serupa yang menggunakan daun benalu mangga yang dilakukan oleh Rachmawati (2013), di mana pada paparan ekstrak daun benalu mangga dosis 100 µg/ml juga terjadi peningkatan jumlah sel yang mengandung caspase-3 aktif tetapi tidak signifikan dosis 50 µg/ml. Hasil ini juga mirip dengan penelitian yang dilakukan oleh Granado-Serrano (2006) yang menunjukkan kuersetin meningkatkan ekspresi caspase-3

aktif pada sel kanker hepatoma hingga dosis 50 $\mu\text{mol/L}$, akan tetapi ekspresi tersebut mengalami penurunan pada dosis di atasnya, yakni 75 dan 100 $\mu\text{mol/L}$.

Ada dua kemungkinan yang menyebabkan peningkatan jumlah sel HeLa yang mengandung caspase-3 aktif pada dosis 100 $\mu\text{g/ml}$ sedikit lebih rendah dibandingkan dosis 50 $\mu\text{g/ml}$. Kemungkinan yang pertama adalah terjadinya bias atau error pada metodologi, dan yang kedua adalah adanya mekanisme pertahanan sel kanker dalam melawan induksi apoptosis.

Telah lama diketahui bahwa sel kanker memiliki mekanisme pertahanan alami maupun adaptif. Pada penelitian ini, diduga terjadi mekanisme alami pertahanan sel kanker melawan apoptosis pada dosis tertentu, dan pada dosis yang ekstrem, pertahanan tersebut tidak dapat berlangsung.

Salah satu mekanisme survival alami sel kanker terhadap induksi apoptosis adalah aktivasi jalur phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt. Kokubo *et al* (2005) melaporkan adanya aktivasi Akt pada sel karsinoma paru yang baru pertama kali dipapar kemoterapi gefitinib. Aktivasi jalur PI3K-Akt pada sel kanker disebabkan adanya mutasi pada gen PIK3CA dan PIK3R1. Signaling PI3K-Akt berefek pada pertumbuhan dan survival sel melalui beberapa mekanisme. Akt menyebabkan survival sel melalui penghambatan protein pro apoptosis Bax. Akt juga menghalangi regulasi negatif dari faktor transkripsi NF- κB , sehingga terjadi peningkatan transkripsi gen anti apoptosis dan pro survival. Fosforilasi Mdm2 oleh Akt mengantagonisasi apoptosis yang dimediasi P53, dan Akt meregulasi negatif faktor transkripsi, sehingga mengurangi produksi protein yang menginduksi kematian sel (Courtney *et al.*, 2010).

Dosis 200 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan peningkatan tajam jumlah sel HeLa yang mengandung caspase-3 aktif. Hal ini memicu timbulnya pertanyaan apakah pada dosis ini terdapat mekanisme lain yang juga dapat menginduksi kematian pada sel normal. Oleh karena diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efek konsentrasi ekstrak batang benalu mangga yang tinggi terhadap sel normal.

Kemampuan benalu dalam memicu apoptosis sel kanker HeLa ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Saifillah (2010) di mana paparan ekstrak batang benalu randhu, benalu yang satu spesies dengan benalu mangga mangga (*Dendrophthoe pentandra*) namun berbeda inang, dapat mengurangi jumlah sel HeLa yang mengandung protein P53 mutan. Selain itu, secara umum, hasil penelitian ini juga mirip dengan penelitian serupa yang menggunakan daun benalu mangga yang dilakukan oleh Rachmawati (2013). Paparan daun benalu mangga dengan dosis 50, 100, dan 200 $\mu\text{g/ml}$ dapat meningkatkan jumlah sel HeLa yang mengandung caspase-3 aktif. Rata-rata jumlah sel yang mengandung caspase-3 aktif per 100 sel pada kelompok kontrol sebanyak 13 sel, dan pada dosis 50, 100, dan 200 $\mu\text{g/ml}$ berturut-turut meningkat menjadi 19, 15, dan 23 sel. Hal ini membuktikan bahwa baik batang maupun daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) memiliki kemampuan untuk menginduksi apoptosis pada sel HeLa.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah :

1. Ekstrak batang benalu mangga meningkatkan jumlah sel HeLa yang mengandung caspase-3 aktif ($p < 0,005$).
2. Terdapat hubungan yang signifikan antara peningkatan dosis ekstrak batang benalu mangga dengan peningkatan jumlah sel HeLa yang mengandung caspase-3 aktif ($r=0,752$).

7.2 Saran

1. Dibutuhkan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh ekstrak batang benalu mangga terhadap sel normal terutama pada dosis 200 $\mu\text{g/ml}$ di mana terjadi peningkatan jumlah sel HeLa yang mengandung caspase-3 aktif yang tajam.
2. Dibutuhkan uji toksikologi untuk mengetahui efek samping yang mungkin timbul pada manusia setelah mengonsumsi ekstrak batang benalu mangga.
2. Dibutuhkan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis yang paling efektif untuk mengeradikasi kanker serviks pada manusia. Sehingga harapannya batang benalu mangga dapat dimanfaatkan sebagai agen terapi kanker serviks yang murah dan mudah didapat.

DAFTAR PUSTAKA

- American Joint Committee on Cancer (AJCC). 2010. Cervix Uteri. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer, pg395-40.
- Ardra.biz. Korelasi Kurs Valuta Asing Berdasarkan Nilai Koefisien Korelasi Momen-Produk Pearson (online), <http://ardra.biz/ekonomi/korelasi-kurs-valuta-asing/koefisien-korelasi-kurs>. Diakses tanggal 27 Februari 2013.
- Artanti, N., Widiyawati, R., dan Fajriyah, S. 2009. Aktivitas dan Toksisitas Ekstrak Air dan Etanol Batang Benalu (*Dendrophthoe pentandra* L. Miq) yang Tumbuh pada Berbagai Inang. LIPI. JKTI, Vol 11, No. 1.
- Avila, M.A., Velasco, J.A., Cansado, J., and Notarlo, V. 1994. Quercetin Mediates the Down-Regulation of Mutant p53 in the Human Breast Cancer Cell Line MDA-MB468. *Cancer Research*, 54:2424-2428.
- Barkett M and Gilmore TD. 1999. *Control of Apoptosis by Rel/NF-kappaB Transcription Factors*. Boston University, 18(49):6910-24.
- Blumenthal, PD, dan McIntosh, Noel. 2005. *Cervical Cancer Prevention, Guidelines For Low-Resources Settings*. Page 3-8.
- Boardman, CH. 2012. Cervical Cancer, (online), <http://emedicine.medscape.com/article/253513-overview#a0104>. Diakses tanggal 26 Juni 2012.
- Brauns, S.C., Dealtry, G., Milne, P., Naude, R., and De Venter, M.V. 2005. Caspase-3 Activation and Induction of PARP Cleavage by Cyclic Dipeptide Cyclo(Phe-Pro) in HT-29 Cells. *Anticancer Research*, 25: 4197-4202.
- Chien, S., et al. 2009. Quercetin-Induced Apoptosis Acts Through Mitochondrial and Caspase-3-Dependent Pathways in Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells. *Hum Exp Toxicol*, 28: 493.
- Courtney, KD, Corcoran, RB, dan Engelman, JA. 2010. The PI3K Pathway as A Drug Target in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(6): 1075-1083.
- Cox R. 1994. Mechanism of Radiation Oncogenesis. *International Journal of Radiation Bioogy*, 65:57-64.
- Darmawan, Akhmad dan Artanti, Nina. 2006. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Antioksidan dari Ekstrak Air Batang Benalu (*Dendrophthoe pentandra* L. Miq.) yang Tumbuh pada Cemara (*Casuarina* sp.). LIPI. Kawasan Puspiptek Serpong-Banten.
- Lamson, D.W. and Brignall, M.S. 2000. Antioxidants and Cancer III:Quercetin. *Alternative Medicine Review*, 5(3):196-208.

- Degterev, A., Boyce, M., and Yuan, J. 2003. A Decade of Caspases. *Oncogene*, 22:8543–8567.
- Devi, P. Uma. 2001. *Basic of Carsinogenesis*. Health Administrator. XIVV (1) : 16-24.
- Dewson, G. and Kluck, R.M. 2010. Bcl-2 Family-Regulated Apoptosis in Health and Disease. Journal review. *Cell Health and Cytoskeleton* 2010:2.
- Elmore, Susan. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4):495-516.
- Fauci, Antony S. et al.. 2008. Harrison's Internal Medicine. Edisi ke 7. *Chapter* 93.
- Feng, Wei, et al. 2007. Senescence and Apoptosis in Carcinogenesis of Cervical Squamous Carcinoma. *Modern Pathology* (2007) 20, 961–966.
- Fridman, J.S. and Lowe S.W. 2003. Control of Apoptosis by P53. *Oncogene* 22:9030–9040.
- Ghobrial, Irene M. et al. 2005. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *American Cancer Society*. 55: 178-194.
- Gibellini, Lara et al.,. 2011. Quercetin and Cancer Chemoprevention. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume* .Article ID 591356.
- Gómez, D.T. and Santos, J.L. 2007. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Pathogenesis And Epidemiology. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, A. Méndez-Vilas (Ed.)
- Granado-Serrano, A. B., Martín, M.A., Bravo, L., Goya, L., and Ramos, S. 2006. Quercetin Induces Apoptosis via Caspase Activation, Regulation of Bcl-2, and Inhibition of PI-3-Kinase/Akt and ERK Pathways in a Human Hepatoma Cell Line (HepG2). *The Journal of Nutrition, Biochemical, Molecular, and Genetic Mechanisms*.: 2715-2721.
- Han, Z., Hendrickson E.A., Bremner, T.A., and Wyche, J.H. 1997. A Sequential Two-Step Mechanism for the Production of the Mature p17:p12 Form of Caspase-3 in Vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 272:13432-13436.
- Hart I.R. and Saini I. 1992. *Biology of Tumor Metastasis*. Lancet, 339:1453-1457.
- Ikawati, M., Wibowo, A. E., Octa. N.S., dan Adelina, S., 2008. Pemanfaatan Benalu Sebagai Agen Antikanker. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Jaganathan, S.K. and Mandal, Mahitosh. 2009. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Volume 2009.

- Jan, AT., Kamli, M.R., Murtaza, Imtiyaz, Singh, J.B., Ali, Arif, and Haq, M.R. 2010. Dietary Flavonoid Quercetin and Associated Health Benefits—An Overview.
- Kokubo, Y *et al.* 2005. Reduction of PTEN Protein and Loss of *Epidermal Growth Factor Receptor* Gene Mutation in Lung Cancer with Natural Resistance to Gefitinib (IRESSA). *British Journal of Cancer* 92(9): 1711–1719.
- Kuo, Pao-Chen, Liu, Huei-Fang, and Chao, Jui-I. 2004. Survivin and p53 Modulate Quercetin-induced Cell Growth Inhibition and Apoptosis in Human Lung Carcinoma Cells. *The Journal Of Biological Chemistry*, 279(53):55875–55885.
- Lee, Y.K., Park, S.Y., Kim, Y.M., Lee, W.S., and Park, O.J. 2009. AMP Kinase/Cyclooxygenase-2 Pathway Regulates Proliferation and Apoptosis of Cancer Cells Treated with Quercetin. *Exp Mol Med*, 41: 201 – 207.
- Martin-Hirsch, Pierre, L., and Wood, N.J. 2011. Cervical Cancer. *Clinical Evidence*, 07: 818.
- NHS. 2008. Management of Cervical Cancer, A National Clinical Guideline. *Scottish Intercollegiate Guidelines Network*.
- Niu, Guomin, *et al.* 2011. Quercetin Induces Apoptosis by Activating Caspase-3 and Regulating Bcl-2 and Cyclooxygenase-2 Pathways in Human HL-60 Cells. *Acta Biochim Biophys Sin* (43): pg 37.
- Porter A.G. and Janicke, R.U. 1999. Emerging Roles of Caspase-3 in Apoptosis. *Journal review. Cell Death and Differentiation*, 6:99-104.
- Rachmawati, Aprillia E.V. 2013. Pengaruh Ekstrak Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) terhadap Viabilitas dan Ekspresi Protein Caspase-3 Aktif pada Sel Kanker Serviks (Sel HeLa). Tugas Akhir. FK UB, Malang.
- Rosidah, S. Yulinah ,Elin, S. Gana. 1999. Uji Aktivitas Antiradang pada Tikus Galur Wistar dan Telaah Fitokimia Ekstrak Batang Babadotan dan Ekstrak Rimpang Jahe. <http://bahan-alam.fa.itb.ac.id>. Diakses pada tanggal 26 Juni 2012.
- Saifillah, Efriko Septananda. 2010. Potensi Ekstrak Batang Benalu Randu (*Dendrophthoe pentandra*) Terhadap Penurunan Ekspresi Protein P53 Mutan pada Sel Kanker Serviks (Sel Hela) Secara in Vitro. Tugas Akhir. FKUB, Malang.
- Slee, E.A., Adrain C., and Martin S.J. 2001. Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-Redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. *J Biol Chem*, 276:7320–7326.
- Steben, M. and Duarte-Franco, E. 2007. Human Papillomavirus Infection: Epidemiology and Pathophysiology. *Gynecologic Oncology* 107 S2–S5.

- Sunaryo dan Rachman, Erlin. 2007. Keanekaragaman jenis Benalu Parasit Pada Tanaman Koleksi di Kebun Raya Eka Karya, Bali. Bogor. *Berk. Penel. Hayati* : 13 (1-5).
- Sunaryo. 2008. Pemasaran Benalu *Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq. pada Tanaman Koleksi Kebun Raya Cibodas, Jawa Barat. *Jurnal Natur* 11(1) : 48-58.
- Supranto, J. 2000. Teknik Sampling untuk Survei dan Eksperimen. Penerbit PT Rineka Cipta, Jakarta.
- Takeichi, M. 1993. *Cadherin* Cell Adhesion Receptors Asa Morphogenetic Regulator. *Science*, 251:1455.
- Tim Kanker-Serviks.net. 2010. Panduan Lengkap Menghadapi Bahaya Kanker Serviks.
- Ting-xiu, X., Xiao-hong, T., Zheng, J., and Pi-long, W. 2006. Effects of Quercetin on Proliferation of Gastric Cancer Lines BGC823 and the Expression of p53, Bcl-2/Bax and PCNA. *Laser Journal*.
- UNSCEAR. 1993. Sources and Effects of Ionizing Radiation. Vol II, Effects. United Nations Scientific Committee on the Effect Atomic Radiation, 1993 Report to the General Assembly. United Nation, New York.
- UNSCEAR. 2000. Sources and Effects of Ionizing Radiation. Vol II, Effects. United Nations Scientific Committee on the Effect Atomic Radiation, 2000 Report to the General Assembly. United Nation, New York.
- Vargas, A.J. and Burd, Randy. 2010. Hormesis and Synergy: Pathways and Mechanisms of Quercetin in Cancer Prevention and Management. *Nutrition Reviews*, 68(7):418–428.
- Vidya, P.R., Senthil, M.R., Maitreyi, S., Ramalingam, K., Karunakaran, D., and Nagini, S. 2010. The Flavonoid Quercetin Induces Cell Cycle Arrest and Mitochondria-Mediated Apoptosis in Human Cervical Cancer (Hela) Cells Through P53 Induction and NF-Kb Inhibition. *Eur J Pharmacol*, 649(1-3):84-91.
- WHO. 2010. Human Papillomavirus and Related Cancer. WHO/ICO HPV information Centre. Edisi ke 3.
- WHO. 2011. Cancer (online), <http://www.who.int/cancer/en/>. Diakses pada tanggal 25 Januari 2012.
- Yoshida, K., Sasaki, R., Nishimura, H., Miyawaki D., and Sugimura K. 2012. Cervical Cancer Treatment in Aging Women. *Topics on Cervical Cancer with an Advocacy for Prevention*. Hyogo, Japan: Kobe University Graduate School of Medicine.

Lampiran 1

Hasil perhitungan sel

Perlakuan	Pengulangan						Rata-rata sel
	1	2	3	4	5	6	
Kontrol	20	21	17	15	31	27	18
dosis 50 $\mu\text{g/ml}$	32	36	35	32	51	38	44
dosis 100 $\mu\text{g/ml}$	34	21	19	18	19	41	33
dosis 200 $\mu\text{g/ml}$	106	110	99	106	131	118	104



Lampiran 2

Uji normalitas *Shapiro-wilk*

Tests of Normality

Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
.221	6	.200 [*]	.940	6	.661
.296	6	.109	.779	6	.037
.339	6	.030	.777	6	.036
.225	6	.200 [*]	.920	6	.509

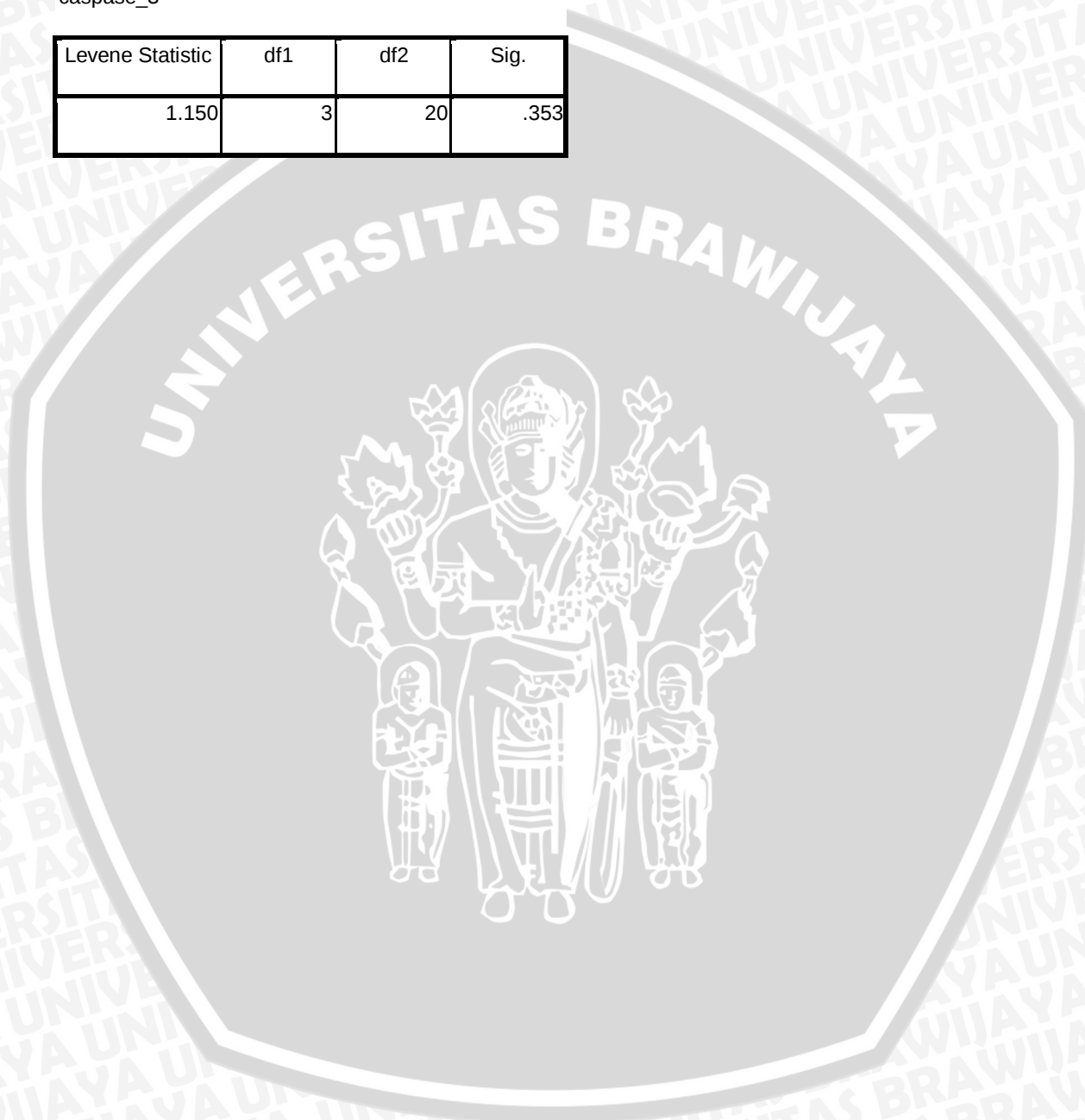


Lampiran 3

Uji homogenitas varians

caspace_3

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.150	3	20	.353



Lampiran 4

Uji One-way Anova

ANOVA

caspase_3					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	32168.125	3	10722.708	138.283	.000
Within Groups	1550.833	20	77.542		
Total	33718.958	23			



Lampiran 5

uji Post Hoc Multiple comparison (Tukey HSD)

Multiple Comparisons

caspase_3

Tukey HSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	dosis 50	-15.500 [*]	5.084	.030	-29.73	-1.27
	dosis 100	-3.500	5.084	.900	-17.73	10.73
	dosis 200	-89.833 [*]	5.084	.000	-104.06	-75.60
dosis 50	kontrol	15.500 [*]	5.084	.030	1.27	29.73
	dosis 100	12.000	5.084	.118	-2.23	26.23
	dosis 200	-74.333 [*]	5.084	.000	-88.56	-60.10
dosis 100	kontrol	3.500	5.084	.900	-10.73	17.73
	dosis 50	-12.000	5.084	.118	-26.23	2.23
	dosis 200	-86.333 [*]	5.084	.000	-100.56	-72.10
dosis 200	kontrol	89.833 [*]	5.084	.000	75.60	104.06
	dosis 50	74.333 [*]	5.084	.000	60.10	88.56
	dosis 100	86.333 [*]	5.084	.000	72.10	100.56

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

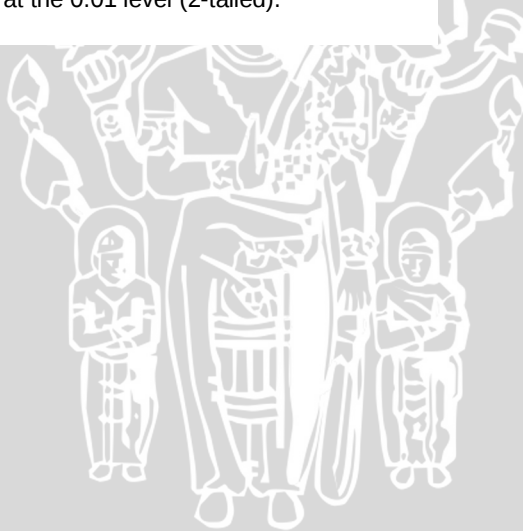
Lampiran 6

uji korelasi *Pearson*

Correlations

		perlakuan	caspase_3
perlakuan	Pearson Correlation	1	.752**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	24	24
caspase_3	Pearson Correlation	.752**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	24	24

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



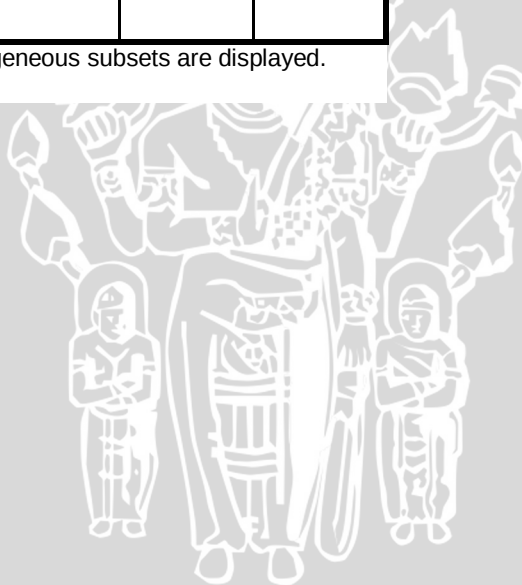
Lampiran 7

Uji homogenitas subset

Duncan

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol	6	18.50		
dosis 100	6	33.50	33.50	
dosis 50	6		44.17	
dosis 200	6			104.33
Sig.		.174	.328	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.





PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Zakiya Zulaifah

NIM : 0910710140

Program Studi : Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya,

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya aku sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 20 Februari 2013

Yang membuat pernyataan,

(Zakiya Zulaifah)

NIM. 0910710140