

**KOMBINASI PULSASI LISTRIK DAN ASPIRIN SEBAGAI
PENGINDUKSI APOPTOSIS *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
(PBMK) DARI PASIEN LEUKEMIA AKUT MELALUI JALUR PENG-
HAMBATAN *B cell lymphocyte 2* (Bcl-2)**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



Oleh:

Taurina Windyaswara Subagyo

NIM: 105070100111058

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2013

HALAMAN PERSETUJUAN

TUGAS AKHIR

KOMBINASI PULSASI LISTRIK DAN ASPIRIN SEBAGAI
PENGINDUKSI APOPTOSIS *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
(PBMC) DARI PASIEN LEUKEMIA AKUT MELALUI JALUR PENG-
HAMBATAN *B cell lymphocyte 2* (Bcl-2)

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran

Oleh :

Taurina Windyaswara Subagyo

NIM: 105070100111058

Menyetujui untuk diuji:

Pembimbing I

Pembimbing II

dr.Maimun Z Arthamin, M.Kes Sp.PK
NIP. 19700526 199702 2 005

Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes
NIP. 19550512 1987012 001

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

KOMBINASI PULSASI LISTRIK DAN ASPIRIN SEBAGAI
PENGINDUKSI APOPTOSIS *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
(PBMC) DARI PASIEN LEUKEMIA AKUT MELALUI JALUR PENG-
HAMBATAN *B cell lymphocyte 2 (Bcl-2)*

Oleh :

Taurina Windyaswara Subagyo

NIM: 105070100111058

Telah diuji pada:

Hari : Jumat

Tanggal: 15 November 2013

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

dr. Habiba Aurora, M.Biomed

NIP. 19840628 200812 2 003

Penguji II

Penguji III

dr.Maimun Z Arthamin, M.Kes Sp.PK
NIP. 19700526 199702 2 005

Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes
NIP. 19550512 198701 2 001

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kedokteran

Prof.Dr.dr.Teguh W. Sardjono DTM& H, MSc, SpPark
19520410 198002 1 001

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum wr. wb.

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas rahmat, karunia, serta hidayah yang senantiasa tercurah, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul "Kombinasi Pulsasi Listrik dan Aspirin Sebagai Penginduksi Apoptosis *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) Dari Pasien Leukemia Akut Melalui Jalur Penghambatan *B cell lymphocyte 2* (Bcl-2)". Tak lupa penulis sampaikan shalawat serta salam terhadap junjungan kita Nabi Muhammad Saw.

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. dr. Maimun Z Arthamin, M.Kes Sp.PK selaku dosen pembimbing pertama beserta dr. Syahrul Chilmi yang telah memberikan ide, dukungan dan bantuan, serta membimbing dengan penuh kesabaran.
3. Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes selaku dosen pembimbing kedua beserta dr. Habiba Aurora, M.Biomed selaku penguji yang telah memberikan dukungan dan bantuan, serta membimbing dengan penuh kesabaran.
4. Segenap tim pengelola tugas akhir, terutama DR. Dra. Sri Winarsih, Apt., MSi., dan dr Soemardini, M.Pd.
5. Staf Laboratorium Biomedik dan Faal FKUB atas bantuan dan dukungannya.
6. Yang tercinta ibunda Sri Winanti dan ayahanda Agus Subagyo, kakak tersayang Aswin Indraswara Subagyo, serta yang terkasih Rochman Ananda Arif Saputra atas segala perhatian, kasih sayang, bantuan, dan doa.

7. Teman-teman penulis Kadek Susi, Devi Anggraeni, Hilma Uswatun, Zuly Vita, Dina Fauziah, Malicha Ahyar, Nilfa Kunlavia, Intan Ratnasari, Thalia, dan Ausi Mutiara atas persahabatan dan dukungan dalam segala hal.
8. Teman-teman Pendidikan Dokter FKUB 2010, dan semua teman-teman lainnya atas persahabatan, persaudaraan, dan kenangan indah lainnya.
9. Seluruh pihak yang telah memberikan bantuan moril maupun materiil demi penyelesaian tugas akhir ini, yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Meskipun penulis telah mencurahkan segala kemampuan demi kesempurnaan tugas akhir ini, namun penulis menyadari segala kekurangan dan keterbatasan. Oleh karena itu, saran dan kritik yang membangun merupakan masukan yang sangat berarti demi penyempurnaan karya selanjutnya. Akhirnya, semoga tugas akhir ini dapat menambah wawasan para pembaca.

Wassalamu'alaikum wr. wb.

Malang, 8 November 2013

Penulis

ABSTRAK

Subagyo, Taurina Windyaswara. 2013. *Kombinasi Pulsasi Listrik dan Aspirin Sebagai Penginduksi Apoptosis Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Dari Pasien Leukemia Akut Melalui Jalur Penghambatan B cell lymphocyte 2 (Bcl-2)*. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Maimun Z. Arthamin, M.Kes Sp.PK (2) Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes.

Leukemia akut (LA) merupakan keganasan yang berasal dari sumsum tulang yang ditandai dengan mutasi *tumor protein 53* (tp 53) sehingga proliferasi menjadi tidak terkendali. Terapi yang ada saat ini berupa kemoterapi, terapi steroid, profilaksis sistem saraf pusat untuk pencegahan invasi sel kanker, dan *testicular radiotherapy* dengan angka kekambuhan masih tinggi serta efek samping pada sel sehat. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan efektifitas kombinasi antara pulsasi listrik dan aspirin pada kultur sel mononuklear darah tepi pasien LA. Aspirin dapat mengurangi ekspresi Bcl-2 sebagai protein anti apoptosis melalui penghambatan PGE2. Sedangkan pulsasi listrik bekerja dengan mengubah permeabilitas membran sel yang menyebabkan pembukaan pori membran (elektroporasi). Pulsasi listrik mampu meningkatkan pemasukan aspirin ke dalam sel target sehingga jumlah sel leukemia akut yang mengalami apoptosis juga meningkat. Studi eksperimental menggunakan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* dilakukan terhadap kultur sel mononuklear darah tepi (PBMC) pasien LA. Sampel penelitian adalah PMC pasien LA yang diambil dari Laboratorium Patologi Klinik RSSA dengan studi *ex vivo* yang dibagi dalam empat kelompok, yaitu kelompok "kontrol" ($n = 5$) serta kelompok yang diberi perlakuan pulsasi listrik sebesar 200 Hz selama 5 detik dan aspirin yang terbagi menjadi tiga dosis ($P1 = 2,5 \text{ mmol/L}$; $P2 = 5 \text{ mmol/L}$; $P3 = 10 \text{ mmol/L}$). Variabel yang diukur adalah ekspresi Bcl-2 dengan menggunakan metode imunositokimia. Hasil analisa perhitungan ekspresi Bcl-2 pada keempat kelompok menggunakan ANOVA didapatkan nilai $p = 0,000$ sehingga menunjukkan adanya pengaruh perbedaan bermakna dengan pemberian pulsasi listrik dan aspirin. Terdapat pula hubungan negatif kuat ($r = -0,977$, $r^2 = 0,955$, $p = 0,000$) antara prosentase ekspresi Bcl-2 dan dosis aspirin. Kesimpulan, kombinasi aspirin dan pulsasi listrik dapat meningkatkan jumlah sel leukemia akut yang mengalami apoptosis yang ditandai dengan penurunan ekspresi Bcl-2. Sel leukemia akut yang mengalami apoptosis terbanyak terdapat pada dosis aspirin 10 mmol/L. Hasil tersebut ditunjukkan dengan penurunan ekspresi Bcl-2 yang signifikan ($p = 0,000$)

Kata kunci: Leukemia Akut, pulsasi listrik, aspirin, apoptosis, Bcl-2

ABSTRACT

Subagyo, Taurina Windyaswara. 2013. *The Combination of Electrical Pulsation And Aspirin As An Apoptotic Inductor Of Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Of Patient Acute Leukemia Through Inhibition Of B cell lymphocyte (Bcl-2)*. Final Assignment, Medical Faculty of Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Maimun Z Arthamin, M.Kes Sp.PK (2) Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes

Acute leukemia (AL) is a malignancy derived from bone marrow that is characterized by mutations in *tumor protein 53* (tp 53) so that proliferation had become unmanageable. Current therapies such as chemotherapy, steroid therapy, central nervous system prophylaxis for the prevention of cancer cell invasion, and testicular radiotherapy with recurrence rates are still high and adverse effects on healthy cells. This study aimed to determine the effectiveness a combination of electrical pulses and aspirin in peripheral blood mononuclear cells cultured of patients AL. Aspirin reduced the expressions of Bcl-2 as an anti-apoptotic protein through inhibition of PGE2. Whereas, electrical pulsation worked by changing the cell membrane's permeability which led to the opening of the membrane's pore (electroporation). Electrical pulses increased revenue aspirin into targeted cells so the number of apoptotic acute leukemia cells are rising. Experimental studies used Post Test Only Randomized Controlled Group Design performed on cultured peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of patients LA. The samples were isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of LA patients were taken from the Laboratory of Clinical Pathology in RSSA with ex vivo studies were divided into four groups, namely "kontrol" group (n = 5) as well as the group treated with electric pulses at 200 Hz for 5 seconds and aspirin were divided into three doses (P1 = 2,5 mmol/L; P2 = 5 mmol/L; P3 = 10 mmol/L). The measured variable is the expression of Bcl-2 by using immunocytochemistry. The analysis calculation results of Bcl-2 expression in all four groups using ANOVA values $p = 0,000$ showed significant differences by administering electrical pulses and aspirin. There is also a strong negative relationship ($r = -0,977$, $r^2 = 0,955$, $p = 0,000$) between the percentage of Bcl-2 expression and dose aspirin. As a conclusion, combination of electrical pulsation and aspirin increased the number of apoptotic cells in acute leukemia which marked by reducing of Bcl-2's expression. The highest number of apoptotic cells is in dose 10 mmol/L of aspirin which showed by significant reducing of Bcl-2's expression.

Key words: Acute Leukemia, electrical pulsation, aspirin, apoptotic, Bcl-2

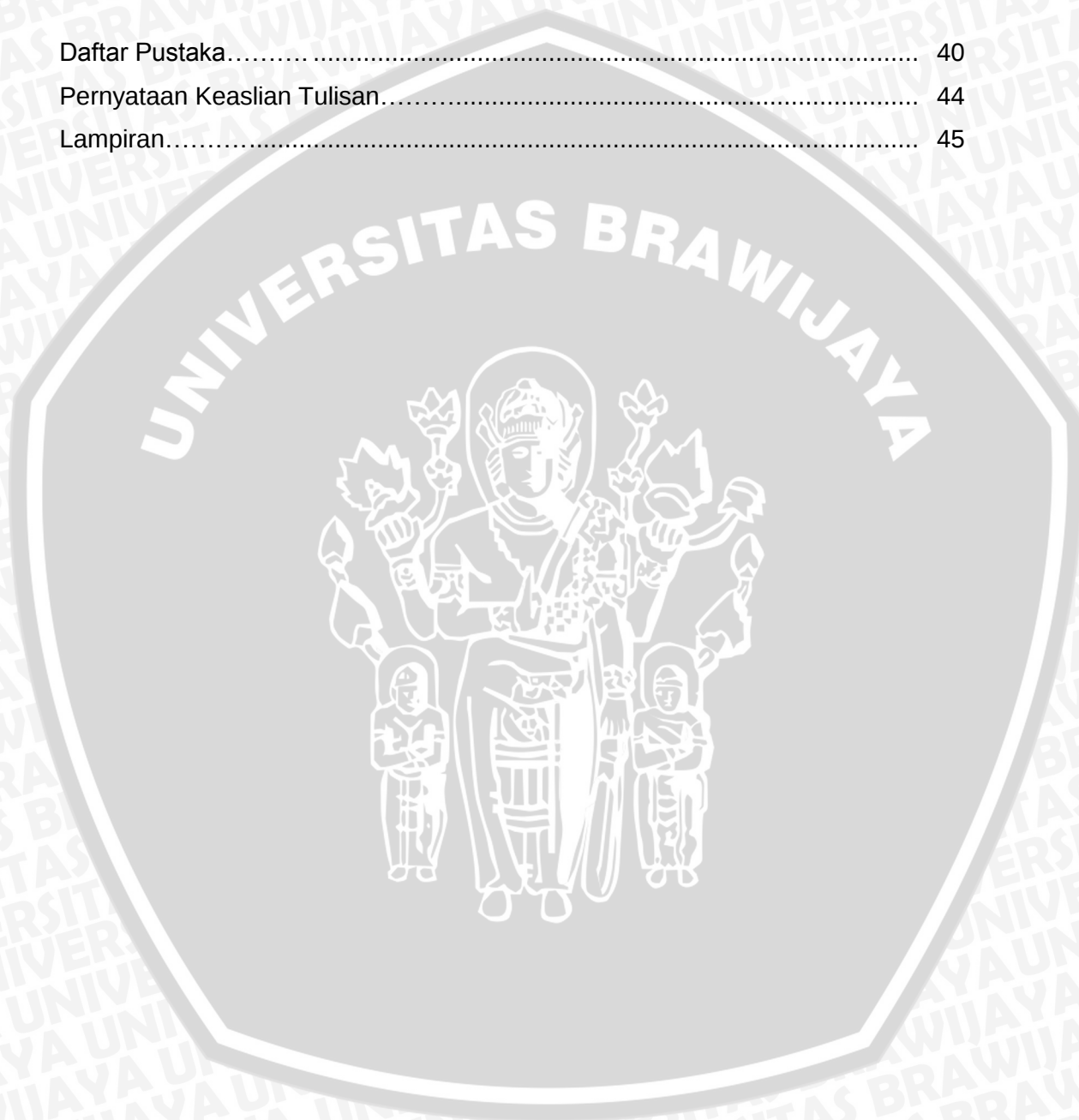
DAFTAR ISI

Halaman

Judul.....	i
Halaman Persetujuan	ii
Halaman Pengesahan	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Gambar.....	xi
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Lampiran.....	xiii
Daftar Singkatan.....	xiv
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	 4
2.1 Leukemia Akut (LA).....	4
2.1.1 Definisi	4
2.1.2 Epidemiologi dan Etiologi	5
2.1.3 Patogenesis	6
2.1.3 Terapi Leukemia Saat Ini.....	6
2.2 Aspirin	7
2.2.1 Aspirin Sebagai Anti Kanker.....	8
2.3 Mekanisme Pulsasi Listrik Sebagai Anti Kanker	9
2.3.1 Sifat Listrik Kanker	9
2.3.2 Mekanisme Pulsasi Listrik Pada Induksi Apoptosis Mitokondria	10
2.3.3 Mekanisme Listrik Meningkatkan Penghantaran Obat ke	

Dalam Sel	12
2.4 Mekanisme Apoptosis Pada Jalur Bcl-2	14
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN	17
3.1 Kerangka Konsep.....	17
3.2 Hipotesis Penelitian.....	18
BAB 4 METODE PENELITIAN	19
4.1 Rancangan Penelitian	19
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	19
4.3 Variabel Penelitian	20
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	20
4.5 Bahan dan Alat Penelitian	20
4.6 Definisi Operasional	22
4.7 Prosedur Penelitian	22
4.8 Alur Penelitian	26
4.9 Analisis Data	26
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA.....	30
5.1 Hasil Penelitian	30
5.1.1 Gambaran Ekspresi Bcl-2 dengan Teknik Imunositokimia	30
5.1.2 Perbandingan Ekspresi Bcl-2 antara Kelompok Perlakuan dan Kontrol	31
5.2 Analisis Data	32
5.2.1 Uji Normalitas Data	32
5.2.2 Uji Homogenitas Varian.....	32
5.2.3 Uji One Way Anova	33
5.2.4 Uji Post Hoc Multiple Comparison	33
5.2.4 Uji Korelasi Pearson.....	33
5.2.1 Uji Regresi.....	34
BAB 6 PEMBAHASAN.....	35

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	39
5.1 Kesimpulan.....	39
5.2 Saran.....	39
Daftar Pustaka.....	40
Pernyataan Keaslian Tulisan.....	44
Lampiran.....	45

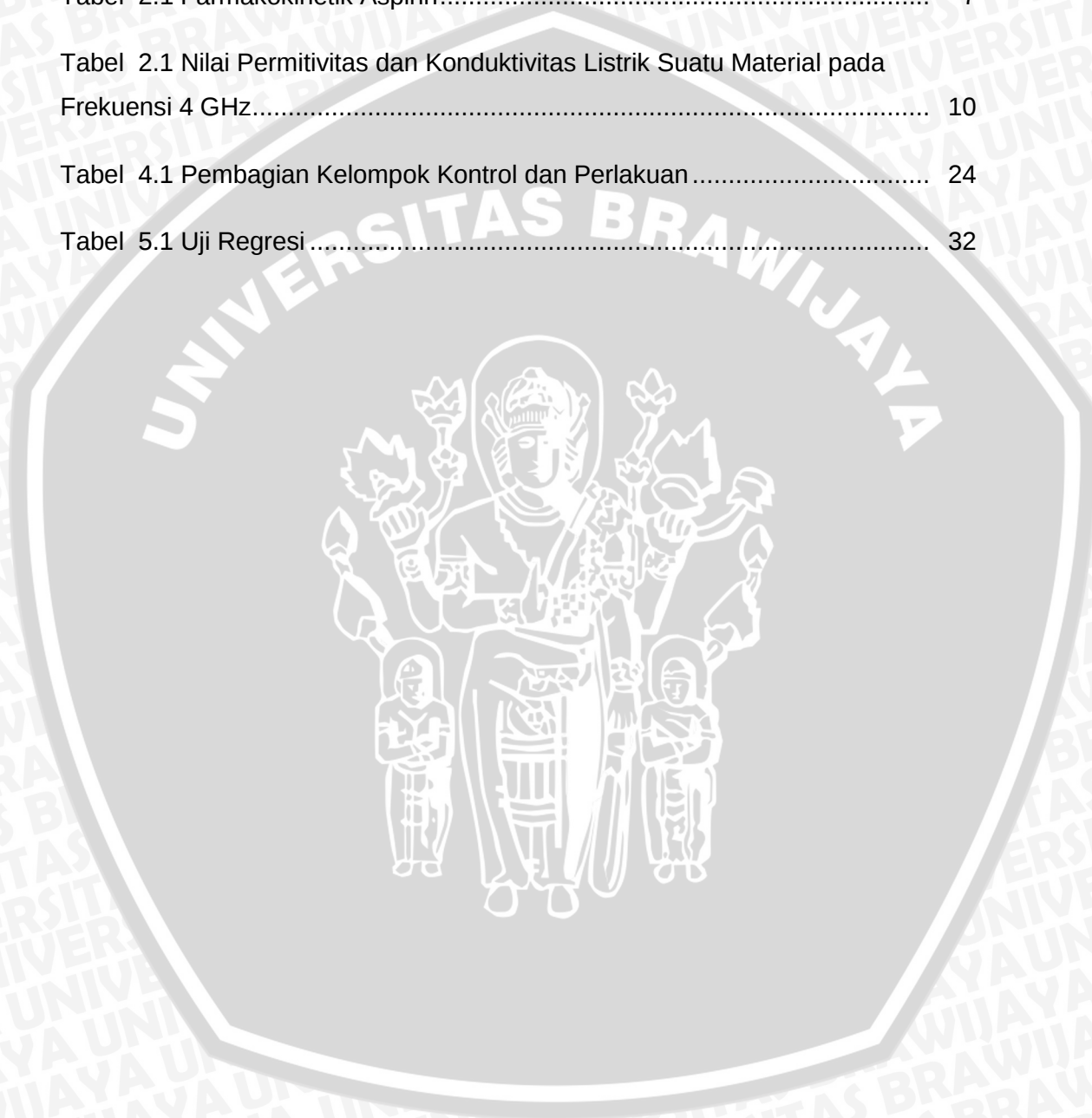


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Metabolisme Asam Arakidonat.....	8
Gambar 2.2 Jalur Apoptosis Menuju Kematian Sel dari Perspektif Protein Keluarga Bcl-2.....	15
Gambar 3.1 Proses Aspirin dan Paparan Listrik Menginduksi Apoptosis Melalui Penghambatan Kerja Bcl-2.....	17
Gambar 4.1 Isolasi PBMC	23
Gambar 4.2 Alur Penelitian.....	26
Gambar 5.1 Gambaran Ekspresi Bcl-2 pada Kultur Sel Darah Tepi Pasien Leukemia Akut	31
Gambar 5.2 Grafik Rerata Prosentase Ekspresi Bcl-2	31

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Farmakokinetik Aspirin.....	7
Tabel 2.1 Nilai Permittivitas dan Konduktivitas Listrik Suatu Material pada Frekuensi 4 GHz.....	10
Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Kontrol dan Perlakuan.....	24
Tabel 5.1 Uji Regresi.....	32



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Jadwal Faktual Pelaksanaan Penelitian	45
Lampiran 2 Dokumentasi Penelitian	46
Lampiran 3 Penghitungan Dosis Aspirin	46
Lampiran 4 Hasil Perhitungan Ekspresi Bcl-2 Pada Kultur Sel.....	48
Lampiran 5 Diagram Rerata Prosentase Ekspresi Bcl-2 dan Apoptosis Sel	50
Lampiran 6 Hasil Uji Normalitas Data, Uji Homogenitas Varian, Uji Anova, serta Uji Post Hoc Perlakuan (Pulsasi Listrik dan Aspirin) dan Bcl-2	51
Lampiran 6 Hasil Uji Korelasi dan Uji Regresi antara Perlakuan (Pulsasi Listrik dan Aspirin) dengan Ekspresi Bcl-2	53

DAFTAR SINGKATAN

ANOVA: *Analysis of Variance*

ASA: *Asetylsalicylic Acid*

AVO meter: *Ampere Voltage Ohm Meter*

BAK: *Bcl-2 Antagonist/Killer*

BAX: *Bcl-2-associated X protein*

Bcl-2: *B cell lymphocyte 2*

BSA: *Bovine Serum Albumin*

COX: *Cyclooxygenase*

DNA: *Deoxyribonucleic Acid*

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic Acid*

FasL: *Fas Ligand*

HSD: *Honestly Significant Difference*

IAP: *Inhibitor of Apoptosis Protein*

IFN- γ : *Interferon gamma*

IgG: *Immunoglobulin G*

IL-1: *Interleukin 1*

IP3R: *Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor*

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

KIE: *Komunikasi, Informasi, dan Edukasi*

LAF: *Laminary Air Flow*

LLA: *Leukemia Limfoblastik Akut*

LMA: *Leukemia Mielogenus Akut*



LOX: *Lipooxygenase*

mRNA: *messenger Ribonucleic Acid*

NFkB: *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NK: *Natural Killer Cell*

OAINS: *Obat Anti Inflamasi Non Steroid*

PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cell*

PBS: *Phosphate-buffered Saline*

PEF: *Pulsed Electric Field*

PGE2: *Prostaglandin E2*

RES: *Reticuloendothelial System*

RNA: *Ribonucleic Acid*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SA-HRP: *Streptavidin-horseradish Peroxidase*

siRNA: *small interfering Ribonucleic Acid*

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

SSP: *Sistem Saraf Pusat*

TNF: *Tumor Necrosis Factor*

tp 53: *tumor protein 53*

WHO: *World Health Organization*

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Leukemia merupakan keganasan yang berasal dari sumsum tulang. Dari semua jenis keganasan yang ditemukan pada anak usia kurang dari 15 tahun, sebanyak 30% merupakan leukemia (ENHIS, 2009). Leukemia dapat dibedakan menjadi leukemia akut dan kronik. Leukemia akut sendiri terdiri atas dua tipe, yakni mielogenik dan limfoblas. Leukemia Limfoblasik Akut (LLA) merupakan tipe kanker yang menyerang perkembangan limfoblas pada sumsum tulang. Sedangkan tipe lain adalah Leukemia Mielogenus Akut (LMA) yang menyerang perkembangan sel mieloid yang merupakan progenitor sel granulosit, monosit, eritrosit, dan trombosit (American Cancer Society, 2012).

Leukemia akut ditandai dengan kegagalan pematangan atau maturasi yang menyebabkan adanya ketidakseimbangan antara proliferasi dan maturasi. Hal tersebut dikarenakan *tumor protein 53* (tp53) yang merupakan antionkogen gagal mengikat DNA sehingga kemampuan mengontrol proliferasi menjadi hilang dan proliferasi sel berjalan terus menerus dan tidak terkendali (Chrestella, 2009). Salah satunya ditandai dengan peningkatan ekspresi Bcl-2 yang merupakan protein anti-apoptosis yang diperantarai oleh pelepasan sitokrom c dari mitokondria ke sitoplasma (Moore *et al.*, 2008).

Berdasarkan data epidemiologi WHO didapatkan insiden leukemia akut pada dewasa terjadi sekitar 2,4 kasus setiap 100.000 populasi per tahun. Sedangkan di Indonesia, insiden leukemia akut diprediksi sekitar 3,4 kasus setiap 100.000 penduduk per tahun dan 2% diantaranya adalah anak-anak (Chandrayani *et al.*, 2010). Terapi yang ada saat ini berupa kemoterapi, terapi steroid, profilaksis sistem saraf pusat untuk pencegahan invasi sel kanker, dan *testicular radiotherapy* (Leukemia Foundation, 2010). Namun, angka relaps setelah terapi tersebut masih cukup tinggi. Efek samping dari kemoterapi dosis tinggi menyebabkan gangguan pada sel-sel sehat yang memiliki proliferasi cepat misalnya rambut akan ikut terganggu (Evans *et al.*, 2008). Oleh karena alasan tersebut, dibutuhkan alternatif terapi yang lebih aman, ekonomis, dan efisien.

Medan listrik sudah digunakan untuk berbagai kepentingan medis dengan besaran frekuensi tertentu sehingga dapat mengubah permeabilitas membran sel baik reversibel maupun irreversibel. Perubahan permeabilitas tersebut disebabkan oleh pembentukan pori membran akibat induksi listrik atau biasa disebut elektroporasi sehingga dapat meningkatkan penyerapan obat ke dalam sel target. Di samping itu paparan listrik juga diketahui mampu mempengaruhi potensial membran sel, mitokondria, endoplasmik retikulum, dan membran plasma. Perubahan tersebut akan menyebabkan pelepasan ion kalsium dari mitokondria dan endoplasmik retikulum dan hal ini akan memunculkan cascade apoptosis melalui aktivasi kaspase (Gehl, 2003; Beebe *et al.*, 2002).

Sedangkan untuk mekanisme kerja aspirin adalah pada penghambatan jalur siklooksigenase. Aspirin utamanya diketahui dapat menghambat produksi PGE2 sehingga dapat mengurangi peningkatan ekspresi dari Bcl-2 sebagai anti-apoptosis (Li *et al.*, 2000). Pada studi *in vitro* didapatkan bahwa COX-2 juga

dapat meregulasi ekspresi protein Bcl-2 anti-apoptosis yang menyebabkan penurunan jumlah sel yang apoptosis pada karsinogenesis (Shimizu *et al.*, 2004).

Sinergisme antara aspirin dan paparan listrik dengan frekuensi tertentu dalam penelitian ini diharapkan akan meningkatkan efektifitas daya bunuh terhadap sel leukemia akut. Paparan listrik yang mampu meningkatkan penyerapan aspirin ke dalam sel target, dapat meningkatkan efektifitas terapi aspirin dengan dosis yang minimal. Kombinasi ini diharapkan dapat menjadi alternatif terapi leukemia akut.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah kombinasi pulsasi listrik dan aspirin dapat meningkatkan apoptosis PBMC dari pasien leukemia akut melalui mekanisme penghambatan kerja Bcl-2?

1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui bahwa kombinasi paparan pulsasi listrik dan aspirin dapat meningkatkan apoptosis PBMC dari pasien leukemia akut melalui mekanisme penghambatan kerja Bcl-2.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Dapat memberikan penjelasan mengenai kemampuan pulsasi listrik dalam menginduksi apoptosis sel kanker.
2. Dapat memberikan penjelasan mengenai efikasi aspirin pada mekanisme induksi apoptosis sel kanker.
3. Dapat menentukan terapi alternatif yang lebih murah dan efek samping lebih rendah dengan terapi kombinasi aspirin dan pulsasi listrik.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Leukemia Akut

2.1.1 Definisi

Leukemia merupakan keganasan yang berasal dari sumsum tulang. Pada keadaan normal, sumsum tulang mengandung sel darah immatur dalam jumlah kecil yang disebut sel blas. Sel blas tersebut akan berkembang dan matur menjadi eritrosit, leukosit, dan trombosit yang kemudian diedarkan ke pembuluh darah (American Cancer Society, 2012).

Leukemia dibedakan menjadi leukemia akut dan kronik. Terminologi akut yang dimaksud menunjukkan bahwa sel leukemia yang meningkat masih berada di fase *undifferentiated* atau sel blas. Leukemia akut sendiri terdiri atas dua macam seri, yakni seri myeloblas yang akan membentuk granulosit, dan seri limfoblas yang akan membentuk limfosit (Seiter, 2012).

Leukemia Limfoblasik Akut (LLA) adalah tipe kanker yang menyerang perkembangan limfoblas pada sumsum tulang. Pada kondisi normal sel limfoblas tersebut akan matur menjadi leukosit spesifik yaitu sel B dan sel T. Sedangkan tipe lain adalah Leukemia Mielogenus Akut (LMA) yang menyerang perkembangan sel mieloid yang merupakan progenitor sel granulosit, monosit, eritrosit, dan trombosit (American Cancer Society, 2012). Maturasi sel yang terhambat akan digantikan oleh multiplikasi berlebihan dan memenuhi sumsum tulang. Hal tersebut menyebabkan sumsum tulang tidak mampu menyediakan

jumlah eritrosit, limfosit, trombosit, granulosit, dan monosit matur dalam jumlah normal sehingga anak dengan leukemia akut cenderung anemia dan mengalami infeksi berulang serta mudah mengalami perdarahan (Greaves M, 2010). Selain itu, proliferasi yang meningkat dengan cepat menyebabkan kebutuhan bahan makanan terutama protein dan vitamin sangat tinggi sehingga jaringan lain akan melemah karena metabolismenya terganggu (Guyton, 1987).

2.1.2 Epidemiologi dan Etiologi

Berdasarkan data epidemiologi WHO didapatkan insiden leukemia akut pada dewasa terjadi sekitar 2,4 kasus setiap 100.000 populasi per tahun. Untuk LMA insiden terendah terdapat pada anak kurang lebih 1 kasus setiap 100.000 populasi per tahun, dan pada dewasa insiden LMA meningkat tajam sampai 10 kasus setiap 100.000 populasi pertahun dan puncaknya di usia 65 tahun hampir mencapai 12,6 kasus setiap 100.000 populasi per tahun. Untuk LLA, insiden tertinggi terjadi pada anak sekitar 30% dari keseluruhan kanker yang menyerang anak-anak. Estimasi dari WHO, setidaknya ada 5200 kasus yang terjadi setiap tahunnya pada negara-negara maju dan 75 persen diantaranya berusia kurang dari 15 tahun (Conter *et al.*, 2004).

Penyebab pasti leukemia akut masih belum diketahui hingga saat ini, namun faktor risiko yang dapat meningkatkan terjadinya leukemia akut telah teridentifikasi. Salah satu faktor risiko leukemia akut adalah genetik. Meskipun hanya sedikit sekali kasus yang berkaitan dengan sindroma kelainan genetik, anak dengan *Down Syndrome* mempunyai kemungkinan 20 kali lebih besar untuk terjadinya leukemia anak dibanding anak tanpa *Down Syndrome* (Alderton *et al.*, 2006).

2.1.3 Patogenesis

Secara umum, terjadinya keganasan dapat disebabkan gangguan keseimbangan antara aktivitas pro-onkogen dan gen supresor tumor. Anti onkogen yang sudah dikenal secara umum adalah tp53. Apabila tp53 gagal mengikat DNA, maka kemampuan mengontrol proliferasi menjadi hilang dan proliferasi sel berjalan terus menerus dan tidak terkendali (Chrestella, 2009).

Sel hematopoietik secara normal terbagi menjadi dua yaitu mieloblas yang merupakan derivat dari neutrofil, basofil, eosinophil, monosit, eritrosit, dan trombosit; serta limfoblas adalah derivat dari limfosit (National Cancer Institute, 2012). Leukemia akut berasal dari proliferasi neoplastik sel hemopoietik akibat mutasi dari sel stem limfoblas dan mieloblas sehingga keduanya didapatkan kondisi abnormal dari leukosit. Mutasi tersebut melibatkan adanya ketidakseimbangan pada translokasi resiprokal pada kromosom dan menyebabkan munculnya fusi gen baru. Translokasi kromosom ini melibatkan gen yang normalnya memegang peranan penting pada maturasi, proliferasi, dan diferensiasi tidak dapat bekerja dengan baik sehingga kemampuannya dalam mengontrol maturasi dan deferensiasi menjadi hilang dan proliferasi berjalan terus-menerus tidak terkendali (Chrestella, 2009).

2.1.4 Terapi Leukemia Saat Ini

Terapi yang ada saat ini berupa kemoterapi, terapi steroid, pengobatan sistem saraf pusat dan profilaksis, dan *testicular radiotherapy* (Leukemia Foundation, 2010). Protokol kemoterapi yang digunakan terdiri atas 4 fase yaitu, fase induksi remisi, profilaksis sistem saraf pusat, konsolidasi, dan *maintenance* (WHO, 2008). Namun, angka relaps setelah terapi tersebut masih cukup tinggi. Efek samping dari kemoterapi dosis tinggi menyebabkan gangguan pada sel-sel

sehat yang memiliki proliferasi cepat misalnya rambut akan ikut terganggu (Evans *et al.*, 2008). Hal tersebut dikarenakan perubahan seluler dan genetik pada sel somatik tanpa keganasan sehingga terjadi komplikasi klinis jangka panjang berupa perkembangan keganasan sekunder (Kendall, 2006).

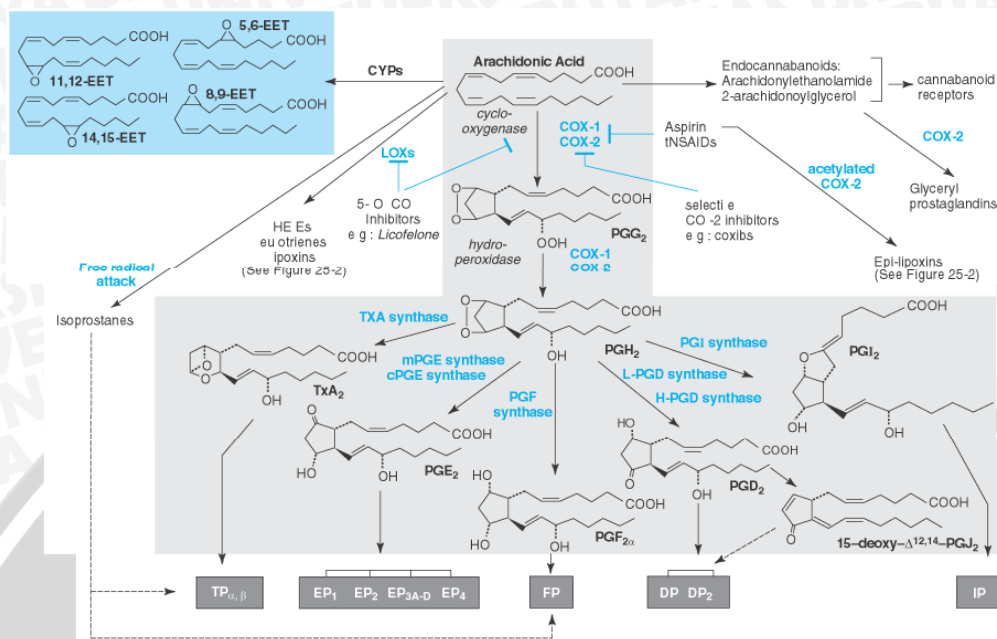
2.2 Aspirin

Nama aspirin dikenal juga sebagai *acetylsalicylic acid* (ASA), sering digunakan sebagai analgesik untuk meredakan nyeri ringan dan sebagai antipiretik untuk menurunkan demam, sekaligus berfungsi sebagai anti-inflamasi (Schrör, 2009). Tabel 2.1 menunjukkan farmakokinetik dari aspirin (Katzung, 2004).

Tabel 2.1 Farmakokinetik Aspirin

	Availabilitas oral (%)	Ekskresi urin (%)	Ikatan plasma (%)	Klirens (L/jam/70 kg)	Volum distribusi (L/70 kg)	T $\frac{1}{2}$ (jam)
Aspirin	68	1	49	39	11	0,25

OAINS dikenal luas sebagai pereda gejala suatu penyakit seperti nyeri dan demam. OAINS merupakan agen anti inflamasi yang bekerja pada dua jalur, yaitu jalur *cyclooxygenase* (COX) dan *lipooxygenase* (LOX). Aspirin bekerja dengan menghambat jalur siklooksigenase baik COX1 maupun COX2 yang dapat terinduksi dengan adanya stimulus sitokin proinflamasi (TNF, IL-1), hormon, polisakarida bakteri, dan faktor pertumbuhan (FKUI, 2007). Gambar 2.1 menjelaskan metabolisme asam arakidonat yang melibatkan aspirin yang bekerja pada jalur COX-1 dan COX-2 dimana jalur COX-2 ditandai dengan warna abu-abu (Goodman & Gilman's, 2006).



Gambar 2.1 Metabolisme Asam Arakidonat (Goodman & Gilman's, 2006)

2.2.1 Aspirin sebagai Anti Kanker

Aspirin bekerja dengan menghambat jalur COX melalui penghambatan sintesis prostaglandin dan imunitas seluler yang diinduksi prostaglandin. COX-1 bertanggung jawab untuk biosintesis *eicosanoid* sebagai proteksi mukosa lambung dan memelihara fungsi platelet. COX-2 merupakan *up-regulated* sebagai respon terhadap peradangan dan luka (Kasum, 2003). Hasil studi epidemiologi menunjukkan bahwa penggunaan aspirin jangka panjang dalam dosis rendah berhubungan dengan penurunan insiden kanker kolon, yang kemungkinan karena efeknya sebagai penghambat COX (Katzung, 2004). Penelitian lain menyebutkan bahwa penggunaan rutin aspirin setelah terdiagnosis spesifik kanker colorectal dapat menurunkan mortalitas sebanyak 29% bila dibandingkan dengan pasien yang tidak mengonsumsi aspirin (Pasche, 2012).

Prostaglandin dapat mensupresi sistem imun melalui *down-regulation* limfokin, proliferasi sel T dan B, seperti aktivitas sitotoksik atau sel NK. Diketahui juga bahwa enzim COX-2 yang terdapat pada jaringan inflamasi dan neoplasma dapat menginduksi respon terhadap stimulus faktor pertumbuhan (*Vascular Endothelial Growth Factor, Epidermal Growth Factor, Fiboblast Growth Factor*) dan sitokin pro-inflamasi (IL-1, TNF) (Sali *et al.*, 2006). Pada suatu penelitian diketahui bahwa aspirin dapat menurunkan protein Bcl-2 pada kanker esofagus (Li *et al.*, 2000).

Aspirin mampu menurunkan regulasi protein Bcl-2 dan menginduksi translokasi BAX, protein pro-apoptosis jalur mitokondria, ke dalam mitokondria dan memecah Bid yang kemudian akan berlanjut pada aktivasi kaspase. Hal tersebut sesuai dengan studi yang menyatakan bahwa enzim COX-2 mampu meregulasi ekspresi protein Bcl-2 anti-apoptosis, sehingga terjadi penurunan jumlah sel yang apoptosis pada karsinogenesis (Shimizu *et al.*, 2004).

2.3 Mekanisme Pulsasi Listrik sebagai Anti Kanker

2.3.1 Sifat Listrik Kanker

Tubuh manusia memiliki kepekaan yang berbeda-beda terhadap induksi listrik dan berperan pada analisis berbagai aplikasi biomedis seperti stimulasi listrik fungsional. Perbedaan besar ada pada sifat dielektrik bahan biologis. Perbedaan-perbedaan ini ditentukan sebagian besar oleh isi cairan material (Miklavčič *et al.*, 2006). Misalnya, darah dan otak bisa menyalurkan arus listrik dengan relatif baik. Paru, kulit, lemak, dan tulang adalah konduktor yang relatif jelek. Sedangkan hati, limpa, dan otot memiliki konduktivitas yang sedang.

Tumor adalah massa abnormal dari jaringan dikelilingi oleh satu atau lebih jaringan tubuh normal. Tumor memiliki konduktivitas yang lebih tinggi dibanding

jaringan normal (Haemmerich *et al.*, 2009). Sebuah studi oleh Smith *et al.* pada tumor dalam jaringan hati menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam sifat listrik antara jaringan hati yang sehat dan tumor. Hasil menunjukkan bahwa konduktivitas tumor adalah 6-7,5 kali lipat lebih tinggi dari konduktivitas hati; perbedaan nilai permitivitas adalah 2-5 kali lipat. Tabel 2.1 menunjukkan nilai permitivitas dan konduktivitas listrik suatu material pada frekuensi 4 GHz (Hagl *et al.*, 2003)

Tabel 2.2 Nilai Permitivitas dan Konduktivitas Listrik Suatu Material pada Frekuensi 4 GHz (Hagl *et al.*, 2003)

Material	Permitivitas Relatif	Konduktivitas (S/m)
Tumor	43,69	6,81018
Darah	773,45	1,0169
Sumsum tulang	28,493	0,0063839
Lemak	19,429	0,026427
Nervus	317,35	0,18415
Pembuluh darah	133,44	0,33448

Selain sifat elektrik di atas, sudah sejak lama diketahui bahwa potensial elektrik membran dan elektrikal impedansi tumor lebih rendah dari sel normal. Namun sifat dielektrik tumor tidak dapat digeneralisir sebagai perbedaan besar ada di antara jenis tumor yang berbeda dan bahkan antara tumor dari jenis yang sama. Sifat listrik juga tergantung banyak pada ukuran atau tahap perkembangan tumor (Miklavčič *et al.*, 2006).

2.3.2 Mekanisme Pulsasi listrik pada Induksi Apoptosis Mitokondria

Membran sel dapat menjadi permeabel terhadap molekul-molekul yang normalnya tidak permeabel setelah mengalami induksi dari *pulsed electric field*

(PEF). Permeabilitas ini ditimbulkan dari pembentukan pore/lubang di membran tersebut akibat induksi elektrik atau biasa disebut elektropor. Elektroporasi dapat digunakan untuk merusak dan menghancurkan sel-sel yang tidak diinginkan, melalui 2 jalur induksi kematian sel yakni nekrosis and apoptosis (Kennedy, 2008).

Proses apoptosis berbeda dengan proses nekrosis karena adanya sinyal-sinyal yang mendahului proses tersebut. Sinyal apoptosis dapat timbul dari membran plasma atau dari struktur intraseluler, termasuk inti, mitokondria, atau retikulum endoplasma, antara lain, yang mengaktifkan jalur yang berkumpul di aktivasi kaspase (Thornberry, 1998). Retikulum endoplasmik dan mitokondria menyimpan kalsium intraseluler, di mana pelepasannya dari mitokondria akan menyebabkan apoptosis.

Sel apoptosis menunjukkan fitur karakteristik yang baik sehingga membedakan mereka dari sel nekrotik. Ini termasuk pemeliharaan integritas membran, eksternalisasi *phosphatidylserine* pada membran plasma, aktivasi kaspase, kondensasi kromosom, dan perubahan morfologi. Beberapa hasil penanda dari *caspase-mediated* hidrolisis protein seluler yang mempertahankan struktur sel dan fungsi (Thornberry, 1998; Hengartner, 2000).

Dengan menggunakan listrik intensitas rendah (2 V/cm) serta frekuensi sedang (100–300 kHz), menyebabkan perubahan medan listrik yang diinduksi oleh elektroda sehingga meningkatkan *uptake* obat-obatan ke dalam sel tanpa melalui membran barrier sel. Telah dibuktikan bahwa aplikasi medan listrik pada sel kanker menyebabkan penghambatan proliferasi dan penghancuran sel. Ketika medan listrik ini diaplikasikan pada model tikus didapatkan reduksi yang signifikan dari kecepatan pertumbuhan tumor tanpa efek samping yang

signifikan. Hal ini dikarenakan efek penghambatan proliferasi bersifat spesifik terhadap sel yang sedang berproliferasi. Pada tingkat seluler medan listrik mengganggu proses polimerasi-depolimerasi normal dari mikrotubulus selama proses mitosis (Kirson, 2004).

2.3.3 Mekanisme Listrik Meningkatkan Penghantaran Obat ke Dalam Sel

Secara umum, elektroporasi terjadi pada rentang pulsasi 0,1 – 10 ms dengan medan listrik beberapa kV/cm (Chen et al., -). Elektroporasi didesain dengan menggunakan sengatan listrik voltase tinggi yang diberikan secara singkat sehingga dapat melewati hambatan membran sel. Dengan pemberian listrik dari luar yang dapat melampaui kapasitas dari membran sel secara sementara dan dapat menginduksi perpecahan dari membran sel yang sifatnya reversibel. Fase *permeabilized transient* dapat dimanfaatkan untuk memasukkan berbagai macam molekul dengan ukuran yang bervariasi. Hal ini tentunya sangat memudahkan proses terapi, mengingat pada umumnya pengiriman obat melalui proses difusi seringkali kurang maksimal dikarenakan batasan ukuran molekul dari obat tersebut. Dengan menggunakan elektroporasi, molekul obat yang berukuran relatif besar pun bisa dimasukkan melalui membran yang sedang tidak stabil (Gehl, 2003).

Awalnya elektroporasi dikembangkan untuk mempermudah transfer gen, akan tetapi pada perkembangan selanjutnya elektroporasi digunakan untuk menyampaikan berbagai macam jenis molekul, mulai dari ion, obat, antibodi, oligonukleotida sampai RNA dan DNA. Elektroporasi sudah terbukti berguna baik secara in vitro, in vivo maupun di pasien, dimana alat ini telah digunakan untuk memasukkan obat kemoterapi pada pasien kanker (Gehl, 2003). Dua obat yang sudah menggunakan elektroporasi dalam dunia klinis adalah bleomycin dan

cisplatinum. Bleomycin adalah obat dengan molekul hidrofilik yang bermuatan sehingga dalam keadaan normal hanya dapat terinternalisasi dalam jumlah terbatas. Namun demikian obat ini sesungguhnya dapat sangat bersifat sitotoksik. Dengan penggunaan elektroporasi, bleomycin dapat secara langsung dimasukkan ke dalam sitosol sel, sehingga sitotoksitas dapat ditingkatkan hingga 300-5000-kali lipat. Dalam kasus cisplatinum, peningkatan sitotoksitas hanya dibatasi sampai 2-13 kali lipat namun sudah dapat memberikan efek yang cukup memadai (Jaroszeski *et al.*, 2000). Peningkatan efektifitas anti tumor setelah aplikasi elektroporasi dapat menurunkan dosis obat yang digunakan secara drastis. Dengan pengurangan dosis obat mengakibatkan menurunnya efek samping yang ditimbulkan (Miklavčič *et al.*, 2006).

Manfaat elektroporasi telah teruji pada beberapa jenis kanker. Hal ini terbukti dari beberapa penelitian kanker yang telah menggunakan elektroporasi sebagai perlakuan seperti karsinoma sel basal, melanoma ganas, adenokarsinoma, karsinoma sel skuamosa, transitocellular karsinoma, dan yang terbaru karsinoma sel ginjal (Sersa *et al.*, 2000). Hal tersebut menunjukkan semua jenis kanker dengan histologi yang berbeda-beda, *electrochemotherapy* telah terbukti sangat efisien (Stephen *et al.*, 2003).

Hal terpenting dalam penggunaan *electrochemotherapy* sebenarnya adalah anatomi yang membatasi penempatan elektroda dengan lapangan elektriknya, bukan *chemosensitivity* dari tumor itu sendiri, yang secara otomatis akan meningkat seiring induksi sitotoksitas yang diberikan. Efek samping dari *electrochemotherapy* juga cukup ringan dan bisa diatasi dengan pemberian anestesi lokal yang memadai seperti lidokain. Meskipun sampai sekarang metode ini sudah digunakan untuk penyembuhan tumor kulit, akan tetapi

perkembangan elektroporasi terus dilakukan untuk mengatasi tumor-tumor yang letaknya lebih profundus (Kennedy *et al.*, 2008).

Elektroporasi juga dapat digunakan untuk memasukkan sejumlah zat penting, molekul biologis aktif untuk sel-sel seperti peptida, protein *full-length*, siRNA, mRNA, dan DNA (4, 12, dan 13) memberikan fleksibilitas yang besar dalam memodifikasi perilaku sel. Agar molekul-molekul tersebut tetap dapat mempertahankan potensi biologis mereka dan memberikan efek terapi, sel harus tetap dalam kondisi baik setelah paparan PEF yang berpotensi traumatis. Sehingga pemberian PEF mensyaratkan bahwa induksi elektrofor hanya bersifat sementara (elektroporasi transien) (Stephen *et al.*, 2003).

2.4 Mekanisme Apoptosis Pada Jalur Bcl-2

Apoptosis dikenal sebagai metode untuk kematian sel yang terprogram, dimana melibatkan eliminasi berdasar genetik dari sel (Guicciardi *et al.*, 2009). Apoptosis memiliki peranan yang penting dalam mengatur pertumbuhan, perkembangan dan respon imun, serta pembersihan sel-sel abnormal di dalam tubuh. Selain itu apoptosis merupakan jalur penting yang memungkinkan tubuh menjaga sel-sel dalam jumlah yang konstan. *Caspase-cascade* merupakan salah satu jenis sistem isyarat yang digunakan dalam tubuh manusia. Dalam proses apoptosis caspase diatur oleh beberapa molekul lainnya seperti *inhibitor of apoptosis protein* (IAP), *Bcl-2 family proteins*, dan *calpain* (Fan *et al.*, 2005).

Apoptosis merupakan mekanisme mengendalikan proliferasi sel atau sebagai respon terhadap adanya kerusakan DNA terutama pada kematian sel sebagai respon terhadap terapi kanker (Kang, 2009). Pada keganasan hematologi didapatkan ekspresi yang berlebihan dari beberapa kelompok Bcl-2 anti-apoptosis. Pemahaman mengenai apoptosis telah memberikan dasar untuk

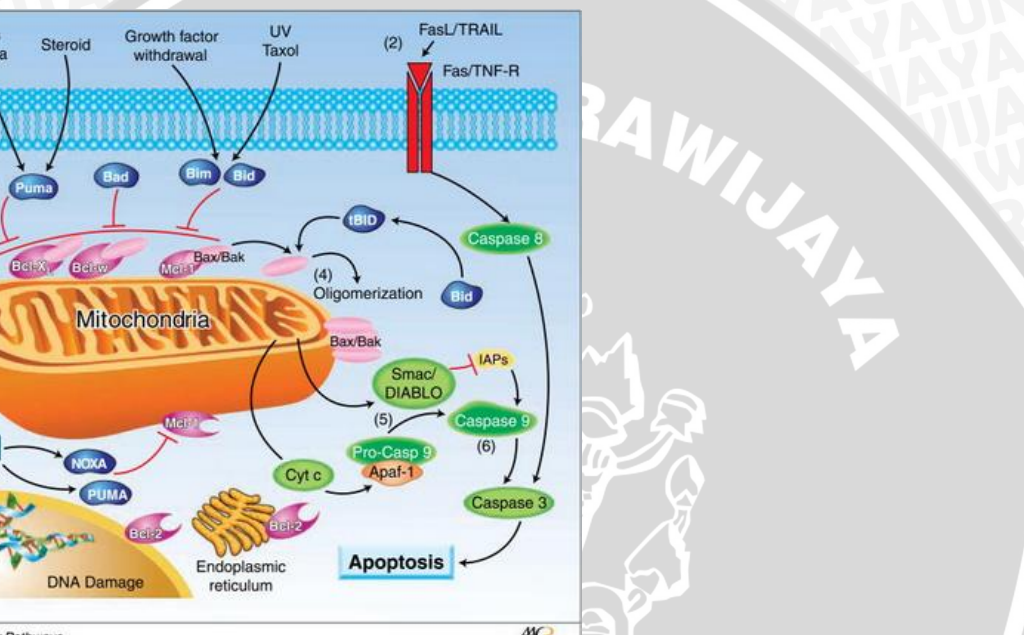
15

mengembangkan strategi terapi baru yang dapat menginduksi kematian sel kanker. Mekanisme biomolekuler terjadinya apoptosis terbagi menjadi dua jalur, yaitu jalur intrinsik (diperankan oleh mitokondria) dan jalur ekstrinsik (Rastogi *et al.*, 2009). Gambar 2.2 menggambarkan peranan protein Bcl-2 pada proses apoptosis (Kang, 2009).



15

mengembangkan strategi terapi baru yang dapat menginduksi kematian sel kanker. Mekanisme biomolekuler terjadinya apoptosis terbagi menjadi dua jalur, yaitu jalur intrinsik (diperankan oleh mitokondria) dan jalur ekstrinsik (Rastogi *et al.*, 2009). Gambar 2.2 menggambarkan peranan protein Bcl-2 pada proses apoptosis (Kang, 2009).



The diagram illustrates the molecular pathways leading to apoptosis, categorized into two main types: (1) Intrinsic pathway and (2) Extrinsic pathway. The intrinsic pathway is triggered by stimuli like drugs, hypoxia, steroid, growth factor withdrawal, and UV/Taxol, leading to the activation of Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, Bax/Bak, Bid, Bim, Bad, Puma, Noxa). These proteins regulate the permeability of the mitochondrial membrane, allowing Cytochrome c (Cyt c) to be released into the cytosol. The extrinsic pathway is triggered by FasL/TRAIL binding to Fas/TNF-R, leading to the activation of Caspase 8. Both pathways converge on the activation of Caspase 9, which then activates Caspase 3, leading to apoptosis. The diagram also shows the role of p53 in the nucleus, which can induce the intrinsic pathway via NOXA and PUMA. The endoplasmic reticulum is also shown, with Bcl-2 and Bcl-XL regulating the release of Cyt c. The diagram is labeled 'CCR Molecular Pathways' and 'MCR'.

Gambar 2.2 Jalur Apoptosis Menuju Kematian Sel dari Prespektif Protein Kelompok Bcl-2 (Kang, 2009)

15

mengembangkan strategi terapi baru yang dapat menginduksi kematian sel kanker. Mekanisme biomolekuler terjadinya apoptosis terbagi menjadi dua jalur, yaitu jalur intrinsik (diperankan oleh mitokondria) dan jalur ekstrinsik (Rastogi *et al.*, 2009). Gambar 2.2 menggambarkan peranan protein Bcl-2 pada proses apoptosis (Kang, 2009).

Gambar 2.2 Jalur Apoptosis Menuju Kematian Sel dari Prespektif Protein Kelompok Bcl-2 (Kang, 2009)

Pada Gambar 2.2, protein Bcl-2 terlokalisir utamanya di mitokondria, RES, dan membrana perinuklear pada sel hematopoietik. Apoptosis jalur mitokondria dikendalikan dan diregulasi oleh kelompok protein anti-apoptosis Bcl-2 dan Bcl-xL (Elmore, 2007). Kelompok Bcl-2 anti-apoptosis berkompetisi dengan protein pro-apoptosis di mitokondria untuk meregulasi pelepasan sitokrom c. Regulasi ekspresi Bcl-2 dapat dihambat oleh aspirin melalui jalur COX-2 yang melibatkan penurunan produksi PGE2 sehingga mampu menekan Bcl-2 anti-apoptosis di mitokondria. Penurunan Bcl-2 anti-apoptosis dapat meningkatkan pelepasan sitokrom c dari mitokondria ke sitoplasma (Li *et al.*, 2001).

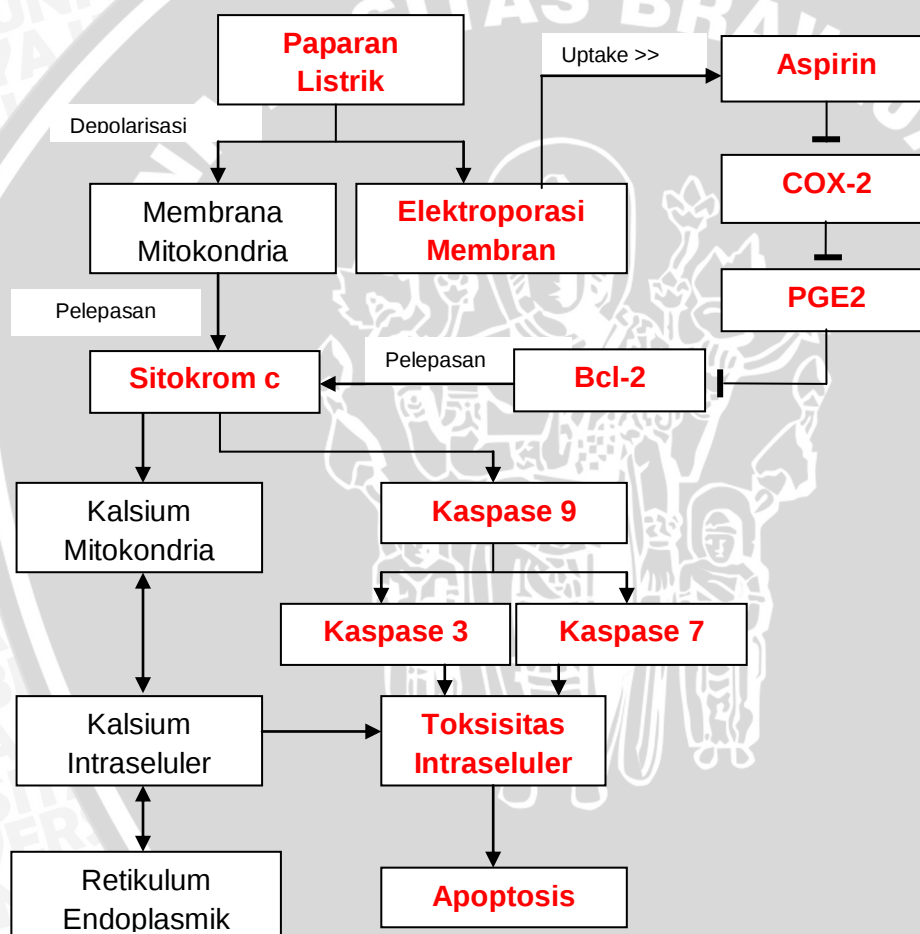
Pulsasi lisrik dapat memicu peningkatan kadar kalsium intraseluler yang menetap dan kemudian akan memicu pelepasan sitokrom c. Pelepasan sitokrom c dalam jumlah kecil akan berinteraksi dengan reseptor IP3 (IP3R) pada retikulum endoplasmik, menyebabkan pelepasan kalsium dari endoplasmik retikulum yang akan menambah kadar kalsium intraseluler. Peningkatan kalsium yang lebih tinggi dari sebelumnya akan memicu pelepasan sitokrom c besar-besaran sehingga mengaktifkan kaspase secara maksimal (Boehning *et al.*, 2004).

Pelepasan sitokrom c akan mengaktifasi kaspase 9, sebuah sistein protease yang akan mengaktifasi kaspase 3 dan kaspase 7 yang berperan menghancurkan sel dari dalam sebagai bagian dari proses akhir apoptosis (ATCC, 2010). Selain disebabkan oleh stimulus pro-apoptosis, pelepasan sitokrom-c ternyata juga dipicu oleh depolarisasi membran mitokondria yang salah satunya dapat disebabkan oleh paparan arus listrik (Heiskanen *et al.*, 1999).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Proses Aspirin dan Paparan Listrik Menginduksi Apoptosis Melalui Penghambatan Kerja Bcl-2

Keterangan bagan:

→ = menyebabkan

⊥ = menghambat

Kata dengan warna merah = jalur yang dilewati pada penelitian ini

Gambar 3.1 menjelaskan mekanisme dari pulsasi listrik dan aspirin yang menyebabkan apoptosis sel. Paparan listrik dapat mempengaruhi dua mekanisme yaitu depolarisasi membrana mitokondria dan elektroporasi membran. Depolarisasi membran memicu pelepasan sitokrom c sehingga dapat meningkatkan kalsium intraseluler. Pelepasan sitokrom c dalam jumlah kecil akan berinteraksi dengan reseptor IP3 (IP3R) pada retikulum endoplasmik, menyebabkan pelepasan kalsium dari endoplasmik retikulum juga akan menambah kadar kalsium intraseluler. Pelepasan sitokrom c akan mengaktivasi kaspase 9, sebuah sistein protease yang akan mengaktivasi kaspase 3 dan kaspase 7 yang berperan menghancurkan sel dari dalam sebagai bagian dari proses akhir apoptosis. Sedangkan kalsium intraseluler yang berlebih dapat juga menimbulkan toksisitas intraseluler secara langsung.

Mekanisme lain adalah elektroporasi membran dengan paparan sengatan listrik voltase tinggi yang diberikan secara singkat sehingga dapat melewati hambatan membran sel sehingga dapat meningkatkan masuknya aspirin ke dalam sel target sehingga dapat menghambat jalur COX-2. Jika jalur COX-2 dihambat maka terjadi penurunan pelepasan PGE2 yang dapat mengurangi ekspresi Bcl-2. Hal tersebut menyebabkan translokasi BAX sebagai protein pro-apoptosis ke membrana mitokondria. Masuknya BAX menginduksi pelepasan sitokrom c ke sitoplasma sehingga apoptosis melalui jalur kaspase berlangsung.

3.2 Hipotesis Penelitian

Kombinasi paparan pulsasi listrik dan aspirin dapat meningkatkan jumlah apoptosis PBMC dari pasien leukemia akut yang mengalami apoptosis melalui mekanisme penghambatan kerja Bcl-2.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian kuantitatif menggunakan desain eksperimen murni pada sampel darah pasien leukemia akut di Rumah Sakit Umum Daerah dr.Saiful Anwar (RSSA). Sebagai kelengkapan, juga disertakan penjelasan kelaikan etik. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah isolat sel mononuklear darah tepi (PBMC) pasien leukemia akut yang diambil dari Laboratorium Sentral RSSA dengan studi *ex vivo*. Pada penelitian ini terdapat kriteria inklusi dan eksklusi agar sampel penelitian menjadi homogen. Berikut adalah kriteria inklusi dan eksklusi sampel:

1. Kriteria inklusi:

- Pasien telah terdiagnosis leukemia akut (LMA atau LLA)
- Hapusan darah tepi 70% sel blas
- Leukosit ≥ 10.000 sel/MI

2. Kriteria eksklusi

- Mendapat terapi kemoterapi
- Remisi parsial/komplit

Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah tiga perlakuan sehingga sampel dibagi menjadi empat kelompok dengan salah satunya menjadi kontrol. Pembagian kelompok berdasarkan dosis aspirin dan pulsasi lisrik yang diberikan. Pada penelitian ini, dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok yang bertujuan untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$p(n-1) \geq 15, p = 4 \text{ sehingga:}$$

$$4(n-1) \geq 15 \rightarrow 4n \geq 19 \rightarrow n \geq 4,75 \sim n \geq 5$$

(p: jumlah kelompok, n: jumlah ulangan)

Dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali dan jumlah sumuran berisi sel kultur leukemia yang digunakan sebanyak 20.

4.3 Variabel Penelitian

1. Variabel tergantung: ekspresi Bcl-2 sebagai penanda jumlah kultur sel mononuklear darah tepi pasien leukemia akut yang mengalami apoptosis.
2. Variabel bebas: paparan pulsasi lisrik dan dosis aspirin yang diberikan.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan April 2013 di Laboratorium Sentral RSSA, Malang serta Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya di Malang.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

1. Pengumpulan Sampel

Bahan: sampel darah tepi pasien leukemia akut, EDTA

Alat: spuit steril, vacoutainer EDTA 3 mL

2. Isolasi PBMC

Bahan: darah, ficoll, PBS NaCl

Alat: blue tip, mikropipet, tabung falcon, pembakar bunsen, inkubator, sentrifugator

3. Kultur PBMC

Bahan: sel darah tepi/PBMC, PBS, Media (RPMI), alkohol 70 %, Tripsin EDTA

Alat: blue tip, semprotan alkohol, mikropipet, tisu gulung, korek, spidol petanda, pembakar bunsen, inkubator, sentrifugator, sumuran

4. Perlakuan (Pemberian Aspirin dan/atau Pulsasi listrik)

Bahan: aspirin

Alat: sumuran, pipet, adapter, timer, AVO meter, *oscilloscope*, generator elektroforator, *power supply*, elektroda aluminium, kuvet elektroforator (BioRad System), kabel

5. Panen

Bahan: PBS, Tripsin-EDTA 1x (Tripsin 0,25%), MK (DMEM/RPMI)

Alat: pipet pasteur, mikropipet 1 ml, conical tube, stiker label/ pulpen petanda

6. Fiksasi

Bahan: gelatin-coated, 4% formaldehyde, media kultur RPMI, wash buffer, PBS

Alat: coverslip, pipet pasteur

7. Pengukuran Ekspresi Bcl-2 dengan Imunohistokimia

Bahan: *human Bcl-2 monoclonal antibody*, PBS, H₂O₂ 3%, BSA 1%, antibody primer, antibodi sekunder IgG Biotin, SA HRP, Diamino benzidine, akuades, Mayer hematoxylen, entelan, akuades, panceau

Alat: chamber, vortex, falcon 15ml, refrigerator, sentrifugator, micropipet, tempat sampel.

4.6 Definisi Operasional

1. Isolat sel mononuklear darah tepi (PBMC) pasien leukemia akut adalah PBMC pasien leukemia akut yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dimana sebelumnya telah dilakukan sentrifugasi berdasarkan gradien berat jenis dan diisolasi dengan menggunakan ficoll.
2. Perlakuan pulsasi listrik adalah paparan listrik arus searah (*direct current*) menggunakan frekuensi sebesar 200 Hz selama 5 detik yang didasarkan penelitian Long (2013)
3. Apoptosis PBMC adalah kematian sel yang terprogram yang ditandai dengan penurunan ekspresi Bcl-2 yang dapat diketahui pada imunositokimia.
4. Aspirin atau *asetylsalicylic acid* yang digunakan dalam bentuk serbuk kristal kemudian dijadikan dalam bentuk suspensi menggunakan pelarut media kultur dengan konsentrasi stok 180 mg/10 mL dengan dosis 2,5 mmol/L, 5 mmol/L, dan 10 mmol/L yang didasarkan pada penelitian Bellosillo (1998).

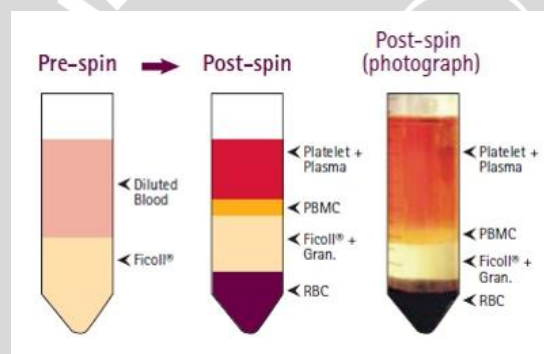
4.7 Prosedur Penelitian

1. Pengumpulan Sampel Sel Darah Pasien Leukemia Akut

Sampel yang digunakan merupakan sisa sampel darah yang diambil dari pasien leukemia akut. Protokol flebotomi yaitu darah diambil dengan spuit steril dan vacutainer 3 ml berisi antikoagulan EDTA.

2. Isolasi PBMC. Proses untuk mendapatkan PBMC seperti yang ditampilkan pada Gambar 4.1 (Biocompare, 2012). Berikut langkah untuk isolasi PBMC:

- a. Mengambil sampel darah dengan mikropipet pindahkan ke tabung falcon
- b. Menambahkan PBS NaCl perbandingan 1:1 dengan darah lalu kocok
- c. Menambahkan ficoll perbandingan 1:1 dengan darah menggunakan syringe
- d. Sentrifugasi 16 x 100 rpm selama 30 menit
- e. Mengambil buffy coat lalu pindahkan ke tabung falcon baru
- f. Menambahkan PBS NaCl
- g. Sentrifugasi 16 x 100 rpm selama 10 menit (2x)



Gambar 4.1 Isolasi PBMC (Biocompare, 2012)

3. Kultur PBMC

- a. Hasil sentrifugasi, supernatan dibuang
- b. Menambahkan media kultur hingga mencapai volume yang diinginkan. Media kultur terdiri dari RPMI, antibiotik dan FBS
- c. Homogenisasi dengan cara mengocok atau menggunakan pipet
- d. Memindahkan ke sejumlah sumuran yang diinginkan dan sudah ditandai lalu diinkubasi
- e. Memindahkan ke 4 sumuran
- f. Memberi tanda tiap sumuran lalu inkubasi di incubator CO₂

4. Perlakuan

Setelah kultur telah mencapai jumlah sel darah yang konfluen, maka diberikan perlakuan kombinasi aspirin dan pulsasi listrik yang bertujuan untuk menginduksi mekanisme apoptosis sel melalui jalur Bcl-2 sehingga diharapkan jumlah sel limfoblas yang terdapat pada darah pasien berkurang.

Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Kontrol dan Perlakuan

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol	Sel darah pasien leukemia akut tanpa diberi perlakuan
Perlakuan 1 (P1)	Kombinasi aspirin dosis 2,5 mmol/L dan pulsasi listrik dengan frekuensi 200 Hz selama 5 s
Perlakuan 2 (P2)	Kombinasi aspirin dosis 5 mmol/L dan pulsasi listrik dengan frekuensi 200 Hz selama 5 s
Perlakuan 3 (P3)	Kombinasi aspirin dosis 10 mmol/L dan pulsasi listrik dengan frekuensi 200 Hz selama 5 s

Berikut adalah langkah-langkah untuk pemberian aspirin dan pulsasi listrik:

- Membuat coverslip untuk fiksasi
- Membuat aspirin cair dengan perhitungan dosis tertentu yang ditambahkan dengan media kultur (lampiran 3)
- Mengambil masing-masing sel dari sumuran lalu dibagi ke dalam 3 cuvet
- Memasukkan aspirin sesuai dosis ke dalam cuvet lalu homogenisasi dengan pipet
- Memberi pulsasi listrik sebesar 200 Hz selama 5 detik
- Melakukan inkubasi selama 2-3 hari

5. Panen dan Fiksasi Sel

- a. Menyiapkan coverslip dengan 1% larutan gelatin-coated selama 2 jam suhu ruangan, bilas dengan air distilasi, dan angin-anginkan semalaman
- b. Membilas lapisan coverslip sampai bersih dengan PBS
- c. Menambahkan 0,5 mL media kultur ke sumuran sel kultur yang sudah ada coverslip
- d. Membilas media kultur tiap sumuran dengan PBS
- e. Menambahkan 4% formaldehid perbandingan volume 1:1 dengan kultur sel dan inkubasi selama 20 menit pada suhu ruangan
- f. Membilas sumuran dua kali dengan PBS lalu tambahkan 400 μ L wash buffer
- g. Menyimpan hasil fiksasi pada kulkas suhu 4°C

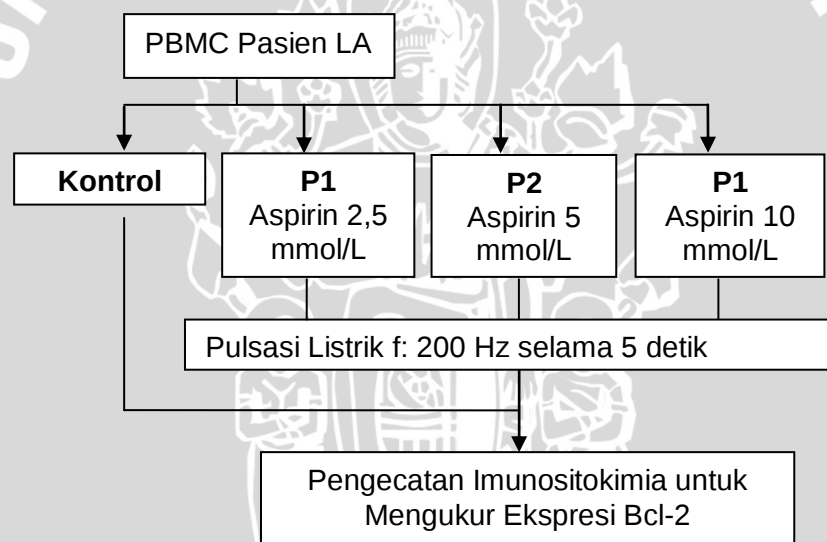
6. Pengukuran Ekspresi Bcl-2 dengan Imunositokimia

Setelah dilakukan fiksasi sel, kultur sel darah tepi dapat digunakan untuk pengetesan ekspresi Bcl-2 dengan metode imunositokimia.

- a. Mencuci sel yang telah terfiksasi dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit)
- b. Menambahkan H₂O₂ 3% selama 20 menit
- c. Mencuci sel yang telah terfiksasi dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit)
- d. Blocking dengan BSA 1% selama 30 menit
- e. Mencuci sel yang telah terfiksasi dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit)
- f. Menambahkan antibodi primer dalam PBS lalu inkubasi semalam 4°C
- g. Mencuci sel yang telah terfiksasi dengan PBS pH 7,4 (2x5 menit)
- h. Menambahkan antibodi sekunder IgG Biotin dalam PBS selama 1 jam pada suhu ruangan

- i. Mencuci sel yang telah terfiksasi dengan PBS pH 7,4 (2x5 menit)
- j. Menambahkan SA HRP dalam PBS selama 1 jam pada suhu ruangan
- k. Mencuci sel yang telah terfiksasi dengan PBS pH 7,4 (2x5 menit)
- l. Melakukan pewarnaan dengan Diamino benzidine
- m. Mencuci dengan akuades 2x5 menit
- n. Counter stain dengan Mayer hematoxylen
- o. Mencuci dengan air kran secukupnya
- p. Mounting dengan entelan

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

Keterangan:

Sampel darah pasien LA diisolasi untuk mendapatkan sel mononuclear dari *buffy coat* kemudian dikultur. Hasil kultur di bagi menjadi empat kelompok. Kelompok kontrol tanpa diberi perlakuan. Sedangkan kelompok perlakuan dibagi menjadi P1, P2, dan P3. Setelah diberikan aspirin sesuai dosis pada kelompok perlakuan, maka langsung diberikan pulsasi listrik 200 Hz selama 5 detik. Setelah itu dilakukan inkubasi kembali. Hasil kuantitatif penelitian berupa pengukuran tingkat apoptosis sel. Pengukuran tingkat apoptosis sel disini diwakili oleh penghitungan ekspresi Bcl-2 sebagai protein anti apoptosis.

4.9 Analisis Data

Data mengenai ekspresi Bcl-2 pada kelompok kontrol dan perlakuan pada penelitian yang diberikan kombinasi pulsasi listrik dan aspirin dianalisis dengan

menggunakan analisis statistik SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) versi 16.0 dengan metode Uji statistika *Analysis of Variance* (ANOVA) *Oneway*. Sebelum melakukan analisis data dengan uji anova, maka harus dipenuhi syarat-syarat dalam melakukan uji *One-way* ANOVA untuk lebih dari 2 kelompok data tidak berpasangan. Syarat uji *One-way* ANOVA adalah populasi yang akan diuji berdistribusi normal, varian dari populasi-populasi tersebut adalah sama (homogen) dan sampel tidak berhubungan dengan yang lain.

Hasil pengukuran tingkat ekspresi Bcl-2 pada kultur sel kontrol dan perlakuan dianalisis secara statistik dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah sebagai berikut:

- a. Uji normalitas data : bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan *mean* dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan *median* dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran data normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal digunakan uji non parametrik. Uji normalitas yang digunakan adalah Uji *Kolmogorov-smirnov*, dimana suatu data dikatakan memiliki sebaran yang normal jika nilai $p > 0,05$ (Dahlan, 2004).
- b. Uji homogenitas varian : bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisis dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA. Tetapi jika didapatkan varian

yang tidak homogen, dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA asalkan memiliki distribusi data yang normal. Pada uji homogenitas *Levene* suatu data dikatakan memiliki varians yang normal bila nilai signifikansi $p > 0,05$ (Dahlan, 2004)

- c. Uji *One-way* ANOVA : bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan. Pada uji statistik ini, yang dievaluasi adalah perbedaan tingkat ekspresi Bcl-2 antar kelompok. Berdasarkan uji statistik ini dapat diketahui apakah terdapat perbedaan tingkat ekspresi Bcl-2 yang menunjukkan adanya perbedaan apoptosis yang signifikan antar kelompok. Perbedaan dianggap bermakna jika nilai $p < 0,05$ atau dengan kata lain hipotesis Null ditolak. Pada uji ANOVA ini Hipotesis Null yang diajukan adalah "Keempat kelompok mempunyai tingkat ekspresi Bcl-2 yang menunjukkan tingkat apoptosis yang sama".
- d. *Post Hoc Tukey Test* : bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA.
- e. Uji Korelasi *Pearson* : untuk mengetahui apakah perakuan aspirin yang terbagi menjadi tiga dosis berpengaruh terhadap tingkat ekspresi Bcl-2 yang menunjukkan tingkat apoptosis kultur sel dalam penelitian ini. Agar penafsiran dapat dilakukan sesuai dengan ketentuan, kita perlu mempunyai kriteria yang menunjukkan kuat atau lemahnya korelasi. Kriterianya sebagai berikut (Sarwono, 2008) :

Nilai Korelasi 0	=	tidak ada korelasi antara dua variabel
Nilai Korelasi $> 0 - 0,25$	=	sangat lemah
Nilai Korelasi $> 0,25 - 0,5$	=	cukup

Nilai Korelasi $> 0,5 - 0,75$	=	kuat
Nilai Korelasi $> 0,75 - 0,99$	=	sangat kuat
Nilai Korelasi 1	=	sempurna

Korelasi dapat positif dan negatif. Korelasi positif menunjukkan arah yang sama hubungan antar variabel, artinya jika variabel 1 besar maka variabel 2 semakin besar pula. Sebaliknya korelasi negatif menunjukkan arah yang berlawanan, artinya jika variabel 1 besar, maka variabel 2 menjadi kecil (Sarwono, 2008).

Signifikansi hubungan dua variabel dapat dianalisis dengan ketentuan, jika probabilitas atau signifikansi $< 0,05$, hubungan kedua variabel signifikan. Jika probabilitas atau signifikansi $> 0,05$, hubungan kedua variabel tidak signifikan. Namun, jika output SPSS pada angka korelasi diberi tanda 2 bintang (**), maka probabilitas atau signifikansi menjadi sebesar 0,01 (Sarwono, 2008).

- f. Uji Regresi : untuk mengetahui pengaruh variabel independen terhadap variabel dependen setelah diketahui ada hubungan antara variabel tersebut.

BAB 5

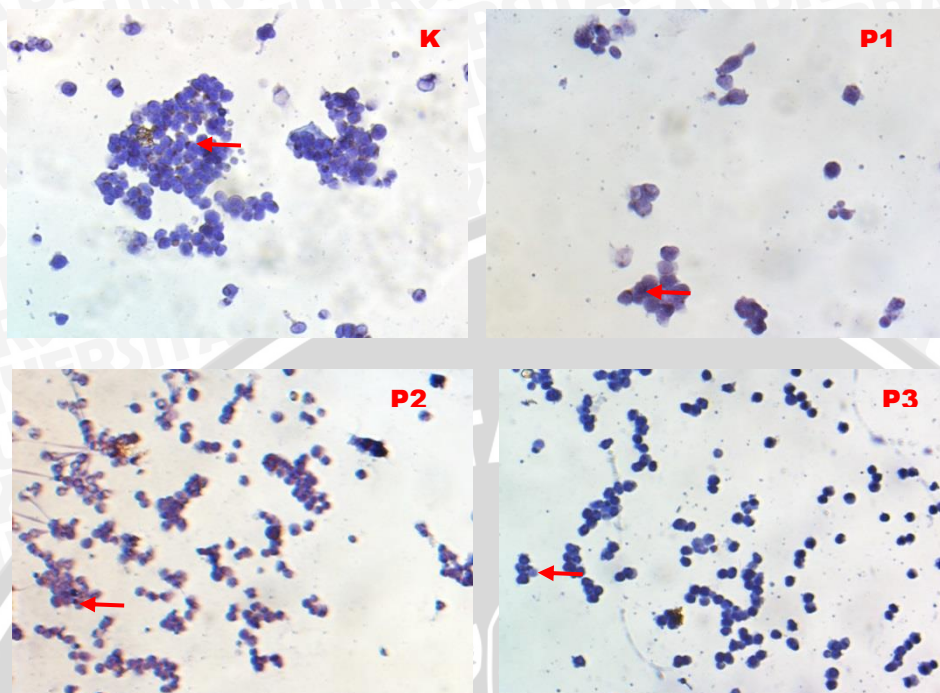
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini menggunakan kultur sel mononuklear darah tepi pasien leukemia akut dengan kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditentukan untuk mengetahui ekspresi Bcl-2 sebagai petanda anti apoptosis pada kultur sel tersebut. Dalam penelitian ini, kultur sel monuklear darah tepi pasien leukemia akut dibagi menjadi empat kelompok, yaitu kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan yang diberikan pulsasi listrik sebesar 200 Hz selama 5 detik ditambah dengan aspirin yang terbagi menjadi tiga dosis yaitu 2,5 mmol/L, 5 mmol/L, dan 10 mmol/L yang kemudian diinkubasi selama 3 hari dan dilakukan pengecatan menggunakan antibody Bcl-2 dengan metode immunositokimia. Data hasil penelitian diperoleh dengan cara menghitung ekspresi Bcl-2 sebagai petanda anti apoptosis persepuluh lapang pandang.

5.1.1 Gambaran Ekspresi Bcl-2 dengan Teknik Imunositokimia

Dengan menggunakan mikroskop *inverted* pembesaran 400x, sel mononuklear dengan sitoplasma berwarna coklat (panah merah) pada kultur PBMC pada kelompok kontrol lebih banyak daripada kelompok perlakuan.

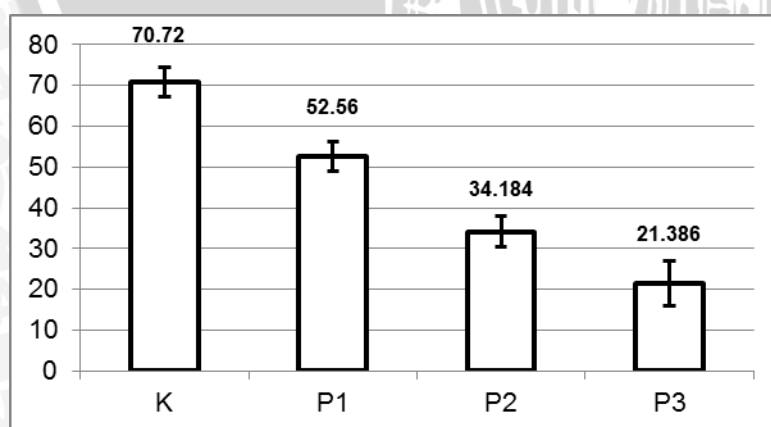


Gambar 5.1 Gambaran Ekspresi Bcl-2 pada Kultur Sel Darah Tepi Pasien Leukemia Akut

Keterangan:

Sel yang dihitung adalah sel yang tidak bertumpuk, bulat, dan mempunyai warna coklat pada sitoplasma (seperti yang ditunjuk dengan panah merah). Penghitungan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x pada 10 lapang pandang untuk tiap sumuran.

5.1.2 Perbandingan Ekspresi Bcl-2 antara Kelompok Perlakuan dan Kontrol



Gambar 5.2 Diagram Rerata Prosentase Ekspresi Bcl-2

Keterangan:

1. K: merupakan kelompok kontrol yang tidak diberikan perlakuan apapun mempunyai rerata ekspresi Bcl-2 sebesar 70,72 (3,634)

2. P1: merupakan kelompok perlakuan yang diberikan kombinasi pulsasi listrik sebesar 200 Hz selama 5 detik dan aspirin sebesar 2,5 mmol mempunyai rerata ekspresi Bcl-2 sebesar 52,56 (3,722)
3. P2: merupakan kelompok perlakuan yang diberikan kombinasi pulsasi listrik sebesar 200 Hz selama 5 detik dan aspirin sebesar 5 mmol mempunyai rerata ekspresi Bcl-2 sebesar 34,18(3,871)
4. P3: merupakan kelompok perlakuan yang diberikan kombinasi pulsasi listrik sebesar 200 Hz selama 5 detik dan aspirin sebesar 10 mmol mempunyai rerata ekspresi Bcl-2 sebesar 21,39 (5,413)

Dari gambar 5.2 di atas diketahui pada kelompok kontrol positif tanpa pemberian perlakuan didapatkan prosentase ekspresi Bcl-2 sebesar 70,72 %. Untuk kelompok P1 didapatkan prosentase ekspresi Bcl-2 sebesar 52,56 %. Sedangkan untuk kelompok P2 dan P3 secara berturut – turut sebesar 34,18 % dan 21,39 %. Dari keempat data tersebut dapat diketahui bahwa terjadi penurunan ekspresi Bcl-2 seiring dengan peningkatan jumlah dosis aspirin yang menandakan bahwa jumlah sel apoptosis semakin banyak pada dosis paling tinggi yang diberikan yaitu 10 mmol/L.

5.2 Analisis Data

5.2.1 Uji Normalitas Data

Berdasarkan pengujian normalitas data dengan menggunakan uji *Kolmogorov-smirnov* didapatkan bahwa data untuk semua kelompok mempunyai sebaran normal (uji *Kolmogorov-Smirnov*, $p > 0,05$) dengan nilai $p = 0,200$ (lampiran 5), sehingga H_0 ditolak dan dapat disimpulkan bahwa data variabel tersebut menyebar mengikuti sebaran normal. Dengan demikian dapat dilakukan pengujian dengan Anova karena syarat kenormalan data telah terpenuhi.

5.2.2 Uji Homogenitas Varian

Setelah mengetahui bahwa data berdistribusi normal, selanjutnya menentukan apakah data prosentase ekspresi Bcl-2 pada kelompok perlakuan memiliki varian yang berbeda atau tidak dengan menggunakan uji homogenitas *Levene*. Pada tabel uji homogenitas didapatkan bahwa data mempunyai varian

yang sama ($p > 0,05$) dengan nilai $p = 0,866$ (lampiran 5). Dengan demikian maka H_0 diterima artinya homogen sehingga analisis data dapat dilakukan dengan menggunakan uji One-way anova.

5.2.3 Uji One Way ANOVA

Pada uji statistik ini, yang dievaluasi adalah perbedaan prosentase ekspresi Bcl-2 pada kultur sel antar kelompok. Perbedaan prosentase rata-rata ekspresi Bcl-2 dianggap bermakna jika nilai $p < 0,05$ atau dengan kata lain H_0 ditolak. Pada uji ANOVA ini H_0 yang diajukan adalah "keempat kelompok mempunyai tingkat ekspresi Bcl-2 yang menunjukkan tingkat apoptosis yang sama". Dari hasil pengujian didapatkan bahwa nilai $p = 0.000$ (lampiran 5) dan berdasarkan hasil tersebut maka H_0 ditolak sehingga dapat disimpulkan bahwa "paling tidak terdapat perbedaan ekspresi Bcl-2 antara keempat kelompok yang berbeda".

5.2.4 Uji Post Hoc Multiple Comparison

Analisis mengenai perbedaan jumlah dari keempat kelompok dapat diketahui dalam *Post Hoc Multiple Comparison test*. Metode *Post Hoc* yang digunakan adalah uji *Tukey HSD*. Pada uji *Post Hoc Tukey HSD*, suatu data dikatakan berbeda secara bermakna apabila nilai signifikansi $p < 0,05$ (lampiran 5). Berdasarkan output uji yang terlampir menunjukkan bahwa perbandingan ekspresi Bcl-2 yang bermakna terletak pada semua kelompok baik antara kelompok dengan perlakuan maupun antar perlakuan.

5.2.5 Uji Korelasi Pearson

Korelasi Pearson digunakan untuk mengukur kekuatan hubungan dua variabel atau lebih yang berskala interval (parametrik). Dalam hal ini, uji korelasi pearson digunakan untuk membuktikan korelasi antara peningkatan dosis aspirin

yang diwakili dengan “kode” terhadap prosentase ekspresi Bcl-2. Dari hasil korelasi yang didapat yaitu -0,977 (lampiran 6), diketahui bahwa terdapat hubungan negatif antara dosis aspirin yang diberikan dengan ekspresi Bcl-2 yang dihitung tergolong signifikan.

5.2.6 Uji Regresi

Tabel 5.1 Hubungan antara Dosis Aspirin dan Ekspresi Bcl-2

Rasio Apoptosis Limfosit (sel/mm ²)		
	$r = -0,977$	
Dosis Aspirin	$r^2 = 0,955$	$p = 0,000$
(Kode)	$y = 86,307 -$	
	$16,638 x$	

Keterangan:

y = prosentase ekspresi Bcl-2

x = dosis aspirin yang diwakili dengan kode

Uji regresi merupakan analisis lanjutan dari korelasi yang digunakan untuk mengetahui sejauh mana pengaruh variabel independen terhadap variabel dependen setelah diketahui ada hubungan antara variabel tersebut. Dalam penelitian ini, uji regresi dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian dosis aspirin terhadap prosentase ekspresi Bcl-2. Hasil yang diperoleh menjelaskan bahwa probabilita dari dosis aspirin adalah sebesar 0,000 dibawah 0,05 (lampiran 6). Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan dosis aspirin memang berpengaruh secara signifikan terhadap ekspresi Bcl-2. Selain itu diketahui juga bahwa dosis aspirin mempengaruhi ekspresi Bcl-2 sebesar 95%.

BAB 6

PEMBAHASAN

Leukemia akut merupakan keganasan klonal pada sumsum tulang yang ditandai dengan terjadinya perkembangan yang berhenti (*arrest of development*) seri limfoid atau seri mieloid pada tahap awal perkembangannya (sel blas). Hal ini disebabkan karena ekspresi gen tertentu yang abnormal sebagai akibat dari translokasi kromosom. Akibatnya, terjadi kelainan proliferasi dan apoptosis yang ditandai dengan tingginya ekspresi NFkB sebagai petanda anti apoptosis (Shimizu *et al.*, 2009). Sedangkan Bcl-2 merupakan protein anti apoptosis yang berperan dalam regulasi apoptosis di mitokondria melalui kemampuannya berkompetisi dengan protein pro apoptosis (BAX) untuk menghambat pelepasan sitokrom c ke sitoplasma (Li *et al.*, 2001).

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan di US National Institutes of Health oleh Katja dan rekannya (2000) pada *cell line* menunjukkan adanya ekspresi yang berlebihan Bcl-2 dalam mencegah aspirin menginduksi pelepasan sitokrom c dan apoptosis. Kesimpulan penelitian tersebut adalah apoptosis terjadi karena pelepasan sitokrom c dari mitokondria dan terjadi aktivasi kaspase. Mekanisme tersebut merupakan efek yang menguntungkan dari penggunaan OAINS dalam pencegahan keganasan (Zimmermann *et al.*, 2000). Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Bellosillo (1998) menggunakan dosis aspirin 1 sampai 10 mmol/L untuk menginduksi apoptosis dan aktivasi kaspase pada sel mononuklear darah tepi pasien leukemia limfositik kronik sel B menunjukkan

bahwa efek yang dapat diobservasi yaitu pada dosis aspirin 2,5 sampai 5 mmol/L, namun pada dosis aspirin 10 mmol/L tidak memberikan pengaruh yang signifikan (Bellosillo *et al.*, 1998).

Pada penelitian ini menggunakan kombinasi antara aspirin dan pulsasi listrik didapatkan rata-rata prosentase ekspresi Bcl-2 tiap kelompok sebesar K: 70,72%; P1 (aspirin 2,5 mmol/L): 52,56%; P2 (aspirin 5 mmol/L): 34,18%; dan P3 (aspirin 10 mmol/L): 21,39%, dimana keempat kelompok tersebut terdapat perbedaan yang signifikan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pulsasi listrik berperan secara asistif dalam menurunkan ekspresi Bcl-2 sebagai anti-apoptosis. Hal itu dikarenakan pulsasi listrik dapat menyebabkan perubahan medan listrik yang diinduksi oleh elektroda sehingga membuka pori membran akibat induksi listrik atau biasa disebut elektroporasi sehingga dapat meningkatkan uptake obat-obatan ke dalam sel dan obat dapat bekerja dengan maksimal. Pada akhirnya diperlukan dosis obat yang lebih sedikit untuk mendapatkan efektifitas yang sama dengan pemberian tanpa paparan pulsasi listrik.

Pemberian aspirin yang dikombinasikan dengan pulsasi listrik pada kultur PBMC dari pasien leukemia akut akan memicu proses apoptosis melalui penghambatan jalur Bcl-2, dengan catatan bahwa pulsasi listrik berperan secara asistif. Hasil penelitian ini membuktikan adanya penurunan ekspresi Bcl-2 sebagai petanda anti apoptosis yang bermakna antar kelompok yaitu ekspresi Bcl-2 paling rendah berada pada perlakuan P3 dengan dosis aspirin 10 mmol/L dan pulsasi listrik 200Hz selama 5 detik ($p = 0,000$). Hasil tersebut ditunjang oleh penelitian yang dilakukan oleh Dina Fauziah (2013) dengan jenis perlakuan yang sama, menunjukkan bahwa hasil penghitungan sel yang hidup mengalami penurunan bermakna setelah dilakukan *counting* dengan Sysmex 4000i

(Fauziah, 2013). Dari hubungan antara penelitian ini dan penelitian yang sudah ada, menunjukkan bahwa benar terjadi apoptosis pada kultur sel ini.

Pada hasil analisis korelasi, didapatkan hasil yang cukup kuat ($r = -0,977$) dan signifikan ($p = 0,000$) mengenai hubungan antara peningkatan dosis aspirin yang diberikan dengan prosentase ekspresi Bcl-2 pada kultur PBMC pasien leukemia akut. Semakin besar dosis aspirin, maka semakin kecil ekspresi Bcl-2 yang menunjukkan semakin meningkatnya apoptosis pada sel yang mengalami keganasan tersebut. Sedangkan pada analisis regresi linier didapatkan hubungan negatif bermakna antara dosis aspirin dan ekspresi Bcl-2, dimana ekspresi Bcl-2 dipengaruhi oleh pemberian dosis aspirin sebesar 95%. Apoptosis limfosit yang ditandai dengan penurunan ekspresi Bcl-2 dapat diprediksi dengan rumus: Ekspresi Bcl-2 = $86,307 - 16,638$ (dosis aspirin yang diwakili dengan kode). Namun, tampaknya penurunan jumlah sel ini dapat juga diperankan oleh faktor selain mempengaruhi ekspresi Bcl-2. Hal ini menunjukkan bahwa penghambatan apoptosis limfosit pada leukemia akut tidak hanya diperankan oleh Bcl-2, tapi juga diperankan oleh beberapa faktor lain yang saling berinteraksi. Faktor tersebut antara lain; peningkatan ekspresi pro-apoptosis BAX, penurunan ekspresi anti-apoptosis kaspase 3, dan/atau faktor proliferasi NFkB.

Penelitian ini menunjukkan bahwa benar terdapat penurunan ekspresi Bcl-2 sebagai anti-apoptosis sehingga pada leukemia akut. Hal tersebut berarti bahwa jumlah sel yang apoptosis meningkat. Adanya berbagai faktor yang ikut mempengaruhi apoptosis limfosit pada penelitian ini, disebabkan adanya respon individual pasien yang berbeda-beda seperti: staging kanker pasien, fenotipe dan genotipe pasien, status gizi, dan sebagainya yang tidak mungkin diseragamkan

pada penelitian ini. Penelitian ini mampu menunjukkan peran jalur intrinsik apoptosis (khususnya Bcl-2) dalam peningkatan apoptosis sel mononuklear sehingga dapat dipertimbangkan sebagai terapi leukemia akut melalui jalur ini.

Terdapat keterbatasan pada penelitian ini, yaitu: (1) pemeriksaan hanya dilakukan sekali setelah dilakukan paparan kombinasi aspirin dan pulsasi listrik, (2) penentuan limfosit hanya berdasarkan morfologi (tidak menggunakan petanda/*petanda* limfosit) sehingga tidak diketahui subset limfosit yang diamati, (3) terdapat keterbatasan sampel sehingga tidak terdapat kelompok perlakuan aspirin atau pulsasi listrik saja, (4) pemberian pulsasi listrik pada penelitian ini masih bersifat asistif, dimana tidak terdapat perubahan frekuensi dan lama paparan, (5) terdapat keterbatasan teknik imunositokimia dalam penentuan sel yang mengekspresikan Bcl-2, (6) faktor-faktor lain yang mempengaruhi apoptosis dan proliferasi sel mononuklear yang tidak diperiksa, (7) jenis leukemia akut yang diteliti, seperti LLA atau LMA tipe tertentu, serta (8) terdapat respon individual, seperti usia pasien, staging kanker pasien, fenotipe dan genotipe pasien, status gizi, serta hal lain yang tidak mungkin diseragamkan pada penelitian ini.

Dengan keterbatasan tersebut maka perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan: (1) penambahan kriteria inklusi dan eksklusi untuk mendapat sampel yang seragam, (2) pemeriksaan secara serial mulai dari sebelum paparan sampai dengan setelah paparan, (3) pemeriksaan petanda limfosit untuk menentukan subset limfosit (terutama sel T CD4+), (4) pemeriksaan ekspresi Bcl-2 dan petanda pro-apoptosis BAX dengan *immunophenotyping flow cytometry*, dan (5) pemeriksaan faktor-faktor lain yang kemungkinan mempengaruhi apoptosis limfosit, antara lain: IFN- γ , Fas/Fas-L, BAK, protein-protein pro- dan anti-apoptosis, serta protein proliferasi.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Kombinasi aspirin dan pulsasi listrik dapat meningkatkan apoptosis PBMC dari pasien leukemia akut yang ditandai dengan penurunan ekspresi Bcl-2. Sel leukemia akut yang mengalami apoptosis terbanyak terdapat pada dosis aspirin 10 mmol/L. Hasil tersebut ditunjukkan dengan penurunan ekspresi Bcl-2 yang signifikan ($p = 0,000$).

7.2 Saran

1. Diperlukan pengamatan sitopatologi dan biomolekuler sel-sel leukemia akut yang telah dilakukan kultur sehingga efek peningkatan apoptosis sel yang mengalami keganasan tersebut akan lebih jelas secara sitologi maupun biomolekuler.
2. Diperlukan penelitian lanjutan dengan menambah kelompok penelitian menjadi kelompok aspirin saja, pulsasi listrik saja, dan kombinasi pulsasi listrik dan aspirin yang dilaksanakan secara bersamaan

DAFTAR PUSTAKA

- Alderton LE, Spector LG, Blair CK, Roesler M, Olshan AS, Robison LL, *et al.* 2006. Child and Maternal Household Chemical Exposure and the Risk of Acute Leukemia in Children with Down's syndrome: a Report from the Children's Oncology Group. (Abstract). *PubMed*, 164 (3): 212-21.
- American Cancer Society. 2012. *Childhood Leukemia*, (Online), (<http://www.cancer.org/cancer/leukemia/inchildren/detailedguide/childhood-leukemia-what-is-childhood-leukemia>, diakses 20 Desember 2012).
- ATCC. 2010. *Product Detail*, (Online), (<http://www.atcc.com/SearchCatalogs/Linkin/?id=TIB-152>, diakses 27 Desember 2012).
- Beebe, SJ, Paula M. Fox, Laura J. Rec, *et al.*, 2002. Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: Apoptosis induction and tumor growth inhibition. *IEEE Trans. Plasma Sci.* (30): 286–292.
- Bellosillo, B., Pique, M., Barragan, M., Caasta, E., Villamor, N., Colomer, D., *et al.*, 1998. Aspirin and Salicylate Induce Apoptosis and Activation of Caspase in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Blood*, 92: 1406-1414.
- Biocompare. 2012. *Human PBMC Isolation and Counting Using the Scepter™ 2.0 Handheld Automated Cell Counter*, (Online), (<http://www.biocompare.com/Application-Notes/118624-Human-PBMC-Isolation-and-Counting-Using-the-Scepter-2-0-Handheld-Automated-Cell-Counter/>, diakses 2 Maret 2012).
- Blanchard, Kathleen. 2012. *New Anti-cancer Hybrid Aspirin Developed*, (Online), (<http://digitaljournal.com/article/320418>, diakses 22 September 2012).
- Boehning D, Patterson RL, Snyder SH. 2004. Apoptosis and Calcium: New Roles for Cytochrome c and Inositol 1,4,5-trisphosphate. *PubMed*, 3 (3): 252-4.
- Chandrayani, S., Adisasmita, A.C & Tehuteru, E.S. 2010. Gambaran Epidemiologi Kasus Leukemia Anak di Rumah Sakit Kanker "Dharmais", 2004-2008. *Indonesia Journal of Cancer* Vol 4, No 1.
- Chrestella, Jessy. 2009. *Neoplasma*. Diterbitkan, USU Institutional Repository, Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Conter V, Rizzari C, Sala A, Chiesa R, Citterio M, & Biondi A. 2004. *Acute Lymphoblastic Leukemia*, (Online), (<http://orpha.net/data/patho/GB/uk-ALL.pdf>, diakses 3 Desember 2012).

- Cotterchio, M., N. Kreiger, M. Sloan, & A. Steingart. 2001. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemio. Biopetanda Prev*, 10, 1213-1217.
- Elmore S. 2007. Apoptosis : A Review of Programmed Cell Death. *Toxicology Pathology*, 35: 495-516.
- ENHIS and WHO Europe. 2009. *Incidence of Childhood Leukaemia*, FACT Sheet, Code: RPG4_Rad_E1.
- Evans WE, Relling MV. 2008. Chemotherapy for acute leukemia in children. *Nature* 429: 426-6.
- Fan, T., Han, L., Cong, R. & Liang, J. 2005. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, ISSN: 1672-9145.
- Fauziah, Dina. 2013. *Efek Pemberian Aspirin Melalui Pulsasi Listrik Dalam Menurunkan Jumlah Leukosit Pada Kultur Leukosit Pasien Leukemia Akut*, Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (Tugas Akhir).
- FKUI. 2007. *Farmakologi dan Terapi*, Edisi 5, Badan Penerbit FKUI, Jakarta, hal. 230-246.
- Gehl, J. 2003. *Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research*. Denmark: Herlev Hospital in University of Copenhagen.
- Greaves M. 2010. Infection, immune and etily of acute leukemia. *Nat Rev Cancer*, 6: 193-203.
- Guicciardi ME & Gores GJ. 2009. Life and Death by Death Receptors. *FASEB J*, 23: 1625-37.
- Guyton, A.C. 1987. *Fisiologi Manusia dan Mekanisme Penyakit*, Edisi 3, EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta, hal. 56.
- Haemmerich D, Schutt DJ, Wright AW, Webster JG, Mahvi DM. 2009. Electrical Conductivity Measurement of Excised Human Metastatic Liver Tumours Before and After Thermal Ablation. *Physol Meas*, 30 (5): 459-66, doi: 10.1088/0967-3334/30/003.
- Hagl DM, Popovic D, Hagness SC, Booske JH & Okoniewski M. 2003. Sensing Volume of Open-ended Coaxial Probes for Dielectric Characterization of Breast Tissue at Microwave Frequencies *IEEE Trans. Microw. Theory Tech*, 51 1194–206.
- Heiskanen, K. M., Bhat, M. B., Wang, H. W., Ma, J. & Nieminen, A. L. 1999. Mitochondrial Depolarization Accompanies Cytochrome c Release during Apoptosis in PC6 cells. *J. Biol. Chem*, 274: 5654-5658.

- Hengartner, M.O. 2000. The Biochemistry of Apoptosis. *Nature*. 407, 770-776.
- Jaroszeski, M.J., Dang, V., Pottinger, C., Hickey, J. Gilbert, R. & Heller, R. 2000. Toxicity of Anticancer Agents Mediated by Electroporation in vitro. *Anticancer Drugs* 11, 201-208.
- Kang, M.H. & Reynolds, C.P. 2009. Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. *PMC*, 15 (4): 1126-1132.
- Kasum, Christina M, *et al.*. 2003. Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Use and Risk of Adult Leukemia. *Cancer Epidemiology Bioprevention & Prevention Prev June* 2003 12; 534.
- Katzung, B.G.. 2004. *Farmakologi Dasar dan Klinik*, Edisi 9, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Kendall, H.E., Vacek, P.M., Rivers, J., *et al.*. 2006. Analysis of Genetic Alterations and Clonal Proliferation in Children Treated for Acute Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res* (66): 8455 – 8561.
- Kennedy, S.M., Ji, Z., Hedstrom, J.C., Booske, J.H, *et al.*. 2008. Quantification of Electroporative Uptake Kinetics and Electric Field Heterogeneity Effects in Cells. *Biophysical Journal* (94): 5018–5027.
- Kirson, E.D *et al.*. 2004. Disruption of Cancer Cell Replication by Alternating Electric Fields. *CANCER RESEARCH* (64): 3288–3295.
- Leukemia Foundation. 2010. *Understanding Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in Children: A Guide for Parents and Family*, Leukemia Foundation, Australia, p. 17.
- Leukemia Foundation. 2008. *Acute Lymphoblastic Leukemia*, (Online), (http://www.leukaemia.org.au/web/aboutdiseases/leukaemias_all.php, diakses 20 Maret 2013).
- Li, H., Kolluri, S.K., Gu, J., Dawson, M.I., Cao, X., Hobbs, P.D., *et al.* 2000. Cytochrome c Release and Apoptosis Induced by Mitochondrial Targeting of Nuclear Orphan Receptor TR3. *Science* 289, 1159-1164.
- Li, M., Wu, X. & Xu, X. 2001. Induction of Apoptosis in Colon Cancer Cells by Cyclooxygenase-2 Inhibitor NS398 through a Cytochrome c-dependent Pathway. *Clin Cancer Res*, 7: 1010.
- Long, G., Bakos, G., Shires, P.K., Gritter, L., Crissman, J.W., Harris, J.L., *et al.* 2013. Histological and Finite Element Analysis of Cell Death due to Irreversible Electroporation. *TCRT Express*, Vol 1, Number 1.
- Miklavc, Damijan I.N.A., Francis X. Hart. 2006. *Electric Properties of Tissue*. England: Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering. Hlm 6.

Moore, V.D.G., Schlis, K.D., Sallan, S.E., Armstrong, S.A., and Letai, A. 2008. BCL-2 Dependence and ABT-737 Sensitivity in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*, doi: 10.1182/blood-2007-06-098012.

National Cancer Institute. 2012. *Blood Cell Lineage*, (Online), (<http://training.seer.cancer.gov/leukemia/anatomy/lineage.html>, diakses 3 Desember 2012).

Pasche B. 2012. Aspirin-From Prevention to Targeted Therapy. *N Engl J Med*, 367 (17): 1650-1, doi: 10.1056/NEJMe1210322.

Rastogi, R.P., Sinha, R. & Sinha, R.P. 2009. Apoptosis: Molecular Mechanisms and Pathogenicity. *EXCLI J*, 8: 155-181.

Sali, Paula dan Jewell, Andrew P. 2006. IL-1 Does Not Reverse Reverse The Anti-proliferative Effect of Aspirin in Breast Cancer. *International Seminars in Surgical Oncology* 2006, 3:24 doi:10.1186/1477-7800-3-24.

Schrör, Karsten. 2009. *Acetylsalicylic Acid*. ISBN 978-3-527-32109-4. Seiter, Karen. 2012. Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Emmanuel C.B., Clarence S., Francisco T., Ronald A.S., (Eds), *Medscape Reference*, (Online), (<http://emedicine.medscape.com/article/207631-overview#aw2aab6b2b3>, diakses 20 Desember 2012).

Sersa, G., Cufer, T., Cemazar, M., Rebersek, M. & Zvonimir, R. 2000. Electrochemotherapy with Bleomycin in the Treatment of Hypernephroma Metastasis: Case Report and Literature Review . *Tumori* 86: 163-165.

Shimizu, D *et al.*. 2004. Cyclooxygenase-2 (COX-2) mediated anti-apoptosis may occur via Bcl-2 in the progression of Barrett's esophagus to adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 22, No 14S (July 15 Supplement), 2004: 9529.

Stephen J *et al.*. 2003. Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells. *The FASEB Journal* : 10.1096/fj.02-0859fje.

Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. 1998. Caspases: Enemies Within. *Science*, 281: 1312-1316.

WHO. 2008. *Acute Lymphoblastic Leukemia in Children A Brief Review of the Internationally Available Protocols*. This paper presented at the Second Meeting of the Subcommittee of the Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines, Geneva, September 29th-October 3rd.

LAMPIRAN

Lampiran 1

Jadwal Faktual Pelaksanaan Penelitian

No	Tanggal	Agenda
1.	November 2013	Ethical clearance penelitian
2.	22 Februari 2013	konsultasi dengan dosen pembimbing untuk memulai penelitian
3.	23 April – 8 Juli 2013	melakukan serangkaian kegiatan penelitian: 1. Pembuatan kultur 2. Perlakuan 3. Panen kultur yang telah diberi perlakuan 4. Penghitungan sel kultur yang apoptosis dengan menghitung ekspresi Bcl-2 menggunakan metode immunositokimia
4	10 juli – 7 Oktober 2013	Pengambilan data, analisis data dan penyelesaian Tugas Akhir

Lampiran 2

Dokumentasi Penelitian

Gambar 1. Pengambilan sampel di lab Sentral RSSA



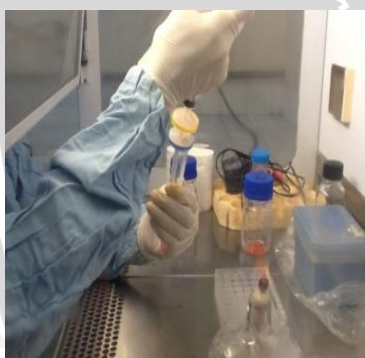
Gambar 2. Persiapan bahan-bahan untuk kultur



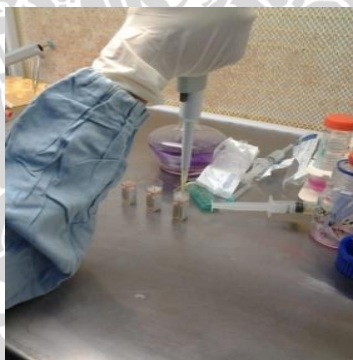
Gambar 3. Kultur sel (isolasi sampel)



Gambar 4. Kultur sel



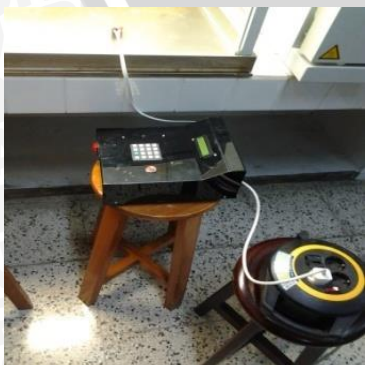
Gambar 5. Perlakuan pemberian aspirin



Gambar 6. Perlakuan Listrik pulsasi dan aspirin



Gambar 7. Alat pulsasi listrik



Gambar 8. Panen sel (setelah 3 hari)



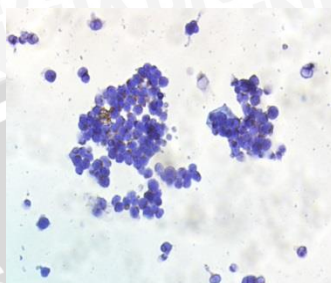
Gambar 9. Pengecatan menggunakan immunositokimia



Gambar 10. Antibody primer NfKb p65 dan Bcl-2



Gambar 11. Pembacaan hasil pengecatan menggunakan inverted mikroskop



Lampiran 3**Penghitungan Dosis Aspirin**

Massa aspirin = 180.157 mg/mol

Kelarutan aspirin = 3 mg/mL

1 sumuran menampung 700 μ L = 0,7 mL

Kelarutan dosis 2,5 mmol/L (P1)

= 2,5 mmol/L x 180.157 mg/mol

= 450,392 x 10⁻³ mg/mL

= 0,45 mg/mL

Kelarutan dosis 1 x Volume sumuran = Kelarutan aspirin x Volume yang diinginkan

0,45 mg/mL x 0.7 mL = 3 mg/mL x Volume yang diinginkan

Volume yang diinginkan = 0,105 mL = 105 μ L

Volume dosis 1 = 105 μ L

Volume dosis 2 (5 mmol/L) = 210 μ L

Volume dosis 3 (10 mmol/L) = 420 μ L

P1 = 105 μ L suspensi aspirin + 595 μ L kultur sel

P2 = 210 μ L suspensi aspirin + 490 μ L kultur sel

P3 = 420 μ L suspensi aspirin + 280 μ L kultur sel

Lampiran 4

Hasil Perhitungan Ekspresi Bcl-2 Pada Kultur Sel (rerata 10 lapang pandang pada setiap kelompok penelitian)

No	Kode	Prosentase ekspresi Bcl-2 per lapang pandang (%)	Prosentase apoptosis per lapang pandang (%)
1	K 1	68,230	31,770
2	K 2	75,389	24,611
3	K 3	73,575	26,425
4	K 4	66,795	33,205
5	K 5	69,030	30,970
6	P1.1	50,732	49,268
7	P1.2	55,196	44,804
8	P1.3	56,680	43,320
9	P1.4	52,919	47,081
10	P1.5	47,271	52,729
11	P2.1	32,850	67,15
12	P2.2	36,456	63,544
13	P2.3	39,727	60,273
14	P2.4	30,166	69,834
15	P2.5	31,712	68,288
16	P3.1	21,820	78,180
17	P3.2	28,807	71,193
18	P3.3	14,218	85,782
19	P3.4	18,771	81,229
20	P3.5	23,305	76,695

Lampiran 5

Diagram Rerata Proentase Ekspresi Bcl-2 dan Apoptosis Sel

Diagram Rerata Prosentase Ekspresi Bcl-2

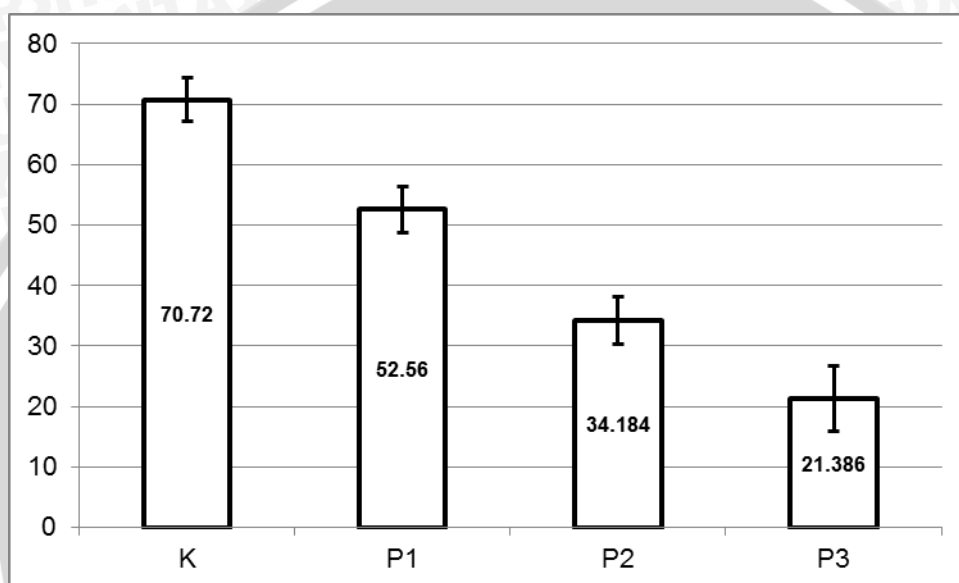
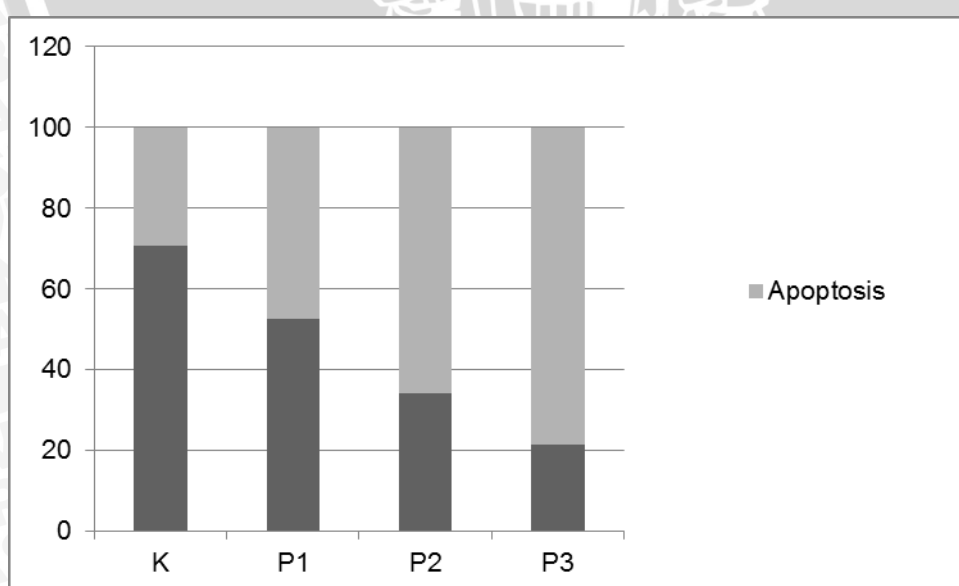


Diagram Perbandingan Rerata Ekspresi Bcl-2 dengan Sel yang Apoptosis



Lampiran 6

Hasil Uji Normalitas Data, Uji Homogenitas Varian, Uji Anova, serta Uji Post Hoc Perlakuan (Pulsasi Listrik dan Aspirin) dan Bcl-2

Tabel Hasil Tes Normalitas Kolmogorov-Smirnov

Tests of Normality							
	Kode	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Bcl_2	1	.221	5	.200*	.928	5	.583
	2	.161	5	.200*	.971	5	.879
	3	.235	5	.200*	.938	5	.654
	4	.161	5	.200*	.994	5	.991
a. Lilliefors Significance Correction							
*. This is a lower bound of the true significance.							

Tabel Hasil Tes Homogenitas Levene

Test of Homogeneity of Variances			
Bcl_2			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.242	3	16	.866

Tabel Hasil Uji ANOVA

ANOVA					
Bcl_2					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6964.741	3	2321.580	130.166	.000
Within Groups	285.368	16	17.835		
Total	7250.109	19			

Tabel Hasil Uji Post Hoc

Multiple Comparisons							
Dependent Variable: Bcl_2							
	(I) Kode	(J) Kode	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1	2	18.16000*	2.67099	.000	10.5182	25.8018
		3	36.53600*	2.67099	.000	28.8942	44.1778
		4	49.33400*	2.67099	.000	41.6922	56.9758
	2	1	-18.16000*	2.67099	.000	-25.8018	-10.5182
		3	18.37600*	2.67099	.000	10.7342	26.0178
		4	31.17400*	2.67099	.000	23.5322	38.8158
	3	1	-36.53600*	2.67099	.000	-44.1778	-28.8942
		2	-18.37600*	2.67099	.000	-26.0178	-10.7342
		4	12.79800*	2.67099	.001	5.1562	20.4398
	4	1	-49.33400*	2.67099	.000	-56.9758	-41.6922
		2	-31.17400*	2.67099	.000	-38.8158	-23.5322
		3	-12.79800*	2.67099	.001	-20.4398	-5.1562
LSD	1	2	18.16000*	2.67099	.000	12.4978	23.8222
		3	36.53600*	2.67099	.000	30.8738	42.1982
		4	49.33400*	2.67099	.000	43.6718	54.9962
	2	1	-18.16000*	2.67099	.000	-23.8222	-12.4978
		3	18.37600*	2.67099	.000	12.7138	24.0382
		4	31.17400*	2.67099	.000	25.5118	36.8362
	3	1	-36.53600*	2.67099	.000	-42.1982	-30.8738
		2	-18.37600*	2.67099	.000	-24.0382	-12.7138
		4	12.79800*	2.67099	.000	7.1358	18.4602
	4	1	-49.33400*	2.67099	.000	-54.9962	-43.6718
		2	-31.17400*	2.67099	.000	-36.8362	-25.5118
		3	-12.79800*	2.67099	.000	-18.4602	-7.1358

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

Lampiran 7

Hasil Uji Korelasi dan Uji Regresi antara Perlakuan (Pulsasi Listrik dan Aspirin) dengan Ekspresi Bcl-2

Tabel Hasil Uji Korelasi

Correlations			
		Bcl_2	Kode
Pearson Correlation	Bcl_2	1.000	-.977
	Kode	-.977	1.000
Sig. (1-tailed)	Bcl_2	.	.000
	Kode	.000	.
N	Bcl_2	20	20
	Kode	20	20

Tabel Hasil Uji Regresi

Model Summary				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.977 ^a	.955	.952	4.27979
a. Predictors: (Constant), Kode				

Coefficients ^a						
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	86.307	2.344		36.818	.000
	Kode	-16.638	.856	-.977	-19.438	.000
a. Dependent Variable: Bcl_2						