

PENGARUH EKSTRAK DAUN BENALU MANGGA (*Dendrophthoe pentandra*) TERHADAP VIABILITAS DAN EKSPRESI CASPASE 3 AKTIF PADA SEL KANKER SERVIKS (SEL HELA)

TUGAS AKHIR

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



Oleh :

APRILLIA EKA VERY RACHMAWATI

0910710037

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

2013

HALAMAN PENGESAHAN
TUGAS AKHIR

PENGARUH EKSTRAK DAUN BENALU MANGGA (*Dendrophthoe
pentandra*) TERHADAP VIABILITAS DAN EKSPRESI CASPASE 3 AKTIF
PADA SEL KANKER SERVIKS (SEL HELA)

Oleh :

Aprillia Eka Very Rachmawati

NIM : 0910710037

Telah diuji pada :

Hari : Kamis

Tanggal : 14 Februari 2013

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

dr. Dian Hasanah, M.Biomed
19740411 200912 2002

Penguji II / Pembimbing I

Dr. dr. I Ketut Gede Muliarta, Sp.PA
090347226

Penguji III / Pembimbing II

Dr.dr.Kusworini, M.Kes, Sp.PK
19560331 19880 2 2001

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kedokteran

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

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Puji syukur alhamdulillah penulis haturkan kepada Allah *Subhanahu wa Ta'ala* yang telah memberikan kemudahan dan kelancaran kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul "Pengaruh Ekstrak Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) Terhadap Viabilitas dan Ekspresi Caspase 3 Aktif pada Sel Kanker Serviks (Sel HeLa)" ini dengan baik.

Pada penulisan Tugas Akhir ini, penulis juga mengucapkan banyak terimakasih kepada segenap pihak yang telah membantu penulis sehingga Tugas Akhir ini dapat terselesaikan, terutama kepada :

1. Dr. dr. *Karyono Mintaroem*, Sp.PA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberi penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. dr. *Teguh Wahyu Sardjono DTM&H, M.Sc, Sp.ParK*, Kajur Kedokteran atas bimbingannya selama ini.
3. Dr. dr. *I Ketut Gede Muliarta*, Sp.PA selaku dosen pembimbing pertama atas segala masukan, bimbingan, dan bantuan yang diberikan selama penulisan Tugas Akhir ini.
4. Dr. dr. *Kusworini, M.Kes, Sp.PK* selaku dosen pembimbing kedua atas segala saran dan bimbingan selama pembuatan Tugas Akhir ini.
5. dr. *Dian Hasanah, M.Biomed*, yang bersedia meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan suasana yang sangat menyenangkan saat menguji.
6. Dr.rer.nat. *Tri Yudani Mardining Raras, M.App.Sc* selaku Kepala Laboratorium Biomedik FKUB atas bantuan dan dukungan dalam memberi keringanan subkultur sel HeLa.
7. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas bantuan dan kemudahan yang telah diberikan.
8. Ayah, Hidayat dan ibu, Naning Setiyanti, atas kasih sayang, doa, serta dukungan lahir dan batin yang telah diberikan sampai saat ini.

9. Mbak Fitri, Pak Santuman, Pak Wibi, Mbak Bunga dan Mbak Ami yang memberi bantuan dalam melakukan dan menyusun metode penelitian Tugas Akhir ini.
10. Teman seperjuangan saya Zakiyah Zulaifah yang selalu membantu, menemani dan memberi motivasi dalam penelitian ini.
11. Kak Efriko Saifillah yang telah membantu dalam menemukan ide judul Tugas Akhir ini.
12. Serta berbagai pihak yang tidak dapat disebutkan satu demi satu yang telah memberi dukungan agar Tugas Akhir ini dapat terselesaikan dengan baik.

Penulis menyadari bahwa Tugas Akhir ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis menerima dengan senang hati untuk segala saran dan kritik yang membangun. Akhir kata, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan, Amin.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh



Malang, Februari 2013

Penulis



ABSTRAK

Rachmawati, Aprillia Eka Very. 2013. **Pengaruh Ekstrak Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) Terhadap Viabilitas dan Ekspresi Caspase 3 Aktif pada Sel Kanker Serviks (Sel HeLa)**. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Pembimbing : (1) Dr. I Ketut Gede Muliarta, Sp.PA, dr (2) Dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK, dr.

Kanker serviks merupakan jenis kanker tersering kedua pada wanita di dunia. Benalu randu (*Dendrophthoe pentandra*) memiliki kandungan kuersetin sebesar 39,8 mg/g. Benalu mangga pun memiliki jenis *Dendrophthoe pentandra*. Kuersetin merupakan salah satu golongan flavonoid yang mampu menginduksi kematian sel melalui mekanisme apoptosis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun benalu mangga terhadap viabilitas sel dan ekspresi caspase 3 aktif. Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel HeLa. Pada kelompok kontrol, sel HeLa tidak diberi perlakuan. Sedangkan pada kelompok perlakuan, diberikan ekstrak daun benalu mangga dalam tiga dosis konsentrasi yang berbeda, yaitu 50 µg/ml, 100 µg/ml dan 200 µg/ml. Metode *MTT assay* dilakukan untuk mengetahui viabilitas sel dan metode imunohistokimia untuk mengetahui ekspresi caspase 3 aktif pada sel HeLa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua dosis ekstrak mampu menurunkan viabilitas sel dan meningkatkan ekspresi caspase 3 aktif secara bermakna (ANOVA $p < 0,05$). Jika dibandingkan dengan dosis ekstrak 50 µg/ml dan 200 µg/ml, dosis ekstrak 100 µg/ml hanya memberikan sedikit efek baik pada penurunan viabilitas sel HeLa maupun pada peningkatan ekspresi caspase 3 aktif. Hasil penelitian ini hampir serupa dengan hasil penelitian pada *Human Hepatoma Cell Line* (HepG2) yang dilakukan oleh Granado-Serrano tahun 2006. Selain itu, hasil penelitian ini membuktikan bahwa dosis ekstrak 200 µg/ml merupakan dosis yang memiliki efek paling besar.

Kata kunci: kanker, sel HeLa, benalu mangga, viabilitas, caspase 3

ABSTRACT

Rachmawati, Aprillia Eka Very. 2013. **The Effect of Parasite on Mango Leaf Extract (*Dendrophthoe pentandra*) to Viability and Caspase 3 Active Expression in Cervical Cancer Cells (Cells HeLa)**. Final Assignment, Medical Department, Faculty of Medicine Brawijaya University, Malang. Supervisors : (1) Dr. I Ketut Gede Muliarta, Sp.PA, dr (2) Dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK, dr.

Cervical cancer is the second commonest kind of cancer on woman in the world. Parasite on randu (*Dendrophthoe pentandra*) contains 39.8 mg/g quercetin. Parasite on mango also has kind of *Dendrophthoe pentandra*. Quercetin is one of flavonoid that able to induce cell death through apoptosis mechanism. This study is aimed to determine the effect of parasite on mango leaf extract to cell viability and caspase 3 active expression. Subjects that have been used in this study were HeLa cells. In the control group, HeLa cells were untreated. While in the treatment group, HeLa cells were given benalu mango leaf extract in three different concentration of doses, such as 50 µg/ml, 100 µg/ml and 200 µg/ml. MTT assay method was performed to determine cell viability and immunohistochemistry method to determine caspase 3 active expression in HeLa cells. Results showed that all doses of the extract can reduce cell viability and increase caspase 3 active expression significantly (ANOVA $p < 0.05$). Compared with 50 µg/ml extract dose and 200 µg/ml extract dose, 100 µg/ml extract dose has little effect on the decline in HeLa cell viability and the increase in caspase 3 active expression. The results of this study were similar to the results of research on the Human Hepatoma Cell Line (HepG2) by Granado-Serrano in 2006. In addition, the results of this study demonstrated that 200 µg/ml extract dose has the greatest effect.

Keywords : cancer, HeLa cells, parasite on mango, viability, caspase 3

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul.....	i
Lembar Pengesahan	ii
Kata Pengantar.....	iii
Abstrak	v
Abstract	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Gambar.....	x
Datar tabel.....	xi
Daftar Lampiran.....	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kanker	5
2.1.1 Definisi Kanker	5
2.1.2 Jenis Kanker.....	5
2.1.3 Karsinogenesis.....	6
2.1.4 Metastasis	8
2.1.5 Angiogenesis.....	8
2.2 Kanker Serviks	9
2.2.1 Definisi	9
2.2.2 Etiologi	9
2.2.3 Faktor Resiko	10
2.2.4 Patogenesis.....	10
2.2.5 Patofisiologi.....	12

2.2.6	Manifestasi Klinis.....	14
2.2.7	Diagnosis.....	14
2.2.8	Stadium Kanker Serviks	16
2.2.9	Terapi.....	19
2.2.10	Pencegahan	20
2.3	Apoptosis	21
2.4	Benalu Mangga (<i>Dendroptoe pentandra</i>).....	23
2.4.1	Klasifikasi dan Karakterisasi Benalu Mangga	23
2.4.2	Kandungan Senyawa Benalu Mangga.....	25
2.5	Kuersetin.....	25

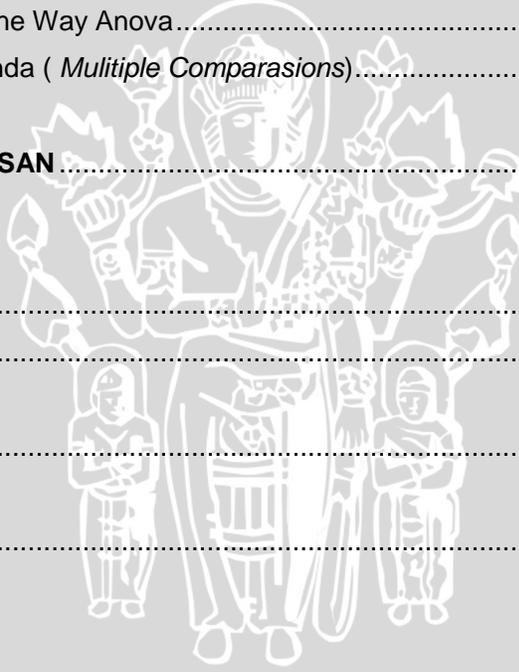
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1	Kerangka Konsep.....	29
3.2	Hipotesis Penelitian.....	30

BAB IV METODE PENELITIAN

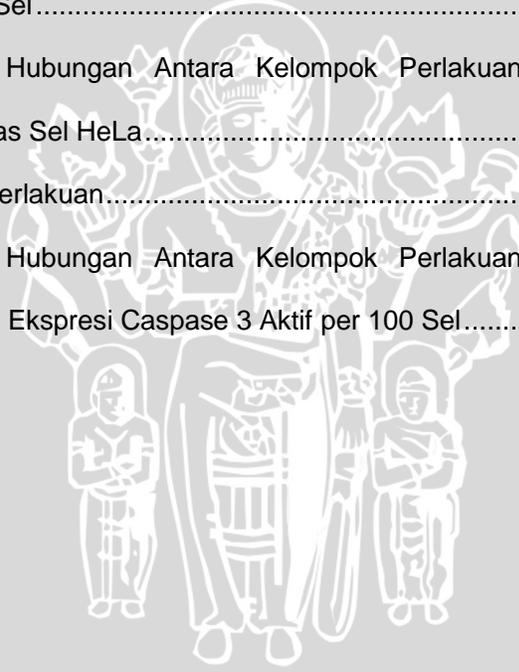
4.1	Rancangan Penelitian	31
4.2	Subjek dan Sampel Penelitian.....	31
4.3	Variabel dan Definisi Operasional	32
4.3.1	Variabel	32
4.3.2	Definisi Operasional	32
4.4	Waktu dan Tempat Penelitian.....	33
4.5	Alat dan Bahan.....	33
4.5.1	Peralatan dan Bahan Kultur Sel HeLa	33
4.5.2	Peralatan dan Bahan Ekstrak Etanol Daun Benalu Mangga	33
4.5.3	Peralatan dan Bahan MTT Assay	34
4.5.4	Peralatan dan Bahan Imunohistokimia	34
4.6	Cara Kerja.....	34
4.6.1	Kultur Sel HeLa	34
4.6.2	Ekstrak Etanol 80% Daun Benalu Mangga	36
4.6.3	Pembuatan Sediaan Benalu Mangga	37
4.6.4	Perlakuan dan Kontrol	39
4.6.5	MTT Assay.....	39
4.6.6	Pengecatan Imunohistokimia.....	40

4.7 Analisa Data.....	41
4.8 Alur Penelitian.....	42
4.9 Jadwal Pelaksanaan	43
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA	
5.1 Hasil Penelitian.....	44
5.1.1 Hasil <i>MTT</i> Assay	45
5.1.2 Hasil Imunohistokimia.....	47
5.2 Analisa Data.....	50
5.2.1 Uji Asumsi Data.....	50
5.2.2 Uji Normalitas dan Homogenitas Data.....	50
5.2.3 Analisa One Way Anova.....	50
5.2.4 Uji Berganda (<i>Multitple Comparasions</i>).....	51
BAB VI PEMBAHASAN.....	53
BAB VII PENUTUP	
7.1 Kesimpulan	58
7.2 Saran	58
DAFTAR PUSTAKA.....	59
LAMPIRAN.....	63



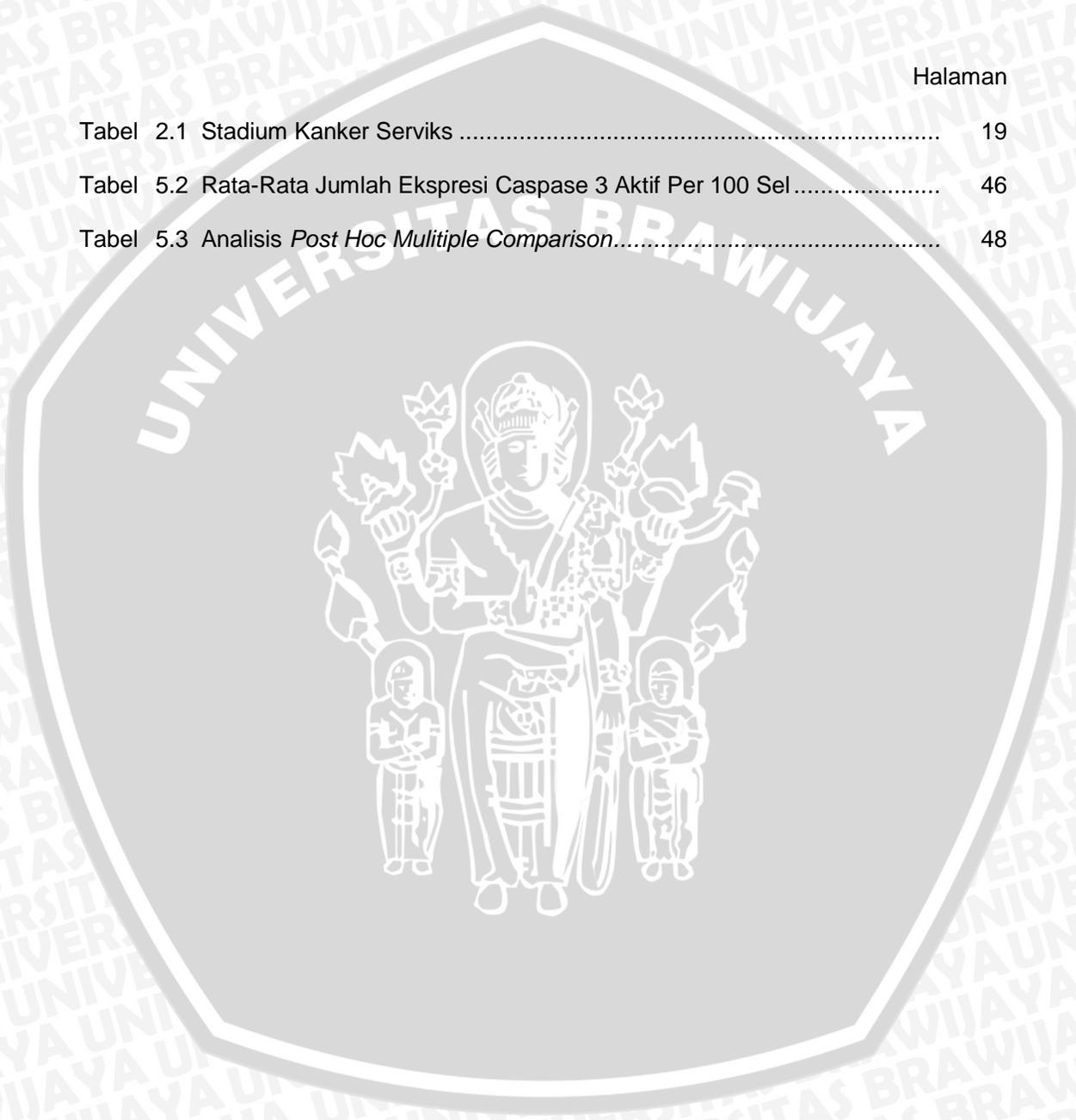
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Mikroanatomi dysplasia.....	14
Gambar 2.2 Jalur Apoptosis	23
Gambar 2.3 Tanaman Benalu Mangga.....	23
Gambar 2.4 Senyawa Kuersetin	26
Gambar 2.5 Siklus Sel.....	27
Gambar 5.1 Grafik Hubungan Antara Kelompok Perlakuan dan Rata-rata Viabilitas Sel HeLa.....	45
Gambar 5.2 Hasil Perlakuan.....	45
Gambar 5.3 Grafik Hubungan Antara Kelompok Perlakuan dan Rata-rata Jumlah Ekspresi Caspase 3 Aktif per 100 Sel.....	47



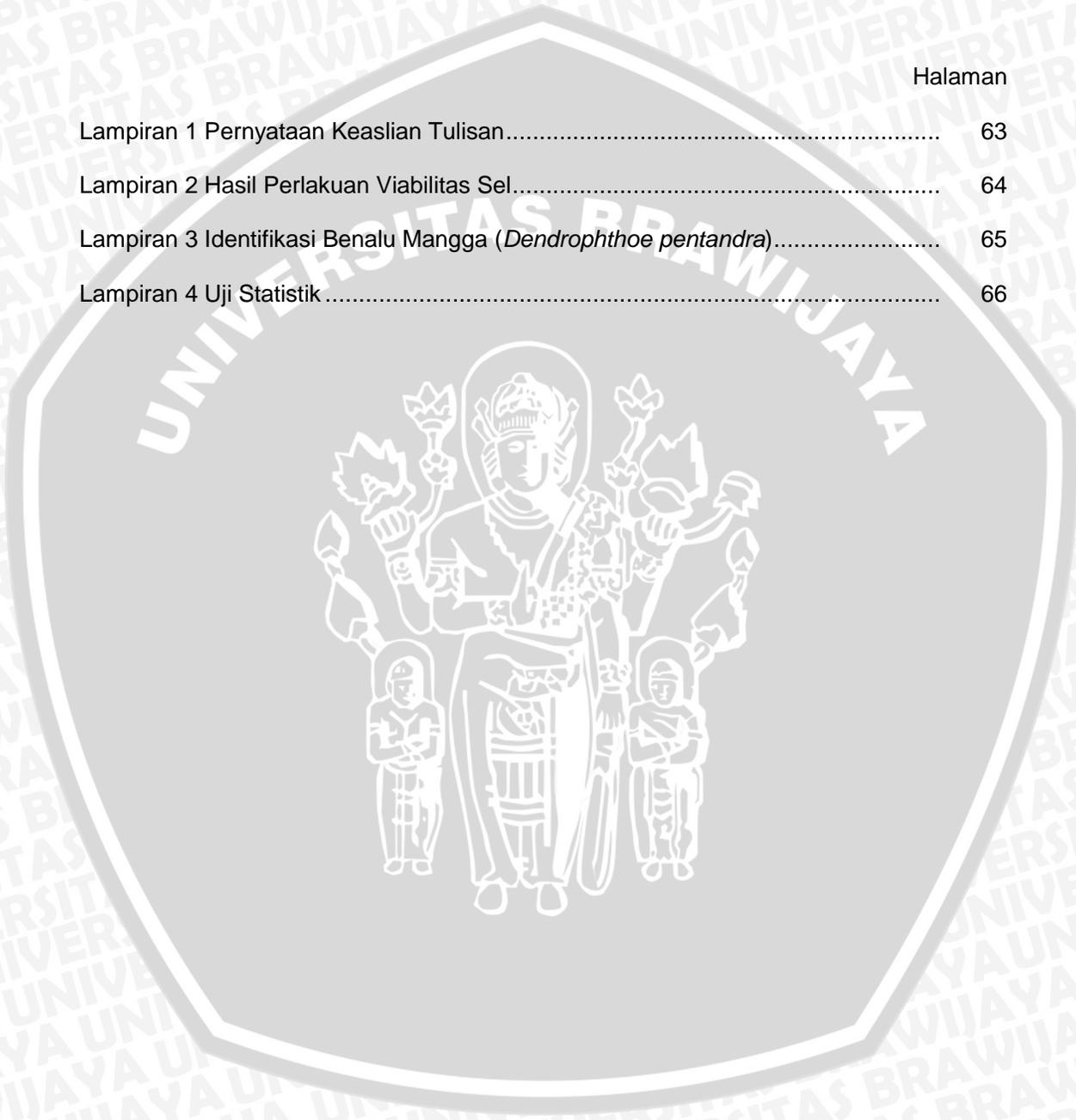
DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Stadium Kanker Serviks	19
Tabel 5.2 Rata-Rata Jumlah Ekspresi Caspase 3 Aktif Per 100 Sel.....	46
Tabel 5.3 Analisis <i>Post Hoc Multiple Comparison</i>	48



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Pernyataan Keaslian Tulisan.....	63
Lampiran 2 Hasil Perlakuan Viabilitas Sel.....	64
Lampiran 3 Identifikasi Benalu Mangga (<i>Dendrophthoe pentandra</i>).....	65
Lampiran 4 Uji Statistik.....	66



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 biasanya juga disebut tumor ganas. Ciri khas dari kanker adalah pertumbuhan sel yang abnormal dan akan menginvasi sel normal disekitarnya serta mampu menyebar ke organ-organ lainnya. Proses penyebaran itulah yang disebut metastasis. Sedangkan metastasis merupakan penyebab besar kematian dari kanker (WHO, 2011).

Kanker serviks merupakan jenis kanker tersering kedua di dunia pada wanita, dengan estimasi 529.409 kasus baru dan 274.883 kematian pada tahun 2008. Di Indonesia, kanker serviks menjadi penyebab kanker ketiga terbanyak setelah kanker payudara dan kanker kolorektal. Kanker serviks juga menjadi penyebab kematian urutan keempat dari seluruh kasus kanker pada wanita (WHO, 2010).

Terapi kanker serviks selama ini berupa terapi bedah, kemoterapi, radioterapi dan terapi paliatif. Namun, 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). 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. Sedangkan 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 angka kematian 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 leukemia, kanker payudara, kanker paru, hepatoma, kanker oral dan kanker kolon. Kuersetin dapat meningkatkan konsentrasi caspase 3 dan caspase 9 dengan mengekspresikan banyak Bax dan sedikit Bcl-2 pada Human Hepatoma Cell Line (HepG2) (Granado-Serrano *et al.*, 2006). Sedangkan 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 dan menginaktivasi protein P53 dan retinoblastoma (Rb) (Gomez dan Santos, 2007). Protein P53 normal dapat menginduksi apoptosis melalui Bax (antagonis Bcl-2). Sehingga, jika protein P53 normal mengalami inaktivasi, proses apoptosis sel akan terhambat. Berdasarkan hal tersebut, maka dapat diduga bahwa kuersetin mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker serviks melalui peningkatan Bax dan penurunan Bcl-2. Aktivasi Bax akan memicu aktivasi dari caspase 3 yang juga merupakan salah satu marker protein apoptosis (Irene *et al.*, 2005). Selain itu, pada penelitian lain menyebutkan bahwa selama *human clinical trial* dilakukan, kuersetin tidak memberikan efek samping yang signifikan hingga mencapai dosis 1.000 mg per hari dengan pemberian secara peroral (Gibellini *et al.*, 2011).

Di Indonesia ada berbagai jenis spesies benalu. Masyarakat di Indonesia pada umumnya hanya menganggap benalu sebagai tumbuhan inang yang tumbuh pada beberapa tanaman, seperti teh, duku, mangga, belimbing dan lain-lain. Selain itu, benalu merupakan tumbuhan parasit yang belum banyak dimanfaatkan oleh masyarakat umum. Namun di sisi lain, benalu mengandung senyawa flavonoid, tannin dan asam amino (Ikawati, 2008). Kuersetin merupakan golongan flavonoid yang paling banyak terisolasi dari benalu randu (*Dendrophthoe pentandra*) sebesar 39,8 mg/g (Saifillah, 2010). Ekstrak berbagai macam benalu memiliki aktifitas antioksidan dan antidiabetes yang signifikan. Bahkan ekstrak daun benalu baik dari kedondong, srikaya dan teh tidak bersifat toksik karena semua mempunyai $LC_{50} > 1.000 \mu\text{g/ml}$ (Artanti *et al.*, 2009). Oleh sebab itu, ekstrak benalu bersifat aman untuk dikonsumsi sebagai obat tradisional atau alternatif. Saifillah (2010) juga telah membuktikan bahwa benalu randu (*Dendrophthoe pentandra*) bisa menurunkan protein P53 mutan pada sel HeLa.

Karena benalu randu dan benalu mangga memiliki jenis benalu yang sama yaitu *Dendrophthoe pentandra* maka dapat diduga benalu mangga pun memiliki kandungan kuersetin sebanyak benalu randu. Berdasarkan hal-hal di atas, kemungkinan besar benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) mampu menurunkan viabilitas dan memicu apoptosis sel kanker serviks (sel HeLa) melalui peningkatan caspase 3. Oleh karena itu, penelitian ini berjudul **“Pengaruh Ekstrak Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) Terhadap Viabilitas dan Ekspresi Caspase 3 Aktif pada Sel Kanker Serviks (Sel HeLa)”**. Dengan demikian, diharapkan penelitian ini nantinya mampu menjadi modalitas terapi kanker serviks yang efektif dengan memanfaatkan bahan dari alam yang sebelumnya dianggap tidak berguna.

1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Apakah ekstrak daun benalu mangga mampu menurunkan viabilitas sel kanker serviks (sel HeLa) ?
- 1.2.2 Apakah ekstrak daun benalu mangga mampu meningkatkan ekspresi caspase 3 aktif pada sel kanker serviks (sel HeLa) ?

1.3 Tujuan Penelitian

- 1.3.1 Untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak daun benalu mangga terhadap viabilitas sel kanker serviks (sel HeLa).
- 1.3.2 Untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak daun benalu mangga terhadap ekspresi caspase 3 aktif pada sel kanker serviks (sel HeLa).

1.4 Manfaat penelitian

- 1.4.1 Dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk meningkatkan khasanah ilmu pengetahuan masyarakat dalam pemanfaatan daun benalu mangga dalam bentuk ekstrak sebagai modalitas terapi kanker serviks berbasis alam yang lebih terjangkau.
- 1.4.2 Dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk memberikan informasi di kalangan perindustrian obat tentang ekstrak daun benalu mangga sebagai modalitas terapi kanker serviks berbasis alam yang mungkin di masa mendatang dapat meningkatkan ragam produksi obat regenerasi yang alami.
- 1.4.3 Dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk penelitian selanjutnya yang menggunakan ekstrak daun benalu mangga hingga nantinya dapat mengetahui efek yang benar-benar efektif untuk penderita kanker serviks.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker

2.1.1 Definisi Kanker

Kanker merupakan pertumbuhan sel yang abnormal, memiliki kemampuan untuk menyerang jaringan lain dan mampu menyebar ke organ jauh melalui pembuluh darah atau saluran limfatik (metastasis) (Mandal, 2013). 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

Berdasarkan jenis jaringan, kanker dapat diklasifikasikan menjadi enam kategori utama :

1. Karsinoma : berasal dari lapisan epitel sel yang membentuk lapisan bagian luar tubuh atau lapisan internal organ dalam tubuh. Karsinoma biasanya mempengaruhi organ atau kelenjar yang mampu sekresi termasuk payudara, paru-paru, kandung kemih, usus dan prostat. Karsinoma terdiri dari dua jenis - adenokarsinoma dan *squamous cell carcinoma*. Adenokarsinoma berkembang pada organ atau kelenjar dan *squamous cell carcinoma* berasal dari epitel skuamosa.
2. Sarkoma : berasal dari jaringan ikat dan penyokong termasuk otot, tulang rawan tulang, dan lemak. Yang termasuk sarkoma adalah *osteosarcoma*, *chondrosarcoma* (tulang rawan), *leiomyosarcoma* (otot polos),

rhabdomyosarcoma (otot rangka), *mesothelioma* (lapisan membran rongga tubuh), *fibrosarcoma* (jaringan fibrosa), *angiosarcoma* atau *hemangioendothelioma* (pembuluh darah), *liposarcoma* (adiposa atau jaringan lemak), *glioma* atau *astrocytoma* (jaringan ikat neurogenik yang ditemukan di otak), *myxosarcoma* (jaringan ikat embrio primitif) dan tumor mesodermal *mesenchymous* atau campuran (campuran jenis jaringan ikat).

3. *Myeloma* : berasal dari sel-sel plasma sumsum tulang. Sel plasma mampu menghasilkan antibodi berbagai respon terhadap infeksi.

4. Leukemia : merupakan jenis kanker darah. Leukemia mempengaruhi sumsum tulang yang merupakan tempat untuk produksi sel darah. Dalam proses karsinogenesis, sumsum tulang mulai memproduksi sel-sel darah putih yang belum matang yang berlebihan.

5. Limfoma : berasal dari sistem limfatik. Limfoma dapat mempengaruhi kelenjar getah bening di regional tertentu seperti abdomen, otak, *intestine* dan lain-lain. Limfoma dapat dibagi menjadi dua jenis - limfoma Hodgkin dan limfoma non-Hodgkin.

6. Jenis campuran : memiliki dua atau lebih komponen dari kanker. Beberapa contoh termasuk tumor mesodermal campuran, karsinosarkoma, karsinoma adenosquamous dan teratokarsinoma.

(Mandal, 2013)

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 dan 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 pertamakali 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. Serviks merupakan pintu keluar uterus 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 Media, 2012).

2.2.2 Etiologi

Infeksi HPV (Human Papilloma Virus) telah terbukti merupakan proses penting pada terjadinya kanker serviks. HPV merupakan DNA berantai ganda yang termasuk dalam famili papillomaviridae (Steben dan Duarte-Franco, 2007). HPV merupakan virus yang tidak memiliki *envelope* dengan diameter 55 nm. 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 jenis 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 (Gomez dan Santos, 2007).

Lebih dari 100 genotif 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 dan 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 dan 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, DNA HPV bereplikasi hingga

mencapai ke permukaan epitel. Pada lapisan basal, replikasi virus kurang produktif dan virus membentuk dirinya sendiri sebagai sejumlah kecil salinan episom dengan 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 model *rolling-circle*, memperbanyak DNA menjadi sejumlah besar salinan, menyintesis protein kapsid, sehingga menghasilkan suatu koloni virus (Gomez dan Santos, 2007).

Onkoprotein E6 dan E7 dari HPV berisiko tinggi meregulasi siklus pertumbuhan sel hospes dengan mengikat dan menginaktivasi dua protein supresor tumor, protein p53 dan retinoblastoma (Rb) (Gomez dan Santos, 2007).

Jalur p53 dan Rb adalah penjaga gerbang dalam menjaga program *senescence*. *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).

Protein P53 juga dapat menginduksi apoptosis melalui aktivasi antagonis Bcl-2, Bax. Onkoprotein Bcl-2 yang terletak pada membran mitokondria dalam, diketahui dapat menghambat apoptosis. Ekspresi berlebihan dari onkogen Bcl-2 dapat memperpanjang *survival* dari sel kanker dan membiarkannya mengalami transformasi maligna (Feng *et al.*, 2007).

Ikatan dan inaktivasi P53 oleh E6 menyebabkan aktivitas normal P53 yang memerintahkan sel untuk masuk ke dalam fase G1 *arrest*, apoptosis, dan perbaikan DNA terhambat. 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 (Gomez dan Santos, 2007).

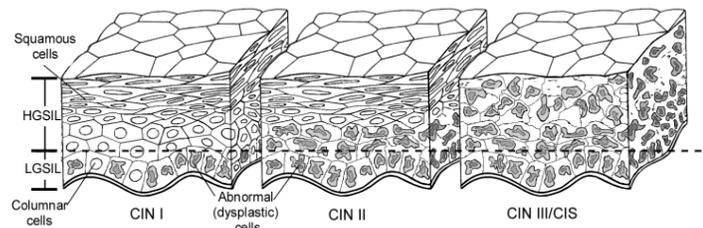
Inaktivasi protein P53 dan Rb berakibat pada peningkatan kecepatan proliferasi dan ketidakstabilan genom. Konsekuensinya, sel hospes mengakumulasi lebih banyak kerusakan DNA yang tidak dapat diperbaiki, yang dapat berubah menjadi sel kanker. Selain efek dari onkogen yang teraktivasi dan ketidakstabilan kromosom, mekanisme potensial yang berkontribusi dalam transformasi menjadi sel kanker meliputi metilasi dari DNA virus dan seluler, aktivasi telomer, serta faktor hormonal dan imunogenetik (Gomez dan 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 *Cervical Intraepithelial Neoplasia* (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. *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (LGSIL) atau

CIN I, memiliki gambaran hampir sepertiga dari epitelnya merupakan sel displasia. *High Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (HGSIL) atau CIN II dan CIN III/ *Carsinoma In Situ* (CIS), memiliki gambaran lebih dari sepertiga lapisan epitelnya terdiri dari sel displasia (Blumenthal dan McIntosh, 2005).



Gambar 2.1 Mikroanatomi dysplasia (Blumenthal dan McIntosh, 2005)

Keterangan : *Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (LGSIL), *Cervical Intraepithelial Neoplasia* (CIN), *High Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (HGSIL), *Carsinoma In Situ* (CIS)

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 scraping* : 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 scraping* 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 ke-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 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 terlihat seperti T1a/IA2
T1b1	IB1	Secara klinis lesi terlihat \leq 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 \leq 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 bawah vagina, dan/atau menyebabkan hidronefrosis atau ginjal tak berfungsi
T3a	IIIA	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 <i>true pelvis</i> (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)

ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS (FIGO 2008)			
Stage 0*	Tis	N0	M0
Stage I	T1	N0	M0
Stage IA	T1a	N0	M0
Stage IA1	T1a1	N0	M0
Stage IA2	T1a2	N0	M0
Stage IB	T1b	N0	M0
Stage IB1	T1b1	N0	M0
Stage IB2	T1b2	N0	M0
Stage II	T2	N0	M0
Stage IIA	T2a	N0	M0
Stage IIA1	T2a1	N0	M0
Stage IIA2	T2a2	N0	M0
Stage IIB	T2b	N0	M0
Stage III	T3	N0	M0
Stage IIIA	T3a	N0	M0
Stage IIIB	T3b	Any N	M0
	T1-3	N1	M0
Stage IVA	T4	Any N	M0
Stage IVB	Any T	Any N	M1

Tabel 2.1 Stadium Kanker Serviks (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. Berikut adalah tipe pembedahan yang bisa dilakukan :

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 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). 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).

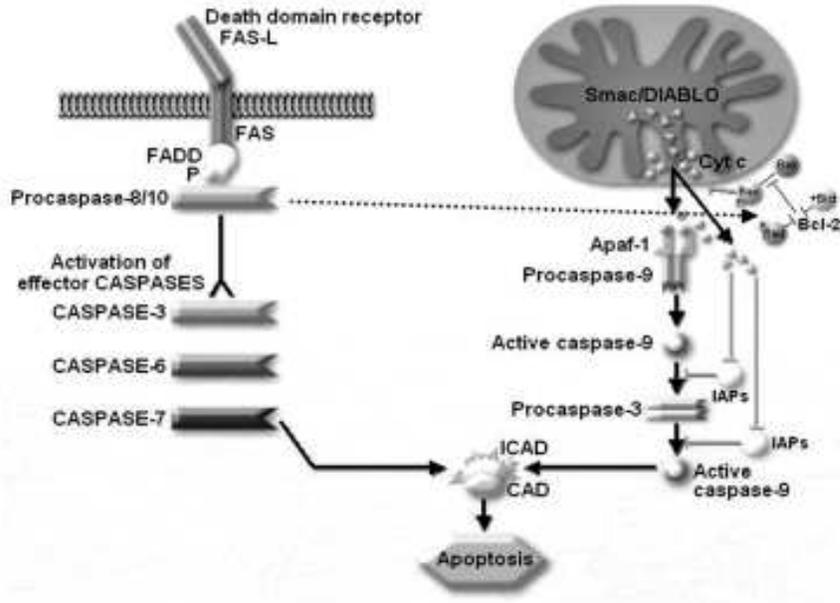
Apoptosis atau program kematian sel merupakan mekanisme sel mengalami kematian untuk mengontrol proliferasi sel atau dalam merespon kerusakan DNA. Apoptosis juga penting dalam menghilangkan limfosit *self-reactive* dan limfosit yang tesusun kembali dari nonproduktif melalui reseptor antigen. Bereberapa 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 (Irene *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 *cytochrome-c* mitokondria dan mengaktifkan signal kematian. Kedua jalur apoptosis bertemu pada jalur akhir yang melibatkan cascade protease atau caspase (Irene *et al.*, 2005).

Jalur ekstrinsik traktivasi karena ligasi reseptor permukaan sel yang disebut death receptor (DRs). Fas yang merupakan anggota TNF disebut juga Apo-1 atau CD 95. 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 infalmasi yang tidak bisa dijelaskan dengan baik. Ketika stimulus kematian memicu jalur ekstrinsik, Fas L berinteraksi dengan kompleks Fas yang nonaktif sehingga membentuk singnal komplek kematian. Sistem FAs L-Fas yang menginduksi kematian mempunyai adaptor protein *Fas-associated death domain* (FADD) , 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 (Irene *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. Anggota antiapoptosis Bcl-2 berperan sebagai penekan apoptosis dengan memblok pengeluaran *cytochrome-c*, agen proapoptosis. Ketika terdapat stimulus apoptosis, membran luar mitokondria menjadi permeabel menyebabkan pengeluaran *cytochrome-c*. *Cytochrome-c* yang pertama kali keluar dalam sitosol berinteraksi dengan Apaf-1, memicu aktivasi proenzim caspase 9. Caspase 9 yang aktif kemudian mengaktifkan caspase 3 yang selanjutnya mengaktifkan cascade caspase yang istirahat dan menyebabkan kematian sel (Irene *et al.*, 2005).



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

Keterangan : IAPs (*Inhibitors of Apoptosis*), Cyt c (*Cytochrome c*), Apaf-1 (*Apoptotic protease activating-factor 1*), FADD (*Fas-associated death domain*), FAS-L (*Fas-Ligand*), SMAC (*second mitochondrial-derived activator of caspase*), Diablo (*direct inhibitor of apoptosis protein-binding protein with low pl*), CAD (*caspase-activated deoxyribonuclease*), ICAD (*Inhibitor of Caspase Activated DNase*)

2.4 Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*)



Gambar 2.3 Tanaman Benalu Mangga (Sunaryo dan Erlin, 2007)

Keterangan : (a)perbungaan tandan, (b)kuncup bunga, (c) daun

2.4.1 Klasifikasi dan Karakterisasi Benalu Mangga

Klasifikasi benalu mangga

Divisi : Spermatophyta

Subdivisi : Angiospermae

Class : Dicotyledoneae
Ordo : Santalales
Famili : Loranthaceae
Genus : *Dendrophthoe*
Spesies : *Dendrophthoe pentandra* (Backer, 1965)

D. pentandra memiliki berbagai macam karakteristik : berupa tumbuhan perdu, bersifat hemiparasit, agak tegak, bercabang banyak, tinggi 0,5 - 1,5 m. Daun tersebar atau sedikit berhadapan, menjorong, panjang 6 - 13 cm dan lebar 1,5 - 8 cm, pangkal menirus–membaji, ujung tumpul–runcing, panjang tangkai daun 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 (Backer, 1965), 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 m, benang sari 5, panjang kepala sari 2 - 5 mm dan tumpul serta melekat pada bagian pangkal, 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 menjadi parasit berbagai jenis tumbuhan inang, baik berupa

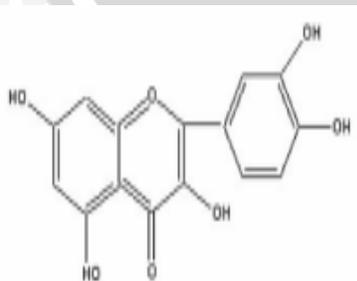
semak atau pun pohon, selama beberapa tahun. *D. pentandra* dapat hidup pada jenis-jenis tumbuhan yang beragam serta rentang sebaran ekologis yang cukup luas meliputi India sampai Indo Cina, Semenanjung Malaya, Sumatera, Jawa, Kalimantan, Nusa Tenggara dan Filipina (Sunaryo, 2008).

Sebagai jenis tumbuhan parasit, keberadaan benalu *D. pentandra* sering mengindikasikan terjadinya gangguan atau pun kerusakan tumbuh-tumbuhan inang, apalagi bila keberadaannya dalam jumlah yang banyak. Namun dilain pihak, beberapa orang menggunakan *D. pentandra* dalam bentuk bubur untuk mengobati luka atau infeksi pada kulit (Sunaryo, 2008).

2.4.2 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 Saifillah, 2010 menyebutkan bahwa kuersetin merupakan golongan flavonoid yang paling banyak terisolasi dari benalu randu (*Dendrophthoe pentandra*) sebesar 39,8 mg/g (Saifillah, 2010).

2.5 Kuersetin



Gambar 2.4 Senyawa kuersetin (Ekawati *et al.*, 2008)

Kuersetin (*3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone*; *Figure 1*, $R= OH$) merupakan senyawa polifenol yang dapat ditemukan pada berbagai macam makanan (Vargas dan Burd, 2010). Kuersetin seringkali terdapat sebagai glikosida (derivat gula), seperti rutin yang memiliki hidrogen dari grup R-4 yang digantikan oleh disakarida. Kuersetin diistilahkan sebagai aglikon atau bentuk tanpa gula dari rutin (Baghel *et al.*, 2012).

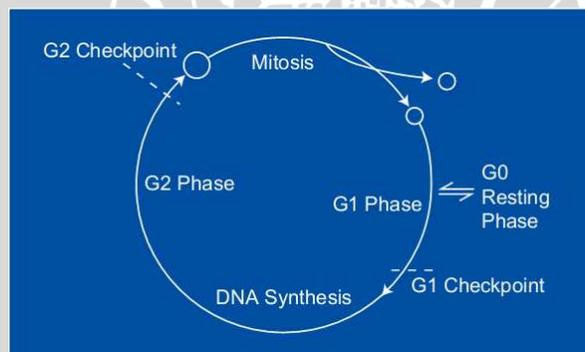
Kuersetin dikenal sebagai antiviral, antiinflamasi, antibakteri, serta antioksidan (Jan *et al.*, 2010). Kuersetin memiliki berbagai macam aksi yang menjadikannya agen anti kanker potensial (Davis and Mathew, 2000). Sifat anti kankernya telah terbukti baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Banyak penelitian 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 terbukti menginduksi apoptosis melalui pembentukan ROS pada sel hepatoma manusia (Chang *et al.*, 2009). 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 dan Burd, 2010).

Keseimbangan dari ekspresi anti dan pro apoptosis dari anggota famili gen Bcl-2 merupakan salah satu mekanisme utama yang meregulasi apoptosis pada sel mamalia (Adams, 2001). Kuersetin terbukti meningkatkan ekspresi Bax tetapi mengurangi level Bcl-2 (Jaganathan dan Mandal, 2009).

Kuersetin menginduksi apoptosis melalui jalur *caspase 3-dependent* dengan menghambat ekspresi COX 2 (Niu *et al.*, 2011). Lee *et al.* (2009) menemukan bahwa kuersetin menghambat ekspresi COX 2 untuk menginduksi apoptosis pada kanker payudara dan kolon. Penelitian lain membuktikan bahwa kuersetin mampu meningkatkan aktivasi dari Bax, menurunkan ekspresi Bcl-2, serta meningkatkan konsentrasi caspase 3 dan caspase 9 pada Human Hepatoma Cell Line (HepG2) (Granado-Serrano *et al.*, 2006)

Selain itu, kuersetin (248 microM) terbukti dapat menekan ekspresi protein P53 mutan hingga pada level yang tidak terdeteksi pada *cell line* kanker payudara. Inhibisi ekspresi protein P53 dapat menghentikan siklus sel pada fase G2-M. Mutasi pada gen P53 merupakan abnormalitas yang paling sering ditemukan pada kanker (Davis and Mathew, 2000).



Gambar 2.5 Siklus sel (Davis and Mathew, 2000)

Kuersetin diketahui dapat 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. Ekspresi tirosin kinase juga dapat dihambat oleh kuersetin. Tirosin kinase dianggap terlibat dalam onkogenesis

melalui kemampuannya untuk mencegah pengaturan kontrol pertumbuhan (Davis and Mathew, 2000).

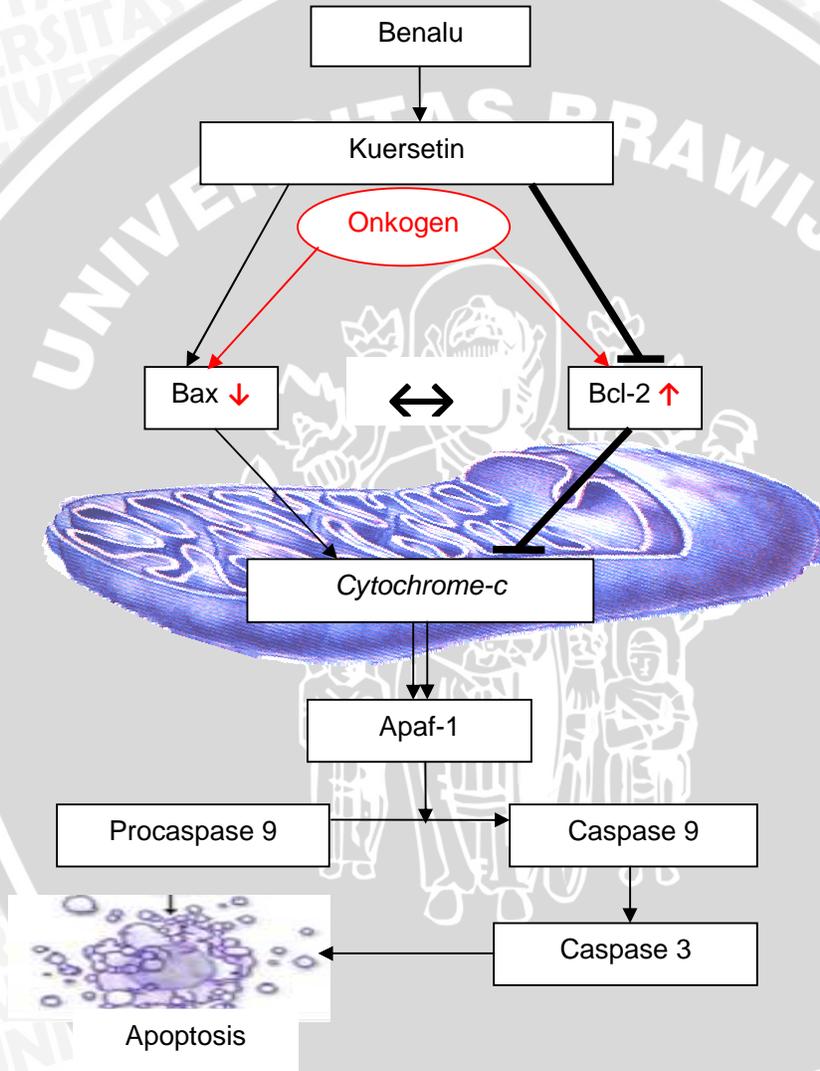
Kuersetin ditemukan dapat menghambat produksi protein *heat shock* pada beberapa *cell line* ganas, meliputi kanker payudara, leukemia, dan kanker kolon. Protein *heat shock* membentuk kompleks dengan P53 mutan yang membuat sel tumor dapat menghindari mekanisme normal *cell cycle arrest* (Davis and Mathew, 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 (Davis and Mathew, 2000).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

→ = memicu, ─| = manghambat, ⇌ = berikatan, ↔ = antagonis

→ = onkogen memicu, ↓ = menurun akibat onkogen, ↑ = meningkat akibat onkogen

Apaf-1 (apoptotic protease activating-factor 1)

Onkogen dapat menyebabkan penurunan Bax dan peningkatan Bcl-2. Bax dan Bcl-2 bekerja secara antagonis. Penurunan Bax dan peningkatan Bcl-2 yang berlebihan menghasilkan kanker. Kuersetin dalam daun benalu mangga memodulasi sejumlah target kunci pada jalur transduksi sinyal seluler yang berhubungan dengan apoptosis. Kuersetin menginduksi apoptosis melalui jalur intrinsik, yakni melalui jalur mitokondria. Kuersetin menekan ekspresi protein Bcl-2. Namun, Kuersetin meningkatkan translokasi Bax dari sitosol menuju membran mitokondria luar, di mana kemudian Bax membentuk pori pada membran. Hal tersebut mengakibatkan dilepaskannya *cytochrome-c* dari mitokondria menuju sitoplasma yang kemudian berikatan dengan Apaf-1. Ikatan *cytochrome-c* dengan Apaf-1 mengaktifasi caspase 9 dari procaspase 9. Caspase 9 yang teraktivasi memicu *caspase signaling cascade*. Pada akhirnya caspase 3 juga teraktivasi dan proses apoptosis terjadi. Peningkatan apoptosis harus terjadi pada sel, kanker agar sel kanker tidak terus berkembang.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Ekstrak daun benalu mangga dapat menurunkan viabilitas sel kanker serviks (sel HeLa)
2. Ekstrak daun benalu mangga dapat meningkatkan ekspresi caspase 3 aktif pada sel kanker serviks (sel HeLa)

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan 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 daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) terhadap viabilitas dan ekspresi caspase 3 aktif pada sel HeLa. Sedangkan caspase 3 merupakan salah satu marker untuk apoptosis sel.

4.2 Subjek dan Sampel Penelitian

Dalam penelitian ini, sampel yang digunakan adalah sel HeLa, *cell line* kanker leher rahim, yang dikultur. Sel HeLa diperoleh dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Brawijaya, Malang.

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

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

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 3, yaitu :

- a. Variabel kontrol

Sel HeLa tanpa perlakuan

- b. Variabel bebas

Ekstrak daun benalu mangga dengan variasi dosis

- c. Variabel terikat

Viabilitas sel HeLa dan ekspresi caspase 3 aktif pada sel HeLa

4.3.2 Definisi Operasional

- Ekstrak daun benalu mangga diperoleh dengan cara ekstraksi menggunakan etanol 80 %. Ekstrak ini didapatkan dari laboratorium Farmakologi FKUB.
- Viabilitas sel HeLa adalah kemampuan sel HeLa untuk bertahan hidup dan secara spesifik disebut sebagai kemampuan untuk hidup, berkembang dan berproliferasi. Pada penelitian ini viabilitas sel diukur dengan menggunakan metode *MTT* assay, yaitu uji colorimertric standart yang mengukur perubahan warna untuk mengukur pertumbuhan sel. *MTT* (3-(4,5 Dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), merupakan senyawa yang tereduksi dan berubah warna menjadi ungu di dalam mitokondria sel hidup. Jika terdapat enzim reduktase yang diproduksi oleh mitokondria aktif, reduksi akan terjadi dan hal tersebut secara langsung berkaitan dengan jumlah sel yang hidup.

- Caspase 3 merupakan eksekutor apoptosis. Caspase ini dideteksi dengan menggunakan antibodi caspase 3 dan dilakukan pengecatan imunohistokimia. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop pembesaran 400x. Lalu dilakukan penghitungan pada sel yang intinya sebagian berwarna coklat. Penghitungan dilakukan per 100 sel dengan tiga kali lapang pandang.

4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober – Desember 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, *well 24 plate culture*, *Conical tube* 45 ml, Lampu spiritus, Mikroskop cahaya, *Hemocytometer*, *Counter*, Laminar air flow, Mikroskop inverted, Penisilin-streptomisin 1%, *Fetal Bovine Serum* (FBS) *qualified* 10%, *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), *Tripsin EDTA*, *Phosphate Bovine Serum* (PBS), Natrium Bicarbonat (Nabic).

4.5.2 Peralatan dan Bahan Ekstrak Etanol Daun 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*, Daun benalu mangga, Etanol 80 %, Aquades.

4.5.3 Peralatan dan Bahan *MTT* assay

Microtiter plate reader with filter 650- and 570-nm filters, Inverted microscope, 37°C incubator, Laminar flow hood, Microtiter plate (false-bottomed), Sterile pipette tips, micropipette-100 µl, 96 well.

4.5.4 Peralatan dan Bahan Imunohistokimia

Pipete, Cover glass, Microscope, Blue tip, Yellow tip, Object glass, Air, StrepAvidin-HorseRadishPeroxidase (SA-HRP), 0.25 % Triton X-100, Phosphate Buffer Saline (PBS), Fetal Bovine Serum (FBS), Antibodi caspase 3 aktif, 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), Meyer hematoxilen.

4.6 Cara Kerja

4.6.1 Kultur Sel HeLa

Metode kultur sel HeLa yang digunakan dalam penelitian ini merujuk pada protokol kultur sel HeLa Biomedik FKUB.

a) Thawing Sel

1. Pisahkan *cryovial* yang berisi sel beku dari nitrogen cair dan segera letakkan dalam air dengan suhu 37°C (*heatshock*) dalam *waterbath* selama 2-3 menit.
2. Pindahkan vial ke *falcon tube*. Sebelum membuka, usap bagian luar vial dengan alkohol 70 %.
3. Buat media serum free yang terdiri dari *RPMI (Roswell Park Memorial Institute)*, 1 % penisilin streptomisin dan 0,2 % natrium bikarbonat.
4. Masukkan sejumlah medium komplet (media serum free + 10 % FBS) yang telah dihangatkan sejumlah yang diinginkan sesuai dengan *cell line*

dengan cara ditetaskan ke dalam tabung sentrifugasi yang berisi sel yang telah mencair.

5. Sentrifugasi suspensi sel 1000 rpm selama 8 menit.
6. Setelah disentrifugasi, buang supernatant, ambil pellet sel.
7. Resuspensikan sel dengan lembut ke dalam medium pertumbuhan komplit, dan pindahkan ke dalam flask kultur T 25 cm² dan inkubasi dalam suhu 37°C, 5% CO₂.

b) Subkultur Sel

1. Lakukan panen sel sesuai protokol panen sel.
2. Resuspensi suspensi sel di dalam *conical tube*.
3. Hitung kerapatan sel, encerkan sampai 10⁶ sel/ml.
4. Tuangkan sel ke dalam *plate culture* 24 well dengan kerapatan sel 10⁶ sel / ml / well.
5. Amati di bawah mikroskop inverted.

c) Penghitungan Sel

1. Panen sel dengan tripsin EDTA.
2. Tampung sel dalam conical tube 15 ml.
3. Sentrifugasi 1000 rpm selama 8 menit.
4. Buang spontan, tambahkan media komplit 1 ml.
5. Ambil 20 µl, tambahkan media sampai 1000 µl (pengenceran 50 x).
6. Ambil 10 µl, tambahkan *Trypan Blue* 0,05 % 10 µl.
7. Hitung dengan *Hemocytometer* pada bilik leukosit.
8. Jumlah sel/ml dihitung dengan rumus jumlah sel x 10⁴ x fp.

4.6.2 Ekstrak Etanol 80 % Daun Benalu Mangga

Metode ekstrak daun benalu mangga diadopsi dari Saifillah, 2010.

a) Proses pengeringan

1. Cuci bersih dengan akuades benalu mangga (sampel basah) yang akan dikeringkan.
2. Potong kecil-kecil.
3. Lalu oven dengan suhu 80°C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air).

b) Proses ekstraksi

1. Setelah kering, haluskan dengan blender sampai halus.
2. Setelah itu Timbang sebanyak 50 gram (sampel kering).
3. Masukkan 50 gram sampel kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter.
4. Kemudian rendam dengan etanol sampai volume 100 mL.
5. Kocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit).
6. Didiamkan 1 malam sampai mengendap.

c) Proses evaporasi

1. Ambil lapisan atas campuran etanol dengan zat aktif yang sudah terambil.
2. Masukkan dalam labu evaporasi 1 liter.
3. Pasang labu evaporasi pada evaporator.
4. Isi water bath dengan air sampai penuh.
5. Pasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (atur sampai suhu 90°C), sambungkan dengan aliran listrik.
6. Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah dalam labu.

7. Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu).
8. Hasil yang diperoleh kira-kira $\frac{1}{3}$ dari bahan alam kering.
9. Masukkan hasil ekstraksi dalam botol plastik.
10. Simpan dalam *freezer*. (Laboratorium Farmakologi FKUB)

4.6.3 Pembuatan Sediaan Benalu Mangga

1. Ekstrak daun benalu mangga diambil secukupnya dan ditaruh dalam eppendorf. Kemudian ditimbang.
2. Didapatkan 8 mg ekstrak yang dilarutkan ke dalam 1.000 μ l media komplit sehingga konsentrasi menjadi 8.000 μ g/ml. Dari sediaan ini kemudian akan dibuat sediaan dengan konsentrasi 5.000 μ g/ml sejumlah 1.000 μ l, dengan perhitungan sebagai berikut :

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$Y \times 8.000 \mu\text{g/ml} = 1.000 \mu\text{l} \cdot 5.000 \mu\text{g/ml}$$

$$Y = 625 \mu\text{l}$$

Jadi untuk membuat stok II yakni 1.000 μ l media dengan konsentrasi 5.000 μ g/ml, dibutuhkan 625 μ l dari stok awal kemudian ditambahkan 375 μ l media komplit.

3. Untuk imunohistokimia dibutuhkan media sebanyak 500 μ l per well. Karena terdapat 6x pengulangan maka media yang dibutuhkan adalah 6 x 500 μ l = 3.000 μ l. Sedangkan untuk *MTT* assay dibutuhkan media sebanyak 100 μ l per well. Sehingga media yang dibutuhkan 6 x 100 μ l = 600 μ l. Sehingga total media yang dibutuhkan adalah 3.000 + 600 = 3.600 μ l. Agar tidak kurang, dibuat media sebanyak 4.500 μ l.

4. Pembuatan sediaan ekstrak daun benalu mangga dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$ sebagai berikut :

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$Y \times 5.000 \mu\text{g/ml} = 4.500 \mu\text{l} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

$$Y = 45 \mu\text{l}$$

Jadi untuk membuat stok 4.500 μl dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$, dibutuhkan 45 μl dari stok II kemudian ditambahkan 4.455 μl media komplit.

5. Pembuatan sediaan ekstrak daun benalu mangga dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ sebagai berikut :

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$Y \times 5.000 \mu\text{g/ml} = 4.500 \mu\text{l} \times 100 \mu\text{g/ml}$$

$$Y = 90 \mu\text{l}$$

Jadi untuk membuat stok 4.500 μl dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$, dibutuhkan 90 μl dari stok II kemudian ditambahkan 4.410 μl media komplit.

6. Pembuatan sediaan ekstrak daun benalu mangga dengan konsentrasi 200 $\mu\text{g/ml}$ sebagai berikut :

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$Y \times 5.000 \mu\text{g/ml} = 4.500 \mu\text{l} \times 200 \mu\text{g/ml}$$

$$Y = 180 \mu\text{l}$$

Jadi untuk membuat stok 4.500 μl dengan konsentrasi 200 $\mu\text{g/ml}$, dibutuhkan 180 μl dari stok II kemudian ditambahkan 4.320 μl media komplit.

4.6.4 Perlakuan dan Kontrol

- a. Enam sumuran berisi kultur sel HeLa saja tanpa dipapar ekstrak daun benalu mangga sebagai kontrol.
- b. Enam sumuran yang berisi sel HeLa yang diberi ekstrak daun benalu mangga dengan konsentrasi dosis 50 µg/ml.
- c. Enam sumuran yang berisi sel HeLa yang diberi ekstrak daun benalu mangga dengan konsentrasi dosis 100 µg/ml.
- d. Enam sumuran yang berisi sel HeLa yang diberi ekstrak etanol daun benalu mangga dengan 200 µg/ml.

Perlakuan diberikan selama 24 jam.

4.6.5 MTT assay

Untuk metode *MTT* assay, peneliti menggunakan protokol dari Laboratorium Biomedik FKUB.

1. Letakkan 1.000 - 100.000 sel per well.
2. Inkubasi selama 24 jam dalam inkubator 37°C, 5% CO₂.
3. Ganti media dengan media baru + dosis ekstrak.
4. Induksi selama 24 jam.
5. Tambahkan 10 µL MTT reagen.
6. Inkubasi selama 3 jam hingga *purple precipitate* terlihat.
7. Tambahkan 100 µL deterjen reagen.
8. Letakkan pada suhu ruangan dalam situasi yang gelap selama 3 jam
9. Catat absorbansi pada 570 nm.
10. Hasil absorbansi di konversi ke dalam nilai persentase viabilitas sel.

$$\% \text{ viabilitas sel} = \frac{A_p - A_m}{A_k - A_m} \times 100 \%$$

Keterangan : A_p (Absorbansi perlakuan), A_k (Absorbansi kontrol), A_m (Absorbansi media)

4.6.6 Pengecatan Imunohistokimia

Pengecatan imunohistokimia dilakukan untuk membedakan antara sel HeLa yang mengekspresikan caspase 3 aktif dengan sel HeLa yang tidak mengekspresikannya. Metode imunohistokimia yang dilakukan berdasarkan protokol laboratorium biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Hari pertama :

1. Cuci sel yang berada dalam 24 well yang telah diberi ekstrak dan diinduksi selama 24 jam menggunakan PBS sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit.
2. Blocking dengan campuran FBS 1%, Triton X-100 0,25%, serta PBS selama 1 jam.
3. Cuci dengan PBS sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit.
4. Berikan antibodi primer (antibodi caspase 3 aktif) yang diencerkan dalam PBS.
5. Inkubasi semalam pada suhu 4 °C

Hari kedua :

1. Bilas dengan PBS sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit.
2. Blocking menggunakan H₂O₂ 3% dalam PBS.
3. Bilas dengan PBS sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit.
4. Berikan antibodi sekunder (*Anti Rabbit Biotin Conjugat*) 1: 500 dalam PBS selama 2 jam.
5. Bilas dengan PBS sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit.
6. Untuk mendapatkan signal lebih kuat maka lakukan inkubasi SA-HRP selama 90 menit.
7. Bilas dengan PBS sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit.

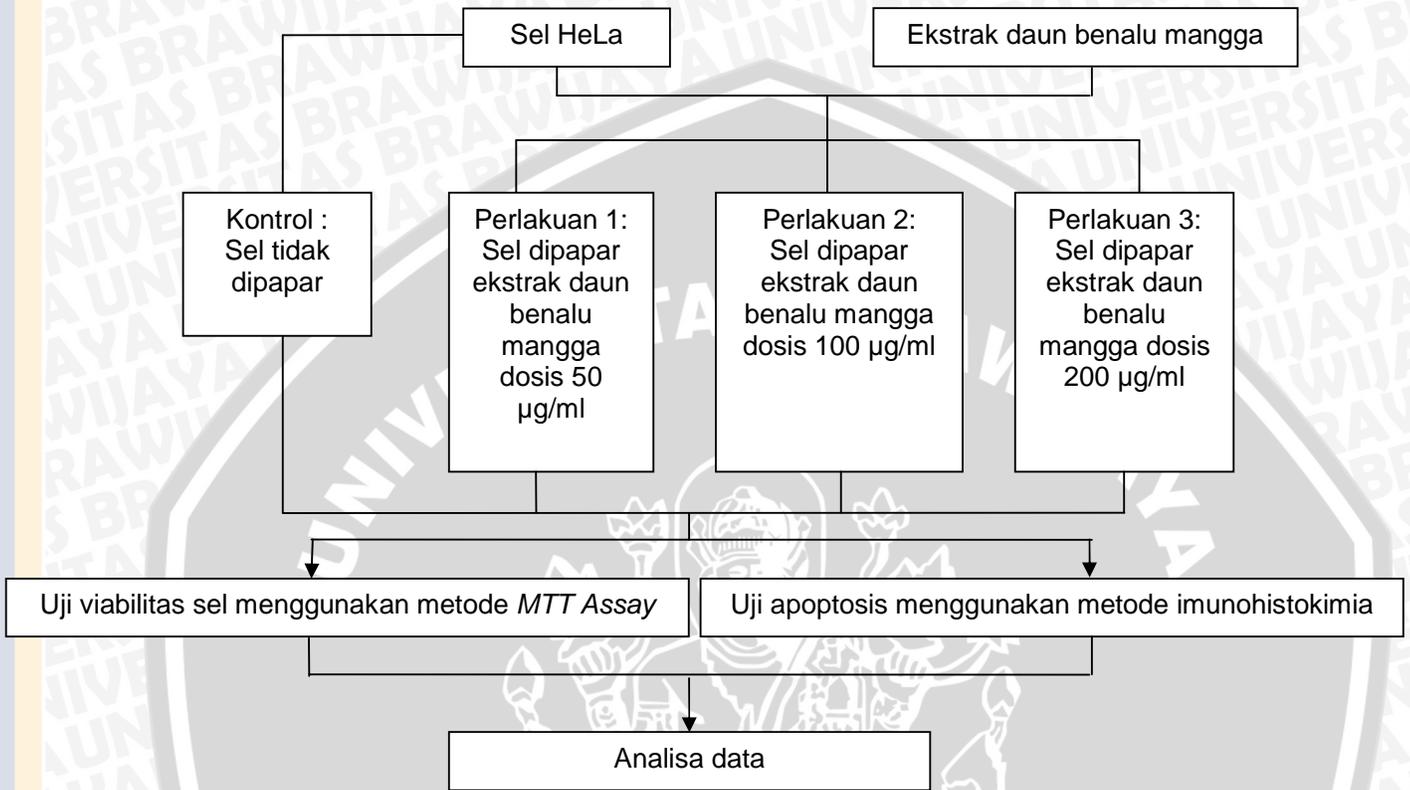
8. Berikan 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) selama 20 menit. Lakukan pengamatan di bawah mikroskop untuk mengetahui sel sudah berwarna menjadi coklat atau belum.
9. Jika sel sudah berubah warna menjadi coklat, bilas dengan PBS sebanyak 3 kali, masing-masing 5 menit.
10. Counterstaining menggunakan meyer hematoxilen selama 15 menit, sehingga sel yang tidak mengaktifkan caspase 3 akan berwarna ungu.
11. Cuci menggunakan air kran hingga bersih
12. Dehidrasi, bersihkan dan lakukan mounting menggunakan entelan.
13. Kemudian lakukan pengamatan pada mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Sel yang dihitung adalah sel yang tampak dengan warna coklat dan pecah-pecah di sekitar inti sel yang berarti sel tersebut mengekspresikan caspase 3 aktif.

4.7 Analisa Data

Analisa data statistik dilakukan dengan menggunakan uji sebagai berikut:

1. Uji normalitas dan homogenitas sebagai syarat untuk melakukan uji One Way Anova.
2. Uji *One way Anova* adalah analisis varian satu variable independen. Analisis varian satu variable independen digunakan untuk menentukan apakah rata-rata dua atau lebih kelompok berbeda secara nyata.
3. Uji *Multiple Comparison Post Hoc Tuckey* merupakan uji lanjutan dari uji One Way Anova.

4.8 Alur Penelitian



4.9 Jadwal Pelaksanaan

Kegiatan	Bulan ke											
	1				2				3			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1. Persiapan												
1.1 Persiapan laboratorium biomedik.	■	■										
1.2 Persiapan kultur sel HeLa	■	■										
1.3 Penyediaan benalu mangga		■										
II. Pelaksanaan												
2.1 Pembuatan kultur sel HeLa			■	■								
2.2 Ekstraksi daun benalu mangga			■	■								
2.3 Pembagian sel HeLa sejumlah perlakuan dan kontrol			■	■	■	■						
2.4 Pemberian ekstrak benalu mangga					■	■						
2.5 Evaluasi viabilitas sel					■	■	■	■				
2.6 Evaluasi ekspresi caspase 3 aktif							■	■	■			
III. Pengumpulan data dan evaluasi hasil												
3.1 Pengumpulan data				■	■	■	■	■	■	■		
3.2 Analisis dan pengolahan data										■	■	■
3.3 Penarikan kesimpulan dan penyusunan laporan												■



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel sel kanker serviks (sel HeLa) yang telah dibekukan dan disimpan dalam inkubator di Laboratorium Biomedik FKUB. Karena sel HeLa dalam keadaan beku, thawing sel HeLa dilakukan terlebih dahulu. Kemudian sel HeLa disubkultur hingga beberapa kali agar mendapatkan jumlah sel yang diperkirakan cukup untuk penelitian. Sel HeLa kemudian ditanam dalam dua jenis well plate, yaitu 96 well plate dan 24 well plate. Pada 96 well plate dilakukan *MTT assay*, sedangkan pada 24 well plate dilakukan imunohistokimia. Sel HeLa terbagi dalam kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol, sel HeLa tidak diberi perlakuan. Sedangkan pada kelompok perlakuan diberikan ekstra daun benalu mangga dalam tiga dosis konsentrasi yang berbeda, yaitu 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ dan 200 $\mu\text{g/ml}$. Penentuan dosis didasarkan pada trial dosis yang menunjukkan bahwa pada dosis 50 $\mu\text{g/ml}$ sudah terdapat kematian sel. Setelah diberi perlakuan, kultur sel diinduksi selama 24 jam. Kemudian dilanjutkan metode *MTT assay* untuk mengetahui viabilitas sel dan metode imunohistokimia untuk mengetahui ekspresi caspase 3 aktif pada sel HeLa. Pada metode *MTT assay*, harus dilakukan pembacaan menggunakan metode *colorimetric*. Sedangkan pada metode imunohistokimia harus dilakukan pengamatan dibawah mikroskop untuk melihat adanya ekspresi caspase 3 aktif.

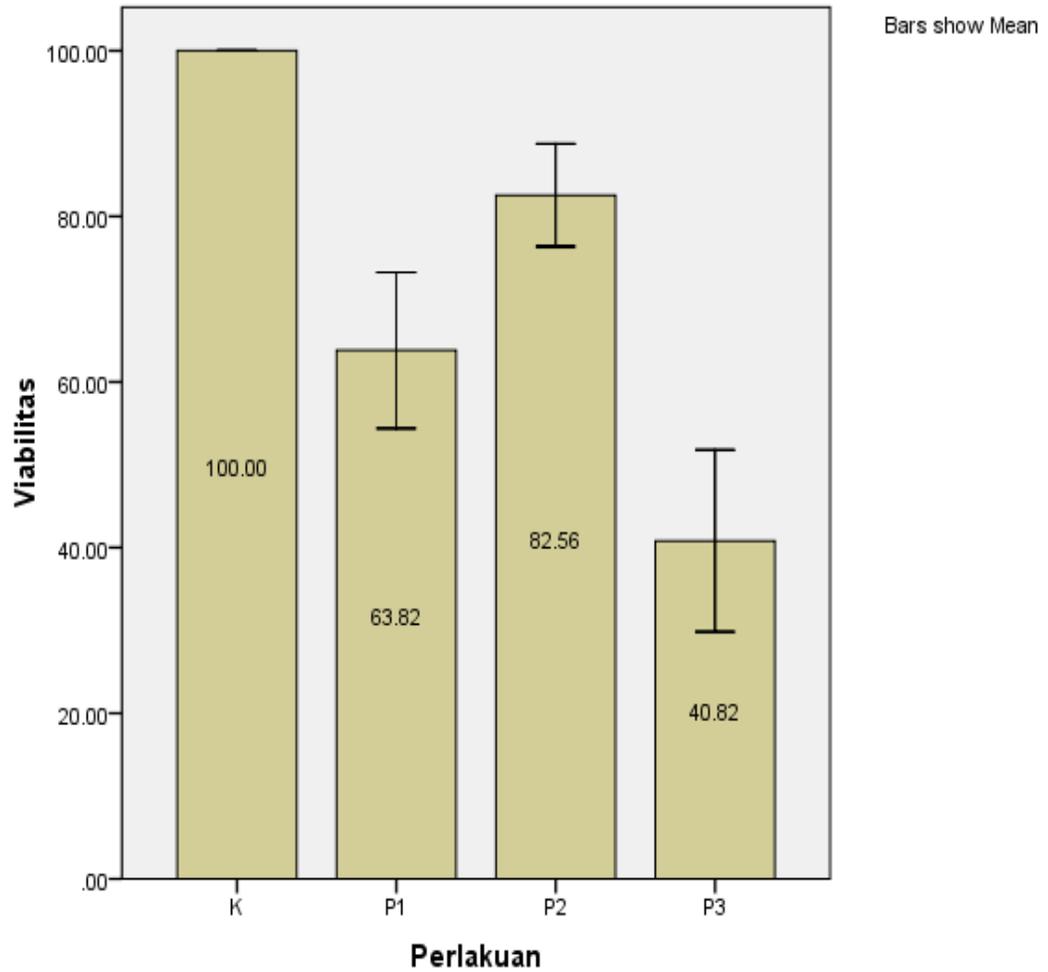
5.1.1 Hasil *MTT* Assay

Table 5.1 Rata-rata % Viabilitas Sel

Perlakuan	Rata-rata % Viabilitas Sel	Standar Deviasi
Kontrol	100	-
Dosis 50	63,82	1,2800
Dosis 100	82,56	8,4215
Dosis 200	40,82	1,4937

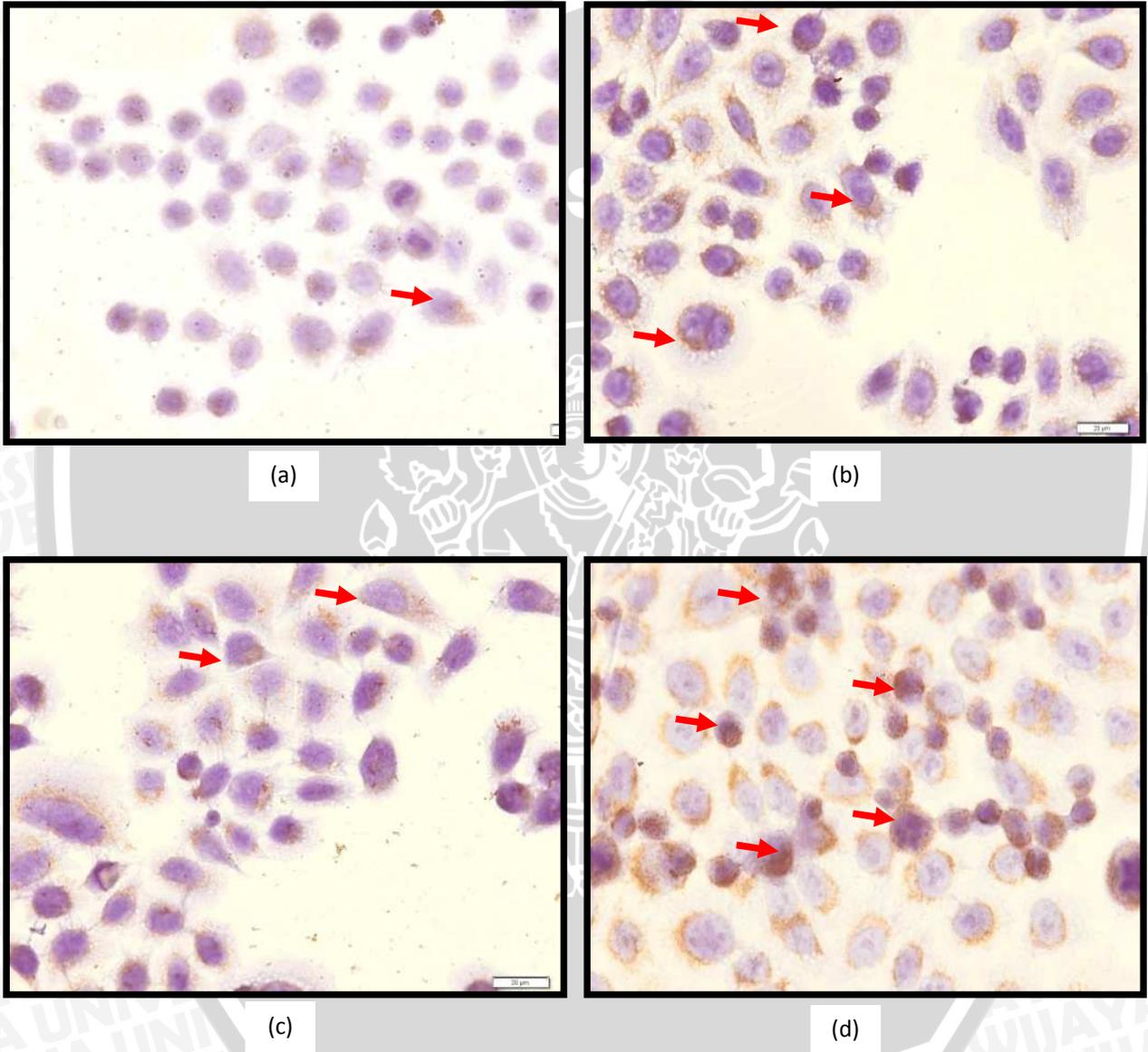
Tabel diatas memaparkan bahwa pemberian ekstrak daun benalu mangga berpengaruh terhadap viabilitas sel HeLa. Terjadi perbedaan rata-rata viabilitas sel HeLa antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Sel HeLa mengalami penurunan viabilitas pada seluruh kelompok perlakuan. Akan tetapi, viabilitas sel HeLa menurun secara tajam hanya pada dosis 50 $\mu\text{g/ml}$ dan dosis 200 $\mu\text{g/ml}$, tidak pada dosis 100 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini memperlihatkan bahwa dosis tertentu dibutuhkan untuk menurunkan viabilitas sel HeLa. Oleh sebab itu, permasalahan tersebut perlu dibahas pada bab pembahasan.

Perbedaan rata-rata viabilitas sel HeLa secara keseluruhan pada setiap perlakuan di atas juga dapat digambarkan dalam bentuk grafik berikut:



Gambar 5.1 Grafik Hubungan Antara Kelompok Perlakuan dan Rata-rata Viabilitas Sel HeLa. Keterangan: K (Sel HeLa tanpa perlakuan); P1 (Sel HeLa + 50 µg/ml ekstrak daun benalu mangga); P2 (Sel HeLa + 100 µg/ml ekstrak daun benalu mangga); P3 (Sel HeLa + 200 µg/ml ekstrak daun benalu mangga), garis yang menusuk balok merupakan standar deviasi.

5.1.2 Hasil Imunohistokimia



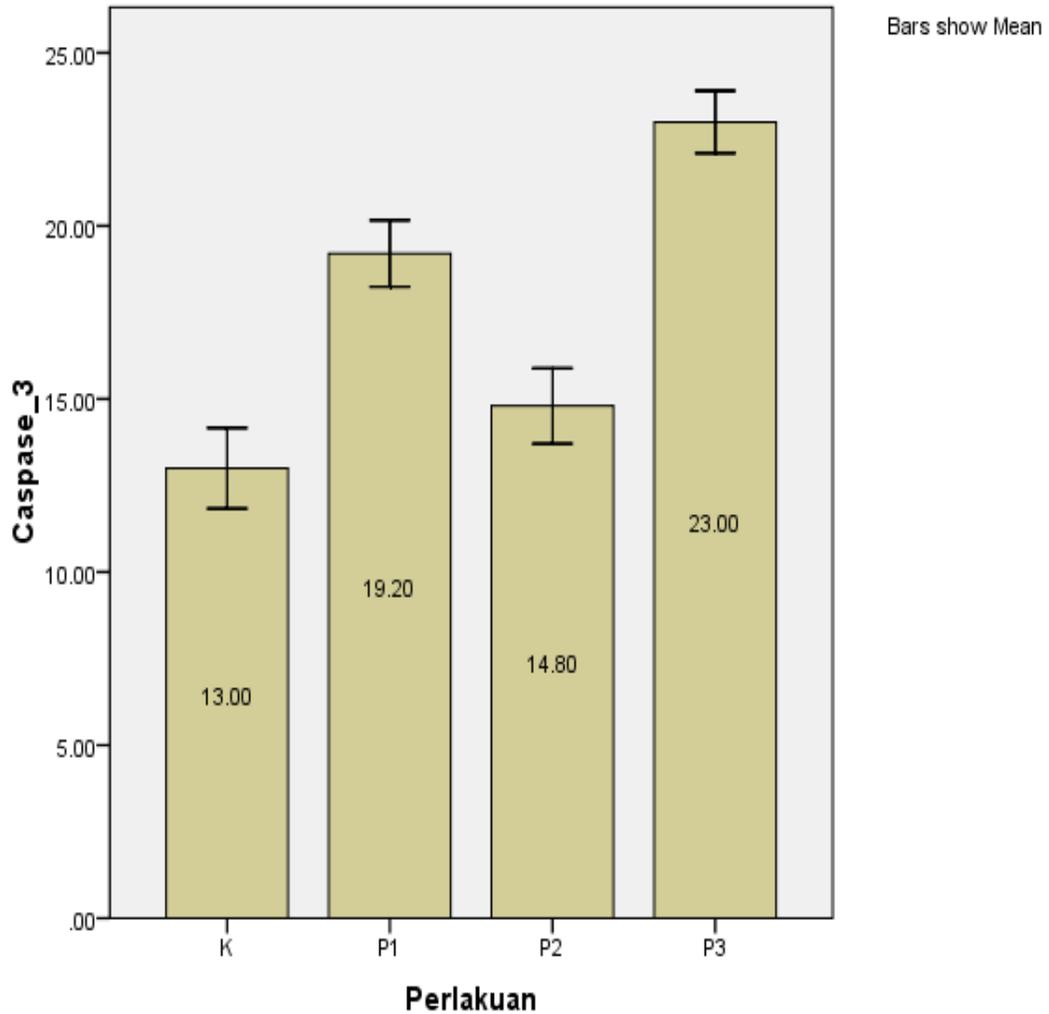
Gambar 5.3 Hasil perlakuan. Keterangan : (a) kontrol (tanpa perlakuan), (b) dosis 50 µg/ml, (c) dosis 100 µg/ml , (d) dosis 200 µg/ml, ➔ ekspresi caspase 3 aktif

Tabel 5.2 Rata-Rata Jumlah Ekspresi Caspase 3 Aktif Per 100 Sel

Perlakuan	Rata-Rata Jumlah Ekspresi	
	Caspase 3 Aktif Per 100 Sel	Standar Deviasi
Kontrol	13	1,5811
Dosis 50	19	1,3038
Dosis 100	15	1,4832
Dosis 200	23	1,2247

Dari tabel diatas, dapat terlihat bahwa pemberian ekstrak daun benalu mangga memiliki pengaruh terhadap ekspresi caspase 3 aktif pada sel HeLa. Pengaruh tersebut dapat dilihat pada perbedaan rata-rata ekspresi caspase 3 aktif per 100 sel antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Peningkatan ekspresi caspase 3 aktif terjadi pada seluruh kelompok perlakuan. Namun, ekspresi caspase 3 aktif terlihat meningkat tajam hanya pada dosis 50 $\mu\text{g/ml}$ dan dosis 200 $\mu\text{g/ml}$ dan tidak pada dosis 100 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini menunjukkan bahwa dibutuhkan dosis tertentu untuk meningkatkan secara signifikan ekspresi caspase 3 aktif. Oleh karena itu, akan dibahas lebih lanjut permasalahan tersebut pada bab pembahasan.

Adapun adanya perbedaan rata-rata ekspresi caspase 3 aktif di dalam sel HeLa secara keseluruhan pada setiap perlakuan di atas juga dapat digambarkan dalam bentuk grafik berikut:



Gambar 5.3 Grafik Hubungan Antara Kelompok Perlakuan dan Rata-rata Jumlah Ekspresi Caspase 3 Aktif per 100 Sel. Keterangan: K (Sel HeLa tanpa perlakuan); P1 (Sel HeLa + 50 µg/ml ekstrak daun benalu mangga); P2 (Sel HeLa + 100 µg/ml ekstrak daun benalu mangga); P3 (Sel HeLa + 200 µg/ml ekstrak daun benalu mangga), garis yang menusuk balok merupakan standar deviasi.

5.2 Analisa Data

5.2.1 Uji Asumsi Data

Uji normalitas dan homogenitas terhadap hasil *MTT* assay dan Immunohistokimia perlu dilakukan sebelum dilakukan uji One Way Anova. Hal tersebut merupakan syarat sebagai uji asumsi data.

5.2.2 Uji Normalitas dan Homogenitas Data

Jika hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* menyatakan bahwa distribusi data normal ($p > 0,05$) dan uji homogenitas menunjukkan data penelitian homogen ($p > 0,05$) maka dapat dilakukan uji One Way Anova. Berdasarkan uji normalitas *Shapiro-Wilk* (lampiran 4.1) distribusi data viabilitas sel HeLa yang merupakan hasil *MTT* Assay adalah normal ($p > 0,05$) dan berdasarkan uji homogenitas, data homogen ($p = 0,087$) (lampiran 4.1). Sedangkan distribusi data ekspresi caspase 3 aktif yang merupakan hasil imunohistokimia pada uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* (lampiran 4.2), didapatkan nilai probabilitas signifikan ($p > 0,05$) dan berdasarkan uji homogenitas data homogen ($p = 0,888$) (lampiran 4.2). Sehingga kedua variabel tersebut dapat dianalisa menggunakan uji One Way Anova.

5.2.3 Analisa One Way Anova

Karena penelitian ini menggunakan beberapa perlakuan dosis, uji One Way Anova merupakan analisa data yang tepat. Uji One way Anova digunakan untuk mengetahui kemungkinan terjadinya perbedaan viabilitas sel dan ekspresi caspase 3 aktif setelah terpapar oleh ekstrak dengan berbagai dosis. Jika uji One Way Anova memberikan hasil $p < 0,05$, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan. Berdasarkan Uji One Way Anova, terdapat perbedaan nilai

yang signifikan baik pada viabilitas sel ($p = 0,000$) (lampiran 4.1) maupun pada ekspresi caspase 3 aktif ($p = 0,000$) (lampiran 4.2). Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa perbedaan dosis ekstrak mengakibatkan perbedaan viabilitas sel dan ekspresi caspase 3 aktif.

5.2.4 Uji Berganda (*Multiple Comparisons*)

Analisis yang selanjutnya dilakukan adalah uji komparasi *Pos Hoc Tukey*. Uji analisis ini digunakan untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan viabilitas sel dan ekspresi caspase 3 aktif antara dua macam dosis yang berbeda. Perbedaan viabilitas sel dan ekspresi caspase 3 aktif yang bermakna dikatakan apabila nilai $p < 0,05$.

Tabel 5.3 Analisis *Post Hoc Multiple Comparison*

Perbandingan Antar Perlakuan		Viabilitas Sel		Caspase 3	
		Nilai Signifikansi	Kesimpulan	Nilai Signifikansi	Kesimpulan
Kontrol	Dosis 50	0,000	Signifikan	0,000	Signifikan
	Dosis 100	0,085	-	0,220	-
	Dosis 200	0,000	Signifikan	0,000	Signifikan
Dosis 50	Kontrol	0,000	Signifikan	0,000	Signifikan
	Dosis 100	0,060	-	0,001	Signifikan
	Dosis 200	0,017	Signifikan	0,003	Signifikan
Dosis 100	Kontrol	0,085	-	0,220	-
	Dosis 50	0,060	-	0,001	Signifikan
	Dosis 200	0,000	Signifikan	0,000	Signifikan
Dosis 200	Kontrol	0,000	Signifikan	0,000	Signifikan
	Dosis 50	0,017	Signifikan	0,003	Signifikan
	Dosis 100	0,000	Signifikan	0,000	Signifikan

Perbedaan nilai viabilitas sel antara dua macam perlakuan terlihat pada tabel 5.3 dan lampiran 4.1. Perbedaan nilai yang signifikan terjadi antara kontrol dengan dosis ekstrak 50 µg/ml dan 200 µg/ml. Sedangkan perbedaan nilai tidak signifikan terdapat pada perbandingan antara kontrol dengan dosis ekstrak 100 µg/ml dan antara dosis ekstrak 50 µg/ml dengan dosis ekstrak 100 µg/ml. Untuk perbedaan nilai antara dosis ekstrak 200 µg/ml dengan dosis ekstrak 50 µg/ml dan dosis ekstrak 200 µg/ml dengan dosis ekstrak 100 µg/ml, keduanya menunjukkan nilai yang signifikan.

Perbedaan nilai ekspresi caspase 3 aktif antar dua macam perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.3 dan lampiran 4.2. Terdapat perbedaan nilai yang signifikan antara kontrol dengan dosis ekstrak 50 µg/ml dan 200 µg/ml. Perbedaan nilai yang signifikan juga terjadi antara dosis ekstrak 50 µg/ml dengan dosis ekstrak 100 µg/ml dan 200 µg/ml. Perbedaan nilai yang tidak signifikan hanya terjadi antara kontrol dengan dosis ekstrak 100 µg/ml. Oleh karena hasil uji *post hoc multiple comparison* baik pada viabilitas sel maupun pada ekspresi caspase 3 aktif seperti yang dijelaskan diatas, sangat terlihat data keduanya tidak perlu dilakukan uji korelasi.

BAB VI

PEMBAHASAN

Kanker serviks merupakan kanker yang diawali oleh infeksi Human Papilloma Virus (HPV) pada epitel serviks. HPV memiliki beberapa onkoprotein. Namun, onkoprotein yang paling mempengaruhi sel hospes adalah onkoprotein E6 dan E7. Onkoprotein E6 dan E7 meregulasi pertumbuhan sel hospes dengan cara mengikat dan menginaktivasi dua protein supresor tumor, protein P53 dan retinoblastoma (Rb) (Gomez dan Santos, 2007). Jalur P53 dan Rb sebagai penjaga gerbang untuk menekan pertumbuhan sel (*senescence*). Selain itu, protein P53 berperan dalam menginduksi apoptosis melalui aktivasi Bax (antagonis Bcl-2). Bcl-2 merupakan protein yang menghambat proses apoptosis atau disebut protein antiapoptosis. Ekspresi onkoprotein Bcl-2 yang berlebihan akan meningkatkan lama kehidupan sel kanker (Feng *et al.*, 2007).

Berdasarkan penelitian Darmawan dan Arianti (2006), diketahui bahwa berbagai jenis benalu termasuk *Dendrophthoe*, memiliki beberapa kandungan senyawa kimia. Kandungan kimia tersebut adalah lektin, 2-galaktosida, senyawa siklik monoterpene glukosida, syringin, coniferin, katekin, epikatekin, kuersetin, tannin dan kuersitrin. Sedangkan menurut Saifillah, 2010, kandungan flavonoid terbanyak dalam benalu randu (*Dendrophthoe pentandra*) adalah kuersetin.

Kuersetin telah dikenal sebagai antiviral, antibakteri dan antioksidan (Jan, *et al.*, 2010). Selain itu, kuersetin diketahui memiliki berbagai macam aksi yang menjadikannya agen anti kanker potensial (Davis and Mathew, 2000). Penelitian (Chang *et al.*, 2009) membuktikan bahwa kuersetin menginduksi apoptosis melalui pembentukan ROS pada sel hepatoma manusia. Bukti lain tentang

Kuersetin adalah dapat menghambat produksi protein *heat shock* pada beberapa *cell line* ganas, meliputi kanker payudara, leukemia, dan kanker kolon (Davis and Mathew, 2000). Kuersetin juga dapat menghambat Akt dan fosforilasi ERK, namun dapat meningkatkan konsentrasi caspase 3 dan caspase 9 dengan mengekspresikan banyak Bax dan sedikit Bcl-2 pada Human Hepatoma Cell Line (HepG2) (Granado-Serrano *et al.*, 2006). Begitupula hasil penelitian (Jaganathan dan Mandal, 2009), memperlihatkan bahwa kuersetin mampu meningkatkan ekspresi Bax tetapi mengurangi level Bcl-2. Penelitian lain menyatakan bahwa kuersetin juga menginduksi apoptosis melalui jalur *caspase 3-dependent* dengan menghambat ekspresi COX 2 (Niu *et al.*, 2011). Penelitian serupa menyebutkan bahwa kuersetin menghambat ekspresi COX 2 untuk memicu apoptosis pada kanker kolon dan kanker payudara (Lee *et al.*, 2000).

Proses apoptosis terjadi melalui dua jalur, yaitu jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik. Jalur ekstrinsik atau sitoplasmik distimulasi oleh *Fas death receptor*. Sedangkan jalur intrinsik atau mitokondria dipicu oleh keluarnya *cytochrome-c* mitokondria. Kedua jalur apoptosis bertemu pada cascade caspase. Jalur intrinsik melibatkan protein Bax dan protein Bcl-2 sebagai antagonisnya. Bcl-2 berperan dalam menghambat proses apoptosis melalui pengeblokan terhadap pengeluaran *cytochrome-c*. Ketika terdapat stimulasi apoptosis, membran luar mitokondria menjadi lebih permeabel sehingga memicu pengeluaran *cytochrome-c*. Kemudian *cytochrome-c* berinteraksi dengan Apaf-1 menyebabkan aktivasi caspase 9. Teraktivasinya caspase 9 menstimulasi aktivasi caspase 3 yang akhirnya membuat kematian sel (Irene *et al.*, 2005). Pada kanker serviks terjadi inaktivasi P53 (Gomez dan Santos, 2007), sedangkan P53 berperan dalam memicu aktivasi Bax (Feng *et al.*, 2007). Oleh sebab itu, terjadi proses hambatan

apoptosis pada kanker serviks. Di sisi lain, kuersetin yang terkandung dalam benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) mampu meningkatkan aktivasi Bax dan menurunkan Bcl-2 (Granado-Serrano *et al.*, 2006 ; Jaganathan dan Mandal, 2009) sehingga kemungkinan besar benalu mangga memiliki kemampuan dalam meningkatkan proses apoptosis pada sel kanker serviks.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) terhadap viabilitas dan caspase 3 pada sel HeLa. Hasil tabel 5.1 menunjukkan bahwa terdapat penurunan viabilitas sel HeLa pada semua dosis ekstrak yang diberikan. Penurunan tersebut lebih jelas terlihat pada grafik yang terdapat pada gambar 5.2. Penurunan viabilitas sel HeLa secara tajam hanya terjadi pada pemberian dosis ekstrak 50 µg/ml dan 200 µg/ml. Sedangkan pada pemberian dosis ekstrak 100 µg/ml, penurunan viabilitas sel tidak begitu tajam dan cenderung menurun. Hasil tabel 5.3 memperlihatkan bahwa pada setiap pemberian dosis ekstrak daun benalu mangga yang berbeda-beda akan terjadi peningkatan ekspresi caspase 3 aktif pada sel HeLa. Pada gambar 5.4, peningkatan tersebut lebih terlihat dengan jelas. Dari semua dosis yang dipaparkan, dosis ekstrak 50 µg/ml dan 200 µg/ml menyebabkan peningkatan ekspresi caspase 3 aktif secara tajam. Sedangkan dosis ekstrak 100 µg/ml menyebabkan peningkatan ekspresi caspase 3 yang tidak begitu tajam dan cenderung menurun.

Uji One Way Anova menunjukkan bahwa penurunan viabilitas sel HeLa bernilai signifikan ($p = 0,000$) dan peningkatan ekspresi caspase 3 aktif juga bernilai signifikan ($p = 0,000$). Untuk viabilitas sel HeLa, analisa statistik *Post Hoc Comparison* (Tukey HSD) memberikan hasil signifikan pada perbandingan antara kontrol dengan dosis ekstrak 50 µg/ml dan 200 µg/ml. Uji ini juga bernilai

signifikan pada perbandingan antara dosis ekstrak 200 µg/ml dengan dosis ekstrak 50 µg/ml dan 100 µg/ml. Sedangkan perbandingan antara kontrol dengan dosis ekstrak 100 µg/ml dan antara dosis ekstrak 50 µg/ml dengan dosis ekstrak 200 µg/ml bernilai tidak signifikan. Untuk ekspresi caspase 3 aktif, uji *Post Hoc Comparison* (Tukey HSD) menampakkan hasil signifikan pada seluruh perbandingan antara 2 kelompok perlakuan, kecuali antara dosis kontrol dengan dosis ekstrak 100 µg/ml bernilai tidak signifikan. Berdasarkan hal diatas dapat disimpulkan bahwa dosis ekstrak 200 µg/ml merupakan dosis yang paling efektif untuk menurunkan viabilitas sel HeLa dan meningkatkan ekspresi caspase 3 aktif.

Hasil penelitian ini hampir serupa dengan penelitian sebelumnya pada *Human Hepatoma Cell Line* (HepG2). Penelitian pada HepG2 ini membuktikan bahwa kuersetin dengan konsentrasi dosis 50 µmol/L merupakan dosis yang paling besar menyebabkan peningkatan caspase 3. Sedangkan dengan konsentrasi 100 µmol/L cenderung menurunkan caspase 3. Namun dosis tertinggi yang dipaparkan ke sel adalah 100 µmol/L sehingga tidak dapat dilakukan penilaian pada dosis yang lebih tinggi. Selain itu, telah disebutkan juga bahwa peningkatan konsentrasi yang lebih tinggi dikemudian hari dapat menurunkan viabilitas karena aktivasi signal eksekutor apoptosis (Granado-Serrano *et al.*, 2006). Sedangkan penelitian yang baru dilakukan memang menunjukkan bahwa dosis ekstrak 200 µg/ml memiliki efek yang lebih besar pada penurunan viabilitas sel dan peningkatan ekspresi caspase 3 pada sel HeLa dibandingkan dengan dosis ekstrak 50 µg/ml dan 100 µg/ml. Penelitian lain juga membuktikan bahwa ekstrak batang benalu mangga dosis 100 µg/ml hanya memiliki sedikit efek pada peningkatan caspase 3 aktif dibandingkan dengan dosis 50 µg/ml dan 200 µg/ml

(Zulaifah, 2013). Oleh karena itu, pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa dosis ekstrak 200 µg/ml merupakan dosis yang memiliki efek paling besar dalam menurunkan viabilitas sel HeLa dan meningkatkan ekspresi caspase 3 aktif. Meskipun perhatian khusus harus diberikan pada konsentrasi ekstrak daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*), daun benalu mangga mungkin tetap dapat menjadi agen kemopreventif dan terapeutik pada sel kanker serviks.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun benalu mangga mampu menurunkan viabilitas sel HeLa dan meningkatkan ekspresi caspase 3 aktif pada sel HeLa. Penelitian ini memperlihatkan bahwa dosis efektif ekstrak daun benalu mangga untuk menurunkan viabilitas sel HeLa dan meningkatkan ekspresi caspase 3 aktif pada sel HeLa adalah 200 µg/ml.

7.2 Saran

Penelitian ini sangat diharapkan bisa dimanfaatkan sebagai dasar penelitian selanjutnya dalam memanfaatkan benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) sebagai alternatif agen antikanker yang efektif, alamiah, dan relatif terjangkau. Selain itu, masih dibutuhkan penelitian lanjut untuk menentukan dosis yang paling efektif terhadap kanker serviks. Penelitian ini tidak menggunakan sel normal sebagai pembandingan untuk sel kanker, sehingga terdapat kelemahan dalam menentukan dosis efektif. Oleh karena itu, jika dilakukan penelitian lebih lanjut, alangkah baiknya menggunakan sel normal sebagai kontrol negatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, J., Cory, S. 2001. Life-Or-Death Decisions By The Bcl-2 Protein Family. *Trends Biochem Sci.* 26:61–6.
- American Cancer Society. 2012. Cervical Cancer.pdf.
- American Joint Committee on Cancer (AJCC). 2010. Cervix Uteri. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer : 395-40.
- Artanti, N., Widiyawati, R., Fajriyah, S. 2009. Aktivitas dan Toksisitas Ekstrak Air dan Etanol Daun Benalu (*Dendrophthoe pentandra L. Miq.*).
- Backer dan Brink. 1968. Karakter dan Kunci Identifikasi pada Flora of Java. Halaman : 67-76.
- Barkett, M. and Gilmore, T.D. 1999. *Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors*. Boston University. 18(49):6910-24.
- Blumenthal, P.D. dan McIntosh, N. 2005. Cervical Cancer Prevention, Guidelines For Low-Resources Settings. Hal 3-8.
- Boardman, C.H. 2012. Cervical Cancer. <http://emedicine.medscape.com/article/253513-overview#a0104>. Diakses tanggal 26 Juni 2012.
- Chang, Y.F., Hsu, Y.C., Hung H.F. *et al.* 2009. Quercetin Induces Oxidative Stress and Potentiates the Apoptotic Action of 2-ethoxyestradiol in Human Hepatoma Cells.
- Cox, R. 1994. Mechanism of radiation oncogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.* 65, 57-64.
- Darmawan, Akhmad dan Artanti, Nina. 2006. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Antioksidan dari Ekstrak Air Daun Benalu (*Dendrophthoe pentandra L. Miq.*) yang Tumbuh pada Cemara (*Casuarina sp.*). LIPI. Kawasan Puspiptek Serpong-Banten.
- Davis, W.L. and Mathew, S.B. 2000. Antioxidants and Cancer III : Quercetin. *Altern Med Kev*; 5 (3): 196-208.
- Devi, P Uma. 2001. *BASIC OF CARCINOGENESIS*. Health Administrator. XIVV (1) : 16-24.
- 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.

- Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M. *et al.* 2011. Quercetin and Cancer Chemoprevention. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Volume.Article ID 591356. 15 halaman.
- Gomez, D.T. dan Santos, J.L. 2007. Human Papilloma Virus 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. *et al.* 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.
- Ikawati, M., Wibowo, A. E., Octa. N.S., Adelina, S. 2008. Pemanfaatan Benalu Sebagai Agen Antikanker. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Irene, M.G., Thomas, E.W., Alex, A.A. 2005. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. American Cancer Society. Pdf.
- Jaganathan, S.K., dan Mandal, Mahitosh. 2009. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Jan, A.T., Kamli, M.R., Murtaza. 2010. Dietary Flavonoid Quercetin and Associated Health Benefits—An Overview.
- Lee Y.K, Park S.Y, Kim Y.M, Lee W.S and Park O.J. AMP kinase/cyclooxygenase-2 pathway regulates proliferation and apoptosis of cancer cells treated with Quercetin. *Exp Mol Med* 2009, 41: 201 – 207.
- Mandal, Ananya. 2013. What is Cancer ?. <http://www.news-medical.net/health/What-is-Cancer.aspx>. Diakses pada tanggal 27 Januari 2013.
- Mandal, Ananya. 2013. Cancer Classification. <http://www.news-medical.net/health/Cancer-Classification.aspx>. Diakses pada tanggal 28 Januari 2013.
- Martin-Hirsch, Pierre, L. dan Wood, N.J. 2011. Cervical Cancer. *Clinical Evidence*; 07: 818.
- NHS. 2008. Management of Cervical Xancer, 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.

- Saifillah, Efriko Septananda. 2010. Potensi Ekstrak Daun Benalu Randu (*Dendrophthoe Pentandra*) Terhadap Penurunan Ekspresi Protein P53 Mutan pada Sel Kanker Serviks (Sel HeLa) Secara In Vitro. FKUB, Malang.
- Sekarumuti, Sri Mutya . 2010. Tingkatkan Keberhasilan Terapi Radiasi Kanker Serviks. UNIVERSITARIA. (10) : 3.
- Robbins, Stanley R., Cotran, Ramzi S., Kumar, Vinay. 2007. Buku Ajar Patologi Robbins. Ed. 7. Vol. 2.
- Steben, M., Duarte-Franco, E. 2007. Human Papillomavirus Infection: Epidemiology and Pathophysiology. *Gynecologic Oncology* 107 (2007) S2-S5.
- Sunaryo dan Rachman, E. 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, 145-1455.
- ThirdAge Media. 2012. Cervical Cancer. <http://www.thirdage.com/hc/c/cervical-cancer>. Diakses pada tanggal 26 Januari 2013.
- UNSCEAR. 1993. Sources and Effects of Ionizing Radiation. Vol II, Effects. United Nations Scientific Commite on the Effect Atomic Radiation, 1993 Report to the Genenral Assembly. United Nation, New York.
- UNSCEAR. 2000. Sources and Effects of Ionizing Radiation. Vol II, Effects. United Nations Scientific Commite on the Effect Atomic Radiation, 2000 Report to the Genenral Assembly. United Nation, New York.
- Watson W, Cai J, Jones D. Diet and apoptosis. *Annu Rev Nutr*. 2000; 20:485–505.
- WHO. 2010. Human Papillomavirus and Related Cancer. WHO/ICO HPV information Centre. Edisi ke 3.
- WHO. 2011. *Cancer*. <http://www.who.int/cancer/en/>. Diakses pada tanggal 25 Januari 2012.

Yoshida, K., Sasaki, R., Nishimura, H., Miyawaki D., dan 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.

Zulaifah, Zakiyah. 2013. Pengaruh Ekstrak Terhadap Peningkatan Jumlah Sel Kanker yang Mengandung Protein Caspase-3 Aktif. FKUB, Malang.



LAMPIRAN**Lampiran 1 Pernyataan Keaslian Tulisan****PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Aprillia Eka Very Rachmawati

NIM : 0910710037

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya,

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar – benar merupakan hasil karya tulis saya sendiri. Saya mengakui bahwa tulisan ini mendapat ide dari penelitian-penelitian yang sebelumnya dilakukan oleh orang lain. Namun saya menegaskan bahwa Tugas Akhir yang saya buat ini bukan merupakan hasil pengambilan semua gagasan atau pikiran orang lain. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, Februari 2013
Yang membuat pernyataan

Aprillia Eka Very Rachmawati
0910710037

Lampiran 2 Hasil Perlakuan Viabilitas Sel



Subkultur sel HeLa



sel HeLa setelah dipapar dengan ekstrak dan sebelum diberi reagen MTT



sel HeLa Setelah dipapar dengan ekstrak dan setelah diberi reagen MTT, terdapat Kristal formalzan (ungu)



Lampiran 3 Identifikasi Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*)

LABORATORIUM TAKSONOMI DAN STRUKTUR TUMBUHAN
JURUSAN BIOLOGI, FAKULTAS MIPA
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
JALAN VETERAN, MALANG 65145
Telepon/faks: 0341-575841

KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0057/Takso.Identifikasi/03/2012

Kepala Laboratorium Taksonomi dan Struktur Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama : Zakiya Zulaifah (NIM. 0910710140)
Aprilia Eka Very (NIM. 0910710037)

Instansi : Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran
Universitas Brawijaya

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume II, halaman 67-76, diidentifikasi sebagai:

Family : **Loranthaceae**
Genus : ***Dendrophthoe***
Species : ***Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.**

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 25 Juni 2012

Kepala Laboratorium
Taksonomi dan Struktur Tumbuhan,

Indriyani, M.Si.
NIP. 19630909 198802 2 001

Lampiran 4 Uji Statistik

Lampiran 4.1 Uji Statistik Viabilitas Sel

Descriptives^a

Perlakuan			Statistic	Std. Error
Viabilitas	P1	Mean	63.8200	5.72446
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 47.9264	Upper Bound 79.7136
		5% Trimmed Mean	63.8889	
		Median	63.8000	
		Variance	163.847	
		Std. Deviation	1.28003	
		E1		
		Minimum	45.30	
		Maximum	81.10	
		Range	35.80	
		Interquartile Range	20.45	
		Skewness	-.232	.913
		Kurtosis	1.635	2.000
		P2	P2	Mean
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 72.1032			Upper Bound 93.0168
5% Trimmed Mean	82.3278			
Median	82.5000			
Variance	70.923			
Std. Deviation	8.42158			
Minimum	73.30			
Maximum	96.00			
Range	22.70			
Interquartile Range	13.45			
Skewness	1.089			.913



	Kurtosis		2.010	2.000
P3	Mean		40.8200	6.68030
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	22.2725	
		Upper Bound	59.3675	
	5% Trimmed Mean		40.9833	
	Median		40.8000	
	Variance		223.132	
	Std. Deviation		1.49376	
			E1	
	Minimum		20.70	
	Maximum		58.00	
	Range		37.30	
	Interquartile Range		28.35	
	Skewness		-.279	.913
	Kurtosis		-1.192	2.000

a. Viabilitas is constant when Perlakuan = K. It has been omitted.

UJI NORMALITAS

Tests of Normality^b

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Viabilitas P1	.240	5	.200*	.956	5	.777
P2	.298	5	.167	.914	5	.491
P3	.173	5	.200*	.973	5	.896

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

b. Viabilitas is constant when Perlakuan = K. It has been omitted.

UJI HOMOGENITAS

Test of Homogeneity of Variances

Viabilitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.617	3	16	.087

UJI ONE WAY ANOVA

ANOVA

Viabilitas	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9672.292	3	3224.097	28.164	.000
Within Groups	1831.608	16	114.476		
Total	11503.900	19			

UJI MULTIKOMPARASI POS HOC TUKEY

Multiple Comparisons

Viabilitas

Tukey HSD

(I) Perlak	(J) Perlak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K	P1	36.18000*	6.76685	.000	16.8199	55.5401
	P2	17.44000	6.76685	.085	-1.9201	36.8001
	P3	59.18000*	6.76685	.000	39.8199	78.5401
P1	K	-36.18000*	6.76685	.000	-55.5401	-16.8199
	P2	-18.74000	6.76685	.060	-38.1001	.6201
	P3	23.00000*	6.76685	.017	3.6399	42.3601
P2	K	-17.44000	6.76685	.085	-36.8001	1.9201
	P1	18.74000	6.76685	.060	-.6201	38.1001

P3		41.74000*	6.76685	.000	22.3799	61.1001
P3	K	-59.18000*	6.76685	.000	-78.5401	-39.8199
	P1	-23.00000*	6.76685	.017	-42.3601	-3.6399
	P2	-41.74000*	6.76685	.000	-61.1001	-22.3799

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

Viabilitas

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
P3	5	40.8200		
P1	5		63.8200	
P2	5		82.5600	82.5600
K	5			1.0000E-2
Sig.		1.000	.060	.085

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 4.2 Uji Statistik Caspase 3

Descriptives

Perlakuan		Statistic	Std. Error
Caspase_3	K	Mean	13.0000
		95% Confidence Interval for Mean	.70711
		Lower Bound	11.0368
		Upper Bound	14.9632
		5% Trimmed Mean	13.0000
		Median	13.0000
		Variance	2.500
		Std. Deviation	1.58114
		Minimum	11.00
		Maximum	15.00
		Range	4.00

	Interquartile Range		3.00	
	Skewness		.000	.913
	Kurtosis		-1.200	2.000
P1	Mean		19.2000	.58310
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	17.5811	
		Upper Bound	20.8189	
	5% Trimmed Mean		19.1667	
	Median		19.0000	
	Variance		1.700	
	Std. Deviation		1.30384	
	Minimum		18.00	
	Maximum		21.00	
	Range		3.00	
	Interquartile Range		2.50	
	Skewness		.541	.913
	Kurtosis		-1.488	2.000
P2	Mean		14.8000	.66332
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	12.9583	
		Upper Bound	16.6417	
	5% Trimmed Mean		14.7778	
	Median		15.0000	
	Variance		2.200	
	Std. Deviation		1.48324	
	Minimum		13.00	
	Maximum		17.00	
	Range		4.00	
	Interquartile Range		2.50	
	Skewness		.552	.913
	Kurtosis		.868	2.000
P3	Mean		23.0000	.54772

95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	21.4793	
	Upper Bound	24.5207	
5% Trimmed Mean		23.0556	
Median		23.0000	
Variance		1.500	
Std. Deviation		1.22474	
Minimum		21.00	
Maximum		24.00	
Range		3.00	
Interquartile Range		2.00	
Skewness		-1.361	.913
Kurtosis		2.000	2.000

UJI NORMALITAS

Tests of Normality

	Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Caspase_3	K	.136	5	.200*	.987	5	.967
	P1	.221	5	.200*	.902	5	.421
	P2	.246	5	.200*	.956	5	.777
	P3	.300	5	.161	.833	5	.146

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

UJI HOMOGENITAS

Test of Homogeneity of Variances

Caspase_3

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.210	3	16	.888

UJI ONE WAY ANOVA

ANOVA

Caspase_3					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	303.400	3	101.133	51.207	.000
Within Groups	31.600	16	1.975		
Total	335.000	19			

UJI MULTIKOMPARASI POS HOC TUKEY

Multiple Comparisons

Caspase_3
Tukey HSD

(I) Perluan	(J) Perluan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K	P1	-6.20000*	.88882	.000	-8.7429	-3.6571
	P2	-1.80000	.88882	.220	-4.3429	.7429
	P3	-10.00000*	.88882	.000	-12.5429	-7.4571
P1	K	6.20000*	.88882	.000	3.6571	8.7429
	P2	4.40000*	.88882	.001	1.8571	6.9429
	P3	-3.80000*	.88882	.003	-6.3429	-1.2571
P2	K	1.80000	.88882	.220	-.7429	4.3429
	P1	-4.40000*	.88882	.001	-6.9429	-1.8571
	P3	-8.20000*	.88882	.000	-10.7429	-5.6571
P3	K	10.00000*	.88882	.000	7.4571	12.5429
	P1	3.80000*	.88882	.003	1.2571	6.3429
	P2	8.20000*	.88882	.000	5.6571	10.7429

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

Caspase_3

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
K	5	13.0000		
P2	5	14.8000		
P1	5		19.2000	
P3	5			23.0000
Sig.		.220	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

