

**AKTIVITAS EKSTRAK MENTIMUN LAUT *Stichopus horrens*
DALAM MENGINDUKSI *p53*-INDEPENDENT APOPTOSIS
PADA SEL HeLa**

SKRIPSI

oleh :
ISNA NUR FITYANA
0710910010-91



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2011**

**AKTIVITAS EKSTRAK MENTIMUN LAUT *Stichopus horrens*
DALAM MENGINDUKSI *p53-INDEPENDENT* APOPTOSIS
PADA SEL HeLa**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

oleh :

ISNA NUR FITYANA

0710910010-91



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2011**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**AKTIVITAS EKSTRAK MENTIMUN LAUT *Stichopus horrens*
DALAM MENGINDUKSI *p53-INDEPENDENT* APOPTOSIS
PADA SEL HeLa**

oleh

**ISNA NUR FITYANA
0710910010-91**

**Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 28 Juni 2011
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

Pembimbing I

Pembimbing II

**Widodo, S.Si.,M.Si.,PhD.Med.Sc.
NIP. 19730811-200003-1-002**

**Muhaimin R., S.Si.,M.Si.,Ph.D.Med.Sc.
NIP. 19680626-199702-1-001**

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Widodo, S.Si., M.Si., PhD.Med.Sc.
NIP. 19730811-200003-1-002**

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Isna Nur Fityana
NIM : 0710910010-91
Jurusan : Biologi
Penulis Skripsi Berjudul : Aktivitas Ekstrak Mentimun Laut
Stichopus horrens dalam Menginduksi *p53-Independent* Apoptosis
pada Sel HeLa

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri, dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka ini, semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi skripsi merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran.

Malang, 28 Juni 2011

Yang menyatakan,

Isna Nur Fityana
NIM. 0710910010-91

Aktivitas Ekstrak Mentimun Laut *Stichopus horrens* dalam Menginduksi *p53-Independent Apoptosis* pada Sel HeLa

Isna N.F., Widodo, M. Rifa'i

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Sel kanker merupakan sel yang berproliferasi dengan cepat dan tidak terkendali karena adanya perubahan genetik. *Stichopus horrens* diketahui mengandung senyawa aktif yang dapat menginduksi kematian sel (apoptosis) pada sel kanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak mentimun laut *Stichopus horrens* terhadap induksi apoptosis pada Sel HeLa. Sel HeLa diinkubasi dengan ekstrak mentimun laut *S. horrens* dengan perlakuan kontrol negatif (0 ug/ml), dosis minimum (0,25 ug/ml), dosis medium (0,50 ug/ml), dan dosis maksimum (0,75 ug/ml). Deteksi terjadinya apoptosis dilakukan dengan pewarnaan imunositokimia TUNEL. Jumlah sel yang mengalami apoptosis pada perlakuan 0 ug/ml; 0,25 ug/ml; 0,50 ug/ml; dan 0,75 ug/ml masing-masing sebesar 15,3%; 26,2%; 31,5% dan 42,3%. Uji korelasi menunjukkan tidak terdapat korelasi antara jumlah sel yang mengekspresikan p53 dengan jumlah sel yang mengalami apoptosis, sehingga mekanisme apoptosis tidak melalui jalur p53 (*p53-independent*). Berdasarkan analisis *pathway* menggunakan program *Osprey 1.0.1* diduga mekanisme ekstrak mentimun laut *S. horrens* menginduksi apoptosis pada sel HeLa melalui beberapa jalur yang mengaktifkan *caspase*.

Kata kunci : apoptosis, kanker, mentimun laut *S.horrens*, *p53-independent*, sel HeLa.

Activity of Sea Cucumber *Stichopus horrens* Extract Induce p53-Independent Apoptosis in HeLa Cell

Isna N.F., Widodo, M. Rifa'i
Biology Department, Mathematic and Science Faculty,
Brawijaya University, Malang

Abstract

Cancer cell is the quick and uncontrollable proliferated cells because genetic alteration. *Stichopus horrens* contain active compounds, which can induce apoptosis in cancer cells. This research is to understand the influence of *Stichopus horrens* extract induce apoptosis in HeLa cells. We treated HeLa cells with *S. horrens* extract in respective doses: control (0 ug/ml), minimum dose (0,25 ug/ml), medium dose (0,50 ug/ml), and maximum dose (0,75 ug/ml). We detected the apoptosis expression with TUNEL imunocytochemistry. Amount of apoptotic cell after treatment with 0 ug/ml; 0,25 ug/ml; 0,50 ug/ml; and 0,75 ug/ml of the extract are 15,3%; 26,2%; 31,5% and 42,3%. Based correlation test, there are no correlation between amount of p53 expression cell and amount of apoptosis cell, so the mechanism is p53-independent apoptosis. Analyze use *Osprey 1.0.1* program known that mechanism of the extract induce apoptosis in HeLa cell through the caspase activation.

Keyword : apoptotis, cancer, sea cucumber *Stichopus horrens*, p53-independent, HeLa cells.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Rabbil ‘Aalamiin, dengan ungkapan rasa syukur pada Allah Yang Maha Kuasa akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang merupakan syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. **Bapak Widodo, S.Si., M.Si., PhD.Med.Sc** selaku Dosen Pembimbing I yang telah mendampingi dan memberi pengarahan serta tambahan ilmu dan saran-saran yang berguna bagi penulis.
2. **Bapak Muhaimin Rifa’i, S.Si., M.Si., PhD.Med.Sc** selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberi pengarahan serta tambahan ilmu dan saran-saran yang berguna bagi penulis.
3. **Dr. Sri Widyarti, MS., Dr. Ir. Sasmito Djati, MS.** dan **Dr. Agung Pramana W.M., M.Si.** selaku Dosen Penguji yang telah memberi saran yang bermanfaat demi perbaikan penyusunan skripsi.
4. **Sdr. Wibi Riawan, S.Si, Sdri. Fitriah, S.Si,** dan **Sdri. Bunga Prihardina, S.Si,** serta tim Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran yang telah membantu pelaksanaan penelitian.
5. **Bapak Adji Achmad Rinaldo F., S.Si., M.Sc.** yang telah membantu analisis statistik.
6. **Ibunda (Nurul Chudaifah), Bapak (Subono), kakak (Husna Ni’matul Ulya), adik (Mughniatul Ilma), dan keluarga tercinta** atas segala doa, dukungan, dan motivasi yang tidak terkira.
7. **Rekan Seperjuangan Biologi Angkatan 2007 “Quorum Sensing”** dan seluruh civitas akademik Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Penulisan skripsi ini merupakan upaya optimal penulis sebagai sarana terbaik dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan untuk menjadikan karya ini semakin bermanfaat.

Malang, Juni 2011

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SIMBOL/SINGKATAN	xiii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Permasalahan.....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tinjauan Umum Tentang Mentimun Laut <i>Stichopus horrens</i>	4
2.2 Tinjauan Umum Tentang Kanker	5
2.3 Tinjauan Umum Tentang Sel HeLa	6
2.4 Proses Kematian Sel (Apoptosis)	7
2.5 <i>Tumor Supressor Gen p53</i>	7
2.6 Siklus Sel	9
2.7 Mekanisme Penghambatan Siklus Sel oleh Antikanker	11
2.8 Kerangka Berpikir	12
2.9 Hipotesis	12
BAB III METODE PENELITIAN	13
3.1 Waktu dan Tempat	13
3.2 Bahan dan Alat.....	13
3.3 Cara Kerja.....	13
3.3.1 Rancangan Penelitian.....	13

3.3.2	Ekstraksi Mentimun Laut <i>Stichopus horrens</i> dengan Metanol (Widodo, dkk., 2009)	14
3.3.3	Kultur Sel HeLa.....	14
3.3.4	Subkultur Sel HeLa	14
3.3.5	Pemberian Ekstrak Mentimun Laut <i>S. horrens</i>	14
3.3.6	Pemanenan Sel	15
3.3.7	Imunositokimia.....	15
	1. Imunositokimia Apoptosis dengan TUNEL	15
	2. Imunositokimia p53	15
	3. <i>Counterstaining</i>	16
3.3.8	Penghitungan Sel.....	16
3.3.9	Analisis Data	16
3.3.10	Prediksi Gen dan Protein Target yang Berperan dalam Apoptosis yang Diinduksi oleh Ekstrak Mentimun Laut.....	16
3.3.11	Prediksi Mekanisme Apoptosis pada Sel HeLa yang Diinduksi oleh Ekstrak Mentimun Laut.....	17
3.3.12	Prediksi Jalur Mekanisme Apoptosis pada Sel HeLa yang Diinduksi oleh Ekstrak Mentimun Laut	17
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....		18
4.1	Kultur Sel HeLa.....	18
4.2	Ekstrak Mentimun Laut <i>Stichopus horrens</i>	19
4.2	Pewarnaan Sel HeLa secara Imunositokimia	21
4.3	Pengaruh Pemberian Ekstrak Mentimun Laut <i>Stichopus horrens</i> terhadap Sel HeLa.....	23
4.4	Pengaruh Pemberian Ekstrak Mentimun Laut <i>Stichopus horrens</i> terhadap Ekspresi Protein p53	24
4.5	Prediksi Gen dan Protein Target dalam Mekanisme Apoptosis yang Diinduksi oleh Ekstrak Mentimun Laut	26
4.6	Prediksi Mekanisme Apoptosis pada Sel HeLa yang Diinduksi Ekstrak Mentimun Laut.....	27
4.7	Prediksi Jalur Mekanisme <i>p53-Independent</i> Apoptosis pada Sel HeLa yang Diinduksi Ekstrak Mentimun Laut.....	28
BAB V PENUTUP		32
5.1	Kesimpulan	32
5.2	Saran.....	32

DAFTAR PUSTAKA.....33
LAMPIRAN.....40

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR GAMBAR

2.1	Mentimun Laut <i>Stichopus horrens</i>	4
2.2	Morfologi Sel HeLa	6
2.3	Apoptosis terjadi melalui dua jalur yaitu jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik.....	7
2.4	Urutan siklus sel.....	9
2.5	Mekanisme penghambatan siklus sel oleh antikanker.....	11
2.6	Inaktivasi p53 sebagai respon DNA <i>damage</i> dan faktor transkripsi pada kanker meningkatkan proliferasi sel dan menurunkan laju apoptosis	12
4.1	Kultur sel HeLa konfluen dalam flask.....	19
4.2	Hasil imunositokimia sel HeLa	21
4.3	Proses imunositokimia pada sel apoptosis dengan TUNEL.....	22
4.4	Rata-rata jumlah sel yang mengalami apoptosis pada setiap perlakuan.....	24
4.5	Perbandingan ekspresi p53 pada sel hidup dan sel apoptosis	25
4.6	Prediksi mekanisme apoptosis terkait gen dan protein yang menjadi target ekstrak mentimun laut.....	27
4.7	Integrasi onkogen E6 ke dalam struktur gen p53	28
4.8	Prediksi jalur mekanisme apoptosis pada sel HeLa oleh ekstrak mentimun laut dari <i>Osprey 1.0.1</i>	29
A.1	Skema Alur Penelitian	39
D.1	Studi homologi struktur dengan <i>KegDraw-0_1_11Beta</i>	44
D.2	Proses penelusuran kesamaan struktur senyawa aktif mentimun laut	44
E.1	Prediksi jalur mekanisme apoptosis menggunakan <i>Osprey 1_0_1</i>	45

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Senyawa aktif mentimun laut yang memiliki sifat antikanker.....	26
Tabel C.1	Tes One-Sample Kolmogorov-Smirnov	42
Tabel C.2	Tes Homogenitas Varian.....	42
Tabel C.3	Uji Anova Sel Hidup Tiap Perlakuan	42
Tabel C.4	Uji Anova Sel Apoptosis Tiap Perlakuan	42
Tabel C.5	Uji Anova Ekspresi p53 pada Sel Apoptosis Tiap Perlakuan.....	42
Table C.6	Uji Anova Ekspresi p53 pada Sel Hidup Tiap Perlakuan	43
Tabel C.7	Beda Nyata Antar Perlakuan pada Sel Hidup	43
Tabel C.8	Beda Nyata Antar Perlakuan pada Sel Apoptosis	43
Tabel C.9	Beda Nyata Antar Jumlah Ekspresi p53 pada Sel Apoptosis.....	43
Tabel C.10	Beda Nyata Antar Ekspresi p53 pada Sel Hidup	43
Tabel C.11	Korelasi antara Ekspresi p53 dengan Apoptosis	43
Tabel C.12	Korelasi antara Ekspresi p53 dengan sel hidup.....	43



DAFTAR LAMPIRAN

L.A Skema Alur Penelitian	40
L.B Perhitungan dosis pemberian ekstrak mentimun laut <i>S. horrens</i> 41	
L.C Output Hasil Analisis Data Menggunakan Program SPSS 16 for Windows	42
L.D Studi Homologi Struktur.....	44
L.E Prediksi Jalur Mekanisme Apoptosis Menggunakan <i>Osprey</i> <i>1_0_1</i>	45



DAFTAR SIMBOL/SINGKATAN

Simbol/Singkatan

Keterangan

AEC	3-amino-9-ethylcarbazole
Apaf-1	Apoptosis protease activating factor-1
ATCC CCL	American Type Culture Collection Certified Cell Line
ATP	Adenosine triphosphate
Bcl-2	B-cell Lymphoma-2
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
Caspase	Cyteinyl aspartate-specific proteases
Cdc	Cell division cycle
CDK	Cyclin dependent kinase
Cyt c	Cytochrom c
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DRs	Death receptors
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FAK	Focal adhesion kinase
FADD	Fas-associated death domain
G	Gap
HeLa cell	Henrietta Lacks cell
HPV	Human Papillomavirus
JNK	c-Jun N-terminal kinases
M	Mitosis
MAPKs	Mitogen-activated protein kinases
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MEM	Minimum Essential Medium
PARP-1	Poly (ADP-ribose) polymerase-1
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
ROS	Reactive oxygen species
S	Sintesis
SMAC	Second Mitochondria-Derived Activator
TIG-1	Tazarotene-Induced Gene-1

TNF
TRADD
TRAIL
TUNEL

$\Delta\Psi$

Tumor Necrosis Factor
TNF-receptor death domain
TNF related apoptosis inducing ligand
Terminal deoxynucleotide Transferase
(TdT) mediated dUTP nick end
labeling
Mitochondrial membrane potential

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan dengan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kanker adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal. Sel-sel kanker berkembang dengan cepat, tidak terkendali, terus membelah diri dan selanjutnya menyusup ke jaringan sekitarnya (invasif) dan menyebar melalui jaringan dan pembuluh darah (metastasis). Faktor terjadinya kanker dapat berupa faktor lingkungan, keturunan, makanan, virus, infeksi, perilaku, kejiwaan/hormonal, dan radikal bebas (Palizban, dkk. 2010). Kanker merupakan salah satu penyakit yang menjadi masalah kesehatan masyarakat, baik di Indonesia maupun di dunia. Persentase kanker paling tinggi adalah kanker payudara dan kedua adalah kanker serviks. WHO (*World Health Organization*) dan Bank Dunia (2005) memperkirakan setiap tahun, 12 juta orang di seluruh dunia menderita kanker dan 7,6 juta di antaranya meninggal dunia. Di Indonesia sendiri, berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS, 2007), kanker payudara tercatat sebanyak 8.227 kasus (16.85%) dan kanker serviks 5.786 kasus (11.78%).

Sel kanker kehilangan jalur kematian sel (apoptosis) karena kegagalan proses perbaikan DNA akibat mutasi atau keabnormalan ekspresi beberapa gen yang mengaturnya, sehingga hal tersebut memicu pembelahan sel, berlangsungnya siklus sel secara terus menerus dan tidak terjadi apoptosis (Garrett, 2001). Apoptosis merupakan suatu proses kematian sel terprogram melalui mekanisme tertentu yang bertujuan untuk perkembangan yang lebih baik serta untuk mengeliminasi sel yang dapat mengancam integritas tubuh. Dua jalur utama apoptosis adalah jalur ekstrinsik yang meliputi pengaktifan reseptor kematian, dan jalur intrinsik meliputi pemberian signal yang memicu proses pelepasan sitokrom C dari mitokondria dan mengaktifkan *caspase 9* (Kastan, dkk. 1995).

Hilangnya jalur apoptosis pada sel kanker salah satunya disebabkan oleh adanya mutasi atau keabnormalan ekspresi *tumor suppressor gene p53* yang berperan penting dalam DNA *repair* dan induksi apoptosis. Jika terkena suatu faktor misalnya paparan radiasi, sel biasanya melakukan *arrest* pada fase G1 atau G2 melalui aktivasi dari p53. Ekspresi dari p53 yang tinggi dalam sel dapat dijadikan penanda bahwa dalam sel terjadi induksi apoptosis. Mutasi atau inaktivasi p53

dalam sel kanker merupakan faktor yang dapat menyebabkan sel kanker *survive* (Syaifudin, 2007).

Perkembangan industri farmasi yang sangat pesat dalam menciptakan obat-obat sintetis saat ini bertujuan untuk mencegah dan mengobati penyakit kanker, namun sebagian besar bersifat toksik. Selain itu, teknologi pengobatan seperti pembedahan, kemoterapi, dan radioterapi dapat memberikan efek samping pada penderita serta memerlukan biaya yang relatif mahal. Beberapa obat telah dikembangkan dan kemungkinan efektif, namun masih perlu dilakukan identifikasi baru dan keefektifan obat yang tinggi untuk meningkatkan daya tahan bagi pasien kanker (Kun Li, dkk. 2008).

Mentimun laut *Stichopus horrens* merupakan invertebrata laut yang termasuk dalam filum Echinodermata kelas Holothuroidea. Hewan ini diketahui mengandung berbagai senyawa aktif yang memiliki efek antikanker sehingga berpotensi untuk mencegah kanker. Berdasarkan penelitian dari Sugawara dkk. (2006) telah diisolasi senyawa aktif *sphingosine* dari mentimun laut *S. variegates* yang dapat menginduksi apoptosis pada kanker kolon manusia. Selain itu, Althunibat dkk. (2009) melaporkan bahwa ekstrak dari mentimun laut *S. chloronotus* memiliki senyawa antiproliferatif hidrofilik pada *human non-small lung carcinoma* (A549) dan *cervical cancer cells* (C33A).

Ekstrak mentimun laut *S. horrens* dipandang lebih efektif daripada obat sintetis, hal ini karena tidak bersifat toksik dan efek samping terhadap tubuh relatif kecil. Pada penelitian Widodo dkk. (2009) ekstrak mentimun laut *S. horrens* ini diujikan pada sel normal (TIG-1) dan sel kanker payudara (MCF-7) yang menunjukkan hasil bahwa ekstrak mentimun laut *S. horrens* mampu membunuh sel MCF-7 dengan nilai LD₅₀ pada dosis sebesar 0,50 ug/ml dan tidak menyebabkan kematian pada sel normal. Penelitian lebih lanjut sangat diperlukan untuk mengetahui potensi mentimun laut *S. horrens* dalam mencegah semua jenis kanker, dalam hal ini adalah sel HeLa yang merupakan *cell line* turunan sel kanker serviks dengan karakteristik cepat tumbuh dan mengalami kegagalan apoptosis akibat adanya overekspresi enzim telomerase yang terus memperpanjang telomer dan inaktivasi p53 (Germino, 2010). Selain itu, dapat mengeksplorasi lebih jauh mekanisme apoptosis sel kanker yang menjadi target dari senyawa aktif yang terkandung dalam hewan ini. Hal ini sangat mendukung perkembangan farmakologis karena sangat erat kaitannya pengembangan obat kanker yang dapat mentarget spesifik pada sel kanker melalui proses apoptosis.

1.2 Perumusan Permasalahan

Berdasarkan latar belakang tersebut maka masalah yang akan dikaji pada penelitian ini adalah :

1. Apakah pemberian ekstrak mentimun laut *Stichopus horrens* mampu menginduksi apoptosis pada sel HeLa?
2. Apakah ekstrak mentimun laut *Stichopus horrens* menginduksi apoptosis pada sel HeLa melalui jalur p53?
3. Bagaimanakah prediksi mekanisme apoptosis pada sel HeLa yang diinduksi oleh ekstrak mentimun laut?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini antara lain :

1. Mengetahui pengaruh ekstrak mentimun laut *Stichopus horrens* dalam menginduksi apoptosis pada sel HeLa
2. Mengetahui mekanisme apoptosis pada sel HeLa yang diinduksi oleh mentimun laut *S. horrens* melalui jalur p53 atau tidak.
3. Memprediksi mekanisme apoptosis pada sel HeLa yang diinduksi oleh ekstrak mentimun laut dengan pendekatan bioinformatika.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah :

1. Menemukan bahan alam yang dapat digunakan sebagai sumber pengobatan baru yang berkhasiat untuk mengobati kanker.
2. Memanfaatkan sumber daya hayati laut secara optimal untuk kesejahteraan masyarakat.
3. Meningkatkan kesadaran masyarakat dalam melestarikan bahan alam seperti mentimun laut *Stichopus horrens* yang bermanfaat untuk kesehatan masyarakat terutama sebagai obat-obatan.
4. Memperluas kajian bioinformatika untuk mendukung penelitian eksperimental sehingga terdapat keterkaitan antara *in vitro* dan *in silico*.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Mentimun Laut *Stichopus horrens*

Mentimun laut *Stichopus horrens* merupakan invertebrata laut yang tersebar luas di lingkungan laut di seluruh dunia, mulai dari zona pasang surut sampai laut dalam terutama di Samudra Hindia dan Samudra Pasifik Barat. Penyebaran dan kepadatan hewan ini berubah-ubah menurut keadaan topografi suatu tempat, habitat maupun keadaan lingkungan seperti suhu (29-30°C), kadar oksigen (4-8 ppm), kadar garam atau salinitas air (29-31 ppt) dan pH air laut (6,5-8,5). Berikut merupakan klasifikasi dari mentimun laut *Stichopus horrens* menurut Pechenik (2000).

Kingdom : Animalia
Filum : Echinodermata
Subfilum : Echinozoa
Kelas : Holothuroidea
Ordo : Aspidochirotida
Family : Stichopodidae
Genus : *Stichopus*
Spesies : *S. horrens*

Hewan ini berukuran 80-120 mm dengan penampang melintang cenderung trapesium; sisi dorsal dipenuhi oleh papulla; sisi ventral dipenuhi oleh kaki tabung yang tersusun 3 baris membujur dari anterior sampai posterior; dan memiliki spikula berbentuk meja, roset, dan C/S (Gambar 2.1). Mentimun laut adalah hewan yang bergerak lambat, hidup pada dasar substrat pasir, lumpur pasiran maupun dalam lingkungan terumbu karang (Scheuer, 1994).



Gambar 2.1 Mentimun Laut *Stichopus horrens*. Hewan ini diperoleh dari Pantai Sendang Biru dan Balaikambang Malang.

Kandungan kimia mentimun laut basah terdiri dari 44%-45% protein, 3%-5% karbohidrat, dan 1,5% lemak. Mentimun laut

mengandung asam amino esensial, kolagen, dan vitamin E. Kandungan asam lemak penting mentimun laut seperti asam eikosapentaenoat (EPA) dan asam dekosahexaenoat (DHA) berperan dalam perkembangan syaraf otak, agen penyembuh luka, dan antitrombotik. Selain itu, mentimun laut juga mengandung bahan aktif antihipertensi, antibakteri, antifungi (antijamur), antikanker, antikoagulan (antipenggumpal), dan lain-lainnya. Metabolit sekunder yang terdapat dalam mentimun laut bermanfaat sebagai anti tumor, anti jamur dan anti virus (Farmasea, 2008).

2.2 Tinjauan Umum Tentang Kanker

Kanker adalah penyakit yang berhubungan dengan peningkatan jumlah sel, perubahan mekanisme regulasi sel, dan proliferasi sel. Penurunan laju kematian sel atau apoptosis merupakan karakteristik dari sel kanker. Penyebab kanker biasanya adalah karena adanya mutasi terhadap informasi genetik (DNA) sel. Mutasi ini bisa disebabkan oleh banyak hal antara lain bahan kimia (karsinogenesis), radiasi (sinar UV), dan virus (seperti HPV) yang berperan sebagai pemicu terjadinya kanker. Kanker seringkali diawali dengan pembentukan tumor, yaitu pertumbuhan sel abnormal dengan pembelahan sel yang cepat (Martinez, dkk. 2003).

Perbedaan kanker dengan sel normal dapat diketahui dari beberapa karakteristik sel kanker, antara lain (Exploratorium, 2010):

1. Adanya sinyal pertumbuhan yang tidak berhenti
Sel kanker terus-menerus mendapatkan sinyal pertumbuhan sehingga tidak ada tahapan dimana sel memasuki fase G₀ pada siklus sel. Hal ini disebabkan adanya mutasi beberapa gen (proto-onkogen) pada sel kanker.
2. Sinyal pertumbuhan sendiri
Sel kanker mampu memproduksi *growth factors* dan *growth factor receptors* sendiri. Proliferasi sel kanker tidak tergantung pada sinyal pertumbuhan normal. Mutasi yang dimilikinya memungkinkan sel kanker untuk memperpendek *growth factor pathways*.
3. Potensi replikasi tidak terbatas
Sel kanker memiliki mekanisme tertentu untuk menjaga telomer tetap panjang, hingga memungkinkan untuk tetap membelah diri. Kelainan regulasi pemendekan telomer inilah yang memungkinkan sel kanker memiliki *unlimited replicative potential*.
4. Menghindari apoptosis

Sel kanker tidak merespon sinyal apoptosis. Kegagalan sel kanker dalam merespon sinyal apoptosis disebabkan karena mutasi gen-gen regulator apoptosis dan gen-gen sinyal apoptosis.

5. Angiogenesis berlebihan

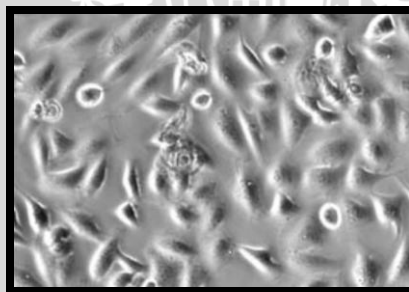
Sel kanker mampu menginduksi angiogenesis, yaitu pertumbuhan pembuluh darah baru di sekitar jaringan kanker. Pembentukan pembuluh darah baru ini memungkinkan sel kanker terus hidup dan meluas ke bagian lain dari tubuh (metastasis).

6. Invasi jaringan dan metastasis

Perpindahan sel kanker dari lokasi primer ke lokasi sekunder atau tertier merupakan faktor utama adanya kematian yang disebabkan karena kanker. Mutasi menyebabkan berkurangnya atau hilangnya adesi antar sel, degradasi, meningkatnya penempelan, dan migrasi.

2.3 Tinjauan Umum Tentang Sel HeLa

Sel HeLa adalah sel kanker serviks akibat infeksi *Human Papillomavirus* (HPV 18) yang mempunyai sifat berbeda dengan sel leher rahim normal, memiliki kapsul isohedral dengan 72 kapsomer, serta mengandung *DNA circular double stranded* dengan panjang kira-kira 8000 pasang basa. Terdapat 3 golongan tipe HPV dalam hubungannya dengan kanker serviks, yaitu : 1) HPV resiko rendah, yaitu HPV tipe 6 dan 11, 46 yang jarang ditemukan pada karsinoma invasif; 2) HPV resiko sedang, yaitu HPV 33, 35, 40, 43, 51, 56, dan 58; 3) HPV resiko tinggi, yaitu HPV tipe 16, 18, 31. Ketiga jenis HPV ini dapat menyebabkan pertumbuhan sel yang abnormal, namun hanya tipe 2 dan 3 yang menyebabkan kanker (Sjamsuddin, 2001).

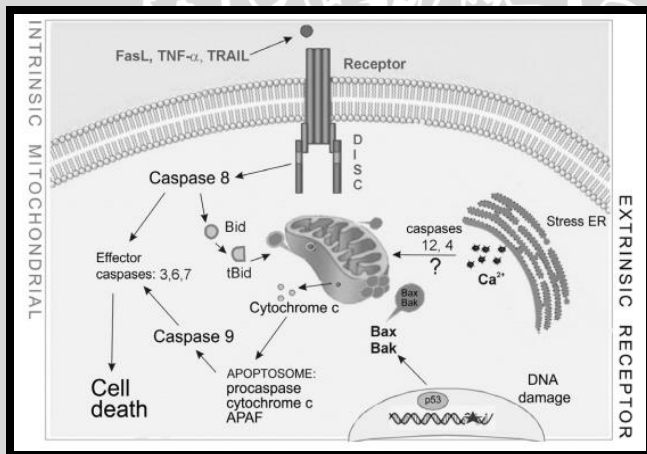


Gambar 2.2 Morfologi sel HeLa, memiliki karakteristik sangat lunak tetapi kuat, dapat bertahan dalam kondisi dimana sel lain mati (Exploratorium, 2010).

Sel HeLa diketahui mengeekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Protein E6 dan E7 terbukti dapat menyebabkan sifat immortal pada kultur primer keratinosit manusia, namun sel yang immortal ini tidak bersifat tumorigenik hingga suatu proses genetik terjadi. Jadi, viral onkogen tersebut tidak secara langsung menginduksi pembentukan tumor, tetapi menginduksi serangkaian proses yang pada akhirnya dapat menyebabkan sifat kanker (Goodwin & DiMaio, 2000).

2.4 Proses Kematian Sel (Apoptosis)

Apoptosis atau proses kematian sel yang terprogram, merupakan mekanisme utama dimana sel mati jika kerusakan DNA tidak diperbaiki. Apoptosis juga penting dalam mengontrol jumlah sel dan proliferasinya sebagai bagian dari perkembangan sel normal. Mekanisme terjadinya apoptosis adalah akibat diaktifkannya beberapa sinyal yang menyebabkan kematian, antara lain kurangnya hormon atau hormon pertumbuhan (Ghobrial, dkk. 2005).



Gambar 2.3 Apoptosis terjadi melalui dua jalur yaitu jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik. Kedua jalur bertemu pada akhir jalur yaitu aktivasi *caspase* yang merusak regulasi dan struktur sel hingga mencapai kematian (Cichorek, 2008)

Apoptosis terjadi melalui dua jalur utama. Pertama adalah jalur ekstrinsik atau jalur sitoplasmik yang dipicu oleh *Fas death receptor* yang merupakan anggota dari *Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor superfamily*. Kedua adalah jalur intrinsik atau jalur mitokondria yang

diregulasi oleh *Bcl-2 family*. *Bcl-2 family* memiliki anggota proapoptosis seperti Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, dan Hrk, dan anggota antiapoptosis seperti Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1, dan Mcl-1. Anggota antiapoptosis berperan dalam mengemblok pelepasan citokrom C, sedangkan anggota proapoptosis berperan sebagai promotor. Kedua jalur tersebut akhirnya akan mengaktifasi kaskade protease yang disebut *caspase* (Ghobrial, dkk. 2005).

Aktivasi jalur ekstrinsik ini diinisiasi dengan ligasi dari reseptor permukaan sel yang disebut *death receptors* (DRs). Ketika terjadi stimulasi apoptosis, membran yang terikat FasL berinteraksi dengan Fas *complexes* dan membentuk *death-inducing signaling complex* (DISC) yang mengandung adaptor protein *Fas-associated death domain* (FADD) dan *caspase* 8, 10 mengaktifasi *caspase* 8 (Ghobrial, dkk. 2005).

Aktivasi jalur intrinsik dimulai ketika terjadi signal kematian menyebabkan membran luar mitokondria menjadi permeabel, dan protein proapoptosis mengalami modifikasi posttransisional. Translokasi protein proapoptosis ke dalam mitokondria menyebabkan pelepasan citokrom C dan *second mitochondria-derived activator* (SMAC) dari *caspase*. Citokrom C yang dilepaskan dari sitosol akan berinteraksi dengan Apaf-1, menyebabkan aktivasi *caspase* 9 *proenzymes*. *Caspase* 9 kemudian mengaktifkan *caspase* 3. Aliran *caspase* menginduksi pembelahan protein kinase, protein sitoskeleton, protein DNA repair, *subunit inhibitor endonuclease* (*CIDE family*) dan akhirnya merusak fungsi sel. *Caspase* juga mempengaruhi struktur sel, regulasi siklus sel, dan jalur pensinyalan yang secara langsung menyebabkan pembentukan morfologi apoptosis seperti kondensasi dan fragmentasi DNA (Ghobrial, dkk. 2005).

2.5 Tumor Suppressor Gene p53

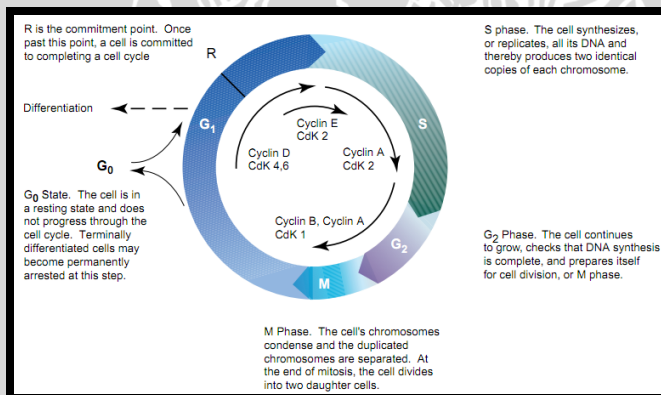
Gen p53 merupakan *tumor suppressor gene* yang aktivitasnya dapat menghentikan pembentukan tumor. Penelitian terbaru tentang kanker menunjukkan bahwa selalu ada keterkaitan dengan p53. p53 juga berperan dalam apoptosis yakni berfungsi sebagai aktivator transkripsi yang meregulasi ekspresi beberapa protein proapoptosis (Bax, Noxa, PUMA, dan Bid) maupun protein antiapoptosis. Aktivasi ini terjadi setelah adanya paparan radiasi maupun stress. p53 berfungsi apabila telah ditranslokasikan ke nukleus dengan mencegah replikasi dari DNA yang rusak pada sel normal dan menginduksi apoptosis dari sel yang

mengandung DNA yang tidak normal. Molekul p53 yang termutasi atau inaktif akan membiarkan sel yang mengandung DNA yang rusak untuk tetap bertahan atau melakukan replikasi yang seharusnya berhenti (Syarifudin, 2007).

Protein p53 yang dikode gen p53 juga berfungsi sebagai faktor transkripsi yang ditemukan pada tingkat yang sangat rendah pada sel yang tidak mengalami stress. Adanya stress menyebabkan modifikasi posttranslasi protein dan akumulasi yang mengaktifkan transkripsi sejumlah besar gen yang terlibat dalam berbagai aktivitas di dalam sel meliputi penghambatan siklus sel dan apoptosis (Kastan, dkk. 1995).

2.6 Siklus Sel

Siklus sel adalah suatu proses pertumbuhan sel yang teratur untuk berduplikasi (menggandakan diri) dan menurunkan informasi genetik dari satu generasi sel ke generasi sel yang berikutnya. Proses siklus sel meliputi pembelahan sel, proses dimana terjadi pertumbuhan sel, replikasi DNA dan pembelahan sel yang terbagi menjadi dua sel anak (Garrett, 2001).



Gambar 2.4 Urutan siklus sel, terdiri dari fase M, S, G₁, dan G₂. G₀ merupakan *resting state* jika replikasi DNA belum sempurna pada fase G₁ (Reynolds & Schecker, 1995).

Siklus sel diatur oleh kelompok protein yaitu *cyclin* dan *cyclin-dependent kinase* (Cdk). *Cyclin* merupakan protein aktif yang mengikat molekul Cdk dan mengontrol kemampuannya dalam memfosforilasi protein. Cdk merupakan protein yang menginduksi proses *downstream* dengan memfosforilasi serin dan threonin (Alberts, dkk. 1994). Siklus

sel dibagi menjadi 4 fase yakni gap (G₁), sintesis (S), G₂ dan mitosis (M). Fase S dan M adalah fase yang paling sensitif terhadap berbagai macam faktor (Syaifudin, 2007). Adapun proses masing-masing fase dalam siklus sel meliputi (Garrett, 2001):

1. Fase G₁ (Gap 1)

Fase Gap 1 memiliki ciri-ciri antara lain sel berbentuk diploid, terjadi sintesis RNA dan protein, ukuran sel meningkat (sel tumbuh). Pada akhir fase ini terbentuk molekul-molekul untuk pembuatan DNA. Terdapat *checkpoint* yang memeriksa ukuran sel dan kerusakan DNA.

2. Fase S (Sintesis)

Fase sintesis ini ditandai dengan terjadinya sintesis DNA baru atau replikasi DNA.

3. Fase G₂ (Gap 2)

Fase Gap 2 memiliki ciri-ciri antara lain sel berbentuk tetraploid, terjadi pembentukan protein sitoplasma, histon, dan protein lain yang berhubungan dengan DNA dan membran sel, terdapat *checkpoint* yang memeriksa apakah DNA sudah direplikasi.

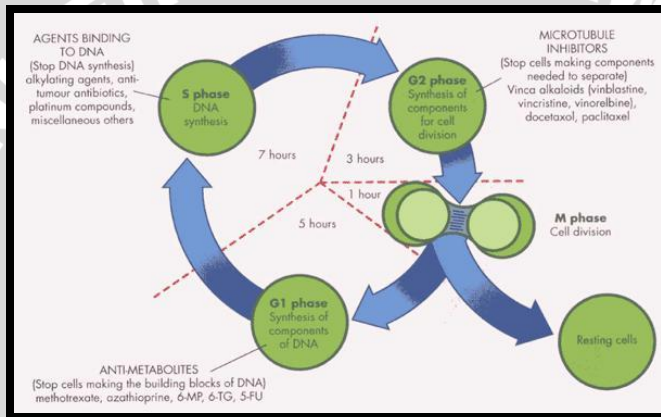
4. Fase M (Mitosis)

Fase mitosis terdiri dari 4 tahap yaitu profase, metafase, anafase dan telofase dengan ciri-ciri terjadi pembelahan sel, sintesis protein dan reduksi RNA, terdapat metafase *checkpoint* dengan benang spindel yang memastikan kesejajaran kromosom.

Sel kanker melakukan pembelahan terus-menerus sehingga muncul sel-sel baru yang berlebihan dan tidak teratur. Sel kanker tidak memiliki kontrol pertumbuhan dan daya lekat berkurang atau bahkan tidak ada. Ketidaknormalan sel kanker tersebut disebabkan oleh hilangnya mekanisme DNA *repair* dalam sel. Sel akan terus berproliferasi karena tidak ada kemampuan koreksi DNA sebelum sel membelah (*checkpoint*). *Checkpoint* merupakan titik pengontrolan yang kritis dimana siklus berhenti tetapi sinyal akan terus mengatur siklus sel, sehingga walaupun sel membawa abnormalitas di dalamnya, sel tetap akan melewati fase-fase dalam siklus sel secara keseluruhan kemudian membelah. Sifat sel kanker berbeda dari sel tubuh normal karena mitosis sel kanker lebih cepat, tidak normal dan tidak terkendali. Sel kanker kemungkinan menciptakan faktor pertumbuhan sendiri atau memiliki abnormalitas pada jalur pensinyalan sistem pengontrolan siklus sel. Hal ini menyebabkan proliferasi tidak terkendali hingga sel kanker berhasil membentuk klonal (Garrett, 2001).

2.7 Mekanisme Penghambatan Siklus Sel oleh Antikanker

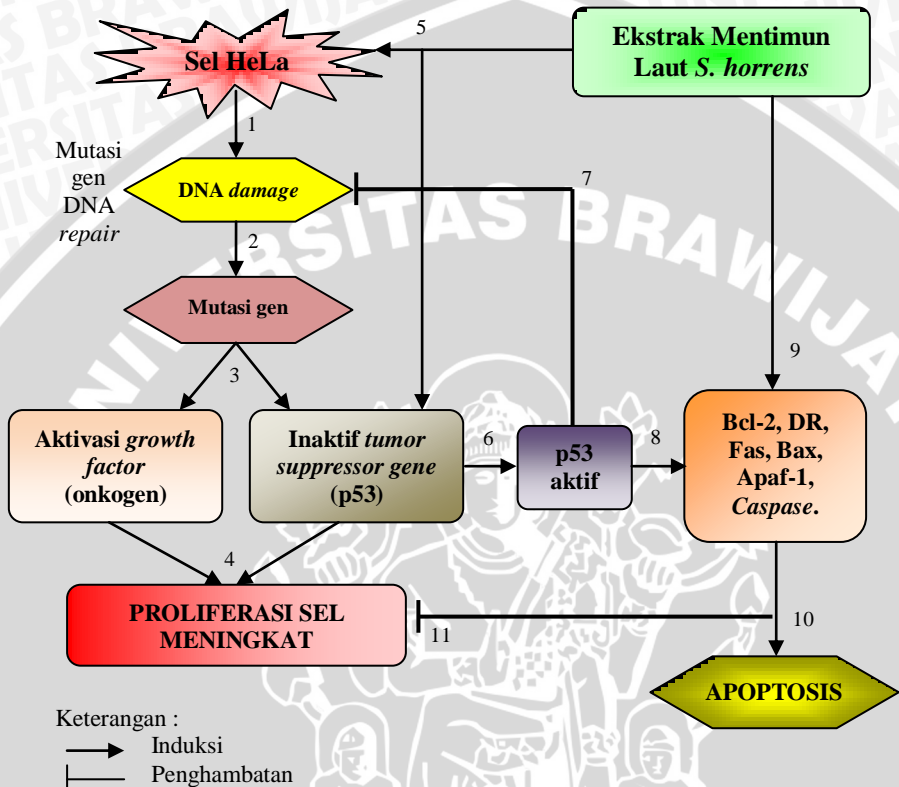
Beberapa obat telah dirancang sebagai antikanker yang memiliki mekanisme tertentu dalam menghambat pertumbuhan sel kanker sesuai target masing-masing. Proses antimetabolit dalam menghambat siklus sel adalah dengan mencegah sintesis DNA dan RNA melalui penghambatan pembentukan asam nukleat dan nukleotida. Antipurin dan antipirimidin menggantikan purin dan pirimidin dalam pembentukan nukleotida, sehingga mengganggu berbagai reaksi penting dalam sel kanker (Payne & Miles, 2010).



Gambar 2.5 Mekanisme penghambatan siklus sel oleh antikanker, membunuh atau menghambat terjadinya siklus sel pada fase tertentu saja (Pharma Tech, 2010)

Golongan *DNA binding agent* salah satunya alkilator secara umum membentuk ion karbonium (alkil) yang sangat reaktif berikatan kovalen silang pada guanin (bersifat nukleofilik) kuat sehingga teralkilasi dan terjadi pasangan basa yang abnormal yaitu basa guanin berpasangan dengan basa timin, dan terjadi *miscoding*. Hal ini menyebabkan ketidakstabilan dan pemecahan DNA yang akhirnya terjadi *cross link*, misalnya terjadi ikatan antara dua guanin sehingga menghambat pemisahan rantai komplemen DNA dan replikasi DNA yang dapat mengakibatkan sel kanker mati. Golongan *microtubule inhibitor* menghancurkan benang *spindle* yang terbentuk dari mikrotubul sehingga pembelahan sel terhenti pada metafase dan akhirnya terjadi kematian sel (Pharma Tech, 2010).

2.8 Kerangka Berpikir



Gambar 2.6 Inaktivasi p53 sebagai respon DNA damage dan faktor transkripsi pada kanker meningkatkan proliferasi sel dan menurunkan laju apoptosis. Pemberian ekstrak mentimun laut *Stichopus horrens* diharapkan mampu mengaktifkan p53 dan meningkatkan ekspresi gen regulator apoptosis sehingga mampu menginduksi apoptosis.

2.9 Hipotesis

Ekstrak mentimun laut *Stichopus horrens* mampu menginduksi apoptosis pada sel HeLa dengan meningkatkan ekspresi berbagai gen regulator apoptosis dan gen-gen sinyal apoptosis.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan mulai bulan November 2010 hingga bulan Mei 2011 di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu HeLa *cell line* (ATCC CCL2), ekstrak mentimun laut *Stichopus horrens*, alkohol 70 %, *Fetal Bovine Serum* FBS (Sigma), *complete medium* (*Minimum Essential Medium*/MEM), Streptomisin (10 ug/ml) (Sigma), Penisilin (100 IU/ml) (Sigma), DMSO (Sigma), akuades, Apo-BrdU-IHC™ *In Situ* DNA Fragmentation Assay Kit (Biovision), antibodi primer p53 (DO-7) *Mouse Monoclonal IgG_{2b}* (Santa Cruz Biotechnology), antibodi sekunder *universal biotin-linked*, Kit Star trex HRP *detection*, tripsin EDTA (Sigma).

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu pinset, spuit 3/5 cc (Terumo), tabung sentrifus (Falcon) (BD), sprayer, *disposable pipet* 2 ml, *blue/white tip* (Corning), kapas, *tissue*, bunsen, *Laminar Air Flow* (ESCO), inkubator CO₂ (ESCO level 2), inkubator kering (Heraeus), *tube* 1,5 ml (Eppendorf), mikropipet 1000 µL; 100 µL; 2,5 µL (Eppendorf), *24 plate well culture* (Costar), vorteks (Heidolph), neraca digital (Ohaus), sentrifus (MSE Mistral 1000), *autoclave* (TOMY), mikrofilter 0,2 µm (Corning), Mikroskop Inverted IX71 (Olympus), *Haemocytometer* (Superior), dan Mikroskop Binokuler (Olympus CX31).

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan faktor tunggal (pemberian ekstrak mentimun laut *S. horrens*) dengan 4 perlakuan dan masing-masing 3 ulangan yaitu:

1. Kontrol = kontrol negatif 0 ug/ml
2. Perlakuan 1 = dosis minimum 0,25 ug/ml
3. Perlakuan 2 = dosis medium 0,50 ug/ml
4. Perlakuan 3 = dosis maksimum 0,75 ug/ml

3.3.2 Ekstraksi Mentimun Laut *Stichopus horrens* dengan Metanol (Widodo, dkk., 2010)

Ekstrak mentimun laut *S. horrens* telah diperoleh dari penelitian Widodo, dkk. (2009). Adapun metode ekstraksinya adalah mentimun laut *S. horrens* segar yang telah diaklimatisasi selama 48 jam dalam akuarium berisi air laut, dipotong-potong dan diblender. Selanjutnya ditambahkan metanol 95% dan diaduk. Larutan disaring dengan kertas whatman. Larutan metanol diuapkan dengan pemanasan pada suhu 30-40°C dengan destilator. Sisa larutan kemudian diencerkan dengan akuades steril.

3.3.3 Kultur Sel HeLa

Sel HeLa beku (*frozen HeLa cell*) dikeluarkan dari *freezer* dan dithawing kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Proses selanjutnya dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Sel HeLa yang telah cair dipindah ke dalam tabung falcon yang telah berisi *complete medium* (MEM + 1% Penstrep + 10% FBS), lalu disentrifus pada kecepatan 1000 rpm, suhu ruang selama 10 menit. Supernatan (media) dibuang dan sel dicuci kembali dengan *complete medium* lalu disentrifus pada kecepatan 1000 rpm, suhu ruang selama 10 menit (dilakukan sebanyak 3 kali). Setelah itu, sel HeLa dikultur dalam *complete medium* pada botol flask. Kultur sel HeLa ini diinkubasi pada suhu 37°C dengan CO₂ 5% sampai sel konfluen.

3.3.4 Subkultur Sel HeLa

Kultur sel HeLa dalam botol flask yang telah konfluen tersebut dibuang mediumnya. Selanjutnya sel HeLa diberi tripsin EDTA sebanyak 2 cc dan diinkubasi 5 menit, suhu 37°C. Bagian bawah flask diketuk-ketuk dan sel HeLa dikoleksi menggunakan *disposable pipet* dan dimasukkan dalam falcon 15 ml. Dilakukan *stop reaction*/dicuci dengan *complete medium* sebanyak 3x. Sel diambil 100 µl dan dihitung dengan *haemocytometer*. Kemudian sel dimasukkan ke *well plate* masing-masing *well* 10⁵ cell/500 µl medium dalam *well*. Kemudian diinkubasi di inkubator CO₂ 5% suhu 37°C sampai sel konfluen.

3.3.5 Pemberian Ekstrak Mentimun Laut *S. horrens*

Setelah sel konfluen, media diganti dengan yang baru kemudian ditambahkan ekstrak mentimun laut *S. horrens* pada berbagai dosis

(0,25; 0,50; dan 0,75 ug/ml) yang telah diencerkan dengan *co-solvent* DMSO (Sigma). Masing-masing sumuran terdiri dari 400 µl media yang mengandung ekstrak mentimun laut *S. horrens* dengan dosis rendah sampai tinggi (sebanyak 3 µl, 6 µl dan 9 µl). Diinkubasi pada 37°C dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam.

3.3.6 Pemanenan Sel

Sel HeLa yang telah diberi ekstrak mentimun laut *S. horrens* dan diinkubasi selama 24 jam, lalu dibuang media dan ekstraknya kemudian dicuci (fiksasi) dengan metanol selama 5 menit. Metanol dibuang kemudian sel disimpan pada suhu 4°C untuk selanjutnya dilakukan pewarnaan imunositokimia.

3.3.7 Imunositokimia

1. Imunositokimia Apoptosis dengan TUNEL

Sel yang telah dipanen direndam dalam PBS selama 5 menit, kemudian direndam dalam 100 ul Proteinase K : PBS (1:100) selama 20 menit. Ditutup keseluruhan sel dengan 100 ul H₂O₂ yang telah didilusikan dengan metanol. Diinkubasikan selama 5 menit dalam suhu ruang. Sel direndam dengan PBS. Ditutup keseluruhan sel dengan 50 ul *Reaction Buffer* yang telah didilusikan dengan H₂O₂. Diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Sel direndam dengan 50 ul *DNA labelling solution*. Sel ditempatkan pada *chamber*. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 1-1,5 jam. Sel direndam dengan PBS. Ditutup keseluruhan sel dengan 100 ul *Blocking Buffer* selama 10 menit. Selanjutnya sel diinkubasi dengan *Antibody solution* (anti-BrdU) selama 1-1,5 jam pada suhu ruang dan sesudah itu dicuci dengan PBS. Ditambahkan *blocking buffer* kembali dan dibuang. Sel direndam dengan 50 ul *diluted conjugate* selama 30 menit. Sel direndam dengan PBS dan akuades. Sementara dipersiapkan DAB (3,3'-diaminobenzidine) *solution* dengan mencampurkan larutan DAB sebanyak 1 ml dan setetes *chromogen* lalu diaplikasikan pada sel sebanyak 100 ul. Selanjutnya sel dicuci dengan PBS, akuades dan PBS.

2. Imunositokimia p53

Sel direndam dengan antibodi primer p53 *mouse monoclonal IgG_{2b}* selama *overnight*. Selanjutnya dicuci dengan PBS dan diaplikasikan antibodi sekunder *universal biotin-linked* sebanyak 100 ul selama 1 jam pada suhu ruang. Sel dicuci dengan PBS dan diaplikasikan *SHRP Biotin labelled solution* selama 40 menit. Sel dicuci dengan PBS

dan akuades. Kemudian sel direndam dengan AEC dan *Buffer* AEC yang telah diencerkan dengan akuades sebanyak 10x konsentrasi dan dibiarkan 5-30 menit hingga sel terwarnai.

3. Counterstaining

Tahap ini dilakukan untuk mewarnai sel yang tidak terwarnai oleh DAB maupun AEC. Sel dicuci dengan PBS dan direndam dalam DI water. Sel dicuci dengan PBS dan direndam dalam DI water. Sel dicuci dengan DI water dan dilakukan *counterstaining* dengan diinkubasi *methyl green* selama 5 menit dan dicuci kembali dengan DI water.

3.3.8 Penghitungan Sel

Sel yang telah diwarnai secara imunositokimia diamati menggunakan mikroskop inverted pada semua sumuran. Sel yang terwarnai coklat menunjukkan apoptosis, sedangkan sel yang terwarnai merah menunjukkan ekspresi p53. Penghitungan dilakukan per 200 sel pada semua ulangan dan dihitung rata-rata sel yang hidup, apoptosis dan ekspresi p53.

3.3.9 Analisis Data

Persentase sel dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ sel} = \frac{\text{rata - rata jumlah sel 3 ulangan}}{200 \text{ sel}} \times 100\%$$

Analisis data yang diperoleh dilakukan secara statistik dengan analisis ragam ANOVA. Hasil yang berbeda nyata antar perlakuan dilanjutkan dengan Uji Tukey ($\alpha = 0,05$) melalui program SPSS *for Windows* ver 16. Korelasi antara apoptosis dengan ekspresi p53 diuji dengan *Pearson correlation*. Selanjutnya dibuat grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak mentimun laut terhadap persentase sel hidup, apoptosis dan ekspresi p53. Data hasil analisis diinterpretasikan secara statistik deskriptif.

3.3.10 Prediksi Gen dan Protein Target yang Berperan dalam Apoptosis yang Diinduksi oleh Ekstrak Mentimun Laut

Mekanisme apoptosis yang diinduksi oleh ekstrak mentimun laut diduga melibatkan beberapa gen dan protein target. Prediksi gen

dan protein target dilakukan dengan inventarisasi senyawa aktif dari berbagai spesies mentimun laut yang memiliki efek antikanker. Senyawa aktif yang belum diketahui gen dan protein targetnya dilakukan studi homologi struktur untuk mencari kesamaan dengan struktur senyawa aktif lain yang memiliki efek antikanker dan diekstraksi pula dengan metanol. Studi homologi struktur dilakukan menggunakan *KegDraw-0_1_11Beta*. Studi homologi struktur dengan *KegDraw-0_1_11Beta*. Struktur senyawa aktif yang diperoleh dari literatur pendukung digambar ulang dan ditelusuri similaritasnya dengan senyawa aktif lain (Gambar D.1 dan Gambar D.2).

3.3.11 Prediksi Mekanisme Apoptosis pada Sel HeLa yang Diinduksi oleh Ekstrak Mentimun Laut

Gen dan protein target yang telah ditemukan berdasarkan studi literatur dan studi homologi struktur diprediksi kemungkinannya berperan dalam mekanisme apoptosis menggunakan *Panther server* dengan cara memasukkan kode gen dan protein target. Selanjutnya *server* akan mengkalkulasi dengan sendirinya dan akan memunculkan berbagai mekanisme terkait dengan gen dan protein yang dimasukkan. Dari hasil tersebut dilihat seberapa besar persentase mekanisme apoptosis yang melibatkan gen dan protein tersebut (Gambar 4.6).

3.3.12 Prediksi Jalur Mekanisme Apoptosis pada Sel HeLa yang Diinduksi oleh Ekstrak Mentimun Laut

Gen dan protein yang terbukti berperan dalam mekanisme apoptosis selanjutnya diprediksi jalurnya dalam menginduksi apoptosis menggunakan *software Osprey 1.0.1*. Kode gen dan protein yang terlibat dimasukkan kodenya dalam *software* ini dan dimunculkan interaksi antar gen dan protein tersebut. Selanjutnya pengaturan posisi dapat dilakukan dengan memanfaatkan fitur-fitur yang telah tersedia. Prediksi jalur mekanisme apoptosis yang telah diperoleh dianalisis dengan cara melihat informasi dari gen dan protein yang terdapat pada *software* tersebut (Gambar E.1).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kultur Sel HeLa

Sel HeLa (ATCC CCL2) merupakan *cell line* yang diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (serviks) manusia. Terdapat beberapa alasan pemilihan kultur sel HeLa pada penelitian ini. Sel HeLa bersifat immortal dan sangat agresif sehingga mampu memproduksi lebih banyak sel (Ensahsy, dkk. 2009). Adanya sifat immortal pada sel HeLa ini dikarenakan hilangnya jalur apoptosis akibat overekspresi enzim telomerase yang memperpanjang telomer (Germino, 2010). Selain itu, kultur sel HeLa memiliki gen p53 inaktif yang dapat diinduksi dengan senyawa yang diujikan sehingga terjadi apoptosis sel (Desaintes dkk. 1999 dalam Anggrianti, 2008).

Media yang digunakan pada kultur sel HeLa adalah *Minimum Essential Medium* (MEM) dengan tambahan serum *Fetal Bovine Serum* (FBS) dan antibiotik *Penisilin-Streptomisin* (Penstrep). Media MEM mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin, garam-garam anorganik dan glukosa, sedangkan serum mengandung hormon yang memicu pertumbuhan sel, albumin sebagai protein transport, lipid untuk pertumbuhan sel dan mineral sebagai kofaktor enzim. Seluruh komponen dalam media MEM tersebut untuk memberikan nutrisi yang cukup pada sel untuk tetap bertahan hidup dan memperbanyak diri (Masters, 2000). FBS berfungsi sebagai suplemen yang membantu pertumbuhan sel. Penstrep merupakan antibiotik yang berfungsi mencegah kontaminasi pada kultur dengan konsentrasi maksimal 100 µg/ml media dan stabil pada suhu 37°C (Djati, 2006).

Sel HeLa beku ditumbuhkan dalam *flask* hingga *confluent* untuk mendapatkan kepadatan sel tertentu. Pelepasan sel HeLa dari dasar *flask* dilakukan dengan tripsinasi yang bertujuan untuk memisahkan sel satu dengan sel yang lainnya (disosiasi). Pada penelitian ini digunakan Tripsin EDTA yaitu enzim proteolitik yang mampu menghancurkan jaringan protein yang membentuk matriks ekstraseluler pada dasar flask. Enzim ini memasuki seluruh permukaan dari sel-sel lapisan tunggal sehingga terlepas dari dasar flask dan terpisah satu sama lain (Djati, 2006).



Gambar 4.1 Kultur sel HeLa konfluen dalam flask. Sel menempel pada dasar flask yang dicirikan dengan populasi sel yang memenuhi tempat sel tumbuh dan saling bersentuhan antar sel menandakan adanya hubungan komunikasi sel.

Sel HeLa disubkultur dalam *well-plate* hingga konfluen. Sel yang menempel pada dasar *well* dicirikan dengan populasi sel yang memenuhi tempat sel tumbuh dan saling bersentuhan antar sel menandakan adanya hubungan komunikasi sel. Dalam keadaan ini, sel siap diperlakukan dengan ekstrak mentimun laut *S. horrens* untuk diuji secara sitotoksik sehingga terjadi apoptosis.

4.2 Ekstrak Mentimun Laut *Stichopus horrens*

Mentimun laut *S. horrens* diketahui mengandung metabolit sekunder tertentu yang memiliki efek antikanker. Ekstrak mentimun laut *S. horrens* diperoleh dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut metanol karena memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan pelarut air. Hal tersebut didukung oleh penelitian Widodo, dkk. (2009) yang melaporkan bahwa uji sitotoksitas ekstrak mentimun laut *S. horrens* fase metanol terhadap sel kanker menunjukkan hasil yang lebih baik bila dibandingkan dengan fase air. Pelarut metanol dipilih karena dapat melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung dalam mentimun laut. Metanol mudah diuapkan dari ekstrak, dan cenderung lebih murah dibandingkan dengan pelarut organik lainnya. Sedangkan air dipilih sebagai pelarut karena banyak digunakan dalam kehidupan sehari-hari (Pasaribu, 2009).

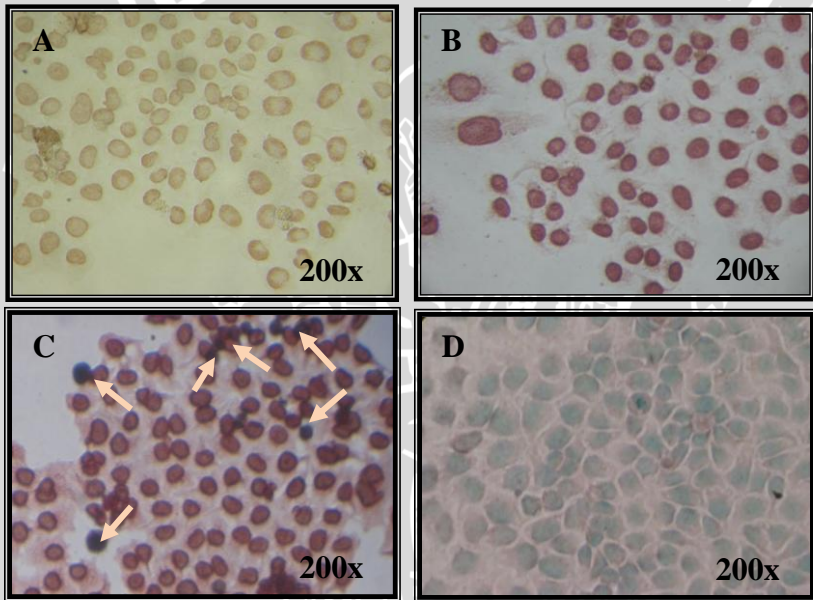
Selain kelebihan diatas, metanol diketahui lebih selektif, menghambat pertumbuhan kapang, tidak beracun, netral, merupakan pelarut polar sehingga memiliki daya absorpsi yang baik, dan dapat bercampur dengan air. Metanol mampu memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut dan mampu mengendapkan albumin serta menghambat kerja enzim (Masters, 2000). Senyawa yang biasanya larut melalui ekstraksi dengan metanol adalah golongan terpenoid, flavonoid, tanin, antosianin, dan alkaloid. Sedangkan pada ekstrak air seringkali tidak didapatkan senyawa terpenoid, hal ini menjadi pertimbangan pemilihan metode ekstraksi karena mentimun laut mengandung sejumlah besar senyawa terpenoid dalam metabolit sekundernya (Pasaribu, 2009).

Prinsip penggunaan ekstrak mentimun laut ini dapat menghambat faktor-faktor yang dapat memperluas penyebaran kanker, memperkuat sel normal di sekitar sel kanker sehingga mampu membentuk pertahanan sel yang dapat menahan penyebaran kanker, dan bersifat suportif, seperti menimbulkan nafsu makan, menghilangkan rasa sakit, menghilangkan rasa lemas, dan meningkatkan daya tahan tubuh (Widowati, 2011). Adapun ekstrak mentimun laut yang digunakan merupakan *crude extract* yang kompleks, sehingga bersifat sistemik dalam melawan sel kanker. Berbagai senyawa aktif yang terkandung di dalamnya kemungkinan mampu menghambat penyebaran sel kanker melalui penghambatan faktor-faktor kanker serta meningkatkan ekspresi gen dan protein untuk apoptosis.

Ekstrak mentimun laut *S. horrens* yang akan dipaparkan pada sel HeLa sebelumnya dilarutkan terlebih dahulu dengan *dimethyl sulfoxide* (DMSO). Muir (1996) menyatakan bahwa DMSO dapat membawa obat seperti morfin sulfat, penisilin, steroid, dan kortison melintasi membran akan tetapi bergantung pada berat molekul, bentuk, dan elektrokimia molekul. Hal ini memungkinkan DMSO berperan sebagai sistem penyampaian obat baru yang dengan resiko infeksi yang rendah. Konsentrasi maksimum DMSO yang digunakan dalam uji *in vitro* biasanya berkisar antara 0,5-1% (NCGC, 2009) sehingga penggunaan DMSO dalam pengenceran ekstrak metanol mentimun laut *S. horrens* dalam penelitian ini tidak bersifat toksik pada sel HeLa.

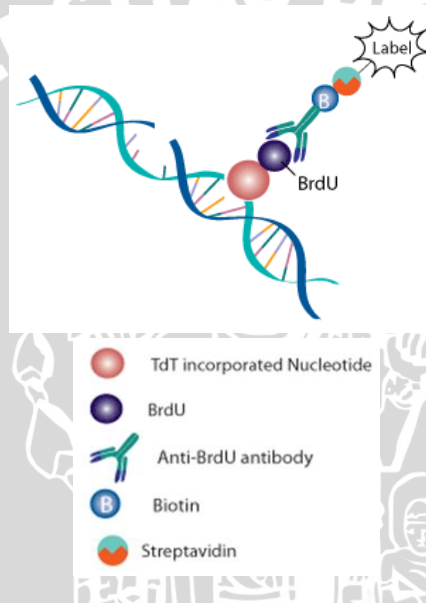
4.2 Pewarnaan Sel HeLa secara Imunositokimia

Prinsip dari teknik imunositokimia adalah adanya ikatan antigen-antibodi yang digunakan untuk mendeteksi suatu molekul dalam sel (Timmis, 2005). Deteksi terjadinya apoptosis dilakukan dengan metode imunositokimia menggunakan TUNEL dan diwarnai dengan kromogen DAB (*3,3'-diaminobenzidine*). Pewarnaan pembanding (*counterstain*) menggunakan *methyl green*. Ekspresi p53 dideteksi menggunakan *Antibodi Primer p53 (DO-7) Mouse Monoclonal IgG₂* dan *Antibodi sekunder universal biotin linked* dan kromogen AEC (*3-amino-9-ethylcarbazole*).



Gambar 4.2 Hasil imunositokimia sel HeLa. Sel berwarna coklat terwarnai DAB merupakan sel yang mengalami apoptosis (A), sel berwarna merah terwarnai AEC merupakan sel yang mengekspresikan p53 (B), sel berwarna pekat terwarnai DAB dan AEC, ditunjukkan dengan anak panah merupakan sel yang mengalami apoptosis dan mengekspresikan p53 (C), dan sel berwarna hijau tidak terwarnai DAB dan AEC, tetapi terwarnai *methyl green* dicirikan sebagai sel hidup (D).

Gambar 4.2 (A) menunjukkan sel apoptosis dengan warna coklat karena adanya DAB *chromogen*. TUNEL dapat membedakan antara sel yang mati dan hidup, namun tidak dapat membedakan antara sel yang mati karena apoptosis atau nekrosis. Penentuan apoptosis mengacu pada prinsip TUNEL yaitu adanya reaksi molekular yang ditandai dengan adanya ligasi antar fragmentasi DNA dan reaksi imunositokimia yang ditandai adanya reaksi antara antigen dan antibodi (Hartono, 2009).



Gambar 4.3 Proses imunositokimia pada sel apoptosis dengan TUNEL. DNA terfragmentasi disambung oleh enzim TdT dan molekul BrdU dideteksi oleh anti-BrdU yang terlabel biotin (R&D, 2011).

Gambar 4.3 diatas menunjukkan adanya DNA yang terfragmentasi karena sel mengalami apoptosis. Ligasi DNA yang terfragmentasi dilakukan oleh enzim TdT untuk membantu penempelan BrdU. BrdU ini akan dideteksi oleh antibodi anti-BrdU yang terlabel biotin. Molekul biotin akan dideteksi oleh ikatan *streptavidin-horseradish peroxidase*. Reagen *streptavidin* akan bereaksi dengan molekul biotin, sedangkan *peroxidase* berperan sebagai indikator enzim

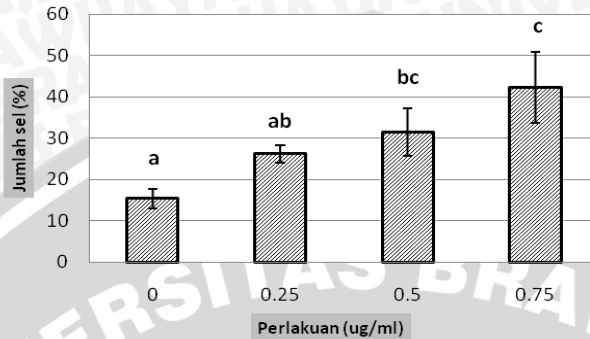
(R&D, 2011). Penambahan substrat H_2O_2 dan DAB menghasilkan formasi presipitasi coklat pada sisi antigen sel, peroksidase akan mengurangi hidrogen peroksida ke air. Reaksi ini dipengaruhi oleh buffer substrat. Selain itu diperlukan sumber elektron yang disediakan oleh DAB substrat. Ketika DAB melepaskan elektron, substrat DAB menjadi tidak larut dan terpresipitasi pada sisi aktif enzim. Presipitasi DAB adalah warna coklat yang dapat diamati dengan mikroskop cahaya (Beckman Coulter, 2008). HRP secara enzimatik memecah substrat H_2O_2 menjadi O^- dan H_2O . Jika kromogen DAB terdapat dalam larutan, maka akan menerima radikal O^- . Hal ini menyebabkan kromogen DAB yang larut dalam air mengalami oksidasi, menghasilkan pigmen yang secara langsung akan terpresipitasi di dekat sisi reaksi (Hartono, 2009).

Gambar 4.2 (B) menunjukkan sel yang mengekspresikan p53. Teknik imunositokimia menggunakan prinsip mengkonjugasikan antibodi primer p53 *Mouse Monoclonal IgG₂* dan antibodi sekunder *universal biotin-linked* dengan peroksidase. Antibodi primer akan berikatan dengan antigen sel yang dideteksi, selanjutnya antibodi sekunder yang terlabel biotin akan dideteksi oleh *streptavidin* dan *peroksidase* sebagai indikator enzim mengkatalisis kromogen AEC yang dapat menghasilkan endapan berwarna pada suatu reaksi sehingga warna dapat tervisualisasi (Dako, 2007).

Gambar 4.2 (D) menunjukkan pewarnaan perbandingan dengan *methyl green* untuk sel yang tidak mengalami apoptosis dimana dicirikan sebagai sel hidup. *Methyl green* membentuk kompleks dengan DNA untuk membentuk warna hijau pada sel (Umemura, *et al*, 2003). Pada prinsipnya, DNA memiliki muatan negatif, sedangkan *methyl green* merupakan kation yang bermuatan positif sehingga dapat mengikat DNA secara spesifik pada inti sel (Heidcamp, 2010).

4.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Mentimun Laut *Stichopus horrens* terhadap Sel HeLa

Hasil penelitian ini menunjukkan kemampuan ekstrak mentimun laut *S. horrens* sebagai antikanker yang ditunjukkan dengan sifat sitotoksik, mampu menghambat proliferasi sel dan memicu apoptosis. Adapun perbandingan jumlah sel yang mengalami apoptosis antar perlakuan ditunjukkan pada gambar 4.4.



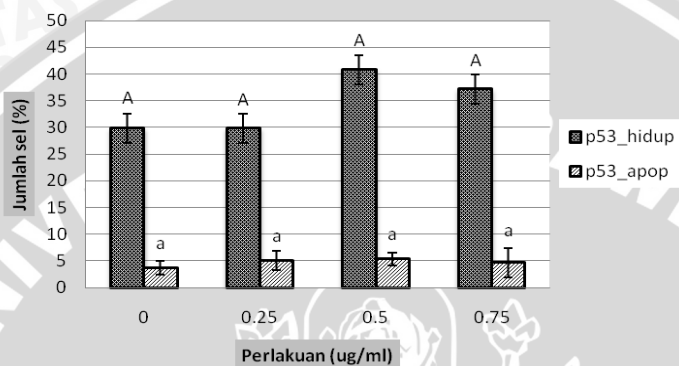
Gambar 4.4 Rata-rata jumlah sel apoptosis pada setiap perlakuan. Sel apoptosis mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya dosis ekstrak mentimun laut *S. horrens*.

Jumlah sel apoptosis paling tinggi diperoleh pada dosis 0,75 ug/ml yaitu sebesar 42,3%. Adanya sel apoptosis pada perlakuan 0 ug/ml disebabkan berkurangnya faktor-faktor yang dapat mempertahankan sel HeLa untuk tetap hidup, sehingga sel dapat mengalami kematian meskipun tidak diinkubasi dengan ekstrak mentimun laut. Berdasarkan uji Anova didapatkan signifikansi ($p < 0,05$) yang mengindikasikan bahwa terdapat paling tidak 1 perlakuan yang berbeda nyata. Pada dosis 0,75 ug/ml memiliki pengaruh yang signifikan ($p < 0,05$) bila dibandingkan dengan dosis 0 ug/ml dan 0,25 ug/ml. Sedangkan dosis 0,5 ug/ml memiliki pengaruh yang signifikan ($p < 0,05$) bila dibandingkan dengan dosis 0 ug/ml.

4.4 Pengaruh Pemberian Ekstrak Mentimun Laut *Stichopus horrens* Ekspresi Protein p53

p53 adalah *tumor suppressor gene* yang penting bagi organisme multiseluler untuk menekan pertumbuhan kanker. p53 berperan dalam menjaga stabilitas sel dengan mencegah terjadinya mutasi genom (Yang, dkk. 2006). Protein p53 merupakan produk gen TP53 *tumor suppressor* yang diekspresikan pada fase G1 untuk memperbaiki kerusakan DNA yang terjadi dan menghentikan siklus sel pada fase S atau untuk menginduksi apoptosis jika kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki (Oliveira, dkk. 2008).

Pengamatan ekspresi p53 pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui seberapa banyak p53 berperan dalam menginduksi apoptosis pada sel HeLa. Adapun jumlah sel yang mengekspresikan p53 ditunjukkan pada gambar 4.5.



Gambar 4.5 Perbandingan jumlah ekspresi p53 pada sel hidup dan sel apoptosis. Jumlah ekspresi p53 rata-rata hampir sama antar perlakuan, sehingga tidak terdapat beda nyata.

Pada penelitian ini diperoleh jumlah sel yang mengekspresikan p53 paling tinggi ditunjukkan oleh perlakuan 0,50 ug/ml dengan persentase sebesar 5,35% pada sel apoptosis dan 40,85% pada sel hidup (Gambar 4.5). Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi p53 pada sel yang mengalami apoptosis tidak meningkat, tetapi justru meningkat pada sel hidup.

Uji korelasi antara ekspresi p53 dengan sel apoptosis dan sel hidup menggunakan uji korelasi *Pearson* memiliki nilai signifikansi ($p > 0,05$), maka hal ini menunjukkan tidak terdapat korelasi ekspresi p53 dengan sel apoptosis dan sel hidup (Andi Offset, 2007). Hal ini menunjukkan tidak adanya keterkaitan antara ekspresi p53 dengan terjadinya apoptosis pada sel HeLa. Artinya p53 tidak berperan dalam proses apoptosis yang diinduksi oleh ekstrak mentimun laut *S. horrens*. Protein p53 kemungkinan dapat berperan dalam apoptosis secara individual sel, akan tetapi secara populasi ekspresinya rendah, sehingga diduga mekanisme pengaruh pemberian ekstrak mentimun laut dalam menginduksi apoptosis pada sel HeLa tidak melalui protein p53 melainkan melalui jalur lain (*p53-independent apoptosis*).

4.5 Prediksi Gen dan Protein Target dalam Mekanisme Apoptosis yang Diinduksi Ekstrak Mentimun Laut

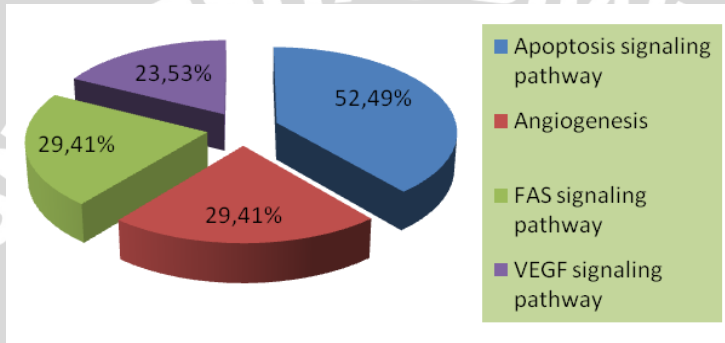
Mentimun laut merupakan spesies invertebrata yang memiliki senyawa aktif yang berpotensi sebagai antikanker. Senyawa aktif tersebut diduga menginduksi apoptosis pada sel kanker dengan mentarget gen dan protein yang berperan dalam apoptosis. Berdasarkan studi literatur dan studi homologi diperoleh beberapa senyawa aktif dari mentimun laut yang memiliki sifat antikanker dan diduga mentarget spesifik gen dan protein yang berperan dalam apoptosis pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Senyawa aktif mentimun laut yang memiliki sifat antikanker

Spesies	Senyawa aktif	Gen/Protein target	Referensi
<i>Stichopus horrens</i>	-	<i>Caspase 9</i>	Widodo dkk, 2009
<i>Stichopus variegates</i>	Sphingosine	Bcl-2	Sugawara, dkk. 2006
<i>Holothuria nobilis</i>	Echinoside A	Top II inhibitor	Li, dkk. 2010
<i>Holothuria scabra</i>	Scabraside A	DR5, PARP, Bax dan Bid	Hua, dkk. 2009; Liang, dkk. 2010
<i>Holothuria scabra</i>	Holothurin A ₄	<i>Caspase 8, 9</i>	Dang, dkk. 2007; Yu & Kim, 2010
<i>Holothuria scabra</i>	Holothurin A ₃	<i>Caspase 3</i>	Dang, dkk. 2007; Chen, dkk. 2006
<i>Mensamaria intercedens</i>	Intercedenol A & B	CD95 (Fas)	Zou, dkk. 2004
<i>Holothuria fuscocinerea</i>	Fuscocineroside C	ERK1 inhibitor	Zhang, dkk. 2006; Chen, dkk. 2005

4.6 Prediksi Mekanisme Apoptosis pada Sel HeLa yang Diinduksi Ekstrak Mentimun Laut

Berdasarkan tabel 4.1 menunjukkan bahwa mentimun laut memiliki berbagai senyawa aktif dari ekstrak metanol yang memiliki beberapa target gen dan protein untuk mendukung terjadinya apoptosis pada sel kanker. Untuk menganalisis fungsi dari masing-masing gen dan protein dalam menginduksi apoptosis pada sel kanker, digunakan *Panther server* untuk memprediksi jalur yang dibentuk (Gambar 4.6).

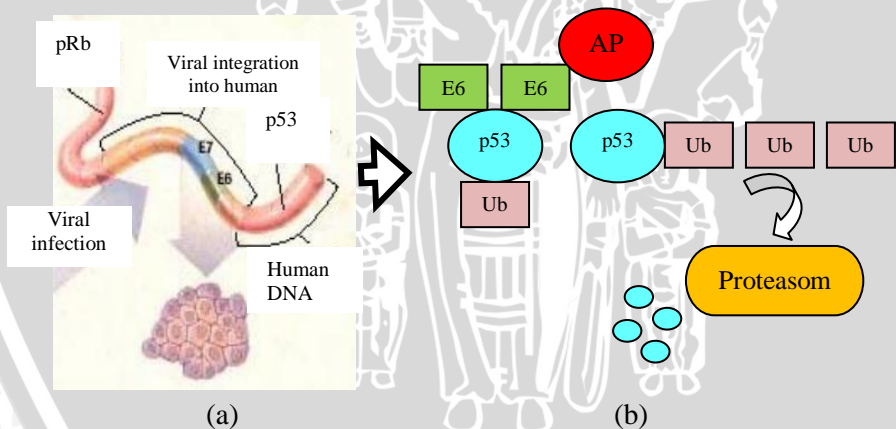


Gambar 4.6 Prediksi mekanisme apoptosis terkait gen dan protein yang menjadi target ekstrak mentimun laut. Gen dan protein yang ditarget ekstrak mentimun laut berperan dalam *apoptosis signaling pathway*.

Berdasarkan prediksi menggunakan *Panther server* diatas dapat diketahui beberapa mekanisme yang melibatkan gen dan protein tersebut diantaranya *apoptosis signaling pathway*, *angiogenesis*, *FAS signaling pathway*, dan *VEGF signaling pathway*. Mekanisme apoptosis memiliki peran paling besar yaitu 52,94%. Hal ini membuktikan bahwa gen dan protein tersebut berperan dalam mekanisme apoptosis. Mekanisme apoptosis yang diperoleh dari *Panther* di atas dapat ditunjukkan dengan penelusuran *pathway* yang melibatkan keseluruhan gen dan protein yang diperoleh dari studi homologi mentimun laut, sehingga diketahui jalur apoptosis lebih dalam untuk menuju pada *whole apoptosis* menggunakan program *Osprey 1.0.1*.

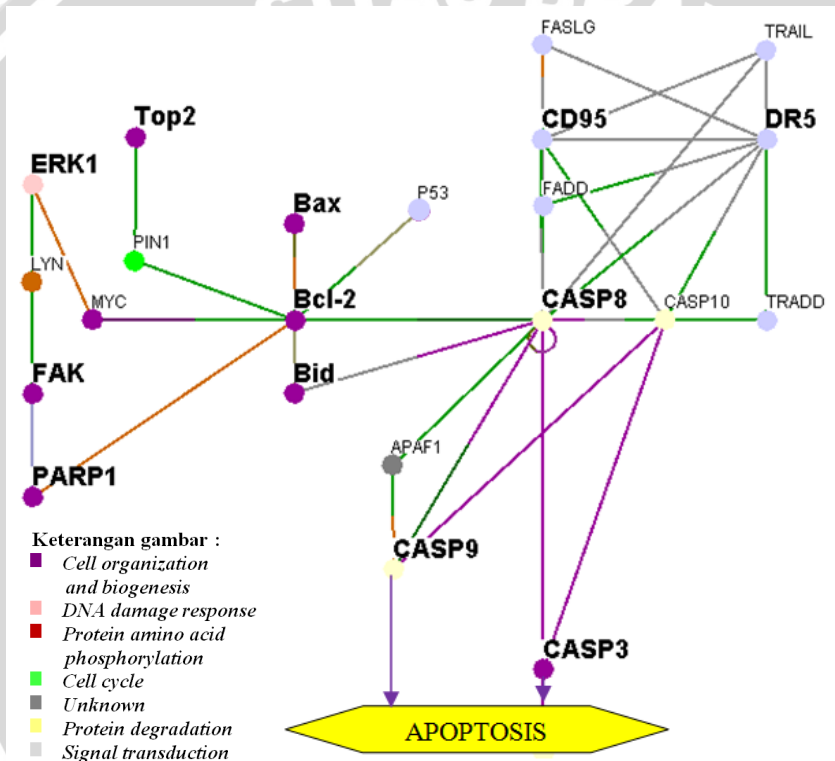
4.7 Prediksi Jalur Mekanisme *p53-Independent* Apoptosis pada Sel HeLa yang Diinduksi Ekstrak Mentimun Laut

Prediksi apoptosis *pathway* ini didasarkan pada hasil uji *in-vitro* yang telah dilakukan dengan hasil bahwa ekstrak mentimun laut *S. horrens* mampu menginduksi apoptosis melalui jalur *p53-independent* karena diketahui bahwa gen *p53* tidak berperan banyak dalam menginduksi apoptosis. Dalam hal ini, *p53* berada dalam keadaan inaktif dimana pada sel HeLa terdapat onkogen E6 yang berintegrasi ke dalam struktur gen *p53* sehingga kompleks tersebut dikenali oleh molekul ubiquitin dan akhirnya didegradasi oleh proteasom (Gambar 4.7). Adanya ekspresi *p53* pada sel kanker yang hidup diduga adanya aktivasi setelah pemberian ekstrak, tetapi ekspresinya masih dalam tahap proapoptosis (Feki, 2004). Ekstrak mentimun laut *S. horrens* terbukti tidak mengaktifkan *p53* sebagai faktor transkripsi, akan tetapi hal tersebut tidak mengurangi laju apoptosis (Desaintes, dkk. 1999) karena ekstrak dapat secara langsung mempengaruhi ekspresi protein regulator apoptosis tanpa melibatkan faktor transkripsi (Sukmaniah, 2005).



Gambar 4.7 Integrasi onkogen E6 ke dalam struktur gen *p53*. Onkogen E6 mengblokir ekspresi *p53* sehingga menyebabkan proliferasi tak terkendali dan pembentukan tumor (a) Komplek E6-*p53* dikenali oleh molekul ubiquitin dan didegradasi oleh proteasom (Feki, 2004).

Penelusuran jalur mekanisme apoptosis ini bertujuan untuk membuat sebuah simulasi mengenai proses terjadinya apoptosis yang didasarkan hasil uji *in vitro* yang dikombinasikan dengan *in silico*. Analisis *Osprey 1.0.1* dilakukan dengan cara mengkombinasikan semua gen dan protein yang berperan dalam apoptosis dari senyawa aktif mentimun laut diatas, maka didapatkan jalur *p53-independent* apoptosis pada sel HeLa akibat induksi dari ekstrak mentimun laut melalui aktivasi jalur ekstrinsik dan intrinsik seperti pada gambar 4.7.



Gambar 4.8 Prediksi jalur mekanisme apoptosis pada sel HeLa oleh ekstrak mentimun laut dari *Osprey 1.0.1*. Apoptosis diinisiasi oleh *death receptor* dan reseptor permukaan CD95, serta aktivasi protein *member Bcl-2 pro-apoptosis* yang mengaktifkan aliran *caspase* dan menginduksi apoptosis.

Aktivasi jalur ekstrinsik apoptosis diperankan oleh FasL dan TRAIL yang merupakan ligan berlokasi pada membran dan matriks ekstraseluler. Kedua ligan ini menginduksi apoptosis melalui signal ekstraseluler. Pengikatan TRAIL terhadap DR5 membentuk *binding site* untuk adaptor protein TRADD (*TNF related apoptotic death domain*) dan mengaktifkan *caspace* 10 dan 8. Ligasi CD95/Fas dengan CD95/Fas reseptor membentuk *binding site* untuk adaptor protein FADD (*Fas-associated death domain*) yang berikatan dengan *procaspase* 8 yang selanjutnya mengaktifkan *caspace* 8 pada plasma membran. *Caspase* 8 mengaktifkan *caspace* efektor 3 dan anggota *Bcl-2 family* Bid. *Caspase* 8 mengaktifkan Bid untuk menginduksi pelepasan citokrom c dan pembentukan apoptosom oleh *caspace* 9 (Woo, dkk. 2004).

Aktivasi jalur intrinsik dipicu oleh perubahan potensial pada membran mitokondria ($\Delta\psi_m$) yang menyebabkan pembentukan pori membran dan diikuti oleh pelepasan citokrom C dan aktivasi *caspace*. Induksi ekstrak mentimun laut diduga menyebabkan perubahan level Bcl-2 dan Bax (Lee, dkk., 2010; Sugawara, dkk., 2006) yang seharusnya ditranskripsi oleh p53, namun ekstrak mentimun laut mampu menarget pada ekspresi protein Bax tanpa melalui p53. Perubahan level Bcl-2 dan Bax menginduksi pelepasan citokrom C dari mitokondria (Muhamad, dkk. 2011; Yang, dkk. 2006) dan terjadi interaksi dengan Apaf-1 membentuk apoptosom. Kompleks apoptosom mengaktifkan *caspace* 9 dan 3 dalam proses apoptosis. Hal ini menunjukkan bahwa jalur mitokondria diduga berperan dalam kematian sel HeLa yang diinduksi oleh ekstrak mentimun laut (Yang, dkk. 2006).

Mekanisme apoptosis yang diinduksi ekstrak mentimun laut melibatkan beberapa gen dan protein lain selain jalur ekstrinsik dan intrinsik diatas. DNA topoisomerase II adalah enzim ubiquitin dan esensial yang merelaksasi DNA *supercoiling* selama proses seluler seperti replikasi, rekombinasi, dan transkripsi. Senyawa aktif mentimun laut diduga mampu menghambat komplek DNA topoisomerase II sehingga menyebabkan produksi ROS pada mitokondria sehingga terjadi depolarisasi membran mitokondria (Ganguly, dkk. 2007; Lee, dkk. 2010). Selain itu, pada sel kanker terjadi abnormal *cyclin* D1 yang mengaktifkan CDK4 dan CDK6 sehingga siklus sel terus berlanjut. PIN 1 diketahui mampu menekan proliferasi sel kanker. PIN 1 berfungsi meregulasi level *cyclin* D1 sehingga memblok proliferasi sel dan menginduksi apoptosis melalui *cell cycle arrest* (Wulf, dkk. 2001).

Focal adhesion kinase (FAK) berperan penting dalam pembentukan mikrotubul selama mitosis, sehingga penghambatan FAK dapat menghentikan proses mitosis sel dan sel berhenti pada metafase. PARP berperan dalam sintesis telomerase dan transkripsi RNA polymerase II. Dengan penghambatan PARP maka replikasi DNA dan sintesis protein akan terganggu sehingga menghentikan siklus sel. Penurunan ekspresi PARP juga dapat mengubah level basal Bax dan Bcl-2 dan selanjutnya mengaktifkan *caspase-8* dan *-9* (Muhamad, dkk. 2011).

Extracellular signal-regulated kinases (ERK1) merupakan anggota dari *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) yang sangat penting dalam regulasi pertumbuhan sel, diferensiasi, dan kematian sel. ERK1 mempertahankan sel untuk hidup dan memblokir jalur yang meningkatkan sensitivitas sel terhadap apoptosis, sehingga ERK1 memiliki efek antiapoptosis. Pemberian ekstrak mentimun laut diduga akan memblokir aktivitas ERK1 sehingga protein proapoptosis dapat meningkat dan menginduksi pelepasan sitokrom C dari mitokondria (Fan, dkk. 2007). Inaktivasi dari ERK1 dan FAK diduga dimediasi oleh ekspresi Lyn yang merupakan protein yang berperan dalam fosforilasi dan aktivitas tirosin kinase. Protein Myc merupakan faktor transkripsi yang mengatur sejumlah gen yang berperan dalam pertumbuhan dan proliferasi sel, selain itu juga mendukung terjadinya apoptosis. Myc dapat memicu terjadinya apoptosis melalui signal intraseluler dan mengaktifkan *caspase* serta menstimulasi pelepasan sitokrom C dari mitokondria melalui aktivasi Bax (Afanasyeva, dkk. 2007).

Penelitian Widodo, dkk. (2009) melaporkan bahwa ekstrak mentimun laut *S. horrens* mampu menyebabkan sel MCF-7 berhenti membelah pada fase G1. Berdasarkan prediksi mekanisme apoptosis diatas dapat diketahui bahwa gen ERK1 yang diduga dihambat pada proses apoptosis kemungkinan juga dihambat dalam siklus sel. Jalur ERK1 penting untuk sel berlanjut pada *restriction point* G1, dan dibutuhkan untuk membawa sel dari G0 menuju G1, sehingga penghambatan ERK1 dapat memicu *cell cycle arrest* pada G1. Menurut Zeng, dkk. (2009), penghambatan ERK1 dapat mengubah level cyclin D1 dan p21(CIP1) yang berperan penting dalam menghambat sel pada fase G1.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Ekstrak mentimun laut *S. horrens* menginduksi apoptosis pada sel HeLa dengan meningkatkan jumlah sel yang mengalami apoptosis seiring dengan peningkatan dosis ekstrak yang diberikan. Mekanisme apoptosis yang diinduksi ekstrak mentimun laut *S. horrens* merupakan jalur *p53-independent apoptosis*. Berdasarkan pendekatan bioinformatika, prediksi mekanisme apoptosis pada sel HeLa yang diinduksi ekstrak mentimun laut adalah melalui beberapa jalur yang mengaktifkan *caspase*.

5.2 Saran

Sebaiknya dilakukan metode fraksinasi dan kromatografi untuk mengetahui jenis dan struktur senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak mentimun laut *S. horrens*. Selain itu, akan lebih baik dilakukan analisis aktivitas beberapa gen regulator apoptosis sehingga dapat dengan mudah diketahui target antikanker pada sel kanker.

DAFTAR PUSTAKA

- Afanasyeva, E.A., E.Y. Komarova, L.G. Larsson, F. Bahram, B.A. Margulis, and I.V. Guzhova. 2007. Drug-induced Myc-mediated Apoptosis of Cancer Cells is Inhibited by Stress Protein Hsp70. *Int. J. Cancer* 121:2615–2621.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, & K. Roberts. 1994. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publishing, New York.
- Althunibat, O.Y., Ridzwan B.H., M. Taher, J. M. Daud, Masa-Aki Ikeda, Zali B.I. 2009. In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Three Malaysian Sea Cucumber Species. *European Journal of Scientific Research*, 37(3): 376-387.
- Andi Offset. 2007. *Panduan Praktis Pengolahan Data Statistik dengan SPSS 15.0*. Penerbit Andi. Yogyakarta.
- Anggrianti, P. 2008. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Kemukus (*Piper cubeba* L.) Terhadap Sel HeLa. Skripsi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Beckman Coulter. 2008. Ultratech DAB Chromogen Kit. www.beckmancoulter.com. Beckman Coulter, Inc. France.
- Biovision. Apo-BrdU-IHC™ In Situ DNA Fragmentation Assay Kit. www.biovision.com. USA.
- Chen, J.C., K.W. Lu, J.H. Lee, C.C. Yeh and J.G. Chung. 2006. Gypenosides Induced Apoptosis in Human Colon Cancer Cells through the Mitochondria-dependent Pathways and Activation of *Caspase-3*. *Anticancer Research*, 26(6B):4313-4326.
- Chen, P.N., Y.S. Hsieh, H.L. Chiou, S.C. Chu. 2005. Silibinin Inhibits Cell Invasion Through Inactivation Of Both PI3K-Akt And MAPK Signaling Pathways. *Chemico-Biological Interactions*, 156(2-3): 141-150.
- Cichorek, M. 2008. Mechanisms Of Tumor Cell's Ability To Avoid Apoptosis. *Dermatologia Estetyczna* 10(6).
- Dako. 2007. AEC Detection Kit. www.dako.com. Dako North America, Inc. California.
- Dang, N.H., N.V. Thanh, P.V. Kiem, L.M. Huong, C.V. Minh, and Y.H.

- Kim. 2007. Two New Triterpene Glycosides from the Vietnamese Sea Cucumber *Holothuria scabra*. *Arch Pharm Res* 30(11): 1387-1391.
- Desaintes, C., S. Goyat, S. Garbay, M. Yaniv, and F. Thierry. 1999. Papillomavirus E2 Induces p53-Independent Apoptosis in HeLa Cells. *Oncogene* 18 : 4538 ± 4545.
- Ensahsy, H.A., A. Abdeen, S. Abdeen, E.A. Elsayed, M.E. Demellawy, A.A. EL Shereef. 2009. Serum Concentration Effects on the Kinetics and Metabolism of HeLa-S3 Cell Growth and Cell Adaptability for Successful Proliferation in Serum Free Medium. *World Applied Sciences Journal* 6 (5): 608-615.
- Exploratorium, 2010. Cancer: Cell Behaving Badly. www.exploratorium.edu/imaging_station. Tanggal akses 17 Oktober 2010.
- Fan, Y., H. Chen, B. Qiao, L. Luo, H. Ma, H. Li, J. Jiang, D. Niu, & Z. Yin. 2007. Opposing Effects of ERK and p38 MAP Kinases on HeLa Cell Apoptosis Induced by Dipyrithione. *Mol. Cells*, 23(1): 30-38.
- Farmasea. 2008. Peran Teripang dalam Farmasi. <http://farmasea.blogspot.com>. Tanggal akses 17 Oktober 2010.
- Feki, A. 2004. P53, HPV P53, HPV and and Cervical Cancer. Postgraduate Training Course in Reproductive Health. University of Geneva.
- Ganguly, A., B. Das, A. Roy, N. Sen, S.B. Dasgupta, S. Mukhopadhyay, and H.K. Majumder. Betulinic Acid, a Catalytic Inhibitor of Topoisomerase I, Inhibits Reactive Oxygen Species–Mediated Apoptotic Topoisomerase I–DNA Cleavable Complex Formation in Prostate Cancer Cells but Does Not Affect the Process of Cell Death. *Cancer Res* 67 (24): 11848-11858.
- Garrett, Michelle D. 2001. Cell Cycle Control and Cancer. *Current Science*, 81(5).
- Gaymes, T.J., S. Shall, L. J. MacPherson, N.A. Twine, N.C. Lea, F. Farzaneh and G.J. Mufti. 2009. Inhibitors of Poly Adp-Ribose Polymerase (Parp) Induce Apoptosis of Myeloid Leukemic

- Cells: Potential for Therapy of Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Haematologica* 94(5): 638-646.
- Germino, J. 2010. The Immortal HeLa Cell Line. <http://www.myhosting.com>. Tanggal akses 1 Juli 2011.
- Ghobrial, Irene M., T.E. Witzig, A.A. Adjei. 2005. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *American Cancer Society*. Atlanta.
- Goodwin, E.C., DiMaio, D. 2000. Repression of Human Papillomavirus Oncogenes In Hela Cervical Carcinoma Cells Causes the Orderly Reactivation of Dormant Tumor Suppressor Pathways. *Biochemistry*, 97(23).
- Hartono, N.W.B. 2009. The Effects of *Alpinia galanga* (Lengkuas) on The Cell Proliferation Activities and Apoptotic Index of Breast Adenocarcinoma C3H Mice. Program Pasca Sarjana Magister Ilmu Biomedik dan Program Pendidikan Dokter Spesialis I Patologi Anatomi Universitas Diponegoro. Semarang.
- Haupt, S., M. Berger, Z. Goldberg & Y. Haupt. 2003. Apoptosis – the p53 Network. *Journal of Cell Science* 116 (20): 4077-4085.
- Heidcamp, H.W. 2010. Methyl Green-Pyronin Staining of DNA. cellab@gac.edu. Biology Department, Gustavus Adolphus College.
- Hua, H., Yang-hua, Y., Ling, LI., Bao-shu, L., Ming-ping, LA., Hong-wei, Z. 2009. Antifungal Active Triterpene Glycosides from Sea Cucumber *Holothuria scabra*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 44 (6): 620-624.
- Kastan, M. B., C. E. Canman and C. J. Leonard. 1995. P53, Cell Cycle Control and Apoptosis: Implications for Cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 14: 3-15. Netherlands.
- Kun Li, Q. Li, Z. Han, J. Li, D. Gao, Z. Liu, F. Zhen. 2008. Alkaloid from *Angelicae dahuricae* Inhibits HeLa Cell Growth by Inducing Apoptosis and Increasing *Caspase-3* Activity. *Labmedicine* 39(9).
- Lee, I.K., K.A. Kang, C.M. Lim, K.C. Kim, H.S. Kim, D.H. Kim, B.J. Kim, W.Y. Chang, J.H. Choi, and J.W. Hyun. 2010. Compound K, a Metabolite of Ginseng Saponin, Induces Mitochondria-

- Dependent and *Caspase*-Dependent Apoptosis via the Generation of Reactive Oxygen Species in Human Colon Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 11:4916-4931.
- Liang, C., Y, H.T. Nguyen, K. Jeong-ah, B. Hye-jin, K. Hee-kyoung, M.C. Nguyen, Y.H. Kim. 2010. Oleanane-type Triterpenoids from *Panax stipuleanatus* and their Anticancer Activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20(23): 7110-7115.
- Li, M., Z.-H. Miao, Z. Chen, Q. Chen, M. Gui, L.-P. Lin, P. Sun, Y.-H. Yi, & J. Ding. 2010. Echinocide A, a New Marine-derived Anticancer Saponin, Targets Topoisomerase2a by Unique Interference with its DNA Binding and Catalytic Cycle. *Annals of Oncology* 21: 597-607.
- Li, Y., Z. Liu, X. Guo, J. Shu, Z. Chen, & L. Li. 2006. Aristolochic Acid I-Induced DNA Damage and Cell Cycle Arrest in Renal Tubular Epithelial Cells In Vitro. *Arch Toxicol.*
- Martinez, J.D., M.T. Parker, K.E. Fultz, N.A. Ignatenko, E.W. Gerner. 2003. Molecular Biology Of Cancer. Departments of Radiation Oncology/Cancer Biology Section. Arizona.
- Maruo, A., I. Oishi, K. Sada, M. Nomi, T. Kurosaki, Y. Minami, & H. Yamamura. 1999. Protein Tyrosine Kinase Lyn Mediates Apoptosis Induced by Topoisomerase II Inhibitor in DT40 cells. *International Immunology*, 11 (9): 1371-1380.
- Masters, J.R.W. 2000. Animal Cell Culture 3rd Edition. Oxford University. London.
- Muhamad, S., A.H.L. Pihie, J. Latif, C.K. Rha & T.G. Sambandan. 2011. Induction of apoptosis in MCF-7 via the *Caspase* pathway by longilactone from *Eurycoma longifolia* Jack. *Research In Pharmaceutical Biotechnology* 3(1): 1-10.
- Muir, M. 1996. Alternative & Complementary Therapies. Mary Ann Liebert, Inc., 2:914.
- NCGC (NIH Chemical Genomic Center). 2009. Setting Up a Cell Proliferation Assay. <http://ncgc.nih.gov>. Tanggal akses 26 April 2011.
- Ozaki, T., & A. Nakagawara. 2011. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers* (3): 994-1013

- Oliveira, M.G., I.S. Lauxen, A.C.M. Chaves, P.V. Rados, M.S.A. Filho. 2008. Immunohistochemical analysis of the patterns of p53 and PCNA expression in odontogenic cystic lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 13(5):275-80.
- Palizban, A.A., H.S. Aliabadi & F. Abdollahpour. 2010. Effect Of Cerium Lanthanide On Hela And Mcf-7 Cancer Cell Growth In The Presence Of Transferrin. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 5(2): 119-125.
- Pasaribu, S.P. 2009. Uji Bioaktivitas Metabolit Sekunder dari Daun Tumbuhan Babadotan (*Ageratum conyzoides* L.). *Jurnal Kimia Mulawarman*, 2(6): 23-29.
- Payne & Miles. 2010. Mechanism of Cancer Drugs.
- Pechenik, J.A. 2000. Biology of the Invertebrate 4th. McGraw Hill Companies. USA.
- Pharma Tech. 2010. Anti Kanker pada Siklus Sel. www.rumahkanker.com. Tanggal akses 17 Oktober 2010.
- R&D. 2011. TUNEL Assay Principle. R&D Systems, Inc.
- Reynolds, Richard J. & J. A. Schecker. 1995. Radiation, Cell Cycle, and Cancer. *Los Alamos Science* 23.
- Scheuer, Paul J. 1994. Produk Alami Lautan dari Segi Kimiawi dan Biologi. Penerjemah Dra. Koensoemardiyah, Apt.SU. IKIP Semarang Press. Semarang.
- Sjamsuddin, S. 2001. Pencegahan dan Deteksi Dini Kanker Serviks. *Cermin Dunia Kedokteran*, 133: 8-13.
- Sugawara, T., Zamia, N., Yamamoto, A., Sakai, S., Noguchi, R., Hiraia, T., 2006. Isolation of Shignoid Bases of Sea Cucumber Cerebrosides and Their Cytotoxic Activity Against Colon Cancer Cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2906-2912.
- Sukmaniah, S. 2005. Nutrigenomik dan Nutrigenetik. Departemen Ilmu Gizi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.
- Syaifudin, M. 2007. Gen Penekan Tumor p53, Kanker dan Radiasi Pengion. *Buletin Alara*, 8(3): 119 – 128.

- Thermo. MultiVision Polymer Detection System: MultiVision anti-rabbit/HRP + anti-mouse/AP polymers. <http://www.thermo.com/labvision>. USA.
- Timmis, S. 2005. Immunohistochemistry. *ACNR* 5(5): 29-30.
- Umemura, S., J. Itoh, S. Takekoshi, H. Hasegawa, M. Yasuda, R.Y. Osamura & K. Watanabe. 2003. Methyl Green and DNA Strands In Vitro: High Affinity of Methyl Green Dye to Cytosine and Guanine. *Acta Histochem. Cytochem*, 36(4): 361-366.
- Widodo, L. Hakim, & S. Permana. 2009. Analisis Diversitas Genetik Invertebrata yang Berpotensi sebagai Antikanker di Pantai Selatan Malang. Laporan Program Hibah Bersaing (LPHB).
- Widowati, L. 2011. Obat Herbal Kanker. <http://www.tempointeraktif.com>. Puslitbang Biomedis dan Farmasi, Badan Litbang Kesehatan.
- Woo, S.H., I.C. Park, M.J. Park, S. An, H.C. Lee, H.O. Jin, S.A. Park, H. Cho, S.J. Lee, H.S. Gwak, Y.J. Hong, S.I. Hong & C.H. Rhee. 2004. Arsenic Trioxide Sensitizes CD95/Fas-induced Apoptosis Through ROS-mediated Upregulation of CD5/Fas by NF- κ B Activation. *Int. J. Cancer* 112:596-606.
- Wulf, G. M., A. Ryo, G. G. Wulf, S. W. Lee, T. Niu, V. Petkova, and K. P. Lu. 2001. Cyclin D1 and Breast Cancer. *EMBO J.* 20:3459-3472.
- Yang, W., X. Gong, X. Zhao, W. An, X. Wang, M. Wang. 2006. Capsaicin Induces Apoptosis in HeLa Cells via Bax/Bcl-2 and Caspase-3 Pathways. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 1(3-4).
- Yu, J.S., & Kim, A.K. 2010. Platycodin D Induces Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *J Med Food*, 13(2): 298-305.
- Zeng, H., M. Wu, and J.H. Botnen. 2009. Methylselenol, a Selenium Metabolite, Induces Cell Cycle Arrest in G1 Phase and Apoptosis via the Extracellular-Regulated Kinase 1/2 Pathway and Other Cancer Signaling Genes. *The Journal of Nutrition*, 1613-1618.
- Zhang, S.Y., Y.H. Yi, & H.F. Tang. 2006. Bioactive Triterpene

Glycosides from the Sea Cucumber *Holothuria fuscocinerea*.

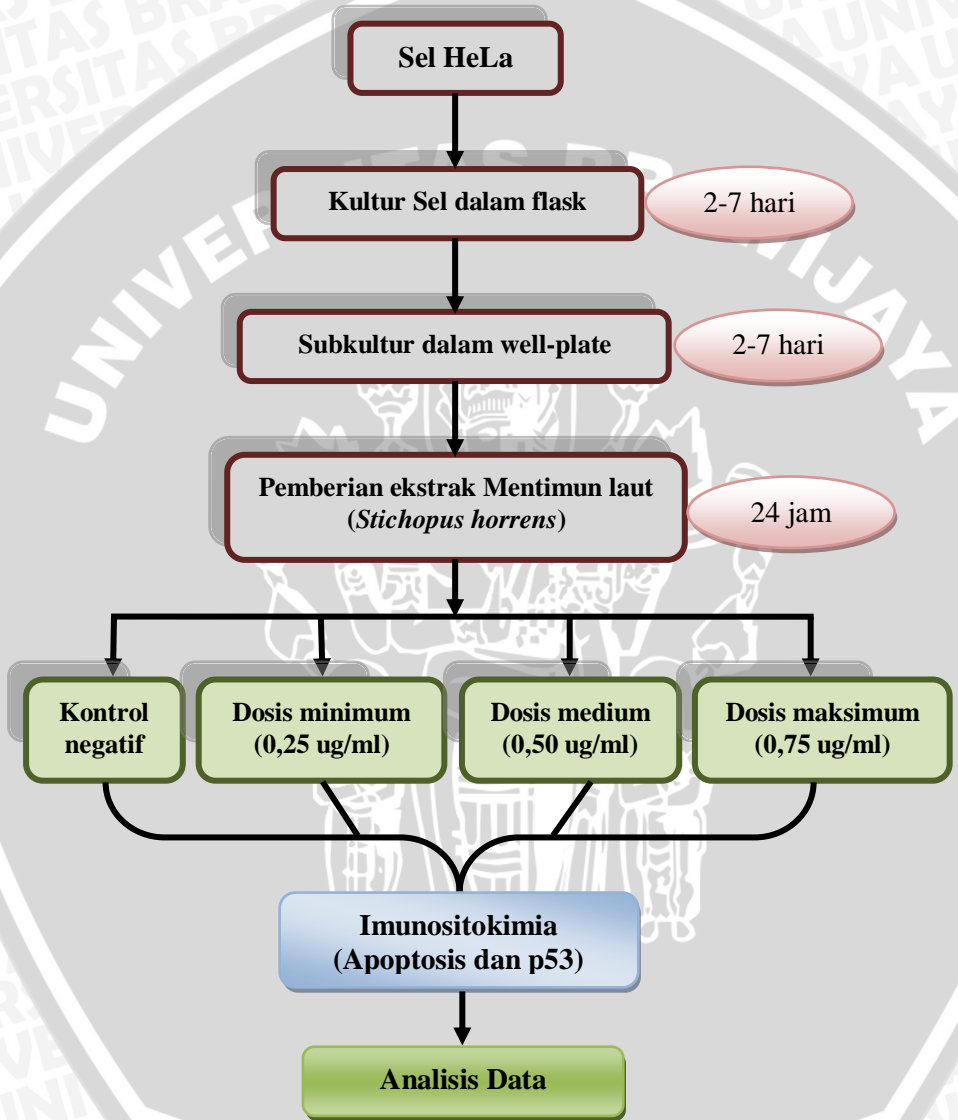
Zinkel, S., A. Gross, and E. Yang. 2006. BCL2 family in DNA damage and Cell Cycle Control. *Cell Death and Differentiation*, 13:1351–1359.

Zou, Z.R., Y.H. Yi, H.M. Wu, J.H.Wu, D.Z. Zhou, S.Y. Zhang. 2004. Intercedenol A and B, Two New Triterpenoids from the Sea Cucumber *Mensamaria intercedens*. *Chinese Chemical Letters* 15(3): 309-312.



LAMPIRAN

Lampiran A. Skema Alur Penelitian



Gambar A.1 Skema Alur Penelitian

Lampiran B. Perhitungan dosis pemberian ekstrak mentimun laut *S. horrens*

Pembuatan stok 100 ug/ml

Diambil ekstrak sebanyak 100 ug lalu dilarutkan dalam 1 ml DMSO

Dalam 100 ug/ml = 1,2 ml

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

1. Dosis minimum

$$0,25 \text{ ug/ml} \rightarrow V_1 = \frac{M_2 \cdot V_2}{M_1}$$

$$= \frac{0,25 \text{ ug/ml} \times 1,2 \text{ ml}}{100 \text{ ug/ml}}$$

$$= 0,003 \text{ ml}$$

$$= 3 \text{ ul} \rightarrow \text{dalam 1200 ul media}$$

2. Dosis minimum

$$0,50 \text{ ug/ml} \rightarrow V_1 = \frac{M_2 \cdot V_2}{M_1}$$

$$= \frac{0,50 \text{ ug/ml} \times 1,2 \text{ ml}}{100 \text{ ug/ml}}$$

$$= 0,006 \text{ ml}$$

$$= 6 \text{ ul} \rightarrow \text{dalam 1200 ul media}$$

3. Dosis minimum

$$0,75 \text{ ug/ml} \rightarrow V_1 = \frac{M_2 \cdot V_2}{M_1}$$

$$= \frac{0,75 \text{ ug/ml} \times 1,2 \text{ ml}}{100 \text{ ug/ml}}$$

$$= 0,009 \text{ ml}$$

$$= 9 \text{ ul} \rightarrow \text{dalam 1200 ul media}$$

Lampiran C. Output Hasil Analisis Data Menggunakan Program SPSS 16 for Windows

Uji Normalitas dan Homogenitas Data

Tabel C.1 Tes One-Sample Kolmogorov-Smirnov

	Perlakuan	Hidup	Apoptosis	H_p53	A_p53	
N	12	12	12	12	12	
Normal Parameters ^a	Mean	.3750	71.1667	28.8333	31.7167	4.6667
	Std. Deviation	.29194	1.11566E1	11.15660	1.15172E1	1.71004
Most Extreme Differences	Absolute	.166	.113	.113	.191	.199
	Positive	.166	.110	.113	.174	.086
	Negative	-.166	-.113	-.110	-.191	-.199
Kolmogorov-Smirnov Z	.574	.392	.392	.661	.689	
Asymp. Sig. (2-tailed)	.897*	.998*	.998*	.775*	.730*	

*Nilai sig. > 0,05 menunjukkan data terdistribusi normal

Tabel C.2 Tes Homogenitas Varian

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hidup	2.410	3	7	.152*
Apoptosis	2.410	3	7	.152*
H_p53	1.921	3	7	.215*
A_p53	1.967	3	8	.198*

*Nilai sig. > 0,05 menunjukkan data memiliki varian yang sama

Uji Anova : untuk mengetahui beda nyata antar perlakuan

Tabel C.3 Uji Anova Sel Hidup Tiap Perlakuan

Hidup	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1136.167	3	378.722	13.003	.002*
Within Groups	233.000	8	29.125		
Total	1369.167	11			

*Nilai sig. < 0,05 menunjukkan adanya beda nyata antar perlakuan

Tabel C.4 Uji Anova Sel Apoptosis Tiap Perlakuan

Apoptosis	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1136.167	3	378.722	13.003	.002*
Within Groups	233.000	8	29.125		
Total	1369.167	11			

*Nilai sig. < 0,05 menunjukkan adanya beda nyata antar perlakuan

Tabel C.5 Uji Anova Ekspresi p53 pada Sel Apoptosis Tiap Perlakuan

A_p53	Sum of Squares	D f	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.667	3	1.556	453	.723*
Within Groups	27.500	8	3.438		
Total	32.167	11			

*Nilai sig. > 0,05 menunjukkan tidak ada beda nyata antar perlakuan

Table C.6 Uji Anova Ekspresi p53 pada Sel Hidup Tiap Perlakuan

H_p53	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	831.690	3	277.230	3.535	.068*
Within Groups	627.407	8	78.426		
Total	1459.097	11			

*Nilai sig. > 0,05 menunjukkan tidak ada beda nyata antar perlakuan

Uji Tukey : untuk mengetahui beda nyata antar perlakuan

Tabel C.7 Beda Nyata Antar Perlakuan pada Sel Hidup

TukeyHSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0.75	3	57.6667		
0.5	3	68.5000	68.5000	
0.25	3		73.8333	73.8333
0	3			84.6667
Sig.		.142	.638	.142

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Tabel C.9 Beda Nyata Antar Jumlah Ekspresi p53 pada Sel Apoptosis

TukeyHSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
0	3	3.6667	
0.75	3	4.6667	
0.25	3	5.0000	
0.5	3	5.3333	
Sig.		.699	

Tabel C.8 Beda Nyata Antar Perlakuan pada Sel Apoptosis

TukeyHSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0	3	15.3333		
0.25	3	26.1667	26.1667	
0.5	3		31.5000	31.5000
0.75	3			42.3333
Sig.		.142	.638	.142

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Tabel C.10 Beda Nyata Antar Ekspresi p53 pada Sel Hidup

TukeyHSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
0	3	19.0333	
0.25	3	29.8333	
0.75	3	37.1667	
0.5	3	40.8333	
Sig.		.065	

Uji Korelasi : untuk mengetahui korelasi ekspresi p53 dengan sel apoptosis maupun sel hidup

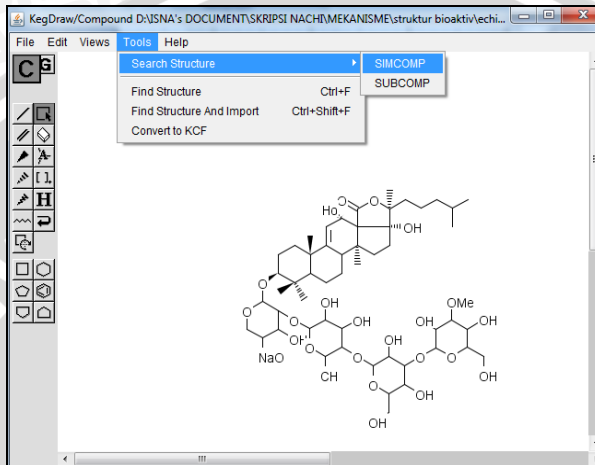
Tabel C.11 Korelasi antara Ekspresi p53 dengan Apoptosis

	Apoptosis	A_p53	
Apoptosis	Pearson Correlation	1	.121
	Sig. (2-tailed)		.709*
	N	12	12
A_p53	Pearson Correlation	.121	1
	Sig. (2-tailed)	.709*	
	N	12	12

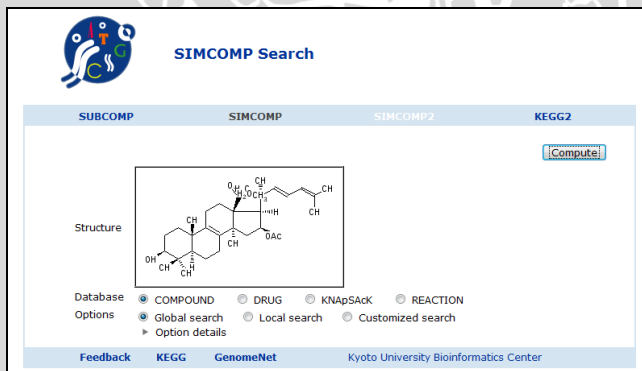
Tabel C.12 Korelasi antara Ekspresi p53 dengan sel hidup

	Hidup	H_p53	
Hidup	Pearson Correlation	1	-.502
	Sig. (2-tailed)		.096*
	N	12	12
H_p53	Pearson Correlation	-.502	1
	Sig. (2-tailed)	.096*	
	N	12	12

Lampiran D. Studi Homologi Struktur : Untuk mencari target gen dan protein yang berperan dalam apoptosis berdasarkan kesamaan struktur



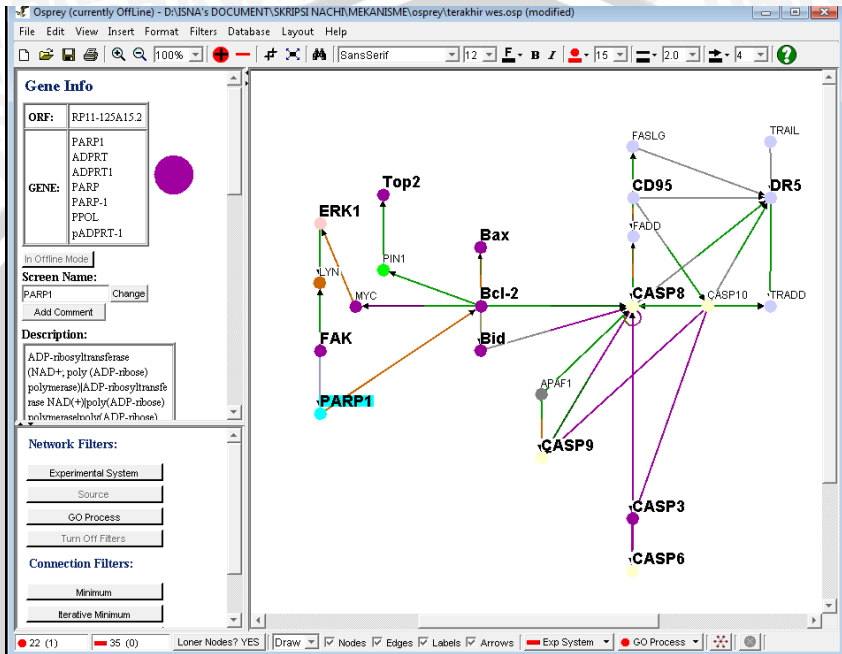
Gambar D.1 Studi homologi struktur dengan *KegDraw-0_1_11Beta*. Struktur senyawa aktif yang diperoleh dari literatur pendukung digambar ulang dan ditelusuri similaritasnya dengan senyawa aktif lain.



The image shows a screenshot of the SIMCOMP Search web interface. At the top left is a logo with a globe and a magnifying glass. The title is "SIMCOMP Search". Below the title are four tabs: "SUBCOMP", "SIMCOMP", "SIMCOMP2", and "KEGG2". The "SIMCOMP" tab is active. In the center, there is a chemical structure of a complex molecule with a steroid-like core and a long side chain. Below the structure, there are search options: "Database" (radio buttons for "COMPOUND", "DRUG", "KnapSack", "REACTION"), "Options" (radio buttons for "Global search", "Local search", "Customized search"), and "Option details" (a link). A "[Compute]" button is located to the right of the structure. At the bottom, there are links for "Feedback", "KEGG", "GenomeNet", and "Kyoto University Bioinformatics Center".

Gambar D.2 Proses penelusuran kesamaan struktur senyawa aktif mentimun laut. Struktur yang telah didapatkan berdasarkan nilai similaritas tertinggi ditelusuri kembali aktivitasnya dalam apoptosis dengan studi literatur.

Lampiran E. Prediksi Jalur Mekanisme Apoptosis Menggunakan *Osprey 1_0_1*



Gambar E.1 Prediksi jalur mekanisme apoptosis menggunakan *Osprey 1_0_1* dengan memasukkan kode gen dan protein target dan dimunculkan interaksinya dan dianalisis sesuai dengan info yang tersedia pada fitur *software*.