

UJI SITOTOKSIK KOMBINASI 5-FLUOROURASIL DAN COELOMIC FLUID
DARI *Lumbricus rubellus* TERHADAP CELL LINE HT-29 SECARA *IN VITRO*

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



Oleh:
Detria Rahma Gasti
NIM 145070107121003

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

**UJI SITOTOKSIK KOMBINASI 5-FLUOROURASIL DAN COELOMIC FLUID
DARI *Lumbricus rubellus* TERHADAP CELL LINE HT-29 SECARA IN VITRO**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:
Detria Rahma Gasti
NIM 145070107121003

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

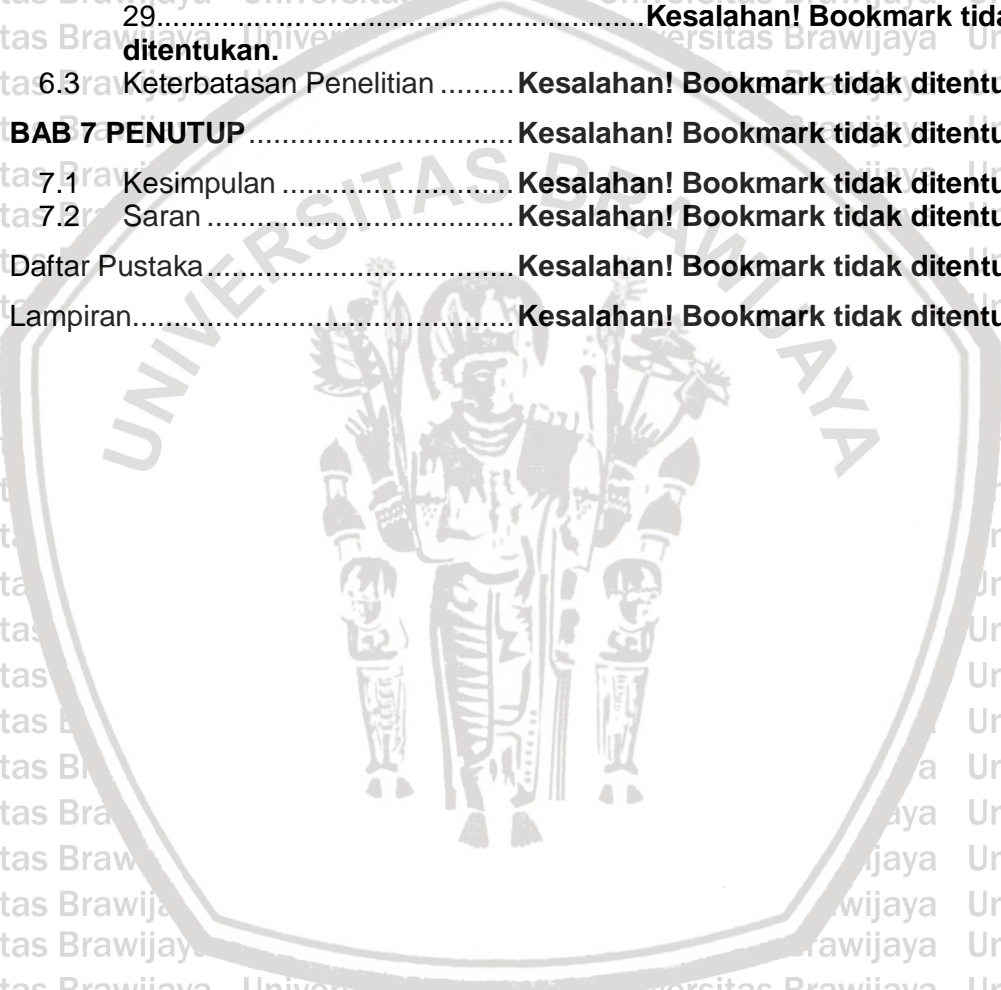
MALANG

2018

DAFTAR ISI

Judul.....	ii
Halaman Pengesahan	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
Pernyataan Keaslian Tulisan	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
Kata Pengantar.....	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
Abstrak	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
Abstract	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
Daftar Isi	iii
Daftar Gambar	v
Daftar Tabel	vi
Daftar Singkatan	vii
BAB 1 PENDAHULUAN	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
1.1 Latar Belakang	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
1.2 Rumusan Masalah	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
1.3 Tujuan Penelitian	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
1.4 Manfaat Penelitian	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
2.1 Kanker Kolon	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
2.2 5-Fluorourasil	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
2.3 Sel Line sebagai Model Kanker Kolorektal	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
2.4 Terapi Kombinasi	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
2.5 Cacing Tanah <i>Lumbricus rubellus</i>	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
2.6 Uji Sitotoksik Secara <i>In Vitro</i>	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
3.2 Hipotesis Penelitian	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
BAB 4 METODE PENELITIAN	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
4.1 Rancangan Penelitian	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
4.2 Sampel Penelitian	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
4.3 Variabel Penelitian	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
4.5 Alat dan Bahan	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
4.6 Definisi Operasional	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
4.7 Prosedur Kerja	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
4.8 Analisis Data	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
5.1 Hasil Penelitian	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.

5.2	Analisis Data	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
BAB 6 PEMBAHASAN		Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
6.1	Kombinasi 5-fluorourasil dan <i>coelomic fluid</i> dari <i>Lumbricus rubellus</i> dapat meningkatkan efek sitotoksik dibanding <i>single therapy</i> terhadap <i>cell line</i> HT-29.....	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
6.2	IC50 dari kombinasi 5-fluorourasil dan <i>coelomic fluid</i> dari <i>Lumbricus rubellus</i> terhadap <i>cell line</i> HT-29.....	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
6.3	Keterbatasan Penelitian	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
BAB 7 PENUTUP		Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
7.1	Kesimpulan	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
7.2	Saran	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
	Daftar Pustaka.....	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
	Lampiran.....	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Cara Kerja 5-Fluorourasil.....	17
Gambar 2.2	Cacing <i>Lumbricus rubellus</i>	20
Gambar 2.3	Siklus hidup <i>Lumbricus rubellus</i>	23



DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Persentase kematian sel..... 39

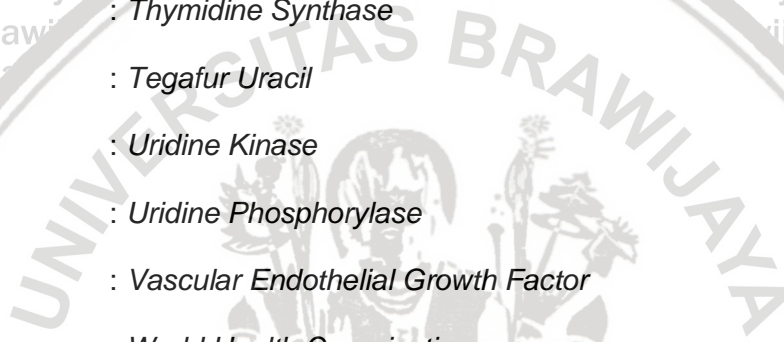
Tabel 5.2 Nilai IC₅₀..... 41



DAFTAR SINGKATAN

ASEAN	: Association of Southeast Asian Nations
ASR	: Age Standard Rate
CCNU	: Cyclohexyl Nitrosourea
DHFU	: Dihydrofluorourase
DNA	: Asam Deoksiribonukleat
DPD	: Dehidropirimidin Dehidrogenase
dTTP	: Deoksitimidin Trifosfat
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
FdUMP	: Deoxyuridine Monophosphate
FdUTP	: Fluorodeoxyuridine Triphosphate
FT-207	: N1-(2 tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil
FUDP	: Fluorouridine Diphosphate
FUDR	: Fluorodeoxyuridine
FUMP	: Fluorouridine Monophosphate
FUR	: Fluorouridine
FUTP	: Fluorouridine Triphosphate
GISTs	: Gastrointestinal Stromal Tumors
HCT-15	: Human sapiens cancer colorectal carcinoma
HT-29	: Human sapiens cancer colorectal adenocarcinoma
IC ₅₀	: Inhibitory Concentration 50
KGB	: Kelenjar Getah Bening
Me-CCNU	: 1-(2-chloroethyl)-3-(trans-4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea
MIMS	: Monthly Index of Medical Specialities

MMC	: Methyl Methcathinone
MTT	: 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OPRT	: Orotate Phosphoribosyl Transferase
RNA	: Asam Ribonukleat
RR	: Ribonucleotide Reductase
TK	: Thymidine Kinase
TME	: Total Mesorectal Excision
TS	: Thymidine Synthase
UFT	: Tegafur Uracil
UK	: Uridine Kinase
UP	: Uridine Phosphorylase
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	: World Health Organization



ABSTRAK

Gasti, Detria R. 2018. **Uji Sitotoksik Kombinasi 5-Fluorourasil dan *Coelomic Fluid* dari *Lumbricus rubellus* Terhadap *Cell Line* HT-29 Secara *In Vitro***. Tugas Akhir, Program Studi S1 Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Agustina Tri Endharti, S. Si, Ph. D (2) dr. Nina Handayani, Sp. M.

Kanker kolorektal merupakan salah satu jenis kanker yang terjadi pada mukosa kolon di mana penyakit ini mempunyai angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi. kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* diharapkan menjadi salah satu alternatif terapi kombinasi yang mampu meningkatkan efek sitotoksik pada *cell line* HT-29. Uji sitotoksik dilakukan dengan metode uji MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) dengan pemberian konsentrasi kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* sebesar 5 µg/ml, 10 µg/ml dan 20 µg/ml. Kemudian hasil uji MTT dihitung menggunakan rumus persentase kematian sel. Dari hasil perhitungan persentase kematian sel didapatkan bahwa perlakuan 3 (20 µg/ml) dapat menghambat pertumbuhan sel paling tinggi. Kemudian data persentase kematian sel digunakan untuk mendapatkan nilai IC₅₀ sebagai nilai penghambatan sebesar 50% terhadap perlakuan. Pada penelitian ini diperoleh nilai IC₅₀ dari rata-rata semua perlakuan sebesar 13,496 µg/ml. Data dari uji sitotoksik kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* terhadap *cell line* HT-29 diperiksa menggunakan metode uji *Kruskal Wallis*. Pada uji *Kruskal Wallis* didapatkan data memiliki nilai signifikan ($p < 0,05$) sehingga data valid untuk digunakan sebagai data penelitian. Berdasarkan penelitian ini, didapatkan kesimpulan bahwa kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* mampu meningkatkan efek sitotoksik terhadap *cell line* HT-29 dengan konsentrasi *coelomic fluid* 20 µg/ml memiliki efek sitotoksik tertinggi dibanding semua perlakuan dan didapatkan nilai IC₅₀ dari rerata semua perlakuan kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* sebesar 13,496 µg/ml.

Kata kunci: *cell line* HT-29, efek sitotoksik, 5-Fluorourasil, *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus*

ABSTRACT

Gasti, Detria R. 2018. **Cytotoxic Assay Of Combination 5-Flourouracil And Coelomic Fluid From *Lumbricus rubellus* Against HT-29 Cell Line In Vitro**. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Agustina Tri Endharti, S. Si, Ph. D (2) dr. Nina Handayani, Sp. M.

Colorectal cancer is one type of cancer that occurs in the mucosa of the colon where the disease has a high morbidity and mortality. The combination of 5-flourouracil and coelomic fluid from *Lumbricus rubellus* is expected to be one of the alternative combination therapy that can increase the cytotoxic effect on HT-29 cell line. The cytotoxic test was performed by MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) by giving combination of 5-flourouracil and coelomic fluid from *Lumbricus rubellus* on concentration 5 µg / ml, 10 µg / ml and 20 µg / ml. Then the MTT assay was calculated using the formula of cell death percentage. From the calculated of cell death percentage it was found that treatment 3 with concentration of 20 µg / ml could inhibit the highest cell growth. Then the percentage data of cell death was used to obtain IC₅₀ value as 50% inhibition value to the treatment. In this research, IC₅₀ average of all treatments is 13,496 µg / ml. The combined 5-flourouracil and coelomic fluid cytotoxic-tests of *Lumbricus rubellus* against HT-29 cell line were examined using Kruskal-Wallis method. In Kruskal Wallis test, the data has significant value (p <0,05) so that the data is valid to be used as research data. Based on this research, it can be concluded that the combination of 5-flourouracil and *coelomic fluid* from *Lumbricus rubellus* can increase the cytotoxic effect on cell line HT-29 with concentration of coelomic fluid 20 µg / ml has the highest cytotoxic effect compared to all treatments and IC₅₀ value from all treatment a combination of 5-flourouracil and coelomic fluid from *Lumbricus rubellus* 13.496 µg / ml.

Keywords: HT-29 cell line, cytotoxic effect, 5-Flourouracil, coelomic fluid from *Lumbricus rubellus*

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker kolorektal merupakan salah satu jenis kanker yang terjadi pada mukosa kolon di mana penyakit ini mempunyai angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi (Tatuhey *et al.*, 2014). Pada tahun 2012 kanker kolorektal menempati peringkat ketiga setelah kanker paru dan kanker payudara sebagai kanker dengan frekuensi terbanyak dengan 1,4 juta kasus baru (Ferlay *et al.*, 2014). Kanker kolorektal menempati urutan ketiga setelah kanker paru, kanker hati sebagai penyebab kematian akibat kanker dengan 774.000 kematian pada tahun 2015 (WHO, 2018). Di Indonesia, kanker kolorektal merupakan jenis kanker ketiga terbanyak. Pada tahun 2008, Indonesia menempati urutan keempat di Negara ASEAN, dengan incidence rate 17,2 per 100.000 penduduk dan angka ini diprediksikan akan terus meningkat dari tahun ke tahun (Kimman *et al.*, 2012).

Penatalaksanaan kanker kolorektal dilihat berdasarkan stadium kankernya. Pembedahan merupakan terapi kuratif dengan tujuan melokalisir kanker tersebut (Medscape, 2018). Untuk kanker kolorektal dengan stadium II risiko tinggi dan stadium III dianjurkan untuk melakukan kemoterapi sebagai terapi adjuvan. Salah satu bahan kimia kemoterapi yang dianjurkan adalah 5-fluorourasil (Komite Penanggulangan Kanker Nasional, 2012). Mekanisme kerja 5-fluorourasil bersifat inaktif dalam bentuk induknya dan memerlukan pengaktifan melalui suatu rangkaian kompleks reaksi enzimatik menjadi metabolit ribosil dan deoksiribosil-

5'-monofosfat (FdUMP) menghambat timidilat sintase dengan akibat hambatan sintesis DNA (Gunawan, 2008).

5-Fluorourasil tetap merupakan obat yang paling luas digunakan dalam pengobatan kanker kolorektal, baik sebagai terapi adjuvan serta untuk penyakit stadium lanjut. Namun pada penelitian Li *et al.*, (2015), 5-Fluorourasil saja menghasilkan tingkat respon yang rendah, reaksi yang merugikan dan toksisitas yang secara bertahap membuat obat ini berbahaya. Penggunaan klinisnya yang menjadi sangat terbatas menyebabkan 5-Fluorourasil bisa mencapai resistensi, sebuah strategi baru dalam bentuk kombinasi digunakan untuk mengobati kanker menggunakan 5-Fluorourasil dan kombinasinya.

Belakangan ini, banyak penelitian dengan mencari bahan-bahan alami untuk di kombinasikan dengan obat-obatan kemoterapi. *Eisenia foetida* merupakan cacing tanah yang menurut banyak penelitian dapat dimanfaatkan sebagai terapi kanker. *Eisenia foetida* mengandung *coelomic fluid* yang didalamnya terdapat berbagai protein yang memiliki efek antibakteri, sitotoksik (antikanker), hemolitik, dan hemaglutinasi. Salah satu protein yang ada dalam *coelomic fluid* yang dapat berpotensi sebagai antikanker adalah lisenin (Kobayashi *et al.*, 2004).

Di Malang, *Eisenia foetida* sulit didapatkan. Sebagai pengganti dari *Eisenia foetida*, *Lumbricus rubellus* yang memiliki *coelomic fluid* diperkirakan memiliki protein lisenin yang sama sehingga penelitian ini menggunakan cacing tanah *Lumbricus rubellus*.

Penelitian tentang uji sitotoksik suatu bahan terhadap sel kanker telah banyak dikerjakan, tetapi masih belum ada penelitian tentang uji sitotoksik

kombinasi 5-fluorourasil dengan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* terhadap *cell line* HT-29 secara *in vitro*.

Dengan demikian, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan efek sitotoksik kombinasi kombinasi 5-fluorourasil dengan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* terhadap *cell line* HT-29 secara *in vitro* sehingga dapat menjadi dasar ilmiah dalam pengembangan terapi kombinasi dari pengobatan konvensional.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* meningkatkan efek sitotoksik terhadap *cell line* HT-29 secara *In Vitro*.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengetahui pengaruh kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* terhadap *cell line* HT-29 secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* dapat meningkatkan efek sitotoksik dibanding single terapi terhadap *cell line* HT-29.
2. Mengetahui IC_{50} dari kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* terhadap *cell line* HT-29.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi bidang keilmuan

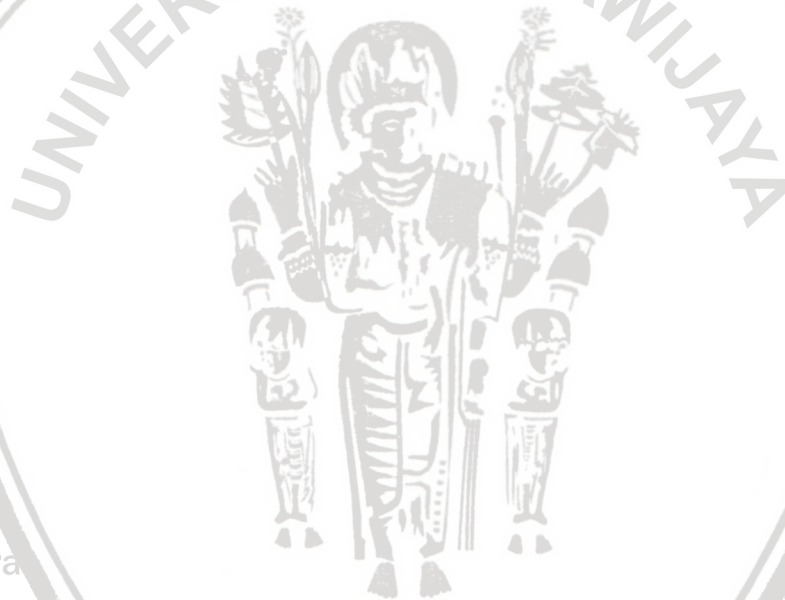
a. Memperluas ilmu pengetahuan tentang kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* yang dapat meningkatkan kadar sitotoksik terhadap *cell line*

HT-29.

b. Dapat digunakan sebagai terapi kombinasi pada kemoterapi kanker kolorektal.

1.4.2 Bagi masyarakat

Memberikan informasi kepada masyarakat bahwa kandungan dalam cacing tanah *Lumbricus rubellus* dapat dijadikan terapi kombinasi pada kemoterapi kanker kolorektal.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Kolon

2.1.1 Definisi

Kanker kolorektal adalah keganasan yang berasal dari jaringan usus besar, terdiri dari kolon (bagian terpanjang dari usus besar) dan atau rektum (bagian kecil terakhir dari usus besar sebelum anus) (Levin *et al.*, 2008).

2.1.2 Epidemiologi

Menurut WHO IAFRIC (2012) kanker kolorektal adalah kanker urutan ketiga yang banyak menyerang pria dengan persentase 10,0% dan yang kedua terbanyak pada wanita dengan persentase 9,2% dari seluruh penderita kanker di seluruh dunia. Hampir 55% kasus kanker kolorektal terjadi di negara maju dengan budaya barat. Ada variasi geografis dalam insidensi di seluruh dunia dimana insidensi tertinggi diperkirakan berada di Australia dan Selandia Baru dengan *Age Standardized Rate* (ASR) 44,8 pada pria dan 32,2 pada wanita per 100,000.

Kematian pasien kanker kolorektal lebih banyak terjadi di daerah yang kurang berkembang dengan persentase 52% dari jumlah kematian pasien kanker kolorektal di dunia. Tingkat kematian pasien kanker kolorektal tertinggi diperkirakan di Eropa Tengah dan Eropa Timur dengan ASR 20,3 per 100,000 untuk pria dan 11,7 per 100,000 untuk wanita. Tingkat kematian terendah terdapat di Afrika Barat dengan ASR 3,5 per 100,000 untuk pria dan 3,0 dari 100,000 untuk wanita (WHO IAFRIC, 2012).

Di Indonesia kanker kolorektal adalah keganasan yang sering terjadi baik pada pria dan wanita setelah kanker prostat dan kanker payudara dengan persentase 11,5% dari jumlah seluruh pasien kanker di Indonesia (WHO IAFRIC, 2012). Insidensi kanker kolorektal di Indonesia cukup tinggi, demikian juga angka kematiannya. Insidensi kanker kolorektal pada pria sebanding dengan wanita dan lebih banyak terjadi pada usia produktif. Hal ini berbeda dengan data yang diperoleh di negara barat dimana kanker biasanya terjadi pada pasien usia lanjut. Pada negara barat, perbandingan insidensi pada pria dan wanita adalah 3 banding 1 dan kurang dari 50% kanker kolon dan rektum ditemukan di rektosigmoid (Jong, 2013).

Kanker kolorektal banyak dijumpai pada usia produktif. Data kesehatan pada tahun 1996-2000 menunjukkan bahwa puncak insidensi kanker kolorektal di Jakarta terjadi pada usia 40-49 tahun dan 50-69 tahun (Kurniawati, 2011). Data lainnya dari Depkes menunjukkan insidensi kanker kolorektal dengan usia kurang dari 45 tahun pada 4 kota besar di Indonesia sebagai berikut, 47,85% di Jakarta, 54,5% di Bandung, 44,3% di Makassar dan 48,2% di Padang (Kumar *et al.*, 2007).

2.1.3 Etiologi

Etiologi kanker kolorektal sama seperti kanker lain, belum jelas hingga kini, tetapi sudah diperhatikan adanya kaitan dengan faktor berikut ini (Desen, 2013):

1. Hereditas dan kanker kolorektal

Risiko terkena kanker kolorektal untuk masyarakat umum adalah 1/50, risiko terkena kanker bagi generasi pertama pasien meningkat 3 kali menjadi 1/17, jika dalam keluarga generasi pertama terdapat 2 orang penderita, risikonya

naik menjadi 1/6. Sifat herediter familial ini pada kanker kolon lebih sering ditemukan dibandingkan kanker rektum.

2. Faktor diet

Umumnya dianggap tingginya masukan protein hewani, lemak dan rendahnya serat makanan merupakan faktor insiden tinggi kanker kolorektal. Masukan tinggi lemak, sekresi empedu juga banyak, hasil uraian asam anaerob dalam usus juga meningkat, sehingga karsinogen, pemacu karsinogenesis dalam usus juga bertambah mengarah ke timbulnya kanker kolorektal. Misalnya bakteri anaerob *Bacillus fusiformis* dapat mengubah asam deoksikolat menjadi 3-metilkolantren yang sudah terbukti merupakan karsinogen.

3. Kelainan usus besar nonkarsinoma

Seperti kolitis ulseratif kronis, poliposis, adenoma, dll. diperkirakan sekitar 3-5% kolitis ulseratif timbul kanker kolorektal. Riwayat kolitis ulseratif 20 tahun, kejadian kanker 12,5%; 30 tahun mencapai 40%. Ada yang berpendapat sekitar 15-40% karsinoma kolon berawal dari poliposis kolon, riwayat penyakit prekanker selama 5-20 tahun. Adenoma dapat berubah ganas, adenoma berdiameter 1 cm berubah ganas 0,9%, bila diameter 2,5 cm ke atas terdapat 12% berubah ganas.

4. Parasitosis

Data dari China menunjukkan sekitar 10,8-14,5% penyakit skistosomiasis lanjut berkomplikasi kanker usus. Di Mesir, kanker usus besar disertai skistosomiasis mansoni menempati 12,5-17,34%.

5. Lainnya

Misalnya faktor lingkungan berkaitan dengan kanker usus besar, di daerah defisiensi molibdenum kanker usus besar banyak, pekerja abses juga banyak menderita kanker usus besar. Kebiasaan defekasi, volume fekal, bakteri usus dan hubungannya dengan kanker kolorektal juga diteliti orang.

2.1.4 Jenis Kanker Kolorektal

1. Adenokarsinoma

Sebagian besar kanker kolorektal (98%) adalah tipe adenokarsinoma (Kumar *et al.*, 2007). Kanker muncul dari sel epitel kelenjar di lapisan dalam usus yang dapat menyebar ke dalam dinding kolon dan berpotensi untuk metastasis ke kelenjar getah bening (KGB). Adenokarsinoma muncul dari lapisan epitel kelenjar sehingga mensekresi mukus untuk melubrikasi bagian dalam kolon dan rektum (Rizqhan, 2014).

2. Karsinoid tumor

Kurang dari 2% keganasan kolorektum adalah jenis karsinoid tumor, tetapi hampir separuh dari tumor ganas usus halus adalah jenis karsinoid tumor. Tumor ini terbentuk dari sel Kulchitsky yang memproduksi hormon pada dinding usus yaitu 5-hidroksitriptamin. Karsinoid tumor sering ditemukan pada rektum dan apendiks namun biasanya asimtomatik dan jarang bermetastasis, walaupun mungkin memperlihatkan penyebaran lokal yang ekstensif (Kumar *et al.*, 2007).

3. Gastrointestinal stromal tumor (GISTs)

Tumor ini terbentuk dari sel spesifik pada dinding kolon disebut intestinal cells of Cajal. Tumor ini adalah tumor mesenkim yang menyerang traktus digestivus yang berasal dari sel ganglion myenteric. Terdapat jenis

benigna dan malignana. Tumor ini sering ditemukan di bagian traktus digestivus atas, namun pada hanya sekitar 5%. Ahli Patologi mendeskripsikan tipe GISTs ini sebagai spindle, epitheloid, dan campuran. Sekitar 70% GISTs merupakan tipe spindle, 20% merupakan tipe epitheloid, dan 10% merupakan tipe campuran (GIST Internasional, 2018).

2.1.5 Gejala klinis

Gejala klinis kanker kolorektal pada lokasi tumor di kolon kiri berbeda dengan kanan. Tumor di kolon kiri sering bersifat skirotik sehingga lebih banyak menimbulkan stenosis dan obstruksi karena feses sudah menjadi padat. Tumor pada kolon kiri dan rektum menyebabkan perubahan pola defekasi seperti konstipasi atau defekasi dengan tenesmi, semakin distal letak tumor feses semakin menipis atau seperti kotoran kambing atau lebih cair disertai darah atau ledir. Pada kanker kolon kanan jarang terjadi stenosis karena feses masih cair. Gejala umumnya adalah dispepsia, kelemahan umum penurunan berat badan dan anemia. Pada kanker di kolon kanan didapatkan masa di perut bagian bawah (Jong, 2013).

2.1.6 Diagnosis

Beberapa hal yang dapat digunakan untuk mendiagnosis pasien dengan kemungkinan kanker kolorektal (Desen, 2013):

1. Gejala klinis sebagai dasar

Gejala klinis kanker kolorektal stadium dini umumnya tidak menonjol, mudah terabaikan oleh pasien ataupun dokter. Laporan umum tentang angka kekeliruan diagnosis kanker kolorektal mencapai 50-60%,

kebanyakan keliru diagnosis dan keliru terapi setengah tahun lebih, ada yang sampai bertahun-tahun, bahkan kehilangan peluang kuratif. Maka semua pasien 20 tahun ke atas dengan: baru-baru ini muncul rasa tak nyaman di perut kontinu, nyeri samar, kembung, perubahan pola defekasi, timbul obstipasi atau diare, atau silih berganti; hematokezia; anemia atau penurunan berat badan dengan sebab tak jelas; massa abdominal harus dipikirkan kemungkinan kanker kolorektal dan dilakukan pemeriksaan lanjutan.

2. Pemeriksaan fisik

Inspeksi dan palpasi bagian abdomen, periksa ada tidaknya massa.

Kanker kolorektal belahan kanan 90% lebih terasa massa; dengan colok dubur: mudah dan sederhana, sangat berguna. Di China 80% lebih kanker kolorektal dapat ditemukan dengan colok dubur, bila posisi pasien miring kiri dengan kedua tungkai bawah ditekuk ke atas dapat diraba massa kanker yang lokasinya lebih tinggi. Dengan pemeriksaan harus diketahui lokasi massa, bentuk, ukuran, dan lingkup sirkumferens yang terkena, derajat mobilitas dasarnya, ada tidak stenosis lumen usus, apakah lesi mengenai jaringan organ sekitarnya. Juga harus diperhatikan di sarung tangan jari apakah terdapat noda darah dan sifat fekesnya, ada tidaknya nodul di dasar pelvis.

3. Endoskopi

Sekitar 70-75% kanker kolorektal terletak di dalam jarak 25 cm dari tepi anus, dengan sigmoidoskopi dapat dilihat lesi, kolon di atas 25 cm dapat dilihat dengan kolonoskopi fiberoptik. Pada waktu pemeriksaan dapat

dilakukan pemotretan, biopsi dan penyikatan untuk sediaan apusan bagi pemeriksaan sitologi.

4. Pemeriksaan *Colon in Loop*

Pemeriksaan *Colon in Loop* diperlukan untuk kanker di atas segmen tengah kolon sigmoid, dapat menemukan di lokasi tumor terdapat efek pengisian menetap, destruksi mukosa, kekakuan dinding usus, konstiksi lumen usus dan perubahan lain; juga dapat menemukan karsinomatosis kolon. Pemeriksaan ini angka positifnya dapat mencapai 90%. Setelah zat barium diekskresikan, dimasukkan udara, pemeriksaan kontras double sangat membantu untuk menemukan kanker kecil dan polip kecil. Bila sudah terdapat ileus tidak boleh dilakukan enema barium, terlebih lagi tidak boleh telan barium. Bila ada kecurigaan ileus, pada foto X-Ray tegak dan baring miring dapat ditemukan "fenomena tangga" permukaan cairan dan gas di beberapa lokasi lumen usus tipikal untuk ileus, bernilai penting untuk diagnosis.

2.1.7 Penatalaksanaan

1. Pembedahan

Pembedahan tetap merupakan pilihan utama pada penatalaksanaan kanker kolorektal yang terlokalisir. Pembedahan pada kanker kolon dilakukan seradikal mungkin dengan pertimbangan preservasi organ sekitar, sedangkan pada tumor rektum penggunaan teknik *total mesorectal excision* (TME) dapat mengurangi rekurensi lokal dan memperbaiki angka *survival*. Pada penyakit stadium lanjut reseksi merupakan pilihan yang terbaik. Terapi adjuvan dapat

berguna berupa radiasi terutama pada kanker rektum sebaiknya diberikan pada kasus yang resektabel maupun yang tidak resektabel (Benson *et al.*, 2017).

Pasien dengan karsinoma rektum stadium II-III berisiko tinggi untuk mengalami kekambuhan lokal dan sistemik. Tetapi adjuvan harus bertujuan menanggulangi kedua masalah tersebut (Benson *et al.*, 2017).

2. Kemoterapi

Umumnya digunakan terapi adjuvan intra dan pasca operasi, juga sering digunakan untuk pasien stadium lanjut yang non-operabel. Obat yang sering dipakai adalah fluorourasil (5-fluorourasil, FT-207. UFT, dll.), MMC, nitrosourea (seperti CCNU, Me-CCNU, dll). belakangan ini dikembangkan obat baru termasuk xeloda, oksaliplatin, irinotekan, C225, avastin, dll. secara klinis terbukti berefek terapeutik tertentu terhadap karsinoma kolorektal stadium lanjut. Secara klinis terapi karsinoma kolorektal umumnya dengan kemoterapi kombinasi atau ditambah modulator. Formula 5-fluorourasil + levamisol, pada masa awal dianggap dapat meningkatkan efektivitas terapi karsinoma kolon stadium III pasca operasi; formula 5-fluorourasil + leukovorin (CF) merupakan formula lebih baru dan efektif dewasa ini, setelah menambahkan oksaliplatin atau irinotekan pada 5-fluorourasil/CF, terjadi peningkatan efektivitas, survival juga lebih baik. Oleh karena itu sekarang ini keduanya (oksaliplatin + 5-fluorourasil/CF atau formula FOLFOX. Irinotekan + 5-fluorourasil/CF atau formula FOLFIRI) dapat diajukan sebagai terapi lini pertama. Xeloda memiliki kelebihan mudah diberikan peroral, efektivitas mirip 5-fluorourasil/CF namun efek toksik sumbu tulang lebih rendah, belakangan ini xeloda dipakai untuk menggantikan 5-fluorourasil/CF dikombinasi dengan oksaliplatin (XELOX atau CAPOX) atau dengan irinotekan (XELIRI atau CAPIRI) untuk terapi kanker usus

besar stadium lanjut. Formula tersebut dalam terapi kanker usus besar stadium lanjut memiliki efektivitas berkisar 46-57,1%. C225 dari avastin merupakan obat baru dengan target molekular, semuanya kompetitif menempati reseptor faktor pertumbuhan epitel (EGFR), menghambat aktivitas tirosin kinase sehingga berefek antitumor. Sedangkan avastin berikatan dan menetralkan aktivitas faktor pertumbuhan epitel vaskular (VEGF) hingga berefek antiangiogenesis.

Efektivitas keduanya dalam terapi kanker usus besar masih perlu penelitian lebih lanjut (Desen, 2013).

2.2 5-Fluorourasil

5-Fluorourasil (5-fluorourasil) merupakan agen kemoterapi utama yang digunakan untuk terapi kanker kolon. 5-fluorourasil bersifat inaktif dalam bentuk induknya dan memerlukan pengaktifan melalui suatu rangkaian kompleks reaksi enzimatik menjadi metabolit ribosil dan deoksiribosil-5'-monofosfat (FdUMP), membentuk suatu kompleks ternari terikat kovalen dengan enzim timidilat sintase dan folat 5, 10-metilentetrahidrofolat tereduksi, suatu reaksi yang sangat penting dalam sintesis de novo timidilat. Hal ini menyebabkan inhibisi sintesis DNA melalui "thymineless death" (Katzung, 2012).

Berdasarkan Katzung (2012), 5-fluorourasil diberikan secara intravena, dan aktivitas klinis obat ini sangat dependen jadwal. Karena waktu-paruhnya yang sangat singkat, dalam kisaran 10-15 menit, pemberian secara infus umumnya lebih disukai daripada secara bolus. Hingga 80-85% dari dosis 5-fluorourasil yang diberikan dikatabolisasi oleh enzim dihidropirimidin dehidrogenase (DPD). Perlu dicatat bahwa pada hampir 5% pasien kanker dijumpai suatu sindrom farmakogenetik yang melibatkan defisiensi parsial atau komplit enzim DPD; dalam

keadaan ini, dijumpai toksisitas berat dalam bentuk mielosupresi, diare, mual dan muntah, serta neurotoksisitas. 5-fluorourasil tetap merupakan obat yang paling luas digunakan dalam pengobatan kanker kolorektal, baik sebagai terapi adjuvan serta untuk penyakit stadium lanjut.

Cara kerja 5-fluorourasil adalah dengan cara mengganggu sintesis DNA yang menyebabkan tidak terbentuknya asam deoksiuridilat menjadi asam thymidylic. 5-fluorourasil juga mengganggu sintesis RNA. 5-fluorourasil bekerja lebih baik pada sel dengan aktivitas pertumbuhan yang tinggi dimana pemberian 5-fluorourasil juga pada dosis yang tinggi (MIMS, 2018).

5-Fluorouracil (5-fluorourasil) dikonversi menjadi 3 metabolit aktif utama yaitu: (1) fluoro-deoxyuridine monophosphate (FdUMP), (2) fluorodeoxyuridine triphosphate (FdUTP), dan (3) fluorouridine triphosphate (FUTP). Mekanisme utama aktivasi 5-fluorourasil adalah konversi menjadi fluorouridine monophosphate (FUMP) juga secara langsung oleh orotate phosphoribosyl transferase (OPRT), atau secara tidak langsung via fluorouridine (FUR) melalui aksi berurutan dari uridine phosphorylase (UP) dan uridine kinase (UK). FUMP kemudian difosforilasi menjadi fluorouridine diphosphate (FUDP), yang dapat juga difosforilasi lebih lanjut menjadi metabolit aktif fluorouridine triphosphate (FUTP), atau dikonversi menjadi fluorodeoxyuridine diphosphate (FdUDP) oleh ribonucleotide reductase (RR). Di sisi lain, FdUDP dapat pula di fosforilasi atau didefosforilasi menjadi metabolit aktif masing-masing FdUTP dan FdUMP. Jalur aktivasi alternatif lainnya melibatkan thymidine phosphorylase yang mengkatalisis konversi 5-fluorourasil menjadi fluorodeoxyuridine (FUDR), kemudian difosforilasi oleh thymidine kinase (TK) dan menjadi thymidylate synthase (TS) inhibitor, FdUMP. Ada pula enzim Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) yang

mengkonversi 5-fluorourasil menjadi dihydrofluorouracil (DHFU) yang tidak aktif.

DHFU adalah rate-limiting step katabolisme 5-fluorourasil pada sel normal dan sel tumor, dan proporsi dari pengrusakan menjadi metabolit tidak aktif mencapai 80% (Longley *et al.*, 2003).

Hal ini akan mengakibatkan induksi apoptosis karena penghambatan sintesis DNA yang disebabkan sel kekurangan deoksitimidin trifosfat (dTTP).

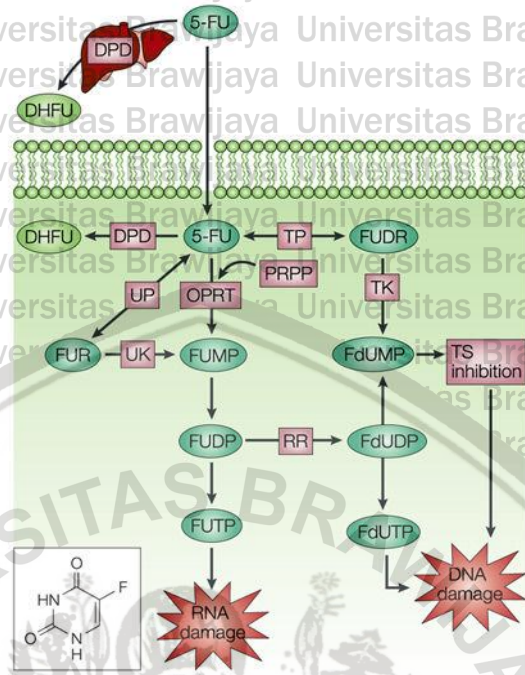
Peningkatan ekspresi TS pada sel kanker merupakan respon sel yang dapat mengakibatkan resistensi terhadap 5-fluorourasil (Giovanetti *et al.*, 2007).

Pada kaitannya dengan daur sel, 5-fluorourasil tidak dapat bekerja pada sel yang berada di luar daur sel (G0). 5-fluorourasil hanya bekerja pada sel yang aktif menjalankan daur sel di mana diperlukan aktivitas TS untuk sintesis basa penyusun DNA. TS diekspresikan tinggi pada fase G1 melalui perantara aktivitas transkripsi dari E2F. Setelah diekspresikan, TS sendiri langsung mensintesis prekursor dUMP yang diperlukan dalam fase sintesis. Perlakuan dengan 5-fluorourasil pada sel kanker dapat menyebabkan akumulasi sel pada fase G1 dan awal fase sintesis (G1/S arrest) (Liu *et al.*, 2006). Namun, bagaimanapun aktivitas penghambatan daur sel oleh 5-fluorourasil tergantung pada jenis sel kanker.

Pada sel kanker kolon HCT-15 dan HT-29, 5-fluorourasil menunjukkan penghambatan pada fase G2/M. 5-fluorourasil meningkatkan ekspresi cyclin A, cyclin B, dan CDC2 yang merupakan protein regulator pada fase G2/M (Lim *et al.*, 2007). Mekanisme yang memperantarai aktivitas pada fase tersebut masih perlu ditelusuri lebih lanjut. Pada sel Lovo dan WiDr, Backus *et al.*, (2001) melaporkan bahwa 5-fluorourasil menyebabkan penghambatan daur sel pada fase S. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas 5-fluorourasil tidak selamanya terkait dengan

aktivitas penghambatan TS dan diperlukan penelitian untuk konfirmasi aktivitas 5-fluorourasil pada daur sel jika digunakan sel yang berbeda.

5-fluorourasil dapat menginduksi terjadinya penghentian daur sel dan pemacuan apoptosis tanpa melibatkan peran p53, tetapi melibatkan peningkatan ekspresi p21 dan pRb. Kedua protein tersebut memiliki peran penting dalam sistem checkpoint pada fase G1. Ekspresi pRb tinggi akan menghambat aktivitas E2F sehingga menyebabkan penghambatan sel untuk melampaui R. Ekspresi p21 akan menghambat aktivitas cyclin E/CDK2 dan cyclin A/CDK2 sehingga dapat menyebabkan penghambatan daur sel pada fase G1 dan S. Sel yang berada pada fase G1 akan terhenti pada fase G1, sedangkan sel yang berada fase S akan terhenti pada fase tersebut. Resistensi yang disebabkan oleh 5-fluorourasil dapat terjadi melalui perantaraan penghambatan daur sel. Sel kanker dengan p21 mutan tidak dapat memacu penghentian daur sel sehingga langsung memacu apoptosis tetapi sel dengan p21 normal yang memacu penghentian daur sel akan memicu munculnya sel yang resisten. Aktivitas 5-fluorourasil dalam pemacuan apoptosis dapat melalui jalur p53 atau tidak (dependent or independent p53) (Levrero *et al.*, 2000). Hal ini dibuktikan bahwa 5-fluorourasil dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker yang mengalami defisiensi p53 atau memiliki p53 mutan.



Gambar 2.1 Cara kerja 5-Fluorourasil: melalui FdUMP membentuk TS inhibitor menyebabkan kerusakan DNA (Longley dan Johnston, 2003)

5-fluorourasil berinteraksi dengan warfarin dan dapat meningkatkan efek warfarin. 5-fluorourasil dapat menurunkan efek vaksin jika diberikan bersamaan.

Leucovorin dapat meningkatkan efek toksisitas 5-fluorourasil (MIMS, 2018).

Dari segi farmakokinetik, 5-fluorourasil tidak dapat ditentukan absorpsinya jika melalui oral dan diabsorpsi sedikit jika melalui topikal. Distribusinya melalui jaringan tubuh dan cairan termasuk *Blood Brain Barrier* (BBB). 5-fluorourasil dimetabolisme melalui hepar, dikatabolisme melalui *dihydropyrimidine dehydrogenase*. 5-fluorourasil diekskresi melalui 2 jalur, yaitu urine dan CO_2 dalam jumlah besar (MIMS, 2018).

Efek samping dari 5-fluorourasil yang ditemukan pada pasien antara lain neutropenia, stomatitis, diare, dan hand-food syndrome. Masing-masing efek ini terkait dengan metode pemberian yang diterapkan pada pasien (Meyerhardt *et al.*, 2005). Pada kasus yang efek samping 5-fluorourasil yang paling parah adalah

kardiotoksitas meskipun hal ini jarang ditemui (Thomas *et al.*, 2004).
 Dibandingkan dengan agen kemoterapi yang lain, 5-fluorourasil memiliki selektivitas yang tinggi pada aktivitas TS dan efek samping yang ditimbulkan relatif lebih ringan. Meskipun demikian, efektivitas 5-fluorourasil sebagai agen kemoterapi baru mencapai 15% sehingga diperlukan pengembangan agen kokemoterapi untuk meningkatkan efektivitas terapi dengan 5-fluorourasil (Meyerhardt *et al.*, 2005).

2.3 Sel Line sebagai Model Kanker Kolorektal

2.3.1 Cell Line HT29

Cell Line HT29 adalah sel line adenokarsinoma kolorektal manusia dengan morfologi epitel. Pertama kali didapatkan dari sel primer kanker kolorektal perempuan kaukasia berusia 44 tahun pada tahun 1964. Sel kanker ini sensitif terhadap pengobatan 5-fluorourasil dan oxaliplatin, yang merupakan pilihan terapi standar pada kanker kolorektal. Selain menjadi model kanker xenograft kanker kolorektal, sel line ini juga digunakan sebagai model in-vitro untuk mempelajari penyerapan, transportasi, dan sekresi oleh sel-sel usus. Dalam keadaan kultur standar, sel-sel ini akan tumbuh menjadi nonpolarized, undifferentiated multilayer (ATCC, 2012).

2.3.2 Cell Line WiDr

Sel line WiDr adalah sel kanker kolorektal manusia yang diisolasi dari usus besar perempuan berusia 78 tahun. Sel-sel WiDr berasal dari sel kanker kolorektal yang lain yaitu HT-29 (ATCC, 2012). Sel Carcinoembryonic antigen WiDr memproduksi dan memerlukan rentang waktu sekitar 15 jam untuk menyelesaikan

satu siklus sel. Salah satu karakteristik dari sel-sel WiDr adalah ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2) merangsang tinggi proliferasi sel WiDr (Palozza *et al.*, 2005).

sel WiDr adalah salah satu yang memiliki sensitivitas rendah untuk pengobatan dengan 5-fluorouracil (5-fluorourasil). WiDr yang transfeksi dengan p53 yang normal juga tidak menyebabkan peningkatan kepekaan terhadap 5-fluorourasil (Giovannetti, *et al.*, 2007). Resistensi sel WiDr ke 5-fluorourasil salah satunya dimediasi oleh peningkatan ekspresi ofthymidylate enzim sintetase yang merupakan target utama dari penghambatan 5-fluorourasil (Sigmond *et al.*, 2003).

2.4 Terapi Kombinasi

2.4.1 Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*)

Artanti *et al.*, (2003) melakukan pengujian aktivitas antioksidan benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) dan benalu nangka (*Macrosolen cochinchinensis*). Uji toksisitas dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) menunjukkan bahwa ekstrak etanol benalu relatif lebih bersifat toksik dibanding ekstrak airnya. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan senyawa yang aktif sebagai antioksidan tidak selalu bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach. Uji sitotoksitas dilakukan dengan menggunakan sel kanker melanoma B16, dimana ekstrak air benalu nangka menunjukkan aktivitas sitotoksik yang paling tinggi. Kromatografi lapis tipis (KLT) dan high pressure liquid chromatography (HPLC) menunjukkan bahwa kedua benalu tersebut mengandung senyawa yang serupa namun memiliki profil kromatogram yang berbeda.

Artanti *et al.*, (2003) menemukan bahwa ekstrak air dan ekstrak etanol benalu spesies *Dendrophthoe pentandra* yang tumbuh pada berbagai inang memiliki senyawa utama yang sama. Senyawa tersebut diperkirakan merupakan senyawa kuersetin, yaitu suatu senyawa flavanol glikosida yang merupakan market taksonomi dari famili *Loranthaceae*. Senyawa yang sama juga telah diisolasi dari benalu nangka (*Macrosolen cochinchinensis*). Senyawa inilah yang kemudian dimungkinkan sebagai senyawa aktif yang bertanggungjawab terhadap aktivitas antikanker benalu.

2.5 Cacing Tanah *Lumbricus rubellus*



Gambar 2.2 cacing *Lumbricus rubellus*: memiliki panjang ± 50 -105mm dengan 95-120 segmen (wikipedia)

2.5.1 Taksonomi

Taksonomi *Lumbricus rubellus* adalah sebagai berikut :

Super Kingdom : *Eukaryota*

Kingdom : *Animalia*

Sub Kingdom : *Metazoa*

Filum : *Annelida*

Kelas : *Oligochaeta*

Ordo : *Haplotaxida*

Sub Ordo : *Lumbricina*

Famili : *Lumbricidae*
Genus : *Lumbricus*
Spesies : *Lumbricus rubellus*
(Hoffmeister, 1843)

2.5.2 Nama Lain

Di luar negeri cacing *Lumbricus rubellus* disebut juga dengan *Red earthworm*, *Red Wiggler*, (*European*) *earthworm*, *Driftworm*, *Gardenworm*, *red marsh worm*. Sedangkan di Indonesia, cacing ini dikenal dengan sebutan cacing merah atau cacing lumbricus (Palungun, 2008).

2.5.3 Deskripsi *Lumbricus rubellus*

Cacing tanah jenis *Lumbricus* mempunyai bentuk tubuh gilig. Tubuhnya terdapat segmen luar dan dalam, berambut, tidak mempunyai kerangka luar, tubuhnya dilindungi oleh kutikula (kulit bagian luar), tidak memiliki alat gerak dan tidak memiliki mata. Jumlah segmen yang dimiliki sekitar 90-195 dan klitelum yang terletak pada segmen 27-32. Klitelium merupakan alat yang membantu perkembangan dan baru muncul saat cacing mencapai dewasa kelamin, sekitar 2 bulan (Ristek, 2009).

Adanya lendir pada tubuhnya yang dihasilkan oleh kelenjar epidermis mempermudah pergerakannya. Pada setiap segmennya terdapat organ seta yang berupa rambut yang relatif keras, berukuran pendek, dan memiliki daya lekat yang sangat kuat. Selain itu, terdapat pula prostomium yang merupakan organ syaraf perasa dan berbentuk seperti bibir.

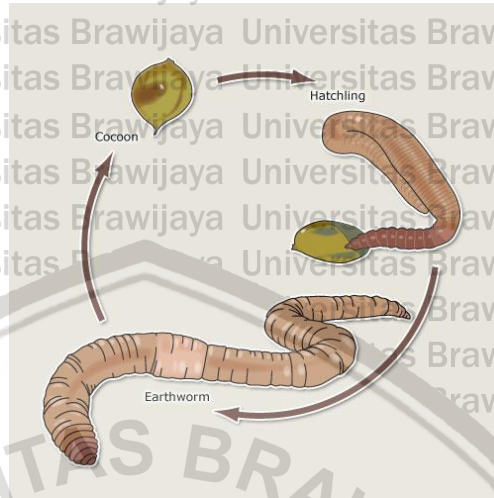
Di bagian akhir tubuhnya terdapat anus untuk mengeluarkan sisa-sisa makanan dan tanah yang dimakannya. Kotoran yang keluar dari anus *Lumbricus rubellus* dikenal dengan istilah kascing. Kascing terdiri dari berbagai komponen biologis (giberelin, sitokinin, auxin) maupun kimiawi (nitrogen, fosfor, kalium, belerang, magnesium, besi) yang sangat diperlukan untuk perkembangan dan pertumbuhan tanaman. Selain itu, kascing bersifat netral dengan pH 6,5-7,4 dan rata-ratanya adalah 6,8 (Palungkun, 2008).

2.5.4 Distribusi dan habitat

Tanah sebagai media hidup cacing harus mengandung bahan organik dalam jumlah yang besar. Bahan-bahan organik tanah dapat berasal dari serasah (daun yang gugur), kotoran ternak atau tanaman hewan yang mati. Cacing tanah menyukai bahan-bahan yang mudah membusuk karena lebih mudah dicerna oleh tubuhnya.

Untuk pertumbuhan yang baik, cacing tanah memerlukan tanah yang sedikit asam sampai netral atau pH sekitar 6-7,2. Dengan kondisi ini, bakteri dalam tubuh cacing tanah dapat bekerja optimal untuk mengadakan pembusukan atau fermentasi. Kelembaban yang optimal untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan cacing tanah adalah antara 15-30%. Suhu yang diperlukan untuk pertumbuhan cacing tanah adalah sekitar 15–250 C atau suam-suam kuku. Suhu yang lebih tinggi dari 250 C masih baik asal ada naungan yang cukup dan kelembaban optimal (Ristek, 2009).

2.5.5 Siklus Hidup



Gambar 2.3 siklus hidup *Lumbricus rubellus*: cocoon → hatching → earthworm (Yeates, 2008)

Setelah cacing tanah, telur yang telah dibuahi dipelihara dalam kepompong pelindung. Cacing bayi (*hatchlings*) muncul dan masuk ke dalam tanah, di mana mereka tumbuh menjadi remaja kemudian menjadi cacing matang (Yeates, 2008).

2.5.6 Kandungan Kimia dan Manfaat

Sejak ribuan tahun lalu *Lumbricus rubellus* telah banyak digunakan oleh masyarakat Cina sebagai obat berbagai macam penyakit (Mihara *et al.*, 1991).

Kandungan gizi *Lumbricus rubellus* cukup tinggi, terutama kandungan proteinnya yang mencapai 64-76% (Palungkun, 2008). Kandungan protein cacing ini ternyata lebih tinggi dari sumber protein lainnya, misalnya daging (65%) dan kacang kedelai (45%). Oleh karena itu, di Jepang, Hongaria, Thailand, Filipina, dan Amerika Serikat cacing ini juga dimanfaatkan sebagai bahan makanan manusia selain digunakan untuk ramuan obat dan bahan kosmetik (Sajuthi *et al.*, 2003).

Protein yang sangat tinggi pada tubuh *Lumbricus rubellus* ini terdiri dari setidaknya sembilan asam amino esensial dan empat macam asam amino non-esensial. Asam amino esensial ini antara lain arginin, histidin, leusin, isoleusin, valin, metionin, fenilalanin, lisin, dan treonin. Sedangkan asam amino non-esensial ialah sistin, glisin, serin, dan tirosin (Palungkun, 2008).

Banyaknya asam amino yang terkandung dalam tubuh cacing tanah ini memberikan gambaran bahwa tubuhnya mengandung berbagai jenis enzim yang sangat berguna bagi kesehatan manusia. Dari berbagai penelitian didapat bahwa *Lumbricus rubellus* mengandung enzim Lumbrokinase, peroksidase, katalase, dan selulosa (Palungkun, 2008).

Selain protein, kandungan gizi lainnya yang terdapat dalam tubuh cacing tanah antara lain lemak 7-10%, kalsium 0,55%, fosfor 1%, dan serat kasar 1,08%. Cacing tanah juga mengandung auxin yang merupakan zat perangsang tumbuh untuk tanaman (Palungkun, 2008).

Menurut Mihara et al. (1991) enzim Lumbrokinase merupakan enzim fibrinolitik kuat yang dapat menghidrolisis gumpalan fibrin dan trombus intravaskular. Pada purifikasi enzim ini dibagi menjadi 3 fraksi. Fraksi-fraksi tersebut masih dibagi lagi menjadi subfraksi-subfraksi. Fraksi F-I dibagi menjadi 3 subfraksi (F-I-1, F-I-2, dan F-I-3) yang memiliki karakteristik biokimiawi yang hampir sama. Fraksi F-II tidak dibagi lagi. Sedangkan fraksi F-III dibagi menjadi 2 subfraksi (F-III-1 dan F-III-2). Karena dapat memisahkan ikatan tyrosine, fraksi F-I disebut sebagai achymotrypsin-like enzyme. Fraksi F-III dapat memisahkan ikatan arginin dan lysin, sehingga disebut a trypsin-like enzyme. Sedangkan F-II tidak seperti chymotrypsin maupun lysin.

Lumbrokinase kaya akan asparagin dan asam aspartat, serta sedikit proline dan lysin. Lumbrokinase stabil terhadap panas dan memiliki pH optimal 7,4-9.

Karena tidak memiliki pH optimal puncak, dapat dikatakan bahwa Lumbrokinase mampu bertahan pada rentang pH yang luas. Berdasarkan sifat yang dimilikinya,

Lumbrokinase mempunyai kelebihan dibanding enzim proteolitik yang lain seperti plasmin dan urokinase karena Lumbrokinase dapat digunakan secara oral, sedangkan enzim lainnya secara parenteral (Mihara *et al.*, 1991).

Pada penelitian secara *in vitro*, Lumbrokinase dapat menghidrolisis fibrin kaya plasminogen, maupun fibrin bebas plasminogen, sehingga dapat disimpulkan bahwa Lumbrokinase bekerja sebagai perangsang plasminogen dan sekaligus dapat mencerna fibrin secara langsung (Mihara *et al.*, 1991).

Menurut Kobayashi et al (2004), cacing *Eisenia foetida* yang memiliki famili yang sama dengan *Lumbricus rubellus* ini memiliki efek sitotoksik melalui protein Lysenin. Lysenin adalah protein 33kDa yang terdapat dalam coelomic fluid *Eisenia foetida*. Terdapat efek sitotoksik Lysenin dari sel limpa normal dan sel tumor lain, kecuali sel melanoma B16F10. Dosis toksisitas efektif minimum sekitar 0,03 mg/ml dan toksisitas maksimum diamati pada sekitar 2,5 mg/ml.

2.6 Uji Sitotoksik Secara *In Vitro*

Uji *in vitro* kemo-resisten dan kemo-sensitivitas telah dikembangkan untuk memberikan informasi tentang karakteristik keganasan individual pasien untuk memprediksi respon potensi kanker mereka terhadap obat spesifik. Metode uji *in vitro* memberikan beberapa keuntungan, antara lain dapat digunakan sebagai langkah awal dalam pengembangan suatu obat, merupakan metode yang cepat, hanya memerlukan sedikit senyawa yang digunakan dalam pengujian, secara

drastis dapat mengurangi penggunaan hewan laboratorium dan untuk beberapa tujuan penggunaan kultur sel primer dari bermacam-macam organ target (hati, paru-paru, ginjal, kulit, SSP) dapat memberikan informasi tentang potensi efeknya pada sel target manusia secara langsung (Doyle *et al.*, 2000).

Uji sitotoksik adalah uji *in vitro* yang menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas anti neoplastik dari suatu senyawa. Penggunaan uji sitotoksik pada suatu sel merupakan salah satu cara penetapan *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat yang sitotoksik. Sistem ini merupakan uji kualitatif dengan cara menetapkan kematian sel. Akhir dari uji sitotoksik dapat memberikan informasi konsentrasi obat yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup (Doyle *et al.*, 2000).

Uji sitotoksik digunakan untuk memprediksi keberadaan obat sitotoksik baru dari bahan alam yang berpotensi sebagai anti kanker. Adapun dasar dari percobaan ini antara lain, bahwa sistem penetapan aktivitas biologi akan menghasilkan kurva dosis respon dan kriteria respon yang seharusnya menunjukkan hubungan lurus dengan jumlah sel. Informasi yang didapat dari kurva seharusnya berhubungan dengan efek *in vivo* dari obat sitotoksik yang sama (Padmi, 2008).

Metode uji sitotoksik yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah metode MTT, dimana prinsip kerjanya adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan *reagen stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA *reader*. Intensitas warna ungu yang

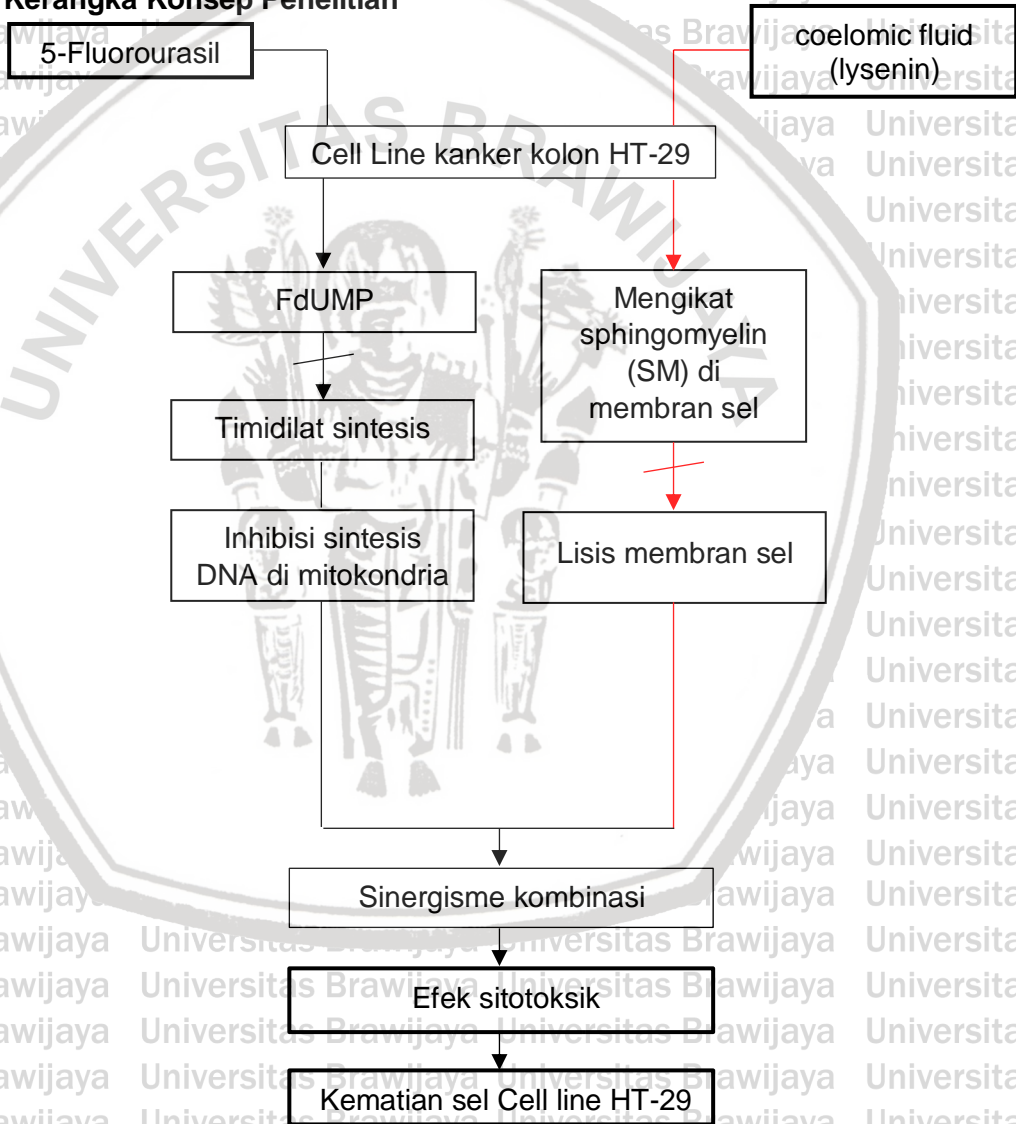
terbentuk proposional dengan jumlah sel yang hidup. Sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak.



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan:

-  : yang diuji
 : memacu
 : menghambat

5-fluorourasil adalah obat antimetabolit yang kebanyakan digunakan untuk pengobatan kanker, terutama kanker kolorektal. 5-fluorourasil bersifat inaktif dalam bentuk induknya dan memerlukan pengaktifan melalui suatu rangkaian kompleks reaksi enzimatik menjadi metabolit ribosil dan deoksiribosil-5'-monofosfat (FdUMP) menghambat timidilat sintase dengan akibat hambatan sintesis DNA

Coelomic fluid dari *Eisenia foetida* memiliki efek sitotoksik melalui protein Lysenin. Lysenin merupakan protein 33kDa yang merusak sel kanker melalui ikatan dengan sphingomyelin (SM) di membran sel. Kemudian Lysenin menyebabkan lisisnya membran sel.

Kombinasi dari 5-fluorourasil dan Coelomic fluid dari *Lumbricus rubellus* ini akan membentuk sinergisme kombinasi yang bisa memberikan efek sitotoksik dan menyebabkan kematian sel HT-29.

3.2 Hipotesis Penelitian

Dari kerangka konsep diatas, maka di buat hipotesis penelitian, yaitu: kombinasi 5-fluorourasil dengan coelomic fluid dari *Lumbricus rubellus* dapat meningkatkan efek sitotoksik pada cell line HT-29.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan ini menggunakan penelitian eksperimental laboratoris yang bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* terhadap *cell line* HT-29 secara *in vitro*.

4.2 Sampel Penelitian

4.2.1 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah *cell line* HT-29 yang diperoleh dari ATCC HTB-38™.

Jumlah sampel dengan rumus (Kosasih, 2013)

$$p(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

p = Jumlah perlakuan

n = Jumlah pengulangan

artinya dilakukan pengulangan minimal 4 kali sehingga sampel total yang diperlukan adalah 20 sampel dengan rincian untuk 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan sebagai berikut :

- Tanpa perlakuan (kontrol negatif)
- Pemberian 5-fluorourasil 5µg/ml (kontrol positif)
- Pemberian 5-fluorourasil 5µg/ml + coelomic fluid 5µg/ml
- Pemberian 5-fluorourasil 5µg/ml + coelomic fluid 10µg/ml
- Pemberian 5-fluorourasil 5µg/ml + coelomic fluid 20µg/ml

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus*.

4.3.2 Variabel tergantung

Variabel terkait dari penelitian ini adalah persentase dari kematian *cell line* HT-29.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

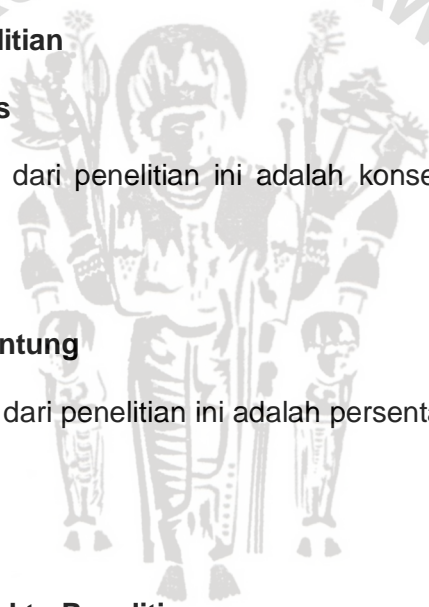
4.4.1 Tempat Penelitian

Tempat penelitian adalah Laboratorium Biomedik dan Parasitologi FKUB.

4.4.2 Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli 2017 – Agustus 2017.

4.5 Alat dan Bahan



4.5.1 Kultur *cell line* HT-29

4.5.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam kultur *cell line* HT-29 adalah mikropipet, flask, *ependorf tube*, mikrotip (*bluetip* dan *yellow tip*), sentrifus, tabung sentrifus

15ml dan 50ml, botol medium 100ml dan 1000ml, kulkas, inkubator, *96 well-plate*, *Laminar Air Flow* (LAF), Bunsen spiritus, korek, filter 0,2 μ dan spuit 10 cc.

4.5.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam kultur sel adalah *cell line* HT-29, *Mc.Coy 5a Medium Sigma*, FBS, PBS, tripsin-EDTA, Amphotericin B, penisilin-streptomycin, *coelomic fluid*, 5-fluorourasil, 5% CO₂, NaHCO₃, dan *sterile water*.

4.5.2 Ekstraksi *Coelomic Fluid*

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam ekstraksi *coelomic fluid* diantaranya kertas saring, kotak plastik, sentrifuse, termometer, mikropipet, mikrotip (*blue tip* dan *yellow tip*), pemanas, labu erlenmeyer, *ependorf tube*, *aliquot*, saringan santan, kulkas, dan pinset.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam ekstraksi *coelomic fluid* menggunakan metode *cold and heat shock* diantaranya: *Lumbricus rubellus*, *icepack*, PBS dan aquadest.

4.5.3 Uji MTT

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam pemaparan *coelomic fluid* pada kultur *cell line* HT-29 adalah 96 well-plate, mikropipet, mikrotip (*blue tip* dan *yellow tip*), tabung sentrifus 15ml 2 buah, *ependorf tube*, LAF, inkubator, *Elisa reader*.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam uji MTT yaitu *cell line* HT-29, PBS, MTT 5mg/ml, 5% CO₂, 4mM HCl, 0,1% Nondet P-40 (NP40) all in isopropanol.

4.6 Definisi Operasional

4.7.1 Kultur *cell line* HT-29

Kultur sel merupakan proses penghilangan atau perpindahan sel dari manusia, hewan, atau tanaman ke dalam medium terkontrol yang sesuai untuk menumbuhkan sel tersebut (Khumairoh, 2017). *Cell line* HT-29 adalah sel adenokarsinoma kanker kolorektal yang didapatkan dari ATCC HTB38™ dan dilakukan kultur di Laboratorium Biomedik dan Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.7.2 5-fluorourasil

5-fluorourasil adalah obat anti-metabolit yang diperoleh dari Sigma Company dengan konsentrasi yang digunakan 5µg/ml (Abdullah *et al.*, 2016).

4.7.3 *Lumbricus rubellus*

Lumbricus rubellus (Cacing Tanah) didapatkan dari CV Rumah Alam Jaya Organik, Jl. S. Supriadi Gang 9 Sukun Malang.

4.7.4 *Coelomic fluid*

Coelomic fluid adalah cairan yang didapatkan dari *Lumbricus rubellus* dengan metode cold and heat shock (Veeramani, 2010).

4.7.5 MTT Assay

MTT Assay adalah mekanisme uji sitotoksik *cell line* HT-29 terhadap perlakuan kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* yang kemudian dihitung persentase kematian selnya untuk mendapatkan nilai IC_{50} (Riss *et al.*, 2013).

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1 Pengambilan *Coelomic Fluid* dengan Cara *Cold Dan Heat Shock*

Pada tahap pengambilan *coelomic fluid* didapatkan dari cacing tanah seberat 15 gram dicuci bersih dengan *aquadest* kemudian PBS. Cacing kemudian ditempatkan pada wadah dan meletakkan *ice pack* yang telah dibungkus plastik diatas cacing sehingga cacing bisa merasakan penurunan suhu karena es di atasnya. Cairan *coelomic* dilepaskan melalui pori-pori punggung pada tubuh karena "*cold shock*". Kemudian selang 5 menit bergantian diletakkan air panas diatas cacing menggunakan labu erlenmeyer (*heat shock*). Selanjutnya dilakukan bergantian antara *cold and heat shock* setiap 5 menit. *Coelomic fluid* yang keluar dikumpulkan dalam tabung reaksi yang kering, bersih dan steril. Cairan *coelomic* yang terkumpul kemudian disentrifugasi pada 5000rpm selama 10 menit untuk mendapatkan supernatan. Supernatan disterilkan melalui penyaring menggunakan jarum suntik 0.2 μ M steril. Filtrat disimpan dalam *aliquot* di suhu – 20°C untuk digunakan lebih lanjut dan analisis (Veeramani, 2010).

4.7.2 Kultur Sel HT-29

Sebelum *thawing*, dilakukan disinfeksi alat kultur. Medium komplet (McCoy's 5a + 10 % (v/v) FBS) dimasukkan dalam *waterbath* dengan suhu 35-37°C. Vial yang berisi sel beku dikeluarkan dari nitrogen cair, dan dithaw ke dalam *waterbath* dengan suhu 35-37°C. Proses *thawing* tersebut tidak boleh terlalu lama hanya

sekitar 2-3 menit kemudian ditransfer ke dalam tabung sentrifus 15 ml. Kemudian dengan pipet 1 ml sel dalam vial yang sudah dithaw sebanyak 1 ml dipindahkan dalam tabung sentrifus yang telah berisi 9 ml medium komplit dan dilakukan *pipetting* (ATTC, 2012).

Tabung berisi sel dan medium disentrifus pada 125xg pada suhu ruang selama 8-10 menit dan setelah supernatan dibuang, pellet ditambahkan 10 ml medium komplit pada tabung tersebut kemudian diresuspensi dengan *pipetting*. *Suspense* yang didapat dipindahkan dalam TC-25 cm² flask yang sudah terlabel (ATTC, 2012).

Flask disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C ± 1°C dan 5% CO₂ sampai sel sudah konfluen 80-90%. Kultur diamati dengan mikroskop *inverted* untuk meyakinkan bahwa kultur bebas dari kontaminasi dan mencapai konfluen (ATTC, 2012).

4.7.3 Tripsinisasi dan Panen Sel Kultur

Media kultur disiapkan dan dihangatkan kemudian flask dikeluarkan dari inkubator. Sel-sel pada flask dibilas dengan medium dasar dan pembilasan dilakukan 2 kali pada setiap flask. Kemudian menambahkan tripsin EDTA sebanyak 3 ml pada kultur sel dan diinkubasi pada inkubator CO₂ selama 5 menit.

Flask selanjutnya dikeluarkan dari inkubator, sel yang lepas dari dasar kemudian ditambahkan medium komplit 5 ml dan dipindahkan dengan pipet ke tabung sentrifus. Sebanyak 100µl diambil dan dihitung untuk kebutuhan subkultur (ATTC, 2012).

Sel disubkultur pada 96 *well-plate* dengan masing-masing *well* berisi 1x10⁴ sel untuk uji MTT. Kemudian diletakkan pada inkubator suhu CO₂ selama 24 jam (Riss, 2013).

4.7.4 Perlakuan secara *In Vitro*

Kultur *cell line* HT-29 dicuci menggunakan McCoy's 5a sebanyak 3 kali.

Kemudian ditambahkan 5-fluorourasil 5µg/ml dan dilarutkan di McCoy's 5a dan media komplit sekitar 4 jam, lalu beri *coelomic fluid*. Kemudian 96 well-plate dibungkus menggunakan kertas aluminium lalu diletakkan kembali pada inkubator suhu CO₂ selama 24 jam (Riss, 2013). Pemberian perlakuan kemudian disesuaikan dengan kelompok yaitu tanpa perlakuan (kontrol negatif), pemberian 5-fluorourasil 5µg/ml (kontrol positif), pemberian 5-fluorourasil 5µg/ml + *coelomic fluid* 5µg/ml, pemberian 5-fluorourasil 5µg/ml + *coelomic fluid* 10µg/ml, pemberian 5-fluorourasil 5µg/ml + *coelomic fluid* 20µg/ml (Wang *et al*, 2015).

4.7.5 Pembuatan larutan *MTT Solution* dan *MTT Solvent*

Larutan *MTT Solution* dibuat untuk melakukan uji MTT dan *MTT Solvent* untuk stopper reaksi MTT. *MTT Solution* dibuat dengan cara menimbang bubuk MTT di timbangan digital sebanyak 0,001gr yang kemudian dicampurkan dengan PBS steril (proses steril didalam LAF) kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Kemudian dilanjutkan membuat larutan *MTT Solvent* yang digunakan sebagai stopper reaksi MTT. *MTT Solvent* dibuat dengan cara menimbang bubuk SDS di timbangan digital sebanyak 0,01gr kemudian dicampurkan dengan isopropanol sebanyak 10ml dan HCl sebanyak 40µl kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Larutan *MTT Solution* dan *MTT Solvent* disimpan dengan cara botol larutan dibungkus dengan kertas aluminium kemudian disimpan di kulkas dengan suhu 0°C. kedua larutan tersebut dapat digunakan untuk 6 bulan kedepan jika disimpan dalam kulkas dengan suhu 0°C (Riss, 2013).

4.7.6 *MTT Assay*

Kultur *cell line* HT-29 yang telah diberi perlakuan dan telah diinkubasi selama 24 jam dikeluarkan dan dipindahkan ke LAF untuk dilakukan uji MTT.

Pertama ambil larutan *MTT Solution* dan *MTT Solvent* dari kulkas kemudian hangatkan dengan tangan hingga es hilang. Kemudian masukkan *MTT Solution* ke seluruh *well* sebanyak 20µl kecuali kontrol negatif. Kemudian kembalikan ke inkubator dan tunggu selama 4 jam. Setelah 4 jam, keluarkan dari inkubator.

Buang medium yang telah diberi *MTT Solution*. Lakukan stopper MTT dengan cara tambahkan *MTT Solvent* sebanyak 150µl dan digoyang plate selama 15 menit.

Kemudian baca hasil MTT dengan *Elisa reader* menggunakan absorbansi 630nm (Riss, 2013).

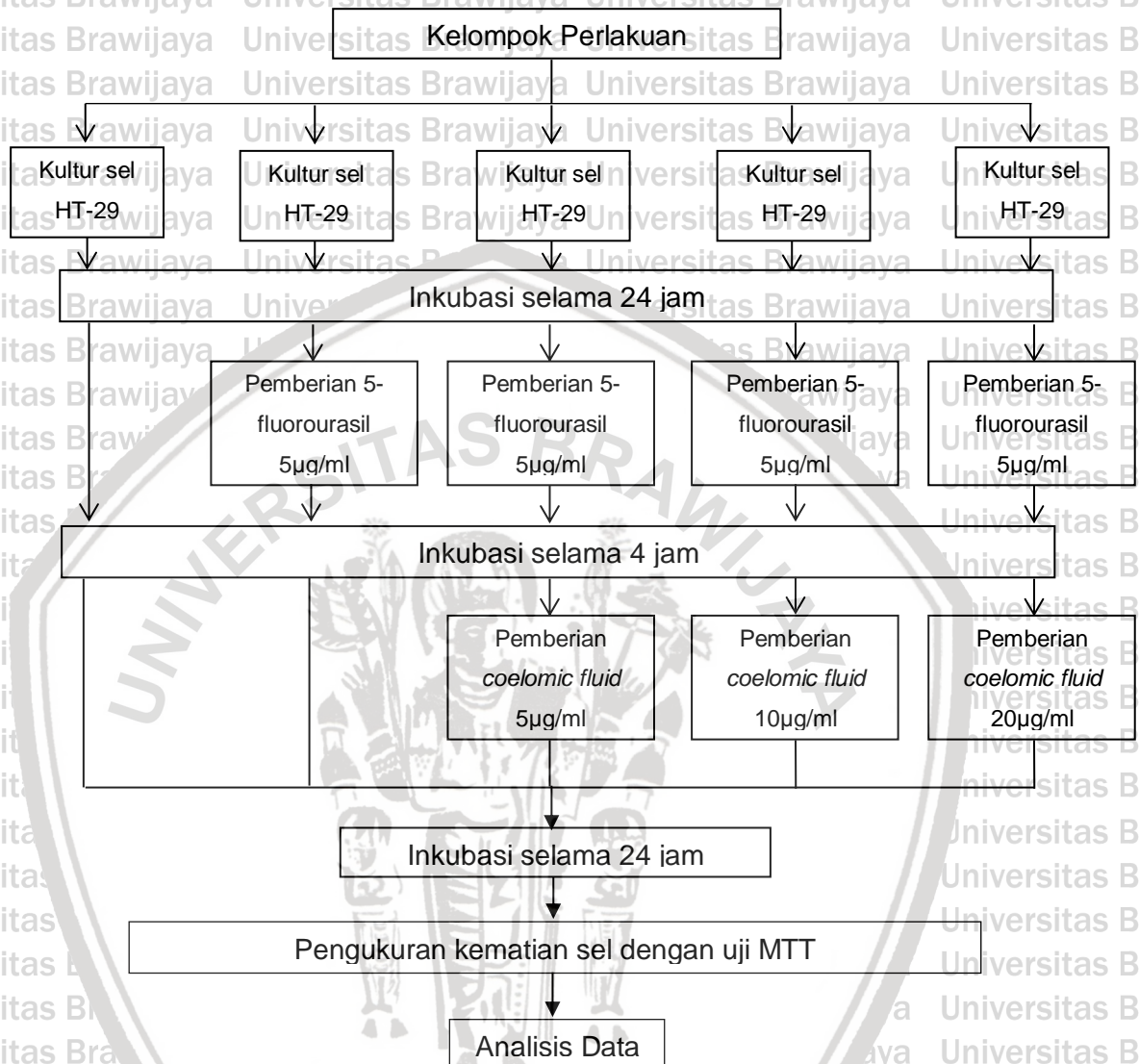
4.7.7 Analisa Data MTT Assay

Selanjutnya hasil absorbansi dianalisa menggunakan rumus persentase kematian sel:

$$\frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi media}) - (\text{absorbansi sel sampel} - \text{absorbansi media})}{(\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi media})} \times 100\%$$

Kemudian hasil persentase kematian sel dicari nilai IC₅₀ menggunakan analisa probit menggunakan SPSS 16.0. (Noor, 2012).

4.7.8 Bagan Alur Penelitian



4.8 Analisis Data

Pada akhir penelitian didapat 5 kelompok data kuantitatif berupa Persentase kematian sel yang mengekspresikan jumlah sel yang mengalami kematian dari kelompok perlakuan dan kontrol. Kemudian dilakukan perhitungan IC_{50} pada hasil rata-rata persentase kematian sel.

Analisa yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan SPSS 16.0. Uji normalitas (*Shapiro-Wilk test*) dan uji homogenitas (*Levene test*) dilakukan sebelum melakukan uji *One Way ANOVA*. Jika sebaran data normal dan homogen maka dilakukan uji beda dengan *One Way ANOVA*. Data dianalisis dengan *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Jika hasilnya signifikan maka test *Post-Hoc*. Jika pada uji normalitas (*Shapiro-Wilk test*) dan uji homogenitas (*Levene test*) tidak berhasil maka uji *One-Way ANOVA* tidak dapat dilakukan, maka bisa digantikan dengan uji *Krusal-Wallis*. Jika pada uji *Krusal-Wallis* didapatkan hasil signifikan maka bisa dilakukan uji *Post-Hoc* menggunakan uji *Mann-Withney*.



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian ini menggunakan sel kanker kolorektal (HT-29) yang disubkultur di laboratorium biomedik sebagai objek penelitian. Subkultur dilakukan pada 96-*well plate* yang terbagi dalam empat kelompok yang masing-masing terdiri dari empat *well plate*. Dalam metode *MTT Assay* diperlukan dua jenis kontrol, yaitu kontrol medium (blank) yang hanya berisi medium Mc Coy 5a, serta kontrol negatif yang berisi sel HT-29 dan medium Mc Coy 5a. Empat kelompok terdiri dari satu kelompok kontrol negatif dan tiga kelompok perlakuan yang masing-masing dipapar dengan supernatan kombinasi 5-fluorourasil dalam konsentrasi 5 µg/ml dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* dalam tiga konsentrasi yang berbeda, yaitu 5 µg/ml, 10 µg/ml dan 20 µg/ml dari volume total dan kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah inkubasi selesai, dilakukan *MTT Assay* untuk menguji kematian *cell line* HT-29. Kemudian dilakukan pembacaan absorbansi dengan *Elisa reader* pada gelombang 630nm.

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Persentase kematian *cell line* HT-29

Persentase kematian *cell line* HT-29 yang pada masing-masing perlakuan didapatkan dari hasil absorbansi *Elisa reader* dan kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut.

Kematian sel (%):

$$\frac{(absorbansi\ kontrol - absorbansi\ media) - (absorbansi\ sel\ sampel - absorbansi\ media)}{(absorbansi\ kontrol\ sel - absorbansi\ media)} \times 100\%$$

Berdasarkan hasil pembacaan absorbansi dan perhitungan kematian sel, didapatkan persentase kematian *cell line* HT-29 pada tabel 5.1

Tabel 5.1 persentase kematian *cell line* HT-29

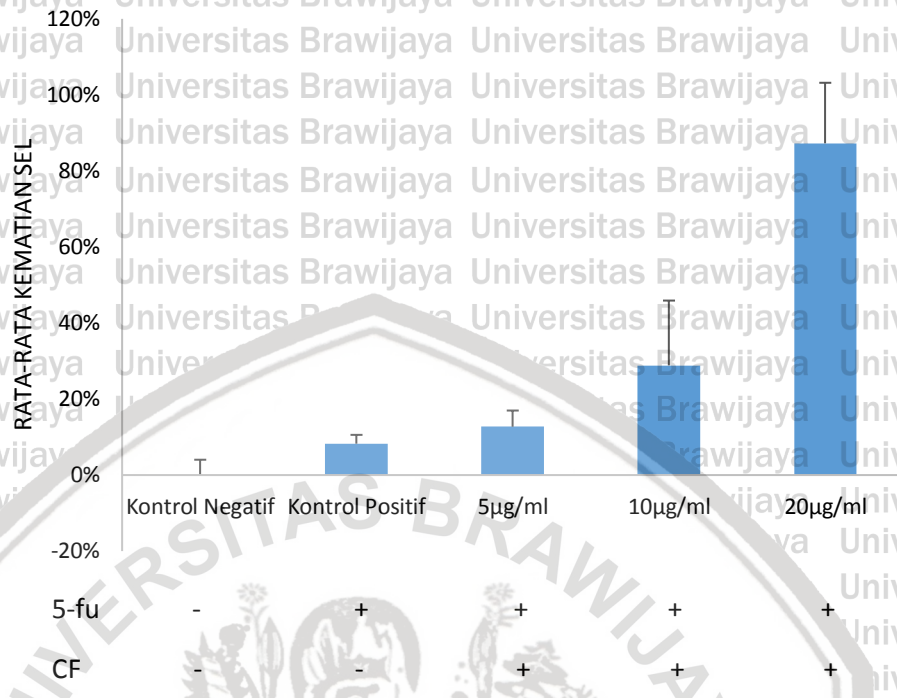
Konsentrasi	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Rata-Rata
A	0%	0%	3%	2%	1%
B	5%	10%	9%	9%	8%
C	13%	18%	10%	10%	13%
D	42%	12%	39%	22%	29%
E	89%	69%	100%	91%	87%

Keterangan: A: kontrol negatif (medium+sel); B: kontrol positif (medium+sel+5 µg/ml 5-fluorourasil); C: perlakuan 1 (medium+sel+5 µg/ml kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus*); D: perlakuan 2 (medium+sel+10 µg/ml kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus*); E: perlakuan 3 (medium+sel+20 µg/ml kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus*) (p < 0,05)

Pada tabel 5.1 menunjukan bahwa secara umum, peningkatan konsentrasi kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* akan menyebabkan peningkatan persentase kematian sel HT-29. Pada konsentrasi tertinggi yaitu 20 µg/mL kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* mampu menghambat pertumbuhan sel kanker sebesar 87%. Obat yang digunakan (kontrol positif), 5-fluorourasil dengan konsentrasi 5µg/ml mempunyai efek kematian sel HT-29 sebesar 8%.

5.1.2 Grafik hubungan konsentrasi terhadap kematian sel HT-29

Hubungan antara konsentrasi perlakuan terhadap persentase rata-rata kematian sel HT-29 ditunjukkan pada gambar 5.1.



Gambar 5.1 Grafik persentase rata-rata kematian sel terhadap konsentrasi pemberian perlakuan

Pada gambar 5.1 tampak adanya peningkatan persentase kematian sel, dengan peningkatan tertinggi pada perlakuan 3. Hal ini menunjukkan bahwa kematian sel tertinggi didapatkan pada perlakuan dengan paparan dosis tertinggi yaitu 20 µ/ml (perlakuan 3).

5.2 Analisis Data

5.2.1 Nilai IC₅₀ dari rata-rata Kematian Sel HT-29

Berdasarkan tabel 5.1, kemudian dihitung IC₅₀ menggunakan analisis probit dengan program SPSS 16.0 ditunjukkan pada tabel 5.2

Tabel 5.2 Nilai IC₅₀

Konsentrasi	Rata-rata %Kematian Sel (Dalam Persen)	IC ₅₀
Kontrol negatif	0,00	13,496 µg/ml
Kontrol positif	8,00	
Perlakuan 1 (5µg/ml)	13,00	
Perlakuan 2 (10µg/ml)	29,00	
Perlakuan 3 (20µg/ml)	87,00	

Keterangan: Nilai IC₅₀ yang dihitung dari rata-rata persentase kematian sel

Pada tabel 5.2 menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ dari rata-rata persentase kematian sel HT-29 adalah 13,496 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan 3 yaitu 20 µ/ml kombinasi 5-fluorourasil dan coelomic fluid dari *Lumbricus rubellus* dapat memenuhi nilai IC₅₀ tersebut.

5.2.2 Uji Kenormalan dan Uji Homogenitas

Setelah dihitung nilai IC50, dilakukan analisis *one-way ANOVA* untuk mengetahui apakah kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* memiliki perbedaan yang signifikan. Sebelum diuji *one-way ANOVA*, maka data harus dinyatakan data parametrik, yaitu data memiliki sebaran normal dan memiliki varian yang homogen. Untuk mengetahui normalitas sebaran data, perlu dilakukan uji *Shapiro-Wilk* dengan kriteria apabila $p > 0.05$ ($\alpha = 5\%$) maka data dinyatakan normal. Pengujian normalitas data yang dihasilkan uji *Shapiro-Wilk* (lampiran 1) sebesar 0.288 maka data dinyatakan normal.

Selanjutnya, untuk uji homogenitas menggunakan uji *Levene*, dengan kriteria apabila $p > 0.05$ ($\alpha = 5\%$) maka data dinyatakan homogen. Pengujian homogenitas data yang dihasilkan dari uji *Levene* (lampiran 2) mendapatkan nilai signifikansi sebesar 0.008 maka data dinyatakan tidak homogen. Data yang tidak homogen tidak dapat digunakan untuk persyaratan uji *one-way ANOVA*, sehingga penelitian ini akan menggunakan uji analisis *Kruskal Wallis*.

5.2.3 Uji Kruskal Wallis

Untuk mengetahui apakah data memiliki nilai yang signifikan maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* dengan kriteria $p < 0.05$ maka data dapat dikatakan ada perbedaan yang berarti antar kelompok perlakuan. Setelah dilakukan uji statistik *Kruskal Wallis* (lampiran 3), didapatkan nilai signifikansi sebesar 0.001 maka data dinyatakan memiliki perbedaan yang berarti antar kelompok perlakuan.

Untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan tersebut, maka dilakukan uji *post hoc* dengan uji *Mann Withney*.

5.2.4 Uji Mann Withney

Setelah mendapatkan nilai signifikan pada uji *Kruskal Wallis*, maka untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan yang berarti, dilakukan uji *Mann Withney* sebagai uji *post hoc*. Melalui uji *post hoc* diketahui ($p < 0,05$):

- a. Kontrol negatif memiliki perbedaan yang berarti (lampiran 4) dengan rata-rata kontrol positif ($p = 0.019$), perlakuan 1 ($p = 0.019$), perlakuan 2 ($p = 0.020$), dan perlakuan 3 ($p = 0.020$).
- b. Kontrol positif memiliki perbedaan yang berarti (lampiran 5) dengan perlakuan 1 ($p = 0.037$), perlakuan 2 ($p = 0.020$), perlakuan 3 ($p = 0.020$).
- c. Perlakuan 1 tidak memiliki perbedaan yang berarti (lampiran 6) dengan perlakuan 2 ($p = 0.081$) namun memiliki perbedaan yang berarti (lampiran 7) pada perlakuan 3 ($p = 0.020$).
- d. Perlakuan 2 memiliki perbedaan yang berarti (lampiran 8) dengan perlakuan 3 ($p = 0.021$).

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang dilakukan untuk mengetahui bahwa kombinasi 5-Fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* dapat meningkatkan efek sitotoksik lebih baik dari *single therapy* terhadap *cell line* HT-29 dengan menggunakan metode MTT assay. Pada penelitian ini terdapat variabel bebas berupa kelompok kontrol, kelompok perlakuan dengan konsentrasi ekstrak *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* 5 µg/mL, 10 µg/mL dan 20 µg/ml. Variabel terkait adalah kematian *cell line* HT-29.

6.1 Kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* dapat meningkatkan efek sitotoksik dibanding *single therapy* terhadap *cell line* HT-29

Berdasarkan gambar 5.1, diketahui bahwa 5-Fluorourasil dengan konsentrasi 5 µg/ml mampu menghambat pertumbuhan *cell line* HT-29 sebesar 8% sedangkan pada kombinasi 5-Fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* dengan konsentrasi 5 µg/ml mampu menghambat pertumbuhan *cell line* HT-29 sebesar 13% ($p < 0,05$). 5-Fluorourasil merupakan agen kemoterapi utama yang digunakan untuk terapi kanker kolon. Mekanisme kerja 5-fluorourasil bersifat inaktif dalam bentuk induknya dan memerlukan pengaktifan melalui suatu rangkaian kompleks reaksi enzimatik menjadi metabolit ribosil dan deoksiribosil-

5'-monofosfat (FdUMP) menghambat timidilat sintase dengan akibat hambatan sintesis DNA (Gunawan, 2008).

Pada penelitian Li *et al.*, (2015), 5-Fluorourasil saja menghasilkan tingkat respon yang rendah, reaksi yang merugikan dan toksisitas yang secara bertahap membuat obat ini berbahaya. Toksisitas utama 5-Fluorourasil mencakup mielosupresi, toksisitas gastrointestinal dalam bentuk mukositis dan diare, toksisitas kulit yang bermanifestasi sebagai sindrom tangan-kaki, dan neurotoksisitas. Penggunaan klinisnya yang menjadi sangat terbatas menyebabkan 5-Fluorourasil bisa mencapai resistensi, sebuah strategi baru dalam bentuk kombinasi digunakan untuk mengobati kanker menggunakan 5-Fluorourasil dan kombinasinya.

Pada kombinasi 5-Fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* dengan konsentrasi 5 µg/ml mampu menghambat pertumbuhan *cell line* HT-29 sebesar 13% ($p < 0,05$). Hal ini membuktikan bahwa penelitian ini terjadi peningkatan efek sitotoksik dengan pemberian kombinasi 5-Fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* dibanding *single therapy* 5-Fluorourasil dengan konsentrasi 5 µg/ml menghambat pertumbuhan *cell line* HT-29 sebesar 8% ($p < 0,05$). Penelitian ini juga menunjukkan bahwa semakin meningkatnya konsentrasi kombinasi 5-Fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* akan meningkatkan penghambatan pertumbuhan *cell line* HT-29. Pada kombinasi 5-Fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* konsentrasi tertinggi yaitu 20 µg/ml mampu menghambat pertumbuhan *cell line* HT-29 sebesar 87% ($p < 0,05$). Menurut Kobayashi *et al.*, (2004), cacing *Eisenia foetida* yang memiliki famili yang sama dengan *Lumbricus rubellus* ini memiliki efek sitotoksik melalui *coelomic fluid* yang mengandung protein Lysenin. Lysenin adalah protein 33kDa yang dapat

ditemukan di *coelomic fluid Eisenia foetida*. Kobayashi *et al.*, (2004) menemukan efek sitotoksik Lysenin pada sel limpa normal. Pada penelitian Yanqin *et al.*, (2007) menyatakan bahwa *coelomic fluid* dari cacing tanah pada konsentrasi 1mg/ml dapat membunuh sel Hela dengan cara nekrosis sel dan lisis sel. Pada penelitian lainnya, *coelomic fluid* menunjukkan efek sitotoksik terhadap sel Hela dan hasilnya menunjukkan konsentrasi tinggi *coelomic fluid* menginduksi sel nekrosis yang mana hal ini sama dengan yang dilaporkan oleh Engelmann (2004) bahwa *coelomic fluid* menunjukkan penurunan kehidupan sel yang signifikan dibandingkan dengan kontrol. Pada penelitian Kauschke *et al.*, (1987) melaporkan bahwa *Eisenia foetida* memiliki efek toksik pada beberapa tipe fibroblast *cell line*.

Dari perbandingan dengan penelitian sebelumnya dapat dikatakan bahwa hasil penelitian ini menunjukkan *coelomic fluid* dapat menghambat pertumbuhan sel tergantung dari konsentrasi *coelomic fluid* dan *cell line* yang diujikan.

6.2 IC₅₀ dari kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* terhadap *cell line* HT-29

Pada tabel 5.2 menunjukkan nilai IC₅₀ kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus*. IC₅₀ adalah konsentrasi suatu senyawa yang menyebabkan penghambatan sebesar 50% terhadap sebuah perlakuan yang diberikan (IUPAC, 2006). Uji sitotoksik kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* dinyatakan dengan nilai IC₅₀ berdasarkan data hubungan antara konsentrasi bahan uji dengan persentase kematian sel kanker.

Penentuan persentase kematian sel dilakukan dengan menggunakan uji MTT dan nilai IC₅₀ ditentukan dengan menggunakan analisis probit. Pada penelitian ini

diperoleh rerata IC₅₀ dari semua perlakuan sebesar 13,496 µg/ml (p < 0,05). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan 3 yaitu 20 µg/ml kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* dapat memenuhi nilai IC₅₀ tersebut. Pada penelitian Hua (2011), ekstrak *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* memiliki nilai IC₅₀ sebesar 77 µg/ml terhadap sel Hela dan 126 µg/ml terhadap sel LTEP-A2. Pada penelitian Veeramani (2010) menyatakan nilai IC₅₀ ekstrak *coelomic fluid* terhadap sel SiHa adalah 5 µg/ml. Berdasarkan analisis diatas bisa dikatakan bahwa nilai IC₅₀ kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* sebesar 13,496 µg/ml dapat diterima.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Dalam penelitian ini hanya berfokus pada efek sitotoksik dari kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* saja sedangkan efek samping dari *coelomic fluid* tidak diteliti. Oleh karena itu perlu dilakukan uji secara *in vivo* menggunakan hewan coba untuk mengetahui farmakokinetik, farmakodinamik, batasan dosis yang aman maupun dosis yang toksik, serta kemungkinan adanya efek samping.

BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

- a. Kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* mampu meningkatkan efek sitotoksik terhadap *cell line* HT-29 dengan konsentrasi *coelomic fluid* 20 µg/ml memiliki efek sitotoksik tertinggi dibanding semua perlakuan.
- b. Didapatkan nilai IC_{50} dari rerata semua perlakuan kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* sebesar 13,496 µg/ml.

7.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut terhadap efek kombinasi 5-fluorourasil dan *coelomic fluid* dari *Lumbricus rubellus* secara *in vivo* pada hewan coba, untuk mengetahui farmakokinetik, farmakodinamik, batasan dosis yang aman maupun dosis yang toksik, serta kemungkinan adanya efek samping.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah M., et al. The Value of Caspase-3 after the Application of *Annona muricata* Leaf Extract in COLO-205 Colorectal Cancer Cell Line. 2017. (Online), (<https://www.hindawi.com/journals/grp/2017/4357165/>), diakses 7 Maret 2018).
- Anggrianti P. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Kemukus (*Piper cubeba* L.) Terhadap Sel HeLa, 2008. (Online), (<http://eprints.ums.ac.id/1532/1/K100040212.pdf>), diakses 7 Maret 2018).
- Artanti N., Jamilah, dan Hartati S., 2003, Laporan Teknis Sub Tolok Ukur Pengembangan Senyawa Potensial antikanker dari *Taxus sumatrana* dan Benalu, Puslit Kimia LIPI, Serpong.
- ATCC. 2012. HT-29 (ATCC® HTB-38™). <https://atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx>.
- ATCC. 2012. Thawing, Propagating, and Cryopreserving Protocol NCI-PBCF-HTB38 (HT-29) Colon Adenocarcinoma (ATCC®HTB-38™). <https://www.atcc.org/~ps/HTB-38.ashx>.
- Backus, H.H.J., Pinedo, H.M., Wouters, D., et al. Differences in the Induction of DNA Damage, Cell Cycle Arrest, and Cell Death by 5-Fluorouracil and Antifolates, *Oncol. Res. Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapy*, 2001, 12(5): 231-239. (Online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11417748>), diakses 7 Maret 2018).
- Benson A.B., Venook A.P., Cederquist L., et al. *Colon Cancer, Version 1, 2017. Clinical Practice Guidelines in Oncology*. 2017. (Online), (<http://www.jnccn.org/content/15/3/370.long>), diakses 7 Maret 2018).
- Desen W. 2013. *Buku Ajar Onkologi Klinis Edisi 2. Tumor Rongga Abdomen.*, Badan Penerbit FKUI, Jakarta, p. 427-428.
- Doyle A., dan Griffiths J.B. 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. John Wiley and Son Ltd., New York.
- Engelmann P., Kiss J., Csongeia V., et al. Earthworm leukocytes kill HeLa, HEP-2, PC-12 and PA317 cells *in vitro*, *J. Biochem. Biophys. Methods* 61. 2004. (Online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15560938>), diakses 7 Maret 2018).
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F., 2014. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data>.
- Giovannetti, E., Backus, H.H.J., Wouters, D., et al. Changes in the Status of p53 Affect Drug Sensitivity to Thymidylate Synthase (TS) Inhibitors by Altering TS Levels, *British J. Can.*, 2007, 96: 769-775. (Online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2360080/>), diakses 7 Maret 2018).

GIST Support Internasional. 2018. Pathology Analyses for GIST. <http://www.gistsupport.org/about-gist/for-new-gist-pages/understanding-your-pathology-report-for-gist/pathology-analyses-for-gist/>

Gunawan, S.G. 2008. *Farmakologi dan Terapi*, 5th ed., FK Universitas Indonesia, Jakarta, p. 732-756

Hoffmeister. 1843. *Lumbricus rubellus*. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=977383#null.

Jong D. 2013. *Buku Ajar Ilmu Bedah: Usus Halus, Appendiks, Kolon, dan Anorektum.*, EGC, Jakarta, p. 731-798.

Katzung B.G. 2010. *Farmakologi dasar dan klinik*. 10th ed., EGC, Jakarta, p. 1085-1086.

Kauschke E. dan Mohrig W. Cytotoxic activity in the coelomic fluid of the annelid *Eisenia foetida* Sav. *J. Comp. Physiol. B:Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 1987. 157: 77-83. (Online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3571568>, diakses 7 Maret 2018).

Khumairoh I., Puspitasari I.M. Kultur Sel. *Farmaka*. 2017. 4(4): 1-16. (Online), (<http://download.portalgaruda.org/article.php?article=476672&val=1386&title=Kultur%20Sel>, diakses 28 Maret 2018).

Kimman, M., Norman, R., Jan, S., Kingston, D., & Woodward, M. The Burden of Cancer in Member Countries of the Association of Southeast Asian Nations (ASEAN). *APJCP*, 2012, 13: 416. (Online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22524799>, diakses 7 Maret 2018)

Kobayashi, H., Ohta, N. dan Umeda, M. Biology of Lysenin, a Protein in the Coelomic Fluid of the Earthworm *Eisenia foetida*. 2004. (Online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15261736>, diakses 7 Maret 2018).

Komite Penanggulangan Kanker Nasional. 2012. Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Kanker Kolorektal. <http://kanker.kemkes.go.id/guidelines/PNPKkolorektal.pdf>.

Kosasih L.M. Tingkat Toksisitas Limbah Tekstil Batik Tanpa Melalui Proses Ipal Terhadap *Daphnia Magna*, Chapter 3. 2013. (Online), (<http://repository.upi.edu/367/>, diakses 13 Maret 2018).

Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. 2007. *Buku Ajar Patologi Volume 2 In: Crawford James M, Kumar Vinay. Rongga Mulut dan Saluran Gastrointestinal.*, EGC, Jakarta, p. 609-662.

Kurniawati A., Tenggara R. Pengaruh Asam Asetil Salisilat terhadap Penurunan Prevalensi Kanker Kolorektal. *Cermin Dunia Kedokteran*, 2011, 38 (5): 350-352. (Online), (http://www.kalbemed.com/Portals/6/11_186Pengaruhasamasetilsalisilat.pdf, diakses 7 Maret 2018).

Levin B., Lieberman D., McFarland B., et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps: a joint

guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin*, 2008, 58: 130–160. (Online), (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/CA.2007.0018/epdf>, diakses 7 Maret 2018).

Levrero, M., Laurenzi, V. De, Constanzo, A., *et al.* The p53/p63/p73 Family of Transcription Factors: Overlapping and Distinct Functions, *J. of Cell Science*, 2000, 113: 1661-1670. (Online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10769197>, diakses 7 Maret 2018).

Lim, Y.J.L., Rhee, J.C., Bae, Y.M., *et al.* Celecoxib Attenuates 5-Fluorouracil-Induced Apoptosis in HCT-15 and HT-29 Human Colon Cancer Cells, *World J. Gastroenterol.*, 2007, 13(13): 1947-1952. (Online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4146971/>, diakses 7 Maret 2018).

Liu, H.C., Chen, G.G., Vlantis, A.C., *et al.* 5-Fluorouracil Mediates Apoptosis and G1/S Arrest in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma via a p53-Independent Pathway, *The Cancer J.*, 2006, 12(6): 482-493. (Online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17207318>, diakses 7 Maret 2018).

Longley, D.B. dan Johnston, P.G. 2007. 5-Fluorouracil: Mechanisms Of Action And Clinical Strategies. (Online), (<https://www.nature.com/articles/nrc1074>, diakses 7 Maret 2018).

Medscape. 2018. Colon Cancer. <https://emedicine.medscape.com/article/277496-overview>.

Meyerhardt, J.A., dan Mayer, R.J. Systemic Therapy for Colorectal Cancer, *N. Engl. J. Med.*, 2005, 352(5): 476-487. (Online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15689586>, diakses 7 Maret 2018).

Mihara H., Sumi H., Yoneta Y., *et al.* A Novel Fibrinolytic Enzyme Extracted from the Earthworm, *Lumbricus rubellus*, *Japanese J. Physicol.* 1991. 41: 461-472. (Online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1960890>, diakses 7 Maret 2018).

MIMS. 2018. 5-Fluorouracil. <http://www.mims.com/indonesia/drug/info/fluorouracil/?type=brief&mtype=generic>

Palozza, P., Serini, S., Maggiano, N., *et al.* Beta-Carotene Downregulates the Steady-State and Heregulin-a-Induced COX-2 Pathways in Colon Cancer Cells, *J.Nutr.*, 2005, 135: 129-136. (Online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15623844>, diakses 7 Maret 2018).

Palungkun R. 2008. *Sukses Beternak Cacing Tanah Lumbricus rubellus.*, Penebar Swadaya, Jakarta, p: 5-15.

Riss T.L., *et al.* Cell Viability Assay. 2016. (Online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>, diakses 7 Maret 2018).

Rizqhan M. Hubungan Indeks Eritrosit Dan Kadar Hemoglobin Terhadap Lokasi Tumor Pada Pasien Kanker Kolorektal. *Jurnal Media Medika Muda*, 2014.

(Online), (<https://ejournal3.undip.ac.id/index.php/medico/article/view/7835>, diakses 7 Maret 2018).

Savigny, 1826. *Eisenia fetida*. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=976620#null.

Sigmond, J., Backus, H.H., Wouters, D., et al. Induction of Resistance to the Multitargeted Antifolate Pemetrexed (ALIMTA) in WiDr Human Colon Cancer Cells is Associated with Thymidilate Synthase Overexpression, *Biochem. Pharmacol.*, 2003. (Online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12907242>, diakses 7 Maret 2018).

Tatuhey W.S., Nikijuluw H., dan Maniase J. Karakteristik Kanker Kolorektal Di Rsud Dr. M Haulussy Ambon Periode Januari 2012–Juni 2013. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan*, 2014, 4 (2): 150-157. (Online), (http://ejournal.unpatti.ac.id/ppr_iteminfo_Ink.php?id=1139, diakses 2 Februari 2017)

Thomas, J.B.D., Sharker, A., et al. Chest Pain Induced by 5-Fluorouracil, *Br. J., Cardiol*, 2004, 11: 483-485. (Online), (<https://bjcardio.co.uk/2004/11/chest-pain-induced-by-5-fluorouracil/>, diakses 7 Maret 2018).

Veeramani. Study on the characterization of coelomic fluid of *Eudrilus eugeniae* and its effect on plants and animal cells in the in-vitro culture system. 2010. (Online), (<http://14.139.186.108/jspui/handle/123456789/8312>, diakses 7 Maret 2018).

WHO IAFRIC. 2013. Globocan 2012 Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

World Health Organization. 2018. Cancer, Fact sheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.

Yangin L., Yan S., Zhenjun S. *Coelomic fluid* of the earthworm *Eisenia fetida* induces apoptosis of HeLa cells *in vitro*. 2007. (Online), (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S116455630700132X>, diakses 7 Maret 2018).

Yeates G. Earthworms - Earthworms in New Zealand, Te Ara - the Encyclopedia of New Zealand, <http://www.TeAra.govt.nz/en/diagram/15491/earthworm-life-cycle>.