

PENELITIAN ANALITIK

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK JINTAN HITAM (NIGELLA SATIVA)
TERHADAP APOPTOSIS PADA KULTUR SEL RETINOBLASTOMA
MELALUI EKSPRESI PROTEIN E2F1**



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Oleh:
AIDA

NIM: 128070600011001

**PESERTA PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I
ILMU KESEHATAN MATA**

**BAGIAN ILMU KESEHATAN MATA
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
RUMAH SAKIT UMUM Dr. SAIFUL ANWAR
MALANG
2018**



HALAMAN PENGESAHAN

PENELITIAN ANALITIK

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK JINTAN HITAM (NIGELLA SATIVA)

TERHADAP APOPTOSIS PADA KULTUR SEL RETINOBLASTOMA

MELALUI EKSPRESI PROTEIN E2F1

Oleh:

AIDA

128070600011001

Dibacakan pada tanggal:

26 Februari 2018

Pembimbing I

Pembimbing II

dr. Hariwati Moehariadi, Sp.M(K)

NIP. 19541226 198412 2 001

dr. Hidayat Sujuti, Sp.M, Ph.D

NIP. 19670123 199601 1 001

Pembimbing III

dr. Lely Retno Wulandari, Sp.M(K)

NIP. 19741213 200812 2 002

Mengetahui,

Ketua Program Studi

Dr. dr. Seskoati Prayitnaningsih, Sp.M(K)

NIP. 19681023 200501 2 001



KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum wa rahmatullahi wa barakatuh,

Maha suci Allah yang maha agung dan segala puji hanya bagi-Nya, limpahan shalawat dan salam kepada junjungan kami Nabi Muhammad shallallahu alaihi wasallam, serta rasa syukur atas limpahan rahmat, pengampunan, kemuliaan dan keberkahan dari Allah subhanahu wa ta'ala sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tugas akhir ini dengan judul **“Pengaruh Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) terhadap apoptosis pada Kultur Sel Retinoblastoma melalui jalur E2F1”**.

Dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. dr. Hariwati Moehariadi, Sp.M(K) sebagai dosen pembimbing I dan Kepala Laboratorium Ilmu Kesehatan Mata / Kepala SMF Ilmu Kesehatan Mata Rumah Sakit Umum dr. Saiful Anwar Malang, yang telah memberikan bimbingan dari awal sampai akhir penulisan tugas akhir ini.
2. dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, Sp.M sebagai dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingannya selama proses penulisan tugas akhir ini.
3. dr. Lely Retno Wulandari, Sp.M(K) sebagai dosen pembimbing III yang telah memberikan bimbingannya selama proses penulisan tugas akhir ini.
4. Rektor Universitas Brawijaya Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, M.S. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan PPDS-1 Ilmu Kesehatan Mata.
5. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan PPDS-1 Ilmu Kesehatan Mata.
6. Direktur Rumah Sakit Umum dr. Saiful Anwar Malang
7. Ketua TKP PPDS-1 dr. Arief Iskandar NAD, SpRAd. (K) yang telah membantu dalam proses menyelesaikan pendidikan spesialis.
8. Ketua Program Bidang Studi PPDS-1 Ilmu Kesehatan Mata Dr. dr. Seskoati Prayitnaningsih, Sp.M(K) yang selalu memberikan dorongan dan motivasi selama saya menjalani masa pendidikan spesialis.
9. Semua guru dan staff di Laboratorium / SMF Ilmu Kesehatan Mata FKUB Malang saya hanturkan terima kasih telah meluangkan waktu untuk

memberikan ilmu yang bermanfaat selama masa studi pendidikan spesialis.

10. Rasa hormat, cinta dan terima kasih penulis persembahkan kepada kedua orangtua, suami, seluruh keluarga dan teman-teman atas segala dukungan, kesabaran, pengertian dan doa yang terus menerus dipanjatkan sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tugas akhir ini dan menyelesaikan pendidikan spesialis. Jazaakumullahu khairan.

Penulis menyadari bahwa penulisan tugas akhir ini masih jauh dari sempurna, dengan segala kerendahan hati penulis membuka diri atas kritik dan saran yang bermanfaat dan membangun. Semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat dan semoga Allah Azza wa Jalla senantiasa melimpahkan rahmat dan selalu membimbing kita di jalan-Nya. Aamiin ya robbal'alamin

Wassalam,

Malang, 2018

Aida



RINGKASAN

Aida, 2018. Pengaruh Pemberian Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella Sativa*) terhadap Apoptosis pada Kultur Sel Retinoblastoma Melalui Ekspresi Protein E2F1. Tugas Akhir, Bagian Ilmu Kesehatan Mata, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing : dr. Hariwati Moehariadi, Sp.M(K); dr. Hidayat Sujuti, Sp.M, Ph.D; dr. Lely Retno Wulandari, Sp.M(K).

Retinoblastoma merupakan kanker intraokular tersering yang terjadi pada anak. Retinoblastoma merupakan tumor neuroblastik yang diakibatkan oleh mutasi gen retinoblastoma (gen RB1) yang menyebabkan mutasi protein retinoblastoma (pRB), sehingga tidak berfungsi sebagai pengikat faktor transkripsi sel protein E2 Promoter-Binding Factor 1 (E2F1) dan terjadilah proses transkripsi, sintesis DNA dan proliferasi sel secara terus menerus tanpa terkendali. Thymoquinone merupakan zat aktif komponen utama dari minyak biji *Nigella sativa* yang memiliki aktivitas antioksidan, antineoplastik, antikarsinogenik dan antimutagenik dengan menghambat pelepasan protein E2F1, yang dibutuhkan untuk menekan progresivitas siklus sel, dan mempromosikan apoptosis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) terhadap apoptosis pada kultur sel retinoblastoma melalui ekspresi protein E2F1 sehingga diharapkan ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) dapat menghambat perkembangan dan mejadi pilihan terapi retinoblastoma. Desain penelitian ini adalah *laboratory experiment posttest control group* secara *in vitro*. Setelah dilakukan pemaparan ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) dengan dosis 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL dan 200 mg/mL dan pemeriksaan menggunakan teknik *flowcytometry* didapatkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, sehingga ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) dapat menurunkan ekspresi protein E2F1 dan meningkatkan apoptosis pada kultur sel retinoblastoma, dengan dosis 150 mg/mL didapatkan penurunan ekspresi protein E2F1 yang paling rendah dan dengan 200 mg/mL didapatkan peningkatan apoptosis yang paling tinggi. Semakin rendah ekspresi protein E2F1, maka semakin tinggi angka apoptosis, namun berkorelasinya agak rendah, sehingga terdapat faktor lain diluar ekspresi protein E2F1 yang mempengaruhi apoptosis pada kultur sel retinoblastoma.

Kata kunci : ekstrak biji Jintan hitam, *Nigella sativa*, E2F1, apoptosis, kultur sel retinoblastoma

SUMMARY

Aida, 2018. The Effect of Black Cumin Extract (*Nigella sativa*) to Apoptosis in Retinoblastoma Cell Culture Through E2F1 Protein Expression. Final Assignment, Ophthalmology Department, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisor: dr. Hariwati Moehariadi, Sp.M(K); dr. Hidayat Sujuti, Sp.M, Ph.D; dr. Lely Retno Wulandari, Sp.M(K).

Retinoblastoma is the most common intraocular cancer that occurs in children. Retinoblastoma is a neuroblastic malignancy caused by mutations in the retinoblastoma gene (RB1 gene) which causes mutation of protein retinoblastoma (pRB) as of it cannot bind the transcription factor protein E2 Promoter-Binding Factor-1 (E2F1) in cycle cell so the process of transcription, DNA synthesis and cell proliferation continued without control. Thymoquinone an active substance and the major component of *Nigella sativa* seeds volatile oil has an antioxidant, antineoplastic, anticarcinogenic and antimutagenic activity by inhibit the releasing of E2F1 protein, which acts to inhibit the progression of cell cycle, and promote the apoptosis. This study aims to determine the effect of *Nigella sativa* extract (Black cumin) to apoptosis in retinoblastoma cell culture through E2F1 protein expression, we hope this extract may and can be the alternative treatment to inhibit the retinoblastoma progression. This is a in vitro laboratory experiment posttest control group design. After the description extract of *Nigella sativa* (Black Cumin) at a dose of 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL and 200 mg/mL and measured with flowcytometry, we found a significant differences between the control group to the treatment group, so the *Nigella sativa* extract (Black cumin) can reduce the expression of E2F1 protein and increase the apoptosis in retinoblastoma cell culture, 150 mg/mL is the effective dose that can decrease the expression of E2F1 protein and 200 mg/mL is the effective dose that increase the apoptosis. The lower of E2F1 protein expression, the higher number of apoptosis, but the correlation rather low, so there are another factors beyond the expression of E2F1 protein that induce the apoptosis in retinoblastoma cell culture.

Keyword : black cumin seed extract, *Nigella sativa*, E2F1, apoptosis, retinoblastoma cell culture

DAFTAR ISI

Halaman Judul	ii
HALAMAN PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
RINGKASAN	v
SUMMARY	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GRAFIK	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
BAB I. Pendahuluan	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Retinoblastoma	5
2.1.1 Definisi	5
2.1.2 Epidemiologi	5
2.1.3 Patogenesis	6
2.1.4 Manifestasi Klinis	7
2.1.5 Klasifikasi	9
2.1.6 Diagnosis	10
2.1.7 Penatalaksanaan	11
2.2 Siklus Sel	12
2.2.1 Fase G1	13
2.2.2 Fase G1/S	13
2.2.3 Fase S	14
2.2.4 Fase G2/M	14
2.3 Protein Regulator Retinoblastoma	15
2.3.1 Protein Retinoblastoma (pRB)	15
2.3.2 Protein E2 Promoter-Binding Factor 1 (E2F1)	17
2.3.3 Peran pRB-E2F1 terhadap tumorigenesis	18





2.4	Jintan Hitam (<i>Nigella sativa</i>).....	20
2.4.1	Klasifikasi <i>Nigella sativa</i>	20
2.4.2	Komposisi Kimia Biji <i>Nigella sativa</i>	22
2.4.3	Peran Ekstrak <i>Nigella sativa</i> sebagai Anti Kanker.....	23
2.5	Kerangka Teori.....	25
BAB III. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN.....		26
3.1	Kerangka Konsep.....	26
3.2	Hipotesa Penelitian.....	26
BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN.....		27
4.1	Rancangan Penelitian.....	27
4.2	Tempat dan Waktu Penelitian.....	27
4.3	Sampel Penelitian.....	27
4.3.1	Pengelompokan Sampel.....	27
4.3.2	Kriteria Inklusi Sampel Penelitian.....	27
4.3.3	Kriteria Eksklusi Sampel Penelitian.....	28
4.3.3	Perkiraan Besar Sampel.....	28
4.4	Variabel Penelitian.....	28
4.4.1	Variabel Bebas.....	28
4.4.2	Variabel Tergantung.....	28
4.5	Definisi Operasional.....	28
4.6	Alat Penelitian.....	29
4.7	Bahan Penelitian.....	30
4.8	Cara Kerja Penelitian.....	31
4.8.1	Pembuatan ekstrak <i>Nigella sativa</i>	31
4.8.2	Persiapan Kultur Sel Retinoblastoma.....	32
4.8.3	Perlakuan terhadap Kultur Sel Retinoblastoma.....	33
4.9	Alur Kerja Penelitian.....	34
4.10	Rancangan Analisa Data.....	35
4.11	Organisasi Penelitian.....	35
4.12	Jadwal Penelitian.....	36
BAB V. HASIL PENELITIAN.....		37
5.1	Pengaruh Ekstrak <i>Nigella sativa</i> (Jintan Hitam) terhadap Ekspresi Protein E2F1.....	37
5.1.1	Data Hasil Pemeriksaan.....	38

5.1.2	Analisa Statistik.....	39
5.1.2.1	Uji Normalitas.....	39
5.1.2.2	Uji Homogenitas.....	39
5.1.2.3	Uji Perbedaan.....	40
5.1.2.4	Uji Korelasi.....	41
5.1.2.5	Uji Pengaruh.....	42
5.2	Pengaruh Ekstrak <i>Nigella sativa</i> (Jintan Hitam) terhadap Apoptosis.....	42
5.2.1	Data Hasil Pemeriksaan.....	43
5.2.2	Analisa Statistik.....	44
5.1.2.1	Uji Normalitas.....	44
5.1.2.2	Uji Homogenitas.....	44
5.1.2.3	Uji Perbedaan.....	45
5.1.2.4	Uji Korelasi.....	46
5.1.2.5	Uji Pengaruh.....	47
5.3	Keterkaitan antara E2F1 dengan Apoptosis.....	48
5.3.1	Hubungan antara E2F1 dengan Apoptosis.....	48
5.3.2	Pengaruh antara E2F1 dengan Apoptosis.....	49
BAB VI. PEMBAHASAN.....		50
6.1	Pengaruh Ekstrak <i>Nigella sativa</i> (Jintan Hitam) terhadap Ekspresi Protein E2F1 pada Kultur Sel Retinoblastoma.....	51
6.2	Pengaruh Ekstrak <i>Nigella sativa</i> (Jintan Hitam) terhadap Apoptosis pada Kultur Sel Retinoblastoma.....	52
6.3	Pengaruh Ekspresi Protein E2F1 terhadap Apoptosis pada Kultur Sel Retinoblastoma.....	53
6.4	Keterbatasan Penelitian.....	54
BAB VII. PENUTUP.....		55
7.1	Kesimpulan.....	55
7.2	Saran.....	55
DAFTAR PUSTAKA.....		56
Lampiran 1.....		62
Lampiran 2.....		65
Lampiran 3.....		68

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 “Two-hit” theory.....6

Gambar 2.2 Leukokoria pada retinoblastoma unilateral sporadik.....7

Gambar 2.3 Retinoblastoma8

Gambar 2.4 Siklus Sel.....13

Gambar 2.5 Struktur Protein Retinoblastoma (pRB).....16

Gambar 2.6 Struktur Kompleks pRB.....18

Gambar 2.7 Peran kompleks pRB-E2F dalam siklus sel fase G1.....19

Gambar 2.8 Biji *Nigella sativa*.....22

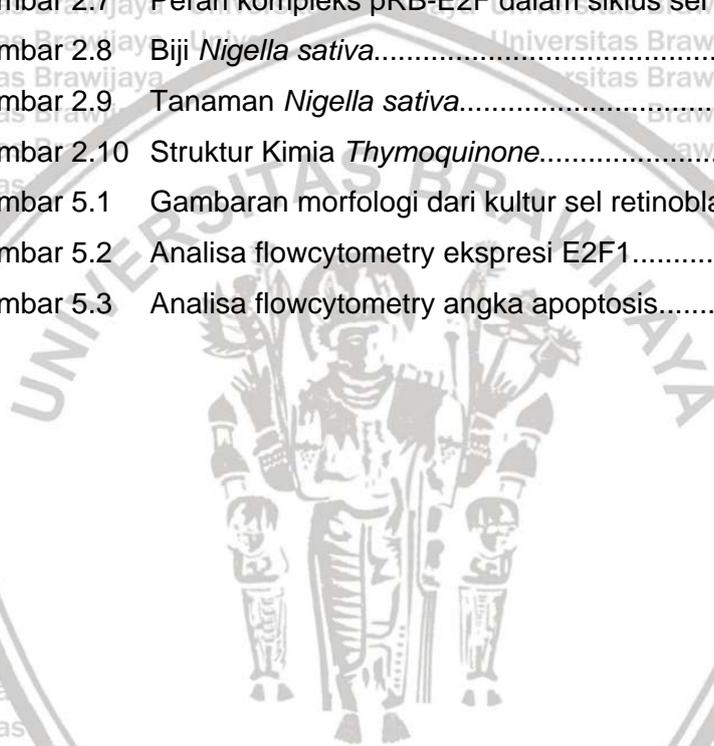
Gambar 2.9 Tanaman *Nigella sativa*.....22

Gambar 2.10 Struktur Kimia *Thymoquinone*.....23

Gambar 5.1 Gambaran morfologi dari kultur sel retinoblastoma.....37

Gambar 5.2 Analisa flowcytometry ekspresi E2F1.....38

Gambar 5.3 Analisa flowcytometry angka apoptosis.....43



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Klasifikasi Reese-Ellsworth.....9

Tabel 2.2 *International Classification for Intraocular Retinoblastoma*.....10

Tabel 5.1 Rerata hasil pengamatan ekspresi E2F1 pada kultur sel retinoblastoma pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak Nigella sativa (jintan hitam).....38

Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas E2F1.....39

Tabel 5.3 Hasil Uji Homogenitas E2F1.....39

Tabel 5.4 Hasil Uji Perbedaan Rata-rata Angka E2F1.....40

Tabel 5.5 Hasil Uji Lanjut Perbedaan Angka E2F1.....40

Tabel 5.6 Hasil Uji Normalitas Dosis dan E2F1.....41

Tabel 5.7 Hasil Analisis korelasi antara Dosis dengan E2F1.....41

Tabel 5.8 Hasil Analisis Regresi Linier Sederhana antara Dosis dengan E2F1.....42

Tabel 5.9 Rerata hasil pengamatan angka apoptosis pada kultur sel retinoblastoma pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak Nigella sativa (jintan hitam).....43

Tabel 5.10 Hasil Uji Normalitas Apoptosis.....44

Tabel 5.11 Hasil Uji Homogenitas Apoptosis.....44

Tabel 5.12 Hasil Uji Perbedaan Rata-rata Angka Apoptosis.....45

Tabel 5.13 Hasil Uji Lanjutan Perbedaan Angka Apoptosis.....45

Tabel 5.14 Hasil Uji Normalitas Dosis dan Apoptosis.....46

Tabel 5.15 Hasil Analisis Korelasi antara Dosis dengan Apoptosis.....46

Tabel 5.16 Hasil Analisis Regresi Linier Sederhana antara Dosis dengan Apoptosis.....47

Tabel 5.17 Hasil Uji Normalitas E2F1 dan Apoptosis.....48

Tabel 5.18 Hasil Analisis korelasi antara E2F1 dengan Apoptosis.....48

Tabel 5.19 Hasil Analisis Regresi Linier Sederhana antara E2F1 dengan Apoptosis.....49

DAFTAR GRAFIK

Grafik 5.1 Grafik persentase ekspresi E2F1 pada kultur sel retinoblastoma pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak *Nigella sativa* (jintan hitam).....38

Grafik 5.2 Grafik pengaruh antara dosis terhadap angka E2F1.....42

Grafik 5.3 Grafik persentase angka apoptosis pada kultur sel retinoblastoma pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak *Nigella sativa* (jintan hitam).....43

Grafik 5.4 Grafik pengaruh antara dosis terhadap angka apoptosis.....47

Grafik 5.5 Grafik pengaruh antara angka E2F1 terhadap angka apoptosis. 49



DAFTAR SINGKATAN

Apaf1	:	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
Bcl	:	B-cell lymphoma/leukemia
Caspase	:	Cyctein Aspartate-spesific Protease
CDC	:	Cell Division Cycle
CDK	:	Cyclin Dependent Kinase
CKI	:	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
CT Scan	:	Computerized Tomography Scanner
Cu	:	Cuprum
DD	:	Diameter Diskus
DNA	:	Deoxyribose Nucleic Acid
E2F	:	E2 Promoter-Binding Factor
Fase G0	:	Fase Gap 0
Fase G1	:	Fase Gap 1
Fase G2	:	Fase Gap 2
Fase S	:	Fase Sintesis
Fase M	:	Fase Mitosis
Fe	:	Ferrum
Gadd45	:	Growth Arrest and DNA Damage-inducible gene 45
HDAC	:	Histone Deacetylase
ICRB	:	International Classification of Retinoblastoma
MAP	:	Microtubule-associate and growth regulator protein
MRI	:	Magnetic Resonance Imaging
P	:	Phosphor
pRB	:	Protein Retinoblastoma
RB	:	Retinoblastoma
Smac/DIABLO	:	Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pl
TGF-β	:	Transforming Growth Factor Beta
TQ	:	Thymoquinone
WHO	:	World Health Organization

EKSTRAK JINTAN HITAM (*NIGELLA SATIVA*) MENGINDUKSI APOPTOSIS PADA KULTUR SEL RETINOBLASTOMA MELALUI EKSPRESI PROTEIN E2F1

Aida, Hariwati Moehariadi, Hidayat Sujuti, Lely Retno Wulandari
Bagian Ilmu Kesehatan Mata, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya
Rumah Sakit Umum dr. Saiful Anwar, Malang, Indonesia

ABSTRAK

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) terhadap apoptosis pada kultur sel retinoblastoma melalui ekspresi protein E2F1 sehingga diharapkan ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) dapat menghambat perkembangan dan mejadi pilihan terapi retinoblastoma.

Metode: Desain penelitian ini adalah *laboratory experiment posttest control group* secara *in vitro*. Setelah dilakukan pemaparan ekstrak *Nigella sativa* dengan dosis 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL dan 200 mg/mL dan pemeriksaan menggunakan teknik *flowcytometry*

Hasil: Pada uji perbedaan ekspresi E2F1 dan angka apoptosis didapatkan nilai signifikansi $p < 0.05$, sehingga didapatkan perbedaan rata-rata ekspresi E2F1 dan angka apoptosis pada masing-masing kelompok perlakuan. Pada uji korelasi dan uji regresi antara dosis dengan ekspresi E2F1, dosis dengan angka apoptosis dan E2F1 dengan apoptosis didapatkan nilai signifikansi $p < 0.05$ yang berarti terdapat hubungan dan pengaruh yang signifikan antara dosis dengan ekspresi E2F1 (korelasi berbalik arah), antara dosis dengan angka apoptosis (korelasi searah) dan antara ekspresi E2F1 dengan apoptosis (korelasi berbalik arah).

Kesimpulan: Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) dapat menurunkan ekspresi protein E2F1 dan meningkatkan apoptosis pada kultur sel retinoblastoma, dengan dosis 150 mg/mL didapatkan penurunan ekspresi protein E2F1 yang paling rendah dan dengan 200 mg/mL didapatkan peningkatan apoptosis yang paling tinggi. Semakin rendah ekspresi protein E2F1, maka semakin tinggi angka apoptosis, namun berkorelasinya agak rendah, sehingga terdapat faktor lain diluar ekspresi protein E2F1 yang mempengaruhi apoptosis pada kultur sel retinoblastoma.

Keyword : ekstrak biji Jintan hitam, *Nigella sativa*, E2F1, apoptosis, kultur sel retinoblastoma

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tumor ganas merupakan suatu permasalahan kesehatan yang utama karena mengancam kehidupan manusia. Retinoblastoma merupakan suatu tumor ganas intraokular tersering yang terjadi pada anak, ditemukan sekitar 5000-9000 kasus baru per tahun dengan prevalensi terbanyak di Asia dan Afrika. Mortalitas akibat retinoblastoma di Asia dan Afrika mencapai 40-70%. Retinoblastoma diakibatkan oleh mutasi gen retinoblastoma (gen RB1) pada kromosom 13q14 yang menyebabkan mutasi protein retinoblastoma (pRb) yang merupakan suatu *tumor suppressor gene*. Gen RB dan pRb memberikan kontribusi yang besar terhadap konsep pertumbuhan dan perkembangan tumor pada retinoblastoma dan hanya sedikit meningkatkan risiko tumor ganas pada jaringan lain.¹

Berdasarkan penelitian dari WHO, sekitar 80% dari penduduk didunia menggantungkan diri terhadap pengobatan tradisional untuk berbagai macam jenis penyakit yang dideritanya. Banyak penelitian-penelitian yang dilakukan untuk mengevaluasi kandungan dan efektifitas dari tumbuh-tumbuhan herbal tersebut, salah satunya adalah *Nigella sativa*.²

Nigella sativa merupakan tanaman berbunga yang berbiji, bijinya tersebut berwarna hitam dan dapat di ekstrak. Efektivitas ekstrak minyak biji (*volatile oil*) *Nigella sativa* jika dibandingkan dengan ekstrak bijinya memiliki efektifitas ekstrak minyak biji yang lebih tinggi karena di dalam *volatile oil* terkandung komponen aktif thymoquinone (TQ). Beberapa manfaat yang telah dilaporkan yang dimiliki oleh ekstrak minyak biji *Nigella sativa* diantaranya adalah memiliki aktifitas antitumor, antimutagenik, antioksidan, antiinflamasi dan analgesik, antihistamin, antimikroba, antiviral, antifungi, antiparasit, antihelminthes, antiepileptogenik dan antikonvulsan, anti hipertensi, anti diabetik, diuretik, antioksidatin, antiurolithiasis, antiasmatik (spasmolitik dan bronkodilator), mempercepat proses penyembuhan luka, neuroprotektif, nefroprotektif, hepatoprotektif, gastroprotektif, kontrasepsi, imunomodulator, dapat

digunakan untuk mengobati pasien ketergantungan opium, toksisitas serta pengobatan penyakit autoimun.²⁻⁶

Komponen aktif thymoquinone (TQ) yang merupakan konstituen utama dalam *volatile oil*, yaitu sebesar 27 - 62 % memiliki aktifitas sitotoksik atau antitumor. Aktifitas sitotoksik TQ diantaranya adalah dengan menghambat masuknya sel dari fase G1 ke dalam fase S siklus sel, meregulasi protein E2 Promoter-Binding Factor 1 (E2F1) dan protein pengontrol siklus sel lainnya yaitu meningkatkan ekspresi protein p53 serta menginduksi apoptosis.⁴⁻⁷

Gen RB1 merupakan suatu *tumor suppressor gene* yang berfungsi memproduksi pRb, yaitu protein yang berperan dalam proses pembelahan sel, diferensiasi dan apoptosis di hampir semua jenis sel.

Peran pRb dalam perkembangan retina manusia sangat penting, dalam kerjanya pRb berikatan dengan E2F1 yang merupakan suatu protein yang dibutuhkan untuk sintesis DNA dalam regulasi siklus sel, yaitu dengan membentuk kompleks pRb-E2F1. Dalam kompleks ini, cyclin-dependent kinase 4 dan 6 (CDK4 dan CDK6) akan memediasi fosforilasi dari pRb pada kompleks pRb-E2F1 sehingga terjadilah pelepasan E2F1 dari kompleks pRb-E2F1 yang mengakibatkan terjadinya proses transkripsi dan progresi dari siklus sel. Dengan mutasi gen RB1 terjadi mutasi dan hilangnya fungsi pRb sebagai penekan atau faktor represor dari E2F1, menyebabkan peningkatan E2F1 yang drastis pada siklus sel dan terjadi progresivitas siklus sel dan proliferasi sel secara terus menerus, sehingga E2F1 berfungsi sebagai onkogen yang menyebabkan pertumbuhan tumor.^{1, 8-12}

Kelompok protein E2F1 meregulasi ekspresi gen yang terlibat didalam proses siklus sel dan memegang peranan penting dalam proliferasi sel, dalam kelompok ini terdapat kelompok yang bertindak sebagai aktivator maupun represor proses transkripsi. Kelompok E2F represor bertindak menghambat proses transkripsi pada fase G0 dan G1 siklus sel. Dalam progresivitasnya siklus sel, represor tersebut digantikan dengan E2F aktivator, yaitu E2F1. Dimana diketahui bahwa E2F1 berikatan dengan protein retinoblastoma (pRb) dengan membentuk kompleks pRb-E2F1 sehingga E2F1 terhambat dan menghambat terjadinya proses transkripsi. Pelepasan E2F1 yang terjadi pada kasus

retinoblastoma akibat malfungsi pRb menyebabkan proses transkripsi dan proliferasi sel terjadinya secara terus menerus.¹³

Efek kandungan TQ dalam *Nigella sativa* telah diteliti sebelumnya oleh Hussain K. I. A. et al. (2012) pada kultur sel retinoblastoma (911 Cells), dimana ditemukan bahwa ekstrak biji dan minyak biji *Nigella sativa* dapat menghambat proliferasi sel, sedangkan Kaseb et al. (2007) mengamati bahwa TQ dapat menghambat proses sintesis DNA, proliferasi dan kelangsungan hidup sel pada kultur sel tumor ganas prostat dengan menurunkan regulasi androgen reseptor dan E2F1. Elkady A. I. (2012) juga menemukan bahwa efek ekstrak etanol *Nigella sativa* secara signifikan menghambat proliferasi sel dan pembentukan koloni serta menginduksi apoptosis pada sel HeLa karsinoma serviks. Motaghed M. (2015) dalam penelitiannya tentang efek TQ pada kultur sel tumor ganas payudara MCF7 mendapatkan hasil adanya penurunan jumlah kelangsungan hidup sel dan menyebabkan akumulasi sel pada fase sub-G1 sehingga menurunkan jumlah sel hingga nol pada fase-fase lain siklus sel.¹⁴⁻¹⁷

Telah diketahui bahwa mutasi gen RB terjadi pada anak dengan retinoblastoma dan dipahami bahwa malfungsi pRb dan pelepasan dari E2F1 menginduksi terjadinya retinoblastoma. Oleh karena itu penting untuk memediasi pelepasan protein E2F1 yang merupakan efek dari hilangnya protein pRb agar proliferasi sel dari retinoblastoma dapat dihambat. Hal ini menyebabkan peneliti ingin mengetahui efektifitas dari thymoquinone yang terdapat dalam ekstrak minyak biji *Nigella sativa* dalam mencegah dan mengobati retinoblastoma, dengan melihat pengaruh ekstrak *Nigella sativa* terhadap protein E2F1 dan apoptosis pada kultur sel retinoblastoma.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian ekstrak *Nigella sativa* dapat mempengaruhi ekspresi protein E2F1 pada kultur sel retinoblastoma ?
2. Apakah terdapat hubungan antara pemberian dosis ekstrak *Nigella sativa* dengan ekspresi protein E2F1 pada kultur sel retinoblastoma ?
3. Apakah terdapat pengaruh antara pemberian dosis ekstrak *Nigella sativa* dengan ekspresi protein E2F1 pada kultur sel retinoblastoma ?

4. Apakah pemberian ekstrak *Nigella sativa* dapat mempengaruhi apoptosis pada kultur sel retinoblastoma ?
5. Apakah terdapat hubungan antara pemberian dosis ekstrak *Nigella sativa* dengan apoptosis pada kultur sel retinoblastoma ?
6. Apakah terdapat pengaruh antara pemberian dosis ekstrak *Nigella sativa* dengan apoptosis pada kultur sel retinoblastoma ?
7. Apakah terdapat hubungan antara ekspresi protein E2F1 dengan apoptosis pada kultur sel retinoblastoma ?
8. Apakah terdapat pengaruh antara ekspresi protein E2F1 dengan apoptosis pada kultur sel retinoblastoma ?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak *Nigella sativa* dalam mempengaruhi ekspresi protein E2F1 pada kultur sel retinoblastoma.
2. Untuk mengetahui hubungan antara pemberian dosis ekstrak *Nigella sativa* dengan ekspresi protein E2F1 pada kultur sel retinoblastoma.
3. Untuk mengetahui pengaruh pemberian dosis ekstrak *Nigella sativa* terhadap ekspresi protein E2F1 pada kultur sel retinoblastoma.
4. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak *Nigella sativa* dalam mempengaruhi apoptosis pada kultur sel retinoblastoma.
5. Untuk mengetahui hubungan antara pemberian dosis ekstrak *Nigella sativa* dengan apoptosis pada kultur sel retinoblastoma.
6. Untuk mengetahui pengaruh pemberian dosis ekstrak *Nigella sativa* terhadap apoptosis pada kultur sel retinoblastoma.
7. Untuk mengetahui pengaruh ekspresi protein E2F1 dengan apoptosis pada kultur sel retinoblastoma.
8. Untuk mengetahui hubungan antara ekspresi protein E2F1 dengan apoptosis pada kultur sel retinoblastoma.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak *Nigella sativa* dalam mencegah perkembangan retinoblastoma dengan mempengaruhi ekspresi protein E2F1 dan apoptosis pada kultur sel retinoblastoma.
2. Sebagai landasan penelitian selanjutnya tentang efek ekstrak *Nigella sativa* sebagai salah satu pilihan terapi pada retinoblastoma.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Retinoblastoma

2.1.1 Definisi

Retinoblastoma merupakan suatu tumor neuroblastik dan secara biologi serupa dengan neuroblastoma atau medulloblastoma. Tumor ini biasanya terdeteksi dalam beberapa tahun pertama kehidupan, namun dalam perkembangannya dapat timbul selama proses perkembangan embrio retina, sehingga sel yang menjadi sel dasar dari sel retinoblastoma merupakan sel progenitor yang dapat menjadi jenis sel apapun dari retina. Sekitar 90% dari kasus retinoblastoma terdiagnosa sebelum usia 3 tahun, namun onset lambat diatas usia 5 tahun pun dapat saja terjadi walaupun jarang. Retinoblastoma dapat unilateral maupun bilateral, retinoblastoma bilateral biasanya familial dan biasanya terdiagnosa dalam satu tahun pertama kehidupan, sedangkan retinoblastoma unilateral biasanya sporadik dan biasanya terdiagnosa saat anak berusia 1-3 tahun. ^{18, 19}

2.1.2 Epidemiologi

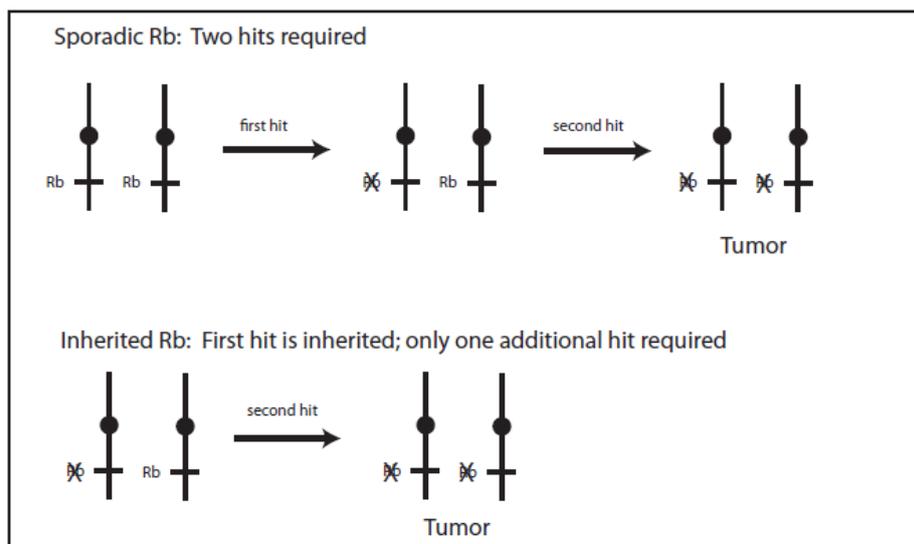
Insiden retinoblastoma rata-rata terjadi 1 dari 15.000-20.000 kelahiran hidup setiap tahunnya, dengan sekitar 5.000-9.000 kasus retinoblastoma baru terdiagnosa setiap tahunnya di dunia. Retinoblastoma paling banyak ditemukan pada daerah dengan populasi yang besar yang memiliki tingkat kelahiran yang tinggi, seperti di Asia dan di Afrika. Negara-negara dengan prevalensi yang terbesar memiliki angka kematian yang tertinggi, yaitu sekitar 40-70% anak-anak dengan retinoblastoma meninggal di Asia maupun di Afrika. ^{18, 20-22}

Retinoblastoma dapat terjadi unilateral maupun bilateral, 2/3 dari kasus didapatkan unilateral dan 1/3 kasus didapatkan bilateral. Baik laki-laki maupun perempuan dapat terkena dan tidak dipengaruhi oleh ras. 85% kasus retinoblastoma adalah sporadik dan hanya 15% yang mempunyai riwayat familial. Semua pasien dengan riwayat keluarga memiliki risiko untuk menderita retinoblastoma, namun hanya sekitar 80% yang bermanifestasi. ^{18, 20-22}

2.1.3 Patogenesis

Retinoblastoma merupakan akibat dari suatu mutasi atau delesi dari gen retinoblastoma (RB1) yang ditransmisikan secara dominan autosomal. Retinoblastoma sporadik / non herediter merupakan jenis retinoblastoma yang terjadi akibat kedua alel gen RB1 mengalami mutasi dan menghasilkan tumor unilateral dan unifokal. Sedangkan pada kasus retinoblastoma familial / inherediter, mutasi dari kedua alel gen RB1 diwariskan, namun hanya 10 % dari semua kasus retinoblastoma tipe ini yang orangtua merupakan penderita, seringnya bilateral dan multifokal.^{8, 18, 21, 23, 24}

Penjelasan mengenai patogenesis penyakit retinoblastoma ini dapat dirumuskan dengan "two-hit theory" oleh Knudson. Knudson menyimpulkan bahwa retinoblastoma disebabkan oleh dua peristiwa mutasi berurutan (*two-hit*). Menurut hipotesis ini, pada tipe familial/inherediter satu gen yang diturunkan / diwariskan secara dominan mengalami mutasi melalui sel-sel germinal dan mutasi yang kedua terjadi secara spontan pada sel-sel somatik dari retina. Sebaliknya, dalam bentuk nonherediter kedua mutasi (mutasi pertama dan mutasi kedua) terjadi pada sel-sel somatik retina. Pada kedua tipe retinoblastoma tersebut, mutasi gen terjadi pada kedua alel pada kromosom 13q14.^{8, 20, 23, 25, 26}



Gambar 2.1 "Two-hit" theory. Pada retinoblastoma sporadic terjadi dua kali mutasi pada sel-sel somatik retina (atas); pada retinoblastoma inherediter mutasi pertama terjadi pada sel-sel germinal dan mutasi yang kedua terjadi pada sel-sel somatik dari retina.²⁵



Mutasi dari gen RB1 menyebabkan gangguan dalam fungsinya memproduksi pRb sehingga pRb pun mengalami gangguan fungsi sehingga tidak dapat berikatan dengan E2F1, sedangkan pRb merupakan suatu protein yang memegang peranan penting dalam siklus sel dimana dalam keadaan terhipopolarisasi pRb berada dalam fase G1 dan mengikat aktivator E2F1 dalam bentuk kompleks pRb-E2F1 dan berperan menghambat E2F1 dalam proses transkripsi dan mencegah sel memasuki siklus S. Dengan gangguan fungsi pRb ini mengakibatkan aktivasi / pelepasan dari E2F1 sehingga mempromosikan *cyclin* E dan meningkatkan ekspresi *cyclin* E yang dibutuhkan untuk berikatan dengan CDK2, yang kemudian membentuk kompleks *cyclin* E-CDK2 dan mendorong siklus sel memasuki fase S, disregulasi ini terus terjadi dan menyebabkan proliferasi tanpa terkendali.^{24, 25}

2.1.4 Manifestasi Klinis

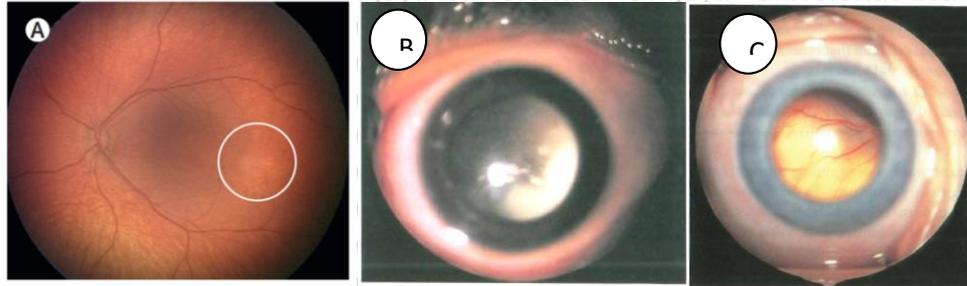
Gejala yang biasanya pertama kali dikenali oleh keluarga penderita digambarkan sebagai adanya sesuatu yang berkilau pada manik mata seperti tampilan mata kucing (*cat's eye appearance*), yang disebut dengan *leukocoria*, yaitu suatu keputihan yang terlihat pada bagian dalam mata (pupil). Temuan lain yang didapatkan pada penderita retinoblastoma adalah strabismus (esotropia atau exotropia), serta yang kurang umum seperti perdarahan vitreous, hifema, peradangan okular dan periokular, glaukoma, proptosis, dan pseudohipopion.^{8, 18, 20, 23}



Gambar 2.2 Leukokoria pada retinoblastoma unilateral sporadik.²³

Dalam tahap klinis paling awal, retinoblastoma ditemukan kecil, berbentuk bulat atau oval berukuran kurang dari 2 mm, tampak pada pemeriksaan oftalmoskop sebagai suatu lesi yang halus, transparan atau terlihat sedikit jelas pada retina. Setiap retinoblastoma dari berbagai ukuran pun dapat menghasilkan gambaran *leukocoria*, namun lebih

sering pada tumor yang berukuran besar. Refleks putih yang muncul ini merupakan akibat dari pantulan sinar dari massa yang berada di area retrolental.^{21, 23}



Gambar 2.3 Retinoblastoma. (A) tumor intraretinal berukuran kecil; (B) Retinoblastoma dengan pola pertumbuhan endophytic; (C) Retinoblastoma dengan pola pertumbuhan exophytic.^{18, 23}

Pola pertumbuhan retinoblastoma terbagi menjadi intraretinal, endophytic dan exophytic. Tumor intraretinal adalah yang terbatas pada substansi retina saja. Retinoblastoma endophytic adalah tumor yang tumbuh dari retina menuju ke dalam rongga vitreous, ditandai dengan adanya massa berwarna putih keruh dan mengaburkan pembuluh darah retina, dapat terlokalisir maupun ekstens sehingga memicu endophthalmitis. Pertumbuhan retinoblastoma exophytic adalah tumor yang tumbuh dari retina luar ke dalam ruang subretinal, sering dikaitkan dengan akumulasi cairan subretinal yang mengaburkan tumor dan memberikan gambaran yang serupa dengan gambaran exudative retinal detachment. Sel-sel retinoblastoma memiliki potensi untuk menempel pada jaringan retina yang sebelumnya tidak terlibat dan tumbuh, sehingga memberi kesan tumor multifokal pada mata yang hanya dengan tumor primer tunggal. Hifema sekunder, perdarahan vitreous dan glaukoma dapat muncul akibat neovaskularisasi.^{18, 21}

2.1.5 Klasifikasi

Klasifikasi retinoblastoma dikembangkan untuk membantu memprediksi keselamatan dari bola mata. Klasifikasi yang paling umum digunakan adalah pengelompokan berdasarkan klasifikasi Reese-Ellsworth. Sebuah *International Classification of Retinoblastoma* (ICRB) saat ini sedang dikembangkan untuk menyederhanakan skema

pengelompokan dan membantu memberikan pendekatan yang lebih praktis dalam menilai keberhasilan dari kemoreduksi.^{18, 21}

Tabel 2.1 Klasifikasi Reese-Ellsworth.²¹

Grup I : penglihatan sangat memungkinkan untuk dipertahankan
<ol style="list-style-type: none"> 1. Tumor soliter, ukuran lebih kecil dari 4 diameter disk (DD), pada atau di belakang ekuator bola mata. 2. Tumor multipel, tidak ada yang lebih besar dari 4 DD, seluruhnya pada atau di belakang ekuator.
Grup II: penglihatan memungkinkan untuk dipertahankan
<ol style="list-style-type: none"> 1. Tumor soliter, 4-10 DD pada atau di belakang ekuator. 2. Tumor multipel, 4-10 DD di belakang ekuator.
Grup III: penglihatan mungkin dapat dipertahankan
<ol style="list-style-type: none"> 1. Setiap lesi yang terletak di depan ekuator. 2. Tumor soliter, >10 DD di belakang ekuator.
Grup IV: penglihatan sulit untuk dipertahankan
<ol style="list-style-type: none"> 1. Tumor multipel, beberapa >10 DD. 2. Setiap lesi yang meluas ke anterior kepada ora serrata
Grup V: penglihatan tidak mungkin untuk dipertahankan
<ol style="list-style-type: none"> 1. Tumor masif meliputi lebih dari setengah retina. 2. Terdapat penyebaran kearah vitreus.

Tabel 2.2 *International Classification for Intraocular Retinoblastoma*.²⁷

Group A	Tumor kecil	Ukuran < 3mm
Group B	Tumor besar Makula Juxtapapillar Cairan subretina	Ukuran >3mm, atau: Lokasi di makula (< 3 mm dari Foveola) Lokasi di Juxtapapillar (< 1.5 mm dari papil) Cairan subretina jernih, 3 mm dari margin
Group C	Penyebaran lokal C1 C2 C3	Retinoblastoma dengan: Penyebaran sub retina < 3mm dari Retinoblastoma Penyebaran Vitreous < 3 mm dari Retinoblastoma Penyebaran sub retina dan vitreous < 3 mm dari Retinoblastoma
Group D	Penyebaran difus D1 D2 D3 D4	Retinoblastoma dengan: Cairan sub retina > 3mm dari Retinoblastoma Penyebaran sub retina > 3mm dari Retinoblastoma Penyebaran vitreous > 3 mm dari Retinoblastoma Penyebaran sub retina dan vitreous > 3 mm dari Retinoblastoma
Group E	Penyebaran Ekstensif	Melibatkan > 50% dari bola mata atau : Glaukoma Neovaskular Media opaque akibat perdarahan bilik mata depan, vitreous atau ruang sub-retina Invasi nervus optic post laminar, koroid (>2mm), sclera, orbit dan bilik mata depan Pthisis bulbi post RB Selulitis orbita yang merupakan tumor nekrosis aseptik

2.1.6 Diagnosis

Evaluasi pasien dengan kecurigaan kearah retinoblastoma membutuhkan pemeriksaan penunjang pencitraan kepala dan orbita, selain bermanfaat untuk mendiagnosa juga berguna untuk mengevaluasi ekstensi tumor ke ekstraokular dan intrakranial. Untuk menghindari paparan radiasi, pemeriksaan penunjang pencitraan yang direkomendasikan adalah *Magnetic resonance imaging* (MRI) dan *ultrasonography* (USG). Pemeriksaan patologi pada retinoblastoma biasanya memberikan gambaran Flexner-Wintersteiner rosettes, Homer-

Wright rosette atau yang lebih jarang ditemukan adalah gambaran fleurettes. Gambaran tersebut menunjukkan suatu diferensiasi fotoreseptor dan neuroblastik.^{18, 19, 23}

Pemeriksaan genetik dan molekular diagnostik dapat dilakukan untuk mendeteksi gene RB1. Pemeriksaan ini penting dilakukan pada anak yang terjangkit maupun pada anggota keluarga lainnya untuk membantu menentukan risiko tumor ganas.¹⁸

2.1.7 Penatalaksanaan

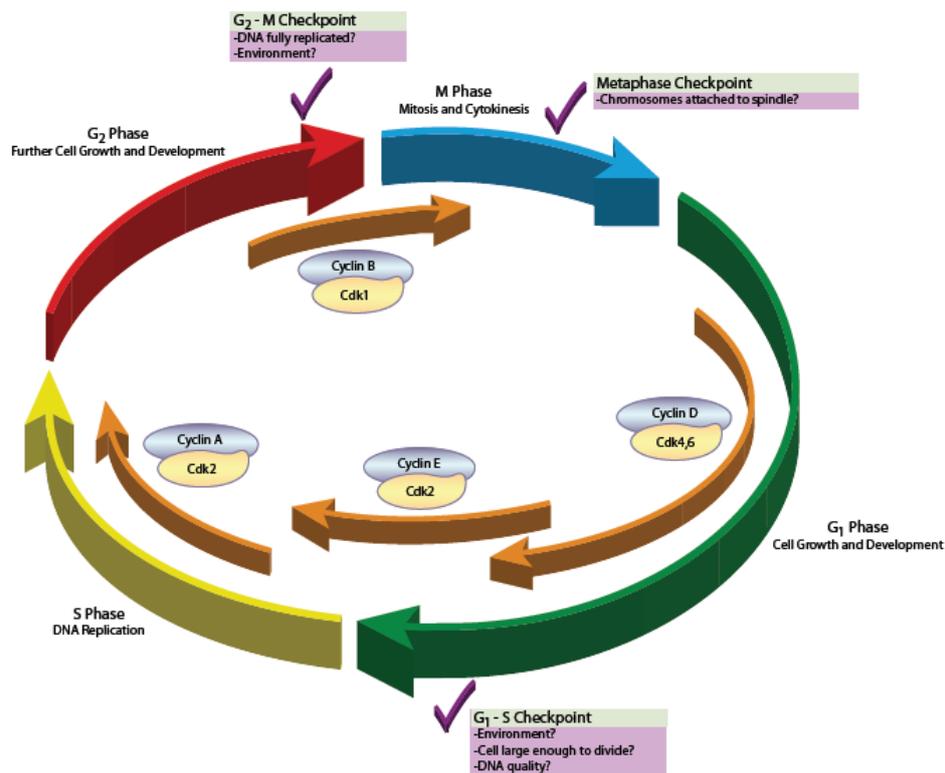
Ada beberapa pilihan metode terapi pada kasus retinoblastoma, dimana pemilihan indikasi, teknik dan keberhasilan terapi harus dipertimbangkan. Untuk retinoblastoma intraokular berdasarkan klasifikasi Reese-Ellsworth, secara umum retinoblastoma grup I-IV diterapi dengan kemoreduksi terapi terapi fokal/lokal (*cryotherapy, laser photocoagulation, thermotherapy* atau *plaque radiotherapy*). Kemoterapi jarang berhasil jika tidak dibarengi dengan lokal terapi. Obat kemoreduksi yang digunakan diantaranya adalah vincristine, carboplatin, epipodophylotoxin, dan cyclosporine. Pada retinoblastoma grup V dianjurkan untuk dilakukan enukleasi untuk mengurangi efek samping dari kemoterapi sistemik dan mencegah penyebaran ekstraokular. Untuk kasus bilateral dilakukan kemoreduksi, kecuali didapatkan perbedaan derajat keganasan yang sangat jauh asimetris, dimana mata yang mengalami kelainan minimal diterapi dengan metode fokal dan mata dengan kelainan yang sudah lanjut di enukleasi. Retinoblastoma ekstraokular yang kebanyakan melibatkan nervus optikus, dapat juga menginvasi ke orbita dan susunan saraf pusat serta metastasis jauh, diterapi dengan intensif kemoterapi multimodalitas, *external-beam radiation* dan terapi hematopoietik sumsum tulang.^{18, 21, 23, 28-30}

Keberhasilan kemoreduksi pada retinoblastoma grup I-IV sekitar 85 % dan hanya 47% pada grup V. Permasalahan utama yang dihadapi adalah rekurensi penyebaran ke dalam vitreous dan subretina setelah dua tahun menjalani terapi tersebut dan 24% pasien mengalami pertumbuhan retinoblastoma baru ketika sedang dalam pengobatan atau setelah menjalani terapi kemoreduksi. Sehingga penanganan retinoblastoma hingga saat ini masih terus berkembang.²¹

2.2 Siklus Sel

Siklus replikasi sel normal terdiri dari 4 fase yaitu gap (G1), sintesis (S), G2 dan mitosis (M). Tahap interfase terdiri dari fase G1, S dan G2, tahap mitosis dibagi atas profase, metafase, anafase dan telofase. Fase G1 merupakan suatu gap yang mendahului fase S, dimana di fase ini sel bersiap-siap untuk melakukan sintesis DNA, dimana sel terus tumbuh dan melakukan metabolisme normal, kemudian sebelum sel akan memasuki replikasi DNA, sel pada G1 akan memasuki fase istirahat yang disebut G0. Sel pada G0 berada pada keadaan tidak tumbuh atau tidak berproliferasi. Lalu replikasi DNA terjadi pada fase S, yang kemudian diikuti dengan gap yang disebut fase G2, pada fase ini sel akan tumbuh dan bersiap untuk melakukan mitosis, dan kemudian pembelahan mitosis terjadi pada fase M. Pada kultur sel manusia, sel eukariotik biasanya membelah sekali dalam waktu 24 jam. Namun durasi ini bervariasi berdasarkan tipe sel dan faktor yang mempengaruhi. Fase S dan M merupakan fase yang paling sensitif terhadap berbagai macam faktor, sehingga apabila sel terpapar oleh suatu faktor seperti paparan radiasi, sel biasanya melakukan perpanjangan arrest pada fase G1 atau G2.^{29, 31}

Siklus sel dikontrol oleh beberapa protein yang bertindak sebagai regulator positif dan negatif. Kelompok *cyclin*, khususnya *cyclin* D, E, A dan B merupakan protein yang kadarnya berfluktuasi selama proses siklus sel. *Cyclin* bersama dengan *cyclin dependent kinase* (CDK), khususnya CDK 4, 6, dan 2 bertindak sebagai regulator positif yang memicu terjadinya progresivitas siklus sel. Ekspresi *kinase* (CDK4/6-CDK2-CDK2-CDK1) berturut-turut bersamaan dengan ekspresi *cyclin* (D-E-A-B) secara berturut-turut seiring dengan jalannya pada siklus sel (G1-S-G2-M). Aktivasi CDK dihambat oleh regulator negatif siklus sel, yaitu CDK inhibitor (CKI), yang terdiri dari Cip/Kip protein (meliputi p21, p27 dan p57), keluarga INK4 (meliputi p15, p16, p18 dan p19) dan *tumor suppressor gene* yaitu protein p53 dan pRb yang juga bertindak sebagai protein regulator negatif.^{32, 33}



Gambar 2.4 Siklus Sel. 29

2.2.1 Fase G1

Siklus sel dimulai dari masuknya sel dari fase G0 ke fase G1 akibat adanya stimulus oleh *growth factor*. Pada awal fase G1, *Cyclin D* meregulasi *checkpoint* pertama, ditemukan berpasangan dan mengaktifkan empat *cyclin dependent kinase*, yaitu CDK2-4-5-6, namun CDK4 merupakan pasangan utama dalam sebagian besar *cyclin D*. Aktivasi CDK4 ini menyebabkan fosforilasi dan menginisiasi hiperfosforilasi pRb yang mengakibatkan lepasnya faktor transkripsi E2F1 dari kompleks pRb-E2F1 yang mengaktifkan gen-gen yang diperlukan untuk sintesis DNA dan mengganggu fungsi histon deasetilase (HDAC) yang menjaga kekompakan struktur kromatin. Akibat melonggarnya struktur DNA dan lepasnya E2F1 menyebabkan progresi siklus sel masuk ke dalam fase S. 13, 30

2.2.2 Fase G1/S

Sintesis *cyclin E* diyakini bertindak pada transisi fase G1 ke fase S setelah *cyclin D* dan menjadi bagian penting untuk menginisiasi replikasi

DNA. *Cyclin E* yang tereksresi tersebut pada saat menjelang akhir fase G1 berikatan dengan CDK2 untuk mengaktifkannya. Setelah sel memasuki fase S dan melanjutkan proses hiperfosforilasi pRb. *Cyclin E* cepat rusak dan CDK2 dilepaskan untuk membentuk kompleks dengan *cyclin A* pada fase berikutnya.^{30, 32}

Biasanya, sel-sel yang telah mengalami kerusakan DNA dicegah untuk memasuki fase S dan hentikan di fase G1, proses ini diregulasi oleh protein *p53-dependent* pada *cyclin-dependent inhibitor kinase* (CDI) melalui regulasi transkripsi CKI p21. Aktivasi p53 akibat kerusakan DNA menyebabkan peningkatan kadar p21 yang kemudian dapat mengikat sejumlah kompleks *cyclin*-CDK termasuk diantaranya *cyclin D*-CDK4 dan *cyclin E*-CDK2 sehingga mencegah hiperfosforilasi dari pRb dan menyebabkan hambatan pelepasan faktor transkripsi E2F1 dari kompleks pRb-E2F1 sehingga siklus sel tertahan di fase G1.^{13, 30}

2.2.3 Fase S

Setelah sel memasuki fase S, kompleks *cyclin A*-CDK2 terus diperlukan untuk melanjutkan proses replikasi DNA. *Cyclin A* tereksresi mulai dari fase S hingga fase G2 dan M. *Cyclin A* mengikat dua CDK yang berbeda. Selama fase S ditemukan berikatan dan membentuk kompleks dengan CDK2, sedangkan selama fase G2 membentuk kompleks dengan CDC2.³⁰

2.2.4 Fase G2/M

Memasuki tahap akhir dari siklus sel, mitosis, ditandai dengan degradasi *cyclin A* dan terjadi peningkatan ekspresi *cyclin B* dan membentuk kompleks *cyclin B*-CDC2. Kompleks ini terakumulasi selama fase S dan G2 tetapi disimpan dalam keadaan tidak aktif oleh residu fosforilasi tirosin 15 dan treonin 14, proses ini diatur oleh kinase weel/mikl. Pada akhir G2, CDC25c fosfatase distimulasi untuk defosforilasi residu ini sehingga mengaktifkan CDC2. *Cyclin B* yang selama interfase terletak di sitoplasma, dalam fase mitosis ini mengalami translokasi ke dalam nukleus. Pada metafase terbentuk serabut spindle yang menempel pada kromosom, lalu kromosom tersusun segaris dan berada ditengah-tengah sel, dan terjadi perpisahan menjadi satu bagian

(mikrotubulus). *Cyclin B*-CDC2 mengendalikan metafase dalam monitor pasangan mikrotubulus, menyusun deretan kromosom yang benar pada metafase *plate* dan pengaturan pembongkaran mikrotubulus dan memungkinkannya untuk terlepas dan terbagi. Kemudian *cyclin B* terdegradasi sesaat sel masuk ke dalam anafase, sehingga proses siklus sel dapat kembali ke dalam tahap interfase lagi. Sedangkan CDK1 walaupun dapat mendorong progresi siklus sel, namun masih belum jelas apakah memiliki respon terhadap kerusakan pada siklus sel.³¹

2.3 Protein Regulator Retinoblastoma

Terdapat beberapa gen di dalam tubuh yang berfungsi untuk mengontrol pertumbuhan sel, membagi sel tersebut menjadi sel-sel baru dan menjaga sel-sel tersebut untuk tetap hidup. Gen-gen ini disebut onkogen. Disisi lain ada gen-gen yang memperlambat proses pembelahan sel dan melakukan pengaturan sel-sel untuk mati pada waktu yang tepat, gen-gen ini disebut sebagai *tumor suppressor gene*.

Tumor ganas dapat disebabkan oleh perubahan DNA yang mengaktifasi onkogen atau menginaktivasi *tumor suppressor gene*.^{30,33}

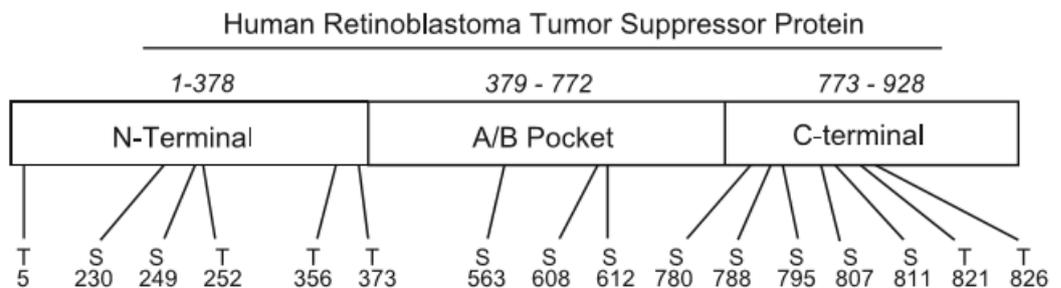
Protein retinoblastoma (pRb) merupakan protein penekan pembentukan tumor yang aktivitasnya diregulasi oleh hiperfosforilasi selama fase G1 dan S siklus sel. E2F1 memegang peranan penting dalam progresivitas siklus sel selama proses transkripsi dan menyebabkan proliferasi sel yang dapat menyebabkan pertumbuhan tumor dan bersifat onkogen jika terjadi peningkatan E2F1 yang drastis.^{13,30}

2.3.1 Protein Retinoblastoma (pRb)

Gen retinoblastoma (RB1) dipetakan pada lokus didalam tangan panjang q14 kromosom 13 (13q14), berfungsi mengkode protein retinoblastoma (pRb) yang merupakan protein penekan pembentukan tumor, dalam fungsinya aktivitas pRb diregulasi oleh hiperfosforilasi yang berjalan selama progresivitas siklus sel yang berjalan normal pada fase G1 dan S, dengan dimediasi oleh kompleks *cyclin* dan *cyclin dependent kinase*. Protein retinoblastoma berfungsi mengikat dan menghambat aktivitas protein E2F1 aktivator yang berlokasi di dalam nukleus, sehingga

membentuk ikatan kompleks pRb-E2F1 yang menghambat progresi dari siklus sel.^{18, 19, 21, 24}

Telah diketahui bahwa pRb berinteraksi dengan faktor transkripsi E2F1 melalui domain saku A/B yang meliputi asam amino 379-772, hal ini menghambat aktivitas transkripsi E2F1. Represi transkripsi yang dihasilkan akibat tingginya afinitas interaksi langsung berkorelasi dengan kemampuan pRb untuk menghentikan siklus sel pada fase G1. Selain domain saku A/B, terdapat domain terminal COOH (Terminal C), meliputi asam amino 773-928, yang juga memainkan peran yang sama pentingnya dalam memfasilitasi ikatan dengan E2F1 dan dibutuhkan untuk represi penuh dan penekanan pertumbuhan.³⁴



Gambar 2.5 Struktur Protein Retinoblastoma (pRb).³⁴

pRb menghambat transkripsi yang dimediasi oleh E2F1 melalui dua mekanisme yang berbeda. Yang pertama, pRb berikatan dengan domain transaktivator E2F1 dan menghambat kemampuan E2F1 dalam mempromosikan gen-gen aktivasi transkripsi yang terkait dengan E2F1. Yang kedua, pRb aktif merepresi ekspresi gen-gen tertentu dengan merekrut faktor remodeling kromatin seperti HDAC, Brg1, dan Suv39H1 yang dalam upayanya bekerja sama untuk menekan transkripsi yang dimediasi oleh E2F1.³⁴

Ada urutan asam amino pada pRb yang dapat berikatan dengan CDK sehingga menyebabkan hiperfosforilasi pRb. Ada 16 kelompok CDK yang dapat berhubungan dengan pRb pada manusia, tujuh terletak di domain terminal COOH (asam amino 773-928), enam berada dalam domain terminal NH2 (asam amino 1-378), dan tiga terletak di domain saku A/B (asam amino 379-772).³⁴

Domain saku A/B terbentuk dan memiliki integritas struktural yang penting dalam fungsi pRb sebagai repressor. Mutasi yang dapat

disebabkan oleh protein virus pada domain ini menyebabkan tumorigenesis.³⁵

Domain terminal C berinteraksi dan mengatur domain saku A/B, interaksi ini diperkuat oleh sisa fosforilasi yang terjadi pada terminal C.

Domain ini memiliki tempat berikatan dengan cyclin yang sangat penting proses fosforilasi pRb untuk menekan pertumbuhan.³⁵

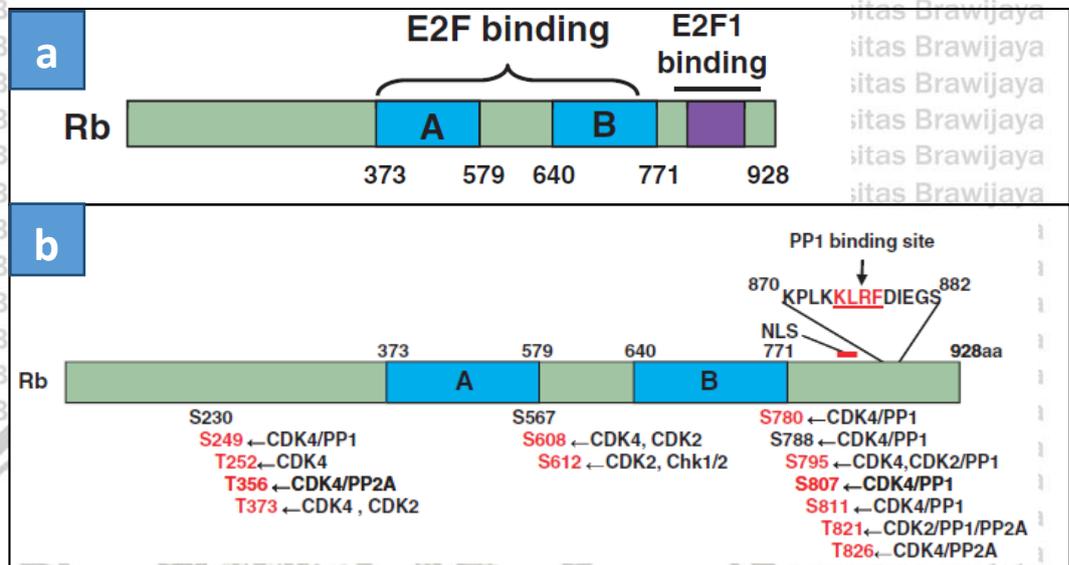
Domain terminal N, juga seperti terminal C yang mengikat domain saku A/B. Namun, interaksi pada domain ini dapat memicu aktivitas pRb karena terminal N merupakan bagian yang mengkonfirmasi aktivasi pRb, sehingga jika terjadi mutasi pada terminal N, fungsi domain saku A/B juga dapat terganggu.³⁵

2.3.2 Protein E2 Promoter-Binding Factor 1 (E2F1)

E2F merupakan kelompok protein faktor transkripsi yang terdiri dari sembilan anggota, yaitu E2F1, E2F2, E2F3a, E2F3b, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7 dan E2F8. Dalam fisiologi sel normal, aktivitas transkripsi E2F diatur oleh kontrol autoregulasi melalui "intrafamilial" cross-talk. Mempunyai dua fungsi yang berbeda. Berdasarkan fungsinya E2F dapat dibagi menjadi dua kelompok yang berbeda, kelompok pertama merupakan kelompok E2F yang bertindak terutama sebagai aktivator faktor transkripsi dengan menargetkan gen yang mempromosikan proliferasi, yang termasuk dalam kelompok ini adalah E2F1, E2F2 dan E2F3a. E2F1 diperlukan untuk aktivasi gen target yang terlibat dalam fase transisi G1/S dan terlibat dalam apoptosis dengan menargetkan gen pada jalur p53. E2F3a merupakan aktivator transkripsi yang terutama diekspresikan selama fase S. Sebaliknya, kelompok yang kedua bertindak sebagai represor transkripsi yang terdiri dari E2F3b, E2F4 dan E2F5, berada pada awal fase G1 siklus sel. Dalam progresivitas siklus sel, E2F represor tersebut digantikan dengan E2F aktivator. Di sisi lain, peran fungsional dari E2F6, E2F7 dan E2F8 belum sepenuhnya dipahami, namun dianggap bertindak terutama sebagai represor transkripsi.^{13, 36-39}

Interaksi antara pRb-E2F1 memegang peranan utama dalam aktivitas onkogenik. Inaktivasi fungsi pRb yang dapat disebabkan oleh onkoprotein viral maupun mutasi pada tumor ganas dalam mengikat E2F1

mengakibatkan proses transkripsi pada siklus sel. Penurunan ekspresi E2F1 akan mensupresi insiden terjadinya perkembangan tumor, dimana kontribusi E2F aktivator lain (E2F2 dan E2F3a) dalam mensupresi tumor masih belum ditemukan.^{13, 38, 40, 41}



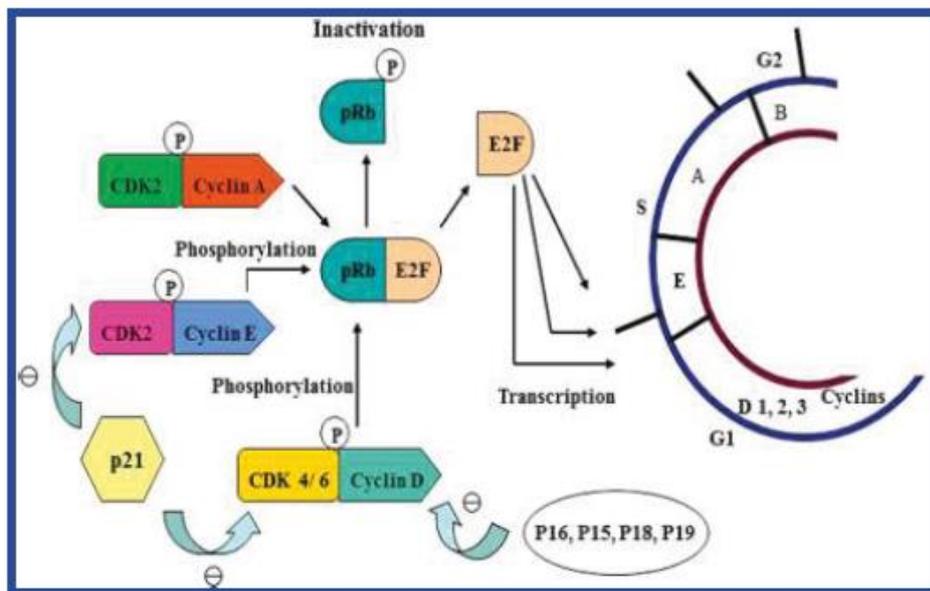
Gambar 2.6 Struktur Kompleks pRb. Struktur Kompleks pRb-E2F dalam keadaan hipofosforilasi (a); Struktur pRb dalam keadaan hiperfosforilasi berikatan dengan CDK4 (b).³⁶

Beberapa contoh kelainan yang telah ditemukan berkaitan dengan kelompok protein E2F, diantaranya E2F1 berhubungan dengan tumor ganas, E2F3 berhubungan dengan kelainan jantung, E2F4 berhubungan dengan defek pembentukan sel darah merah. Biomolekular dari masing-masing perbedaan fungsi spesifik tersebut belum banyak dimengerti.⁴¹

2.3.3 Peran Kompleks pRb-E2F1 terhadap tumorigenesis

Ketika E2F berikatan dengan pRb, pRb berfungsi merepresi aktivator E2F1 dalam melakukan proses transkripsi melalui 3 mekanisme. Yang pertama, melalui ikatan langsungnya pRb dengan E2F1 mencegah E2F1 untuk berikatan / berinteraksi dengan faktor-faktor protein atau gen-gen aktivator lain. Yang kedua, setelah ditambahkan kepada E2F1, secara bersamaan domain aktivasi pRb dapat mengikat faktor aktivator lain, dengan cara ini pRb dapat memadamkan dua aktivator dalam waktu yang bersamaan. Yang Ketiga, Kompleks pRb- E2F1 yang dimediasi oleh pRb juga menghambat aktivator lain yang tidak berikatan dengan pRb.³⁵

Pada awal fase G1, ketika tidak terhiperfosforilasi pRb berikatan dengan suatu protein transkripsi yang disebut dengan E2F1 dan membentuk kompleks pRb-E2F1 sehingga menghambat dan terjadi penekanan proses transkripsi pada siklus sel. Pada akhir fase G1, ketika pRb terhiperfosforilasi oleh CDK4 dan CDK6, pRb tidak lagi efisien dalam bentuk kompleksnya bersama E2F1, sehingga E2F1 terlepas dan dengan pengaturan diferensiasi dan faktor transkripsinya mampu mengaktifkan ekspresi sejumlah gen yang mengatur dan mempromosikan masuknya sel ke dalam fase S, diantaranya adalah DNA polymerase α , thymidylate synthase, ribonucleotide reductase, cyclin E dan dihydrofolate reductase. CDK4 dan CDK6 mengalami penurunan aktivitas bila diikat langsung oleh p16 dan mengembalikan pRb dalam keadaan terhipofosforilasi dan kembali membentuk kompleks pRb-E2F1. Selain p16, CDK inhibitor lainnya yang dapat memutuskan kompleks CDK4/6 adalah p21 dan p27, yang juga akan mensupresi aktivitas CDK2 dan meningkatkan kadar ekspresi pRb terhipofosforilasi.^{9, 18, 21, 24, 34, 36, 42}



Gambar 2.7 Peran kompleks pRb-E2F dalam siklus sel fase G1. CKI p21 dan p27 mengikat kompleks cyclin-CDK sehingga terjadi penurunan aktivitasnya dan menyebabkan hipofosforilasi pRb dan membentuk kompleks pRb-E2F yang menyebabkan arrest dan kemudian terjadi perbaikan pada kerusakan DNA fase G1.⁹

Pada Retinoblastoma peningkatan ekspresi protein E2F1 akibat mutasi pRb menyebabkan stimulus pada mRNA untuk menginduksi TGF- β yang memberikan banyak respon melalui berbagai jalur yang akan

menyebabkan apoptosis dari kerusakan sel, diantaranya adalah dengan menghambat aktivitas human telomerase reverse transcriptase (hTERT) yang mana aktivitas hTERT menyebabkan replikasi dan transformasi onkogenik pada sel-sel tumor sebanyak 85-90%. Dengan adanya mutasi genom yang mengarah pada transformasi onkogenik dan adanya kerusakan DNA, TGF- β juga berperan meningkatkan ekspresi p53 yang akan menyebabkan upregulasi dan peningkatan ekspresi mediator utamanya yaitu protein p21 yang merupakan CKI (CDK *Inhibitor*) yang berfungsi mengikat kompleks *cyclin*-CDK sehingga menghalangi hiperfosforilasi protein Rb yang dimediasi oleh *cyclin* D-CDK4 dan *cyclin* E-CDK2 dan menghambat pelepasan E2F1 yang berperan menginduksi ekspresi gen yang dibutuhkan untuk memasuki fase S, sehingga menimbulkan respon seluler berupa penghentian siklus sel (*cell cycle arrest*), menghidupkan jalur apoptosis yang memaksa sel-sel yang rusak dan mengandung mutasi melakukan bunuh diri sehingga mencegah perbanyakan dan pertumbuhan selular yang abnormal. Target kerja dari p53 lainnya adalah merepresi berbagai ekspresi gen regulator negatif terhadap apoptosis, gen yang dapat ditekan oleh p53 termasuk adalah Bcl-2, Bcl-X1, *cyclin* B, MAP4 dan survivin. Respon produk gen target p53 lainnya, yaitu peningkatan ekspresi Gadd45 yang berpartisipasi dalam penghentian fase G2. Gadd45 mengikat CDC2 sehingga mencegah pembentukan kompleks *cyclin* B-CDC2 dan menghambat aktivitasnya dalam mengendalikan metafase dan pengaturan pembongkaran mikrotubulus. Selain itu TGF- β berperan dalam mengaktivasi gen pro apoptosis Apaf1, Caspase 3, Caspase 7, p73, dan Smac/DIABLO, TGF- β juga menghambat *cdc25a* sehingga aktivasi CDC2 terhambat dan menyebabkan cycle cell arrest pada fase G2. Sedangkan efek dan peran pro apoptosis pRb akibat kerusakan DNA sendiri adalah dengan cara menstimulasi TNF- α baik melalui jalur intrinsik (mitokondria) maupun melalui jalur ekstrinsik (aktivasi caspase).^{30, 32, 34, 43-47, 48}

2.4 Jintan Hitam (*Nigella sativa*)

Nigella sativa, atau di Indonesia lebih dikenal dengan nama jintan hitam, atau juga disebut *black cumin* atau *black seed* dalam bahasa Inggris dan *Habbatussauda* dalam bahasa Arab. Tanaman ini tumbuh di

negara-negara Mediterania dan Asia Barat seperti India, Pakistan dan Bangladesh. *Nigella sativa* sebagian besar tumbuh di dataran, tumbuh sekali dalam setahun selama akhir bulan Oktober-November hingga bulan Maret-April, dan sekitar bulan Mei-Juni dan jarang dapat tumbuh di daerah perbukitan.⁴⁹⁻⁵²

Nigella sativa merupakan tanaman berbunga. Tumbuh dengan tinggi sekitar 20-30 cm. Memiliki morfologi daun berbentuk linear hingga lancip dengan panjang 2 – 3 cm, bunga yang halus dengan diameter \pm 3,5 4,5 cm terdiri dari 5-10 kelopak yang biasanya berwarna kuning, putih, merah muda, biru pucat atau ungu pucat, buah yang besar dan berkapsul cembung terdiri dari 3-7 folikel yang bersatu yang masing-masingnya berisikan biji yang banyak. Biji berwarna hitam, pipih, lonjong dan berbentuk corong dengan panjang 0,2 cm dan lebar 0,1 cm.⁵³⁻⁵⁵

Nigella sativa dipercaya memiliki khasiat pengobatan yang sangat banyak terutama di Asia dan Timur Tengah. Hal ini didasari oleh keyakinan dan pengetahuan. Dimana minyak biji *Nigella sativa* memiliki aktivitas anti-neoplastik, anti-karsinogenik atau anti-mutagenik yang menjanjikan baik pada in vivo dan in vitro pada beberapa kultur sel tumor yang berbeda. Kegiatan biologis ini terkait dengan komponen aktif utama, thymoquinone (TQ), zat kristal yang diisolasi dari minyak biji *Nigella sativa* dan merupakan komponen utama dari minyak ini.^{50-52, 56, 57}

2.4.1 Klasifikasi *Nigella sativa*

Kerajaan	:	<i>Plantae</i>
Divisi	:	<i>Magnoliophyta</i>
Kelas	:	<i>Magnoliopsida</i>
Ordo	:	<i>Ranunculales</i>
Familiya	:	<i>Ranunculaceae</i>
Genus	:	<i>Nigella</i>
Spesies	:	<i>Nigella sativa</i>



Gambar 2.8 Biji *Nigella sativa*.⁵⁸



Gambar 2.9 Tanaman *Nigella sativa*.^{55, 58}

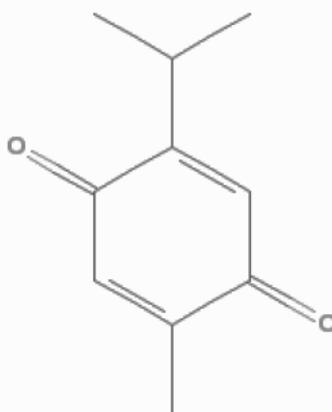
2.4.2 Komposisi Kimia Biji *Nigella sativa*

Biji *Nigella sativa* mengandung 26,7 % protein, 28,5 % lemak, 24,9 % karbohidrat, 8,4 % serat, dan total kandungan mineral lain sebesar 4,8 % diantaranya adalah Cu, P, Zn, Fe, dll. Sedangkan akar dan pucuk daun *Nigella sativa* dilaporkan mengandung asam vanilat.^{49, 53}

Di dalam biji *Nigella sativa* terkandung sekitar 30 – 53 % *fixed oil* (tidak mudah menguap) dengan total 85 % asam lemak tidak jenuh (linoleic acid (50 – 60 %), oleic acid (20 %), eicodadienoic acid (3 %) dan

dihomolinoleic acid (10 %). Sedangkan asam lemak jenuh (palmitic, stearic acid) totalnya hanya < 30 %.^{49, 53, 54, 59}

Kandungan *volatile oil* (mudah menguap) di dalam biji *Nigella sativa* sebesar $\pm 0,4 - 2,5$ % dengan bermacam-macam komponen yang memiliki aktivitas biologik aktif yang dapat diisolasi dan diidentifikasi dari minyak ini. Komponen-komponen aktif yang paling penting diantaranya adalah *thymoquinone* (TQ) 27 – 62 %, *thymohydroquinone*, *dithymoquinone*, *p-cymere* (7 - 15 %), *carvacrol* (6 - 12 %), *4-terpineol* (2 - 7 %), *t-anethol* (1 - 4 %), *sesquiterpene longifolene* (1 - 8 %), α -pinene dan *thymol*. TQ merupakan konstituen utama yang paling banyak ditemukan dan diisolasi dari *Nigella sativa*.^{51, 53, 56, 58, 60, 61}



Gambar 2.10 Struktur Kimia *Thymoquinone*.⁵¹

2.4.3 Peran Ekstrak *Nigella sativa* sebagai Anti Tumor

Banyak penelitian telah dilakukan terhadap *Nigella sativa*. Dari berbagai penelitian tersebut ditemukan bahwa TQ sebagai konstituen utama minyak biji *Nigella sativa* dan merupakan agen yang sangat potensial sebagai antioksidan dan antikarsinogenik.^{51, 56}

Kaseb et al. (2007) mengamati bahwa *thymoquinone* yang terkandung yang terdapat di dalam *Nigella sativa* dengan dosis 75 $\mu\text{mol/L}$ dapat menghambat sintesis DNA, proliferasi dan kelangsungan hidup sel tumor ganas prostat baik in vitro dan in vivo dengan menurunkan ekspresi dari androgen receptor (AR) dan E2F1 serta meningkatkan ekspresi p21, p27, dan protein proapoptosis Bax sehingga menginduksi apoptosis setelah 48 jam pemaparan dan efek yang didapatkan lebih besar setelah pemaparan 72 jam.⁶²

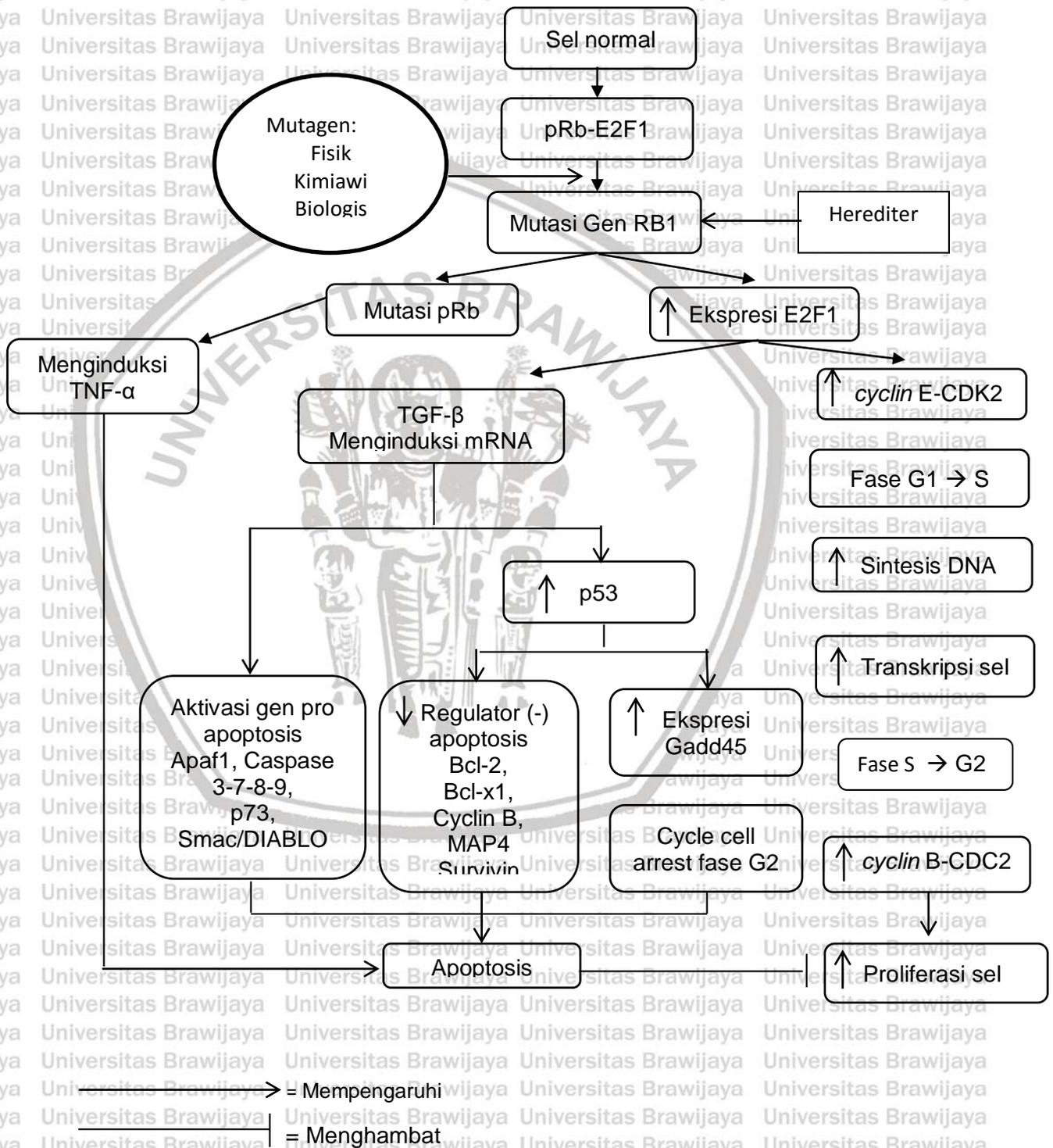
Elkady A. I. (2012) menemukan bahwa efek ekstrak etanol *Nigella sativa* secara signifikan menghambat pembentukan koloni pada sel HeLa tumor ganas cervix setelah pemaparan selama 24 jam dengan dosis pemberian 25, 50, 75 dan 100 µg/ml masing-masing sebesar 20, 65, 85 dan 90%, serta menginduksi apoptosis yang dikaitkan dengan penurunan ekspresi onkoprotein *mitochondrial cytochrome c* (c-Myc), *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT), *cyclin D*, *CDK4*, dan agen anti apoptosis Bcl-2 serta meningkatkan ekspresi agen pro apoptosis seperti Bax, caspase-3-8-9, p21 dan p53.⁶³

Hussain K. I. A. et al. (2012) menilai efek dari biji dan minyak biji *Nigella sativa* pada kultur sel retinoblastoma (911 Cells). Pada penelitian ini, sel di kultur pada medium yang mengandung ekstrak biji dan ekstrak minyak *Nigella sativa* masing-masing pada konsentrasi 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL dan 200 mg/mL selama 72 jam, kemudian proliferasi sel dinilai dengan menggunakan MTT Assay didapatkan bahwa ekstrak biji *Nigella sativa* memiliki efek inhibisi yang lebih tinggi dan efek inhibisi tertinggi dari minyak biji *Nigella sativa* terjadi pada konsentrasi 200 mg/mL, dimana pada konsentrasi 200 mg/mL ekstrak biji *Nigella sativa* hanya menghambat proliferasi sebesar 38,2% sedangkan ekstrak minyak *Nigella sativa* menghambat sebesar 70,6%. Penghambatan proliferasi sel ini terjadi akibat adanya penurunan ekspresi dari agen anti apoptosis Bcl-2 serta peningkatan ekspresi dari *tumor suppressor gene* p53.⁶⁴

Motaghed M. (2015) dalam penelitiannya tentang efek thymoquinone setelah dipaparkan dengan TQ konsentrasi 100 µM pada kultur sel tumor ganas payudara MCF7 beliau mendapatkan hasil adanya penurunan jumlah kelangsungan hidup sel setelah 12 jam dan didapatkan peningkatan apoptosis yang signifikan setelah 24 jam. Penghentian siklus sel fase G1 dan penurunan jumlah sel pada fase S pun terjadi dengan persentase yang tinggi setelah 12 jam pemaparan tersebut, peningkatan durasinya hingga 24 jam menyebabkan akumulasi sel yang lebih banyak pada fase G1 dan didapatkan pula jumlah sel yang terendah pada fase S. Setelah 72 jam efek inhibisi thymoquinone pada konsentrasi 100 µM menyebabkan akumulasi sel pada fase sub-G1 sehingga menurunkan jumlah sel hingga nol pada fase-fase lain siklus sel. Hal ini disebabkan

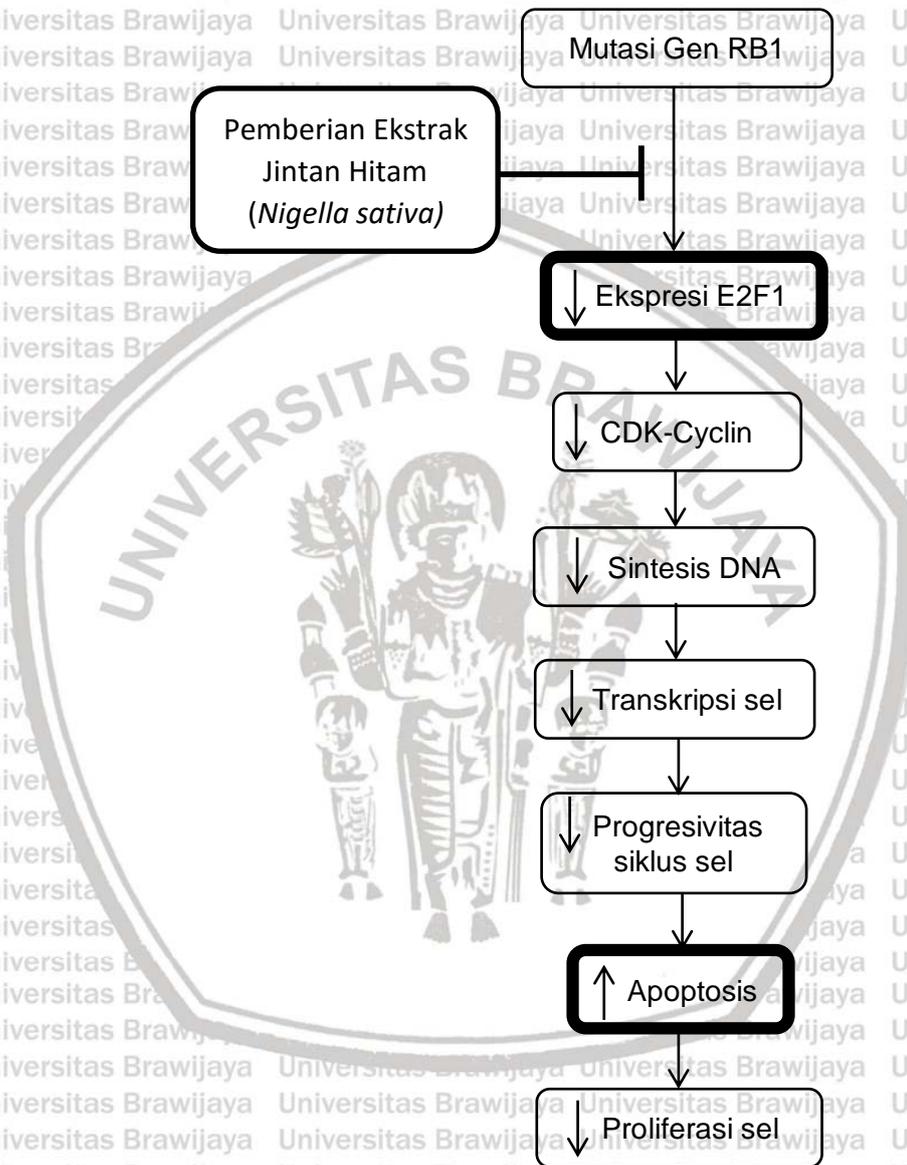
akibat ditemukannya peningkatan dari ekspresi cytochrome c, Bax dan p27 dan serta penurunan ekspresi dari Bcl2 dan Bcl-xL.⁶⁵

2.5 Kerangka Teori



BAB III
KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



3.2 Hipotesa Penelitian

Ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) dapat mempengaruhi ekspresi protein E2F1 dan apoptosis pada kultur sel retinoblastoma.

BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *laboratory experiment posttest control group* secara *in vitro* pada kultur sel retinoblastoma yang dipaparkan dengan ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL dan 200 mg/mL.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Faal divisi Fisiologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dengan waktu penelitian Desember 2016 – Januari 2017.

4.3 Sampel Penelitian

4.3.1 Pengelompokan Sampel

Sampel penelitian pada eksperimen ini adalah kultur sel retinoblastoma yang dipaparkan dengan ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*). Kultur sel retinoblastoma dibagi dalam 5 kelompok sebagai berikut:

- I. Kelompok kontrol : kelompok yang tidak mendapatkan paparan apapun.
- II. Kelompok perlakuan I : kelompok dengan paparan ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 50 mg/mL.
- III. Kelompok perlakuan II : kelompok dengan paparan ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 100 mg/mL.
- IV. Kelompok perlakuan III : kelompok dengan paparan ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 150 mg/mL.
- V. Kelompok perlakuan IV : kelompok dengan paparan ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan dosis 200 mg/mL.

4.3.2 Kriteria Inklusi Sample Penelitian

Kultur sel yang menunjukkan karakteristik sel retinoblastoma, yang ditandai dengan biakan sel berbentuk gelondong (*spindle shaped cell*).

4.3.3 Kriteria Eksklusi Sampel Penelitian

1. Kultur sel yang tidak tumbuh selama masa inkubasi
2. Kultur sel yang mengalami kontaminasi

4.3.4 Perkiraan Besar Sampel

Untuk menentukan besar sample/replikasi pada penelitian eksperimental di hitung menggunakan rumus Frederer berikut:

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

t : merupakan banyaknya kelompok penelitian

r : merupakan jumlah replikasi

Pada penelitian ini terdapat 5 kelompok penelitian, sehingga dibutuhkan jumlah replikasi pada masing-masing kelompok sebanyak 5. Dengan demikian jumlah sampel penelitian yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah sebanyak 25 well.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variable bebas adalah variabel yang mempengaruhi variabel lain. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*).

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung merupakan variabel yang hasilnya tergantung pada variabel lain. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah ekspresi protein E2F1 dan apoptosis.

4.5 Definisi Operasional

1. Kultur sel retinoblastoma merupakan kultur sel retinoblastoma yang berasal dari kultur sel Y79 yang didapat dari American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Boulevard Manassas, VA 20110 USA.
2. Ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) merupakan hasil ekstraksi jintan hitam dengan ethanol yang didapat dari Laboratorium Farmakologi

Universitas Brawijaya. Sediaan dibagi dalam dosis 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL dan 200 mg/mL.

3. Ekspresi E2F1 merupakan suatu protein yang ekspresinya akan diamati menggunakan teknik *flowcytometry* yang hasilnya akan muncul persentase jumlah dengan menggunakan anti-E2F1 yang didapat dari Santa Cruz Biotechnology (SCBT) 10410 Finnell Street, Dallas, Texas, 75220, USA.

4. Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram yang akan diamati menggunakan teknik *flowcytometry* yang hasilnya muncul dalam persentase jumlah dengan menggunakan FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI yang didapat dari Biolegend 9727 Pasific Heights Blvd. San Diego, CA 92121.

4.6 Alat Penelitian

1. Alat ekstraksi *Nigella sativa*

- a. Timbangan
- b. *Shaker digital*
- c. Tabung *Erlenmeyer*
- d. Corong gelas
- e. Kertas Saring
- f. Labu evaporator
- g. Labu penampung
- h. Evaporator
- i. Pendingin spiral
- j. *Water pump*
- k. *Selang water pump*
- l. *Water bath*
- m. *Vacuum pump*
- n. Botol hasil ekstrak

2. Alat perlakuan kultur sel retinoblastoma

- a. Freezer
- b. Icepack
- c. Waterbath
- d. Tabung sentrifuge steril

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

- e. Inkubator CO₂
- f. Sentrifuge
- g. Filter disposibel 0,2 µm
- h. Membran filter
- i. Flash 30 mL
- j. Mikroskop cahaya
- k. Object glass
- l. Plate 24 well
- m. Mikropipet
- n. Tip mikropipet
- o. Holder
- p. FACS Calibur Flowcytometry
- q. Laminar air flow
- r. Mikrotube Eppendorf (e-tube)
- s. Spuit 20 cc
- t. Bunsen burner
- u. Masker
- v. Sarung tangan
- w. Jas Laboratorium

4.7 Bahan Penelitian

1. Ekstraksi *Nigella sativa*
 - a. Bubuk Jintan Hitam
 - b. Ethanol 90%
2. Perlakuan Kultur sel retinoblastoma
 - a. Kultur sel retinoblastoma
 - b. Alkohol 70 %
 - c. Medium kultur Dulbecco Minimum Essential Medium (DMEM)
 - d. Larutan Serum free 3 ml
 - e. Larutan Gelatin 0,2 %
 - f. Natrium Bikarbonat
 - g. L-glutamine
 - h. Fetal Bovine Serum (FBS) 10 %
 - i. Streptomisin 1 %

- j. EDTA Tetrasodium salt dihydrate 0,27 %
- k. DMSO 0,1 %
- l. Paraformaldehide
- m. Larutan Phosphate Buffer Saline (PBS)
- n. Cell staining buffer
- o. Antibodi E2F1 (mouse monoclonal IgG)
- p. FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI

4.8 Cara Kerja Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *laboratory experiment posttest control group* dalam upaya mempelajari efek pemberian ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) pada kultur sel retinoblastoma dengan cara mengamati ekspresi E2F1 dan apoptosis dengan menggunakan teknik *flowcytometry*.

4.8.1 Pembuatan ekstrak *Nigella sativa*

- Bubuk jintan hitam ditimbang sebanyak 50 gram.
- Lakukan pembasahan dengan ethanol 90% sebanyak \pm 200 mL.
- Masukkan serbuk yang telah dibasahi dengan pelarut ke dalam toples, diratakan dan ditambahkan pelarut ethanol 90% sampai terendam \pm sebanyak 200 mL. Tutup toples dengan rapat selama 24 jam. Dan dikocok dengan *shaker digital* dengan kecepatan 50 rpm.
- Saring ekstrak cair dengan penyaring kain. Tampung ekstrak dalam Erlenmeyer
- Ampas dimasukkan lagi dalam toples dan tambahkan pelarut sampai terendam \pm sebanyak 300 mL.
- Biarkan selama 24 jam diatas *shaker digital* dengan kecepatan 50 rpm.
- Remaserasi dilakukan sampai filtrat/ekstrak menjadi lebih jernih menggunakan pelarut sebanyak \pm 300 mL.
- Hasil ekstrak cairan yang pertama sampai dengan yang terakhir dijadikan satu dan diuap dengan menggunakan *rotary evaporator*, dibutuhkan waktu \pm 1 jam.
- Ekstrak yang dihasilkan dievaporasi/diuapkan diatas *water bath* selama \pm 2 jam.

- Hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap dan di segel.
- Hasil ekstrak berupa cairan kental berwarna coklat tua-hitam sebanyak ± 10 mL, dengan konsentrasi 1 g/mL.

4.8.2 Persiapan Kultur Sel Retinoblastoma

- *Cryotube* yang berisi sel dipindahkan dari freezer -80°C ke dalam wadah yang berisi icepack kemudian dihangatkan dalam *waterbath* (37°C) selama ± 2 menit.
- Dekontaminasi *cryotube* menggunakan alkohol 70 % spray.
- Seluruh isi *cryotube* dipindahkan ke dalam tube 1,5 mL.
- Tambahkan medium DMEM komplet 1 mL (medium serum free yang ditambahkan dengan FBS 10% 150 μL dan streptomisin 1 % 15 μL) Lalu inkubasi pada inkubator CO_2 dengan saturasi 5 % selama 15 menit untuk proses pemulihan sel pada suhu ruang. Lakukan sentrifugasi pada 1000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Buang supernatant dan resuspensi pellet. Lakukan sebanyak 3x dengan tujuan untuk pencucian dan menghilangkan medium preservasi.
- Tanamkan pellet dengan medium komplet DMEM pada flash 30 mL. Inkubasi pada inkubator CO_2 dengan saturasi 5 % pada suhu 37°C hingga terbentuk lapisan monolayer, hal ini dilakukan pengecekan setiap hari dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x dan juga untuk melihat apakah sel mengalami kontaminasi dan lapisan monolayer didapatkan setelah 4 hari diinkubasi.
- Dilakukan tripsinasi dengan tripsin EDTA 0,27 % sebanyak 5 mL untuk melepaskan kultur sel retinoblastoma.
- Dipindah ke dalam tabung flash 1,5 mL ditambahkan medium serum free. Lakukan sentrifugasi pada 2300 rpm selama 3 menit pada suhu ruang. Buang supernatant dan resuspensi pellet. Lakukan sebanyak 2x dengan tujuan untuk pencucian medium.
- Tanamkan pellet dengan medium komplet DMEM pada *plate* sebanyak 25 *well*. Inkubasi pada inkubator CO_2 dengan saturasi 5 % pada suhu 37°C hingga terbentuk lapisan monolayer/konfluen (untuk melihat dilakukan pengecekan setiap hari dengan menggunakan

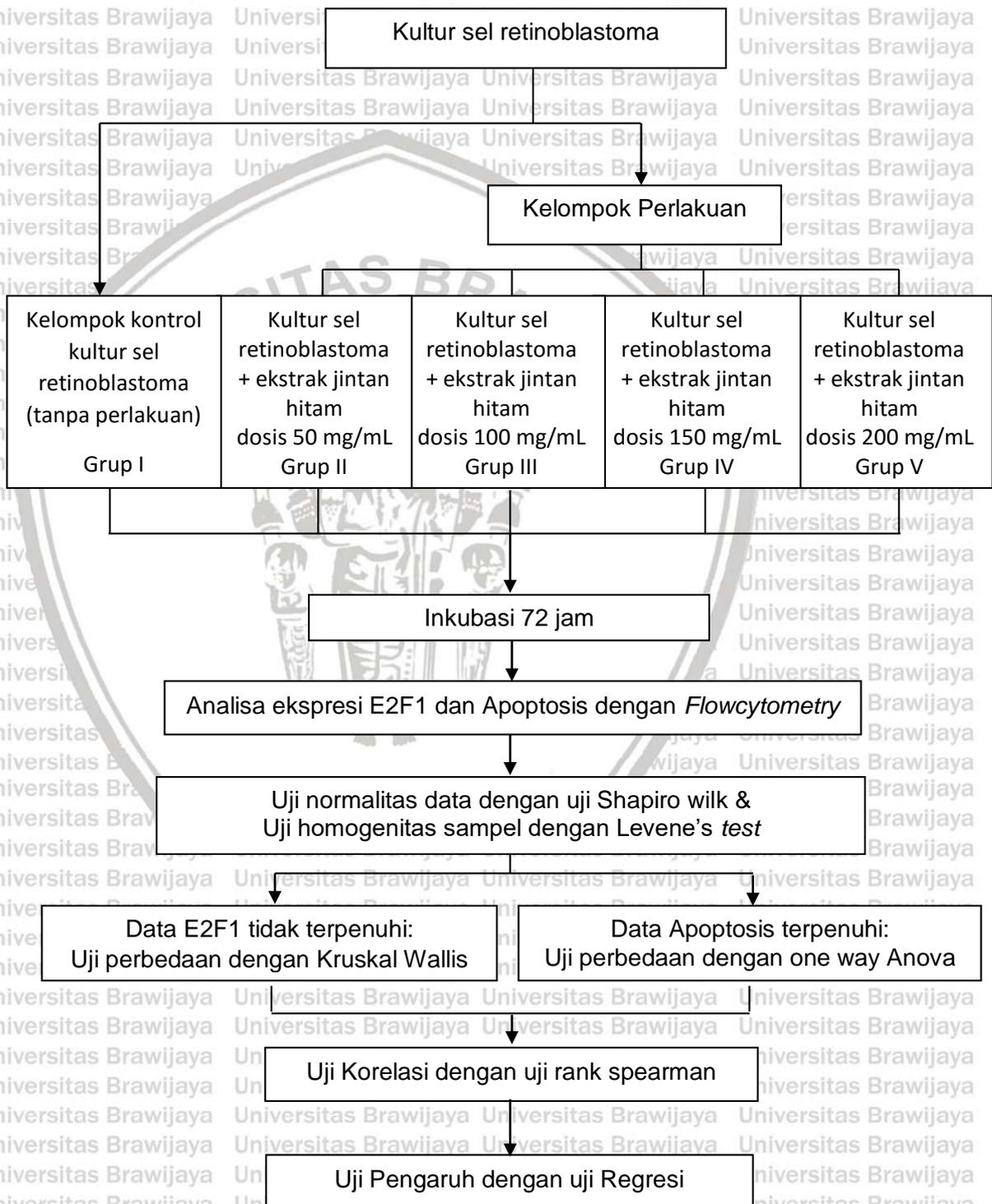
mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x), dan hasilnya didapatkan setelah 3 hari diinkubasi.

4.8.3 Perlakuan Kultur Sel Retinoblastoma

- Angkat medium komplet pada kultur sel retinoblastoma lalu ganti dengan medium pelarut DMSO 0,1% pada kelompok kontrol dan medium ekstrak *Nigella sativa* dengan dosis sesuai dengan masing-masing kelompok sebanyak 50 μ L. Inkubasi pada inkubator CO₂ dengan saturasi 5 % selama 72 jam pada suhu 37°C.
- Difiksasi dengan meneteskan paraformalidehide hingga memenuhi *well* (2 mL) ditaruh pada suhu 37°C selama 24 jam .
- Dilakukan tripsinasi (melepaskan kultur sel retinoblastoma dari dasar *well*) dengan tripsin EDTA 0,27 % sebanyak 500 μ L.
- Masing-masing dipindahkan ke dalam tube 1,5 mL, ditambahkan dengan 1 mL medium DMEM komplet, lakukan sentrifugasi pada 2800 rpm selama 7 menit pada suhu ruang. Buang supernatant dan resuspensi pellet, ditambahkan dengan PBS 1 mL, lakukan sentrifugasi pada 2800 rpm selama 7 menit pada suhu ruang untuk mencuci medium. Buang supernatant dan resuspensi pellet.
- Ambil pellet, larutkan dengan *cell staining buffer* 1 mL, lakukan sentrifugasi pada 2800 rpm selama 7 menit pada suhu ruang. Buang supernatant dan resuspensi pellet. Dilakukan sebanyak 2x.
- Ambil Pellet
 - Ekspresi E2F1: Masukkan ke dalam tube 1,5 ml sebanyak 25 buah lalu tambahkan 100 μ L PBS dan anti-E2F1 1:100, lalu inkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan.
 - Apoptosis: Masukkan ke dalam tube 1,5 ml sebanyak 25 buah, lalu resuspensi dengan Annexin V Binding Buffer, tambahkan 5 μ l FITC Annexin V dan 10 μ l Propidium Iodide Solution pada masing-masing tube. Inkubasi selama 15 menit pada suhu ruangan. Lalu tambahkan 400 μ l Annexin V Binding Buffer.
- Sampel diencerkan sampai 1 mL, masukkan ke dalam alat *flowcytometry*. Perlakuan dan pembacaan hasil dilakukan oleh satu orang yang ahli dibidangnya

- Melakukan analisa ekspresi E2F1 dan apoptosis dengan software dari sistem *flowcytometry* (FACS Calibur *flowcytometry* and Cell Quest software) pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

4.9 Alur Kerja Penelitian



4.10 Rancangan Analisa Data

Data yang telah didapatkan dianalisa dengan menggunakan program SPSS 18 for Windows. Untuk mengetahui normalitas data karena jumlah sampel kurang dari 30 maka dilakukan uji Shapiro wilk, dan untuk mengetahui homogenitas sampel kontrol dan perlakuan dilakukan uji dengan *Levene's test*. Dari uji normalitas dan homogenitas tersebut didapatkan salah satu asumsi uji normalitas data E2F1 yang tidak terpenuhi (data tidak berdistribusi normal) maka untuk mengetahui ada perbedaan ekspresi protein E2F1 pada semua kelompok dilakukan uji Kruskal Wallis, lalu dilakukan uji lanjut dengan Mann Whitney untuk melihat perbedaan di antara masing-masing kelompok. Uji normalitas dan homogenitas data apoptosis terpenuhi maka untuk mengetahui ada perbedaan angka apoptosis pada semua kelompok dilakukan uji perbedaan dengan one-way Anova dan dilanjutkan dengan uji Post Hoc Tukey untuk melihat perbedaan di antara masing-masing kelompok. Jika didapatkan perbedaan yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji korelasi untuk melihat hubungan berbanding lurus atau bertolak belakang antara dosis pemberian dengan ekspresi protein E2F1 dan apoptosis serta untuk melihat hubungan antara ekspresi E2F1 dengan apoptosis, uji korelasi dilakukan dengan uji Rank spearman oleh karena data tidak berdistribusi normal dan pada penelitian terdapat >2 kelompok. Lalu dilakukan uji regresi untuk mengetahui pengaruh antara dosis pemberian dengan ekspresi protein E2F1 dan apoptosis serta pengaruh antara ekspresi E2F1 dengan apoptosis.

4.11 Organisasi Penelitian

Peneliti : dr. Aida

Pembimbing I : dr. Hariwati Moehariadi, Sp.M(K)

Pembimbing II : dr. Hidayat Sujuti, Sp.M, Ph.D

Pembimbing III: dr. Lely Retno Wulandari, Sp.M(K)

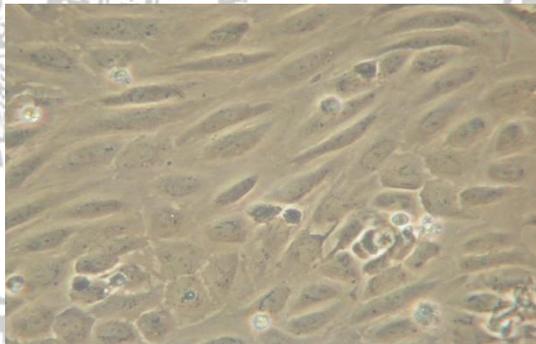
4.12 Jadwal Penelitian

No Kegiatan	Bulan											
	Des 2015	Jan-Mar 2016	Apr 2016	Mei-Juli 2016	Agu 2016	Sep-Okt 2016	Nov 2016	Des 2016	Jan 2017	Feb 2017	Feb 2018	Mar 2018
1. Studi Kepustakaan												
2. Pengajuan Judul												
3. Pembuatan Usulan Penelitian												
4. Konsultasi Usulan Penelitian												
5. Presentasi Usulan Penelitian												
6. Pelaksanaan Penelitian												
7. Pembuatan Laporan Penelitian												
8. Presentasi Laporan Penelitian												
9. Pengumpulan Laporan Penelitian												



BAB V HASIL PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan kultur sel retinoblastoma yang didapatkan dari American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Boulevard Manassas, VA 20110 USA. Hasil penelitian berupa 50 sampel yang diambil dari 25 well yang terdiri atas 5 kelompok (1 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan) untuk masing-masing variabel penelitian. Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapatkan perlakuan. Sedangkan kelompok perlakuan adalah kelompok yang diberikan ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) dengan dosis 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL dan 200 mg/mL. Sampel kemudian diinkubasi selama 72 jam, lalu ekspresi protein E2F1 diamati menggunakan teknik flowcytometry dengan menggunakan anti-E2F1 yang didapat dari Santa Cruz Biotechnology (SCBT) 10410 Finnell Street, Dallas, Texas, 75220, USA, sedangkan apoptosis diamati menggunakan teknik *flowcytometry* dengan menggunakan FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI yang didapat dari Biolegend 9727 Pasific Heights Blvd. San Diego, CA 92121. Data yang telah didapatkan dianalisa dengan menggunakan program SPSS 18 for Windows.



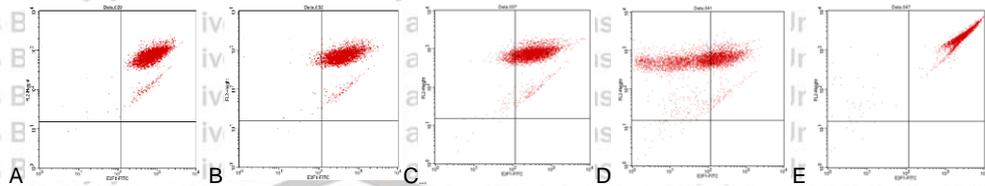
Gambar 5.1. Gambaran morfologi dari kultur sel retinoblastoma (dilihat dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x).

5.1 Pengaruh Ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) terhadap Ekspresi Protein E2F1

Pada kultur sel retinoblastoma dilakukan pemeriksaan dengan *flowcytometry*, kemudian presentasi protein E2F1 dihitung menggunakan *cell quest software* dan hasil berupa persentase pada kelima kelompok (Lampiran 1).

5.1.1 Data Hasil Pemeriksaan

Hasil rerata ekspresi protein E2F1 pada kultur sel retinoblastoma yang sudah dipaparkan dengan ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) terangkum pada tabel 5.1. Dari tabel tersebut tampak ekspresi protein E2F1 menurun pada kelompok perlakuan 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL dan 200 mg/mL dibandingkan dengan kelompok kontrol.

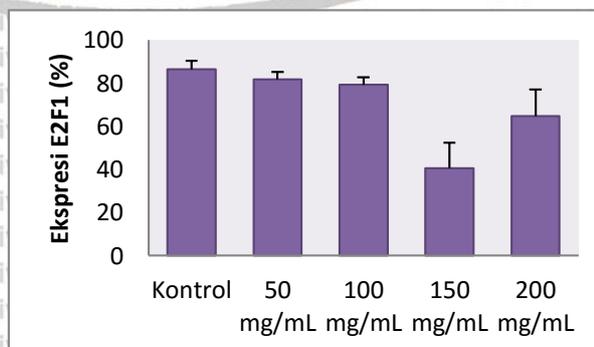


Gambar 5.2. Analisa flowcytometry ekspresi E2F1. Angka apoptosis dilihat dari kotak sebelah kanan atas. (A) Kelompok kontrol, (B) kelompok perlakuan dengan dosis 50 mg/mL, (C) kelompok perlakuan dengan dosis 100 mg/mL, (D) kelompok perlakuan dengan dosis 150 mg/mL, (E) kelompok perlakuan dengan dosis 200 mg/mL.

Tabel 5.1. Rerata hasil pengamatan ekspresi E2F1 pada kultur sel retinoblastoma pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak *Nigella sativa* (jintan hitam).

Kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kontrol	5	86,390	4,030241928	82,29	92,81
50 mg/mL	5	81,694	3,514182693	75,51	83,87
100 mg/mL	5	79,356	3,299928787	75,70	82,91
150 mg/mL	5	40,356	11,85010886	31,85	60,11
200 mg/mL	5	64,610	12,36851446	44,51	76,12

Berdasarkan tabel diatas terlihat bahwa adanya pengaruh pemberian ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) terhadap ekspresi protein E2F1 pada kultur sel retinoblastoma, semakin tinggi dosis yang diberikan semakin menurunkan ekspresi protein E2F1 pada kultur sel retinoblastoma.



Grafik 5.1. Grafik persentase ekspresi E2F1 pada kultur sel retinoblastoma pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak *Nigella sativa* (jintan hitam).

5.1.2 Analisa Statistik

Untuk melakukan uji beda pada penelitian dengan >2 kelompok perlakuan, sebelumnya dilakukan uji normalitas untuk melihat apakah asumsi data berdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji Shapiro Wilk, dan uji homogenitas untuk melihat apakah varian data homogen atau tidak dengan menggunakan Levene's test. Jika data yang digunakan tidak memenuhi salah satu atau semua asumsi, maka dilakukan pengujian pengganti one-way anova, yaitu uji Kruskal Wallis.

5.1.2.1 Uji Normalitas

Uji normalitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Shapiro wilk.

Tabel 5.2. Hasil Uji Normalitas E2F1

Kelompok	Signifikansi
Kontrol	.510
50 mg/mL	.011
100 mg/mL	.323
150 mg/mL	.071
200 mg/mL	.314

Hasil uji normalitas dengan metode Shapiro Wilk menunjukkan nilai signifikansi kelompok kontrol, kelompok perlakuan 100, 150, dan 200 lebih besar dari α (0.05), yang berarti distribusi data kelompok tersebut adalah normal, namun untuk kelompok perlakuan 50 data tidak berdistribusi normal dengan nilai signifikansi kurang dari 0.05.

5.1.2.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Levene's test.

Tabel 5.3. Hasil Uji Homogenitas E2F1

Uji	Nilai
Levene Statistic	2.128
Signifikansi	.115

Nilai signifikansi pada uji homogenitas ragam data sebesar 0.115 lebih besar dari α (0.05) membuktikan bahwa ragam data sudah homogen. Namun karena ada satu kelompok data yang tidak memenuhi asumsi normalitas, maka selanjutnya untuk mengetahui adanya

perbedaan ekspresi E2F1 pada semua kelompok dilakukan pengujian pengganti menggunakan kruskal wallis.

5.1.2.3 Uji Perbedaan

Tabel 5.4. Hasil Uji Perbedaan Rata-rata Angka E2F1

Chi-square hitung	Signifikansi	Chi-square table	Kesimpulan
19.930	0.001	9.488	Signifikan

Hipotesis analisis yang digunakan adalah sebagai berikut:

- H0: Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan respon yang diamati.
- H1: Terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan respon yang diamati.

Dengan kriteria pengujian sebagai berikut:

- jika nilai F hitung > F tabel (atau chi-square hitung > chi-square tabel), dan nilai signifikansi < 0.05, maka H0 ditolak ;
- jika nilai F hitung < F tabel (atau chi-square hitung < chi-square tabel), dan nilai signifikansi > 0.05, maka H0 diterima.

Berdasarkan hasil yang tercantum pada tabel, dengan derajat distribusi chi square, diperoleh nilai chi-square hitung yang lebih besar dari chi-square tabel dan nilai signifikansi sebesar 0.001 lebih kecil dari α (0.05), sehingga dapat disimpulkan bahwa H0 ditolak dan terdapat perbedaan rata-rata angka E2F1 pada masing-masing kelompok. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji mann whitney.

Tabel 5.5. Hasil Uji Lanjut Perbedaan Angka E2F1

Kelompok	Signifikansi	Kesimpulan
Kontrol dengan 50	.094	Tidak berbeda signifikan
Kontrol dengan 100	.028	Berbeda signifikan
Kontrol dengan 150	.009	Berbeda signifikan
Kontrol dengan 200	.009	Berbeda signifikan
50 dengan 100	.251	Tidak berbeda signifikan
50 dengan 150	.009	Berbeda signifikan
50 dengan 200	.016	Berbeda signifikan
100 dengan 150	.009	Berbeda signifikan
100 dengan 200	.016	Berbeda signifikan
150 dengan 200	.016	Berbeda signifikan

Berdasarkan hasil yang tercantum diperoleh bahwa kelompok kontrol berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 100, 150 dan 200.

Tetapi kelompok kontrol tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 50. Kelompok perlakuan 50 berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 150 dan 200 dan tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 100. Kelompok perlakuan 100 berbeda nyata dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 150 dan 200.

Kelompok perlakuan 150 berbeda nyata dengan semua kelompok. Kelompok perlakuan 200 juga berbeda nyata dengan semua kelompok.

5.1.2.4 Uji Korelasi

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui apakah ada hubungan yang signifikan antara dosis dengan angka E2F1. Untuk menentukan uji korelasi sebelumnya ada asumsi yang mendasari yaitu uji normalitas data yang dilakukan dengan uji Shapiro Wilk. Jika uji normalitas data didapatkan data berdistribusi normal maka selanjutnya dilakukan analisis korelasi pearson. Namun jika data yang digunakan tidak memenuhi asumsi tersebut maka dilakukan pengujian pengganti, yaitu uji korelasi rank spearman.

Tabel 5.6. Hasil Uji Normalitas Dosis dan E2F1

Data	Signifikansi
Dosis	.013
E2F1	.000

Hasil uji normalitas dengan uji one Shapiro Wilk menunjukkan nilai signifikansi data dosis dan E2F1 kurang dari α (0.05), yang berarti distribusi data tersebut tidak normal, maka dilakukan uji korelasi rank spearman.

Tabel 5.7. Hasil Analisis korelasi antara Dosis dengan E2F1

Correlation Coefficient	Signifikansi	Kesimpulan
-0.806	0.000	Signifikan

Hipotesis yang digunakan adalah:

- H0 : Terdapat hubungan yang tidak signifikan;
- H1 : Terdapat hubungan yang signifikan.

Dengan kriteria pengujian sebagai berikut:

- jika nilai signifikansi < 0.05, maka H0 ditolak ;
- jika nilai signifikansi > 0.05, maka H0 diterima.

Pada uji korelasi didapatkan nilai signifikansi 0.000 lebih kecil dari α (0.05) yang berarti bahwa H_0 ditolak atau terdapat hubungan yang signifikan antara dosis dengan angka ekspresi E2F1 yang diukur. Hubungan berbalik arah antara dosis ekstrak jintan hitam dengan angka E2F1 pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai korelasi yang negatif. Menurut Arikunto (2010), nilai korelasi yang berada diantara 0.80 – 1.00 masuk dalam kategori korelasi tinggi.

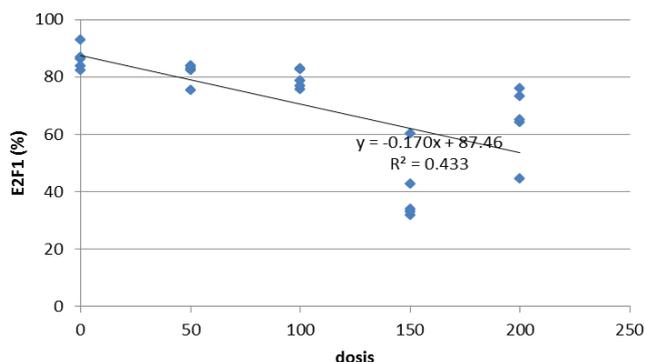
5.1.2.5 Uji Pengaruh

Uji pengaruh dilakukan untuk melihat apakah terdapat pengaruh yang signifikan antara besarnya dosis perlakuan ekstrak jintan hitam terhadap ekspresi protein E2F1.

Tabel 5.8. Hasil Analisis Regresi Linier Sederhana antara Dosis dengan E2F1

	Coefficients	t hitung	Sig.	F	Sig.
Constant	87.461	17.614	0.000	17.540	0.000
Dosis	- 0.170	-4.188	0.000		

Persamaan tersebut memiliki nilai signifikansi sebesar 0.000 lebih kecil dari α (0.05) yang berarti terdapat pengaruh yang signifikan antara dosis ekstrak jintan hitam terhadap angka ekspresi protein E2F1. Dapat dilihat pada gambar 5.1 bahwa dosis ekstrak jintan hitam berpengaruh nyata dan negatif terhadap angka E2F1, atau dengan kata lain dengan meningkatnya dosis dapat menurunkan angka E2F1 secara nyata.



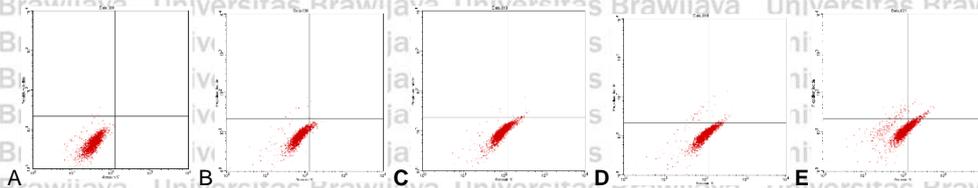
Grafik 5.2. Grafik Pengaruh antara dosis terhadap angka E2F1.

5.2 Pengaruh Ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) terhadap Apoptosis

Pada kultur sel retinoblastoma dilakukan pemeriksaan dengan *flowcytometry*. Tampak dengan gambaran histogram, kemudian presentasi tingkat apoptosis dihitung berupa persentase pada kelima kelompok (Lampiran 2).

5.2.1 Data Hasil Pemeriksaan

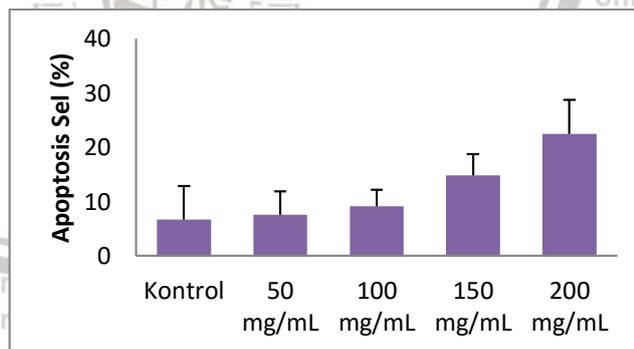
Hasil rerata apoptosis pada kultur sel retinoblastoma yang sudah dipaparkan dengan ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) terangkum pada tabel 5.9. Dari tabel tersebut tampak apoptosis meningkat pada kelompok perlakuan 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL dan 200 mg/mL.



Gambar 5.3. Analisa flowcytometry angka apoptosis. Angka apoptosis dilihat dari kotak sebelah kanan atas. (A) Kelompok kontrol, (B) kelompok perlakuan dengan dosis 50 mg/mL, (C) kelompok perlakuan dengan dosis 100 mg/mL, (D) kelompok perlakuan dengan dosis 150 mg/mL, (E) kelompok perlakuan dengan dengan dosis 200 mg/mL.

Tabel 5.9. Rerata hasil pengamatan angka apoptosis pada kultur sel retinoblastoma pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak *Nigella sativa* (jintan hitam).

Kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kontrol	5	6,718	6,132171	0,01	12,96
50 mg/MI	5	7,584	4,290551	2,67	13,62
100 mg/mL	5	9,122	3,081334	5,08	12,09
150 mg/mL	5	14,788	3,988442	8,92	18,77
200 mg/mL	5	22,422	6,324743	16,57	29,75



Grafik 5.3. Grafik persentase angka apoptosis pada kultur sel retinoblastoma pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak *Nigella sativa* (jintan hitam).

Berdasarkan tabel dan grafik diatas terlihat bahwa adanya pengaruh pemberian ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) terhadap apoptosis pada kultur sel retinoblastoma, semakin tinggi dosis yang diberikan dapat dilihat bahwa semakin meningkatkan terjadinya apoptosis sel pada kultur sel retinoblastoma.

5.2.2 Analisa Statistik

Untuk melakukan uji beda pada penelitian dengan >2 kelompok perlakuan, sebelumnya dilakukan uji normalitas untuk melihat apakah asumsi data berdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji Shapiro Wilk, dan uji homogenitas untuk melihat apakah varian data homogen atau tidak dengan menggunakan Levene's test. Jika data yang digunakan tidak memenuhi salah satu atau semua asumsi, maka dilakukan pengujian pengganti one-way anova, yaitu uji Kruskal Wallis.

5.2.2.1 Uji Normalitas

Uji homogenitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Levene's test.

Tabel 5.10. Hasil Uji Normalitas Apoptosis

Kelompok	Signifikansi
Kontrol	.236
50 mg/mL	.718
100 mg/mL	.394
150 mg/mL	.650
200 mg/mL	.089

Hasil uji normalitas dengan uji one Shapiro Wilk menunjukkan nilai signifikansi masing-masing kelompok perlakuan lebih besar dari α (0.05), yang berarti bahwa distribusi data semua kelompok tersebut adalah normal.

5.2.2.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Levene's test.

Tabel 5.11. Hasil Uji Homogenitas Apoptosis

Uji	Nilai
Levene Statistic	1.934
Signifikansi	.144

Nilai signifikansi pada uji homogenitas ragam data sebesar 0.144 lebih besar dari α (0.05) membuktikan ragam data sudah homogen. Karena data yang digunakan sudah memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas, maka selanjutnya dilakukan uji perbedaan dengan menggunakan one-way anova.

5.2.2.3 Uji Perbedaan

Tabel 5.12. Hasil Uji Perbedaan Rata-rata Angka Apoptosis

F hitung	Signifikansi	F table	Kesimpulan
8.853	0.000	2.866	Signifikan

Hipotesis analisis yang digunakan adalah sebagai berikut:

- H0: Tidak terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan respon yang diamati.
- H1: Terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan berdasarkan respon yang diamati.

Dengan kriteria pengujian sebagai berikut:

- jika nilai F hitung > F tabel (atau chi-square hitung > chi-square tabel), dan nilai signifikansi < 0.05, maka H0 ditolak ;
- jika nilai F hitung < F tabel (atau chi-square hitung < chi-square tabel), dan nilai signifikansi > 0.05, maka H0 diterima.

Berdasarkan hasil yang tercantum pada tabel diperoleh nilai F hitung yang lebih besar dari F tabel dan nilai signifikansi sebesar 0.000 lebih kecil dari α (0.05), sehingga dapat disimpulkan bahwa H0 ditolak dan terdapat perbedaan rata-rata angka apoptosis pada masing-masing perlakuan. Untuk melihat letak perbedaannya, dilakukan uji lanjut dengan uji post hoc tukey.

Tabel 5.13. Hasil Uji Lanjutan Perbedaan Angka Apoptosis

Kelompok	Signifikansi	Kesimpulan
Kontrol dengan 50	.999	Tidak berbeda signifikan
Kontrol dengan 100	.936	Tidak berbeda signifikan
Kontrol dengan 150	.110	Tidak berbeda signifikan
Kontrol dengan 200	.001	Berbeda signifikan
50 dengan 100	.987	Tidak berbeda signifikan
50 dengan 150	.182	Tidak berbeda signifikan
50 dengan 200	.001	Berbeda signifikan
100 dengan 150	.391	Tidak berbeda signifikan
100 dengan 200	.003	Berbeda signifikan
150 dengan 200	.143	Tidak berbeda signifikan

Berdasarkan hasil yang tercantum diperoleh bahwa kelompok kontrol berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 200. Tetapi kelompok

kontrol tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 50, 100 dan 150. Kelompok perlakuan 50 berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 200 dan tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 100 dan 150. Kelompok perlakuan 100 berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 200 dan tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 50 dan 150. Kelompok perlakuan 150 tidak berbeda nyata dengan semua kelompok. Kelompok perlakuan 200 berbeda nyata dengan kelompok kontrol, 50, dan 100 tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan 150.

5.2.2.4 Uji Korelasi

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui apakah ada hubungan yang signifikan antara dosis dengan angka Apoptosis. Untuk menentukan uji korelasi sebelumnya ada asumsi yang mendasari yaitu uji normalitas data yang dilakukan dengan uji Shapiro Wilk. Jika uji normalitas data didapatkan data berdistribusi normal maka selanjutnya dilakukan analisis korelasi pearson, Namun jika data yang digunakan tidak memenuhi asumsi tersebut maka dilakukan pengujian pengganti, yaitu uji korelasi rank spearman.

Tabel 5.14. Hasil Uji Normalitas Dosis dan Apoptosis

Data	Signifikansi
Dosis	.013
Apoptosis	.304

Hasil uji normalitas dengan uji one Shapiro Wilk menunjukkan nilai signifikansi data dosis kurang dari α (0.05) yang berarti bahwa distribusi data tersebut tidak normal, sedangkan data apoptosis lebih besar dari α (0.05) yang berarti bahwa distribusi data tersebut normal. Namun karena ada salah satu data yang digunakan tidak memenuhi asumsi normalitas maka dilakukan uji korelasi rank spearman.

Tabel 5.15. Hasil Analisis Korelasi antara Dosis dengan Apoptosis

Correlation Coefficient	Signifikansi	Kesimpulan
0.753	0.000	Signifikan

Hipotesis yang digunakan adalah:

- H0 : Terdapat hubungan yang tidak signifikan;
- H1 : Terdapat hubungan yang signifikan.

Dengan kriteria pengujian sebagai berikut:

- jika nilai signifikansi < 0.05, maka H0 ditolak ;
- jika nilai signifikansi > 0.05, maka H0 diterima.

Pada uji korelasi didapatkan nilai signifikansi 0.000 lebih kecil dari α (0.05) yang berarti bahwa H0 ditolak atau terdapat hubungan yang signifikan antara dosis dengan angka apoptosis yang diukur. Hubungan searah antara dosis ekstrak jintan hitam dengan angka apoptosis pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai korelasi yang positif. Menurut Arikunto (2010), nilai korelasi yang berada diantara 0.60 – 0.80 masuk dalam kategori korelasi cukup tinggi.

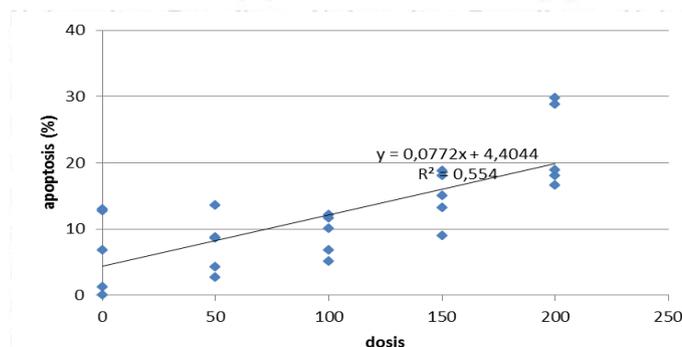
5.2.2.5 Uji Pengaruh

Uji pengaruh merupakan uji yang dilakukan untuk melihat apakah terdapat pengaruh yang signifikan antara besarnya dosis perlakuan ekstrak jintan hitam terhadap apoptosis.

Tabel 5.16. Hasil Analisis Regresi Linier Sederhana antara Dosis dengan Apoptosis

	Coefficients	t hitung	Sig.	F	Sig.
Constant	4.404	2.489	0.020	28.566	0.000
Dosis	0.077	5.345	0.000		

Persamaan tersebut memiliki nilai signifikansi sebesar 0.000 lebih kecil dari α (0.05) yang berarti terdapat pengaruh yang signifikan antara dosis ekstrak jintan hitam terhadap angka apoptosis. Berdasarkan gambar 5.2 diketahui bahwa dosis ekstrak jintan hitam berpengaruh nyata dan positif terhadap angka apoptosis, atau dengan kata lain meningkatnya dosis dapat meningkatkan angka apoptosis secara nyata, didukung dengan hasil uji regresi yang berpengaruh signifikan.



Grafik 5.4. Grafik pengaruh antara dosis terhadap angka apoptosis.

5.3 Keterkaitan antara E2F1 dengan Apoptosis

5.3.1 Hubungan antara E2F1 dengan Apoptosis

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui apakah ada hubungan yang signifikan antara ekspresi E2F1 dengan angka Apoptosis. Untuk menentukan uji korelasi sebelumnya ada asumsi yang mendasari yaitu uji normalitas data yang dilakukan dengan uji Shapiro Wilk. Jika uji normalitas data didapatkan data berdistribusi normal maka selanjutnya dilakukan analisis korelasi pearson, Namun jika data yang digunakan tidak memenuhi asumsi tersebut maka dilakukan pengujian pengganti, yaitu uji korelasi rank spearman.

Tabel 5.17. Hasil Uji Normalitas E2F1 dan Apoptosis

Data	Signifikansi
E2F1	.000
Apoptosis	.304

Hasil uji normalitas dengan uji one Shapiro Wilk menunjukkan nilai signifikansi data E2F1 kurang dari α (0.05) yang berarti distribusi data tersebut tidak normal, sedangkan data apoptosis lebih besar dari α (0.05) yang berarti distribusi data tersebut normal, namun karena salah satu data yang digunakan tidak memenuhi asumsi normalitas maka dilakukan uji korelasi rank spearman.

Tabel 5.18. Hasil Analisis korelasi antara E2F1 dengan Apoptosis

Correlation Coefficient	Signifikansi	Kesimpulan
-0.578	0.002	Signifikan

Hipotesis yang digunakan adalah:

- H0 : Terdapat hubungan yang tidak signifikan;
- H1 : Terdapat hubungan yang signifikan.

Dengan kriteria pengujian sebagai berikut:

- jika nilai signifikansi < 0.05 , maka H0 ditolak ;
- jika nilai signifikansi > 0.05 , maka H0 diterima.

Pada uji korelasi didapatkan nilai signifikansi 0.002 lebih kecil dari α (0.05) yang berarti H0 ditolak atau terdapat hubungan yang signifikan antara angka E2F1 dengan angka apoptosis yang diukur. Hubungan

berbalik arah antara ekspresi protein E2F1 ekstrak jintan hitam dengan angka apoptosis pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai korelasi yang negatif. Menurut Arikunto (2010), nilai korelasi yang berada diantara 0.40 – 0.60 masuk dalam kategori korelasi agak rendah.

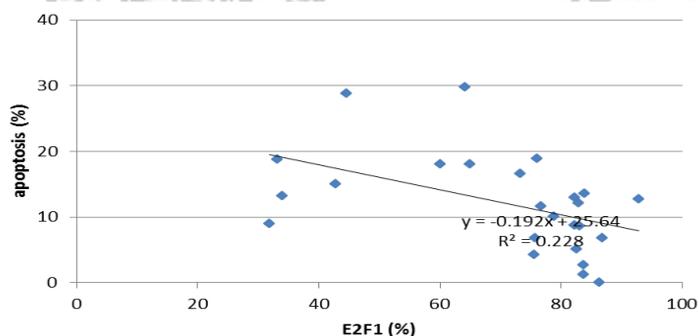
5.3.2 Pengaruh antara E2F1 dengan Apoptosis

Uji pengaruh dilakukan untuk melihat apakah terdapat pengaruh yang signifikan antara angka E2F1 terhadap apoptosis.

Tabel 5.19. Hasil Analisis Regresi Linier Sederhana antara E2F1 dengan Apoptosis

	Coefficients	t hitung	Sig.	F	Sig.
Constant	25.643	4.782	0.000	6.779	0.016
Dosis	- 0.192	-2.604	0.016		

Persamaan tersebut memiliki nilai signifikansi sebesar 0.016 lebih kecil dari α (0.05) yang berarti terdapat pengaruh yang signifikan antara angka ekspresi protein E2F1 terhadap angka apoptosis. Berdasarkan gambar 5.3 diketahui bahwa angka E2F1 berpengaruh nyata dan negatif terhadap angka apoptosis. Dengan kata lain meningkatnya angka E2F1 dapat menurunkan angka apoptosis secara nyata, atau menurunnya angka E2F1 dapat meningkatkan angka apoptosis secara nyata, didukung dengan hasil uji regresi yang berpengaruh signifikan.



Grafik 5.5. Grafik pengaruh antara angka E2F1 terhadap angka apoptosis.

BAB VI PEMBAHASAN

Retinoblastoma merupakan tumor neuroblastik yang mengenai sel progenitor yang merupakan asal dari berbagai jenis sel yang ada pada retina. Retinoblastoma disebabkan oleh dua peristiwa mutasi, dapat satu mutasi yang diwariskan melalui sel-sel germinal dan mutasi yang kedua secara spontan terjadi pada sel-sel somatik dari retina atau kedua mutasi terjadi pada sel-sel somatik retina. Mutasi terjadi pada kedua alel gen RB1 pada kromosom 13q14. Mutasi gen retinoblastoma (RB1) yang berfungsi mengkode protein penekan pembentukan tumor retinoblastoma (pRb) sehingga pRb menjadi tidak diproduksi atau nonaktif dalam fungsinya, sedangkan fungsi atau aktivitas dari pRb tersebut adalah mengikat dan menghambat aktivator transkripsi sel protein E2F1, hal ini mengakibatkan proses transkripsi, sintesis DNA dan proliferasi sel terus terjadi tanpa terkendali.

Thymoquinone (TQ) merupakan zat aktif yang dapat diisolasi dari minyak biji *Nigella sativa* dan merupakan komponen utama dari minyak ini. *Nigella sativa* dipercaya memiliki khasiat pengobatan yang sangat banyak, diantaranya minyak biji *Nigella sativa* memiliki aktivitas antioksidan, anti-neoplastik, anti-karsinogenik atau anti-mutagenik yang menjanjikan baik pada in vivo dan in vitro pada beberapa kultur sel tumor yang berbeda-beda. TQ dapat menghambat pelepasan protein E2 Promoter-Binding Factor 1 (E2F1), yang berperan menginduksi ekspresi gen yang dibutuhkan untuk progresivitas siklus dalam memasuki fase S, sehingga menimbulkan respon seluler berupa penghentian siklus sel (*cell cycle arrest*) dan menghidupkan jalur apoptosis. Target kerja lain dari TQ adalah dengan meningkatkan tumor supresor gen p53, dengan merepresi berbagai ekspresi gen regulator negatif terhadap apoptosis serta gen pro apoptosis.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) terhadap ekspresi protein E2F1 dan apoptosis pada kultur sel retinoblastoma. Kultur sel yang digunakan pada penelitian ini berasal dari kultur sel Y79 yang didapat dari American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Boulevard Manassas, VA

20110 USA. Kultur sel yang diberi perlakuan dipaparkan dengan ekstrak jintan hitam (*Nigella sativa*) dalam berbagai dosis yaitu 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL dan 200 mg/mL. Pemilihan waktu 72 jam berdasarkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Hussain K. I. A. et al. pada tahun 2012, dimana dalam waktu 72 jam ekstrak biji *Nigella sativa* dapat menghambat proliferasi sel retinoblastoma pada kultur sel retinoblastoma (911 Cells) dan penelitian-penelitian lain yang banyak menggunakan waktu 72 jam untuk mendapatkan hasil yang maksimal.

6.1 Pengaruh Ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) terhadap Ekspresi Protein E2F1 pada Kultur Sel Retinoblastoma

Pada penelitian ini, Uji homogenitas ragam data E2F1 sebesar 0.115 lebih besar dari α (0.05) membuktikan ragam data sudah homogen, karena ada satu kelompok data tidak memenuhi asumsi normalitas, maka dilakukan uji perbedaan dengan kruskal wallis, sehingga hasilnya dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata angka E2F1 pada masing-masing kelompok perlakuan, uji mann whitney dilakukan untuk melihat letak perbedaannya. Pada uji korelasi didapatkan nilai signifikansi 0.000 lebih kecil dari α (0.05) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan antara dosis dengan angka E2F1 yang diukur. Hubungan berbalik arah antara dosis ekstrak jintan hitam dengan angka E2F1 pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai korelasi yang negatif. Pada uji pengaruh didapatkan nilai signifikansi sebesar 0.000 lebih kecil dari α (0.05) yang berarti terdapat pengaruh yang signifikan antara dosis ekstrak jintan hitam terhadap angka ekspresi protein E2F1, dengan kata lain meningkatnya dosis dapat menurunkan ekspresi protein E2F1 secara nyata pada kultur sel retinoblastoma.

Kaseb et al. (2007) melakukan penelitian bahwa thymoquinone, kandungan yang terdapat di dalam *Nigella sativa* dengan dosis 75 $\mu\text{mol/L}$ dapat menghambat sintesis DNA, proliferasi dan kelangsungan hidup sel tumor ganas prostat baik in vitro dan in vivo dengan menurunkan ekspresi dari androgen receptor (AR) dan E2F1 setelah 48 jam dan efek yang didapatkan lebih besar setelah pemaparan 72 jam.⁶¹

Hussain K. I. A. et al. (2012) melakukan penelitian bahwa dengan meningkatnya dosis ekstrak biji dan minyak biji *Nigella sativa* pada

konsentrasi 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL dan 200 mg/mL selama 72 jam akan semakin menghambat proliferasi sel pada kultur sel retinoblastoma (911 Cells).⁶³

6.2.3 Pengaruh Ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) terhadap Apoptosis pada Kultur Sel Retinoblastoma

Pada penelitian ini normalitas dan homogenitas data apoptosis memenuhi asumsi sehingga dilakukan pengujian menggunakan one-way anova. Berdasarkan hasil nilai signifikansi sebesar 0.000 lebih kecil dari α (0.05), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata angka apoptosis pada masing-masing perlakuan, untuk melihat letak perbedaannya dilanjutkan uji post hoc tukey. Untuk uji korelasi, uji normalitas data dosis kurang dari α (0.05), yang berarti distribusi data tersebut tidak normal, sedangkan data apoptosis lebih besar dari α (0.05), namun karena salah satu data yang digunakan tidak memenuhi asumsi normalitas maka dilakukan uji korelasi rank spearman, didapatkan nilai signifikansi 0.000 lebih kecil dari α (0.05) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan antara dosis dengan angka apoptosis yang diukur. Hubungan searah antara dosis ekstrak jintan hitam dengan angka apoptosis pada taraf nyata 5% ditunjukkan dengan nilai korelasi yang positif. Uji pengaruh juga memiliki nilai signifikansi sebesar 0.000 lebih kecil dari α (0.05) yang berarti terdapat pengaruh yang signifikan antara dosis ekstrak jintan hitam terhadap angka apoptosis. Sehingga diketahui bahwa dengan meningkatnya dosis dapat meningkatkan angka apoptosis secara nyata.

Motaghd M. (2015) dalam penelitiannya tentang efek thymoquinone setelah dipaparkan dengan konsentrasi 100 μ M pada kultur sel tumor ganas payudara MCF7 mendapatkan hasil adanya penurunan jumlah kelangsungan hidup sel setelah 12 jam dan didapatkan peningkatan apoptosis yang signifikan setelah 24 jam. Penghentian siklus sel fase G1 dan penurunan jumlah sel pada fase S pun terjadi dengan persentase yang tinggi setelah 12 jam pemaparan tersebut, peningkatan durasinya hingga 24 jam menyebabkan akumulasi sel yang lebih banyak pada fase G1 dan didapatkan pula jumlah sel yang terendah pada fase S. Setelah 72 jam efek inhibisi thymoquinone pada konsentrasi 100 μ M

menyebabkan akumulasi sel pada fase sub-G1 sehingga menurunkan jumlah sel hingga nol pada fase-fase lain siklus sel.⁶⁴

6.3 Pengaruh Ekspresi Protein E2F1 terhadap Apoptosis pada Kultur Sel Retinoblastoma

Pada penelitian ini, uji normalitas data E2F1 kurang dari α (0.05), yang berarti distribusi data tersebut tidak normal, sedangkan data apoptosis lebih besar dari α (0.05), namun karena salah satu data yang digunakan tidak memenuhi asumsi normalitas maka dilakukan uji korelasi rank spearman dan didapatkan nilai signifikansi 0.002 lebih kecil dari α (0.05) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan antara ekspresi protein E2F1 dengan angka apoptosis yang diukur. Hubungan berbalik arah dengan nilai korelasi yang negatif, namun korelasinya agak rendah. Terdapat pengaruh yang signifikan antara angka ekspresi protein E2F1 terhadap angka apoptosis, diketahui bahwa angka E2F1 berpengaruh nyata dan negatif terhadap angka apoptosis. Dengan kata lain dengan menurunnya ekspresi protein E2F1 dapat meningkatkan angka apoptosis secara nyata atau sebaliknya. Angka apoptosis juga dipengaruhi oleh faktor lain diluar ekspresi protein E2F1.

Pada Retinoblastoma peningkatan ekspresi protein E2F1 akibat mutasi pRb menyebabkan stimulus pada mRNA untuk menginduksi TGF- β yang memberikan banyak respon melalui berbagai jalur yang akan menyebabkan apoptosis dari kerusakan sel, diantaranya adalah dengan menghambat aktivitas human telomerase reverse transcriptase (hTERT) yang mana aktivitas hTERT menyebabkan replikasi dan transformasi onkogenik pada sel-sel tumor sebanyak 85-90%. Dengan adanya mutasi genom yang mengarah pada tranformasi onkogenik dan adanya kerusakan DNA, TGF- β juga berperan meningkatkan ekspresi p53 yang akan menyebabkan upregulasi dan peningkatan ekspresi mediator utamanya yaitu protein p21 yang merupakan CKI (CDK *Inhibitor*) yang berfungsi mengikat kompleks *cyclin*-CDK sehingga menghalangi hiperfosforilasi protein Rb yang dimediasi oleh *cyclin* D-CDK4 dan *cyclin* E-CDK2 dan menghambat pelepasan E2F1 yang berperan menginduksi ekspresi gen yang dibutuhkan untuk memasuki fase S, sehingga menimbulkan respon seluler berupa penghentian siklus sel (*cell cycle*

arrest), menghidupkan jalur apoptosis yang memaksa sel-sel yang rusak dan mengandung mutasi melakukan bunuh diri sehingga mencegah perbanyakan dan pertumbuhan selular yang abnormal. Target kerja dari p53 lainnya adalah merepresi berbagai ekspresi gen regulator negatif terhadap apoptosis, gen yang dapat ditekan oleh p53 termasuk adalah Bcl-2, Bcl-X1, cyclin B1, MAP4 dan survivin. Respon produk gen target p53 lainnya, yaitu peningkatan ekspresi Gadd45 yang berpartisipasi dalam penghentian fase G2. Gadd45 mengikat CDC2 sehingga mencegah pembentukan kompleks *cyclin* B-CDC2 dan menghambat aktivitasnya dalam mengendalikan metafase dan pengaturan pembongkaran mikrotubulus. Selain itu TGF- β berperan dalam mengaktivasi gen pro apoptosis Apaf1, Caspase 3, Caspase 7, p73, dan Smac/DIABLO, TGF- β juga menghambat cdc25a sehingga aktivasi CDC2 terhambat dan menyebabkan cycle cell arrest pada fase G2. ^{30, 32, 34, 43-47}

6.4 Keterbatasan Penelitian

Penelitian dari pengaruh ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) terhadap kultur sel retinoblastoma ini masih terbilang berada pada tahap awal, sehingga masih diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis yang memberikan efektif maksimal serta masa inkubasi yang berbeda juga dapat dilakukan untuk menambah efektifitas dari ekstrak, selain itu perlu dilakukan penelitian *in vivo* untuk melihat efek samping, dosis toksik serta administrasi yang efektif. Dalam penelitian ini pun masih banyak faktor-faktor lain terkait apoptosis selain E2F1 yang belum diteliti.

BAB VII PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dalam penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) terhadap kultur sel retinoblastoma:

- Menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan antar kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, sehingga ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) dapat menurunkan ekspresi protein E2F1 dan meningkatkan apoptosis pada kultur sel retinoblastoma.
- Dosis pemberian ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) dapat semakin menurun ekspresi protein E2F1, sedangkan dosis pemberian ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) dapat semakin meningkatkan apoptosis. Hubungan antara E2F1 dengan apoptosis menunjukkan bahwa semakin rendah ekspresi protein E2F1, maka semakin tinggi angka apoptosis, namun berkorelasinya agak rendah, sehingga terdapat faktor lain diluar ekspresi protein E2F1 yang mempengaruhi apoptosis pada kultur sel retinoblastoma.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian ini, diharapkan:

- Adanya penelitian lebih lanjutan dengan dosis dan masa inkubasi yang berbeda sehingga didapatkan efektifitas maksimal dari ekstrak *Nigella sativa* (Jintan Hitam) dalam menurunkan ekspresi E2F1 dan meningkatkan apoptosis terhadap kultur sel retinoblastoma.
- Adanya penelitian yang melihat hubungan dan pengaruh faktor lain yang mempengaruhi proliferasi sel dan apoptosis sel retinoblastoma.
- serta perlunya dilakukan penelitian pada *in vivo* agar dapat menjadi mendasari penelitian tingkat klinis.