

**PENGARUH EKSTRAK RIMPANG LENGKUAS (*Alpinia galanga*)  
TERHADAP EKSPRESI APOPTOSIS INDUCING FACTOR (AIF) PADA  
INTI SEL KANKER SERVIKS (SEL HELA)**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**



**Oleh:**

**Febrina Carolina Sandra**

**NIM: 0910753023**

**PROGRAM STUDI FARMASI**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2013**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH EKSTRAK RIMPANG LENGKUAS (*Alpinia galanga*)  
TERHADAP EKSPRESI APOPTOSIS INDUCING FACTOR (AIF) PADA  
INTI SEL KANKER SERVIKS (SEL HELA)**

Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi

Oleh :

Febrina Carolina Sandra  
NIM: 0910753023

Telah diuji pada :

Hari : Selasa

Tanggal : 9 Juli 2013

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

Dra. Diana Lyrawati, Apt., MS., Ph. D

NIP: 19681101 199303 2 004

Pembimbing I

Pembimbing II

Valentina Yurina, S.si, M.si.

NIP. 19830209 201012 2 001

Dr. dr. Tatit Nurseta, Sp. OG(K)Onk

NIP. 19670909 199703 1 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi

Drs. Bambang Sidharta, Apt., M.S.

NIP. 19481216 198002 1 001

“Karena masa depan sungguh ada dan harapanmu tidak akan hilang”





## KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kepada Tuhan yang Maha Esa atas segala berkat dan anugerahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Rimpang Lengkuas (*Aplinia galanga*) Terhadap Ekspresi *Apoptosis Inducing Factor* (AIF) pada Inti Sel Kanker Serviks (Sel HeLa)”.

Dengan selesainya tugas akhir ini, peneliti ingin mengucapkan terima kasih kepada :

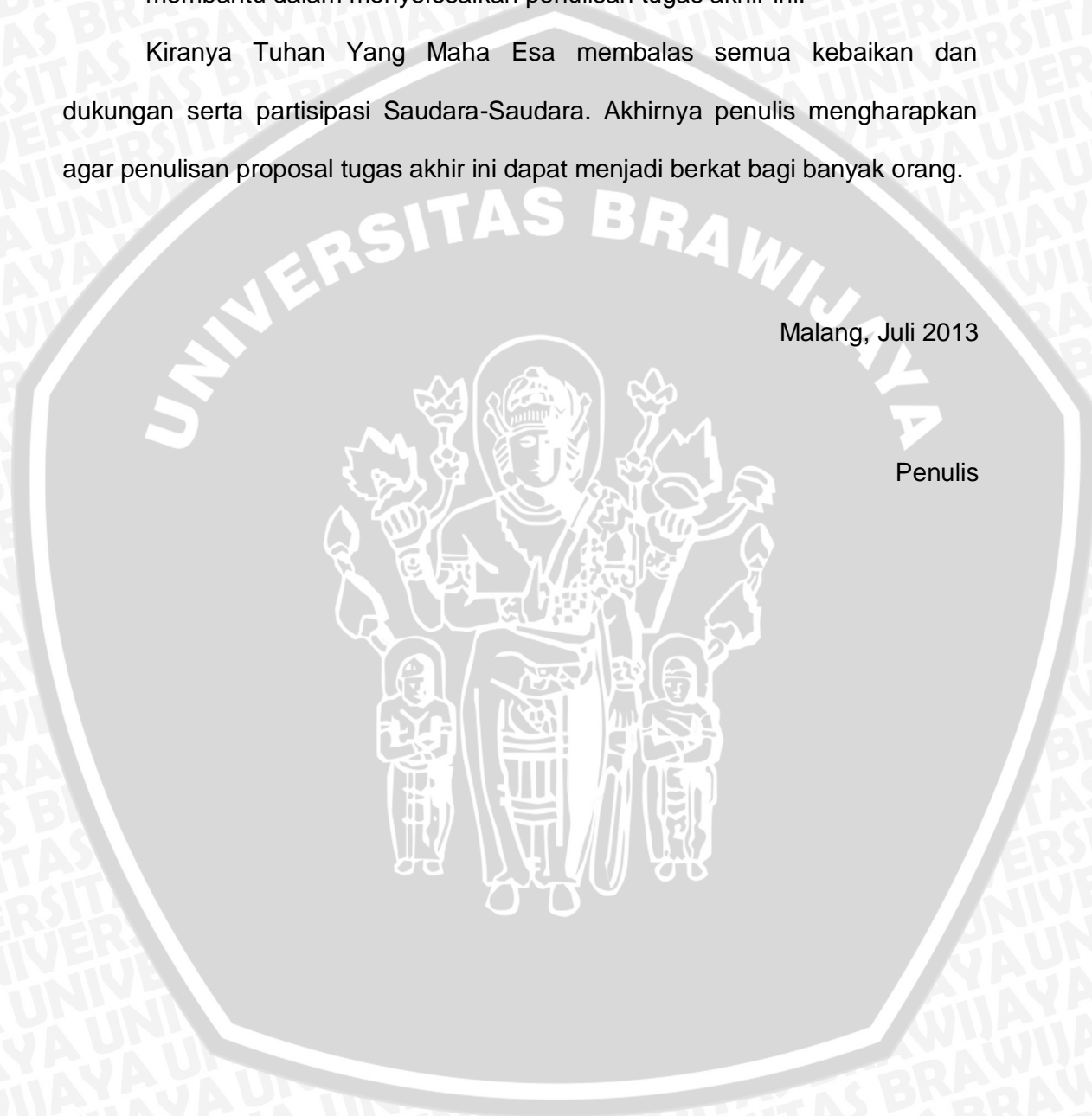
1. Ibu Valentina Yurina, S.si., M.si. sebagai pembimbing pertama yang dengan setia membimbing, memberikan masukan, kritik, dan saran kepada peneliti.
2. Dr. dr. Tatit Nurseta, SpOG(K)Onk. sebagai pembimbing kedua yang telah membimbing, memberikan saran dan masukan yang sangat berarti kepada peneliti.
3. Dra. Diana Lyrawati, Apt., M.S., Ph. D sebagai penguji, yang telah mengkritisi dan memberikan masukan untuk tugas akhir ini.
4. Bapak Suwibi atas hibah antibodi AIF yang diberikan kepada peneliti.
5. Staff laboran dari laboratorium Biomedik, Farmakognosi, dan Biokimia yang telah mendampingi peneliti selama proses penelitian.
6. Ayah Agus Sugianto, Ibu Idham Yuniati, Kakak Desy Marshelina Sandra, dan Adik Octavina Novita Sari yang tiada hentinya memberikan semangat, dukungan secara materiil dan moril, doa, serta harapan pada peneliti.
7. Elvin Bizaliel, yang setia menemani, mendukung, mendoakan, dan memberi masukan pada peneliti, selama suka dan duka pengerjaan tugas akhir ini.

8. Teman-teman Farmasi 2009 atas semangat, dukungan, dan bantuan tanpa henti selama penelitian ini.
9. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, yang telah membantu dalam menyelesaikan penulisan tugas akhir ini.

Kiranya Tuhan Yang Maha Esa membalas semua kebaikan dan dukungan serta partisipasi Saudara-Saudara. Akhirnya penulis mengharapkan agar penulisan proposal tugas akhir ini dapat menjadi berkat bagi banyak orang.

Malang, Juli 2013

Penulis



10.

## ABSTRAK

**Sandra, Febrina Carolina. 2013. Pengaruh Ekstrak Rimpang Lengkuas (*Alpinia Galanga*) Terhadap Ekspresi Apoptosis Inducing Factor (AIF) pada Inti Sel Kanker Serviks (Sel HeLa). Tugas Akhir, Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Valentina Yurina, S.Si., M.Si. (2) Dr. dr. Tatit Nurseta, SpOG(K)Onk.**

Ekstrak *Alpinia galanga* telah terbukti mempunyai aktivitas antikanker, diperantarai oleh kandungan ACA, HCA, dan galangin. Mekanisme antikanker *A. galanga* adalah dengan meningkatkan ekspresi Bax, penurunan Bcl-2 dan Bcl-xL yang menyebabkan peningkatan level ROS, rilisnya cytochrome c, peningkatan kadar  $Ca^{2+}$  dalam mitokondria dan sitosol, serta aktivasi dari caspase 3. Namun, belum ada penelitian yang mengamati mekanisme induksi apoptosis dari *A. galanga* melalui jalur caspase-independen apoptosis, yaitu dengan peningkatan translokasi AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) ke nukleus. Translokasi AIF ke nukleus adalah faktor penting penentu terjadinya apoptosis. Maka, studi *true experimental* menggunakan kultur sel kanker serviks atau sel HeLa ini dilakukan untuk pengamatan fenomena tersebut. Penelitian dilakukan dengan pemberian 0,150, 300, 600  $\mu\text{g/ml}$  ekstrak ethanol rimpang *A. galanga* selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan pengamatan dengan metode imunohistokimia menggunakan antibodi AIF dan dilakukan penghitungan indeks ekspresi AIF. Analisis data menggunakan *oneway-ANOVA* menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol, indeks rata-rata sel yang mengekspresikan AIF adalah sebesar  $5,49\% \pm 0,417$ ,  $P_1=14,92\% \pm 1,327$ ,  $P_2=19,13\% \pm 1,131$  dan  $P_3 = 23,07\% \pm 0,938$  dengan  $p=0,000$  ( $<0,05$ ). Disimpulkan bahwa ekstrak *A. galanga* secara signifikan dapat meningkatkan ekspresi AIF pada inti sel HeLa.

Kata kunci : *Alpinia galanga*, Apoptosis Inducing Factor, Acetoxychavicol acetate (ACA), Hydroxycinnamaldehyde (HCA), galangin, imunohistokimia, sel HeLa.



**ABSTRACT**

**Sandra, Febrina Carolina. 2013. Effect of *Alpinia Galanga* Rhizome Extract on the Expression of Apoptosis Inducing Factor (AIF) in HeLa Cells's Nucleus.** Final Assignment, Program Study of Pharmacy, Medical Faculty, Brawijaya University. Supervisors: (1) Valentina Yurina, S.Si., M.Si. (2) Dr. dr. Tatit Nurseta, SpOG(K)Onk.

*Alpinia galanga* extract have been proved as an anticancer, mediated by ACA, HCA, and galangin content. Anticancer mechanism of *A. galanga* associated with increase of Bax, decrease of Bcl-2 and Bcl-xL, resulting incline level of ROS, release of cytochrome c, higher level of mitochondrial and cytosomal Calcium, and also activation of caspase 3. However, there is still no research that documented about the effect of *A. galanga* in caspase-independen apoptosis pathways, through the AIF nuclear translocation. Nuclear translocation of AIF became crucial effector to induce caspase-independen apoptosis. This true experimental studi used HeLa Cells line to observe the phenomenon. HeLa Cells lines were exposed with 0; 150; 300; 600  $\mu\text{g/ml}$  ethanol extract *A. galanga* rhizome for 24 hours. The translocation of AIF was observed with immunohistochemistry method, using AIF antibody. Data was colleted and analyzed using oneway-ANOVA. The result showed that in control group, the index of cell that expressed the AIF iwas  $5.49\% \pm 0,417$ ,  $P1=14.92\% \pm 1.327$ ;  $P2=19.13\% \pm 1.131$  and  $P3 = 23.07\% \pm 0.938$  with  $p=0.000 (<0.05)$ . It can be inferred from this research that ethanolic extract of *A. galanga* rhizome can significantly increased the expression of Apoptosis Inducing Factor (AIF) in HeLa Cells's nucleus.

**Keywords:** *Alpinia galanga*, Apoptosis Inducing Factor, Acetoxychavicol acetate (ACA), Hydroxycinnamaldehyde (HCA), galangin, imunohistochemistry, HeLa Cells.

## DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Sampul Depan.....	i
Halaman Pengesahan .....	ii
Halaman Peruntukan .....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vii
Abstract.....	viii
Daftar Isi.....	ix
Daftar Tabel.....	xi
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Lampiran.....	xiii
Daftar Singkatan .....	xiv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang Masalah .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
1.4.1 Manfaat Akademis .....	4
1.4.2 Manfaat Praktis .....	4
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Kanker Serviks.....	6
2.1.1 Definisi dan Etiologi.....	6
2.1.2 Faktor Risiko .....	8
2.1.3 Tanda dan Gejala.....	9
2.1.4 Patofisiologi dan Mekanisme Onkogenesis .....	10
2.1.5 Terapi Kanker Serviks .....	14
2.2 Sel HeLa .....	16
2.3 <i>Alpinia galanga</i> .....	17
2.3.1 Morfologi dan Taxonomi .....	18
2.3.2 Kandungan Fitokimia dan Aktivitas Farmakologi .....	19
2.3.3 Aktivitas Antikanker <i>Alpinia galanga</i> .....	22
2.4 Apoptosis .....	23
2.5 <i>Apoptosis Inducing Factor</i> .....	27
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	
3.1 Kerangka Konsep .....	29
3.2 Hipotesis Penelitian.....	30



**BAB 4 METODE PENELITIAN**

4.1 Rancangan Penelitian .....	31
4.1.1 Rancangan Sampel Acak Sederhana .....	31
4.2 Sampel Penelitian .....	32
4.3 Variabel Penelitian .....	32
4.4 Waktu dan Tempat Penelitian .....	33
4.5 Alur Penelitian .....	33
4.5.1 Alur Penyiapan Ekstrak <i>Alpinia galanga</i> .....	33
4.5.2 Alur Penyiapan Kultur Sel HeLa .....	34
4.5.3 Skema Pemberian Perlakuan dan kontrol .....	34
4.6 Alat dan Bahan .....	35
4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak .....	35
4.6.2 Alat dan Bahan Uji Fitokimia Kualitatif .....	36
4.6.3 Alat dan Bahan Kultur Sel HeLa .....	36
4.6.4 Alat dan Bahan Imunohistokima .....	36
4.7 Prosedur Kerja .....	37
4.7.1 Prosedur Pembuatan Ekstrak .....	37
4.7.2 Prosedur Uji Fitokimia .....	38
4.7.3 Prosedur Pembuatan Sediaan Ekstrak .....	39
4.7.4 Prosedur Kultur Sel HeLa .....	30
4.7.5 Prosedur Imunohistokimia .....	43
4.8 Analisis Data .....	45
4.9 Definisi Operasional .....	45
4.10 Keterbatasan Penelitian .....	46

**BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**

5.1 Hasil Penelitian .....	47
5.1.1 Hasil Ekstraksi dan Uji Fitokimia .....	47
5.1.2 Hasil Uji Ekspresi AIF .....	48
5.2 Analisis data .....	49

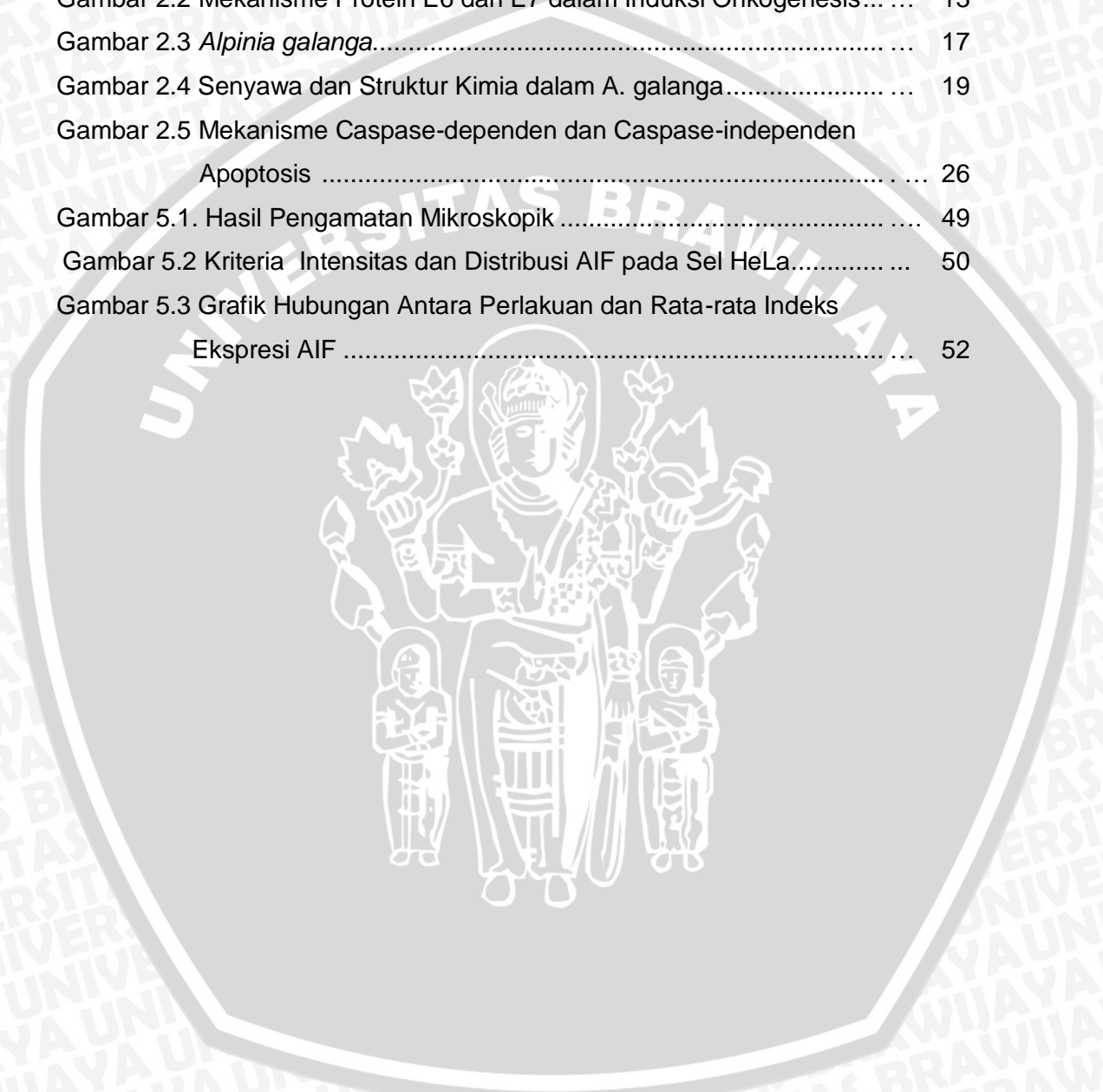
**BAB 6 PEMBAHASAN** ..... 54**BAB 7 PENUTUP**

7.1 Kesimpulan .....	60
7.2 Saran .....	60

**DAFTAR PUSTAKA**..... 62

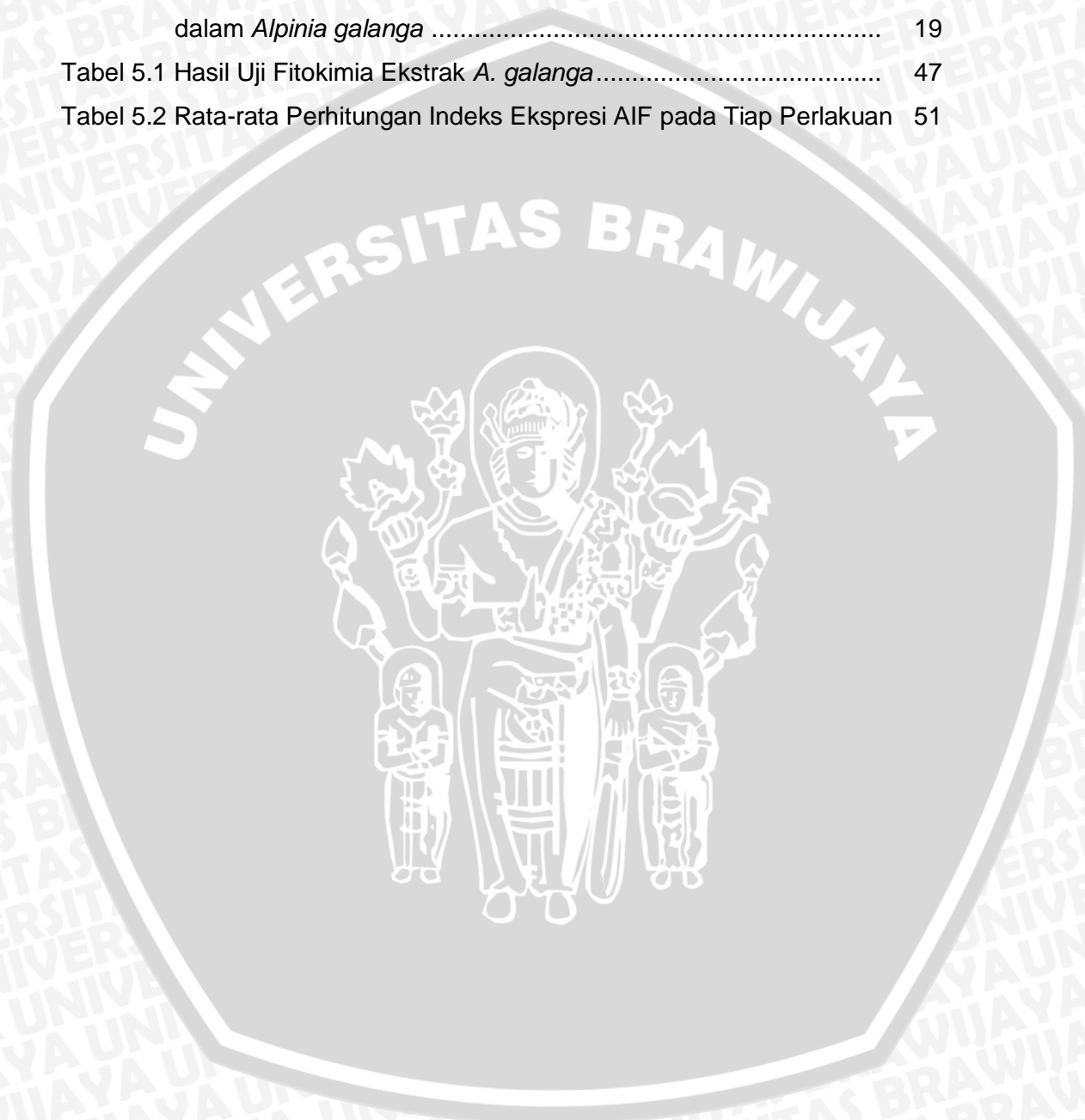
**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 2.1 <i>Human Papilloma Virus</i> dan Skema Genome DNA sirkular rantai ganda HPV 16.....	7
Gambar 2.2 Mekanisme Protein E6 dan E7 dalam Induksi Onkogenesis.....	13
Gambar 2.3 <i>Alpinia galanga</i> .....	17
Gambar 2.4 Senyawa dan Struktur Kimia dalam <i>A. galanga</i> .....	19
Gambar 2.5 Mekanisme Caspase-dependen dan Caspase-independen Apoptosis .....	26
Gambar 5.1. Hasil Pengamatan Mikroskopik .....	49
Gambar 5.2 Kriteria Intensitas dan Distribusi AIF pada Sel HeLa.....	50
Gambar 5.3 Grafik Hubungan Antara Perlakuan dan Rata-rata Indeks Ekspresi AIF .....	52



DAFTAR TABEL

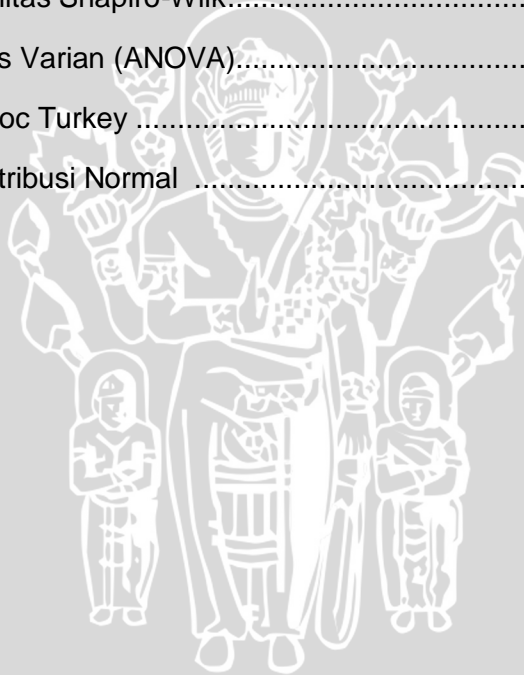
	Halaman
Tabel 2.1 Pedoman Terapi Kanker Serviks Berdasarkan FIGO .....	15
Tabel 2.2 Senyawa dan Struktur Kimia yang Terkandung dalam <i>Alpinia galanga</i> .....	19
Tabel 5.1 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak <i>A. galanga</i> .....	47
Tabel 5.2 Rata-rata Perhitungan Indeks Ekspresi AIF pada Tiap Perlakuan	51





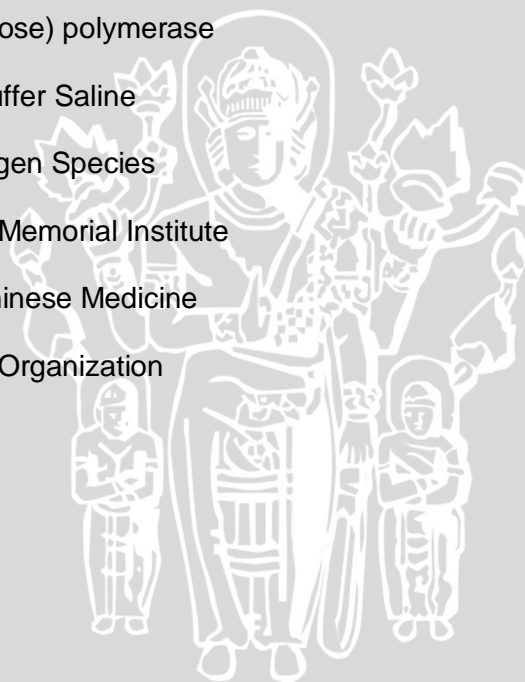
DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Hasil Penghitungan Indeks Ekspresi AIF .....	67
Lampiran 2 Hasil Pengamatan Uji Fitokimia.....	69
Lampiran 3. Analisis Deskriptif .....	71
Lampiran 4. Grafik Hubungan antara Perlakuan dan Rata-rata Indeks Ekspresi AIF.....	72
Lampiran 5. Uji Homogenitas Lavene .....	73
Lampiran 6. Uji Normalitas Shapiro-Wilk.....	73
Lampiran 7. Uji Analisis Varian (ANOVA).....	73
Lampiran 8. Uji Post Hoc Turkey .....	74
Lampiran 9. Grafik Distribusi Normal .....	75



**DAFTAR SINGKATAN**

- ACA : Acetoxychavicol acetate
- AIF : Apoptosis Inducing Factor
- DAB : Diaminobenzidine
- FIGO : International Federation of Gynecologist and Obstetricians
- HCA : Hydroxycinnamal dehyde
- HPV : Human Papilloma Virus
- HRP : Horseradish Peroxidase
- PAR : Poly (ADP-ribose)
- PARP : Poly (ADP-ribose) polymerase
- PBS : Phosphate Buffer Saline
- ROS : Reactive Oxygen Species
- RPMI : Roswell Park Memorial Institute
- TCM : Traditional Chinese Medicine
- WHO : World Health Organization



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Serviks atau mulut rahim adalah bagian bawah dari rahim atau uterus yang menghubungkan vagina dan uterus. Sel-sel epitel pada serviks yang tumbuh secara tidak terkontrol akan berkembang menjadi kanker serviks. Kanker berawal ketika sel tertentu dari tubuh tumbuh secara tidak terkontrol (*American Cancer Society*, 2013). Kanker serviks merupakan kanker yang paling banyak terjadi pada wanita di Indonesia dan beberapa negara berkembang lainnya (Vet *et. al.*, 2008). Berdasarkan data statistik tahun 2008, yang dikeluarkan *World Health Organization* (WHO), mengenai *Human Papilloma Virus*, kanker serviks menempati posisi keempat tertinggi, yang paling banyak menyebabkan kematian pada wanita di Indonesia (*World Health Organization*, 2010).

WHO telah sejak lama merekomendasikan penggunaan obat tradisional dalam pemeliharaan kesehatan, pencegahan, dan pengobatan penyakit, terutama untuk penyakit degeneratif dan kanker (Sari, 2006). Pada masa terakhir ini, produk-produk natural, telah menjadi pertimbangan sebagai sumber pengobatan yang sangat penting dalam pengobatan tradisional untuk terapi penyakit kanker. Beberapa studi menunjukkan bahwa ekstrak dari tanaman herbal menunjukkan aktivitas antikanker, baik secara *in vivo* dan *in vitro*, misalnya senyawa Taxol dari *Taxus brevifolia* (Srisapoomi *et. al.*, 2008).

Apoptosis adalah proses kematian sel yang terprogram. Tingkat apoptosis ini akan mempengaruhi kecepatan pertumbuhan kanker. Tingkat apoptosis yang semakin tinggi menyebabkan tingkat pertumbuhan tumor semakin lambat. Terapi radiasi atau terapi dengan senyawa sitotoksik yang



digunakan selama ini menggunakan prinsip tersebut dalam pengobatan kanker. Pada penelitian lebih lanjut, kemampuan induksi apoptosis pada sel kanker selain dimiliki oleh obat-obatan sitotoksik, juga dimiliki oleh beberapa senyawa tanaman dan salah satunya adalah senyawa yang terkandung dalam lengkuas.

*Alpinia galanga* atau yang sering disebut dengan lengkuas adalah salah satu tanaman yang dimanfaatkan sebagai pengobatan dalam Ayurveda, Unani, TCM (*Traditional Chinese Medicine*), dan pengobatan tradisional Thailand. *A. galanga* adalah jenis tanaman berumpun yang banyak ditemui di negara-negara, seperti Thailand, Indonesia, China, dan Malaysia. Rimpang *A. galanga* dalam Ayurveda digunakan untuk pengobatan bronchitis, dalam Unani digunakan sebagai stomakik, diuretik, ekspektoran, nyeri rematik, dan penyakit ginjal (Chudiwal *et. al.*, 2010).

*A. galanga* berdasarkan hasil penelitian mempunyai banyak aktivitas farmakologi. Beberapa aktivitas farmakologi dari tanaman ini adalah aktivitas antimikroba, antiinflamasi, hipoglikemik, dan antioksidan (Srividya *et. al.*, 2010; Oonmetta-aree *et. al.*, 2005). Pada penelitian lebih lanjut, diketahui bahwa rimpang *A. galanga* mempunyai efektivitas proapoptosis pada kultur sel kanker Human Leukemic HL60 dan U937. Mekanisme induksi apoptosis tersebut diperantarai oleh senyawa aktif 4-Hydroxycinnamaldehyde (4-HCA), yang diketahui menyebabkan apoptosis melalui jalur stress mitokondria dan stress retikulum endoplasma. Mekanisme tersebut diperantarai peningkatan ekspresi Bax, penurunan Bcl-2 dan Bcl-xL yang menyebabkan peningkatan level ROS, rilisnya cytochrome c, peningkatan kadar  $Ca^{2+}$  dalam mitokondria dan sitosol, serta aktivasi dari caspase 3 (Banjerdpongchai *et. al.*, 2011). Selain 4'-HCA, galangin yang terkandung pada ekstrak *A. galanga* juga mempunyai efek penghambatan pada siklus sel di fase G0-G1 (Murray *et. al.*, 2006). Senyawa lainnya yang juga terbukti menginduksi terjadinya apoptosis adalah

acetoxychavicol acetate (ACA) (Awang *et. al.*, 2010). Ekstrak etil asetat rimpang lengkuas telah terbukti menghambat proliferasi dan meningkatkan proses apoptosis pada model tikus kanker payudara melalui ekspresi caspase 3 (Awang *et. al.*, 2010). *A. galanga* telah terbukti efektif untuk menginduksi apoptosis pada jalur caspase-dependen. Namun, belum ada studi yang mempelajari mekanisme mengenai peningkatan aktivitas apoptosis ekstrak rimpang *A. galanga* dari jalur caspase-independen.

Dari latar belakang inilah, peneliti ingin mengetahui efektivitas ekstrak ethanol rimpang *A. galanga* terhadap mekanisme apoptosis dari jalur caspase-independen. Penelitian dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan kultur sel HeLa, yaitu kultur sel kanker serviks. Sel HeLa akan dipapar dengan tiga dosis ekstrak *A. galanga* yang berbeda selama 24 jam. Selanjutnya aktivitas apoptosis dari jalur caspase-independen akan diamati dengan metode imunohistokimia menggunakan antibodi *Apoptosis Inducing Factor* (AIF). AIF ini akan menjadi indikator terjadinya apoptosis dari jalur caspase-independen.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak ethanol rimpang lengkuas (*A. galanga*) terhadap ekspresi AIF pada inti sel kanker serviks (sel HeLa). Penelitian ini bermanfaat untuk mendorong masyarakat dalam pemanfaatan rimpang *A. galanga* sebagai antikanker serviks, mendorong penelitian lebih lanjut untuk mengoptimalkan isolasi zat aktif dari lengkuas, dan mendorong untuk dilakukannya penelitian secara *in vivo*, sehingga dapat dinilai efektivitas, efek samping, dan keamanannya.



## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak ethanol rimpang lengkuas (*A.galanga*) dapat meningkatkan ekspresi AIF pada inti sel HeLa?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui pengaruh ekstrak ethanol rimpang lengkuas (*A. galanga*) dalam induksi apoptosis jalur caspase independen melalui peningkatan ekspresi AIF pada inti sel HeLa.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.1.1 Manfaat Akademis

#### 1. Bagi Ilmu Pengetahuan

Penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai efektivitas antikanker dari ekstrak ethanol *A. galanga* pada kanker serviks serta mekanismenya dalam induksi apoptosis dari jalur caspase-independen.

#### 2. Bagi Peneliti

Penelitian ini menjadi sarana bagi peneliti untuk mempelajari lebih dalam mengenai pemanfaatan tanaman sebagai terapi antikanker dan mempelajari metode penelitian secara lebih mendetail.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

#### 1. Bagi Masyarakat

Memberikan informasi bagi masyarakat tentang pemanfaatan *A. galanga* sebagai antikanker serviks.



## 2. Bagi Peneliti lain

Penelitian dapat mendorong penelitian lebih lanjut untuk mengamati mekanisme kerja dari kandungan *A. galanga* sebagai antikanker, mengoptimalkan isolasi zat aktif dari lengkuas, serta mendorong untuk dilakukannya penelitian secara *in vivo*, sehingga dapat dinilai mengenai efektivitas, efek samping, dan keamanannya.

## 3. Bagi Klinisi dan famasis

Penelitian ini dapat menjadi bahan pertimbangan untuk menggunakan lengkuas sebagai terapi pendamping untuk pasien kanker serviks.



## BAB 2

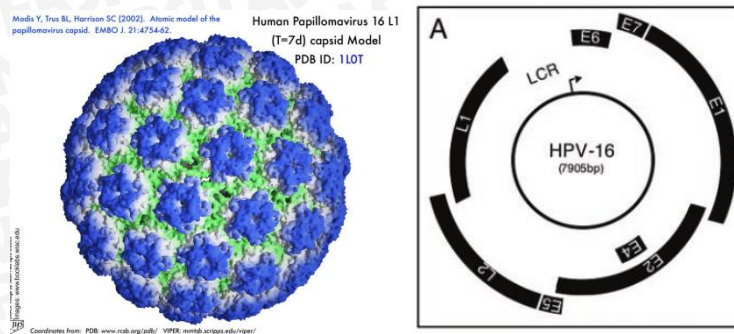
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Kanker Serviks

##### 2.1.1. Definisi dan Etiologi

Kanker adalah kondisi malignansi neoplasma yang dikarakteristikan dengan adanya proliferasi sel anaplastik. Kondisi proliferasi yang terus menerus dapat menginvasi jaringan di sekitarnya dan bahkan bermetastase ke jaringan tubuh yang lain (Mosby, 2009). Kanker serviks adalah kanker yang bermula pada jaringan serviks. Secara lebih spesifik tipe kanker yang berkembang di jaringan serviks adalah karsinoma atau tipe kanker yang berawal dari sel epitel atau sel yang melapisi organ.

Penyebab dari kanker serviks terutama adalah akibat dari infeksi *Human papilloma virus* (HPV). Virus HPV sebenarnya dapat menginfeksi seluruh sel epitel pada tubuh manusia. Salah satu akibat yang paling banyak terjadi akibat infeksi dari HPV adalah timbulnya *warts* atau kutil pada tangan, tumit, atau telapak kaki. Terdapat lebih dari seratus strain HPV dan tidak semua strain HPV dapat menyebabkan kanker serviks. Strain HPV dikategorikan dalam strain risiko tinggi dan risiko rendah untuk menyebabkan kanker serviks. Strain yang termasuk risiko tinggi adalah strain 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 dan strain risiko rendah adalah strain 6, 11, 40, 42, 54, 55, 83, 84 (Wee *et. al.*, 2008). Kanker serviks kebanyakan disebabkan oleh HPV strain 16 dan 18 (Spencer, 2006). Strain HPV yang termasuk dalam kategori risiko tinggi lebih banyak menyebabkan kanker karena ekspresi protein yang dihasilkan strain tersebut mempunyai afinitas pengikatan lebih kuat pada protein atau DNA manusia (Munger *et. al.*, 1992).



**Gambar 2.1. Human Papilloma Virus (Modis Y. *et.al.*, 2002) dan Skema Genome DNA sirkular rantai ganda HPV 16 (Munger *et. al.*, 2004)**

Virus Papilloma adalah virus yang termasuk dalam *non-enveloped* virus dengan diameter kurang lebih lima puluh lima nanometer (Munger *et. al.*, 2004). HPV adalah virus yang berbentuk seperti *icosahedrons*, tetapi pada tiap sisi triangularnya terdapat struktur kecil yang memanjang keluar yang disebut dengan kapsomer. Virus ini mempunyai tujuh puluh dua kapsomer, berbentuk pentagonal dengan lima sisi yang simetris seperti pada gambar 2.1. Tipe HPV dituliskan dengan nomor, berdasarkan sejarah penemuan deskripsi sekuen DNA HPV. (Bernard, 2005).

Paparan HPV terjadi secara cepat ketika HPV bertransmisi melalui hubungan seksual. Selama satu hingga delapan bulan, pasien tidak merasakan gejala atau tanda infeksi. Setelah masa inkubasi ini, mulai terbentuk lesi dan memicu respon imun selama tiga sampai enam bulan, diikuti dengan kondisi remisi (Weaver, 2006). Masa inkubasi akan terus berlanjut hingga terbentuk *carcinoma in situ* dalam rentang waktu tujuh sampai dua belas tahun (Moscicki, 2005).

HPV secara umum mempunyai dua protein pembentuk kapsidnya, yaitu *major capsid* yang dikode oleh gen L1 dan *minor capsid* yang dikode oleh gen



L2 (Spencer, 2006). Partikel HPV selain terdiri dari kapsid, juga terdiri dari genome yang berupa rantai ganda DNA. Genome HPV berbentuk DNA sirkular yang terdiri dari delapan ribu pasangan basa. Gen HPV diklasifikasikan menjadi tiga bagian utama, yaitu *Early (E)*, *Late (L)*, dan *Non-Coding Long Chain Region (LCR)*. *Early gene* terdiri dari E1-E7 dan *late gene* terdiri L1-L2 (Barakat *et. al.*, 2009). Gen E1 dan E2 adalah gen yang diperlukan untuk replikasi virus. Protein E2 yang dihasilkan mempunyai kemampuan sebagai aktivator untuk transkripsi. Gen E4 akan mempengaruhi stabilitas mekanikal keratin (Munger *et. al.*, 2004). Gen E5 adalah gen yang berfungsi untuk memproduksi protein yang dapat meningkatkan waktu paruh dari *tyrosine-kinase containing growth factor* seperti EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Saavedra *et. al.*, 2012). Gen E6 dan E7 adalah bentuk *early gene* yang tidak berperan penting terhadap replikasi sel, tetapi berperan terhadap pertumbuhan kanker (Spencer, 2006). Gen L1 dan L2 tidak diperlukan sampai masa akhir replikasi. Gen ini secara langsung mengekspresikan protein yang akan digunakan untuk membentuk kapsid baru. Kapsid yang baru ini menjadi tahap terakhir dalam maturasi virus, sampai virus siap menginfeksi sel di sekitarnya (Spencer, 2006).

HPV ditransmisikan melalui rute *skin-to-skin*. Ketika virus memasuki kulit, HPV menginfeksi sel epitel terutama pada lapisan basal. Siklus hidup HPV ini tidak dapat dimengerti secara keseluruhan karena virus ini tidak tumbuh dengan baik pada media di bawah kondisi laboratorium.

### 2.1.2. Faktor Risiko

Faktor risiko penyebab terjadinya kanker serviks adalah merokok, supresi sistem imun, penggunaan kontrasepsi oral jangka lama, malnutrisi, termasuk undernutrisi dan obesitas. Pada sebuah studi, kematian akibat kanker

menjadi lebih tinggi pada pasien dengan BMI diatas normal. Status sosioekonomi juga menjadi faktor risiko yang berperan penting pada terjadinya kanker serviks. Wanita dengan tingkat pendapatan dan tingkat ekonomi yang rendah cenderung mendapatkan kesulitan untuk mengakses perawatan medis. Hal tersebut mengakibatkan wanita dengan pendapatan rendah kesulitan untuk melakukan *screening test*, termasuk *screening test* untuk kanker serviks (Spencer, 2006).

Berdasarkan studi yang dilakukan Castellsaque pada tahun 2006, risiko terjadinya *adenocarcinoma* secara statistik akan meningkat signifikan pada wanita yang tidak mengenyam pendidikan, mempunyai usia lebih muda saat melakukan *sexual intercourse* pertama, mempunyai pasangan seks lebih banyak, mempunyai riwayat penyakit menular seksual, dan mempunyai riwayat pernah melakukan anal seks. Dalam penelitian yang sama, dikatakan bahwa risiko akan meningkat seiring pada wanita multiparitas. Faktor hormonal endogen seperti tingkat kehamilan dan hormonal eksogen seperti kontrasepsi hormonal dalam jangka waktu lama adalah kofaktor dalam patogenesis *adenocarcinoma* (Cestallsaque *et. al.*, 2006). Keduanya dapat menginduksi abnormalitas glandular pada serviks (Nojomi *et. al.*, 2008). Risiko terinfeksi juga semakin besar pada wanita yang melakukan hubungan seksual dengan laki-laki yang tidak sirkumsisi (Spencer, 2006).

### 2.1.3. Tanda dan Gejala

Wanita yang mengalami kanker serviks masa awal dan prekanker biasanya tidak menunjukkan adanya gejala. Gejala tidak akan timbul sampai pada masa pre-kanker berkembang menjadi kanker yang invasif dan berkembang hingga ke jaringan sekitar. Sampai pada tahap tersebut, gejala yang akan dialami adalah pendarahan vagina secara tidak normal (*American Cancer Society*, 2012). Gejala yang timbul setelah memasuki masa kanker invasif adalah



perdarahan, anemia, penurunan berat tubuh, kelelahan, dan pembengkakan ekstremitas bagian bawah atau kaki (Barakat *et. al.*, 2009)

#### 2.1.4. Patofisiologi dan Mekanisme Onkogenesis

Secara anatomi, serviks dibagi menjadi empat bagian, yaitu *ectoserviks*, *external os*, *endocervical canal*, dan *internal os*. *Ectocervix* adalah jaringan yang menonjol pada vagina. Bagian ini mempunyai panjang rata-rata tiga centimeter dan lebar 2,5 centimeter. *External os* adalah bagian awal dari *ectocervix* ke vagina. Bentuk dan ukurannya sangat bervariasi, tergantung umur wanita dan keadaan hormonalnya. *Endocervical canal* adalah jalan antara *external os* dan uterus. *Internal Os* adalah bagian awal serviks yang berada di dalam rongga uterus (Spencer, 2006).

Serviks dan struktur lain saluran reproduksi wanita terbentuk dari jaringan yang spesifik. Sel epitel pada serviks terdiri dari dua tipe sel yang berbeda, yaitu sel epitel kolumnar dan sel epitel *squamous*. Pada kedua sel inilah HPV dapat menginfeksi dan dapat berkembang menjadi kanker serviks. Sel *squamous* adalah sel yang banyak menjadi awal terbentuknya kanker serviks (Spencer, 2006).

Sel epitel kolumnar berbentuk panjang dan tersusun atas satu lapisan. Sel epitel *squamous* berbentuk pipih, panjang, dan tersusun bertumpuk antara satu dengan yang lainnya. *Endocervical canal* terdiri dari sel epitel kolumnar yang mengeluarkan mucus dan berakhir dengan sel *squamous*. Daerah perbatasan antara epitel kolumnar dan *squamous* disebut *transformation zone*. Pada *transformation zone* ini merupakan tempat HPV menginfeksi dan menjadi tempat untuk mengambil sel sampel untuk *Papanicolaou Smear* (Spencer, 2006). Kanker serviks diawali dengan adanya perubahan interval displasia epitel,



terutama pada bagian *transformation zone*. Hal tersebut dikenal dengan *cervical intraepithelial neoplasia* (CIN), yang dapat berkembang menjadi kanker yang invasive. Berdasarkan kedalamannya CIN diklasifikasikan menjadi CIN 1, CIN 2, dan CIN 3. CIN 1 adalah displasia yang terbatas pada satu per tiga lapisan basal dari epitel. CIN 2 dan CIN 3 adalah displasia yang mencapai dua per tiga atau lebih dari lapisan basal. Jika mencapai ketebalan dari seluruh lapisan epitel maka disebut dengan *carcinoma in situ* (CIS) (Barakat *et. al.*, 2009)

Sel kanker, sama halnya dengan sel normal, bereplikasi melalui urutan yang spesifik yang disebut dengan siklus sel. Siklus sel mempunyai empat fase, yaitu fase S, M, G1, dan G2. Fase pertama dalam aktivitas siklus sel adalah fase M, dimana sel sedang mengalami mitosis atau pembelahan sel. Setelah menjalani fase mitosis, sel memasuki tahap istirahat atau gap, yaitu fase G1. Selama fase G1, sel membuat enzim yang diperlukan untuk sintesis DNA. Proses sintesis DNA akan berlangsung pada fase S. Setelah memasuki fase S, sel memasuki tahap istirahat kedua atau G2. RNA dan protein lainnya akan disintesis selama fase G2 ini untuk persiapan fase M. Setelah sel menyelesaikan fase M, maka sel telah terbagi dan kemudian akan mengulangi siklus yang sama untuk selanjutnya. Sel yang telah mengalami mitosis juga dapat mengalami diferensiasi atau menjadi lebih matang menjadi sel yang terspesialisasi dan kemudian akan mati atau apoptosis (Koda *et. al.*, 2009).

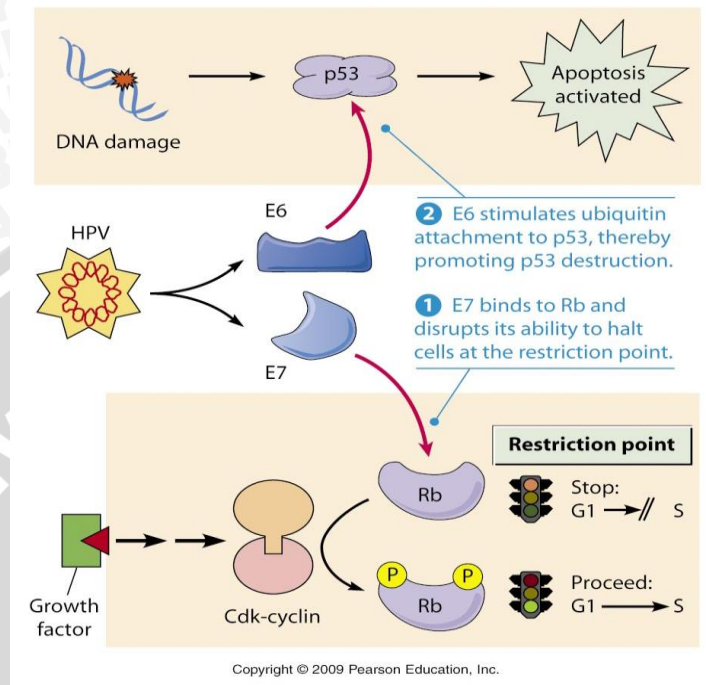
Proliferasi sel normal berada dalam kontrol untuk menyeimbangkan antara sel yang mati dan sel baru yang diproduksi. *Proto-oncogenes* dan *tumor suppressor gen* adalah gen yang mengatur sinyal stimulasi dan inhibisi regulasi siklus sel. Terdapat beberapa protein dalam nukleus yang disebut *cyclins* dan *cyclin-independent kinase* (CDK). *Cyclin* dan CDK yang berkombinasi akan membentuk kompleks yang akan bekerja sebagai pemicu molekular. Pemicu

molekular ini akan menyebabkan sel bergerak dari fase G1 ke fase S. Jika jumlah *cyclin* dan CDK berkurang pada fase G1, maka sel tidak akan masuk ke fase S. Level *cyclin* dan CDK ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti transkripsi gen *cyclin*, degenerasi *cyclin*, aktivasi *CDK inhibitor*, dan transfer grup fosfor dari protein dan enzim. Sinyal dari lingkungan sel akan ditransmisikan ke nukleus dengan *signaling pathways*, yang nantinya akan mempengaruhi kompleks *cyclin* dan CDK. Kompleks ini akan menghasilkan gugus fosfat dari ATP dan menransfernya ke *retinoblastoma protein* (Rb). Jika protein Rb mendapatkan gugus fosfat yang cukup, maka protein Rb akan merilis faktor transkripsi ke sel yang membutuhkan, sehingga protein esensial dapat diproduksi untuk keperluan pembelahan sel. Pada sel kanker, regulasi dan fungsi dari *cyclin*, CDK dan protein inhibitor terganggu oleh transformasi malignan. Atau sebaliknya, adanya perubahan pada protein-protein tersebut menyebabkan terjadinya malignansi (Koda *et. al.*, 2009).

Perubahan siklus sel dapat terjadi karena infeksi HPV. Infeksi HPV dimulai pada lapisan basal, karena lapisan basal tersebut aktif membelah dan mengekspresikan reseptor spesifik sebagai sarana masuknya virus. Molekul heparin sulfat dan *glycosaminoglycans* diketahui memediasi penempelan virion melalui interaksi *major protein capsid*, L1, ke lapisan basal. Ketika virus telah memasuki sel, pembongkaran partikel HPV terjadi dalam vesikel sitoplasma, diikuti dengan penghantaran DNA virus ke nukleus yang dimediasi oleh L2 (Saavedra *et. al.*, 2012). HPV selanjutnya menginduksi karsinogenesis dengan mengintegrasikan genome HPV pada kromosom inang. Integrasi genome HPV terjadi pada daerah yang rawan pada genome inang (Munger *et. al.*, 2004). Setelah infeksi, genome HPV akan terbentuk sebagai elemen ekstrakromosom



yang secara autonomik bereplikasi dan mulai mengekspresikan gen E6 dan E7 (Saavedra *et. al*,2012).



**Gambar 2.2. Mekanisme Protein E6 dan E7 Dalam Induksi Onkogenesis (Pearson Education, 2009 )**

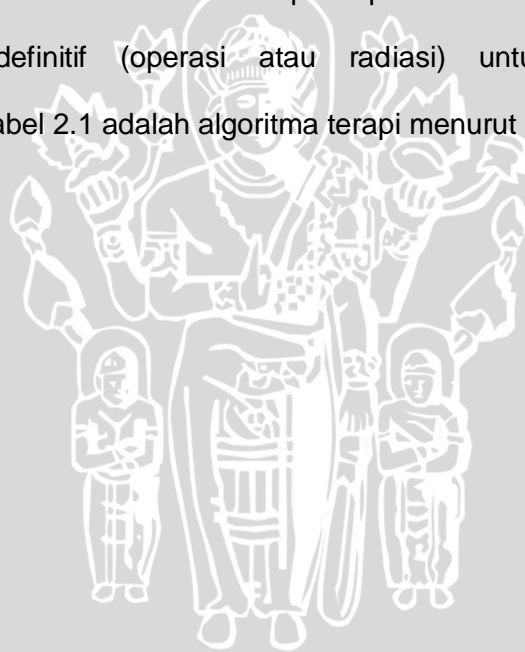
Protein E6 dan E7 yang dihasilkan dapat mengganggu regulasi *cyclin*, CDK, dan CDK-inhibitor (gambar 2.2). Hal tersebut berakibat pada disregulasi siklus sel dan jalur apoptosis. Protein apoptosis yang penting, seperti p53 dan Rb, dapat kehilangan fungsinya (Lax *et. al.*, 2011). Protein Rb adalah protein yang berfungsi pada inhibisi siklus sel dan protein p53 adalah protein yang meregulasi penghambatan pembelahan sel dan menginduksi sel normal untuk melakukan apoptosis (Koda *et. al.*, 2009). Protein E6 akan berikatan dengan p53, menghasilkan instabilitas kromosom, mengaktifkan telomerasi, menghambat apoptosis, dan berujung pada *cellular immortalization*. Protein E7 akan berikatan dengan pRb, menginaktifkan Rb *protein-related pocket proteins*, mengaktifasi *cyclin*, menghambat *CDK inhibitor*, dan berujung pada *cellular immortalization*.



Protein E7 bersifat antiapoptosis dan kedua protein tersebut menyebabkan terbentuknya malignansi pada epitel serviks (Barakat *et. al.*, 2009). Dengan demikian protein E6 dan E7 dapat menghambat inhibisi pertumbuhan sel yang berakibat pada proliferasi terus menerus pada sel epitel serviks yang berujung pada kanker serviks (Lax *et. al.*, 2011).

### 2.1.6 Terapi Kanker Serviks

Algoritma terapi kanker serviks menurut FIGO didasarkan pada stadiumnya. Secara umum, terapi standar kanker serviks stadium awal yaitu IA, IB, IB2, IIA, IIA2 adalah dengan pembedahan. Sedangkan untuk stadium lanjut (IIB-V) adalah dengan radiasi. Kemoterapi dapat diberikan sebelum atau sesudah tindakan definitif (operasi atau radiasi) untuk meningkatkan keberhasilan terapi. Tabel 2.1 adalah algoritma terapi menurut FIGO (2003).



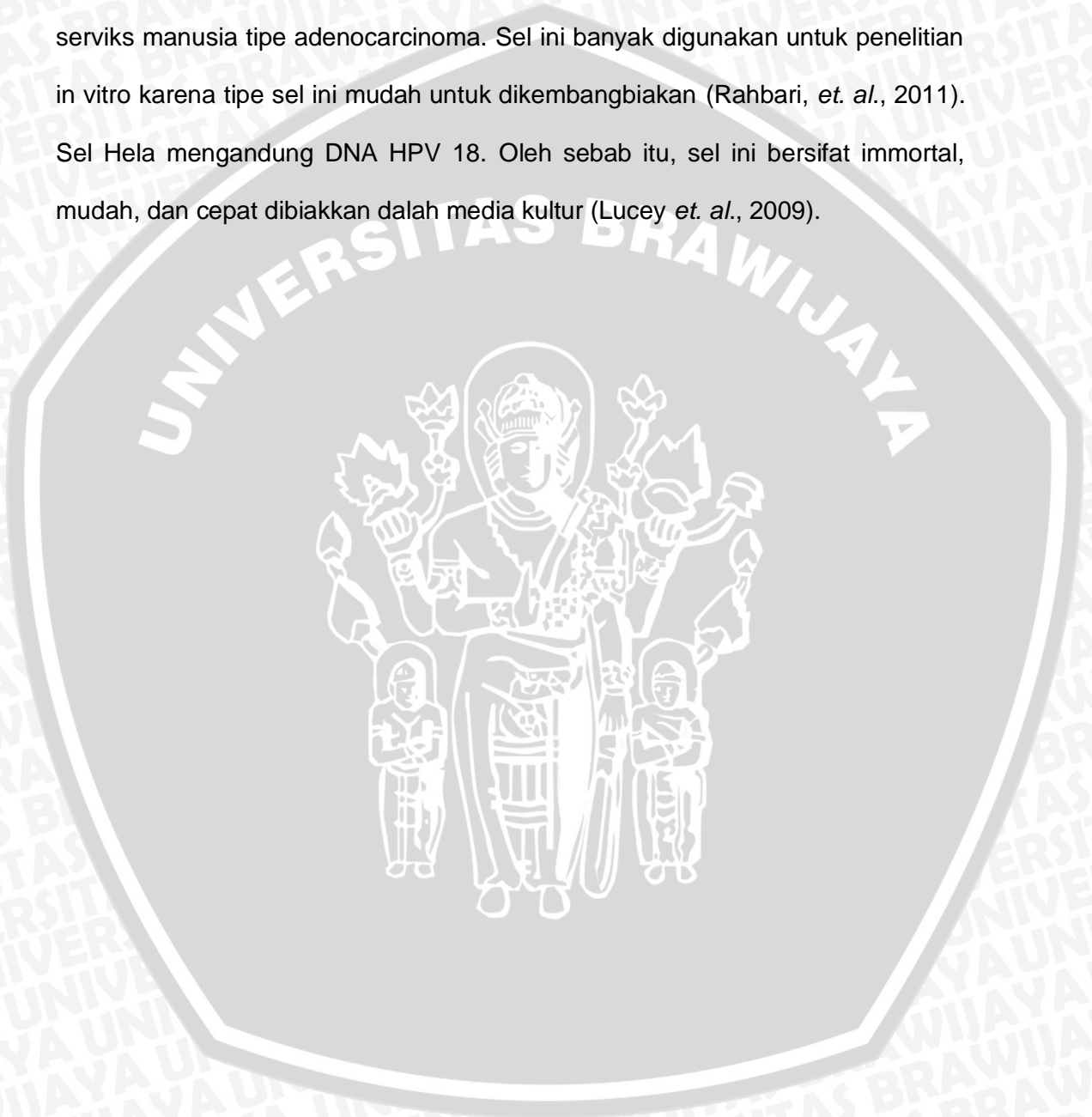
**Tabel 2.1 Pedoman Terapi Kanker Serviks Berdasarkan FIGO (FIGO,2003)**

Stage	Terapi Standar	Pertimbangan khusus
IA1	Simpel histerektomi	
IA2	Simpel atau radikal histerektomi dan bilateral pelvis limphadenektomi	
IB1	Radikal histerektomi dan bilateral pelvis limphadenektomi	
IB2	kemoradiasi atau radikal histerektomi dan bilateral pelvis limphadenektomi	Kemoterapi neoadjuvant
IIA 1 atau 2	kemoradiasi atau radikal histerektomi dan bilateral pelvis limphadenektomi	Kemoterapi neoadjuvant
IIB	kemoradiasi atau radikal histerektomi dan bilateral pelvis limphadenektomi	Kemoterapi neoadjuvant
IIIA	Kemoradiasi atau radioterapi	
IIIB	Kemoradiasi atau radioterapi	
IVA	Kemoradiasi atau radioterapi	
IVB	Radioterapi paliatif atau kemoterapi	

Selain terapi farmakologi, tindakan pencegahan kanker serviks dapat dilakukan dengan pemberian vaksin HPV. Pada tahun 2006, FDA (*Food and Drug Administration*) telah menerima vaksin HPV sebagai profilaksis (Arney *et. al.*, 2010). Vaksin HPV berisi sebagian partikel protein virus. Vaksin Gardasil (Merck) adalah vaksin pertama yang disetujui oleh FDA. Vaksin ini diberikan dalam tiga suntikan selama 6 bulan dan dapat melindungi wanita dari kanker akibat infeksi HPV tipe 6, 11, 16, dan 18 (Arney *et. al.*, 2010). Vaksin diindikasikan untuk wanita berumur sembilan sampai dua puluh enam tahun (Arney *et. al.*, 2010). Vaksin kedua yang disetujui oleh FDA adalah Cervarix, yang ditujukan untuk mencegah kanker akibat HPV tipe 16 dan 18.

## 2.2 Sel HeLa

Sel HeLa pertama kali ditemukan pada tahun 1951 oleh George Gey. Nama HeLa didapatkan dari nama pasien yang mendonasikan sel nya, yaitu Henrietta Lacks. Sel HeLa adalah kultur sel yang didapatkan dari sel kanker serviks manusia tipe adenocarcinoma. Sel ini banyak digunakan untuk penelitian in vitro karena tipe sel ini mudah untuk dikembangbiakan (Rahbari, *et. al.*, 2011). Sel Hela mengandung DNA HPV 18. Oleh sebab itu, sel ini bersifat immortal, mudah, dan cepat dibiakkan dalam media kultur (Lucey *et. al.*, 2009).





## 2.3 *Alpinia galanga*

### 2.3.1 Morfologi dan Taxonomi

*Alpinia galanga* (*A. galanga*) atau lengkuas adalah tanaman dari famili *Zingiberaceae*. Gambar 2.2 adalah penampakan morfologi dari tanaman *A. galanga*. Berikut ini adalah taxonomi dari *A. galanga* (Verma *et. al.*, 2011) :



Gambar 2.3. *Alpinia galanga* (Samart, 2007)

Kingdom	: Plantae
Order	: Zingiberales
Family	: Zingiberaceae
Subfamily	: Alpinioideae
Tribe	: Alpinieae
Genus	: <i>Alpinia</i>
Species	: <i>A. galanga</i>

*A. galanga* adalah tanaman tahunan yang mempunyai batang semu. Dapat tumbuh hingga mencapai ketinggian satu hingga tiga meter. Batang muda keluar sebagai tunas dari pangkal batang yang telah tua. Daun tanaman ini berbentuk lanset, bundar memanjang, ujung tajam, dan berambut sangat halus atau kadang-kadang tidak berambut. Urat daun menyirip sejajar, panjang 24 cm sampai 47 cm. Bunga *A. galanga* terbentuk di ujung batang, berbentuk tandan, tegak, gagang panjang, ramping. Rimpang menjalar, berdaging, berkulit mengkilap warna merah atau kuning pucat, berserat kasar, berbau harum dan rasa pedas. Terdapat beberapa varietas yang ditanam dan yang tumbuh liar. Lengkuas putih dengan bagian tanaman yang lebih besar daripada varietas yang lain. Lengkuas merah mempunyai rimpang berwarna merah, rumpunnya lebih kecil daripada lengkuas putih. Tanaman ini tumbuh di seluruh Indonesia, pada ketinggian tempat sampai 1200 m di atas permukaan laut (Materia Medika Indonesia II, 1978).

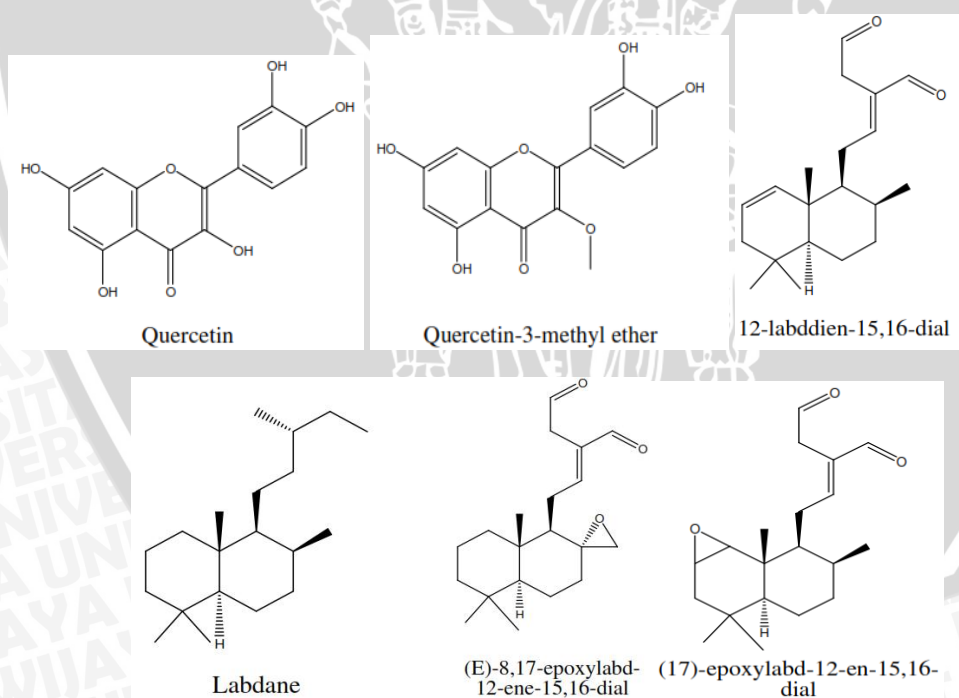
Rimpang paling baik dipanen pada umur 2,5 – 4 bulan, sehingga tidak terlalu tua. Rimpang yang terlalu tua akan menghasilkan banyak serat. Rimpang lengkuas mengandung minyak atsiri tidak kurang dari 0,5% v/b. Ciri organoleptik dari rimpang lengkuas adalah mempunyai bau aromatik, rasa pedas, panjang 4-6 cm, tebal 1 – 2 cm, kadang bercabang, ujung bengkok, warna permukaan coklat kemerahan, parut daun jelas, , berkas patahan berserat pendek, berbutir-butir kasar, warna coklat (Materia Medika Indonesia II, 1978).

Pada studi di Kerala, India tahun 1995-1999, ditemukan bahwa waktu paling baik untuk memanen *A. galanga* adalah saat tanaman berumur 42 bulan. Pada waktu tersebut akan didapatkan ukuran rimpang yang maximum dan jumlah minyak yang baik (Verma *et. al.*, 2011).



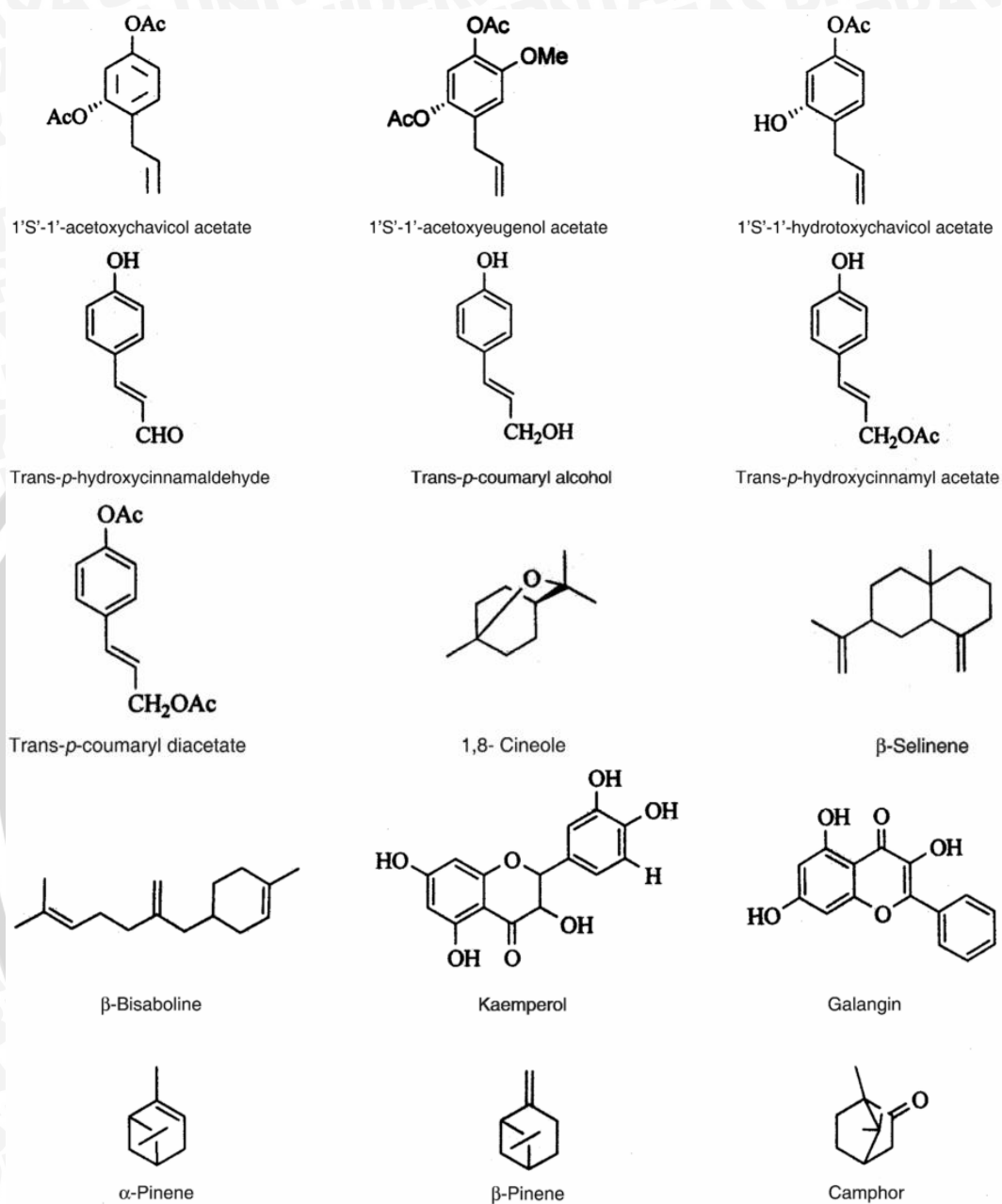
### 2.3.2 Kandungan Fitokimia dan Aktivitas Farmakologi

Rimpang *A. galanga* mempunyai tiga komponen senyawa utama, yaitu flavonoid, glikosida, dan diarylheptanoids (Samart, 2007). Senyawa yang berhasil diisolasi dari rimpangnya adalah galangoisoflavonoid,  $\beta$ -sitosterol diglucosyl caprate, methyleugenol, p-cumaryl diacetat, 1'-acetoxyeugenol acetate, trans-p-acetocynnamyl alcohol, p-hydroxybenzaldehyde, p-hydroxycinnamaldehyde, galangin, galanganol B. Senyawa yang paling banyak ditemukan pada rimpang adalah acetoxychavicol acetat (ACA) dan hydroxychavicol acetate (HCA) (Kaushik *et. al.*, 2011). Beberapa struktur kimia dari senyawa yang berhasil diisolasi dari *A. galanga* dapat dilihat pada gambar 2.4 (Verma *et. al.*, 2011; Chudiwal *et. al.*, 2010).



Gambar 2.4(a). Senyawa dan Struktur Kimia yang Terkandung dalam *Alpinia galanga* (Verma *et. al.*, 2011; Chudiwal *et. al.*, 2010).





**Gambar 2.4(b).** Senyawa dan Struktur Kimia yang Terkandung dalam *Alpinia galanga* (Verma *et. al.*, 2011; Chudiwal *et. al.*, 2010).

Dalam penggunaan secara tradisional di Ayurveda, rimpang *A. galanga* digunakan untuk meningkatkan nafsu makan, mengatasi bronchitis, dan penyakit jantung. Pada pengobatan tradisional Unani, rimpang *A. galanga* digunakan

sebagai stomakik, aprosidiak, tonik, diuretik, ekspektorant, karminatif, pereda sakit kepala, nyeri rematik, sakit tenggorokan, nyeri dada, diabetes, rasa terbakar pada liver, dan penyakit ginjal (Chudiwal *et. al.*, 2010).

*A. galanga* diketahui mempunyai aktivitas antimikroba pada penelitian yang dilakukan oleh Elsamma Thomas Shanmugam, J. & Rafi, M. M. (1996). *A. galanga* menunjukkan potensi sebagai antimikroba pada *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumonia*. Selain mempunyai aktivitas antimikroba, *Alpinia galanga* juga mempunyai aktivitas antiinflamsi. Pada penelitian Matsuda *et. al.* (2003), ekstrak 80% *aqueous acetone* dari rimpang *A. galanga* menghambat rilis dari beta-hexosaminisade, yaitu sebuah marker *antigen-IgE-Mediated degranulation* pada sel RBL-2H3. Lebih jauh lagi, pada penelitian Ye Ying Li BaoAn *et. al.* (2006), dilaporkan bahwa *A. galanga* mempunyai efektivitas anti-HIV dengan menghambat *Reverse Transport* pada replikasi HIV tipe 1.

Aktivitas farmakologi lainnya yang dimiliki oleh *A. galanga* adalah sebagai antidiabetik. Akthar *et. al.* (2002) menyebutkan bahwa ekstrak methanol dan ekstrak air rimpang *A. galanga* dapat secara signifikan menurunkan kadar gula darah. *A. galanga* juga telah terbukti mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Kubota *et. al.* (2001) menyebutkan bahwa aktivitas antioksidan dari *Alpinia galanga* dimiliki oleh senyawa 1'-acetoxychavicol acetate yang terkandung di dalamnya.

Penelitian menunjukkan bahwa ekstrak alkoholik dari rimpang *A. galanga* aman digunakan pada manusia hingga 2000 mg/ kg (Kaushik *et. al.*, 2013). Penggunaan dosis tiga kali sehari antara 50 mg, 100 mg, atau 200 mg/kg disarankan untuk penggunaan farmakologi (Kaushik *et. al.*, 2013). Sediaan ekstrak *A. galanga* juga telah diproduksi oleh industri kecil dan industri obat

tradisional Indonesia dalam bentuk bubuk, yang terdaftar pada BPOM dengan nomor registrasi MD 2555631024017 (BPOM, 2013). Sedangkan di negara-negara maju, *A. galanga* telah diproduksi dalam skala lebih besar sebagai suplemen makanan. Industri yang memproduksi suplemen dengan bahan *A. galanga* salah satunya adalah *United State Nature Sunshine* dalam bentuk kapsul (Anonymous.,2013) Pada produk tersebut *A. galanga* dikombinasikan dengan bahan alam yang lain seperti *Glycyrrhiza glabra* dan digunakan untuk pengobatan tradisional untuk saluran nafas.

### 2.3.3 Aktivitas Farmakologi *Alpinia galanga* Sebagai Antikanker

Ekstrak *A. galanga* telah terbukti mempunyai aktivitas penghambatan proliferasi pada sel HeLa (Rusmarilin, 2003). Penelitian yang dilakukan Hartono (2009) juga telah membuktikan bahwa ekstrak *A. galanga* mempunyai aktivitas penghambatan proliferasi serta peningkatan apoptosis pada adenokarsinoma mamma mencit C3H. Ekstrak *A. galanga* pada dosis 300 µg/ml dapat menyebabkan apoptosis pada sel kultur p-53 inactive fibroblast, sel tumor payudara, serta adenocarcinoma paru (Kaushik *et. al.*, 2011).

Salah satu kandungan dari ekstrak *A. galanga* yang mempunyai potensi sebagai pemicu apoptosis adalah ACA (acetoxychavicol acetat). ACA terbukti berperan dalam aktivitas dalam meningkatkan apoptosis sel kanker (Kaushik *et.al.*, 2011; Awang *et. al.*, 2010). ACA diketahui sebagai komponen utama yang memiliki aktivitas sitotoksik yang signifikan setelah 48 jam paparan pada kultur sel kanker paru (COR L23 cell) dan kultur sel kanker payudara (MCF7 cells) dengan IC<sub>50</sub> 7.8 µM dan 23.9 µM (Chudiwal *et. al.*, 2010). Penelitian yang dilakukan oleh Murakami *et. al.* (2005) menyebutkan bahwa 1'-ACA mempunyai aktivitas antikanker dengan mekanisme penghambatan COX-2 dan pada



penelitian Moffat *et. al.* (2000) ACA diketahui menginduksi apoptosis melalui metabolisme polyamine dan aktivasi caspase 3 pada tumor sel *Ehrlich ascites*.

Pada penelitian lebih lanjut, diketahui bahwa rimpang *A. galanga* mempunyai efektivitas proapoptosis pada kultur sel kanker Human Leukemic HL60 dan U937. Mekanisme induksi kematian sel ini diperantarai oleh senyawa aktif 4-Hydroxycinnamaldehyde (4-HCA) yang menyebabkan apoptosis melalui jalur stress mitokondria dan stress retikulum endoplasma (Banjerdpongchai *et. al.*, 2011). Isolasi senyawa HCA didapatkan secara perkolasi dari pelarut hexane dan acetone (Banjerdpongchai *et. al.*, 2011). 4-HCA dapat menginduksi apoptosis melalui jalur mitokondria dengan peningkatan ekspresi Bax, penurunan Bcl-2 dan Bcl-xL yang menyebabkan peningkatan level ROS, rilisnya cytochrome c, peningkatan kadar Ca dalam mitokondria dan sitosol, serta aktivasi dari caspase 3 (Banjerdpongchai *et. al.*, 2011).

Selain ACA dan 4-HCA, senyawa lain dalam *A. galanga* yang mempunyai aktivitas antikanker adalah galangin. Galangin (3,5,7-trihydroxyflavone) adalah flavonoid golongan flavonol (Murray *et. al.*, 2006), yang dapat menekan respon beta-catenin, yaitu suatu senyawa yang dapat meningkatkan pertumbuhan pada sel kanker kolon dan kanker liver secara abnormal (Patel *et. al.*, 2012). Galangin terbukti dapat menurunkan regulasi beta-catenin intraselular pada sel kanker dengan menginaktivasi mutasi adenomatous polyposis coli (Patel *et. al.*, 2012). Galangin juga memperlihatkan aktivitas penghambatan fase G0-G1 ke fase S pada siklus sel dan menurunkan kadar pRb, cdk4, cdk1, dan cyclin B (Patel *et. al.*, 2012; Murray *et. al.*, 2006). Galangin juga menurunkan kadar Bcl-2 dan meningkatkan aktivitas apoptosis pada sel Bcr-Abl (Patel *et. al.*, 2012). Sebanyak 10% galangin dapat dihasilkan dari ekstraksi dengan ethanol pada *A. galanga* (Murray *et. al.*, 2006).

Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan tersebut, maka mekanisme induksi apoptosis oleh *A. galanga* adalah melalui jalur mitokondria dengan regulasi senyawa pro-apoptosis dari kelompok Bcl-2 dan aktivasi caspase.

#### 2.4 Apoptosis

Apoptosis adalah proses kematian sel yang terprogram (Zhang et. al., 2011). Apoptosis ditandai dengan beberapa perubahan morfologi pada sel, misalnya pada nukleus kromatin berkondensasi menjadi lebih kompak dan terlihat menjadi berbentuk globular (Li Bai et. al. 2003). Saat kromatin berkondensasi, maka kromatin akan berkumpul dan menjauh dari membran nukleus. Penampakan khas lainnya pada sel yang mengalami apoptosis adalah pengkerutan sel dan terbentuknya *apoptosis-bodies*. Pada *apoptosis-bodies* terlihat fragmentasi nukleus dan organel selular lain, termasuk mitokondria (Li Bai et. al. 2003).

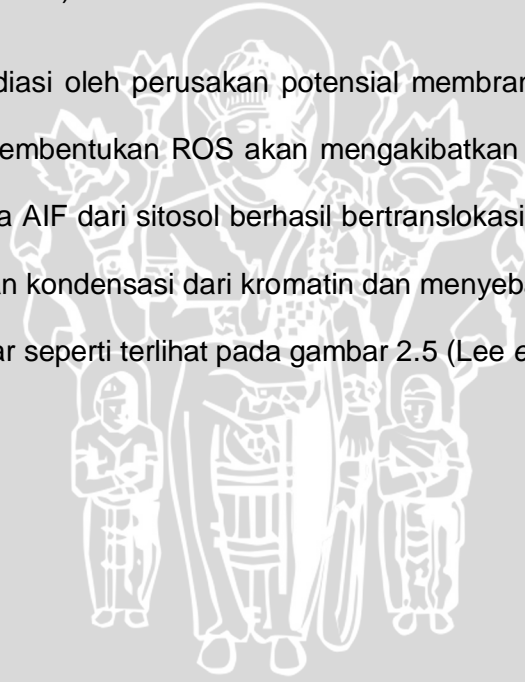
Aktivasi apoptosis dapat diinduksi secara ekstrinsik dan intrinsik. Aktivasi apoptosis melalui jalur ekstrinsik melibatkan *receptor cell death* yang memicu caspase 8 terprogram (Zhang et. al., 2011). Aktivasi apoptosis dari jalur intrinsik adalah aktivasi apoptosis yang melalui depolarisasi mitokondrial, yang nantinya akan menginduksi cytochrome C (Zhang et. al., 2011). Induksi apoptosis dengan agen kemoterapi seperti agen pengalkilasi, inhibitor topoisomerase, dan agen antimetabolit diperantarai oleh *mitochondrial apoptotic pathway*. Dimana pada jalur ini agen-agen tersebut akan meningkatkan permeabilitas membran luar mitokondria dan menyebabkan rilis senyawa-senyawa yang akan menginduksi apoptosis (Lee et. al., 2006).

Peristiwa apoptosis jalur mitokondria dibagi menjadi dua, yaitu jalur caspase-dependen apoptosis dan caspase-independen apoptosis. Mekanisme

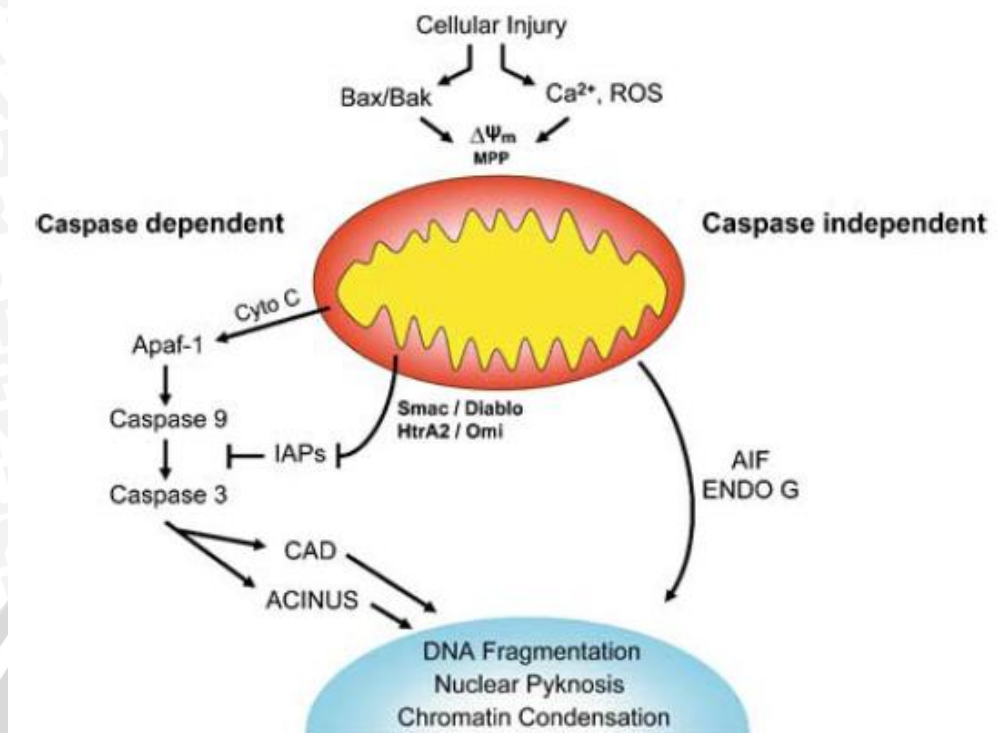


utama proses apoptosis jalur mitokondria adalah terjadinya peningkatan permeabilitas membran luar mitokondria. Hal tersebut akan menyebabkan rilisnya komponen apoptosis seperti cytochrome c, *apoptosis inducing factor* (AIF), *second-mitochondrial-derived activator of caspase*, endonuclease G, dan HtrA2. Rilisnya protein apoptosis seperti cytochrome c akan memicu aktivasi dari caspase dan memicu fragmentasi DNA sehingga akan menyebabkan kematian sel. Mekanisme tersebut disebut dengan caspase dependen apoptosis. Sedangkan rilis AIF dan Endonuclease G akan memicu apoptosis tanpa perantara caspase, sehingga mekanisme ini disebut caspase-independen apoptosis (Lee *et. al.*, 2006).

Rilis AIF dimediasi oleh kerusakan potensial membran mitokondria oleh pembentukan ROS. Pembentukan ROS akan mengakibatkan rilis AIF ke sitosol (Lee *et. al.*, 2006). Jika AIF dari sitosol berhasil bertranslokasi ke nukleus, maka AIF akan menyebabkan kondensasi dari kromatin dan menyebabkan fragmentasi DNA dalam skala besar seperti terlihat pada gambar 2.5 (Lee *et. al.*, 2006).







**Gambar 2.5. Mekanisme Caspase-dependen dan Caspase-independen Apoptosis (Lee *et.al.*, 2006)**

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *Reactive Oxygen Species* (ROS) adalah salah satu mediator yang memicu kerusakan membran mitokondria yang nantinya akan merilis AIF. Beberapa senyawa tanaman seperti evodamine dan curcumin mempunyai aktivitas antikanker dengan induksi pembentukan ROS mitokondria dan memicu caspase-independen apoptosis (Lee *et. al.*, 2006; Ponngprakhananon *et. al.*, 2010). Kandungan 4'HCA dalam *Alpinia galanga* juga terbukti mempunyai efek induksi pembentukan ROS pada sel kanker HL-60 dan U397 (Banjerdpongchai *et. al.*, 2011). Induksi pembentukan ROS akan menurunkan potensial membran mitokondria dan meningkatkan permeabilitas membran mitokondria.

## 2.5 Apoptosis Inducing Factor

Tantangan utama dalam terapi kanker adalah banyaknya tumor sel yang bermutasi yang dapat mempengaruhi gen apoptosis seperti p53, protein Bcl, atau gen lain yang mempengaruhi signaling caspase. Hal ini mengakibatkan pemberian terapi dengan kemoterapi tidak lagi efektif, sehingga diperlukan strategi lain untuk menginduksi apoptosis pada sel kanker. Jalur mekanisme apoptosis yang lain, yaitu mekanisme caspase-independen apoptosis menjadi salah satu alternatif untuk membunuh sel kanker. Mekanisme caspase-independen apoptosis telah memperlihatkan pengaruh yang penting dalam memediasi proses kematian sel (Cregan *et. al.* 2004).

Pada jalur mekanisme caspase-independen apoptosis, mitokondria akan merilis faktor-faktor yang terlibat dalam proses apoptosis, salah satunya dengan *apoptosis-inducing factor* (AIF). AIF adalah faktor penting dalam regulasi caspase independen apoptosis. Ketika AIF dirilis oleh mitokondria, maka AIF berperan sebagai eksekutor aktif layaknya cytochrome c. Pada sel HeLa rilisnya AIF ini akan mengakibatkan kondensasi kromatin perifer dan fragmentasi DNA (Cregan *et. al.* 2004).

AIF adalah flavoprotein dengan ukuran 57kDa yang dalam keadaan normal berada dalam ruang intramembran mitokondria (Antonson, 2003). Selama apoptosis, AIF akan dirilis ke sitosol. Di dalam sitosol, AIF kemudian akan bertranslokasi ke dalam nukleus karena perbedaan elektrostatis. Di dalam nukleus, kehadiran AIF ini akan menginduksi fragmentasi DNA dalam skala besar (50 kbp) dan menginduksi kondensasi kromatin. Namun, mekanisme AIF dalam induksi fragmentasi DNA dan kondensasi kromatin masih belum jelas hingga saat ini (Antonson, 2003). Namun dimungkinkan bahwa mekanisme AIF

adalah dengan berikatan pada DNA dan bertindak menyerupai nuclease, meningkatkan kepekaan DNA terhadap nuclease, atau mengaktifkan nuclease (Cande *et. al.*, 2002).

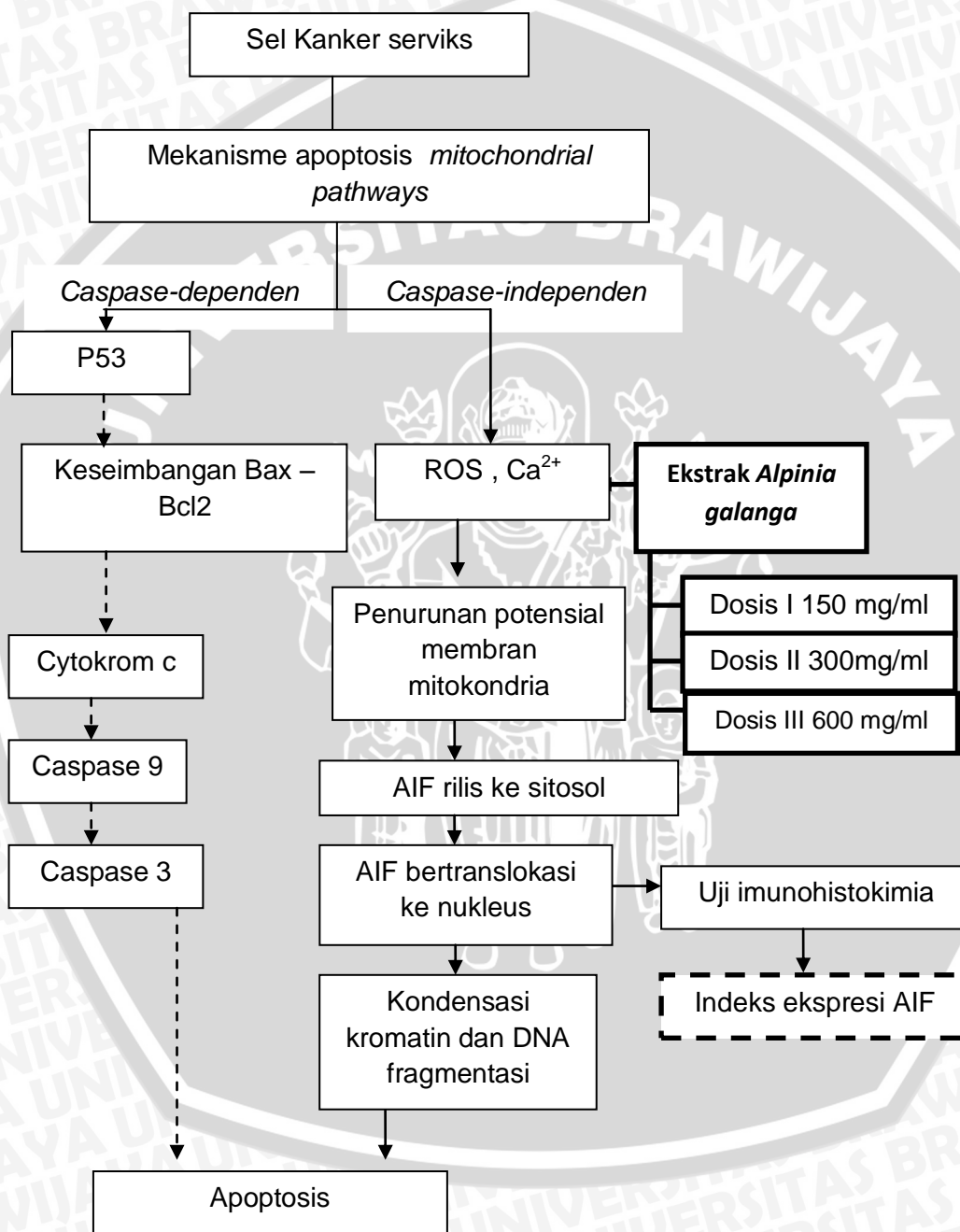









BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



**Keterangan :**

Variabel bebas	: 	Alur yang tidak diteliti	: 
Variabel terikat	: 		
Alur yang akan diteliti	: 	Alur Induksi	: 

Apoptosis melalui jalur mitokondria dapat melalui jalur caspase independen dan caspase dependen. Apoptosis yang akan diamati adalah dari jalur caspase independen. Apoptosis dari sel kanker serviks dapat diinduksi dengan peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Tiga dosis ekstrak dari *Alpinia galanga* dipaparkan pada sel dan diharapkan dapat menginduksi peningkatan ROS, sehingga dapat menurunkan potensial membran mitokondria. Pada proses tersebut akan terjadi rilis AIF ke sitosol, yang kemudian akan bertranslokasi ke nukleus, menyebabkan fragmentasi DNA dan kondensasi kromatin. Peningkatan ekspresi AIF pada inti akan diamati dengan metode imunohistotokimia dan dilihat ekspresi AIF pada sel. Variabel bebas adalah dosis ekstrak *Alpinia galanga*. Variabel terikat yang akan diukur adalah Indeks ekspresi AIF.

**3.2 Hipotesis**

Ekstrak ethanol rimpang lengkuas (*A. galanga*) dapat meningkatkan ekspresi AIF pada inti sel HeLa.

## BAB 4

## METODOLOGI PENELITIAN

## 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain studi *True Experimental* dengan pendekatan *Randomized Group Post Test Only Design*. Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* menggunakan sel HeLa. Pemilihan subjek dilakukan dengan metode *simple random sampling*. Sel HeLa akan diberikan 4 perlakuan, 1 grup kontrol dan 3 grup perlakuan. Tiga grup perlakuan akan dipapar dengan ekstrak lengkuas dengan dosis 150 µg/ml, 300 µg/ml, dan 600 µg/ml selama 24 jam. Selanjutnya, translokasi AIF ke nukleus diamati dari ekspresi AIF pada nukleus dengan metode imunohistokimia. Sel yang mengekspresikan AIF akan dihitung indeks atau persentasenya. Selanjutnya, data yang diperoleh akan dianalisis dengan ANOVA.

4.1.1 Rancangan Sampel Acak Sederhana (*Simple Random Sampling*)

Setiap bagian dari populasi memiliki kesempatan untuk diseleksi sebagai sampel, maka pengambilan sampel dapat dilakukan secara acak sederhana. Teknik pengambilan sampel secara acak sederhana dengan menggunakan angka acak (*random number*). Dengan menggunakan *random number*, masing-masing subjek dimasukkan ke dalam empat kelompok yang terdiri dari:

Kelompok I : sel HeLa yang tidak diberikan ekstrak rimpang lengkuas (*A. galanga*) sebagai kontrol negatif.

Kelompok II : sel HeLa yang diberikan ekstrak rimpang lengkuas (*A. galanga*) sebagai kelompok perlakuan dosis I (150µg/ml).

Kelompok III : sel HeLa yang diberikan ekstrak rimpang lengkuas (*A. galanga*) sebagai kelompok perlakuan dosis II (300µg/ml).



Kelompok IV : sel HeLa yang diberikan ekstrak rimpang lengkuas (*A. galanga*) sebagai kelompok perlakuan dosis III (600 $\mu$ g/ml).

## 4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel Hela, *cell line* kanker serviks yang dikultur. Sel HeLa diperoleh dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Brawijaya, Malang. Jumlah sampel yang digunakan, dihitung menurut rumus Federer :

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

dimana : t = banyaknya kelompok perlakuan

r = jumlahnya replikasi / pengulangan

Pada penelitian ini diberikan 4 perlakuan, sehingga t = 4 dan jumlah replikasi/pengulangan adalah :

$$(4-1)(r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15 : 3$$

$$r \geq 5 + 1$$

$$r \geq 6$$

Dari perhitungan diatas, didapatkan bahwa jumlah replikasi untuk setiap perlakuan adalah 6, sehingga total sampel yang diperlukan adalah 4 x 6, yaitu 24 sampel. Replikasi pertama akan digunakan sebagai kontrol pada proses imunohistokimia (tidak mendapat antibodi primer).

## 4.3 Variabel

### a. Variabel bebas

Variabel bebas adalah dosis ekstrak rimpang lengkuas (*A. galanga*). Dosis yang diberikan berdasarkan deret ukur, yaitu deret yang

perubahan sukunya berdasarkan perkalian terhadap sebuah bilangan tertentu ( $2n$ ) untuk mendapatkan dosis ekstrak rimpang lengkuas (*A. galanga*) yang akan dipaparkan pada sel HeLa. Dosis yang terbukti mempunyai efektifitas menginduksi apoptosis adalah  $300\mu\text{g/ml}$  pada kultur sel adenocarcinoma paru dan kanker payudara (Khausik *et.al*, 2011). maka peneliti menetapkan dosis yang digunakan adalah  $150\mu\text{g/ml}$ ,  $300\mu\text{g/ml}$ ,  $600\mu\text{g/ml}$ , sesuai dengan penghitungan deret ukur.

b. Variabel terikat

- Ekspresi AIF sel HeLa

c. Variabel konstan

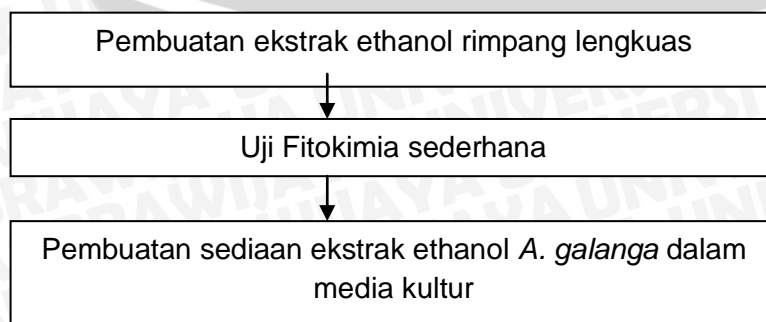
- Lama pemaparan sel HeLa dengan ekstrak, yaitu selama 24 jam.
- Medium tumbuh, yaitu RPMI Complete, dengan 10% penisilin-streptomisin dan 1% FBS.
- Protokol imunohistokimia.

#### 4.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan Mei – Juni 2013, di Laboratorium Biomedik, Laboratorium Bahan Alam, dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Malang.

#### 4.5 Alur Penelitian

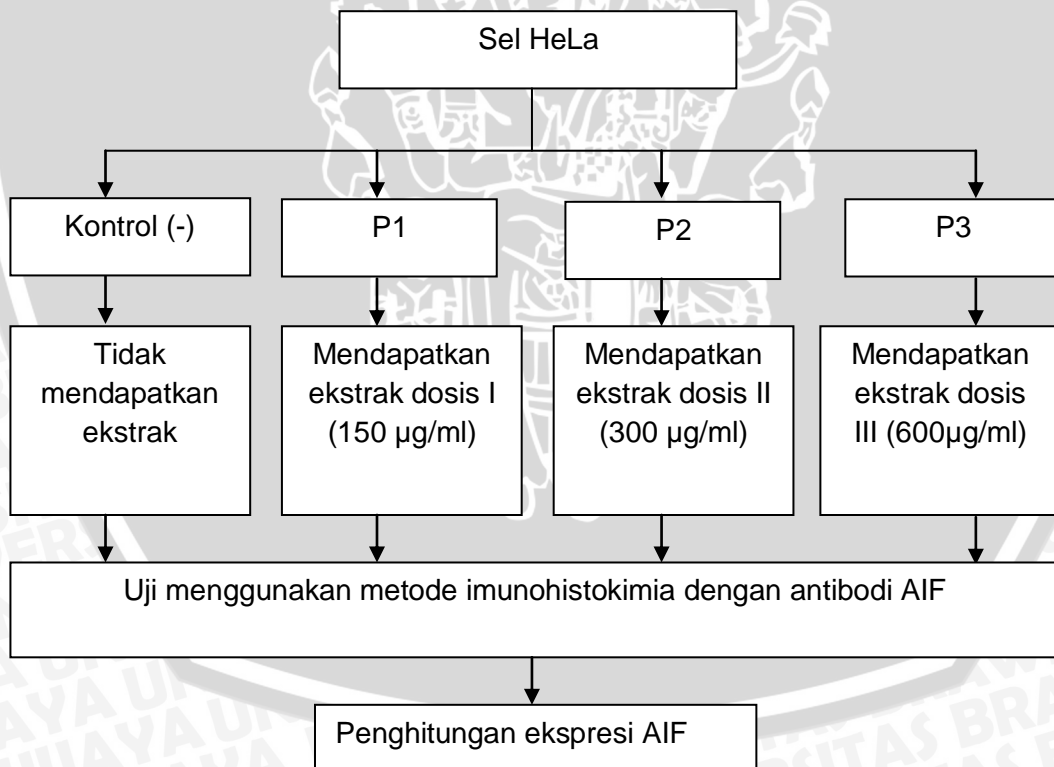
##### 4.5.1 Alur Penyiapan Ekstrak *Alpinia galanga*



#### 4.5.2 Alur Penyiapan Kultur sel HeLa



#### 4.5.3 Skema Pemberian Perlakuan dan Kontrol





Keterangan :

- Kontrol negatif : Enam *wells* berisi kultur sel HeLa saja tanpa dipapar ekstrak rimpang lengkuas (*A. galanga*) sebagai kontrol positif.
- P1 : Enam *wells* yang berisi sel HeLa yang diberi ekstrak ethanol rimpang lengkuas (*A. galanga*) dengan konsentrasi I (150 µg/ml).
- P2 : Enam *wells* yang berisi sel HeLa yang diberi ekstrak ethanol rimpang lengkuas (*A. galanga*) dengan konsentrasi II (300 µg/ml).
- P3 : Enam *wells* yang berisi sel HeLa yang diberi ekstrak ethanol rimpang lengkuas (*A. galanga*) dengan konsentrasi III (600 µg/ml).

Peta 24 Well :

	1	2	3	4	5	6
A	K (-)	K (-)	K (-)	K (-)	K (-)	K (-)
B	P1	P1	P1	P1	P1	P1
C	P2	P2	P2	P2	P2	P2
D	P3	P3	P3	P3	P3	P3

#### 4.6 Alat dan Bahan

##### 4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak

Serbuk rimpang *A. galanga* didapatkan dari Balai Materia Medika Batu.

Bahan lain yang digunakan adalah ethanol 70% yang didapatkan dari Laboratorium Bahan Alam, Program Studi Farmasi, Universitas Brawijaya

Alat yang digunakan untuk ekstraksi adalah wadah maserat, *Rotary Evaporator*, botol kaca, kain flannel sebagai penyaring, bejana *stainless steel*, aluminium foil, timbangan digital, spatel, cawan porselen, gelas ukur 100 ml.

#### 4.6.2 Alat dan Bahan Uji Fitokimia Kualitatif

Bahan untuk uji fitokimia adalah kloroform-amoniak, asam sulfat 2 M, pereaksi Meyer, kloroform, asam sulfat pekat, HCl 2 N, serbuk magnesium, alkohol, FeCl<sub>3</sub> 1%. Semua bahan ini didapatkan dari Laboratorium Bahan Alam, Program Studi Farmasi, Universitas Brawijaya

Alat yang digunakan antara lain tabung reaksi, rak tabung, penjepit kayu, pipet tetes, batang pengaduk, kertas saring, *beaker glass*, api bunsen dan erlenmeyer.

#### 4.6.3 Alat dan Bahan Kultur Sel HeLa

Sel HeLa didapatkan dari LPPT Universitas Gajahmada, Jogjakarta. Bahan lainnya adalah Penisilin-streptomisin 1%, FBS (*Fetal bovine serum*) *qualified* 10%, RPMI, Tripsin-EDT, methanol dan PBS (*Phospate Buffer Saline*). Semua alat dan bahan didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Alat yang digunakan untuk kultur sel HeLa adalah *Laminar Air Flow* (LAF), incubator dan tabung gas CO<sub>2</sub>, mikropipet 1 ml, *plate 24 wells*, sentrifuse, Poly-L-Lysine cover slip, membran filter 0.2µm, dan 0,45 µm, tabung falcon, *disposable pipet*, bunsen, mikroskop inverter, *hemacytometer*

#### 4.6.4 Alat dan Bahan Imunohistokimia

Alat untuk imunohistokimia adalah *coverglass*, *object glass*, *micropippet*, *tip*, *tissue*, botol semprot, pipet tetes. Semua alat tersebut didapatkan dari

Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Proses pengambilan gambar sel menggunakan Mikroskop BX-53 di Laboratorium Biosains, Universitas Brawijaya.

Bahan yang digunakan adalah entelan, PBS, aquades, antibody AIF, Antibody sekunder (Biotin), HRP, DAB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Hematoxylin. Semua bahan didapatkan dari Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

#### 4.7.1 Prosedur Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi rimpang *A. galanga* dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut ethanol. Konstituen utama yang diharapkan mempunyai efektivitas antikanker yang akan ditarik dari serbuk *A. galanga* adalah ACA, HCA dan galangin. ACA dapat ditarik dengan pelarut ethanol dengan metode maserasi (Oonmetta, 2005). Galangin adalah senyawa flavonoid golongan flavonol dan dapat diekstraksi dengan ethanol (Murray *et. al.*, 2006). Diharapkan dengan ekstraksi menggunakan maserasi dengan ethanol 70% dapat menarik keluar ACA, HCA dan galangin. Langkah ekstraksi diambil dari Chan *et. al.* (2011) dengan menggunakan pelarut ethanol 70% dan terdapat beberapa penyesuaian:

1. Ditimbang sebanyak 150 gram serbuk *Alpinia galanga* dengan timbangan digital.
2. Diambil 750 ml ethanol 70% dengan gelas ukur.
3. Serbuk dimasukkan dalam toples kaca sambil dibasahkan dengan pelarut sedikit demi sedikit. Sisa pelarut kemudian dimasukkan.
4. Larutan diaduk menggunakan stirrer dengan kecepatan 120 rpm selama 1 jam sebanyak 3 kali dalam waktu yang berlainan (pada jam ke 1,3,23).



5. Larutan didiamkan selama 24 jam.
6. Larutan disaring dengan kain flannel dan diambil filtratnya. Filtrat disimpan.
7. Residu kemudian diremaserasi dengan 750 ml ethanol selama 24 jam dan disaring.
8. Filtrat yang terkumpul dimasukkan dalam *labu rotary evaporator*. *Rotary evaporator* di-*setting* dengan kecepatan putar 60 rpm dengan suhu 40<sup>0</sup> C.
9. Ekstrak di oven pada suhu 40<sup>0</sup> C selama satu malam agar lebih pekat dan tidak ada residu ethanol.
10. Dihasilkan ekstrak pekat *A. galanga*.

#### 4.7.2 Prosedur Uji Fitokimia Kualitatif Ekstrak

##### 1. Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan metode pengendapan. Sebanyak 30mg ekstrak diambil dan dilarutkan dengan HCL 2N. Selanjutnya dipanaskan selama 3 menit dan setelah dingin ditambahkan dengan beberapa tetes NaCl dan disaring. Filtrat ditambah dengan HCL dan ditambah pereaksi Meyer. Adanya alkaloid ditunjukkan dengan adanya endapan berwarna cream dan larutan menjadi keruh.

##### 2. Saponin

Uji saponin dilakukan dengan metode Forth. Saponin dapat dideteksi dengan uji busa. Sejumlah sampel dilarutkan dalam aquades dan dikocok keras selama 10 menit. Busa yang stabil selama 15 menit dan tidak hilang menunjukkan adanya saponin.

##### 3. Flavonoid

Uji flavonoid menggunakan metode Wilstater. Sejumlah sampel (30 mg) dilarutkan dalam pelarutnya yaitu ethanol sebanyak 3 ml. Selanjutnya larutan sampel ditambahkan dengan HCl p.a sebanyak 0,5 ml dan serbuk magnesium. Serbuk magnesium ditambahkan hingga terjadi perubahan warna. Selanjutnya ditambahkan air suling dan 1 ml butanol. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga (Flavon), merah pucat (Flavonol), merah tua (Flavonon), atau hijau sampai biru (glikosida).

#### 4. Tanin

Uji Tanin menggunakan uji Ferriklorida. Sejumlah sampel (30 mg) yang sudah dilarutkan dalam ethanol, ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  kemudian campuran dihomogenkan. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman pada larutan.

##### 4.7.3 Prosedur Pembuatan Sediaan ekstrak

Larutan stok dibuat dengan melarutkan 100 mg ekstrak dalam 10 ml *deionized water* sehingga didapatkan larutan stock dengan konsentrasi 10 mg/ml. Larutan stok ini akan diencerkan dengan media RPMI hingga didapatkan konsentrasi 150  $\mu\text{g/ml}$ , 300  $\mu\text{g/ml}$ , dan 600  $\mu\text{g/ml}$  sebanyak 500 $\mu\text{L}$ . Berikut adalah penghitungan pembuatan larutan sediaan ekstrak :

- a. Pembuatan larutan dengan konsentrasi 600  $\mu\text{g/ml}$

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

$$V_1 \times 10 \text{ mg/ml} = 500 \mu\text{L} \times 600 \mu\text{g/ml}$$

$$V_1 = 30 \mu\text{L}$$

Diperlukan 30  $\mu\text{L}$  larutan stock dalam 470  $\mu\text{L}$  media RPMI

- b. Pembuatan larutan dengan konsentrasi 450  $\mu\text{g/ml}$

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

$$V1 \times 10 \text{ mg/ml} = 500 \mu\text{L} \times 300 \mu\text{g/ml}$$

$$V1 = 15 \mu\text{L}$$

Diperlukan 15  $\mu\text{L}$  larutan stock dalam 485  $\mu\text{L}$  media RPMI

c. Pembuatan larutan dengan konsentrasi 150  $\mu\text{g/ml}$

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 10 \text{ mg/ml} = 500\mu\text{L} \times 150 \mu\text{g/ml}$$

$$V1 = 7.5 \mu\text{L}$$

Diperlukan 7.5  $\mu\text{L}$  larutan stock dalam 492.5  $\mu\text{L}$  media RPMI

#### 4.7.4 Prosedur Kultur Sel HeLa

##### 1. Aktivasi dan Pemiakan Sel HeLa (*Thawing cell*)

Proses *thawing cell* dilakukan dengan prosedur berikut :

- Vial Sel HeLa diambil dari tabung nitrogen cair.
- Vial dihangatkan dengan cara menggosok-gosokkan vial dengan kedua telapak tangan di suhu ruang, hingga larutan sel menjadi cair
- Disiapkan bahan-bahan untuk media sel berupa RPMI, Penicillin-streptomycin, dan FBS (*Fetal Bovine Serum*). Media dibuat dengan kadar Penicillin-streptomycin 1%, FBS 10%. Media yang telah dicampur ditandai dengan "*RPMI Complete*" dan difilter dengan membran ukuran 0.2 $\mu\text{m}$ .
- Setelah media dibuat, diambil  $\pm 10$  ml media dan tabung sentrifuse dan larutan sel HeLa yang telah cair dituangkan pada media dalam tabung sentrifuse, kemudian didispersikan.
- Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 900 rpm selama 10 menit untuk membersihkan sel dari larutan DMSO.



- f. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan pellet didispersikan lagi dengan 10 ml RPMI Complete untuk dilakukan sentrifugasi kedua dengan 900 rpm selama 10 menit.
- g. Supernatant dibuang, dan pellet didispersikan kembali dengan *RPMI complete*.
- h. Selanjutnya Sel HeLa yang terdispersi dalam media dituang dalam T-flashk dan ditambahkan media *RPMI Complete* hingga memenuhi dasar T-Flashk
- i. Dilakukan inkubasi dengan dalam inkubator dalam suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam.
- j. Setelah 24 jam dilakukan pengamatan viabilitasnya, jika sel mengalami pertumbuhan yang baik maka dapat dilakukan subkultur. Jika belum, maka media diganti dan dilakukan inkubasi kembali.

## 2. Subkultur Sel

Proses subkultur sel dilakukan dengan cara sebagai berikut :

- a. Media di dalam *T-flask* dibuang dan sel dicuci dengan PBS 15 mL sebanyak dua kali.
- b. Sel ditambahkan trypsin sebanyak 2 mL dan diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% selama 5 menit hingga sel terlepas.
- c. 1 mL RPMI dan 20% FBS berserum ditambahkan ke dalam T-flask. Campuran sel dimasukkan ke dalam falcon, lalu disentrifuge dengan kecepatan 1000 rpm selama 8 menit.
- d. Pelet diresuspensikan dengan RPMI *complete* 7 mL lalu dimasukkan ke dalam T-flask. Sebelum diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% suhu 37°C, sel dilihat dengan mikroskop. Selanjutnya, pembiakan sel

dilakukan dengan mengganti medium RPMI *complete* secara berkala sampai diperoleh kerapatan sel yang diinginkan.

### 3. Penghitungan Sel

Perhitungan sel menggunakan metode *hemacytometer*. Langkah perhitungan sel sebagai berikut:

1. *Chamber* dan *cover glass* dibersihkan dengan alkohol dan dikeringkan.
2. Hemacytometer ditutup dengan menggunakan *cover glass*.
3. Sel HeLa 0.1 ml diambil, diencerkan dalam 0,9 ml medium dan diletakkan dalam chamber.
4. Ditambahkan 10  $\mu$ l *tripan blue*.
5. *Chamber* ditempatkan di bawah mikroskop.
6. Diamati dan dihitung jumlah sel hidup.
7. Dihitung jumlah sel dari 4 lapang pandang (kamar A, B, C, D) menggunakan rumus dibawah ini :

$$\begin{aligned}
 \text{Jumlah sel} &= \frac{\Sigma \text{sel kamar A} + \Sigma \text{sel kamar B} + \Sigma \text{sel kamar C} + \Sigma \text{sel kamar D}}{4} \times 10^4 \\
 &= \frac{27+20+17+18}{4} \times 10^4 \times \text{faktor pengenceran} \\
 &= 2,05 \times 10^5 \text{ sel /ml} \times 10^1 \\
 &= 2,05 \times 10^6 \text{ sel /ml} \\
 &= 20.500 \text{ sel/}\mu\text{L}
 \end{aligned}$$

Jika akan dilakukan seeding 500,000 sel dalam setiap *wells*, maka dalam setiap

$$\text{wells diisi sebanyak : } \frac{500.000}{20.500} = 24,39 \mu\text{L}.$$

#### 4. Pemberian Perlakuan

1. Sel HeLa dalam T-flask ditambahkan  $\pm 10$ ml media.
2. Sel dipindahkan ke *wells* dengan perkiraan *seeding* 500.000 sel per *wells* dan diinkubasi 24 jam hingga sel menempel pada *cover slip*. Cover slip yang digunakan adalah cover slip yang dilapisi dengan Poly-L-Lisine.
3. Setelah diinkubasi 24 jam, media diambil dan diganti dengan media mengandung ekstrak pada kelompok P1, P2, P3.
4. Sel diinkubasi kembali selama 24 jam.
5. Setelah diinkubasi selama 24 jam, media dalam *wells* dibuang.
6. Sel dicuci dengan PBS.
7. Sel difiksasi dengan methanol, disk ditempel pada cover glass dengan entelan dan kemudian dilakukan proses imunohistokimia.

##### 4.7.5 Prosedur Imunohistokimia

Protokol imunohistokimia yang digunakan untuk uji ini bergantung pada merk antibodi AIF yang dipakai. Berikut adalah protokol staining yang dikerjakan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

1. Fiksasi spesimen dengan formaldehyde 3% selama 15 menit dalam temperature ruang dan segera mungkin dilakukan staining
2. Dilakukan proses staining :
  - a. Spesimen dicuci dengan buffer (PBS) sebanyak 3 kali selama 5 menit.
  - b. Diinkubasi selama 10 menit dalam ruang temperature dalam  $H_2O_2$  3% dalam methanol.
  - c. Spesimen dicuci kembali dengan buffer (PBS) sebanyak 3 kali selama 5 menit.



- d. Dilakukan tahap *blocking* dengan pemberian *Blocking Solution* menggunakan *Background Sniper*.
- e. Spesimen dicuci kembali dengan buffer (PBS) sebanyak 3 kali selama 5 menit.
- f. Ditambahkan 100-400  $\mu$ l antibodi primer, yaitu AIF yang telah dilarutkan dengan perbandingan 1:200.
- g. Diinkubasi selama 2 jam dalam suhu ruang.
- h. Larutan antibodi dihilangkan dengan pencucian spesimen dengan larutan buffer (PBS) sebanyak 3 kali selama 5 menit.
- i. Spesimen ditetesi dengan antibody sekunder (Biotin) dan diinkubasi dalam humidified chamber selama 40 menit dalam temperature ruang
- j. Spesimen dicuci dengan larutan buffer (PBS) sebanyak 3 kali selama 5 menit.
- k. Spesimen ditambahkan dengan HRP dan diinkubasi selama 40 menit.
- l. Spesimen dalam humidified chamber selama 40 menit dalam temperature ruang
- m. Spesimen dicuci dengan larutan buffer (PBS) sebanyak 3 kali selama 5 menit.
- n. Spesimen diberi larutan kromogram DAB dan diinkubasi selama 10 menit.
- o. Spesimen dibilas dengan  $H_2O_2$  selama 10 menit
- p. Dilakukan proses counterstaining dengan hematoxylin selama 10 menit dan dicuci dengan  $H_2O_2$  selama 10 menit
- q. Spesimen ditutup dengan cover slip.
- r. Spesimen diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x untuk melihat AIF yang tertranslokasi dalam nukleus. Diambil 5 lapang pandang dan dilakukan penghitungan indeks.

s. Rumus Indeks ekspresi AIF

$$= \frac{\text{Jumlah total sel yang mengekspresikan AIF (5 Lapang pandang)}}{\text{Jumlah total sel yang diamati (5 Lapang pandang)}} \times 100\%$$

#### 4.8 Analisa Data

Analisa data dilakukan dengan uji statistik menggunakan *one way Anova*.

Uji *one way anova* adalah analisi varian untuk satu variabel independen. Analisa data dilakukan untuk mengetahui perbedaan rata-rata jumlah sel yang mengekspresikan AIF terhadap perlakuan yang diberikan dan perbedaan dikatakan signifikan bila  $p \leq 0,05$ . Hipotesis statistik pada penelitian ini adalah:

H0 = Ekstrak ethanol rimpang lengkuas (*A. galanga*) tidak dapat meningkatkan translokasi AIF ke nukleus pada sel HeLa.

H1 = Ekstrak ethanol rimpang lengkuas (*A. galanga*) dapat meningkatkan translokasi AIF ke nukleus pada sel HeLa.

#### 4.9 Definisi Operasional

1. Rimpang lengkuas (*A. galanga*) adalah rimpang lengkuas (*A. galanga*) varian lengkuas merah, yang berbentuk serbuk dan diperoleh dari Balai Materia Medika Batu, Jawa Timur. Rimpang lengkuas (*A. galanga*) ditanam di daerah Batu, pada ketinggian terletak pada ketinggian  $\pm 875$  D.P.L.
2. Ekstrak rimpang lengkuas (*A. galanga*) adalah ekstrak ethanol dari serbuk rimpang lengkuas (*A. galanga*) yang dibuat dengan metode maserasi selama 24 jam dengan pelarut ethanol 70% (1:5).
3. Ekspresi AIF adalah ekspresi AIF pada nukleus. Ekspresi AIF yang akan diamati adalah ekspresi dari AIF yang hanya terekspresi pada nukleus sel



HeLa. Secara mikroskopik penampakan sel yang mengekspresikan AIF berwarna coklat, berbentuk bulat, dan tidak ada batas yang jelas antara sitoplasma dan nukleus.

4. Apoptosis adalah kematian sel yang terprogram dari sel HeLa. Dalam hal ini proses apoptosis yang diamati adalah proses apoptosis dari jalur caspase-independen.
5. Imunohistokimia adalah metode imunostaining untuk melihat ekspresi AIF. Imunohistokimia yang dilaksanakan dalam penelitian ini menggunakan antibodi *Apoptosis Inducing Factor* (AIF).
6. Indeks ekspresi AIF adalah metode untuk menghitung jumlah sel yang diperkirakan mengekspresikan AIF. Dihitung dengan cara melihat jumlah sel yang terwarnai oleh antibodi AIF berdasarkan intensitas dan distribusi tertentu. Indeks dihitung dengan cara melihat minimal total 200 sel dalam satu slide (dibagi dalam 5 lapang pandang). Sel yang mengekspresikan AIF dihitung, dibandingkan dengan total sel dan dikalikan 100%. Rumus Indeks =  $(\text{sel terekspresi} / \text{total sel}) \times 100\%$ .

#### 4.10 Keterbatasan Penelitian

Peneliti mempunyai keterbatasan dalam penyediaan reagen untuk mengukur apoptosis secara total. Pada penelitian ini tidak dilakukan pengujian tingkat apoptosis seperti *TUNEL assay*.

Peneliti juga mempunyai keterbatasan dalam uji kuantitatif ACA, HCA, dan galangin. Akibatnya, kadar ACA, HCA, dan galangin tidak dapat diukur dan penentuan dosis hanya berdasarkan pengalaman penelitian sebelumnya.

Pada metode penelitian, seharusnya peneliti juga menggunakan kontrol positif, yaitu sel HeLa yang dipapar dengan cisplatin sebagai *gold standard*.



Namun, hal tersebut tidak dapat dilakukan karena keterbatasan biaya dan ketersediaan bahan.



## BAB 5

## HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

## 5.1 Hasil Penelitian

## 5.1.1 Hasil Ekstraksi dan Uji Fitokimia

Hasil ekstrak pekat rimpang lengkuas yang didapatkan dalam penelitian ini adalah sekitar 13,7 gram. Dari hasil pengamatan organoleptik, didapatkan ekstrak yang berwarna coklat kemerahan, konsistensi pekat bergranul, berbau pedas khas lengkuas, dan berasa pedas pahit.

Uji kualitatif Fitokimia pada ekstrak ethanol *A. galanga* tercantum pada tabel 5.1 dibawah ini.

**Tabel 5.1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak *A. galanga***

Uji	Metode / Reagen / Perlakuan	Hasil
Flavonoid	Wilstater	+
Saponin	Fort	+
Tanin	FeCl <sub>3</sub>	-
Alkaloid	Mayer	+

Ekstrak ethanol *A. galanga* yang didapatkan mengandung flavonoid, saponin, alkaloid dan tidak terkandung senyawa golongan tannin. Dengan demikian, ethanol 70% efektif untuk menarik flavonoid dalam rimpang *A. galanga*. Metode maserasi dengan pengadukan selama 3 jam juga telah sesuai untuk menarik flavonoid dalam *A. galanga*. Namun, proses remaserasi sebanyak 3 kali dianggap kurang efektif, karena hasil ekstrak pekat yang dihasilkan pada remaserasi hanya sedikit, yaitu ±3,21 gram. Hasil dari maserasi pertama adalah

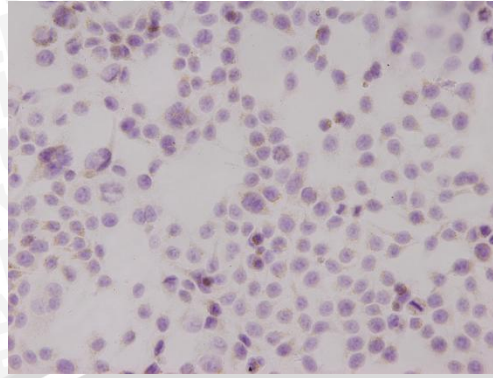
$\pm 10,49$  gram. Maserasi *A. galanga* dirasa cukup efektif jika hanya dilakukan satu kali dengan perbandingan pelarut 1:5. Proses maserasi 3 kali dianggap menghabiskan lebih banyak pelarut dan memakan banyak waktu.

### 5.1.2 Hasil Uji Ekspresi AIF

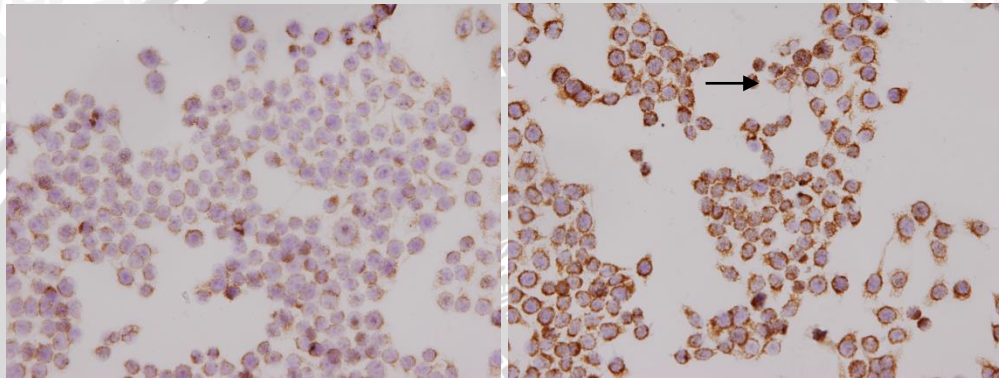
Pada penelitian ini terdapat 4 kelompok perlakuan, yaitu kontrol, P1, P2, dan P3 dengan replikasi sebanyak 6 kali (1 replikasi sebagai kontrol saat dilakukannya imunohistokimia atau tidak diberi antibodi primer). Pada kelompok kontrol, sel HeLa tidak mendapatkan paparan ekstrak, pada P1 sel HeLa mendapat paparan ekstrak dengan dosis 150  $\mu\text{g/ml}$ , P2 mendapatkan dosis 300  $\mu\text{g/ml}$ , dan P3 mendapatkan dosis 600  $\mu\text{g/ml}$ . Perlakuan diberikan selama 24 jam. Setelah pemaparan selama 24 jam, akan dilakukan imunohistokimia. Ekspresi yang diamati adalah ekspresi AIF pada nukleus yang menghasilkan morfologi sel berupa warna coklat pada nukleus, bentuk sel menjadi bulat, dan tidak tampak batas yang jelas antara nukleus dan sitoplasma.

Pada penelitian ini, pengamatan secara mikroskopik ekspresi AIF dilakukan menggunakan metode imunohistokimia dengan menggunakan antibody AIF. Penampakan mikroskopik dari masing-masing perlakuan dapat dilihat pada gambar 5.1. Penampakan ekspresi AIF ditandai dengan terbentuknya warna coklat pada nukleus, bentuk sel menjadi bulat dan tidak terlihat batas yang jelas antara nukleus dan sitoplasma.



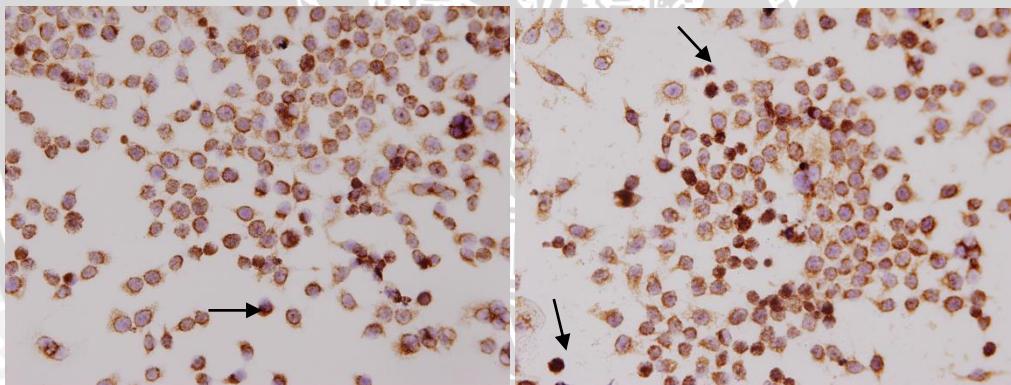


Kontrol negatif (tanpa antibodi primer)



Kontrol

150 µg/ml



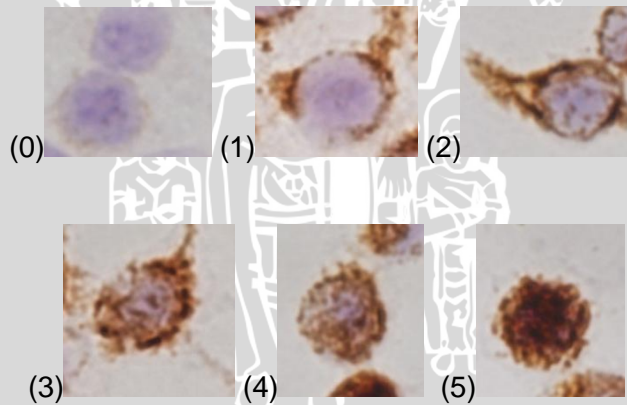
300 µg/ml

600 µg/ml

**Gambar 5.1** Hasil Pengamatan Mikroskopik (perbesaran 400x). Sel yang mengekspresikan AIF pada nukleus ditandai dengan tanda panah hitam, sel berbentuk bulat dan berwarna coklat)

Sistem penghitungan dalam IHC dilakukan oleh *single observer*, berdasarkan derajat penghitungan, yang ditetapkan oleh peneliti pada gambar 5.2. Sel dengan intensitas dan distribusi sesuai gambar (3), (4), dan (5) akan

diinterpretasikan sebagai sel yang mengekspresikan AIF yang telah bertranslokasi dan terakumulasi lebih dari 50% di nukleus. Kriteria ini ditetapkan oleh peneliti, mengacu pada teori mekanisme rilisnya AIF. Hal tersebut dilakukan untuk mempermudah peneliti dalam menetapkan penghitungan, karena tidak didapatkan literature yang menyebutkan kriteria penghitungan AIF pada sel HeLa. Pemberian kriteria oleh peneliti ini digunakan meminimalkan kemungkinan bias. Salah satu kelemahan dalam penelitian ini adalah peneliti hanya menggunakan mikroskop cahaya, sehingga tidak dapat mengukur dan mengamati secara kuantitatif jumlah AIF yang terekspresi di nukleus. Dibutuhkan pula menggunakan mikroskop fluorescent untuk lebih memastikan apakah AIF benar-benar telah bertranslokasi ke nukleus. Adanya ekspresi AIF yang secara normal terdapat pada mitokondria, yang kemudian akan terekspresi pada daerah sitoplasma dapat menjadi faktor bias dalam pengamatan.



**Gambar 5.2.** Kriteria Intensitas dan Distribusi AIF pada Sel HeLa (perbesaran 1000x). Pada gambar (0) nukleus tampak jelas oleh pewarnaan Hematoxilyn bewarna ungu biru. Pada sitoplasma nampak sangat sedikit warna coklat akibat endapan DAB. Gambar (1) nukleus tampak jelas oleh pewarnaan Hematoxilyn bewarna ungu biru. Pada sitoplasma nampak warna coklat. Batas antara nukleus dan sitoplasma jelas. Gambar (2) batas nukleus dan sitoplasma mulai tidak jelas. Warna coklat pada sitoplasma tampak semakin tua/pekat bertumpuk dengan warna ungu nukleus. Pada gambar (3) sitoplasma masih jelas. Namun intensitas warna coklat pada nukleus mulai tampak lebih kuat (lebih



dari 50%). Pada gambar (4) batas nukleus dan sitoplasma sudah tidak nampak, bentuk sel menjadi lebih bulat (mengkerut). Warna coklat masuk ke bagian tengah nukleus dan hampir memenuhi nukleus. Pada gambar (5) Tidak lagi tampak warna ungu pada nukleus. Warna coklat mulai mendominasi nukleus. Bentuk sel menjadi bulat dan batas nukleus dan sitoplasma tidak nampak.

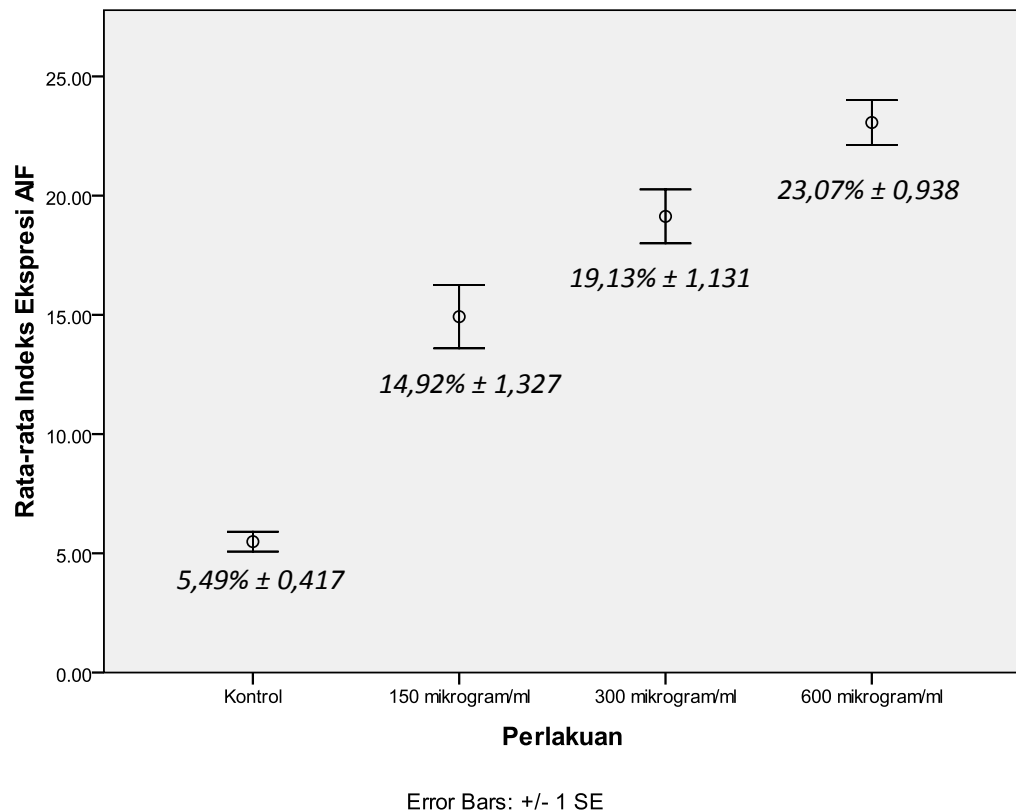
Indeks ekspresi AIF didapatkan dengan menghitung sel yang mengekspresikan AIF dan total keseluruhan sel dalam satu lapang pandang. Selanjutnya sel yang mengekspresikan AIF dan total sel dari lima lapang pandang dijumlahkan. Indeks AIF adalah persentase perbandingan total sel yang mengekspresikan AIF dan total sel dari lima lapang pandang (lampiran 1). Hasil indeks ekspresi AIF dari masing-masing kelompok kemudian dirata-ratakan dan tercantum pada tabel 5.2.

**Tabel 5.2. Rata-rata Indeks Ekspresi AIF pada Tiap Perlakuan**

Perlakuan	Replikasi 1 $\% \left( \frac{\text{total AIF}}{\text{Total sel}} \right)$	Replikasi 2 $\% \left( \frac{\text{total AIF}}{\text{Total sel}} \right)$	Replikasi 3 $\% \left( \frac{\text{total AIF}}{\text{Total sel}} \right)$	Replikasi 4 $\% \left( \frac{\text{total AIF}}{\text{Total sel}} \right)$	Replikasi 5 $\% \left( \frac{\text{total AIF}}{\text{Total sel}} \right)$	Rata-rata ± Std. Error
Kontrol	4.62 $\left( \frac{19}{411} \right)$	4.56 $\left( \frac{22}{482} \right)$	6.81 $\left( \frac{36}{529} \right)$	5.72 $\left( \frac{42}{724} \right)$	5.74 $\left( \frac{50}{871} \right)$	5,49% ± 0,417
P1	18.70 $\left( \frac{121}{647} \right)$	14.16 $\left( \frac{83}{586} \right)$	17.15 $\left( \frac{83}{586} \right)$	11.37 $\left( \frac{84}{739} \right)$	13.24 $\left( \frac{72}{544} \right)$	14,92% ± 1,327
P2	16.13 $\left( \frac{105}{651} \right)$	22.12 $\left( \frac{115}{520} \right)$	21.12 $\left( \frac{136}{644} \right)$	17.21 $\left( \frac{116}{674} \right)$	19.07 $\left( \frac{111}{582} \right)$	19,13% ± 1,131
P3	25.41 $\left( \frac{138}{543} \right)$	20.21 $\left( \frac{113}{559} \right)$	23.05 $\left( \frac{130}{564} \right)$	24.73 $\left( \frac{160}{647} \right)$	21.95 $\left( \frac{124}{565} \right)$	23,07% ± 0,938

Pada kelompok kontrol, indeks rata-rata sel yang mengekspresikan AIF adalah sebesar 5,49% ± 0,417. Pada kelompok P1 rata-rata indeks adalah 14,92% ± 1,327. Pada kelompok P2 adalah sebesar 19,13% ± 1,131 dan pada P3 adalah 23,07% ± 0,938. Grafik hubungan antara perlakuan terhadap nilai rata-rata indeks ekspresi AIF dapat dilihat pada gambar 5.3. Grafik dibuat dengan menampilkan nilai rata-rata dan dilengkapi dengan nilai ± 1 *standard error*.





**Gambar 5.3. Grafik Pengaruh Dosis Ekstrak terhadap Rata-rata Indeks Ekspresi AIF.**

## 5.2 Analisis Data

Data yang didapatkan dalam penelitian ini dianalisis menggunakan program SPSS 17 untuk Windows 7. Analisis menggunakan analisis varian atau ANOVA. Syarat penggunaan uji statistik ANOVA adalah data yang didapatkan memenuhi uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan *Lavene test*.

Pada uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk Test* (Lampiran 6) didapatkan bahwa data yang didapatkan mempunyai distribusi normal. Pada uji homogenitas *Lavene* (Lampiran 5), didapatkan data dengan nilai  $p=0,116$ . Nilai  $p>0,05$ , hal

tersebut menandakan bahwa data yang diperoleh mempunyai varians yang normal. Data yang diperoleh telah memenuhi uji normalitas dan homogenitas, maka data dapat dianalisis secara parametrik menggunakan *one-way* ANOVA (Lampiran 7) dan dilakukan analisis *Post Hoc Multiple Comparison* dengan analisis Tukey (Lampiran 8) untuk mengetahui signifikansi antar kelompok perlakuan. Pada analisis ANOVA didapatkan bahwa nilai signifikansi adalah  $p < 0.05$ . Hal tersebut menunjukkan bahwa  $H_0$  diterima dan  $H_1$  ditolak, sehingga pemberian ekstrak *A. galanga* meningkatkan ekspresi AIF pada inti sel HeLa secara signifikan. Selanjutnya, dilakukan analisis *Post Hoc* untuk mengetahui signifikansi antar perlakuan.

Berdasarkan analisis *Post Hoc Tukey*, dapat diinterpretasikan bahwa pemberian ekstrak dengan konsentrasi 150, 300, dan 600  $\mu\text{g/ml}$  secara signifikan meningkatkan angka indeks ekspresi AIF dibandingkan dengan kontrol. Hal tersebut ditunjukkan oleh nilai signifikansi antara kontrol-P1, kontrol-P2, kontrol-P3 yang dibawah 0,05. Peningkatan nilai indeks ekspresi AIF secara signifikan juga ditunjukkan antara P1-P2, serta P1-P3. Namun, hal berbeda terjadi antara P2-P3, kenaikan dosis dari P2 ke P3 tidak membawa peningkatan secara signifikan terhadap nilai indeks ekspresi AIF, karena nilai signifikansi diatas 0,05, yaitu  $\text{sig}=0,618$ .

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian eksperimental ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *A. galanga* terhadap ekspresi AIF pada inti sel HeLa secara *in vitro*. Pada penelitian terdahulu *A. galanga* telah terbukti menghambat proses proliferasi dan meningkatkan proses apoptosis pada sel HeLa. Beberapa mekanisme peningkatan apoptosis oleh *A. galanga* diperantarai oleh senyawa ACA, HCA, dan galangin. *A. galanga* meningkatkan apoptosis melalui peningkatan ekspresi Bax, penurunan Bcl-2 dan Bcl-xL yang menyebabkan peningkatan level ROS, penurunan potensial membran mitokondria, rilisnya cytochrome c, peningkatan kadar Ca dalam mitokondria dan sitosol, serta aktivasi dari caspase 3 (Banjerdpongchai *et. al.*, 2011).

Salah satu penyebab penurunan potensial permeabilitas membran luar mitokondria adalah karena terbentuknya ROS atau *Reactive Oxygen Species*. Apoptosis akibat ROS akan menyebabkan disfungsi rantai respirasi mitokondria dan meningkatkan permeabilitas membran mitokondria (Gallego *et. al.*, 2008) dan menurunkan potensial membran mitokondria (Banjerdpongchai *et. al.*, 2011). ROS adalah mediator pada proses caspase independen apoptosis (Lee *et. al.*, 2006) Diharapkan senyawa dalam *A. galanga* dapat menginduksi pembentukan ROS dan menurunkan potensial membran mitokondria untuk memicu rilisnya AIF, sehingga dapat menginduksi apoptosis dari jalur caspase-independen.

Berdasarkan hasil penelitian, *A. galanga* telah mempunyai hasil positif dalam meningkatkan ekspresi AIF. Dosis 150 µg/ml, 300 µg/ml, dan 600 µg/ml terbukti secara signifikan meningkatkan ekspresi AIF pada sel HeLa dibandingkan dengan kontrol, setelah pemaparan selama 24 jam. Dosis optimum



ekstrak *A. galanga* yang secara efektif meningkatkan ekspresi AIF adalah 300 µg/ml. Peningkatan dosis menjadi 600 µg/ml akan meningkatkan ekspresi AIF, namun peningkatannya tidak signifikan daripada dosis 300 µg/ml. Dengan demikian *A. galanga* terbukti dapat meningkatkan ekspresi AIF dan lebih jauh lagi *A. galanga* dapat menginduksi apoptosis tidak hanya dari jalur caspase dependen, tetapi juga dari jalur caspase independen. Dosis 150 µg/ml sebenarnya telah dapat menginduksi rilisnya AIF secara signifikan. Dosis 300 µg/ml dapat meningkatkan ekspresi AIF daripada dosis sebelumnya. Peningkatan dosis hingga 600 µg/ml tidak meningkatkan ekspresi AIF secara signifikan. Perlu dilakukan penelitian yang lebih lanjut untuk memperbanyak rentang penggunaan dosis ekstrak *A. galanga* sehingga diketahui dosis maksimum *A. galanga* dalam induksi ekspresi AIF

Peningkatan AIF pada kelompok perlakuan disebabkan oleh penurunan potensial dan peningkatan permeabilitas membran mitokondria akibat peningkatan pembentukan ROS yang diperantarai oleh kandungan HCA (Banjerdpongchai *et. al.*, 2011) dan ACA (Ito *et. al.*, 2004) dalam ekstrak *A. galanga*. Pada penelitian Banjerdpongchai *et. al.* (2011) peningkatan ROS terjadi setelah pemaparan selama 4 jam, sehingga dalam pada penelitian ini pemaparan selama 24 jam dianggap cukup untuk menyebabkan peningkatan ROS dan menyebabkan translokasi AIF ke nukleus. Sebenarnya, ROS secara alami terbentuk sebagai hasil samping dari respirasi sel oleh mitokondria (Kirkinezos *et al.*, 2002). Secara normal, sel mempunyai bentuk pertahanannya sendiri terhadap ROS, yaitu dengan adanya glutathione dan Bcl-2. Glutathione dan Bcl-2 mempunyai fungsi sebagai antioksidan dan melindungi sel dari kondisi stress oksidatif (Brozovic *et. al.*, 2010). HCA dalam *A. galanga* terbukti menurunkan kadar Bcl-2 (Banjerdpongchai *et. al.*, 2011), sedangkan ACA terbukti

menurunkan kadar glutathione intraselular (Ito *et. al.*, 2004). Turunnya kadar Bcl-2 dan glutathione inilah yang menyebabkan ketidakseimbangan antara pembentukan ROS dan kemampuan detoksifikasi sel (Brozovic *et. al.*, 2010), sehingga menyebabkan rilisnya AIF dari mitokondria ke sitosol, yang akhirnya akan bertranslokasi ke nukleus dan menyebabkan sel berapoptosis.

Selain ACA dan HCA, galangin adalah senyawa dalam *A. galanga* yang mempunyai aktivitas antikanker. Dalam penelitian Zhang *et. al.* (2011) mekanisme utama galangin dalam induksi apoptosis pada hepatocellular carcinoma adalah dengan rilisnya AIF ke sitosol. Maka, dalam penelitian ini peningkatan ekspresi AIF juga disebabkan oleh galangin. Mekanisme rilisnya AIF ini diperantarai oleh translokasi Bax. Normalnya, Bax terdapat dalam sitosol atau terikat lemah pada membran luar mitokondria. Adanya galangin akan memperantarai translokasi Bax ke membran dalam mitokondria sehingga permeabilitas membran meningkat dan merilis AIF ke sitosol (Zhang *et. al.*, 2011). Pada penelitian yang sama juga disebutkan bahwa kadar Bcl-2 dapat mempengaruhi efek apoptosis galangin. Peningkatan kadar Bcl-2 dapat menurunkan efek apoptosis galangin dan penurunan kadar Bcl-2 dapat meningkatkan efek apoptosis galangin (Zhang *et. al.*, 2011).

Penemuan jalur apoptosis alternatif selain melalui caspase-dependen apoptosis telah menjadi terobosan baru dalam penemuan antikanker. Salah satu jalur alternatif dalam induksi apoptosis adalah melalui caspase-independen apoptosis. AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) adalah salah satu faktor pemicu yang akan menentukan terjadinya apoptosis pada jalur ini. AIF harus menjalani dua tahap hingga dapat menginduksi apoptosis. Tahap pertama adalah masuknya AIF ke dalam sitosol dan tahap kedua adalah proses translokasi dan akumulasi AIF ke nukleus. AIF yang berhasil bertranslokasi ke nukleus, maka akan terjadi



kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA dalam skala besar. Hal tersebut akan menyebabkan sel mengalami apoptosis.

Rilisnya AIF ini dapat menjadi jalur alternatif dalam induksi apoptosis. Jalur alternatif ini sangat membantu dalam proses peningkatan aktivitas apoptosis sel kanker terutama dalam kasus kemoresistan. Pada penelitian Yang *et. al.* (2008) pada kasus kemoresistan kanker ovarium, peningkatan level AIF dapat meningkatkan sensitivitas sel terhadap cisplatin. Yang *et. al.* (2008) menjelaskan bahwa gagalnya translokasi AIF ke nukleus adalah penyebab resistensi cisplatin pada kanker ovarium. Dengan demikian, AIF adalah mediator penting bagi cisplatin untuk menginduksi apoptosis, terutama pada sel yang kemoresistan. Sehingga, peningkatan ekspresi AIF oleh *A. galanga* dapat dijadikan salah satu alternatif untuk mengatasi masalah kemoresistan, terutama pada kasus kanker serviks.

*A. galanga* dapat dipertimbangkan sebagai salah satu obat untuk mempotensiasi agen kemoterapi konvensional yang lain. *A. galanga* dapat digunakan bersama dengan cisplatin untuk mendapat efek yang lebih poten. *A. galanga* dapat meningkatkan pembentukan ROS dalam sel. Pembentukan ROS dalam sel dapat mengurangi kadar glutathione (Borozovic *et.al.*,2012). Tingginya kadar glutathione dalam sel dapat menyebabkan sel resisten terhadap cisplatin (Borozovic *et.al.*, 2012). Jika ROS yang diinduksi oleh *A. galanga* dapat berikatan dengan glutathion, maka akan lebih banyak cisplatin yang berikatan dengan DNA, sehingga meningkatkan potensi dan sensitivitas cisplatin untuk berikatan dengan DNA.

Selektivitas kemampuan cytotoxic *A. galanga* tidak dilakukan pada penelitian ini. Pada penelitian Awang *et. al.* (2010) kandungan ACA, yang juga



terdapat pada *A. choncigera* tidak menimbulkan efek sitotoksik pada kultur sel normal *Human mammary epithelial cells*. Tidak terdapat banyak data yang didapatkan mengenai selektivitas kemampuan apoptosis *A. galanga*. Perlu dilakukan penelitian dengan menambahkan kultur sel normal.

Pada penelitian ini, peneliti tidak melakukan pengujian pada tingkat apoptosis dan tingkat pertumbuhan sel, peneliti hanya menggunakan dasar studi terdahulu mengenai aktivitas peningkatan apoptosis dan penghambatan proliferasi pada kultur sel kanker. Penelitian ini akan menjadi lebih valid jika dilakukan penelitian independen kembali sebanyak tiga kali, serta pada penghitungan sel dilakukan penghitungan silang. Kelemahan dari penelitian ini adalah tidak adanya kelompok kontrol positif, kelompok sel HeLa yang dipapar dengan cisplatin, yaitu agen sitotoksik standard yang digunakan sebagai terapi kanker serviks. Akibatnya, peneliti tidak dapat membandingkan seberapa besar kemampuan *A. galanga* dalam peningkatan ekspresi AIF dibandingkan dengan cisplatin. Peneliti juga tidak membuat kelompok perlakuan dimana sel dipapar dengan ekstrak *A. galanga* yang dikombinasi dengan AIF, sehingga peneliti tidak dapat secara langsung mengamati efek potensiasi antara *A. galanga* dengan cisplatin.

Ekstrak pekat *A. galanga* sukar larut dalam *deionized water*, sehingga pada saat pembuatan sediaan ekstrak banyak endapan yang tersaring dalam membran filter. Peneliti juga mencoba untuk membandingkan kelarutan ekstrak dalam aquades dan dalam ethanol 70%, tampak bahwa ekstrak lebih mudah larut dan tampak lebih pekat dalam ethanol 70%. Karena hal inilah, perlu dipertimbangkan kembali penggunaan pelarut yang sesuai untuk ditambahkan dalam media tumbuh, agar senyawa yang dipaparkan ke sel tidak berkurang saat dilakukan penyaringan.

Sebagai penguat untuk membuktikan *A. galanga* benar-benar dapat menginduksi apoptosis dari jalur caspase-independent, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan caspase-inhibitor (z-VAD-fmk) untuk menghambat aktivitas dari caspase.



## BAB 7

### KESIMPULAN

#### 7.1 Kesimpulan

1. Ekstrak ethanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) dapat meningkatkan ekspresi AIF pada inti sel HeLa.

#### 7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian independen kembali minimal sebanyak 3 kali, untuk membuktikan bahwa *A. galanga* benar-benar dapat meningkatkan translokasi AIF ke nukleus pada sel HeLa.
2. Pengamatan mikroskopik disarankan menggunakan perbesaran 1000 kali dan menggunakan mikroskop fluoresen.
3. Perlu dilakukan penelitian untuk membuktikan bahwa AIF secara independent dapat menginduksi terjadinya apoptosis dengan menambahkan caspase inhibitor dan pengukuran tingkat apoptosis dengan TUNEL assay untuk melengkapi penelitian ini.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menambahkan kontrol positif, yaitu menambahkan kelompok perlakuan yang diberi paparan cisplatin sebagai *gold standard* terapi kanker serviks agar dapat membandingkan potensi *A. galanga* dengan cisplatin. Serta ditambahkan kelompok yang diberi perlakuan dengan diberikan kombinasi cisplatin dan ekstrak *A. galanga* untuk mengamati efek potensiasi *A. galanga* dengan cisplatin.
5. Perlu dilakukan penelitian untuk optimasi proses ekstraksi *A. galanga* untuk mendapatkan ekstrak yang mempunyai kandungan antikanker paling banyak dan paling efektif.



6. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membandingkan potensi *A. galanga* dengan tanaman lain yang mempunyai aktivitas antikanker agar dapat dibandingkan potensi dan efek sinergisme atau potensiasinya.
7. Perlu dilakukan uji in vivo untuk mengetahui selektivitas, keamanan, dan toksisitas dari penggunaan ekstrak *A. galanga*.



## DAFTAR PUSTAKA

- American Cancer Society. 2012. Cervical Cancer: Prevention and Early Detection.
- Arney, A., Katie M. B. 2010. Molecular Diagnostic of Human Papillomavirus. *Labmedicine*. Vol 41 no 9.
- Anonymous. 2013. Bronchial Formula Ayurvedic. (Online). (<http://www.naturessunshine.com/us/products/product/stocknumber1297-bronchial-formula-ayurvedic-100-caps.aspx>, diakses 10 Juli 2013).
- Antonsson, B. 2003. The Mitochondrial Apoptosis Pathway dalam Xiao Ming Yin dan Zhend Dong. *Essential of Apoptosis*. Humana Press : New Jersey.
- Awang, K., M. N. Azmi, L. I. L. Aun, A. N. Aziz., H. Ibrahim, N. H. Nagoor. 2010. The Apoptotic Effect of 1'S-1'-Acetoxychavicol Acetate from *Alpinia conchigera* on Human Cancer Cells. *Molecules* 2010, 15, 8048-8059; doi:10.3390/molecules15118048.
- Barakat, R. Richard, Markman Maurie, Randall Marcus. 2009. Principles and Practice of Gynecology Oncology 5<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams dan Wilkins: New York.
- Banjerdpongchai, R., P. Punyati., A. Nakrob, W. Pompimon, P. Kongtawelert. 2011. 4'-Hydroxinnamaldehyde from *Alpinia galanga* (Linn) Induces Human Leukemic Cell Apoptosis via Mitochondrial and Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention* Vol 12: 593-598.
- Bernard, H.U., 2004. The Clinical Importance of The Nomenclature, Evolution, And Taxonomy of Human Papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology* 38:81-86. *Critical Reviews in Toxicology*, 2010;40(4):347-359.
- B POM. 2013. (Online) Data Regisrasi Badan Pengawas Obat dan Makanan (<http://www.pom.go.id/webreg/index.php/home/produk/all/row/10/page/0/oder/4/DESC/search/1/lengkuas>. Diakes tanggal 10 Juli 2013).
- Brozovic, A., Andreja Ambriovic-Ristov, Maja Osmak. 2010. The Relationship Between Cisplatin-Induced Reactive Oxygen Species, Gluthation, and Bcl-2 and Resistance to Cisplatin. *Critical Review in Toxicology*. Vol 40 (4); 347-359.
- Castellsagué, X., Mireia Díaz , Silvia de Sanjosé , Nubia Muñoz , Rolando Herrero , Silvia Franceschi , Rosanna W. Peeling , Rhoda Ashley , Jennifer S. Smith , Peter J. F. Snijders , Chris J. L. M. Meijer , F. Xavier Bosch. 2006. Worldwide Human Papillomavirus Etiology of Cervical Adenocarcinoma and Its Cofactors: Implications for Screening and Prevention. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 98, No. 5, March 1, 2006.



- Chan, E. W. C, Ng, V. N, Tan, V. V., Yin Yin Low. 2011. Antioxidant and Antibacterial Properties of *Alpinia galangal*, *Curcuma longa*, and *Etilnfera elator* (Zingiberaceae), Faculty of Applied Science : Kuala Lumpur, Malaysia.
- Chudiwal, A. K., D. P. Jain, R. S. Somani. 2010. *Alpinia galanga* Willd. – An Overview on Phyto-Pharmacological Properties. *Indian Journal of Nature Products and Resources* Vol.1(2), June 2010, pp. 143-149.
- Cregan. P. S., V. L. Dawson, R. S. Slack. 2004. Role of AIF in Caspase-Dependent and Caspase-Independent Cell Death. *Nature Publishing Group Oncogene* (2004) 23, 2785–2796.
- Departemen Kesehatan RI. 1978. *Materia Medika Indonesia* Jilid II. Jakarta: Depkes RI.
- FIGO Committee on Gynecology Oncology. 2009. Revised FIGO Staging For Carcinoma of The Vulva, Cervix, and Endometrium. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 105 (2009) 103–104.
- Gallego, M.A., C. Baloot, H. Hajji, A. Martoriati, L. Castera, C. Cuevas, P. Formstecher, B. Joseph, G. Kroemer, C. Bailly, P. Marchetti. 2004. Apoptosis Inducing Factor Determines the Chemoresistance of Non-Small Cell Lung Carcinomas. *Oncogene*. (2004)23, 6282-6291.
- Gallego, M.A., C. Baloot, H. Hajji, A. Martoriati, L. Castera, C. Cuevas, P. Formstecher, B. Joseph, G. Kroemer, C. Bailly, P. Marchetti. 2008. Overcoming Chemoresistance of Non-Small Cell Lung Carcinoma Through Restoration of an AIF-Dependent Apoptotic Pathway. *Oncogene*. (2008)27, 1981-1992.
- Ito, K. Tomonori Nakazato, Akira Murakami, Kenji Yamato, Yoshitaka Miyakawa, Taketo Yamada, Nobumichi Hozumi, Hajime Ohigashi, Yasuo Ikeda, Masahiro Kizaki. 2004. Induction of Apoptosis in Human Myeloid Leukemic Cells by 1'-Acetochavicol Acetate Through a Mitochondrial- and Fas Mediated Dual Mechanism. *Clinical Cancer Research*. Vol 10, 2120-2130
- Kaushik, D., Jyoti Y., Pawan K., Discha S., Ruby R., 2011. Current Pharmacological and Phytochemical Studie of The Plant *Alpinia galanga*. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, October 2011, Vol 9 no 10.
- Kaushik P., D. Kaushik, J. Yadav and P. Pahwa, 2013. Protective Effect of *Alpinia galanga* in STZ Induced Diabetic Nephropathy. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16: 804-811.
- Kirkinezos, I. G., Carlos T. Moraes. 2001. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Diseases. *Cell and Development Biology*. Vol12(2001);449-457.



- Koda, K, Mary Anne, Young L., Alldredge B. K, Corelli R., Guglielmo B. J., Kradjan W., William B. 2009. Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs 9<sup>th</sup> Edition. Lippincot Williams & Wilkins : New York.
- Lax, S. 2011. Histopathology of Cervical Precursor Lesions and Cancer. *Acta Dermatoven APA Vol 20*, 2011, No 3.
- Lee, T. J., Eun Jung Kim, Shin Kim, Eun Mi Jung, Jong Wook Park, Seung Hun Jeong, Sang Eun Park, Young Hyun Yoo, Taeg Kyu Won. 2006. Caspase-Dependent and Caspae-Independent Apoptosis Induced by Evodamine in Human Leukemic U937 Cells. *Mol Cancer Ther*2006;5:2398-2407.
- Lucey, B. P., Walter A. Nelson-Ress, Grover M. Hutchins. 2009. Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Arch Pathol Lab Med*.Vol 133.
- Modis Y., Trus B.L. Harrison S.C. 2002. Human Papillomavirus 16 L1 (t=7d) Capsid Model PDB ID:1LOT., (Online), (<http://www.virology.wisc.edu/virusworld/images/hpv-gwb.jpg>., diakses tanggal 22 Juli 2013).
- Mosby. 2009. Mosby's Medical Dictionary 8<sup>th</sup> Edition. Elsevier
- Moscicki, A.B. 2005. Impact of HPV Infection in Adolescent Populations. *Journal of Adolescent Health* 2005;37(6 Suppl):S3–9.
- Muangnoi, P. 2007. Cytotoxicity, Apoptosis and DNA Damage Induced by Alpinia galanga Rhizome Extract. *Planta Medica*. Jul2007, Vol. 73 Issue 8, p748-754. 7p. [Abstract]
- Munger, K.,Amy Baldwin, Kirsten M. Edwards, Hiroyuki Hayakawa, Christine L. Nguyen, Michael Owens, Miranda Grace,and KyungWon Huh. 2004. Minireview: Mechanism of Human Papillomavirus-Induce Oncogenesis. *Journal Of Virology*, Nov. 2004, p. 11451–11460.
- Munger, K., Scheffner M., Huijbregtse J.M., Howley P.M. 1992. Interactions of HPV E6 and E7 Oncoproteins With Tumours Suppressor Gene Products.(Abstract) *Cancer Surv*.1992;12:197-217.
- Murray, T. and Yang, X., et al. (2006) Growth of a Human Mammary Tumor Cell Line is Blocked by Galangin, A Naturally Qccurring Bioflavonoid, and is Accompanied by Down-regulation of Cyclins D3, E, and A. *Breast Cancer Research* 2, 8 :R17 (doi:10.1186/bcr1391).
- Patel, D. K., K. Patel, M. Gadewar, V. Tahilyani. 2012. Pharmacological and Bioanalytical Aspects of Galangin – A Concise Report. *Asian Pasific Joournal of Tropical Biomedicine* (2012)S449-S455.
- Pearson Education. 2009. (Online). (<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-24/2418.jpg>., Diakses pada 22 Juli 2013)

- Rahbari, R. Tom Sheean, Vasileos Modes, Pam Collier, Catriona Macfarlane, Richard M. 2009. A Novel L1 Retrotransposon Marker for HeLa Cell Line Identification. *Biotechniques*. 46(4):277-284.
- Rusmarilin. 2003. Aktivitas Antikanker Ekstrak Rimpang Lengkuas Lokal (*Alpinia galanga* (L). Sw) Pada Alur Sel Kanker Manusia Serta Mencit yang Ditransplantasi dengan Sel Tumoe Primer. Bogor : disertasi IPB.
- Saavedra, A. P., Tanya P. T., Lilia C. A., Minerva M. G., Ana M.G.J., Fernando E. G., Lourdes G. X. 2012. Molecular Bases of Human Papillomavirus Pathogenesis in The Development of Cervical Cancer: Human Papillomavirus and Related Disease-From Bench to Bedside-Research Aspects. *InTech*
- Samart, N. 2007. Isolation and Identification of Galangin and Other Compounds from *Alpinia galanga* Linnaeus Willd. and *Alpinia officinarum* Hance. Suranaree University of Technology, Thailand.
- Sari, L. 2006. Pemanfaatan Obat Tradisional Dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol II (1):01-07.
- Spencer, Juliet V. 2009. *Deadly Disease and Epidemics Cervical Cancer*. Infobase Publishing: USA.
- Srisapoomi T, jiratchariyakul W, O-partkiatikul N. 2008. Effect of Tow Thai Herbal Remedies on the Sensitivity of Chemotherapeutic Agents in Human Cancer Cells. *Asian journal of Traditional Medicines*. 2008; 3(4): 144-52.
- Oonmetta, J. A., Tomoko Suzuki, Piyawan Gasaluck, Griangsak Eungkeb. 2005. Antimicrobial Properties and Action of Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *Elsevier Ltd on behalf Swiss Society of Food Science and Technology* . LWT39(2006)1214-1220.
- Verma, R. K., Garima Mishra, Pradeep Singh, K.K. Jha, R. L. Khosa. 2011. *Alpinia galanga – An Important Medicinal Plant : A Review*. *Pelagia Research Library*. *Der Pharmacia Sinica* 2001,2(1):142-154.
- Vet, J.N.I, M.A de Boer, B.E.W.M van den Akker, B. Siregar, Lisnawati, S. Budiningsih, D. Tyasmorowati, Moestikaningsih, S. Cornain, A.A.W. Peters, G.J. Fleurens. 2008. Prevalence of Human Pappilomavirus in Indonesia: a Population-Based Study in Three Regions. *British Journal of Cancer*.(2008) 99:214-218.
- Weaver, B.A., 2006. Epidemiology and Natural History of Genital Human Pappilomavirus Infection. *Journal of the American Osteopathic Association* 2006;106 (Suppl 1):S2-8.
- Wee, C. C., Annong Huang, Karen W. Huskey, and Ellen P. McCarthy. 2008. Obesity and the Likelihood of Sexual Behavioural Risk Factors for HPV and Cervical Cancer. *NIH Public Access Obesity* (Silver Spring) 16 (11) : 2552-2555.doi:10.1038/oby.2008.394.



WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). 2010. Human Papillomavirus and Related Cancers in Indonesia. *Summary Report*.

Yang, X., M. Fraser, M.R. Abedini, T. Bai, B.K. Tsang. 2008. Regulation of Apoptosis-Inducing Factor Mediated, Cisplatin-Induces Apoptosis by Akt. *British Journal of Cancer*. (2008)98,803-808.

Zhang, Z., Kiichiro Teruya, Hiroshi Eto, Sanetaka Shirahata. 2011. Fucoidan Extract Induces Apoptosis in MCF-7 Cells Via a Mechanism Involving the ROS-Dependent JNK Activation and Mitochondria-Mediated Pathway. *Plos One* 6(11):e27441. Doic:10:1371.





Lampiran 1. Hasil Penghitungan Indeks Ekspresi AIF

Perlakuan	Lapang pandang	Replikasi 1		Replikasi 2		Replikasi 3		Replikasi 4		Replikasi 5	
		AIF	Total Sel	AIF	Total sel	AIF	Total sel	AIF	Total sel	AIF	Total sel
Kontrol	1	12	70	8	113	8	175	12	165	12	85
	2	2	95	9	143	5	93	11	197	12	177
	3	2	147	4	126	9	138	10	163	8	197
	4	3	99	5	87	10	146	6	103	10	236
	5	10	180	4	126	12	152	3	106	8	176
	Total	19	411	22	482	36	529	42	734	50	871
	Indeks		4.62		4.56		6.81		5.72		5.74
P1	1	15	109	8	96	26	106	24	130	17	104
	2	43	156	14	134	7	50	11	93	16	94
	3	13	152	12	108	12	97	22	162	10	142
	4	20	106	21	112	26	153	16	219	10	95
	5	30	124	28	136	17	107	11	135	19	109
	Total	121	647	83	586	88	513	84	739	72	544
	Indeks		18.70		14.16		17.15		11.37		13.24
P2	1	24	157	24	98	33	97	27	84	17	131
	2	19	95	21	117	17	149	17	157	16	102
	3	19	123	35	142	32	143	23	137	23	123
	4	15	146	23	95	27	102	28	135	25	128
	5	28	130	12	68	27	153	21	161	30	98
	Total	105	651	115	520	136	644	116	674	111	582
	Indeks		16.13		22.12		21.12		17.21		19.07

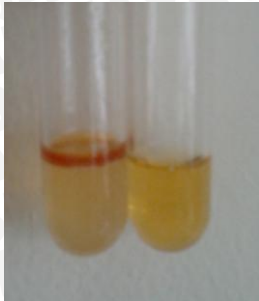
Perlakuan	Lapang pandang	Replikasi 1		Replikasi 2		Replikasi 3		Replikasi 4		Replikasi 5	
		AIF	Total Sel	AIF	Total sel	AIF	Total sel	AIF	Total sel	AIF	Total sel
P3	1	37	110	16	86	17	108	34	107	32	139
	2	20	70	19	66	24	157	31	175	20	80
	3	38	106	32	162	31	105	35	118	16	106
	4	16	129	29	151	32	109	28	140	35	130
	5	27	128	17	94	26	85	32	107	21	110
	Total	138	543	113	559	130	564	160	647	124	565
	Indeks	25.41		20.21		23.05		24.73		21.95	





## Lampiran 2 Hasil Pengamatan Uji Fitokimia

### 1. Pengamatan Kandungan Flavonoid



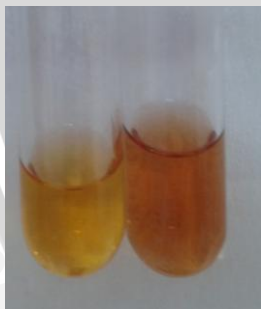
Kandungan flavonoid ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada uji Wilstater. Tabung sebelah kanan adalah larutan kontrol dan larutan sebelah kiri adalah larutan yang diujikan.

### 2. Pengamatan kandungan saponin



Kandungan saponin terlihat dari munculnya busa setelah proses pengocokan. Busa setinggi 1,8 cm bertahan selama 30 detik.

### 3. Pengamatan Kandungan Alkaloid



Kandungan alkaloid terlihat dengan terbentuknya endapan berwarna coklat merah setelah penambahan larutan Meyer pada tabung sebelah kanan. Tampak larutan berwarna lebih keruh karena endapan coklat dibandingkan dengan larutan kontrol yang disebelah kiri.

### 4. Pengamatan kandungan Tanin



Tidak terdapat kandungan tannin pada ekstrak, ditandai dengan tidak terbentuknya endapan coklat pada penambahan  $\text{FeCl}_3$  pada tabung sebelah kanan.

Lampiran 3 . Analisis Deskriptif

Descriptives

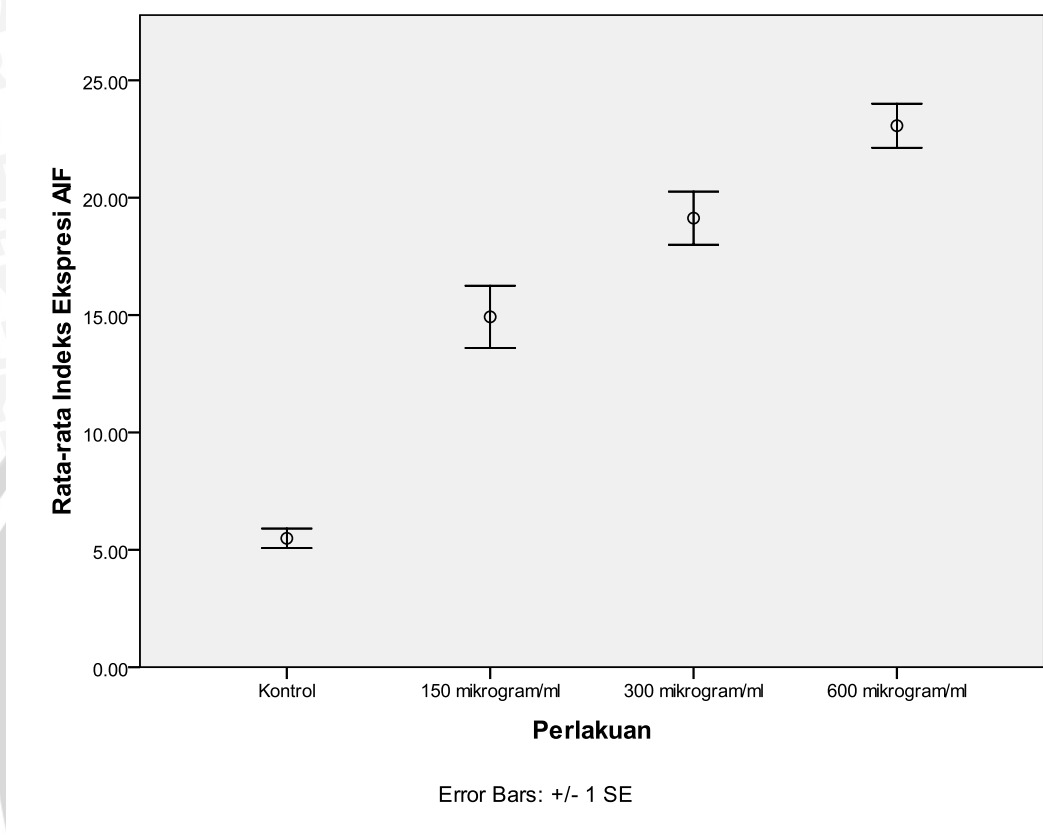
Kode			Statistic	Std. Error
Index kontrol	Mean		5.4900	.41711
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4.3319	
		Upper Bound	6.6481	
	5% Trimmed Mean		5.4683	
	Median		5.7200	
	Variance		.870	
	Std. Deviation		.93268	
	Minimum		4.56	
	Maximum		6.81	
	Range		2.25	
	Interquartile Range		1.69	
	Skewness		.444	.913
	Kurtosis		-.792	2.000
Perlakuan 1	Mean		14.9240	1.32785
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	11.2373	
		Upper Bound	18.6107	
	5% Trimmed Mean		14.9117	
	Median		14.1600	
	Variance		8.816	
	Std. Deviation		2.96916	
	Minimum		11.37	
	Maximum		18.70	
	Range		7.33	
	Interquartile Range		5.62	
	Skewness		.235	.913
	Kurtosis		-1.635	2.000



2	Perlakuan	Mean		19.1300	1.13115
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		15.9894	
		Upper Bound		22.2706	
	5% Trimmed Mean		19.1306		
	Median		19.0700		
	Variance		6.398		
	Std. Deviation		2.52934		
	Minimum		16.13		
	Maximum		22.12		
	Range		5.99		
	Interquartile Range		4.95		
	Skewness		.014	.913	
	Kurtosis		-2.191	2.000	
3	Perlakuan	Mean		23.0660	.93896
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		20.4590	
		Upper Bound		25.6730	
	5% Trimmed Mean		23.0944		
	Median		23.0400		
	Variance		4.408		
	Std. Deviation		2.09958		
	Minimum		20.21		
	Maximum		25.41		
	Range		5.20		
	Interquartile Range		3.98		
	Skewness		-.328	.913	
	Kurtosis		-1.197	2.000	



Lampiran 4. Grafik Hubungan antara Perlakuan dan Rata-rata Indeks Ekspresi AIF.



Lampiran 5. Uji Homogenitas Lavene

Test of Homogeneity of Variances

Index

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.298	3	16	.116

Lampiran 6. Uji Normalitas Shapiro-Wilk

Tests of Normality

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Index kontrol	.225	5	.200*	.896	5	.388
P1 (150 mikrogram/ml)	.202	5	.200*	.959	5	.801
P2 (300 mikrogram/ml)	.184	5	.200*	.948	5	.722
P3 (600 mikrogram/ml)	.185	5	.200*	.965	5	.841

a. Lilliefors Significance Correction

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

Lampiran 7. Analisis Varian (ANOVA)

ANOVA

Index

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	854.301	3	284.767	55.587	0.00000001
Within Groups	81.966	16	5.123		
Total	936.267	19			



Lampiran 8. Uji Post Hoc Turkey

Multiple Comparisons

Index

Tukey HSD

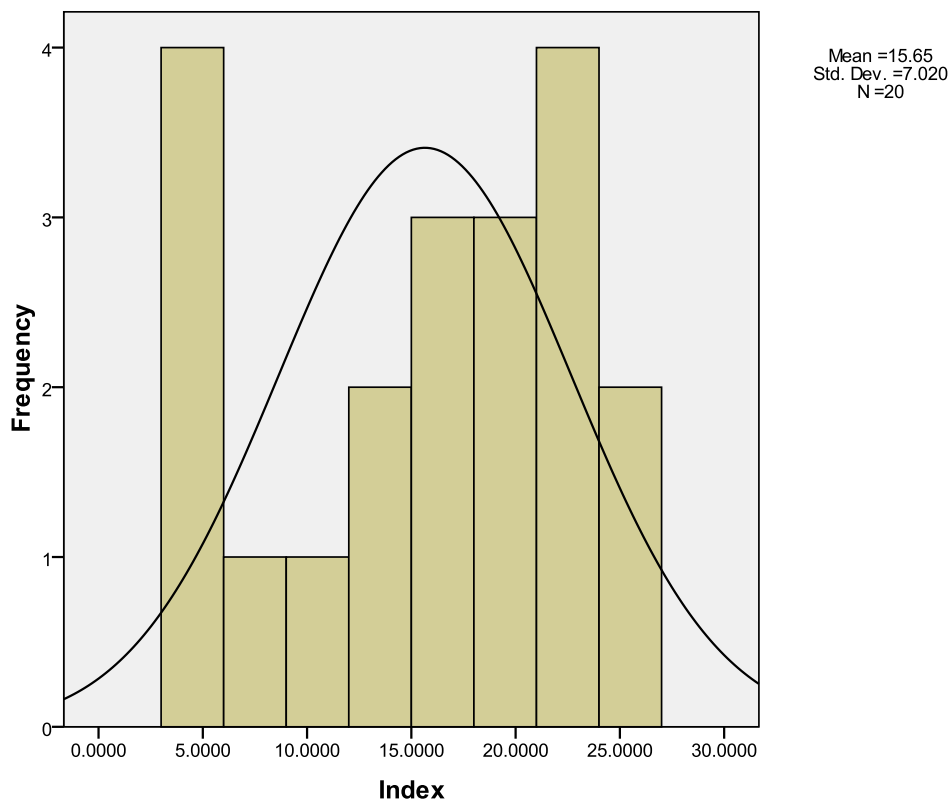
(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol	P1	-9.434*	1.4314891	.000033589	-13.529519	-5.338481
	P2	-13.640*	1.4314891	.000000297	-17.735519	-9.544481
	P3	-17.576*	1.4314891	.000000008	-21.671519	-13.480481
P1 (150 µg/ml)	kontrol	9.434*	1.4314891	.000033589	5.338481	13.529519
	P2	-4.206*	1.4314891	.043092675	-8.301519	-.110481
	P3	-8.142*	1.4314891	.000178705	-12.237519	-4.046481
P2 (300 µg/ml)	kontrol	13.640*	1.4314891	.000000297	9.544481	17.735519
	P1	4.206*	1.4314891	.043092675	.110481	8.301519
	P3	-3.936	1.4314891	.061809168	-8.031519	.159519
P3 (600 µg/ml)	kontrol	17.576*	1.4314891	.000000008	13.480481	21.671519
	P1	8.142*	1.4314891	.000178705	4.046481	12.237519
	P2	3.936	1.4314891	.061809168	-.159519	8.031519

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





Lampiran 9. Histogram Distribusi Normal



**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Febrina Carolina Sandra

NIM : 0910753023

Program Studi : Program Studi Farmasi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, Juli 2013

Febrina Carolina Sandra

NIM. 0910753023