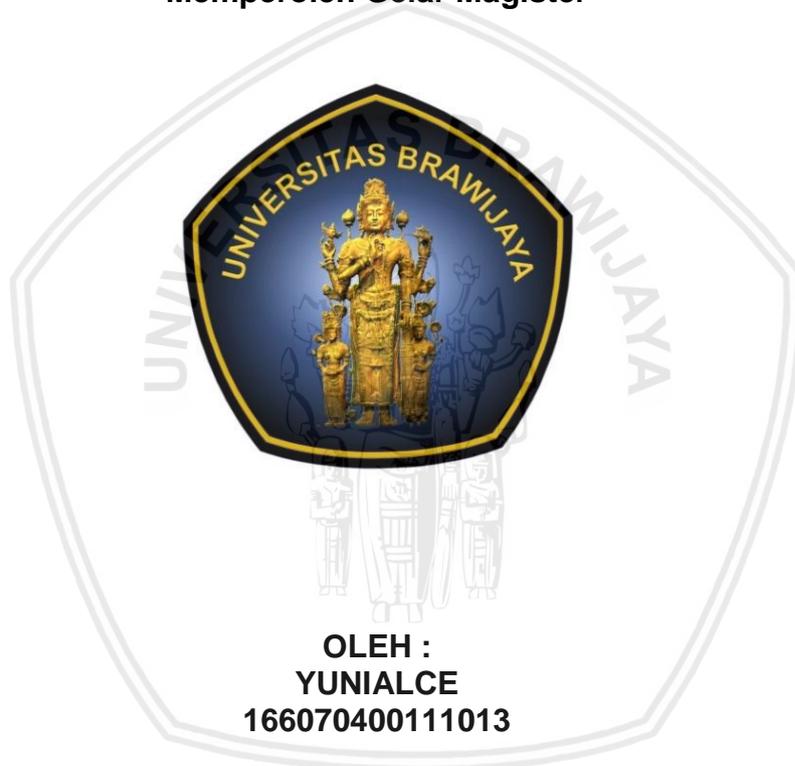


repository.ub.ac.id

**PENGARUH TERAPI KOMBINASI 5-FLUOROURACIL  
DAN EKSTRAK ETHANOL BENALU MANGGA  
(*Denrothoe pentandra L.*) TERHADAP  
APOPTOSIS DAN PROLIFERASI PADA  
KANKER SERVIKS HeLa**

**TESIS**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH :  
YUNIALCE  
166070400111013**

**PROGRAM STUDI MAGISTER KEBIDANAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PERSETUJUAN .....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS .....	iv
HALAMAN PERUNTUKAN .....	v
RINGKASAN .....	vi
<i>SUMMARY</i> .....	viii
KATA PENGANTAR .....	ix
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL .....	xv
DAFTAR GAMBAR .....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvii
DAFTAR SINGKATAN .....	xviii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.3.1 Tujuan Umum .....	5
1.3.2 Tujuan Khusus .....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	6
1.4.1 Manfaat Akademik .....	6
1.4.2 Manfaat Aplikasi.....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>7</b>
2.1 Kanker Serviks .....	7
2.1.1 Epidemiologi Kanker Serviks .....	9
2.1.2 Etiologi dan Patofisiologi Kanker Serviks .....	10
2.1.3 Pencegahan dan Pengobatan.....	13
2.2 Sel HeLa .....	15
2.3 Apoptosis .....	16
2.3.1 Jalur Ekstrinsik Apoptosis .....	17
2.3.2 Jalur Intrinsik Apoptosis .....	17
2.3.3 Morfologi sel dan Perubahan Fisiologis .....	20
2.3.4 Mekanisme Apoptosis terhadap sel kanker.....	20
2.4 Proliferasi .....	22
2.5 Benalu Mangga .....	23
2.5.1 Taksonomi Benalu Mangga .....	23
2.5.2 Deskripsi Benalu Mangga .....	24
2.5.3 Quercetin.....	26



2.5.4	Mekanisme quercetin terhadap sel kanker.....	28
2.6	5-Fluorouracil .....	29
2.6.1	Mekanisme 5-Fluorouracil dalam sel.....	30
<b>BAB 3</b>	<b>KERANGKA KONSEP PENELITIAN</b> .....	<b>33</b>
3.1	Kerangka Teori.....	33
3.2	Kerangka Konsep.....	34
3.3	Hipotesis Penelitian.....	36
<b>BAB 4</b>	<b>METODE PENELITIAN</b> .....	<b>37</b>
4.1	Desain Penelitian .....	37
4.2	Tempat dan Waktu Penelitian.....	37
4.2.1	Tempat Penelitian.....	37
4.2.2	Waktu Penelitian.....	37
4.3	Sampel Penelitian dan Replikasi .....	38
4.4	Pembagian Kelompok dan Penentuan Dosis.....	38
4.5	Variabel Penelitian.....	39
4.5.1	Variabel Independent.....	39
4.5.2	Variabel Dependent.....	39
4.6	Definisi Operasional .....	40
4.7	Bahan dan Alat Penelitian .....	41
4.7.1	Kultur Sel.....	41
4.7.2	Ekstrak Ethanol Benalu Mangga.....	41
4.7.3	5-Fluorouracil.....	41
4.8	Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data .....	41
4.8.1	Kultur Sel.....	41
4.8.2	Pembuatan Ekstrak Ethanol Benalu Mangga.....	43
4.8.3	5-Fluorouracil.....	45
4.8.4	prosedur pemberian perlakuan dan kontrol.....	45
4.8.5	Pengukuran apoptosis dengan Flow cytometri.....	46
4.8.6	Pemeriksaan proliferasi dengan flow cytometri.....	47
4.9	Analisa Data.....	48
4.10	Alur Penelitian .....	50
<b>BAB 5</b>	<b>HASIL PENELITIAN</b> .....	<b>51</b>
5.1	Terapi kombinasi 5-Fluorouracil dan ekstrak benalu mangga meningkatkan apoptosis pada sel HeLa.....	52
5.2	Proliferasi sel HeLa menurun pada terapi kombinasi 5-Fluorouracil dan ekstrak benalu mangga .....	55
<b>BAB 6</b>	<b>PEMBAHASAN</b> .....	<b>58</b>
6.1	Ekstrak benalu mangga yang dikombinasikan dengan 5-Fluorouracil meningkatkan apoptosis pada sel HeLa.....	58
6.2	Terapi kombinasi 5-Fluorouracil dan ekstrak benalu mangga menurunkan proliferasi sel HeLa .....	61
6.3	Keterbatasan Penelitian .....	64
6.4	Implikasi Kebidanan .....	64
<b>BAB 7</b>	<b>PENUTUP</b> .....	<b>65</b>
7.1	Kesimpulan.....	65
7.2	Saran.....	65



DAFTAR PUSTAKA.....	66
LAMPIRAN.....	72
RIWAYAT HIDUP .....	106



**DAFTAR SINGKATAN**

ATCC	: <i>American type culture collection</i>
Anova	: <i>Analisis of variance</i>
APAF1	: <i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
Akt	: <i>A serine/threonine kinase</i>
Bax	: <i>Bcl-2 associated x protein</i>
BrdU	: <i>Bromodeoxyuridine</i>
Bcl-2	: <i>B cell Lymphoma</i>
BB	: <i>Berat Badan</i>
Caspase	: <i>Cystein Aspartyl Specific Protease</i>
CIN	: <i>Cervical intraepithelial neoplasma</i>
DNA	: <i>Deoxyribose nucleat acid</i>
DR	: <i>Death Receptor</i>
dTTP	: <i>deoxythymidine Triphosphate</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ECM	: <i>Ekstraseluler matriks</i>
ER	: <i>Estrogen Receptor</i>
FADD	: <i>Fas associated Death Domain Protein</i>
FUTP	: <i>Fluorouridine Triphosphate</i>
FUDP	: <i>Fluorouridine diphosphate</i>
FUMP	: <i>Fluorouridine monophosphate</i>
FdUTP	: <i>Fluorodeoxyuridine Triphosphate</i>
FdUMP	: <i>Fluorodeoxyuridine monophosphate</i>
FdUDP	: <i>Fluorodeoxyuridine diphosphate</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FIGO	: <i>The International Federation of gynaecology and obsterics</i>
HPV	: <i>Human papillomavirus</i>
HeLa	: <i>Henrietta Lacks</i>
ICTV	: <i>International Council on Taxonomy of virusses</i>

IAPs	: <i>inhibitor of apoptosis protein</i>
MAP3	: <i>Mitogen Activating protein Kinase</i>
MOM	: <i>Mitochondrial outer membran</i>
NaCl	: <i>Natrium chlorida</i>
NF- $\kappa$ $\beta$	: <i>Nuclear factor kappa beta</i>
NO	: <i>Nitrit Oxide</i>
ORFs	: <i>Open reading frames</i>
OPRT	: <i>Orotate Phosphotibosyltransferase</i>
PBS	: <i>Phospate Buffer Saline</i>
P53	: <i>protein 53</i>
PCNA	: <i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PI3K	: <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PV	: <i>Papillomavirus</i>
pRb	: <i>Protein Retinoblastoma</i>
RR	: <i>Ribonucleutida Reductase</i>
RNA	: <i>Ribonucleic acid</i>
Rpm	: <i>Rotasi per menit</i>
RPMI	: <i>Roswell park memorial institute</i>
ROS	: <i>Reactive Oxydation Species</i>
RNS	: <i>Species Nitrogen reaktif</i>
SPSS	: <i>Statistical package for social sciences</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TS	: <i>Thymidilate Synthase</i>
UTP	: <i>Uridine Triphosphate</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>
5-Fu	: <i>5-Fluorouracil</i>



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1</b>	Infeksi HPV pada epitel .....	8
<b>Gambar 2.2</b>	Komponen onkoprotein E6 dan E7 .....	12
<b>Gambar 2.3</b>	Organisasi genom Human Papillomavirus .....	13
<b>Gambar 2.4</b>	Sel HeLa.....	16
<b>Gambar 2.5</b>	Jalur apoptosis .....	19
<b>Gambar 2.6</b>	Mekanisme apoptosis dan karsinogenesis.....	21
<b>Gambar 2.7</b>	Benalu mangga ( <i>Dendrophthoe pentandra.L</i> ).....	24
<b>Gambar 2.8</b>	Struktur kimia quercetin .....	27
<b>Gambar 2.9</b>	Mekanisme quercetin terhadap sel kanker.....	29
<b>Gambar 2.10</b>	Anabolisme dan Katabolisme 5 Fu .....	31
<b>Gambar 3.1</b>	Kerangka teori .....	33
<b>Gambar 3.2</b>	Kerangka konsep.....	34
<b>Gambar 4.1</b>	Alur Penelitian .....	50
<b>Gambar 5.1</b>	Sel HeLa dengan berbagai kelompok perlakuan.....	51
<b>Gambar 5.2</b>	Hasil analisis <i>Flow cytometri</i> apoptosis.....	52
<b>Gambar 5.3</b>	Histogram persentase apoptosis .....	54
<b>Gambar 5.4</b>	Hasil analisis <i>Flow cytometri</i> proliferasi .....	55
<b>Gambar 5.5</b>	Histogram rata-rata proliferasi sel.....	57

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 2.1</b>	Klasifikasi stadium kanker serviks FIGO .....	9
<b>Tabel 4.1</b>	Definisi Operasional.....	40
<b>Tabel 5.1</b>	Uji one way ANOVA.....	53
<b>Tabel 5.2</b>	Uji <i>Kruskal wallis</i> .....	56



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>LEMBAR PERSETUJUAN</b> .....	ii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	iii
<b>RINGKASAN</b> .....	vi
<b>SUMMARY</b> .....	viii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiii
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xiv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan Umum.....	5
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1 Manfaat Akademik.....	6
1.4.2 Manfaat Aplikasi.....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	7
2.1 Kanker Serviks.....	7
2.1.1 Epidemiologi Kanker Serviks.....	9
2.1.2 Etiologi dan Patofisiologi Kanker Serviks.....	10
2.1.3 Pencegahan dan Pengobatan.....	13
2.2 Sel HeLa.....	15
2.3 Apoptosis.....	16
2.3.1 Jalur Ekstrinsik Apoptosis.....	17
2.3.2 Jalur Intrinsik Apoptosis.....	17
2.3.3 Morfologi sel dan Perubahan Fisiologis.....	20
2.3.4 Mekanisme Apoptosis terhadap sel kanker.....	20
2.4 Proliferasi.....	22
2.5 Benalu Mangga.....	23
2.5.1 Taksonomi Benalu Mangga.....	23
2.5.2 Deskripsi Benalu Mangga.....	24
2.5.3 Quercetin.....	26
2.5.4 Mekanisme quercetin terhadap sel kanker.....	28
2.6 5-Fluorouracil.....	29
2.6.1 Mekanisme 5-Fluorouracil dalam sel.....	30
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP PENELITIAN</b> .....	33
3.1 Kerangka Teori.....	33

3.2 Kerangka Konsep.....	34
3.3 Hipotesis Penelitian.....	36
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN.....</b>	<b>37</b>
4.1 Desain Penelitian .....	37
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....	37
4.2.1 Tempat Penelitian .....	37
4.2.2 Waktu Penelitian .....	37
4.3 Sampel Penelitian dan Replikasi.....	38
4.4 Pembagian Kelompok dan Penentuan Dosis .....	38
4.5 Variabel Penelitian .....	39
4.5.1 Variabel Independent .....	39
4.5.2 Variabel Dependent.....	39
4.6 Definisi Operasional .....	40
4.7 Bahan dan Alat Penelitian .....	41
4.7.1 Kultur Sel.....	41
4.7.2 Ekstrak Ethanol Benalu Mangga.....	41
4.7.3 5-Fluorouracil .....	41
4.8 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data.....	41
4.8.1 Kultur Sel.....	41
4.8.2 Pembuatan Ekstrak Ethanol Benalu Mangga.....	43
4.8.3 5-Fluorouracil .....	45
4.8.4 prosedur pemberian perlakuan dan kontrol .....	45
4.8.5 Pengukuran apoptosis dengan Flow cytometri .....	46
4.8.6 Pemeriksaan proliferasi dengan flow cytometri.....	47
4.9 Analisa Data.....	48
4.10 Alur Penelitian .....	50
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>51</b>
5.1 Terapi kombinasi 5-Fluorouracil dan ekstrak benalu mangga meningkatkan apoptosis pada sel HeLa .....	52
5.2 Proliferasi sel HeLa menurun pada terapi kombinasi 5-Fluorouracil dan ekstrak benalu mangga .....	55
<b>BAB 6 PEMBAHASAN .....</b>	<b>58</b>
6.1 Ekstrak benalu mangga yang dikombinasikan dengan 5-Fluorouracil meningkatkan apoptosis pada sel HeLa .....	58
6.2 Terapi kombinasi 5-Fluorouracil dan ekstrak benalu mangga menurunkan proliferasi sel HeLa.....	61
6.3 Keterbatasan Penelitian .....	64
6.4 Implikasi Kebidanan .....	64
<b>BAB 7 PENUTUP .....</b>	<b>65</b>
7.1 Kesimpulan .....	65
7.2 Saran .....	65
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>66</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>72</b>
<b>RIWAYAT HIDUP.....</b>	<b>105</b>



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1</b>	Surat Keterangan Kelaikan Etik .....	72
<b>Lampiran 2</b>	Surat Keterangan bebas plagiasi .....	73
<b>Lampiran 3</b>	Bukti <i>Accepted</i> jurnal .....	74
<b>Lampiran 4</b>	Prosedur kultur sel HeLa .....	75
<b>Lampiran 5</b>	Hasil analisis Flow cytometri terhadap apoptosis ....	79
<b>Lampiran 6</b>	Hasil analisis Flow cytometri terhadap proliferasi ....	86
<b>Lampiran 7</b>	Output SPSS analisis statistik .....	92





## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan yang Maha esa karena atas limpahan rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tulisan tesis yang berjudul **“Pengaruh terapi kombinasi 5-Fluorouracil dan ekstrak ethanol benalu mangga (*Denropthoe pentandra. L*) terhadap apoptosis dan proliferasi pada Kanker Serviks HeLa”**.

Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi kanker serviks, etiologi dan patofisiologinya, apoptosis, mekanisme apoptosis dan mekanisme apoptosis terhadap sel kanker, proliferasi sel, benalu mangga, quercetin dan mekanisme quercetin terhadap sel kanker.

Dengan selesainya tesis ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

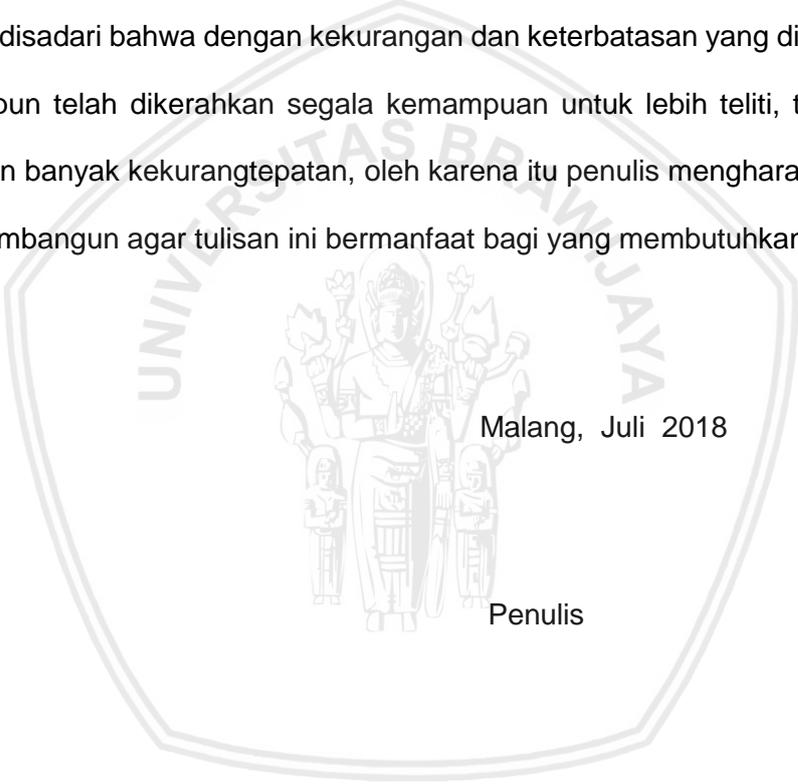
1. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR., MS selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS., selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang periode 2014-2018 beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes., selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, atas izin yang diberikan selama penulis dapat menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.



4. Dr. dr. Bambang Rahardjo, Sp.OG (K), selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan Universitas Brawijaya Malang yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
5. Agustina Tri Endharti, S.Si, Ph.D, selaku ketua komisi pembimbing dan Dr. dr. Tatit Nurseta, Sp.OG (K), selaku anggota komisi pembimbing yang telah memberikan bimbingan dan masukan selama proses penyusunan tesis ini.
6. dr. M. Nooryanto, Sp.OG (K), selaku penguji 1 dan Dr. dr. Karyono Mintaroem, SpPA, selaku penguji 2 yang telah banyak memberikan masukan dan arahan demi kesempurnaan tesis ini.
7. Seluruh Dosen pascasarjana yang telah memberikan didikan, pengetahuan serta banyak membantu selama pendidikan.
8. Pimpinan beserta seluruh staf Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah banyak membantu selama proses penelitian.
9. Kepala Badan Pengembangan Sumber Daya Manusia Kesehatan Kementerian Kesehatan RI, yang telah memberikan dukungan finansial selama penulis menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
10. Risa Rerungan, SKM, M.Kes selaku Sekretaris RSUD Poso yang telah memberikan izin kepada penulis untuk mengikuti pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

11. Orang tua (Kel Pasapari-Kawalangi), kakak (Kel Pasapari-Tarima) dan adik (Kel Pasapari-Lionard) yang terus mendukung penulis dengan doa dan meteri selama menempuh pendidikan.
12. Kelompok tim penelitian kultur sel Hela, Rabiah Umanilo dan Eni Sulastri atas setiap kebersamaan, kekompakan selama proses penelitian
13. Teman-teman angkatan 2016 program studi Magister Kebidanan yang telah berjuang bersama dalam proses pendidikan

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurangtepatan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.



Malang, Juli 2018

Penulis

## RINGKASAN

### Yunialce

Pengaruh Terapi Kombinasi *5-Fluorouracil* dan Ekstrak Etanol Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra.L*) terhadap Apoptosis dan Proliferasi pada Kanker Serviks HeLa. Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Ketua Komisi Pembimbing: Agustina Tri Endharti, S.Si, Ph.D; Anggota: Dr. dr. Tatit Nurseta, SpOG (K).

Peningkatan jumlah penderita kanker serviks setiap tahunnya menjadi masalah kesehatan utama saat ini, di negara-negara berkembang termasuk Indonesia hampir setiap tahun terdapat peningkatan jumlah perempuan yang terdeteksi kanker serviks. Human papilloma virus (HPV) merupakan penyebab dari 90% kanker serviks, tipe high risk yakni tipe 16 dan 18, invasi HPV ke sel squamosa menyebabkan lesi yang merupakan awal pencetus terjadinya kanker, virus menyatu ke DNA menyebabkan over ekspresi dari onkoprotein E6 dan E7 yang menghambat aktivasi dari gen supresor tumor yaitu p53 sehingga sel akan terus membelah dan tidak terkontrol. Terhambatnya kematian sel akibat dari ketidakseimbangan protein pro dan antiapoptosis memungkinkan sel ganas akan terus berkembang, oleh karena itu target pengobatan sel kanker yang terus dikembangkan yaitu dengan menginduksi apoptosis selain pengobatan dengan kemoterapi ataupun radioterapi.

*5-Fluorouracil* menjadi salah satu obat kemoterapi konvensional yang sering digunakan, yang diharapkan dapat membunuh sel-sel kanker, walaupun tidak buruk kemoterapi dengan 5-Fu tidak spesifik ke sel kanker tapi juga membunuh sel normal lainnya serta menyebabkan pasien menjadi resisten karena penggunaan yang berulang dengan dosis yang meningkat, selanjutnya pengembangan pengobatan dengan bahan alam dapat menjadi pilihan dengan mengkombinasikannya dengan agen kemoterapi salah satunya benalu mangga yang memiliki senyawa aktif quercein yang bersifat antikanker dan antiproliferatif.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh terapi kombinasi *5-Fluorouracil* dan ekstrak etanol benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra.L*) terhadap persentase jumlah sel yang mengalami apoptosis dan proliferasi pada kanker serviks. Penelitian *true experimental* dengan *post test only with control group design*, dengan menggunakan sel HeLa yang diperoleh dari ATCC (*American Type Culture Collection*) sel HeLa di kultur dengan menggunakan medium RPMI 1640 (Gibco) saat sel konfluen sel dipanen dan di masukkan pada well plate 24, dibagi menjadi kelompok kontrol negatif, kontrol positif, kelompok perlakuan dengan masing-masing dosis yaitu 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL. Pemeriksaan persentase apoptosis menggunakan Annexin V/propidium iodide selanjutnya dianalisis dengan *flow cytometri* sedangkan proliferasi sel dievaluasi dengan BrdU selanjutnya data dianalisis dengan menggunakan program SPSS versi 18.0.

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan menggunakan Uji ANOVA dan *Kruskal Wallis* diikuti dengan *Least Significant Difference* (LSD) dan *Mann Whithney* didapatkan rata-rata persentase apoptosis meningkat pada kelompok perlakuan yang diberi terapi kombinasi 5-Fu dengan ekstrak ethanol benalu mangga dengan nilai signifikansi  $p=0.000$  ( $p<0.05$ ) semakin meningkat dosis ekstrak ethanol benalu mangga semakin meningkat persentase apoptosis, terdapat perbedaan bermakna dari setiap perlakuan dari masing-masing dosis. Proliferasi sel HeLa yang diberi terapi kombinasi secara signifikan menurun, dengan nilai signifikansi  $p=0.001$  ( $p<0.05$ ) semakin tinggi dosis ekstrak ethanol benalu mangga maka semakin rendah persentase dari proliferasi sel dan terdapat perbedaan yang secara statistik bermakna pada tiga dosis pada terapi kombinasi. Hal ini diduga merupakan efek dari quercetin dimana ekstrak ethanol benalu mangga yang mengandung senyawa quercetin terbukti dapat menghambat pertumbuhan sel tumor, mencegah kanker dan menekan proliferasi sel kanker dengan menginduksi apoptosis.

Terapi kombinasi adalah strategi pengobatan yang paling efektif dalam melawan kanker, faktanya lebih memiliki banyak target dalam terapi kanker dengan berbagai mekanisme yang mungkin merupakan efek dari obat antikanker ataupun bahan alami yang dikombinasikan, dasar pemikirannya terapi kombinasi menggunakan obat yang bekerja dengan mekanisme yang berbeda, sehingga mengurangi kemungkinan perkembangan sel kanker yang resisten. Interaksi agen kemoterapi konvensional dengan bahan alami memungkinkan alternatif baru dalam terapi kanker.



## SUMMARY

### Yunialce

The Effect of Combined 5-Fluorouracil and Ethanol Extract of Mango Mistletoe (*Dendrophthoe pentandra.L*) Therapy on Apoptosis and Proliferation of Cervical Cancer HeLa. Master of Midwifery program faculty of medicine, Brawijaya University. Chairman of supervisor Commision: Agustina Tri Endharti, S.Si, Ph.D; Members: Dr. dr. Tatit Nurseta, SpOG (K).

The increasing number of cervical cancer patients annually becomes a recent major health problem. Developing countries in almost every year, including Indonesia, have an increase of women suffering cervical cancer. Human Papilloma Virus (HPV) is identified as the cause of 90 percent of cervical cancers, high risk type 16 and 18. Invasion of HPV to squamous cells causes lesions that initiate cancer. Virus invaded into the DNA causes over expression of E6 and E7 oncoprotein inhibiting the activation of tumor suppressor gene of p53, therefore cells will continue to divide uncontrollably. Inhibition of cell death, due to the imbalance pro- and anti-apoptosis protein, allows malignant cells to continue growing, therefore cancer treatment targeting apoptosis induction needs to be developed extensively apart from the chemotherapy or radiotherapy treatment.

5-Fluorouracil is one of the most commonly used conventional chemotherapy drugs to kill cancer cells although they are not dire. Chemotherapy with 5-Fu is not only specific to cancer cells but also kills other normal cells. This causes resistant among patients due to repeated usage with increases in doses. Furthermore, the development of treatments using natural ingredients can be an alternative by combining it with chemotherapy agents. One of them is mango mistletoe that has quercetin as active compounds with anticancer and antiproliferative effects.

The aim of this study is to investigate the effect of combined 5-Fluorouracil and ethanol extract of mango mistletoe (*dendrophthoe pentandra.L*) therapy on the percentage of apoptosis and proliferation in cervical cancer cells. This research was a true experimental with post-test only with control group design, using HeLa cells obtained from ATCC (American Type Culture Collection). HeLa cells were cultured using RPMI 1640 (Gibco) medium. Confluent cells were harvested and inserted in 24 well plate, then divided into three groups: negative control, positive control, and treatment group with doses of 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL respectively. Apoptosis percentage was examined using Annexin V/propidium Iodide, then analyzed with flow cytometry while cell proliferation was evaluated with BrdU. Then, the data were analyzed using SPSS program version 18.0.

Based on the statistical analysis results using ANOVA and Kruskal-Wallis tests followed by Least Significant Difference (LSD) and Mann-Whitney, it was found that the average percentage of apoptosis increased significantly in the treatment group treated with the combination of 5-Fu with ethanol extract of mango mistletoe therapy ( $p = 0.000$ ;  $p < 0.05$ ). The higher the dosage of ethanol extract from mango mistletoe, the higher apoptosis percentage is occurred. There was a significant difference from each treatment of each dose. The proliferation of HeLa cells given the combined therapy decreased significantly ( $p = 0.001$ ;  $p < 0.05$ ). The higher the dosage of ethanol extract from mango mistletoe, the lower the percentage of cell proliferation is. There were also significant differences in three doses of combined therapy. This was assumed to be the effect of quercetin contained in ethanol extract of mango mistletoe compounds that could inhibit the growth of tumor cell, prevent cancer and suppress the proliferation of cancer cells by inducing apoptosis.

Combination therapy is the most effective treatment strategy in cancer. In fact, the more targets in cancer therapy with a variety of mechanisms are suggested to be the effects of anticancer drugs or combined natural ingredients. The rationale of combination therapy is that using drugs with different mechanisms reduces the possibility of developing resistant cancer cells. The interaction of conventional chemotherapy agents with natural ingredients allows a new alternative in cancer therapy.







## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1. Latar Belakang

Kanker serviks adalah kanker kedua yang umum terjadi pada perempuan di seluruh dunia. Pada tahun 2015, dilaporkan ada 526.000 perempuan menderita kanker serviks dan 239.000 perempuan meninggal akibat kanker serviks (Kashafi *et al*, 2017). Berdasarkan *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2008 ada sekitar 530.000 kasus baru kanker serviks telah terdeteksi menyerang kalangan perempuan berusia antara 15-44 tahun dan 275.000 perempuan telah kehilangan nyawa setiap tahunnya, (Sulaiman *et al*, 2015). Di negara berkembang seperti Afrika, Amerika selatan, Asia dan Oceania setiap tahun terdapat 445.000 kasus baru dan 230.000 terjadi kematian, di Amerika Serikat pada tahun 2010 ada 12.200 kasus baru dan sekitar 4.210 kematian yang dikaitkan dengan kanker serviks (Sankaranarayanan, 2015; Ganesh *et al*, 2013; Ramesh, 2012).

Indonesia, setiap tahun terdapat sekitar 15.000 kasus baru kanker serviks dan 7.500 kematian terjadi akibat kanker serviks. Kanker Serviks merupakan yang paling sering terjadi pada wanita usia reproduksi 15-44 tahun. Faktor-faktor yang meningkatkan resiko kanker serviks meliputi usia yang terlalu muda saat melakukan hubungan seksual pertama kali, berganti-ganti pasangan, dan paritas tinggi, hal ini tidak jauh berbeda dengan kejadian di negara lain di Asia Tenggara (Domingo, 2008).

Kanker serviks menjadi masalah utama di Indonesia karena sebagian besar pasien datang dalam stadium akhir dari penyakitnya, disebabkan oleh 90% *Human papilloma virus* (Sangthong *et al*, 2014) secara umum setelah terinfeksi dengan HPV *high risk* protein E6 dan E7 meningkat yang akan mengganggu stabilitas fungsi penekan tumor P53, tidak adanya P53 menyebabkan penurunan

pada apoptosis yang menyebabkan proliferasi sel tidak terkendali yang memfasilitasi perubahan sel ke keganasan (Sangthong *et al*, 2014). *Human Papillomavirus* (HPV) ini membutuhkan waktu 10 sampai 15 tahun untuk berubah dari keadaan non berbahaya (pra-kanker) menjadi berbahaya (kanker), perkembangan lesi pre krusor *cervical intraepithelial neoplasia* (CIN) berevolusi perlahan-lahan menjadi kanker invasif, dan persisten beresiko tinggi untuk kanker serviks tipe 16 dan 18 (Wang, 2007).

Ada beberapa pengobatan yang digunakan untuk kanker serviks, radioterapi, kemoterapi dan operasi atau pembedahan, pembedahan di khususnya pada pasien dengan tahap awal sedangkan radioterapi dan kemoterapi efektif namun dapat merusak seluruh sel normal (Kashafi *et al*, 2017). Pembedahan radikal atau radioterapi dapat bersifat kuratif bagi mayoritas pasien kanker serviks stadium dini, sedangkan kemoterapi selalu menjadi pilihan pertama pada pasien dengan stadium lanjut (Ramesh, 2012).). Kemoterapi yang diyakini dapat merusak sel-sel kanker namun juga dapat mempengaruhi beberapa sel-sel sehat dalam tubuh dan menyebabkan efek samping seperti mual, muntah, kerontokan pada rambut, kelelahan, dan tidak tersedianya tindakan profilaksis untuk mengatasi efek samping tersebut (Ganesh *et al*, 2013). Meskipun terdapat kemajuan dalam terapi, pengobatan kanker tetap buruk karena resistensi yang disebabkan oleh sel kanker terhadap obat kemoterapi konvensional sehingga pencarian alternatif baru sangat dibutuhkan (Hemaiswarya dan Doble, 2013).

*5-Fluoruracil* (5-Fu) secara luas digunakan sebagai kemoterapi standar untuk kanker (Sadahiro *et al*, 2011). 5-Fu bekerja dengan menghentikan siklus sel pada fase G1/S yang menyebabkan terhentinya sintesis DNA (Dun *et al*, 2015). Sebagai agen tunggal kemoterapi 5-Fu memiliki efek penyembuhan yang cukup besar namun sangat bersifat toksik sehingga 5-Fu biasanya digunakan dalam terapi kombinasi dengan agen kemoterapi lainnya (Zhang *et al*, 2016). Pada

penelitian yang dilakukan oleh Kashafi *et al* (2017) membuktikan terapi kombinasi kaempferol dan 5-Fu dapat meningkatkan apoptosis pada kanker serviks sel HeLa melalui jalur signal PI3K/Akt dan jalur telomerase (Kashafi *et al*, 2017). Selanjutnya Zhang *et al*, (2016) melaporkan hasil terapi kombinasi matrine yang merupakan bahan alami yang memiliki aktivitas anti tumor dan menghambat pertumbuhan tumor dengan 5-Fu terbukti dapat meningkatkan efektivitas terapeutik serta meningkatkan jumlah apoptosis pada tumor SW480. Terapi kombinasi 5-*Fluorouracil* dan resveratrol yang merupakan phytoalexin alami yang ditemukan pada tanaman terbukti dapat meningkatkan efek 5-*Fluorouracil* dengan menginduksi apoptosis dan mencegah proliferasi sel (Dun *et al*, 2015). Oleh karena itu bahan alami atau herbal digunakan sebagai terapi komplemen dari terapi utama yang dapat menghasilkan efek lebih dan dapat mempercepat kesembuhan.

Benalu tumbuh diberbagai pohon di Indonesia. Benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra.L*) adalah salah satu jenis benalu yang tumbuh dipohon mangga. Benalu adalah tanaman parasit yang banyak digunakan sebagai obat tradisional, dan bukan sebagai pengganti obat terapi standar dalam pengelolaan terapi kanker, benalu berpotensi sebagai agen kemopreventif karena mengandung senyawa flavonoid quercetin. Menurut Rosidah *et al* (1999) kandungan *quercetin* yang terdapat pada benalu mangga mencapai 39,9 mg/g dibandingkan dengan kandungan quercetin pada benalu teh yaitu 9,6 mg/g sehingga quercetin dapat dikombinasikan dengan agen kemoterapi agar dapat mengurangi dosis kemoterapi yang diperlukan (Ikawati *et al*, 2008).

Quercetin merupakan golongan flavonoid terdapat pada tanaman dilaporkan dapat memodulasi sinyal jalur transduksi yang terkait dengan proliferasi sel dan apoptosis (Priyadarsini *et al*, 2010). Huang *et al* menyatakan bahwa quercetin menghambat proliferasi sel HeLa dan menginduksi apoptosis melalui

jalur intrinsik mitokondria (Merino *et al*, 2014). Induksi quercetin flavonoid dapat menekan kelangsungan hidup atau viabilitas sel HeLa dengan cara menghentikan siklus sel pada fase G2/M (Priyadarsini *et al*, 2010). Berdasarkan penelitian dari Endharti *et al* (2016) ekstrak *Denrophanthe pentandra.L* pada tikus model Ca Colon dapat menginduksi p53, dimana p53 memainkan peran sentral pada pencegahan kanker. Beberapa penelitian dilakukan untuk membuktikan bahwa kemoterapi agen kanker dengan menginduksi apoptosis untuk membunuh sel kanker (Ramesh *et al*, 2012), diantaranya penelitian yang mengevaluasi kematian sel apoptosis yang disebabkan oleh induksi quercetin dibebberapa kanker pada manusia yaitu kanker hati, paru-paru, prostat dan kanker kolon yang di fokuskan pada Bcl-2 dan caspase (Priyadarsini *et al*, 2010).

Dari beberapa penelitian diatas tentang terapi kombinasi 5-Fu dan bahan herbal yang mengandung senyawa flavonoid pada terapi kanker, namun belum ada penelitian tentang terapi kombinasi 5-Fu dengan senyawa flavonoid quercetin yang terkandung dalam benalu mangga pada kanker serviks HeLa dimana 5-Fu bekerja pada fase S dengan menghambat sintesis DNA sedangkan quercetin bekerja pada fase G2/M yang mencegah proliferasi sel olehnya itu penelitian ini ditujukan untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi kombinasi 5-Fluorouracil yang merupakan agen kemoterapi standar yang banyak digunakan dalam kemoterapi kanker dan ekstrak ethanol benalu mangga yang mengandung senyawa quercetin yang memiliki aktivitas sebagai antikanker.

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

Apakah terdapat pengaruh terapi kombinasi 5-*Fluorouracil* dan ekstrak ethanol benalu mangga (*Denrophanthoe pentandra.L*) terhadap apoptosis dan proliferasi sel pada Kanker Serviks HeLa

## 1.3. Tujuan Penelitian

### 1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh terapi kombinasi 5-*Fluorouracil* dan ekstrak ethanol benalu mangga (*Denrophanthoe pentandra.L*) terhadap penghambatan sel kanker dalam hal apoptosis dan proliferasi sel pada Kanker Serviks HeLa.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan apakah terapi kombinasi 5-*Fluorouracil* dan ekstrak ethanol benalu mangga (*Denrophanthoe pentandra.L*) dapat meningkatkan apoptosis pada kultur *cell line HeLa*
2. Membuktikan apakah terapi kombinasi 5-*Fluorouracil* dan ekstrak ethanol benalu mangga (*Denrophanthoe pentandra.L*) dapat menurunkan proliferasi sel pada kultur *cell line HeLa*
3. Mengetahui dosis ekstrak ethanol benalu mangga (*Denrophanthoe pentandra.L*) yang paling bermakna dalam terapi kombinasi dengan 5-*Fluorouracil* terhadap peningkatan persentase apoptosis
4. Mengetahui dosis ekstrak ethanol benalu mangga (*Denrophanthoe pentandra.L*) yang paling bermakna dalam terapi kombinasi dengan 5-*Fluorouracil* terhadap penurunan proliferasi sel

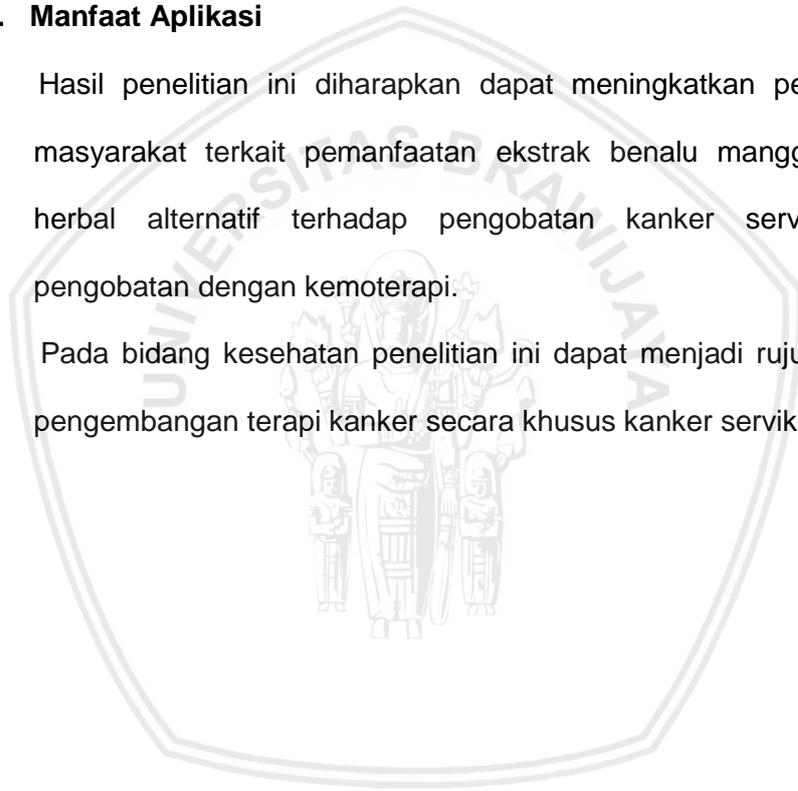
## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Akademik

1. Penelitian ini memberikan pengetahuan terkait pemanfaatan ekstrak ethanol benalu mangga sebagai terapi kombinasi dengan kemoterapi terhadap apoptosis dan proliferasi sel pada kanker serviks HeLa.
2. Hasil penelitian sebagai dasar dalam pengembangan penelitian selanjutnya.

### 1.4.2. Manfaat Aplikasi

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan pengetahuan masyarakat terkait pemanfaatan ekstrak benalu mangga sebagai herbal alternatif terhadap pengobatan kanker serviks selain pengobatan dengan kemoterapi.
2. Pada bidang kesehatan penelitian ini dapat menjadi rujukan dalam pengembangan terapi kanker secara khusus kanker serviks.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Kanker Serviks

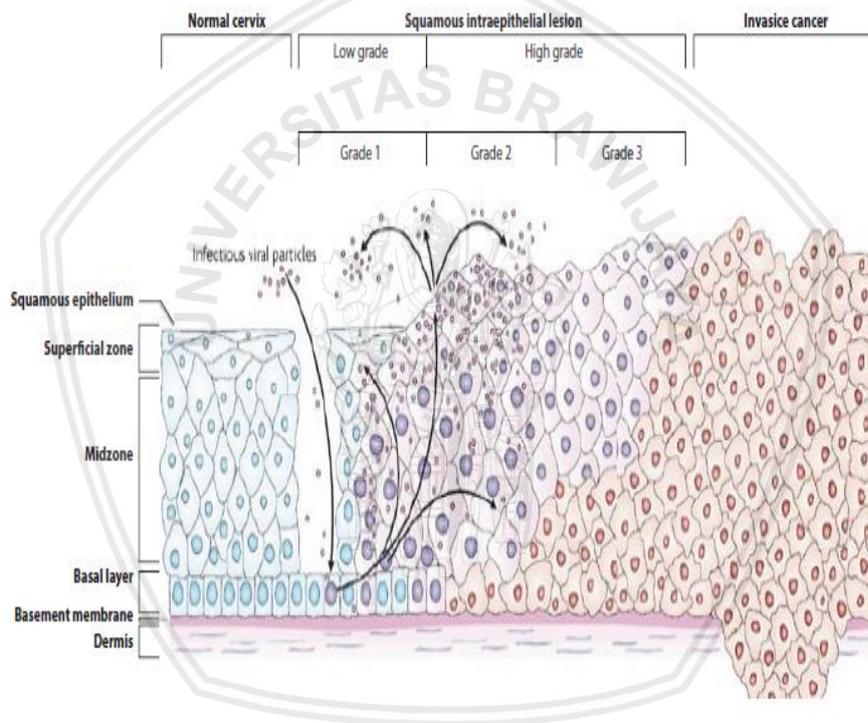
Kanker ditandai dengan proliferasi sel abnormal yang menyebabkan pertumbuhan sel, difensiasi sel, dan proliferasi sel yang tidak terkontrol dan disebabkan karena perubahan genetik. Jenis kanker yang paling sering terjadi pada wanita adalah payudara, leher rahim, ovarium, kerongkongan, mulut, dari jumlah tersebut kanker serviks menduduki urutan kedua yang terjadi di kalangan perempuan di dunia (Dasari *et al*, 2015).

Kanker serviks adalah istilah untuk keganasan neoplasma yang timbul dari sel-sel yang berasal dari serviks uteri. Salah satu gejala dari kanker serviks ialah pengeluaran cairan vagina yang bersifat patologi, namun pada beberapa kasus tidak disertai gejala yang jelas sampai kanker telah berkembang menjadi stadium lanjut. Gejala awal perdarahan pervaginam yang tidak normal biasanya setelah melakukan hubungan seksual dan perdarahan setelah periode menopause, keputihan yang terus menerus, berubah warna dan berbau, gejala yang berat dirasakan apabila kanker sudah menyebar ke organ lain misalnya kandung kemih, paru-paru, usus dan hati (Jadon *et al*, 2012).

Kanker serviks adalah keganasan ginekologi yang paling umum terjadi dan melibatkan pembelahan sel yang tidak terkontrol dari serviks uteri (Lopes *et al*, 2017; Dasari *et al*, 2015). Kanker serviks adalah keganasan ketiga dan penyebab keempat mortalitas pada wanita di seluruh dunia (Deng *et al*, 2016). Infeksi yang terus menerus oleh *Human papillomavirus* dikenali sebagai faktor penyebab utama kanker serviks, namun terdapat bukti lainnya bahwa paparan HPV saja tidak cukup untuk perkembangan kanker faktor lainnya seperti sel inang berperan penting dalam proses transformasi keganasan serviks oleh karena itu, identifikasi yang

baik serta diagnosis penting sebagai tindakan pencegahan dan pengobatan dari kanker serviks (Deng *et al*, 2016).

Kanker serviks dimulai dari sel-sel dipermukaan leher rahim, ada dua jenis sel pada permukaan serviks sel skuamosa dan sel kolumnar. Sebagian besar kanker serviks dimulai dari sel skuamosa dan berkembang perlahan-lahan yang dimulai dari kondisi pra kanker atau displasia dan membutuhkan waktu bertahun-tahun untuk berubah menjadi kanker, kondisi displasia tersebut pada umumnya dapat terdeteksi dengan pap smear (Jadon *et al*, 2012).



**Gambar 2.1 : Infeksi HPV pada epitel**

(a) HPV menginfeksi lapisan basal (b) infeksi ke seluruh epitel (c) menyebar menembus lapisan basal (Novel *et al*, 2012).

*The International Federation of Gynaecology and Obstetrics* (FIGO) menetapkan stadium klinis dari kanker serviks yaitu dengan mempertimbangkan hasil pemeriksaan fisik, kolposkopi, histopatologi (biopsi serviks atau konisasi) radiografi, endoskopi (Petignat Roy, 2007). FIGO mengklasifikasikan stadium klinis dari kanker serviks yang juga dapat menjadi acuan dalam menentukan diagnosis dan penatalaksanaan kanker serviks (Petignat Roy, 2007).

**Tabel 2.1**  
**Klasifikasi stadium kanker serviks berdasarkan *The International Federation of Gynaecology and Obstetrics (FIGO)***

Stadium	Keterangan
<b>0</b>	Carsinoma in situ
<b>IA1</b>	Karsinoma invasif, terbatas pada serviks, diagnosa hanya dengan mikroskopi, invasif stroma $\leq 3\text{mm}$ dan $\leq 7\text{mm}$ penyebarannya horisontal
<b>IA2</b>	Karsinoma invasif, terbatas pada serviks, diagnosa hanya dengan mikroskopi, invasif stroma $\geq 3\text{mm}$ dan $\geq 7\text{mm}$ penyebarannya horisontal
<b>IB1</b>	Karsinoma invasif, terbatas pada serviks, lesi mikroskopik atau lesi klinis terlihat $\leq 4\text{ cm}$ pada dimensi besar
<b>IB2</b>	Karsinoma invasif, terbatas pada serviks, lesi klinis terlihat $>4\text{ cm}$ pada dimensi besar
<b>IIA</b>	Ektensi tumor diluar serviks sampai ke vagina tapi tidak sampai sepertiga bagian vagina dan tidak ada invasi parametrial
<b>IIB</b>	Ektensi tumor diluar serviks, invasi parametrial tapi tidak sampai ke pelvis, dinding vagina, tapi tidak sampai sepertiga bagian vagina
<b>IIIA</b>	Ekstensi tumor sampai sepertiga bagian vagina tapi tidak ke pelvis
<b>IIIB</b>	Ekstensi tumor ke pelvis, menyebabkan hidronefrosis dan gangguan fungsi ginjal
<b>IVA</b>	Invasi tumor sampai ke bladder dan rectum
<b>IVB</b>	Metastase luas

### 2.1.1 Epidemiologi kanker serviks

Kanker serviks mewakili 9% kasus keganasan pada wanita dan merupakan penyebab utama ketiga kanker pada wanita di seluruh dunia, dengan lebih dari 529.000 kasus baru dan 275.000 kematian per tahun. 85% dari kanker serviks terjadi di negara berkembang dengan perkiraan prevalensi kanker serviks adalah 11,7%, angka morbiditas dan mortalitas yang disebabkan oleh kanker serviks di negara maju dan negara berkembang berbeda, dimana di negara berkembang pencegahan dan pengendalian kanker serviks belum adekuat. Di negara maju kejadian kanker serviks berkurang sekitar 80% sebagai hasil dari efektifnya pelaksanaan program deteksi dini dan penanganan lesi pra kanker, sebaliknya di

negara berkembang masih terkendala dengan sistem kesehatan yang masing-masing di terapkan sehingga masyarakat masih kesulitan untuk melakukan skrining dan upaya pencegahan serta upaya pengobatan (Freitas *et al*, 2012).

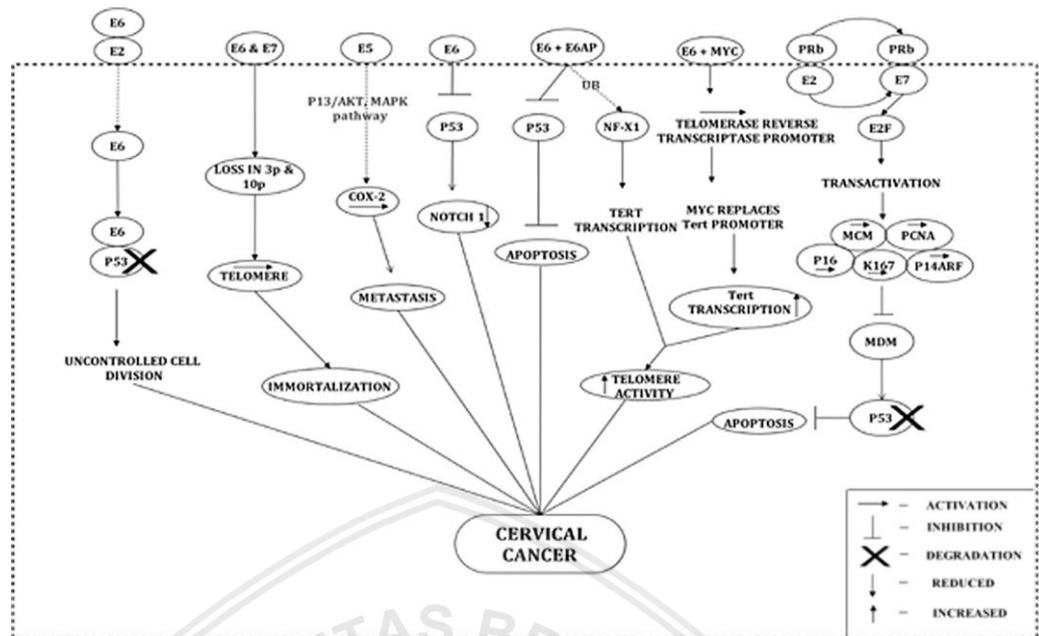
Di Indonesia, kanker serviks merupakan kanker dengan jumlah penderita terbanyak dengan jumlah 432 kasus diantara 918 kasus keganasan pada perempuan. Hal ini disebabkan karena penderita datang untuk memeriksakan diri sudah pada stadium lanjut. Keterlambatan diagnosis, keadaan umum penderita lemah, status sosial ekonomi rendah, terbatasnya sumber daya, keterbatasan sarana dan prasarana, tingkat pendidikan berpengaruh dalam menentukan prognosis bagi penderita (Rasjidi, 2009).

### **2.1.2 Etiologi dan patofisiologi kanker serviks**

Human Papillomavirus (HPV) merupakan penyebab utama dari kanker serviks, HPV diklasifikasikan menurut genotipe dan potensi onkogeniknya, HPV *low risk* (non onkogenik) adalah HPV tipe 6, 11, 42, 43, dan 44 sedangkan tipe *high risk* (onkogenik) adalah tipe 16, 18, 31, 33, 34, 39, 45, 51 (Lopes *et al*, 2017). Berdasarkan *International Council on Taxonomy of Viruses* (ICTV) HPV termasuk dalam family papillomaviridae yang terdiri dari 29 generasi dan 189 papillomavirus (PV), termasuk 120 Human papillomavirus, 69 PV non mamalia, 3 PV pada burung dan 2 PV pada reptil, semua PV memiliki fitur yang sama dan memiliki genom DNA beruntai ganda (Freitas *et al*, 2012). virus ini telah berkembang selama bertahun-tahun dan tersebar pada berbagai spesies yang berbeda termasuk manusia (Doorbar *et al*, 2016). Genom HPV dibagi menjadi dua bagian gen E atau di sebut *early gen* merupakan bagian yang mengatur sintesis protein di awal sedangkan gen L berfungsi mengatur sintesis protein yang menyusun struktur atau disebut *late gen* (Novel *et al*, 2012).

Terbentuknya lesi adalah awal pencetus terjadinya kanker, infeksi oleh HPV menyebabkan adanya perubahan morfologi dan pembelahan sel akibat proliferasi yang tidak terkendali dan terhambatnya diferensiasi sel oleh karena itu, terjadinya kanker serviks berkaitan erat dengan siklus sel dengan protein utama adalah E6 dan E7 (Novel *et al*, 2012).

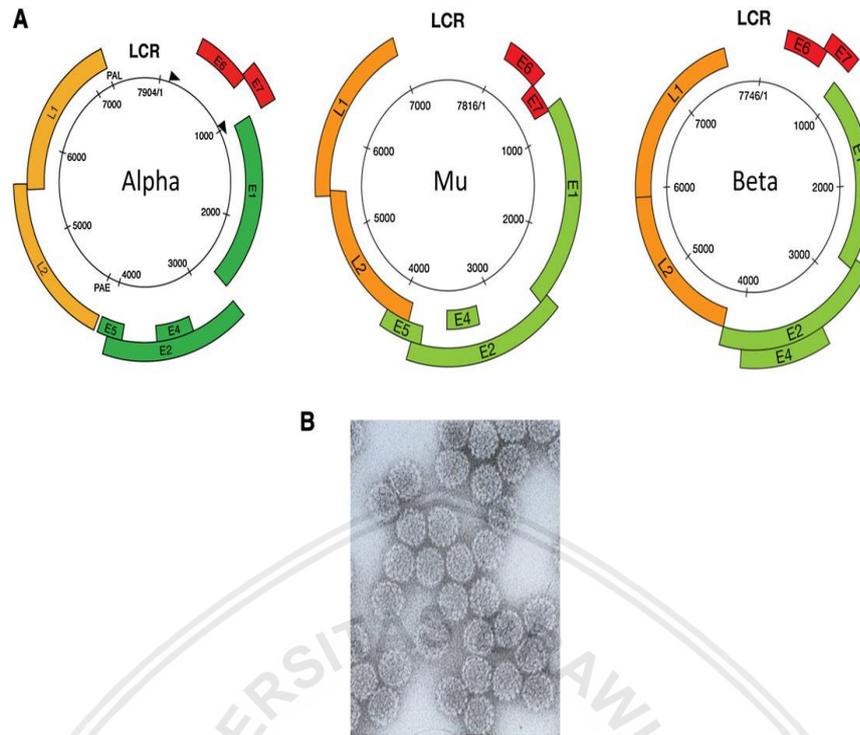
Mekanisme infeksi pada kanker serviks lebih dititik beratkan pada HPV tipe 16 dan 18, dan beberapa onkoprotein yang terekspresi pada fase awal infeksi yaitu E5, E6, dan E7 sebagai onkoprotein utama pada perkembangan kanker serviks (Ramakrishnan *et al*, 2015). Setelah virus HPV menyatu ke DNA (*Deoxy ribonucleat Acid*) manusia terjadi peningkatan dari ekspresi E6 dan E7, dimana E6 mencegah aktivasi dari tumor supresor yaitu p53 sedangkan E7 menghambat pRb, yang mengendalikan pembelahan sel dengan menghalangi aktivitas faktor transkripsi, akibat dari meningkatnya sintesis E6 dan E7 induksi E2 terganggu dimana E2 berperan dalam mengatur transkripsi, mengikat dan menahan aktivitas E6 dan E7 dalam sel (Ramakrishnan *et al*, 2015). Saat E6 dan E7 tidak berikatan dengan E2, E6 bebas untuk berikatan dengan p53 dan E7 berikatan dengan pRb, sehingga p53 dan pRb tidak berfungsi sebagai penekan tumor, tidak berfungsinya p53 memungkinkan sel akan terus membelah tidak terkontrol dan menghasilkan sel dengan fenotip ganas (Ramakrishnan *et al*, 2015).



**Gambar 2.2 : Komponen utama dari E6 dan E7**

E6 dan E7 sebagai onkoprotein dalam mekanisme molekuler HPV tipe 16 dan 18 etiologi kanker serviks (Doorbar *et al*, 2016).

Meskipun terdapat perbedaan yang berhubungan dengan penyakit yang disebabkan, struktur dari papillomavirus umumnya icosahedral tidak terbungkus, genom sirkuler DNA beruntai ganda atau episom, terdiri dari 8000 pasang basa yang mengandung 8 atau 9 ORFs, memiliki ukuran kecil (diameter 50-60 nm) namun jumlah protein yang dihasilkan jauh lebih besar (Doorbar *et al*, 2016).



**Gambar 2.3 : Organisasi Genom Human Papillomavirus**

(A) Organisasi genom Alpha, Mu, dan Beta HPV *high risk*, meskipun memiliki genetik yang sama namun ukuran dan posisi pada ORF bervariasi, HPV Beta kekurangan ORF E5. Posisi promotor utama ditandai dengan panah pada peta genom Alpha HPV *high risk*. (B) Elektron mikrograf dari partikel HPV, partikel HPV berukuran sekitar 55 nm dan tidak terbungkus (Doorbar *et al*, 2016).

### 2.1.3 Pencegahan dan Pengobatan

Fakta bahwa infeksi HPV *high risk* menyebabkan kanker serviks, menghasilkan dua pendekatan baru dalam pengendalian kanker serviks yaitu pencegahan primer dengan vaksinasi pada pra remaja dan remaja (usia 9-18 tahun), pencegahan sekunder berupa deteksi dini lesi pra kanker dengan skrining HPV pada wanita usia 30 tahun lebih dan pencegahan tersier yaitu pengobatan untuk mengurangi morbiditas dan mortalitas (Sankaranarayanan, 2015; Kessler, 2016). Terdapat dua jenis vaksin rekombinan yang mengandung partikel virus yang tersedia saat ini yakni vaksin quadrivalent yang menargetkan HPV onkogenik tipe 16, 18, 6, 11, dan vaksin bivalen yang menargetkan HPV tipe 16 dan 18, kedua vaksin tersebut menunjukkan imunogenitas yang baik terhadap perlindungan

infeksi persisten vaksinasi kedua vaksin tersebut berpotensi mencegah 70% kanker serviks pada perempuan yang mendapatkan vaksin yang memadai dalam artian sesuai dengan dosis pemberian vaksin. Vaksinasi HPV saat ini merupakan bagian dari program imunisasi nasional di 62 negara dengan sasaran pra remaja dan remaja, namun di beberapa negara implementasi program ini masih sulit karena besarnya biaya menjadi masalah utama (Sankaranarayanan, 2015).

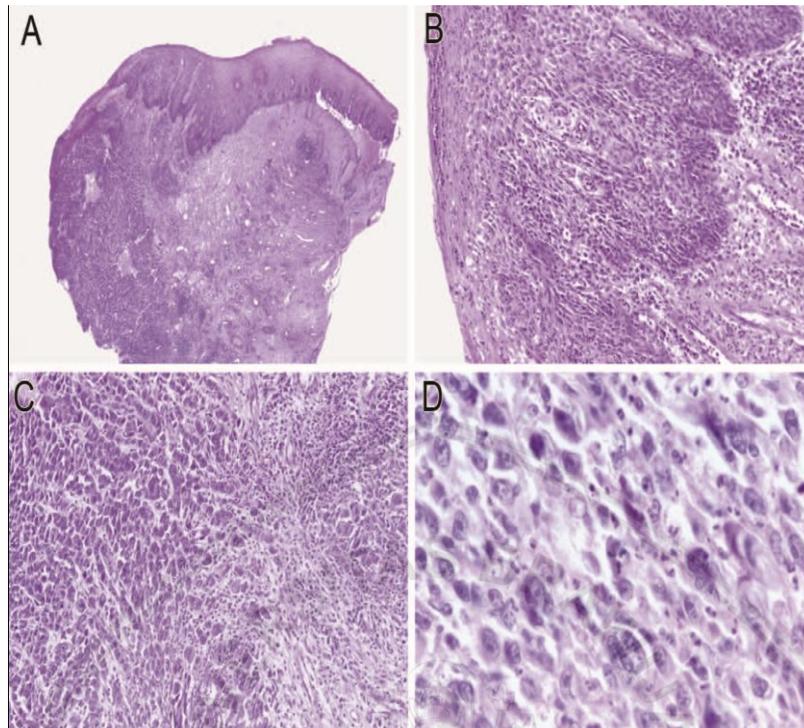
Penderita kanker serviks dengan stadium 1A1 yang telah terdiagnosis, jika tidak terlihat metastase pada kelenjar getah bening penderita bisa diobati secara konservatif, histerektomi sub total atau dengan konisasi jika penderita masih ingin memiliki anak atau tetap mempertahankan kesuburan, namun biasanya praktisi lebih menyukai penatalaksanaan dengan operasi radikal atau dengan radiasi (Petignat dan Roy, 2007). Penderita dengan stadium 1A2, 1B1, dan IIA penatalaksanaan dengan histerektomi radikal menjadi pilihan dengan tetap memperhatikan kelangsungan fungsi dari ovarium, dan juga radioterapi sama efektifnya dengan penatalaksanaan kanker serviks stadium awal sedangkan penderita dengan stadium 1B2 (tumor >4 cm) sebagian besar membutuhkan radioterapi adjuvant dan kemoradioterapi sebagai pengobatan pilihan, penderita stadium dini yang disertai dengan pembesaran tumor, stroma, dengan invasi ke limfavaskular lebih beresiko mengalami kejadian berulang setelah penanganan. Pengelolaan penderita dengan stadium lanjut yakni stadium IIB, III, IVA kemoterapi dan operasi radikal diharapkan dapat memberikan kelangsungan hidup bagi penderita, selanjutnya pengelolaan pada stadium IVB profil toksisitas sangat berpengaruh dalam menentukan pengobatan, lebih difokuskan pada penanganan yang bersifat paliatif (Petignat dan Roy, 2007).

Prognosis pasien dengan kanker serviks buruk, mekanisme yang tepat untuk penanganan kanker serviks masih belum tepat, pemahaman tentang patogenesis kanker serviks akan membantu mengembangkan terapi yang efektif untuk penyakit tersebut (Sun Qing *et al*, 2017).

Kemoterapi merupakan pilihan utama dalam memerangi kanker, pendekatan kemoterapi yang di gunakan berbeda-beda di setiap pusat layanan kesehatan (Kacar *et al*, 2017). Mayoritas obat yang digunakan untuk kemoterapi kanker memiliki efek toksisitas yang tinggi sehingga penggunaannya dibatasi, karena pada dasarnya reaksi obat tersebut tidak spesifik ke sel kanker dan menunjukkan toksisitas yang paralel dan kontinyu pada sel normal (Sharma *et al*, 2017). Meningkatnya penggunaan agen kemoterapi yang berasal dari tanaman yang menghasilkan efek anti proliferaatif dan terbukti dapat menginduksi apoptosis baik melalui jalur ekstrinsik atau melalui jalur mitokondria, karena kegagalan pada jalur sinyal apoptosis akan menyebabkan proliferasi sel yang tidak terkontrol yang dapat menyebabkan berkembangnya sel kanker (Priyadarsini *et al*, 2010 ; Sharma *et al*, 2017).

## **2.2 Sel line HeLa**

Sel line manusia dapat digunakan sebagai model pada penelitian biologi dan penyakit (Mittelman dan Wilson, 2013). Sel HeLa adalah sel line yang kuat dan bertahan, mudah diperbanyak secara kultur. Sel HeLa menjadi sel kanker manusia pertama dan digunakan oleh peneliti di seluruh dunia (Lucey *et al*, 2009). Sel line HeLa berasal dari sel kanker seorang pasien bernama Henrietta Lacks (Landry *et al*, 2013). Biopsi serviks dari Henrietta lacks terus dikembangkan pada laboratorium kultur jaringan, sel ini digunakan pada penelitian untuk mengembangkan terapi pada kanker serviks. Sel HeLa terbukti mengandung HPV 18 yang dihubungkan dengan adenokarsinoma yang sangat agresif (Lucey *et al*, 2009).



**Gambar 2.4 : Sel HeLa**

A) sekilas bagian dari spesimen biopsi serviks Henrietta Lacks, epitel squamosa di kanan atas tampak normal, B) bagian epitel di kiri atas mengandung karsinoma in situ, C) bagian kiri bawah menunjukkan infiltrasi karsinoma, D) infiltrasi karsinoma menunjukkan pleomorphism ganas (hematoxylin-eosin, perbesaran asli 5 (A), 64 (B dan C), 100 (D)) (Lucey *et al*, 2009).

### 2.3 Apoptosis

Apoptosis adalah kematian sel yang terprogram, dan memegang peran penting dalam perkembangan dan homeostatis jaringan, dimana apoptosis berperan dalam penghapusan sel yang tidak diinginkan untuk mempertahankan kelangsungan hidup sel (Hassan *et al*, 2014).

Memahami akan mekanisme apoptosis sangat penting khususnya dalam membantu pengobatan penyakit, yang menggunakan obat-obatan yang menargetkan apoptosis melalui jalur apoptosis itu sendiri. Caspase merupakan peran sentral dari apoptosis karena sebagai inisiator dan penggerak dari apoptosis, ada tiga jalur dalam mengaktifkan caspase jalur inisiasi yang terdiri dari jalur intrinsik (jalur mitokondria) dan jalur ekstrinsik (*death receptor*), sedangkan

jalur kedua adalah jalur umum atau tahap pelaksanaan dari apoptosis, dan jalur ketiga yang kurang populer yakni jalur intrinsik endoplasma (Rebecca, 2011).

### 2.3.1 Jalur Ekstrinsik Apoptosis

Jalur ini terkait dengan pengikatan ligan terhadap reseptor kematian pada permukaan sel yaitu TNF (TNFR1) dan FasL. Reseptor kematian ini memiliki domain kematian intraseluler yang merekrut protein adaptor seperti *fas associated death domain protein* (FADD), TNF dan caspase 8 yang mengikat ligan kematian (Rebecca, 2011). Ikatan ini akan menarik pro caspase 8 dan pro caspase 8 akan diubah menjadi bentuk aktifnya yakni caspase 8 dan kemudian dilepaskan ke dalam sitosol, yang pada akhirnya akan memulai untuk menginduksi apoptosis, sedangkan Fas berikatan dengan protein adaptor yang mengaktifkan *mitogen activating protein kinase* (MAP3). Fosforilasi yang meningkat pada reseptor permukaan sel misalnya sitokin, TNF akan berikatan dengan reseptor kematian (TNFR1) dan *fas associated death domain protein* (FADD). Kompleks ini yang kemudian mengikat caspase 8, sebagai caspase inisiator yang mengaktifasi caspase eksekutor apoptosis yakni caspase 3 (Merino *et al*, 2014).

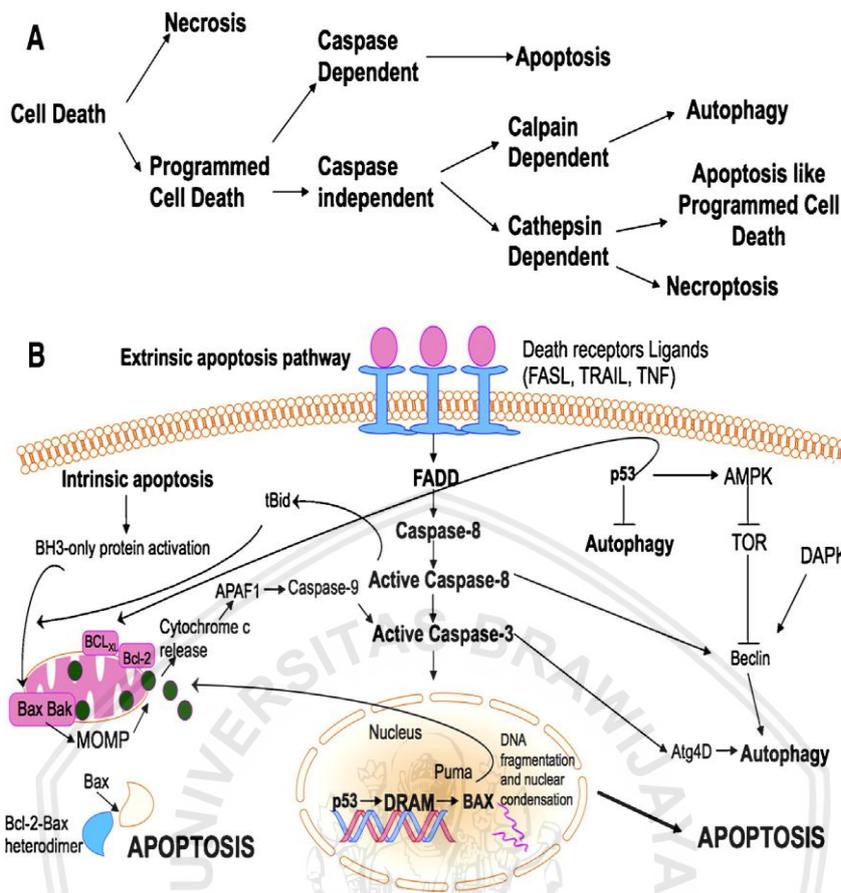
### 2.3.2 Jalur Intrinsik Apoptosis

Jalur mitokondria intrinsik dimulai dalam sel, stimulus internal seperti kerusakan gen yang tidak dapat diperbaiki, hipoksia, dan peningkatan stres oksidatif menjadi pemicu apoptosis pada jalur ini. Dimulai dengan peningkatan permeabilitas mitokondria serta pelepasan molekul pro apoptosis yakni sitokrom c. Terlepas dari adanya stimulus, jalur mitokondria ini di kendalikan oleh kelompok protein yang merupakan famili B cell Lymphoma 2 (Bcl-2) yaitu protein pro apoptosis (Bax, Bid,) anti apoptosis (Bcl-2, bcl-XL) (Rebecca, 2011).

Mitokondria menginduksi apoptosis dengan melepaskan sitokrom c ke dalam sitosol, sitokrom tersebut melepaskan multiprotein kompleks yang mengaktifasi *cysteine aspartyl specific proteases* (caspase) disebut apoptosom

yakni Apaf-1 dan procaspase 9 (Hassan *et al*, 2014). Procaspase 9 dan Apaf-1 bertanggung jawab untuk mengaktivasi caspase 9 sebagai inisiator caspase yang secara proteolitik mengaktifkan caspase 3, caspase 6, dan caspase 7 yang merupakan caspase efektor yang menginduksi apoptosis (Merino *et al*, 2014).





**Gambar 2.5 : Jalur Apoptosis**

Jalur apoptosis (A) Jalur berbeda selama proses aktivasi kematian sel. (B) Apoptosis dapat terjadi karena adanya rangsangan eksternal yang di pengaruhi oleh reseptor (jalur ekstrinsik) atau pun melalui jalur mitokondria (jalur intrinsik). Jalur ekstrinsik dipengaruhi oleh beberapa reseptor kematian seperti FASL, TRAIL, TNF. Sehingga, molekul adaptor FADD juga diketahui sebagai domain protein kematian terkait dengan FAS, reseptor kematian ini mengaktifasi caspase 8 sehingga caspase 8 mengaktifkan caspase -7 atau caspase-3 yang menyebabkan apoptosis. Sedangkan jalur intrinsik dimodulasi oleh aktivasi protein BH3 yang memicu beberapa jenis stres pada sel seperti kerusakan DNA atau adanya tekanan pada ER yang kemudian mengaktifkan BAX pada embran luar mitokondria (MOM). Permeabilisasi MOM (MOMP) menyebabkan pelepasan dari molekul mediator apoptosis yang berbeda seperti sitokrom C, yang mengaktifkan caspase -9. pembentukan formasi autophagosome memerlukan aktivasi beclin 1 yang berperan sebagai komponen kompleks multiprotein (P13K). Komunikasi antara autophagy dan apoptosis dimediasi oleh sebagian dari interaksi fungsional dan struktur antara beclin 1 dan protein anti apoptosis BCL-2 dan BCL-XL. Rangsangan apoptosis yang beragam baik dari jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik dapat menyebabkan aktivasi dari caspase. Gen supresor tumor p53 memiliki peran penting dalam apoptosis dan autophagy. Selain apoptosis p53 juga bisa menginduksi autophagy melalui hambatan pada TOR dan juga aktivasi faktor transkripsi DRAM (Muqbil *et al*, 2015).

### 2.3.3 Morfologi Sel dan Perubahan Fisiologis Selama Apoptosis

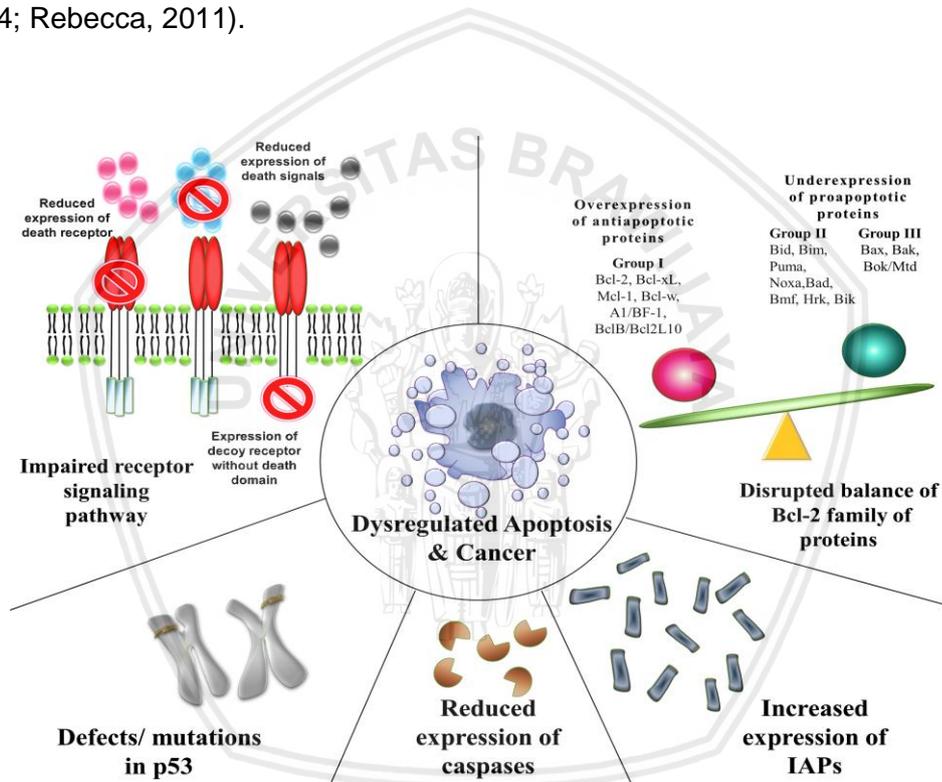
Perubahan morfologi apoptosis dapat di lihat dengan mikroskop cahaya, dan mikroskop elektron untuk mendapatkan hasil yang lebih baik dari pengamatan. Perubahan ciri morfologi pada apoptosis di dalam nukleus yaitu adanya kondensasi kromatin, fragmentasi DNA yang disertai dengan perubahan pada sel, serta penurunan volume seluler. Kondensasi kromatin dimulai dari tepi membran nukleus, membentuk struktur seperti cincin (Rebecca, 2011).

### 2.3.4 Mekanisme apoptosis terhadap sel kanker

Beberapa protein dilaporkan memiliki aktivitas sebagai pro apoptosis dan anti apoptosis dalam sel diantaranya keluarga protein Bcl-2, protein tersebut memainkan peran penting dalam regulasi kematian sel misalnya kelebihan atau kekurangan ekspresi gen tertentu (protein pengatur) dapat berkontribusi pada karsinogenesis dengan mengurangi apoptosis pada sel kanker (Rebecca, 2011).

Hambatan terhadap mekanisme kematian sel terprogram atau apoptosis menyebabkan perkembangan terhadap patogenesis tumor, dan memungkinkan sel-sel neoplastik untuk hidup, dan memberikan perlindungan terhadap stres oksidatif dan hipoksia sehingga menyebabkan perkembangan dari tumor. hal tersebut menyebabkan terjadinya perubahan genetik, regulasi proliferasi sel, gangguan terhadap diferensiasi, meningkatkan angiogenesis, selama perkembangan tumor. Apoptosis sebagai mekanisme pertahanan sel karena kerusakan DNA yang terjadi sesaat sebelum sintesis dan replikasi terdeteksi pada saat *Checkpoint* fase G1/S pada siklus sel mendorong sel tersebut untuk bunuh diri sehingga kelangsungan hidup sel yang tidak stabil secara genetik terhenti sehingga tidak terjadi proliferasi sel yang tidak stabil dan menghentikan perkembangan tumor. Ada beberapa mekanisme molekuler yang digunakan sel tumor untuk menekan terjadinya apoptosis, seperti mengganggu keseimbangan

protein antiapoptosis yaitu Bcl-2 dan protein proapoptosis yakni BAX, ekspresi Bcl-2 dan BAX diatur oleh gen supresor tumor yaitu p53, mengurangi fungsi caspase, dan mengganggu sinyal *death receptor*. Dengan demikian regulasi apoptosis yang tidak teratur atau terganggu merupakan hal mendasar dalam perkembangan tumor dan proliferasi sel kanker, oleh karena itu pemberantasan sel kanker dengan menginduksi apoptosis merupakan salah satu pendekatan pengobatan kanker selain pengobatan konvensional yakni radioterapi dan kemoterapi (Hassan *et al*, 2014; Rebecca, 2011).



**Gambar 2.6 : Mekanisme kontribusi apoptosis dan karsinogenesis**

over ekspresi atau under ekspresi protein pengatur yang memiliki aktivitas pro dan antiapoptosis menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan protein keluarga Bcl-2, sehingga menyebabkan peningkatan ekspresi IAPs (inhibitor of apoptosis protein), berkurangnya ekspresi caspase menyebabkan terganggunya fungsi p53 (Rebecca, 2011)

## 2.4 Proliferasi

Proliferasi sel proses menghasilkan sel dari satu sel menjadi dua sel, hal ini diperlukan untuk pertumbuhan sel itu sendiri dan selanjutnya akan diikuti oleh pembelahan sel, proliferasi sel yang tidak terkontrol sebagai tanda khas dari keganasan atau kanker. Pada jaringan normal, proliferasi sel pada umumnya terbatas pada sel yang terdapat di jaringan tertentu, karena sebagian besar jaringan dianggap mengandung sel punca yang juga memiliki fungsi untuk penambahan (Hyland, 2008) atau membelah secara asimetris untuk menghasilkan sel induk baru sehingga pada perkembangan pengobatan kanker serviks selanjutnya yaitu dengan menargetkan eliminasi sel punca kanker dengan tujuan memberantas karsinoma sel skuamosa (Merino *et al*, 2014). Jumlah sel tidak hanya bergantung pada proses proliferasi tetapi juga dipengaruhi oleh kematian sel yang terprogram atau apoptosis, proses dimana sel-sel yang rusak dan berkembang lebih banyak dikeluarkan (Hyland, 2008), proliferasi memainkan peran penting dalam perkembangan tumor dan transformasi sel ganas pada manusia, proliferasi sel pada mamalia dipengaruhi oleh lingkungan, adhesi matriks ekstraseluler (ECM), sel adhesi dan faktor pelarut seperti faktor yang menghambat pertumbuhan polipeptida, mitogenik lipid, sitokin inflamasi dan hormon (Li *et al*, 2017).

Pengendalian proliferasi sel umumnya terjadi pada tahap pertama (G1) oleh karena itu, kontrol siklus sel pada fase G1 terkait secara intrinsik dengan berbagai jalur yang mengendalikan diferensiasi sel (Duronio dan Xiong, 2013). Protein kinase terlibat dalam regulasi seluler yang terkait dengan proliferasi sel dan kelangsungan hidup sel, pengatur protein kinase dan jaringan caspase menyebabkan perubahan pada kelangsungan hidup sel, transformasi dan proses tumorigenesis. Selain protein kinase, sel juga mengandung protease spesifik yang

dikenal sebagai caspase yang memainkan peran utama dalam pengaturan kelangsungan hidup sel melalui perannya dalam tahap inisiasi dan eksekutor dari apoptosis. Olehnya itu keterlibatan protein kinase dan caspase dalam regulasi seluler yang berujung pada kematian sel dan pembelahan sel yang dihubungkan dengan situasi kanker dimana peningkatan fosforilasi oleh protein kinase yang abnormal akan meningkatkan kelangsungan hidup sel tumor (Duncan *et al*, 2010).

Proliferasi sel merupakan satu dari karakteristik yang dimiliki oleh setiap makhluk hidup untuk terus dapat tumbuh dan berkembang serta mempertahankan kehidupannya, proliferasi terjadi melalui serangkaian proses yang disebut siklus sel. Merupakan kejadian genomik yaitu suatu proses kompleks yang terdiri dari berbagai tahapan dimana masing-masing tahapan membutuhkan waktu, sama seperti pada proses transkripsi dan translasi, sampai dengan kerja serangkaian protein yang menimbulkan efek metabolik (Rachmawati, 2012).

## **2.5 Benalu Mangga**

### **2.5.1 Taksonomi Benalu mangga**

Salah satu spesies dari benalu adalah *Dendrophthoe pentandra.L* atau lebih dikenal sebagai benalu mangga, adapun klasifikasi dari benalu mangga sebagai berikut :

Divisi : Magnoliophyta  
Classis : Magnoliopsida  
Subclass : Rosidae  
Ordo : Santalales  
Family : *Loronthaceae*  
Genus : *Dendrophthoe*  
Spesies : *Dendrophthoe pentandra*

(Backer dan Van den Brink, 1965)



**Gambar 2.7 : Benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra.L*)**

salah satu spesies dari keluarga Loranthaceae tumbuh di berbagai pohon dan mendapatkan nutrisi dari pohon inangnya, terdapat diberbagai negara di benua Asia (Zainuddin dan sul'ain, 2015).

### 2.5.2 Deskripsi Benalu mangga

Peningkatan pesat kejadian kanker serta belum ditemukannya cara mengatasinya menggerakkan peneliti dalam melakukan upaya eksplorasi terhadap bahan alami yang di duga berpotensi sebagai antikanker (Ikawati *et al*, 2008). Upaya yang dilakukan dalam menempuh pengobatan selain dengan kemoterapi, menggerakkan ilmuwan dari kalangan akademis dan juga industri farmasi berusaha untuk menemukan terapi lainnya dalam melawan kanker salah satunya adalah kanker serviks, selain sintesis obat baru upaya untuk menemukan cara baru dengan menggunakan alternatif pengobatan lainnya banyak dilakukan (Chen *et al*, 2016).

Di Indonesia Mistletoe tumbuh di berbagai jenis pohon, *mango mistletoe* (*Dendrophthoe pentandra.L*) adalah salah satu jenis benalu yang tumbuh di pohon mangga (Endharti *et al*, 2016). *Dendrophthoe pentandra.L* merupakan salah satu spesies dari keluarga *Loranthaceae* yang mendapatkan nutrisi untuk tumbuh dari tanaman inangnya, *Dendrophthoe pentandra.L* tersebar luas di negara kawasan

asia tenggara. Tanaman ini telah digunakan sebagai pengobatan tradisional pada beberapa penyakit diantaranya diabetes, hipertensi, batuk, cacar, ulkus, infeksi kulit dan juga dalam pengobatan dan perawatan kanker dibanyak negara (Zainuddin dan sul'ain, 2015).

Jamilah (2003) melakukan penelitian dan menemukan bahwa ekstrak air dan ekstrak etanol pada benalu mangga mengandung senyawa utama yaitu quercetin. Kadar quercetin dalam ekstrak benalu mangga adalah 0,57  $\mu\text{g/g}$  yang diukur dengan kromatografi (Endharti *et al*, 2016). Quercetin merupakan senyawa flavanol glikosida dan senyawa inilah yang di duga sebagai zat aktif yang memiliki aktivitas sebagai antikanker, berperan dalam siklus sel yang berikatan dengan reseptor estrogen (ER) tipe II, menghambat enzim tirosin kinase, aktivitas antioksidan yang dimiliki bersifat reaktif dalam mengikat radikal bebas (Ikawati *et al*, 2008). Benalu mangga dapat menginduksi sitotoksitas melalui beberapa jalur, serta dapat mencegah proliferasi melalui penghambatan pada fase S melalui induksi ekspresi p53 pada penelitian in vivo kanker colon (Endharti *et al*, 2016). Daniel *et al* melaporkan *Dendrophthoe pentandra.L* memiliki efek sitotoksik dan antikanker, sedangkan Gamal *et al* melaporkan bahwa *Dendrophthoe pentandra.L* dapat menurunkan ekspresi p53 mutan pada sel Hela yang dilakukan secara in vitro (Elsyana *et al*, 2016).

Tumbuhan benalu dianggap sebagai tanaman pengganggu bagi tumbuhan inangnya, sebagai tumbuhan semi parasit bioaktivitas tumbuhan benalu pun bergantung pada tanaman inangnya, dan telah diketahui bahwa kandungan kimia dari benalu mangga yakni flavonoid quercetin, saponin dan tanin (Nurfaat dan Indriyati, 2016) saat ini tumbuhan benalu mangga menjadi salah satu alternatif pilihan sebagai pengobatan tradisional karena mengandung quercetin yang berpotensi sebagai antikanker serta memperbaiki aksi obat 5-Fluorouracil (5-FU) yang dapat meningkatkan ekspresi p53 dan apoptosis pada kanker colon oleh

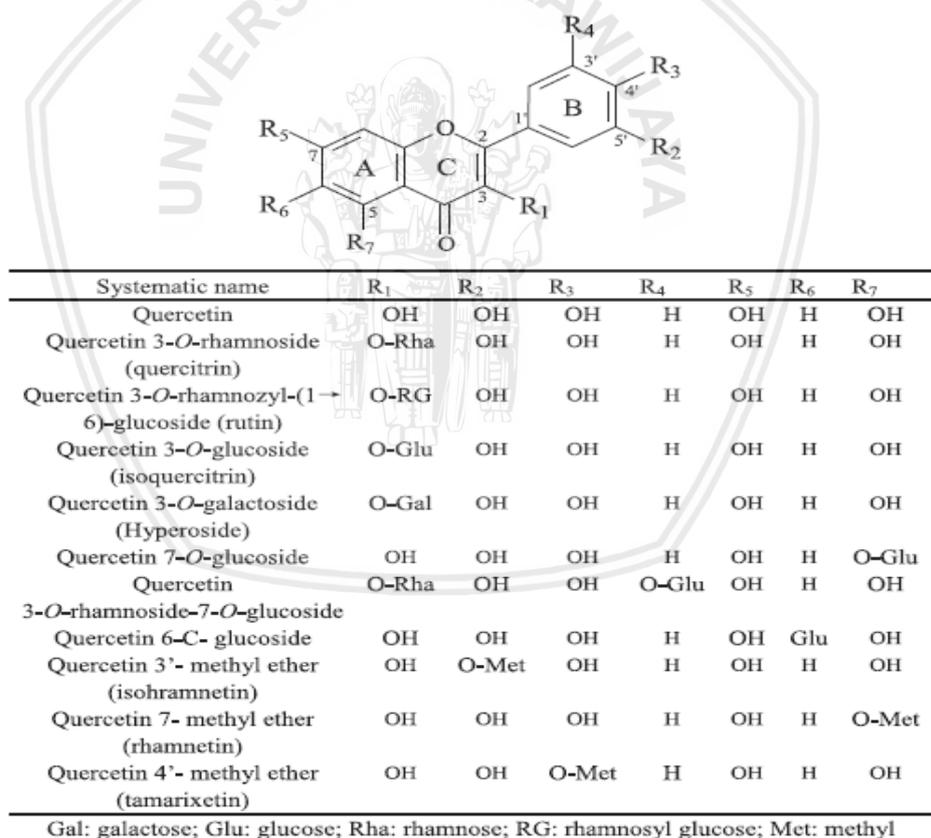
karena itu, benalu mangga menjadi salah satu tanaman potensial yang dapat menjanjikan dalam terapi alternatif kanker (Endharti *et al*, 2016). Berdasarkan penelitian oleh Hegnauer tahun 1966 benalu mengandung senyawa aktivitas antikanker yaitu quercetin yang mampu menghambat enzim DNA topoisomerase sel kanker, enzim topoisomerase bertanggung jawab dalam proses pembukaan double heliks DNA pada replikasi DNA pada fase S siklus sel (Ikawati *et al*, 2008).

### 2.5.3 Quercetin

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxy-flavon), merupakan flavonoid yang memberikan efek antikanker, antiinflamasi dan antiproliferatif. Beberapa tahun terakhir quercetin menarik perhatian karena senyawa yang terkandung di dalamnya (Srivastava *et al*, 2016).

Hasil penelitian menunjukkan quercetin dapat menghambat proliferasi berbagai jenis sel kanker seperti kanker kolorektal, kanker prostat, kanker hati, pankreas dan kanker paru dengan memodulasi proses seluler dan mencegah perkembangan sel itu sendiri. Fungsi quercetin sebagai anti kanker pada dasarnya terkait dengan kuatnya kandungan antioksidan yang terkandung di dalamnya (Wang *et al*, 2016). Quercetin adalah senyawa lipofilik dan cukup larut dalam etanol (4,0 mg/ml, 37 °C), dapat larut dalam dimetil sulfoksida (150 mg/ml, 25°C) namun, tingkat kelarutan dalam air hanya sekitar 0,01 mg/ml, 25°C (Wang *et al*, 2016). Quercetin memodulasi beberapa jalur sinyal transduksi yang terkait dengan proliferasi sel dan apoptosis, penelitian tentang mekanisme molekuler dari quercetin yang menginduksi kematian sel dengan memfokuskan pada ekspresi protein keluarga Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl1, Bax, Bad, p-Bad), sitokrom c, Apaf-1, caspase, dan survivin serta siklus sel, protein regulator (p53, p21) dan keluarga NF- $\kappa$ B (p50, p65,) menunjukkan bahwa quercetin menekan viabilitas sel HeLa pada fase G2/M dan menginduksi apoptosis melalui jalur mitokondria (Priyadarsini *et al*, 2010).

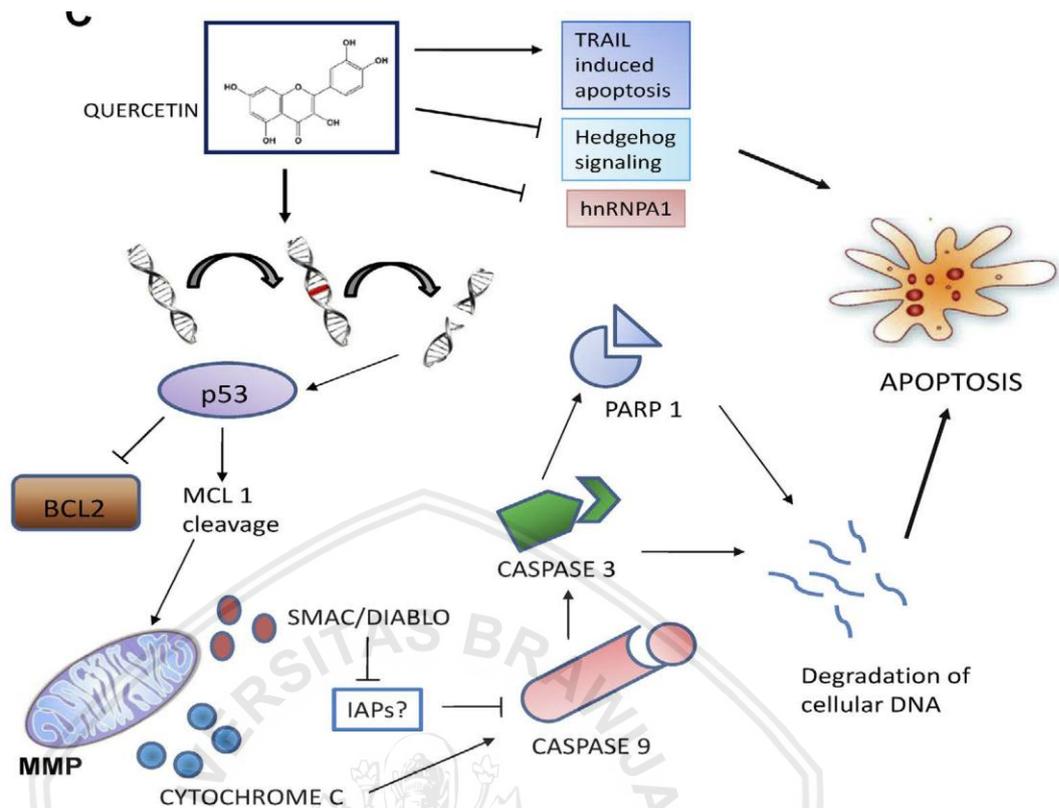
quercetin memiliki struktur flavonoid yang khas dan mengandung lima kelompok hidroksil. Kelompok utama dari quercetin dan turunannya adalah quercetin O-glikosida dan beberapa turunan lainnya, dimana pada umumnya komponen dari quercetin memiliki tingkat kelarutan dalam air yang rendah (Wang *et al*, 2016). Beberapa tanaman dan sayuran mengandung quercetin O-glikosida dan lokasi yang paling umum terletak pada C-3 carbon yang berhubungan dengan monosakarida yang meliputi glukosa, galaktosa, xylose. Quercetin 3-O-glukosida ditemukan pada kacang-kacangan, quercetin 3-O-galaktosida ditemukan di lingonberry, sedangkan quercetin 3-O-xylosida ditemukan pada buah mangga (Wang *et al*, 2016).



Gambar 2.8 : Struktur kimia quercetin dan turunannya

#### 2.5.4 Mekanisme quercetin terhadap sel kanker

Flavonoid quercetin dapat mengganggu tahapan spesifik dari proses karsinogenik, dengan mencegah proliferasi sel, menginduksi apoptosis pada beberapa jenis sel kanker termasuk pada sel line Caski dan HeLa (Gibellini *et al*, 2011). Mekanisme quercetin dalam mencegah perkembangan sel kanker dikaitkan dengan kemampuan quercetin dalam menghentikan *reactive oxidation spesies* (ROS), spesien nitrogen reaktif (RNS) dan radikal lainnya, quercetin dapat menyebabkan kerusakan DNA serta menyebabkan upregulasi p53, ini mengakibatkan turunnya regulasi protein antiapoptosis Bcl-2, pemecahan MCL 1 dan pelepasan sitokrom C dari mitokondria dan menghambat pertumbuhan beberapa sel kanker manusia dan menginduksi fase *S arrest* pada siklus sel dengan berbagai macam model sel dan hewan coba (Srivastava *et al*, 2016). Flavonoid quercetin tidak hanya memberikan efek antioksidan dengan cara meredakan ROS tetapi juga dengan memodulasi aktivitas beberapa enzim detoksifikasi termasuk lipooksigenase, siklooksigenase dan nitrit oxide, serta dapat berperan pada remodeling kromatin sehingga dapat mengganggu perubahan epigenetik yang penting dalam perkembangan kanker (Gibellini *et al*, 2011).



**Gambar 2.9 : Mekanisme quercetin terhadap sel kanker**

pengobatan quercetin pada sel kanker menyebabkan apoptosis melalui jalur intrinsik, quercetin menyebabkan terjadinya interkalasi DNA sehingga terjadi kerusakan DNA, meningkatkan p53, dan menghambat protein antiapoptosis terjadi pemecahan MCL1 sehingga mitokondria melepaskan sitokrom c, caspase 9 dirilis sebagai inisiator dari apoptosis (srivastava *et al*, 2016).

## 2.6 5-Fluorouracil

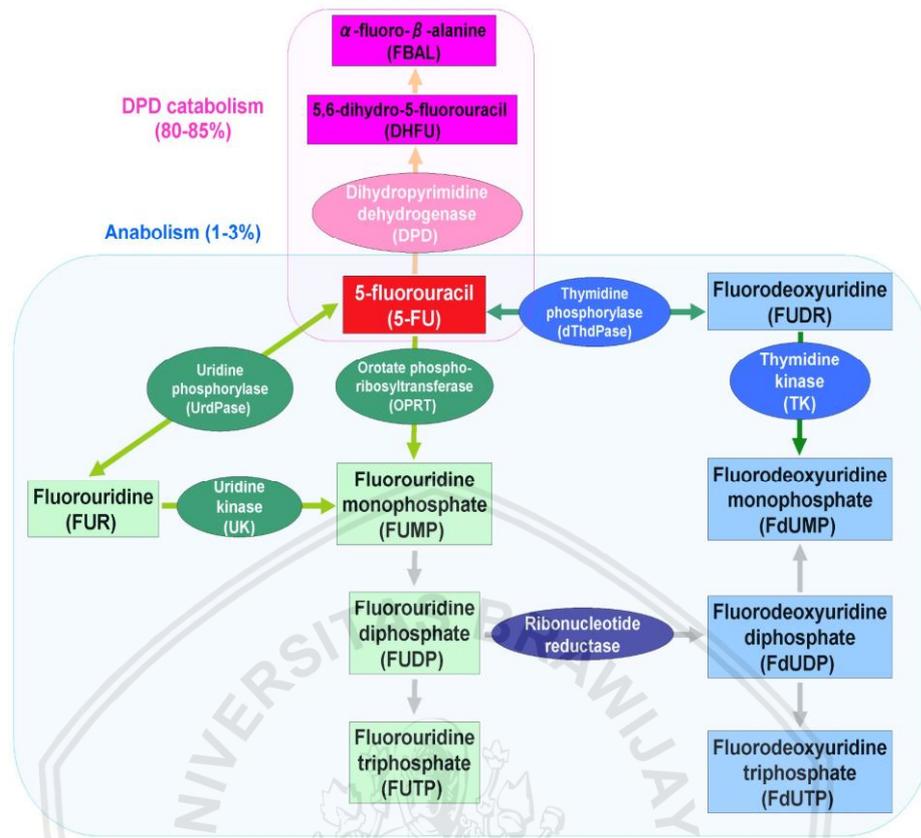
*5-Fluorouracil* (5-FU atau 5-fluoro-2, 4-pyrimidinedione) adalah antimetabolit analog dengan pirimidin, memiliki aktivitas spektrum luas dalam melawan tumor, terapi tunggal ataupun dikombinasikan dengan regimen kemoterapi lainnya. Karena strukturnya, 5-Fu dapat menghalangi metabolisme nukleosida sehingga dapat digabungkan dengan RNA dan DNA heliks tunggal maupun ganda, sehingga dengan demikian 5-Fu dapat menyebabkan toksisitas dan kematian sel olehnya itu 5-Fu menjadi pilihan utama dalam kemoterapi kanker khususnya kanker colon, namun khasiat dari 5-Fu dapat terhambat pada proses metabolisme secara khusus pada pemberian secara oral karena enzim

dihidropirimidin dehidrogenase yang terdapat pada dinding usus sehingga aplikasi klinis 5-Fu oral kurang maksimal dan menyebabkan resistensi obat pada penggunaan yang terus menerus pada dosis tinggi, sehingga penggunaan 5-Fu dengan jalur intravena lebih direkomendasikan dan disukai walaupun mempunyai efek gastrointestinal, saraf dan memperparah penyakit jantung (Jaferian *et al*, 2016). *5-Fluorouracil* saat ini digunakan sebagai obat antikanker untuk mendapatkan respon optimal dan memperpanjang kelangsungan hidup pasca operasi pada pasien kanker serviks (Ahmed dan Jamil, 2011). Sejak diperkenalkan, *5-Fluorouracil* telah menjadi obat antikanker yang telah digunakan untuk mengobati berbagai jenis keganasan baik terapi tunggal maupun sinergi dengan obat antikanker lainnya (Miura *et al*, 2010).

Antimetabolit spesifik *5-Fluorouracil* telah digunakan secara klinis selama lebih dari 60 tahun dan memainkan peran penting dalam pengobatan spektrum luas tumor solid termasuk kanker (Dun *et al*, 2015). Agen kemoterapi *5-fluorouracil* telah menjadi pilihan pertama untuk kemoterapi dasar dan terapi kombinasi pada pasien dengan kanker (Zhang *et al*, 2016).

### **2.6.1 Mekanisme 5-Fluorouracil dalam sel**

Antimetabolit spesifik *5-Fluorouracil* memainkan peran penting dalam pengobatan spektrum luas tumor termasuk kanker. Senyawa *5-Fluorouracil* bekerja dengan menyebabkan G1/S *arrest*, dan menginduksi apoptosis sel kanker dengan menghambat proses biosintesis. Meskipun *5-Fluorouracil* adalah obat ampuh, namun memiliki reaksi merugikan dan serius yang tidak dapat dicegah (Dun *et al*, 2015). *5-Fluorouracil* menggunakan efek antikankernya dengan menghambat *thymidylate synthase* (TS) (Pensel *et al*, 2017). Thomas *et al*, 2001 membuktikan bahwa 5-Fu sebagai agen anti neoplastik yang menghambat sintesis DNA, sehingga terjadi apoptosis (Ahmed dan Jamil, 2011).



**Gambar 2.10 : Anabolisme dan Katabolisme 5-Fu**

pembentukan senyawa 5-Fluorouracil dari uridine kinase dan proses pemecahan atau penguraian 5-Fluorouracil menjadi fluorodeoxyuridine menjadi thymidine kinase, FdUMP, FdUDP, FdUTP (Miura *et al*, 2010).

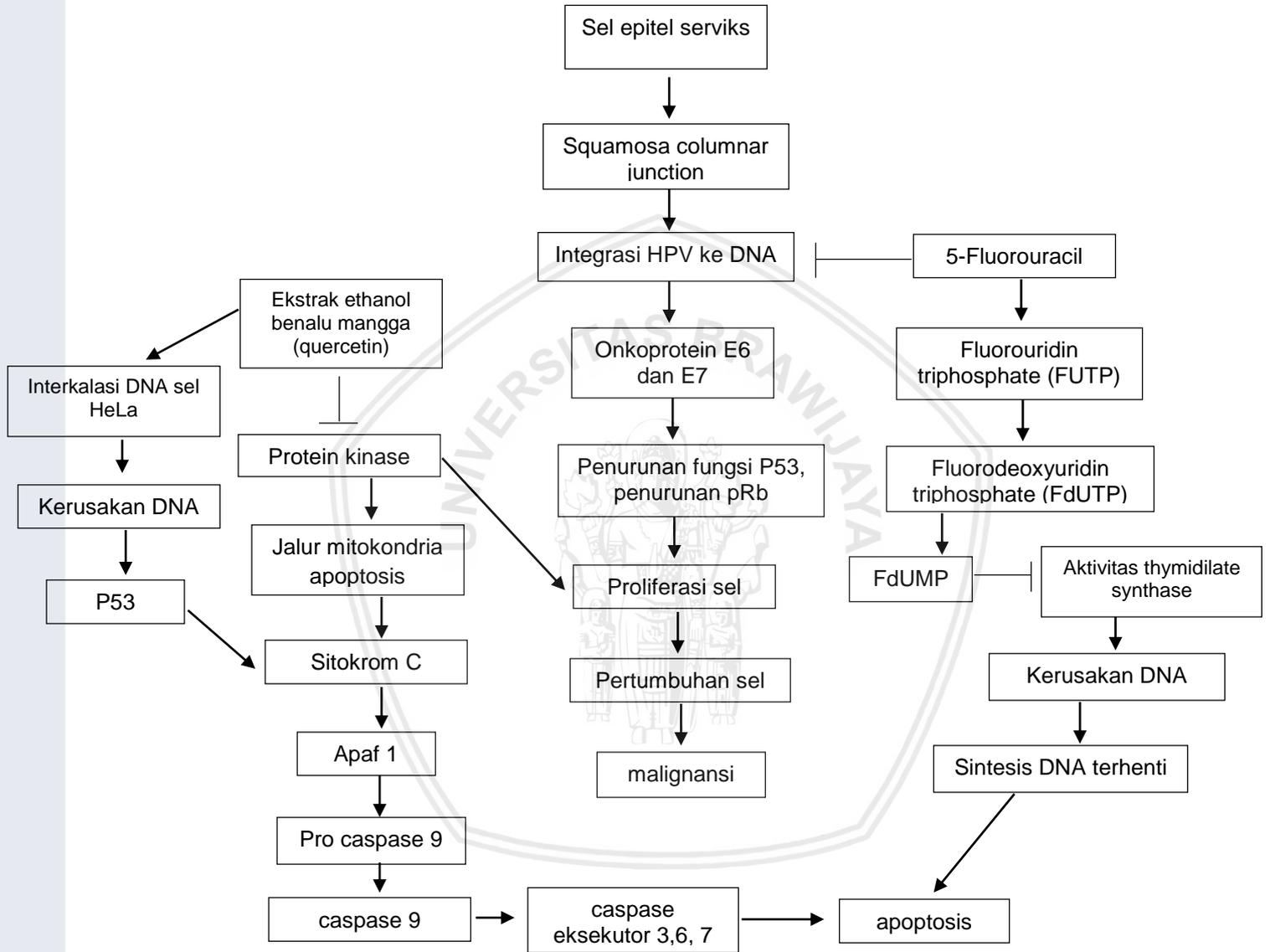
Kemoterapi kompleks 5-Fluorouracil analog dengan uracil, yakni pertama 5-Fu diubah menjadi metabolit aktif *fluorouridine monophosphate* (FUMP) dengan *orotate phosphotibosyltransferase* (OPRT), kemudian di fosforilasi menjadi fluorouridine difosfat (FUDP) selanjutnya mengalami perubahan menjadi fluoridine triphosphate (FUTP), sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan pada RNA (Miura *et al*, 2010). Ketika FUTP masuk kedalam RNA, tRNA dan mRNA tidak dapat diterjemahkan atau mRNA tidak dapat diubah menjadi mRNA matang sehingga rRNA, tRNA, mRNA tidak dapat di proses dalam sel. FUDP juga dapat menjadi *fluorodeoxyuridine diphosphate* oleh *ribonucleotide reductase* (RR), yang membuat *ribonukleotida* menjadi *deoxyribonucleotide*, *fluorodeoxyuridine monophosphate* (FdUMP) menghambat *thimydylate synthase*, yang merupakan

satu-satunya enzim yang dapat membentuk *deoxythimidine monophosphate* dari *deoxyuridine monophosphate*. Sehingga jika terdapat kekurangan *deoxythimidine monophosphate*, sintesis DNA dihentikan (Miura *et al*, 2010).



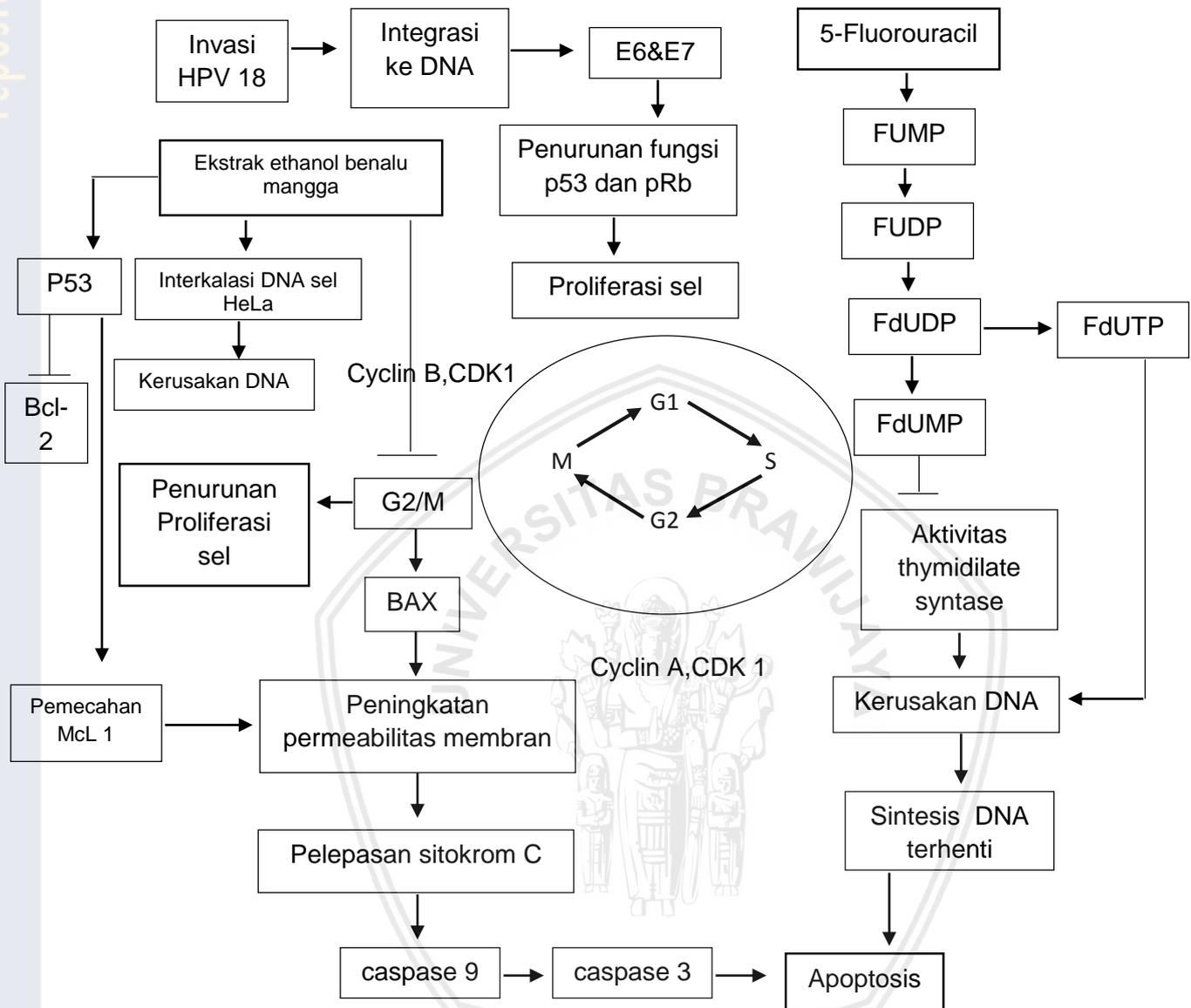
### BAB 3 KERANGKA KONSEP PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1 : Kerangka teori

### 3.2 Kerangka Konsep



Keterangan :

□ : variabel diteliti

→ : menginduksi

⊥ : menghambat

Gambar 3.2 : Kerangka Konsep

Invasi *Human papillomavirus* (HPV) dalam sel stratum germinativum akan menginfeksi sel yang rapuh dari serviks yaitu sel squamosa columnar junction. HPV akan berinteraksi dengan DNA manusia yang menyebabkan adanya peningkatan Gen E6 dan E7 sebagai onkoprotein, E6 dan E7 akan berikatan dengan tumor supresor gen yakni p53 dan pRb serta mengganggu fungsi dari p53 dan pRb tersebut, p53 sebagai tumor supresor gen pada saat *checkpoint* apabila terjadi kerusakan akan menghentikan siklus sel di fase G1 dengan menggunakan jalur p21. P21 merupakan protein kecil berperan dalam menghambat siklus sel pada tahapan G2/M dengan menghambat CDK, cyclin yang dimediasi oleh kontrol E2F. Siklus sel yang tidak terkontrol menyebabkan proliferasi sel yang abnormal dan berubah menjadi keganasan.

*5-Fluorouracil* sebagai obat yang digunakan dalam kemoterapi jenis kanker yang diharapkan dapat membunuh sel-sel abnormal/meningkatkan kematian sel, dengan menginduksi terjadinya G1/S *arrest* pada siklus sel dengan mengubah fluorouridine monophospat yang akan menghambat aktivitas *thymidilate syntase* serta menyebabkan kerusakan pada DNA yang menyebabkan terhentinya sintesis DNA pada fase G1/S dalam siklus sel, namun memiliki kerugian karena membunuh sel normal lainnya dan efek samping yang ditimbulkan, olehnya itu kombinasi terapi dengan terapi adjuvant dikembangkan. Benalu mangga yang mengandung senyawa flavonoid quercetin dapat berfungsi sebagai antikanker dan anti proliferasi, dengan menginduksi p53 sebagai gen supresor tumor yang menghambat protein antiapoptosis Bcl-2 serta menghambat G2/M yang menyebabkan terjadinya G2/M *arrest* sehingga terjadi penurunan proliferasi dari sel kanker dan menyebabkan dirilisnya BAX yang merupakan protein pro apoptosis sehingga terjadi peningkatan permeabilitas membran diikuti dengan pelepasan sitokrom C oleh mitokondria.

### 3.3 Hipotesis Penelitian

Terapi kombinasi 5-*Fluorouracil* dan ekstrak ethanol benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra.L*) dapat lebih meningkatkan apoptosis dan penurunan proliferasi sel pada sel kanker serviks HeLa dibandingkan dengan terapi tunggal 5-*Fluorouracil*.



## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental dengan post test only with control group design*. *True experimental* adalah penelitian yang bertujuan menyelidiki hubungan sebab akibat yang membandingkan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (Sastroasmoro, 2011) sedangkan *post test only with control group design* adalah rancangan penelitian yang pengujiannya dilakukan setelah pemberian perlakuan. Tahapan pada penelitian ini yaitu pemberian terapi pada kultur sel line HeLa pada enam kelompok yang terdiri dari satu kelompok kontrol negatif yaitu sub kultur sel HeLa dan pelarut, kelompok kontrol positif yang diberi terapi 5-fluorouracil dengan dosis 5 µg/mL, serta pemberian ekstrak ethanol benalu mangga, tiga kelompok perlakuan yaitu pemberian terapi kombinasi 5-Fu dan ekstrak ethanol benalu mangga dengan masing-masing dosis yaitu 12,5, 25, dan 50 µg/mL (Elsyana *et al*, 2016).

#### 4.2 Tempat dan Waktu penelitian

##### 4.2.1 Tempat penelitian

Dilaksanakan di Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang Jawa Timur

##### 4.2.2 Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2017 sampai dengan Februari 2018.

### 4.3 Sampel penelitian dan replikasi

Sampel dalam penelitian ini yaitu sel line HeLa yang diperoleh dari *American type culture collection* (ATCC). Penelitian ini menggunakan 24 well kultur sel HeLa pada medium *Roswell park memorial institute* 1640 (RPMI 1640) (Gibco). Masing-masing well berisi  $5 \times 10^5$  sel/ ml. Sampel dalam penelitian ini terdiri dari satu kelompok kontrol negatif yaitu sub kultur HeLa, dan kelompok kontrol positif yang diberi 5-Fu dengan dosis  $5 \mu\text{g/mL}$ , dan ekstrak ethanol benalu mangga dosis  $50 \mu\text{g/mL}$  serta kelompok perlakuan yang diberi terapi kombinasi 5-Fu dan ekstrak ethanol benalu mangga dengan dosis yang masing-masing telah ditentukan.

Penentuan pengulangan ditentukan dengan menggunakan rumus replikasi (Hanafiah, 2012) yaitu :

$$\text{Rumus } (t-1) (r-1) \geq 15$$

$$(6-1) (r-1) \geq 15$$

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

$$5 r = 15 + 5$$

$$5r = 20/5$$

$$r = 4$$

keterangan :

t : jumlah perlakuan

r : jumlah replikasi

Jadi, dalam penelitian ini pengulangan dilakukan empat kali untuk masing-masing kelompok pada masing-masing variabel yang diukur.

### 4.4 Pembagian kelompok dan Penentuan Dosis

Sampel dibagi menjadi enam kelompok terdiri dari kelompok kontrol negatif yaitu sub kultur sel HeLa yang di beri pelarut, kelompok kontrol positif yang diberi terapi tunggal 5-Fu dengan dosis  $5 \mu\text{g/mL}$ , ekstrak ethanol benalu mangga, tiga

kelompok perlakuan dimana perlakuan satu diberi terapi 5-Fu dan ekstrak ethanol benalu mangga dengan dosis 12,5µg/mL, perlakuan dua diberi dosis terapi kombinasi dengan dosis 25µg/mL dan perlakuan tiga pemberian terapi kombinasi 5-Fu dan ekstrak ethanol benalu mangga dengan dosis 50µg/mL.

Penentuan dosis didasarkan pada penelitian sebelumnya tentang aktivitas cytotoxicity dan antiproliferatif ekstrak *dendrophthoe pentandra.L* pada sel line kanker K562 (*Human chorionic myelogenous leukemia*) oleh Elsyana *et al* (2016) dengan dosis 25µg/mL, 50µg/mL, 75µg/mL, 100µg/mL dan 125µg/mL, pada penelitian ini dosis yang digunakan ditentukan dengan didasari pada penelitian tersebut dengan mengambil tiga dosis yaitu 12,5µg/mL, 25µg/mL, dan dosis 50µg/mL, sedangkan dosis 5-Fluorouracil yang digunakan adalah 5µg/mL didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Liu *et al* (2015).

#### **4.5 Variabel Penelitian**

##### **4.5.1 Variabel Independent**

Variabel *Independent* pada penelitian ini ialah pemberian terapi tunggal agen kemoterapi 5-Fluorouracil, ekstrak ethanol benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra.L*) dan pemberian terapi kombinasi 5-Fluorouracil dan ekstrak ethanol benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra.L*).

##### **4.5.2 Variabel dependent**

Variabel *dependent* dalam penelitian ini yaitu peningkatan apoptosis dan penurunan proliferasi sel

#### 4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Hasil ukur	Skala
<b>5-Fluorouracil</b>	Agen kemoterapi kanker yang digunakan pada berbagai jenis keganasan, digunakan sebagai terapi tunggal maupun sinergi dengan obat lainnya, dikonversi menjadi fluorodeoxyuridine monophosphate dengan dosis pemberian 5µg/mL, diberikan pada kultur sel HeLa (Sigma Aldrich)	µM/ml	Ratio
<b>Ekstrak etanol benalu mangga (<i>Dendrophthoe pentandra.L</i>)</b>	Ekstrak etanol benalu diperoleh melalui proses pengeringan, simplisia daun benalu mangga dilarutkan dengan etanol 80% kemudian disaring dan dievaporasi sehingga didapatkan hasil ekstrak berbentuk pasta	µg/ml	Ratio
<b>Terapi kombinasi 5-Fu dan ekstrak etanol benalu mangga</b>	Terapi kombinasi yang diberikan pada sub kultur sel HeLa setelah sel dinilai konfluen 70% berdasarkan masing-masing dosis yang telah ditentukan	Dosis 5-Fu 5µg/mL Dosis ekstrak 12,5,25,50 µg/mL	Ratio
<b>Apoptosis</b>	Persentase jumlah sel yang ditandai dengan marker Annexin V untuk sel yang mengalami apoptosis dan marker propidium iodide untuk sel yang mengalami nekrosis yang diukur dengan <i>flow cytometri</i>	Persentase (%)	Ratio
<b>Proliferasi sel</b>	Persentase jumlah sel yang dilabeli dengan antibodi BrdU dan anti BrdU, identifikasi sel positif BrdU yang selanjutnya diukur dengan <i>flow cytometri</i>	Persentase (%)	Ratio

## 4.7 Bahan dan Alat Penelitian

### 4.7.1 Kultur Sel

Bahan yang digunakan pada pelaksanaan kultur sebagai berikut :

Cell line HeLa yang diperoleh dari *American type culture collection* (ATCC), Medium kultur RPMI 1640 yang terdiri dari 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 100 U/ml Penicilin, 100 U/ml streptomycin, 20% PBS, HEPES, Natrium Bicarbonate, tripsin/EDTA (Gibco), HCl, surgical masker, handscoen.

Alat yang digunakan pada pelaksanaan kultur sebagai berikut :

Laminar air flow II, Incubator CO<sub>2</sub>, mikropipet, tabung conical steril, sentrifuse suhu ruang, mikroskop inverted, tissue kultur flask, tabung sentrifuse, scrapper, haemocytometer

### 4.7.2 Ekstrak Ethanol Benalu Mangga

Bahan yang digunakan pada pelaksanaan Ekstrak benalu mangga sebagai berikut : daun benalu mangga, etanol 80%

Alat yang digunakan pada pelaksanaan Ekstrak benalu mangga sebagai berikut : timbangan, toples kaca, gelas ukur, evaporator

### 4.7.3 5-Fluorouracil

Bahan yang digunakan pada pelaksanaan sebagai berikut : 5-Fu, mikropipet dan pelarut yang terdapat pada medium

## 4.8 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

### 4.8.1 Kultur Sel

Prosedur pelaksanaan kultur sel terdiri dari tiga tahapan sebagai berikut :

Aktivasi dan pembiakan sel HeLa (*Thawing cell*) :

Media sel yang telah dicampur yang terdiri dari RPMI, penicillin-streptomycin 1%, FBS 10% difilter dengan membran ukuran 0,2  $\mu\text{m}$ , selanjutnya vial sel HeLa diambil dari tabung nitrogen cair sebanyak 200  $\mu\text{L}$ , vial tersebut terlebih dahulu dicairkan dalam wadah berisi air, setelah itu medium komplit yang telah dibuat diambil  $\pm 5$  ml dan dimasukkan ke dalam Flask tabung konikal kemudian didispersikan, kemudian sel HeLa yang terdispersi dalam media dituang dalam *T-flask* 25  $\text{cm}^2$  dan ditambahkan media medium komplit  $\pm 5$  ml sehingga memenuhi dasar *T-flask*, setelah 24 jam lakukan pengamatan viabilitasnya, jika sel mengalami pertumbuhan yang baik maka dapat dilakukan sub kultur

Prosedur sub kultur sel sebagai berikut :

Saat sel dinyatakan konfluen 80-90%, pada pengamatan dibawah mikroskop inverted lakukan sub kultur 1 flask menjadi 3 flask, media dalam *T-flask* dibuang dan masukan tripsin/EDTA dalam flask sebanyak 2 cc selanjutnya inkubasi sel selama 5 menit, amati sel dibawah mikroskop inverted jika sel sudah terlepas tuang ke dalam falcon kemudian lakukan sentrifugasi 800 rpm selama 8 menit, supernatan dibuang, flask dicuci dengan PBS 2 kali sebanyak 2 cc, masukan medium komplit dalam flask sebanyak 4 cc, tambahkan medium komplit dalam falcon yang berisis pellet sebanyak 2 cc kemudian dipipeting, masukan ke masing-masing flask 1000  $\mu\text{L}$ , selanjutnya sel diinkubasi dalam inkubator  $\text{CO}_2$  5% suhu  $37^\circ\text{C}$ , lalu sel dilihat dengan mikroskop, dan pembiakan sel dilakukan dengan mengganti medium RPMI komplit secara berkala sampai diperoleh kerapatan sel yang diinginkan yaitu 70%

Penanaman sel HeLa dalam *well* adalah sebagai berikut :

Pada saat sel dinyatakan konfluen dalam *T-flask*, medium dalam flask dibuang, masukan tripsin/EDTA dalam flask sebanyak 2 cc selanjutnya inkubasi sel selama 5 menit, amati sel dibawah mikroskop inverted jika sel sudah terlepas tuang ke dalam falcon kemudian lakukan sentrifugasi 800 rpm selama 8 menit,

supernatan dibuang, pellet dalam falcon diberi medium komplet 1 cc selanjutnya lakukan pipeting sampai sel terdispersi, sel dimasukkan ke dalam *well plate* 24 dengan perkiraan seeding 500.000 sel per well dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator 37°C, CO<sub>2</sub> 5%, dilanjutkan dengan pemberian perlakuan pada masing-masing kelompok perlakuan.

Pemanenan sel HeLa sebagai berikut :

selanjutnya setelah sel dinyatakan konfluen sel dipanen, media yang lama dibuang, pada masing-masing well diberi tripsin/EDTA secara merata dan inkubasi didalam inkubator selama 5 menit, lakukan sentrifugasi tambahkan RPMI komplet untuk menginaktifkan tripsin, jika ada sel yang menggerombol sel diresuspensi kembali, sel yang telah terlepas diletakan dalam eppendorf yng telah dilabeli sesuai dengan jumlah sampel.

#### **4.8.2 Pembuatan ekstrak Ethanol Benalu mangga**

Daun benalu mangga diperoleh dari kota Probolinggo, Jawa Timur dan telah identifikasi dan disahkan oleh ahli Jurusan Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (nomer spesimen 0170/identifikasi taksonomi/03/2015).

Daun benalu mangga yang didapatkan terlebih dahulu dikeringkan, dihaluskan sampai berbentuk serbuk kemudian dilanjutkan dengan ekstraksi yang melalui dua tahapan proses maserasi dan evaporasi. Tahapan maserasi, serbuk halus dari benalu mangga kering diambil sebanyak 500 gram, masukan ke dalam toples kaca, selanjutnya ditambahkan etanol 80% sebanyak 1 liter, diaduk sampai tercampur selama 30 menit kemudian disimpan selama 1 jam agar mengendap. Bagian atas dari campuran etanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur diambil dengan menggunakan kertas saringan selanjutnya campuran zat aktif dan pelarut dipisahkan pada tahap evaporasi.

Pada tahap evaporasi, campuran hasil penyaringan dimasukkan dalam labu evaporasi, yang di hubungkan dengan evaporator, masukkan air pada waterbath, beserta semua rangkaian dari evaporator seperti rotary evaporator dan pemanas waterbath disambungkan pada aliran listrik dengan pengaturan suhu 78.4°C. pelarut etanol dibiarkan sampai terpisah dengan zat aktif yang terdapat dalam labu evaporasi, pemisahan dilakukan sampai pelarut etanol tidak menetes lagi pada labu penampung biasanya satu labu isinya  $\pm$  900 mL. Hasil dari penyaringan kemudian di evaporasi sampai ekstrak berbentuk padat, kandungan quercetin dari ekstrak benalu mangga 0,57  $\mu\text{g/g}$  berat kering.

Pada penelitian ini, ekstrak ethanol benalu mangga yang digunakan dalam bentuk pasta encer oleh sebab itu sediaan tersebut akan dilarutkan dengan medium RPMI. Prosedur pembuatan larutan stok ekstrak benalu mangga sebagai berikut ekstrak sebanyak 1 mg/mL dalam volume 5 mL dalam medium. Untuk membuat larutan stok dengan konsentrasi 1mg/mL dalam 5 mL volume konsentrasi yang berisi volume larutan ekstrak ethanol benalu mangga dengan RPMI digunakan rumus sebagai berikut :

$$V1.M1 = V2.M2$$

Keterangan :

V1 : Volume larutan sebelum diencerkan

V2 : Volume larutan setelah diencerkan

M1 : Molaritas larutan sebelum diencerkan

M2 : Molaritas larutan setelah diencerkan

$$\begin{aligned} V1 &= \frac{V2.M2}{M1} \\ &= \frac{5\text{mL} \cdot 1\text{mg}}{1\text{mL}} \\ &= 5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Untuk melarutkan 5mg ekstrak ethanol benalu mangga, maka diperlukan 5 mL medium sehingga didapatkan konsentrasi larutan yaitu 1mg/mL atau

100 $\mu$ g/mL. Jadi untuk mendapatkan volume larutan 5 mL dengan konsentrasi 100 $\mu$ g/mL maka diambil 1 mL volume ekstrak ethanol benalu mangga dan ditambahkan 4 mL medium, selanjutnya untuk mendapatkan 5mL volume larutan dengan konsentrasi 50 $\mu$ g/mL maka diambil ekstrak ethanol benalu mangga dari volume larutan sebelumnya sebanyak 2,5 mL dan ditambahkan 2,5 mL medium. Kemudian untuk konsentrasi 25 $\mu$ g/mL diambil 2,5 mL dari volume konsentrasi 50  $\mu$ g/mL dan ditambahkan medium 2,5 mL sedangkan untuk konsentrasi 12,5  $\mu$ g/mL maka diambil 2,5 mL dari volume konsentrasi 25  $\mu$ g/mL dan ditambahkan 2,5 mL medium.

#### **4.8.3 5-Fluorouracil**

Konsentrasi dosis yang digunakan adalah 5 $\mu$ g/mL, dengan pelarut yang terdapat pada medium. 5-Fluorouracil (Sigma) dilarutkan dengan cara melarutkan 0,05 mg 5-Fu yang berbentuk serbuk dilarutkan dengan 5 mL medium RPMI, sehingga diperoleh konsentrasi 0,01 mg/mL atau 10  $\mu$ g/ml. Untuk mendapatkan 5 ml dengan konsentrasi 10  $\mu$ g/ml diambil 1 ml 5-Fu ditambahkan 4 ml medium dan untuk mendapatkan konsentrasi 5  $\mu$ g/ml diambil 2,5 ml 5-Fu ditambah 2,5 ml medium.

#### **4.8.4 Prosedur pemberian perlakuan dan kontrol**

Saat sel dinyatakan konfluen 70%, buang medium dalam flask, beri tripsin/EDTA 2 cc selanjutnya inkubasi sel selama 5 menit, amati sel dibawah mikroskop inverted jika sudah terlepas, masukkan sel dalam tabung konikal steril dan lakukan sentrifugasi 800 rpm selama 8 menit, buang supernatan, pellet dalam falcon diberi medium komplet 1 cc kemudian dipipeting, masukkan dalam well dengan perkiraan  $5 \times 10^5$ /ml dan diinkubasi selama 24 jam. Dilakukan pemberian terapi kemoterapi standar 5-Fluorouracil dosis 5 $\mu$ g/mL dengan menggunakan mikropipet pada setiap well selanjutnya tiga jam kemudian ditambahkan terapi

kombinasi ekstrak ethanol benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra.L*) pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol positif, untuk kontrol negatif sel HeLa dalam medium tidak diberi apapun. Pada kelompok kontrol positif diberi kemoterapi standar *5-Fluorouracil* dosis  $5\mu\text{g/mL}$ , dan pemberian ekstrak ethanol benalu mangga dosis  $50\mu\text{g/mL}$  dalam volume larutan 5 mL berdasarkan konsentrasi larutan yang telah dibuat yaitu 2,5 mL larutan ekstrak ethanol benalu mangga ditambahkan dengan medium sebanyak 2,5 mL. Pada kelompok perlakuan yaitu terapi kombinasi *5-Fluorouracil* dan ekstrak ethanol benalu mangga, yaitu media yang mengandung ekstrak ethanol benalu mangga pada masing-masing dosis berdasarkan konsentrasi larutan yang dibuat, pada dosis  $50\mu\text{g/mL}$  volume ekstrak yang diberikan sebanyak 2,5 mL ditambahkan dengan medium 2,5 mL, dosis  $25\mu\text{g/mL}$  volume larutan diambil sebanyak 2,5 mL dari volume konsentrasi  $50\mu\text{g/mL}$  diencerkan dengan menambahkan medium 2,5 mL, sedangkan pada dosis  $12,5\mu\text{g/mL}$  yang telah dilarutkan berdasarkan perhitungan konsentrasi larutan yaitu 2,5 mL dari volume konsentrasi  $25\mu\text{g/mL}$  yang kemudian diencerkan dengan medium 2,5 mL, diinkubasi sel pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

#### 4.8.5 Pengukuran apoptosis dengan *Flow cytometri*

Bahan yang digunakan: phosphate Buffer saline (PBS), tripsin/*ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA), FBS/FCS, Annexin V Biotin Apoptosis Detection Kit e-Bioscience cat/300.

Apoptosis diukur dengan menggunakan Annexin V Biotin Apoptosis Detection Kit e-Bioscience cat/300 sebagai berikut : sel yang terdapat dalam well plate dikeluarkan dari inkubator setelah diinkubasi selama 24 jam, medium dibuang, pada masing-masing well diberi tripsin/EDTA  $120\mu\text{L}$  selanjutnya diinkubasi selama 5 menit, sel dalam well dipindahkan ke dalam tabung ependorf yang sudah terlebih dahulu dilabeli, lakukan sentrifus 2500 rpm selama 3 menit, selanjutnya

supernatan dibuang, cuci sel dengan cell staining buffer 200 $\mu$ L (CSB) lakukan pipeting, disentrifus 2500 rpm selama 3 menit, buang supernatan, masukkan annexin V pada masing-masing sampel 20 $\mu$ L dalam ruang gelap selanjutnya dipipeting sampai sel terdispersi, inkubasi pada suhu 4 $^{\circ}$ C selama 15 menit, selanjutnya sel dicuci dengan CSB 200 $\mu$ L kemudian lakukan pipeting, sentrifus 2500 rpm selama 3 menit, buang supernatan, beri propidium iodide 20 $\mu$ L pada masing-masing well dalam ruang gelap kemudian dipipeting, inkubasi selama 15 menit pada suhu 4 $^{\circ}$ C dan dilakukan analisis dengan flowcitometer. Hasil flow cytometri apoptosis terdiri dari 4 kuadran yakni kuadran kiri bawah yang mempresentasikan populasi sel hidup, kuadran kiri atas merupakan populasi sel yang mengalami nekrosis, selanjutnya kuadran kanan bawah menunjukkan sel yang mengalami apoptosis awal sedangkan kuadran kanan atas menunjukkan presentase sel yang mengalami apoptosis akhir.

#### **4.8.6 Pemeriksaan proliferasi sel dengan *flow cytometri***

Kit *Bromodeoxyuridine* (BrdU) (Biolegend) untuk *flow cytometri* mengandung reagen dan buffer yang diperlukan untuk mengidentifikasi dan memeriksa proliferasi sel dengan analisis *flow cytometri*.

Bahan yang digunakan : BrdU dengan konsentrasi 200 $\mu$ g/mL simpan dalam botol steril pada kondisi steril, antibodi anti BrdU terkonyugasi *fluorochrom* simpan pada suhu 4 $^{\circ}$ C, staining buffer, PBS steril, tripsin/EDTA (Gibco) fiksasi/permeabilisasi (Biolegend) diluent 1 x 100 mL dalam botol simpan pada suhu 4 $^{\circ}$ C, medium RPMI.

Tahap 1 : sel in vitro dengan BrdU

Sel dalam well dikeluarkan dari inkubator medium di buang, masukan pada masing-masing well BrdU + medium RPMI 100 $\mu$ L (1 $\mu$ L BrdU dilarutkan dengan 999 $\mu$ L mediun RPMI dalam ependorf, larutan dipindahkan dalam falcon ditambahkan 2,9mL medium RPMI) inkubasi selama 45 menit pada inkubator suhu

37°C, setelah 45 menit keluarkan dari inkubator cuci dengan PBS steril 1X pada masing-masing well, selanjutnya tambahkan tripsin/EDTA 120µL tunggu beberapa menit selanjutnya sel dipindahkan ke tabung ependorf lalu di sentrifus 2500 rpm selama 3 menit.

Tahap 2 : fiksasi sel dan permeabilisasi

Sebelumnya supernatan dibuang, pellet dalam ependorf ditambahkan fixation buffer 20µL dalam kondisi gelap, inkubasi selama 30 menit dalam gelap pada suhu 4°C (ependorf ditutup dengan aluminium foil), selanjutnya cuci dengan staining buffer 300µL lakukan pipeting, sentrifus 6000 rpm selama 3 menit.

Tahap 3 : pelabelan anti BrdU

Sebelumnya supernatan dibuang, pellet dalam ependorf, tambahkan 20µL anti BrdU terkonyugasi *fluorochrome*-FITC per sampel, campurkan dan inkubasi selama 20 menit pada suhu 4°C dalam gelap, kemudian analisis hasil dengan menggunakan *flow cytometer* dengan memperhatikan area M1 pada gambar hasil analisis yang menunjukkan persentase sel yang mengalami penurunan proliferasi.

#### 4.9 Analisa Data

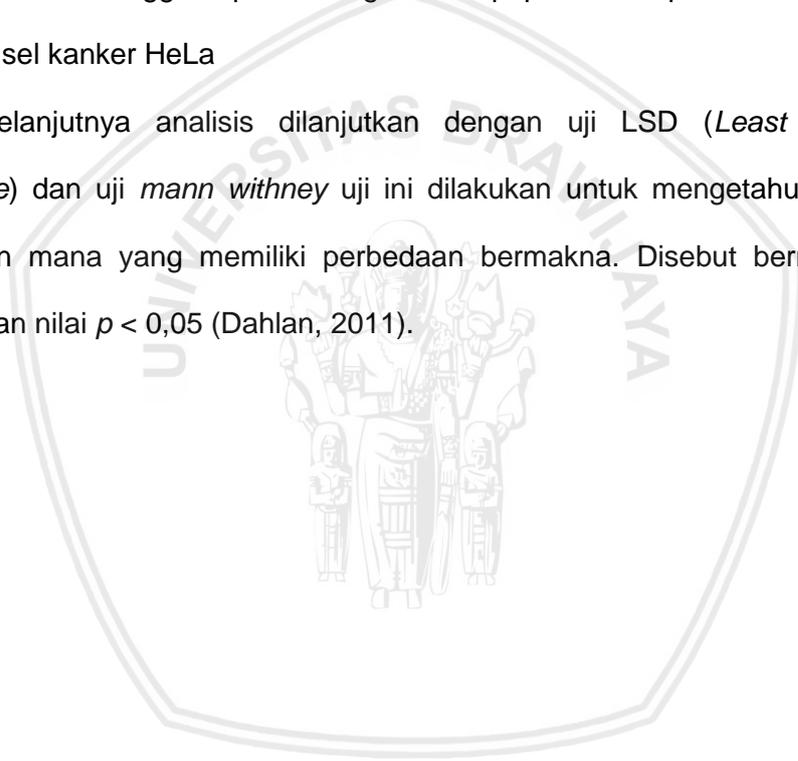
Pengolahan data hasil penelitian dianalisis dengan sistem komputerisasi menggunakan *software Statistical package for social sciences (SPSS) 18.0* penentuan tingkat signifikansi 0,05 ( $p = 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Data yang diperoleh akan dianalisis menggunakan uji parametrik *One-way ANOVA (Analysis of Variance)*, untuk membandingkan rerata variabel terukur antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan yang bertujuan untuk mendapatkan data persentase jumlah peningkatan apoptosis dan penurunan proliferasi sel.

Adapun syarat menggunakan Uji parametrik *One-way ANOVA* menurut dahlan (2011) adalah kelompok penelitian lebih dari 2 dan tidak berpasangan, data

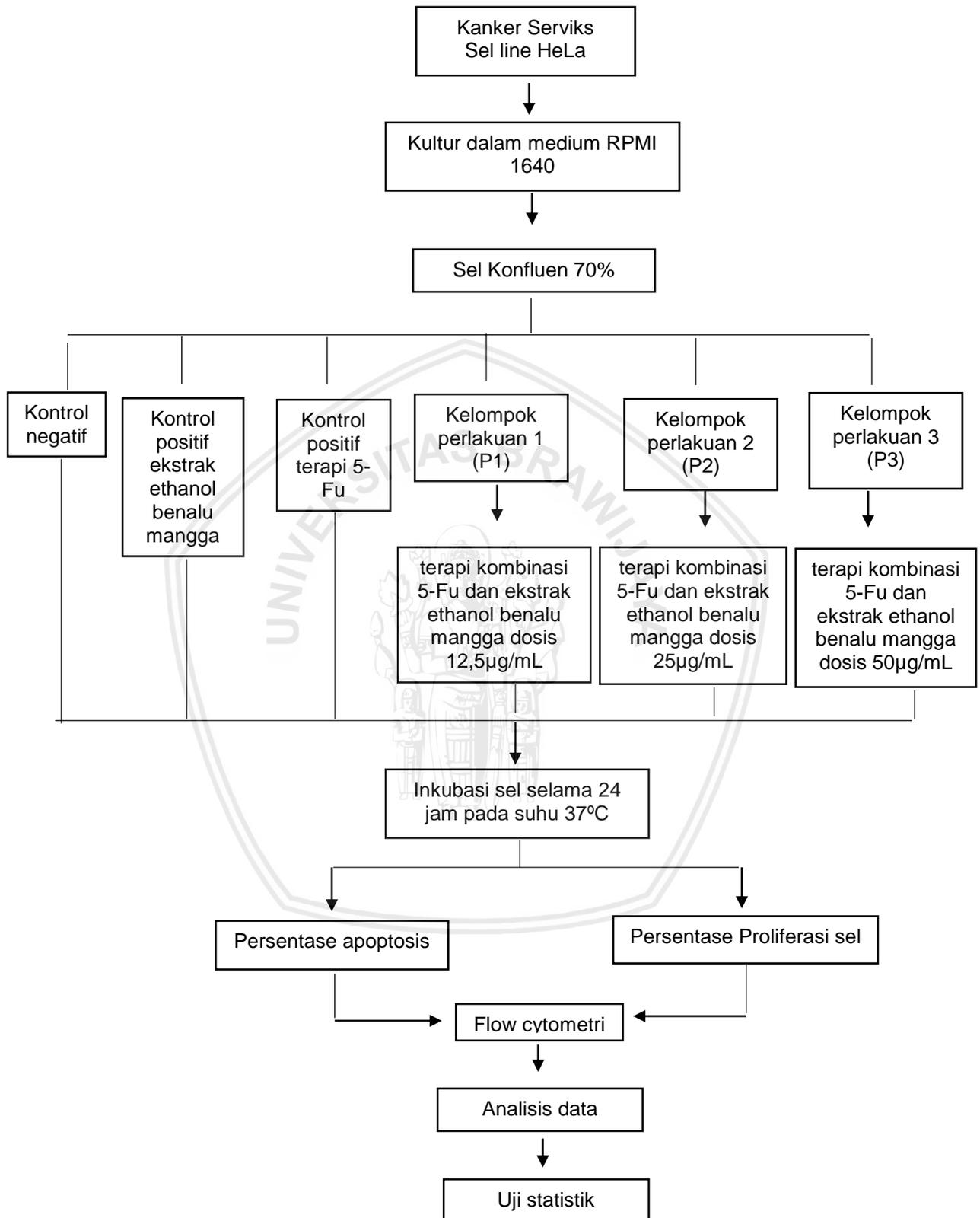
terdistribusi normal yang diketahui dari uji normalitas menggunakan uji *Shapiro wilk* dengan penentuan nilai probabilitas ( $p > 0,05$ ), varians data homogen ( $p > 0,05$ ) diketahui dengan melakukan uji homogenitas. Jika varians data tidak homogen, selanjutnya analisa data dilakukan dengan menggunakan uji alternatif yaitu *Kruskal-Wallis*.

Jika hasil analisa didapatkan nilai  $p < 0,05$  hipotesis pada penelitian ini diterima yang berarti pemberian terapi kombinasi *5-Fluorouracil* dan ekstrak ethanol benalu mangga dapat meningkatkan apoptosis dan penurunan proliferasi sel pada sel kanker HeLa

Selanjutnya analisis dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Diference*) dan uji *mann withney* uji ini dilakukan untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan bermakna. Disebut bermakna jika didapatkan nilai  $p < 0,05$  (Dahlan, 2011).



#### 4.10 Alur Penelitian



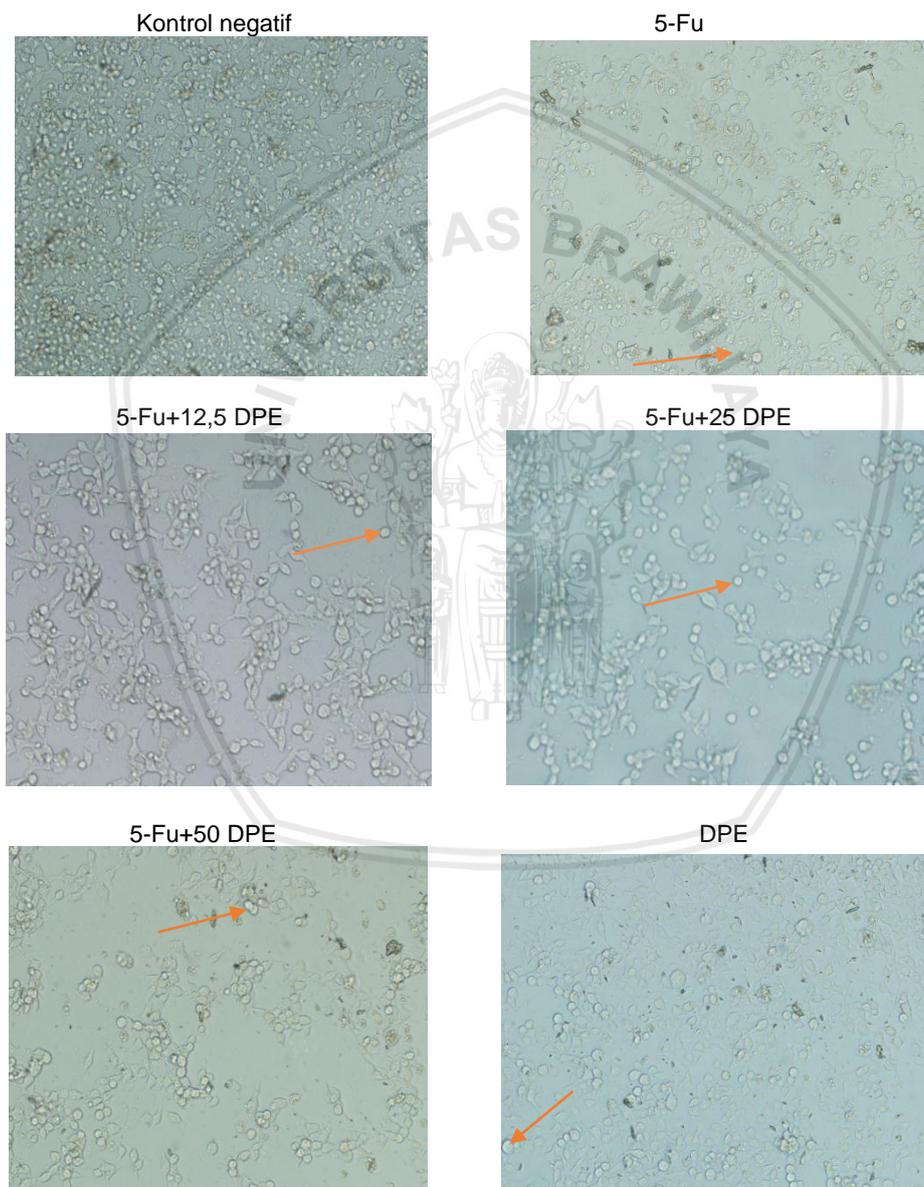
Gambar 4.1 : Alur Penelitian



## BAB 5

### HASIL PENELITIAN

Sel HeLa yang dikultur, diberi terapi kombinasi 5-Fu dan ekstrak benalu mangga, inkubasi selama 24 jam selanjutnya dilihat pertumbuhan sel yang berbeda pada sel yang diberi perlakuan dan tanpa perlakuan.

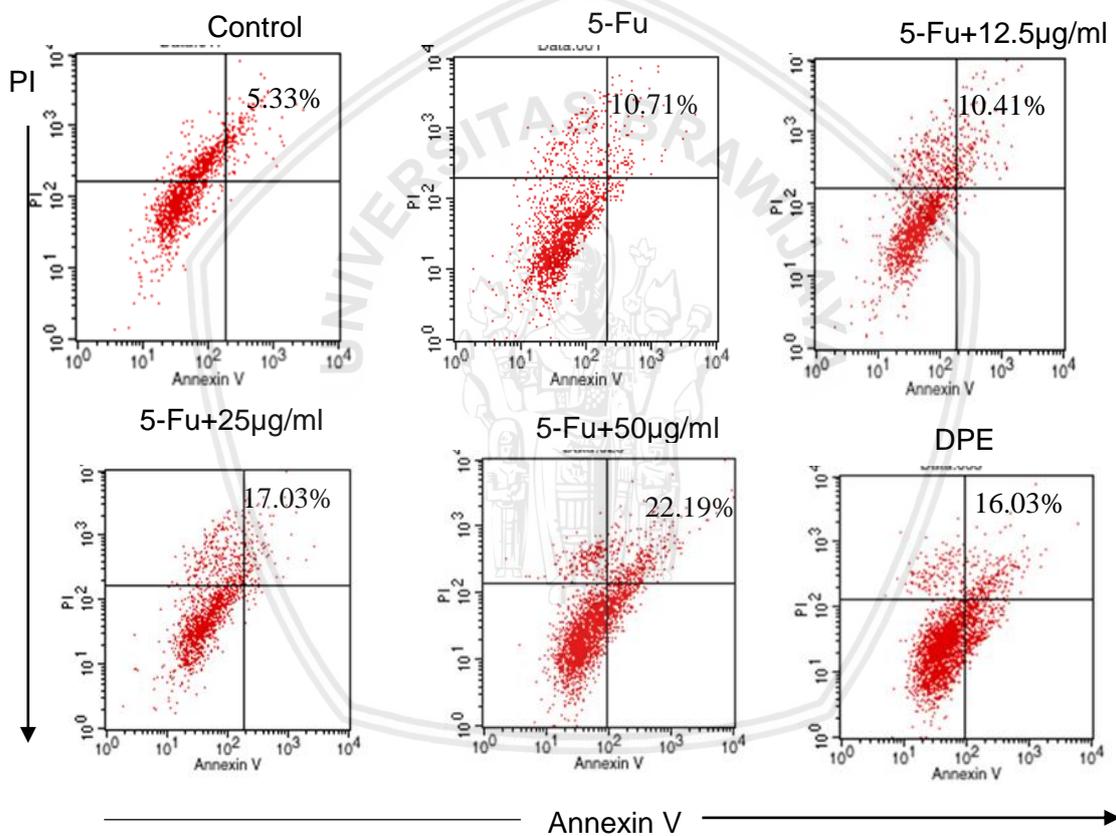


**Gambar 5.1 : Sel HeLa berbagai kelompok perlakuan**

Perubahan morfologi sel HeLa yang di beri terapi kombinasi 5-Fu dan DPE diamati dengan kamera olympus pembesaran 200X, pada kelompok perlakuan nampak sel mengalami kondensasi kromatin, DNA fragmentasi, dalam nukleus disertai dengan perubahan pada sel (Blebbing).

### 5.1 Terapi kombinasi 5-Fluorouracil dan ekstrak ethanol benalu mangga meningkatkan apoptosis pada sel HeLa

Terjadi peningkatan persentase apoptosis secara signifikan dari terapi kombinasi 5-Fu dan ekstrak ethanol benalu mangga dengan tiga dosis berbeda pada sel HeLa yang dievaluasi dengan menggunakan annexin V/propidium iodide (PI). Terapi kombinasi secara signifikan meningkatkan persentase apoptosis yang didasarkan pada hasil analisis *flow cytometri* sel HeLa yang telah diberi perlakuan



**Gambar 5.2 : Hasil analisis *flow cytometri* apoptosis**

Pewarnaan Annexin-V-FITC/PI pada sel HeLa untuk mendeteksi persentase sel yang mengalami apoptosis setelah di beri terapi kombinasi 5-Fu dan ekstrak benalu mangga (12.5, 25, 50µg/ml) setelah di inkubasi selama 24 jam hasil analisis flow cytometri menunjukkan adanya peningkatan persentase sel yang mengalami apoptosis pada kuadran kanan atas (Late apoptosis) pada terapi kombinasi dibandingkan dengan kelompok kontrol terapi tunggal 5-Fu, peningkatan persentase apoptosis tertinggi terjadi pada dosis DPE 50µg/ml.

Untuk membuktikan apakah terdapat perbedaan rata-rata persentase apoptosis antar kelompok perlakuan secara statistik, maka selanjutnya akan dilakukan analisis statistik dengan *analysis of variance* (ANOVA).

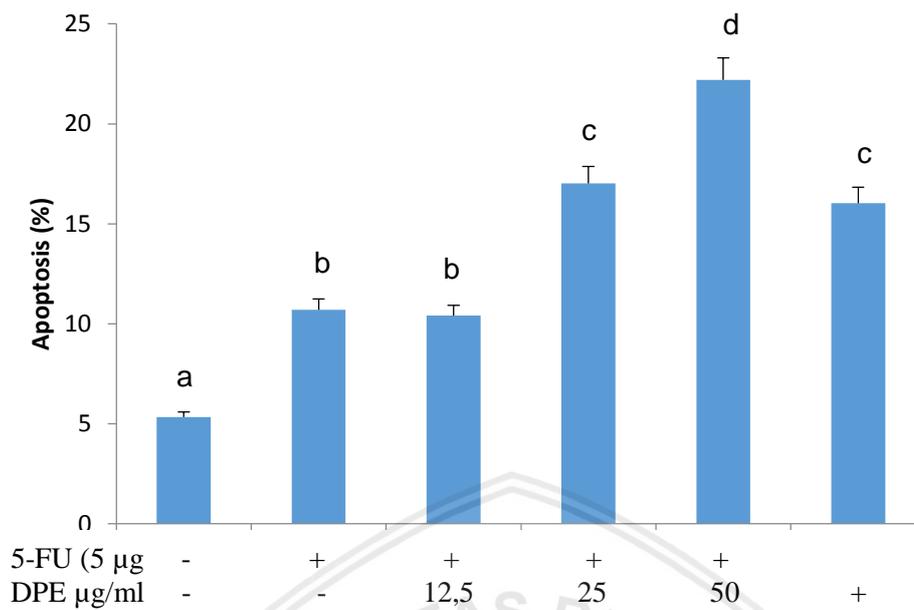
**Tabel 5.1 Hasil uji one way ANOVA**

F hitung	P value	F tabel	Kesimpulan
136.417	0.000	2.772	Signifikan

Keterangan : Berdasarkan tabel tersebut, diperoleh nilai F hitung lebih besar dari F tabel dan nilai signifikansi yang kurang dari  $\alpha$  ( $p < 0.05$ ), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan persentase apoptosis pada kelompok perlakuan.

Didasarkan pada hasil analisis dengan menggunakan ANOVA didapatkan nilai-p sebesar 0.000 lebih kecil dari  $\alpha = 0.05$  ( $p < 0.05$ ) oleh karena itu dapat disimpulkan pada pengujian ini terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata persentase apoptosis antar kelompok perlakuan

Berikut adalah grafik rata-rata persentase apoptosis kelompok kontrol dan perlakuan secara lengkap ditunjukkan dalam histogram dengan huruf notasi yang berbeda berdasarkan hasil uji lanjut *Least Significant Difference* (LSD) yang menyatakan bahwa terdapat perbedaan yang secara statistik bermakna pada masing-masing kelompok perlakuan dari terapi kombinasi 5-Fu dan ekstrak benalu mangga terhadap persentase apoptosis.



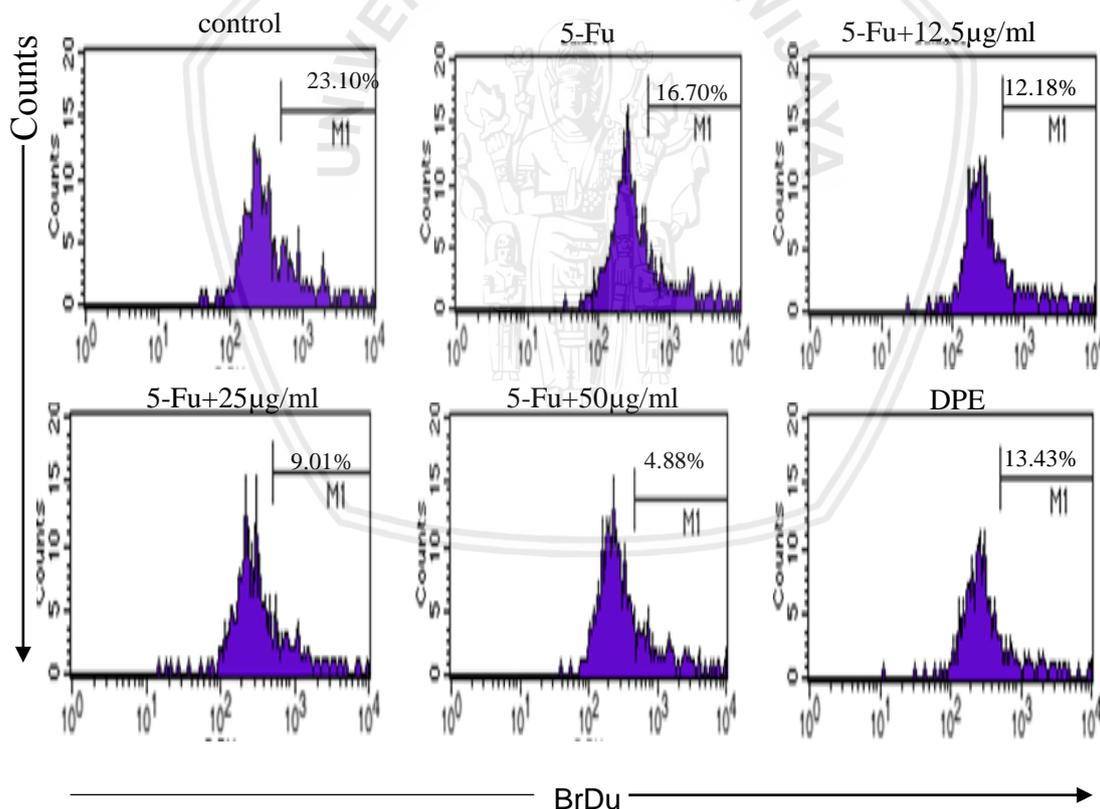
**Gambar 5.3 : Histogram persentase apoptosis**

Histogram rata-rata persentase apoptosis pada masing-masing kelompok perlakuan, yang memuat notasi huruf yang berbeda menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna dari masing-masing kelompok perlakuan, peningkatan persentase apoptosis meningkat pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol dan semakin tinggi dosis semakin meningkat pula persentase apoptosis.

Pada gambar 5.3, terlihat bahwa rata-rata persentase apoptosis meningkat pada semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol (5-Fu dan DPE) dimana persentase apoptosis tertinggi pada perlakuan 3 (5-Fu+50 µg/ml) sebesar  $22.19 \pm 0.963$ , dan rata-rata persentase apoptosis terendah pada P1 (5-Fu +12.5µg/ml) yaitu sebesar  $10.41 \pm 0.833$  dimana rata-rata ini tidak jauh berbeda dengan rata-rata pada kelompok kontrol (5-Fu) yaitu sebesar  $10.71 \pm 1.933$ . Dari hasil analisis statistik apoptosis secara signifikan mengalami peningkatan pada terapi kombinasi 5-Fluorouracil dan DPE tiga dosis berbeda, peningkatan maksimum terjadi pada dosis 50µg/ml ekstrak benalu mangga.

## 5.2 Proliferasi sel HeLa menurun pada terapi kombinasi 5-Fluorouracil dan ekstrak etanol benalu mangga dibandingkan terapi tunggal dengan 5-Fu

5-Fluorouracil yang di kombinasikan dengan ekstrak benalu mangga mampu menghambat proliferasi sel HeLa yang di evaluasi dengan menggunakan BrdU untuk mendeteksi proliferasi sel HeLa setelah pemberian terapi kombinasi 5-Fu dan ekstrak benalu mangga. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi kombinasi menghambat proliferasi sel dengan dosis yang berbeda (12,5, 25, 50 $\mu$ g/ml) secara signifikan menurunkan proliferasi sel,  $p=0,001$  ( $p<0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok kontrol penurunan maksimum proliferasi sel pada dosis ekstrak benalu mangga 50 $\mu$ g/ml.



**Gambar 5.4 : Hasil analisis *flow cytometri* proliferasi**

Hasil analisis *flow cytometri* terapi kombinasi 5-Fu dan ekstrak benalu mangga dengan dosis berbeda (12,5, 25, 50 $\mu$ g/ml) yang di deteksi dengan BrdU menunjukkan penurunan proliferasi sel HeLa yang signifikan pada kelompok perlakuan terapi kombinasi dibandingkan dengan kelompok kontrol, semakin meningkat dosis ekstrak semakin menurun proliferasi sel.

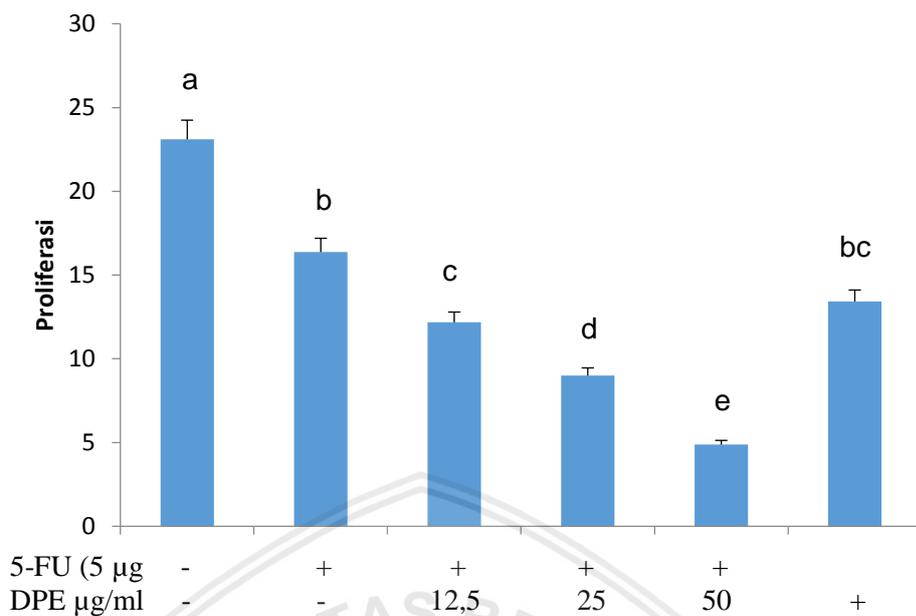
Hasil tersebut juga didukung dengan hasil uji statistik dengan menggunakan uji alternatif *kruskal wallis* karena tidak memenuhi asumsi homogenitas maka didapatkan nilai-p sebesar 0.001 lebih kecil daripada  $\alpha = 0.05$  ( $p < 0.05$ ) dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata proliferasi sel antar kelompok perlakuan.

**Tabel 5.2 Hasil uji *Kruskal wallis***

Chi-square hitung	P value	Chi-square tabel	Kesimpulan
21.419	0.001	11.071	Signifikan

Keterangan : Berdasarkan tabel tersebut, diperoleh nilai chi-square hitung lebih besar dari chi-square tabel dan nilai signifikansi yang kurang dari  $\alpha$  ( $p < 0.05$ ), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata angka proliferasi pada kelompok perlakuan.

Hasil analisis dengan menggunakan *kruskal wallis* didapatkan nilai-p 0.001 lebih kecil daripada  $\alpha = 0.05$  ( $p < 0.05$ ) sehingga dari pengujian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata proliferasi sel antar kelompok perlakuan, selanjutnya mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna dilakukan uji lanjut dengan *Mann Whitney* didapatkan hasil sebagai berikut



**Gambar 5.5 : Histogram rata-rata proliferasi sel**

Histogram rata-rata penurunan proliferasi sel pada masing-masing kelompok perlakuan, dengan notasi huruf berbeda yang artinya terdapat perbedaan bermakna dari setiap kelompok perlakuan, terdapat penurunan proliferasi sel HeLa pada kelompok perlakuan

Proliferasi sel diamati dari tiga dosis ekstrak benalu mangga yang dikombinasikan dengan 5-Fu. Berdasarkan gambar 5.5, terlihat bahwa rata-rata proliferasi sel HeLa menurun pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol (5-Fu dan DPE) proliferasi terendah nampak pada perlakuan 3 (5-Fu +50µg/ml) sebesar  $4.88 \pm 0.426$ , selanjutnya pada perlakuan 2 (5-Fu µg/ml+ 25 µg/ml) dengan rata-rata proliferasi sel sebesar  $9.01 \pm 0.580$ , sedangkan P1 konsentrasi 5-Fu + 12.5µg/ml, kontrol positif (5-Fu) dan pemberian DPE angka rata-rata proliferasi tidak berbeda jauh. 5-Fluorouracil dan DPE yang mengandung quercetin secara signifikan menurunkan proliferasi sel HeLa jika dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diinkubasi selama 24 jam setelah pemberian terapi.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh terapi kombinasi 5-*Fluorouracil* dan DPE terhadap peningkatan apoptosis dan penurunan proliferasi sel HeLa, pada terapi 5-*Fluorouracil* yang dikombinasikan dengan berbagai konsentrasi ekstrak benalu mangga dengan kandungan senyawa quercetin yang potensial sebagai antikanker.

Flavonoid quercetin merupakan zat aktif yang secara biologi terdapat pada tanaman ataupun organisme laut yang memiliki cara tersendiri untuk melindungi diri dari pengaruh eksternal. Banyak dari senyawa alami tersebut menunjukkan efek kemopreventif terhadap DNA baik itu yang kita konsumsi sebagai nutrisi ataupun dalam bentuk obat dengan dosis tertentu (Rejhova *et al*, 2018).

#### **6.1 Ekstrak benalu mangga yang dikombinasikan dengan 5-Fu terbukti meningkatkan persentase apoptosis pada sel HeLa**

Kanker serviks masih menjadi penyebab utama kematian perempuan di dunia, dengan prevalensi kejadian yang meningkat setiap tahunnya dan kemoterapi menjadi pilihan utama dalam pengobatan semua jenis kanker. Kemoterapi kanker menggunakan bahan kimia dengan mekanisme kerja yang diharapkan yakni merusak DNA yang mengandung virus kanker atau DNA yang tidak dapat diperbaiki, namun sifatnya tidak spesifik sehingga kemoterapi juga membunuh sel normal lainnya. Mollaei *et al*, (2017) menyatakan agen kemoterapi menyebabkan kerusakan DNA sehingga menyebabkan siklus sel arrest dan menginduksi apoptosis melalui jalur intrinsik.

Pada sel line HeLa terdapat dua jenis protein onkogen yang diekspresikan yaitu E6 dan E7, keduanya akan berikatan dengan P53 dan pRb yang dikenal sebagai gen supresor tumor yang berhubungan dengan perkembangan kanker serviks. Pada keadaan normal, jika terdapat kerusakan DNA akan mengaktivasi

P53 yang kemudian akan menghentikan siklus sel pada fase G1 sehingga terjadi perbaikan DNA atau menginduksi terjadinya apoptosis pada DNA yang tidak dapat diperbaiki (Sudiwati *et al*, 2015).

Selanjutnya pengembangan dalam terapi kanker terus dikembangkan salah satunya dengan menggunakan bahan alami yang memiliki efek terhadap penghambatan pertumbuhan sel kanker sehingga dapat mengurangi efek toksik dari kemoterapi dan radioterapi, digunakan sebagai terapi tunggal ataupun dikombinasikan dengan agen kemoterapi lainnya, yang diharapkan dapat meningkatkan efek obat kemoterapi yang digunakan maupun dalam usaha mengetahui target baru dalam intervensi kanker. Terapi kombinasi adalah strategi pengobatan yang paling efektif dalam mengatasi kanker, toksisitas dan resistensi terhadap obat (Hemaiswarya dan Doble, 2013). Apoptosis menjadi target intervensi dalam terapi kanker karena mekanisme aksi obat antikanker didasarkan pada kemampuan obat untuk menginduksi apoptosis (Hazzani *et al*, 2011). Apoptosis terjadi melalui dua jalur utama intrinsik dan ekstrinsik, jalur intrinsik diaktifkan oleh rangsangan intraseluler, termasuk kerusakan DNA, kurangnya faktor pertumbuhan dan stres oksidatif, dimana keluarga protein Bcl-2 dan Bax memiliki peran penting dalam jalur intrinsik yang mengendalikan pelepasan sitokrom C dengan mengatur peningkatan permeabilitas membran mitokondria (Su *et al*, 2015).

Pada penelitian ini (Gambar 5.2) yang didasarkan pada hasil analisis terbukti bahwa pemberian terapi kombinasi *5-Fluorouracil* sebagai obat kemoterapi kanker dan DPE dengan tiga dosis berbeda dapat meningkatkan persentase apoptosis secara signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (5-Fu dan DPE)  $p=0.000$  ( $p<0.05$ ), semakin meningkat dosis ekstrak ethanol benalu mangga maka persentase apoptosis semakin meningkat dengan dosis maksimum  $50\mu\text{g/ml}$  dan adanya perbedaan yang bermakna dari setiap

perlakuan dengan masing-masing dosis, penelitian ini sejalan dengan Duo *et al* (2012) semakin meningkat dosis quercetin semakin meningkat pula persentase apoptosis pada MCF 7 sel line. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan DPE dengan senyawa aktif quercetin dapat lebih meningkatkan jumlah sel yang mengalami kematian atau apoptosis pada sel HeLa yang dikombinasikan dengan agen kemoterapi konvensional, mekanisme dari kedua obat baik 5-Fu dan ekstrak benalu mangga yang masing-masing memiliki target dalam menginduksi apoptosis diduga menjadi penyebab peningkatan persentase dari apoptosis melalui jalur intrinsik mitokondria yang melibatkan protein pro apoptosis keluarga Bcl-2 yakni Bax dan Bid, yang menyebabkan lepasnya sitokrom C dari mitokondria yang diawali dengan peningkatan permeabilitas membran, namun dalam penelitian ini tidak memfokuskan pada peran protein pro apoptosis tersebut, sedangkan pada kelompok kontrol yang menggunakan terapi tunggal ekstrak benalu mangga berdasarkan hasil analisis juga dapat meningkatkan apoptosis sehingga ekstrak benalu mangga merupakan salah satu kandidat potensial anti kanker (Gambar 5.3). Hal ini di duga merupakan efek dari quercetin yang mengaktifkan p53 yang diikuti dengan pembelahan Mcl-1 yang merupakan penanda apoptosis, menghambat protein anti apoptosis, menginduksi protein pro apoptosis Bax yang meningkatkan permeabilitas membran sehingga menyebabkan pelepasan sitokrom C. Nui *et al*, (2011) menyatakan quercetin menginduksi apoptosis melalui mekanisme jalur mitokondria, menghambat ekspresi Cox-2 yang mungkin mengatur ekspresi Bcl-2/Bax untuk mengaktivasi caspase 3. Quercetin juga dapat bersifat sebagai anti proliferasif dan menginduksi apoptosis pada sel HeLa melalui jalur PI3k/Akt, Akt merupakan protein anti apoptosis yang bekerja dengan memfosforilasi p21 sehingga mengganggu ikatan antara p21 dan PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) yang menyebabkan terjadinya fase checkpoint

yang menyebabkan terjadinya DNA repair atau kematian sel (Kashafi *et al*, 2017; Xiu *et al*, 2018)

Xavier *et al*, (2011) dalam penelitiannya membuktikan bahwa kombinasi 5-*Fluorouracil* dengan senyawa flavonoid quercetin secara signifikan meningkatkan apoptosis melalui jalur mitokondria serta menginduksi p53 pada kanker colon sel line yang diinkubasi selama 24 jam. Penelitian lainnya menyatakan terdapat peningkatan apoptosis dan siklus sel arrest pada kombinasi terapi 5-*Fluorouracil* dengan *phenylpropanoids* pada sel line HeLa, dapat disimpulkan bahwa kemoterapi kanker dengan 5-Fu dalam kombinasi dengan agen lainnya dapat meningkatkan kelangsungan hidup penderita (Hemaiswarya dan Doble, 2013). Penelitian lainnya yang membuktikan bahwa senyawa flavonoid quercetin memberikan efek lebih terhadap peningkatan persentasi apoptosis dan menghambat pertumbuhan sel ganas yang dikombinasikan dengan obat antikanker pada kanker gaster baik study secara in vitro maupun in vivo (Syuan Lei *et al*, 2018).

## **6.2 Terapi kombinasi 5-Fu dan ekstrak benalu mangga menurunkan proliferasi sel HeLa**

Proliferasi sel merupakan bagian penting dari perkembangan kanker yang disebabkan oleh ekspresi protein dan atau aktivitas protein terkait adanya perubahan dari siklus sel. Proliferasi sel bergantung pada proses dari siklus sel, yang diatur dan dikendalikan oleh fase *checkpoint* pada fase G1/S dan G2/M, pada fase *checkpoint* sel yang rusak dan tidak dapat diperbaiki akan mengalami apoptosis sehingga proliferasi sel tidak terjadi (Duo *et al* 2012).

Dalam penelitian ini, penurunan proliferasi sel diamati pada kelompok perlakuan yaitu terapi kombinasi 5-Fu dan ekstrak ethanol benalu mangga yang dibandingkan dengan kelompok kontrol (Gambar 5.4). Proliferasi sel HeLa yang diberi terapi kombinasi secara signifikan menurun, diamati setelah inkubasi sel

selama 24 jam setelah pemberian terapi, dimana semakin tinggi dosis ekstrak ethanol benalu mangga maka semakin rendah persentase dari proliferasi sel dan terdapat perbedaan yang secara statistik bermakna pada tiga dosis berbeda (Gambar 5.5). Efek antiproliferatif quercetin pada sel kanker melalui beberapa mekanisme yakni senyawa tersebut menghambat siklus sel dan menginduksi apoptosis. Ekstrak *Dendrothoe pentandra.L* mampu menghambat proliferasi sel line K562 (*Human chronic myelogenous leukemia*) dan MCM-B2 (*Canine benign mixed mammary*) mekanisme antikanker dari DPE yaitu kandungan senyawa flavonoid yang bersifat antioksidan mampu menangkal radikal bebas serta menghambat enzim yang terlibat dalam pembentukan ROS dan memblokir senyawa oksidasi seluler, selain itu flavonoid memodulasi jalur proliferasi kanker, menyebabkan *cell cycle arrest*, dan menginduksi terjadinya apoptosis (Elsyana *et al*, 2016). Bragonhol *et al*, (2006) menganalisis efek quercetin pada sel glioma manusia yang diberi terapi quercetin 10-100 $\mu$ M, proliferasi sel berkurang pada dosis 30  $\mu$ M, quercetin diduga menyebabkan G2/M *arrest* dengan meningkatkan caspase 3 dan caspase 7. Chou *et al*, (2007) mengevaluasi efek quercetin pada sel MCF-7 dimana quercetin menyebabkan fase S *Arrest* dengan menurunkan ekspresi protein CDK2, siklin A dan B (Tekin dan Ozturk, 2017).

Quercetin yang banyak terdapat pada buah dan sayuran, terbukti dapat menghambat pertumbuhan sel tumor, mencegah kanker dan menekan proliferasi sel kanker dengan menginduksi apoptosis atau menghentikan siklus sel pada fase G2/M (Ren *et al*, 2015; Priyadarsini *et al*, 2010). Penelitian lainnya membuktikan bahwa quercetin memiliki efek sebagai antiproliferasi dan pro apoptosis pada sel HeLa serta mampu menghambat perkembangan kanker (Xiu Mei *et al*, 2018). Senyawa quercetin yang terkandung dalam benalu mangga mampu menghambat siklus sel pada fase G2/M melalui peningkatan regulasi p21 dan cyclin B yang mengatur siklus sel arrest pada fase G1 dan fase G2/M pada sel kanker,

dilaporkan juga bahwa dosis quercetin 50 sampai 200  $\mu\text{M}$  secara signifikan menghambat proliferasi sel yang diberikan pada sel line MCF-7 (Sakhile *et al*, 2014). Flavonoid quercetin menunjukkan efek inhibitor pada proliferasi sel dengan meningkatkan Bax atau menurunkan Bcl-2 dan mengaktivasi caspase, yang efektif dalam proses apoptosis (Tekin dan Ozturk, 2017). *5-Fluorouracil* sebagai antimetabolit yang bersifat enzimatis dimetabolisme dalam tubuh sehingga menjadi efektif, masih menjadi obat konvensional utama dalam terapi keganasan diberikan sebagai terapi tunggal ataupun kombinasi dengan agen kemoterapi lainnya. Di dasarkan pada hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa kombinasi 5-Fu dan DPE menurunkan proliferasi sel HeLa pada berbagai macam konsentrasi hal ini didukung oleh beberapa penelitian sebelumnya menurut Rejhova *et al*, (2018) terapi kombinasi *5-Fluorouracil* dengan quercetin yang di uji ke sel line HT-29 menunjukkan terjadinya penurunan viabilitas sel secara signifikan, menghambat pertumbuhan sel oleh peningkatan ekspresi gen p53 dan p21 pro apoptosis, dan selanjutnya menghambat ekspresi COX-2. Kombinasi 5-Fu dan eugenol terbukti menyebabkan siklus sel *arrest* pada fase G0/G1 atau fase S, kombinasi tersebut mengurangi proliferasi sel HeLa dibandingkan dengan kelompok kontrol (Hemaiswarya dan Doble, 2013).

Terapi kombinasi adalah strategi pengobatan yang paling efektif dalam melawan kanker, faktanya lebih memiliki banyak target dalam terapi kanker dengan berbagai mekanisme yang mungkin merupakan efek dari obat antikanker ataupun bahan alami yang dikombinasikan, dasar pemikirannya terapi kombinasi menggunakan obat yang bekerja dengan mekanisme yang berbeda, sehingga mengurangi kemungkinan perkembangan sel kanker yang resisten. Interaksi agen kemoterapi konvensional dengan bahan alami pada akhirnya dapat memungkinkan alternatif baru dalam terapi kanker. Temuan ini dapat mengarah pada strategi pengobatan baru dan juga bisa membuka peluang pengurangan

jumlah agen antikanker yang dibutuhkan sebagai dosis terapeutik penurunan jumlah obat sintesis pada akhirnya dapat menyebabkan penurunan toksisitas dan efek samping yang ditimbulkan pada pasien.

### **6.3. Keterbatasan Penelitian**

Keterbatasan dalam Penelitian ini tidak memfokuskan protein pro apoptosis seperti Bax, Bid pada jalur intrinsik mitokondria setelah di beri terapi kombinasi 5-*Fluorouracil* dan ekstrak ethanol benalu mangga

### **6.4 Implikasi Kebidanan**

Profesi bidan dekat dengan masyarakat khususnya kaum perempuan, salah satu peran bidan berfokus pada kesehatan reproduksi sehingga penyampaian informasi dalam bentuk penyuluhan kesehatan sering dilakukan, olehnya itu informasi tentang pemanfaatan bahan alam sebagai pengobatan dalam kanker serviks namun bukan sebagai pengganti obat standar dapat disampaikan secara akurat dan ilmiah.



## BAB 7 PENUTUP

### 7.1 Kesimpulan

1. Terapi kombinasi 5-*Fluorouracil* dan ekstrak benalu mangga berdasarkan hasil penelitian terbukti dapat meningkatkan persentase apoptosis pada sel HeLa dibandingkan dengan terapi tunggal 5-*Fluorouracil*.
2. 5-*Fluorouracil* yang dikombinasikan dengan ekstrak benalu mangga dalam penelitian ini terbukti dapat menurunkan proliferasi sel HeLa dibandingkan dengan terapi tunggal 5-*Fluorouracil*.
3. Dosis ekstrak benalu mangga dalam terapi kombinasi, yang paling efektif dalam meningkatkan apoptosis adalah 50µg/ml.
4. Dosis ekstrak benalu mangga dalam terapi kombinasi, yang paling efektif dalam menurunkan proliferasi sel yaitu dosis 50µg/ml.

### 7.2 Saran

1. Perlunya pengembangan penelitian ini untuk lebih spesifik mengetahui protein pro apoptosis yang tereskpresi setelah pemberian terapi kombinasi dengan metode penelitian in vivo dan menggunakan metode pengukuran yang berbeda

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed M., Jamil K. 2011. *Cytotoxicity of neoplastic drugs Gefitinib, Cisplatin, 5-FU, Gemcitabine, and Vinorelbine on human cervical cancer cells (HeLa)*. Article Biologi and medicine, **3** (5): 60-71, 2011.
- Backer C. A and Van den Brink R. C. B. 1965. *Flora of Java (spermatophytes only)*, Vol II. N.V.P. 363-364, 424-425. Noordhoff-Groningen Netherlands.
- Dasari S., Wudayagiri R., Valluru L. 2015. *Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment*. Clinica Chimica Acta **445** (2015) 7-1.
- Dahlan S. 2011. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan . Jakarta : Salemba Medika.
- Deng. Y., Xiong. Y., Liu. Y. 2016. *miR-376c inhibits cervical cancer cell proliferation and invasion by targeting BMI1*. International Journal Experimental pathology (2016) **97**, 257-265.
- Domingo. J. E., Noviani R., Noor M.R., Ngelangel C. A., Limpaphayom K. K., Thuan T. V., Louie K. S., Quinn M. A. 2008. *Epidemiology and Prevention of cervical cancer in Indonesian, Malaysia, the Philippines, Thailand and vietnam*. Vaccine (2008) M71–M79.
- Dooban J., Egawa N., Griffin H., Kranjec CH., Murakami I. 2016. *Human papillomavirus molecular biology and disease association*. Medical Virulogy (2016); **25**: 2-23.
- Dun J., Chen X., Gao H., Zhang Y., Zhang H., Zhang Y. 2015. *Resveratrol synergistically augments anti-tumor effect of 5-FU in vitro and in vivo by increasing S-phase arrest and tumor apoptosis*. Experimental Biology and Medicine 2015; **0**: 1–10.
- Duo J., Guang Ying G., Wen gang G., Zhang L. 2012. *Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation*. Moleculer Medicine Reports **5**: 1453-1456, 2012.
- Duncan J. S., Turowec J. P., Vilk G., Shawn S. C., Gregory B., Litchfield D. W. 2010. *Regulation of cell proliferation and survival: Convergence of protein kinases and caspases*. Biochimica et Biophysica Acta **1804** (2010) 505–510.
- Duronio R. J., Xiong Y. 2013. *Signaling pathways that control cell proliferation*. Biology Library-E on march **4** (2013).
- Endharti. A. T., Wulandari. A., Listyana. A., Norahmawati. E., Permana. S. 2016. *Dendrophthoe pentandra (L.) Miq extract effectively inhibits inflammation, proliferation and induces p53 expression on colitis-associated colon cancer*. BMC Complementary and Alternative Medicine (2016)



- Elsyana V., Bintang M., Priosoeryanto. 2016. *Cytotoxicity and Antiproliferatif activity assay of Clove Mistletoe (Dendrophthoe pentandra (L) Miq) leaves extracts*. Advances in Pharmacological Sciences 2016.
- Freitas A. C., Pavla A., Gurgel A. D., Chagas B. S., Coimbra E. C., Medeiros Amaral C. M. 2012. *Susceptibility to cervical cancer: An overview*. Gynecologic oncology **126** (2012) 304-311.
- Ganesh. G. T., Abishek. B. M., Saurabh. C., Sarada. N.C. 2013. *Cytotoxic and Apoptosis induction potential of mimusops elengi.L in human cervical cancer (SiHa) cell line*. Journal of King Saud University – Science **26** (2014) 333–337.
- Gubellini L., Pinti M., Nasi M., Montagna J. P., Biasi S., Roat E., Bertonceli L., Cooper E., Cossarizza A. 2011. *Quercetin and cancer chemoprevention*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2011.
- Hassan M., Watari H., Almaaty., Ohba Y., Sakuragi N. 2014. *Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer*. BioMed Research International 2014.
- Hanafiah K. A. 2012. Rancangan percobaan teori dan aplikasi. Edisi ketiga. Jakarta : Raja Grafindo Persada.
- Hazzani A. A., Alshatwi A. A. 2011. *Catechin hydrate inhibits proliferation and mediates apoptosis of SiHa human cervical cancer cells*. Food and Chemical Toxicology **49** (2011) 3281–3286.
- Hemaiswarya S., Doble M. 2013. *Combination of phenylpropanoids with 5 fluorouracil as anti-cancer agents against human cervical cancer (HeLa) cell line*. Phytomedicine **20** (2013) 151–158.
- Hyland L. 2008. *Cell proliferation and Its regulation*. Molecular Biology of the Cell; 5th Edition, Garland Science, 2008.
- Ikawati M., Wibowo A. E., Octa N. S., Adelina R. 2008. Pemanfaatan benalu sebagai antikanker. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Jadon G., Joshi K. Y. 2012. *Cervical Cancer*. Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research **1** (1) 2012, 01-04.
- Jaferian S., Negahdari B., Eatemadi A. 2016. *Colon cancer targeting using conjugates biomaterial 5-fluorouracil*. Biomedicine & Pharmacotherapy **84** (2016) 780–788.
- Kashafi. E., Moradzadeh. M., Mohamadkhani. A., Erfanian. S. 2017. *Kaempferol Increases Apoptosis in Human Cervical Cancer HeLa Cells via PI3K/AKT and Telomerase Pathways*. Biomedicine & Pharmacotherapy **89** (2017) 573-577.



- Kacar O., Cevatemre B., Hatipoglu I., Arda N., Ulukaya E., Yilmaz V. Y., Acilan C. 2017. *The role of cell cycle progression for the apoptosis of cancer cells induced by palladium(II)-saccharinate complexes of terpyridine*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **25** (2017) 1770–1777.
- Kessler S. F., Wexler C., Maloba M., Mabachi M., Moffor F. N., Bukusi E. 2016. *Cervical cancer prevention and treatment research in Africa: a systematic review from a public health perspective*. *BMC Women's Health* (2016) 16:29.
- Landry J., Pyl P. T., Rausch T., Zichner T., Tekkedil M., Stutz A. M., Jauch A., Aiyar R. S., et al. 2013. *The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line*.
- Lopes. C.S., Krauskopf. E., Villota. C.E., Burzio. L.O., Villegas. J.E. 2017. *Cervical cancer, human papillomavirus and vaccines: assessment of the information retrieved from general knowledge websites in Chile*. *Public Health* **148** (2017) 19-24.
- Li R., Peng C., Zhang X., Wu Y., Pan S., Xiao Y. 2017. *Roles of Arf6 in cancer cell invasion, metastasis and proliferation*. *Life Sciences* **182** (2017) 80–84.
- Liu Y., Bi T., Dai W., Wang G., Qion., Gao Q., Shen G. 2015. *Oxymatrine synergistically enhances the inhibitory effect of 5-fluorouracil on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo*. *International Society of Oncology and Biomarkers (ISOBM) 2015*.
- Lucey B. P., Rees N., Hutchins GM. 2009. *Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination*
- Merino J. M., Paredes A. C., Ulloa E. V., zavaleta L. R., Gonzales A. F., Lizano M. 2014. *The Role of Signaling Pathways in Cervical Cancer and Molecular Therapeutic Targets*. *Archives of Medical Research* **45** (2014) 525-539.
- Muqbil I., Mohammad R. M., Lowe L., Yedjou C., Yin Hsu H., et al. 2015. *Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer*. *Seminars in Cancer Biology* **35** (2015) S78–S103.
- Mittelman D., Wilson J. 2013. *The fractured genome of HeLa cells*. *Genome Biology* 2013, 14:111.
- Miura K., Kinouchi M., Ishida K., Fujibuchi W., Naitoh T., Ogawa H., Ando T., Yazaki N., et al. 2010. *5-FU Metabolism in Cancer and Orally Administrable 5-FU Drugs*. *Cancers* 2010, **2**, 1717-1730.
- Mollaei H., Safaralizadeh R., Babaei E., Abedini M. R., Hoshyar R. 2017. *The anti-proliferative and apoptotic effects of crocin on chemosensitive and chemoresistant cervical cancer cells*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **94** (2017) 307 – 316.

- Novel S.S., Safitri R., Nuswantara S. 2012. *Human Papillomavirus*. Universitas Padjadjaran Bandung Indonesia. **39** (5) (2012).
- Nurfaat D. L., Indriyati W. 2016. *Uji toksisitas akut ekstrak etanol benalu mangga (Dendrophthoe petandra) terhadap mencit swiss webster*. Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Jawa Barat, Indonesia. **3**, (2), Juni 2016.
- Nui G., Yin S., Xie S., Li Y., Nie D., Ma L., Wang X., Wu Y. 2011. *Quercetin induces apoptosis by activating caspase-3 and regulating Bcl-2 and cyclooxygenase-2 pathways in human HL-60 cells*. *Acta Biochim Biophys Sin* 2011, **43**: 30–37.
- Peng Y., Zhao Z., Guo C. S., Zhang Y. X., Jiang B., Wang li Q. 2013. *Effects and Mechanism of Baicalin on Apoptosis Cervical Cancer HeLa Cells in vitro*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (2015), **14** (1): 251-261.
- Petignat P., Roy M. 2007. *Diagnosis and management of cervical cancer*. 13 Oktober 2007. **355**.
- Pensel P. E., Elissondo N., Gambino G., Gamboa G. U., Benoit J. P., Elissondo M. C. 2017. *Experimental cystic echinococcosis therapy: In vitro and in vivo combined 5-fluorouracil/albendazole treatment*. *Veterinary Parasitology* **245** (2017) 62-70.
- Priyadarsini R. V., Murungan. R. S., Maitreyi. S., Ramalingan. K., Karunagaran. D. B., Nagini, S. 2010. *The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- $\kappa$ B inhibition*. *European Journal of Pharmacology* **649** (2010) 84-91.
- Ramesh. E., Alshatwi. A. A. 2012. *Naringin induces death receptor and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (SiHa) cells*. *Food and Chemical Toxicology* **51** (2013) 97–105 .
- Rachmawati E., Karyono S., Suyuti H. 2012. *The Effect of Annona Muricata Leaf on Proliferation and Appoptosis of HeLa Cells Mediated by p53*. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, **27** (1) Februari 2012.
- Ramakrishnan S., Patricia S., Mathan G. 2015. *Overview of highrisk HPV 16 and 18 infected cervical cancer; pathogenesis to prevention*. *Biomed pharmacotherapy*. 2015 Mar;**70**;103-10.
- Rasjidi I. 2009. *Epidemiologi kanker serviks*. Divisi Ginekologi Onkologi, Departemen Obstetri dan Ginekologi Siloam Hospitals. *Indonesian Journal of Cancer*. **3** (3).
- Rejhova A., Opattova A., Cumova A., Sliva D., Vodicka P. 2018. *Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment*. *European Journal of Medicinal Chemistry* **144** (2018) 582-594.
- Rebecca SY. W. 2011. *Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment*. *Journal of experimental & clinical cancer research* 2011, 30:87.

- Ren M. X., Hui Deng X., Ai F., yuan G., Yan Song H. 2015. *Effect of quercetin on the proliferation of the human ovarian cancer cell line SKOV-3 in vitro*. *Experimental and Therapeutic Medicine* **10**: 579-583, 2015.
- Sadahiro. T., Suzuku T., Tanak A., Okada K., Okamura H., Kamijo A., Nagase H., Uchida J. 2011. *High Level of Thymidine Phosphorylase Gene Expression in Tumour Tissues is Associated With Response to Oral Uracil and Tegafur/leucovorin Chemotherapy in Patients With Colorectal Cancer*. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011 Mar; **65**(4):735-42.
- Sankaranarayanan. R. 2015. *HPV vaccination: The most pragmatic cervical cancer primary prevention strategy*. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* **131** (2015) S33–S35.
- Sastroasmoro S. 2011. *Dasar-dasar metodologi penelitian klinis*. Edisi keempat. Jakarta : CV. Sagung Seto.
- Sakhile K. S., Eddy O., Tendekayi G., Protus S., sabelov D. 2014. *Molecular mechanism of the effects of quercetin on human breast cancer cells*. *Direct Research Journal of Health and Pharmacology (DRJHP)* **2** (1), pp. 6-9
- Sharmaa G., Ranaa N. K., Singh P., Dubeya P., Pandey D. S., Koch B. 2017. *p53 dependent apoptosis and cell cycle delay induced by heteroleptic complexes in human cervical cancer cells*. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **88** (2017) 218–231.
- Sangthong. S., Sangphech. N., Vilaivan. T., Palaga. T., Ngamrojanavanich. N., Puthong. S., Muangsin. N. 2014. *Anthracene-9, 10-dione derivatives induced apoptosis in human cervical cancer cell line (CaSki) by interfering with HPV E6 expression*. *European Journal of Medicinal Chemistry* **77** (2014) 334-342.
- Sudiwati N., Nurseta T., Aulani., Mulyohadi A. 2015. *In-vitro and In-silico Anticancer Activity of Parasitic Tea Plant Scurrula atropurpurea (Blume) Danser against Cervical Cancer*. *International Journal of Pharm Tech Research*. **8**, No.7, pp 12-18, 2015.
- Su Z., Yang Z., Xu Y., Chen Y., Yu Q. 2015. *Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis*. *Molecular Cancer* (2015) 14:48.
- Sulaiman. S. N., Mat-Isa. N. A., Othman. N. H., Ahmada. F. 2015. *Improvement of features extraction process and classification of cervical cancer for the neuralpap system*. *Procedia Computer Science* **60** ( 2015 ) 750 – 759.
- Sun Qing., Liang Y., Zhang T., Wang K., Yang X. 2017. *ER- $\alpha$ 36 mediates estrogen-stimulated MAPK/ERK activation and regulates migration, invasion, proliferation in cervical cancer cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **487** (2017) 625-632.

- Srivastava S., Somasagara R., Hegde M., Nishana M., Tadi S. K., Srivastva M., Choudhary B., Raghavan S. C. 2016. *Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, Arrest Cell Cycle and causes Tumor regression by activating Mitochondrial pathway of apoptosis*. Scientific Report **6** (2016) 24049.
- Syuan Lei C., Chen Hou Y., Hui Pai M., Tsan Lin M., Ling Yeh S. 2018. *Effects of quercetin combined with anticancer drugs on metastasis-associated factors of gastric cancer cells: in vitro and in vivo studies*. Journal of Nutritional Biochemistry **51** (2018) 105–113.
- Tekin G., Ozturk B. 2017. *Effects of Quercetin and Hesperetin on MCF-7 Cell Proliferation by Using Real-Time Cell Analyzer*. Journal of Basic and Clinical Pharmacy **8**:121-126.
- Wang. K. L. 2007. *Human Pappilomavirus and vaccination in cervical cancer department of obstetrics and gynecology*. Taiwan Journal Obstetry Gynecology .December 2007. **46**(4).
- Wang W., Sun C., Mao L., Peihua M., Liu F., Yang J., Gao Y. 2016. *The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review*. Trends in Food Science & Technology **56** (2016) 21-38.
- Wei Keat. Ng., Yazan. L. S., Ismail. M. 2011. *Thymoquinone from Nigella sativa was more potent than cisplatin in eliminating of SiHa cells via apoptosis with down-regulation of Bcl-2 protein*. Toxicology in Vitro **25** (2011) 1392–1398.
- Xavier CP., Lima CF., Rohde M., Pereira-Wilson c. 2011. *Quercetin enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53 modulation*. Cancer Chemother Pharmacol. 2011 Dec;**68**(6):1449-57.
- Xiu M., Liu J., Fang-Fang Pan, Dong-Dong Shi, Zhi-Guo Wen, Pei-Long Y. 2018. *Quercetin and aconitine synergistically induces the human cervical carcinoma HeLa cell apoptosis via endoplasmic reticulum (ER) stress pathway*. PLoS ONE **13**(1).
- Zainuddin N. I. S., Sul'ain M. D. 2015. *Antiproliferatif effect of Dendrophthoe pentandra extracts towards human breast adenocarcinoma cells (MCF-7)*. Jurnal teknologi Malaysia:**2** (2015) 35-39.
- Zhao-jie Chen., Zhang Z., Bei-bei Xie., Zhang H. 2016. *Development and evaluation of topotecan loaded solid lipid nanoparticles: A study in cervical cancer cell lines*. Journal of Photochemistry & Photobiology,: Biology **165** (2016) 182–188.
- Zhang X. H., Liang L., Wang X. Y., Zhang L., Zheng Y. X., Deng H. Z., Wu X. R. 2016. *Matrine enhances the inhibitory effect of 5-FU on SW480 cells in vitro and in vivo*. Sains Malaysiana **45**(1)(2016): 109–113.