

**PENGARUH PEMBERIAN
EKSTRAK DAUN CIPLUKAN (*Physalis angulata L.*)
TERHADAP APOPTOSIS DAN PROLIFERASI
KULTUR SEL RETINOBLASTOMA**

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Dokter Spesialis Mata



Oleh :

MARSHA DECHAstra CHAIRISSY

NIM : 148070600111007

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

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

MALANG

2018

HALAMAN PENGESAHAN

HASIL PENELITIAN ANALITIK

**PENGARUH PEMBERIAN
EKSTRAK DAUN CIPLUKAN (*Physalis angulata L.*)
TERHADAP APOPTOSIS DAN PROLIFERASI
KULTUR SEL RETINOBLASTOMA**

Oleh :

Marsha Dechastra C.

NIM : 148070600111007

Dibacakan pada tanggal :

29 November 2018

dr.Lely Retno Wulandari Sp. M (K)

NIP:19741213 200812 2 002

Pembimbing I

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

NIP: 446/DF/367 1/3573 306/2009

Pembimbing II

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

Ketua Program Studi

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Marsha Dechastra Chairissy

NIM : 148070600111007

Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri.

Apabila dikemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, Desember 2018

Yang membuat pernyataan,

Marsha Dechastra Chairissy
NIM 148070600111007

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr.Wb.

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikan kemudahan, rahmat, petunjuk dan hidayahnya sehingga saya dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul "**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN CIPLUKAN (*Physalis angulata L.*) TERHADAP APOPTOSIS DAN PROLIFERASI KULTUR SEL RETINOBLASTOMA**".

Sehubungan dengan itu penulis ingin menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. **Prof. DR. Nuhfil Hanani A.R., M.S.** selaku Rektor Universitas Brawijaya
2. **DR. dr. Sri Andarini , M.Kes** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
3. **dr. Restu Kurnia, M.Kes** selaku Direktur RSUD dr. Saiful Anwar Malang
4. **dr. Safaruddin Refa Sp.M-KVR** selaku Kepala SMF Ilmu Kesehatan Mata RSUD dr. Saiful Anwar Malang
5. **DR.dr. Seskoati Prayitnaningsih, Sp.M (K)** selaku Ketua Program Studi PPDS-1 Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
6. **dr. Lely Retno Wulandari, Sp.M (K)** selaku dosen pembimbing 1 seklaigus orang tua asuh saya atas segala semangat, masukan, bimbingan, dan bantuan yang diberikan selama penulisan tugas akhir ini dan selama saya menjalani pendidikan di IK Mata.
7. **dr. Hidayat Sujuti, Sp.M Ph.D** selaku dosen pembimbing 2 atas segala masukan, bimbingan, dan bantuan yang diberikan selama penulisan tugas akhir ini.



8. **DR. dr. Debby Shintiya Dewi, Sp.M (K)** selaku orang tua asuh saya atas segala semangat, bimbingan, dan bantuan yang diberikan selama saya menjalani pendidikan di IK Mata.
9. **Seluruh guru, supervisor**, di SMF IK Mata RSSA-FKUB yang selama ini telah membimbing, mengajar, berbagi ilmu, dan memberikan semangat serta nasehat yang sangat berarti selama proses pendidikan di IK Mata
10. **Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang** beserta jajaran stafnya atas segala bantuannya selama berlangsungnya pengerjaan tugas akhir ini.
11. Seluruh Keluarga Besar, khususnya **kedua orang tua dan mertua, Istri dan anak-anakku tersayang**, serta **adik-adikku** atas semua pengorbanan, dukungan, kasih sayang, semangat, dan do'a yang tiada henti.
12. **Teman-teman satu angkatan Juli 2014** (Mbak Asa, Mbak Ayu, Mbak Oli, Tata, Eci) atas kebersamaan, pengertian dan bantuan kalian selama ini.
13. **Teman-teman PPDS, Para Senior PPDS dan Adik-adik tingkat PPDS** atas segala bantuan dan dukungannya selama ini.
14. Dan yang terakhir untuk **semua pihak yang telah membantu** dalam penyelesaian Tugas Akhir ini baik secara langsung maupun tidak langsung yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu. Semoga Allah memberi balasan kepada kalian dengan kebaikan yang banyak.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih banyak kekurangan, kesalahan dan jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun dalam menyempurnakan tulisan ini, sehingga dapat semakin banyak mendatangkan manfaat. Amien.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, Desember 2018

Marsha Dechastra Chairissy

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIASI	iii
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	
1.3.1 Tujuan umum	4
1.3.2 Tujuan khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	
1.4.1 Manfaat Akademis	4
1.4.2 Manfaat Klinis	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Retinoblastoma.....	5
2.1.1 Definisi	5
2.1.2 Epidemiologi	6
2.1.3 Patogenesis	6
2.1.4 Faktor Resiko	9
2.1.5 Klasifikasi Retinoblastoma	9
2.1.6 Diagnosis	12
2.1.6.1 Anamnesa	13
2.1.6.2 Manifestasi klinis	13
2.1.6.3 Pemeriksaan penunjang	16
2.1.7 Diagnosis banding.....	19
2.1.8 Penatalaksanaan	29
2.1.8.1 Terapi retinoblastoma intraokuler	20
2.1.8.2 Terapi retinoblastoma ekstraokuler	25
2.1.8.3 Terapi paliatif	25
2.1.9 Prognosis	26
2.2 Regulasi proliferasi dan apoptosis sel	26
2.2.1 Kerusakan DNA	26
2.2.2 Jalur pRB	27
2.2.3 Jalur p53	28
2.2.4 Interaksi pRB dan p53	28
2.3 Ciplukan (<i>Physalis angulata L.</i>).....	29
2.3.1 Deskripsi.....	29
2.3.2 Morfologi	30
2.3.3 Taksonomi	31
2.3.4 Kandungan kimia.....	31
2.3.5 Potensi <i>Physalis angulata L</i> sebagai Antikanker	33
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep	35
3.2 Kerangka Teori	36
3.3 Hipotesis Penelitian	37
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	



4.1	Rancangan Penelitian	38
4.2	Tempat dan Waktu Penelitian	38
4.3	Sampel Penelitian	38
4.3.1	Kriteria inklusi sampel penelitian	38
4.3.2	Kriteria eksklusi sampel penelitian.....	39
4.4	Penentuan besar sampel penelitian	39
4.5	Variabel Penelitian	39
4.5.1	Variabel bebas	39
4.5.2	Variabel dependen.....	39
4.6	Penentuan Besar Dosis	39
4.7	Definisi Operasional	40
4.8	Alat Penelitian	40
4.8.1	Kultur sel retinoblastoma	40
4.8.2	Pembuatan ekstrak ciplukan.....	40
4.8.3	Jumlah Proliferasi Sel menggunakan <i>MTT Cell Proliferation Assay</i>	41
4.8.4	Jumlah Apoptosis menggunakan <i>flowcytometry Annexin V Apoptosis Detection Kit</i>	41
4.9	Bahan penelitian	41
4.9.1	Kultur sel retinoblastoma.....	41
4.9.2	Ekstrak daun ciplukan.....	42
4.9.3	Pemeriksaan proliferasi menggunakan <i>MTT Cell Proliferation Assay</i>	42
4.9.4	Pemeriksaan apoptosis menggunakan <i>flowcytometry Annexin V Apoptosis Detection Kit</i>	42
4.10	Prosedur penelitian	42
4.10.1	Kultur sel retinoblastoma	42
4.10.2	Pembuatan sediaan ekstrak daun ciplukan.....	43
4.10.3	Pembuatan dosis ekstrak daun ciplukan.....	44
4.10.4	Perlakuan kultur sel retinoblastoma	45
4.10.5	Prosedur Pemeriksaan proliferasi menggunakan <i>MTT Cell Proliferation Assay</i>	45
4.10.6	Prosedur Pemeriksaan apoptosis menggunakan <i>flowcytometry Annexin V Biotin Kit Apoptosis Detection</i> ...	46
4.11	Rancangan Analisa Data	46
4.12	Alur Kerja Penelitian.....	47
4.13	Organisasi Penelitian	47
4.14	Jadwal Penelitian	48
BAB 5 HASIL PENELITIAN		
5.1	Gambaran Umum Hasil Penelitian	49
5.2	Data Hasil Penelitian	49
5.3	Analisa Statistik	50
5.3.1	Uji Normalitas	50
5.3.2	Uji Homogenitas	51
5.3.3	Uji One Way Anova.....	51
5.3.4	Uji Tukey	51
BAB 6 PEMBAHASAN		
6.1	Pengaruh Ekstrak Daun Ciplukan (<i>Physalis angulata sp.</i>) terhadap Apoptosis Sel Kultur retinoblastoma.....	55
6.2	Pengaruh Ekstrak Daun Ciplukan (<i>Physalis angulata sp.</i>) terhadap Proliferasi Sel Kultur retinoblastoma	57
6.3	Mekanisme anti-kanker oleh Ciplukan (<i>Physalis angulata sp.</i>)	59
6.4	Keterbatasan Penelitian	62

BAB 7 PENUTUP	
7.1 Kesimpulan	64
7.2 Saran	64
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Klasifikasi Reese-Ellsworth 10

Tabel 2.2 Klasifikasi ABC pada Retinoblastoma..... 11

Tabel 2.3 Sistem Staging TNM untuk Retinoblastoma 12

Tabel 5.1 Rerata hasil pengamatan apoptosis dan proliferasi kultur sel
retinoblastoma pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 50

Tabel 5.2 Tabel Hasil Uji Normalitas 50

Tabel 5.3 Tabel Hasil Uji Homogenitas 51

Tabel 5.4 Tabel Hasil Uji *One-way Anova* 51

Tabel 5.5 Tabel Hasil Uji Tukey Apoptosis..... 52

Tabel 5.4 Tabel Hasil Uji Tukey Proliferasi 52



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Ilustrasi Perbandingan Mata Normal dengan Retinoblastoma	5
Gambar 2.2	Mekanisme inaktivasi RB1 dalam proliferasi sel normal (A) dan tumorigenesis (B).....	7
Gambar 2.3	Interaksi p53 dan RB1 dalam regulasi apoptosis sel	8
Gambar 2.4	Klasifikasi Retinoblastoma berdasarkan <i>International Intraocular Retinoblastoma Classification (IIRC)</i>	11
Gambar 2.5	Gambaran leukokoria atau <i>white cat appearance</i> pada mata kiri	13
Gambar 2.6	Gambaran USG Retinoblastoma	15
Gambar 2.7	Gambaran CT scan retinoblastoma	16
Gambar 2.8	Gambaran MRI pada Pasien Retinoblastoma	16
Gambar 2.9	Gambaran <i>Flexner-Wintersteiner Rosettes</i> dengan Lumen Jernih di Sentral.....	18
Gambar 2.10	Gambaran <i>Homer-Wright Rosettes</i> yang tidak memiliki lumen dengan pusat tertutup filamen neural	18
Gambar 2.11	Gambaran <i>Florettes</i> pada retinoblastoma dengan seluruh sel fotoreseptor tampak berdeferensiasi	18
Gambar 2.12	Respon seluler terhadap kerusakan DNA	27
Gambar 2.13	Interaksi p53 dan RB1 dalam regulasi proliferasi dan apoptosis .	29
Gambar 2.14	Morfologi Tanaman Ciplukan (<i>Physalis angulata L</i>)	31
Gambar 2.15	Mekanisme apoptosis sel kanker paru (NCI-H23) oleh ekstrak kloroform <i>Physalis angulata L</i>).....	34
Gambar 5.1	Pengamatan kultur sel	49
Gambar 5.2	Grafik rata-rata Apoptosis	52
Gambar 5.3	Grafik rata-rata Proliferasi	53



Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Ciplukan (*Physalis angulata L.*)

Terhadap Apoptosis dan Proliferasi Kultur Sel Retinoblastoma

Marsha Dechastra Chairissy, Lely Retno Wulandari, Hidayat Sujuti
Departemen Ilmu Kesehatan Mata, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar, Malang, Indonesia

ABSTRAK

Latar Belakang : Ciplukan telah terbukti memiliki potensi anti kanker namun belum ada yang meneliti potensinya pada retinoblastoma

Tujuan : Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) terhadap apoptosis dan proliferasi kultur sel retinoblastoma.

Metode : Penelitian ini adalah penelitian eksperimental in-vitro, menggunakan kultur *cell line* retinoblastoma dan dibagi menjadi kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak daun ciplukan dosis 25 µg/mL, 50 µg/mL, dan 100 µg/mL. Setelah inkubasi selama 24 jam, dilakukan pemeriksaan dengan menggunakan *MTT cell proliferation assay* dan *Annexin V Apoptosis Detection*. Analisa statistik dilakukan menggunakan uji Tukey.

Hasil : Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun ciplukan dapat meningkatkan apoptosis dan menurunkan jumlah sel hidup secara signifikan pada sel retinoblastoma. Peningkatan apoptosis dan penurunan jumlah sel hidup sejalan dengan peningkatan dosis yang diberikan. Berdasarkan uji Tukey, didapatkan perbedaan signifikan pada kelompok perlakuan dosis 50 µg/ml ($p = 0,025$) dan 100 µg/ml ($p = 0,001$) pada pengukuran apoptosis. Pada pengukuran proliferasi didapatkan juga penurunan dari jumlah sel hidup yang signifikan pada kelompok perlakuan dosis 50 µg/ml ($p = 0,004$), dan 100 µg/ml ($p = 0,000$). Sedangkan pada dosis 25 µg/ml tidak didapatkan perbedaan yang signifikan pada kedua pengukuran tersebut. Peningkatan apoptosis dan penurunan jumlah sel hidup terbesar pada dosis 100 µg/ml. Penurunan dari jumlah sel hidup pada pengukuran proliferasi dapat disebabkan proliferasi yang terhambat ataupun oleh karena peningkatan dari apoptosis.

Kesimpulan : Ekstrak daun ciplukan dapat meningkatkan apoptosis pada kultur sel retinoblastoma namun untuk menghambat proliferasi masih memerlukan penelitian lebih lanjut.

KEYWORDS: Ciplukan, *Physalis angulata*, Apoptosis, Proliferasi, Retinoblastoma

repository.ub.ac.id

Pro-apoptotic and anti-proliferative effects of *Physalis angulata* leaf extract as an anti-cancer agent on Retinoblastoma Cells

Marsha Dechastra Chairissy, Lely Retno Wulandari, Hidayat Sujuti
Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya
Saiful Anwar General Hospital, Malang

ABSTRACT

BACKGROUND : Many studies have proven the anticancer potential of *Physalis angulata*, there has not been any study that proves its benefits in retinoblastoma cancer cells.

PURPOSE : To determine the effect of *Physalis angulata* leaf extract on apoptotic and proliferation of retinoblastoma cells

METHOD : This study is an in-vitro experimental study, using retinoblastoma cell line culture which is divided into control group whereas group I, II and III are given 25 µg/ml, 50 µg/ml, and 100 µg/ml of *Physalis angulata* leaf extract respectively. After 24 hours incubation, an examination using *MTT cell proliferation assay* and *Annexin V Apoptosis Detection* was carried out. Statistical analysis was performed using the Tukey test.

RESULTS : *The result showed that Physalis angulata leaf extract significantly induced apoptosis and reduce the number of living cells in retinoblastoma cells. Increased apoptosis and a decrease in the number of living cells were in line with the increase in given dose. Based on the Tukey test, a significant difference was found in the dose of 50 µg/ml (apoptosis $p=0.025$; proliferation $p=0.004$), and 100 µg/ml (apoptosis $p=0.001$; proliferation $p=0.000$). Meanwhile, at a dose of 25 µg/ml there was no significant difference in the two measurements. The greatest result were obtained at a dose of 100 µg/ml. A decrease in the number of living cells can be caused by inhibited proliferation or increasing amount of apoptosis.*

CONCLUSION : *Physalis angulata* leaf extract can increase apoptosis in retinoblastoma cell, but further research on how to inhibit proliferation is needed.

KEYWORDS: *Physalis angulata*, Apoptotic, Proliferation, Retinoblastoma cells

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Retinoblastoma merupakan keganasan intraokuler primer yang paling sering terjadi pada anak. Penyakit ini dapat memberikan dampak gangguan pada kesehatan dan penglihatan anak. Insiden retinoblastoma secara umum berkisar antara 1:14.000 sampai 1:34.000 kelahiran hidup.¹ Di Amerika Serikat, 250-350 anak terdiagnosa retinoblastoma setiap tahunnya. Jumlah tersebut mewakili sekitar 11% dari kanker secara keseluruhan selama periode pertama kehidupan, dan mewakili sekitar 4% kanker selama 15 tahun pertama kehidupan. Puncaknya terutama selama beberapa bulan pertama kehidupan, namun setelah usia 6 tahun insiden tersebut menjadi sangat amat rendah. Angka harapan hidup di Amerika Serikat adalah sangat tinggi mendekati 100%.² Namun, prognosis di negara lain tidak sebagus Amerika Serikat, hal ini berhubungan dengan kurangnya deteksi dan buruknya akses ke pelayanan kesehatan. Angka harapan hidup di Cina sebesar 81%, di India 48%, dan di Afrika sebesar 20-46%. Di seluruh dunia, diperkirakan bahwa 3000-4000 kematian terjadi setiap tahunnya disebabkan oleh retinoblastoma.³

Patogenesis retinoblastoma berawal dari gangguan regulasi siklus sel sehingga menyebabkan pertumbuhan sel retina yang abnormal. Disebutkan pada retinoblastoma terjadi mutasi atau inaktivasi protein tumor supresi diantaranya adalah protein retinoblastoma (pRB) dan faktor transkripsi p53.⁴ pRB dan p53 merupakan dua jalur utama supresi tumor yang mengontrol respon seluler terhadap stimulus onkogenik seperti kesalahan pembelahan sel, kerusakan DNA dan sinyal mitogenik yang tidak sesuai. Masing-masing jalur tersebut memiliki regulator dan efektor tertentu yang keduanya bertujuan untuk menghentikan siklus sel atau bahkan menginduksi apoptosis.⁵ Inaktivasi pRB dapat menyebabkan sel masuk ke dalam fase proliferasi yang selanjutnya berakibat replikasi DNA yang tidak terkontrol dan hasil replikasi yang tidak sempurna.⁶ Gangguan jalur pRB saja tidak cukup untuk menginduksi terbentuknya tumor. Disregulasi pada jalur p53 juga akan menginduksi anti-*apoptosis* dan pertumbuhan sel yang berlebihan.⁷

Pada umumnya, retinoblastoma terdeteksi pertama kali ketika tumor putih tampak melalui pupil (leukokoria) atau gangguan penglihatan. Gambaran

klinis lain yang sering muncul adalah strabismus dan inflamasi okular. Sedangkan gambaran klinis lain yang mungkin tampak antara lain heterochromia iris, hifema, perdarahan vitreous, selulitis orbita, glaukoma, proptosis dan hipopion.⁶ Diagnosis awal dan tatalaksana yang tepat dapat menyembuhkan kanker dan menyelamatkan penglihatan. Akan tetapi, diagnosis yang terlambat dapat menyebabkan invasi ke dalam saraf optik dan otak yang tidak dapat disembuhkan atau metastase ke anggota tubuh lain sehingga memerlukan intervensi ekstensif. Kegagalan diagnosis pada stadium awal akan menyebabkan kebutaan, gangguan kosmetik yang permanen dan pada kasus yang berat akan menyebabkan kematian, sehingga harus tanggap terhadap gejala dini retinoblastoma. Diagnosis dini dan pengobatan yang adekuat pada tumor yang masih terbatas intraokular dapat menghasilkan *survival rate* 90%-95%. Tanpa pengobatan, tumor ini akan berekstensi ke ekstraokular dan mempunyai prognosis yang buruk.⁷

Tatalaksana retinoblastoma bervariasi tergantung pada kondisi tumor. Di beberapa negara maju, retinoblastoma unilateral memiliki angka kesembuhan yang tinggi dengan enukleasi, sedangkan retinoblastoma bilateral membutuhkan terapi multimodalitas yang terdiri dari terapi lokal, kemoterapi dan radioterapi.⁸ Salah satu kekurangan terapi retinoblastoma yang ada saat ini adalah memiliki rentang index terapi yang sempit sehingga memungkinkan timbulnya toksisitas pada jaringan normal. Selain itu tingkat rekurensi yang cukup tinggi menyebabkan besarnya angka kegagalan terapi. Oleh karena itu, akhir-akhir ini peneliti mencoba mengembangkan agen anti-tumor yang bekerja dengan menargetkan mekanisme yang dapat menekan perkembangan tumor, salah satunya adalah pRB. Dua strategi utama yang telah dikembangkan dengan target RB1 sebagai terapi kanker antara lain eksploitasi mutasi RB1 dan reaktivasi fungsi penekan tumor dari RB1.⁹ Beberapa strategi lain yang sedang dikembangkan antara lain terapi viral, terapi gen, terapi sitokin, penggunaan vitamin D analog dan lain-lain.¹⁰

Salah satu tanaman yang disebutkan memiliki potensi anti-kanker secara *in vitro* maupun *in vivo* adalah ciplukan (*Physalis angulata L.*).¹¹ Berdasarkan PERMENKES no.6 tahun 2016 ciplukan ditetapkan sebagai tanaman herbal asli Indonesia yang berpotensi sebagai terapi paliatif dan suportif pada beberapa penyakit kanker seperti Adenokarsinoma Paru, Ca mammae, Leukemia, Ca hepar, Ca renal, Ca ovarium.¹² Salah satu zat aktif antikanker yang berhasil diisolasi dari

ekstrak metanol daun ciplukan adalah *physalin* yang merupakan turunan glikosida flavonoid, selain itu didapatkan kandungan lain yaitu *luteolin*, *carotenoid*, dan *withanolides*. Selain efek antikanker, ekstrak daun ciplukan juga disebutkan memiliki potensi sebagai antiparasitik, antiinflamasi, antimikroba, antinyeri, dan immunosupresif.¹³

Penelitian yang dilakukan oleh Darma *et al.* tahun 2010 melaporkan bahwa ciplukan memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker rahim melalui modulasi ekspresi dari p53 sehingga menyebabkan terhentinya proliferasi sel.¹⁴ Penelitian yang dilakukan Fitria *et al.* 2011 menyebutkan bahwa ekstrak etanol herba ciplukan memiliki efek sitotoksik dan mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7.¹⁵ Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Handayani pada tahun 2012 dimana ekstrak etanol *Physalis angulata* dapat menghambat pertumbuhan sel kanker payudara dengan menurunkan ekspresi protein C-Myc, meningkatkan ekspresi protein p53 dan Apaf-1, menurunkan jumlah mitosis dan meningkatkan jumlah apoptosis.¹⁶ Penelitian lain yang dilakukan oleh Hseu *et al* (2011) juga melaporkan bahwa ekstrak etil asetat dari *P.angulata* dapat menghambat tahapan penting dalam metastase termasuk migrasi dan invasi *human oral squamous carcinoma cells*.¹⁷ Mekanisme ini diduga karena ekstrak daun ciplukan dapat menginduksi berhentinya siklus sel dan menginduksi apoptosis sel melalui aktivasi protein P53.¹⁸

Meskipun banyak penelitian telah membuktikan potensi antikanker dari ciplukan, belum ada penelitian yang membuktikan manfaatnya pada sel kanker retinoblastoma. Selain itu belum banyak teori yang menjelaskan bagaimana mekanisme kerja ekstrak ciplukan dalam perannya sebagai antikanker. Oleh karena itu penelitian ini didesain untuk menguji pengaruh pemberian ekstrak daun ciplukan terhadap apoptosis dan proliferasi pada kultur sel retinoblastoma.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) dapat meningkatkan apoptosis sel pada kultur sel retinoblastoma?
2. Apakah pemberian ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) dapat menurunkan proliferasi sel pada kultur sel retinoblastoma?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) terhadap apoptosis dan proliferasi sel pada kultur sel retinoblastoma.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui apakah pemberian ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dapat meningkatkan apoptosis sel pada kultur sel retinoblastoma.
2. Untuk mengetahui apakah pemberian ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dapat menurunkan proliferasi sel pada kultur sel retinoblastoma.

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1 Manfaat akademis

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan dan memperluas teori mengenai bahan-bahan alami di lingkungan sekitar yang dapat dimanfaatkan dalam dunia kedokteran.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi sumbangan terhadap ilmu pengetahuan mengenai potensi ciplukan (*Physalis angulata L.*) sebagai agen anti kanker sehingga dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya
3. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan penjelasan secara ilmiah mengenai efek ciplukan (*Physalis angulata L.*) sebagai terapi alternatif pada retinoblastoma

1.4.2 Manfaat Klinis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan penjelasan secara ilmiah mengenai efek ciplukan (*Physalis angulata L.*) sebagai terapi alternatif pada retinoblastoma

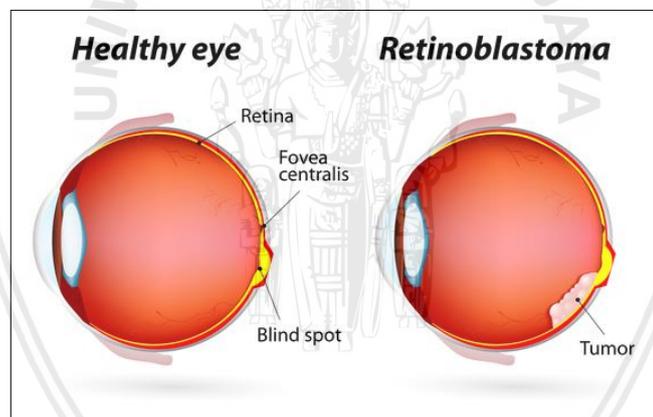
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Retinoblastoma

2.1.1 Definisi

Retinoblastoma merupakan keganasan intraokuler primer yang paling umum pada anak-anak dan dapat memberikan dampak gangguan pada kesehatan dan penglihatan anak. Penyakit ini merupakan kanker retina dominan autosomal yang berkembang terutama pada anak di bawah usia lima atau enam tahun.¹ Tumor ini merupakan tumor neuroblastik yang secara biologi mirip dengan neuroblastoma dan medulloblastoma. Sel-sel tumor ini berasal dari sel-sel embrional retina sebelum differensiasi yang terakhir (retinoblast). Hal ini yang kemudian dinamakan retinoblastoma oleh Veorhoff, yang kemudian diadopsi *American Ophthalmology Society* pada tahun 1926 sebagai nama umum untuk kelainan ini.¹⁹



Gambar 2.1. Ilustrasi perbandingan mata normal dengan retinoblastoma.¹

Pada umumnya, tumor ini terdeteksi pertama kali ketika tumor putih tampak melalui pupil (dikenal sebagai leukokoria) atau penglihatan yang terhalang. Ketika diperhatikan lebih awal, terapi yang tepat dapat menyembuhkan kanker dan menyelamatkan satu mata (atau kedua mata) dan penglihatan. Akan tetapi, diagnosis yang terlambat dapat menyebabkan invasi ke dalam saraf optik dan otak yang tidak dapat disembuhkan, atau metastase ke anggota tubuh manapun kadang dapat disembuhkan dengan intervensi ekstensif.¹

2.1.2 Epidemiologi

Retinoblastoma merupakan tumor intraokular yang sering terjadi pada bayi dan anak. Retinoblastoma mewakili sekitar 4% dari keseluruhan keganasan pada anak. Insiden retinoblastoma berkisar antara 1:14.000 sampai 1:34.000 kelahiran hidup. Diperkirakan 250-350 kasus baru terdiagnosa di Amerika Serikat, 5000 kasus ditemukan di seluruh dunia.² Lebih dari 95% anak dengan retinoblastoma di Amerika Serikat dan di beberapa negara maju bertahan atas keganasan ini, dimana sekitar 50% bertahan diseluruh dunia. Hal ini disebabkan oleh karena adanya deteksi dini yang dilakukan di Amerika Serikat dan negara maju lainnya dimana tumor masih intraokular, sedangkan pada beberapa negara berkembang tumor retinoblastoma sering terdiagnosa setelah adanya invasi ke orbita atau otak. Sekitar 6% penderita retinoblastoma memiliki riwayat retinoblastoma dalam keluarganya. Pada kasus-kasus ini diturunkan melalui gen autosomal dominan. Sekitar 94% kasus retinoblastoma muncul secara sporadik, 15%-nya membawa gen retinoblastoma.³

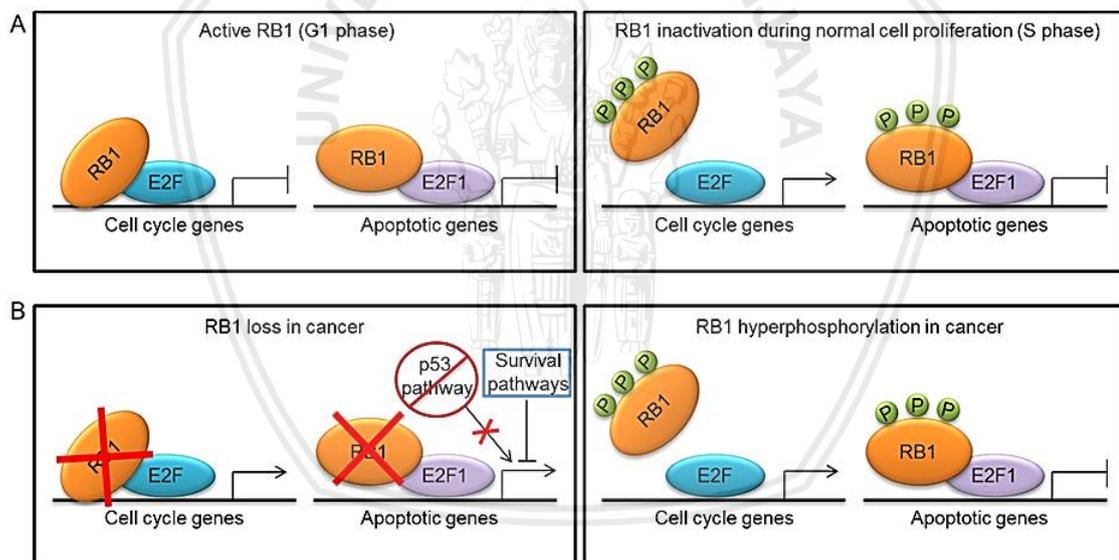
Dari keseluruhan pasien dengan retinoblastoma, sekitar 11% bertempat tinggal di negara berpendapatan tinggi, 69% di negara berpendapatan menengah dan 20% di negara berpendapatan rendah. Meskipun prevalensinya lebih tinggi di negara berpendapatan menengah dan rendah, sebagian besar pusat pengobatan retinoblastoma berada di negara berpendapatan menengah dan tinggi, sehingga hal ini menciptakan sebuah jarak dalam akses pelayanan kesehatan. Disesuaikan dengan pendapatan yang menjadi tolok ukuran standar hidup, retinoblastoma di negara berpendapatan rendah dikaitkan dengan angka harapan hidup yang rendah (~30%) dibandingkan dengan negara berpendapatan tinggi (>95%), tetapi data internasional yang komprehensif masih kurang.²⁰

2.1.3 Patogenesis

Retinoblastoma dikaitkan dengan mutasi gen retinoblastoma (RB1) pada sel retina tunggal yang rentan. Protein ini akan mengatur siklus sel retina sehingga tidak terjadi pertumbuhan sel retina yang berlebihan. Gen RB1 mengkode protein Rb, dimana fungsinya adalah sebagai tumor suppressor, dengan cara mengontrol siklus sel melalui interaksi kompleks dengan beberapa enzim kinase. Pada keadaan absennya stimulus mitogenik, RB1 akan menghambat siklus sel G1-S melalui hambatan pada gen target E2F yang berperan dalam proses sintesis DNA dan siklus sel. Fungsi protein ini diatur

melalui mekanisme fosforilasi yang diperantarai oleh *cyclin-dependent kinase* (CDK) complexes, CDK inhibitors dan aktivitas phosphatase. Ketika RB1 pada kondisi hiperfosforilasi, akan terjadi hambatan ikatan kompleks RB1 dengan E2F sehingga proses transkripsi DNA dan siklus sel dapat ditekan. Ketika RB1 mengalami fosforilasi yang diinisiasi oleh kompleks CDK sebagai respon sinyal mitogenik maka akan terjadi inaktivasi fungsi RB1 melalui disosiasi ikatan RB1 dan E2F.⁹

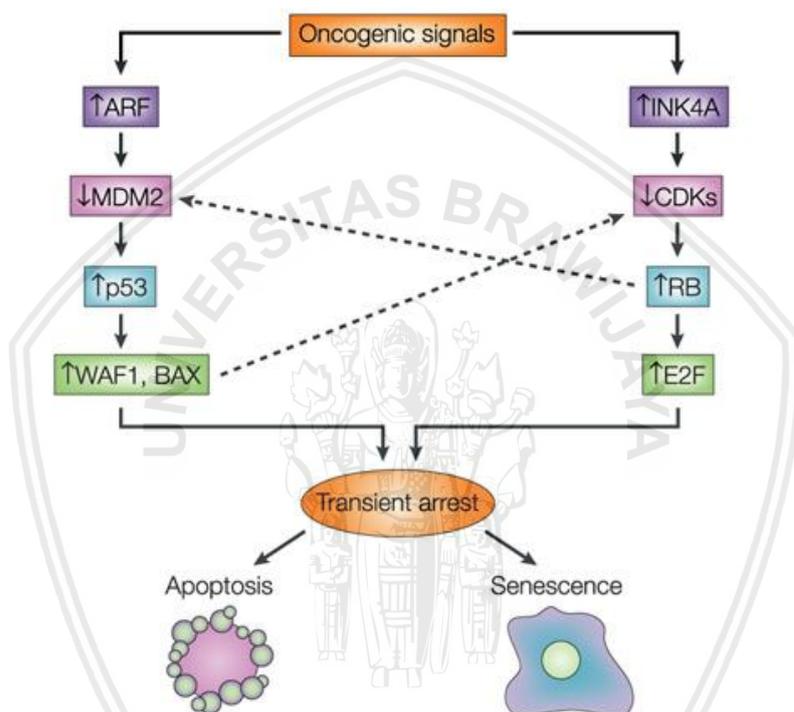
Pada kasus retinoblastoma, protein RB1 mengalami hiperfosforilasi sehingga menjadi inaktif yang selanjutnya berakibat replikasi DNA yang tidak terkontrol dan hasil replikasi yang tidak sempurna. Keadaan hiperfosforilasi tersebut dapat dipicu oleh virus yang mengubah protein regulator seperti adenovirus E1A, virus 40 (SV40) dan HPV-7. Berikut ini adalah gambar skematik yang menjelaskan mekanisme inaktivasi RB1 dalam proliferasi sel yang normal dan tumorigenesis.⁹



Gambar 2.2 Mekanisme inaktivasi RB1 dalam proliferasi sel normal (A) dan tumorigenesis (B)⁹

Selain RB1, tumor suppressor gen lain yang berperan pada fase G1 yaitu p53. Protein 53 (p53) merupakan *tumor-suppressor gene* yang berfungsi dalam mengontrol siklus sel dan apoptosis. Dalam keadaan adanya stress, kerusakan DNA atau sinyal onkogenik akan menginduksi ARF. ARF akan memecah MDM2 yang selanjutnya memfasilitasi degradasi dan aktivasi p53. Protein p53 memiliki efek baik aktivasi maupun inhibisi sehingga dapat mengontrol transkripsi beberapa gen. Aktivasi gen WAF1 dan inhibisi CDKs akan menyebabkan

terhentinya siklus sel. Sedangkan aktivasi protein BAX akan menyebabkan apoptosis sel. Pada retinoblastoma disebutkan terjadi inaktivasi jalur p53, meskipun tidak ditemukan mutasi gen penyandi protein 53 (TP53). Disregulasi ini dilaporkan karena peningkatan protein MDM4 dan MDM2 pada 63% dan 10% pasien retinoblastoma. Kedua protein tersebut berperan dalam inhibisi jalur aktivasi p53 sehingga bila jumlahnya meningkat maka akan terjadi inaktivasi jalur p53.⁶ Berikut ini merupakan gambar yang menjelaskan interaksi antara RB1 dan p53 dalam regulasi apoptosis sel:



Gambar 2.3 Interaksi p53 dan RB1 dalam regulasi apoptosis sel.⁶

Selain itu terdapat juga teori radikal bebas, Reactive oxide species seperti radikal bebas superoksida (O₂⁻) dan hidrogen peroksida (H₂O₂) memberikan peran penting terhadap inisiasi dan progresi dari karsinogenesis. Reactive oxide species yang bergabung bersama reactive nitrogen species secara endogen atau eksogen dinamakan "oxidative and nitrossative stress", kemudian hasilnya berupa agen vasoaktif nitrit oksida (NO). Agen vasoaktif NO disintesis dari asam amino L-Arginin oleh enzim nitrit oksida sintase (NOS), berfungsi sebagai vasodilator.²¹

Telah ditemukan tiga bentuk isoform dari enzim NOS yang mengkode tiga gen berbeda. Dua diantara isoform NOS adalah endotelial dependen kalsium dan tipe neural (eNOS dan nNOS); bentuk isoform lainnya induksi (iNOS) dan

aksinya tidak dependen kalsium. Telah ditemukan ekspresi gen eNOS dan iNOS pada jaringan tumor RB. Ekspresi gen eNOS ditemukan pada RB stadium awal maupun stadium invasif, sedangkan ekspresi gen iNOS lebih banyak ditemukan pada RB stadium invasif.²¹

2.1.4 Faktor Risiko

Faktor risiko retinoblastoma dapat berupa mutasi gen RB1 yang menyebabkan sel retinoblas membelah tidak terkontrol sehingga membentuk tumor. Mutasi ini dapat terjadi secara sporadic (didapat) yang bisa terjadi kapan saja selama hidupnya atau inherited (diwariskan) dari orang tua ke anak. Faktor risiko berikutnya adalah riwayat keluarga. Anak dengan orang tua yang mempunyai riwayat retinoblastoma bilateral mempunyai risiko 45%, sedangkan anak dengan orang tua yang mempunyai riwayat retinoblastoma unilateral mempunyai risiko 7,5% untuk mengalami retinoblastoma. Anak dengan riwayat saudara kandung yang mengalami retinoblastoma bilateral mempunyai risiko 5-7%, sedangkan untuk retinoblastoma unilateral mempunyai risiko 1%. Anak dengan saudara kandung yang mengalami retinoblastoma unilateral atau bilateral, disertai dengan riwayat orang tua yang juga mengalami retinoblastoma, memiliki risiko 45% untuk mendapatkan retinoblastoma.²²

Faktor risiko selanjutnya adalah status gizi anak. Status gizi anak menentukan diagnosis tingkat keparahan dan penatalaksanaan RB. Penelitian sebelumnya di RSUP H.Adam Malik periode 1999-2003, dari total 32 pasien, dijumpai ada 13 (40,6%) pasien retinoblastoma dengan malnutrisi berat, 9 (28,1%) pasien RB dengan malnutrisi sedang, dan 2 (6,3%) pasien dengan malnutrisi ringan, dan hanya 8 (25%) pasien RB dengan status gizi normal.²³ Kurangnya asupan folat selama kehamilan juga diprediksi berperan dalam faktor risiko retinoblastoma, terutama retinoblastoma unilateral, pada negara berkembang.²⁴ Selain itu, di negara berkembang, terdapat tingkat pendidikan dan kondisi sosioekonomi yang rendah, serta kurang memadainya sarana kesehatan. Hal ini mengakibatkan tertundanya diagnosis dan penatalaksanaan retinoblastoma yang optimal. Hal ini turut berperan dalam meningkatkan risiko retinoblastoma dan dapat memperparah kondisi anak.²⁵

2.1.5 Klasifikasi Retinoblastoma

Terdapat beberapa kriteria dalam klasifikasi retinoblastoma. Berdasarkan arah perkembangannya retinoblastoma dapat diklasifikasikan menjadi :²⁶

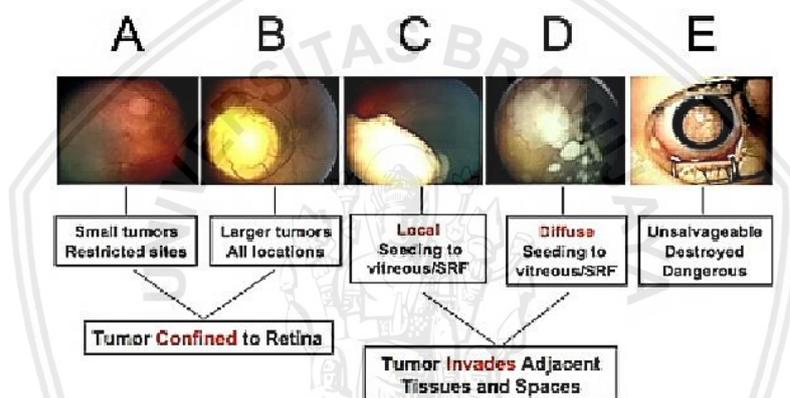
- a) Intraokular (*endophytic*)
 Intraokular retinoblastoma terlokalisasi hanya di dalam mata mencakup retina atau bisa memanjang sampai melibatkan koroid, badan siliar, anterior chamber, dan nervus optikus. Intraokular RB tidak menyebar sampai jaringan-jaringan di sekitar mata atau tubuh.
- b) Ekstraokular (*exophytic*)
 Ekstraokularretinoblastoma yang dikenal dengan proses metastasis merupakan perluasan intraokular retinoblastoma sampai diluar mata. Ekstraokular retinoblastoma dapat menyebar sampai ke jaringan sekitar mata atau menyebar lebih jauh lagi sampai ke sistem saraf pusat, sumsum tulang, atau nodus limfatikus (metastasis retinoblastoma).
- c) Gabungan intraokular dan ekstraokular (*mixed endophytic-exophytic*)
 Klasifikasi *Reese-Ellsworth* merupakan klasifikasi yang banyak dipakai sampai saat ini. Klasifikasi ini berdasarkan pada jumlah tumor, ukuran dan lokasi tumor dalam bola mata. Klasifikasi ini juga dapat dipakai untuk menentukan terapi dan prognosa retinoblastoma intraocular. Semenjak klasifikasi Reese-Ellsworth diketahui menjadi prediktor yang buruk terhadap keberhasilan kemoreduksi, maka klasifikasi tersebut sudah tidak digunakan lagi. Sistem klasifikasi internasional untuk RB intraokular yang diperkenalkan pada tahun 2003 merupakan klasifikasi yang diterima saat ini dan digunakan dalam protokol terapi terbaru kelompok Onkologi Anak-anak. Sistem staging untuk RB ekstraokuler telah disusulkan dan diikuti, meskipun sering tidak berkaitan di area Amerika Serikat, di mana tingkat perluasan ekstraokuler yang rendah.²²

Tabel 2.1 Klasifikasi Reese-Ellsworth pada Retinoblastoma ²²

Group	Likelihood of Globe Salvage	Features
I	Very favorable	<ul style="list-style-type: none"> • Solitary tumor, less than 4 disc diameters, at or behind equator • Multiple tumors, none over 4 disc diameters, all at or behind equator
II	Favorable	<ul style="list-style-type: none"> • Solitary tumor, 4 to 10 disc diameters, at or behind equator • Multiple tumors, 4 to 10 disc diameters, behind equator
III	Doubtful	<ul style="list-style-type: none"> • Any lesion anterior to equator • Solitary tumors larger than 10 disc diameters behind equator
IV	Unfavorable	<ul style="list-style-type: none"> • Multiple tumors, some larger than 10 disc diameters • Any lesion extending anteriorly to ora serrata
V	Very unfavorable	<ul style="list-style-type: none"> • Massive tumors involving more than half of retina • Vitreous seeding



Saat ini *American Joint Committee of Cancer Classification of RB* mengklasifikasikan retinoblastoma secara klinis dan patologis di bawah sistem staging TNM yang menyertakan keganaan sistemik. Ketika terapi baru telah tersedia, kolaborasi internasional yang dipimpin oleh Murphree mengembangkan *International Intraocular Retinoblastoma Classification (IIRC)*, yang memprediksi respon kemoterapi intravena (IVC) dengan lebih baik dibandingkan klasifikasi Reese–Ellsworth. IIRC mengklasifikasikan mata dalam Kelompok A-E, di mana Kelompok E merupakan yang paling parah. Akan tetapi, modifikasi berikutnya (Shields IIRC) menghasilkan dalam versi IIRC yang sangat berbeda, misalnya mata yang terlibat dengan berat (berbahaya) diklasifikasikan dengan mata yang terkena secara angulatal. Berikut ini klasifikasi IIRC : ²⁷



Gambar 2.4. Klasifikasi Retinoblastoma berdasarkan *International Intraocular Retinoblastoma Classification (IIRC)* ²⁵

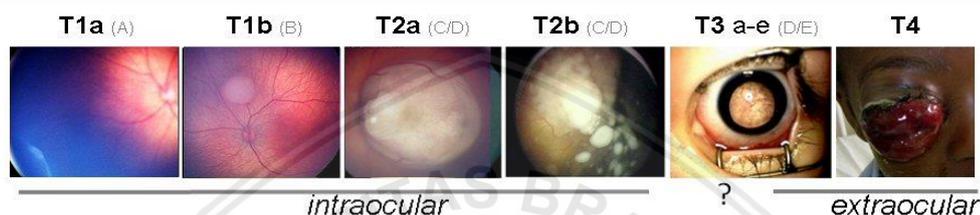
Tabel 2.2 Klasifikasi ABC pada Retinoblastoma

Group	Clinical features
A Very low risk	All tumors are 3 mm or smaller, confined to the retina, and located at least 3 mm from the foveola and 1.5 mm from the optic nerve. No vitreous or subretinal seeding
B Low risk	Retinal tumors may be of any size or location not in Group A. No vitreous or subretinal seeding allowed. A small cuff of subretinal fluid extending no more than 5 mm from the base of the tumor is allowed
C Moderate risk	Eyes with only focal vitreous or subretinal seeding and discrete retinal tumors of any size and location. Vitreous or subretinal seeding may extend no more than 3 mm from the tumor. Upto one quadrant of subretinal fluid may be present
D High risk	Eyes with diffuse vitreous or subretinal seeding and/or massive, nondiscrete endophytic or exophytic disease. More than one quadrant of retinal detachment
E Very high risk eyes	Eyes with one or more of the following Irreversible Neovascular glaucoma Massive intraocular hemorrhage Aseptic orbital cellulitis Phthisis or pre-phthisis Tumor anterior to anterior vitreous face Tumor touching the lens Diffuse infiltrating retinoblastoma

Selanjutnya, *Children's Oncology Group* (COG) menyisipkan variasi minor lebih lanjut. Sistem klasifikasi kanker TNM untuk semua kanker (yang didefinisikan dengan tumor primer (T), perluasan limfe nodi (N) dan metastase jauh (M)) adalah sistem lain yang sedikit berbeda yang digunakan untuk klasifikasi retinoblastoma. Berikut klasifikasi sistem TNM pada retinoblastoma :²⁸

Tabel 2.3 Sistem Staging TNM pada Retinoblastoma²⁸

TNM Staging System for Retinoblastoma
(Comparison with International Intraocular Rb Classification)



TNM CLASSIFICATION FOR RETINOBLASTOMA
(AJCC/UICC TNM, 6th edition January 2003)

PRIMARY TUMOR (pT)

- pTX: Primary tumor cannot be assessed
- pT0: No evidence of primary tumor
- pT1: Tumor confined to the retina, the vitreous, or subretinal space. No optic nerve or choroidal invasion
- pT2: Minimal invasion of the optic nerve and/or optic coats**
- pT2a: Tumor invades optic nerve up to, but not through, the level of the lamina cribrosa
- pT2b: Tumor invades choroid focally
- pT2c: Tumor invades optic nerve up to, but not through, the level of the lamina cribrosa and invades the choroid focally
- pT3: Significant invasion of the optic nerve and/or optic coats**
- pT3a: Tumor invades optic nerve through the level of the level cribrosa but not to the line of resection.
- pT3b: Tumor massively invades the choroid
- pT3c: Tumor invades the optic nerve through the level of the lamina cribrosa but not to the line of resection and massively invades the choroid
- pT4: Extraocular tumor extension that includes any of the following: invasion of optic nerve to the line of resection; invasion of orbit through the sclera; extension both anteriorly or posteriorly into the orbit; extension into the brain; extension to but not through, the chiasm; extension into the brain beyond the chiasm

REGIONAL LYMPH NODES (pN)

- pNX: Regional lymph nodes cannot be assessed
- pN0: No regional lymph node metastasis
- pN1: Regional lymph node metastasis

DISTANT METASTASIS (pM)

- pMX: Cannot be assessed
- pM1: Distant metastasis
- pM1a: Bone marrow
- pM1b: Other sites
- *Specify, if known: _____

MARGINS

- Cannot be assessed
- No tumor at margins
- Tumor present at surgical margin of optic nerve

2.1.6 Diagnosis Retinoblastoma

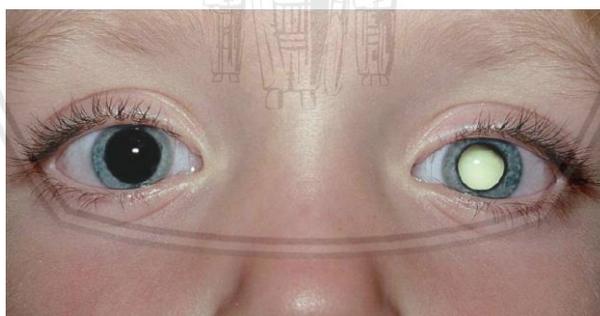
Diagnosis retinoblastoma ditegakkan berdasarkan dari anamnesa, manifestasi klinis dan pemeriksaan penunjang.

2.1.6.1 Anamnesa

Anamnesa sangat diperlukan dan dapat membantu member tambahan informasi mengenai retinoblastoma. Beberapa yang harus ditanyakan antara lain adanya mata putih (*leukokoria*) dan mata juling, onset timbul gejala, penurunan tajam penglihatan, riwayat kehamilan, riwayat trauma pada mata sebelumnya, pemakaian oksigen dengan konsentrasi tinggi, riwayat tumbuh kembang, kontak dengan hewan peliharaan serta riwayat keluarga apakah pernah kehilangan satu mata atau menderita tumor ganas pada mata.¹

2.1.6.2 Manifestasi klinis

Diagnosis retinoblastoma biasanya tampak jelas dari tanda yang muncul dan pemeriksaan klinis. Tanda yang paling umum adalah leukokoria (pupil putih). Ketika orang tua megeluhkan pantulan yang aneh pada mata anaknya, retinoblastoma seharusnya menjadi diagnosis banding yang utama. Tanda yang paling umum kedua adalah strabismus, ketika penglihatan pusat terganggu. Stadium penyakit lebih lanjut kemungkinan muncul dengan perubahan warn iris, pembesaran kornea dan mata dikarenakan tekanan yang meningkat, atau inflamasi orbita non-inflamasi. Pada stadium penyakit yang sangat lanjut, mata menjadi menonjol dari orbita, gejala umum dalam kondisi di mana kesadaran dan informasi kesehatan tidak adekuat.²⁹



Gambar 2.5 Gambaran leukokoria atau *white cat appearance* pada mata kiri²⁹

Temuan klinis terbanyak di dunia saat didiagnosis adalah leukokoria (90%) dan strabismus (35%). Akan tetapi, temuan klinis tersebut memiliki perbedaan berdasarkan faktor sosiodemografi suatu negara. Penelitian di beberapa negara maju, yaitu Amerika, Inggris, Swiss, dan Finlandia menemukan bahwa leukokoria terjadi pada 50-60%, strabismus baik esotropia maupun eksotropia 20-25%, dan tanda radang (mata merah atau selulitis pseudoorbital) 6-10%.³⁰

Penelitian di RS Cipto Mangunkusumo, dari 64 pasien RB baru, leukokoria ditemui sebanyak 19 pasien (30%), leukokoria disertai proptosis sebanyak 41 pasien (64%), buftalmos 2 pasien (3%), dan mata merah 2 pasien (3%). Penelitian di Sumatera Utara, di RSUP H. Adam Malik Medan, dari total 61 pasien (53 unilateral dan 8 bilateral), gejala klinis terbanyak adalah proptosis yang ditemui sebanyak 40 kasus (54,1% pada unilateral RB dan 11,4% pada bilateral RB). Berdasarkan penelitian-penelitian di atas dapat disimpulkan bahwa gejala klinis di Indonesia lebih banyak ditemukan proptosis dibandingkan leukokoria.³¹

Adapun gambaran lain dari retinoblastoma yang jarang dijumpai seperti heterokromia, hifema, perdarahan vitreus, glaukoma, proptosis dan hipopion. Keluhan penglihatan jarang didapatkan dikarenakan retinoblastoma terjadi pada anak-anak usia prasekolah, keluhan penglihatan dijumpai pada anak-anak yang lebih besar. Biasanya gejala subyektif yang muncul adalah penglihatan menurun.³²

Pola pertumbuhan retinoblastoma dapat berupa endofitik dan eksofitik. Pada pertumbuhan endofitik, tampak sebagai gambaran massa putih sampai coklat muda yang menembus membrane limitans interna. Sedangkan pola pertumbuhan endofitik kadang berhubungan dengan *vitreous seeding* dimana sebagian kecil meluas memberikan gambaran klinis mirip endoftalmitis. Vitreus juga memasuki bilik mata depan, berkumpul di iris membentuk nodul atau menimbulkan gejala lain seperti iris heterokromia, hifema, pseudohipopion, dan glaukoma sekunder.³³

Retinoblastoma dapat menyebar baik secara lokal maupun ekstraokular atau metastase. Penyebaran lokal berupa penyebaran intraocular dan invasi ke khoroid, saraf optik dan sklera. Adapun penyebaran secara ekstraokular atau metastase melalui 5 jalur, melalui aliran darah (hematogen), cairan serebrospinal, antara rongga orbita, ekspansi transklera dan cairan limfe.³³

2.1.6.3 Pemeriksaan penunjang

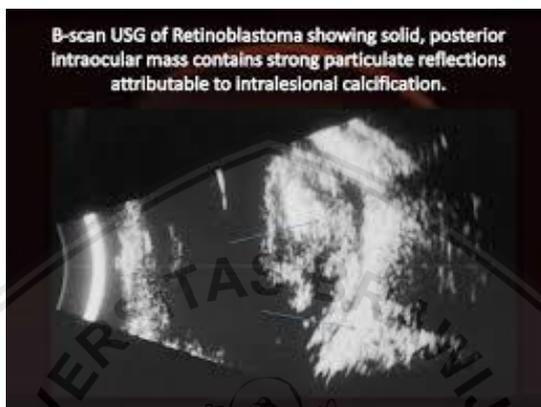
Pemeriksaan penunjang diperlukan untuk menegakkan diagnose retinoblastoma. Pemeriksaan yang dilakukan antara lain :

a) *Foto Polos Orbita*

Pemeriksaan foto polos orbita berguna untuk mencari daerah kalsifikasi, melihat pelebaran kanalis optikus dan adanya destruksi tulang.³⁴

b) *Ultrasonografi (USG) Mata*

Dilakukan pada penderita yang belum mengalami proptosis. Dari pemeriksaan USG dapat diketahui letak, ukuran dan bentuk massa yang berada di dalam bola mata. Gambaran USG pada retinoblastoma memperlihatkan yang khas, yaitu adanya reflektivitas yang tinggi pada A-scan yang merupakan tanda kalsifikasi. Tanda ini pada gambaran B-scan menunjukkan adanya “*shadowing effect*” yang merupakan tanda khas retinoblastoma.³⁴



Gambar 2.6 Gambaran USG Retinoblastoma³⁴

c) *CT Scan Orbita*

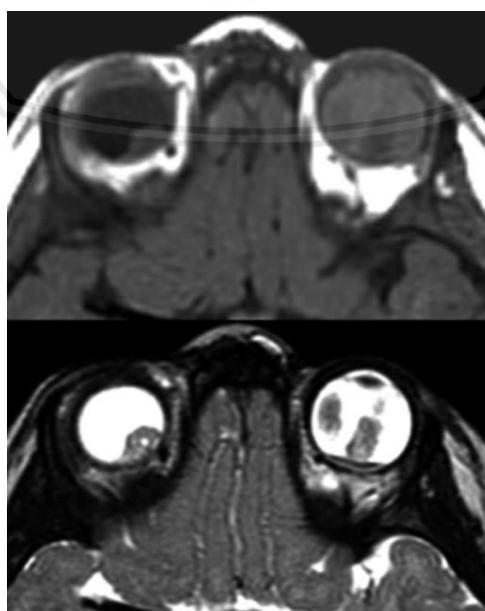
Pemeriksaan CT scan merupakan pemeriksaan radiologi yang direkomendasikan pada retinoblastoma dibandingkan MRI. CT scan dapat menunjukkan massa intraokular dengan densitas yang tinggi dibandingkan badan vitreus, kalsifikasi pada 90% kasus dan menunjukkan *moderate enhanced* setelah pemberian kontras *iodine*. Tes ini dapat memberi keterangan mengenai ukuran massa RB dan bagaimana penyebarannya di dalam dan sekitar mata, digunakan untuk menilai perluasan tumor ke arah retrobulbar, mendeteksi adanya metastasis ke intrakranial, menemukan adanya tumor primer yang lain (*second primary tumor*) ataupun membedakan dengan lesi yang lain yang secara klinis sudah terdiagnosa menderita retinoblastoma. Selain itu juga mampu mendeteksi adanya kalsifikasi dengan diameter 2 mm dimana adanya kalsifikasi intraokular merupakan tanda patognomonik untuk retinoblastoma. Pemeriksaan CT scan orbita ini juga digunakan untuk menentukan rencana terapi dan memperkirakan prognosa penyakit. Apabila diduga adanya metastase jauh dapat dilakukan CT scan tulang, hepar/adrenal, otak maupun peritoneum. Akan tetapi, CT scan mempunyai kelemahan radiasi tinggi.³⁴



Gambar 2.7 Gambaran CT scan retinoblastoma. Tampak gambaran kalsifikasi pada CT Scan Penderita ³⁴

d) *MRI (Magnetic Resonance Imaging)*

Tes MRI sangat berguna jika ada kecurigaan metastasis ekstraokular (sering pada metastasis intrakranial) dimana anak datang dengan tekanan intrakranial yang meningkat dan dicurigai adanya trilateral retinoblastoma.⁵⁸ Pemeriksaan MRI digunakan untuk melengkapi pemeriksaan CT scan. Keuntungan pemeriksaan menggunakan MRI adalah kemampuan pemeriksaan multiplanar, superioritas dalam pencitraan jaringan lunak, lebih spesifik untuk mengetahui adanya penyebaran sel tumor ke cairan subretina, saraf optikus maupun ke subarachnoid. Bila dibandingkan dengan CT scan, pemeriksaan MRI kurang sensitif untuk mendeteksi adanya kalsifikasi intra tumor. Selain itu dengan pemeriksaan menggunakan MRI dapat juga menunjukkan adanya ablasi retina maupun penumpukan cairan subretina.³⁴



Gambar 2.8 Gambaran MRI pada Pasien Retinoblastoma ³⁴

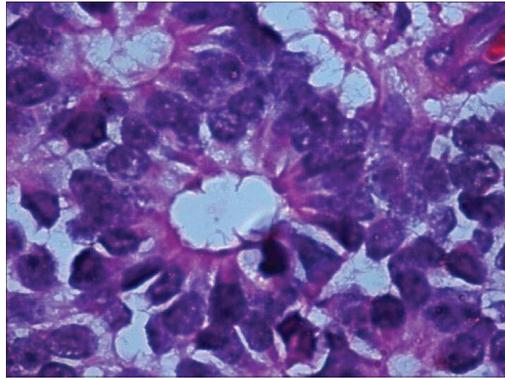
e) *Pemeriksaan Patologi Anatomi*

Pemeriksaan PA terhadap tumor bertujuan untuk konfirmasi diagnosis histopatologik beserta diferensiasi tumor dan penetapan perluasan tumor. Hasil pemeriksaan ini dapat memberikan informasi untuk pengobatan lebih lanjut dan penentuan prognosis penyakit. Biopsi pada RB tidak dilakukan sebab dapat memicu rusaknya jaringan tumor sehingga tumor dapat menyebar lebih cepat. Pemeriksaan histologi retinoblastoma setelah enukleasi pada mata yang terkena adalah satu-satunya cara mengevaluasi gambaran resiko tinggi (invasi tumor ke dalam saraf optik di luar batas mata atau sampai ke potongan akhir saraf; invasi lapisan vaskuler (koroid) >3 mm di bawah retina; atau invasi ke sklera) dan cara menegakkan staging patologis.³⁵

Persiapan dan pemeriksaan enukleasi mata telah dioptimalkan untuk mengevaluasi semua gambaran resiko. Spesimen patologi digolongkan menggunakan skema klasifikasi patologi TNM dan IRSS. Akan tetapi, pemeriksaan retrospektif masih terlalu sering menemukan resiko yang tidak teramati sebelumnya setelah didiagnosis penyakit metastasis. Pewarnaan marker spesifik untuk sel fotoreseptor (faktor transkripsi *cone-rod homeobox* (CRX)) dan untuk sel tumor (N-glycosylated ganglio side) dapat memudahkan deteksi sel tumor pada sisi ekstraokuler yang kadang terlupakan.³⁵

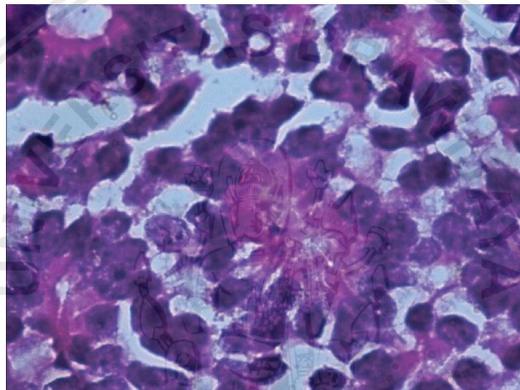
Gambaran histopatologi yang khas pada retinoblastoma yang biasa didapatkan adalah *Flexner-Wintersteiner rosettes*, sedangkan gambaran *fleurettes* jarang dijumpai. *Homer-Wright rosettes* sering dijumpai tetapi kurang spesifik untuk retinoblastoma karena sering juga dijumpai pada tumor neuroblastik lain.³⁶ Tumor terdiri dari sel *basophilic* kecil (retinoblast), dengan nucleus hiperkromatik besar dan sedikit sitoplasma. Kebanyakan retinoblastoma ditandai dengan pembentukan *Rosettes* yang terdiri dari 3 tipe³⁵

1. *Flexner-Wintersteiner Rosettes*, yang terdiri dari lumen sentral yang dikelilingi oleh sel kolumnar tinggi. Tipe ini yang disebut dengan *true rosette*



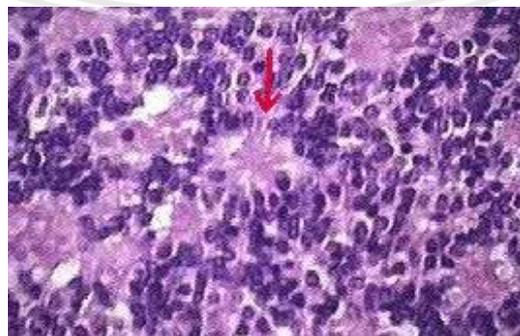
Gambar 2.9 Gambaran *Flexner-Wintersteiner Rosettes* dengan lumen jernih di sentral ³⁵

2. *Homer-Wright Rosettes*, rosettes yang tidak mempunyai lumen dimana bentuk ini tidak spesifik untuk retinoblastoma, karena gambaran histologist ini dapat ditemukan juga pada neuroblastoma dan meduloblastoma.



Gambar 2.10 Gambaran *Homer-Wright Rosettes* yang tidak memiliki lumen dengan pusat tertutup filamen neural ³⁵

3. *Florettes* merupakan focus sel tumor yang menunjukkan diferensiasi fotoreseptor, kelompok sel dengan proses pembentukan sitoplasma dan tampak menyerupai seperti karangan bunga.



Gambar 2.11 Gambaran *Florettes* pada retinoblastoma dengan seluruh sel fotoreseptor tampak berdiferensiasi ³⁵

f) *Diagnosis Genetik*

Beberapa pasien dengan retinoblastoma adalah individu pertama yang harus didiagnosa dalam suatu keluarga; hanya 6% pasien terindikasi ketika diperiksa mengenai mutasi RB1 dimana anggota keluarga sebelumnya didiagnosa retinoblastoma. Akan tetapi, studi berbasis populasi di Inggris menyatakan bahwa 35% dari pasien yang terkena RB bilateral memiliki riwayat keluarga.³⁵ Pada tiga studi berbasis populasi dengan 2,738 pasien retinoblastoma, 30-37% kasus adalah kasus bilateral. Ketika 15-18% kasus unilateral yang juga membawa alel mutan RB1, maka sekitar 45% orang dengan retinoblastoma membawa satu mutasi RB1 dalam sel utamanya. Dari pasien dengan retinoblastoma unilateral, 98% mempunyai gen RB1 bialel somatik yang hilang dan 2% mempunyai gen RB1 yang normal tetapi digantikan dengan amplifikasi onkogen MYCN somatic.²⁸

Pengetahuan mengenai profil mutasi RB1 pasien memungkinkan menjadi skrining hubungan dan generasi selanjutnya yang tepat dan akurat. Tanpa pemeriksaan genetik, semua anak beresiko (yang sudah mengenai satu mata dan /atau riwayat keluarga positif) seharusnya menjalani pemeriksaan multipel dengan anastesi pada 3 tahun pertama kehidupan untuk mendeteksi tumor kecil yang masih mudah diobati. Ketika pemeriksaan genetik memperlihatkan mutasi RB1 dalam sebuah keluarga, anak yang beresiko dapat menjalani pemeriksaan terhadap mutasi tersebut. Dari pasien dengan RB unilateral, 85% testnya negatif, dengan *residual risk* <1% untuk mosaikism level rendah yang tidak terdeteksi, di mana menurunkan intensitas surveilan tumor pada mata normal dan memperbaiki perkiraan resiko kanker pada anggota keluarga.³⁷ Pada retinoblastoma familial, skrining prenatal dapat dilakukan dengan pengambilan DNA dari cairan amnion. Ketika pemeriksaan prenatal menghasilkan temuan yang positif, tim retinoblastoma dapat bekerja dengan spesialis untuk menginduksi persalinan mendekati matur dengan aman agar memudahkan deteksi dan terapi tumor retinoblastoma sedini mungkin. Diagnosis genetik preimplantasi terhadap mutasi orang tua yang sudah diketahui memberikan pilihan pada keluarga untuk mempunyai anak yang tidak terkena retinoblastoma.²⁸

2.1.7 Diagnosa banding

Sejumlah gangguan mata pada bayi dan anak-anak secara klinis dapat menyerupai retinoblastoma. Meskipun penampilan klasik retinoblastoma, hampir

50% pasien yang didiagnosis awalnya dengan kemungkinan retinoblastoma, namun saat rujukan ke ahli onkologi okular dilakukan simulasi dan ternyata bukan retinoblastoma. Pseudoretinoblastoma yang paling umum antara lain meliputi *persistent hyperplastic primary vitreous*, *Coats'disease*, dan toksocariasis okular. Oleh karena itu, penting agar diagnosis retinoblastoma ditetapkan tanpa keraguan sebelum memulai pengobatan. Konsultasi dengan ahli onkologi okular yang berpengalaman dengan retinoblastoma dapat membantu dalam mengkonfirmasi diagnosis klinis retinoblastoma dan membantu dalam rencana terapi untuk penyakit yang berpotensi fatal ini.³⁸

2.1.8 Penatalaksanaan

Tujuan utama dari penatalaksanaan RB adalah menyelamatkan hidup pasien, sedangkan kembalinya fungsi visual mata merupakan tujuan sekunder. Penatalaksanaan RB melibatkan tim dari berbagai multidisiplin, yaitu disiplin ilmu onkologi mata, onkologi pediatrik, onkologi radiasi, onkologi psikiatri, genetika, dan onkopatologi oftalmologi. Strategi manajemen tata laksana retinoblastoma tergantung dari tingkat keparahannya, seperti retinoblastoma intraokular, retinoblastoma dengan karakteristik risiko tinggi, retinoblastoma orbital dan retinoblastoma metastasis.⁸

Tata laksana untuk retinoblastoma intraokular meliputi enukleasi, *external beam radiation therapy* (EBRT), *cryotherapy*, laser fotokoagulasi, *thermotherapy*, *brachytherapy* serta kemoterapi sistemik. Sedangkan untuk tata laksana RB ekstraokular diberi terapi lebih lanjut.³⁹

2.1.8.1 Terapi Retinoblastoma Intraokuler

a) E nukleasi

E nukleasi merupakan terapi lini pertama untuk dominan mata dengan retinoblastoma secara global. Sebagian besar anak tanpa riwayat keluarga retinoblastoma masuk dalam kelompok penyakit D atau kelompok E pada klasifikasi Murphree IIRC saat didiagnosis dan >50% memiliki penyakit retinoblastoma unilateral dengan mata lain tidak terkena sehingga pengobatan dapat dicapai dengan enukleasi. Sebagian besar kelompok mata E membutuhkan enukleasi karena mereka memiliki risiko penyebaran ekstraokuler dan ini dapat dikonfirmasi hanya dengan indentifikasi gambaran patologis risiko tinggi pada mata yang menjalani enukleasi. Hasil kosmetik yang bagus didapat

dengan penggantian bola mata dengan implan dalam orbita dan prostetik yang dipasang dalam kantung konjungtiva di belakang kelopak mata.⁴⁰

E nukleasi merupakan pilihan tata laksana untuk retinoblastoma intraokular unilateral dengan klasifikasi grup E yang melibatkan neovaskularisasi iris, glaukoma sekunder, tumor invasif anterior chamber, tumor >75% volum vitreous, tumor nekrosis dengan inflamasi sekunder orbital, tumor terkait hifema atau perdarahan vitreous, dimana karakteristik tumor tidak bisa dilihat, dan melibatkan satu mata. Metode enukleasi dilakukan dengan mengangkat penuh mata hingga ke nervus optikus kemudian dilakukan pemeriksaan histopatologinya.³⁹

b) *External Beam Radiation Therapy (EBRT)*

EBRT merupakan pilihan tata laksana untuk retinoblastoma bilateral tingkat lanjut, dimana ditemukannya bercak difus pada vitreous, pada pasien yang menolak dilakukannya tindakan enukleasi setelah gagal bentuk terapi konservatif lainnya. Akan tetapi, EBRT mempunyai kelemahan karena dapat memicu efek komplikasi lokal dan dapat mengakibatkan kanker sekunder pada daerah sekitar radiasi setelah RB sembuh.³⁹

EBRT sudah tidak lagi direkomendasikan sebagai terapi lini pertama retinoblastoma intraokuler primer, sebagaimana radiasi yang memiliki resiko tinggi perkembangan kanker sekunder terutama pada tahun pertama kehidupan ketika pasien membawa mutasi RB1. Meskipun tidak terdapat peran EBRT dalam terapi utama retinoblastoma intraokuler, masih terdapat peran ketika menekankan pada penyelamatan mata yang tersisa jika terapi lain gagal. Analisis komprehensif dari literatur yang telah dipublikasikan mengenai penyelamatan mata melalui beberapa strategi dibingungkan oleh penggunaan lima sistem klasifikasi yang berbeda.³⁹

c) *Cryotherapy*

Cryotherapy merupakan pilihan tata laksana untuk tumor kecil pada garis ekuator atau retina perifer dengan ukuran diameter basal ≤ 4 mm dan ketebalan 2mm. *Cryotherapy* menghancurkan tumor primer kecil atau rekurensi secara efektif di bagian perifer retina. *Cryotherapy* diaplikasikan pada retinoblastoma dengan interval 4-6 minggu sampai tumor mengalami regresi. Akan tetapi, *cryotherapy* mempunyai kelemahan, yaitu meninggalkan jaringan parut lebih besar dari tumor. Komplikasi lebih lanjut meliputi lepasnya retina sementara, robekan retina, maupun rhegmatogenous retinal detachment.⁴¹

d) *Laser Fotokoagulasi*

Laser fotokoagulasi merupakan pilihan tata laksana untuk tumor posterior kecil dengan diameter basal 4 mm dan ketebalan 2 mm. Tujuan terapi ini untuk regresi tumor dan mengkoagulasikan suplai aliran darah menuju tumor dengan menggunakan laser. Komplikasi dapat berupa lepasnya retina sementara, oklusi vaskuler retina, robekan retina, traksi retina dan fibrosis preretinal.⁴¹

Dua jenis terapi laser dilakukan setiap bulan sampai tumor menipis, atrofik atau kalsifikasi. Termoterapi transpupillary melibatkan arahan laser dioda 810 nm melalui pupil yang dilebarkan untuk memanaskan tumor, dan dibanding menggumpalkan tumor secara akurat, selama 3-5 menit per titik. Terapi fotokromulasi dengan sinar laser 532 nm, 810 nm atau gelombang 1064 nm terus menerus diberikan secara langsung melalui beberapa pembakaran jarak dekat (0,7 detik) pada tumor kecil, tumor aktif atau yang dicurigai, yang secara bertahap meningkatkan daya dari intensitas kekuatan subkoagulasi sampai tumor menggumpal. dan berwarna putih buram. Sebaliknya, cryotherapy melibatkan pembekuan tumor melalui sklera dengan probe nitrous oxide; tumor divisualisasikan secara langsung dan durasi pembekuan disesuaikan dengan bentuk tumor secara keseluruhan. Setelah sel tumor mati, kemudian didiamkan 1 menit untuk setiap pencairan di antara siklus pembekuan.⁴¹

e) *Thermotherapy*

Thermotherapy merupakan pilihan tatalaksana untuk tumor kecil dengan diameter 4 mm dan ketebalan 2 mm. Metodenya dengan melakukan radiasi sinar inframerah level subfotokoagulasi pada jaringan untuk menginduksi nekrosis tumor dan mencegah rusaknya pembuluh darah retina. Regresi tumor secara komplit dapat mencapai 85% setelah dilakukannya 3-4 kali *thermotherapy*.⁴¹

f) *Brachytherapy dengan plak I-125 atau Ro-106*

Plaque brachytherapy menggunakan zat radioaktif (umumnya I-125 atau Ro106) yang diimplantasikan pada sklera. Tujuannya adalah untuk radiasi tumor secara transsklera. Kelebihannya adalah radiasi fokal tumor sehingga tidak menyebabkan rusaknya jaringan normal di sekitar tumor.⁴⁰

g) *Kemoterapi*

Kemoterapi merupakan pilihan tatalaksana pada pasien dengan tujuan mengurangi volum tumor sampai ukuran dimana terapi laser bisa diberikan. Terapi ini juga efektif untuk kelainan vitreous, subretinal dan ekstraokular

maupun metastasis Beberapa jenis teknik kemoterapi pada retinoblastoma antara lain IVC, IAC,.⁴²

Sejak tahun 1996, terapi lini pertama dalam mengendalikan kelompok penyakit B, C dan D Murphree IIRC adalah melalui IVC (*intravenous chemotherapy*) dengan kombinasi, dosis, jadwal dan durasi *carboplatin, etoposide and vincristin* (CEV) yang berbeda dilanjutkan dengan terapi fokal untuk menggabungkan respon kemoterapi.⁴³ Prinsip dasar untuk terapi kanker sistemik juga berlaku pada retinoblastoma yaitu mencapai hasil optimal dengan intensitas dosis tinggi dan kombinasi beberapa agen dengan mekanisme tindakan komplementer. Toksisitas akut IVC pada retinoblastoma sama seperti halnya pada penderita kanker pediatrik lainnya, meliputi pansitopenia transien, rambut rontok, neurotoksisitas dan infeksi. Toksisitas jangka panjang meliputi toksisitas yang diinduksi carboplatin yaitu kehilangan pendengaran nada tinggi pada beberapa pasien, risiko kanker non-okular sekunder oleh agen alkilasi dan leukemia myeloid akut sekunder setelah kemoterapi dengan inhibitor topoisomerase, agen doxorubicin dan alkilasi.⁴⁴

IVC sendiri masih belum bisa menghilangkan retinoblastoma sepenuhnya, sehingga terapi fokal dengan pemeriksaan berulang sangat penting dilakukan. Tumor di wilayah makula, yang mengancam penglihatan, sangat berisiko rekuren tanpa terapi fokal, kemungkinan dikarenakan oleh kewaspadaan agar tidak merusak penglihatan akibat tindakan tersebut. OCT (*optical coherence tomography*) dapat digunakan untuk memantau tumor makula dan bekas luka terhadap rekurensi yang angulatal sehingga dapat memperbaiki *outcome*.⁴²

Lokasi tumor adalah prediktor ketajaman visual akhir yang paling penting (ketajaman visual mendekati normal $\geq 0,5$ pada 22% mata dengan tumor makula dan pada 67% mata dengan tumor ektrafoveal). Pada tumor anak-anak yang mengenai dua mata, memanfaatkan mata yang lebih baik untuk memaksa penggunaan mata yang perkembangannya tergantung pada mata lainnya dengan keterlibatan makula akan mencapai penglihatan dekat normal pada 53% dan penglihatan yang penuh pada 73% pasien. Tidak ada laporan mengenai toksisitas lokal IVC pada mata.⁴²

IAC (*intra-arterial chemotherapy*) telah digunakan untuk terapi selama beberapa dekade di Jepang dan baru-baru ini disempurnakan untuk mencapai penyampaian yang lebih selektif ke mata. Ahli radiologi intervensi melewati

mikrokontroler melalui arteri femoralis sampai ke lubang arteri mata yang menderita retinoblastoma kemudian kemoterapi (obat tunggal atau kombinasi; melphalan, topotecan dan/atau carboplatin) diinfuskan dalam pola hitungan nadi lebih dari 30 menit. Tiga studi IAC dengan mayoritas pasien yang memiliki follow up rata-rata 13-79 bulan dengan total 488 pasien, menunjukkan bahwa IAC dapat menyelamatkan mata sebanyak 65% dari semua mata yang terkena. Dalam sebuah penelitian, keberhasilan penyelamatan mata secara keseluruhan adalah sebesar 74% ketika IAC digunakan sebagai pengobatan lini pertama dan sebesar 67% bila digunakan sebagai pengobatan lini kedua.⁴²

Komplikasi okular yang disebabkan oleh IAC meliputi perdarahan vitreous (2%), sumbatan arteri retina cabang (1%), spasme arteri oftalmik dengan reperfusi (2%), obstruksi arteri oftalmik (2%), iskemia choroidal parsial (2%) dan neuropati optik (<1%). Komplikasi transien ringan saat prosedur IAC meliputi termasuk edema kelopak mata sementara (5%), blepharoptosis (kelopak mata berkabut, 5%) dan peningkatan aliran darah ke dahi (2%). Electroretinogram menunjukkan sedikit bukti toksisitas retina yang berlangsung hingga 12 bulan, yang tidak dianggap relevan secara klinis.⁴²

Terapi fokal yang meliputi terapi laser dan cryotherapy. Terapi fokal adalah penerapan terapi lokal ke mata, di bawah penglihatan langsung melaluik pupil yang dilebarkan secara farmakologis. Terapi fokal adalah pengobatan utama untuk Kelompok A Murphree IIRC dan digunakan untuk menggabungkan respon mata kelompok B, C dan D setelah IVC atau IAC dengan tujuan untuk menghancurkan secara fisik sisa retinoblastoma residual atau rekurensi yang aktif berukuran kecil. Secara umum, terapi fokal diulang setiap bulan sampai tumornya menjadi atrofi atau kalsifikasi dengan lengkap.⁴²

Kemoterapi intravitreal dilakukan jika terapi primer gagal dengan adanya benih vitreus. Kemoterapi intravitreal merupakan tambahan terhadap terapi lainnya dan dimulai hanya setelah sumber benih bisa dikendalikan. Penggunaan kemoterapi intravitreal untuk mengendalikan benih vitreous sangat menjanjikan, terutama dalam kombinasi dengan teknik injeksi yang disempurnakan dengan aman dan kriteria kelayakan yang jelas. Di bawah kendali anestesi, tekanan intraokular diturunkan dengan mengeluarkan sedikit cairan dari ruang anterior atau dengan pijat digital. Kemoterapi disuntikkan ke vitreous di balik lensa melalui konjungtiva, sklera dan pars plana dengan jarum berukuran kecil. Setelah penarikan jarum, tempat suntikan disegel dan disterilkan dengan krioterapi dan

mata digerakkan dengan lembut untuk mendistribusikan obat tersebut ke seluruh vitreous.⁴²

Kombinasi terapi dapat digunakan untuk target area relaps. Untuk relaps yang terbatas pada retina dan/atau vitreous, maka dianjurkan terapi fokal dan/atau intravitreal selama terapi *whole-eye* tidak diperlukan. Tumor rekuren yang mengenai saraf optik dan/atau daerah penglihatan kritis seperti bundel maculopapillary, serta tumor retina atau subretinal dangkal yang difus, merupakan indikasi yang baik untuk IAC, yang mungkin bisa menghasilkan visus yang lebih baik daripada terapi fokal.⁴²

2.1.8.2 Terapi Retinoblastoma Ekstraokuler

Retinoblastoma ekstraokular dapat terjadi dengan kemunculan penyakit ekstraokular, terutama di negara-negara berpenghasilan rendah. Perluasan orbita dari retinoblastoma intraokular dapat dideteksi secara klinis pada anak-anak dengan proptosis atau masa fungasi atau kadang-kadang dengan pemeriksaan pencitraan. Pengobatan meliputi kemoterapi neoadjuvant menggunakan CEV, cisplatin, siklofosamid dan anthracyclines untuk retinoblastoma intraokuler kemudian dilanjutkan dengan enukleasi dan eksisi terbatas pada jaringan yang terkena, radiasi orbital dan kemoterapi ajuvan.³⁹ Kemoterapi juga dapat digunakan dan kemoterapi dosis tinggi dengan penyelamatan sel induk dapat ditambahkan pada penyakit metastatik. Anak-anak dengan penyakit orbital atau penyebaran metastase tanpa invasi sistem saraf pusat dapat disembuhkan dengan terapi intensif. Hasil jangka panjang pada pasien retinoblastoma yang muncul dengan penyakit ekstraokular dipersulit oleh efek yang berkembang di akhir, namun secara keseluruhan hasilnya adalah cukup.²⁹

2.1.8.3 Terapi Paliatif

Terapi paliatif meliputi manajemen nyeri, mengurangi gejala, dukungan nutrisi dan dukungan psikososial untuk anak dan keluarga. Retinoblastoma yang tidak diobati sangat sensitif terhadap kebanyakan agen kemoterapi. Anak-anak yang mengalami retinoblastoma orbital biasanya mengalami rasa sakit dan ketidaknyamanan yang berat yang dapat diatasi dengan penggunaan terapi antikanker dengan tepat, termasuk kemoterapi konvensional, walaupun tidak ada maksud penyembuhan yang dilakukan. Pasien sering mengalami penurunan

berat badan yang drastis yang membutuhkan perawatan medis segera. Radioterapi juga bisa membantu, terutama untuk relaps sistem saraf pusat atau untuk pengobatan perluasan orbit yang massif.⁴⁴

2.1.9 Prognosis

Prognosis retinoblastoma ditentukan oleh beberapa faktor yaitu faktor histiologis dan faktor klinis. Faktor histiologis adalah ada tidaknya invasi sel tumor dan diferensiasi sel tumor. Adanya invasi sel tumor ke khoroid, nervus optikus dan orbita merupakan tanda prognosa yang jelek. Dari faktor diferensiasi sel tumor didapatkan angka mortalitas lebih rendah apabila semakin banyak gambaran *rosettes* dibandingkan dengan *highly undifferentiated tumor*. Faktor klinis adalah kecepatan dan ketepatan diagnosis, riwayat operasi intraocular sebelumnya dan penggunaan terapi tambahan *external beam radiotherapy*.⁴⁵

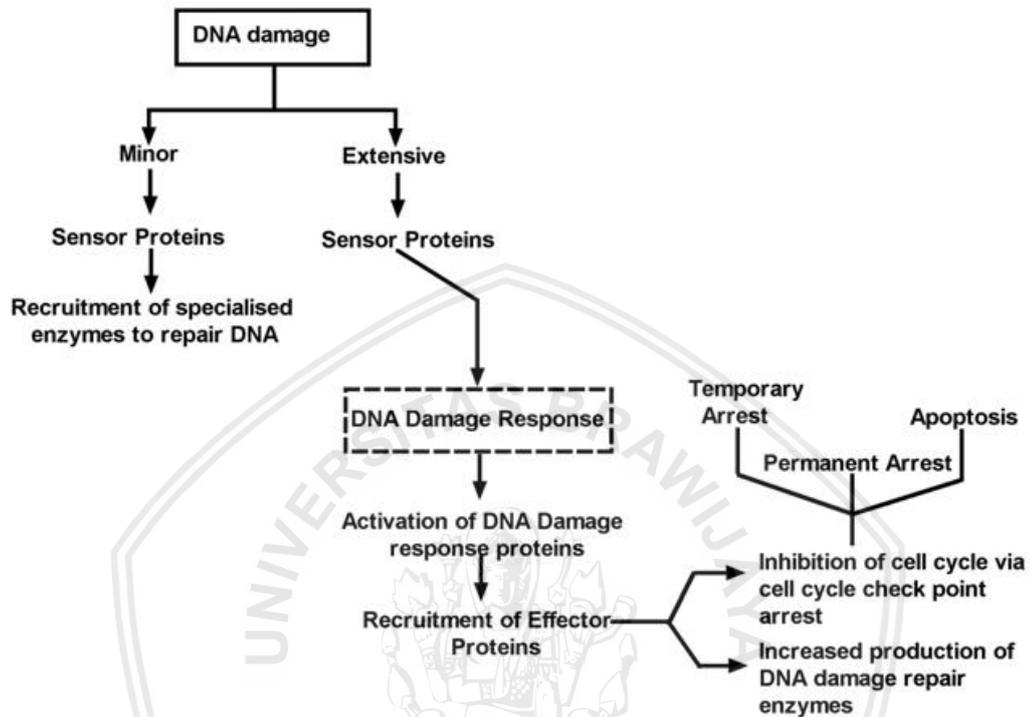
2.2 Regulasi proliferasi dan apoptosis sel

2.2.1 Kerusakan DNA

Untuk kelangsungan hidup dan fungsi normal sel dan pada akhirnya seluruh organisme, konservasi dan perlindungan urutan dan struktur DNA asli diperlukan. Namun, tubuh kita terus-menerus terkena beragam jenis paparan genotoksik dari berbagai sumber yang dapat merusak DNA. Dalam rangka mempertahankan integritas genomik, sel-sel memiliki mekanisme penginderaan dan perbaikan DNA sebagai respon adanya kerusakan DNA dan menjamin kelangsungan hidup.⁴⁶

Kerusakan DNA yang terjadi akibat stimulus kimia, radikal bebas, atau radiasi yang berasal dari paparan lingkungan, produk sampingan metabolisme intraseluler, atau terapi medis. Kerusakan DNA dapat terbatas pada perubahan susunan basa atau ekstensif seperti kerusakan pada *double-strand*. Protein nukleus mendeteksi kerusakan DNA dan memulai perlekatan kompleks protein pada lokasi lesi. Selanjutnya, sinyal transduser, mediator, dan protein efektor target terfosforilasi (misalnya, p53) akan menyebabkan berhentinya siklus sel pada fase G1/ S, intra-S, atau G2/ M sampai dilakukan proses perbaikan DNA. Gangguan yang terjadi pada fase berhentinya siklus sel pada DNA yang rusak pada masing-masing *checkpoint* ini berhubungan dengan ketidakstabilan genom dan onkogenesis. Ketika perbaikan DNA berhasil, siklus sel dapat dilanjutkan. Namun jika perbaikan tidak berhasil (misalnya, dengan dosis tinggi agen perusak

DNA atau cacat genetik pada mesin perbaikan DNA), maka hal ini dapat menyebabkan berhentinya siklus sel secara permanen (*senescence*), apoptosis atau onkogenesis.⁴⁷ Berikut ini merupakan bagan yang menjelaskan jalur yang terjadi sebagai respon kerusakan DNA:



Gambar 2.12 Respon seluler terhadap kerusakan DNA

2.2.2 Jalur pRB

Fungsi yang paling utama dari protein retinoblastoma (pRB) adalah untuk mengontrol progresi siklus sel dengan berinteraksi dan menghambat faktor transkripsi famili E2F, yang mengatur ekspresi gen yang diperlukan untuk proliferasi sel. Afinitas pRB terhadap E2Fs (E2F-1, -2, -3a, -3b) bergantung pada status fosforilasinya, yang dimodulasi oleh *cyclin* dan *cyclin-dependent kinase* (CDK). Adanya sinyal proliferasi, terjadi peningkatan aktivitas kompleks cyclin-CDK yang selanjutnya memfosforilasi pRB, yang menyebabkan disosiasi E2Fs dari pRB. Akibatnya, E2Fs mengaktifkan target transkripsional, sehingga masuk ke dalam siklus sel dan menginduksi pembelahan sel. Mengingat peran penting dari pRB dalam kontrol siklus sel, mutasi RB1 menyebabkan sel pada kapasitas untuk memasuki siklus sel dan membelah secara tidak tepat, atau memungkinkan sel-sel yang ditakdirkan untuk keluar siklus tetap berproliferasi.⁴⁸

2.2.3 Jalur p53

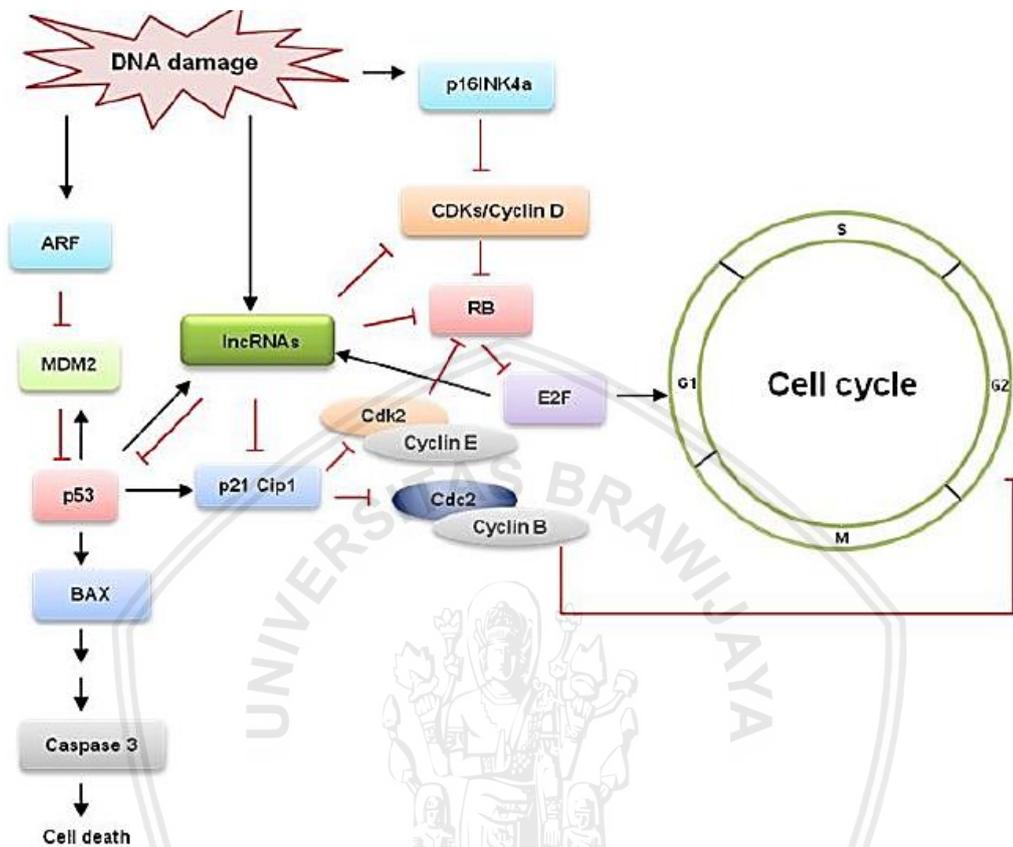
Protein 53 (p53) merupakan *tumor-suppressor gene* yang berfungsi dalam mengontrol siklus sel dan apoptosis. Dalam keadaan adanya stress, kerusakan DNA atau sinyal onkogenik akan menginduksi ARF. ARF akan memecah MDM2 yang selanjutnya memfasilitasi degradasi dan aktivasi p53. Protein p53 memiliki efek baik aktivasi maupun inhibisi sehingga dapat mengontrol transkripsi beberapa gen. Aktivasi gen WAF1 dan inhibisi CDKs akan menyebabkan terhentinya siklus sel. Sedangkan aktivasi protein BAX akan menyebabkan apoptosis sel. Pada retinoblastoma disebutkan terjadi inaktivasi jalur p53, meskipun tidak ditemukan mutasi gen penyandi protein 53 (TP53). Disregulasi ini dilaporkan karena peningkatan protein MDM4 dan MDM2 pada 63% dan 10% pasien retinoblastoma. Kedua protein tersebut berperan dalam inhibisi jalur aktivasi p53 sehingga bila jumlahnya meningkat maka akan terjadi inaktivasi jalur p53.⁷

2.2.4 Interaksi pRB dan p53

Studi *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa ARF penting dalam menyampaikan sinyal yang diprakarsai oleh inaktivasi pRB untuk memicu perkembangan tumor yang dimediasi oleh p53. Konsekuensi langsung dari inaktivasi pRB adalah derepresi faktor transkripsi E2F1, yang dalam konteks tertentu, mampu menginduksi transkripsi ARF. E2F1 mengatur ARF melalui elemen responsif E2F baru yang berbeda dari lokasi E2F pada umumnya. Elemen ini merespon aktivitas E2F1 yang menyimpang yang dihasilkan dari inaktivasi pRB atau ekspresi ektopik E2F1, tetapi tidak pada fluktuasi fisiologis normal E2F1 selama siklus sel. Oleh karena itu pada saat inaktivasi pRB, aktivitas E2F1 yang menyimpang dapat mengaktifkan ARF, yang pada gilirannya mengaktifkan p53 untuk menekan tumorigenesis. Supresi tumor yang dimediasi oleh ARF ditunjukkan pada model tumor hipofisis tikus yang diprakarsai oleh mutasi RB, di mana ARB diaktifkan saat inaktivasi RB.⁴

Teori lain menyebutkan bahwa jalur penekan tumor p53 dan retinoblastoma (RB) mengendalikan respons kerusakan DNA. p16INK4a dan p14ARF mengontrol aktivitas RB dan p53. RB menginduksi berhentinya siklus sel di G1 dan mengatur masuk ke fase S dengan menghambat E2Fs. p53 memediasi beberapa efek, termasuk menyebabkan G1 dan G2 menangkap dan mempromosikan apoptosis. Hilangnya fungsi p53 juga mendorong

ketidakstabilan genomic.⁵ Berikut ini gambar yang menjelaskan interaksi antara pRB dan p53 dalam regulasi siklus sel dan apoptosis:



Gambar 2.13 Interaksi p53 dan RB1 dalam regulasi proliferasi dan apoptosis.⁵

2.3 Ciplukan (*Physalis angulata L.*)

2.3.1 Deskripsi

Ciplukan (*Physalis angulata L.*) merupakan tumbuhan semak yang tumbuh musiman dan tergolong sebagai tanaman liar. Ciplukan ditemukan di sebagian besar daerah tropis termasuk Afrika, Asia dan Amerika yang tersebar luas di wilayah lahan kosong dengan tanah yang lembab. Di Indonesia, pulau Jawa merupakan pulau yang dapat ditumbuhi secara liar oleh ciplukan baik di kebun, tepi jalan, semak dan tepi hutan. Ketinggian tanah yang baik untuk mendukung pertumbuhan ciplukan adalah sekitar 1 – 1.550 m di atas permukaan laut. Ciplukan di Indonesia semula hanya dianggap sebagai tanaman liar dan kurang memiliki nilai guna. Sedangkan di Perancis, ciplukan merupakan buah eksklusif yang banyak dikonsumsi. Bangsa lain yang juga memanfaatkan ciplukan adalah Amerika, Kanada, Korea Selatan, dan Taiwan. Selain ciplukan

dimakan sebagai buah segar, tanaman ini juga digunakan sebagai bahan untuk terapi alternatif terapi beberapa jenis penyakit.⁴⁹

2.3.2 Morfologi

Ciplukan tumbuh tegak dengan tinggi 0,1-1 m. Batang pokoknya tidak jelas, percabangan menggarpu, bersegi tajam, berusuk, berongga, bagian yang hijau berambut pendek. Tanaman ini memiliki 2 bentuk yaitu bentuk berdaun tipis dengan permukaan datar, berbulu, dan tepi daun bergerigi, sedangkan bentuk yang lain berdaun agak tebal dengan permukaan tidak rata, berbulu, dan tepi daun bergelombang. Akar ciplukan berbentuk bulat, tumbuh memanjang, berwarna putih, dan rasanya pahit. Akar yang berasal biji berupa akar cabang, serabut, atau akar tunggang di mana akar tunggang ini tidak ditemukan pada perbanyak vegetatif.⁵⁰

Batang ciplukan berwarna hijau dan lembayung, berdiri tegak yang selanjutnya dapat membentuk percabangan ke samping bahkan bisa mendatar menyentuh tanah, serta batang bawah berbentuk bulat dengan alur kecoklatan. Daun ciplukan tipis, lemas, berbulu lebat, dan cepat layu setelah dipetik. Daun pertama sampai kelima dari tanaman generatif berbentuk oval, urat jelas, dan tepi belum berleku sedangkan daun-daun berikutnya sudah berlekuk. Panjang tangkai 2-3 cm, bersegi, dan berwarna hijau.⁵⁰

Bunga ciplukan berbentuk tunggal. Kelopak bunga menyerupai terompet berbulu, berwarna lembayung, dan dengan ujung bercelah 5. Mahkota berbentuk lonceng, berwarna kuning, lebar lebih dari 1 cm, bagian tepi sedikit berlekuk, dan di dalam leher terdapat noda kecoklatan yang dibawahnya ditumbuhi rambut kelompok seperti huruf M gemuk. Tangkai sari berjumlah 4, kurang dari 1 cm, berwarna kebiru-biruan dengan ujungnya kuning kehitaman. Tangkai putik kebiru-biruan dengan kepala putik gundul kebiru-biruan. Buah ciplukan sebesar kelereng, berkulit tipis dan licin. Panjang buah 15-20 mm dengan diameter 1.5 cm. Biji bertekstur keras, panjang kurang dari 1mm, dan berwarna coklat muda. Satu buah ciplukan dapat mengandung 150 biji.⁵⁰

Berikut ini gambar morfologi tanaman ciplukan:



Gambar 2.14 Morfologi Tanaman Ciplukan (*Physalis angulata* L.) a. Bunga, b. Buah, c. Daun, d. Batang⁴⁹

2.3.3 Taksonomi

Taksonomi ciplukan (*Physalis angulata* L.) dalam ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*) adalah sebagai berikut :⁴⁹

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Subkelas	: Asteridae
Ordo	: <i>Solanales</i>
Famili	: <i>Solanaceae</i>
Genus	: <i>Physalis</i>
Spesies	: <i>Physalis angulata</i> L

2.3.4 Kandungan Kimia

Senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam ciplukan antara lain alkaloid, flavonoid dan beberapa jenis steroid tanaman. Komponen zat aktif utama dalam ciplukan antara lain:

a. *Physalins*

Physalins merupakan steroid yang berasal dari *Physalis* atau genus yang dekat, yang termasuk ke dalam famili *Solanaceae*. *Physalins* secara biologis berkaitan erat dengan *withanolides*.⁵¹ Dari batang dan daun *P. angulata* telah

berhasil diisolasi 5 jenis physalins baru yaitu physalins E, F, H, I dan K, selain physalins B, G dan D yang telah ditemukan sebelumnya. Physalins U dan V serta komponen steroid tipe ergostane yang lain berhasil diisolasi dari ekstrak metanol daun *P. angulata*.⁵²

Akumulasi suatu zat physalin dapat ditemukan pada jaringan utuh dari ciplukan. Total, ada 6 jenis physalin yang bisa di temukan dari ekstrak tanaman physalis, yaitu physalin A, B, D, F, J dan N. Kandungan physalin terbanyak dapat ditemukan di bagian bunga dan daunnya.⁵³

b. *Withanolides*

Withanolides adalah kelompok steroid yang berasal dari kerangka ergostane, dimana rantai C-22 dan C-26 mengalami oksidasi untuk membentuk cincin δ -lactone. Komponen ini spesifik untuk famili Solanaceae Beberapa withanolides baru yaitu *physagulin* A, B, C dan D diperoleh dari ekstrak metanol daun segar dan batang *P. angulata*.⁵² Penelitian lain yang dilakukan oleh He *et al.* (2007) melaporkan isolasi dan elusidasi sebelas *withanolides* dari ekstrak *P. angulata* yaitu *physagulins* L, M, N dan O, *withangulatin* A, *physagulin* K, *withaminimin*, *physagulin* J, *physagulin* B, *pubesenolide* dan *physagulin* D. Hingga saat ini aktivitas *withanolides* yang telah dibuktikan antara lain antikanker, antikonvulsan, immunosuppresan dan antioksidan.⁵⁴

c. *Luteolin*

Selain *physalin* dan *withanolides*, daun ciplukan juga mengandung luteolin yang merupakan glikosida flavonoid, senyawa turunan dari flavones. Luteolin diduga berperan penting pada tubuh manusia sebagai antioksidan, *free radical scavenger*, agen pencegah inflamasi, promotor metabolisme karbohidrat, dan modulator sistem imun. Beberapa eksperimen penelitian menjelaskan luteolin sebagai agen biokimia yang secara signifikan menurunkan inflamasi dan memiliki aktivitas antikanker.⁵²

d. *Carotenoids*

Sebanyak 22 jenis *carotenoid* yang berasal dari buah *P.angulata* berhasil diidentifikasi dengan metode HPLC-PDA-MS/MS. Sebagian besar *carotenoid* merupakan *all-trans-caroten* yaitu sekitar 62,2%, kemudian *9-cis-carotene* sebesar 2,9% dan *all-trans-cryptoxanthin* sebesar 2,7%. Bebeapa penelitian telah membuktikan bahwa terdapat korelasi positif antara konsumsi sayur dan buah yang mengandung *carotenoid* dan penyakit kronis degeneratif seperti

kanker, inflamasi, penyakit kardiovaskular, katarak dan penyakit makula degeneratif.⁵⁵

2.3.5 Potensi *Physalis angulata L* sebagai Antikanker

Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa daun ciplukan memiliki aktivitas anti kanker. Penelitian Chiang *et al.* pada tahun 1992 telah menyatakan bahwa ekstrak etanol tanaman utuh *P. angulata* memiliki aktivitas sitotoksik in vitro pada beberapa *cell line* manusia yaitu: HA22T (hepatoma), HeLa (kanker serviks), KB (Nasopharing), Colo 205 (colon) dan Calu (paru). Sedang pada hewan coba, tanaman tersebut memiliki aktivitas sitotoksik in vitro terhadap H1477 (melanoma), Hep-2 (laryngeal) dan 8401 (glioma) dan memiliki efek anti tumor melawan P388 limpositik leukemia pada tikus secara in vivo.⁵⁶

Pada penelitian yang lain, ciplukan memiliki aktivitas antihepatoma pada sel hepatoma manusia Hep G2, Hep 3B dan PLC/PRF/5. Pada penelitian selanjutnya, didapatkan hasil bahwa *Physalis angulata* berperan dalam regulasi proliferasi, siklus sel dan apoptosis sel kanker payudara MDA-MB 231. *Physalis angulata* menghentikan sel kanker tersebut pada fase G2/M melalui penurunan level cyclin A / cyclin B, dan meningkatkan level p21waf1/cip1, p27kip1 dan Chk2 pada fase G2/M dimana terjadi peningkatan fosforilasi Cdc25C dan menginduksi penekanan level Cdc2 serta meningkatkan level Wee1. Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol ciplukan memiliki efek antiproliferasi dan sitotoksik.¹⁵

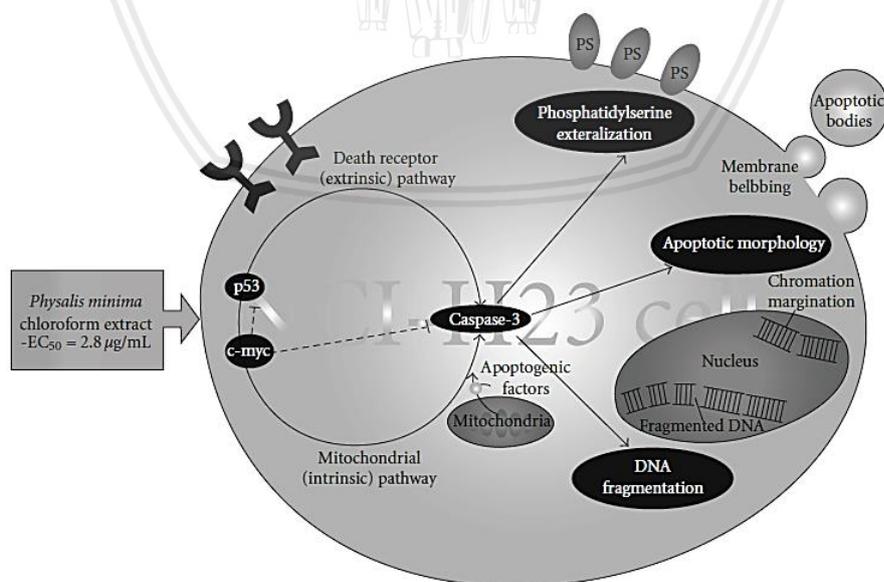
Darma *et al.* (2010) dalam penelitiannya melaporkan bahwa ciplukan memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker rahim melalui modulasi ekspresi dari p53 sehingga menyebabkan terhentinya proliferasi sel.¹⁴ Penelitian yang dilakukan oleh Ooi pada tahun 2010 melaporkan bahwa pemberian ekstrak *P. angulata* dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara T-47D manusia melalui jalur c-myc-, p53-, dan caspase-3-dependent.⁵⁷

Hal ini sejalan dengan penelitian Handayani pada tahun 2012 dimana ekstrak etanol *P. angulata* dapat menghambat pertumbuhan sel kanker dengan menurunkan ekspresi protein c-Myc, meningkatkan protein p53 liar dan ekspresi protein Apaf-1, menurunkan jumlah mitosis dan meningkatkan jumlah apoptosis.¹⁶

Penelitian yang dilakukan oleh Hseu *et al.* (2011) melaporkan bahwa ekstrak etil asetat *P. angulata* menyebabkan inhibisi terhadap beberapa tahapan

metastase, termasuk migrasi dan invasi *human oral squamous carcinoma cells* (HSC-3).¹⁷ He et al. (2007) juga melaporkan aktivitas sitotoksik dari 11 jenis whitanilides yang diisolasi dari ekstrak metanol *P. angulata* pada sel kanker NCI-H460 (lung) dan HCT-116 (colon). Withangulatin A disebutkan memiliki potensi antikanker paling tinggi pada cell line HCT-116 dengan nilai IC₅₀ 1.64±0.06 M, sedangkan physagulin B menghasilkan toksisitas paling tinggi terhadap cell line NCI-H460 dengan nilai IC₅₀ 0.43 ± 0.02 M.⁵⁴

Mekanisme antikanker ini diduga karena ekstrak *P. angulata* dapat menginduksi berhentinya siklus sel dalam fase G2/M.⁵⁵ Selain itu menurut Wu et al. (2012) dalam penelitiannya melaporkan bahwa *Physalin F* menginduksi apoptosis sel melalui jalur mitokondria yang diperantarai oleh ROS serta menekan aktivasi NF-κB pada sel kanker renal manusia A498.⁵⁹ Penelitian yang dilakukan oleh Leong et al. (2011) berhasil membuktikan efek sitotoksik dan mekanisme apoptosis sel kanker paru NCI-H23 yang diinduksi *Physalis angulata* L. Mekanisme apoptosis diperantarai oleh aktivasi p53, caspase-3 dan c-myc yang merupakan protein regulator utama baik pada jalur intrinsik maupun ekstrinsik. Hal ini selanjutnya akan menghasilkan beberapa efek biologis antara lain gangguan morfologi dan biokimia sel, termasuk fragmentasi DNA, eksternalisasi phosphatidylserine, migrasi kromatin, membran blebbing dan *apoptotic bodies*.⁶⁰ Berikut ini gambar skematis yang menjelaskan mekanisme kerja *Physalin* dalam aktivasi p53 :

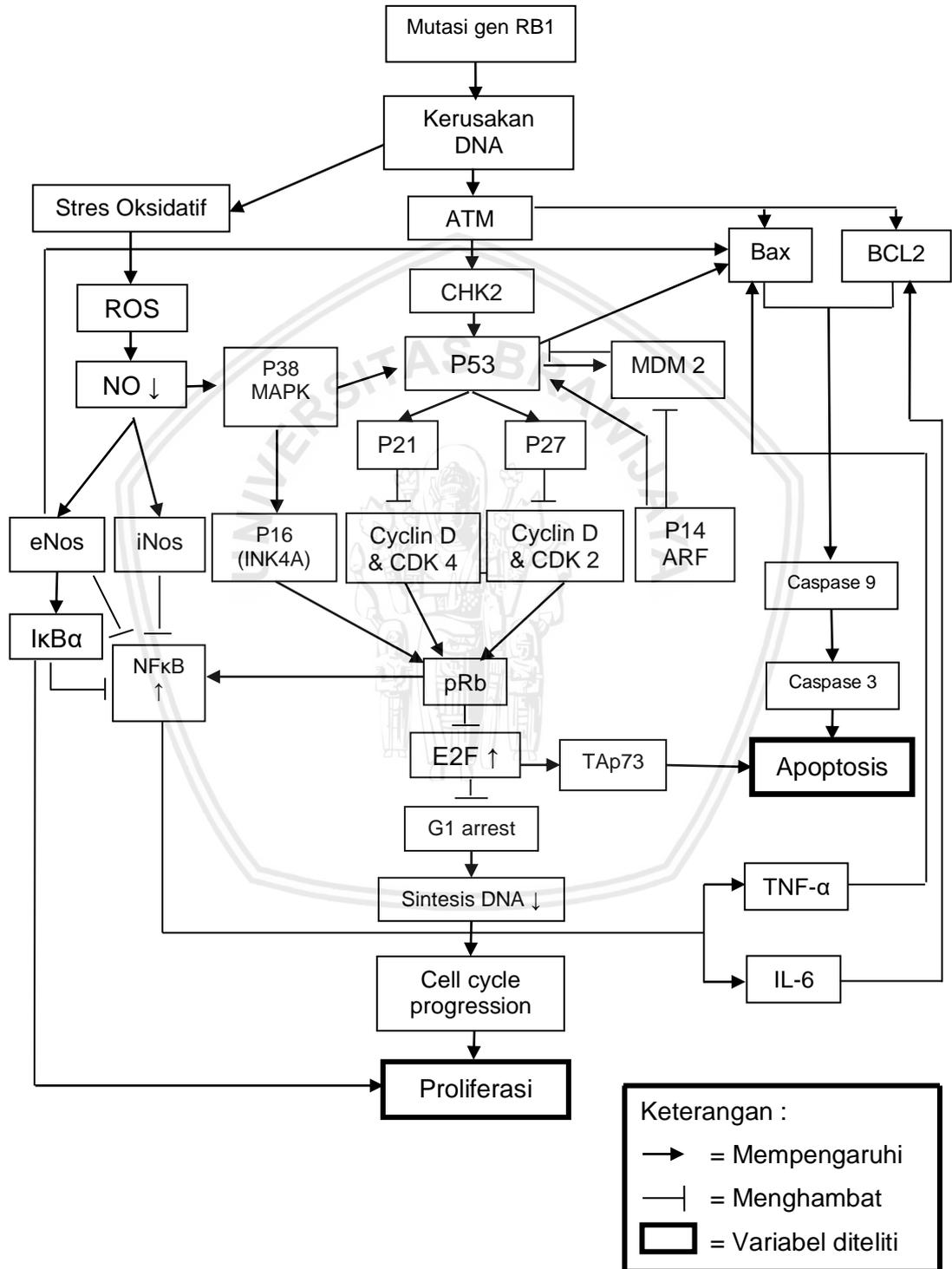


Gambar 2.15 Mekanisme apoptosis sel kanker paru (NCI-H23) oleh ekstrak kloroform *Physalis angulata* L.⁶⁰

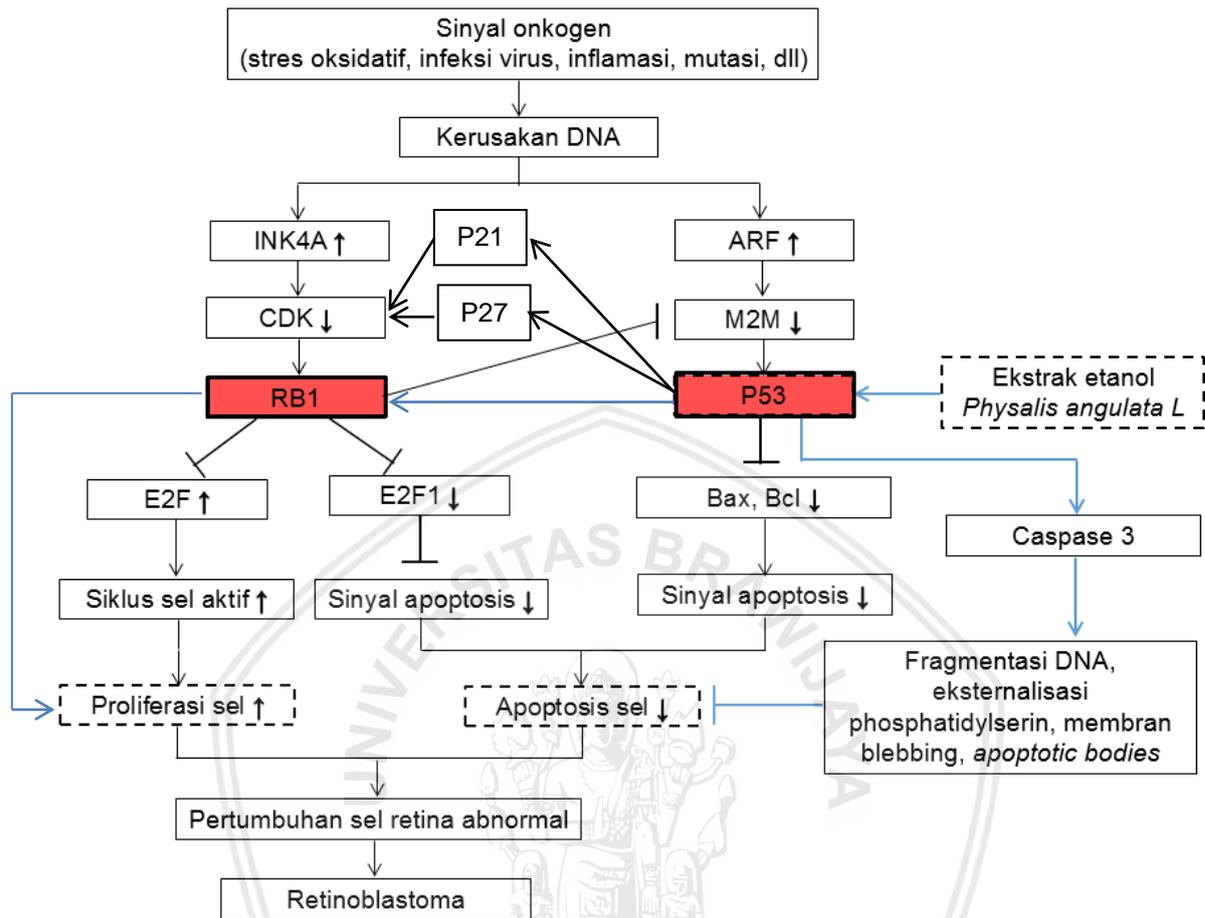
BAB 3

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori



3.2 Kerangka Konsep



Keterangan :

- Menginduksi
- | Menghambat
- (blue) Mekanisme kerja *Physalis angulata L*
- (red) Inaktivasi
- (dashed) Variabel yang diukur

Dari gambar kerangka konsep di atas dapat dijelaskan bahwa adanya sinyal onkogenik yang berupa stres oksidatif, infeksi virus, inflamasi, mutasi dan lain-lain akan menyebabkan kerusakan DNA. Kerusakan DNA ini akan menginduksi aktivasi beberapa protein regulator diantaranya P53 dan RB1. Keduanya merupakan protein supresor tumor yang berperan mengendalikan proliferasi dan apoptosis sel. Adanya kerusakan DNA akan menyebabkan aktivasi ARF yang selanjutnya mendegradasi M2M yang merupakan inhibitor dari

P53. Bila kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki maka P53 akan mengaktifkan sinyal apoptosis melalui Bax, Bcl dan protein lain sehingga terjadi apoptosis. Sedangkan pada jalur RB1, adanya kerusakan DNA akan menyebabkan aktivasi INK4A sehingga menurunkan CDK dan mengaktifkan protein RB1. Selain itu P53 akan menginduksi P21 dan P27 yang juga menyebabkan penurunan dari CDK dan juga mengaktifkan protein RB1. Protein RB1 merupakan protein yang dapat berperan ganda baik proliferasi dan apoptosis. Ketika protein RB1 menempel pada protein E2F maka akan menghentikan siklus sel sehingga menekan proliferasi, sedangkan ikatan RB1 dengan E2F1 akan menginduksi apoptosis.

Pada patogenesis retinoblastoma disebutkan terjadi mutasi atau inaktivasi dari kedua protein supresor tumor RB1 dan P53. Sehingga tidak ada yang mengontrol apoptosis yang berujung pada proliferasi sel yang berlebihan. Ekstrak daun *Physalis angulata L* disebutkan dapat menginduksi secara langsung protein P53 yang selanjutnya akan meningkatkan ekspresi caspase 3, suatu protein yang berperan dalam jalur apoptosis. Aktivasi caspase 3 menyebabkan beberapa efek biologis antara lain gangguan morfologi dan biokimia sel, termasuk fragmentasi DNA, eksternalisasi phosphatidylserine, migrasi kromatin, membran blebbing dan *apoptotic bodies*. Dengan meningkatkan apoptosis dan menurunkan proliferasi maka diharapkan perkembangan sel retinoblastoma dapat ditekan.

3.3 Hipotesis Penelitian

Ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L*) dapat meningkatkan apoptosis dan menurunkan proliferasi pada kultur sel retinoblastoma.

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true eksperimental in vitro* dengan desain pre dan post test control group. Penelitian menggunakan kultur sel jaringan retinoblastoma yang dipapar menggunakan ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) yang bertujuan melihat jumlah apoptosis dan proliferasi pada kultur sel retinoblastoma dan dibandingkan dengan kultur sel retinoblastoma setelah dipapar ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*)

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan dilakukan pada bulan Oktober 2018 – November 2018.

4.3 Obyek Penelitian

Obyek penelitian pada percobaan ini adalah sel kultur jaringan retinoblastoma yang didapat dari *American Type Culture Collection (ATCC)* 10801 University Boulevard Manassas, VA 20110 USA. Kultur sel retinoblastoma ini akan dipapar dengan berbagai dosis ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*). Kemudian kultur sel retinoblastoma dibagi dalam 4 kelompok:

- Kelompok kontrol: kelompok yang tidak mendapatkan paparan apapun
- Kelompok perlakuan 1: kelompok dengan paparan ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dosis 25 µg/mL
- Kelompok perlakuan 2: kelompok dengan paparan ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dosis 50 µg/mL
- Kelompok perlakuan 3: kelompok dengan paparan ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dosis 100 µg/mL

4.3.1 Kriteria inklusi obyek penelitian

Kriteria inklusi obyek adalah kultur sel yang menunjukkan karakteristik sel line retinoblastoma Y79 (ATCC® HTB18™) yang ditandai dengan biakan sel berbentuk multicellular cluster atau *grape-like cluster*.

4.3.2 Kriteria eksklusi obyek penelitian

Kriteria eksklusi obyek antara lain:

- Kultur sel yang tidak menunjukkan karakteristik sel retinoblastoma
- Kultur sel yang tidak tumbuh selama masa inkubasi ataupun sel mengalami kontaminasi dari bahan kimia, mikroorganisme maupun fungi
- Terdapat kesalahan dalam perlakuan.

4.4 Penentuan Besar Ulangan Penelitian

Berdasarkan rancangan penelitian eksperimental maka perhitungan besaran kelompok adalah sebagai berikut :

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

Dimana t adalah banyaknya kelompok penelitian dan r adalah jumlah replikasi. Pada penelitian ini terdapat kelompok penelitian (t) = 4, maka diperlukan jumlah replikasi (r) pada tiap kelompok = 6. Dengan demikian jumlah kelompok penelitian yang diperlukan pada penelitian ini sebanyak 24 *well*.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*)

4.5.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah apoptosis dan proliferasi sel pada kultur sel retinoblastoma

4.6 Penentuan Besar Dosis

Ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) yang diberikan ditentukan berdasarkan "dose doubling design", yaitu 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, dan 100 $\mu\text{g/mL}$.

Dosis	Dosis (mg.mL)
1. D	25 $\mu\text{g/mL}$
2. 2 x D	50 $\mu\text{g/mL}$
3. 4 x D	100 $\mu\text{g/mL}$

Oleh karena penelitian ini belum pernah dilakukan sebelumnya maka dasar pemberian dosis tersebut disesuaikan dengan penelitian yang dilakukan oleh Fitria *et al.*, yang meneliti efek ekstrak ciplukan pada sel kanker payudara.¹⁵

4.7 Definisi Operasional

1. **Kultur sel retinoblastoma** adalah kultur sel yang berasal dari kultur sel Y79 (ATCC® HTB18™) yang didapat dari American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Boulevard Manassas, VA 20110 USA
2. **Ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*)** adalah daun ciplukan yang diekstraksi dengan pelarut etanol absolut memakai alat ekstraktor sokhlet.
3. **Dosis perlakuan** adalah ekstrak bentuk cairan yang diencerkan hingga mendapatkan konsentrasi dosis 25 µg/mL, 50 µg/mL, dan 100 µg/mL.
4. **Proliferasi dan Apoptosis sel retinoblastoma** adalah pertumbuhan sel retinoblastoma yang dihitung dengan menggunakan metode *MTT Cell Proliferation Assay* yang dinyatakan dalam prosentase sel hidup dan *Flowcytometri Annexin V Apoptosis Detection Kit*

4.8 Alat Penelitian

4.8.1 Kultur sel retinoblastoma

- Plate 24 well
- CO₂ incubator
- Tabung sentrifuge steril 15 cc
- Sentrifuge
- Staining kit
- Mikroskop inverted
- Pipet disposable 2 ml
- Mikropipet
- Tip mikropipet
- Holder
- Gunting
- Spuit 10cc
- Bunsen
- Botol 250 ml

4.8.2 Pembuatan Ekstrak Ciplukan

- Satu set alat evaporator vakum/rotary vaccum untuk menghilangkan pelarut ekstrak
- Oven untuk menghilangkan pelarut ekstrak yang tersisa atau mengeringkan ekstrak

- Neraca analitik untuk menimbang simplisia
- Tabung erlenmayer
- Corong gelas dan kertas saring
- Labu evaporator dan labu penampung etanol
- Waterpump dan selangnya
- Vacuum pump
- Waterbath untuk pemanas ekstrak
- PH meter untuk mengukur PH

4.8.3 Jumlah Proliferasi Sel menggunakan *MTT Cell Proliferation Assay*

- Mikropipet 20, 200, 1000 μ l
- Tabung reaksi kecil
- Rak tabung kecil
- Vortex
- Conical *tube*

4.8.4 Jumlah Apoptosis menggunakan *flowcytometry Annexin V Apoptosis Detection Kit*

- Centrifuge
- Pipet 2-10 pi, 10-100 pi, dan 100-1000 pi
- Inkubator
- Eppendorf
- Flowcytometri

4.9 Bahan penelitian

4.9.1 Kultur sel retinoblastoma

- Alkohol 70%
- Kertas tissue
- Larutan kolagenase
- Larutan *Phospate Bufer Saline-A* (PBSA)
- Medium kultur *Dulbecco Minimum Essential Medium* (DMEM)
- Larutan serum free 3 ml
- Larutan gelatin 0,2%
- Medium kultur DMEM dan *Fetal Calf Serum* (FCS) 1-%

4.9.2 Ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*)

- Bubuk daun kering (simplisia) daun ciplukan 100 gram diperoleh dari Balai Tanaman Obat Materia Medika, kotatif Batu, Malang
- Pelarut etanol sebagai zat pelarut organik
- Aquades

4.9.3 Pemeriksaan Proliferasi menggunakan *MTT Cell Proliferation Assay*

- Stok obyek penelitian (10 mg) dalam eppendorf
- Pelarut DMSO
- Media kultur
- PBS (phosphate buffer saline)
- Larutan MTT 0,5 mg/ml
- Stopper SDS 10% dalam 0,1 NHCL

4.9.4 Pemeriksaan Apoptosis menggunakan *flowcytometry Annexin V Apoptosis Detection Kit*

- Stok obyek penelitian (10 mg) dalam eppendorf
- Media kultur
- PBS (phosphate buffer saline)
- EDTA
- Trypsin
- Annexin V
- Streptavidin
- PI (Annexin V Biotin Apoptosis Detection Kit e-Bioscience cat. no.BMS500B T/300)
- Staining buffer

4.10 Prosedur penelitian

4.10.1 Kultur sel retinoblastoma

- Jaringan tumor retinoblastoma dicuci dengan PBS steril sebanyak 3 kali didalam laminar flow
- Jaringan dicacah dalam media serum free hingga berukuran 1x1 mm
- Lakukan sentrifugasi pada 1000 rpm selama 10 menit suhu ruang. Buang supernatant dan resuspensi *pellet* dengan medium komplet, lakukan 3 kali

- Tanam pada *flash* menggunakan medium komplet, inkubasi pada incubator CO₂ dengan saturasi 5% CO₂ pada suhu 37°C selama 2 hari
- Setelah konfluen, lakukan subkultur pada *plate* kultur, pertama lakukan tripanisasi menggunakan tripsin-EDTA selama 5 menit, pada suhu 37°C – masukkan pada tabung sentrifus 15cc, kemudian disentrifugasi pada 1000 rpm selama 5 menit, cuci selama 3 kali menggunakan medium tanpa serum dan kemudian resuspensi menggunakan medium komplet.
- Tanam pada *plate* kultur sebanyak 24 *well*, sejumlah 1x10⁶ kemudian diinkubasi pada CO₂5%, setelah sel konfluen 70% baru diberi perlakuan.

4.10.2 Pembuatan sediaan ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*)

- Bubuk daun kering (simplisia) daun ciplukan 100 gram diperoleh dari Balai Tanaman Obat Materia Medika, kotatif Batu, Malang yang telah ditimbang beratnya, dibungkus dengan kertas saring dan dimasukkan dalam gelas erlenmayer ukuran 1 liter
- Simplisia ceplukan direndam dengan pelarut etanol sampai volume 900 ml untuk mengeluarkan senyawa-senyawa yang terkandung dalam daun ceplukan. Kocok sampai benar-benar tercampur (± 30 menit). Perendaman dengan larutan etanol dilakukan angulatal sehari semalam.
- Larutan hasil rendaman disisihkan, dan simplisia dapat di rendam kembali dengan pelarut etanol yang baru. Pekerjaan ini dilakukan berulang-ulang sampai di dapatkan larutan yang cukup atau sampai larutan berwarna jernih.
- Larutan hasil rendaman ditampung dan dibiarkan mengendap. Endapan dipisahkan dari larutan yang tidak mengendap.
- Larutan yang tidak mengendap dimasukkan dalam labu evaporasi 1 liter
- Pasang labu evaporasi pada evaporator, isi water bath dengan air sampai penuh, pasang semua rangkaian alat termasuk rotary evaporator dan pemanas water bath (atur sampai 90° C), sambungkan dengan aliran listrik
- Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu, hingga diperoleh ekstrak kental, tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (± 1,5 - 2 jam untuk 1 labu)
- Ekstrak kental dioven pada suhu 70° C untuk menghilangkan pelarut etanol yang tersisa.

- Masukkan hasil ekstrak ke dalam botol plastik dan simpan dalam freezer. Hasil yang diperoleh kira-kira 1/3 dari bahan alam kering.

4.10.3 Pembuatan dosis ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*)

- Buat larutan stok sebanyak 100 mg/mL, dimana 100 mg ekstrak daun ciplukan diencerkan dengan 1 mL air sehingga 1 mL air mengandung 100 mg ekstrak daun ciplukan.
- Rumus yang digunakan : $V1.M1 = V2.M2$
V1 = volume larutan sebelum pengenceran M1 = molaritas larutan sebelum pengenceran V2 = volume larutan setelah pengenceran M2 = molaritas larutan setelah pengenceran
 1. Dosis 100 mg/mL
 $V1.M1 = V2.M2$
 $X . 100 = 100 . 1,2$
 $X = 1.2 \text{ mL}$ (diambil dari larutan stok)
1,2mL larutan ekstrak 100 mg setara diencerkan hingga 1,2 cc sehingga terbentuk larutan dengan konsentrasi 100 μ g/ml
 2. Dosis 50 mg/mL
 $V1.M1 = V2.M2$
 $X . 100 = 50 . 1,2$
 $X = 0,6 \text{ mL}$ (diambil dari larutan stok)
0,6 mL larutan ekstrak 100 mg setara diencerkan hingga 1,2 cc sehingga terbentuk larutan dengan konsentrasi 50 μ g/ml
 3. Dosis 25 mg/mL
 $V1.M1 = V2.M2$
 $X . 100 = 25 . 1,2$
 $X = 0,3 \text{ mL}$ (diambil dari larutan stok)
0,3 mL larutan ekstrak 100 mg setara diencerkan hingga 1,2 cc sehingga terbentuk larutan dengan konsentrasi 25 μ g/ml
- Larutkan 1.2 mL larutan tersebut kedalam DMEM sehingga larutan ekstrak dapat bereaksi dengan sel kultur. Ekstrak dibagi untuk 6 replikasi, jadi tiap *well* ditetesi 0.2 mL larutan ekstrak tiap dosis

4.10.4 Perlakuan Kultur Sel Retinoblastoma

- Kultur sel retinoblastoma terbagi menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan
- Pada kelompok kultur sel retinoblastoma yang mendapat perlakuan dibagi menjadi 3 grup yang masing-masing dipapar dengan ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dosis 25 µg/mL, 50 µg/mL, dan 100 µg/mL dilarutkan dalam medium kultur kemudian diinkubasi selama 24 jam.
- Melakukan analisa apoptosis retinoblastoma dengan menggunakan *flowcytometry Annexin V Apoptosis Detection Kit* pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.
- Melakukan analisa proliferasi retinoblastoma dengan menggunakan *MTT Cell Proliferation Assay* pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

4.10.5 Prosedur pemeriksaan proliferasi dengan *MTT Cell Proliferation Assay*

- Setelah masa inkubasi selesai dan sudah didokumentasikan, berikan larutan MTT 0,5 mg/ml sebanyak 100 µl pada setiap sumuran
- Inkubasi sel selama 2-4 jam dalam incubator sampai terbentuk Kristal formazan yang berwarna ungu
- Setelah 2-4 jam, periksa kondisi sel dengan mikroskop. Jika formazan telah jelas terbentuk, tambahkan stopper SDS 10%, dalam 0,1 NHCL
- Bungkus plate dengan kertas atau aluminium foil dan diinkubasikan di tempat gelap (suhu ruangan) semalam
- Keesokan harinya, plate di shaker selama 10 menit untuk melarutkan formazan
- Masukkan ke dalam ELISA reader, baca absorbansi warna dengan panjang gelombang λ :550-600nm (595nm). Sel hidup dinyatakan dengan warna ungu, sedangkan sel mati ditunjukkan dengan warna kuning. Hasil absorbansi kemudian dimasukkan ke dalam rumus sebagai berikut:
$$\text{Sel hidup (\%)} = \frac{(\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media})}{(\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media})} \times 100\%$$
- Pembacaan absorbansi dilakukan oleh satu orang observer yang terlatih di bidangnya.

4.10.6 Prosedur pemeriksaan apoptosis dengan *flowcytometry Annexin V Apoptosis Detection Kit*

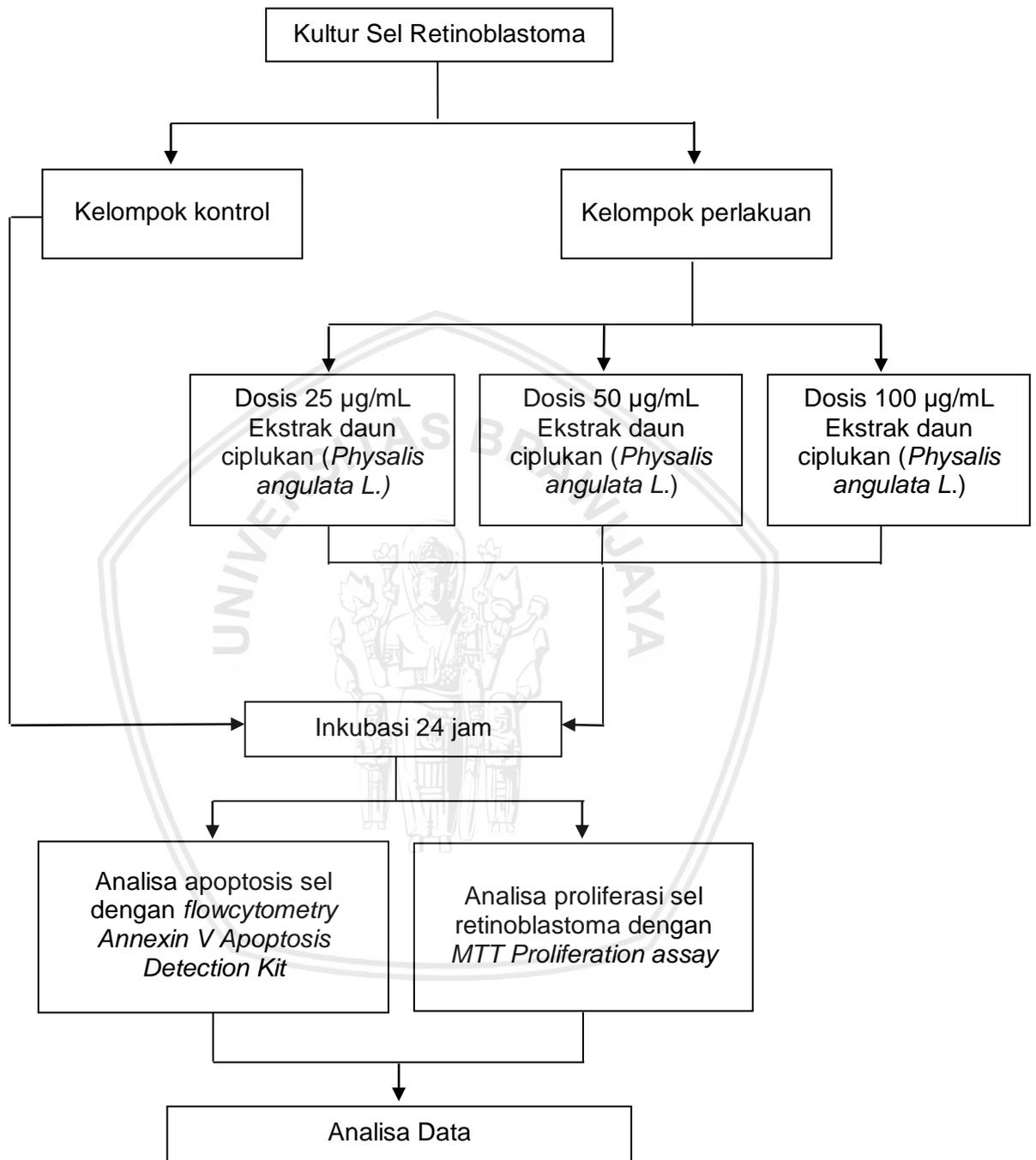
- Dilakukan inkubasi 24 well-plate pada inkubator CO 5% 2 37°C
- Sel dikeluarkan dari inkubator
- Medium dan EEDS diaspirasi
- Tiap sumuran tambahkan D-PBS, EDTA, tripsin
- Inkubasi selama 2 menit pada inkubator CO
- semua aspirat diletakkan pada eppendorf
- dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 5 menit
- Sel pada masing-masing eppendorf dicuci dengan PBS dingin
- Sentrifugasi sel pada kecepatan 1500 rpm
- Tambahkan Annexin V, streptavidin, PI (Annexin V Biotin Apoptosis Detection Kit e-Bioscience cat. no.BMS500B T/300) dan inkubasi 10 menit pada suhu 4°C dalam gelap.
- Tambahkan staining buffer sebanyak 300µl pada tiap sumuran.
- Analisis menggunakan flowcytometri pada waktu kurang dari 1 jam

4.11 Rancangan Analisa Data

Pada penelitian ini menggunakan uji *one-way* ANOVA, uji korelasi dan regresi linier, maka syarat yang harus dipenuhi sebelum melakukan pengujian adalah melakukan uji normalitas dan homogenitas. Untuk menguji distribusi normal data numerik pada *variabel dependent* maka dilakukan uji *Kolmogorof-smirnov* terhadap data pada tiap kelompok. Untuk mengetahui homogenitas ragam data numerik pada *variabel dependent* maka dilakukan uji *Levene*.

Untuk mengetahui apoptosis dan proliferasi sel retinoblastoma antara setiap perlakuan menggunakan analisa *one way ANOVA*. Apabila dari uji *one way ANOVA* didapatkan perbedaan yang signifikan antar kelompok maka dilanjutkan dengan uji rentang ganda (*multiple comparison, Tukey*), dimana dengan uji ini dapat diketahui perbedaan antar kelompok sehingga bisa diketahui kelompok mana saja yang berbeda signifikan atau tidak berbeda signifikan. Kemaknaan ditentukan berdasarkan nilai $p < 0.05$. data disajikan dalam bentuk tabulasi menggunakan program SPSS 22.0 *for windows*.

4.12 Alur Kerja Penelitian

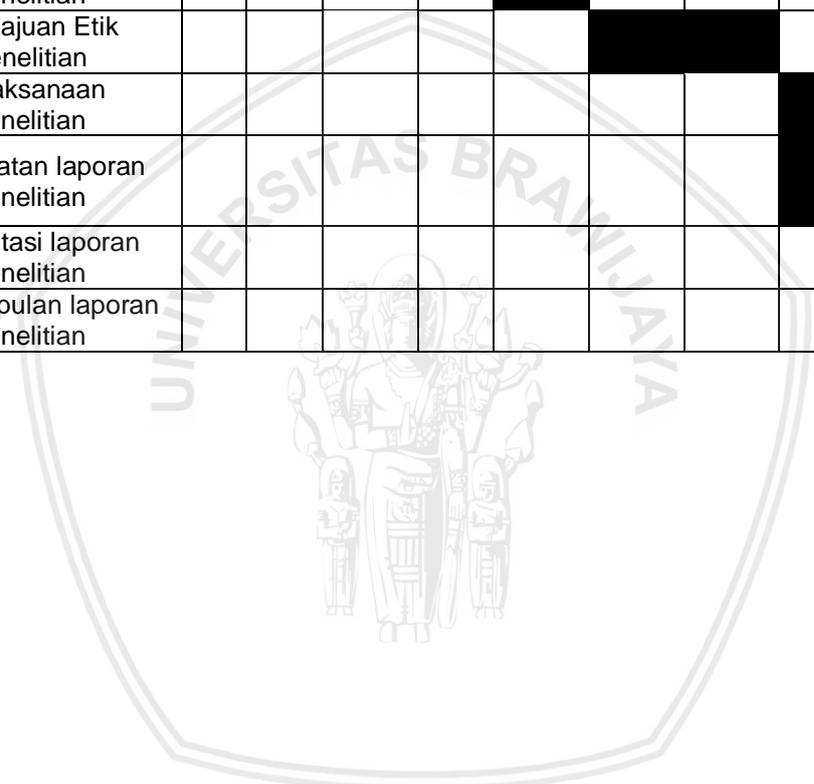


4.13 Organisasi Penelitian

Peneliti : dr. Marsha Dechastra C.
Pembimbing : dr. Lely Retno W, Sp.M (K)
dr. Hidayat Sujuti, Sp.M, PhD

4.14 Jadwal Penelitian

No	Kegiatan	2017					2018				
		Jul	Ags	Sep	Okt	Nov	Ags	Sep	Okt	Nov	Des
1.	Studi kepustakaan	■									
2.	Pengajuan Judul		■	■	■						
3.	Pembuatan usulan penelitian		■	■	■						
4.	Konsultasi usulan penelitian			■	■	■					
5.	Presentasi usulan penelitian					■					
6.	Pengajuan Etik Penelitian						■	■	■		
7.	Pelaksanaan penelitian								■	■	
8.	Pembuatan laporan penelitian								■	■	■
9.	Presentasi laporan penelitian									■	■
10.	Pengumpulan laporan penelitian										■

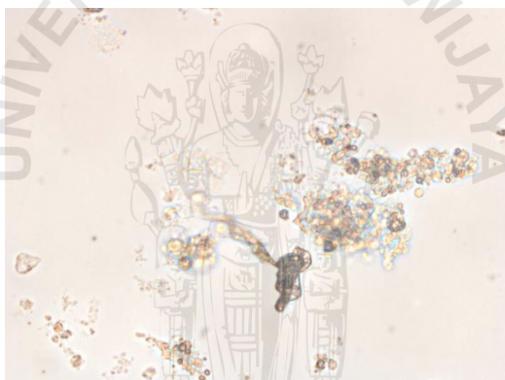


BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Gambaran Umum Hasil Penelitian

Penelitian ini menggunakan kultur *cell line* retinoblastoma yang didapatkan dari *American Type Culture Collection* (ATCC) 10801 University Boulevard Manassas, VA 20110 USA. Hasil penelitian berupa 24 ulangan yang terdiri atas 4 kelompok yaitu kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan. Sedangkan kelompok perlakuan diberikan ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dengan dosis 25 µg/ml, 50 µg/ml dan 100 µg/ml kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah dilakukan inkubasi maka dilakukan pemeriksaan apoptosis dengan menggunakan *Annexin V Apoptotic Detection Kit* dan pemeriksaan proliferasi sel menggunakan metode *MTT Cell Proliferation Assay*.



Gambar 5.1 Pengamatan kultur sel. Gambaran sel retinoblastoma tanpa pengecatan pada perbesaran 40x

Pada gambar diatas tampak gambaran kultur sel retinoblastoma dimana terlihat sel yang aktif berbentuk *spindle shaped cell*. Sel kemudian akan dihitung persentasinya berapa jumlah sel yang hidup serta berapa jumlah sel yang mengalami apoptosis setelah diberikan perlakuan. Pada penelitian ini didapatkan kepadatan koloni sel adalah sebesar 1×10^2 pada setiap *well* setelah dilakukan proses thawing selama 2 minggu.

5.2 Data Hasil Penelitian

Hasil rerata apoptosis dan proliferasi kultur sel retinoblastoma yang sudah dipapar ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) terangkum pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Rerata hasil pengamatan apoptosis dan proliferasi kultur sel retinoblastoma pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Parameter	Perlakuan	N	Mean	SD	Min.	Max.	95% CI Mean	
							Lower Bound	Upper Bound
Apoptosis	Kontrol	6	0.860	0.181	0.630	1.150	0.671	1.049
	P1	6	1.060	0.312	0.740	1.570	0.733	1.387
	P2	6	1.332	0.169	1.090	1.520	1.154	1.509
	P3	6	1.540	0.335	1.040	2.030	1.188	1.892
Proliferasi	Kontrol	6	89.647	1.176	88.220	91.350	88.412	90.881
	P1	6	87.837	1.012	86.410	88.880	86.775	88.899
	P2	6	86.770	1.748	84.390	89.330	84.935	88.605
	P3	6	84.800	1.010	82.950	86.050	83.740	85.860

Berdasarkan data tabel diatas terlihat bahwa terlihat adanya pengaruh pemberian ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) terhadap apoptosis dan proliferasi sel retinoblastoma pada kelompok perlakuan dengan dosis 25 µg/ml, 50 µg/ml dan 100 µg/ml. Dapat dilihat bahwa semakin tinggi dosis maka semakin tinggi pula efeknya dan meningkatkan apoptosis dan menghambat proliferasi yang terjadi pada sel retinoblastoma.

5.3 Analisa Statistik

5.3.1 Uji Normalitas

Dari hasil pengamatan penelitian, data yang diperoleh dilakukan uji normalitas data untuk mengetahui distribusi data. Pada penelitian ini digunakan metode *Kormogolov-Smirnov*.

Uji normalitas ini digunakan untuk menganalisis apakah data tersebut mempunyai distribusi secara normal atau tidak.

Tabel 5.2. Tabel Hasil Uji Normalitas

	Statistic	Sig.	Keterangan
Apoptosis	0.471	0.979	Normal
Proliferasi	0.466	0.982	Normal

Pada uji normalitas data, hipotesis dari data ditentukan melalui nilai signifikansi yang diperoleh dimana H_0 adalah data berdistribusi normal. H_0 diterima bila nilai signifikansi $>0,05$. Berdasarkan hasil analisis tersebut didapatkan nilai signifikansi untuk Apoptosis dan Proliferasi $>0,05$ sehingga H_0 ditolak dan berarti data tersebut berdistribusi normal.

5.3.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas ragam dilakukan untuk menguji kesamaan ragam data respon antar perlakuan di mana metode yang digunakan adalah *Lavene*.

Tabel 5.3. Tabel Hasil Uji Homogenitas

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Apoptosis	1.159	3	20	0.350
Proliferasi	1.317	3	20	0.297

Berdasarkan hasil uji homogenitas data diketahui nilai signifikansi sebesar 0,297 dan 0,350 ($p > 0,05$). Hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa ragam data adalah homogen. Karena data memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas maka digunakan uji parametric. Adapun uji parametrik yang digunakan yaitu one-way Anova dan Tukey.

5.3.3 Uji One-way Anova

Berdasarkan uji *One-way Anova*, hipotesis ditentukan dari nilai signifikansi yang diperoleh. H_0 adalah tidak adanya perbedaan antara perlakuan yang diuji. H_1 adalah adanya perbedaan antara perlakuan yang diuji. H_0 diterima bila nilai signifikansi >0.05 dan H_1 diterima bila nilai signifikansi <0.05 .

Tabel 5.4. Tabel Hasil Uji One-way Anova

	F	Sig.	Kesimpulan
Apoptosis	7.916	0.001	Signifikan
Proliferasi	15.198	0.000	Signifikan

Dari tabel uji One Way Anova, didapatkan nilai signifikansi untuk Apoptosis sebesar 0,001 dan Proliferasi sebesar 0,000 ($p < 0,05$), maka dapat dinyatakan tolak H_0 yang berarti terdapat perbedaan antara perlakuan yang diuji.

Untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang mempunyai perbedaan, maka perlu dilakukan analisis *post hoc*. Alat untuk melakukan analisis post hoc adalah uji tukey.

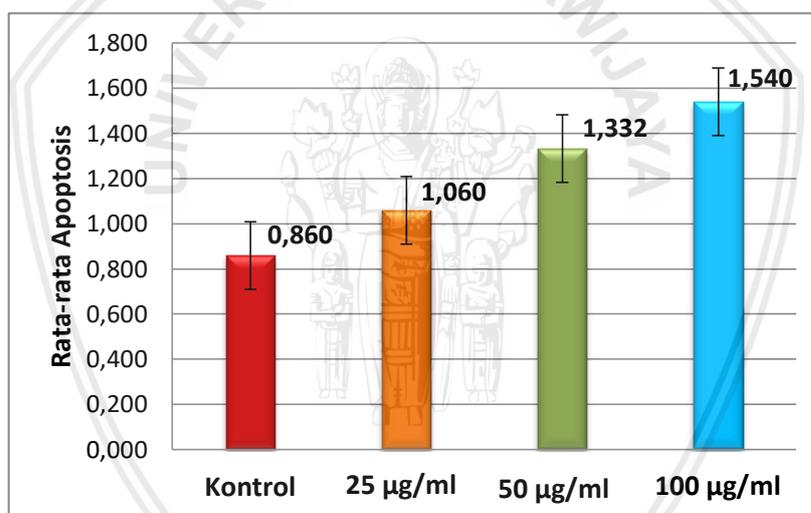
5.3.4 Uji Tukey

Langkah selanjutnya adalah mengolah data dengan menggunakan metode Tukey. Jika angka p-value $<0,05$, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan diantara perlakuan yang diuji tersebut. Dengan metode ini akan dilakukan perbandingan antara masing-masing kelompok yang diuji .

Tabel 5.5 Tabel Hasil Uji Tukey Apoptosis

Perbandingan kelompok		p	Keterangan
Kontrol	P1	0.555	Tidak Signifikan
	P2	0.025	Signifikan
	P3	0.001	Signifikan
P1	P2	0.299	Tidak Signifikan
	P3	0.022	Signifikan
P2	P3	0.522	Tidak Signifikan

Berdasarkan uji Tukey dalam tabel tersebut ditunjukkan bahwa terdapat beberapa kelompok perlakuan yang menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan yaitu pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 2, dan perlakuan 3. Antara kelompok kontrol dengan perlakuan 1 terdapat perbedaan yang tidak signifikan.

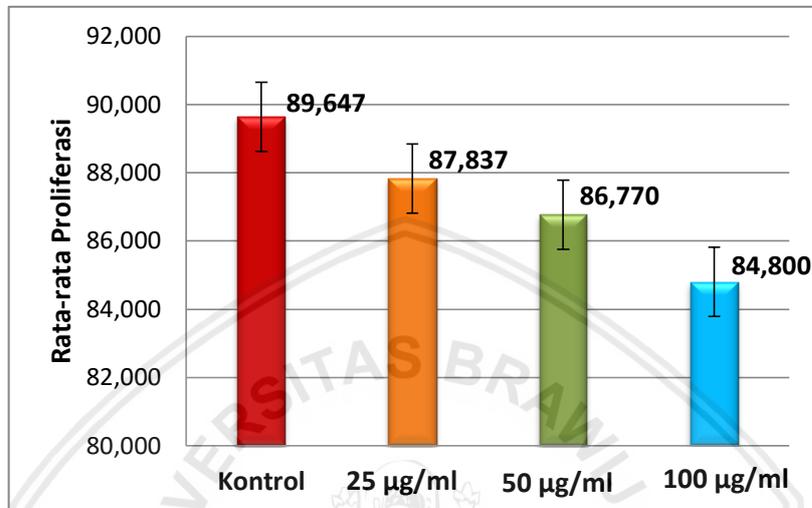


Gambar 5.2 Grafik rata-rata Apoptosis. Dari grafik tersebut dapat dilihat perbedaan apoptosis sel retinoblastoma yang terjadi pada kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan dimana penurunan apoptosis terbesar terjadi pada kelompok perlakuan 3 (dosis 100 µg/ml)

Tabel 5.6 Tabel Hasil Uji Tukey Proliferasi

Perbandingan kelompok		p	Keterangan
Kontrol	P1	0.097	Tidak Signifikan
	P2	0.004	Signifikan
	P3	0.000	Signifikan
P1	P2	0.484	Tidak Signifikan
	P3	0.003	Signifikan
P2	P3	0.064	Tidak Signifikan

Berdasarkan uji Tukey dalam tabel tersebut ditunjukkan bahwa terdapat beberapa kelompok perlakuan yang menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan yaitu pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 2, dan perlakuan 3. Antara kelompok kontrol dengan perlakuan 1 terdapat perbedaan yang tidak signifikan.



Gambar 5.3 Grafik rata-rata Proliferasi. Dari grafik tersebut dapat dilihat perbedaan proliferasi sel retinoblastoma yang terjadi pada kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan dimana penurunan proliferasi terbesar terjadi pada kelompok perlakuan 3 (dosis 100 µg/ml)

BAB 6

PEMBAHASAN

Pada retinoblastoma terdapat 3 teori yang menyebabkan gangguan dari proses apoptosis dan proliferasi ini yaitu teori kerusakan DNA, Gangguan pRB dan p53 dan teori radikal bebas. Kerusakan DNA akan menyebabkan gangguan dari siklus sel dimana gangguan tersebut dapat terjadi pada fase G1/ S, intra-S, atau G2/ M sampai dilakukan proses perbaikan DNA. Berhentinya siklus sel pada DNA yang rusak pada masing-masing *checkpoint* ini berhubungan dengan ketidakstabilan genom dan onkogenesis. Ketika perbaikan DNA berhasil, siklus sel dapat dilanjutkan. Namun jika perbaikan tidak berhasil (misalnya, dengan dosis tinggi agen perusak DNA atau cacat genetik pada mesin perbaikan DNA), maka hal ini dapat menyebabkan berhentinya siklus sel secara permanen (*senescence*), apoptosis atau onkogenesis.⁴⁷

Protein pRB dan p53 merupakan protein supresor tumor yang berperan mengendalikan proliferasi dan apoptosis sel. Pada retinoblastoma terjadi gangguan pada keduanya sehingga terjadi ketidakseimbangan pada jumlah proliferasi dan apoptosis yang terjadi. Gangguan pada pRB dan p53 juga menyebabkan gangguan dari siklus sel dimana RB menginduksi berhentinya siklus sel di G1 dan mengatur masuk ke fase S dengan menghambat E2Fs. p53 memediasi beberapa efek, termasuk menyebabkan G1 dan G2 menangkap dan mempromosikan apoptosis. Hilangnya fungsi p53 juga mendorong ketidakstabilan genomic.⁵ Penurunan dari p53 juga menyebabkan aktivasi dari BAX dimana menyebabkan aktivasi caspase-3 yang mempengaruhi apoptosis.⁷

Teori radikal bebas disebutkan juga berpengaruh dalam terjadinya gangguan apoptosis dan proliferasi pada retinoblastoma walaupun besar pengaruhnya masih dalam penelitian lebih lanjut. Telah ditemukan ekspresi gen eNOS dan iNOS pada jaringan tumor RB. Ekspresi gen eNOS ditemukan pada RB stadium awal maupun stadium invasif, sedangkan ekspresi gen iNOS lebih banyak ditemukan pada RB stadium invasif.²¹ Adanya stres oksidatif yang terjadi dapat mempengaruhi apoptosis dan proliferasi sel melalui jalur NF κ B dan I κ B α .²¹

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) terhadap apoptosis dan proliferasi sel kultur retinoblastoma. Kultur sel retinoblastoma yang digunakan pada penelitian ini merupakan sel kultur jaringan retinoblastoma yang didapat dari *American Type*

Culture Collection (ATCC) 10801 University Boulevard Manassas, VA 20110 USA. Sel kultur akan diberikan perlakuan dengan dipaparkan dengan ekstrak daun ciplukan dalam berbagai dosis yaitu 25 µg/mL, 50 µg/mL, dan 100 µg/mL selama 24 jam. Karena penelitian terhadap retinoblastoma sebelumnya belum pernah dilakukan maka besar dosis dan dasar pemilihan waktu 24 jam mengacu pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fitria *et al*, pada tahun 2011 yang meneliti tentang pengaruh ekstrak ciplukan pada sel kanker payudara.¹⁵ Beberapa penelitian lain yang meneliti tentang efek ciplukan juga dilakukan inkubasi selama 24 jam.

Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa daun ciplukan memiliki aktivitas anti kanker. Hasil yang didapatkan pada penelitian ini sejalan dengan penelitian-penelitian terdahulu yang dilakukan untuk melihat pengaruh dari ekstrak ciplukan terhadap apoptosis dan proliferasi.

6.1 Pengaruh Ekstrak Daun Ciplukan (*Physalis angulata L.*) terhadap Apoptosis Sel Kultur retinoblastoma

Apoptosis adalah mekanisme kematian sel yang terprogram yang penting dalam berbagai proses biologi. Berbeda dengan nekrosis, yang merupakan kematian sel akibat sel terluka atau rusak secara akut, apoptosis secara umum memberi keuntungan selama siklus kehidupan suatu organisme. Apoptosis memiliki peranan penting dimana proses apoptosis yang tidak sempurna dapat menyebabkan terjadinya penyakit. Terlalu banyak apoptosis menyebabkan sel mengalami kekacauan dan bila terlalu sedikit, apoptosis juga menyebabkan proliferasi sel tidak terkontrol seperti pada kanker.^{9,60}

Kami melakukan penghitungan apoptosis dengan menggunakan menggunakan Annexin V. Metode ini adalah metode penghitungan apoptosis secara kuantitatif. Penggunaan Annexin V dalam pengukuran apoptosis berdasarkan fenomena fosfatidilserine yang terjadi selama apoptosis dan kemampuan Annexin V untuk berikatan dengan fosfatidilserine dengan afinitas tinggi. Annexin tidak berikatan dengan sel normal karena molekul tersebut tidak dapat berpenetrasi ke dalam lapisan fosfolipid bilayer. Pada sel mati, lapisan dalam dapat terikat secara ekstrinsik dengan Annexin V karena integritas membran plasma yang sudah hilang. Hal ini menyebabkan Annexin V juga akan berikatan dengan sel nekrosis. Kemudian untuk membedakan antara sel mati dan sel apoptosis, Propidium Iodida (PI) ditambahkan pada suspensi sel.

Dengan metode ini, sel mati dan sel apoptosis dapat dibedakan dengan dan kemudian dianalisa dengan *Flow cytometry*.^{9,60}

Dari analisa data pada penelitian ini diperoleh sebaran data yang normal, dan uji varian homogenitas data dengan uji *Lavene* didapatkan signifikan yang mengindikasikan varian data homogen. Karena varian data normal dan homogen maka untuk mengetahui perbedaan pengaruh ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) terhadap sel kultur retinoblastoma antar kelompok perlakuan digunakan uji Tukey. Analisa data menggunakan uji Tukey terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) yaitu pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dosis 50 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,025$), dan dosis 100 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,01$) sedangkan antara kelompok kontrol dengan dosis 25 $\mu\text{g/ml}$ terdapat perbedaan yang tidak signifikan ($p = 0,555$). Dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dapat meningkatkan apoptosis yang terjadi pada sel retinoblastoma. Dari hasil analisa tersebut dapat dilihat dosis 100 $\mu\text{g/ml}$ merupakan dosis yang memberikan hasil peningkatan apoptosis yang paling besar dibandingkan dengan kelompok dosis yang lain.

Hal ini sejalan dengan penelitian Handayani (2012) dimana ekstrak etanol *P. angulata* dapat menghambat pertumbuhan sel kanker payudara dengan menurunkan ekspresi protein c-Myc, meningkatkan protein p53 liar dan ekspresi protein Apaf-1, menurunkan jumlah mitosis dan meningkatkan jumlah apoptosis.¹⁶ Penelitian yang dilakukan oleh Ooi pada tahun 2010 melaporkan bahwa pemberian ekstrak *P. angulata* dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara T-47D manusia melalui jalur c-myc-, p53-, dan caspase-3-dependent.⁵⁶ Pada penelitian terhadap sel kanker payudara yang lain dilakukan oleh Hsieh et al, dimana hasilnya sejalan dengan penelitian Ooi *et al.*, dimana ciplukan menghambat proliferasi dari sel dan meningkatkan penghambatan G2/M dan apoptosis.⁵⁷ Pada penelitian lainnya, didapatkan hasil bahwa *Physalis angulata* berperan dalam regulasi proliferasi, siklus sel dan apoptosis sel kanker payudara MDA-MB 231.¹⁵

Pada penelitian pada beberapa sel kanker yang lain seperti yang dilakukan oleh Wu *et al.*, ciplukan memiliki aktivitas antihepatoma pada sel hepatoma manusia Hep G2, Hep 3B dan PLC/PRF/5.⁵⁸ Hal tersebut dengan penelitian yang dilakukan oleh Ooi *et al.* (2011) berhasil membuktikan efek sitotoksik dan mekanisme apoptosis sel kanker paru NCI-H23 yang diinduksi *Physalis angulata L.* Mekanisme apoptosis diperantarai oleh aktivasi p53,

caspase-3 dan c-myc yang merupakan protein regulator utama baik pada jalur intrinsik maupun ekstrinsik.⁵⁹ Penelitian yang dilakukan oleh Lutfhia *et al.*, (2011) juga menemukan bahwa ciplukan dapat meninduksi apoptosis ekstrak etanol ciplukan pada sel kanker servik melalui penekanan ekspresi bcl-2.⁶¹

6.2 Pengaruh Ekstrak Daun Ciplukan (*Physalis angulata L.*) terhadap Proliferasi Sel Kultur retinoblastoma

Proliferasi sel merupakan suatu proses dimana sel memperbanyak diri dengan tumbuh dan kemudian membelah diri menjadi dua. Pada keadaan normal pergantian dan peremajaan sel akan terjadi sesuai kebutuhan melalui proliferasi sel dan apoptosis. Proliferasi dan apoptosis merupakan suatu proses yang fisiologis yang terjadi hampir pada semua jaringan tubuh manusia untuk berkembang biak. Pada tumor terjadi proses proliferasi yang berlebihan tanpa diimbangi oleh proses apoptosis.⁹

Terdapat beberapa metode dalam penghitungan proliferasi sel, dua metode yang sering dilakukan yaitu metode penghitungan langsung (*direct counting*) dengan *tryphan blue* dan metode *MTT assay*. *Direct counting* merupakan metode sederhana yang bertujuan menilai integritas membrane sel namun metode ini dinilai kurang sensitive. *MTT assay* bertujuan untuk mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel. *MTT* diabsorpsi oleh sel hidup kemudian dipecah menjadi formazan berwarna ungu. Konsentrasi formazan yang berwarna ungu dapat diukur dengan spektrofotometri dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena formazan terbentuk hanya pada mitokondria sel aktif. Semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup. Pada penelitian ini pengukuran proliferasi menggunakan *MTT assay* dikarenakan metode ini memiliki kelebihan yaitu relative lebih cepat, sensitif, dan lebih akurat bila dibandingkan dengan metode *direct counting*.⁶²

Hasil penghitungan proliferasi sel pada penelitian ini dinyatakan dengan presentasi sel hidup berdasarkan dari hasil absorbansinya. Terapat pengaruh pemberian ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) mulai dengan dosis 25 µg/mL. bila dibandingkan dengan dosis lain yaitu dosis 50 µg/mL, dan dosis 100 µg/mL, maka persentase jumlah sel hidup semakin sedikit. Dengan demikian, dapat dinyatakan bahwa pemberian ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*)

mempunyai pengaruh terhadap penurunan jumlah sel hidup dari kultur sel retinoblastoma.

Dari analisa data pada penelitian ini diperoleh sebaran data yang normal, dan uji varian homogenitas data dengan uji *Lavene* didapatkan signifikan yang mengindikasikan varian data homogen. Karena varian data normal dan homogen maka untuk mengetahui perbedaan pengaruh ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) terhadap sel kultur retinoblastoma antar kelompok perlakuan digunakan uji Tukey. Analisa data menggunakan uji Tukey terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) yaitu pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dosis 50 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,004$), dan dosis 100 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,00$) sedangkan antara kelompok kontrol dengan dosis 25 $\mu\text{g/ml}$ terdapat perbedaan yang tidak signifikan ($p = 0,097$). Dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dapat menurunkan jumlah sel hidup dari sel retinoblastoma. Dari hasil analisa tersebut dapat dilihat dosis 100 $\mu\text{g/ml}$ merupakan dosis yang memberikan hasil penurunan sel hidup yang paling besar dibandingkan dengan kelompok dosis yang lain. Penurunan jumlah sel hidup tersebut disebabkan oleh proliferasi sel yang terhambat dimana hal tersebut sesuai dengan beberapa penelitian lain yang menyatakan bahwa ekstrak daun ciplukan dapat menurunkan proliferasi sel yang terjadi namun masih juga terdapat kemungkinan penurunan jumlah sel hidup tersebut terjadi oleh karena jumlah apoptosis yang meningkat sehingga dalam pengukuran proliferasi ini masih memerlukan pengukuran lanjutan baik dengan menggunakan Ki-67 ataupun dengan menggunakan BdrU yang mana pada pemeriksaan tersebut lebih sensitif dan spesifik dalam memeriksa proliferasi sel dibandingkan dengan metode *MTT assay*.

Penelitian yang dilakukan oleh Utami (2007) mengenai hasil uji penghambatan kinetika proliferasi menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol tanaman ciplukan mampu menghambat kinetika proliferasi sel HeLa.⁶³ Penelitian Evaningrum (2007) juga menunjukkan hasil yang sama dimana dari Uji penghambatan kinetika proliferasi yang dilakukan menunjukkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanolik tanaman ciplukan mampu memperpanjang kinetika proliferasi sel HeLa.⁶⁴

Penelitian oleh Darma *et al.* (2010) melaporkan bahwa ciplukan memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker rahim melalui modulasi ekspresi dari p53 sehingga menyebabkan terhentinya proliferasi sel.¹⁴ Pada penelitian yang

dilakukan oleh Fitria *et al*, (2011) disebutkan bahwa *Physalis angulata* berperan dalam regulasi proliferasi, siklus sel dan apoptosis sel kanker payudara MDA-MB 231 dimana kesimpulan dari penelitian tersebut ciplukan memiliki efek antiproliferasi dan sitotoksik.¹⁵ Hasil yang sama didapatkan dari penelitian Monikawati *et al.*, pada sel payudara tikus betina galur sprague dawley terinduksi 7,12-dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) dan Penelitian Fauzi *et al*, Terhadap Sel Hepar Tikus Betina Galur Sprague Dawley Terinduksi 7,12-Dimetilbenz[a]antrasena dimana ekstrak ciplukan dapat menghambat proliferasi dari sel-sel tersebut.^{65,66}

Selain di Indonesia penelitian mengenai daun ciplukan juga dilakukan diluar negeri dengan hasil yang sejalan dengan penelitian-penelitian di Indonesia. Penelitian yang dilakukan oleh He *et al.* tahun 2007 melaporkan aktivitas sitotoksik dari ekstrak ciplukan pada sel kanker NCI-H460 (lung) dan HCT-116 (colon).⁵³ Pada penelitian yang dilakukan oleh Hseu *et al.* tahun 2011 melaporkan bahwa ekstrak ciplukan dapat menyebabkan inhibisi terhadap beberapa tahapan metastase, termasuk migrasi dan invasi *human oral squamous carcinoma cells* (HSC-3).¹⁷

Dari hasil penelitian ini, dugaan kami adalah ekstrak daun ciplukan lebih cenderung memiliki efek pro apoptosis dibandingkan dengan anti proliferasi sehingga ekstrak daun ciplukan lebih cocok sebagai terapi adjuvant kemoterapi yang bersifat anti-proliferasi dalam penggunaannya kedepan walaupun kami tidak memiliki data yang akurat karena masih memerlukan penelitian lebih lanjut dengan kualitas sel yang lebih baik dan dengan masa inkubasi yang lebih panjang (48 atau 72 jam) sehingga data yang didapatkan dapat lebih akurat. Selain itu untuk mendapatkan data proliferasi yang lebih baik maka disarankan juga melakukan sinkronisasi sel selama 48 jam sebelum dilakukan pengukuran proliferasi.

6.3 Mekanisme anti-kanker oleh Ciplukan (*Physalis angulata L.*)

Mekanisme anti kanker dari ekstrak ciplukan diduga disebabkan oleh kandungan dari ciplukan yaitu Physalin, dan Withanolides. Dimana kandungan-kandungan tersebut berdasarkan penelitian memiliki efek anti-inflamasi, anti-kanker, dan anti-oksidan.⁵²⁻⁵⁴ Akumulasi suatu zat physalin dapat ditemukan pada jaringan utuh dari ciplukan. Total, ada 6 jenis physalin yang bisa di temukan dari ekstrak tanaman physalis, yaitu physalin A, B, D, F, J dan N. Kandungan

physalin terbanyak dapat ditemukan di bagian bunga dan daunnya.⁵² Rengifo-Salgado et al., telah menemukan beberapa withanolides baru yaitu *physagulin A*, B, C dan D diperoleh dari ekstrak metanol daun segar dan batang *P. Angulata*.¹³

Penelitian Chiang *et al.* (1992) telah mengisolasi kandungan Physalin F dari ekstrak ciplukan dimana Physalin F menunjukkan sitotoksitas in-vitro dengan tes DEA dan MTT pada delapan jalur sel kanker, lima garis sel kanker manusia: HA22T (hepatoma), HeLa (serviks uteri), KB (nasofaring), Colo205 (kolon) dan Calu-1 (paru-paru); dan tiga jalur sel kanker hewan: H1477 (melanoma), Hep2 (laring) dan 8401 (glioma). Ditemukan bahwa tindakan anti-hepatoma adalah yang paling kuat, diikuti oleh anti-HeLa. Physalin F juga memiliki efek antitumor in-vivo terhadap leukemia limfositik P388 pada tikus sedangkan physalin D tidak aktif baik in-vitro dan in-vivo. Mereka juga menemukan bahwa baik physalin B dan physalin F menghambat pertumbuhan beberapa sel leukemia manusia: K562 (erythroleukemia), APM1840 (leukemia limfoid akut), HL-60 (akut promyelocytic leukemia), KG-1 (leukemia myeloid akut), CTV1 (leukemia monositik akut) dan sel B (acute B lymphoid leukemia).⁵⁵

Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Magalhães et al., (2006) physalin B dan physalin D yang diisolasi dari bagian dari *Physalis angulata* menunjukkan banyak sitotoksitas in-vitro terhadap beberapa jalur sel kanker (Ca Kulit, Ca colon, Ca prostat, Ca payudara dan leukaemia), menunjukkan nilai IC50 dalam kisaran 0,58–15,18 mg / mL untuk physalin B, dan 0,28-2,43 mg/mL untuk physalin D.⁶⁷ Penelitian lain yang dilakukan oleh Kuo *et al.*, juga menyebutkan Physalins B, D dan F yang diisolasi dari *P. angulata* menunjukkan sitotoksitas yang kuat terhadap berbagai jalur sel tumor, termasuk KB (Ca nasofaring), A431 (Ca epitel), HCT-8 (Ca duodenum), PC-3 (Ca prostat), dan ZR751 (Ca payudara), dengan nilai EC 50 <4 mg/mL.⁶⁸

Pada penelitian yang dilakukan Hsu *et al.*, physalin B yang diisolasi dari *P. angulata* memiliki sitotoksitas selektif untuk sel melanoma. Physalin B dapat menginduksi apoptosis sel melanoma melalui jalur NOXA, caspase-3, dan mitochondria-mediated. Oleh karena itu, physalin B dapat dikembangkan sebagai senyawa chemotherapeutic yang efektif untuk pengobatan melanoma maligna.⁶⁹

Wu *et al.* (2012) dalam penelitiannya melaporkan bahwa *Physalin F* menginduksi apoptosis sel melalui jalur mitokondria yang diperantarai oleh ROS serta menekan aktivasi NF-κB pada sel kanker renal manusia A498.⁵⁸

Penelitian yang dilakukan oleh He *et al.*, (2007) sebelas senyawa withanolide diuji untuk aktivitas antiproliferatif terhadap Ca Colorectal (HCT-116) dan sel kanker paru-paru (NCI-H460). Didapatkan senyawa 5 menunjukkan aktivitas antikanker tertinggi terhadap garis sel HCT-116, dan senyawa 9 menunjukkan sitotoksisitas tertinggi terhadap sel NCI-H460.⁵³ Penelitian oleh Lee *et al.*, (2008) menemukan Withangulatin A dan withangulatin I menunjukkan aktivitas penghambatan in-vitro terhadap Kanker colorectal (COLO 205) dan Karcinoma Gaster (AGS).⁷⁰

Evaluasi biologis dari withangulatin B – H (1–7), dan physalin minor baru, physalin W, bersama dengan 14 senyawa yang dikenal, termasuk physaprun A, withaphysanolide, dihydrowithanolide E, physanolide A, withaphysalin A, dan physalins B, D, F, G, I, J, T, U, dan V, diisolasi dari tanaman *P. angulata* terhadap sel kanker manusia menunjukkan aktivitas sitotoksik yang luas. Withangulatin B dan physalins D dan F menunjukkan aktivitas sitotoksik yang kuat terhadap berbagai jalur sel kanker manusia dengan nilai EC 50 antara 0,2-1,6 mg/mL (small cell lung cancer, Ca Payudara, Ca kulit, Ca Ovarian, Ca prostat, ileocecal, Ca nasofaring). Analisis hubungan struktur-aktivitas menunjukkan bahwa withanolides dan physalins dengan 4 β -hydroxy-2-en-1-one and 5 β ,6 β -epoxy moieties adalah agen sitotoksik potensial.⁷¹

Withanolides physangulidines A, B dan C diisolasi dari *P. angulata* menunjukkan aktivitas antiproliferatif signifikan terhadap DU145 sel kanker prostat.⁷² Physangulidine A juga menunjukkan aktivitas antiproliferatif yang signifikan terhadap berbagai lini sel kanker tambahan. Glikosida flavonol baru, myricetin 3-O-neohesperidoside yang diisolasi dari ekstrak metanol daun *Physalis angulata*, menunjukkan sitotoksisitas yang nyata in-vitro terhadap sel leukemia murine P-388, karsinoma epidermoid dari sel nasofaring KB-16, dan paru adenokarsinoma A -549 dengan nilai ED₅₀ masing-masing 0,048, 0,50 dan 0,55 mg/mL.⁷³ Pada penelitian Reyes *et al.*,(2012) menunjukkan Physangulidine A, salah satu jenis Withanolide yang diisolasi dari *Physalis angulata*, dapat mengganggu siklus sel dan meningkatkan apoptosis pada sel kanker prostat. Kandungan tersebut diduga sebagai mekanisme anti kanker dari ciplukan dengan efeknya dalam meningkatkan apoptosis dan menurunkan proliferasi.⁷⁴

Dugaan mekanisme lain dalam efek ekstrak ciplukan sebagai pro-apoptosis dan anti-proliferasi adalah kandungan dari ekstrak ciplukan yang memiliki pengaruh terhadap siklooksigenase. Pada penelitian yang dilakukan oleh Umi Kulsum (2013) , Ekstrak ciplukan ini memiliki efek yang besar pada penurunan kadar COX 1, COX 2 dan PLA2.⁷⁵ Pada penelitian oleh Sutrisna *et al.*, juga menemukan bahwa ekstrak ciplukan dapat menurunkan aktivitas COX-2 pada sel kanker payudara (MCF-7).⁷⁶ Penelitian dari Sun *et al.*, menemukan kandungan Withangulatin A yang diisolasi dari ekstrak ciplukan dapat menurunkan ekspresi COX-2 melalui jalur MAPK dan NF- κ B.⁷⁸

Temuan tersebut juga mendukung penelitian ini dimana pada penelitian Filho *et al.*, pada retinoblastoma terjadi peningkatan COX-2 dimana COX 2 ini berperan dalam angiogenesis dan proses metastase.⁷⁸ Pada penelitian Filho *et al.*, yang lain tentang efek pemberian anti COX-2 terhadap proliferasi pada sel retinoblastoma didapatkan hasil adanya penurunan yang signifikan dari proliferasi yang terjadi.⁷⁹ Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Corcoran *et al.*, didapatkan hubungan antara peningkatan ekspresi COX 2 dengan penurunan kadar p53 pada sel kanker dimana p53 memiliki pengaruh dalam apoptosis dan proliferasi yang terjadi.⁸⁰ Sehingga didapatkan kemungkinan adanya pengaruh pemberian ciplukan melalui jalur siklooksigenase yang juga berperan dalam menurunkan proliferasi pada penelitian ini.

6.4 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan penelitian ini adalah jumlah kepadatan sel yang sangat kecil ($\pm 1 \times 10^2$). Hal tersebut terjadi oleh karena pertumbuhan sel dari retinoblastoma yang lambat. Terdapat beberapa kemungkinan penyebab hal tersebut terjadi. Pertama adalah sel yang kami gunakan merupakan *passage* keempat sehingga kondisi sel tidak maksimal oleh karena telah terjadi ketidakstabilan genetik dan pergeseran fenotip yang terjadi saat proses kultur sebelumnya. Kemungkinan kedua adalah kesalahan saat proses penyimpanan ataupun perlakuan sebelumnya baik saat proses frozen dengan cryo maupun proses penyimpanan dalam liquid nitrogen. Kemungkinan yang lain adalah saat dilakukan pembiakan sebelumnya, sel dibekukan dengan jumlah sel yang tidak mencukupi atau masih sedikit sehingga saat dilakukan proses thawing pada penelitian ini. Hasil sel yang didapatkan hasilnya juga sedikit walaupun telah dilakukan proses thawing yang

lebih lama hingga 2 minggu. (waktu paruh untuk sel retinoblastoma tersebut adalah 40 jam).

Keterbatasan yang lain adalah kurangnya rentang dosis yang digunakan dalam penelitian ini sehingga memerlukan penelitian lebih lanjut dengan kelompok ulangan yang lebih besar dan kepadatan sel yang lebih banyak serta masa inkubasi yang lebih panjang (48 jam atau 72 jam) untuk mendapatkan hasil yang lebih baik dan dapat mengetahui dosis efektif dan dosis toksik dari pemberian ekstrak daun ciplukan. Disamping itu, pada penelitian ini struktur kimiawi daun ciplukan tidak dipisah secara spesifik dikarenakan kurang tersedianya sarana, waktu serta biaya yang mahal. Oleh karena itu kedepannya diperlukan pemisahan struktur kimiawi yang diteliti serta pengaruhnya terhadap apoptosis dan proliferasi pada sel normal.



BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan pada penelitian ini dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dapat meningkatkan apoptosis sel retinoblastoma.
2. Ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) dapat menurunkan jumlah sel hidup pada sel retinoblastoma. Penurunan dari sel hidup ini dapat disebabkan oleh karena penurunan proliferasi yang terjadi namun dapat juga disebabkan oleh peningkatan dari apoptosis sel retinoblastoma.
3. Didapatkan peningkatan apoptosis dan penurunan jumlah sel hidup terbesar pada dosis 100 µg/ml.

7.2 Saran

Berdasarkan pembahasan dan kesimpulan penelitian, dikemukakan saran penelitian sebagai berikut :

1. Dilakukan penelitian dengan kondisi dan kualitas sel yang lebih baik sehingga dapat menunjukkan hasil penelitian yang lebih akurat.
2. Dilakukan penelitian lanjutan mengenai efek ekstrak daun ciplukan terhadap proliferasi menggunakan Ki-67 ataupun BrdU dan juga sebelum dilakukan pengukuran proliferasi dilakukan sinkronisasi selama 48 jam untuk mendapatkan dapat proliferasi yang lebih akurat.
3. Dilakukan penelitian dengan menggunakan zat aktif yang terkandung dalam ekstrak daun ciplukan secara terpisah (dengan menggunakan titrasi berkala untuk mengisolasi kandungan zat aktif) untuk mengetahui pengaruhnya secara langsung pada kultur sel retinoblastoma.
4. Dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui dosis efektif dan dosis toksik dari penggunaan ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) pada kultur sel retinoblastoma.
5. Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata L.*) pada kultur sel yang normal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Galindo, CR, Wilson MW. *Retinoblastoma*. Ophthalmology. New York: Springer Science and Bussines Media, 2010; 1-52
2. Augsburger J, Bornfeld N, and Giblin N. *Retinoblastoma*. Ophthalmology. By Yanoff M and Duker J. Edinburgh: Mosby Elsevier 2009; 887-93
3. Villegas V, Hess D, Wildner A, Gold A, Murray T. Retinoblastoma. *Curr Opin in Ophthalmol* 2013;24(6):581588
4. Kwong-Him To. 2009. Role of the tumor suppressor *ARF* and the p53-pathway in retinoblastoma development. Master of Science, Graduate Department of Molecular Genetics University of Toronto.
5. Subramanian, M, Matthew F. Jones and Ashish Lal. Long Non-Coding RNAs Embedded in the Rb and p53 Pathways *Cancers* 2013; 5:1655-1675.
6. Dommering, C.J., Berber M Mol, Annette C Moll, Margaret Burton, Jacqueline Cloos, Josephine C Dorsman, Hanne Meijers-Heijboer, Annemarie H van der Hout. RB1 mutation spectrum in a comprehensive nationwide cohort of retinoblastoma patients. *Cancer genetics* 2014;51(6)
7. Laurie, N.A, Stacy L. Donovan, Chie-Schin Shih, Jiakun Zhang, Nicholas Mills, Christine Fuller et al. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature* 2009;444:61–66
8. Pandey AN. Retinoblastoma: An overview. *Saudi Journal of Ophthalmology* 2014;28(4):310-315
9. Indovina P, Pentimalli F, Casini N, Vocca I, Giordano A. RB1 dual role in proliferation and apoptosis: cell fate control and implications for cancer therapy. *Oncotarget*. 2015 Jul 20; 6(20): 17873–17890.
10. Bhavsar, D., Krishnakumar Subramanian, Swaminathan Sethuraman & Uma Maheswari Krishnan. Management of retinoblastoma: opportunities and challenges. *Drug Delivery* 2016; 23(7)
11. Kusumaningtyas, R. W., Noer Laily, Putri Limandha. Potential of Ciplukan (*Physalis angulate L.*) as Source of Functional Ingredient *Procedia Chemistry* 2015;14:367-372
12. Kemenkes, 2016. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 6 Tahun 2016 Tentang Formularium Obat Herbal Asli Indonesia [online].(binfar.kemkes.go.id/?wpdmact=process&did=ND AxLmhvdGxpbnms=. Diakses tanggal 18 Maret 2018)
13. Rengifo-Salgado, Elsa et al. *Physalis angulata L.* (Bolsa Mullaca): A Review of its Traditional Uses, Chemistry and Pharmacology. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 2013;12(5):431-445
14. Darma A.P. Ashari, R.A, Nugroho P.A, et al, aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanolik Herbal Ciplukan (*Physalis angulata L.*) Pada Sel Kanker Leher Rahim HeLa Melalui Modulasi Ekspresi Protein p53. *Jurnal Saintifika* 2010;2(2):1-8
15. **Fitria M et al.** 2011. Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (*Physalis angulata l.*) Berefek Sitotoksik dan Menginduksi Apoptosis pada Sel Kanker Payudara MCF-7. *Bionatura – Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik* 2011;13(2):101-107
16. Handayani, 2012, Efek Pemberian Ekstrak Etanol *Physalis Minima* Linn Terhadap Ekspresi Protein C-Myc, P53 Wild Type, Apaf-1, Mitosis Dan Apoptosis Sel Kanker Payudara Penelitian Eksperimental Pada Tikus Wistar, *Airlangga Press* [online], (repository.unair.ac.id/32132/ diakses tanggal 10 maret 2018)

17. Hseu Y, Wu C, Chang H, Kumar K, Lin M, Chen C, Cho H, Huang C, Huang C, Lee H, Hsieh W, Chung J, Wang H, Yang H. Inhibitory effects of *Physalis angulate* on tumor metastasis and angiogenesis. *J Ethnopharmacol* 2011;135:762-771
18. Leong, Ooi Kheng, Tengku Sifzizul Tengku Muhammad, and Shaida Fariza Sulaiman. Cytotoxic Activities of *Physalis minima* L. Chloroform Extract on Human Lung Adenocarcinoma NCI-H23 Cell Lines by Induction of Apoptosis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011:1-10
19. Ramasubramanian A, Shields CL. Retinoblastoma first. 2012. New Delhi. p:3-8
20. Yun, J., Yang Li, Chang-Tai Xu and Bo-Rong Pan. Epidemiology and Rb1 gene of retinoblastoma. *Int J Ophthalmol* 2011;4(1):103-109
21. Kandam M, Mitra M, Subramanian K, Biswas J. Molecular pathology of retinoblastoma. [Middle East Afr J Ophthalmol](#). 2010 Jul;17(3):217-23.
22. Khetan V, Gupta A, Gopal L. Retinoblastoma: Recent trends A mini review based on published literature. *Oman J Ophthalmol* 2011;4(3):108-115
23. Nafianti S. Retinoblastoma In Children In Haji Adam Malik Hospital Medan. *Majalah Kedokteran Nusantara*. Vol. 39 No. 3 Sept 2006
24. Orjuela MA, et al. Risk of retinoblastoma is associated with a maternal polymorphism in dihydrofolatereductase (*DHFR*) and pre-natal folic acid intake. *Cancer* 2012;118(23): 5912-5919
25. Gregory et al. *Pediatric ophthalmology and Strabismus*. *Pediatric Ophthalmology and Strabismus Section 6*. American Academy of Ophthalmology. San Francisco:2012, hal. 354
26. National Cancer Institute of Spain (NCIS), 2013. Retinoblastoma Treatment: Stage Information. U.S. Departement of Health and Human Services, National Institute of Health.
27. Murphree, A. L. Intraocular retinoblastoma: the case for a new group classification. *Ophthalmol. Clin. North Am* 2005;18:41-53
28. Dimaras, H., Kahaki Kimani, Elizabeth A O Dimba, Peggy Gronsdahl, Abby White, Helen S L Chan, Brenda L Gallie. Retinoblastoma. *Lancet* 2012;379: 436-1446
29. Deegan, William F. Retinoblastoma: A Review of Current Treatment Strategies. *Journal of Ophthalmic Prosthetics* 2012:1-6
30. Othman IS. Retinoblastoma major review with updates on Middle East management protocols. *Saudi Journal of Ophthalmology* 2012;26(2):163-175
31. Asih, D., Gatot, D., Sitorus, R.S. Computed Tomography Findings of Retinoblastoma Patient at Cipto Mangunkusumo Hospital Jakarta. *Med J Indones* 2009;18(4): 239-244.
32. Paduppai, Suliati. Characteristic of Retinoblastoma Patients at Wahidin Sudirohusodo Hospital 2005-2010. *The Indonesian Journal of Medical Science* 2010;2(1):1-7
33. Balmer A, Zografos L and Munier F. Diagnosis and current management of retinoblastoma. Ocular Oncology Service, Jules Gonin University Eye Hospital, Lausanne, Switzerland. *Oncogene* 2008;25:5341-5349
34. Aerts I et al. Retinoblastoma. *Orphanet J Rare Dis* 2009;1(31):1-11
35. Das D, Bhattacharjee K, Barthakur SS, et al. A new rosette in retinoblastoma. *Indian Journal of Ophthalmology*, 2014; 62(5): 638-641

36. MacCarthy, A. et al. Retinoblastoma in Great Britain 1963–2002. *Br. J. Ophthalmol* 2009;93:33–37
37. Canadian Retinoblastoma Society (CRS). National Retinoblastoma Strategy Canadian Guidelines for Care. *Canadian Journal of Ophthalmology*. NRC Research Press 2009;44(2):S1-88
38. Kollodge T., Hinkley S. Retinoblastoma; a scientific and clinical review. *Vision Dev & Rehab* 2015;1(1):39-45
39. Kaliki, Swathi dan Carol L Shields. Retinoblastoma: Achieving new standards with methods of chemotherapy. *Indian J Ophthalmol* 2015;63(2):103–109
40. Meel.R , Radhakrishnan. V. Bakhshi,.S. Current therapy and recent advances in the management of retinoblastoma. *Indian Journal of Medical and Pediatric Oncology* 2012;33(2):124-129
41. Shields, C. L. et al. The International Classification of Retinoblastoma predicts chemoreduction success. *Ophthalmology* 2008;113:2276–2280
42. Yanik, O, Kaan Gündüz, Kivılcım Yavuz, Nurdan Taçy, Emel Üna. Chemotherapy in Retinoblastoma: Current Approaches. *Turk J Ophthalmol* 2015;45:259-267
43. Murphree, A. L. Intraocular retinoblastoma: the case for a new group classification. *Ophthalmol. Clin. North Am.* 18, 41–53 (2005). This article describes the creation of a new classification for retinoblastoma, representing the shift from EBRT to chemotherapy as primary therapy
44. Chantada, G. et al. SIOP-PODC recommendations for graduated-intensity treatment of retinoblastoma in developing countries. *Pediatr. Blood Cancer* 2013;60:719–727
45. Jurkiewicz, Elzbieta, Olga Rutynowski, Dawta Perek. *Pediatric Cancer: Diagnosis, Therapy, and Prognosis*. London: Springer Science and Business Media Dordrecht 2012, hal.185-200
46. Idowu MA, Khalil HS, Bown JL, Zhelev N. Reverse engineering of drug induced DNA damage response signalling pathway reveals dual outcomes of ATM kinase inhibition. *BioDiscovery* 2013; 9(4):1-12.
47. Houtgraaf, Jaco H, JorieVersmissen, Wim J.van der Giessen. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovascular Revascularization Medicine* 2016; 7(3): 165-172.
48. Pentimalli, Francesca, Paola Indovina & Antonio Giordano. Retinoblastoma beyond *RB1*: recent advances in genetic biomarkers, *Expert Review of Ophthalmology* 2010; 5(6): 717-721.
49. Latifah, N., Hidayati, A.A., Yunas, S.R., Sulistyorini, Endang. S.P, . 2009. *Ciplukan (Physalis Angulata L.)* CCRC Universitas Gadjah Mada [online], <http://ccrcfarmasiugm.wordpress.com/>. Diakses tanggal 15 Maret 2018)
50. Alamendah. 2010. *Ceplukan (Physalis angulata) yang Kaya Manfaat*. <http://alamendah.wordpress.com/2010/08/10/ceplukan-physalis-angulata-yang-kaya-manfaat/>. Diakses tanggal 20 Maret 2018.
51. Chen LX, He H, Qiu F. Natural withanolides: an overview. *Nat Prod Rep*. 2011 Apr;28(4):705-40
52. Azlan, G.Jualang. *Accumulation of Physalin in Cells and Tissues of Physalis minima L.* (online), http://www.pubhort.org/members/showdocument?booknrnr=676_5. 2008. Diakses tanggal 18 Oktober 2017.

53. He QP, Ma L, Luo JY, He FY, Lou LG, Hu LH. Cytotoxic withanolides from *Physalis angulata* L. [Chem Biodiver](#). 2007 Mar;4(3):443-9.
54. de Rosso VV, Mercadante AZ. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. [J Agric Food Chem](#). 2007 Jun 27;55(13):5062-72. Epub 2007 May 26.
55. Chiang HC, Jaw S.M, & Chen P.M. 1992. Inhibitory Effect of Fisalin B and Fisalin F on Various Human Leukimia Cells in vitro. *Anticancer Res*, 12 (4): 1155-62
56. Ooi KL, Tengku Muhammad TS, Lim CH, Sulaiman SF. Apoptotic effects of *Physalis minima* L. chloroform extract in human breast carcinoma T-47D cells mediated by c-myc-, p53-, and caspase-3-dependent pathways. [Integr Cancer Ther](#). 2010 Mar;9(1):73-83.
57. Hsieh WT, Huang KY, Lin HY, Chung JG. *Physalis Angulata* induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. 2006. *Food Chem Toxicol* 44: 974–983.
58. **Wu S, L. Ng, D.Lin., S.Huang., S.Wang, & C.Lin. Extract Induces Apoptosis in Human Hep G2 Cells through CD95/ CD95L system and the Mitochondrial Signaling Transduction Pathway. 2009. *Cancer Letters*, 215(2):199-208.**
59. Ooi KL, Tengku Muhammad TS, Lim CH, Sulaiman SF. Cytotoxic Activities of *Physalis minima* L. Chloroform Extract on Human Lung Adenocarcinoma NCI-H23 Cell Lines by Induction of Apoptosis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011:1-10
60. Chantika, Tris Febriana. Pengaruh Lingkungan Sel Fibroblast Normal dan Kanker Terhadap Apoptosis Sel Punca Kanker Payudara dengan Uji Annexin V dan Sitokrom C. 2012. Skripsi FMIPA UI, Jakarta.
61. Luthfia I, Darma AP, Nugroho PA, Hermawan A, Meiyanto E., Induksi Apoptosis Ekstrak Etanol Ciplukan (*Physalis Angulata* L.) Pada Sel Kanker Leher Rahim Hela Melalui Penekanan Ekspresi Bel-2. 2011. Jurnal Bahan Alam Indonesia Vol 7, No 7
62. Junaidi, S., Isolasi dan uji sitotoksisitas senyawa alkaloid dari spon koleksi no MD-02c yang diambil dari taman laut bunaken terhadap sel HeLa dan sel Vero, 2005, Skripsi, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
63. Utami, Dewi Andon Budi *Efek Sitotoksik Dan Penghambatan Kinetika Proliferasi Ekstrak Etanolik Tanaman Ceplukan (Physalis angulata Linn.) Terhadap Sel HeLa.* 2007. Skripsi thesis, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
64. Evaningrum, Alia. *Efek Sitotoksik Dan Penghambatan Kinetika Proliferasi Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanolik Tanaman Ceplukan (Physalis angulata Linn.) Terhadap Sel HeLa.* 2007. Skripsi thesis, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
65. Monikawati A, Farida S, Putri LW, Ikhtiansyah YG, and Meiyanto E. Antiproliferative Activity of Ethanolic Extract of Ciplukan Herbs (*Physalis angulata* L.) on 7,12Dimethylbenz[a]ntracene-Induced Rat Mammary Carcinogenesis. 2011. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 2(2):227-232

66. Fauzi IA, Amalia F, Sabila N, Hermawan A, Ikawati M, Meiyanto E, Aktivitas Antiproliferasi Ekstrak Herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) Terhadap Sel Hepar Tikus Betina Galur Sprague Dawley Terinduksi 7,12-Dimetilbenz[a]antrasena. 2011. *Majalah Kesehatan PharmaMedika*, Vol,3, No,1.
67. Magalhães HI, Veras ML, Torres MR, Alves AP, Pessoa OD, Silveira ER, Costa-Lotufo LV, de Moraes MO, Pessoa C. In-vitro and in-vivo antitumour activity of physalins B and D from *Physalis angulata* . 2006. *J Pharm Pharmacol* 58(2):235–241
68. Kuo PC, Kuo TH, Damu AG, Su CR, Lee EJ, Wu TS, Shu R, Chen CM, Bastow KF, Chen TH, Lee KH Physanolide A, a novel skeleton steroid, and other cytotoxic principles from *Physalis angulata* . 2006. *Org Lett* 8(14):2953–2956
69. Hsu CC, Wu YC, Farh L, Du YC, Tseng WK, Wu CC, Chang FR Physalin B from *Physalis angulata* triggers the NOXA-related apoptosis pathway of human melanoma A375 cells. 2012. *Food Chem Toxicol* 50(3–4):619–624
70. Lee CC, Houghton P (2008) Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. *J Ethnopharmacol* 100(3):237–243
71. Damu AG, Kuo PC, Su CR, Kuo TH, Chen TH, Bastow KF, Lee KH, Wu TS. Structures, and structure–cytotoxic activity relationships of withanolides and physalins from *Physalis angulata*. 2007. *J Nat Prod* 70(7):1146–1152
72. Jin Z, Mashuta MS, Stolorowich NJ, Vaisberg AJ, Stivers NS, Bates PJ, Lewis WH, Hammond GB (2012) Physangulidines A, B, and C: three new antiproliferative withanolides from *Physalis angulata* L. *Org Lett* 14(5):1230–1233
73. Ismail N, Alam M (2005) A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata* . *Fitoterapia* 72(6):676–679
74. Reyes-Reyes EM, Jin Z, Vaisberg AJ, Hammond GB, Bates PJ. Physangulidine A, a withanolide from *Physalis angulata*, perturbs the cell cycle and induces cell death by apoptosis in prostate cancer cells. 2013. [J Nat Prod](#). Jan 25;76(1):2-7.
75. Kalsum U, Ali M, Widodo AM, Kalim H. Effect of methanolic extract of *Physalis minima* on gastric inflammation and gastric ulcers formation. 2013. *J Exp Integr Med* ; 3(4):331-335
76. Sutrisna EM, Indwianastuti , Haryadi. The Ethanol Extract of *Physalis angulata* Linn Inhibits COX-2 Activity in MCF-7 Cell In Vitro. 2012. International Conference: Research and Application on Traditional Complementary and Alternative Medicine in Health Care (TCAM) June, 22nd-23rd 2012 Surakarta Indonesia
77. Sun L, Liu J, Cui D, Li J, Yu Y, Ma L, Hu L. Anti-inflammatory function of Withangulatin A by targeted inhibiting COX-2 expression via MAPK and NF-kappaB pathways. 2010. [Cell Biochem](#). Feb 15;109(3):532-41.
78. Filho JPS, Martins MC, Correa ZM, Odashiro AN, Anteckka E, Coutinho AB, Macedo CR, Vianna RN, Burnier MN Jr. The expression of cyclooxygenase 2 in retinoblastoma: primary enucleated eyes and

- enucleation after conservative treatment. 2006. [Am J Ophthalmol](#). 2006 Oct;142(4):625-31.
79. Filho JPS, Correa ZM, Marshall JC, Anteka E, Coutinho AB, Martins MC, Burnier MN. The effect of a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor on the proliferation rate of retinoblastoma cell lines. 2006. [Eye \(Lond\)](#). 2006 May;20(5):598-601.
80. Corcoran CA, He Q, Huang Y, Sheikh MS. Cyclooxygenase-2 interacts with p53 and interferes with p53-dependent transcription and apoptosis. 2005. [Oncogene](#). 2005 Feb 24;24(9):1634-40.

