

**EFEK ANTI-PROLIFERASI COELOMIC FLUID *Lumbricus rubellus* DAN 5-FLUOROURACIL DALAM MEMODULASI PROLIFERASI SEL DAN EKSPRESI *FOCAL ADHESION KINASE* (FAK) PADA MENCIT YANG DIINDUKSI *CELL LINE* HT-29**

**TESIS**

Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Magister Ilmu Biomedik



Oleh:  
**Reny Purnama Hadi**  
NIM : 17607010011001

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
MINAT FARMAKOLOGI, TOKSIKOLOGI,  
DAN FISILOGI MOLEKULER**

**PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

TESIS

EFEK ANTI-PROLIFERASI COELOMIC FLUID *Lumbricus rubellus*  
DAN 5-FLUOROURACIL DALAM MEMODULASI PROLIFERASI SEL  
DAN EKSPRESI FOCAL ADHESION KINASE (FAK) PADA MENCIT  
YANG DIINDUKSI CELL LINE HT-29

Oleh:  
RENY PURNAMA HADI

Komisi Pembimbing,

Agustina Tri Endharti, S.Si., PhD  
Ketua

Drs. Sofy Permana, M.Sc. DSc  
Anggota

Penguji,

Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, SpMK(K)  
Penguji 1

dr. Eviana Norahmawati, SpPA(K)  
Penguji 2

Malang,

Universitas Brawijaya  
Fakultas Kedokteran  
Dekan,

Dr. Dr. Wisnu Barlianto, Msi. Med, Sp.A(K)  
NIP. 197307262005011008

## PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia agar tesis ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (Magister) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, 15 Agustus 2019  
Mahasiswa

Nama : Reny Purnama Hadi  
NIM : 176070100111001  
PS : Ilmu Biomedik  
Program : Pascasarjana  
Fakultas : Kedokteran UB

## IDENTITAS TIM PENGUJI

### JUDUL TESIS:

**EFEK ANTI-PROLIFERASI COELOMIC FLUID *Lumbricus rubellus* DAN 5-FLUOROURACIL DALAM MEMODULASI PROLIFERASI SEL DAN EKSPRESI FOCAL ADHESION KINASE (FAK) PADA MENCIT YANG DIINDUKSI CELL LINE HT-29**

Nama Mahasiswa : RENY PURNAMA HADI  
NIM : 176070100111001  
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik  
Minat : Farmakologi, Toksikologi dan Fisiologi Molekuler

### KOMISI PEMBIMBING:

Ketua : Agustina Tri Endharti, S.Si., PhD  
Anggota : Drs. Sofy Permana, M.Sc., DSc

### TIM DOSEN PENGUJI:

Dosen Penguji 1 : Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, SpMK(K)  
Dosen Penguji 2 : dr. Eviana Norahmawati, SpPA(K)

Tanggal Ujian : 24 September 2019

## PERNYATAAN KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH

Sofy Permana, **Reny Purnama Hadi**, Eviana Norahmawati, Agustina Tri Endharti. Coelomic Fluid of *Lumbricus rubellus* Enhances Anti-proliferative Effect of 5-Fluorouracil by Modulating Focal Adhesion Kinase Express and IL-1 $\beta$  of Colorectal Cancer in Mice. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Vol.9 (08). Pp 041-046.



## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT, atas semua limpahan berkah dan mukzizat-Nya penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul: Efek Anti-Proliferasi *Coelomic Fluid Lumbricus rubellus* dan *5-Fluorouracil* dalam Memodulasi Proliferasi Sel dan Ekspresi *Focal Adhesion Kinase* (FAK) Pada Mencit yang Diinduksi *Cell Line* HT-29.

Tesis ini disusun untuk memenuhi sebagian syarat dalam memperoleh gelar Magister Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Dalam kesempatan kali ini, penulis mengucapkan banyak terimakasih, khususnya kepada:

1. Orang tua, yang dengan penuh rasa ikhlas selalu memberikan semangat kepada penulis
2. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
3. Dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, Sp.M., selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
4. Ibu Agustina Tri Endharti, S.Si., PhD, selaku ketua komisi pembimbing tesis yang telah banyak meluangkan banyak waktu dan tenaga dalam membimbing dan memberikan arahan kepada penulis.
5. Bapak Dr. Sofy Permana, M.Sc. DSc selaku anggota komisi pembimbing tesis yang telah memberikan waktu dan arahan kepada penulis untuk menyelesaikan penyusunan tesis ini
6. Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, SpMK(K) dan dr. Eviana Norahmawati, SpPA(K) selaku dosen penguji tesis yang telah memberikan ilmu, masukan serta saran yang sangat bermanfaat dalam perbaikan tesis ini.
7. Seluruh staf Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Sentra Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah banyak membantu dan memberikan bimbingan selama penelitian
8. Segenap pihak terdekat penulis yang dengan setia mendampingi dan memberikan semangat kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun agar tesis ini dapat menambah wawasan dan memberikan manfaat.

Malang, September 2019

Penulis



## RINGKASAN

**Reny Purnama Hadi**, NIM. 176070100111001. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Tanggal Bulan 2018. Efek Anti-Proliferasi *Coelomic Fluid Lumbricus rubellus* dan 5-*Fluorouracil* dalam Memodulasi Proliferasi Sel dan *Ekspresi Focal Adhesion Kinase* (FAK) Pada Mencit yang Diinduksi *Cell Line* HT-29. Komisi Pembimbing Ketua: Agustina Tri Endharti, Anggota: Sofy Permana, Sumarno, Eviana Norahmawati

Kanker Kolorektal merupakan salah satu jenis kanker dengan peringkat ketiga penyebab kematian tertinggi di dunia. Angka kejadian pada laki-laki berkisar 19,1% dan wanita berkisar 15,6 % per 100.000 populasi di Indonesia. Tingginya kematian akibat Kanker Kolorektal umumnya disebabkan oleh kemampuan proliferasi sel kanker yang cukup tinggi sehingga sel kanker mampu bermetastasis dengan cepat ke organ atau jaringan yang lain. *Focal adhesion kinase* (FAK) dan Protein Ki67 merupakan marker yang bisa digunakan sebagai diagnosa proliferasi sel kanker. Peningkatan ekspresi dari FAK dan Protein Ki67 umumnya berkaitan dengan tingkat keparahan pada pasien kanker. Peningkatan dari kedua marker ini diketahui memberikan prognosis yang buruk pada pasien kanker.

Penggunaan obat kemoterapi seperti 5-*Fluorouracil* (5-FU) sudah menjadi pengobatan yang umum digunakan sebagai terapi Kanker Kolorektal. Akan tetapi, terapi ini memiliki banyak efek samping, seperti neutropenia, stomatitis, diare, dan kardiotsitas sehingga dalam penggunaannya seringkali dikombinasikan dengan obat yang lain. Sayangnya penggunaan obat-obatan modern saat ini seringkali menimbulkan resistensi terhadap penggunaannya, oleh sebab itu diperlukan alternatif baru dalam pemberian obat kemoterapi. Salah satu bahan alam yang mempunyai potensi sebagai agen anti-kanker dan dapat digunakan sebagai alternatif untuk diberikan bersama obat kemoterapi adalah *coelomic fluid* (CFL) dari cacing tanah (*Lumbricus rubellus*). Pada hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *coelomic fluid* dari *Eisenia foetida* menunjukkan adanya aktivitas anti-kanker yang ditunjukkan oleh nekrosis dan apoptosis pada sel *Hela*. CFL *Lumbricus rubellus* diketahui memiliki zat aktif berupa *lysenin* yang diduga berperan sebagai anti-kanker. *Lysenin* akan berikatan dengan spingomyelin untuk menghasilkan ceramide yang mampu menurunkan aktivitas dari integrin sehingga menghambat aktivasi dari FAK dan menurunkan proliferasi.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek anti-proliferasi dari kombinasi 5-FU dan CFL *Lumbricus rubellus* secara *in-vivo*. Dalam penelitian ini, mencit betina jenis *Balb/c* diinjeksi dengan *cell line* HT-29 *human colorectal cancer* selama 4 minggu untuk selanjutnya dilanjutkan dengan pemberian terapi kombinasi 5-FU dan CFL selama 4 minggu. Kultur sel HT-29 didapatkan dari *American Type Culture Collection* (ATCC® HTB38™). Sel HT-29 dikultur menggunakan medium *McCoy's 5A* dalam *24-well plate* dengan densitas  $2 \times 10^5$ /plate. CFL

*lumbricus rubellus* diperoleh menggunakan metode *heat and cold shock*. Mencit diberi terapi dengan beberapa konsentrasi yaitu 5-FU sebanyak 50 µg/g BB dan CFL sebanyak (50, 100 dan 200 µg/g BB) yang diberikan secara intraperitoneal (i.p). Pada minggu ke-8, mencit dieutanasi dan organ kolon diambil untuk dianalisis.

Metode penelitian adalah kuantitatif eksperimental murni dengan desain *posttest only control group*. Sampel terdiri dari kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dosis tunggal 5-FU, dosis tunggal CFL, serta dosis kombinasi 5-FU dan CFL. Analisis ekspresi proliferasi sel dan FAK dilakukan menggunakan uji *immunofluorescent* yang kemudian dianalisis menggunakan *software* Fiji. Uji statistik dianalisis menggunakan One Way Anova dan uji *Post Hoc* menggunakan uji *Tukey* dengan tingkat kepercayaan 0.05. ( $p < 0.05$ ).

Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa pemberian kombinasi terapi 5-FU dan CFL mampu menurunkan ekspresi proliferasi dan FAK pada jaringan kolon mencit yang diinduksi sel HT-29. Hasil terbaik ditunjukkan oleh kelompok yang diterapi menggunakan kombinasi 5-FU dan CFL dosis 200 µg/g BB dengan penurunan ekspresi Ki67 hingga 5,86% dan ekspresi FAK hingga 5,28%. *Lysenin* yang terdapat pada CFL bekerja secara sinergis dengan 5-FU dalam menekan proliferasi. *Lysenin* berikatan dengan reseptor FcγRIIA dan memecah spingomyelin menjadi ceramide dan mengganggu aktivitas integrin. Sedangkan 5-FU bekerja dengan merusak sintesis DNA dan RNA dari sel yang mungkin dapat mengarah pada gangguan aktivitas integrin. Gangguan aktivitas dari integrin dimungkinkan menjadi penyebab penurunan ekspresi FAK dan penurunan proliferasi. Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian kombinasi 5-FU dan CFL mampu menekan proliferasi dan ekspresi FAK pada mencit yang diinduksi sel HT-29 sehingga kedepannya mungkin dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan kanker.

## SUMMARY

**Reny Purnama Hadi**, NIM. 176070100111001. Master Program in Biomedical Sciences, Faculty of Medicine Universitas Brawijaya Malang, Desember, 2018. **The Anti-Proliferative Effect of Coelomic Fluid of *Lumbricus rubellus* and 5-Fluorouracil to Modulating Cell Proliferation and Focal Adhesion Kinase Expression in Mice Induced by HT-29 Cell Line**. Supervisor Chairman: Agustina Tri Endharti, Member: Sofy permana, Sumarno, Eviana Norahmawati.

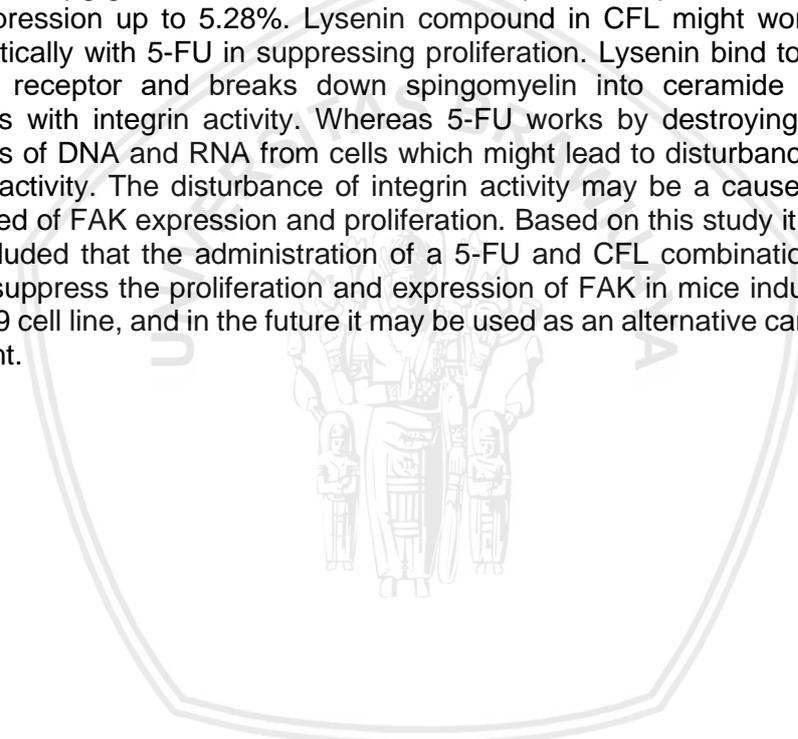
Colorectal cancer is the third deadly cancer which most occur in the world. The prevalence rate in man was 19,1% while in woman was 15,6% per 100.000 of population in Indonesia. High mortality of colorectal cancer commonly was caused by the high proliferation ability of cancer cell which lead the cancer cell to metastases rapidly into other organ or tissue. Focal adhesion kinase (FAK) and protein Ki67 are some of bio molecular substance which able to use as diagnostic marker for cancer cell proliferation. High expression of FAK and Protein Ki67 have correlation with the grade of cancer patients. The increasing in those markers have been known to give poor prognosis in cancer patients.

Chemotherapy drug such as 5-Fluorouracil (5-FU) was commonly use as chemotherapy treatment in colorectal cancer but this drug has been known to have a lot of side effect such neutropenia, stomatitis, diarrhea, and cardio toxicity. Because of their side effect, 5-FU mostly being use together with the other drug as combination. Unfortunately, the use of modern drug have a high chance of resistance in patients, therefore new alternatives are needed for administration of chemotherapy drug. One of the natural substance that has potential as an anti-cancer agent and can be used as an alternative to be given with chemotherapy drugs is a coelomic fluid (CFL) from earthworms (*Lumbricus rubellus*). The results on the previous studies showed that the coelomic fluid from *Eisenia foetida* had ability as anti-cancer activity which was shown by necrosis and apoptosis in Hela cells. CFL of *Lumbricus rubellus* is known to have lysenin as its active substance which being predict able to act as an anti-cancer. Lysenin binds to spingomyelin to produce ceramide which is able to reduce the activity of integrins and lead to inhibition of the FAK activation and decreases proliferation.

The purpose of this study was to determine anti-proliferative effects of 5-FU and CFL *Lumbricus rubellus* as combination therapy in-vivo . In this study, female Balb / c mice was injected by Ht-29 human colorectal cancer cell line for 4 weeks and continued with combination therapy of 5-FU and CFL for next 4 weeks. HT-29 cell culture was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC® HTB38™). HT-29 cells were cultured using McCoy's 5A medium in a 24-well plate with a density of  $2 \times 10^5$  / plate. CFL *lumbricus rubellus* was obtained using the heat and cold shock method. The mice were given treatment with combination of 50 µg/g BW 5-FU and variant dose of CFL (50, 100 and 200 µg/g BW) given by intraperitoneal (ip). At the 8th week, mice were euthanized and colon organs were taken for analysis.

The research method was purely experimental quantitative with a posttest only control group design. The sample consisted of a negative control group, a positive control group, a single dose of 5-FU, a single dose of CFL, and a combination dose of 5-FU and CFL. Analysis of cell proliferation and FAK expression was performed using an immunofluorescent test and analyzed used Fiji software. Statistical tests were analyzed using One Way Anova and Post Hoc tests applied used the Tukey test with a confidence level of 0.05 ( $p < 0.05$ ).

The results showed that the administration of a combination of 5-FU and CFL therapy was able to reduce the expression of proliferation and FAK in mice induced by HT-29 cell line. The best results were demonstrated by the group treated used a combination of 5-FU and CFL doses of 200  $\mu\text{g/g}$  BW with a reduction in Ki67 expression up to 5.86% and FAK expression up to 5.28%. Lysenin compound in CFL might worked synergistically with 5-FU in suppressing proliferation. Lysenin bind to the Fc $\gamma$ RIIA receptor and breaks down spingomyelin into ceramide and interferes with integrin activity. Whereas 5-FU works by destroying the synthesis of DNA and RNA from cells which might lead to disturbance of integrin activity. The disturbance of integrin activity may be a cause the decreased of FAK expression and proliferation. Based on this study it can be concluded that the administration of a 5-FU and CFL combination is able to suppress the proliferation and expression of FAK in mice induced by HT-29 cell line, and in the future it may be used as an alternative cancer treatment.



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>ii</b>
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS .....</b>	<b>iii</b>
<b>IDENTITAS TIM PENGUJI .....</b>	<b>iv</b>
<b>PERNYATAAN KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH .....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vi</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>viii</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN.....</b>	<b>xvii</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>
2.1 Kanker Kolorektal .....	6
2.2 Proliferasi Sel Kanker .....	19
2.3 Protein Ki67 .....	21
2.4 FAK .....	23
2.5 Integrin.....	29
2.6 5-FU .....	31
2.7 <i>Coelomic Fluid</i> .....	34
2.8 <i>Lumbricus rubellus</i> .....	35
2.9 <i>Lysenin</i> .....	38
2.10 <i>Cell Line</i> HT-29.....	39
2.11 Metode Induksi Kanker .....	40
2.12 Hewan Model Kanker.....	45
2.13 <i>Balb/c mice</i> .....	50
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....</b>	<b>51</b>
3.1 Kerangka Konsep.....	51
3.2 Hipotesis Penelitian .....	53
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN.....</b>	<b>54</b>
4.1 Jenis dan Desain Penelitian .....	54
4.2 Waktu dan Tempat .....	55
4.3 Variabel Penelitian .....	55
4.4 Definisi Operasional .....	55
4.5 Alat dan Bahan.....	57
4.6 Prosedur Kerja.....	58
4.7 Analisis Data.....	64
4.8 Alur Penelitian.....	65
<b>BAB 5 HASIL .....</b>	<b>66</b>
5.1 Hasil Pemeriksaan Jaringan Kolon Mencit yang	



Diinduksi Sel HT-29 .....	66
5.2 Hasil Pengamatan Ekspresi Proliferasi dan FAK .....	67
5.3 Hasil Pengamatan Ekspresi FAK.....	70
5.4 Korelasi antara ekspresi FAK dan Proliferasi Sel .....	75
<b>BAB 6 PEMBAHASAN .....</b>	<b>77</b>
6.1 Pengaruh Terapi Kombinasi 5-Fu dan <i>Coelomic Fluid</i> (CFL) pada Proliferasi Sel dan FAK.....	80
6.2 Pengaruh Terapi Kombinasi 5-FU dan Coelomic Fluid (CFL) pada Ekspresi FAK.....	84
6.3 Korelasi Ekspresi Proliferasi Sel dan Ekspresi FAK pada Mencit yang Diinduksi Sel HT-29 .....	87
6.4 Batasan Masalah dalam Penelitian .....	89
<b>BAB 7 PENUTUP.....</b>	<b>90</b>
7.1 Kesimpulan .....	90
7.2 Saran .....	90
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>91</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>102</b>



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1</b>	Profil Mortalitas Kanker di Indonesia.....	7
<b>Gambar 2.2</b>	Skema Pertumbuhan Sel Kanker.....	9
<b>Gambar 2.3</b>	Jass Classification .....	12
<b>Gambar 2.4</b>	Struktur Pembagian Kolon .....	13
<b>Gambar 2.5</b>	Histologi Kolon.....	14
<b>Gambar 2.6</b>	Subtipe Histologi Kanker Colorectal.....	15
<b>Gambar 2.7</b>	Marker Histologi Prognostik dari Kanker Colorectal .....	17
<b>Gambar 2.8</b>	Regulasi Proliferasi Sel.....	20
<b>Gambar 2.9</b>	Peningkatan Ekspresi Protein Ki67 pada Kanker Kolorektal .....	21
<b>Gambar 2.10</b>	Ekspresi FAK pada Jaringan Kolon .....	23
<b>Gambar 2.11</b>	Mekanisme Sinyal FAK.....	24
<b>Gambar 2.12</b>	Struktur FAK.....	25
<b>Gambar 2.13</b>	Peran FAK dalam Pertumbuhan Kanker.....	27
<b>Gambar 2.14</b>	Transduksi Sinyal FAK pada Sel Kanker .....	29
<b>Gambar 2.15</b>	Struktur Integrin.....	30
<b>Gambar 2.16</b>	Mekanisme Metabolisme 5-FU .....	33
<b>Gambar 2.17</b>	<i>Lumbricus rubellus</i> .....	36
<b>Gambar 3.1</b>	Kerangka Konsep Penelitian.....	51
<b>Gambar 5.1</b>	Hasil Pemeriksaan Histopatologi Jaringan Kolon Mencit yang Diinduksi SEI HT-29 .....	66
<b>Gambar 5.2</b>	Hasil FOBT pada Feses Mencit yang Diinduksi Sel HT-29.....	67
<b>Gambar 5.3</b>	Hasil Immunofluorescence Proliferasi.....	68
<b>Gambar 5.4</b>	Grafik Ekspresi Proliferasi .....	70
<b>Gambar 5.5</b>	Hasil Immunofluorescence FAK.....	72
<b>Gambar 5.6</b>	Grafik Ekspresi FAK .....	74
<b>Gambar 5.7</b>	Korelasi Nilai Proliferasi dengan Ekspresi FAK.....	75



**DAFTAR TABEL**

**Tabel 2.1** Klasifikasi Sistem TNM ..... 10  
**Tabel 2.2** Metode Pembuatan Hewan Model Kanker..... 40  
**Tabel 2.3** Hewan Coba dalam Penelitian Kanker..... 46  
**Tabel 2.4** Animal Model dalam Kanker ..... 47  
**Tabel 2.5** Mencit *Immune-Compromised*  
 yang Memproduksi Model Kanker..... 48  
**Tabel 5.1** Perhitungan Ekspresi Proliferasi ..... 69  
**Tabel 5.2** Perhitungan Ekspresi FAK..... 73



**DAFTAR LAMPIRAN**

**Lampiran 1.** Laik Etik Penelitian..... 103  
**Lampiran 2.** Timeline Penelitian..... 104  
**Lampiran 3.** Pembedahan dan Pengambilan Organ ..... 105  
**Lampiran 4.** Pembuatan Preparat HE ..... 106  
**Lampiran 5.** Metode Flourosence ..... 107  
**Lampiran 6.** Hasil Perhitungan Immunofluoscene  
 Ekspresi Proliferasi dengan Software Fiji ..... 108  
**Lampiran 7.** Hasil Perhitungan Immunofluoscene Ekspresi FAK  
 dengan Software Fiji ..... 109  
**Lampiran 8.** Hasil Statistik Proliferasi ..... 110  
**Lampiran 9.** Hasil Statistik FAK ..... 112  
**Lampiran 10.** Uji Korelasi Pearson..... 114



## DAFTAR SINGKATAN

5-FU	: 5 – fluouracil
AJC	: American Joint Committee
APC	: Antigen precenting cell
BrdU	: 5-bromo-2'-deoxyuridine
CDKs	: Cyclin-Dependent Kinases
CDX	: Cell-line derived xenograft
CFL	: Coelomic fluid
CR	: Cytokine receptor
CRC	: Colorectal cancer
CSCs	: Cancer stem cells
DHFU	: Dihydrofluorouracil
DMAB	: 3,2-dimethyl-4-aminobiphenyl
DMBA	: 9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracene
DNA	: Deoxyribonucleic acid
dNTP	: Deoxynucleotide pool
DPD	: Dihydropyrimidine Dehidrogenase
dTMP	: Deoxythymidine monophosphate
dUTP	: Deoxyuridine triphosphate
ECM	: Extracellular matrix
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
EFE	: Earthworm Fibrinolytic Enzymes
EMT	: Endothelial-mesenchymal transtition
ERK	: Extracellular signal-regulated kinase
ESC	: Embryonal Stem Cell
FAK	: Focal Adhesin Kinase
FAT	: focal adhesion target
FdUMP	: Fluorodeoxyuridine Monofosfat
FdUDP	: Fluorodeoksiuridin Difosfat
FdUTP	: Fluorodeoksiuridin Trifosfat
FERM	: Protein 4.1 (F), ezrin(E), radixin (R), dan moesin (M)
FUMP	: Fluorouridine Monophosphate
FUR	: Fluorouridine
FUTP	: Fluorouridin Trifosfat
GDP	: Guanosine diphosphate
GEMM	: Genetically engineered mouse models
GFR	: Growth factor receptor
GPCR	: G-protein coupled receptor
GTP	: Guanosine triphosphate
HMM	: Humanized mouse model
HT-29	: Homo Sapiens Colon Colorectal Adenocarsinoma
IBD	: Inflammatory bowel disease
ICAMs	: Intercellular adhesion Molecules
i.m	: Intramuscular
i.p	: Intraperitoneal
i.v	: Intravena
MDR	: Multidrug resistance
MMPs	: Matrix metalloproteinases



MMR	: Mismatch Repair
MRI	: Magnetic resonance imaging
MSI-H	: High-level microsatellite instable
MSI-L	: Low-level microsatellite instable
MSS	: Microsatellite stable
mTOR	: Mechanistic target of rapamycin
OPRT	: Orotate phosphoribosyltransferase
PAHs	: Polycyclic aromatic hydrocarbons
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PCNA	: Proliferating cell nuclear antigen
PDX	: Patient-derived xenograft
PET	: Positioning imaging tomography
p.o	: Per-oral
PP 1	: Protein Phosphatase
RhoGEF	: Rho guanine nucleotide exchange factors
RM	: Regenerative medicine
RNA	: Ribonucleic acid
s.c	: Subcutan
SFKs	: SRC family kinase
S6K	: Ribosomal protein s6 kinase
SEER	: Surveillance, Epidemiologi and End Result
SM	: Sphingomyelin
TATA	: Transabdominal transanal resections
Tcf/LEF	: T-cell factor/lymphocyte enhancer factor
TE	: Tissue engineering
TK	: Thymidine kinase
TNM	: Staging in tumor
TS	: Thymidylate synthase
UCK2	: Uridine kinase
UICC	: Union Internationale Contre Le Cancer
u-PAR	: Urokinase receptor
UMPS	: Uridine monophosphate synthase
VCAMs	: Vascular Cell Adhesion Molecules
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
Wnt	: Wingless-related integration site



## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan salah satu penyakit yang hingga saat ini menjadi penyebab kematian terbesar di dunia. Salah satu jenis kanker yang banyak ditemukan di masyarakat saat ini adalah Kanker Kolorektal. Kanker Kolorektal merupakan salah satu jenis kanker yang paling banyak ditemukan dan menyebabkan kematian ke-tiga terbesar di dunia. Meskipun angka masa hidup pasien Kanker Kolorektal mengalami peningkatan, akan tetapi angka kematian dari kasus ini masih cukup tinggi. Angka kematian ini berdasarkan besarnya penyebaran atau *metastasis* yang terjadi pada kasus Kanker Kolorektal. Kejadian *metastasis* pada kasus Kanker Kolorektal, ditemukan hampir pada 20-25% pasien yang didiagnosis menderita penyakit tersebut, serta mengalami peningkatan hingga 50% pada pasien selama menderita penyakit tersebut (Oh *et al*, 2016). Data yang diperoleh dari *National Cancer Institute* dan *Surveillance, Epidemiology and End Result* (SEER) yang diambil pada tahun 2011 telah menunjukkan angka kejadian Kanker Kolorektal di Amerika adalah sebesar 43.3% dengan tingkat kematian sebesar 15,9% dari 100.000 orang setiap tahunnya (Mittal *et al*, 2015). Di Negara Eropa, dari keseluruhan jenis kanker yang ditemukan setiap tahunnya, 13,2% dari 2,9 juta kasus kejadian kanker yang ada merupakan Kanker Kolorektal. Di Indonesia, kasus Kanker Kolorektal juga diketahui menyebabkan kematian lebih dari 85% pertahunnya (Sudoyo, dkk., 2010). Data yang ditunjukkan oleh Komisi Penanggulangan Kanker Nasional (KPKN) pada tahun 2017 menunjukkan bahwa sejak 2012, angka kejadian Kanker Kolorektal di Indonesia adalah 12,8% kasus dari 100.000 orang dewasa dengan tingkat kematian mencapai 9,5% dari keseluruhan kasus kanker yang ada di Indonesia. Meskipun angka hidup dari kasus Kanker Kolorektal mengalami peningkatan, akan tetapi angka kejadian dari kasus ini terus mengalami peningkatan setiap tahunnya (Anonim, 2017).

Sel kanker merupakan suatu abnormalitas yang dikarakteristikan dengan adanya perubahan fisiologi dari sel yang menyebabkan peningkatan diferensiasi dan proliferasi kearah keganasan. Proliferasi dalam sel kanker memainkan peranan penting dalam pertumbuhan kanker, tidak hanya perkembangan dari sel kanker itu sendiri melainkan juga perkembangan lingkungan di sekitar sel kanker. Pertumbuhan dan penyebaran sel kanker seringkali dipicu oleh proses

*angiogenesis* yang merupakan suatu proses pertumbuhan dari jaringan pembuluh darah yang menempel pada jaringan kanker sebagai sumber nutrisi dan oksigen. Proliferasi juga berperan dalam pembelahan dan differensiasi sel kanker untuk berkembang semakin banyak dan menyerang organ atau jaringan disekitarnya. Dengan demikian, pertumbuhan dan keganasan dari sel kanker lebih banyak dipengaruhi oleh kemampuan dari sel kanker tersebut untuk berproliferasi (Demetrius *et al.*, 2010). Selama perkembangan dan pertumbuhan sel kanker, adanya ketidakseimbangan antara kematian sel dan proliferasi sel menjadi salah satu penyebab pertumbuhan sel kanker. Protein Ki67 (pKi67) diketahui merupakan salah satu marker yang menandai terjadinya proliferasi sel. Protein Ki67 merupakan suatu *nuclear antigen* yang terekspresikan pada semua fase siklus sel, mulai dari fase G1 hingga fase M pada sel yang mengalami pertumbuhan. Protein Ki67 seringkali digunakan sebagai biomarker untuk penanda prognostik dari tumor (Melling *et al.*, 2015). Peningkatan ekspresi Protein Ki67 berkaitan erat dengan proliferasi dan pertumbuhan sel kanker. Protein Ki67 banyak digunakan sebagai indikator prognostik dan prediksi pasien dengan kanker. Semakin tinggi ekspresi Protein Ki67 dihubungkan dengan semakin buruknya *prognosis* dari kanker tersebut (Li *et al.*, 2015).

Pertumbuhan dan proliferasi sel kanker tidak lepas dari pengaruh lingkungan disekitar sel kanker. Dalam upayanya untuk tetap hidup, sel kanker akan terus tumbuh dan menyebar ke jaringan ataupun organ yang lain. Hal ini tidak lepas dari keterlibatan *microenvironment* di sekitar sel kanker yang menghasilkan faktor-faktor biokimia untuk mendukung perkembangan sel kanker. *Microenvironment* di sekitar sel kanker ini bekerja dengan cara mengaktivasi molekul-molekul seperti protein *adaptor*, *nonreceptor tyrosine kinase*, *small GTPase*, dan protein-protein sitoskeleton. Salah satu molekul yang memiliki peranan penting dalam perkembangan sel kanker adalah *Focal Adhesion Kinase* (FAK) (Ling *et al.*, 2015). Sebagai usaha untuk berproliferasi dan *metastasis*, sel kanker harus memiliki kemampuan untuk melekat atau adesi ke jaringan dan organ yang lain. *Focal Adhesion Kinase* (FAK) merupakan salah satu molekul yang terlibat dalam kemampuan sel kanker untuk melakukan adesi. *Focal Adhesion Kinase* (FAK) merupakan salah satu *cytoplasmic nonreceptor tyrosine kinase* yang diaktivasi oleh reseptor faktor pertumbuhan atau integrin yang terdapat pada berbagai sel kanker (Ling *et al.*, 2015). *Focal Adhesion Kinase* (FAK) merupakan

regulator multifungsional dari proses penghantaran sinyal sel yang terdapat lingkungan *microenvironment* dari kanker. Selama perkembangan kanker, FAK memainkan peran dalam motilitas, invasi, pertahanan hidup, dan proliferasi sel kanker. Tingginya nilai FAK diketahui dikaitkan dengan buruknya *prognosis* dari penyakit kanker tersebut (Sulzmaier *et al.*, 2014).

Pengobatan kanker saat ini merupakan salah satu faktor penentu dari tingkat kesembuhan penyakit kanker. Berbagai agen kemoterapi telah banyak dikembangkan atau dikombinasikan untuk meningkatkan efek terapi terhadap kanker. Salah satu obat kemoterapi yang banyak digunakan dalam terapi kanker adalah 5-FU (*5-Fluorouracil*). 5-FU merupakan suatu obat kemoterapi yang serupa dengan *fluoropyrimidine* dan bekerja dengan menghambat aktivitas *thymidylate synthase* (TS) dan sintesis serta perbaikan DNA melalui metabolisme terhadap DNA serta RNA dari sel kanker. Terapi kanker dengan menggunakan 5-FU diketahui mampu meningkatkan angka kehidupan pada beberapa kasus kanker. Meskipun demikian, penggunaan serta efisiensi dari 5-FU terbatas kepada dosis toksik terhadap pasien serta *multidrug resistance* (MDR) pada kanker. Sel kanker yang terpapar 5-FU dalam waktu yang lama dapat menyebabkan disregulasi ekspresi p53, Bax, dan Bcl-2 yang dapat mengarah pada MDR. 5-FU juga diketahui dapat menimbulkan beberapa efek samping seperti mual, muntah, penurunan nafsu makan, *alopecia*, dan pada kasus yang parah dapat menyebabkan gangguan fungsi saraf (Wei *et al.*, 2016; Thomas *et al.*, 2016). Oleh sebab itu, banyak penggunaan 5-FU yang saat ini dikombinasikan dengan obat lain untuk mengurangi efek samping dari 5-FU atau bekerja secara sinergis untuk meningkatkan kerja dari 5-FU.

Dalam perkembangan pengobatan kanker, seringkali penggunaan obat-obat kemoterapi yang ada dikombinasikan dengan obat herbal atau obat-obatan yang berasal dari bahan alam. Berbagai macam obat yang berasal dari alam, baik yang berasal dari tanaman maupun hewan dikembangkan sedemikian rupa hingga memiliki potensi dalam pengobatan kanker. Salah satu bahan alam yang saat ini mulai lebih dikembangkan efek potensialnya sebagai terapi kanker adalah cacing tanah. *Lumbricus rubellus* merupakan jenis cacing tanah yang diketahui memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat tradisional pada berbagai penyakit. Di Negara Cina, Jepang, dan negara-negara timur lainnya, *Lumbricus rubellus* telah

diketahui memiliki potensi sebagai anti-inflamasi, anti-oksidan, anti-tumor, anti-bakteri dan memiliki aktivitas fibrinolitik (Parwanto, *et al.*, 2016).

Sebagai anti-kanker, cacing tanah diketahui memiliki potensi dalam menghambat proliferasi sel kanker dan menginduksi terjadinya apoptosis pada sel kanker melalui *coelomic fluid* (CFL) yang terdapat dalam tubuh cacing tanah. Penelitian yang pernah dilakukan menunjukkan efektivitas dari *lysenin* yang terdapat pada cacing tanah *Eisenia fetida* dalam meningkatkan apoptosis sel kanker serta menghambat pertumbuhan sel kanker (Vidya *et al.*, 2016). *Lumbricus rubellus* juga diketahui memiliki komponen yang serupa dengan *Eisenia fetida* meskipun hingga saat ini penelitian untuk lebih memperdalam efektivitas *L. rubellus* sebagai terapi kanker masih sangat terbatas dan belum banyak dilakukan. Pada penelitian terdahulu mengenai efek anti-kanker dari *L. rubellus* telah membuktikan efektivitas dari CFL dalam menekan proliferasi sel kanker secara *in-vitro*. Akan tetapi, studi secara *in-vivo* belum banyak dilakukan sehingga mekanisme CFL sebagai anti-kanker pada hewan coba belum banyak dipelajari. Hal inilah yang mendasari peneliti untuk mengetahui potensi kombinasi 5FU dengan *Lumbricus rubellus* sebagai anti-kanker, khususnya dalam mekanisme keduanya terhadap proliferasi sel dan ekspresi FAK.

## 1.2 Rumusan Masalah

### 1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Apakah kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid Lumbricus rubellus* sebagai anti-kanker mampu berperan sebagai anti-proliferasi dan mempengaruhi ekspresi FAK pada mencit yang diinduksi Sel HT-29?

### 1.2.2 Rumusan Masalah Khusus

1. Apakah pemberian terapi kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid Lumbricus rubellus* dapat menurunkan ekspresi proliferasi sel pada mencit yang diinduksi Sel HT-29?
2. Apakah pemberian terapi kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid Lumbricus rubellus* dapat menurunkan ekspresi FAK pada mencit yang diinduksi Sel HT-29?
3. Apakah ada korelasi antara ekspresi FAK dan proliferasi sel pada jaringan kolon mencit yang diinduksi Sel HT-29?

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Untuk membuktikan bahwa efek terapi kombinasi 5FU dan *coelomic fluid Lumbricus rubellus* sebagai anti-proliferasi dan mempengaruhi ekspresi FAK pada mencit yang diinduksi Sel HT-29.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

- 1 Untuk membuktikan bahwa terapi kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid Lumbricus rubellus* mampu menurunkan ekspresi proliferasi sel pada mencit yang diinduksi Sel HT-29.
- 2 Untuk membuktikan bahwa terapi kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid Lumbricus rubellus* mampu menurunkan ekspresi FAK. pada mencit yang diinduksi Sel HT-29.
- 3 Untuk membuktikan adanya korelasi antara ekspresi FAK dan proliferasi sel pada jaringan kolon mencit mencit yang diinduksi Sel HT-29.

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Manfaat Teoritis

Melalui penelitian diharapkan peneliti mampu mengobservasi kemampuan kombinasi 5FU dari *Lumbricus rubellus* sebagai terapi pada mencit yang diinduksi Sel HT-29 melalui pengaruhnya terhadap proliferasi dan ekspresi FAK. Melalui penelitian ini juga diharapkan peneliti mampu mengetahui mekanisme potensi *Lumbricus rubellus* sebagai pengobatan kanker, khususnya Kanker Kolorektal sehingga dapat dikembangkan sebagai suatu alternatif pengobatan kanker dari bahan alam yang dapat dikombinasikan dengan obat standar kanker.

#### 1.4.2 Manfaat Praktis

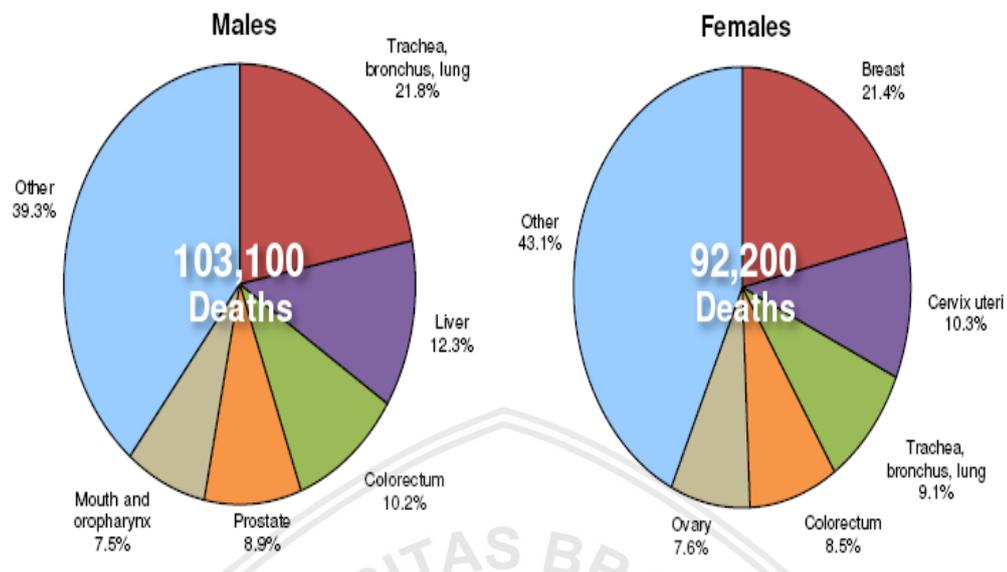
- 1 Untuk mengembangkan budidaya cacing tanah sebagai penggunaannya dalam terapi khususnya kanker.
- 2 Memberikan pemahaman kepada masyarakat akan manfaat bahan alam, seperti cacing alam dalam dunia kesehatan, khususnya sebagai alternatif pengganti obat moderen saat ini.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Kanker Kolorektal

Kanker Kolorektal merupakan salah satu jenis kanker yang saat ini menjadi permasalahan dalam dunia kesehatan. Kanker Kolorektal merupakan salah satu penyakit kanker penyebab kematian ketiga terbesar di dunia yang hingga saat ini hampir 1,2 juta kasus baru muncul setiap tahunnya dengan angka kematian dapat mencapai 600.000 kematian per-tahunnya. *Prognosis* dari kasus Kanker Kolorektal ini juga cukup buruk, dimana *prognosis* masa hidup 5 tahun setelah diagnosis dapat kurang dari 20% (Roper and Hung, 2013). Kanker Kolorektal merupakan penyakit *heterogenous* yang muncul melalui adanya efek dari berbagai mutasi genetik dan juga perubahan epigenetik yang melibatkan gen-gen yang berpengaruh dalam proses regulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel. Kanker Kolorektal muncul dengan *neoplasma broad spectrum* yang dapat tumbuh dari pertumbuhan sel yang jinak menjadi ganas. Pertumbuhan kanker ini diawali dari lapisan dalam kolon dan rektum sebagai suatu benjolan yang disebut polip, hingga kemudian semakin berkembang ke lapisan-lapisan lainnya dari kolon dan rektum (Mundade *et al.*, 2014). Pada tahun 2014, dari 8.8 juta kematian yang terjadi di seluruh dunia, penyebab utamanya adalah kanker. Data dari *World Health Organization* (WHO) tahun 2014 menunjukkan persentasi kasus Kanker Kolorektal di Indonesia telah mencapai 10,2% pada pria dan 8,9% pada wanita dari keseluruhan angka kejadian kasus kanker yang ada (**Gambar 2.1**) (Anonim, 2017).



**Gambar 2.1. Profil Mortalitas Kanker di Indonesia.** Data tahun 2014 menunjukkan persentasi Kanker Kolorektal di Indonesia mencapai 10,2% pada pria dan 8,9% pada wanita (Anonim, 2017).

### 2.1.1 Epidemiologi

Kanker Kolorektal merupakan jenis kanker *adenomatous* atau adenoma yang pada awalnya merupakan jenis tumor jinak yang dapat berubah menjadi ganas atau menjadi kanker. Perubahan yang terjadi ini umumnya merupakan hasil dari mutasi atau delesi dari gen-gen regulator yang menyebabkan terjadinya hiperplasia dari adenoma ke karsinoma kemudian mengalami *metastasis* (Mundade *et al.*, 2014). *Adenocarcinoma* sendiri merupakan jenis kanker yang paling banyak menyebabkan kematian. Kanker Kolorektal dapat terjadi baik pada wanita maupun pria dan pada umumnya mulai terjadi pada kisaran umur 60-65 tahun (Sack and Rothman, 2000). Kanker Kolorektal merupakan penyakit *heterogenous*, dimana baik faktor lingkungan maupun faktor genetik dapat menjadi resiko terjadinya penyakit ini. Dari beberapa faktor yang ada, pola makan dan gaya hidup merupakan faktor lingkungan yang memberikan kontribusi yang cukup besar dalam berkembangnya Kanker Kolorektal. Makanan yang mengandung lemak jenuh, tidak dimasak dengan sempurna, konsumsi alkohol yang berlebihan, serta kurangnya olahraga diketahui sebagai beberapa resiko terjadinya Kanker Kolorektal. Selain itu, adanya riwayat penyakit seperti *inflammatory bowel disease* (IBD), *Crohn's* atau *ulcerative colitis*, merokok, diet tinggi lemak dan kurang serat,

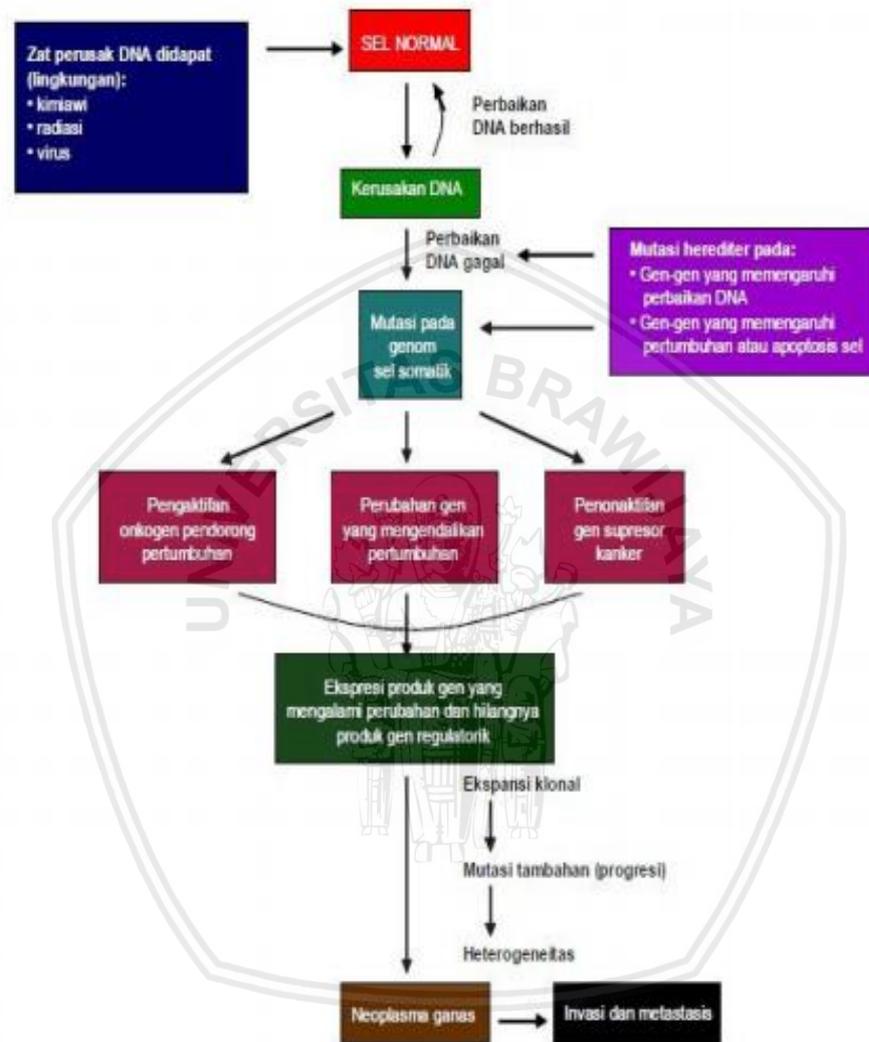
obesitas, serta terapi aspirin yang berkepanjangan mampu meningkatkan resiko terjadinya Kanker Kolorektal (Roper and Hung, 2013; Collusi *et al.*, 2013)

### 2.1.2 Patogenesis

Patogenesis dari Kanker Kolorektal sebenarnya merupakan suatu mekanisme yang cukup kompleks dan luas serta melibatkan berbagai macam faktor baik faktor lingkungan maupun faktor genetik. Secara umum, kanker timbul akibat adanya abnormalitas genomik akibat adanya kerusakan gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel. Gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel disebut proto-onkogen dan *tumor suppressor genes*, dan terdapat pada semua kromosom dengan jumlah yang banyak. Proto-onkogen yang telah mengalami perubahan hingga dapat menimbulkan kanker disebut onkogen. Suatu pertumbuhan normal diatur oleh kelompok gen, yaitu *growth promoting protooncogenes*, *growth inhibiting cancer supresor genes (anti-oncogenes)* dan gen yang berperan pada kematian sel terprogram (apoptosis). Selain ketiga kelompok gen tersebut, terdapat juga kelompok gen yang berperan pada perbaikan DNA yang berpengaruh pada proliferasi sel. Ketidakmampuan dalam memperbaiki DNA yang rusak menyebabkan terjadinya mutasi pada genom dan menyebabkan terjadinya keganasan. Proses karsinogenesis atau pembentukan kanker ini sendiri merupakan suatu proses multi-tahapan yang terjadi baik secara fisik maupun genetik. Pada tingkat molekuler, pertumbuhan sel kanker merupakan hasil dari suatu kumpulan lesi genetik (Sudoyo *et al.*, 2010).

Patogenesis dari Kanker Kolorektal bervariasi bergantung dengan perubahan genetik atau epigenetik yang terjadi. Berdasarkan beberapa teori yang ada, perubahan genetik dan epigenetik bertanggung jawab terhadap respon spesifik pada *sequence* DNA yang mengarahkan pada munculnya Kanker Kolorektal. Perubahan ini diketahui menyebabkan terjadi inisiasi pembentukan neoplasma pada sel epitel kolon yang sehat serta menyebabkan munculnya pertumbuhan sel dari tahap jinak ke ganas. Keberagaman jalur tersebut dikarakteristikan oleh adanya ketidakstabilan genetik, manifestasi klinik dari *subsequent* DNA, serta tingkah laku patologis. Kebanyakan kasus Kanker Kolorektal melibatkan jalur ketidakstabilan kromosom (*CIN pathway*), yang ditunjukkan dengan hilangnya *heterozigosis* dan abnormalitas kromosom. Jalur lain yang mengarahkan pada terjadi Kanker Kolorektal adalah *derangement* dari sistem DNA, *Mismatch Repair* (MMR) dan *microsatellite instability* (MSI). Sistem ini diketahui terlibat dalam

produksi protein yang mengenali dan secara langsung akan memperbaiki nukleotida yang mengalami *mismatches* pada *sequence microsatellite* yang terlepas dari sistem *proofreading DNA polymerase* (Collusi *et al.*, 2013).



**Gambar 2.2 Skema Pertumbuhan Sel Kanker.** Agen karsinogenik yang memapar sel normal dapat menyebabkan adanya kerusakan DNA yang apabila tidak diperbaiki maka dapat menyebabkan mutasi secara genomik dari sel somatik. Mutasi yang terjadi mampu merubah sifat fisiologi dari sel dimana terjadi peningkatan onkogen, perubahan pada faktor pertumbuhan dan inaktivasi gen supresor yang mengakibatkan adanya perubahan ekspresi produk dari gen-gen tersebut sehingga memicu timbulnya neoplasma (Anonim, 2017).

Kanker Kolorektal merupakan sebuah penyakit yang berawal dari lapisan dinding kolon dan rektum yang terdiri dari sel-sel epitelial. Munculnya tumor sendiri diakibatkan karena adanya mutasi pada jalur sinyal Wnt dan juga peningkatan aktivitas seluler. Gen yang paling umum mengalami mutasi pada Kanker Kolorektal adalah *Antigen Presenting Cell Gene* (gen APC) yang memproduksi Protein APC. Protein APC memiliki fungsi dalam mencegah akumulasi Protein  $\beta$ -catenin, sehingga tanpa adanya Protein APC, Protein  $\beta$ -catenin akan mengalami peningkatan dan bertranslokasi ke dalam nukleus. Protein ini selanjutnya akan mengikat DNA dan mengaktifasi transkripsi dari proto-onkogen. Gen ini sendiri sebenarnya merupakan gen yang berperan penting dalam pembaruan stem sel dan diferensiasi sel, akan tetapi, apabila gen tersebut terekspresi dalam jumlah yang tinggi maka akan menyebabkan terjadinya pertumbuhan sel-sel kanker (Mustafa *et al.*, 2016).

### 2.1.3 Klasifikasi *Tumor stage*

*Tumor stage* umumnya banyak digunakan untuk menentukan prognosa dan merupakan salah satu dasar dari penentuan langkah terapi yang akan diberikan. Kanker Kolorektal pertama kali diklasifikasikan berdasarkan anatomi infiltrasi sel tumor melalui dinding kolon serta ada atau tidaknya keterlibatan limfa nodul. Klasifikasi ini dikenal dengan *Duke staging classification*. Seiring berjalannya perkembangan *diagnosis* dari kanker, klasifikasi Kanker Kolorektal mengalami berbagai modifikasi dan mencakup berbagai aspek. Dua diantaranya yang paling banyak digunakan adalah sistem TNM yang ditetapkan oleh *American Joint Committee (AJC)* dan *Union Internationale Contre Le Cancer (UICC)*, serta *Jass Classification* yang ditetapkan oleh Jass dan Morson.

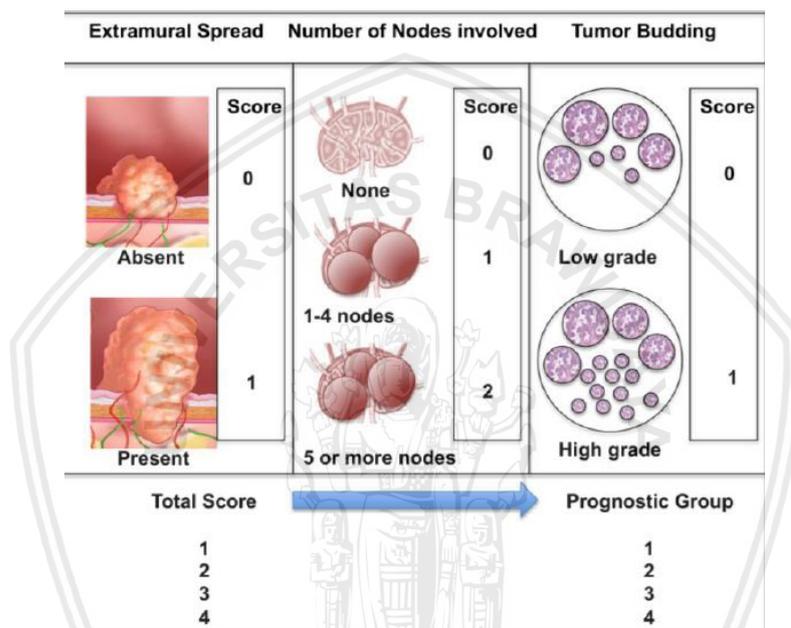
**Tabel 2.1** Klasifikasi Sistem TNM (Anonym, 2018)

Klasifikasi	Keterangan
<b>Tumor primer (pT)</b>	<p><b>Tx</b> tumor primer tidak dapat dianalisa</p> <p><b>T0</b> tidak ada bukti adanya tumor primer</p> <p><b>Tis</b> <i>Carcinoma in situ, intramucosal carcinoma</i> (tumor ada pada lamina propria tanpa menembus <i>muscularis mucosa</i>)</p> <p><b>T1</b> tumor menginvasi <i>submucosa</i></p> <p><b>T2</b> tumor menginvasi <i>muscularis mucosa</i></p> <p><b>T3</b> tumor menembus <i>muscularis propia</i> ke dalam jaringan <i>pericolorectal</i></p> <p><b>T4a</b> perforasi hingga permukaan <i>peritoneum visceral</i></p> <p><b>T4b</b> invasi ke organ atau jaringan lain</p>

<b>Limfa regional (pN)</b>	<b>nodul</b>	<p><b>Nx:</b> regional limfa nodul tidak ditemukan</p> <p><b>N0:</b> tidak ada <i>metastasis</i> pada regional limfa nodul</p> <p><b>N1 :</b> 1-3 nodul positif</p> <p><b>N1a :</b> 1 nodul</p> <p><b>N1b :</b> 2-3 nodul</p> <p><b>N1c :</b> tumor pada <i>subserosa</i>, tanpa nodul regional</p> <p><b>N2 :</b> 4-lebih nodul positif</p> <p><b>N2a :</b> 4-6 nodul</p> <p><b>N2b :</b> 7-lebih nodul</p>
<b>Metastasis (pM)</b>		<p><b>M0:</b> tidak ada bukti <i>metastasis</i> yang ditemukan</p> <p><b>M1a:</b> metastasis pada 1 organ, tanpa <i>metastasis</i> pada <i>peritoneal</i></p> <p><b>M1b:</b> metastasis pada 2- lebih organ, tanpa <i>metastasis</i> pada <i>peritoneal</i></p> <p><b>M1c:</b> disertai <i>metastasis</i> pada permukaan peritoneal</p>
<b>Tingkat dan kelengkapan mesorectum pada total potongan mesorectal</b>	<b>kualitas</b>	<p><b>Complete:</b> <i>mesorectum</i> menempel dan halus, kerusakan yang terjadi tidak lebih dari 5 mm, tidak disertai <i>coning</i>, potongan halus dan regular</p> <p><b>Near complete:</b> <i>mesorectum bulky</i> dan <i>irregular</i>, tampak kerusakan pada <i>muscularis propria</i>, <i>moderate coning</i>, potongan <i>irregular</i></p> <p><b>Incomplete:</b> <i>mesorectum</i> hanya memiliki sedikit <i>bulk</i>, <i>muscularis propria</i> sangat rusak, <i>moderate coning</i>, potongan <i>irregular</i></p>
<b>Regresi setelah nonadjuvant</b>	<b>tumor terapi</b>	<p><b>0 (complete response):</b> tidak ada sel kanker yang tampak</p> <p><b>1 (near complete response):</b> tampak sel tunggal atau kelompok sel kecil</p> <p><b>2 (partial response):</b> tampak regresi sel tumor yang masih disertai sisa residu sel berupa sel tunggal atau kelompok kecil</p> <p><b>3 (poor or no response):</b> tidak tampak adanya regresi sel tumor</p>
<b>Stage Grouping</b>		<p><b>Stage 0:</b> Tis, N0, M0</p> <p><b>Stage I:</b> T1-T2, N0, M0</p> <p><b>Stage IIA:</b> T3, N0, M0</p> <p><b>Stage IIB:</b> T4a, N0, M0</p> <p><b>Stage IIC:</b> T4b, N0, M0</p> <p><b>Stage IIIA:</b> T1-T2, N1/N1c, M0 atau T1, N2a, M0</p> <p><b>Stage IIIB:</b> T3-T4a, N1/N1c, M0 atau T2-T3, N2a, M0, atau T1-T2, N2b, M0</p> <p><b>Stage IIIC:</b> T4a, N2a, M0 atau T3-T4a, N2b, M0 atau T4b, N1-N2, M0</p> <p><b>Stage IVA:</b> seluruh T, seluruh N, M1a</p> <p><b>Stage IVB:</b> seluruh T, seluruh N, M1b</p> <p><b>Stage IVC:</b> seluruh T, seluruh N, M1c</p>

Sistem TNM merekam seluruh data klinis dan patologis, serta kemungkinan terapi dan *prognosis* menjadi satu (**Tabel 2.1**), sedangkan *Jass*

*Classification* lebih mengarah pada keterlibatan permukaan invasif dari tumor dalam menentukan *prognosis* kanker (**Gambar 2.3**) (Marzouk and Schofield, 2011). Klasifikasi berdasarkan sistem TNM seperti pada **Tabel 2.1** di atas mengarahkan pembagian *stage* kanker sesuai dengan pertumbuhan sel kanker di dalam lapisan dinding kolon, dan penyebarannya ke jaringan disekitar serta jumlah limfa nodul yang terlibat. Hal ini yang selanjutnya digunakan dalam penentuan *prognosis* dan tingkat keparahan kanker (Anonym, 2018).



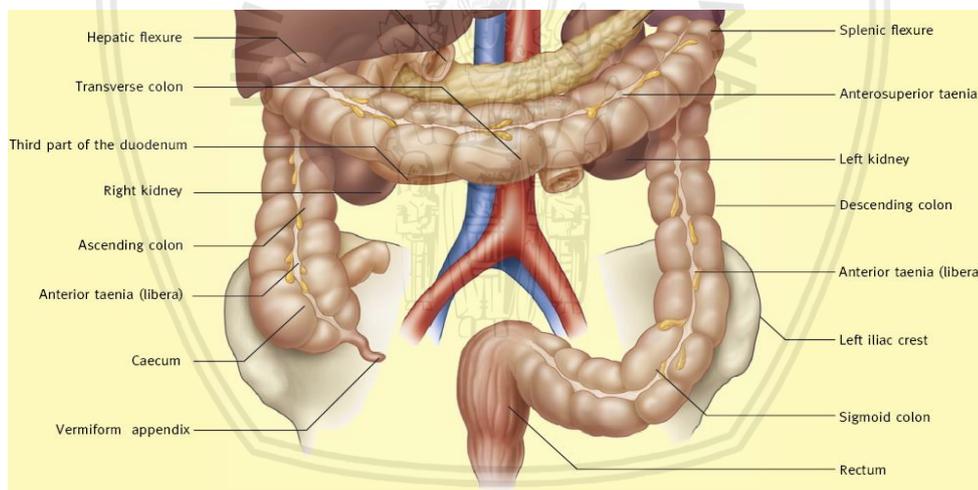
**Gambar 2.3 Jass Classification.** Dalam klasifikasi ini, *grading* Kanker Kolorektal dibagi berdasarkan 3 aspek, yaitu: penyebaran *extramural*, nodul positif, dan *tumor budding* yang selanjutnya akan dinilai dan dikelompokkan sesuai kelompok prognostiknya (Marzouk and Schofield, 2011).

Hampir serupa dengan sistem TNM, *Jass Classification* juga menggunakan penyebaran sel tumor dan keterlibatan limfa nodul untuk menentukan tingkat keparahan dan *prognosis* dari sel kanker. Selain itu, sistem ini juga melihat *tumor budding* atau besar dari kelompok sel tumor yang berkoloni (**Gambar 2.3**). Akan tetapi, tidak seperti sistem TNM, sistem ini tidak mengelompokkan *T stage* menjadi beberapa kelompok, sehingga sistem ini tidak maksimal dalam memisahkan atau mengelompokkan indikasi eksisi lokal, *polypectomy* dan *sphincter* tertentu yang digunakan untuk *transabdominal transanal resections* (TATA) (Marzouk and Schofield, 2011).

Hingga saat ini, sistem TNM merupakan salah satu metode yang lebih sering digunakan dalam menentukan *stage* atau *grade* dari kanker colorectal melalui kelebihanannya dalam mengklasifikasikan *T stage* hingga berbagai subunit. Akan tetapi, dalam penanganan kanker saat ini, keputusan terapi lebih banyak dilakukan melalui kombinasi diagnosa dari sistem TNM dan beberapa faktor prognostik lain seperti *tumor budding*, deposit tumor ektranodul, serta marker molekuler dan genetik yang terkait dengan Kanker Kolorektal (Marzouk and Schofield, 2011).

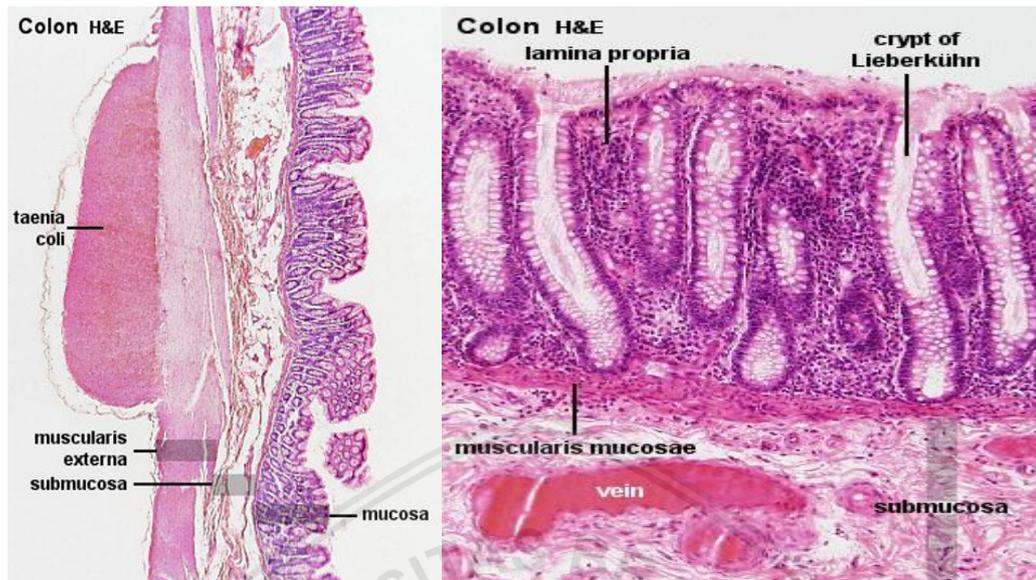
### 2.1.3 Histopatologi Kanker Kolorektal

Kolon merupakan salah satu bagian dari organ pencernaan yang memiliki fungsi dalam mereabsorpsi air dan garam-garam inorganik, serta mensekresi *mucus* yang berperan sebagai pelumas dari transportasi substansi di dalam usus. Secara anatomi, kolon terbagi menjadi empat bagian yaitu *ascending*, *transverse*, *descending*, dan *sigmoid* (**Gambar 2.4**).



**Gambar 2.4 Struktur Pembagian Kolon.** Kolon terbagi menjadi empat bagian yaitu *ascending*, *transverse*, *descending*, dan *sigmoid colon* (Ellis and Mahadevan, 2014).

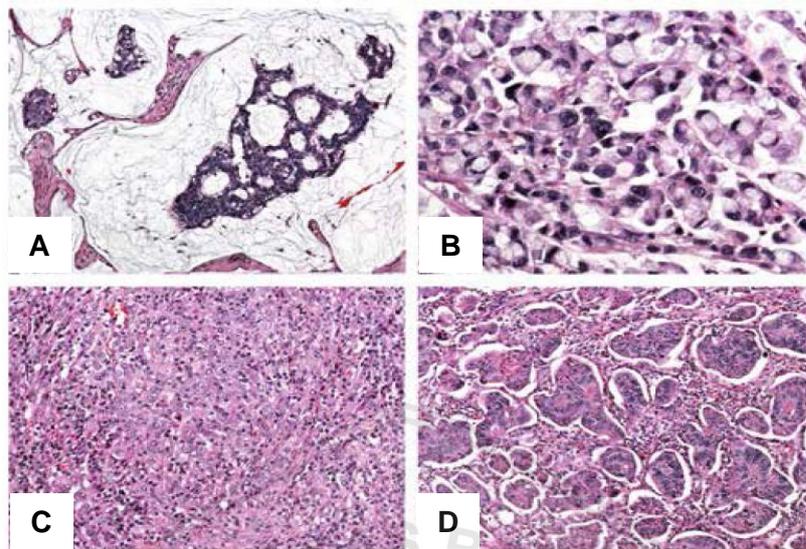
Secara histologi, kolon terdiri dari beberapa lapisan yaitu *mucosa*, *submucosa*, *muscularis externa*, dan *adventitia* atau *serosa* (**Gambar 2.5**).



**Gambar 2.5 Histologi Kolon.** Lapisan lumen kolon dari dalam keluar terdiri dari *mucosa*, *submucosa*, *muscularis externa*, dan *serosa* (gambar kiri). Pada lapisan *mucosa* terdapat *crypta lieberkuhn* dan *lamina propria* (gambar kanan) (Hill, 2019).

Jaringan kolon terdiri dari sel epitel kuboid kolumnar yang menyusun epitel kolon menjadi tubulus yang rapat dan panjang dengan banyak sel goblet. Pada lapisan mukosa usus juga terdapat *crypta lieberkuhn* yang terbuka pada permukaan sel epitel dan dikelilingi oleh *fibroblast* atau *myofibroblas* (Gulwani, 2018).

Kanker Kolorektal umumnya banyak terjadi pada bagian *descending colon* hingga rektum. Meskipun penentuan *stage* tumor seringkali ditetapkan melalui sistem TNM, akan tetapi berbagai perubahan histologi yang ditemukan pada kolon juga dapat digunakan sebagai penentuan diagnosa dan jenis dari Kanker Kolorektal. Secara umum, 90% dari jenis Kanker Kolorektal yang sering muncul merupakan *adenocarcinoma*. Namun dari hasil histopatologi yang ditemukan, sel kanker dapat dibedakan menjadi beberapa sub-tipe antara lain, *mucinous adenocarcinoma*, *signet ring cell carcinoma*, *medullary carcinoma*, dan *micropapillary adenocarcinoma* (**Gambar 2.6**) (Resch et al., 2015).



**Gambar 2.6 Subtipe Histologi Kanker Kolorektal (Resch et al., 2015).**

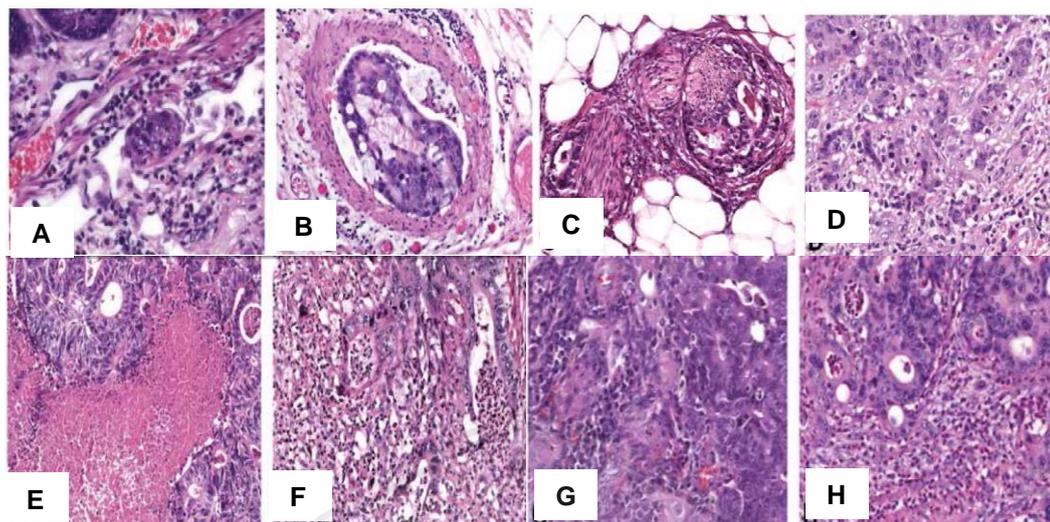
Keterangan: **A:** Tipe *mucinous adenocarcinoma* yang dikarakteristikan dengan produksi *mucin* ekstraseluler. **B:** Tipe *signet ring cell carcinoma* yang ditandai dengan deposisi *prominen mucin* intrasitoplasmik, serta *dysplasia* dan *molding* dari nukleus sel tumor. **C:** Tipe *medullary carcinoma* yang ditandai dengan jaringan sel ganas dengan *vesicular nucleus* yang memiliki *nuclei prominen* dan infiltrasi limfositik *prominen*. **D:** Tipe *micropapillary adenocarcinoma* ditandai oleh papiler kecil dan kumpulan sel tumor *trabecular* di dalam rongga stromal yang nampak seperti saluran vaskuler.

Histologi marker dari sub-tipe sel kanker ini merupakan salah satu marker yang dapat digunakan untuk melihat *prognosis* dan jenis dari sel kanker yang tumbuh. Dari keempat sub-tipe histologi di atas, *mucinous adenocarcinoma* merupakan sub-tipe yang paling banyak ditemukan pada Kanker Kolorektal. Diferensiasi dari tipe sel ini banyak ditemukan pada *high-level microsatellite instable* (MSI-H) yang menunjukkan tingkat keparahan yang rendah, sedangkan diferensiasi yang lain ditemukan pada *microsatellite stable* (MSS), dan *low-level MSI* (MSI-L) yang menunjukkan tingkat keparahan yang tinggi. Diferensiasi dari *mucinous adenocarcinoma* umumnya memiliki *prognosis* yang buruk. Tipe *signet ring cell carcinoma* ditemukan pada 1% kasus Kanker Kolorektal dan banyak ditemukan pada pasien dengan tingkat keparahan yang tinggi sehingga umumnya memiliki *prognosis* yang buruk. Jenis sel ini umumnya akan berkembang dan menyebar ke daerah peritoneum dan ovarium. *Medullary carcinoma* merupakan sub-tipe yang jarang ditemukan. Tipe ini merupakan variasi dari MSI-H dan merupakan tipe yang memiliki *prognosis* yang tidak terlalu buruk. Dari beberapa kasus Kanker

Kolorektal degan tipe ini menunjukkan angka kehidupan 1-2 tahun lebih lama dengan persentase sebesar 73,8-92,7%. Sub-tipe yang ke-empat adalah *micropapillary adenocarcinoma*. Tipe ini merupakan sel kanker *adenocarcinoma* yang disertai dengan komponen *micropapiler*, yang memiliki potensi keganasan tinggi dengan frekuensi infiltratif ke *limpovascular* dan *perineural*. Adanya komponen *micropapiler* dalam jumlah yang kecil diketahui dapat meningkatkan penyebaran *metastasis* lokal sebesar 40-74% dan *metastasis* distan sebesar 8-16% (Resch *et al.*, 2015).

Selain memiliki beberapa sub-tipe histologi, Kanker Kolorektal juga diketahui dapat menunjukkan pertumbuhan dan invasi yang berbeda-beda. Hal tersebut dapat ditandai oleh beberapa marker-marker histologi tambahan yang merupakan variabel prognostik dari Kanker Kolorektal. Marker histologi tambahan yang dapat digunakan untuk mendiagnosa keberadaan sel kanker antara lain, invasi limpa dan pembuluh darah, invasi perineural, *tumor budding*, nekrosis tumor, dan juga respon inflamasi (**Gambar 2.7**).

Dalam perkembangan sel kanker, akan nampak beberapa perubahan-perubahan histologi yang menunjukkan seberapa besar tingkat keparahan dari kanker. Ciri histologi awal dari pertumbuhan sel tumor adalah invasi dari sel tumor ke pembuluh darah dan ke daerah perineural. Invasi sel tumor ke dalam pembuluh darah akan ditandai dengan adanya sel tumor di dalam area pembuluh darah. Hal ini memainkan peranan penting dalam proses *metastasis* dari sel kanker (Betge and Langner, 2011). Sedangkan invasi perineural ditunjukkan dengan adanya sel tumor di dalam jaringan saraf. Hal ini menunjukkan penyebaran sel kanker yang umumnya telah lebih dulu terjadi melalui darah dan pembuluh limfatik (Poeschl *et al.*, 2010).



**Gambar 2.7** Marker Histologi Prognostik dari Kanker Kolorektal (Resch *et al.*, 2015).

Keterangan: **A:** Invasi limfatik yang ditunjukkan dengan adanya sel tumor di dalam pembuluh darah yang disertai dengan garis endotelial yang *unequivocal* serta dinding muskular yang tebal. **B:** Invasi *venous* yang ditandai dengan adanya sel tumor di dalam pembuluh darah yang mengandung sel darah merah serta dinding muskular yang tebal. **C:** Invasi perineural ditandai dengan invasi sel tumor di dalam jaringan saraf. **D:** *Tumor budding* ditandai oleh adanya sel tunggal atau kelompok sel kanker yang terdiri dari kurang dari lima sel, yang menyebar di dalam stroma pada batas invasif tumor. **E:** Tumor nekrosis ditandai dengan massa koagulatif yang menunjukkan adanya luka iskemik kronis sehingga menimbulkan respon inflamasi anti-tumor. **F:** Inflamasi di dalam batas massa tumor ditandai dengan infiltrasi sel inflamasi yang merusak sel islet. **G:** Respon imun anti-tumor ditunjukkan oleh infiltrasi limfositik peritumoral. **H:** Infiltrasi eosinofilik dari area tumor menunjukkan tumor yang disertai oleh sel eosinofil.

Invasi dari sel tumor juga dapat ditunjukkan melalui pembentukan *tumor budding*. Hal ini dikarakteristikkan dengan adanya kumpulan sel-sel kanker dalam stroma yang menunjukkan sifat agresif dari sel kanker dan umumnya digunakan dalam *prognosis* Kanker Kolorektal (Lugli *et al.*, 2012). Selain invasi sel tumor, marker lain dalam perkembangan sel kanker dapat dilihat melalui infiltrasi sel-sel inflamasi dan respon imun. Nekrosis tumor dan infiltrasi sel inflamasi umumnya berkaitan dengan kecepatan pertumbuhan sel kanker dan peningkatan potensi *metastasis* serta *prognosis* yang buruk. Hal ini ditandai dengan adanya area nekrotik pada jaringan yang menyebar dengan cepat serta semakin meluas (Resch *et al.*, 2015).

### 2.1.5 Gejala dan Diagnosis

Manifestasi klinik dari Kanker Kolorektal umumnya berdasarkan lokasi dari tumor serta penyebaran yang telah terjadi. Gejala umum yang sering nampak pada kasus ini adalah konstipasi yang terjadi secara terus menerus, adanya darah pada feses, penurunan konsistensi feses, penurunan nafsu makan, penurunan berat badan, mual, muntah, adanya perdarahan pada rektum, serta anemia. Sedangkan diagnosis yang dapat dilakukan untuk mendeteksi adanya Kanker Kolorektal antara lain meliputi *colonoscopy* atau *sigmoidoscopy*, *CT scan*, *positron emission tomography* (PET), serta MRI. *Staging* dari Kanker Kolorektal sendiri berdasarkan TNM *staging system* yang telah ditetapkan oleh WHO, UICC dan AJCC. Penentuan *stage* dari kanker ini berdasarkan dari seberapa besar penyebaran yang telah terjadi, adanya keterlibatan pada *lymph node*, serta seberapa besar penyakit yang terjadi akibat metastasisnya (Mustafa *et al.*, 2016).

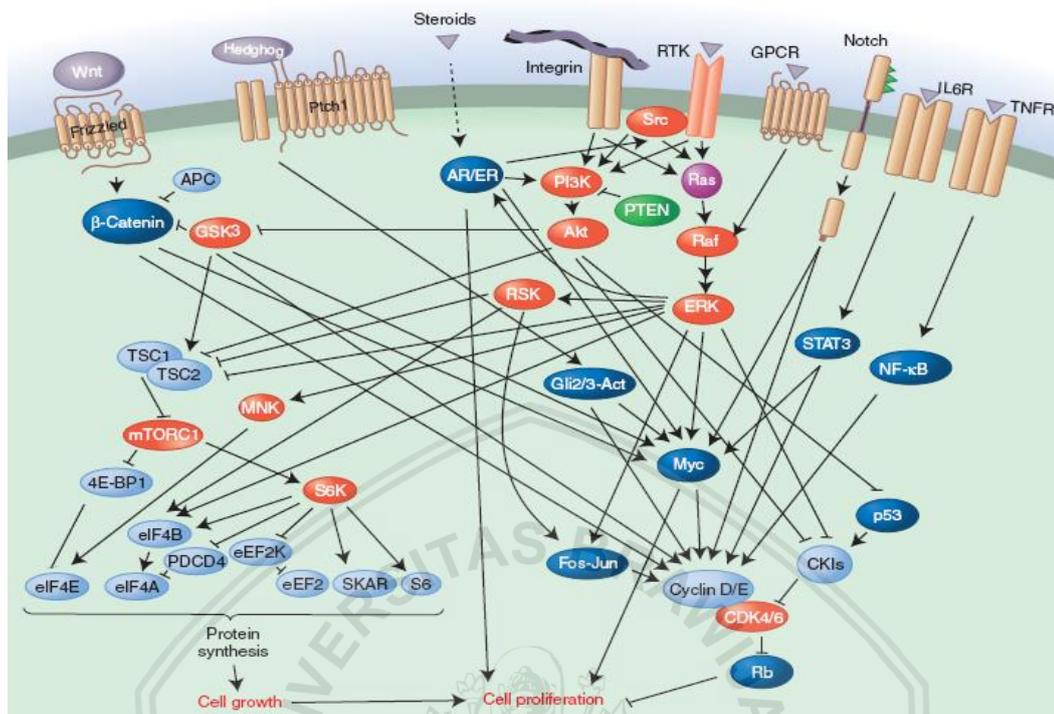
### 2.1.6 Manajemen, Penanganan dan Terapi

Manajemen penanganan dari Kanker Kolorektal hampir serupa dengan penanganan terhadap jenis kanker yang lainnya, yaitu meliputi operasi pengangkatan sel tumor, kemoterapi, radiasi, serta perawatan paliatif dan *follow-up* pasien. Dalam kebanyakan kasus yang terjadi, umumnya *prognosis* dari Kanker Kolorektal adalah buruk dimana angka kehidupan selama 5 tahun kurang dari 60% dan akan menurun menjadi 20% apabila pasien telah memasuki *stage IV*. Oleh sebab itu, telah banyak metode pencegahan yang telah dilakukan untuk mencegah terjadi Kanker Kolorektal, antara lain: perubahan pola hidup dan diet, *screening*, serta olahraga yang teratur (Mustafa *et al.*, 2016). Terapi pada Kanker Kolorektal umumnya melibatkan operasi pengangkatan tumor primer. Akan tetapi, terapi ini juga berbeda-beda bergantung dengan stadium dari kanker tersebut. Pada pasien dengan Kanker Kolorektal stadium III, terapi yang dilakukan umumnya dengan menggunakan obat kemoterapi seperti *5-Fluorouracil* (5-FU) atau *leucovorin*, bergantung dengan *adjuvant* kemoterapi yang digunakan dalam kombinasinya. Kombinasi untuk obat kemoterapi ini dapat berupa *oxaliplatin* atau *irinotecan*. Selain itu, penggunaan antibodi monoklonal seperti *cetuximab* dan *panitumumab*, diketahui mampu menekan reseptor *epidermal growth factor* apabila dikombinasikan dengan obat kemoterapi. Antiangiogenik seperti *bevacizumab*, juga dapat bekerja dengan target *vascular endothelial growth factor* apabila dikombinasikan dengan obat kemoterapi (Touil *et al.*, 2013).

## 2.2 Proliferasi Sel Kanker

### 2.2.1 Peran Proliferasi dalam Perkembangan Kanker

Proliferasi sel merupakan kemampuan sel dalam menghasilkan dua sel dari satu sel, dimana mekanisme ini melibatkan faktor pertumbuhan dan pembelahan sel. Pada sel normal, proliferasi sel umumnya berfungsi untuk membentuk suatu jaringan dimana sel akan membelah dan menghasilkan sel yang sesuai dengan fungsinya masing masing. Proliferasi secara normal akan terkontrol sehingga hanya bagian sel-sel tertentu dalam tubuh yang mengalami pembelahan. Proliferasi yang tidak terkontrol akan menyebabkan sel melakukan pembelahan yang berlebihan yang memicu tumbuhnya sel abnormal atau yang disebut juga sebagai sel kanker (Hyland, 2010). Sel kanker merupakan suatu penyakit yang terjadi akibat adanya perubahan genetik dan telah lama diketahui memiliki keterkaitan dalam adanya peningkatan proliferasi sel. Proliferasi sel yang tinggi dan bersifat tidak terkendali terjadi karena adanya gangguan keseimbangan faktor proto-onkogen dan gen penekan tumor (*tumor suppressor gene*) sehingga terjadi peningkatan produksi *growth factors* dan jumlah reseptor permukaan sel yang dapat memacu transduksi sinyal interselluler untuk meningkatkan produksi faktor transkripsi. Kebanyakan sel muncul dari satu sel (dalam jumlah yang kecil) dan menjadi ganas akibat proliferasi sel yang tinggi. Perubahan pada onkogen dan gen penekan tumor memicu peningkatan proliferasi sel melebihi dari kemampuan normal. Proses ini akan mengakibatkan pembentukan sel abnormal yang apabila tidak dapat ditoleransi oleh tubuh maka sel tersebut akan terus menerus berproliferasi menghasilkan sel-sel abnormal lainnya dalam jumlah yang sangat banyak. Hal inilah yang menyebabkan munculnya sel kanker serta salah satu hal yang berperan dalam keganasan sel kanker (Anonym, 2010). Proliferasi dalam sel kanker melibatkan berbagai macam jalur yang secara umum menargetkan aktivasi pada jalur PI3K-Akt, Ras-ERK dan  $\beta$ -catenin (**Gambar 2.8**).



**Gambar 2.8 Regulasi Proliferasi Sel.** Mekanisme proliferasi secara umum direspon oleh aktivitas dari berbagai macam sel dan jalur khususnya jalur Ras-ERK dan PI3K-Akt (Sever and Brugge, 2015).

Jalur Ras-ERK dan PI3K-Akt merupakan regulator dari proliferasi sel normal dan peningkatan aktivitas dari jalur sinyal ini akan meningkatkan respon proliferasi. Stimulasi proliferasi sel pada jalur ini dapat melalui induksi berbagai gen yang mengkode *cyclin* G1/S, CDKs dan *E2F-family transcription factors* (Sever and Brugge, 2015).

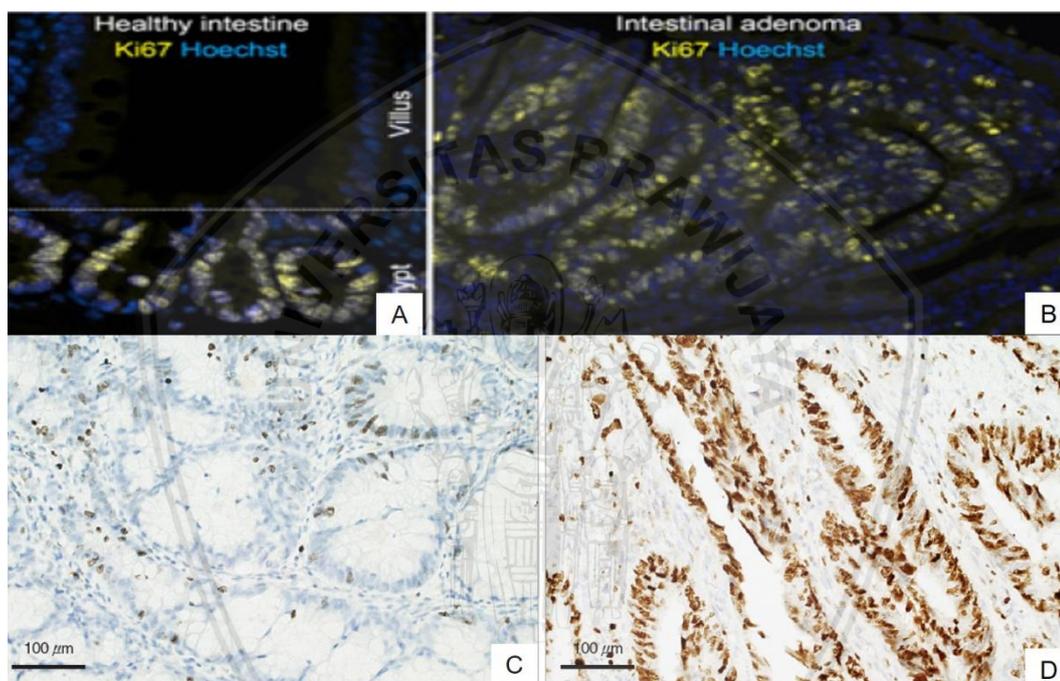
Terdapat berbagai macam marker yang dapat digunakan dalam mendiagnosis terjadinya proliferasi sel. Beberapa marker tersebut diantaranya adalah *5-bromo-2'-deoxyuridine* (BrdU) yang terdapat selama fase S siklus sel, *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) yang merupakan nuklear polipeptida yang disintesis selama fase G1 dan fase S pada sel yang berproliferasi, Protein Ki67 yang merupakan antigen intranuklear yang tereksresi selama proliferasi sel, serta *Cyclin D1* yang merupakan protein yang bekerja selama fase G1 siklus sel (Ohta and Ichimura, 2000). Selain molekul tersebut, beberapa marker adesi juga dapat digunakan sebagai marker proliferasi diantaranya adalah *Focal Adhesion Kinase* (FAK), *Intercellular adhesion Molecules* (ICAMs), *Vascular Cell Adhesion Molecules* (VCAMs), dan lain sebagainya. Dalam proliferasi sel kanker, molekul

adesi ini berperan untuk penyebaran dan perlekatan sel kanker baik secara lokal maupun ke jaringan dan organ lain (Harjunpaa *et al.*, 2019).

### 2.3 Protein Ki67

Ki67 merupakan salah satu biomarker yang banyak digunakan untuk mendeteksi proliferasi sel. Ki67 mengkode dua isoform protein dengan berat molekul 345 dan 395 kDA. Protein ini memiliki masa hidup 1 – 1,5 jam dan terekspresi pada semua fase siklus sel aktif (G1, S, G2, dan M), akan tetapi tidak terekspresi pada fase istirahat sel (G0), serta akan mengalami penurunan ekspresi pada fase mitosis *anaphase* dan *telophase* (Li *et al.*, 2015). Ki67 merupakan protein awal yang berikatan dengan lapisan *perichromosomal* pada mitosis. Protein Ki67 terletak pada bagian korteks dan di dalam komponen fibrillar dari nukleus selama fase *interphase*, selanjutnya selama fase mitosis, protein ini terlokalisasi di daerah perifer dari kromosom yang telah mengalami kondensasi. Protein Ki67 juga diketahui terlibat dengan matriks nuklear, *satellite* DNA, dan *pre-ribosome* pada G1, serta pada *scaffold* dari DNA dalam fase mitosis. Beberapa studi menunjukkan bahwa Ki67 juga terlibat dalam regulasi fosforilasi. Ki67 yang mengalami hiperfosforilasi tidak akan berikatan dengan DNA selama fase mitosis yang memfasilitasi peningkatan mobilitas. Sedangkan pada fase *interphase*, Ki67 tidak akan terfosforilasi sehingga akan berikatan dengan DNA dan terlibat dalam pembentukan kromatin nukleolar selama fase *interphase* pada sel yang mengalami proliferasi (Booth *et al.*, 2014). Ki67 umumnya banyak terdapat di *nucleolus* selama fase *interphase*, sedangkan pada fase mitosis, protein ini melapisi kromosom. Ki67 diketahui memainkan peranan dalam pembentukan lapisan perikromosomal pada fase mitotik. Pada fase ini, Ki67 akan memiliki ukuran yang lebih besar dan memiliki muatan komposisi asam amino yang sangat tinggi. Hal ini berfungsi untuk menjaga individual mitotik kromosom tidak teragregasi akibat adanya *nuclear envelope disassembly* sehingga normal kinetik tetap terjaga untuk perkembangan proses *anaphase*. Ketika memasuki fase *anaphase*, Ki67 akan berikatan dengan *protein phosphatase 1 $\gamma$*  (PP1 $\gamma$ ) untuk selanjutnya membentuk holoenzim. Enzim ini merupakan molekul penting yang menjadi target *substrat* yang akan terdefosforilasi selama akhir fase mitotik (Sun *et al.*, 2016).

Poliferasi sel kanker merupakan salah satu cara sel kanker untuk berkembang dan mengalami *metastasis*. Ki67 merupakan *nuclear antigen* yang diketahui terlibat dalam proliferasi sel kanker dan seringkali digunakan sebagai marker untuk diagnosis *prognosis* dari kanker. Tingginya ekspresi Ki67 diduga memiliki korelasi dengan *outcome* dari kanker, dan umumnya hal ini dikaitkan dengan prognosa yang buruk. Beberapa penelitian telah banyak menunjukkan adanya peningkatan ekspresi Protein Ki67 pada kanker yang menyertai dengan metastasis dan proliferasi kanker (**Gambar 2.9**)



**Gambar 2.9 Peningkatan Ekspresi Protein Ki67 pada Kanker Kolorektal.**

Gambar A dan C menunjukkan ekspresi Protein Ki67 pada jaringan kolon yang sehat sedangkan gambar B dan D menunjukkan ekspresi Protein Ki67 pada adenoma kolon. Hasil menunjukkan peningkatan warna *fluorescence* (kuning) pada gambar B dan warna peningkatan warna hematoksilin-eosin (coklat) pada gambar D yang mengindikasikan peningkatan ekspresi Protein Ki67.

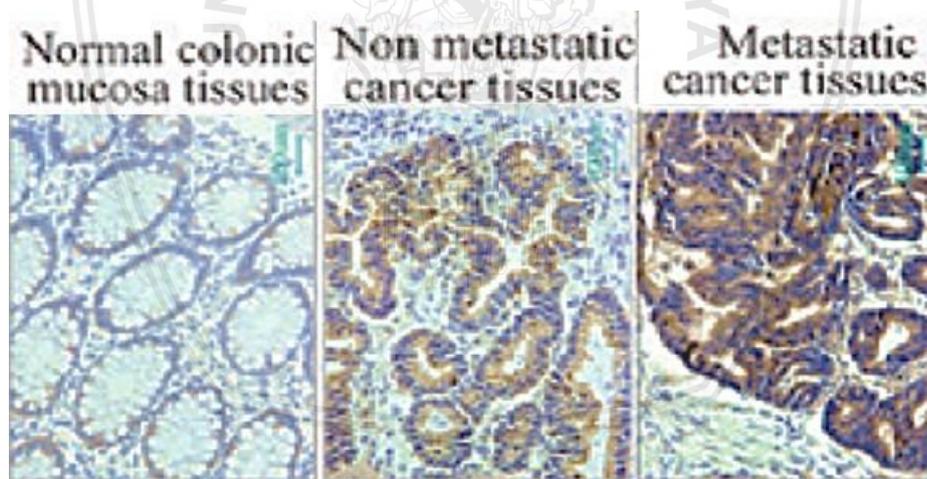
Keterangan: Gambar A dan B merupakan Hasil *Immunofluorescence* pada jaringan kolon dalam kasus adenoma kolon. Gambar C dan D merupakan hasil pewarnaan immunohistokimia pada jaringan kolon dalam kasus adenoma kolon (Huh *et al.*, 2009; Sobecki *et al.*, 2017).

Pada studi tentang Kanker Kolorektal juga menunjukkan bahwa tingginya ekspresi Ki67 merupakan marker prognostik yang dapat dipertimbangkan untuk diagnosis keganasan kanker (Melling *et al.*, 2015). Ki67 mampu menentukan pertumbuhan neoplastik yang terkait dengan perkembangan kanker. Beberapa penelitian yang

lain juga menunjukkan keterkaitan Ki67 dengan derajat keganasan kanker, invasif, potensi metastasis, *survival*, serta resiko adanya *relapse* pada kasus kanker. Pada kasus yang lain, *metastasis* pada hepar dalam kasus *colorectal cancer* (CRC) menunjukkan pula tingginya ekspresi Ki67 dan menyertai buruknya *prognosis* dari CRC (Li *et al.*, 2016).

#### 2.4 Focal Adhesion Kinase (FAK)

*Focal Adhesion Kinase* (FAK) merupakan suatu protein *cytoplasmic tyrosin kinase* yang pada kondisi normal berperan dalam meregulasi adesi seluler, motilitas, proliferasi, dan *survival* pada berbagai jenis sel. Pada kondisi kanker, FAK umumnya akan teraktivasi dan mengalami peningkatan ekspresi yang berfungsi dalam memberi keuntungan bagi sel kanker untuk berkembang dan mengalami *metastasis* (Yoon *et al.*, 2014). Berbagai penelitian telah banyak menunjukkan adanya peningkatan ekspresi FAK pada kasus kanker kolorektal (**Gambar 2.10**).

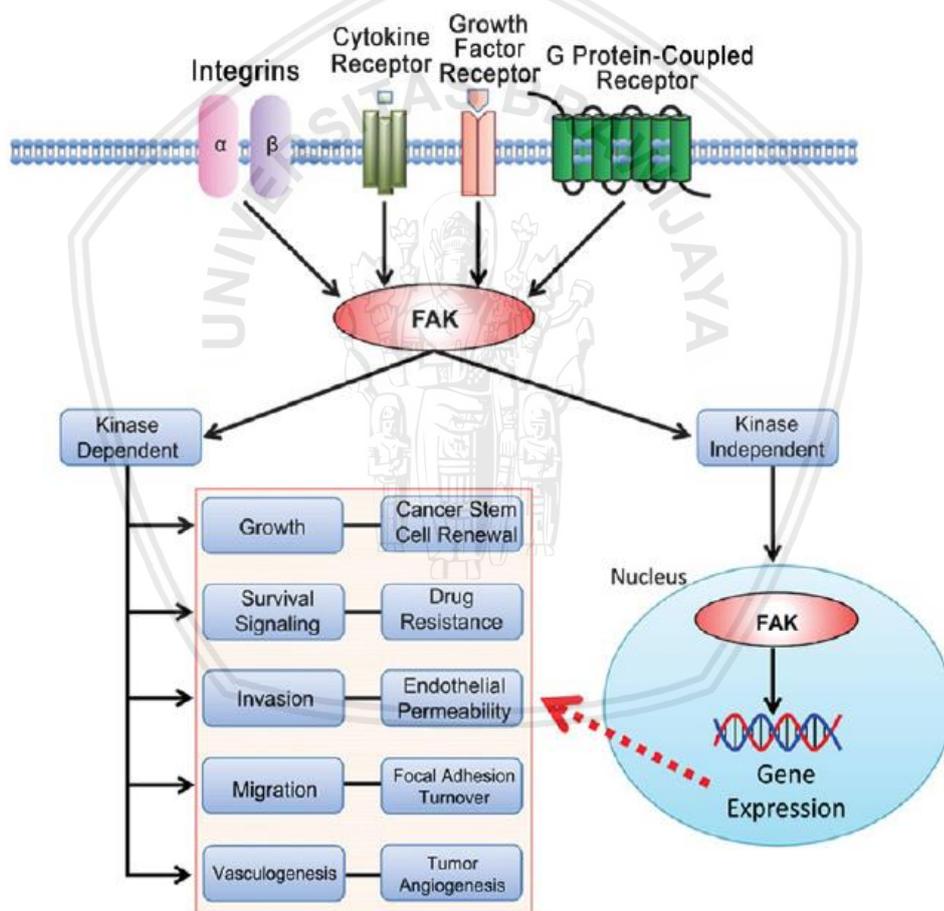


**Gambar 2.10 Ekspresi FAK pada Jaringan Kolon.** Pewarnaan Immunohistokimia pada jaringan kolon yang menunjukkan peningkatan ekspresi FAK (warna coklat) pada *non metastatic cancer tissues* dan *metastatic cancer tissues*. Ekspresi FAK diketahui semakin meningkat pada jaringan kolon yang mengalami metastasis (ujung kanan) yang mengindikasikan FAK akan mengalami peningkatan pada jaringan yang berproliferasi (Liu *et al.*, 2019).

Tingginya ekspresi FAK pada kanker ini umumnya mengindikasikan proliferasi sel kanker dan keparahan kanker. Peningkatan pada FAK seringkali menunjukkan prognosa yang buruk bagi penderita kanker.

### 2.4.1 Mekanisme Sinyal FAK

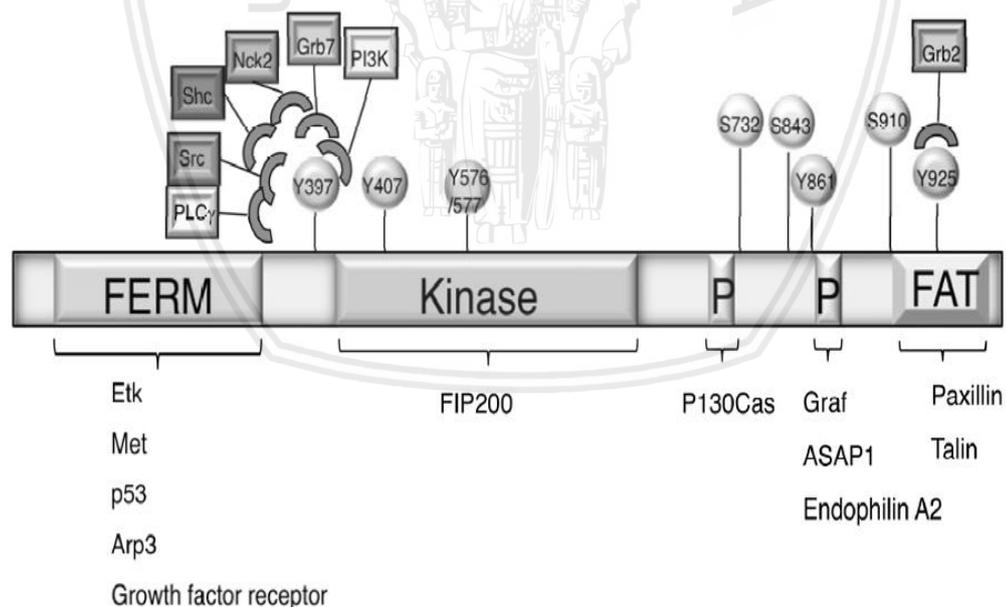
*Focal Adhesion Kinase* (FAK) merupakan suatu mediator intraseluler yang memiliki peranan yang sangat penting dalam perubahan ekstraseluler seperti pada proses *remodelling* matriks ekstraseluler (ECM), ketersediaan nutrisi, dan faktor pertumbuhan. FAK merupakan salah satu protein non-reseptor yang akan diaktivasi oleh beberapa cara seperti interaksinya dengan integrin, reseptor sitokin, reseptor *growth factor*, serta reseptor *G-protein* (**Gambar 2.13**). Mekanisme kerja sinyal FAK melibatkan beberapa faktor meliputi integrin, reseptor sitokin (CR), reseptor *growth factor* (GFR), dan reseptor *G-protein* (GPCR).



**Gambar 2.11 Mekanisme Sinyal FAK.** Integrin, reseptor sitokin (CR), reseptor faktor pertumbuhan (GFR), dan reseptor *G protein-coupled* (GPCR) merupakan reseptor transmembran yang terletak pada permukaan sel dan berperan dalam menghantarkan sinyal ekstraseluler ke FAK. Aktivasi FAK akan dipicu oleh sinyal *cascade* pada berbagai jenis proses seluler seperti sinyal *survival*, pertumbuhan, *angiogenesis*, migrasi, dan invasi. *Kinase-inhibited* FAK masuk ke dalam nukleus dan memiliki potensi untuk meregulasi ekspresi gen untuk mempengaruhi perkembangan kanker (Yoon *et al.*, 2014).

Faktor-faktor tersebut merupakan reseptor trans-membran yang terdapat pada permukaan sel dan mengaktifkan FAK melalui hantaran sinyal ekstraseluler yang diterima. Aktivasi FAK selanjutnya akan memicu aktivasi sinyal *cascade* yang terlibat dalam berbagai proses di dalam tubuh seperti pertumbuhan, invasi, *angiogenesis*, *survival*, dan migrasi dari berbagai jenis sel (Yoon *et al.*, 2014).

Dalam struktur genom manusia, gene yang mengkode FAK terletak pada kromosom 8q24.3 dan secara umum diekspresikan hampir di seluruh jenis sel. protein FAK (PTK2, FAK1, pp125FAK, atau FADK) memiliki lebih dari 95% identitas dan struktur asam amino dan tersusun atas beberapa domain, yaitu: *N-terminal* FERM (homolog dengan protein 4.1, radixin, enzrin, dan moesin), *central kinase*, serta *C-terminal* yang mana seluruh domain tersebut memiliki *sequence Focal Adhesion Target* (FAT) yang bertanggung jawab terhadap lokalisasi FAK sebagai suatu *focal adhesion* (Zhao and Guan, 2009). Protein FAK memiliki domain *central kinase* yang diapit oleh dua domain lainnya yaitu domain *N-terminal* FERM dan *C-terminal* (**Gambar 2.12**).

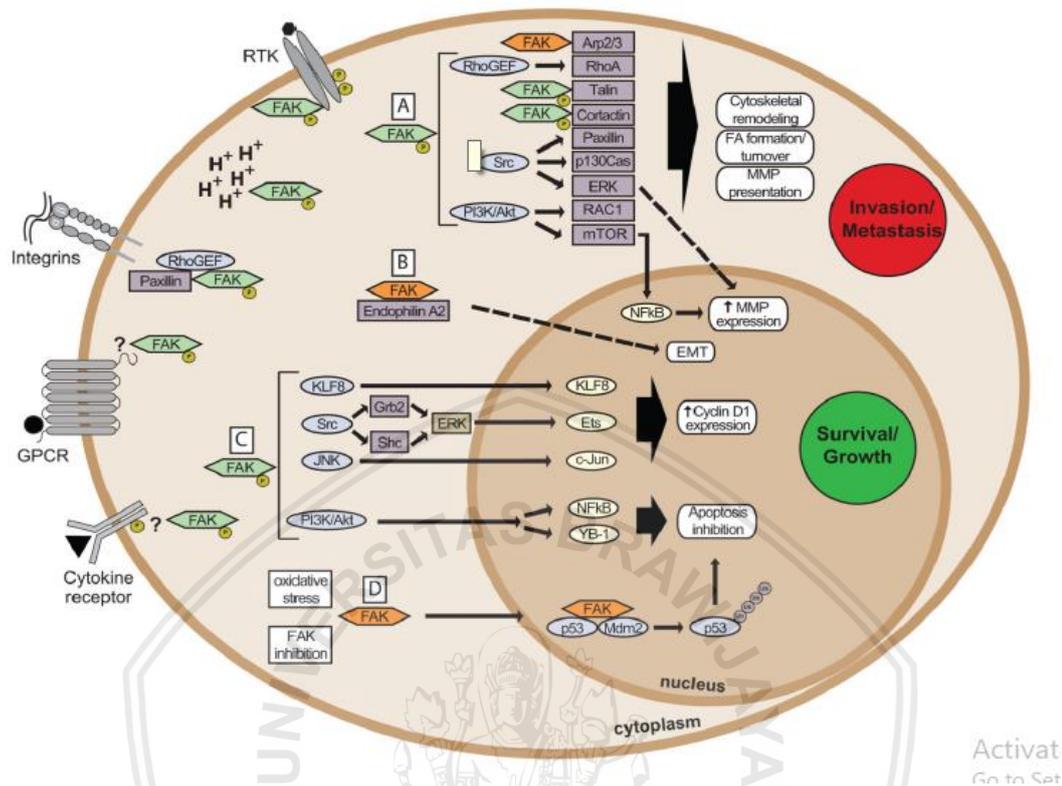


**Gambar 2.12 Struktur FAK.** FAK memiliki domain central kinase yang diapit oleh region *N-terminal* yang memiliki *domain* FERM dan region *C-terminal* yang memiliki dua motif *proline-rich* (P) serta domain FAT. Beberapa tirosin dan sisi proliferasi *serine* ditunjukkan pada diagram, selain itu beberapa protein juga diketahui berinteraksi dengan region spesifik pada FAK (Peng and Guan, 2011).

*Domain C-terminal* pada FAK memiliki bagian FAT dan beberapa *rolinee-rich motifs* (PR1 dan PR2). *Domain* ini memiliki peran sebagai transduktor dalam menghantarkan sinyal ekstrasel melalui fosforilasi tirosin menjadi berbagai molekul intrasel. *Domain* ini juga berperan dalam aktivasi integrin, dimana FAT mampu menargetkan FAK pada tempat adesi melalui interaksinya dengan berbagai protein seperti *paxillin*, *vinculin* dan *talín* (Ling *et al.*, 2015). Sedangkan *domain* FERM lebih memainkan perannya dalam regulasi aktivasi dari FAK melalui interaksi intra-molekuler dengan *domain kinase*. *Domain* ini diberi nama sesuai dengan protein penyusunnya yaitu: Protein 4.1 (F), *Ezrin* (E), *Radixin* (R), dan *Moesin* (M). FERM memiliki fungsi utama dalam mengumpulkan protein sitoplasmik ke membran plasma dan menempelkan permukaan sel protein ke sitoskeleton sehingga memediasi interaksi antara protein dan *phosphoinositide* sebagai bentuk regulasi aktivasi FAK. Ketika FAK tidak teraktivasi, FERM akan berinteraksi dengan kinase untuk memblokir akses kinase untuk mengkatalisis, serta menekan aktivasi *loop* yang merupakan kunci autofosforilasi Y397 (tyrosin 397). Sebaliknya, pada kondisi teraktivasi, FERM akan berpindah dengan cara mengaktifkan protein yang akan memperantarai untuk terjadinya autofosforilasi dari Y397 serta mempengaruhi *docking site* dari *Src family kinases* untuk mengoptimalkan aktivasi FAK (Peng and Guan, 2011; Zhao and Guan, 2009).

### 2.2.2 Peran FAK dalam Kanker

Secara normal, FAK tidak berperan sebagai onkogen, akan tetapi peningkatan ekspresi dari FAK diketahui memiliki keterlibatan dalam perkembangan sel kanker. Aktivasi dari FAK pada kanker memainkan peran penting sebagai mediator kunci progresi dan metastasis dari sel kanker. Pada beberapa studi yang pernah dilakukan menunjukkan bahwa mutasi pada FAK (FAK-Del33) akan meningkatkan migrasi sel kanker melalui autofosforilasi Y397 (Yoon *et al.*, 2014). FAK memiliki peran dalam keterlibatannya pada berbagai jalur sinyal yang mendukung pertumbuhan dan *metastasis* dari sel kanker (**Gambar 2.13**).



**Gambar 2.13 Peran FAK dalam Pertumbuhan Kanker.** FAK akan teraktivasi oleh adanya reseptor *tyrosine kinase* (RTK), perubahan pH pada intrasel ( $H^+$ ), integrin, reseptor *G-protein* (GPCR) dan reseptor sitokin. FAK yang teraktivasi dapat meningkatkan motilitas sel melalui efek Arp2/3, *Rho guanine nucleotide exchange factors* (*RhoGEF*), *talin* atau *cotactin*, serta SRC- atau *PI3-kinase*. Melalui mekanisme ini, FAK akan memediasi sinyal untuk *remodelling* sitoskeleton, pembentukan adesi fokal, presentasi *matrix metalloproteinases* (MMPs) pada permukaan sel, serta meningkatkan invasi dan *metastasis* sel tumor. FAK juga mempengaruhi proliferasi sel baik melalui *kinase-dependent* atau *-independent* melalui induksi ekspresi *endothelial-mesenchymal transition* (EMT). FAK juga mampu menginduksi perkembangan siklus sel melalui *cyclin D1* yang melibatkan sinyal-sinyal lain seperti KLF8, Src-ERK, JNK, PI3K/akt serta peran lain dalam *scaffold* p53 dan Mdm2, maupun peningkatan p53 *polyubiquitinatin* (Ub) dan degradasi sel (Sulzmaier *et al.*, 2014).

Secara garis besar, mekanisme FAK dalam perkembangan sel kanker melibatkan *kinase-dependent control* dari motilitas, invasi, serta *survival* sel kanker (Sulzmaier *et al.*, 2014). Aktivasi FAK pada sel melalui adanya sinyal adesi diketahui memberikan peran penting dalam pertumbuhan *anchorage-independent* dari sel tersebut sehingga bersifat kanker. FAK dapat mendukung perkembangan

sel kanker melalui berbagai jalur aktivasi yang menstimulasi progresi dari siklus sel (Zhao and Guan, 2009). Beberapa mediator lain yang terlibat dalam peran FAK untuk mendukung perkembangan sel kanker juga dapat diamati pada **Gambar 2.14**

Secara khusus, peran FAK dalam sel kanker dapat dibedakan berdasarkan fungsi spesifiknya antara lain:

**a. Kanker Survival dan Proliferasi**

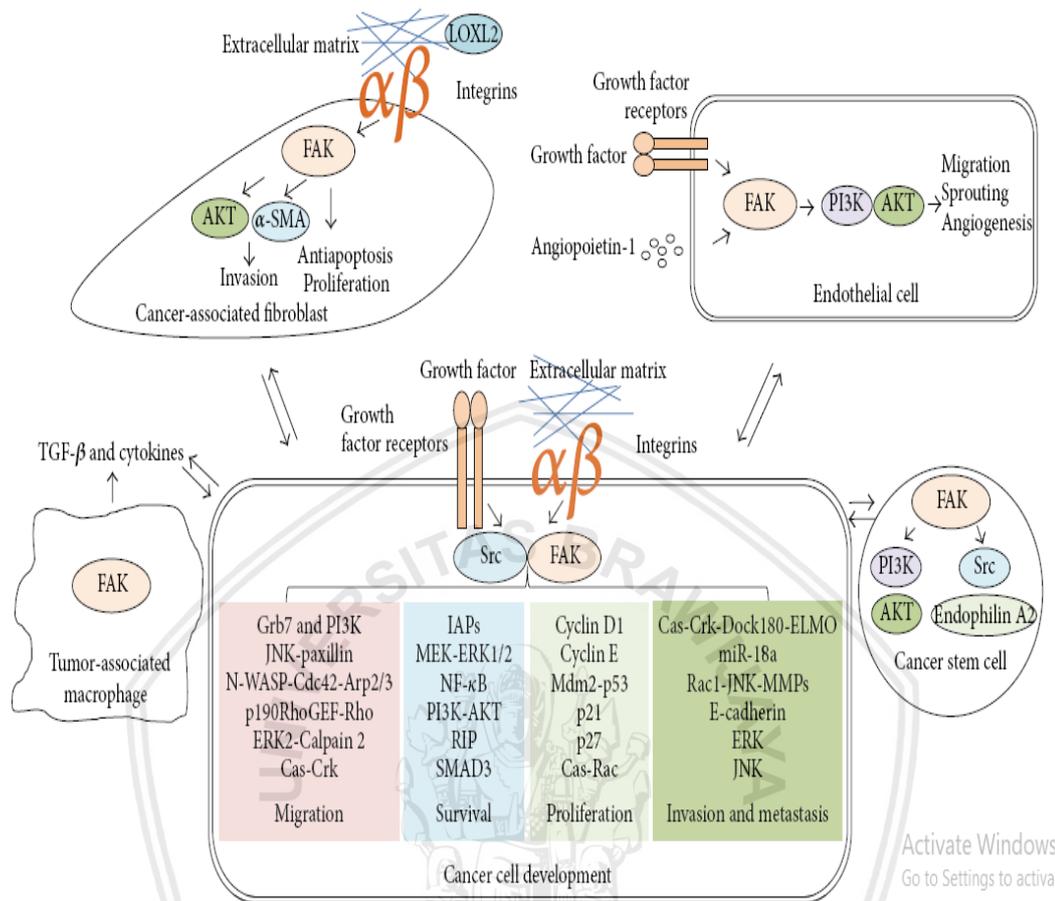
FAK meningkatkan *survival* dari sel kanker melalui *kinase-dependent* dan *-independent*, serta PI3K/Akt *cascade*. Dalam hal ini, stimulus yang dihasilkan oleh integrin atau molekul ekstraseluler lainnya akan menginduksi sinyal *survival* dari FAK untuk menghambat *anoikis* dan kematian sel. FAK juga diketahui meningkatkan progresi sel melalui sinyal antara FAK dengan p130Cas, Rac GTPase, dan *actin binding protein lamellipodin* (Sulzmaier *et al.*, 2014).

**b. Migrasi, Invasi dan Metastasis**

Invasi sel kanker ke daerah disekitarnya merupakan suatu tahap perkembangan sel kanker yang memungkinkan sel kanker untuk menyebar ke lokasi sekundernya. Proses invasi ini membutuhkan suatu transisi fenotip melalui perubahan pada FA, alterasi MMPs, serta dinamika sitoskeletal yang memfasilitasi invasi ECM. FAK akan mengaktifasi *Fas* yang akan berikatan dengan *RhoGEF* dan menghasilkan sinyal yang akan meningkatkan invasi lokal (Sulzmaier *et al.*, 2014). Proses fosforilasi pada FAK merupakan mekanisme penting dalam meregulasi ekspresi *E-cadherin* yang akan meningkatkan sinyal *Src*. FAK juga diketahui memainkan peranan dalam memediasi *VEGF-induced vascular permeability* melalui menfosforilasi secara langsung  $\beta$ -*catenin* pada Y142 (Yoon *et al.*, 2014).

**c. Kanker Stem Cell**

*Stem cell* kanker (CSCs) memiliki kemampuan untuk memperbaharui diri serta berdiferensiasi menjadi bentuk sel kanker yang lainnya. Hal tersebut diketahui berkaitan dengan aktivasi FAK. Melalui NANOG yang berikatan dengan FAK, dapat meningkatkan rangsangan pada pelepasan ekspresi FAK yang kemudian akan menjaga kestabilan faktor-faktor transkripsi pada sel kanker (Yoon *et al.*, 2014).

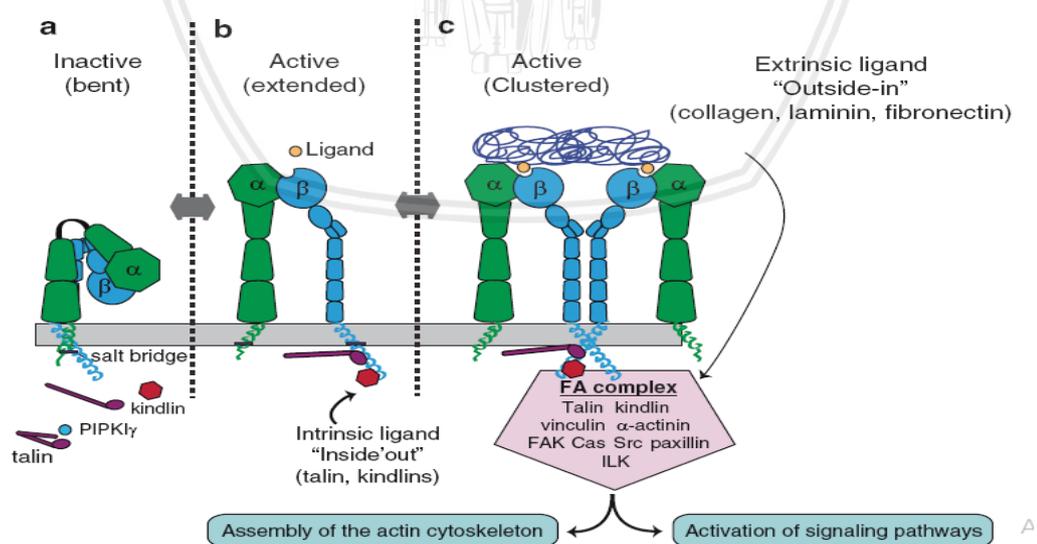


**Gambar 2.14 Transduksi Sinyal FAK pada Sel Kanker.** Aktivasi FAK terinisiasi melalui ikatanan antara integrin dengan ECMs serta melalui reseptor *growth factor* sehingga mampu meregulasi proliferasi sel, *survival*, migrasi, invasi, dan *metastasis* yang terkait dengan perkembangan kanker. Autofosforilasi kompleks FAK/Scr (pada Tyr397) meningkatkan kemampuan forofilasi *cascade* tirosin dalam memodulasi jalur sinyal yang ada. Pada *stem cell* kanker, FAK memodulasi *endophilin* fosforilasi A2 melalui *Src* atau PI3K-AKT. Pada sel endotel VEGF-A/VEGF atau sinyal *angiopoietin-1* meregulasi *FAK-mediated* dalam mengaktifasi PI3K/AKT untuk meningkatkan migrasi, penyebaran, dan *angiogenesis*. FAK juga meregulasi ekspresi *growth factor* atau sitokin untuk memfasilitasi perkembangan kanker. FAK juga mempengaruhi ekspresi  $\alpha$ -SMA dan sinyal AKT untuk mengontrol invasi, apoptosis, dan proliferasi pada *cancer-associated fibroblast* (Ling *et al.*, 2015).

## 2.5 Integrin

Nama integrin berasal dari kompleks membran protein integral yang pertama kali dikarakteristikan pada tahun 1986. Penamaan ini diperoleh melalui penemuan bahwa protein yang diidentifikasi ini menghubungkan matriks

ekstraseluler dengan sitoskeleton. Integrin merupakan suatu heterodimer dari sub-unit  $\alpha$  dan  $\beta$  yang berikatan secara non-kovalen. Pada vertebrata integrin memiliki 18 sub-unit  $\alpha$  dan 8 sub-unit  $\beta$  yang dapat bergabung membentuk 24 macam reseptor yang berbeda-beda dengan berbagai molekul penggabung dan terdistribusi pada berbagai jenis jaringan yang berbeda. Sub-unit  $\alpha$  dan  $\beta$  pada integrin tersusun atas berbagai domain yang mudah untuk berikatan (**Gambar 2.17**). Setiap sub-unit juga memiliki *single membrane-spanning helix* serta ekor sitoplasmik yang umumnya berukuran pendek. Ukuran sub-unit  $\alpha$  dan  $\beta$  beragam akan tetapi umumnya terdiri dari 750-1000 asam amino (Campbell and Humphries, 2011). Integrin merupakan keluarga besar dari reseptor transmembran heterodimer glikoprotein tipe 1 yang berfungsi sebagai reseptor metazoan utama untuk sel adesi dan menghubungkan lingkungan intrasel dan ekstrasel. Setiap heterodimer dari ntegrin mengandung domain ekstrasel besar yang mengikat protein pada lingkungan ekstrasel, domain transmembran *single membrane-spanning*, dan domain ekor sitoplasmik ekstrasel. Ikatan ini akan menghubungkan elemen sitoskeleton melalui protein adaptor sitoplasmik. Integrin mampu mengikat glikoprotein matrik ekstrasel (ECM) termasuk kolagen, fibronektin, laminin, dan reseptor sel yang berkaitan dengan adesi atau perlekatan sel (Srichai and Zent, 2010).



**Gambar 2.15 Struktur Integrin.** Struktur integrin saat tidak berikatan (a) atau kondisi inaktif, saat teraktivasi oleh talin dan kindling (b), dan saat berikatan dengan ligan (c) (Srichai and Zent, 2010).

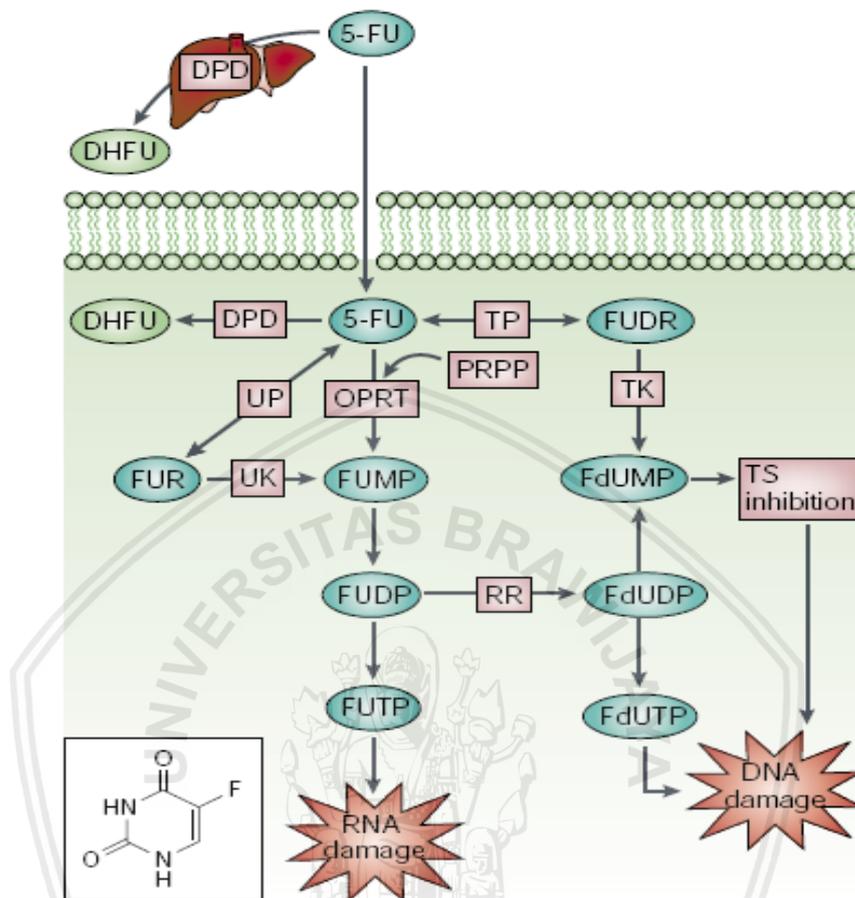
Integrin diketahui memiliki keterkaitan dalam berbagai tipe kanker. integrin dan *integrin-dependent* memberikan pengaruh pada perkembangan kanker, termasuk juga dalam inisiasi dan proliferasi kanker, serta invasi sel kanker baik secara lokal maupun vascular. Integrin juga berperan dalam pertahanan hidup sel kanker serta metastasis sel kanker. Pada perkembangan sel kanker, integrin memberikan peranan melalui meningkatkan gen matriks metalloproteinase dan memfasilitasi aktivasi protease serta fungsi reseptor pada permukaan matriks ekstrasel (ECM). Integrin mampu mengaktivasi reseptor yang berperan dalam molekul adesi, seperti *Focal adhesion kinase* (FAK) sehingga sel kanker akan melekat pada jaringan (Hamidi and Ivaska, 2018). Sejak penemuannya pada tahun 1980an, integrin telah menjadi reseptor utama yang terlibat dalam sel adesi dan respon sinyal sel, serta berbagai fungsinya dalam tumorigenesis. Melalui ikatannya dengan ECM, integrin memfasilitasi sel kanker dalam proses proliferasi, migrasi, dan berbagai proses lainnya. Ligan integrin akan berikatan dengan jaringan aktin melalui talin dan protein penghubung dari sitoskeleton yang menyebabkan integrin mampu mengaktivasi FAK dan *SRC family kinase* (SFKs). Gabungan antara aktin sitoskeleton dan sinyal kinase akan memberikan respon pro-mitogenik atau *pro-survival* dan menghasilkan transkripsi dari jalur-jalur tersebut yang meliputi jalur Ras-ERK, PI3K/AKT, dan YAP/TAZ. Aktivasi dari sinyal-sinyal tersebut berperan dalam pertahanan dan proliferasi sel, begitu pula pada sel kanker (Cooper and Giancotti, 2019).

## 2.6 5-FU (5-Fluorouracil)

*Fluorouracil* merupakan salah satu agen terapi yang banyak digunakan dalam kemoterapi kanker, khususnya Kanker Kolorektal. 5-FU membentuk suatu proses anabolik yang mengganggu fungsi DNA dan RNA dan bersifat sitotoksik pada level sel (Chintal *et al.*, 2011). 5-FU merupakan antimetabolik kemoterapi yang memiliki bentuk metabolit aktif yaitu FdUMP (*Fluorodeoxyuridine monophosphate*) dan FUTP (*fluorouridine triphosphate*) yang bekerja dengan mengganggu sintesis RNA dan sintase *thymidylate*. Sebagai agen kemoterapi, 5-FU juga memiliki efek yang luas tidak hanya pada sel kanker, melainkan juga pada sel sehat. Efek samping yang sering ditimbulkan oleh 5-FU antara lain yaitu: diare, mual, muntah, *mouth sores*, penurunan nafsu makan, *photosensitivity*, *metallic taste*, *neutropenia*, dan *trombositopenia*. Efek samping lain yang dapat muncul

meliputi perubahan warna kulit, gangguan dermatologi, *alopecia*, perubahan pada kuku, serta *hand-foot syndrome*. Efek serius yang dapat ditimbulkan oleh 5-FU yaitu hiperammonemia atau *encephalopathy* serta gangguan neurologis. Oleh sebab itu saat ini penggunaan 5-FU sebagai agen kemoterapi seringkali dikombinasikan dengan obat lain, seperti *leucovorin* yang bekerja sinergis dengan 5-FU atau *methotrexate* yang bekerja antagonis dengan 5-FU (Thomas *et al.*, 2016). Efek toksitas 5-FU umumnya beragam pada setiap individu, akan tetapi pada penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya diketahui bahwa pada pasien Kanker Kolorektal, pemberian 5-FU dapat menyebabkan toksisitas yang tinggi pada dosis  $> 38.94 \text{ mg}^* \text{h/L}$  (Fang *et al.*, 2016).

5-FU merupakan obat kemoterapi yang memiliki analog dengan *uracil* dan dapat masuk ke dalam sel dengan menggunakan mekanisme yang serupa dengan *uracil*. Di dalam sel, 5-FU akan dikonversi menjadi beberapa bentuk metabolit aktif yaitu *fluorodeoxyuridine triphosphate* (FdUTP), *fluorouridine triphosphate* (FUTP), dan *fluorodeoxyuridine monophosphate* (FdUMP). Ketiga hasil metabolit ini merupakan metabolit aktif yang memiliki kemampuan untuk merusak sintesis RNA dan DNA, serta menghambat aksi *thymidylate synthase* (TS). Secara umum, hampir 80% 5-FU dikatabolisme di hepar melalui enzim *dihydropyrimidine dehydrogenase* (DPD), yang mana akan mengkonversikan 5-FU menjadi *dihydrofluorouracil* (DHFU). Mekanisme 5-FU seperti yang tampak pada **Gambar 2.16** merupakan mekanisme yang melibatkan beberapa jalur mekanisme dengan hasil akhir adalah kerusakan RNA dan DNA (Longley *et al.*, 2003).



**Gambar 2.16 Mekanisme Metabolisme 5-FU.** 5-FU akan dikonversikan menjadi tiga bentuk metabolit aktif, yaitu FdUMP, FdUTP, dan FUTP. Mekanisme utama dari proses aktivasi 5-FU adalah proses konversi *fluorouridine monophosphate* (FUMP), baik melalui mekanisme langsung dengan *orotate phosphoribosyltransferase* (OPRT) atau melalui mekanisme tidak langsung dengan *fluorouridine* (FUR). FUMP akan terfosforilasi menjadi *fluorouridine diphosphate* (FUDP) yang selanjutnya akan terfosforilasi menjadi metabolit aktif FUTP atau terkonversi menjadi FdUDP. 5-FU juga dapat dikonversikan menjadi *fluorodeoxyuridine* (FUDR) melalui jalur alternatif yang kemudian akan terfosforilasi oleh *thymidine kinase* (TK) menjadi FdUMP (Longley *et al*, 2003).

Pada kemoterapi kanker, 5-FU bekerja sebagai agen antikanker melalui hambatan terhadap *thymidylate synthase* (TS) oleh FdUMP. Hal inilah yang diketahui sebagai mekanisme utama 5-FU sebagai sitotoksik. FdUMP terbentuk sebagai suatu hasil dari aktivitas produk gen *thymidine phosphorylase* (TYMP) dan *thymidine kinase* (TK). 5-FU juga diketahui dapat membentuk metabolit aktif lainnya berupa *5-fluorouridine monophosphate* (FUMP) melalui mekanisme



langsung yang melibatkan OPRT yang merupakan gen produk dari *uridine monophosphate synthase* (UMPS), atau melalui mekanisme tidak langsung yang melibatkan *uridine phosphorylase 1* dan *uridine kinase* (UCK2). FUMP diketahui sebagai prekursor dari pembentukan metabolit sitotoksik lainnya, yaitu *deoxyuridine triphosphate* (dUTP) dan *5-fluorouridine triphosphate*. Kedua hasil metabolit ini diketahui bersifat sitotoksik dan apabila mengikat DNA, maka akan terjadi *misincorporation* dari DNA dan RNA yang menyebabkan DNA serta RNA tidak dapat diperbaiki selama proses sintesis dan *repair*. Selain itu, *5-fluorouridine triphosphate* juga dapat mengikat RNA yang berbeda-beda dan mengganggu metabolisme seluler dari RNA sehingga menyebabkan kematian sel (Muhale *et al.*, 2011). Pada terapi kanker, 5-Fu juga diketahui memiliki target yaitu integrin, dimana 5-FU diketahui dapat menurunkan mobilitas dan aktivitas dari integrin sehingga terjadi penurunan invasi dan proliferasi sel kanker.

## 2.7 Coelomic Fluid

*Coelomic fluid* (CFL) merupakan komponen cairan yang terdapat dalam rongga tubuh dari cacing. Cairan ini berisi berbagai macam sel yang disebut *coelomocytes* yang ditransportasikan keseluruh tubuh cacing melalui kanal yang terdapat di antara segmen-segmen tubuh dari cacing. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menyebutkan bahwa CFL pada cacing tanah memiliki lebih dari 40 macam protein yang memiliki sifat sitolitik, proteolitik, anti-mikroba, hemolitik, hemaglutinasi, tumorolitik, serta memiliki aktivitas mitogenik (Bilej *et al.*, 2013). *Coelomic fluid* memiliki peranan sebagai bentuk pertahanan tubuh cacing dari berbagai macam kondisi serta berperan juga sebagai mekanisme sistem imun alami bagi cacing (Kauschke *et al.*, 2007). *Coelomic fluid* disekresikan oleh cacing untuk menjaga kelembapan dan membantu aktivitas fisiologis dari cacing seperti dalam proses respirasi. CFL terdiri dari cairan matriks yang mengandung *coelomocytes* dan berperan dalam membentuk pertahanan alami cacing. Molekul pertahanan ini terdiferensiasi menjadi beberapa tipe, diantaranya adalah *amoebocytes*, *mucocytes*, *circular cells*, dan *chloragogen cells*. Keempat tipe ini memiliki bentuk dan ukuran yang berbeda-beda serta menjalankan fungsi yang berbeda pula. Beberapa fungsi sel-sel tersebut antara lain sebagai tekanan tubuh, pengeluaran cairan, respirasi kulit, memproduksi cairan pertahanan terhadap

predator, regenerasi, menyalurkan nutrisi di dalam tubuh, dan sebagai bentuk mekanisme pertahanan di dalam dan di luar tubuh (Patil and Biradar, 2017).

CFL dari cacing tanah telah banyak digunakan dalam pengobatan tradisional cina, akan tetapi penelitian yang terkini telah menemukan pemanfaatan CFL sebagai anti-kanker. Penelitian yang dilakukan menggunakan CFL dari *Eisenia fetida* menunjukkan kemampuan CFL dalam menginduksi apoptosis pada sel HeLa secara *in-vitro*. CFL dari cacing tanah diketahui mampu menghambat berbagai fungsi biologis dan berperan sebagai bakteriostatik, proteolitik, sitolitik, dan mitogenik (Dinesh *et al.*, 2013). Komponen anti-kanker pada CFL telah dilaporkan mampu menghambat proliferasi pada sel HeLa dan sel LTEP-A2. CFL diketahui mampu menyebabkan kematian dari sel-sel tersebut melalui hambatan pada viabilitas sel dan menyebabkan apoptosis. Efek sitotoksik dari CFL juga telah dilaporkan mampu melawan sel HeLa, sel Kanker Kolon, sel tumor ganas WBC dan sel tumor otak (Fiolka *et al.*, 2019). Efek toksik CFL secara *in-vivo* sendiri belum banyak diketahui, akan tetapi efek toksik CFL pada hewan vertebratae pernah dilakukan oleh Kobayashi *et al* (2001). Dalam penelitian ditunjukkan bahwa pemberian CFL dosis >150 µl/kg BB memberikan efek letal pada mencit apabila diberikan secara *i.v*, akan tetapi dosis 1000 µl/kg BB tetap aman apabila diberikan secara *i.p*, *s.c*, atau *p.o* (Kobayashi *et al.*, 2001).

## 2.8 *Lumbricus rubellus*

*Lumbricus rubellus* merupakan jenis cacing tanah yang saat ini mulai dikembangkan sebagai salah satu alternatif pengobatan tradisional. Di Cina, cacing ini telah banyak digunakan sebagai obat tradisional, khususnya sebagai pengobatan suportif untuk relaksasi otot dan tonifikasi sistem saraf simpatis serta suplemen untuk penyakit pencernaan (Praba and Shatya, 2014). *Lumbricus rubellus* dikenal juga dengan sebutan *angle worm*, *leaf worm*, *red wiggler*, atau *red worm*. Cacing ini banyak ditemui di Hutan *Coniferous* dan berasal dari Eropa yang kemudian mulai dikenalkan ke daerah Amerika Utara. Cacing ini mudah sekali tumbuh pada tanah yang memiliki kelembapan dan kepadatan yang tinggi, seperti dibawah akar pepohonan (ISSG, 2011).

### 2.8.1 Taksonomi

Cacing *Lumbricus rubellus* merupakan salah satu *earthworm* dari spesies *Lumbricus* yang memiliki banyak manfaat. Taksonomi dari cacing ini adalah:

Kingdom	: Animalia
Sub kingdom	: Metazoa
Filum	: Annelida
Kelas	: Oligochaeta
Ordo	: Haplotaxida
Sub Ordo	: Lumbricina
Family	: Lumbricidae
Genus	: <i>Lumbricus</i>
Spesies	: <i>Lumbricus rubellus</i> (Wulandari, 2010).

*Lumbricus rubellus* merupakan *earthworm* yang secara umum memiliki morfologi yang hampir serupa dengan *earthworm* yang lainnya, yaitu; tubuh bersegmen pada bagian luar dan dalam, terdapat sedikit rambut pada bagian luar, tidak memiliki rangka luar, tidak memiliki mata, dan terdapat kutikula pada bagian luar tubuhnya. *Lumbricus rubellus* memiliki *prostomium* yang merupakan saraf sensorik yang juga bersifat sebagai mata bagi hewan ini. *Lumbricus rubellus* sangat sensitif terhadap sinar matahari sehingga hewan ini dapat langsung mati apabila terpapar sinar matahari (Earthworm, 2009). Cacing *Lumbricus rubellus* memiliki panjang 60-130 mm dengan diameter sekitar 3-4 mm dan jumlah segmen berkisar antara 100-120 ruas. Cacing ini berbentuk silinder dengan bagian *posterior* yang sedikit datar atau pipih (**Gambar 2.17**). Cacing ini merupakan jenis cacing hemaprodit yang memiliki bagian ujung kepala berwarna merah keunguan yang akan semakin memudar ke arah *posterior* (Greiner *et al.*, 2012).



**Gambar 2.17 *Lumbricus rubellus* (Earthworm, 2009)**

Sebagai *earthworm* yang mudah ditemukan dimana saja, *Lumbricus rubellus* memiliki banyak sekali manfaat baik bagi lingkungan maupun bagi

kesehatan. *Lumbricus rubellus* memiliki kandungan protein sebesar 64-76%, lemak 7-10%, kalsium 0,55%, fosfor 1%, fiber 1,08%, serta *auxin* yang merupakan bahan aktif yang dapat digunakan sebagai perangsang pertumbuhan pada tanaman. *Lumbricus rubellus* juga terdiri dari 9 macam asam amino esensial dan 4 macam asam amino esensial. Dalam kesehatan, *Lumbricus rubellus* memiliki berbagai manfaat yang menguntungkan diantaranya memiliki potensi anti-bakteri, dan anti-inflamasi. Selain itu, *Lumbricus rubellus* juga diketahui mengandung enzim yang berperan dalam aktivitas fibrinolitik yaitu *lumbrokinase*, *lumbofebrin*, *lumbrocin I*, dan enzim-enzim lain seperti: *peroksidase*, *catalase*, dan *selulose* yang juga dapat dimanfaatkan sebagai potensi terapeutik. *Lumbricus rubellus* juga memiliki kandungan lain berupa asam arakhidonat yang diketahui mampu menurunkan demam akibat infeksi (Wulandari, 2010).

*Earthworm* telah banyak diketahui memiliki potensi sebagai terapi untuk berbagai penyakit. Ekstrak *earthworm* telah banyak direkomendasikan sebagai suplemen kesehatan untuk menjaga kesehatan hepar dan darah serta menangani berbagai masalah kesehatan lainnya. *Earthworm* juga diketahui memiliki berbagai manfaat terapi seperti pada gangguan darah, sebagai anti-inflamasi, anti-mikroba, menyembuhkan luka, anti-oksidan, dan lain sebagainya. *Lumbricus rubellus* juga merupakan *earthworm* yang memiliki manfaat tersebut. Sebagai efek fibronolitik, *Lumbricus rubellus* menghasilkan *serine protease* yang juga diketahui memiliki efek sitotoksik dan aktivitas anti-kanker (Verma *et al.*, 2013). Sebagai anti-oksidan, *Lumbricus rubellus* memiliki komponen fenolik yang mampu menetralkan radikal bebas melalui gugus hidroksilnya. Selain itu, pada beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa *Lumbricus rubellus* mampu menurunkan nilai MDA dan 8-OHdG yang merupakan prekursor dari radikal bebas. Komponen enzim fibrinolitik, *polyphenol*, *G-90 glycoprotein* yang mengandung *serine phosphate*, *insulin like growth factor*, *epidermal growth factor*, serta *immunoglobulin growth factor* yang juga diketahui mampu bermanfaat sebagai pro-apoptosis, anti-koagulan, anti-*ischemia*, anti-inflamasi, anti-thrombosis, anti-oksidan, serta mediator untuk regenerasi jaringan dan *wound healing* (Aldarraj *et al.*, 2013; Samatra *et al.*, 2017).

### **2.8.2 Potensi *Lumbricus rubellus* sebagai Terapi Kanker**

Cacing tanah, salah satunya adalah *Lumbricus rubellus*, saat ini telah banyak dikembangkan dalam terapi menggunakan bahan alam, khususnya yang saat ini sedang banyak diteliti adalah kemampuannya sebagai anti-kanker. Cacing

ini diketahui memiliki potensi sebagai anti-kanker melalui kemampuannya sebagai pro-apoptosis bagi sel kanker. Salah satu komponen pada cacing tanah yang diketahui memiliki potensi sebagai anti-kanker adalah *coelomic fluid* yang terdapat pada cacing tanah. *Coelomic fluid* merupakan cairan yang berada di dalam rongga lapisan mesenkim dari tubuh cacing tanah. *Coelomic fluid* ini diketahui mengandung beberapa enzim dan protein seperti fibrinolitik enzim dan *lysenin* yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai anti kanker. *Coelomic fluid* ini juga diketahui mampu menghambat pertumbuhan sel tumor dan merangsang terjadinya apoptosis pada sel kanker (Vidya *et al*, 2016).

## 2.9 *Lysenin*

*Lysenin* merupakan salah satu protein yang terdapat dalam *coelomic fluid* cacing tanah atau yang juga dikenal sebagai *pore-forming protein*. Umumnya, *pore-forming protein* akan berikatan dengan lipid atau protein lainnya untuk mengenali membran target. Protein ini akan membentuk *oligomer* pada permukaan *bilayer* membran untuk selanjutnya masuk menembus membran. Dalam proses ini, protein tersebut harus membentuk suatu struktur dan mengkonversikan molekul mereka menjadi bentuk yang stabil sehingga mampu menembus membran. *Lysenin* sendiri, merupakan *pore-forming protein* yang banyak ditemukan pada cacing tanah dan secara spesifik berinteraksi dengan *spingomyelin* (SM) serta dapat berperan bersama sistem imun *innate* untuk melawan parasit dengan merusak membran selnya. Struktur kristal dari *lysenin* dan kompleks yang terbentuk bersama *spingomyelin* diketahui mampu menghasilkan interaksi yang dapat dimanfaatkan sebagai terapi. *Lysenin* diketahui mampu mengenali *spingomyelin* dan mengaktivasi *spingomyelin* (Colibus *et al.*, 2012).

Pengikatan *sphingomyelin* dan *lysenin* dan pengikatan membran yang efektif membutuhkan partisipasi dari lima dari enam residu *triptofan* tersebar di seluruh polipeptida serta reseptor FcγRIIA pada membran berperan sebagai molekul reseptor dan pensinyalan terfosforilasi yang mengindikasikan aktivasi *sphingomyelin* dan *lysenin* (Kulma *et al.*, 2012) dengan memproduksi hasil metabolisme yaitu *ceramide*. *Ceramide* sendiri merupakan *sphingolipid* yang juga dikenal sebagai mediator *lipid* yang banyak berperan dalam induksi kematian sel, diferensiasi, migrasi, proliferasi *autophagy* dan berbagai mekanisme fungsi sel

yang lainnya (Taniguchi and Okazaki, 2013). Beberapa penelitian juga menunjukkan pemberian *ceramide* pada Kanker Kolorektal mampu menurunkan ekspresi dari integrin yang merupakan reseptor permukaan sel sehingga menurunkan adesi seluler (Morad *et al*, 2016).

## 2.10 Cell line HT29

Sel HT-29 merupakan *colorectal cancer cell line* yang berasal dari manusia. Sel ini merupakan *colorectal adenocarcinoma* yang diperoleh dari wanita berbangsa Caucasian berusia 44 tahun pada tahun 1964 oleh J.Fogh melalui metode *explant culture*. Sel lin HT-29 memiliki kariotipe nomor 71 dengan *range* antara 68 hingga 72. Sel line ini memiliki nomor kromosom *stem line* hipertriploid dengan komponen 2S pada 2,4%. Pada tahap *metaphase*, terdapat beberapa marker kromosom yang dapat ditemukan yaitu: M1p-(=t(3p-;?)) dengan delesi lengan pendek, t(7q;?), t(10q;?), i(13q), 19q+a; M6, ?t(8q;9q-), ?Xp, M9, 6q+, t(13;?)a, t(13;?)b, 19q+b, M14, M15, 15p+, dan Xq-. Pada sel HT-29 ini, kromosom 13 merupakan *nullisomic* sedangkan kromosom 8 dan 14 merupakan *monosomic*. Selain itu pada sel ini tidak ditemukan adanya kromosom Y (Anonym, 2012).

Sel HT-29 akan tumbuh membentuk sel berlapis (*multilayer*) yang non-polar dan *undifferentiated* fenotip, serta secara fungsional tidak menunjukkan karakteristik tertentu dari sel usus, tetapi mengekspresikan sedikit *hydrolase*. Meskipun demikian, sel ini dapat menunjukkan karakteristik dari sel usus yang matang seperti sebagai enterosit atau sel penghasil *mucus*. Sel HT-29 hidup dengan mengonsumsi banyak glukosa, sehingga dalam pembiakannya membutuhkan medium dengan konsentrasi glukosa yang tinggi (glukosa 25 mM dan 10% serum). Sel HT-29 dipertimbangkan sebagai *cell line* usus yang *pluripotent* dan mampu dimodulasi untuk mengekspresikan berbagai jalur diferensiasi enterosit apabila ditumbuhkan dalam medium kultur yang tepat. Diferensiasi dari sel ini akan muncul setelah 15 hari pertumbuhan, dimana sel akan mulai membentuk *monolayer* dengan jarak antar sel rapat serta tampak *brush border* yang mengandung protein yang banyak ditemukan pada mikrovili usus (Martinez *et al.*, 2015).

Sel line HT-29 memiliki beberapa ekspresi antigen seperti golongan darah A, RH+, HLAA1, A3, B17, B12, dan Cw5. Selain itu sel ini juga dapat menunjukkan ekspresi reseptor *human adrenergic alpha2A*, *urokinase receptor* (u-PAR), vitamin

D, *myc* +, *ras* +, *myb* +, *fos* +, *sis* +, *p53* +, *abl* -, *ros* -, dan *src* -. Sel line HT-29 merupakan sel line yang memiliki sifat *adherent* atau menempel pada medium dan dapat berdiferensiasi dengan baik pada mencit (*nude mice*) serta menunjukkan koloni primer (*grade I*) (Anonym, 2012).

HT-29 merupakan *human colorectal adenocarcinoma cell line* dengan morfologi epitelial dan sensitif terhadap obat kemoterapi seperti 5-*fluorouracil* dan oxaliplatin. Sel HT-29 seringkali digunakan dalam studi *in-vitro* melalui model tumor *xenograf* untuk melihat berbagai mekanisme kanker seperti *absorbs*, *transport*, dan sekresi oleh sel usus. Pada medium kultur standar, sel HT-29 bersifat non-polar dan dapat membentuk *undifferentiated multilayer* (Nautiyal *et al.*, 2011).

### 2.11 Metode Induksi Kanker

Dalam penelitian kanker, selain pemilihan hewan coba, yang perlu untuk diperhatikan adalah pemilihan metode pembuatan hewan model kanker. Dengan semakin berkembangnya IPTEK, metode pembuatan hewan model kanker yang dapat digunakan saat ini cukup beraneka ragam. Metode-metode ini tidak hanya meliputi induksi zat karsinogenik maupun radiasi, melainkan juga implant dan rekayasa genetika. Secara umum, prinsip metode pembuatan hewan model kanker adalah menginduksi hewan coba dengan bahan karsinogenik, yang dapat berupa sel dan jaringan kanker, ataupun zat kimia yang bersifat karsinogenik, dengan tujuan menumbuhkan kanker pada hewan coba tersebut yang hampir serupa dengan kanker pada manusia. Pada **Tabel 2.2** selanjutnya akan disajikan beberapa metode pembuatan hewan model kanker (Navale, 2013).

**Tabel 2.2.** Metode Pembuatan Hewan Model Kanker (Navale, 2013)

Metode	Hewan coba	Cara kerja	Contoh kanker
<b>Spontaneous tumor model</b>	Mencit atau <i>inbred strain</i>	Penumbuhan alami	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leukemia</li> <li>• kanker mammae</li> <li>• <i>pulmonary adenoma</i></li> <li>• <i>hepatoma</i></li> </ul>
<b>Virus induced tumor model</b>	Mice	Injeksi <i>homogenate</i> tumor, implantasi bagian atau sel inokulasi tumor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Friend leukemia, rous sarcoma</i></li> </ul>

<b>Radiation induced tumor</b>	<i>Hairless mouse</i>	Paparan radiasi UV dalam dosis tertentu (bisa dikombinasikan dengan pemberian zat karsinogenik)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• UV induced skin tumor untuk skin papilloma</li> <li>• Two stages model skin tumor (dengan kombinasi karsinogen)</li> </ul>
<b>Chemically induced tumor</b>	Tikus atau mencit	Pemberian secara injeksi (lebih banyak secara subkutan/sc) senyawa polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) seperti: benzo[a]pyrene, dibenz[a,h]anthracene, and 3-methylcholanthrene	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMBA (9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracen) untuk kanker mammae</li> <li>• DMAB (3,2-dimethyl-4-aminobiphenyl) untuk kanker kolon</li> <li>• 3,4,9,10 Dibenzopyrene untuk fibrosarcoma</li> </ul>
<b>Transplantable tumor</b>	Tikus atau mencit	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Heterotopic transplant</i>: transplantasi sel atau jaringan tumor pada tempat selain asal tumor itu tumbuh</li> <li>• <i>Orthotopic transplantation</i>: transplantasi sel atau jaringan tumor sesuai dengan tempat tumor itu tumbuh.</li> <li>• <i>Syngenic model</i>: menggunakan mouse atau rat cancer cell line yang ditransplan ke inbred animal dengan background genetic yang</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• carcinoma ditransplan ip atau sc</li> <li>• sel tumor paru ditransplantasi ke organ paru</li> <li>• Leukemia 1210 cell diimplan pada DBA/2 mouse (sc)</li> <li>• Lewis Lung Carcinoma (jaringan paru) ditransplan pada C57BL/6 mouse (sc)</li> <li>• Ehrlich Ascites Carcinoma ditranplan pada female albino mouse (ip)</li> </ul>



<p><b>Genetically Engineered Mouse Models (GEMs)</b></p>	<p><i>Transgenic mice</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mencit diinjeksi dengan gen asing melalui <i>microinjection retroviral infection</i> atau <i>embryonal stem cell (ESC)</i></li> </ul>	<p>sama dengan asal <i>cell line</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Xenograft model</i>: transplasi human tumor ke <i>nude</i> atau <i>SCID mice</i></li> <li>• <i>CX-1 colon (human colon cancer cell line)</i> ditransplan pada <i>nude mice</i> untuk <i>adenocarcinoma colon</i></li> <li>• <i>LX-1 Lung</i> ditransplan pada <i>nude mice</i> untuk <i>lung carcinoma</i></li> <li>• <i>MX-1 mammary</i> ditransplan pada <i>nude mice</i> untuk <i>mammary carcinoma</i></li> </ul>
	<p><i>Knockout mice</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mencit yang tidak memiliki kedua alel untuk gen yang spesifik (allel dihilangkan)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>TRAMP</i>: sebagai model kanker prostat (memiliki antigen SV40 tumor)</li> <li>• <i>P53+/-Wnt-1</i> : sebagai model <i>mammary tumor</i> (disilangkan dengan <i>MMTV-Wnt-1 transgenik mice</i>)</li> <li>• <i>Apc deficient</i>: sebagai model kanker kolon (memiliki mutasi <i>Apc/adenomatous polyposis coli</i>)</li> <li>• <i>Nkx 3.1</i>: sebagai model kanker prostat (tidak memiliki gen <i>Nkx 3.1</i> yang merupakan <i>prostate specific tumor suppressor gen</i>)</li> <li>• <i>Homozygous p53</i>: sebagai model <i>lypoma</i> (delesi p53)</li> <li>• <i>Brca1 conditional</i> : sebagai model <i>mammary tumor</i> (delesi <i>Brca1</i>)</li> </ul>

Setiap metode pembuatan hewan model, tentunya memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing. Oleh sebab itu, pemilihan metode induksi dalam penelitian kanker harus terlebih dahulu memperhatikan apakah metode yang akan kita lakukan dapat memberikan hasil sesuai dengan target penelitian yang

dilakukan, serta aman untuk dilakukan. Berikut ini akan disajikan beberapa contoh deskripsi mengenai hewan model kanker.

a. GEMM (*Genetically engineered mouse models*)

Merupakan jenis hewan coba berupa mencit yang telah direkayasa secara genetik dengan menghilangkan (*knockout*) atau menambahkan (*knock-in*) materi genetik tertentu menggunakan alat molekuler (CRISPR/Cas9 atau TALENs) sehingga hewan coba tersebut memiliki sifat genetik yang menunjang dan menstimulus pembentukan kanker. Perubahan genetik yang dilakukan dapat berupa merubah protein, jaringan, maupun keseluruhan property individu.

Kelebihan : memiliki beragam mekanisme molekuler dan metode pengiriman genetik, mudah diinduksi dan model yang stabil serta kondisional bergantung dengan kontrol yang dilakukan, memiliki sistem imun yang fungsional, dan tidak ada incompatibilitas dalam spesiesnya.

Batasan : memerlukan waktu yang lama untuk menumbuhkan kanker, mahal, *genetic heterogeneity*, ekspresi gen dan fenotip yang diproduksi hanya sedikit, *off-target effect* dan memiliki kemungkinan untuk terjadinya mutasi pada salah satu protein (Landgraf *et al.*, 2012).

b. CDX (*cell-line derived xenograft*) dan PDX (*patient-derived xenograft*)

Merupakan metode pembuatan hewan coba dimana dilakukan implantasi atau injeksi sel manusia atau jaringan kanker ke dalam tubuh mencit *immunodeficient*. Karena metode ini dilakukan dengan menginduksikan *cell line*, maka seringkali sel tumor yang ditumbuhkan telah memiliki perbedaan sifat fenotip dengan sel kanker *parental* dan umumnya akan memberikan respon terapi yang berbeda. Sehingga pada metode ini, umumnya kematian terjadi akibat *metastasis*

Kelebihan : berbagai jenis *cell line* dapat digunakan untuk menumbuhkan berbagai jenis kanker dalam satu hewan coba, aplikasi dengan tingkat keberhasilan yang cukup baik, mudah dan cepat untuk dikembangkan, dapat dilakukan untuk pengobatan yang spesifik

Batasan : host harus *immunodeficient*, hanya bisa dilakukan dengan implantasi secara *ectopic* atau subkutan, *genetic heterogeneity* terbatas, memungkinkan terjadi alterasi genetik dan fenotip dari transplan di *host* (Landgraf *et al.*, 2012).

c. Humanized (*humanized mouse model* / HMM)

Merupakan metode yang melibatkan teknik *tissue engineering* (TE) dan *regenerative medicine* (RM) untuk menstabilkan lingkungan mikro di dalam tubuh mencit. Setelah sistem imun *humanized* stabil, maka akan terjadi seleksi melawan subset sel mencit untuk menjadi *graft versus host disease*, dan sistem *haematopoietic* yang mirip dengan manusia akan bekerja untuk merespon melawan sel kanker.

Kelebihan : dapat digunakan untuk mempelajari sistem imun manusia dan *microenvironment* dalam organ yang diinginkan, mengurangi *incompatibility* dalam spesies, *modular generation* dari *animal model* mudah dilakukan, aplikasi memberikan tingkat keberhasilan yang baik, dapat diterapkan pada *personalized medicine*.

Batasan : derajat humanisasi terbatas, butuh keahlian, memerlukan prosedur pembedahan yang cukup kompleks (Landgraf *et al.*, 2012).

d. *Radiation Induced Tumor Models (UV Radiation)*

Merupakan metode yang menggunakan paparan sinar UV pada hewan coba dengan dosis radiasi yang telah ditentukan sebelumnya. Metode ini terkadang dikombinasikan dengan bahan karsinogenik untuk menginduksi kanker dengan lebih cepat.

Kelebihan : biasa dilakukan untuk membuat model kanker kulit, dapat digunakan untuk memprediksi aktivitas antitumor secara umum, mudah untuk dilakukan

Batasan : radiasi yang dilakukan memiliki potensi berbahaya untuk peneliti, membutuhkan waktu paparan yang panjang, memerlukan *host* berupa *hairless mice* (Navale, 2013).

e. *Chemical Induced Tumor Models*

Induksi tumor menggunakan bahan kimia yang bersifat karsinogenik memiliki potensi kemiripan dengan awal mula terbentuknya kanker secara alami pada manusia. Metode ini dilakukan dengan menginduksikan zat karsinogenik pada tubuh hewan coba, sesuai dengan bagian atau daerah target kanker. Zat karsinogenik yang diberikan akan bereaksi terhadap RNA, DNA maupun protein seluler untuk menginduksi kanker.

- Kelebihan** : mekanisme pembentukan kanker mirip dengan mekanisme alami terbentuknya kanker pada manusia, mudah dilakukan, tidak memerlukan modifikasi genetik pada hewan coba,
- Batasan** : bahan yang digunakan juga bersifat karsinogenik untuk peneliti, efek karsinogenik bergantung dengan sifat kanker dan ketahanan hewan coba yang digunakan, bahan dengan cepat diekskresikan dan dimetabolisme dalam feses dan urin hewan coba (Navale, 2013).

Dari berbagai kelebihan dan kekurangan tiap-tiap metode pembuatan hewan coba tersebut, maka peneliti dapat menentukan metode mana yang lebih memiliki keuntungan untuk digunakan dalam penelitian dan lebih memberikan hasil yang maksimal sesuai dengan target penelitian.

## 2.12 Hewan Model Kanker

Hewan model kanker merupakan salah satu aspek yang diperlukan dalam penelitian kanker, yang mendukung untuk menginvestigasi dasar, translasional, serta aspek klinis dari biologi kanker. Melalui penggunaan animal model, kita bisa merekapitulasi penyakit, dan memberikan gambaran karakteristik genotip dan fenotip dari kanker yang tentunya akan membantu dalam pengamatan patogenesis kanker. Meskipun demikian, penggunaan *animal model* tidak secara sempurna menggambarkan kanker pada manusia. Adanya perbedaan sistem imunitas yang bekerja, serta *microinvironment* yang ada di dalam tubuh hewan coba terkadang menjadikan aplikasi terapi yang dilakukan pada hewan coba dan manusia menjadi berbeda. Akan tetapi, melalui animal model, sedikit banyak kita mampu memahami lebih jauh mengenai kanker (Gardaneh, 2017).

Pada tahun 1911, ayam memberikan informasi mengenai model yang paling awal untuk perkembangan dan penyebaran kanker yang selanjutnya dalam perkembangannya mulai dipelajari onkogenesis pada tikus, kelinci, ayam, primata, dan kuda. Saat ini, berbagai jenis hewan, termasuk kuda dan primata digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian kanker (Darling and Dolan, 2017). Penggunaan hewan sebagai model kanker terbagi menjadi beberapa kategori, yaitu:

- a. Hewan dimana kanker dapat terjadi secara spontan tanpa adanya alterasi dari gen hewan tersebut atau inisiasi kanker menggunakan bahan karsinogenik.

- b. Hewan yang mengalami gangguan secara genetik, sehingga kanker dapat tumbuh secara spontan dan memiliki tipe serta komponen yang sama dengan kanker yang terjadi pada manusia.
- c. Hewan yang menumbuhkan kanker secara spontan apabila diekspos oleh faktor lingkungan seperti bahan karsinogenik atau radiasi.
- d. Hewan yang masih alami, tanpa kerusakan genetic sehingga memfasilitasi peneliti untuk mengidentifikasi gen yang terlibat dalam pertumbuhan kanker.

Penggunaan hewan model untuk penelitian kanker bervariasi tergantung spesies dan ketersediaan reagen serta peralatan yang mendukung penelitian (Anonym, 2015). Beberapa hewan yang dapat digunakan dalam penelitian kanker antara lain dapat dilihat pada **Tabel 2.3**

**Tabel 2.3** Hewan Coba dalam Penelitian Kanker (Anonym, 2015).

Hewan	Jenis	Model	Keuntungan
Mencit	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Genetically altered mice</i> (ex: c-Myc)</li> <li>• <i>Inbred Mice</i> (ex: DBA, A, BALB, C3H, C57BL, CFW, SWR)</li> <li>• <i>Immune deficient strains</i> (<i>Nude</i>, SCID, NOD/SCID, NSB, NSG, NOG, RB)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Transplantation model (allograft, xenograft)</i></li> <li>• Induksi karsinogenik</li> <li>• Paparan radiasi (radiasi UV)</li> <li>• Pemberian <i>physical agonis</i> (ex: <i>asbestos fibers</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Berukuran kecil</li> <li>• Tidak membutuhkan banyak tempat untuk pemeliharaan</li> <li>• Manifestasi penyakit konsisten</li> <li>• Mudah di-handle</li> <li>• Mudah didapat</li> <li>• Memiliki kemiripan yang tinggi secara biologis dengan genetik manusia</li> </ul>
Tikus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Rattus norvegicus</i></li> <li>• <i>Wistar</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Chemical mutagenesis</i></li> <li>• <i>Insersi mutagenesis</i></li> <li>• <i>Transgenic</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ukuran lebih besar sehingga pengamatan lebih mudah</li> <li>• Mudah mendapatkan sampel darah</li> <li>• Dapat digunakan untuk uji farmakologi, toksikologi, nutrisi, <i>behavior</i>, dll.</li> <li>• Lebih mudah untuk dimanipulasi</li> <li>• <i>Gen mapping</i> dan ekspresi mirip dengan manusia</li> </ul>



Hamster	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Syrian golden (Cricetus auratus dan Cricetus griserus)</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Model oral <i>carcinogenesis</i></li> <li>• Model <i>lymphoma</i></li> <li>• Model <i>greene melanoma</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Memiliki proges dalam pemahaman mekanisme dan potensi terapi</li> <li>• Memberikan tambahan informasi genomik dan strategi transgenik</li> </ul>
Kelinci	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Oryctolagus cuniculus</i></li> <li>• <i>Sylvilagus floridanus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Transplantable tumor model (papilloma, liver cancer, oral cancer, lung cancer)</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meningkatkan pemahaman biologi</li> <li>• Bagus untuk pengembangan infrastruktur untuk model kanker</li> </ul>
Zebrafish	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Danio rerio</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diberikan perlakuan dengan komponen karsinogenik</li> <li>• Transplantasi <i>human cancerous cells</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Memiliki gen dan <i>pathway</i> yang <i>comparable</i> untuk memicu pertumbuhan sel abnormal</li> <li>• Mudah diamati</li> <li>• Memiliki informasi genetik, genomik, dan visualisasi yang telah banyak diketahui sehingga memudahkan penelitian</li> </ul>

Saat ini hewan coba yang paling sering digunakan dalam penelitian kanker adalah tikus atau mencit. Selama 50 tahun terakhir, tikus dan mencit mampu memberikan keuntungan bagi pengetahuan dan meningkatkan pemahaman terhadap kanker. Berbagai penemuan telah diaplikasikan untuk pengembangan *animal model* kanker dan sebagai hasilnya telah diperoleh beberapa tipe hewan coba yang dapat digunakan sebagai *animal model* kanker (Tabel 2.4).

**Tabel 2.4.** *Animal Model* dalam Kanker (Gardaneh, 2017)

Model	Host	Transplant	Produksi	Keterangan
<i>Ectopic xenografs</i>	<i>Syngeneic atau immune-compromised rodent host</i>	<i>Tumor-derived cell lines, jaringan tumor</i>	Injeksi: <i>Subcutan (s.c)</i> <i>Intraperitoneal (ip)</i> <i>Intravena (iv)</i> <i>Intramuskular (im)</i>	
<i>Orthotopic</i>	<i>Immune-compromised Rodent host</i>	<i>Tumor-derived cell lines, jaringan tumor</i>	Implantasi pada organ atau jaringan	Baik untuk memproduksi interaksi antar sel dan lingkungan

				untuk perkembangan tumor
<i>Germ-line transgenic And conditional transgenic models (GEMMs)</i>	<i>Rodents</i>	Vector ekspresi gen	Metodelogi transgenik	Target onkogen atau <i>tumor suppressor gen</i> bisa diregulasi secara sistematis
<i>Primary human tumor graft</i>	<i>Immune-compromised animal</i>	Fragmen primer dari human tumor atau sel tumor	Implantasi langsung atau bertahap	Menjaga sifat genotip dan fenotip dari parental tumor
<i>Carcinogen-induced model</i>	<i>Immune-compromised animal</i>	Agen karsinogenik (dapat diberikan tunggal maupun kombinasi) Contoh: <i>Benzoaphyren DMBA</i>	Injeksi	Untuk merekapitulasi perkembangan patogenesis tumor sebagai respon dari lingkungan yang karsinogenik.

Penggunaan mencit sebagai *animal model* kanker yang paling sering ini dikarenakan mencit atau tikus memiliki kemiripan gambaran fisiologis dan patologi sel serta jaringan dengan yang dimiliki manusia dengan tingkat kemiripan sebesar 99%. Kemiripan tersebut juga meliputi sifat yang homolog dari sistem saraf, kardiovaskular, endokrin, sistem imun, muskuloskeletal, serta organ interna meskipun pada beberapa aspek, seperti biologi tumor, interaksi microenvironment, respon obat dan resistensi terapi mungkin masih memiliki perbedaan apabila dibandingkan dengan kanker pada manusia (Landgraf *et al.*, 2012). Oleh sebab itu, saat ini banyak dikembangkan jenis mencit yang telah mengalami modifikasi secara genetik sehingga dapat lebih sempurna untuk menggambarkan kanker pada manusia (**Tabel 2.5**). Mencit ini umumnya telah dimodifikasi secara imunologis yang disebut dengan *Immune-compromised mice*, sehingga memiliki kondisi yang disesuaikan dengan target penelitian yang ingin diperoleh.

**Tabel 2.5.** Mencit *Immune-Compromised* yang Memproduksi Model Kanker (Gardaneh, 2017).

Mencit	Deskripsi
<i>Athymic nude mice</i> (Balb/c, CD-1, Nu/Nu)	Kekurangan thymus dan tidak mampu memproduksi sel T. Model ini dapat membawa mutasi tidak hanya pada nude gene tetapi juga pada <i>xid</i> yang memberikan efek terhadap maturasi <i>T-Independent B lymphocytes</i> , atau <i>beige</i> yang menyebabkan defeksi pada <i>natural killer (NK) cells</i> .
<i>SCID Mice</i>	Membawa berbagai kombinasi imunodefisiensi yang mempengaruhi sel limfosit B dan T, tetapi memiliki sel <i>natural killer (NK)</i> normal
<i>Nonobese diabetic (NOD)-SCID Mice</i>	Defisiensi sel T, sel B, dan sel NK
<i>Rag2-knockout mice</i>	Tidak memiliki <i>recombinant-activating gene 2</i>

Dalam penelitian kanker, peneliti umumnya menggunakan beragam variasi dan teknik untuk menghasilkan hewan model kanker yang sesuai dengan keperluan penelitian dan aplikasi. Beberapa teknik, seperti *inbreeding* telah banyak dilakukan selama bertahun-tahun. Selain *inbreeding*, metode lain seperti mengekspresikan gen asing pada hewan atau mengalterasi *germline* hewan juga dapat digunakan untuk memodifikasi *animal model* kanker. Pada beberapa spesies, dapat digunakan teknik untuk menentukan lokasi genomik pada hewan tersebut kemudian dilakukan modifikasi dan infestigasi. Pada spesies yang lain, peneliti dapat membiarkan tumbuh secara normal, untuk selanjutnya dilakukan berbagai metode untuk intervensi dan pengembangan di tempat lain sebagai cara untuk mempelajari dan menangani tumor tersebut (Anonym, 2015).

Berbagai jenis dan tipe hewan model telah tersedia untuk digunakan dalam penelitian kanker, dan setiap jenisnya memiliki kelebihan dan kekurangan sendiri-sendiri. Oleh sebab itu, meskipun penggunaan hewan model mampu memberikan gambaran mengenai mekanisme perkembangan maupun terapi kanker, akan tetapi seringkali hasil uji klinis memberikan hasil yang berbeda. Hal ini disebabkan karena hewan model tidak sepenuhnya merekapitulasi dasar biologi tumor, interaksi *microenvironment* tumor, respon obat, serta resistensi terapi dengan 100% sama persis pada kanker yang terjadi di manusia. Dengan demikian, dalam



pemilihan hewan model untuk terapi kanker, sebelumnya dapat diketahui lebih dahulu mengenai kelebihan dan kekurangan dari masing masing tipe hewan model.

### 2.13 *Balb/c mice*

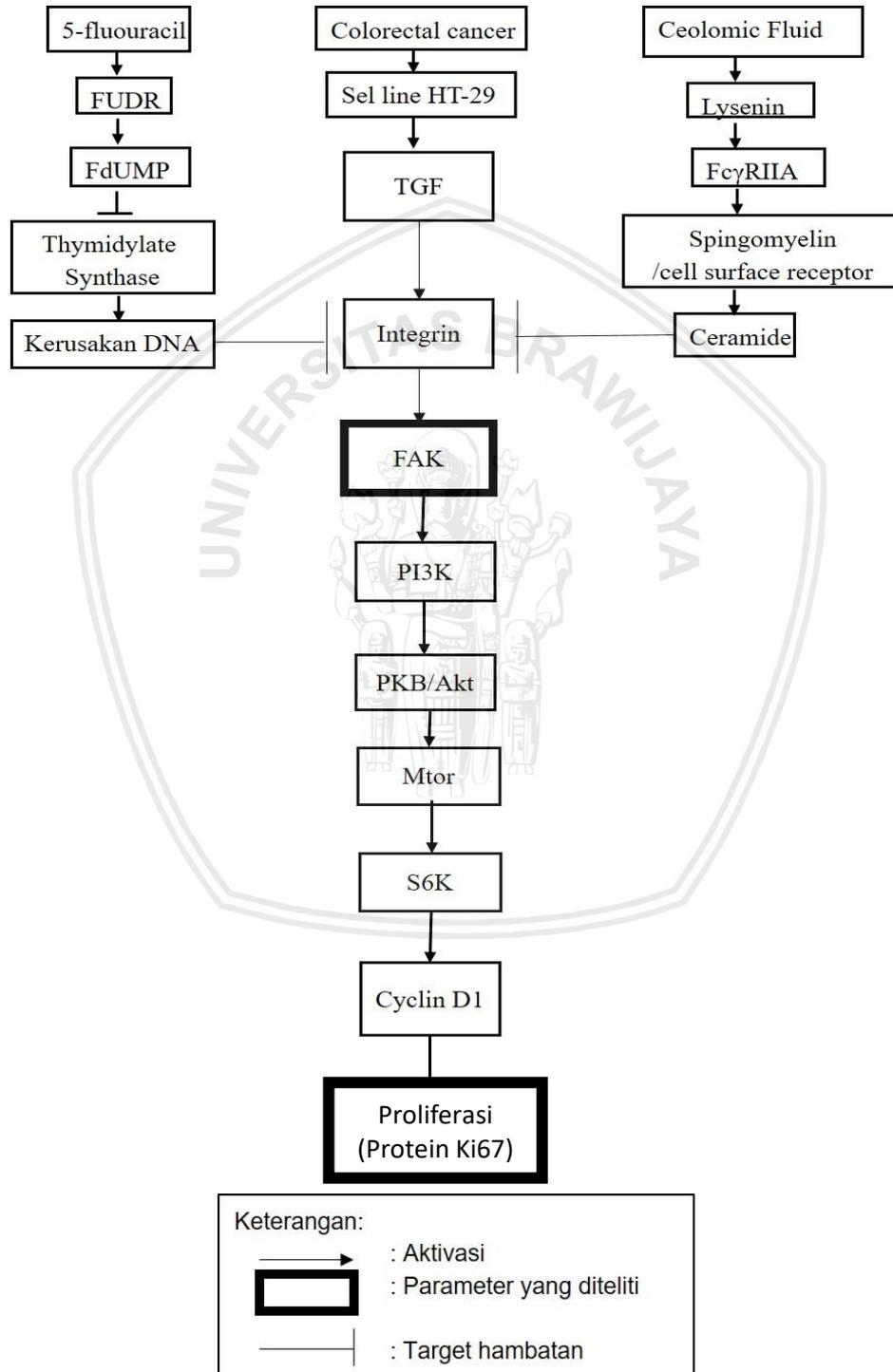
*Balb/c mice* merupakan salah satu strain mencit yang banyak digunakan dalam berbagai subjek penelitian seperti kardiovaskular, penuaan, dan studi farmakologi. *Balb/c mice* merupakan jenis mencit albino berukuran kecil yang pertama kali dikenalkan oleh H. Bagg pada tahun 1913 sehingga dikenal juga dengan nama "*Bagg albino*". Pada tahun 1923, mencit ini dikembangkan oleh MacDowell dari Cold Spring Harbor, NY, USA dan pada tahun 1932 diubah menjadi *Balb/c mice* (Anonym, 2016).

*Balb/c* atau *nude mice* dikembangkan melalui persilangan antar *nude gene*. *Balb/c mice* memiliki berat 20-22 g untuk betina dan 20-25 g untuk jantan. *Strain* ini memiliki *nomenclature* CBySmn.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/J (001803) merupakan jenis *homozygous* yang tidak memiliki sel T dan B dewasa. *Balb/c mice* seringkali digunakan sebagai *host xenograft* untuk sel kanker, pengujian efisiensi terapi antibodi, penelitian mengenai penyakit infeksius, dan sebagainya (Soper, 2015).

*Balb/c mice* memiliki usia hidup berkisar antara 15-22 bulan untuk jantan dan 20-24 bulan untuk betina. Mencit ini banyak digunakan dalam berbagai penelitian onkologi dan farmakologi seperti contohnya penelitian mengenai: ulcer kulit, tumor, alergi, respon imun terhadap infeksi, reaksi toksisitas pada jantung dan paru, infeksi bakteri dan virus, dan transplantasi organ atau tumor. *Balb/c mice* juga memiliki performa reproduksi yang baik dan masa reproduktif yang lama (Anonym, 2016).

**BAB III**  
**KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA**

**3.1 Kerangka Konsep**



**Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian**

Induksi *cell line* HT-29 pada mencit akan menginduksi terjadinya pertumbuhan Kanker Kolorektal melalui aktivasi *Tumor growth factor* (TGF). Aktivasi dari TGF ini akan memberikan stimulus pada integrin yang akan mengaktifkan *Focal Adhesion Kinase* (FAK). Aktivasi dari FAK selanjutnya akan menstimulus aktivasi *cyclin D1* untuk meningkatkan proliferasi sel melalui aktivasi sinyal P13K dalam jalur sinyal P13K/Akt. Aktivasi jalur ini telah diketahui terlibat dalam berbagai respon seluler, salah satunya respon seluler terhadap pertumbuhan kanker. Aktivasi P13K/Akt akan mengaktifkan sinyal mTOR dan membentuk kompleks. mTOR selanjutnya akan mengaktifkan faktor translasi *ribosomal S6 kinase* (S6K) menuju ke ribosom dan menstimulus terjadinya proliferasi sel melalui aktivasi *cyclin D1*.

Pemberian kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid* dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* pada mencit yang diinduksi *cell line* HT-29 akan menghambat proliferasi sel melalui jalur intrinstik yang menyebabkan kerusakan DNA yang akan merusak integrin sehingga menghambat mobilitas dan aktivitas integrin. Paparan 5-*Fluorouracil* pada tubuh mencit akan dimetabolisme dan dikonversikan melalui jalur alternatif dari 5-FU menjadi *fluorodeoxyuridine* (FdUR) yang selanjutnya akan difosforilasi oleh *thymidine kinase* (TK) menjadi *fluorodeoxyuridine monophosphate* (FdUMP). FdUMP merupakan metabolit aktif yang akan mengganggu sintesis DNA melalui ikatannya pada *nucleotide-binding site* dari *thymidylate synthase* (TS) dan membentuk *ternary complex* yang stabil dengan bantuan enzim dan  $\text{CH}_2\text{THF}$ . Kompleks ini akan menyebabkan *blocking* pada ikatan TS sehingga menghambat TS untuk mensintesis *deoxythymidine monophosphate* (dTMP) sehingga replikasi dan *repair* DNA tidak terjadi. Hal ini akan menyebabkan ketidak seimbangan *deoxynucleotide pool* (dNTP) serta meningkatkan *deoxyuridine triphosphate* (dUTP) yang dapat menyebabkan kerusakan DNA. Kerusakan DNA merusak integrin sel sehingga terjadi hambatan mobilitas dan aktivasi dari integrin yang berpengaruh terhadap penurunan ekspresi FAK serta hambatan proliferasi sel. Kombinasi dengan *coelomic fluid* diharapkan akan membantu menurunkan proliferasi sel yang terjadi pada Kanker Kolorektal.

*Lysenin* yang terdapat pada *coelomic fluid* dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* diketahui akan berikatan secara langsung dengan *spingomyelin* (SM) yang merupakan reseptor permukaan sel. *Lysenin* akan berikatan dengan reseptor *FcyRIIA* pada membran sel dan kemudian memecah *spingomyelin* dan

menghasilkan suatu produk metabolit yaitu *ceramide*. *Ceramide* kemudian akan meregulasi dan menurunkan ekspresi integrin sehingga diharapkan terjadi penurunan ekspresi FAK serta hambatan proliferasi sel.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan latar belakang, tinjauan pustaka, serta kerangka konsep, maka dapat dibuat hipotesis sebagai berikut:

Hipotesis umum dari penelitian ini adalah pemberian kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid Lumbricus rubellus* mampu berperan sebagai anti-proliferasi dan mempengaruhi ekspresi FAK pada mencit yang diinduksi sel HT-29.

Sedangkan hipotesis khusus yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Terapi kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid Lumbricus rubellus* mampu menurunkan proliferasi sel pada mencit yang diinduksi Sel HT-29.
2. Terapi kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid Lumbricus rubellus* mampu menurunkan ekspresi FAK pada mencit yang diinduksi Sel HT-29.
3. Terdapat korelasi antara ekspresi FAK dan proliferasi sel pada jaringan kolon mencit diinduksi sel HT-29.

## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif eksperimental murni yang menggunakan metode *in-vivo* melalui induksi sel line HT-29 pada mencit *Balb/c* yang diterapi dengan kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid Lumbricus rubellus*. Rancangan penelitian menggunakan *post test only control group* dimana peneliti mengukur pengaruh perlakuan atau intervensi yang terdapat pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok eksperimen dengan kelompok kontrol.

Dalam penelitian ini terdiri dari tujuh kelompok yaitu:

1. Kelompok kontrol negatif (K-): Merupakan kelompok kontrol tanpa perlakuan.
2. Kelompok kontrol positif (K+): Merupakan mencit yang diinduksi HT-29
3. Kelompok Perlakuan 1 (5-FU): Merupakan kelompok yang diinduksi HT-29 dan diterapi dengan kombinasi 5-FU 50 µg/g BB
4. Kelompok Perlakuan 2 (D1): Merupakan kelompok yang diinduksi HT-29 dan diterapi dengan 5-FU serta *coelomic fluid* dosis 50 µg/g BB.
5. Kelompok Perlakuan 3 (D2): Merupakan kelompok yang diinduksi HT-29 dan diterapi dengan 5-FU serta *coelomic fluid* dosis 100 µg/g BB.
6. Kelompok Perlakuan 4 (D3): Merupakan kelompok yang diinduksi HT-29 dan diterapi dengan 5-FU serta *coelomic fluid* dosis 200 µg/g BB.
7. Kelompok Perlakuan 5 (C): Merupakan kelompok yang diinduksi HT-29 dan diterapi dengan *coelomic fluid* dosis 200 µg/g BB.

Jumlah sampel dalam penelitian ditentukan melalui rumus dimana rumus yang digunakan untuk menghitung jumlah sampel sesuai dengan rumus dalam Supranto (2000) yaitu sebagai berikut:

Diketahui : Jumlah perlakuan = 7

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

$$(7-1) (r-1) \geq 15$$

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

$$6r \geq 21$$

$$r \geq 3.5, \text{ Jumlah pengulangan} = 3 \text{ atau } 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut maka jumlah ulangan yang didapatkan minimal 3 kali sehingga sampel total yang diperlukan adalah 21 hewan coba dengan rincian untuk satu kelompok terdiri dari 3 hewan coba.

## **4.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

### **4.2.1 Waktu penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan, dimulai dari bulan Agustus hingga November 2018.

### **4.2.2 Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

## **4.3 Variabel Penelitian**

### **4.3.1 Variabel bebas**

Variabel bebas dari penelitian ini adalah kombinasi 5-Fu dan *coelomic fluid Lumbricus rubellus* yang diberikan pada mencit *Balb/c* yang diinduksi *cell line HT-29*.

### **4.3.2 Variabel terikat**

Variabel terikat dari penelitian ini adalah proliferasi sel dan ekspresi FAK

### **4.3.3 Variabel kontrol**

Variabel kontrol dari penelitian ini adalah mencit *Balb/c* yang diinduksi *cell line HT-29*

## **4.4 Definisi operasional**

### **4.4.1 Mencit *Balb/c***

Mencit yang digunakan adalah jenis *Balb/c* betina usia 8-10 minggu dengan berat 20-25 gram yang diperoleh dari Pusvetma Surabaya yang dipelihara dengan kelembapan 50-55% dengan kondisi *light-dark cycle* (12:12 jam). Mencit diberi pakan standar pellet dan minum *ad libitum*, serta diperlakukan sesuai dengan standar dari *Guiding principle for care and use of animals for scientific purpose in the institutional animal care and use committee* (IACUC) serta persetujuan laik etik dari komisi etik Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.4.2 Kultur Cell Line HT-29

Kultur *cell line* HT-29 yang digunakan merupakan sel *human adenocarcinoma*, dan diperoleh dari *American Type Culture Collection (ATCC® HTB38™, USA)* dan telah dilakukan kultur sel di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sesuai metode dari ATCC (2012).

#### 4.4.3 *Lumbricus rubellus*

*Lumbricus rubellus* merupakan cacing tanah yang diperoleh dari CV. Rumah Alam Jaya Organik Malang.

#### 4.4.4 5-FU

Sebagai obat standar kemoterapi kanker *colorectal* digunakan obat 5-FU (5-Fluorouracil) yang diperoleh dari Sigma-Aldrich, USA dan diberikan dengan dosis 50 mg/kg BB (Tao *et al.*, 2010).

#### 4.4.5 *Coelomic fluid*

*Coelomic fluid* yang berasal dari cacing *Lumbricus rubellus* didapatkan melalui metode *heat* dan *cold shock* yang sesuai dengan prosedur yang telah dilakukan oleh Dinesh *et al.*, (2013). Selanjutnya dilakukan pengenceran *coelomic fluid* dilakukan sesuai dengan rumus :

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

Keterangan :

V1 = Volume larutan yang akan diencerkan (ml)

M1 = Konsentrasi *coelomic fluid* yang tersedia (%)

V2 = Volume larutan (air + *coelomic fluid*) yang diinginkan (ml)

M2 = konsentrasi *coelomic fluid* yang akan dibuat (%)

#### 4.4.6 Proliferasi Sel

Pengamatan dilakukan dengan menggunakan metode *indirect immunofluorescence* pada jaringan kolon. Proliferasi sel diamati melalui marker proliferasi sel yaitu protein Ki67 menggunakan antibodi *monoclonal anti mouse Ki67 (BioLegend, USA)* dan pewarna *fluorescence* FITC. Hasil yang ditunjukkan berupa warna *fluorescence* hijau pada nukleus sel epitel kolon.

#### 4.4.7 Ekspresi FAK

FAK atau *Focal Adhesion Kinase* merupakan protein adhesi yang memfasilitasi proliferasi dan adesi dari sel kanker. Pengujian ekspresi FAK pada jaringan kolon dilakukan dengan *direct Immunofluorescence*. Antibodi yang

digunakan adalah *antibody primer mouse igG1k C-Terminal (h) FAK antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)* yang telah dilabel dengan pewarna *fluorescence FITC*. Hasil FAK memberikan warna hijau yang tampak pada sitoplasma sel epitel kolon.

#### 4.4.8 Pewarnaan *Immunofluorescence*

Metode *immunofluorescence* dilakukan untuk melihat besar ekspresi dari protein yang diamati, yaitu Protein KI67 dan FAK. Metode ini dilakukan melalui pewarnaan preparat jaringan dengan antibodi yang telah terlabel dengan pewarna *fluorescence*. Ikatan antara antigen dan antibodi pada jaringan akan menghasilkan pendaran warna *fluorescence* yang dapat diamati menggunakan mikroskop *fluorescence*. Pendaran warna yang muncul merupakan ekspresi dari protein yang diinginkan. Besar persentase dari protein yang diamati selanjutnya akan dihitung menggunakan *software* pada lima lapang pandang yang kemudian akan dirata-rata untuk memperoleh hasil akhir.

### 4.5 Alat dan Bahan

#### 4.5.1 Kultur sel HT-29

##### 4.5.1.1 Alat

Mikropipet, *ependorf tube*, mikrotip, mesin sentrifus, tabung sentrifus 15 ml dan 50ml, botol medium 100 ml and 1000 ml, lemari pendingin -20°C, inkubator CO<sup>2</sup>, *24-well plate cultur sel*, laminar air flow (LAF), lemari pendingin suhu 4°C, *flask*, bunsen spiritus, korek, filter 0.2 µl, dan *syringe* 10 ml.

##### 4.5.1.2 Bahan

*Cell line HT-29*, *fetal bovine serum (FBS)*, *phosphat buffer saline (PBS)*, *McCOY'S 5A Medium (Sigma Aldrict, USA)*, *sodium hidrogen bicarbonat (NaHCO<sub>3</sub>)*, 5% CO<sup>2</sup>, *steril water* 1 liter, *trypsin EDTA*, *amphotericin* dan *penicillin/streptomycin*.

#### 4.5.2 Pengambilan *ceolomic fluid Lumbricus rubellus* dengan cara *heat and cold-shock*

##### 4.5.2.1 Alat

Kertas saring, pinset, mikrotip, termometer, mesin sentrifus, mikropipet, *ependorf tube*, *electric water heater*, gelas *beaker*, plastik, kotak plastik makanan, penyaring, serta lemari pendingin -20 °C.

#### 4.5.2.2 Bahan

Cacing tanah *Lumbricus rubellus*, PBS, *aquades* dan *ice pack*.

#### 4.5.3 Induksi *Cell line* HT-29 pada Mencit Balb/c

##### 4.5.3.1 Alat

Mikropipet, mikrotip, *eppendorff*, *syringe* 1 cc,

##### 4.5.3.2 Bahan

*Cell line* HT-29 (ATCC® HTB38™, USA), Mencit *Balb/c* betina, *ketamine*, PBS, *azoxymethane* (AOM), *dextran sodium sulfate* (DSS) 5%

#### 4.5.4 Terapi 5-FU dan *Coelomic Fluid*

##### 4.5.4.1 Alat

*Syringe* 1 cc, kapas

##### 4.5.4.2 Bahan

5-FU, *coelomic fluid*, mencit *Balb/c*, alkohol

#### 4.5.5 Pengamatan FAK dan Proliferasi dengan *Immunofluorescence*

##### 4.5.5.1 Alat

Mikropipet, mikrotip, *coverslip*, *humidified chamber*, *water bath*, mikroskop *fluorescent*.

##### 4.5.5.2 Bahan

Organ kolon mencit (kelompok kontrol, kelompok yang diinduksi sel HT-29, serta kelompok terapi yang diberi paparan 5-FU dan *coelomic fluid*) yang telah di-*embedding* dalam parafin, *antibodi mouse igG1k C-Terminal (h) FAK antibody* (*Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA*) berlabel FITC, Antibodi primer *monoclonal anti mouse Ki67* (*BioLegend, USA*), antibodi sekunder berlabel FITC, DAPI (*BioLegend, USA*) PBS, *Paraformaldehyde* (PFA) 10%, *Xylol* 1 dan 2, *Ethanol absolut* 1 dan 2, *ethanol* bertingkat (95%, 80%, dan 70%), *Buffer sitrat* pH 6 ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2$  2,94 g, *Aquades* 1 L, 0,5 ml Tween 20), 3% *blocking buffer* (3% BSA, 0,25% Triton-X, PBS), dan gliserol.

#### 4.6 Prosedur Kerja

##### 4.6.1 Aklimatisasi Hewan Uji

Persiapan hewan coba dilakukan dengan melakukan proses adaptasi terhadap lingkungan laboratorium selama 1 minggu. Kandang yang digunakan dari plastik yang berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm dan di beri penutup dari kawat.

Pakan yang diberikan adalah pakan standar dan minum *ad-libitum* pada semua mencit. Dilakukan penimbangan pada mencit. Mencit dibagi dalam 7(tujuh) kelompok perlakuan.

#### 4.6.2 Pembuatan medium kultur Sel HT-29 dalam 500 ml (Anonym, 2012)

Bahan yang digunakan dalam medium kultur ditimbang dengan jumlah masing-masing yaitu *McCOY'S 5A Medium* (*Sigma-Aldrich, USA*) sebanyak 5.59 gram,  $\text{NaHCO}_3$  (Sodium bikarbonat) sebanyak 1,1 gram. Bahan yang sudah ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam gelas ukur 500 ml dan ditambahkan  $\text{H}_2\text{O}$  steril hingga 500 ml. Larutan kemudian dihomogenkan hingga warna medium terlihat bening dan selanjutnya disteril dengan cara difilter menggunakan filter 20  $\mu\text{m}$  (*Biotech-Minisart®, USA*) dan dilakukan dalam LAF (*Laminar Air Flow*). Medium kemudian dibagi menjadi 5 pada gelas ukur 100 ml masing- masing berisi medium 100 ml setelah itu *medium stock* disimpan pada suhu 4°C.

#### 4.6.3 Thawing dan sub-culture (Anonym, 2012)

Medium komplit disiapkan melalui *medium stock McCOY'S* yang ditambahkan dengan FBS sebanyak 10% (v/v) serta ditambahkan antibiotik dan antijamur. Vial yang berisi *cell line* beku dikeluarkan dari nitrogen cair, dan di-*thawing* di dalam *waterbath* pada suhu 35-37°C selama 2-3 menit di dalam tabung sentrifus 15 ml. Selanjutnya, sel yang diperoleh diambil sebanyak 1 ml menggunakan mikropipet dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifus yang telah berisi 9 ml medium komplit. Sel kemudian dicampur dengan cara *pipetting* dan tabung berisi sel dan medium disentrifus pada 800rpm pada suhu ruang selama 8-10 menit. Selanjutnya supernatan yang dihasilkan dibuang dan pelet disisakan. Pellet ini merupakan sel HT-29 yang menempel pada dasar tabung. Kemudian ditambahkan 9 ml medium komplit dan 1 ml FBS pada tabung tersebut. Larutan kemudian diresuspensi dengan cara *pipetting* dan suspensi yang didapat kemudian dipindah dalam *flask*. *Flask* diinkubasi pada suhu 37 °C dalam 5%  $\text{CO}_2$ , hingga sel mencapai konfluen sekitar 80%.

Kultur diamati secara langsung dengan mikroskop *inverted* untuk dilakukan pemeriksaan bahwa kultur bebas dari kontaminasi dan mencapai konfluens dan apabila medium berubah warna menjadi *orange* / kuning maka medium harus diganti.

#### **4.6.4 Induksi *cell line* HT-29 pada mencit *Balb/c* (Endharti *et al*, 2016 dan Takahashi *et al*, 2004).**

Metode pembuatan Kanker Kolorektal dilakukan menggunakan induksi *cell line* HT-29 secara *transanal* yang sesuai dengan modifikasi metode milik Endharti *et al* (2016) dan Takahashi *et al* (2004). Metode pembuatan hewan model Kanker Kolorektal dengan induksi *cell line* dilakukan dengan pemberian air minum yang mengandung 3% DSS (*ICN Biomedical Inc, CA, USA*). Induksi *cell line* dilakukan dengan cara mencit dianestesi dengan *ketamine* dan diposisikan dengan kepala di bawah kemudian *cell line* HT-29 sebanyak 26 sel ( $1-2 \times 10^6$  sel/mencit) diinjeksikan pada mukosa kolon secara *transanal* menggunakan *syringe* 1 cc yang dimasukkan  $\pm 2$  cm ke dalam anus mencit. Selanjutnya mencit dibiarkan pada posisinya selama  $\pm 30$  menit untuk mencegah kebocoran. Sel HT-29 kemudian dibiarkan berkembang selama 4 minggu untuk selanjutnya dilakukan terapi pada mencit.

#### **4.6.5 Metode Konfirmasi Peneguhan Telah terjadi Kanker (Ontario, 2009)**

Konfirmasi pembentukan kanker pada kolon mencit dilakukan setelah 4 minggu *pasca* induksi *cell line* HT-29. Uji konfirmasi dilakukan dengan pengujian *Fecal Occult Blood Test* (FOBT) untuk melihat adanya darah pada feses dan pemeriksaan histopatologi jaringan kolon untuk melihat kemungkinan telah terbentuknya sel kanker. Metode ini diharapkan dapat mampu menjadi perwakilan diagnosa awal pertumbuhan sel kanker pada kolon mencit.

#### **4.6.6 Pengambilan *coelomic fluid Lumbricus rubellus* dengan cara *cold-and heat shock* (Dinesh *et al.*, 2013)**

Pengambilan *coelomic fluid* dilakukan dengan menimbang cacing sebanyak 15 gram dengan pinset kemudian diletakkan diatas saringan dan dicuci hingga bersih menggunakan air mengalir secara terus menerus hingga kotoran yang menyelimuti cacing hilang. Selanjutnya cacing dimasukkan ke dalam kotak plastik yang sebelumnya telah diberi kertas saring agar air yang menyelimuti meresap, kemudian dipindahkan ke dalam kotak plastik yang baru untuk dilakukan kejutan *heat shock and cold shock*.

Proses *heat shock* dilakukan menggunakan air yang telah dipanaskan dalam *water heater* pada suhu antara 45-50°C, dan kemudian air dimasukkan dalam *beaker glass* 50 ml. Sedangkan untuk proses *cold shock* dilakukan menggunakan *ice pack* atau es batu. Proses *heat shock dan cold shock* dilakukan

secara bergantian dengan selang waktu 3 menit dan diulang hingga cacing kolaps. Proses *heat shock* dilakukan dengan cara meletakkan *beaker glass* yang telah diisi air di atas permukaan tubuh cacing tanah, sedangkan proses *cold shock* dilakukan dengan cara meletakkan *ice pack* atau es batu pada tubuh cacing tanah tersebut hingga cacing dan *ice pack* menyatu. *Ceolomic fluid* selanjutnya akan dilepaskan melalui pori-pori punggung pada tubuh cacing akibat "*heat dan cold shock*".

*Ceolomic fluid* yang tertampung selanjutnya dikumpulkan dalam *ependorf tube* steril menggunakan pipet. *Ceolomic fluid* kemudian ditambah dengan *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF) dan *amonium sulfat* 85%. Campuran tersebut diprespitasi agar terbentuk endapan dan disentrifugasi pada 15000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan supernatan. Supernatan yang dihasilkan kemudian difilter menggunakan filter 0.2  $\mu$ M serta diukur pada *nanodrop* untuk melihat konsentrasi protein dan filtrat disimpan dalam *aliquot* di suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk digunakan lebih lanjut.

#### **4.6.7 Pemberian 5-FU dan *coelomic fluid* pada mencit *Balb/c* (Tao et al., 2015).**

Pemberian 5-FU dan *coelomic fluid* dilakukan pada 4 minggu *post*-induksi HT-29 pada mencit *Balb/c* secara *intra peritoneal* (i.p) dengan menggunakan terapi 5-FU sebanyak 50 mg/g (Tao et al., 2015) BB dan *coelomic fluid* dengan 3 variasi dosis. Kelompok perlakuan dibagi seperti kelompok di bawah ini:

1. Kelompok dengan induksi *cell line* HT-29 dan terapi 5-FU dengan dosis 50  $\mu$ g /g BB (5-FU).
2. Kelompok dengan induksi *cell line* HT-29 dan terapi 5-FU dengan dosis 50  $\mu$ g /g BB serta *coelomic fluid* dosis 1, yaitu 50  $\mu$ g/g BB (D1).
3. Kelompok dengan induksi *cell line* HT-29 dan terapi terapi 5-FU dengan dosis 50  $\mu$ g /g BB serta *coelomic fluid* dosis 2, yaitu 100  $\mu$ g/g BB (D2).
4. Kelompok dengan induksi *cell line* HT-29 dan terapi terapi 5-FU dengan dosis 50  $\mu$ g /g BB serta *coelomic fluid* dosis 3, yaitu 200  $\mu$ g/g BB (D3)
5. Kelompok dengan induksi *cell line* HT-29 dan terapi *coelomic fluid* dosis 200  $\mu$ g/g BB (C).

Terapi diberikan 1x dalam seminggu dan dilakukan selama 4 minggu. Dan setelah 4 minggu, mencit dipuasakan untuk dilakukan pembedahan dan pengambilan organ.

#### 4.6.8 Pembedahan dan Pengambilan Organ (Williams *et al.*, 2016)

Mencit dianestesi dengan menggunakan metode *deep* anestesi melalui pemberian *ketamine* dengan dosis 22-44 mg/kg BB (Bramson and Wagner, 2016). Setelah tikus teranestesi, organ kolon dan rektum diisolasi dan disimpan dalam formalin 10% untuk selanjutnya digunakan untuk pemeriksaan lanjutan berupa pembuatan preparat untuk uji *immunofluorescence*. Pemotongan organ dilakukan pada bagian kolon *ascendant* atau kolon bagian atas.

#### 4.6.9 Pembuatan Preparat Jaringan (Prihantono *et al.*, 2017)

Organ kolon difiksasi pada PFA 10%. Kemudian dilakukan dehidrasi menggunakan etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95% dan *absolute*) masing-masing selama 60 menit. Setelah itu dilakukan *clearing* menggunakan *xylol* 1 dan *xylol* 2 kali masing-masing 60 menit. Selanjutnya dilakukan infiltrasi menggunakan *paraffin* cair lalu dilakukan *embending* pada blok *paraffin* dan didinginkan pada suhu 4°C. Organ dalam blok parafin kemudian dipotong 5µm menggunakan *rotary microtome* dengan posisi horizontal (memanjang). Potongan kemudian diletakkan pada objek *glass* yang telah ter-*coated Polysine* (*Biogear Microscope Slide*). Slide preparat kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit sebelum digunakan.

#### 4.6.10 Pewarnaan Histopatologi menggunakan Hematoksilin-eosin (Prihantono *et al.*, 2017)

Preparat jaringan yang telah disiapkan di-deparafinasi di dalam larutan *xylol* sebanyak 3 kali, masing-masing dilakukan selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan proses rehidrasi dengan merendam di dalam etanol bertingkat (*absolut*, 95%, 90%, 80%, dan 70%) masing-masing selama 10 menit. Preparat jaringan kemudian diwarnai menggunakan pewarna hematoksilin selama 5-10 menit dan selanjutnya dibilas dengan air mengalir hingga zat warna yang tidak menempel hilang. Preparat selanjutnya ditetesi larutan warna eosin dan dibiarkan selama 5-10 menit, kemudian dibilas dengan air hingga zat warna sisa hilang. Kemudian dilanjutkan dengan proses dehidrasi dengan merendam preparat jaringan ke dalam larutan etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95% dan *absolute*) masing-masing selama tidak lebih dari 5 detik. Proses dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan *xylol* sebanyak 3x, masing-masing 1-3 menit. Proses ini dinamakan *clearing*. Preparat kemudian dikering anginkan dan setelah preparat kering dilakukan proses mounting dan pelabelan.

#### 4.6.11 Pewarnaan Preparat jaringan dengan Metode *Immunofluorescent*

##### 4.6.11.1 Pewarnaan Ekspresi Proliferasi Sel (Protein Ki67) dengan *Indirect Immunofluorescent* (Cepeda, 2014).

Identifikasi Protein Ki67 pada jaringan kolon dilakukan dengan metode *direct immunofluorescence*. Langkah awal yaitu dengan deparafinasi jaringan kolon pada *xylol* 1 dan *xylol* 2, masing masing selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan proses rehidrasi pada *ethanol* absolut 1 dan 2, masing masing 10 menit dan kemudian dilanjutkan dengan perendaman pada *ethanol* bertingkat 95%, 80%, dan 70% masing masing selama 1 menit. Selanjutnya *slide* preparat dicuci menggunakan *aquades* selama 3x 1 menit. Setelah pencucian, *slide* kemudian dilanjutkan ke proses *antigen retrieval* dengan cara direndam dalam *buffer* sitrat dan dipanaskan dalam *water bath* suhu 95°C selama 20 menit. Selanjutnya *slide* dikeluarkan dan biarkan dingin di suhu ruang kurang lebih selama 20 menit dan dicuci dengan PBS 3x 1 menit. Proses kemudian dilakukan dengan proses *staining* dengan antibodi. Prosedur pertama yaitu *slide* diposisikan horizontal pada *chamber* kemudian ditetaskan 3% *blocking buffer* dan diinkubasi selama 30 menit. Pada metode ini diberikan dua antigen yaitu antigen primer dan antigen sekunder berlabel *fluorescence*. Pada metode ini, inkubasi antigen primer dilakukan dengan pemberian antibodi primer *monoclonal anti mouse Ki67* (*BioLegend, USA*) dalam PBS (perbandingan 1:100) dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam. *Slide* dengan PBS sebanyak 3x 1 menit. Proses kemudian dilanjutkan dengan inkubasi menggunakan antibodi sekunder *goat anti-mouse IgG* berlabel FITC (*Sigma*) dalam PBS (perbandingan 1:67) selama 1 jam pada suhu ruang di ruang gelap. *Slide* jaringan kemudian dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3x 1 menit. Proses kemudian dilanjutkan dengan pemberian DAPI selama 5 menit dan pencucian dengan PBS 3 x 1 menit. Selanjutnya dilakukan proses *mounting* dengan pemberian gliserol dan ditutup dengan *cover glass*.

##### 4.6.11.2 Pewarnaan Ekspresi FAK dengan Metode *Direct Immunofluorescent* (Cepeda, 2014).

Langkah *direct immunofluorescence* serupa dengan *indirect immunofluorescence*, tetapi dalam metode ini hanya digunakan satu antibodi yang sudah berlabel *fluorescence*. Inkubasi antigen dilakukan dengan menggunakan *mouse igG1k C-Terminal (h) FAK antibody* berlabel FITC (*Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA*) dalam *blocking buffer* (perbandingan 1:100) selama 2

jam pada suhu ruang di ruang gelap. *Slide* jaringan kemudian dicuci 3x1 menit dengan menggunakan PBS dan dilanjutkan dengan pemberian DAPI (pengenceran 1:1000 dengan PBS) selama 5 menit. *Slide* selanjutnya dicuci dengan PBS 3x 1 menit dan dikering anginkan hingga tidak ada cairan yang tersisa. Proses selanjutnya yaitu *mounting coverslip* dengan menggunakan gliserol untuk selanjutnya dilakukan pengamatan dengan mikroskop.

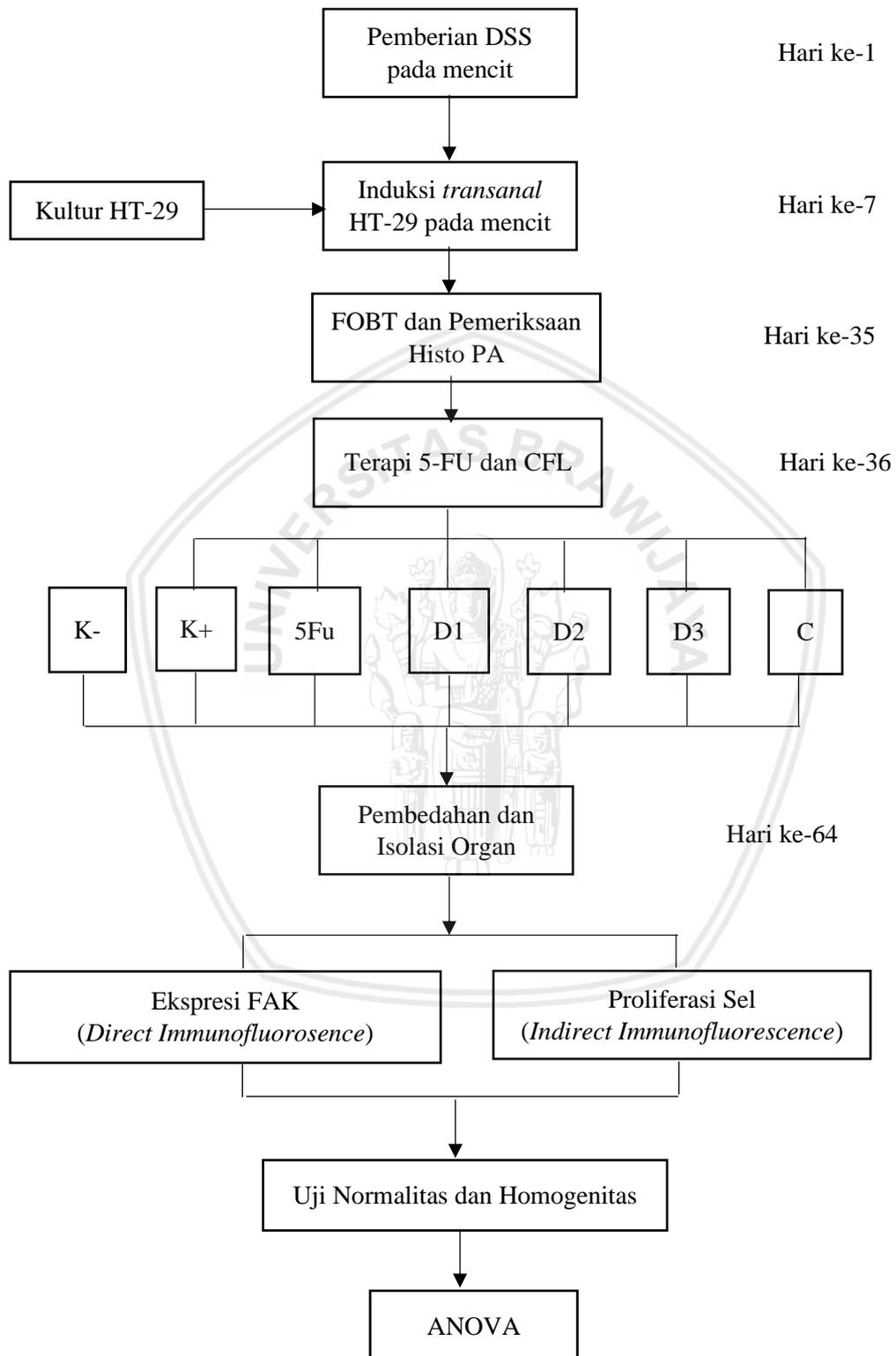
#### **4.6.12 Analisis Ekspresi Proliferasi sel (Protein Ki67) dan FAK (Schindelin, *at al.*, 2012)**

Ekspresi *fluorescence* yang menandakan ekspresi protein pada preparat jaringan yang telah diwarnai diamati menggunakan mikroskop *convocal fluorescence* dengan perbesaran 400x sebanyak lima lapang pandang. Pengamatan ekspresi proliferasi yang dimarker oleh Protein Ki67 dan ekspresi FAK akan tampak berpendar berwarna hijau. Ekspresi Protein Ki67 dapat diamati pada nukleus sel epitel kolon, sedangkan ekspresi FAK dapat diamati baik pada nukleus maupun sitoplasma sel epitel kolon. Ekspresi yang dihasilkan kemudian dihitung menggunakan Fiji *software* (Fiji-win32) dengan menghitung intensitas warna *fluorescence* yang dihasilkan pada jaringan.

#### **4.7 Analisis Data (Raharjo, 2003)**

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini adalah uji parametrik *One-way ANOVA* setelah memenuhi uji normalitas dan uji homogenitas data. Uji normalitas data menunjukkan bahwa sebaran data penelitian ini normal ( $p > 0,05$ ). Karena itu, untuk penyajian digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Uji homogenitas varian menunjukkan bahwa data yang diperoleh memiliki varian yang homogen ( $p = 0,05$ ). Selanjutnya dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan tiap kelompok. Analisis data menggunakan program SPSS 16.0 dengan derajat kepercayaan 95% dan  $\alpha = 0,05$ . Uji analisis dinyatakan signifikan apabila  $p < 0,05$ .

#### 4.8 Alur Penelitian

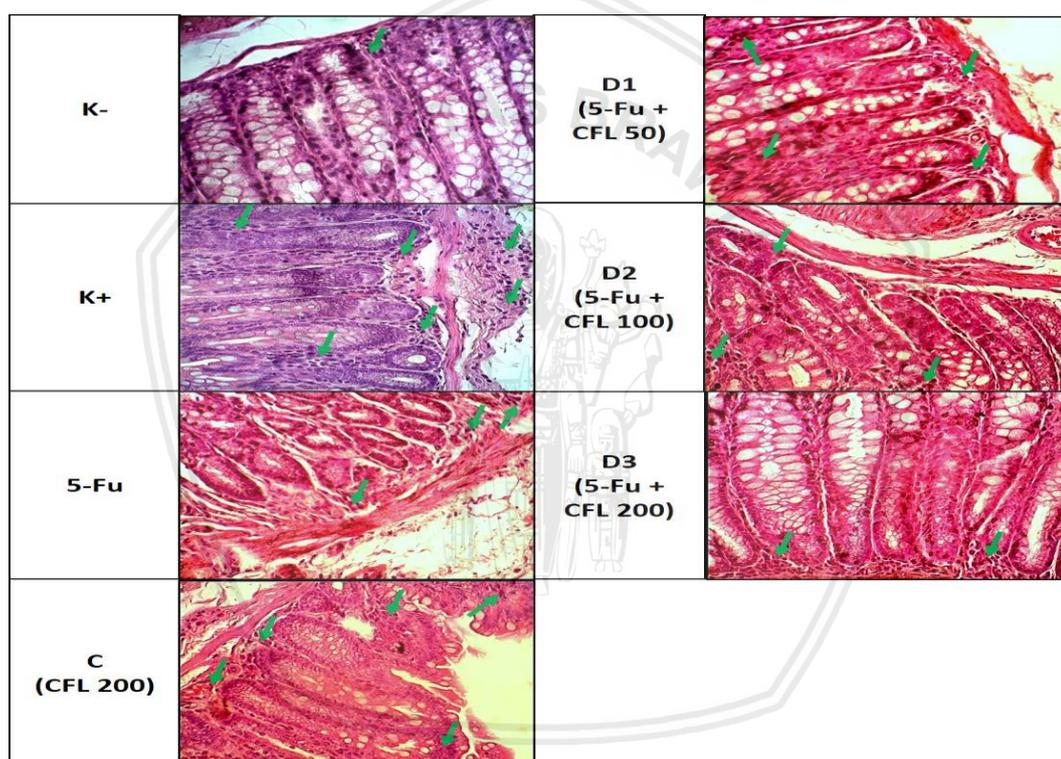


## BAB V

### HASIL

#### 5.1 Hasil Pemeriksaan Jaringan Kolon Mencit yang Diinduksi Sel HT-29

Pengamatan histopatologi dengan pewarnaan hematoksin-eosin pada jaringan kolon dilakukan sebagai bentuk peneguhan diagnosa yang menunjukkan perubahan setelah induksi sel HT-29 dan setelah pemberian terapi. Pengamatan histopatologi dilakukan pada setiap kelompok perlakuan seperti yang tampak pada **Gambar 5.1.**



**Gambar 5.1 Hasil Pemeriksaan Histopatologi Jaringan Kolon Mencit yang Diinduksi SEI HT-29.** Hasil pemeriksaan histopatologi (perbesaran 400x) pada setiap kelompok perlakuan menunjukkan penurunan sel radang pada jaringan kolon mencit yang ditunjukkan dengan tanda panah hijau (↙).

Keterangan: **K-** (tanpa perlakuan), **K+** (Diinduksi sel HT-29), **5-FU** (diterapi dengan 5-FU saja), **D1** (terapi 5-FU dan CFL dosis 50 µg/g), **D2** (terapi 5-FU dan CFL dosis 100 µg/g), **D3** (terapi 5-FU dan CFL dosis 200 µg/g), **C** (terapi CFL dosis 200 µg/g).

Hasil pengamatan menunjukkan adanya perubahan jumlah infiltrasi sel radang pada kelompok K+ (kontrol positif yang diinduksi sel HT-29) dengan kelompok perlakuan yang telah diterapi baik dengan dosis tunggal 5-FU atau CFL,

maupun dengan terapi kombinasi. Hasil pada **Gambar 5.1** menunjukkan adanya infiltrasi sel radang (panah hijau) yang cukup banyak dibandingkan dengan kelompok K- (mencit tanpa perlakuan). Pada kelompok perlakuan (D1, D2, D3, 5-FU, dan C) juga menunjukkan adanya infiltrasi sel radang meskipun tidak sebanyak pada kelompok K+. Hal ini menunjukkan adanya penurunan jumlah sel radang pada jaringan kolon mencit kelompok perlakuan (pasca terapi) apabila dibandingkan dengan mencit pada kelompok K+.

Peneguhan diagnosa pada mencit setelah diinduksi sel HT-29 juga dilakukan menggunakan pemeriksaan FOBT (*Fecal Occult Blood Test*). Pemeriksaan ini dilakukan menggunakan Kit FOBT untuk memeriksa adanya darah pada feses yang menandakan awal terjadinya colitis dan Kanker Kolorektal.

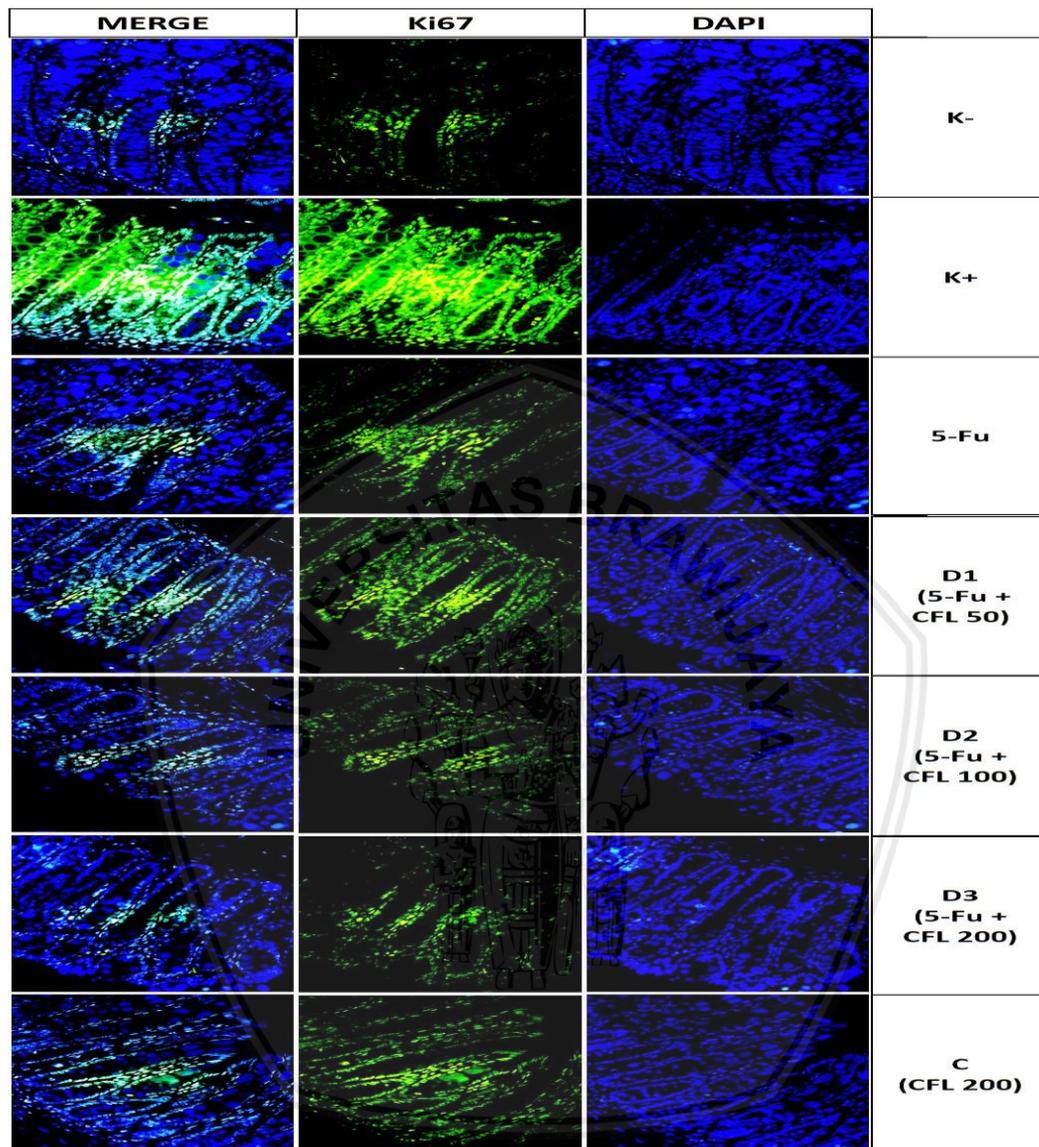


**Gambar 5.2 Hasil FOBT pada Feses Mencit yang Diinduksi Sel HT-29.** Hasil FOBT pada feses mencit kelompok K+ (yang diinduksi sel HT-29) menunjukkan warna biru (gambar kanan) pada kit yang dapat diartikan bahwa terdapat darah pada feses (hasil positif).

Hasil FOBT pada **Gambar 5.2** menunjukkan adanya warna kebiruan disekitar feses mencit kelompok K+ atau mencit yang diinduksi sel HT-29 (**Gambar 5.2** kanan), yang dapat diartikan bahwa terdapat darah pada feses mencit tersebut. Hal ini berbeda dengan feses pada mencit kelompok K- (tanpa perlakuan) yang tampak pada **Gambar 5.2** kiri, dimana pada hasil pemeriksaan kit FOBT tidak menunjukkan warna kebiruan dan dapat diartikan bahwa tidak ada darah pada feses tersebut.

## 5.2 Hasil Pengamatan Ekspresi Proliferasi di Jaringan Kolon Mencit yang Diinduksi Sel HT-29.

Pengamatan proliferasi (Protein Ki67) pada jaringan kolon mencit yang diinduksi sel HT-29 ini dilakukan dengan menggunakan metode *indirect immunofluorescence* melalui penggunaan antibodi primer dan antibodi sekunder yang telah terlabel dengan FITC.



**Gambar 5.3 Hasil *Immunofluorescence* Proliferasi pada Jaringan Kolon Mencit yang Diinduksi Sel HT-29.** Pengamatan dilakukan dengan mikroskop *convocal immunofluorescence* dengan perbesaran 400x. Hasil menunjukkan penurunan intensitas dan jumlah sel yang memancarkan *immunofluorescence* terjadi paling signifikan pada kelompok terapi kombinasi 5-Fu dan CFL.

Keterangan: **K-** (tanpa perlakuan), **K+** (Diinduksi sel HT-29), **5-FU** (diterapi dengan 5-FU saja), **D1** (terapi 5-FU dan CFL dosis 50 µg/g), **D2** (terapi 5-Fu dan CFL dosis 100 µg/g), **D3** (terapi 5-FU dan CFL dosis 200 µg/g), **C** (terapi CFL dosis 200 µg/g). DAPI menunjukkan inti sel. Merge merupakan penggabungan warna dari DAPI dan antibodi Ki67.

Hasil *immunofluorescence* yang dihasilkan dapat diamati pada **Gambar 5.3**. Warna hijau yang dihasilkan merupakan ekspresi dari antigen Protein Ki67 sedangkan warna biru merupakan inti sel yang terwarnai dengan DAPI. Kombinasi *merge* yang ditunjukkan pada **Gambar 5.3** menunjukkan gabungan antara warna hijau yang terdapat pada antigen Ki67 serta warna biru pada inti sel. Hal ini akan menunjukkan letak antigen dan membedakan lokasi antigen tersebut berada di nukleus atau di sitoplasma sel.

Ekspresi yang dihasilkan pada jaringan diatas selanjutnya dihitung menggunakan Fiji *software* dengan cara menghitung besar intensitas warna yang dihasilkan. Data dari lima lapang pandang selanjutnya dirata-rata berdasarkan jumlah ulang dan dianalisis menggunakan SPSS (**Lampiran 6**). Hasil perhitungan yang diperoleh dapat diamati pada **Tabel 5.1** di bawah ini.

**Tabel 5.1** Perhitungan Ekspresi Proliferasi pada Jaringan Kolon Mencit

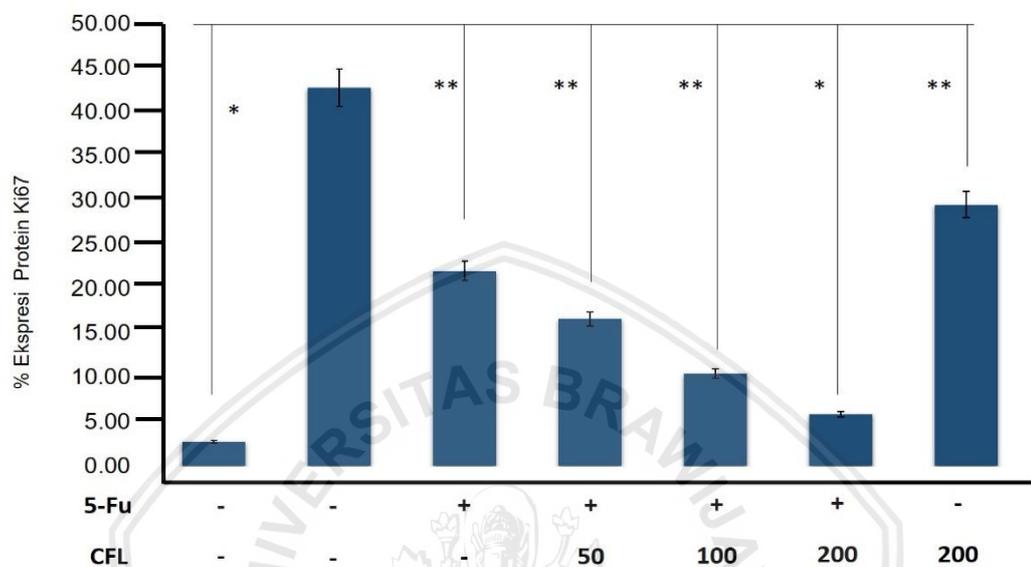
Kelompok	Mean $\pm$ SD
K-	2.73 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>
K+	42.77 $\pm$ 0.58 <sup>g</sup>
5-Fu	22.06 $\pm$ 0.40 <sup>e</sup>
D1	16.62 $\pm$ 0.43 <sup>d</sup>
D2	10.43 $\pm$ 0.55 <sup>c</sup>
D3	5.86 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>
C	29.55 $\pm$ 0.77 <sup>f</sup>

Notasi huruf pada setiap kelompok menunjukkan perbedaan nyata dari setiap kelompok perlakuan.  $p < 0.05$ .

Keterangan: **K-** (tanpa perlakuan), **K+** (Diinduksi sel HT-29), **5-FU** (diterapi dengan 5-FU saja), **D1** (terapi 5-FU dan CFL dosis 50  $\mu\text{g/g}$ ), **D2** (terapi 5-FU dan CFL dosis 100  $\mu\text{g/g}$ ), **D3** (terapi 5-FU dan CFL dosis 200  $\mu\text{g/g}$ ), **C** (terapi CFL dosis 200  $\mu\text{g/g}$ ).

Hasil perhitungan mean dan standar deviasi menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada setiap kelompok perlakuan yang dilambangkan dengan notasi huruf seperti yang ditunjukkan pada **Tabel 5.2**. Hasil menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan dan kelompok K+. Hasil yang paling signifikan ditunjukkan oleh kelompok D3 (terapi 5-FU dan CFL

200) yang memiliki notasi b dengan kelompok K+ (kontrol positif yang diinduksi sel HT-29) yang memiliki notasi g. Hasil *mean* yang diperoleh ini selanjutnya dianalisis dalam bentuk grafik sesuai yang ditunjukkan pada **Gambar 5.4**.



**Gambar 5.4 Grafik Ekspresi Proliferasi (Ki67) pada Jaringan Kolon Mencit.**

Hasil grafik menunjukkan penurunan ekspresi proliferasi (protein Ki67) pada setiap kelompok perlakuan mengalami penurunan apabila dibandingkan dengan K+ (kontrol yang diinduksi sel HT-29). Penurunan tertinggi tampak pada kelompok D3 (5-FU +, CFL 200). \*)  $p > 0.05$ , \*\*)  $p < 0.05$ .

Keterangan: Dari kiri ke kanan menunjukkan kelompok **K-** (tanpa perlakuan), **K+** (Diinduksi sel HT-29), **5-FU** (diterapi dengan 5-FU saja), **D1** (terapi 5-FU dan CFL dosis 50 µg/g), **D2** (terapi 5-Fu dan CFL dosis 100 µg/g), **D3** (terapi 5-FU dan CFL dosis 200 µg/g), **C** (terapi CFL dosis 200 µg/g).

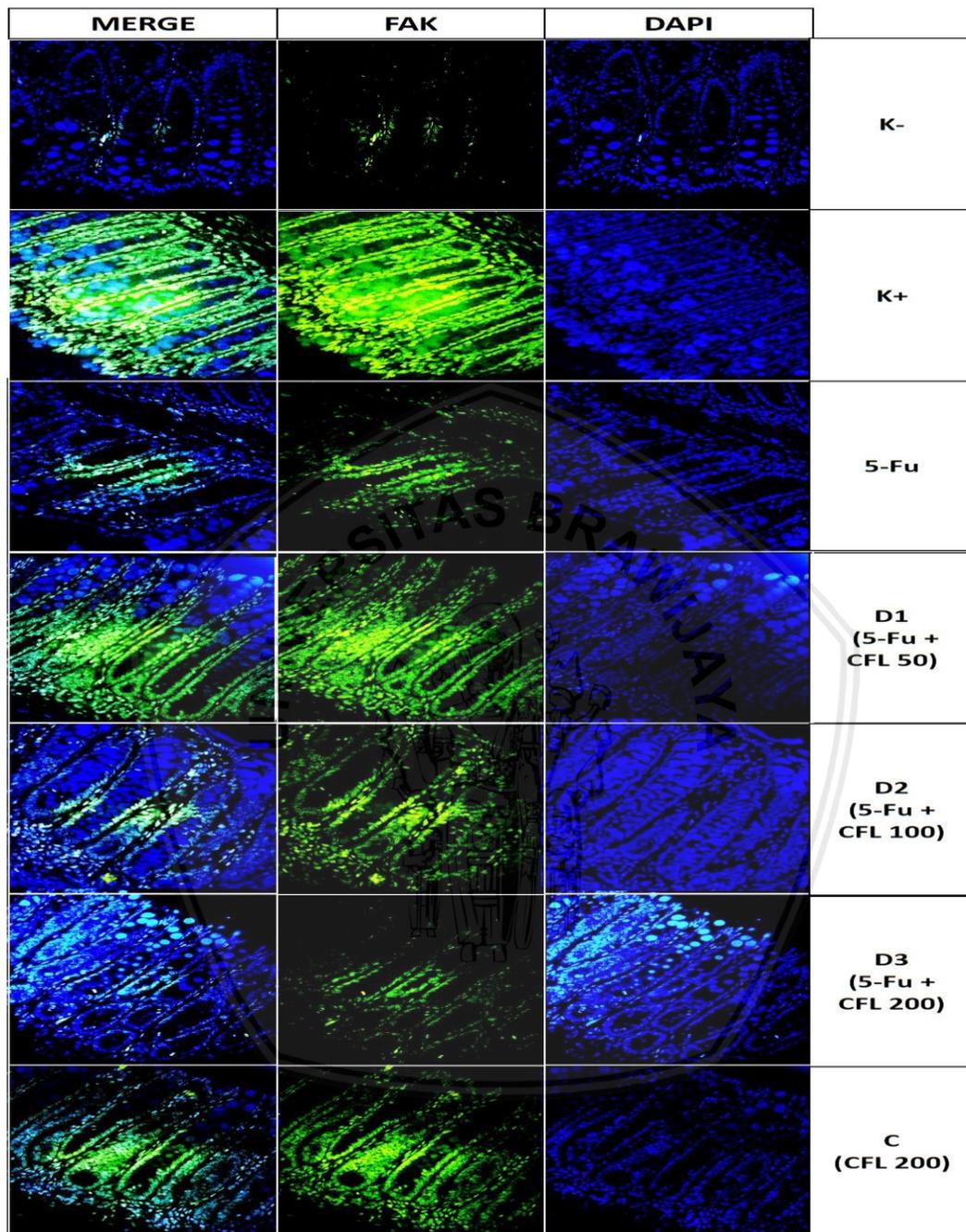
Hasil grafik pada **Gambar 5.4** menunjukkan kelompok terapi kombinasi 5-Fu dan CFL mampu menurunkan ekspresi proliferasi (protein Ki67) pada jaringan kolon mencit yang diinduksi sel HT-29. Nilai yang paling rendah ditunjukkan oleh kelompok D3 (terapi dengan 5-FU dan CFL dosis 200) dengan penurunan menjadi 5,86%.

### 5.3 Hasil Pengamatan Ekspresi FAK di Jaringan Kolon Mencit yang Diinduksi Sel HT-29.

Hasil serupa juga ditemukan pada ekspresi FAK pada kolon mencit. Pengamatan ekspresi *Focal Adhesion Kinase* (FAK) dilakukan menggunakan

metode *direct immunofluorescence* dengan antibodi yang telah berlabel FITC. Ekspresi yang dihasilkan akan tampak melalui warna hijau berpendar seperti yang terlihat pada **Gambar 5.5**. Pemberian warna FITC akan menghasilkan warna hijau yang menandakan ekspresi antigen dari protein FAK. Warna biru yang tampak pada **Gambar 5.5** menunjukkan inti sel yang telah terwarnai oleh DAPI. Kombinasi antara ekspresi antigen FAK dan warna DAPI ditunjukkan melalui gambar *merge*. Melalui kombinasi ini maka dapat diamati ekspresi protein yang ada terdapat pada inti sel atau pada nukleus. Ekspresi protein yang terdapat pada inti sel akan membaur dengan warna yang dihasilkan oleh DAPI, sedangkan ekspresi protein pada sitoplasma akan tetap berwarna hijau, sedangkan inti sel yang tidak mengekspresikan protein akan tetap tampak berwarna biru.

Analisis hasil *immunofluorescence* selanjutnya dilakukan menggunakan *software* Fiji. Melalui *software* tersebut akan dihitung besar intensitas warna yang dihasilkan pada jaringan tersebut. Seperti yang dapat diamati pada **Gambar 5.5** semakin terang intensitas warna yang dihasilkan menunjukkan semakin banyak protein yang terdapat dalam jaringan tersebut. Hasil perhitungan intensitas warna tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam *Microsoft excel* (**Lampiran 7**) dan diolah secara statistik menggunakan *software* SPSS (**Lampiran 9**) untuk melihat perbedaan nyata yang dihasilkan pada tiap kelompok.



**Gambar 5.5** Hasil *Immunofluorescence* FAK pada Jaringan kolon mencit yang diinduksi sel HT-29 yang diamati dengan mikroskop *convocal immunofluorescence* dengan perbesaran 400x. Hasil pengamatan menunjukkan penurunan intensitas warna pada setiap kelompok perlakuan apabila dibandingkan dengan kelompok K+.

Keterangan: **K-** (tanpa perlakuan), **K+** (Diinduksi sel HT-29), **5-FU** (diterapi dengan 5-FU saja), **D1** (terapi 5-FU dan CFL dosis 50 µg/g), **D2** (terapi 5-FU dan CFL dosis 100 µg/g), **D3** (terapi 5-FU dan CFL dosis 200 µg/g), **C** (terapi CFL dosis 200 µg/g). DAPI menunjukkan inti sel. Merge merupakan penggabungan warna dari DAPI dan antibodi FAK.

Dari lima lapang pandang yang diamati menggunakan mikroskop perbesaran 400x, ekspresi FAK yang tampak dihitung menggunakan Fiji *software* dan kemudian hasil data yang diperoleh dirata-rata berdasarkan jumlah ulangan yang ada (**Lampiran 7**). Hasil persentase ekspresi FAK yang telah dihitung dapat dilihat pada **Tabel 5.2**.

**Tabel 5.2** Perhitungan Ekspresi FAK pada Jaringan Kolon Mencit

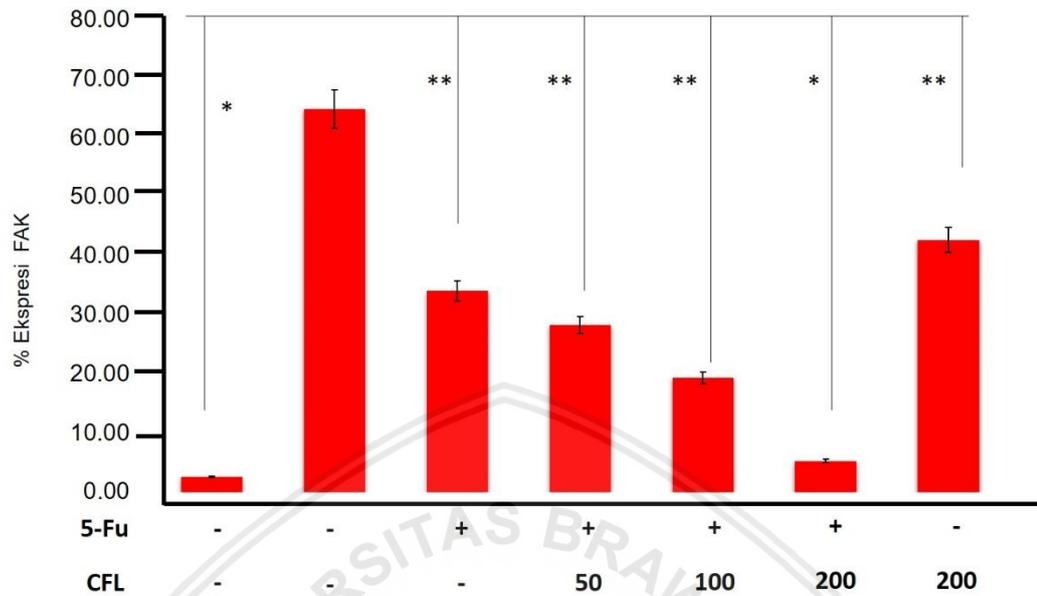
Kelompok	Mean $\pm$ SD
K-	2.52 $\pm$ 2.44 <sup>a</sup>
K+	64.84 $\pm$ 1.52 <sup>f</sup>
5-Fu	34.05 $\pm$ 0.95 <sup>d</sup>
D1	28.26 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>
D2	19.29 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
D3	5.25 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
C	42.68 $\pm$ 0.38 <sup>e</sup>

Notasi huruf pada setiap kelompok menunjukkan perbedaan signifikan yang ditunjukkan oleh setiap kelompok.  $p < 0.05$ .

Keterangan: **K-** (tanpa perlakuan), **K+** (Diinduksi sel HT-29), **5-FU** (diterapi dengan 5-FU saja), **D1** (terapi 5-FU dan CFL dosis 50  $\mu\text{g/g}$ ), **D2** (terapi 5-FU dan CFL dosis 100  $\mu\text{g/g}$ ), **D3** (terapi 5-FU dan CFL dosis 200  $\mu\text{g/g}$ ), **C** (terapi CFL dosis 200  $\mu\text{g/g}$ ).

Hasil analisa menggunakan SPSS (**Lampiran 9**) dari setiap kelompok menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dari setiap kelompok perlakuan. Notasi huruf yang diberikan juga menunjukkan kelompok K- (kontrol negatif) dan perlakuan D3 (terapi dosis 3) memiliki beda nyata yang tidak terlalu signifikan yang ditandai dengan notasi yang sama. Hasil yang paling signifikan ditunjukkan melalui perbandingan dari kelompok K+ (kontrol positif) dan kelompok D3.

Data yang diperoleh selanjutnya juga dianalisis dalam bentuk grafik seperti yang tampak pada **Gambar 5.6** di bawah ini.



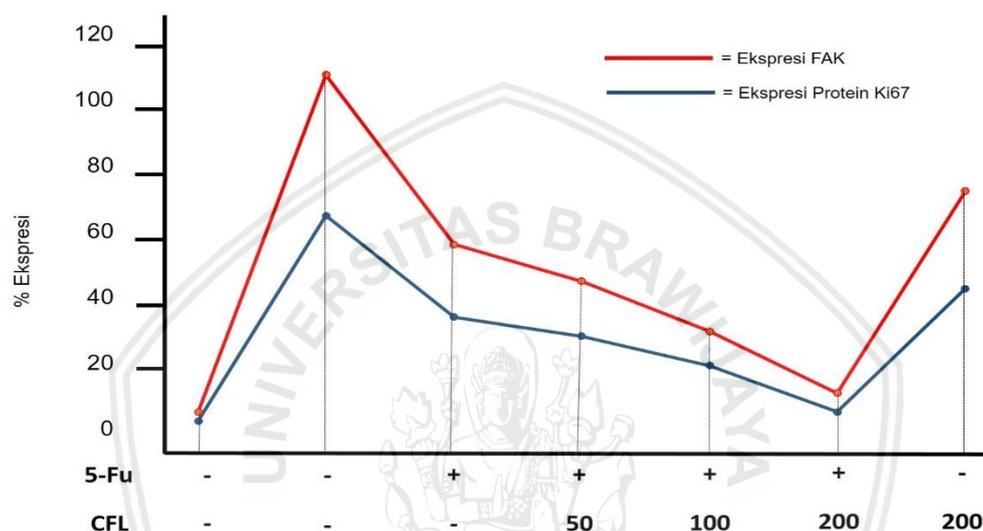
**Gambar 5.6 Grafik Ekspresi FAK pada Jaringan Kolon Mencit.** Data grafik menunjukkan penurunan ekspresi FAK pada setiap kelompok perlakuan. Data grafik menunjukkan penurunan ekspresi yang sangat signifikan apabila dibandingkan dengan kelompok K+ dengan penurunan tertinggi ada pada kelompok D3. \*)  $p > 0.05$ , \*\*)  $p < 0.05$ .

Keterangan: Dari kiri ke kanan menunjukkan kelompok **K-** (tanpa perlakuan), **K+** (Diinduksi sel HT-29), **5-FU** (diterapi dengan 5-FU saja), **D1** (terapi 5-FU dan CFL dosis 50  $\mu\text{g/g}$ ), **D2** (terapi 5-FU dan CFL dosis 100  $\mu\text{g/g}$ ), **D3** (terapi 5-FU dan CFL dosis 200  $\mu\text{g/g}$ ), **C** (terapi CFL dosis 200  $\mu\text{g/g}$ ).

Hasil perhitungan ekspresi FAK yang terlihat pada grafik di atas menunjukkan kombinasi terapi 5-Fu dan CFL berhasil menurunkan ekspresi FAK pada jaringan kolon mencit. Berdasarkan grafik di atas juga ditunjukkan bahwa kelompok D3 (terapi dengan 5-FU dan CFL dosis 200) menunjukkan penurunan yang paling tinggi apabila dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain, yaitu menjadi 5,25%.

#### 5.4 Korelasi antara ekspresi FAK dan Proliferasi Sel pada Jaringan Kolon mencit model yang diinduksi sel HT-29

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui keterkaitan antara marker proliferasi (Protein Ki67) dengan FAK. Hubungan korelasi antar dua parameter ini dianalisis menggunakan *Microsoft Excell* untuk melihat grafik korelasi antar parameter (**Gambar 5.7**).



**Gambar 5.7 Korelasi Nilai Proliferasi dengan Ekspresi FAK pada Mencit yang Diinduksi Sel HT-29.** Grafik menunjukkan korelasi positif dari nilai proliferasi atau Protein Ki67 (garis biru) dan ekspresi FAK (garis merah) yang terdapat pada setiap kelompok perlakuan. Kenaikan pada FAK disertai juga kenaikan ekspresi Protein Ki67. Penurunan pada FAK juga disertai dengan penurunan pada Protein Ki67

Keterangan: Dari kiri ke kanan menunjukkan kelompok **K-** (tanpa perlakuan), **K+** (Diinduksi sel HT-29), **5-FU** (diterapi dengan 5-FU saja), **D1** (terapi 5-FU dan CFL dosis 50 µg/g), **D2** (terapi 5-Fu dan CFL dosis 100 µg/g), **D3** (terapi 5-FU dan CFL dosis 200 µg/g), **C** (terapi CFL dosis 200 µg/g).

Pada **Gambar 5.7** menunjukkan grafik korelasi antara nilai proliferasi dan ekspresi FAK pada setiap kelompok perlakuan. Dari grafik tersebut ditunjukkan bahwa pada kelompok K+ atau kelompok kontrol positif (yang diinduksi sel HT-29) terjadi peningkatan ekspresi FAK yang juga disertai dengan peningkatan proliferasi. Begitu juga pada kelompok terapi kombinasi yang menunjukkan penurunan ekspresi FAK, juga menunjukkan adanya penurunan proliferasi. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang positif antara proliferasi dan ekspresi FAK, dimana peningkatan ekspresi FAK juga diiringi oleh peningkatan proliferasi.

Hasil selanjutnya juga dianalisis menggunakan pengujian korelasi secara statistik menggunakan Uji Korelasi *Pearson*. Pengujian korelasi dengan metode *Pearson* pada SPSS (**Lampiran 10**) juga menunjukkan nilai sig (*2-tailed*) dari kedua kelompok  $< 0.05$ , yang mana hal ini dapat diartikan bahwa terdapat korelasi antar kedua kelompok. Hasil identifikasi dengan nilai  $r$  tabel pada **Lampiran 10** juga menunjukkan korelasi yang positif ( $r > r$  tabel).



## BAB VI

### PEMBAHASAN

Kanker Kolorektal merupakan salah satu jenis kanker penyebab kematian terbesar di dunia. Kanker Kolorektal merupakan kanker yang terjadi pada kolon dan berasal dari sel epitel yang melapisi kolon atau rektum. Berdasarkan etiologinya, Kanker Kolorektal muncul dari *polip adenomatous*. Perkembangan *polip adenomatous* menjadi karsinoma melibatkan berbagai faktor baik genetik maupun molekuler. Proses ini melibatkan aktivasi proto-onkogen dan berkurangnya *tumor suppressor gen*, serta proliferasi dari *colonocytes*. Proliferasi sel yang terjadi ini akan bermigrasi membentuk mikroadenoma yang kemudian akan berkembang secara cepat membentuk adenoma. Secara bertahap, akan terjadi pertubuhan fokal dan perubahan displastik dari mukosa kripta ke arah karsinoma. Proses ini membutuhkan waktu yang cukup lama (Mundade *et al.*, 2014; Sack and Rothman, 2002).

Dalam penelitian ini, pembuatan hewan model Kanker Kolorektal dilakukan dengan induksi *human colorectal cancer cell line* HT-29 melalui metode induksi *transanal* selama 4 minggu serta pemberian DSS dalam air minum. Metode ini merupakan metode kombinasi sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Takahashi *et al* (2004) dan Endharti *et al* (2016). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Takahashi *et al* (2004) induksi *colorectal cancer cell line* pada mencit secara *transanal* selama 4 minggu mampu menginduksi terjadinya Kanker Kolorektal pada mencit dan telah dibuktikan melalui pemeriksaan *fluorescence* secara *endoscopy*. Dalam penelitian ini, dilakukan pemeriksaan FOBT dan pengambilan histologi jaringan kolon mencit sebagai diagnosa awal kanker. Dari hasil kedua pemeriksaan tersebut didapatkan hasil positif pada pemeriksaan FOBT (**Gambar 5.2**) yang menunjukkan adanya darah pada feses mencit. Hal ini sesuai dengan Williams *et al* (2016) bahwa gejala awal yang sering muncul pada kasus Kanker Kolorektal adalah adanya darah pada feses. Akan tetapi, pada hasil pemeriksaan histopatologi menunjukkan bahwa pemberian induksi sel HT-29 selama 4 minggu pada mencit belum menunjukkan terbentuknya massa kanker, meskipun tampak adanya peradangan pada jaringan kolon (**Gambar 5.1**). Hal ini dapat disebabkan karena waktu induksi *cell line* yang terlalu singkat sehingga sel HT-29 yang diinduksikan belum cukup untuk membentuk sel kanker. Penyebab lain yang

mungkin menyebabkan belum terbentuknya kanker pada mencit pasca induksi *cell line* adalah adanya hambatan atau penolakan dari tubuh tikus yang menyebabkan sel HT-29 yang berasal dari manusia tidak dapat tumbuh secara maksimal hingga menyebabkan kanker yang mana tentu saja hal ini memerlukan penelitian lebih lanjut dan lebih maksimal. Akan tetapi, terjadinya inflamasi pada jaringan kolon ini diharapkan merupakan respon awal dalam pertumbuhan sel kanker. Seperti yang telah banyak dijelaskan, inflamasi merupakan salah satu respon awal dalam perkembangan sel kanker. Pada kanker, inflamasi berperan sebagai mediator awal dalam pertumbuhan sel kanker. Inflamasi berperan dalam inisiasi, promosi, invasi, metastasis, dan keganasan sel kanker. Selain itu inflamasi juga berperan dalam memberikan lingkungan mikro yang menguntungkan untuk perkembangan sel kanker (Sergei *et al.*, 2010). Inflamasi merupakan suatu proses yang terjadi sebagai bentuk mekanisme perlindungan akibat adanya kerusakan jaringan yang disebabkan oleh infeksi, trauma, atau paparan zat kimia (Xinglong *et al.*, 2018). Dalam penelitian ini, inflamasi yang terjadi pada jaringan kolon dapat dimungkinkan terjadi akibat pemberian DSS (*Dextran sodium sulfate*). Pemberian DSS dalam beberapa penelitian diketahui mampu menyebabkan reaksi inflamasi dan menyebabkan *colitis* pada kolon. Kandungan sulfat polisakarida pada DSS dapat berperan sebagai senyawa toksin pada epitel kolon serta menyebabkan kerusakan pada sel epitel meskipun tidak secara langsung menyebabkan inflamasi pada jaringan kolon. Meskipun demikian, kerusakan sel epitel dan gangguan yang terjadi pada lapisan *monolayer* epitel usus dapat mengarahkan bakteri usus dan antigen-antigen pada usus masuk ke dalam mukosa dan menyebabkan infiltrasi sel-sel pro-inflamasi (Eichele and Kharbanda, 2017). Selain itu pemberian induksi *cell line* HT-29 pada kolon mencit juga dimungkinkan memicu terjadinya reaksi inflamasi karena tubuh mengenali *cell line* sebagai benda asing sehingga menyebabkan aktivasi antigen dan sitokin pro-inflamasi sebagai bentuk respon perlindungan tubuh. Hal inilah yang menyebabkan terjadinya akumulasi sel inflamasi pada jaringan kolon.

Selain inflamasi, proliferasi merupakan salah satu faktor penting yang memperlancar pertumbuhan sel kanker. Peningkatan dan abnormalitas pada proliferasi sel kanker diketahui dapat menentukan keganasan dari sel kanker tersebut. Dalam penelitian ini, pengamatan proliferasi sel kanker dilihat melalui ekspresi Protein Ki67 dan FAK pada jaringan kolon mencit. Protein Ki67 sendiri

merupakan protein marker yang menandai terjadinya proliferasi sel. peningkatan pada Protein Ki67 diketahui juga merupakan marker adanya peningkatan pada proliferasi sel. Protein Ki67 diekspresikan pada seluruh fase pembelahan, kecuali pada fase G0. Karakteristik inilah yang menyebabkan Protein Ki67 merupakan marker yang tepat untuk menandai proliferasi sel. Oleh sebab itu, Protein Ki67 seringkali digunakan dalam diagnosis kanker untuk menandai proliferasi yang terjadi pada sel kanker dimana apabila terjadi kanker, umumnya akan terjadi peningkatan ekspresi Protein Ki67 (Takagi *et al.*, 2014). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan ekspresi Protein Ki67 pada kelompok kontrol positif (K+) yang mana kelompok ini merupakan tikus yang diiduksi dengan *cell line* HT-29 *colorectal cancer* tanpa diberi terapi (**Gambar 5.3**).

Parameter lain yang diamati dalam penelitian ini adalah FAK atau *Focal Adhesion Kinase*. FAK merupakan mediator intrasel penting dalam perubahan ekstrasel seperti *remodeling* matriks ekstraseluler (ECM), ketersediaan nutrisi, serta faktor pertumbuhan. FAK adalah suatu protein tirosin kinase non-reseptor yang teraktivasi oleh interaksi dengan integrin, reseptor faktor pertumbuhan, reseptor *G protein-coupled* (GPCRs), dan juga reseptor sitokin. Pada kanker, ekspresi FAK akan mengalami peningkatan. Gen FAK akan teramplifikasi di dalam kromosom atau ter-upregulasi melalui interaksi dengan *tumor-related transcription factor* sehingga menyebabkan peningkatan ekspresi dan aktivasi FAK pada kanker. Aktivasi dari FAK dapat memainkan perananan penting sebagai mediator progresi dan *metastasis* dari sel kanker. Oleh sebab itu FAK merupakan salah satu target yang dapat digunakan dalam terapi kanker (Yoon *et al.*, 2014). Peningkatan FAK dalam penelitian ini juga dapat dibuktikan melalui grafik peningkatan ekspresi FAK (**Gambar 5.6**) yang tampak pada kelompok kontrol positif (K+).

Peningkatan ekspresi Protein Ki67 dalam penelitian ini dimungkinkan terkait dengan proses inflamasi yang terjadi sebagai bentuk respon awal kanker. Pemberian DSS pada mencit memungkinkan untuk terjadinya kerusakan pada epitel jaringan kolon yang menyebabkan terjadinya inflamasi. Akumulasi sitokin pro-inflamasi pada jaringan diketahui akan memicu aktivasi dari FAK melalui fosforilasi tirosin dan ikatannya dengan TNFR1 dan TNFR2 (Yanju *et al.*, 2010). Selain itu, adanya sitokin pro-inflamasi diketahui mampu mengaktifkan ekspresi Protein p53 sebagai bentuk respon akibat stres yang disebabkan oleh inflamasi (Uehara and Tanaka, 2018). Di lain sisi, FAK yang teraktivasi diketahui mampu

mengikat p53 menyebabkan hambatan aktivitas pada p53 serta menghambat aktivitas transkripsi p53 dari p21 (Golubovskaya and Cance, 2011). Adanya hambatan aktivitas p53 ini diketahui mampu menyebabkan *cell cycle arrest* dan kegagalan dalam *repair* atau *recovery* DNA sehingga siklus sel tidak bisa memasuki fase G0 dan meningkatkan ekspresi Protein Ki67 (Monique *et al.*, 2019). Peningkatan ekspresi Protein Ki67 dan FAK yang ditampilkan pada **Gambar 5.4** dan **Gambar 5.6** ini merupakan salah satu indikasi bahwa telah terjadi peningkatan proliferasi sel pada tikus yang diinduksi dengan sel HT-29. Hal ini juga dapat mengindikasikan bahwa injeksi *cell line* HT-29 secara transanal pada kolon mencit mampu menstimulasi terjadinya proliferasi sel yang mungkin akan mengarah pada terjadinya Kanker Kolorektal. Melalui hasil ini, maka selanjutnya dapat dilakukan pemberian terapi pada hewan coba.

Pemberian terapi dalam penelitian ini dilakukan pada minggu ke-4 setelah induksi *cell line*, dan terapi diberikan selama 4 minggu dengan berbagai variasi dosis obat terapi. Pemberian terapi dilakukan dengan injeksi obat terapi secara intra-peritoneal. Setelah 4 minggu, mencit di eutanasi dan dilakukan pembedahan untuk pengambilan organ kolon. Organ ini selanjutnya digunakan untuk pembuatan preparat histologi yang akan diwarnai dengan menggunakan pewarnaan *immunofluorescence* dan mengamati ekspresi proliferasi (Protein Ki67) dan *Focal Adhesion Kinase* (FAK) yang terkespresi pada jaringan kolon.

### **6.1 Pengaruh Terapi Kombinasi 5-FU dan Coelomic Fluid (CFL) Terhadap Ekspresi Proliferasi Sel pada Mencit yang Diinduksi Sel Ht-29.**

Hasil penelitian yang tampak pada **Gambar 5.3** dan **Gambar 5.4** menunjukkan bahwa terapi kombinasi 5-FU dan CFL mampu menurunkan proliferasi sel. Pada diagram yang ditampilkan pada **Gambar 5.4**, menunjukkan bahwa kelompok terapi kombinasi 5-FU dengan CFL dosis 200 µg/g BB mampu menghasilkan penurunan proliferasi sel yang paling tinggi, yaitu hingga 5,86%. Pada **Tabel 5.1** juga menunjukkan bahwa pemberian terapi kombinasi, khususnya pada dosis kombinasi CFL 200 µg/g mampu menurunkan proliferasi sel hingga mendekati persentase pada tikus normal (kelompok K-). Penurunan ini diduga berhubungan dengan kemampuan dari CFL dalam bekerja secara sinergis dengan 5-FU dalam menghambat terjadinya proliferasi sel pada tikus model kanker kolon yang ditandai dengan penurunan ekspresi protein Ki67. Besar penurunan ekspresi

Ki67 pada penelitian ini juga tampak berbanding lurus dengan dosis CFL yang digunakan, dimana semakin besar dosis yang diberikan, maka semakin besar pula penurunan proliferasi sel yang terjadi.

Ekspresi Protein Ki67 telah banyak dikaitkan dengan proliferasi sel dan selama fase *interphase* dalam pembelahan sel, antigen Ki67 dapat ditemukan pada nukleus, sedangkan pada fase *mitosis*, Ki67 dapat ditemukan pada permukaan kromosom. Protein Ki67 dapat ditemukan hampir disemua siklus sel (G1, S, G2, dan *mitosis*), akan tetapi tidak ditemukan pada fase istirahat atau G0. Hal ini yang menyebabkan Protein Ki67 banyak digunakan untuk mendeterminasikan pertumbuhan sel dalam populasi sel, begitu juga dalam menunjukkan pertumbuhan sel tumor. Oleh sebab itu, peningkatan atau penurunan yang terjadi pada ekspresi Protein Ki67 seringkali digunakan dalam menentukan perkembangan sel tumor khususnya yang terkait dengan proliferasi sel tumor (Li *et al.*, 2016; Takagi *et al.*, 2014).

Antigen Ki67 berikatan dengan nukleus sel yang mengalami proliferasi (Li *et al.*, 2016), sehingga penurunan ekspresi Ki67 yang dapat diamati secara *fluorescence* pada **Gambar 5.3** juga menunjukkan banyaknya sel yang mengalami proliferasi. Pada penelitian ini, kelompok tikus yang diberikan terapi kombinasi 5-FU dan CFL menunjukkan penurunan ekspresi Ki67 yang lebih baik apabila dibandingkan dengan kelompok yang lain. Hal ini dapat dimungkinkan akibat kombinasi kerja antara 5-FU dan CFL yang mampu menekan proliferasi sel. 5-*Fluorouracil* (5-FU) telah banyak diketahui sebagai obat kemoterapi yang digunakan pada Kanker Kolorektal dengan menekan proliferasi dan menginduksi apoptosis. Melalui senyawa metabolit aktifnya yaitu *fluorodeoxyuridine monophosphate* (FduMP), *fluorodeoxyuridine triphosphate* (FdUTP), dan *fluorouridine triphosphate* (FUTP), 5Fu akan bekerja dengan mengganggu sintesis DNA dan RNA serta aksi *tymidilate sythesis* (TS). Adanya gangguan pada sintesi DNA dan RNA ini tentunya juga akan mengganggu proses pembelahan sel yang berakibat terjadinya hambatan proliferasi sel (Zhang *et al.*, 2015; Longley *et al.*, 2003). Disisi lain, CFL yang mengandung *lysenin* bekerja dengan menghasilkan senyawa *ceramide* melalui ikatannya dengan *spingomyelin*. Senyawa *ceramide* ini diketahui mampu merusak dan mengganggu fungsi sel yang berakibat terhambatnya proses mitosis pada sel (Hannun and Newcomb, 2015). Hambatan *mitosis* ini tentunya juga akan menyebabkan hambatan pada proses proliferasi sel.

Sinergis dari kedua komponen inilah yang diduga mampu menyebabkan penurunan pada proliferasi sel tikus model Kanker Kolorektal.

Berbeda dengan hasil yang ditunjukkan pada kelompok terapi kombinasi, terapi dosis tunggal CFL menunjukkan penurunan yang tidak lebih baik dari kelompok terapi yang lainnya. Meskipun pada grafik **Gambar 5.4** ditunjukkan penurunan ekspresi Protein Ki67 pada kelompok dosis tunggal CFL menjadi 29,55%, akan tetapi penurunan yang terjadi lebih sedikit bila dibandingkan dengan terapi kombinasi. Hasil pada **Gambar 5.3** juga menunjukkan dimana perubahan *fluorescence* yang terlihat pada kelompok CFL hanya mengalami penurunan yang sedikit apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K+). Hasil ini juga diperkuat dengan notasi yang ditunjukkan pada **Tabel 5.1**, dimana notasi kelompok CFL mendekati kelompok K+. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun pemberian terapi CFL dosis tunggal mampu menurunkan ekspresi Protein Ki67 pada tikus yang diinduksi Sel HT-29, akan tetapi hasil yang diberikan tidak semaksimal apabila terapi diberikan dengan kombinasi 5-FU (**Gambar 5.4**). Hal ini juga menunjukkan bahwa pemberian terapi kombinasi 5-FU dan CFL mampu memberikan hasil yang lebih maksimal dalam menekan proliferasi sel kanker.

Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, kemampuan CFL sebagai anti-kanker dimungkinkan berasal dari senyawa aktif di dalam CFL, yaitu *lysenin*. *Lysenin* mampu menghasilkan senyawa berupa *ceramide* melalui ikatannya dengan *spingomyelin* pada sel, yang diketahui dapat menghambat fase *mitosis* dari sel sehingga proliferasi sel dapat dihambat (Hannun and Newcomb, 2015). Akan tetapi, dari hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian dosis tunggal CFL dengan dosis 200 µg/g BB belum mampu menghambat proliferasi secara maksimal, sehingga kombinasi dengan obat kemoterapi seperti 5-FU masih tetap diperlukan. Hal ini mungkin dapat disebabkan oleh faktor-faktor eksternal lain yang dapat mempengaruhi proliferasi sel, yang belum menjadi target dari *lysenin*.

Hingga saat ini, informasi mengenai kemampuan *lysenin* dari CFL dalam menghambat pertumbuhan sel kanker masih sangat terbatas. Berbagai sumber penelitian hanya menyebutkan kemampuan *lysenin* dalam menghasilkan senyawa *ceramide* melalui ikatannya yang secara spesifik terjadi hanya dengan *spingomyelin* (Sukumwang and Umezawa, 2013). Oleh sebab itu, dapat dimungkinkan bahwa belum maksimalnya efektifitas CFL dalam menghambat proliferasi sel kanker adalah karena masih terdapat beberapa faktor penyebab

proliferasi sel yang tidak menjadi target dari CFL, sehingga meskipun CFL mampu menurunkan proliferasi sel kanker akan tetapi hasil yang diperoleh tidak semaksimal dengan terapi kombinasi. Meskipun demikian, dari penelitian telah menunjukkan bahwa pemberian CFL pada tikus yang diinduksi Sel HT-29 mampu memperlihatkan sebuah alternatif baru dalam terapi kanker.

*5-Fluorouracil* (5-FU) merupakan salah satu obat kemoterapi yang banyak digunakan dalam terapi kanker kolon. 5-FU telah diketahui mampu menghambat proliferasi sel kanker melalui senyawa metabolit aktifnya yang menyebabkan gangguan pada sintesis DNA dan RNA sel kanker (Zhang *et al.*, 2015). Dalam penelitian ini, pemberian dosis tunggal 5-FU sebesar 50 µg/ g BB mampu menurunkan ekspresi Protein Ki67 hingga 22,06% atau hampir 50% dari ekspresi Ki67 pada kelompok K+ (42,77%) (**Gambar 5.4**). Hal ini juga dapat diamati dari hasil pewarnaan *fluorescence* (**Gambar 5.3**), dimana intensitas warna *fluorescence* pada kelompok terapi dosis tunggal 5Fu lebih sedikit apabila dibandingkan dengan kelompok K+. Hasil pada **Tabel 5.1** juga menunjukkan adanya perbedaan nyata antara kelompok 5-FU dengan kelompok K+ yang diwakilkan oleh notasi yang terdapat pada setiap kelompok. Meskipun terapi dosis tunggal 5-FU menunjukkan hasil yang efektif dalam menurunkan proliferasi sel, akan tetapi hasil ini tidak lebih baik apabila dibandingkan dengan terapi kombinasi 5-FU dengan CFL (**Gambar 5.4**). Pemberian CFL sebagai kombinasi dengan 5-FU terbukti mampu menurunkan proliferasi dengan lebih maksimal daripada pemberian obat ini secara tunggal.

Hasil ini, kemungkinan dapat disebabkan oleh sinergisitas dari 5-FU dan CFL yang mampu menghambat proliferasi sel secara lebih optimal dibandingkan dengan pemberian obat ini secara tunggal. Hal ini mungkin dapat disebabkan karena umumnya lebih dari 8-% pemberian dosis 5-FU akan secara cepat terdegradasi, dan hanya 1-3% dikoversi ke dalam metabolit aktif FdUMP dan akan menghambat TS sehingga terjadi hambatan sintesis DNA dan RNA yang akan menurunkan proliferasi sel (Kunicka *et al.*, 2016). Efektifitas pemberian 5-FU umumnya bergantung pada dosis dan intensitas pemberian obat tersebut. Semakin tinggi dosis pemberian dan semakin sering intensitas pemberian tentunya akan menghasilkan hasil yang maksimal. Akan tetapi dosis tinggi dari 5-FU dan intensitas pemberian yang lebih sering akan meningkatkan toksisitas dan resistensi dari 5-FU (Pardini *et al.*, 2011). Dalam penelitian ini pemberian 5-FU

dengan dosis 50 µg/g BB selama 1x dalam seminggu menunjukkan penurunan ekspresi FAK sebesar 50% dibanding kelompok K+. Penurunan ini diketahui mengalami peningkatan dengan pemberian kombinasi 5-FU dengan CFL. Hal ini membuktikan suatu kemungkinan baru dimana dosis rendah dari 5-FU mampu menghasilkan efek yang maksimal untuk menurunkan proliferasi sel melalui kombinasi dengan CFL.

## 6.2 Pengaruh Terapi Kombinasi 5-FU dan *Coelomic Fluid* (CFL) Terhadap Ekspresi FAK pada Mencit yang Diinduksi Sel HT-29.

Hasil penelitian yang diperoleh terhadap ekspresi FAK juga menunjukkan gambaran yang serupa dengan ekspresi Protein Ki67, dimana tikus yang diterapi dengan kombinasi 5Fu dan CFL memberikan penurunan ekspresi FAK yang lebih tinggi. Besar persentase penurunan juga menunjukkan nilai yang berbanding lurus dengan dosis CFL dimana kombinasi terapi 5Fu dengan CFL 200 µg/g memberikan besar penurunan yang paling tinggi yaitu menjadi 5,25% (**Gambar 5.6**). Nilai persentase ini juga menunjukkan nilai yang cukup baik dikarenakan mendekati persentase ekspresi FAK pada kelompok tikus normal (K-) (**Tabel 5.2**).

*Focal Adhesion Kinase* (FAK) merupakan suatu protein non-reseptor tirosin kinase yang diketahui memainkan peranan dalam regulasi migrasi sel, proliferasi, dan pertahanan sel. Aktivasi FAK dapat distimulasi oleh aktivitas dari integrin, faktor pertumbuhan GPCRs dan reseptor sitokin. Melalui sinyal yang diberikan oleh integrin dan faktor pertumbuhan, FAK akan mengaktivasi dan memfosforilasi berbagai sinyal protein lainnya dan memodulasi proliferasi, adesi, apoptosis, dan diferensiasi sel sebagai respon dari sel adesi serta stimulasi mitogen. Hal ini menyebabkan FAK juga berperan dalam mengontrol sebagian besar proses tumor (Ling *et al.*, 2015; Peng and Guan, 2011). Oleh sebab itu penurunan dan peningkatan pada ekspresi dapat dikaitkan dengan perkembangan sel kanker.

Seperti halnya pada ekspresi Protein Ki67, penurunan ekspresi FAK yang diamati dalam penelitian ini dapat disebabkan oleh sinergitas kerja dari 5Fu dan CFL dalam menekan pertumbuhan sel kanker. Kemampuan 5FU dalam mengganggu sintesis DNA dan RNA dalam sel dapat menyebabkan terganggunya aktifitas fungsional dari, termasuk juga aktivitas dari reseptor FAK dan berbagai protein sel yang lain (Zhang *et al.*, 2015). Disisi lain, kemampuan CFL dalam mengikat *spingomyelin* dan menghasilkan senyawa *ceramide* diketahui

mampu mengganggu stabilitas dari integrin pada sel (Eich *et al.*, 2016). Hal ini tentunya akan berpengaruh pada aktivasi FAK dan aktivitas protein lain yang berperan dalam perkembangan sel tumor, khususnya protein yang dimodulasi oleh FAK. Gangguan pada integrin inilah yang dimungkinkan menjadi penyebab penurunan ekspresi FAK dalam penelitian ini.

Hasil yang ditunjukkan pada grafik **Gambar 5.6** juga menunjukkan bahwa pemberian dosis tunggal CFL mampu menurunkan ekspresi FAK apabila dibandingkan dengan kelompok K+, akan tetapi penurunan yang terjadi tidak semaksimal penurunan yang ditunjukkan oleh kelompok terapi kombinasi maupun kelompok terapi dosis tunggal 5-FU (**Gambar 5.6**). Pada **Tabel 5.2** juga ditunjukkan notasi kelompok dosis tunggal CFL masih mendekati kelompok K+. Meskipun demikian, pemberian dosis tunggal CFL mampu menurunkan ekspresi FAK menjadi 42,68%. Dari hasil pewarnaan *fluorescence* (**Gambar 5.5**) juga menunjukkan perbedaan intensitas warna *fluorescence* yang dihasilkan oleh kelompok dosis tunggal CFL bila dibandingkan dengan kelompok K+. Hal ini membuktikan bahwa CFL memiliki potensi untuk digunakan sebagai suatu alternatif baru untuk terapi kanker, meskipun penggunaannya akan lebih maksimal apabila diberikan dengan kombinasi obat kemoterapi.

Efek pemberian dosis tunggal CFL pada ekspresi FAK yang ditunjukkan dalam penelitian ini mungkin dipengaruhi oleh dosis CFL yang diberikan sehingga aktifitas senyawa CFL yang dihasilkan belum secara maksimal mampu menghambat proliferasi sel. Morad *et al* (2016), pernah menyebutkan dalam penelitiannya bahwa paparan *ceramide* mampu menurunkan molekul adesi pada Kanker Kolorektal, akan tetapi penurunan yang terjadi bergantung pada dosis *ceramide* yang dihasilkan. Seperti yang telah kita ketahui, senyawa *lysenin* pada CFL diketahui mampu menghasilkan senyawa *ceramide* melalui ikatannya dengan *spingomyelin*. *Ceramide* yang dihasilkan ini selanjutnya mampu menurunkan integrin yang terdapat pada permukaan sel, dimana penurunan integrin yang terjadi akan menyebabkan penurunan molekul adesi seperti FAK (Morad *et al.*, 2016; Ling *et al.*, 2015). Meskipun demikian, kemampuan *ceramide* dalam menurunkan ekspresi molekul adesi bergantung dengan dosis dari *ceramide* tersebut. Morad *et al* (2016) juga menyebutkan bahwa *ceramide* dengan konsentrasi antara 2.5 – 10  $\mu$ M mampu menurunkan molekul adesi sebesar 50%. Hal inilah yang perlu ditambahkan lebih lanjut dalam penelitian ini, dikarenakan

meskipun kita mengetahui bahwa *lysenin* dari CFL mampu menghasilkan *ceramide*, kita belum bisa mengetahui berapa besar konsentrasi *ceramide* yang dihasilkan pada tiap gram CFL. Hal inilah yang mungkin menjadi penyebab mengapa dalam penelitian ini, pemberian dosis tunggal CFL belum mampu secara maksimal menurunkan ekspresi FAK pada tikus yang diinduksi Sel HT-29.

Hasil terapi dosis tunggal 5-FU terhadap ekspresi FAK menunjukkan interpretasi yang serupa dengan hasil pada ekspresi Protein Ki67. Pada grafik **Gambar 5.6** menunjukkan dosis tunggal 5-FU menurunkan ekspresi FAK menjadi 34,05% atau  $\pm 50\%$  dibandingkan dengan ekspresi pada kelompok K+ (64,84%). Intensitas pewarnaan *fluorescence* pada kelompok terapi dosis tunggal 5-FU juga menunjukkan penurunan bila dibandingkan dengan kelompok K+ (**Gambar 5.5**), yang mana hal ini juga ditunjukkan dengan notasi yang tampak pada **Tabel 5.2**. Akan tetapi, sama halnya dengan ekspresi Protein Ki67, pemberian dosis tunggal 5-FU belum secara maksimal menurunkan ekspresi FAK pada tikus yang diinduksi Sel HT-29. Hal ini terlihat dari grafik penurunan ekspresi FAK pada kelompok 5Fu masih lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok terapi kombinasi (**Gambar 5.6**). Hasil ini membuktikan bahwa meskipun terapi dosis tunggal 5-FU mampu menurunkan ekspresi FAK hingga 50%, akan tetapi melalui pemberian terapi kombinasi 5Fu dan CFL hasil yang diperoleh dapat lebih maksimal dibandingkan dengan pemberian dosis tunggal.

Park *et al* (2017) menyebutkan dalam penelitiannya bahwa pemberian dosis tunggal 5-FU sebagai terapi Kanker Kolorektal memang tidak efektif apabila diberikan dengan dosis tunggal. Hal ini disebabkan karena 5-FU dosis tunggal hanya menghambat *micrometastasis* saja bukan *macrometastasis*. Hal ini dapat diartikan bahwa hanya sebagian kecil dari *metastasis* sel kanker yang mampu dihambat oleh pemberian dosis tunggal 5-FU. Pada kanker, *metastasis* dan proliferasi sel merupakan faktor penting yang mempengaruhi perkembangan sel kanker. FAK sendiri merupakan salah satu molekul yang berperan penting pada *metastasis* dan proliferasi sel kanker. Dosis tunggal 5-FU telah diketahui mampu berperan sebagai anti-tumor melalui kemampuannya dalam menghambat TS dan menyebabkan kerusakan DNA, akan tetapi dosis tunggal 5-FU belum mampu menekan ekspresi FAK secara maksimal (Park *et al.*, 2017; Ling *et al.*, 2015). Hal inilah yang menyebabkan melalui pemberian kombinasi CFL, mampu memberikan hasil yang lebih maksimal dalam menghambat FAK karena CFL bekerja dengan

menghasilkan senyawa *ceramide* melalui ikatan lysenin dengan *spingomyelin* yang akan menurunkan dan mengganggu integritas dari integrin. Gangguan pada integrin menyebabkan hambatan pada molekul adesi seperti FAK sehingga terjadi penurunan ekspresi FAK (Morad *et al.*, 2016). Berdasarkan hasil diatas menunjukkan bahwa pemberian dosis tunggal 5-FU tidak lebih baik dalam menekan ekspresi FAK apabila dibandingkan dengan dosis terapi kombinasi.

### 6.3 Korelasi Ekspresi Proliferasi Sel dan Ekspresi FAK pada Tikus yang Diinduksi Sel HT-29

Korelasi proliferasi melalui ekspresi Protein Ki67 dan ekspresi FAK pada **Lampiran 8** menunjukkan nilai yang positif dimana hal ini dapat diartikan terdapat korelasi positif antara ekspresi Protein Ki67 dan FAK. Pada **Gambar 5.7** juga ditunjukkan grafik korelasi antara ekspresi FAK dan proliferasi pada setiap kelompok dimana dari hasil tersebut ditunjukkan peningkatan FAK yang juga disertai oleh peningkatan proliferasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa apabila terjadi peningkatan pada proliferasi sel, maka juga terjadi peningkatan pada ekspresi FAK. Hasil ini didukung oleh pernyataan Ling *et al.* (2015) bahwa peningkatan ekspresi FAK umumnya juga menunjukkan adanya peningkatan proliferasi sel kanker.

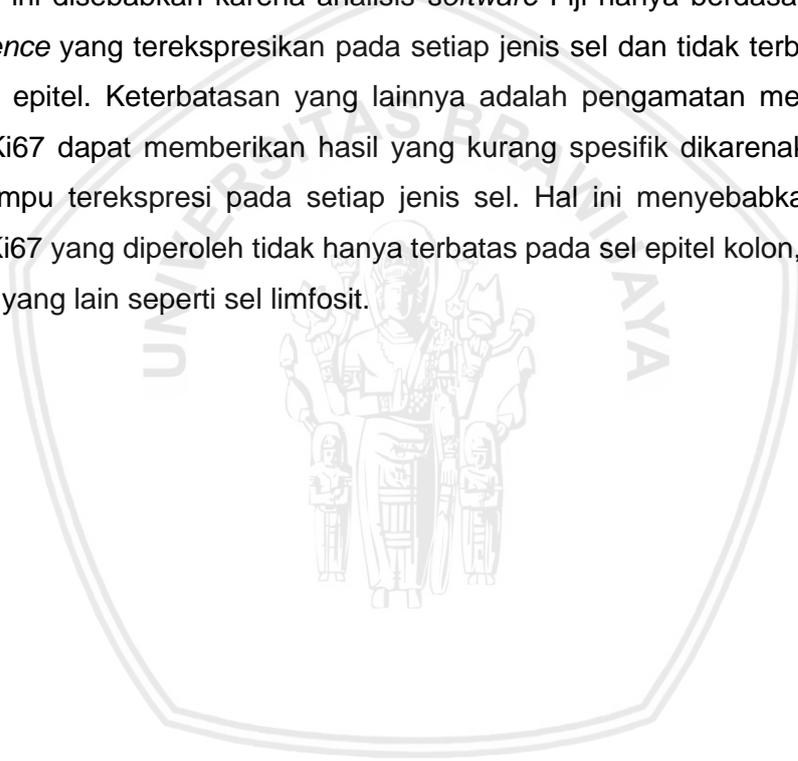
FAK merupakan mediator intrasel penting yang berperan dalam berbagai fungsi seluler seperti adesi sel, motilitas, proliferasi, dan pertahanan sel. Semakin tinggi aktivitas FAK, maka akan semakin besar pengaruhnya terhadap proliferasi dan *metastasis* sel tumor. FAK telah diketahui memainkan peranan dalam mengatur proliferasi melalui interaksinya dengan integrin dan faktor pertumbuhan yang akan membantu regulasi perkembangan siklus sel dan mengarahkan untuk terjadinya proliferasi. Pada tahap fibroblas, FAK mengatur transisi antara fase G1 ke fase S melalui kemampuannya dalam meregulasi transkripsi *cyclin* D1 (Yoon *et al.*, 2015; Serrel *et al.*, 2012). Aktivasi dari FAK akan mengaktifkan sinyal P13K dalam jalur sinyal P13K/Akt. Aktivasi P13K/Akt selanjutnya akan mengaktifkan sinyal mTOR dan membentuk kompleks. Kompleks mTOR selanjutnya akan mengaktifkan faktor translasi *ribosomal S6 kinase* (S6K) menuju ke ribosom dan menstimulus terjadinya proliferasi sel melalui aktivasi *cyclin* D1 (Ling *et al.*, 2015; Sulzmaier, *et al.*, 2014). Aktivasi dari *cyclin* D1 inilah yang nantinya akan berperan dalam proliferasi sel.

Korelasi antara FAK dan Protein Ki67 juga terjadi dalam keterkaitannya terhadap inflamasi pada respon awal kanker. Inflamasi merupakan salah satu mekanisme yang memperlambat terjadinya pertumbuhan sel kanker. Dalam kondisi normal, inflamasi terjadi sebagai upaya tubuh melawan respon berbahaya seperti benda asing, zat kimia, infeksi atau trauma. Pada kanker, inflamasi berperan sebagai respon awal dalam memberikan lingkungan mikro yang memfasilitasi perkembangan sel kanker. Inflamasi berperan dalam inisiasi, keganasan, promosi, invasi, serta metastasis sel kanker (Sergei *et al.*, 2010; Xinglong *et al.*, 2018). Dalam penelitian ini, pemberian DSS dan *cell line* dimungkinkan dapat menyebabkan inflamasi melalui gangguan integritas epitel sel kolon. Gangguan yang terjadi pada lapisan epitel kolon dapat menyebabkan aktivasi dan akumulasi sitokin pro-inflamasi sebagai bentuk respon imun inate dan adaptif. Aktivasi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$  diketahui mampu mengaktivasi FAK melalui ikatannya dengan TNFR1 dan TNFR2 melalui fosforilasi tirosin. Hal ini disebabkan karena FAK mampu mengenali perubahan mekanis yang terjadi dalam respon inflamasi. Pada kasus *colitis*, produksi sitokin dan TGF $\beta$  juga diketahui akan meningkatkan ekspresi FAK melalui jalur Smad dan MAPK (Thomas *et al.*, 2019; Yanju *et al.*, 2010). FAK yang teraktivasi mampu berikatan dengan domain N-Terminal pada p53 dan mengakibatkan penurunan aktivitas dari p53 serta menghambat aktivitas transkripsional dari p53. Hal ini dapat menyebabkan *arrest* dari siklus sel melalui *cyclin-dependent kinase inhibitor* p21 yang mengakibatkan proses *repair* DNA dan apoptosis tidak terjadi. Hambatan aktivitas dari p53 ini dapat mengakibatkan sel tidak dapat memasuki fase G0 sehingga terjadi peningkatan ekspresi Protein Ki67 (Golubovskaya and Cance, 2011; Monique *et al.*, 2019).

Berdasarkan penjelasan di atas, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan korelasi yang sejajar antara FAK dan proliferasi dimana adanya peningkatan ekspresi FAK juga dapat menyebabkan peningkatan proliferasi sel. Oleh sebab itu, FAK dapat juga digunakan sebagai marker penanda proliferasi sel.

#### 6.4 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan yang ditemui di dalam penelitian ini antara lain meliputi: berdasarkan pemeriksaan penunjang histopatologi, peneliti belum berhasil mendapatkan hewan coba model Kanker Kolorektal melalui induksi sel HT-29 selama 4 minggu, sehingga hasil yang diperoleh tidak spesifik pada kondisi Kanker Kolorektal. Hasil pemeriksaan *immunofluorescence* yang dianalisis menggunakan *software* Fiji juga dapat memberikan hasil yang bias dikarenakan dalam *software* ini tidak dapat memastikan setiap sel yang diamati hanya spesifik pada sel epitel saja. Hal ini disebabkan karena analisis *software* Fiji hanya berdasarkan warna *fluorescence* yang terekspresikan pada setiap jenis sel dan tidak terbatas hanya pada sel epitel. Keterbatasan yang lainnya adalah pengamatan menggunakan marker Ki67 dapat memberikan hasil yang kurang spesifik dikarenakan Protein Ki67 mampu terekspresi pada setiap jenis sel. Hal ini menyebabkan ekspresi Protein Ki67 yang diperoleh tidak hanya terbatas pada sel epitel kolon, tetapi juga pada sel yang lain seperti sel limfosit.



## BAB VII

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

1. Pemberian terapi kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid Lumbricus rubellus* pada mencit yang diinduksi Sel HT-29 pada dosis tertinggi (200 µg/g BB), mampu menurunkan ekspresi proliferasi sel (Protein Ki67) hingga 5.86%
2. Pemberian terapi kombinasi 5-FU dan *coelomic fluid Lumbricus rubellus* dengan dosis tertinggi (200 µg/g BB), mampu menurunkan ekspresi FAK hingga 5,25% pada mencit yang diinduksi Sel HT-29
3. Terdapat korelasi positif antara ekspresi FAK dan proliferasi sel pada mencit yang diinduksi Sel HT-29, dimana apabila ekspresi FAK turun maka ekspresi proliferasi (Ki67) juga mengalami penurunan.

#### 3.2 Saran

1. Perlu dilakukan perpanjangan waktu induksi sel HT-29 atau peningkatan jumlah sel HT-29 yang diinduksikan pada hewan coba, sehingga dapat diperoleh hewan model yang spesifik mengalami Kanker Kolorektal.
2. Metode pemeriksaan lain seperti Immunohistokimia dapat dilakukan untuk menganalisis ekspresi protein Ki67 dan FAK, sehingga hasil yang diperoleh lebih spesifik teramati pada sel epitel kolon
3. Perlu dilakukan analisis menggunakan marker proliferasi lainnya, seperti PCNA sehingga pengamatan terhadap proliferasi sel lebih spesifik terbatas pada sel epitel yang mengalami proliferasi saja.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aldarraj, Q.M., N. Halimoon, and N.M.Majid. 2013. Antioxidant activity and total phenolic content of earthworm paste of *Lumbricus rubellus* (red worm) and *Eudrilus eugenia* (African night crawler). *Journal of Entomology and Nematology*. Vol.5(3): 33-37. DOI: 10.5897/JEN2013.0075.
- Anonim. 2017. Kanker Kolorektal. Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran. Komite Penanggulangan Kanker Nasional [KPKN]. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Hal: 1-159
- Anonym. 2009. *Lumbricus genus* (assorted species, including: *Lumbricus terrestris* and *Lumbricus rubellus*). Article. Earthworm. No. 454578. Pp: 1-3.
- Anonym. 2010. Molecular Hallmarks of Cancer. Mechanism of Carcinogenesis. Section 3. WCR. Page: 200-270.
- Anonym. 2011. *Lumbricus rubellus* (annelid). Ecology. National Biological Information Infrastructure (NBII). The Global Invasive Species Invasive Species Specialist Group [ISSG]. Database IUCN Species Survival Commission, page 1.
- Anonym. 2012. Thawing, Propagating, and Cryopreserving Protocol: NCI-PBCF-HTB38 (HT-29) Colon Adenocarcinoma. Version 1.6. Physical Sciences-Oncology Center Network. Bioresource Core Facility. American Type Culture Collection [ATCC]. ATCC®HTB-38™. Pp:1-38.
- Anonym. 2015. What Are Animal Models of Cancer. eMICE. <https://emice.nci.nih.gov/aam>. [diakses 20 Mei 2018]
- Anonym. 2016. Balb/c: Bagg's Albino. Research Models and Service. Envigo. RMS-0114-BU-01-D5-166: pp:1-8
- Anonym. 2018. 2018. *AJCC Cancer Staging Manual*. Eight Edition. American Joint Committee on Cancer [ACJJ]. Springer.
- Betje J and C. Lagner, 2011. Vascular Invasion, perineural Invasion and Tumor Budding: Predictor of Outcomes in Colorectal Cancer. *Acta Gastroenterol Belg*: 74(4): 516-529.
- Bilej, M., P. Prochazkova, M. Silerova, and R. Joskova. 2013. Earthworm Immunity. *Madame Curie Bioscience Database*. Landes Bioscience. Page 1-23.

- Booth, D.G., M. Takagi, L. Sanchez-Pulido, E. Petfalski, G. Vargiu, K. Samejima, N. Imamoto, C.P. Ponting, D. Tollervey, W.C. Earnshaw, and P. Vagnarelli. 2013. Ki67 is A PP1-Interacting Protein That Organises The Mitotic Chromosome Periphery. *Elife*. 3:e01641. DOI: 10.7554/elife.01641.
- Campbell I.D and M.J. Humphries. 2011. Integrin Structure, Activation, and Interaction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Vol. 3. PP: 1-15
- Cepeda, S. 2014. Immunohistochemistry Paraffin-Embedded Protocol (Fluorescence). Aviva System Biology. PP: 1-2
- Chintal, L., S. Vaka, J. Baranda, and S.K. Williamson. 2011. Capecitabine versus 5-Fluorouracil in *Colorectal* Cancer: Where are we now. *Oncol Rev*. 5: 129-14-. Doi: 10.1007/s12156-011-0074-3.
- Collibus, LD., A.F.P. Sonnen, K.J. Morris, C.A. Siebert, P. Abrusci, J. Plitzko, V. Hodnik, M. Leippe, E. Volpi, G. Anderluh, and R.J.C. Gilbert. 2012. Structure of Lysenin Reveal a Shared Evolutionary Origin for Pore-Forming Proteins and Its Mode of Sphingomyelin Recognition. *Structure*. Vol.20: 1498-1507.
- Collusi D, G. Brandi, F. Bazzoli, and L. Ricciardiello. 2013. Molecular Pathway Involved in *Colorectal* Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *Int Journal of Molecular Science*. Vol.14: 16365-16368. DOI: 10.3390/ijms140816365.
- Cooper J and F.G. Giancotti. 2019. Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Ephithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. *Cancer Cell. Review*. Vol. 35. Issues 3. PP: 347-367.
- Darling F and KP. Dolan. 2007. Animal in Cancer Research. Lab Animal Europe. AnimalResearch.Info.
- Demetrius LA., JF. Coy, and JA. Tuszynski. 2010. Cancer proliferation and Therapy: The Warburg Effect and Quantum Metabolism. *Theor Biol Med Model*. DOI:10.1186/1742-4682-7-2.
- Dinesh, M.S., S. Sridhar, P.G. Chandana, V. Pai, K.S. Geetha, and R.N. Hegdge. 2013. Anticancer Potentials of Peptides of Coelomic Fluid of Earthworms *Eudrilus eugenia*. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 10(2): 601-606. DOI: 10.13005/bbrsa/1170
- Eich, C, C. Manzo, S. Keijzer, G. Bakker, I. Reinieren-Beeren, MF. Garcia-Parajo, and A. Cambi. 2016. Changes in Membrane Spingolipid Composition Modulate Dinamics and Adhesion of Integrin Nanoclusters. *Nature*. Vol.6: 20693. PP 1-15.

- Eichele, D.D and K.K. Kharbanda. 2017. Dextran Sodium Sulfate Colitis murine model: An Indispensable tool for Advancing our Understanding of Inflammatory Bowel disease Pathogenesis. *World J Gastroenterol*. Vol. 23. No. 33. PP: 6016-6029.
- Ellis H and V. Mahadevan. 2014. Anatomy of The Caecum, Appendix, and Colon. *Basic Science Surgery*. Elsevier. (1): 155-158.
- Endharti, A.T. A. Wulandari, A. Listyana, E. Norahmawati, and S. Permana. 2016. *Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq Extract Effectively Inhibits Inflammation, Proliferation and Induces p53 Expression on Colitis-associated Colon Cancer. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16:374. Doi: 10.1186/s12906-016-1345-0.
- Endharti, AT., S. Permana, Pearlindah, and Z. Sholihah. 2018. Cytotoxic Effect and Anti-Proliferative Cancer Activity of Coelomic Fluid from *Lumbricus rubellus* Promotes Apoptosis and Reduce G2/M Phase Progression in HT-29 Cells. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*.
- Fang, L., Y. Jiang, Y. Yang, Y. Zheng, J. Zheng, H. Jiang, S. Zhang, L. Lin, J. Zheng, S. Zhang, and X. Zhuang. 2016. Determine The Optimal 5-FU Therapeutic Dosage in The Treatment of Colorectal Cancer Patients. *Oncotarget*. Vol. 7. No. 49. PP: 81880-81887.
- Fiolka, M.J., J. Rzymowska, S. Biliska, K. Iewtak, M. Dmoszynska-Graniczka, K. Grzywnowicz, W. Kazmierski, and T. Urbanik-Sypniewska. 2019. Antitumor Activity and Apoptotic Action of Coelomic from The Earthworm *Dendrobaena veneta* Against A549 Human Lung Cancer. *APMIS*. Vol. 127. Issue G. PP: 1-26.
- Gardaneh. 2017. Human Cancer Modeling: Recapitulating Tumor Heterogeneity Towards Personalized Medicine. *Multidisciplinary Cancer Investigation*. Vol. 1, Issue. 2. Doi: 10.21859/mci-01021.
- Greiner HG., DR. Kashian, and SD. Tiegs. 2012. Impacts of invasive Asian (*Amyntas hilgendorfi*) and European (*Lumbricus rubellus*) earthworms in a North American temperate deciduous forest. *Biological Invasions*: 14(10):2017-2027.
- Golubovskaya, V.M. and W.G. Cance. FAK and p53 Protein Interactions. *Anti-cancer Agents in Medical Chemistry*. 2011. Vol 11. PP: 617-619
- Gulwani H. 2018. Normal Histology. Pathologi Online. Review 1, Page 1-2.

- Harjunpaa, H., M.L. Asens, C. Guenther, and S.C. Fagerholm. 2019. Cell Adhesion Molecules and Their Roles and regulation in The Immune and Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*. Vol. 10. Article 1078. PP:1-24.
- Hamidi H and J. Ivaska. 2018. Every Step of The Way: Integrins in Cancer Progression and Metastasis. *Nature. Review: Cancer*. Vol. 18. PP: 533-548.
- Hannun Y.A and B. Newcomb. 2015. A New twist to The Emerging Functions of Ceramides in Cancer: Novel Role for Platelet Acid Sphingomyelinase in Cancer Metastasis. *EMBO Molecular Medicine*. Vol. 7, No. 6. PP: 692-694.
- Hill, M.A. 2019. **Embryology Gastrointestinal Tract - Colon Histology**. UNSW Embryology. ISBN: 978 0 7334 2609 4 – UNSW CRICOS Provider Code No. 00098G.  
[https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Gastrointestinal Tract - Colon Histology](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Gastrointestinal_Tract_-_Colon_Histology). [Diakses 20 maret 2019].
- Huh J.W., H.R. Kim, S.H. Cho, and Y.J. Kim. 2009. Clinical Significance of p53 and Ki-67 Expression in Colorectal Cancer. *J.Korean Soc Coloproctol*. Vol. 25. No. 2. PP: 107-112.
- Hyland, K. 2010. Cell Proliferation and Its Regulation. Biochemistry/Molecular Biology Lecture. Page: 35-57.
- Kauschke, E., W. Mohrig, and E.L. Cooper. 2007. Coelomic Fluid Proteins as Basic Components of Innate Immunity in Earthworms. *European Journal of Soil Biology*. Vol. 43.
- Kobayashi H., M. Ohtomi, Y. Sekizawa, and N. Ohta. 2001. Toxicity of Coelomic Fluid of The Earthworm *Eisenia foetida* to Vertebrates but not Invertebrates: probable role of Sphingomyelin. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol 128. PP: 401-411
- Kulma M, Kwiatkowska K, Sobota A. 2012. Raft coalescence and FcγRIIA activation upon sphingomyelin clustering induced by lysenin. *Cell Signal*. 24 (8): 1641-7. PP: 110-115.
- Kunicka T, P.Prochazka, I. Krus, P. Bendova, M. Protivova, S.Susova, V. Hlavac, V. Liska, P. Novak, M. Schneiderova, P. Pitule, J. Bruha, O. Vycital, P. Vodicka, and P. Soucel. 2016. Molecular Profile of 5-Fluorouracil Pathway Genes in Colorectal Carcinoma. *BMC Cancer*. Vol, 16:795. PP: 1-12.
- Landgraf, M., JA. McGovern, P. Friedl, and DW. Huttmacher. 2017. Rational Design of Mouse Models for Cancer Research. *Trends in Biotechnology*. No. 1589, Pages: 1-10.

- Li, L.T., G. Jiang, Q. Chen, and J.N. Zheng. 2015. Ki67 is A Promising Molecular Target in The Diagnosis of Cancer. *Molecular Medicine Reports*. Vol.11: 1566-1572. DOI: 10.3892/mmr.2014.2914.450623.
- Li, P., ZT. Xiao, T.A. Braciak, QJ. Ou, G. Chen, and F.S. Oduncu. 2016. Assosiation Between Ki67 Index and Clinicopathological Features in *Colorectal Cancer*. *Oncol Rea Treat*. 39:696-702. DOI: 10.1159/000.
- Ling Tai, Y., LC. Chen, and TL. Shen. 2015. Emerging Roles of Focal Adhesiom Kinase in Cancer. *Biomed Research International*. Vol.2015, ID. 690690. DOI:10.1155/2015/690690.
- Liu, S., C. Xu, W. Wu, Z. Fu, S. He, M. Qin, and J. Huang. 2019. Sphingosine Kinase 1 Promotes The Metastasis of Colorectal Cancer by Inducing the Epithelial-mesenchymal transistion Mediated by FAK/AKT/MMPs axis. *International Journal of Oncology*. VOI. 54. PP: 41-52.
- Longley D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston. 2003. 5-Flourouracil: Mechanism of Action and Clinical Strategies. *Nature*. Vol.3. doi: 10.1038/nrc1074.
- Lugli, A., E. Karamitopoulou, and I. Zlobec. 2012. Tumor Budding: A Promising Parameter in Colorectal Cancer. *Br J Cancer*. 106(11): 1713-1717.
- Martinez MD., B. Miralles, and I. Recio. 2015. HT29 Cell Line. *The Impact of Food Bioactive on Health*. ISBN 978-3-319-15791-7;pp:113-124.
- Marzouk O and J. Shofield. 2011. Review of Histopathological and Molecular Prognostic Features in Colorectal Cancer. *Cancers*: No.3: 2767-2810. ISSN 2072-6694.
- Mittal, V.K, J.S. Bhullar, and K. Jayant. 2015. Animal Models of Human *Colorectal Cancer*: Current status, uses and Limitations. *World J Gastroenterol*. 21(41): 11854-11861. DOI: 10.378/wjg.v21.i41.11854.
- Melling, N., C.M. Kowitz, R. Simon, C. Bokemeyer, L. Terracciano, G. Sauter, J.R. Izbicki, and A.H. Marx. 2015.High Ki67 Expression is An Independent Good Prognostic Marker in *Colorectal Cancer*. *J. Clin Pathol*. 0: 1-6. DOI: 10.1136/jclinpath-2015-202985.
- Monique, G.C.T.O., R.H. Medema, P.J. Slootweg, and G. Rijksen. Positivity of Proliferation Marker Ki-67 in Noncycling Cells. *Am J Clin Pathol*. 2019. Vol 110. PP: 24-31
- Morad, S.A.F., L.C. Bridges, A.D.A. Larrea, A.L. Mayen, M.R. MacDougall, T.S. Davis, M. Kester, M.C. Cabot. 2016. Short-Chain Ceramides Depress

Integrin Cell Surface Expression and Function in *Colorectal* Cancer Cells. *Cancer Letters*. Doi: 10.1016/j.canlet.2016.03.049.

Muhale, F.A., B.A. Wetmore, R.S. Thomas, and H.L.McLeod. 2011. System Pharmacology Assessment of 5-Flourouracil Pathway. *Pharmacogenomics*. 12(3): 341-350. Doi: 10.2217/pgs.10.188.

Mundade, R., T.F. Imperiale, L. Prabhu, P.J. Loehrer, and T. Lou. 2014. Genetic Pathways, Prevention, and Treatment of Sporadic *Colorectal* Cancer. *Oncoscience*. Vol.1, No.6.

Mustafa, M, J. Menon, RK. Muniandy, EL. Illizam, MJ. Shah, and AM. Sharifa. 2016. *Colorectal* Cancer: Pathogenesis, Management, and Prevention. *IOSR Journal of Dental and Medical Science*. Vol.15, Issue 5, Ver.IV, PP: 94-100.

Nautiyal J et al. 2011. Combination of dasatinib and curcumin eliminates chemo-resistant colon cancer cells. *Journal of Molecular Signaling*: 6(7). PubMed ID: [21774804](#).

Navale, A.M. 2013. Animal Models of Cancer: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*. Vol.1, Issue 1. ISSN: 0975-8232.

Oh, BY., H.K.Hong, W.Y.Lee, and Y.B. Cho. 2016. Animal Models of *Colorectal* Cancer with Liver Metastasis. *Cancer letter*. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.01.048.

Ohta, Y and K. Ichimura. 2000. Proliferation Markers, Proliferating Cell Nuclear Antigen, Ki67, 5-Bromo-2'-Deoxyuridine, and Cyclin D1 in Mouse Olfactory Epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. Vol.109. PP: 1046-1048

Ontario. 2009. Fecal Occult Blood Test for Colorectal Cancer Screening; An Evidence-Based Analysis. *Ontario Health Technology Assessment Series*. Vol. 9, No. 10. Page: 1-40.

Pardini B, R. Kumar, A. Naccarati, J. Novotny, RB. Prasad, A. Forsti, K. Hemminki, P. Vodicka, and JL. Bermejo. 2011. 5-Fluorouracil-based Chemotherapy for Colorectal Cancer and MTHFR/MTRR Genotypes. *British Journal of Clinical Pharmacology*. Vol.72, No.1. PP: 162-163.

Park M, P. Sundaramoorthy, JJ. Sim, K. Jeong, and HM. Kim. 2017. Synergistically Anti-Metastatic Effect of 5-Fluorouracil on Colorectal Cancer Cells via Calcium-mediated Focal Adhesion Kinase Proteolysis. *Anticancer Research*. Vol. 37. PP: 103-114.

Parwanto, M.L.E., Mahyunis, H. Senjaya, H.J. Edy, Syamsurizal. 2016. Fractionation and Characterization of Proteins in *Lumbricus rubellus*

- Powders. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. Vol.8(1): 15-21. ISSN- 0975 1556.
- Patil S.R and P.M Biradar. 2017. Earthworm's Coelomic Fluid: Extraxtion and Importance. *International Journal of Advanced Scientific Research*. Vol. 2, Issue 2. PP: 01-04.
- Peng, X and J. Guan. 2011. Foca; Adhesion Kinase: From In Vitro Studies to Functional Analysis In Vivo. *Current Protein and Peptide Science*. 12: 52-67.
- Poeschl EM., MJ. Pollhelmer, P. Komprat, RA Lindtner, A. Schlemmer, and P. Rehak. 2010. Perineural Invasion: Correlation with Aggressive Phenothype and Independent Prognostic Variable in Both Colon and Rectum Cancer. *J. Clin Oncol*: 27(31): 5131-5137.
- Prabha, L.M and S. Shathya. 2014. Earthworm-An Alternative Approach to Biomedicine. *Int J Curr Sci*. Vol.13: E 6-8. ISSN-2250-1770.
- Prihantono, P., M. Hatta, C. Binekada, D. Sampepajung, H. Haryasena, B. or of Nelwan, A.A. Islam, dan A.N. Usman. 2017. Ki67 Expression by Immunohistochemistry and Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction as Predictor of Clinical Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Locally Advanced Breast Cancer. *Journal of Oncology*. Vol. 2017. ID: 6209849.
- Raharjo M. 2003. Statistika. Pelatihan Instruktur/ Pengembangan Mutu. Yogyakarta: Depdiknas PPPG Matematika.
- Resch A., NI. Schneider, and C. Langner. 2015. Pathological Evaluation of Colorectal cancer Specimens: Andvanced and Early Lesions. *Cesk Patologie*: 51(1): 12-22.
- Roper J and K.E. Hung. 2013. Molecular Mechanism of *Colorectal Cancer*. *Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer*. DOI: 10.1007/978-1-4614-8412-7\_2. Page: 25-65.
- Sack J and J.M. Rothman. 2002. *Hospyal Physician: Colorectal Cancer*. Natural History and Management. Clinical Review Article. Turner White Communications, Inc. Pages: 64-73.
- Samatra, D.P.G.P., M. Tjokorda, D.M. Sukrama, N.W.S. Dewi, R.K. Praja, D. Nurmansyah, and I.P.E. Widyadharma. 2017. Extract of Earthworms (*Lumbricus rubellus*) Reduced Malondialdehyde and 8-hydroxydeoxyguanosine Level in Male Wistar Rats Infected by *Salmonella typhi*. *Biomedical & Pharmacology Journal*. 10(4): 1765-1771. DOI: 10.13005/bpj/1290.

- Schindelin J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Tinevez, D. James White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona. 2012. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nature Methods*. Vol.9. No.7. PP:676-682.
- Sergei I.G., FR. Greten, and M. Karin. 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. Vol. 140. No. 6. PP: 883-899.
- Serrels A, K. McLeod, M. Canel, A. Kinnaird, K. Graham, MC. Frame, and VG. Brunton. 2012. The Role of Focal Adhesion Kinase Catalytic Activity on The Proliferation and Migration of Squamous Cell Carcinoma Cells. *International Journal of Cancer*. Vol. 131. PP: 287-297.
- Sever R and J.S. Brugge. 2015. Signal Transduction in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. Vol.5. PP: 1-21.
- Sobecki M., K. Mrouj, J. Colinge, F. Gerbe, P. Jay, L. Krasinska, V. Dulic, and D. Fisher. 2017. *Cancer Res*. Vol.77. No. 10. PP: 2722-2734.
- Soper, BW. 2015. Modeling Human Cancer in Mice. Jackson Laboratory. Charles River Presentation 1, pp: 1-56.
- Srichai M.B and R. Zent. 2010. Chapter 2: Integrin Structure and Function. *Cell-Extracellular Matrix Interaction in Cancer*. Springer. Vol. XII. Page: 19-28
- Sudoyo, A.W., B. Hernowo, E. Krisnuhani, A.H. Reksodiputro, D. Hardjodisastro, and E.S. Sinuraya. 2010. Colorectal Cancer among Young Native Indonesians: A clinicopathological and molecular assessment on microsatellite instability. *Med J Indones*. Vol. 19, No.4. Page: 245-251.
- Sukumwang N and K Umezawa. 2013. Earthworm-Derived Pore-Forming Toxin Lysenin and Screening of Its Inhibitors. *Toxins*. Vol 5. ISSN 2072-6651. PP: 1392-1401.
- Sulzmaier, F.J., C. Jean, and D.D. Schlaepfer. 2014. FAK in Cancer: Mechanistic Finding and Clinical Applications. *Nat Rev Cancer*. Vol. 14(9): 598-610. DOI: 10.1038/nrc3792.
- Sun X., A. Bizhanova, T.D. Matheson, J. Yu, L.J. Zhu, and P.D. Kaufman. 2016. Ki67 Contributes to Normal Cell Cycle Progression and Inactive X Heterochromatin in p21 Checkpoint-Proficient Human Cells. *Molecular and Cell Biology*. Vol.37, Issue 17.
- Supranto, J. 2000. *Teknik Sampling untuk Survei dan Eksperimen*. Penerbit PT Rineka Cipta, Jakarta.

- Takagi, M., Y. Nishiyama, A. Taguchi, and N. Imamoto. 2014. Ki67 Antigen Contributes to the Timely Accumulation of Protein Phosphatase 1 $\gamma$  on Anaphase Chromosomes. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 289, No. 33. PP: 22877-22887.
- Takahashi, T., M. Morotomi, and K. Nornoto. 2004. A Novel Mouse Model of Rectal Cancer Established by Orthotopic Implantation of Colon Cancer Cells. *Cancer Science*. Vol. 39. No.6. pp:514-519.
- Tao, L., JK. Yang, Y. Gu, X. Zhou, AG. Zhao, J. Zheng, and YJ. Zhu. Weichang'an and 5-Fluorouracil Suppresses Colorectal Cancer in a Mouse Models. *World J. gastroenterol*. 28; 21(4): 1125-1139. Doi:10.3748/wjg.v21.i4.1125.
- Taniguchi M and T. Okazaki. 2013. The Role of Spingomyelin and Spingomyelin Synthase in Cell Death, Proliferation, and Migration-From Cell and Animal Models to Human Disorders. *Biochimica et Biophysica Acta*. 57599, No: 12; 4C; 2,3.
- Thomas, S.A., Z. Grami, S. Mehta, and K. Patel. 2016. Adverse Effects of 5-Fluorouracil: Focus on Rare Side Effects. *Cancer Cell & Microenvironment*. Vol.3: e1266. Doi: 10.14800/ccm.1266.
- Thomas, S.K., K.A. Owen, K. Conger, R.A. Llewellyn, A.H. Bouton, and J.E. Casanova. 2019. Non-reductant functions of FAK and Pyk2 in Intestinal Epithelial Repair. *Nature*. Vol 9. No. 4497. Pp: 1-10.
- Touil Y., W. Igoudjil, M. Corvaisier, AF. Dessen, J. Vandomme, D. Monte, L. Stechly, N. Skrypek, C. Langlois, G. Grard, G. Millet, E. Leteurtre, P. Dumont, S. Truant, FR. Pruvot, M. Hebbar, F. Fan, L.M. Ellis, P. Formstecher, I.V. Seuningen, C. Gespach, R. Polakowska, and G. Huet. 2014. Colon Cancer Cells Escape 5FU Chemotherapy-Induced Cell Death by Entering Stemness and Quiescence Associated with the c-Yes/YAP Axis. 2013. *Clinical Cancer Research*. Vol, 20. No.4. Page: 837-846.
- Uehara, I and N. Tanaka. Role of p53 in The Regulation of The Inflammatory Tumor Microenvironment and Tumor Suppression. 2018. *Cancer*. Vol. 10. No. 219. PP: 2-13.
- Verma, M.K., F. Xavier, Y.K. Verma, and K. Sobha. 2013. Evaluation of Cytotoxic and Anti-tumor Activity of Partially Purified Serine Protease Isolate from The Indian Earthworm *Pheretima posthuma*. *Asian Pac J Trop Biomed*. 3(11): 896-901. DOI: 10.1016/S2221-1691(13)60175-6.
- Vidya. N., Dinesh.M.S., Ananda S., Radha.D., Kale. 2016. Cytotoxic Potential of *Eudrilus eugeniae* coelomcyte culture supernatant against tumor cells. *International Journal of Scientific and Research Publications*. Volume 6, Issue 8: 202 ISSN 2250-3153.

- Wei X., W. Wang, L. Wang, Y. Zhang, M. Chen, F. Wang, J. Yu, Y. May, and G. Sun. 2016. MicroRNA-21 Induces 5-Fluorouracil Resistance in Human Pancreatic Cancer Cells by Regulating PTEN and PDCD4. *Cancer Med.* 5(4): 693-702. DOI:10.1002/cam4.626.
- Williams, J.M., C.A. Duckworth, K. Vowell, M.D. Burkitt, and D.M. Pritchard. 2016. Intestinal Preparation Techniques for Histological Analysis in The Mouse. *Current Protocols In Mouse Biology*, Volume 6, Issue 2. Page 148-168.
- Wilson, O.J., C.S. Shaw, M. Sherlock, P.M. Stewart, and A.J.M. Wagenmakers. 2012. Immunofluorescent Visualisation of Focal Adhesion Kinase in Human Skeletal Muscle and Its Associated Microvasculature. *Histochem Cell Biol.* 138:617-626.
- Wulandari, D. 2010. Pengaruh Terapi Kombinasi Klorokuin dan Serbuk *Lumbricus rubellus* Terhadap Ekspresi Gen TNF-a pada Mencit Swiss yang Diinfeksi *Plasmodium berghei* Anka. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Xinglong, Q. Y. Tang, and S. Hua. Immunological Approaches Towards Cancer and Inflammation: A Cross Talk. *Frontiers in Immunology : Review.* Vol.9. Article 563. PP: 1-19.
- Yanju, M. S. Semba, A. Maemoto, M. Takeuchi, I. Kameshita, S. Kato, T. Katoh, Y. Liu, and T. Taniguchi. 2010. Oxazolone-induced Over-expression of Focal Adhesion Kinase in Colon Epithelial Cells of Colitis Mouse Model. *FEBS Letters. Elsvier.* Vol. 584. PP: 3949-3954.
- Yoon, H., J.P. Dehart, J.M. Murphy, and S.S. Lim. 2014. Understanding the Roles of FAK in Cancer: Inhibitors, Genetic Models, and New Insight. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* Vol. 63(2). DOI: 10.1369/0022155414561498.
- Zhang, JT., WL. Zhou, C. He, T. Liu, CY. Li, and L. Wang. 2015. 5-Fluorouracil Induces Apoptosis of Colorectal Cancer Cells. *Genetic and Molecular Research.* Vol. 15, No. 1. PP: 1-9.
- Zhao, J and J. Guan. 2009. Signal Transduction by Focal Adhesion Kinase in Cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 28: 35-49. DOI: 10.1007/s10555-008-9165-4.
- Zhao, X., L.Li, T.K. Starr, and S. Subramanian. 2017. Tumor Location Impacts immune Response in Mouse Models of Colon Cancer. *Oncotarget.* Vol.18(33): 54775-54787





# LAMPIRAN

Lampiran 1. Laik Etik Penelitian



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 976-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL : KOMBINASI TERAPI 5-FU DAN COELOMIC FLUID  
LUMBRICUS RUBELLUS TERHADAP PROLIFERASI  
DSN EKSPRESI FOCAL ADHESION KINASE (FAK)  
PADA MENCIT Balb/c YANG DIINDUKSI SEL HT-29  
COLORECTAL CANCER

PENELITI : AGUSTINA TRI ENDHARTI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Madiang, 25 April 2018  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya

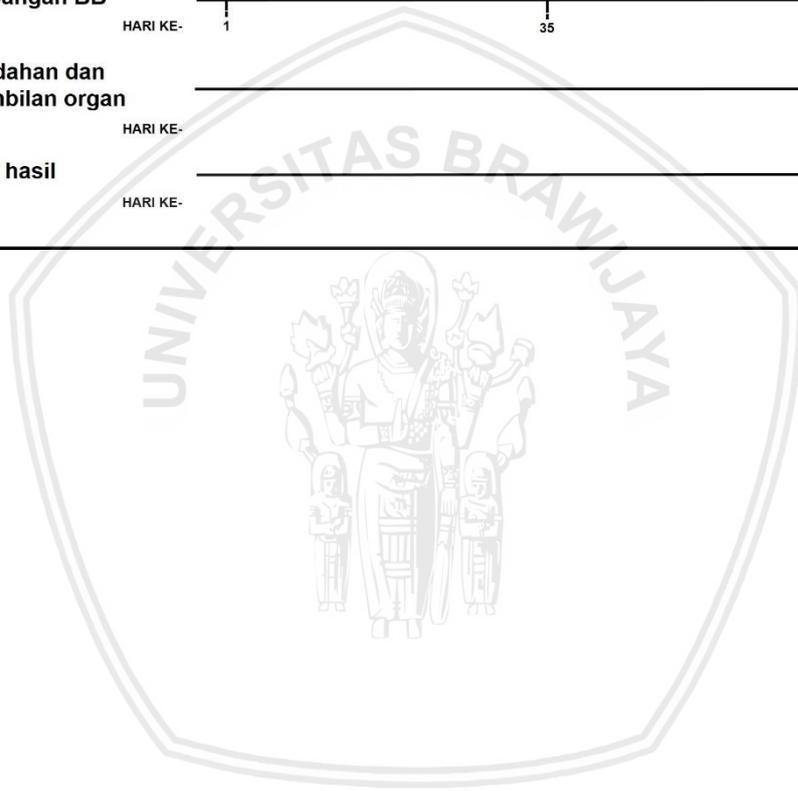
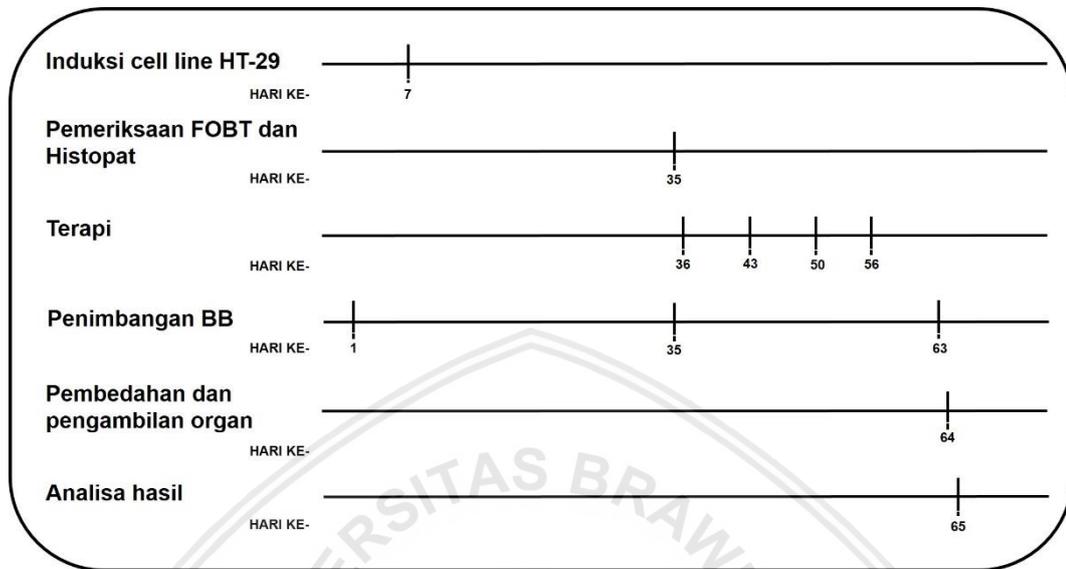


Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.  
NIP. 19600903 198802 2 001

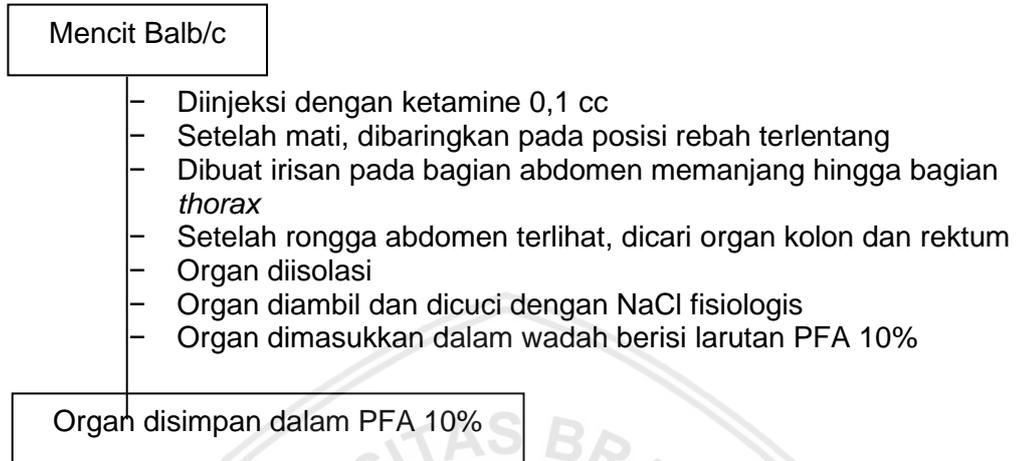
*NB: Nama yang tercantum pada sertifikat ini merupakan anggota peneliti*

NO	NAMA	NIM/NIP
1	Drs. Sofy Permana, MSc., DSc	196809301994021003
2	Reny Purnama Hadi	17607100111001
3	Iryasti Yudistia	176070100011006
4	Andre Setiawan	176070100011002
5	Hilmia Lukman	176070100111004

**Lampiran 2. Timeline Penelitian**



### Lampiran 3. Pembedahan dan Pengambilan Organ



**Lampiran 4. Pembuatan Organ dalam Blok *Paraffin* dan Preparat Histopatologi serta Pewarnaan Hematoxylen-eosin/HE (Prihantono *et al.*, 2017)**

Organ yang disimpan di dalam PFA 10 %

- Direndam dalam etanol 70%, 24 jam
- Direndam dalam etanol 80%, 2 jam
- Direndam dalam etanol 90%, 20 menit
- Direndam dalam etanol 95%, 25 menit
- Direndam dalam etanol *absolute*, 3 x 30 menit
- Direndam xylol I, 2 x 30 menit pada suhu ruang
- Direndam xylol II selama 30 menit pada suhu 60 - 63°C
- Diinfiltirasi pada *paraffin* cair
- *Embedding* blok *paraffin*
- Didinginkan pada suhu 4°C

Organ di dalam Blok *Paraffin*

**Proses Embedding**

Organ di dalam Blok *Paraffin*

- Dipotong dengan ketebalan 5µm dengan mikrotom
- Dipindahkan ke air hangat dengan suhu 38-40°C
- Diambil dengan objek *glass*
- Dikeringkan diatas *hot plate* suhu 38-40°C
- Disimpan dalam inkubator dengan suhu 38-40°C selama 24 jam

Preparat Jaringan

**Proses Pewarnaan HE**

Preparat Jaringan

- Direndam dalam *xylol* selama 10 menit, sebanyak 3x
- Direndam dalam etanol bertingkat masing-masing 10 menit
- Diwarnai dengan hematoksilin selama 5-10 menit
- Dicuci dengan air mengalir
- Diwarnai dengan eosin selama 5-10 menit
- Dicuci dengan air mengalir
- Direndam di dalam etanol bertingkat <5 detik
- Direndam dalam etanol sebanyak 3x, @ 1-3 menit
- Dikeringkan
- Dimounting dengan entelan
- Dilabel

Preparat HE

**Lampiran 5. Metode Pemeriksaan *Immunofluorescence* (Cepeda, 2014).**

## Preparat Jaringan dalam parafin

- Deparafinasi pada *xylo* 1 dan 2, 10 menit
- Rehidrasi dengan *ethanol* absolut 1 dan 2, 10 menit
- Dilanjutkan dengan *ethanol* bertingkat (95%,80%, &70%), 1 menit
- Dicuci dengan *aquades* 3 x 1 menit
- *Antigen retrival* dalam *buffer sitrat* pada suhu 95°C, 20 menit
- Dicuci PBS 3x 1 menit
- Diinkubasi dalam 3% *blocking buffer*, 30 menit
- Diinkubasi antibodi berlabel FITC, 2 jam dalam ruang gelap
- Dicuci dengan PBS 3x1 menit
- Diinkubasi dalam DAPI, 5 menit
- Dicuci PBS sebanyak 3x1 menit
- Di-*mounting* dengan gliserol
- Ditutup dengan *cover glass*
- Diamati dengan miroskop *fluorescent*

## Preparat IF



**Lampiran 6. Hasil Perhitungan Immunofluorescence Ekspresi Proliferasi dengan Software Fiji**

Group	Ulangan	Lapang pandang					Rata-rata	Standar deviasi
		1	2	3	4	5		
<b>K-</b>	1	2.17	3.73	4.62	2.75	1.82	3.01	1.15
	2	2.81	1.99	3.98	3.24	1.56	2.71	0.97
	3	1.56	3.37	2.75	2.61	1.90	2.44	0.72
<b>Rata-rata</b>							2.73	0.29
<b>K+</b>	1	42.25	43.97	35.19	50.24	44.66	43.26	5.41
	2	40.61	49.63	41.43	40.29	42.67	42.92	3.86
	3	39.70	50.50	40.77	40.36	39.32	42.13	4.72
<b>Rata-rata</b>							42.77	0.58
<b>D1</b>	1	17.40	13.79	17.99	19.07	16.54	16.95	1.99
	2	14.00	20.37	11.65	17.54	17.09	16.13	3.37
	3	8.16	20.42	20.99	19.65	14.65	16.77	3.38
<b>Rata-rata</b>							16.62	0.43
<b>D2</b>	1	13.72	10.29	13.36	8.46	9.52	11.07	2.35
	2	10.11	11.67	10.65	9.68	8.45	10.11	1.19
	3	10.08	10.27	9.65	11.63	8.90	10.11	2.89
<b>Rata-rata</b>							10.43	0.55
<b>D3</b>	1	9.75	5.91	6.28	6.33	4.56	6.57	1.91
	2	6.11	4.09	5.86	4.39	6.26	5.35	1.02
	3	4.49	4.5	6.20	4.33	5.65	5.03	0.83
<b>Rata-rata</b>							5.86	29.55
<b>5-FU</b>	1	23.69	22.34	19.65	25.22	20.54	22.29	2.27
	2	24.36	20.81	20.69	19.22	22.89	21.59	2.02
	3	25.96	20.86	20.99	24.65	19.01	22.29	1.00
<b>Rata-rata</b>							22.06	0.40
<b>C</b>	1	30.23	32.29	30.65	33.39	25.64	30.44	2.97
	2	33.82	27.97	25.24	30.54	27.56	29.02	3.27
	3	27.85	24.52	30.17	33.77	29.62	29.19	5.43
<b>Rata-rata</b>							29.55	0.77

**Lampiran 7. Hasil Perhitungan Immunofluorescence Ekspresi FAK dengan Software Fiji**

Group	Ulangan	Lapang pandang					Rata-rata	Standar deviasi
		1	2	3	4	5		
<b>K-</b>	1	7.67	6.35	2.14	7.99	2.55	5.34	2.81
	2	0.88	0.93	1.99	1.04	0.53	1.07	0.54
	3	0.13	1.63	2.11	0.54	1.25	1.14	0.80
<b>Rata-rata</b>							2.52	2.45
<b>K+</b>	1	64.38	69	78.96	56.97	63.67	66.6	8.14
	2	67.1	67.1	66.38	60.1	59.62	64.06	3.84
	3	60.32	59.22	61.26	70.12	68.46	63.87	5.03
<b>Rata-rata</b>							64.84	1.52
<b>D1</b>	1	33.45	24.63	22.73	26.2	35.43	28.49	5.61
	2	28.96	30.48	27.65	26.98	26.33	28.08	1.65
	3	27.53	30.02	27.12	25.84	30.54	28.21	1.2
<b>Rata-rata</b>							28.26	0.21
<b>D2</b>	1	19.44	22.20	17.68	19.33	17.84	19.3	1.82
	2	17.65	20.81	19.88	17.46	20.02	19.16	1.51
	3	17.63	17.1	20.54	22.64	19.09	19.4	2.25
<b>Rata-rata</b>							19.29	0.12
<b>D3</b>	1	2.08	2.99	10.11	4.33	6.54	5.21	3.21
	2	7.01	3.55	4.89	7.32	3.64	5.28	1.80
	3	2.51	7.33	7.99	6.40	2.09	5.26	2.77
<b>Rata-rata</b>							5.25	0.04
<b>5-FU</b>	1	30.3	39.77	28.39	33.77	42.66	34.98	6.1
	2	35.63	38.22	29.09	33.64	33.89	34.09	3.34
	3	30.25	28.99	33.65	33.46	49.02	33.07	3.9
<b>Rata-rata</b>							34.05	0.95
<b>C</b>	1	40.22	45.65	41.65	44.97	42.98	43.09	2.26
	2	44.93	40.09	44.66	42.65	40.76	42.62	2.2
	3	44.65	42.03	43.88	40.65	40.46	42.33	1.89
<b>Rata-rata</b>							42.68	0.38

## Lampiran 8. Hasil Analisis Statistika Ekspresi Proliferasi

### Uji Normalitas

Tests of Normality

kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
nilai k-	.178	3	.	1.000	3	.960
k+	.270	3	.	.948	3	.562
5fu	.383	3	.	.754	3	.008
d1	.306	3	.	.905	3	.402
d2	.384	3	.	.752	3	.005
d3	.291	3	.	.924	3	.467
c	.348	3	.	.832	3	.194

a. Lilliefors Significance Correction

Uji normalitas *Shapiro-Wilk* menunjukkan nilai sig >0.05 sehingga menunjukkan bahwa data yang diperoleh terdistribusi normal

### Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

nilai

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.135	6	14	.392

Uji homogenitas menunjukkan hasil nilai sig >0.05, yang berarti bahwa data homogen, sehingga dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.

### Uji Anova

ANOVA

nilai	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3603.808	6	600.635	2.016E3	.000
Within Groups	4.171	14	.298		
Total	3607.978	20			

Uji Anova menunjukkan nilai Sig sebesar <0.05 yang artinya menolak H0. Hal ini dapat diartikan bahwa terdapat perbedaan signifikan pada setiap kelompok.

**Uji Post Hoc**

nilai

kelompok	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Tukey HSD <sup>a</sup>								
k-	3	2.7265						
d3	3		5.8567					
d2	3			10.4318				
d1	3				16.6237			
5fu	3					22.0610		
c	3						29.5525	
k+	3							42.7734
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Uji lanjutan berupa *Tukey* dilakukan untuk melihat perbedaan yang terdapat pada setiap kelompok.

## Lampiran 9. Hasil Analisis Statistika Ekspresi FAK

### Uji Normalitas

Tests of Normality

kelomp ok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
nilai k-	.380	3	.	.761	3	.025
k+	.364	3	.	.800	3	.115
5fu	.186	3	.	.998	3	.922
d1	.262	3	.	.957	3	.599
d2	.202	3	.	.994	3	.852
d3	.295	3	.	.920	3	.453
c	.231	3	.	.980	3	.732

a. Lilliefors Significance Correction

Uji normalitas menunjukkan nilai sig > 0.05, yang dapat diartikan bahwa data terdistribusi secara normal

### Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

nilai

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.042	6	14	.001

Uji homogenitas menunjukkan nilai sig < 0.05 sehingga dapat diartikan bahwa data yang diperoleh tidak homogen, sehingga tidak dapat dilakukan uji Anova. Untuk melihat adanya perbedaan pada setiap kelompok, maka uji yang dilakukan adalah uji *Kruskal-Wallis*



### Uji *Kruskal-Wallis*

Test Statistics<sup>a,b</sup>

	nilai
Chi-Square	19.325
df	6
Asymp. Sig.	.004

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan nilai *Asymp.sig* <0.05 yang dapat diartikan bahwa terdapat perbedaan bermakna antar setiap perlakuan.

### Uji *Post Hoc*

		nilai						
kelompok	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	
Tukey HSD <sup>a</sup>	k-	3	2.5153					
	d3	3	5.2533					
	d2	3		19.2871				
	d1	3			28.2597			
	5fu	3				34.0475		
	c	3					42.6799	
	k+	3						64.8441
	Sig.		.123	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Uji lanjutan dilakukan untuk melihat perbedaan pada setiap kelompok.

**Lampiran 10. Uji Analisis Korelasi *Pearson***

**Correlations**

		prolferasi	FAK
prolferasi	Pearson Correlation	1	.993**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	7	7
FAK	Pearson Correlation	.993**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	7	7

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Berdasarkan hasil uji korelasi *Pearson* menunjukkan nilai *sig (2-tailed)* < 0.05, sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi yang signifikan antara proliferasi dan FAK. Tanda bintang 2 (\*\* ) menunjukkan bahwa korelasi yang ada memiliki nilai signifikan 1%

Distribusi Nilai <i>t</i> tabel		
PRODUCT MOMENT		
N (df)	The Level of Significance	
	5%	1%
3	0.997	0.999
4	0.950	0.990
5	0.878	0.959
6	0.811	0.917
7	0.754	0.874
8	0.707	0.834
9	0.666	0.798
10	0.632	0.765
11	0.602	0.735
12	0.576	0.708
13	0.553	0.684

Selanjutnya berdasarkan uji *Pearson* diketahui nilai *r* adalah 0,993, dimana berdasarkan distribusi nilai *r* tabel dengan N=7 maka, nilai *r* pada kedua kelompok > *r* tabel 0.874. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa korelasi yang dihasilkan adalah positif dimana apabila proleferasi mengalami kenaikan maka nilai FAK juga meningkat.