

**EKSPRESI CASPAGFE 3 DAN Ki67 PADA
ADENOKARSINOMA MAMMAE MENCIT C3H
YANG DIBERI EKSTRAK AKAR *SALVIA
MILTIORRHIZAE BUNGE***

*CASPASE 3 AND Ki67 EXPRESSION IN C3H MICE MAMMARY
ADENOCARCINOMA ADMINISTERED WITH
SALVIA MILTIORRHIZAE BUNGE ROOTS EXTRACT*



**Tesis
untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S-2**

Magister Ilmu Biomedik

**SYEBEN HEZER
2201011400083**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2014**

TESIS

EKSPRESI CASPASE 3 DAN Ki67 PADA ADENOKARSINOMA MAMMAE
MENCIT C3H YANG DIBERI EKSTRAK AKAR *SALVIA MILTIORRHIZA*
BUNGE

Disusun oleh :

Syeben Hezer
NIM: 22010110400083

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji pada tanggal 29 Agustus 2014

Menyetujui,
Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr.dr. Indra Wijaya, SpPA(K)
NIP: 19460105 197301 1 001

dr.Noor Widjayahadi, Mkes, Sp.FK
NIP: 196406301996031001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Prof.DR.dr.Tri Nur Kristina, DMM., M.Kes.
NIP: 195905271986032001

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelas kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya, serta tidak terdapat unsur-unsur yang tergolong plagiarism sebagaimana yang dimaksud dalam permendiknas no 17 tahun 2010. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, September 2014

Syeben Hezer

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : dr. Syeben Hezer Epatah Hietingwati
Tempat / Tanggal Lahir : Kupang / 19 September 1977
Agama : Kristen
Jenis Kelamin : Laki-laki
Alamat : Jln. Menoreh Utara III no 5 Sampangan-
Semarang

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN X Perumnas Bairopite- Dili : Lulus tahun 1990
2. SMN I Gleno-Ermera : Lulus tahun 1993
3. SMA II Dili : Lulus tahun 1996
4. FK Maranatha- Bandung : Lulus tahun 2004
5. PPDS I Patologi Anatomi FK UNDIP : Januari 2011- Juni 2014
6. Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana UNDIP Semarang

C. Riwayat Pekerjaan

1. Dokter LSM (2004- 2005)
2. Dokter PTT: - Puskesmas Nembrala Rote-NTT (2005-2007)
- RSUD Ba'a Rote-NTT (2007-2008)
2. Dokter PNS di RSUD Johannes Kupang- NTT (2008 – sekarang)
- Dokter UGD

D. Riwayat Keluarga

- a. Nama Ayah : Petrus Hietingwati
- b. Nama Ibu : Engelina Siokh

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan YME atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan judul “ekspresi caspase 3 dan Ki67 pada adenokarsinoma mammae mencit C3H yang diberi ekstrak akar *Salvia milthiorrhiza Bunge*”. Pada kesempatan yang baik ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Diponegoro Semarang dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
2. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, Prof. Dr. dr. Tri Nur Krisna, DMM, M.Kes.
3. Prof.Dr. Sarjadi, Sp PA(K) (Alm) sebagai pembimbing pertama awal, atas bimbingan, motivasi, waktu dan kesabaran yang telah diberikan kepada saya.
4. dr. Indra Wijaya, SpPA(K), sebagai penguji dan pembimbing pertama, atas segala bimbingan, waktu, dan kesabaran yang telah diberikan kepada saya sehingga dapat menyelesaikan tesis ini.
5. dr.Noor Widjayahadi, Mkes, Sp.FK sebagai penguji dan pembimbing kedua atas bimbingannya.
6. dr.Siti Amarwati,SpPA(K) selaku Ketua Program Studi PPDS I Patologi Anatomi sekaligus sebagai Ketua Bagian Patologi Anatomi FK UNDIP yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh ini dan atas perhatian, motivasi, dan fasilitas yang diberikan selama proses pendidikan dan penyelesaian tesis.
7. dr. Awal Prasetyo, Mkes, SpTHT-KL yang telah turut membimbing pelaksanaan penelitian ini.
8. dr. Dik Puspa MKes,SpPA dan dr. Devia MKes, SpPA yang telah turut membimbing dalam pembacaan hasil penelitian.

9. Para guru besar dan guru-guru saya di Patologi Anatomi FK UNDIP Semarang Prof. dr. Tirtosugondo, SpPA(K), Prof. dr. Soebowo, SpPA(K), Prof. Dr. dr. Tjahjono, SpPA(K), FIAC (Alm), dr. Kasno, SpPA(K), dr. Noor Yazid, SpPA(K), dr. Bambang Endro Putranto, SpPA(K), dr. Udadi Sadhana, Mkes, SpPA, dr. Ika Pawitra Miranti, MKes, SpPA, dr. Vega MKes, SpPA, dr. Meira MKes, SpPA. dr. Andika MKes, SpPA,, atas bimbingan yang diberikan selama pendidikan.
10. Teman- teman residen, dr. Dyah Ari, dr. Liza, dr. Eny, dr. Lina, dr. Yovi, dr. Diana, dr. Nadia, dr. Sigit, dr. Yuni, dr. Marliana, dr. Raudatul, dr. Faiza Rizky, dr. Edi Prasetyo, dr. Hapsari, dr. Al Ichsan, yang selalu memberi semangat.
11. Dra. Puspita Eka Wuyung dan Pak Slamet atas waktu dan bantuan yang diberikan selama menjalankan penelitian di FK UI Jakarta.
12. Bu Agustin, atas waktu dan bantuan yang diberikan dalam pembuatan sediaan imunohistokimia di RS Dr. Sardjito Yogyakarta.

Semarang, September 2014

Syeben Hezer

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|----------|
| Halaman judul | i |
| Lembar persetujuan | ii |
| Lembar monitoring perbaikan tesis | iii |
| Pernyataan Plagiarsm | iv |
| Daftar riwayat hidup | v |
| Kata pengantar | vi |
| Daftar isi | viii |
| Daftar tabel | xii |
| Daftar gambar | xiii |
| Daftar lampiran | xiv |
| Daftar singkatan | xv |
| Abstrak | xviii |
| BAB I PENDAHULUAN.....,,..... | 1 |
| 1.1. Latar belakang | 1 |
| 1.2. Perumusan masalah..... | 4 |
| 1.3. Tujuan penelitian..... | 4 |
| 1.3.1. Tujuan umum | 4 |
| 1.3.2. Tujuan khusus | 5 |

| | | |
|---|---|----|
| 1.4. | Manfaat penelitian..... | 5 |
| I.5. | Orisinalitas..... | 5 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | | 9 |
| 2.1 | Karsinoma mamma..... | 9 |
| 2.1.1 | Gambaran umum dan klasifikasi..... | 9 |
| 2.1.2 | Terapi..... | 11 |
| 2.2. | <i>Salvia miltiorrhiza Bunge</i> | 12 |
| 2.3 | Caspase 3 dalam mekanisme apoptosis..... | 23 |
| 2.3.1 | Apoptosis..... | 23 |
| 2.3.2 | Caspase 3..... | 27 |
| 2.3.3 | Peran <i>S. miltiorrhiza bunge</i> terhadap caspase 3.... | 27 |
| 2.4 | Ki67 dalam mekanisme proliferasi sel | 29 |
| 2.4.1 | Proliferasi sel..... | 29 |
| 2.4.2 | Ki67..... | 33 |
| 2.4.3 | Peran <i>S. miltiorrhize Bunge</i> terhadap Ki67..... | 34 |
| BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS..... | | 36 |
| 3.1. | Kerangka teori,,..... | 36 |
| 3.2. | Kerangka konsep..... | 37 |
| 3.3 | Hipotesis..... | 37 |
| BAB IV METODE PENELITIAN..... | | 38 |

| | | |
|-------------------------|---|----|
| 4.1 | Ruang lingkup penelitian..... | 38 |
| 4.2 | Tempat penelitian..... | 38 |
| 4.3 | Jenis dan rancangan penelitian..... | 38 |
| 4.4 | Populasi dan sampel penelitian..... | 39 |
| | 4.4.1 Populasi penelitian..... | 39 |
| | 4.4.2 Sampel penelitian..... | 39 |
| 4.5 | Variabel penelitian..... | 40 |
| | 4.5.1 Variabel bebas ,,,,,,..... | 40 |
| | 4.5.2 Variabel tergantung..... | 40 |
| | 4.5.3 Definisi operasional..... | 41 |
| 4.6 | Bahan dan alat..... | 42 |
| 4.7 | Cara kerja..... | 43 |
| 4.8 | Analisis data | 45 |
| 3.9 | Ethical clearance..... | 46 |
| BAB V HASIL..... | | 47 |
| 5.1 | Analisis sampel..... | 47 |
| 5.2 | Hasil analisis skor ekspresi caspase 3..... | 47 |
| 5.3 | Hasil analisis skor ekspresi Ki67 | 51 |
| 5.4 | Perhitungan nilai kappa | 54 |
| 5.5 | Pengukuran tumor | 54 |
| BAB VI PEMBAHASAN | | 55 |

| | | |
|------------------------------------|-------------------------------|----|
| 6.1 | Ekspresi caspase 3..... | 55 |
| 6.2 | Ekspresi Ki 67 | 57 |
| 6.3 | keterbatasan penelitian | 58 |
| BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN | | 59 |
| 7.1 | Kesimpulan | 59 |
| 7.2 | Saran..... | 59 |
| Daftar pustaka..... | | 60 |
| Lampiran..... | | 65 |

DAFTAR TABEL

| | |
|--|----|
| Tabel 1. Penelitian-penelitian <i>S milthiorrhiza Bunge</i> sebelumnya | 5 |
| Tabel 2. Analisis skor ekspresi caspase 3 | 47 |
| Tabel 3. Analisis skor ekspresi Ki67 | 51 |
| Tabel. 4 Rerata volume tumor | 54 |

DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|---------|
| 1. Daun dan bunga <i>Salvia miltiorrhiza Bunge</i> | 12 |
| 2. Akar <i>Salvia miltiorrhiza Bunge</i> | 13 |
| 3. Jalur metabolisme <i>tanshinones</i> | 15 |
| 4. Jalur intrinsik dan ekstrinsik apoptosis..... | 26 |
| 5. Siklus pembelahan sel..... | 30 |
| 6. Fase G1 siklus sel..... | 32 |
| 7. Skor Allred..... | 41 |
| 8. <i>Box-plot</i> skor ekspresi caspase 3 | 48 |
| 9. pewarnaan IHK ekspresi caspase 3 dan HE | 50 |
| 10. <i>Box-plot</i> skor ekspresi Ki67 | 51 |
| 11. pewarnaan IHK ekspresi Ki6..... | 53 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|---|---------|
| Lampiran 1. Metode induksi tumor | 65 |
| Lampiran 2. Penatalaksanaan jaringan..... | 66 |
| Lampiran 3. Pewarnaan jaringan HE..... | 67 |
| Lampiran 4. Metode pembuatan sediaan Immunohistokimia..... | 68 |
| Lampiran 5. Data deskriptif ekspresi caspase dan ki67..... | 70 |
| Lampiran 6. Hasil uji kappa | 75 |
| Lampiran 7. Uji beda | 77 |
| Lampiran 8. Data hasil penelitian | 82 |
| Lampiran 9 Ethical clearance | 84 |
| Lampiran 10 Surat ijin pelaksanaan penelitian | 85 |
| Lampiran 11 foto-foto penelitian | 86 |
| Lampiran 12 Perhitungan dosis <i>S. milthiorrhiza Bunge</i> | 87 |

SINGKATAN

| | |
|-------|--|
| ER | = <i>Estrogen reseptor</i> |
| TI | = <i>Tanshinone I</i> |
| IIIa | = <i>Tanshinone IIa</i> |
| CT | = <i>Cryptotanshinone</i> |
| DH-TI | = <i>Dihydrotanshinone I</i> |
| MVA | = <i>Mevalonate</i> |
| MEP | = <i>Metil-D-eritritol-4-fosfat</i> |
| DXS | = <i>Deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase</i> |
| DXR | = <i>Deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase</i> |
| GA-3P | = <i>Glyceraldehyde-3-phosphate</i> |
| DXP | = <i>Deoxy-d-xylulose-5-phosphate</i> |
| IPP | = <i>Isopentenylidiphosphate</i> |
| DMAPP | = <i>Dimethylallyldiphosphate</i> |
| GPP | = <i>Geranyldiphosphate</i> |
| FPP | = <i>Farnesyl pyrophosphate</i> |
| GGPPS | = <i>Geranylgeranyldiphosphate synthase</i> |
| GGPP | = <i>Geranylgeranyldiphosphate</i> |
| CPP | = <i>Copalylidiphosphate</i> |
| KSL | = <i>Kaurene synthase-like</i> |
| MMP | = <i>Mitochondrial membrane potential</i> |

| | |
|------------------------|---|
| <i>P13K/AKT kinase</i> | = <i>Phosphatidylinositide 3-kinases / protein kinase B</i> |
| CDK | = <i>Cyclin dependent kinase</i> |
| CDC | = <i>Cell division cycle</i> |
| TNF- α | = <i>Tumor necrosis factor-α</i> |
| MCL1 | = <i>Myeloid cell leukemia 1</i> |
| EGFR | = <i>Epidermal growth factor receptor</i> |
| HER2/ErbB-2/Neu | = <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> |
| BCL-2 | = <i>B-Cell lymphoma 2</i> |
| GADD153 | = <i>Growth arrest- and DNA damage-inducible gene 153</i> |
| ROS | = <i>Reactive oxygen species</i> |
| p38 MAPK | = <i>p38 mitogen- activated protein kinase</i> |
| AP-1 | = <i>Activator protein-1</i> |
| mTOR | = <i>Mammalian target of rapamycin</i> |
| Rb | = <i>Retinoblastoma</i> |
| STAT | = <i>Signal transducer and activator of transcription</i> |
| JNK | = <i>Jun N-terminal kinase</i> |
| iNOS | = <i>Inducible nitric oxide synthase</i> |
| NO | = <i>Nitrogen oxide</i> |
| VEGF | = <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| IL-1 | = <i>Interleukin-1</i> |
| IL-6 | = <i>Interleukin-6</i> |

| | |
|----------------|---|
| MRSA | = <i>Methicillin resistant Staphylococcus aureus</i> |
| LDL | = <i>Oksidasi low-density lipoprotein</i> |
| CD95 | = <i>Cluster of differentiation 95</i> |
| TNFR1 | = <i>TNF receptor-1</i> |
| TRADD | = <i>TNF- receptor associated death domain protein</i> |
| FADD | = <i>Fas-associated death domain</i> |
| DISC | = <i>Death-inducing signalling complex</i> |
| TRAF-2 | = <i>TNF receptor-associated factor- 2</i> |
| cIAP1 | = <i>Cellular inhibitor of apoptosis protein-1</i> |
| RIP | = <i>Ribosome-inactivating protein</i> |
| NF- κ B | = <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> |
| AIF | = <i>Apoptosis inducing factor</i> |
| Smac | = <i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i> |
| DIABLO | = <i>Direct IAP Binding protein with Low Pi</i> |
| HtrA2 | = <i>Omi/high temperature requirement protein A</i> |
| IAPs | = <i>Inhibitor of apoptosis proteins</i> |
| HBIXP | = <i>hepatitis B X-linked interacting protein</i> |
| XIAPI | = <i>X-linked inhibitor of apoptotisis protein</i> |
| CDKs | = <i>Cyclins dependent kinase</i> |
| CKIs | = <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i> |
| ER α | = <i>Estrogen receptor α</i> |
| Apf-1 | = <i>ATP-dependent proteolysis factor 1</i> |

ABSTRAK

Latar belakang: Kanker payudara pada wanita merupakan kanker yang paling umum ditemukan di seluruh dunia. Ekstrak akar *salvia milthiorrhizae Bunge* memiliki kandungan *tanshinones* yang dapat meningkatkan apoptosis dan menurunkan aktivitas proliferasi sel kanker. Tujuan penelitian ini untuk membuktikan adanya peningkatan ekspresi caspase 3 dan penurunan ekspresi Ki67 pada kelompok yang diberikan terapi dan kelompok kontrol

Metoda: Penelitian eksperimental hewan coba, dengan desain *pre and post test control group design*, sampel 18 ekor mencit C3H yang diinokulasi sel tumor, dibagi 3 kelompok: satu kelompok kontrol (K) dan dua kelompok yang diberikan ekstrak *Salvia miltiorrhizae Bunge* dosis 60mg/kgbb/hari (P1) dan dosis 180mg/kgbb/hari (P2) selama 3 minggu. Penilaian ekspresi caspase 3 dan Ki67 berdasarkan Allred skor. Data dianalisis dengan non-parametrik Kruskal Willis dilanjutkan Mann-Whitney tes dengan nilai signifikan $p \leq 0,05$.

Hasil: Terdapat perbedaan bermakna ekspresi caspase 3 antara ketiga kelompok ($p=0,001$), kelompok K dibandingkan P1 ($p=0,033$), kelompok K dibandingkan P2 ($p=0,00$) serta kelompok P1 dibandingkan P2 ($p=0,033$). Terdapat perbedaan bermakna ekspresi Ki67 antara ketiga kelompok ($p=0,00$), kelompok K dibandingkan P2 ($p=0,00$), kelompok P1 dibandingkan P2 ($p=0,001$), sedangkan pada kelompok K dibandingkan P1 tidak terdapat perbedaan bermakna ($p=0,318$)

Kesimpulan: Ekstrak akar *Salvia miltiorrhiza bunge* dapat meningkatkan ekspresi caspase 3 dan menurunkan ekspresi Ki67.

Kata kunci: *Salvia miltiorrhizae bunge*, *tanshinones*, caspase 3, Ki67

ABSTRACT

Background: In women, breast cancer is the most common in worldwide. The *Salvia miltiorrhiza Bunge* root extract contains tanshinone may induce apoptosis and reduce cancer cell's proliferation. This research prove that increasing caspase 3 and decrease Ki67 expressions in the groups given treatment and control group

Methods: The animal experiment laboratory was using randomized post test control only design. Eighteen C3H mice were inoculated with tumour and divided into three groups: The control group (K) and two groups administered by *Salvia miltiorrhiza Bunge* root extract dose of 60 mg / kgBW / day (P1) and 180 mg / kgBW / day (P2) for three weeks. Caspase 3 and Ki67 expression were scored with Allred criteria. All data were analysed by non-parametric Kruskal-Wallis and continued with Mann-Whitney tests with level of significant $p \leq 0,05$.

Results: There were significant differences on the caspase 3 expression between three groups ($p= 0,001$), K compared with P1 ($p=0,033$), K compared with P2 ($p=0,00$) and P1 compared P2 ($p=0,033$). There were significant difference on the Ki67 expression between three groups ($p=0,00$), K compared with P2 ($p=0,00$), P1 compared P2 ($p=0,001$), whereas K compared with P1 had no significant difference ($p=0,318$).

Conclusion: *Salvia miltiorrhiza Bunge* root extract can increase caspase 3 and reduce Ki67 expression.

Key words: *Salvia miltiorrhizae Bunge*, tanshinone, caspase 3, Ki67