

**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI 5FU-
LEUCOVORIN DENGAN *PHALERIA MACROCARPA*
TERHADAP EKSPRESI PERFORIN DAN
GRANZYME PADA TUMOR KOLON TIKUS
*SPRAGUE DAWLEY***

***THE EFFECT OF 5FU-LEUCOVORIN WITH PHALERIA
MACROCARPA COMBINATION TO PERFORIN AND
GRANZYME EXPRESSION OF COLON TUMOR MASS OF
SPRAGUE DAWLEY RAT***



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

Magister Ilmu Biomedik

**Mohamad Sueb
22040111300013**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2015**

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI 5FU-LEUCOVORIN DENGAN
PHALERIA MACROCARPA TERHADAP EKSPRESI PERFORIN DAN
GRANZYME PADA TUMOR KOLON TIKUS *SPRAGUE DAWLEY*

disusun oleh

Mohamad Sueb
22040111300013

Akan dipertahankan di depan Tim Penguji
Pada tanggal 24 Agustus 2015
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,
Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr.dr. Selamat Budijitno, MSi.Med, Sp.B, Sp.B(K)Onk
NIP.19710807200812 1 001

dr.M.Adi Soedarso, Sp.U
NIP. 196403291989031001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

dr. A. Zulfa Juniarto, Msi. Med, Sp. And, PhD
NIP.197006081997021001

Pengaruh Pemberian Kombinasi 5FU-Leucovorin dengan *Phaleria macrocarpa* terhadap Ekspresi Perforin dan Granzyme pada Tumor Kolon Tikus *Sprague dawley*

Sueb Mohamad*, Budijitno S**, Soedarso M. Adi***

*) Residen Bedah Umum Universitas Diponegoro /RSUP Dr. Kariadi, Semarang

***) Staf Subbagian Bedah Onkologi Universitas Diponegoro / RSUP Dr. Kariadi, Semarang

****) Staf Subbagian Bedah Urologi Universitas Diponegoro / RSUP Dr. Kariadi, Semarang

Abstrak

Pendahuluan

Kanker kolorektal adalah kanker terbanyak ketiga pada laki-laki setelah kanker paru dan kanker prostat dan terbanyak ke dua pada wanita setelah kanker payudara. Angka kejadiannya masih tinggi di seluruh dunia dan terus meningkat di negara berkembang. Modalitas utama penanganan kasus ini adalah dengan pembedahan diikuti dengan kemoterapi, radiasi dan imunoterapi. *Phaleria macrocarpa* (Mahkota Dewa) terbukti memiliki efek sitostatika dan dapat meningkatkan imunitas seluler terhadap sel kanker.

Tujuan

Penelitian ini ingin membuktikan pengaruh pemberian ekstrak buah *P macrocarpa* terhadap tumor kolon dengan mengukur ekspresi perforin dan ekspresi granzyme.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan rancangan *Randomized post test control group only design* dengan menggunakan binatang percobaan tikus putih betina strain *Sprague dawley* sebagai objek penelitian. Objek penelitian diinduksi dengan 1,2-DMH subkutan selama 7 minggu sampai muncul kanker kolon kemudian dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok K, P1 (kelompok *P macrocarpa*), P2 (kelompok kemoterapi), dan P3 (Kelompok kombinasi). Kemoterapi 5FU-leucovorin diberikan sesuai regimen *Rosswell Park*. sebanyak 1 siklus. *P macrocarpa* diberikan dengan dosis 0,495 mg/hari (0,99 mL /hari) per oral. Ekspresi perforin dan ekspresi granzyme dinilai dengan pengecatan imunohistokimia.

Hasil

Dari analisis multivariat ekspresi perforin dan ekspresi granzyme, terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,000$ dan $p=0,000$ secara berurutan). Dari hasil uji Post Hoc ekspresi perforin, didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan P1 ($p=0,013$) dan P3 ($p=0,000$), antara P1 dengan P2 ($p=0,006$) dan antara P2 dengan P3 ($0,000$). Perbedaan yang tidak bermakna terdapat antara kelompok kontrol dengan P2 ($p=0,758$), dan antara P1 dengan P3 ($0,133$). Dari hasil uji Post Hoc ekspresi granzyme didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan P1 ($p=0,000$) dan P3 ($p=0,000$). Perbedaan yang bermakna juga terjadi antara kelompok P1 ($p=0,000$) dengan P2

($p=0,000$), P2 ($p=0,000$) dengan P3 ($p=0,000$) serta P1($p=0,000$) dengan P3 ($p=0,003$). Perbedaan yang tidak bermakna terdapat antara kelompok kontrol dengan P2 ($p=0,327$). Dari uji korelasi *Spearman* disimpulkan terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi perforin terhadap ekspresi granzyme ($p = 0,040$ dan $r = 0,832$).

Kesimpulan

P macrocarpa memiliki potensi sebagai imunostimulator pada kanker kolon dan mampu menambah efektifitas kemoterapi dalam hal meningkatkan ekspresi perforin dan ekspresi granzyme.

Kata kunci : *P macrocarpa*, kanker kolon, ekspresi perforin, ekspresi granzyme, kemoterapi

The Effect of 5FU-Leucovorin with *Phaleria macrocarpa* Combination to Perforin and Granzyme Expression of Colon Tumor Mass of *Sprague dawley* Rat

Sueb Mohamad*, Budijitno S**, Soedarso M. Adi***

*) Student of General Surgery Diponegoro University / Dr. Kariadi Hospital, Semarang

**) Staff of The Surgical Oncology Division Diponegoro University
/Dr. Kariadi Hospital, Semarang

***) Staff of The Surgical Urology Division Diponegoro University
/Dr. Kariadi Hospital, Semarang

Abstract

Introduction

Colorectal cancer is the third most frequent cancer in men following lung cancer and prostate cancer, and the second in women following breast cancer. Its incidence rate is high in the world and it continues to rise in developing countries. The main modalities to treat this case is with surgery followed by chemotherapy, radiation and immunotherapy. *P. haleria macrocarpa* (Mahkota Dewa) is shown to have effects in improving sitostatica and cellular immunity against cancer cells.

Objective

This study aimed to prove the effect of the *P macrocarpa* extract against colon tumors by measuring the expression of perforin and expression of granzyme.

Method

This research was designed as a randomized laboratory experimental, with *post test only control group design* using animal experiments of female white Sprague Dawley strain rats as the subject. We induced the subject with 1,2-DMH subcutaneous for 7 weeks until the colon cancer develop, the subjects were divided into 4 groups: group K, P1 (group *P macrocarpa*), P2 (chemotherapy group), and P3 (combination group). 5FU-leucovorin chemotherapy was given according *Rosswell Park* regimen in 1 cycle. *P macrocarpa* given in a dose of 0,495 mg / day (0.99 mL / day) orally. The expression of perforin and granzyme was assessed by immunohistochemistry staining.

Result

Multivariate analysis of the perforin expression and apoptotic index showed significant difference ($p = 0.000$ and $p = 0.000$, respectively). From the Post Hoc test of perforin expression, we found a significant difference between the control group and P1 ($p = 0.013$) and P3 ($p = 0.000$), P1 and P2 ($p = 0.006$) and also P2 and P3 ($p = 0,000$). There is a significant difference between the control group and P2 ($p = 0.758$), \hat{A} and between P1 and P3 (0.133). From the Post Hoc test of granzyme expression, we found a significant difference between the control group

and P1 ($p = 0.000$) and P3 ($p = 0.000$), P1 and P2 ($p = 0.000$), P1 and P3 ($p = 0.003$) and also P2 and P3 ($p = 0,000$). There is no significant difference between the control group and P2 ($p = 0.327$). *S pearman* correlation tention showed significant correlation between the expression of perforin against granzyme expression ($p = 0.040$ and $r = 0.832$).

Conclusion

P macrocarpa has potential as an immunostimulatory on colon cancer and able to increase the effectiveness of chemotherapy in terms of increasing the expression of perforin and granzyme.

Keywords: *P macrocarpa*, colon cancer, perforin expression, granzyme expression, chemotherapy

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi atau lembaga pendidikan lainnya, serta tidak terdapat unsur-unsur yang tergolong Plagiarism sebagaimana dimaksud dalam Permendiknas No.17 Tahun 2010. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum atau tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Juli 2015

Mohamad Sueb

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Mohamad Sueb
NIM Magister Biomedik : 22040111300013
Tempat/Tgl Lahir : Jepara, 22 Januari 1979
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Laki-laki

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN V Ujung Pandan Jepara : Lulus tahun 1991
2. SMP Al Khairiyah Jakarta : Lulus tahun 1994
3. SMUN 110 Jakarta : Lulus tahun 1997
4. FK UKI Jakarta : Lulus tahun 2006
5. PPDS Ilmu Bedah FK UNDIP : (2011 - sekarang)
6. Magister Ilmu Biomedik PPS UNDIP : (2011 - sekarang)

C. Riwayat Pekerjaan

1. Tahun 2006-2007 : Dokter Klinik PT Hardlent, Gunung Putri, Bogor
2. Tahun 2007-2009 : Dokter PTT Puskesmas Galela, Kec. Galela, Kab. Halmahera Utara
3. Tahun 2009-2010: Dokter PTT RSUD Pulang Pisau, Kab. Pulang Pisau Kalteng
4. Tahun 2010-2011 : Dokter RS Khusus Bedah Sudirman Yogyakarta

D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : Sudarto
Ibu : Sufi
2. Nama Istri : dr. Nina Zabrina Dwisaputri
3. Nama Anak : Khayla Almeera Maritza
Arsakha Virendra Alden

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
PERNYATAAN.....	vii
RIWAYAT HIDUP.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
KATA PENGANTAR	xviii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	6
1.3. Tujuan Penelitian	7
1.4. Manfaat Penelitian	8
1.5. Keaslian Penelitian	8
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1. Adenokarsinoma Kolon	10
2.1.1. Insidensi	10

2.1.2. Etiologi dan Patogenesis	11
2.1.3. Klasifikasi	14
2.1.4. Penatalaksanaan	16
2.1.5. Prognosis	17
2.2. Respon Immunologik terhadap sel tumor	19
2.2.1. Antigen Tumor	19
2.2.2. Immunosurveillance kanker.....	21
2.2.3. Mekanisme efektor dalam melawan sel tumor	22
2.2.3.1. Sel Natural Killer (Sel NK).....	22
2.2.3.2. Makrofag	26
2.2.3.3. Limfosit T	27
2.2.3.4. Peranan sistem imun humoral terhadap sel kanker	28
2.2.4. Perforin.....	29
2.2.5. Granzyme	30
2.3. <i>Phaleria macrocarpa</i>	38
2.4 5FU - Leucovorin.....	43
2.5. <i>1,2 Dimethylhidrazine</i>	47
BAB III. KERANGKA TEORI, KONSEP, DAN HIPOTESIS	50
3.1. Kerangka Teori	50
3.2. Kerangka Konsep.....	51
3.3. Hipotesis	51
BAB IV. METODE PENELITIAN	53
4.1. Rancangan Penelitian.....	53

4.2. Populasi dan Sampel.....	54
4.2.1. Populasi	54
4.2.2. Sampel	54
4.3. Waktu dan Lokasi Penelitian	55
4.4. Variabel Penelitian.....	56
4.4.1. Variabel Bebas	56
4.4.2. Variabel Tergantung	56
4.4.3. Definisi Operasional	56
4.5. Bahan dan Alat Penelitian.....	57
4.5.1. Bahan untuk Perlakuan	57
4.5.2. Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin.....	59
4.5.3. Bahan tambahan untuk pewarnaan imunohistokimia	59
4.5.4. Alat untuk untuk perawatan tikus	59
4.5.5. Alat untuk pembuatan sediaan penelitian dengan pewarnaan H&E	59
4.5.6. Alat tambahan untuk pewarnaan imunohistokimia.....	60
4.5.7. Alat untuk pengamatan dan dokumentasi sediaan	60
4.6. Prosedur Pengumpulan Data.....	60
4.7. Alur Kerja	62
4.8. Prosedur- Prosedur Laboratorium.....	63
4.8.1. Prosedur pembuatan preparat histologi.....	63
4.9. Cara Pengumpulan Data	66
4.10. Analisa Data	67
4.11. Persyaratan etik.....	67

BAB V. HASIL PENELITIAN	69
5.1 Analisa Deskriptif	71
5.1.1. Deskripsi data ekspresi perforin.....	72
5.1.2. Deskripsi data ekspresi granzyme.....	72
5.2 Distribusi Data	73
5.3 Uji Statistik	74
5.3.1. Ekspresi perforin	74
5.3.2. Ekspresi granzyme	75
BAB VI. PEMBAHASAN	79
BAB VII. SIMPULAN DAN SARAN.....	81
7.1 Simpulan	81
7.2 Saran	82
DAFTAR PUSTAKA	83
LAMPIRAN.....	92

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Gambar skematis karsinogenesis karsinoma colon	13
Gambar 2. Peran granzyme dalam eliminasi sel kanker.....	32
Gambar 3. Tahapan sitolitik sel target oleh CTL	34
Gambar 4. Pengenalan sel target oleh sel-NK.....	38
Gambar 5. Proses kerusakan DNA dan RNA oleh 5FU.....	45
Gambar 6. <i>Consolidated report</i> penelitian.....	70
Gambar 7. Grafik box plot ekspresi perforin.....	71
Gambar 8. Grafik box plot ekspresi granzyme.....	72

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Perbandingan <i>5-year survival rates</i> antara klasifikasi <i>Dukes</i> , <i>staging</i> dan sistem TNM	18
Tabel 2. Jenis antigen tumor manusia	20
Tabel 3. Nilai IC50 dari ekstrak <i>Phaleria macrocarpa</i> terhadap kanker kolon, kanker payudara, sel HeLa, sel hepar	40
Tabel 4. Total kandungan phenol dan flavonoid dari berbagai bagian buah <i>Phaleria macrocarpa</i>	42
Tabel 5. Karakteristik data ekspresi perforin.....	71
Tabel 6. Karakteristik data ekspresi granzyme	72
Tabel 7. Uji normalitas dan homogenitas data ekspresi perforin dan ekspresi granzyme	73
Tabel 8. Analisis perbedaan ekspresi perforin antar kelompok perlakuan	74
Tabel 9. Analisis post hoc ekspresi perforin antara kelompok perlakuan	75
Tabel 10. Analisis perbedaan ekspresi granzyme antara kelompok perlakuan.....	76
Tabel 11. Analisis post hoc ekspresi granzyme antar kelompok perlakuan	76
Tabel 12. Hasil uji Korelasi Pearsons ekspresi perforin dan ekspresi granzyme kelompok P3	77

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Perhitungan Dosis Konversi	92
Lampiran 2. Hasil Pengukuran Penelitian.....	93
Lampiran 3. Foto Penelitian.....	96
Lampiran 4. Gambaran Mikroskopis	97
Lampiran 5. Hasil pengecatan dengan IHC <i>antibody monoclonal anti perforin</i> pembesaran 400x	98
Lampiran 6. Hasil pengecatan dengan IHC <i>antibody monoclonal anti granzyme</i> pembesaran 400x.....	100
Lampiran 7. Analisis Statistik.....	102
Lampiran 8. Ethical Clearance.....	108

DAFTAR SINGKATAN

5 – FU	= 5-fluorouracil
ABC	= Avidin-Biotin-peroxidase Complex
ADCC	= Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
AOM	= Azoxymethane
APC	= Adenoma-Poliposis Coli
CD4	= Limfosit T-helper
CD8	= sel T-sitotoksik
CIN	= Chromosomal Instability
CTL	= Cytotoxic T Lymphocyte
DCC	= Deleted in Colon Cancer
DMH	= 1,2-Dimethylhydrazine Dihydrochloride
EGFR	= Epidermal Growth Factor Receptor
Fd UDP	= Fluorouridine Diphosphate
Fd UMP	= 5-Fluoro-Deoxyuridine Monophosphate
Fd UTP	= Fluorouridine Triphosphate
FGR	= Fibroblast Growth Factor Receptor
FUDP	= Fluorouridine Diphosphate
FUTP	= Fluorouridine Triphosphate
GA	= Gallic Acid
HE	= Hematoksin-Eosin
IL – 12	= Interleukin-12
INF – γ	= Interferon- γ
K	= Kontrol
LAK	= Lymphokine-Activated Killer
LC 50	= Lethal Concentration
LOH	= Loss of Heterozygosity
LPPT4	= Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 4

MAF	= Macrophag Activating Factor
MAPK	= Mitogen – Activated Protein Kinase
MHC	= Major Histocompatibility Complex
MMR	= Mismatch Repair
M ₀ Ab	= Mouse Monoclonal Antibody
MSI	= Microsatellite Instability
NCCN	= National Comprehensive Cancer Network
NF –Kb	= Nuclear Faktor Kappa B
NK	= Natural Killer
P1	= Perlakuan 1
P2	= Perlakuan 2
P3	= Perlakuan 3
PDGF	= Platelet Derived Growth Factor Receptor
RR	= Ribonucleotide Reductase
RTK _s	= Receptor Tirosin Kinase
TAA	= Tumor Associated Antigen
TCR	= T-cell receptor
TIL	= Tumor Infiltrating Lymphocyte
TME	= Total Mesorectal Excision
TNF – α	= Tumor Necrosis Factor
TNF	= Tumor Necrosis Factor
TSAs	= Tumor-Spesifik Antigen

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan berkah-Nya, sehingga kami dapat menyelesaikan tesis yang berjudul: **PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI 5-FU LEUCOVORIN DENGAN PHALERIA MACROCARPA TERHADAP EKSPRESI PERFORIN DAN EKSPRESI GRANZYME (Studi Eksperimental In Vivo Pada Adenocarcinoma Kolon Tikus Sprague-Dawley Yang Diberi Neoadjuvant 5-FU dan Leucovorin)**

Penelitian ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar derajat sarjana S-2 Magister Ilmu Biomedik dan Program Pendidikan Dokter Spesialis I di Bagian Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.

Tesis ini diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap perkembangan ilmu di bidang bedah terutama onkologi

Pada kesempatan yang baik ini, ingin kami menyampaikan ucapan terimakasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Drs. Sudharto P. Hadi, MS, Ph.D selaku Rektor Universitas Diponegoro Semarang.
2. Prof. Dr. dr. Tri Nur Kristina, DMM, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
3. dr. Sahal Fatah, Sp.B.Sp.BTKV. selaku Kepala Bagian / SMF Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk

mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis I Bedah dan Program Magister Ilmu Biomedik serta perhatian, dorongan, dan bimbingan sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

4. dr. Benny Issakh, Sp.B.Sp.B.(K)Onk. selaku Ketua Program Studi Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis I Bedah dan Program Magister Ilmu Biomedik serta perhatian dan bimbingan sehingga tesis ini dapat diselesaikan.
5. Dr. dr. Selamat Budijitno, M.Si Med, Sp.B.(K)Onk guru sekaligus pembimbing I dalam penelitian ini, yang selalu meluangkan waktu, dan tenaga dalam membimbing tesis ini hingga selesai.
6. dr. M. Adi Soedarso guru sekaligus pembimbing II dalam penelitian ini, atas segala waktu, tenaga dan bimbingan yang diberikan sehingga tesis ini dapat selesai.
7. Kepada guru-guru kami, staf pengajar Bagian Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
8. dr. A. Zulfa Juniarto, Msi. Med, Sp. And, PhD, selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
9. Guru-guru Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro yang telah memberi pengetahuan dan bimbingan kepada kami serta memberikan motivasi selama mengikuti program pendidikan magister dan penyusunan tesis ini.

10. Semua rekan sejawat Residen Bagian Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, karyawan dan karyawan Bagian Bedah, karyawan dan karyawan Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro serta staf yang telah membantu kami selama dalam penelitian hingga penyusunan tesis.
11. Yang tercinta istri ; Nina dan anak kami; Khayla dan Arsa atas kesabaran, dukungan moral dan semangat bagi kami untuk menyusun dan menyelesaikan tesis ini.
12. Orang tua kami Bapak Sudarto dan Ibu Sufi atas dukungannya dalam menyelesaikan tesis ini.
13. Mertua Bapak Hendrawan dan Ibu Ani atas dukungannya yang telah diberikan.

Kami menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu kami mengharapkan saran dan kritik untuk kesempurnaan tesis ini. Akhir kata, kami mohon maaf atas segala kesalahan dan kekhilafan, sengaja maupun tidak sengaja baik itu perkataan atau perbuatan yang kami lakukan selama kami menyelesaikan tesis ini.

Semarang, Juli 2015

Mohamad Sueb