

**EKSPRESI p53 DAN Bcl2 ADENOKARSINOMA
MAMMAE MENCIT C3H YANG DIBERI EKSTRAK
AKAR *SALVIA MILTIORRHIZAE BUNGE***

*p53 AND Bcl2 EXPRESSIONS 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

**Liza Suryani Dewi
2201010400031**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2014**

TESIS

EKSPRESI p53 DAN Bcl2 ADENOKARSINOMA MAMMAE
MENCIT C3H YANG DIBERI EKSTRAK AKAR
SALVIA MILTIORRHIZAE BUNGE

disusun oleh :

Liza Suryani Dewi
2201010400031

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 21 Agustus 2014

Menyetujui

Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr.dr.Indra Wijaya, SpPA (K)
NIP. 194601051973011001

dr.Noor Widjayahadi, M.Kes.,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

KATA PENGANTAR

Puji Syukur kepada Tuhan Yang Maha Kasih, sampai pada akhirnya, tesis ini dapat diselesaikan dengan baik. Manusia berusaha, pada akhirnya hanya tergantung kebaikan dan kemurahan Tuhan saja. Kemuliaan, Puji dan Sembah hanya bagi NYA.

Tesis ini ditulis dan dikerjakan dengan hati yang rindu akan pengertian mendalam tentang ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* yang digunakan secara luas dalam pengobatan timur, juga kepedulian akan kejadian kanker payudara dengan perubahan molekuler intra seluler, terutama protein p53 yang memiliki sifat pro apoptotik dan protein Bcl2 yang memiliki sifat anti apoptotik. Seiring dengan proposal penelitian yang disetujui, maka eksperimen pun dilaksanakan, sehingga sediaan kanker payudara mencit C3H dapat diproses histopatologi, pengecatan rutin dan pengecatan imunohistokimia. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan dan menambah pengetahuan pengguna ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge*, secara preventif dan kuratif pada berbagai efek berbagai penyakit.

Sedalam dan sejauh ilmu dimengerti manusia, rahasia Illahi jauh sungguh luas dan besar, setitik sepercak hasil penelitian ini, masih ada hal-hal yang belum tersingkap. Bila ada masukan, kritik dan saran membangun untuk kemajuan kesehatan dan kesejahteraan manusia tentang penelitian ini, peneliti menerima dan mengucapkan terimakasih.

Semarang, Agustus 2014

Liza Suryani Dewi

KEPADA YTH. (Alm) PROF.DR.dr.SARJADI, SpPA(K)

Bimbingan penuh dedikasi dan arah yang jelas

Tujuan jelas, semangat tuntas,

Ilmu luas, selalu dibagi,

Dalam negri, luar negri,

Menjadi teladan hidup kami.

Terimakasih kami selalu ada di hati,

Tak terucap, tercermin dalam sikap,

Menjadi teladan hidup kami.

Semarang, Agustus 2014

Liza Suryani Dewi

UCAPAN TERIMAKASIH

Selesainya penulisan penelitian tesis yang menjadi salah satu syarat mencapai derajat Sarjana S-2, Magister Ilmu Biomedik, tidak dapat terjadi dengan sendirinya, tetapi semua melalui langkah-langkah kecil yang dilalui dibantu dan didorong berbagai pihak yang terkait dan berwenang. Penulis ingin mengungkapkan rasa terimakasih dan penghormatan, kepada :

1. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro : Prof.Dr.dr Tri Nur Kristina,DMM., M.Kes., yang telah memberikan wadah bagi peneliti untuk berkarya dan berkembang, meningkatkan keilmuan yang dapat berguna bagi semua.
2. Dr.dr.Indra Wijaya, SpPA(K) dan dr.Noor Wijayahadi, M.Kes., SpFK, serta tak lupa (Alm)Prof.Dr.dr.Sarjadi, SpPA(K), sebagai pembimbing penelitian, atas saran, arahan, bimbingan dorongan dan waktu yang telah diberikan kepada peneliti sehingga penelitian tesis ini dapat diselesaikan.
3. Dr.dr.RA.Kisdjamiatun RMD, M.Sc., dan Prof.dr.Edi Dharmana, M.Sc, PhD, Sp.ParK sebagai penguji, atas masukan pertanyaan dan saran perbaikan penelitian tesis ini.
4. Prof.dr.Soebowo, SpPA(K) dan Dr. Siti Amarwati, SpPA (K), sebagai pembimbing dan mentor keahlian spesialisasi, yang selalu memberikan semangat, arahan dan bimbingan serta masukan yang membangun dan menghidupkan.

5. dr. Dik Puspasari, SpPA dan dr.Devia Eka Listiana, M.Si.Med., SpPA yang telah membaca slide imunohistokimia p53 dan Bcl2 untuk penelitian tesis ini, sehingga data penelitian ini dapat digunakan dengan baik.
6. Dr.dr.Awal Prasetyo, M.Kes., SpTHT-KL yang telah memberikan saran dan konsultasi tentang statistik, serta pembahasan, sehingga tesis ini dapat menjadi lebih baik.
6. dr.Udadi Sadhana, M.Kes., SpPA, dr.Ika Pawitra Miranti, SpPA, dr.Bambang Endro Putranto, SpPA(K), dr.Kasno, SpPA(K), dr.Noor Yazid, SpPA(K), dr.Meira DKA, M.Si. Med, SpPA., yang selalu siap memberikan jawaban dan pertimbangan untuk semua konsultasi yang tidak terjadwal.
7. dr.Syeben Hezer Heitingwati, SpPA., sebagai rekan sejawat, seprofesi, sepenanggungan dalam penelitian. Berkat Kasih Sejahtera Tuhan Yesus melimpah atas kita.
8. Dra.Puspita Eka Wuyung dan Bpk.Slamet, sebagai penyedia tempat pemeliharaan tikus dan prosesing jaringan histopatologi rutin, di Unit Patologi Eksperimental Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
9. Ibu Agustin, analis IHC laboratorium Patologi Anatomi RS Sarjito / Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada.
10. Analis Laboratorium Patologi Anatomi RSUP dr.Kariadi Semarang / FK Universitas Diponegoro, Mbak Didit, Ibu Yuli, Ibu Heni, Mas Sis, Mas Benny, Bu Titik, Mbak Nina, Pak Bardi, Ibu Ning, Mas Mur, Mbak Dyah, dan Pak Dwi.

11. Analis Laboratorium Patologi Anatomi RS Elisabet Semarang, Mbak Wiwik.
12. Analis Laboratorium Patologi Anatomi Waspada Semarang, Pak Pur, Pak Aris, Pak Slamet, Pak Misran, Pak Suali, Mbak Sprit, Mbak Indah, Pak Nardi.
13. Staf Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Ibu Nata, Ibu Vika, Ibu Hartini dan Ibu Tri, yang telah banyak membantu dalam semua urusan administrasi, penjadwalan dan semua akomodasi.
14. Skolastika Nanik Sulistyorini, S.Kom., staf Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro,
15. Hocky Hayanto, sebagai suami yang selalu mendukung dengan penuh kasih, moriil dan materiil, Felizia Ester Haryani dan Agneta Elizabet Haryani, anak-anak kami, Dalam Kasih Damai Sejahtera dan Berkat Tuhan Yesus Kristus, yang ikut berperan dalam doa, semangat, tenaga dan kasih sayang.
16. Ibunda tercinta, Ruth Wigiarti, yang selalu mendukung dalam doa, tenaga, dan semangat serta merawat dengan setia, Ayahanda tercinta, Cornellius Soegijono, sehingga tercipta damai sejahtera dan penuh berkat.
17. Semua pihak yang belum disebutkan namanya, yang telah membantu atas selesainya penelitian tesis ini.

Semarang, Agustus 2014

Liza Suryani Dewi

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini 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 dan lembaga pendidikan lainnya, serta tidak terdapat unsur-unsur yang tergolong plagiarisme 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, Agustus 2014

Peneliti

Liza Suryani Dewi

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar.....	iii
Ucapan Terimakasih.....	v
Pernyataan.....	viii
Daftar Riwayat hidup.....	ix
Daftar Isi	x
Daftar Tabel	xiv
Daftar Gambar	xv
Daftar Lampiran	xvii
Daftar Singkatan	xviii
Abstrak	xxi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan masalah	8
1.3 Tujuan penelitian	9
1.4 Manfaat penelitian	9
1.5 Orisinalitas penelitian	10
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	16
2.1 Karsinoma Mammae	16
2.1.1 Terapi	17

2.2. p53	18
2.3 Bcl 2	21
2.4 Danshen	25
2.4.1 Kandungan bahan kimia dalam akar <i>Salvia</i> <i>miltiorrhizae Bunge</i>	27
2.4.2 Toksisitas <i>Salvia miltiorrhizae</i>	29
2.4.3 Aktifitas Farmakologis <i>Salvia miltiorrhizae</i>	30
2.4.4 Biomolekuler <i>Salvia miltiorrhizae Bunge</i>	37
 BAB III. KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS	
3.1 Kerangka teori	40
3.2 Kerangka konsep	41
3.3 Hipotesis	41
 BAB IV. METODE PENELITIAN	
4.1 Ruang lingkup penelitian	42
4.2 Tempat penelitian	42
4.3 Jenis dan Rancangan penelitian	42
4.4 Populasi dan sampel	43
4.5 Variabel penelitian	44
4.6 Bahan dan Alat	44
4.7 Cara Kerja	45
4.8 Analisis Data	48
4.9 Definisi operasional	49

4.10 <i>Ethical Clearence</i>	51
BAB V. Hasil Penelitian.....	52
5.1 Ukuran Tumor	52
5.2 Ekspresi p53	53
5.3 Ekspresi Bcl2	53
5.4 Nilai Kappa	54
5.5 Gambaran Mikroskopis	55
5.5.1. Terminasi Hari Pertama	55
5.5.2. Pengecatan Hematoxyllin Eosin	56
5.5.2.1. Kelompok Kontrol	56
5.5.2.2. Kelompok Perlakuan 1	56
5.5.2.3. Kelompok Perlakuan 2	57
5.5.3. Pengecatan p53	57
5.5.3.1. Kelompok Kontrol	57
5.5.3.2. Kelompok Perlakuan 1	58
5.5.3.3. Kelompok Perlakuan 2	58
5.5.4. Pengecatan Bcl2	58
5.5.4.1. Kelompok Kontrol	59
5.5.4.2. Kelompok Perlakuan 1	59
5.5.4.3. Kelompok Perlakuan 2	60
BAB VI. Pembahasan	61
BAB VII.Simpulan dan Saran	65
Daftar Pustaka	66

Lampiran 75

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Penelitian terdahulu tentang Tanshinone dan Kanker Payudara	10
Tabel 2. Komponen Utama <i>Salvia Miltiorrhizae</i>	27
Tabel 5.1.1. Rerata Volume Tumor.....	52
Tabel 5.2.1. Rerata Perbedaan Allred Score Ekspresi p53.....	53
Tabel 5.2.2. Uji Beda Ekspresi p53 antar kelompok perlakuan.....	53
Tabel 5.3.1. Rerata Perbedaan Allred Score Ekspresi Bcl2.....	54
Tabel 5.3.2. Uji Beda Ekspresi Bcl2 antar kelompok perlakuan	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Jalur Lengkap Apoptosis	24
Gambar 2. Daun dan Bunga <i>Salvia miltiorrhizae Bunge</i>	25
Gambar 3. Akar Merah <i>Salvia miltiorrhizae Bunge</i>	26
Gambar 4. Danshen adalah Akar Kering <i>Salvia miltiorrhizae Bunge</i>	26
Gambar 5. Jalur Regulasi Tanshinone I	32
Gambar 6. Skema Rancangan Penelitian	42
Gambar 7. Alur Kerja	48
Gambar 8. Representasi Diagramatik Interpretasi <i>Allred Score</i>	51
Gambar 5.5.1. Gambar Mikroskopis Adenokarsinoma Mammae Mencit C3H, Terminasi hari Pertama, Pengecatan Hematoxyllin Eosin, Pembesaran 400x	55
Gambar 5.5.2.1. Gambaran Histopatologi Adenokarsinoma Mammae Mencit C3H, Kelompok Kontrol, Pengecatan Hematoxyllin Eosin, Pembesaran 400x	56
Gambar 5.5.2.2. Gambaran Histopatologi Adenokarsinoma Mammae Mencit C3H, Kelompok Perlakuan 1, Pengecatan Hematoxyllin Eosin, Pembesaran 400x	56
Gambar 5.5.2.3. Gambaran Histopatologi Adenokarsinoma Mammae Mencit C3H, Kelompok Perlakuan 2, Pengecatan Hematoxyllin Eosin, Pembesaran 400x	57
Gambar 5.5.3.1. Gambaran Histopatologi Adenokarsinoma Mammae Mencit	

C3H, Kelompok Kontrol, Pengecatan p53, Pembesaran 400x	57
Gambar 5.5.3.2. Gambaran Histopatologi Adenokarsinoma Mammae Mencit	
C3H, Kelompok Perlakuan 1, Pengecatan p53, Pembesaran 400x	58
Gambar 5.5.3.3. Gambaran Histopatologi Adenokarsinoma Mammae Mencit	
C3H, Kelompok Perlakuan 2, Pengecatan p53, Pembesaran 400x	58
Gambar 5.5.4.1. Gambaran Histopatologi Adenokarsinoma Mammae Mencit	
C3H, Kelompok Kontrol, Pengecatan Bcl2, Pembesaran 400x	59
Gambar 5.5.4.2. Gambaran Histopatologi Adenokarsinoma Mammae Mencit	
C3H, Kelompok Perlakuan 1, Pengecatan Bcl2, Pembesaran 400x	59
Gambar 5.5.4.3. Gambaran Histopatologi Adenokarsinoma Mammae Mencit	
C3H, Kelompok Perlakuan 2, Pengecatan Bcl2, Pembesaran 400x	60

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

1. Penatalaksanaan Sediaan Histopatologi
2. Standart pengecatan Rutin Jaringan
3. Metode pembuatan sediaan imunohistokimia
4. Data sheet Reagen Imunohistokimia
5. Ethical Clearance
6. Surat Ijin Pelaksanaan Penelitian
7. Kalender Penelitian
8. Data Hasil Allred Score
9. Foto-Foto Penelitian

DAFTAR SINGKATAN

APAF1	: <i>Activator Protease Apoptosis Factor 1</i>
BAX	: protein pro apoptotik Bcl2 terdiri dari domain BH1, BH2 dan BH3
Bcl-2	: <i>B cell lymphoma 2</i>
Bcl-xl	: <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BrdU	: <i>Bromodeoxyuridine C9H11 BrN2O5</i>
CMC	: <i>CarboxyMethylCellulose</i>
CNS	: <i>Central Nervous System</i>
CO2	: <i>Carbon Dioxide</i>
CRP	: <i>C- Reactive Protein</i>
DDB2 (P48)	: <i>DNA damaged binding protein</i>
DMSO	: <i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	: <i>deoxyribonucleic Acid</i>
ECL	: <i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ER	: <i>Estrogen Receptor</i>
ER-positif	: <i>Estrogen Receptor positive</i>
FACS	: <i>Flow cytometry Analysis</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
GADD45	: <i>The Growth Arrest and DNA damage</i>

GLOBOCAN	: <i>a global resource for data on incidence, prevalence and mortality in cancer</i>
HIV	: <i>Human immunodeficiency virus</i>
IC50	: <i>Inhibitory Concentration half maximal</i>
IDC	: <i>Invasive Ductal Carcinoma</i>
IGFBP3	: <i>insulin-like growth factor binding protein 3</i>
IL-1 beta	: <i>interleukin 1 beta</i>
IL-6	: <i>interleukin 6</i>
LDL	: <i>Low Density Lipoprotein</i>
MCF	: <i>Michigan Cancer Foundation</i>
MOM	: <i>Mitochondrial Outer Membrane</i>
MPT	: <i>Mitochondria Permeability Transition</i>
MRSA	: <i>methicillinresistant Staphylococcus aureus</i>
NADH	: <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADPH	: <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NO	: <i>nitric oxide</i>
NQO1	: <i>NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1</i> , adalah enzim yang pada manusia dikode oleh gen <i>NQO1</i>
p21Waf1/Cip1	: <i>cyclin dependent kinase inhibitor 1</i>
p53	: gen supresor tumor yang bentuk inaktif nya cenderung berhubungan dengan kanker yang ganas, sebagai contoh adalah kanker paru, kanker payudara, kanker kolon, dan

merupakan protein yang dihasilkan oleh gen dengan berat molekulnya +53

p53R2	: <i>ribonucleotid reductase directly regulated by p53</i>
PI	: <i>Propidium Iodide</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI-1640	: <i>Rosswell Park Memorial Institute -1640 medium</i>
SD	: <i>Standart Deviation</i>
ssRNA	: <i>single stranded RNA</i>
Tan-IIA	: <i>Tanshinone IIA</i>
TNF	: <i>TumorNekrosis Factor</i>
TUNEL assay	: <i>Terminal Deoxynucleotidyl transferase</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

ABSTRAK

Latar Belakang : Kanker payudara merupakan keganasan peringkat pertama atau kedua dibanyak tempat di seluruh dunia. Insiden kanker payudara semakin meningkat, juga di Indonesia. Peran preventif dan kuratif belum memuaskan, sehingga pasien maupun praktisi medis masih mencari agen terapeutik dan preventif. Agen terapeutik yang digunakan dunia kedokteran timur, antara lain ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* yang mengandung bahan aktif *tanshinone* dan derivatnya, telah diteliti di luar negeri dengan hasil, memiliki efek anti karsinogenik.

Tujuan Penelitian : membuktikan perbedaan ekspresi p53 dan Bcl2 pada adenokarsinoma mammae mencit C3H yang diberi ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* dosis bertingkat.

Metode : Rancangan penelitian *randomized post test only controlled group design*. Besar sampel berdasarkan kriteria WHO, 18 ekor mencit C3H bertumor, terbagi dalam 3 kelompok. Kelompok kontrol hanya diberi pakan standar dan air minum. Kelompok perlakuan 1, diberikan ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae* dosis 60mg/KgBB/hari, sedangkan kelompok perlakuan 2, diberikan ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae* dosis 180mg/KgBB/hari yang masing-masing dilarutkan dalam air minum yang disondekan per oral tiap hari, selama 21 hari. Mencit diterminasi hari ke-22. Ekspresi p53 dan Bcl2 dianalisis dengan *Allred score*. Ekspresi p53 dan Bcl2 masing-masing diuji dengan uji Kruskal Wallis dilanjutkan uji *Post-Hoc* Mann Whitney U.

Hasil : Hasil data deskriptif menunjukkan mean *Allred score* ekspresi p53 meningkat berturutan antara kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2, dan hasil mean ekspresi Bcl2 menurun. Uji non parametrik Kruskal Wallis menunjukkan hasil beda bermakna, juga uji *post-Hoc* Mann Whitney U pada semua perbandingan antar kelompok.

Simpulan : Ekstrak akar *Salvia miltiorrhizae Bunge* dosis bertingkat menunjukkan perbedaan bermakna peningkatan ekspresi p53 dan beda bermakna penurunan ekspresi Bcl2 pada adenokarsinoma mammae mencit C3H.

Kata Kunci : adenokarsinoma mammae, *Salvia miltiorrhizae Bunge*, p53, Bcl2

ABSTRACT

Background : Breast cancer is on the first or second most malignancy in many places around the world. The incidence of breast cancer was increasing, also in Indonesia. Prevention and treatment of breast cancer have not been satisfactory, since patients and medical practitioners are searching for other therapeutic and preventive agents. *Salvia miltiorrhizae* Bunge roots is one of the therapeutics agent used in traditional medicine have been studied in foreign country.

Objective : To prove the p53 and Bcl2 expression in C3H mice mammary adenocarcinoma using multilevel doses of the *Salvia miltiorrhizae* Bunge roots extract.

Method : The study is a randomized post-test only controlled group design. A total of 18 adenocarcinoma mice, divided into 3 groups. The first group was administered with 60mg/KgBW/day and the second group was given by 180mg/KgBW/day, for 21 days. All mice were terminated on day 22nd. The p53 and Bcl2 expressions were analyzed using Allred score, statistically analyzed by Kruskal Wallis followed by *Post-Hoc* Mann Whitney U test.

Results: Immunohistochemistry staining shows the p53 expressions have been increased between groups, but Bcl2 were decreased. The Kruskal-Wallis and *Post-Hoc* Mann Whitney U test are significantly difference between groups.

Conclusions : All of the p53 and Bcl2 expressions between groups are significantly differences.

Key words : mammary adenocarcinoma, *Salvia miltiorrhizae* Bunge, p53, Bcl2