

**PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI 5FU-
LEUCOVORIN DENGAN *PHALERIA MACROCARPA*
TERHADAP EKSPRESI *CYCLIN D1* DAN p53
STUDI EKSPERIMENTAL ADENOKARSINOMA
KOLON TIKUS *SPRAGUE DAWLEY***

***THE EFFECT OF 5FU-LEUCOVORIN WITH PHALERIA
MACROCARPA COMBINATION TO CYCLIN D1 AND p53
EXPRESSION
AN EXPERIMENTAL STUDY TO ADENOCARCINOMA
COLON TUMOR OF SPRAGUE DAWLEY RAT***



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

Arief Ismail Khalik

**MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2015**

TESIS

PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI 5FU-LEUCOVORIN DENGAN
PHALERIA MACROCARPA TERHADAP EKSPRESI *CYCLIN D1* DAN p53
PADA ADENOKARSINOMA KOLON TIKUS *SPRAGUE DAWLEY*

disusun oleh

Arief Ismail Khalik
22010112410021

Menyetujui,
Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr.dr. Selamat Budijitno, MSi.Med, Sp.B, Sp.B(K)Onk
NIP.19710807 200812 1 001

dr. Ardy Santosa, SpU
NIP. 19550626 18312 1 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik
Program Pascasarjana UNDIP

dr. A. Zulfa Juniarto, MSi.Med, Sp.And, PhD
NIP.19700608 199702 1 001

Pengaruh Pemberian Kombinasi 5FU-Leucovorin dengan *Phaleria Macrocarpa* Terhadap Ekspresi cyclin-D1 Dan p53

Studi Eksperimental Adenokarsinoma Kolon Tikus *Sprague Dawley*

Khalik AI*, Budijitno S**, Santosa A ***

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

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

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

Abstrak

Pendahuluan

5FU-leucovorin (5FU) masih merupakan agen kemoterapi standar emas pengobatan kanker kolorektal, namun memiliki efek sitotoksik merugikan antara lain myelosuppressi berupa neutropenia berat. Tanaman obat *Phaleria macrocarpa* (PM) dikenal sebagai imunostimulator dan diduga memiliki efek anti tumor. Ekstrak tanamannya dilaporkan berperan sebagai inhibitor spesifik terhadap CDKs (*Cyclin-dependent kinases*) yang dapat merubah aktivitas proliferasi sel. Pemberiannya bersama (5FU + PM) diharapkan menurunkan ekspresi cyclin-D1 dan meningkatkan p53, dan bersinergi dalam membunuh sel tumor.

Metode

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental *Randomized post test control group only design*. Duabelas ekor tikus betina *Sprague dawley* yang diinokulasi adenokarsinoma kolorektal dibagi menjadi kelompok Kontrol (5FU) dan kelompok perlakuan (5FU + PM 0.495/hari). Kemoterapi diberikan sebanyak 6 siklus sesuai *Rosswell Park Regiment*. Setelah perlakuan selama 7 minggu dilakukan pemeriksaan patologi menggunakan pengecatan imunohistokimia, ekspresi cyclin-D1 dan p53. Kedua kelompok dianalisa secara statistik menggunakan *independent t test* dan uji korelasi *Pearson*.

Hasil

Pemberian 5FU + PM menurunkan ekspresi cyclin-D1 dan meningkatkan p53 secara bermakna ($p < 0,05$) dibanding 5FU saja. Pada uji korelasi terdapat hubungan yang negatif kuat antara keduanya ($p < 0.0001$ dan $r = -0,945$).

Kesimpulan

PM memiliki efek sinergis bila diberikan bersama 5FU dalam menurunkan ekspresi cyclin-D1 dan meningkatkan ekspresi p53.

Kata kunci : *Phaleria macrocarpa*, 5FU-Leucovorin, adenokarsinoma kolon, cyclin-D1, p53

***The Effect Of 5FU-Leucovorin With Phaleria Macrocarpa
Combination To cyclin-D1 And p53 Expression
Experiment Study To Adenocarcinoma Colon Tumor Of Sprague
Dawley Rat***
Khalik AI*, Budijitno S**, Santosa A ***

*) General Surgery Resident of Diponegoro University / RSUP Dr. Kariadi, Semarang
**) Staff on Oncology Surgery of Diponegoro University / RSUP Dr. Kariadi, Semarang
***) Staff on Urology Surgery of Diponegoro University / RSUP Dr. Kariadi, Semarang

Abstract

Introduction

5 FU-leucovorin (5 FU) is still the gold standard chemotherapeutic agents for colorectal cancer treatment, but has adverse cytotoxic effects include severe neutropenia myelosuppressi form. Medicinal plants *Phaleria macrocarpa* (PM) is known as immunostimulatory and is thought to have anti-tumor effects. Extracts of the plant reportedly acts as a specific inhibitor of the CDKs (Cyclin-dependent kinases) that can alter the activity of cell proliferation. Gift together (5FU + PM) is expected to decrease the expression of cyclin D1 and p53 increase and synergy in killing tumor cells.

Method

This study is a randomized experimental study posttest control group design only. Twelve female Sprague Dawley rats were inoculated with colorectal adenocarcinoma were divided into a control group (5FU) and the treatment group (5FU + PM 0.495 / day). Chemotherapy is given as 6 cycles according Rosswell Park Regiment. After 7 weeks of treatment for pathological examination using immunohistochemical staining, the expression of cyclin D1 and p53. Both groups were statistically analyzed using independent t test and Pearson correlation test.

Result

Administration of 5 FU + PM lowers the expression of cyclin-D1 and increases p53 significantly ($p < 0.05$) compared with 5FU alone. In the correlation test there is a strong negative correlation between the two ($p < 0.0001$ dan $r = -0,945$).

Conclusion

PM have a synergistic effect when administered together with 5FU in reducing the expression of cyclin D1 and the expression of p53 increase.

Keywords: *Phaleria macrocarpa*, 5FU-leucovorin, colon adenocarcinoma, cyclin-D1, p53

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/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, November 2015

Arief Ismail Khalik

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Arief Ismail Khalik
NIM Magister Biomedik : 22010112410022
NIM PPDS I Bedah : 22040111300015
Tempat/Tgl Lahir : Palembang, 24 Februari 1982
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Laki-laki

B. Riwayat Pendidikan

1. SD Xaverius 4, Palembang : Lulus tahun 1994
2. SMP Xaverius 1, Palembang : Lulus tahun 1997
3. SMU Xaverius 1, Palembang : Lulus tahun 2000
4. FK Univ Maranatha, Bandung : Lulus tahun 2008
5. PPDS Ilmu Bedah FK UNDIP : (2012 - sekarang)
6. Magister Ilmu Biomedik PPS UNDIP : (2012 - sekarang)

C. Riwayat Pekerjaan

1. Dokter PTT pusat Puskesmas Bandar Agung, Musi Banyuasin, Sumatera Selatan (Tahun 2010 – 2011)
2. Dokter PNS Puskesmas Bandar Agung, Musi Banyuasin, Sumatera Selatan (Tahun 2011 – sekarang)

D. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : Khalik Djais
Ibu : Kurniawaty L.K.
2. Nama Istri : Made Ayu Stiyaningrum
3. Nama Anak : Muazzam Ikram Ismail
Muazzarah Izzati Ilmi
Munadhil Isman Ismail

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
PERNYATAAN.....	v
RIWAYAT HIDUP.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
KATA PENGANTAR	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	7
1.3. Tujuan Penelitian	7
1.3.1. Tujuan Umum	7
1.3.2. Tujuan Khusus	7
1.4. Manfaat Penelitian	8
1.5. Keaslian Penelitian.....	8
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	12

2.1. Kanker Kolon.....	12
2.1.1. Epidemiologi.....	12
2.1.2. Anatomi dan Histologi.....	14
2.1.3. Etiologi dan Patogenesis.....	16
2.1.4. Klasifikasi.....	18
2.1.5. Penatalaksanaan.....	21
2.1.6. Prognosis.....	22
2.2. Mekanisme Siklus Sel Eukariot.....	23
2.3. Apoptosis.....	29
2.4. <i>Cyclin- D1</i>	32
2.5. protein p53.....	35
2.6. <i>Phaleria macrocarpa</i>	39
2.7. 5FU-Leucovorin.....	42
2.8. <i>1,2 Dimethylhidrazine</i>	45
BAB 3. KERANGKA TEORI, KONSEP, DAN HIPOTESIS.....	48
3.1. Kerangka Teori.....	48
3.2. Kerangka Konsep.....	49
3.3. Hipotesis.....	50
BAB 4. METODE PENELITIAN.....	51
4.1. Desain Penelitian.....	51
4.2. Populasi dan Sampel Penelitian.....	51
4.2.1. Populasi Target.....	52
4.2.2. Sampel.....	52

4.3. Waktu dan Lokasi Penelitian	54
4.4. Variabel Penelitian.....	54
4.4.1. Variabel Bebas	54
4.4.2. Variabel Tergantung	54
4.4.3. Definisi Operasional	54
4.5. Analisis Data.....	56
4.6. Bahan dan Alat Penelitian.....	56
4.6.1. Bahan untuk Perlakuan	56
4.6.2. Bahan untuk Pemeriksaan Histopatologi Rutin	57
4.6.3. Alat untuk pembuatan slide dengan pewarnaan H&E	58
4.6.4. Alat untuk pengamatan dan dokumentasi sediaan.....	58
4.7. Prosedur Pengumpulan Data.....	58
4.8. Alur Kerja	59
4.9. Prosedur Penelitian	61
4.9.1. Prosedur pembuatan preparat histopatologi.....	61
4.10 Etika Penelitian	62
BAB V. HASIL PENELITIAN	63
5.1. Gambaran Proses Penelitian	63
5.2. Analisis deskriptif	64
5.2.1. Deskripsi prosentase ekspresi cyclin-D1	64
5.2.2. Deskripsi prosentase ekspresi p53	66
5.3. Uji Komparasi ekspresi cyclin-D1 dan p53	67
5.4. Uji Korelasi ekspresi cyclin-D1 dan p53	69

BAB VI. PEMBAHASAN	71
BAB VII. SIMPULAN DAN SARAN	73
7.1. Simpulan	73
7.2. Saran	73
DAFTAR PUSTAKA	74
LAMPIRAN	83

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Skematik kejadian morfologik & molekuler tumorigenesis kolorektal	18
Gambar 2. Siklus sel dan <i>checkpoints</i>	25
Gambar 3. Kontrol terhadap perkembangan sel cyclin-CDK.....	27
Gambar 4. Aktivitas regulasi kompleks cyclin-CDK terhadap siklus sel.....	28
Gambar 5. Mekanisme molekuler apoptosis.....	30
Gambar 6. Alur Kerja cyclin-D1 dan p53 Dalam Regulasi Siklus Sel.....	34
Gambar 7. p53 mutant berakumulasi dalam sel karena tidak mampu melakukan transkripsi mdm2	37
Gambar 8. Komponen jalur sinyal p53.....	38
Gambar 9. Rancangan penelitian.....	51
Gambar 10. Alur Penelitian	59
Gambar 11. Gambaran mikroskopis adenokarsinoma kolorektal dengan pengecatan HE	64
Gambar 12. <i>Box plot</i> median ekspresi cyclin-D1 adenokarsinoma kolorektal	65
Gambar 13. Gambaran ekspresi cyclin-D1 adenokarsinoma kolorektal yang hanya diberi 5FU –Leucovorin	65
Gambar 14. Gambaran ekspresi cyclin-D1 adenokarsinoma kolorektal yang diberi 5FU –Leucovorin dengan <i>Phaleria Macrocarpa</i>	65

Gambar 15. <i>Box plot</i> median ekspresi cyclin-D1 adenokarsinoma kolorektal	67
Gambar 16. Gambaran ekspresi p53 adenokarsinoma kolorektal yang hanya diberi 5FU –Leucovorin.....	67
Gambar 17. Gambaran ekspresi p53 adenokarsinoma kolorektal yang diberi 5FU –Leucovorin dengan <i>Phaleria Macrocarpa</i>	67
Gambar 18. Gambar hewan coba sedang diinduksi <i>1,2-dimethylhydrazine</i>	86
Gambar 19. Gambar hewan coba sedang mendapat perlakuan	86
Gambar 20. Gambaran makroskopis adenokarsinoma kolorektal yang sudah diisolasi.....	86

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Perbandingan <i>5-year survival rates</i> antara klasifikasi <i>Dukes</i> , <i>staging</i> dan sistem TNM.....	22
Tabel 2. Spektrum mutasi gen p53	36
Tabel 3. Beberapa mekanisme inaktivasi fungsi gen p53 dalam kanker manusia.....	39
Tabel 4. Total kandungan phenol dan flavonoid dari berbagai bagian buah <i>Phaleria macrocarpa</i>	41
Tabel 5. Nilai IC50 dari ekstrak <i>Phaleria macrocarpa</i> terhadap kanker kolon, kanker payudara, sel HeLa, sel hepar	41
Tabel 6. Data jumlah ekspresi cyclin-D1 pada kelompok Kontrol (K) dan Perlakuan (P1)	64
Tabel 7. Data jumlah ekspresi p53 pada kelompok Kontrol (K) dan Perlakuan (P1)	66
Tabel 8. Analisis perbedaan ekspresi cyclin-D1 antara kelompok Kontrol (K) dan Perlakuan (P1).....	68
Tabel 9. Analisis perbedaan ekspresi p53 antara kelompok Kontrol (K) dan Perlakuan (P1).....	68
Tabel 10. Uji normalitas distribusi ekspresi cyclin-D1 dan p53 antara kelompok Kontrol (K) dan Perlakuan (P1).....	69
Tabel 11. Hasil Uji Normalitas ekspresi cyclin-D1 dan p53	69
Tabel 12. Hasil Uji Korelasi Pearson p53 dan Cyclin D1	69

Tabel 13. Tabulasi Data cyclin-D1	85
Tabel 14. Tabulasi Data p53	85

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Perhitungan Dosis Konversi	84
Lampiran 2. Hasil Pengamatan Ekspresi Cyclin-D1 dan p53	85
Lampiran 3. Foto Penelitian	86
Lampiran 4. Analisis Statistik	87
Lampiran 5. <i>Ethical Clearance</i>	92

DAFTAR SINGKATAN

5FU	= 5 Fluorouracyl
ADP	= <i>Adenosin Diphosphat</i>
Apaf-1	= <i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	= <i>Adenoma poliposis coli</i>
APC	= <i>Antigen Presenting Cell</i>
ATP	= <i>Adenosine Tri-Phosphate</i>
CD8	= Cluster of differentiation 8
CDK	= <i>Cyclin Dependent Kinase</i>
CIN	= <i>Chromosomal Instability</i>
DCC	= <i>Deleted in Colon Cancer</i>
DISC	= <i>Death Inducing Signaling Complex</i>
DMH	= <i>1,2 Dimethylhidrazine</i>
DNA	= <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
dUTP	= <i>Deoxyuridin Triphosphate</i>
EGFR	= <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
FADD	= <i>Fas Associated Death Domain</i>
FasL	= <i>Fas-ligand</i>
FGR	= <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
GA	= <i>Gallic Acid</i>
HNPCC	= <i>Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer</i>
Ig	= <i>Imunoglobulin</i>
LCS	= <i>Liquor Cerebro Spinalis</i>
LOH	= <i>Loss of Heterozygosity</i>
MAPK	= <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MHC	= <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMR	= <i>mismatch repair</i>
MSI	= <i>Microsatellite Instability</i>
NCCN	= <i>National Comprehensive Cancer Network</i>

NO = Nitrit Oxide

PDGF = *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*

RTK = *Receptor Tirosin Kinase*

TME = *Total Mesorectal Excision*

TNF = *Tumor Necrosis Factor*

UMP = *Uridine Mono-Phosphate*

UTP = *Uridine Tri-Phosphate*

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan berkah-Nya, sehingga kami dapat menyelesaikan tesis yang berjudul:

“PENGARUH PEMBERIAN KOMBINASI 5FU-LEUCOVORIN DENGAN *PHALERIA MACROCARPA* TERHADAP EKSPRESI *CYCLIN D1* DAN p53 : STUDI EKSPERIMENTAL ADENOKARSINOMA KOLON TIKUS *SPRAGUE DAWLEY*”

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 bidang bedah onkologi.

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

1. Prof. DR. Yos Johan Utama, S.H., M.H., selaku Rektor Universitas Diponegoro Semarang.
2. Prof. Dr. dr. Tri Nur Kristina, DMM, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran.
3. DR. dr. RA. Kisdjamiatun RMD, M.Sc selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro (tahun 2015-)

4. dr. A. Zulfa Juniarto, Msi. Med, Sp. And, PhD, selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro (tahun 2014-Desember 2015)
5. 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.
6. 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.
7. Dr. dr. Selamat Budijitno, M.Si Med, Sp.B.(K)Onk, guru sekaligus pembimbing I dalam penelitian ini, atas segala waktu, tenaga dan bimbingan yang diberikan sehingga tesis ini dapat selesai.
8. dr. Ardy Santosa Sp.U (K), guru sekaligus pembimbing II dalam penelitian ini, yang selalu meluangkan waktu, dan tenaga dalam membimbing tesis ini hingga selesai.
9. Kepada guru-guru kami, staf pengajar Bagian Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

10. 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.
11. 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.
12. Yang tercinta istri dan anak-anak kami atas kesabaran, dukungan moral dan semangat untuk menyusun dan menyelesaikan tesis ini.
13. Orang tua – orang tua kami atas dukungannya baik secara moral maupun finansial dalam menyelesaikan tesis ini.

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, November 2015

Arief Ismail Khalik