



Buku ini dipersembahkan untuk

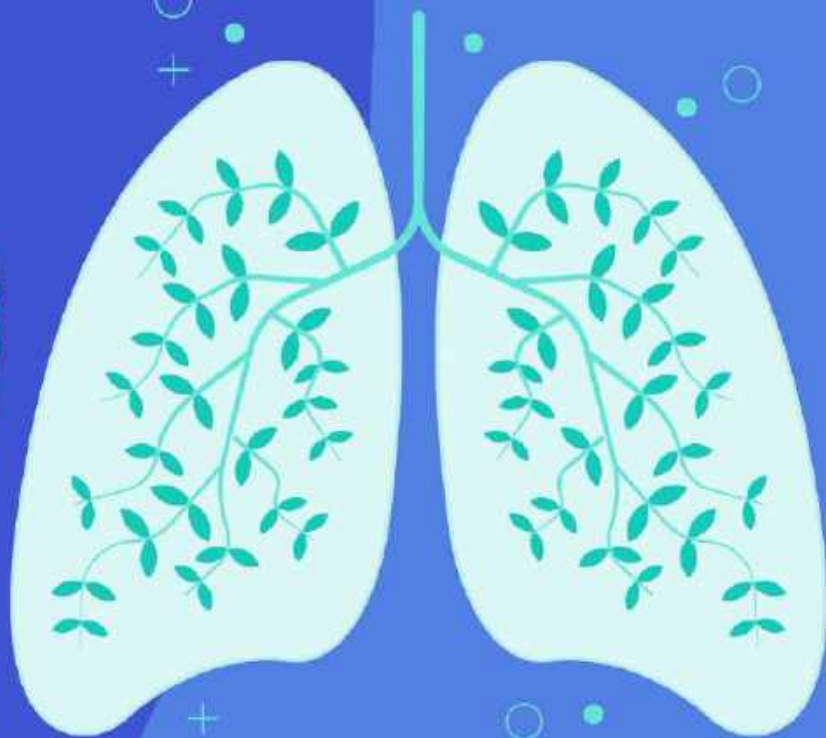
.....

Hak cipta dilindungi Undang-undang No. 28 Tahun 2014
Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian
atau seluruh isi buku ini tanpa seizin tertulis dari penerbit



FISIBILITY STUDY
METODE BENZOPYRENE-INDUCED LUNG CANCER

**PENGARUH PERBEDAAN
RUTE PEMBERIAN BENZOPYRENE
TERHADAP
EKSPRESI GEN Caspase 3, dan p53**



Dr. dr. Titiek Hidayati, M.Kes., Sp.DLP, FISH, FISCM.
Dr. dr. Akrom, M. Kes.
dr. Indrayanti, Sp. PA.

**FISIBILITY STUDY
METODE BENZOPYRENE-INDUCED LUNG CANCER
PENGARUH PERBEDAAN RUTE PEMBERIAN BENZOPYRENE
TERHADAP EKSPRESI GEN Caspase 3, dan p53**

Penulis : Dr. dr. Titiek Hidayati, M.Kes., Sp.DLP, FISH. FISC.M.
Dr. dr. Akrom, M. Kes.
dr. Indrayanti, Sp. PA
Penata Letak : Tim Azkiya
Desain Sampul : Tim Azkiya

Penerbit:



Perum Bukit Golf, Arcadia Housing
Blok E 5 No 21 dan F6 No 10 Leuwinanggung,
Gunung Putri, Bogor, 16963
E-mail : nennyrcho2@yahoo.com
www.noorhanilaksmi.wordpress.com

Cetakan:

I. Jakarta, 2021

Katalog dalam terbitan (KDT)
Dr. dr. Titiek Hidayati, M.Kes., Sp.DLP, FISH. FISC.M., dkk/Fisibility Study
Metode Benzopyrene-Induced Lung Cancer Pengaruh Perbedaan Rute Pem-
berian Benzopyrene Terhadap Ekspresi Gen Caspase 3, Dan P53
- Cet. 1. - Jakarta: November 2021
iv + 84 hlm.; illus.; 23 cm.
Bibliografi: 51
ISBN : 978-623-5733-15-9

Dr. dr. Titiek Hidayati, M.Kes., Sp.DLP., FISH. FISC.M.

Dr. dr. Akrom, M. Kes.

dr. Indrayanti, Sp. PA

Penelitian dan Penyusunan buku ini atas pembiayaan dari
Kemendikbudristek RI melalui hibah penelitian PTUPT
nomor kontrak 036/SP.LRI/VIII/2021

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Alhamdulillahirabbil-alamin, dengan mengucap puji serta syukur kepada Allah Swt atas seluruh rahmat serta hidayah-Nya yang sudah diberikan kepada penulis sehingga bisa menyelesaikan penyusunan buku ini. Serta tidak lupa juga kita panjatkan shalawat dan salam kita hanturkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW, yang telah mengantarkan kita dari jaman kegelapan menuju ke jaman yang terang benderang seperti saat ini. Penulisan buku ini disusun sebagai salah satu keluaran tambahan pada program penelitian PTUPT dengan pembiayaan dari kemendikbudristek RI yang berjudul **“MENGEMBANGKAN PROTOTIPE OHT SUPLEMEN KEMOPREVENTIVE KANKER PARU DI LAYANAN PRIMER”** dengan nomor kontrak 036/SP.LRI/VIII/2021.

Penyusunan buku ini tentu tidak lepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Kemendikbudristek RI yang telah membiayai penelitian ini.
2. Pimpinan UMY dan LPPM UMY yang telah memfasilitasi dan memberikan dukungan pelaksanaan penelitian ini.

3. Pimpinan dan staf Laboratorium UPHP/LPPT-4 yang telah menyediakan tempat dan fasilitas untuk pelaksanaan pengujian pada hewan uji.
4. Teman-teman kampus dan sejawat yang selalu memberi inspirasi

Semoga Allah Swt membalas semua kebaikan yang telah diberikan. Penulis menyadari dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan, sehingga segala bentuk kritik dan saran sangat diperlukan. Semoga penelitian ini bermanfaat bagi masyarakat.

Wassalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Yogyakarta, 08-09-2021

Tim Penyusun

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	2
BAB I KARSINOGEN BENZOPIREN	5
BAB II METODE INDUKSI BENZOPIRENE KARSINOGENESIS KANKER PARU	12
BAB III CASPASE DAN KARSINOGENESIS	19
BAB IV KARAKTERISTIK, AKTIFITAS DAN EKSPRESI GEN P53	32
BAB V PENUTUP	50
DAFTAR PUSTAKA	51
DAFTAR LAMPIRAN	56
BIODATA PENULIS	82

BAB I

KARSINOGEN BENZOPIREN

A. Latar Belakang

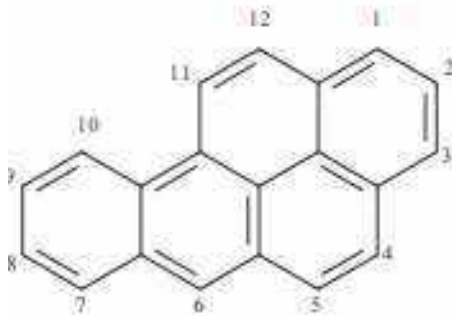
Benzopiren merupakan zat karsinogenik golongan *polycyclic aromatic hydrocarbons* yang bersifat toksik serta sangat berbahaya. Benzopiren memiliki efek mutagenik yang terdapat pada batu bara, minyak bumi, asap rokok, gas buangan rokok serta makanan yang dipanggang atau diasap (Guo *et al*, 2002). Benzopiren menghasilkan metabolit reaktif *benzopyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-oxide* yang dapat berikatan secara kovalen dengan basa guanin DNA sehingga terjadi mutasi genetik (Sattar *et al.*, 1999).

Senyawa benzopiren yang masuk ke dalam tubuh dapat terdistribusi dan mengendap pada organ paru, jantung, hati dan ginjal, baik yang diadministrasikan melalui peroral maupun intraperitoneal (Selvendiran *et al.*, 2004). Benzopiren yang masuk ke dalam tubuh akan memicu terjadinya transkripsi CYP 450 1A1 dengan cara berikatan dengan gen CYP 450 1A1 yaitu AhR yang berada di sitosol. Benzopiren akan diubah menjadi benzopiren-7,8 epoksida dengan cara dioksidasi oleh CYP 450 1A1. Kemudian di hidrolisis oleh epoksida hidrolase menjadi 7,8-diol yang kemudian akan bereaksi

dengan CYP 1A1 membentuk metabolit reaktif yaitu benzopiren-7,8-dihidrodiol-9,10-epoksida (BPDE) yang dapat berikatan dengan DNA membentuk *adduct* DNA yang dapat menyebabkan kerusakan pada DNA (Aklillu *et al.*, 2005; Magesh *et al.*, 2007; Sissung *et al.*, 2006; Wenzlaff *et al.*, 2005). Dengan adanya kerusakan pada DNA menyebabkan terjadinya peningkatan ekspresi protein Bcl 2 yang mengakibatkan membran luar mitokondria tetap utuh dan kebocoran sitokrom c dapat dicegah. Karena sitokrom c tidak keluar, maka faktor apoptosis tidak terinduksi dan ekspresi caspase 3 akan menurun. Menurunnya ekspresi caspase 3 berarti kemampuan apoptosis sel pun menurun (Hidayat *et al.*, 2011).

B. Struktur, Karakteristik, Metabolisme Benzopiren dan rute pemberian

1. Struktur dan Karakteristik



Gambar 1. Struktur Benzopiren (IARC, 2012)

Benzopiren merupakan zat karsinogenik dari golongan *polycyclic aromatic hydrocarbons* yang bersifat toksik serta sangat berbahaya.. Benzopiren memiliki efek mutagenik yang terdapat pada batu bara, minyak bumi, asap rokok, gas buangan rokok serta makanan yang dipanggang atau diasap. Benzopiren berupa kristal bening berbentuk jarum, dengan rumus kimia $C_{20}H_{12}$ massa molekul : 252,3 dengan

titik lebur 179-179,3°C. Benzopiren merupakan salah satu senyawa yang paling banyak diteliti karena bersifat karsinogenik (Guo *et al*, 2002) . Benzopiren menghasilkan senyawa metabolik genotoksik *benzopyrene-7,8 dihydrodiol – 9,10 – epoxide*. Senyawa genotoksik umumnya diklasifikasikan berdasarkan susunan kimiawi, terbagi menjadi dua kategori yang pertama yaitu senyawa yang secara langsung bersifat genotoksik yang kedua senyawa yang metabolitnya bersifat genotoksik dan kedua senyawa yang metabolitnya bersifat genotoksik akibat proses biotransformasi, dapat bersifat pro mutagen atau secara langsung bersifat mutagen (Mehdizadeh, 1991).

Benzopiren merupakan senyawa hidrokarbon polisiklik aromatik (PAH) yang digolongkan sebagai senyawa pro karsinogen kuat. Senyawa ini dapat dijumpai dilingkungan sebagai hasil proses pembakaran yang tidak sempurna , seperti pada daging panggang, sate, makanan yang diasap, asap rokok serta asap kendaraan bermotor. Hingga saat ini masih terus berkembang anggapan bahwa benzo(α) piren sebagai penyebab kanker (Sofyan *et al.*, 2011).

Berikut ini merupakan karakteristik dari benzopiren (IARC, 2012) :

Sinonim	: BaP; <i>benzo(def)chrysene</i> ; 3,4- <i>benzopyrene</i> ; 6,7- <i>benzopyrene</i> ; <i>benz(α)pyrene</i> ; 3,4- <i>benz(α)pyrene</i> ; 4,5- <i>benzopyrene</i> .
Rumus molekul	: C ₂₀ H ₁₂
Massa molekul	: 252.31 g/mol
Titik didih	: 310-312 °C pada 10 mmHg
Titik lebur	: 171 -179,3 °C ; 178,1 °C
Kelarutan dalam air	: 0,00162 mg/L pada suhu 25 °C ; 0,0038 mg/L pada suhu 25°C.

2. Sumber benzopiren

Sumber Benzopiren menurut *Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)*, (2009) adalah:

(1) Udara

Konsentrasi PAH di udara bervariasi mulai kurang dari 5 hingga 200.000 nanogram/meter kubik (ng/m^3). Benzopiren yang terdapat di udara bersumber dari asap rokok, asap tembakau.

(2) Air

PAH dapat larut dari tanah ke dalam air. Paparan benzopiren melalui air disebabkan oleh pencemaran yang terjadi pada air dari limbah industri dan tumpahan dari minyak yang tidak sengaja terbuang di laut.

(3) Bahan Makanan

Makanan yang dibakar atau dipanggang menggunakan arang, kayu, atau jenis lainnya dapat meningkatkan konsentrasi PAH. Beberapa tanaman seperti gandum hitam, gandum, lentil dapat mensintesis PAH atau menyerap PAH melalui udara, air, dan tanah.

3. Metabolisme dan aktivitas biologis Benzopiren

Berdasarkan jalur pemberiannya jalur intraperitoneal memiliki toksisitas lebih besar dibandingkan pemberian jalur oral. Benzopiren yang diinduksi secara oral harus memasuki usus kecil dan hati sebelum memasuki sirkulasi, sedangkan benzopiren yang diinduksi secara intraperitoneal diserap melalui mesenterika vena dan limfatik, dan melewati hati tetapi tidak dimetabolisme dan dihilangkan segera oleh usus (Uno *et al.*, 2004).

Secara garis besar jalur absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi benzopiren adalah sebagai berikut:

(1) Absorpsi

Absorpsi ditandai oleh masuknya xenobiotika atau toksin dari suatu tempat (paparan) menuju sirkulasi sistemik tubuh atau pembuluh limfa (Rahayu & Solihat, 2018). Ada tiga rute jalur absorpsi pada manusia yaitu melalui paru-paru, melalui kulit dan melalui saluran pencernaan (*Scientific Committee on Food*, 2002).

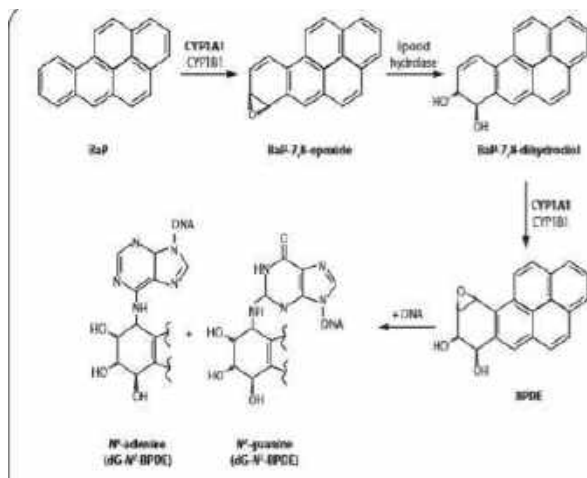
Benzopiren yang diberikan secara oral akan terdispersi dan melarut didalam cairan saluran pencernaan. Bentuk yang terlarut melalui pembuluh kapiler pada saluran pencernaan akan terabsorpsi. Absorpsi sebagian besar berlangsung di pembuluh kapiler usus halus, kemudian melalui pembuluh kapiler mesenterika menuju vena porta hepatica menuju hati sebelum ke sirkulasi sistemik. Sedangkan Benzopiren yang diberikan secara intraperitoneal diabsorpsi di rongga peritoneum (Rahayu & Solihat, 2018).

(2) Distribusi

Setelah xenobiotika mencapai sistem peredaran darah, bersama dengan darah akan didistribusikan keseluruh tubuh (Rahayu & Solihat, 2018).

Benzopiren yang masuk ke dalam tubuh dapat terdistribusi dan mengendap pada organ seperti paru, jantung, hati, dan ginjal, baik yang masuk melalui oral, inhalasi, maupun intraperitoneal (Selvendiran *et al.*, 2004).

(3) Metabolisme



Gambar 2. Jalur aktivasi metabolik BPDE merusak ikatan DNA
(Mosserová et al., 2009)

Benzopiren diaktifasi oleh enzim CYP 1A1 untuk memperoleh sifat mutagenik dan karsinogeniknya. Tahap awal aktivasi benzopiren adalah pembentukan *benzopyrene-7,8-epoxide*, kemudian dihidrolisis oleh *epoxide hydrolase* (EH) menjadi *benzopyrene-7,8-dihydrodiol*, selanjutnya dimetabolisme oleh enzim CYP 1A1 menjadi genotoksik akhir yaitu menjadi *benzopyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide* (BPDE) (Mosserová et al., 2009).

Metabolit benzopiren tersebut dapat berikatan dengan DNA membentuk *benzopyrene-DNA adduct*. Senyawa kompleks inilah yang dapat menghambat replikasi DNA dan mutasi gen dengan cara berikatan dengan N²-*deoxyguanosine* DNA. DNA *adduct* yang terbentuk dapat mengakibatkan kerusakan pada DNA. Jika DNA *adduct* tidak diperbaiki dapat menyebabkan kesalahan kode selama proses replikasi sehingga dapat mengakibatkan mutasi yang permanen. Jika mutasi terjadi di wilayah gen yang penting

seperti onkogen dan gen penekan tumor, maka kanker dapat terjadi (Moserová *et al.*, 2009; Sagredo *et al.*, 2009).

Dengan adanya kerusakan pada DNA akan menyebabkan terjadinya peningkatan ekspresi protein Bcl 2 yang mengakibatkan membran luar mitokondria akan tetap utuh dan kebocoran sitokrom c dapat dicegah. Oleh karena sitokrom c tidak keluar, maka faktor apoptosis tidak terinduksi dan ekspresi caspase 3 akan menurun. Menurunnya ekspresi caspase 3 berarti kemampuan apoptosis sel pun menurun (Hidayat *et al.*, 2011). Berdasarkan jalur pemberiannya jalur intraperitoneal lebih toksik dibandingkan dengan pemberian jalur oral. Benzopiren yang diinduksi secara oral harus memasuki usus kecil dan hati sebelum memasuki sirkulasi, sedangkan benzopiren yang diinduksi secara intraperitoneal diserap melalui mesenterika vena dan limfatik, dan melewati hati tetapi tidak dimetabolisme dan dihilangkan segera oleh usus (Stoner *et al.*, 1984).

C. Manfaat dan Urgensi Penelitian Pendahuluan Benzopiren

Benzopiren banyak digunakan dalam penelitian sebagai model kanker. Salah satu metode untuk melihat terjadinya kanker dapat melalui apoptosis, pada penelitian ini membandingkan dua perlakuan yang berbeda yaitu peroral dan intraperitoneal untuk melihat pengaruhnya pada proses karsinogenesis.

Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan serta wawasan terkait perubahan ekspresi gen yang terlibat pada karsinogenesis dan pembentukan kanker paru, antara gen p53, caspase 3, VEGF dan Bcl2 pada hewan uji yang diinduksi dengan benzopiren secara peroral dan intraperitoneal.

BAB II

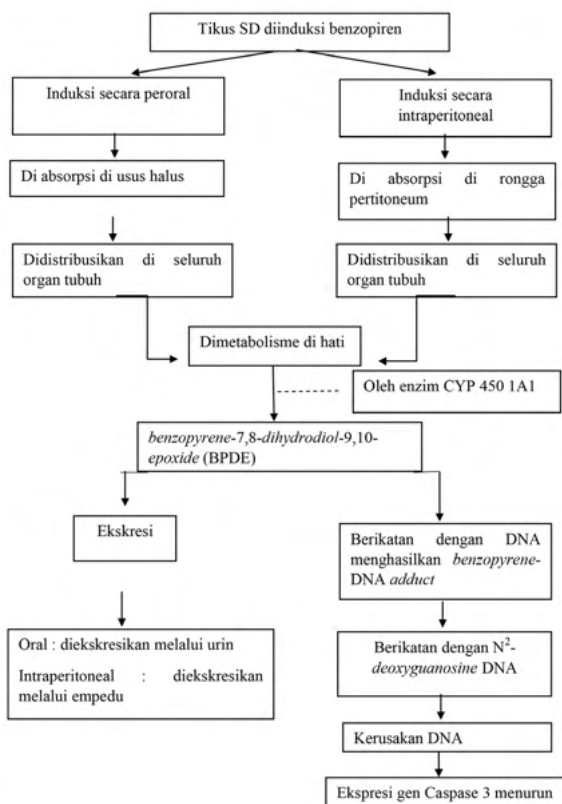
METODE INDUKSI BENZOPIRENE KARSINOGENESIS KANKER PARU

A. Pendahuluan

Benzopiren yang diinduksikan secara oral diabsorpsi di usus halus. Benzopiren yang diinduksi secara intraperitoneal akan diabsorpsi di rongga peritoneum (Wirasuta, 2006). Pada rute induksi peroral dan rute intraperitoneal, keduanya didistribusikan hampir diseluruh organ tubuh dan kemudian akan dimetabolisme di hati oleh enzim CYP 450 1A1 membentuk BPDE . Hasil metabolit yang terbentuk akan berikatan dengan DNA membentuk kompleks BPDE-DNA *adduct*, kemudian berikatan dengan N²-deoksiganosin atau BPDE-N²-dG DNA yang dapat menghambat replikasi DNA dan menyebabkan mutasi gen p53 (Moserová *et al.*, 2009). Benzopiren yang diinduksi secara oral dapat didetoksifikasi secara efisien oleh enzim CYP 1A1 yang berada di dalam sel epitel saluran gastrointestinal sehingga metabolit yang berikatan dengan DNA lebih sedikit dibandingkan dengan induksi secara intraperitoneal (Nebert *et al.*, 2013). Hal ini menyebabkan induksi intraperitoneal memiliki toksisitas yang lebih besar dibandingkan dengan induksi peroral.

B. Kerangka konsep Karsinogenesis Benzopirene

Benzopiren yang diinduksi secara oral diabsorpsi di usus halus. Benzopiren yang diinduksi secara intraperitoneal akan diabsorpsi di rongga peritoneum. Pada rute induksi peroral dan rute intraperitoneal keduanya didistribusikan hampir di seluruh organ tubuh dan kemudian akan dimetabolisme dihati oleh enzim CYP 450 1A1 membentuk BPDE. Hasil metabolit yang terbentuk akan berikatan dengan DNA membentuk *benzopyrene-DNA adduct* , kemudian berikatan dengan *N²-deoxyguanosine / BPDE-N2-dg* yang dapat menghambat replikasi DNA dan mutasi gen caspase 3.



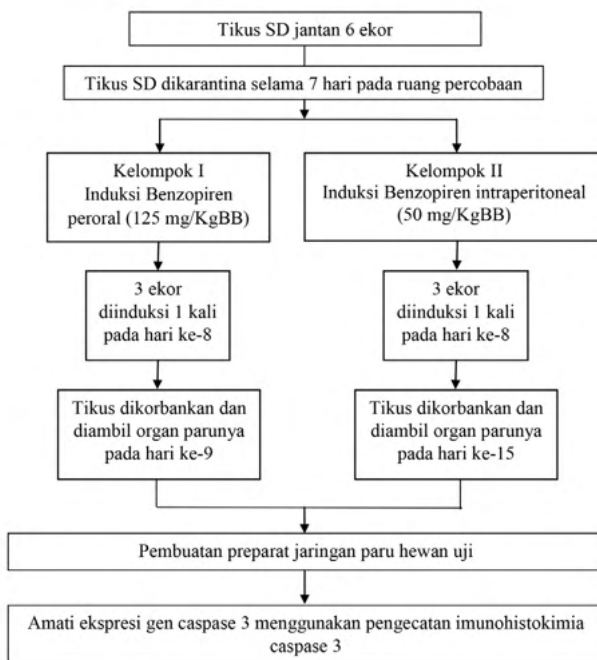
Gambar 3. Skema Kerangka Berfikir

Benzopiren yang diinduksi secara oral dapat didetoksifikasi secara efisien oleh enzim CYP 1A1 yang berada didalam sel epitel saluran gastrointestinal sehingga metabolit yang berikatan pada DNA lebih sedikit dibandingkan dengan benzopiren yang diinduksi secara intraperitoneal. Hal ini menyebabkan induksi intraperitoneal memiliki toksisitas lebih besar dibandingkan dengan induksi benzopiren secara peroral (Moserová *et al.*, 2009; Uno *et al.*, 2004).

C. Metode Pengujian

1. Desain Penelitian.

Jenis penelitian yang digunakan pada umumnya adalah ekspreimental dengan rancangan penelitian *post test only group design*. Desain penelitian eksperimental ini dapat dilakukan pada hewan uji mencit maupun tikus.



Gambar 4. Rancangan Penelitian

2. Sampel

Hewan percobaan yang digunakan adalah tikus putih galur *Sprague Dawley* jantan dengan berat rata-rata 100 gram yang diperoleh dari PAU (Pusat Antar Universitas) UGM. Jumlah hewan uji yang digunakan sebanyak 6 ekor terbagi menjadi 2 kelompok, masing-masing kelompok sebanyak 3 ekor. Kelompok I adalah kelompok yang diinduksi benzopiren secara per oral dengan dosis 125 mg/KgBB dan kelompok II adalah kelompok yang diinduksi benzopiren secara intraperitoneal dengan dosis 50 mg/KgBB (Ali et al., 2017; Sehgal et al., 2012). Tikus dikarantina selama 7 hari dalam ruang percobaan sebelum diinduksi. Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*.

3. Bahan dan Alat yang Digunakan

Sebelum pelaksanaan, peneliti hendaknya sudah menyiapkan bahan dan alat.

1. Bahan

Bahan yang digunakan pada percobaan ini adalah tikus SD jantan berumur 30 hari dengan berat rata-rata 100 gram sebanyak 6 ekor yang diperoleh dari PAU UGM, benzopiren (sigma, cat . D3254), aquadest, minyak jagung, formalin 10 %, xylol, etanol absolut, etanol 90%, etanol 80%, etanol 70 %, aquadest steril, buffer sitrat pH 6.0, PBS, H₂O₂, anticaspase-3, DAB, enzim SA-HRP, mayer.

2. Alat

Peralatan yang digunakan untuk praperlakuan dan perlakuan meliputi : kandang tikus, tempat pakan dan minum, alat sonde, alat bedah, *waterbath*, inkubator, timbangan analitik, labu takar, sarung

tangan, *rotary microtom*, *object glass*, propipet, pipet volume, gelas beaker, mikroskop.

4. Prosedur Penelitian

1. Induksi benzopiren dan perlakuan awal

Sejumlah 6 ekor tikus *Sprague Dawley* jantan dikelompokkan menjadi dua kelompok. Kelompok I adalah kelompok yang diinduksi benzopiren secara peroral dengan dosis 125 mg/kgbb dan kelompok II adalah kelompok yang diinduksi benzopiren secara intraperitoneal dengan dosis 50 mg/kgbb. Setiap kelompok perlakuan terdapat 3 ekor tikus. Pada perlakuan secara per oral induksi dilakukan sebanyak 1 kali pada hari ke 8 sedangkan pada perlakuan intraperitoneal induksi dilakukan sebanyak 1 kali pada hari ke 8. Efek induksi benzopiren diamati pada hari ke 7 setelah waktu induksi. Masing – masing hewan uji pada tiap perlakuan mendapatkan volume pemberian benzopiren maksimal sebanyak 2 ml.

2. Pembedahan dan pengambilan organ paru

Hewan uji kelompok 1 dikorbankan pada hari ke-9 dan hewan uji kelompok 2 dikorbankan pada hari ke-15, tikus dikorbankan dengan cara didislokasi pada tulang leher. Kemudian tikus dibedah dan diambil organ parunya. Organ paru yang telah diambil dimasukkan kedalam pot yang berisi formalin 10% untuk menjaga agar organ paru tidak rusak.

3. Pembuatan preparat

Jaringan paru dimasukkan kedalam tabung formalin 10% dipotong dengan *rotary microtom* setebal 4 mikron dan diletakkan dalam *poly-L-lysine object glass* dan dibiarkan dalam suhu kamar. Selanjutnya dilakukan defaranisasi , tetapi sebelumnya slide

dipanaskan dahulu pada suhu 60 °C selama 60 menit. Kemudian ditambahkan dengan larutan berikut secara berurutan yaitu : xylol (2 x 10 menit), etanol absolut (2 x 10 menit), etanol 90 % (1 x 5 menit), etanol 80 % (1 x 5 menit), etanol 70 % (1 x 5 menit), dan aquadest steril (3 x 5 menit) (Prakosa, Ratnawati, & Prabawati, 2017).

4. Pengukuran ekspresi gen dengan Metode Imunohistokimia

Langkah awal adalah proses *antigen retrieval* dengan buffer sitrat pH 6,0, kemudian dipanaskan didalam *waterbath* suhu 95 °C selama 20 menit. *Slide* dikeluarkan dari *waterbath*, ditunggu hingga suhu ruang (+/- 20 menit) setelah itu dicuci dengan PBS (3 x 2 menit). Selanjutnya dilakukan pengecatan secara imunohistokimia sebagai berikut : *slide* ditetesi dengan 3 % H₂O₂ dalam metanol dan diinkubasi selama 15 menit, setelah itu dicuci dengan PBS selama 2 menit sebanyak 3 kali. Kemudian dilakukan *blocking unspecific protein* dengan ditetaskan *backgrund snipper*, diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali selama 2 menit. Setelah itu, ditetaskan antibodi primer (anticaspase-3 yang dilarutkan dalam buffer PBS dengan perbandingan 1:50 dan 5% FBS) selama semalam pada suhu 4 °C. Setelah itu *slide* diinkubasi dengan antibodi sekunder selama 30 menit pada suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali selama 2 menit. Setelah itu, diinkubasi dengan enzim SA-HRP selama 20 menit pada suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali selama 2 menit dan dibilas dengan aquadest. Kemudian ditetaskan DAB dan DAB buffer dengan perbandingan 1:50 dan diinkubasi selama 3-10 menit pada suhu ruang, setelah itu dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali selama 2 menit dan dicuci dengan aquadest sebanyak 3 kali selama 2 menit. Selanjutnya ditetaskan Mayer dan *tap water* dengan perbandingan 1:10 dan diinkubasi selama 5-10 menit pada

suhu ruang, kemudian dibilas dengan *tap water*, dikeringkan dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali (Prakosa et al., 2017).

Pengamatan ekspresi gen caspase 3 menggunakan mikroskop cahaya. Ekspresi gen caspase 3 ditunjukkan oleh sitoplasma yang berwarna coklat sedangkan sel yang tidak mengekspresikan gen caspase 3 akan berwarna biru. Persentase ekspresi gen caspase 3 dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Persentase ekspresi caspase 3} = \frac{\text{Jumlah sel yang terekspresi}}{\text{Jumlah sel tumor seluruhnya}} \times 100\%$$

5. Analisis Data

Data yang diperoleh yaitu berupa gambaran ekspresi dan kuantitatif caspase 3. Data ekspresi caspase 3 disajikan dalam bentuk gambar atau deskriptif. Data presentase ekspresi caspase 3 dilakukan uji normalitas *Shapiro Wilk*, uji homogenitas *Levene's Test*, dan uji non parametrik *Mann Withney*. Dengan tingkat kepercayaan 95%. Analisis dilakukan dengan menggunakan fasilitas pengolah dan penyaji *program product and service solution* (SPSS).

BAB III

CASPASE DAN KARSINOGENESIS

A. Pendahuluan

Caspase 3 berperan sebagai protein eksekutor yang memutuskan sel untuk apoptosis. Apabila caspase 3 teraktivasi maka akan terjadi kematian sel berupa apoptosis. Apoptosis merupakan proses kematian sel dalam rangka mempertahankan integritas tubuh secara keseluruhan. Program ini memiliki peran yang sangat penting dalam *homeostasis* serta perkembangbiakan sel. Salah satu peran penting apoptosis adalah untuk membatasi proliferasi sel yang tidak diperlukan, mekanisme yang efisien untuk mengeliminasi sel yang tidak diperlukan serta berbahaya. Pada sel kanker apoptosis ini mengalami gangguan (Salido *et al*, 2009).

B. Karakteristik dan aktifitas biologis

Kaspase adalah enzim protease yang mengandung sistein sebagai residu katalitik yang memutus substrat spesifik pada residu asam aspartat, kaspase yang ada didalam sel dalam keadaan inaktif berbentuk zymogen. Struktur kaspase berupa rantai polipeptida berukuran 32-55 kDa, terbagi menjadi tiga domain, domain yang

pertama memiliki ukuran 17-21 kDa merupakan domain sentral yang merupakan subunit katalitik terbesar (*active side*), domain yang kedua memiliki ukuran 10-13 kDa merupakan domain terminal yang merupakan subunit katalitik terkecil, domain yang ketiga memiliki ukuran 3-24 kDa merupakan prodomain yang disebut death domain (Bhat, *et al.* , 2008). Enzim kaspase dapat berfungsi sebagai aktivator sitokin (kaspase 1, 4 , dan 5) inisiator apoptosis (kaspase 8 dan 9), dan efektor apoptosis (kaspase 3, 6, dan 7) (Utami, 2007).

Berdasarkan fungsinya, caspase dibagi dua yaitu caspase inisiator dan caspase eksekutor atau efektor. Caspase 3 masuk dalam caspase eksekutor atau efektor, dimana pengaktifannya dari caspase inisiator, caspase 8 dan caspase 9. Salah satu ciri sel kanker ialah mampu menghindari apoptosis. Aktivasi apoptosis baik jalur intrinsik maupun ekstrinsik akan berujung pada aktivasi caspase 3 sebagai caspase eksekutor. Bila caspase 3 telah teraktivasi , terjadi determinasi, kematian sel tidak terhindar, dan terjadi apoptosis (Moningka, 2019).

Caspase berperan sebagai protein eksekutor yang dapat memutuskan sel untuk apoptosis. Caspase yang belum aktif disebut procaspase. Agar caspase dapat berfungsi, maka harus mengalami aktivasi dengan pemotongan sisi karboksil dan juga pemotongan sisi terminal amino sehingga sisinya kan menempel sedemikian rupa dan menjadi caspase aktif. Ada stimulus tertentu yang mengubah procaspase menjadi caspase. Caspase 3 termasuk golongan caspase eksekutor yang diaktifkan oleh caspase inisiator, seperti caspase 8 dan caspase 9. Aktivasi apoptosis baik jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik akan berujung pada aktivasi caspase 3 menjadi caspase eksekutor. Apabila caspase 3 teraktivasi maka akan terjadi kematian sel yang biasa disebut dengan apoptosis (Muhartono & Subeki, 2017).

Apoptosis adalah proses kematian sel dalam rangka mempertahankan integritas tubuh secara keseluruhan. Program ini memiliki peran yang penting untuk menjaga *homeostasis* serta perkembangbiakan sel. Salah satu peranan penting apoptosis adalah untuk membatasi proliferasi sel yang tidak diperlukan, mekanisme yang efisien yang tidak diperlukan dan berbahaya. Pada sel kanker apoptosis ini mengalami gangguan (Salido *et al.*, 2009).

C. Perkembangan Penelitian caspase-3

Pada penelitian yang telah dilakukan oleh (Malhotra *et al.*, 2014) induksi benzopiren dengan dosis 100mg/kgBB pada tikus menghasilkan peningkatan ekspresi protein Bcl-2 secara signifikan sedangkan ekspresi Bax menurun secara signifikan serta dan penurunan yang signifikan pada aktivitas enzim caspase 3 dan caspase 9. Respon tumor paru terhadap benzopiren berbeda nyata ketika senyawa diberi secara oral dan ip. Perbedaan ini sangat jelas terlihat pada benzopiren yang beberapa kali lipat lebih aktif ketika diberikan secara ip dan menunjukkan bahwa rute ip lebih baik daripada rute po saat menguji hidrokarbon polisiklik untuk induksi tumor paru pada tikus A/J (Stoner *et al.*, 1984).

D. Ekspresi Caspase-3 berdasarkan jalur induksi

Penelitian kali ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian *post test only group design*. Pada penelitian ini, pengamatan ekspresi gen caspase 3 pada jaringan paru tikus galur *Sprague Dawley* jantan dilakukan dengan pengecatan imunohistokimia. Dalam penelitian ini hewan uji yang digunakan adalah tikus *Sprague Dawley* jantan berjumlah 6 ekor berumur 30 hari dengan berat rata-rata 100 gram yang diperoleh dari Pusat Antar Universitas (PAU) UGM. Tikus dibagi menjadi 2 kelompok

perlakuan, tiap kelompok terdapat 3 ekor tikus. Kelompok 1 adalah tikus yang diberi perlakuan induksi benzopiren secara peroral dengan dosis 125 mg/kgBB, sedangkan kelompok 2 adalah tikus yang diberi perlakuan induksi intraperitoneal dengan dosis 50 mg/kgBB (Ali *et al.*, 2017; Sehgal *et al.*, 2012). Induksi benzopiren dilakukan satu kali pada masing-masing perlakuan di hari ke – 8.

Penelitian kali ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh induksi benzopiren terhadap ekspresi caspase 3. Pengamatan perubahan ekspresi caspase 3 dilakukan menggunakan metode imunohistokimia. Prinsip dari metode imunohistokimia adalah perpaduan antara reaksi imunologi dan kimiawi, dimana reaksi imunologi ditandai dengan adanya reaksi antara antigen dengan antibodi, dan reaksi kimiawi ditandai dengan adanya reaksi antara enzim dan substrat. Reaksi penginduksian oleh benzopiren dalam menimbulkan perubahan ekspresi pada gen caspase 3 pada paru-paru hewan uji akan menjadi indikator pengamatan dalam penelitian ini. Pembuatan model paru pada penelitian ini menggunakan senyawa karsinogenik berupa benzopiren.

Benzopiren yang masuk ke dalam tubuh dapat menimbulkan gangguan pada organ tubuh, hal ini bergantung pada jumlah serta berapa lama organ tersebut terpapar oleh benzopiren. Pada organ paru yang diinduksi benzopiren ditemukan adanya nekrosis dan penebalan pada septa alveoli (Bire *et al.*, 2018).

Hewan uji yang telah diinduksi dengan senyawa benzopiren kemudian dikorbankan dan diambil organ parunya. Pada kelompok 1 (perlakuan induksi peroral) hewan uji dikorbankan pada hari ke – 9 sedangkan pada kelompok 2 (perlakuan induksi intraperitoneal) dikorbankan pada hari ke – 15. Organ paru yang telah diambil dipotong secara melintang pada tiga bagian yang berbeda selanjutnya dibuat blok parafin untuk persiapan pembuatan preparat jaringan paru

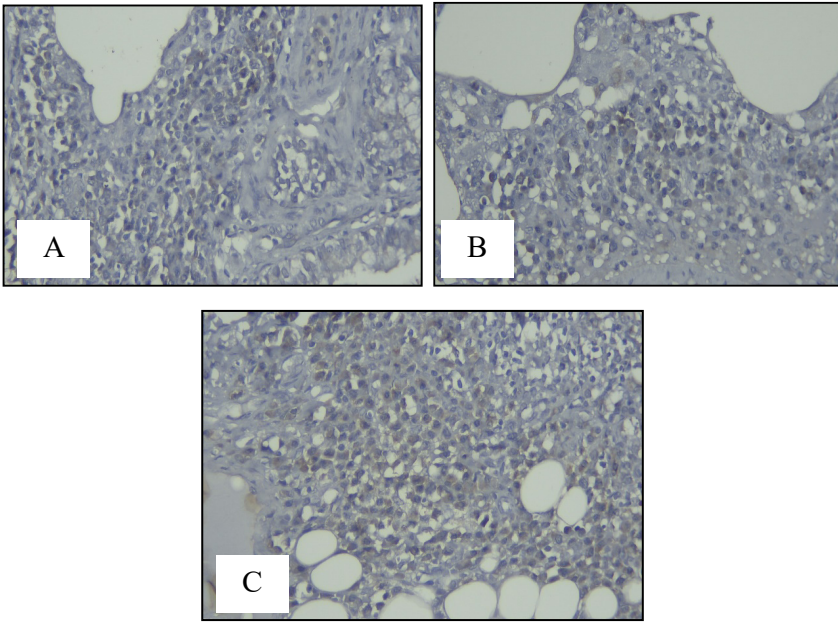
untuk prosedur pengecatan imunohistokimia caspase 3. Pengecatan dan pembacaan hasil imunohistokimia caspase 3 dilakukan dibagian Patologi Anatomi FK-KMK UGM.

Pengamatan caspase 3 dilakukan dengan pengecatan imunohistokimia dan melihat jumlah sel pada organ paru yang bereaksi terhadap pewarnaan imunohistokimia pada perbesaran 400 x. Jumlah sel yang terwanai yaitu terbentuknya berwarna coklat pada sitoplasma. Hasil mikroskopis ekspresi caspase 3 terdapat pada gambar 5 dan gambar 6, data persentase ekspresi gen caspase 3 terdapat pada tabel 1.

Tabel I. Data rata-rata presentase ekspresi gen caspase 3

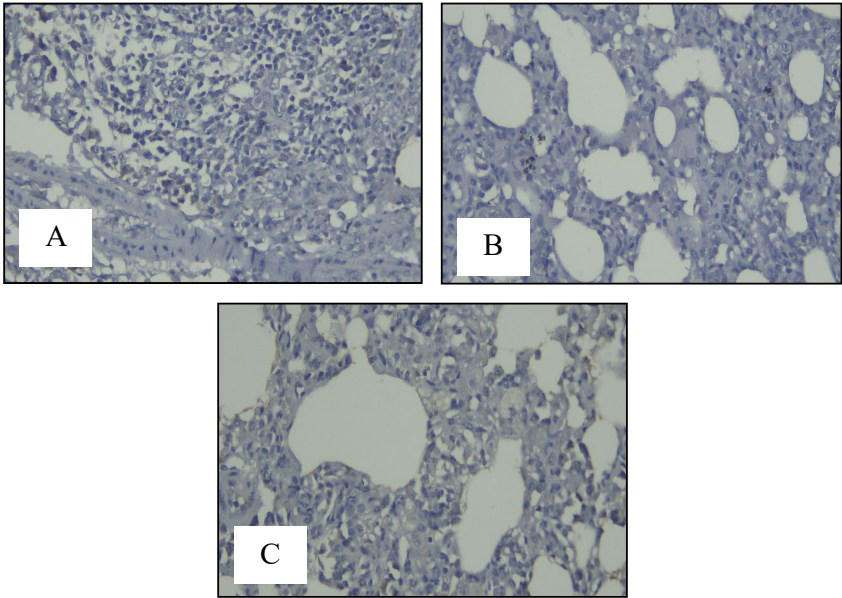
Kelompok	Rata-rata persentase ekspresi caspase 3 \pm SD
Oral	1,6 % \pm 0,1
Intraperitoneal	0,2 % \pm 1,053

Keterangan : Kelompok perlakuan oral replikasi 1,2,3 dengan dosis benzopiren 125 mg/kgBB. Kelompok perlakuan intraperi-toneal replikasi 1,2,3 dengan dosis benzopiren 50 mg/kgBB.



Gambar 5. Gambaran Mikroskopis Ekspresi Caspase 3 yang di Induksi secara Peroral.

Keterangan: Jaringan paru tikus yang diinduksi benzopiren secara peroral (kelompok 1) dengan dosis 125 mg/kgBB. Perlakuan oral replikasi 1 (A) jumlah sel yang terpulas positif sebanyak 8, perlakuan oral replikasi kedua jumlah sel yang terpulas positif sebanyak 7, perlakuan oral replikasi ketiga jumlah sel yang terpulas positif sebanyak 28. Tanda panah menunjukkan warna coklat dari ekspresi caspase 3.



Gambar 6. Gambaran Ekspresi Caspase 3 yang di Induksi Benzopiren secara Intraperitoneal.

Keterangan: Gambaran mikroskopis ekspresi gen caspase 3 pada jaringan paru- Paru tikus Sprague Dawley yang diinduksi benzopiren secara intraperitoneal (kelompok 2) dengan dosis 50 mg/kgBB. Perlakuan intraperitoneal replikasi pertama (A), perlakuan intraperitoneal replikasi kedua (B), dan perlakuan intraperitoneal replikasi ketiga (C). Tanda panah menunjukkan warna coklat dari ekspresi caspase 3.

Hasil ekspresi gen caspase 3 pada kelompok yang mendapat induksi benzopiren secara oral dengan dosis 125 mg/kgBB (kelompok 1) maupun kelompok yang mendapat induksi benzopiren secara intraperitoneal dengan dosis 50 mg/kgBB (kelompok 2) pada masing-masing jaringan paru terdapat sel yang terpulus positif. Pada

kelompok perlakuan peroral sel yang terpulas positif lebih banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan intraperitoneal. Sel paru yang mengekspresikan caspase 3 menunjukkan warna coklat pada sitoplasma, sel paru yang tidak mengekspresikan caspase 3 berwarna biru. Warna coklat yang terbentuk pada gambaran mikroskopis ekspresi gen caspase 3 di atas tidak pekat hal ini dapat disebabkan oleh dosis benzopiren dan lama induksi benzopiren. Warna coklat merupakan hasil interaksi antara antigen yang berikatan dengan antibodi primer dan enzim SA-HRP dengan *substrate diamino benzidine* (DAB).

Kromogen DAB yang mengandung H_2O_2 sebagai penanda yang akan membentuk kompleks dengan enzim peroksidase dalam kompleks SA-HRP. Kompleks yang terbentuk dari kromogen DAB akan membentuk warna coklat gelap. Kromogen ini memiliki ikatan yang sangat kuat dengan peroksida sehingga dengan proses dehidrasi dan *clearing* tidak akan mengalami perubahan warna (Bintari, 2016).

Perbedaan Ekspresi Gen Caspase 3 Berdasarkan Perbedaan Cara Induksi Benzopiren

Perbedaan ekspresi gen caspase 3 berdasarkan perbedaan cara induksi benzopiren dapat dilihat pada tabel 1.

Ekspresi caspase 3 dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Persentase ekspresi caspase 3} = \frac{\text{Jumlah sel yang terekspresi}}{\text{Jumlah sel tumor seluruhnya}} \times 100\%$$

Berdasarkan rumus di atas diperoleh rata-rata persentase ekspresi caspase 3 seperti yang tertera pada tabel 1. Persen ekspresi caspase 3 dilihat pada rata-rata lima lapang pandang dengan perbesaran 400

x. Pada kelompok yang diinduksi benzopiren secara oral diperoleh persen ekspresi caspase 3 sebesar 1,6 % dan pada kelompok yang diinduksi benzopiren secara intraperitoneal diperoleh persen ekspresi caspase 3 sebesar 0,2 %.

Data pada kelompok perlakuan oral dan intraperitoneal kemudian dibandingkan dengan data kelompok kontrol. Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak diberi induksi benzopiren. Data kelompok kontrol pada penelitian ini diperoleh dari penelitian yang sudah ada sebelumnya. Data kelompok perlakuan dibandingkan dengan data kelompok kontrol untuk melihat apakah kelompok perlakuan memiliki ekspresi yang lebih kecil daripada kelompok kontrol atau tidak. Pada penelitian yang dilakukan oleh (Ali Hussein *et al.*, 2016) diperoleh persentase ekspresi caspase 3 pada kelompok kontrol sebesar 0,00059%. Tikus yang digunakan pada kelompok kontrol adalah tikus jenis swiss albino. Dari data tersebut dapat menjelaskan bahwa induksi benzopiren secara peroral dan intraperitoneal dapat menyebabkan peningkatan ekspresi caspase 3 dengan melihat persen ekspresi yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok kontrol, hal ini tidak sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh (Malhotra *et al.*, 2014) yang menyatakan bahwa ekspresi caspase 3 menurun secara signifikan setelah diinduksi dengan senyawa benzopiren. Disisi lain (Ali Hussein *et al.*, 2016) menyatakan adanya peningkatan jaringan paru caspase 3 pada kelompok yang diberi benzopiren.

Tabel II. Median ekspresi gen caspase 3

Kelompok	Ekspresi gen caspase 3		
	Median	Min	Max
Oral	1,100	0,0	7,3
Intraperitoneal	0,000	0,0	1,0

Berdasarkan tabel diatas median ekspresi gen caspase 3 pada sel jaringan paru yang diinduksi benzopiren secara oral (kelompok 1) adalah 1,100 ; min 0,0 ; dan max 7,3. Sedangkan median pada kelompok yang diinduksi benzopiren secara intraperitoneal (kelompok 2) adalah 0,000 ; min 0,0 ; dan max 1,0. Nilai median pada kelompok yang diinduksi benzopiren secara oral lebih besar dibandingkan dengan kelompok yang diinduksi benzopiren secara intraperitoneal.

Preparat Paru Hewan Uji



Sebelum dilanjutkan ke tahap uji statistik terlebih dahulu dilakukan uji normalitas. Uji normalitas merupakan pengujian tentang kenormalan distribusi data. Untuk mengetahui apakah data yang kita miliki normal atau tidak, kita menggunakan uji Shapiro Wilk, menggunakan Shapiro Wilk karna sampel yang digunakan < 50.

Hasil dari uji saphiro wilk pada kedua perlakuan diperoleh nilai signifikansi pada kelompok oral sebesar 0,001 dan pada kelompok intraperitoneal sebesar 0,000. Nilai signifikansi kelompok oral dan kelompok intraperitoneal < 0,05 yang artinya data pada kelompok

pemberian oral dan kelompok pemberian intraperitoneal tidak terdistribusi normal (Lampiran 6) .

Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui apakah objek yang diteliti mempunyai varian yang sama atau tidak. Pada penelitian ini uji homogenitas dilakukan dengan bantuan program SPSS (*Statistical Package for Social Science*) versi 25.

Uji levene lebih dianjurkan sebab uji tersebut dapat digunakan untuk menguji homogenitas varians pada data yang tidak berdistribusi normal. Nilai uji *Levene's Test* ditunjukkan pada nilai based on mean, yaitu dengan nilai Sig (*P value*) $0,004 < 0,05$ yang artinya ekspresi caspase 3 pada perlakuan induksi oral dan perlakuan induksi intraperitoneal tidak memiliki varian yang sama (Lampiran 9). Berdasarkan hasil di atas maka data akan diolah lebih lanjut dengan uji statistik non parametrik (uji *Mann Withney*) karna data tidak terdistribusi normal. Uji hipotesis ini dilakukan menggunakan bantuan SPSS Statistics 25.

Hasil analisis uji *Mann Withney* terhadap kelompok oral dan kelompok intraperitoneal menghasilkan nilai probabilitas (sig) $< 0,05$ ($0,001 < 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan ekspresi caspase 3 secara signifikan pada tikus SD yang diinduksi dengan benzopiren secara oral dan intraperitoneal (Lampiran 11). Dalam penelitian ini, digunakan senyawa karsinogenik golongan *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) yaitu benzopiren. Benzopiren merupakan senyawa PAH yang terbentuk dari proses pembakaran yang tidak sempurna. Benzopiren dapat dijumpai pada asap rokok, asap kendaraan, limbah industri bahkan pada produk makanan (Donauer *et al.*, 2012). Pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya banyak yang membuktikan bahwa benzopiren merupakan senyawa karsinogenik golongan PAH yang dapat menyebabkan kanker pada manusia karna sifat karsinogennya.

Benzopiren menghasilkan metabolit genotoksik yang reaktif serta bersifat karsinogenik yaitu *benzopyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide* (BPDE). BPDE dapat mengikat makromolekul nukleofilik seperti protein dan DNA dan menyebabkan mutasi (Donauer *et al.*, 2012). Apabila BPDE berikatan dengan DNA dapat menyebabkan kerusakan DNA. Jika kerusakan DNA terjadi dapat menyebabkan terjadinya penurunan ekspresi caspase 3. Ekspresi caspase 3 turun disebabkan oleh menurunnya ekspresi Bcl-2 yang mengakibatkan membran mitokondria tetap tertutup sehingga sitokrom c tidak dapat keluar ke sitoplasma. Apabila sitokrom c tidak dapat keluar ke sitoplasma maka tidak dapat berikatan dengan Apaf-1 membentuk *Caspase Recruitment Domain (CARD)*. Dimana CARD tersebut dapat bergabung dengan kompleks apoptosom mengaktifasi pro-caspase 9 menjadi caspase 9. Jika caspase 9 tidak teraktivasi maka caspase 3 pun tidak teraktivasi sehingga kemampuan sel untuk apoptosis pun menurun (Hidayat *et al.*, 2011; Sari, n.d.).

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian benzopiren secara oral dan intraperitoneal mempengaruhi ekspresi caspase 3 pada paru tikus *Sprague Dawley*. Ekspresi caspase 3 pada perlakuan oral jika dibandingkan dengan perlakuan intraperitoneal diperoleh *P value* 0,001 ($<0,05$) yang artinya terdapat perbedaan ekspresi caspase 3 antara perlakuan induksi oral dan perlakuan induksi intraperitoneal.

Secara teoritis ekspresi caspase 3 akan menurun setelah diberikan induksi benzopiren. Pada penelitian ini pemberian benzopiren dibandingkan dengan kelompok kontrol mengalami peningkatan ekspresi caspase 3 yang signifikan, hal ini dapat disebabkan oleh waktu induksi benzopiren yang cukup singkat sehingga ekspresi caspase 3 pada kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok oral.

Benzopiren yang diberikan secara intraperitoneal lebih unggul dibandingkan dengan benzopiren yang diberikan secara peroral (Stoner et al., 1984). Sehingga berdasarkan jalur pemberiannya pada kelompok yang diinduksi benzopiren secara oral memiliki ekspresi lebih besar dibandingkan dengan kelompok yang diinduksi benzopiren secara intraperitoneal.

Rute administrasi benzopiren secara intraperitoneal akan mengalami fase metabolisme yang lebih cepat dan akan menghasilkan metabolit yang lebih banyak dibandingkan dengan rute administrasi benzopiren secara peroral. Hal ini ditunjukkan dari nilai rata-rata persentase ekspresi caspase 3 pada kelompok yang diinduksi benzopiren secara intraperitoneal memiliki ekspresi yang lebih rendah dibandingkan dengan rata-rata persentase ekspresi caspase 3 pada kelompok yang diinduksi benzopiren secara peroral.

Hal ini dapat terjadi dikarenakan benzopiren yang diberikan secara oral akan larut di dalam cairan saluran pencernaan. Benzopiren yang terlarut akan terabsorpsi secara normal dalam duodenal dari susu halus dan ditranspor melalui pembuluh kapiler mesenterika menuju vena porta hepatica menuju hati sebelum ke sirkulasi sistemik. Sedangkan benzopiren yang diberikan secara intraperitoneal disuntikkan langsung ke dinding otot peritoneum (Rahayu & Solihat, 2018).

Berdasarkan hasil perhitungan ekspresi caspase 3 pada preparat jaringan paru hewan uji dari masing – masing kelompok dapat disimpulkan bahwa induksi benzopiren secara intraperitoneal lebih banyak menghasilkan senyawa metabolit reaktif benzopiren yaitu *benzo(a)opyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide* (BPDE) dibandingkan dengan induksi benzopiren secara oral sehingga menyebabkan terjadinya penurunan ekspresi caspase 3.

BAB IV

KARAKTERISTIK, AKTIFITAS DAN EKSPRESI GEN P53

A. Pendahuluan

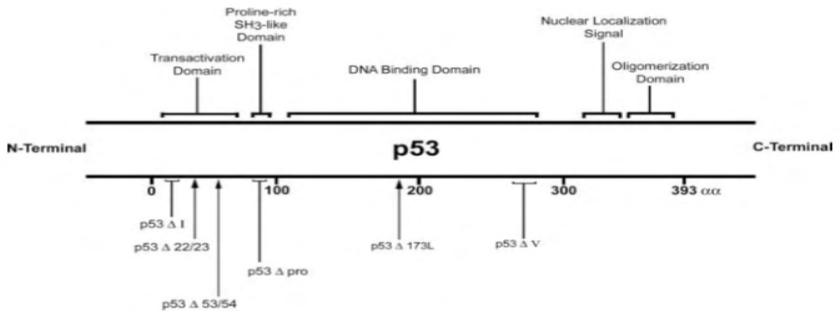
Pada penelitian (Ali *et al.*, 2016) benzopiren dalam pelarut minyak jagung yang diinduksikan pada tikus wistar dengan dosis 50 mg/kgBB secara intraperitoneal terbukti menyebabkan penurunan SOD dan peningkatan ekspresi gen p53 pada jaringan paru tikus. Peningkatan ekspresi gen p53 terjadi pada saat sel mengalami kerusakan DNA, hipoksia, stres oksidatif maupun onkogen yang disebabkan oleh paparan dari benzopiren yang merupakan senyawa karsinogen (Arora *et al.*, 2004; Melnikova dan Ananthaswamy, 2006).

B. Karakteristik dan Aktivitas Biologis Gen p53

p53 pertama kali ditentukan pada tahun 1979 dan penurunan kadar *p53* pertama kali dilaporkan pada tahun 1989. *p53* adalah protein utama yang berperan untuk modulasi transkripsi gen, mengatur siklus sel, mengaktifkan apoptosis dan mempertahankan stabilitas genomik (Syarifudin, 2012). *Tumor suppressor protein* adalah protein yang berfungsi sebagai faktor pengendali dalam proses pertumbuhan sel.

pRB dan *wild p53* termasuk dalam bagian *tumor suppressor protein* (Mendelsohn *et al.*, 2008).

a) *Wild p53*



Gambar 3. Representasi skematik struktur p53 (Cregan *et al.*, 2004)

Wild p53 terletak pada kromosom 17 lengan pendek (p) dan 11 ekson. Berat molekul (BM) dari *wild p53* sebesar 53 kDa. *Wild p53* memiliki 3 domain struktural yang diekspresikan di semua jaringan di dalam tubuh. *Wild p53* memiliki 3 bagian struktur yaitu daerah N terminal, daerah *DNA binding spesifik* dan daerah C-terminal. Bagian-bagian tersebut memiliki fungsi yang berbeda yaitu (Cotran *et al.*, 2005) :

(1) N terminal

Daerah N terminal trans-aktivasi merupakan daerah yang bertanggung jawab atas pengaturan stabilitas dari *wild p53* intrasel. Trans-aktivasi *wild p53* sendiri dapat dihambat dengan adanya ikatan MDM2 (*Murine Double Minute 2*).

(2) *DNA binding spesifik*

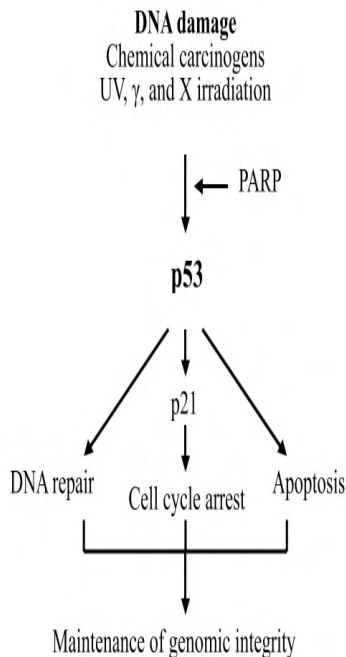
Daerah *DNA binding spesifik* merupakan tempat spesifik dimana *wild p53* dapat menempel sehingga akan menghambat terjadinya proses transkripsi.

(3) C-terminal

Daerah C-terminal memiliki fungsi sebagai tempat menempelnya *wild p53* pada rantai tunggal DNA. Pada proses reparasi/perbaikan DNA dan *Bax* pada apoptosis, GADD45 akan teraktivasi oleh *wild p53* akibat menempelnya *wild p53* pada rantai tunggal DNA.

b) Fungsi *wild p53*

Wild p53 merupakan *tumor suppressor gene* yang bekerja di dalam inti sel. Fungsi dari *wild p53* yaitu mengendalikan CDK pada siklus pembelahan sel. Selain berperan dalam siklus pembelahan sel, *wild p53* juga berperan merusak sel yang abnormal dalam pengaturan proses apoptosis (kematian sel) (Mendelsohn *et al.*, 2008).



Gambar 4. Jalur p53 (Serpi, 2003)

Dalam proses apoptosis, *wild p53* akan mengaktivasi *Bax* serta menghambat aktivitas dari gen-gen apoptosis seperti *Bcl-2* dan *Bcl-xl*. DNA yang mengalami kesalahan maupun mengalami kerusakan akan diperbaiki oleh *wild p53* dengan cara menghentikan siklus sel pada fase G1 serta memicu transkripsi *p21*. Namun jika melalui proses tersebut perbaikan DNA kurang sempurna maka akan berlanjut ke proses apoptosis (Kresno, 2011).

c) Aktivasi *wild p53*

Aktivasi *wild p53* terjadi pada saat sel mengalami kerusakan DNA, hipoksia, stres oksidatif maupun onkogen. Terdapat tiga jalur penting dalam aktivasi gen p53 antara lain (Melnikova dan Ananthaswamy, 2006) :

(1) Mengaktivasi perbaikan DNA yang rusak

Pada keadaan normal, p53 dalam keadaan tidak aktif dan terikat pada protein *Murine Double Minute* (MDM2) atau protein *Human Double Minute* (HDM2) yang mencegah aktivasi p53. Saat terjadi induksi oleh zat karsinogen yang dapat menyebabkan kerusakan DNA, maka beberapa protein seperti *Ataxia-Telangiectasia-Mutated* (ATM), *Checkpoint Kinase 1* (CHK1) dan CHK2 akan menyebabkan terjadinya fosforilasi p53 sehingga p53 menjadi aktif. Setelah p53 teraktivasi, p53 akan memperbaiki sel yang rusak serta dapat mengaktifkan proses apoptosis.

(2) Menahan siklus sel pada titik *G1/S regulation point* saat terjadi kerusakan DNA

Gen p53 memiliki fungsi mencegah proliferasi sel yang tidak terkendali. Apabila terbentuk sel yang abnormal selama

proses pembelahan sel secara kontinyu, maka sel akan masuk dan ditahan pada siklus G1 sehingga sel abnormal tersebut dapat dihancurkan.

- (3) Mengontrol proses apoptosis, jika kerusakan DNA tidak lagi dapat diperbaiki

Proses apoptosis dapat mematikan sel-sel yang abnormal. Sehingga sel-sel tersebut tidak dapat bereplikasi. Namun apabila p53 mengalami mutasi, maka fungsi apoptosis dari p53 akan hilang sehingga p53 tidak memiliki kemampuan untuk memastikan sel-sel abnormal telah hancur dan tidak lagi membelah.

d) Inaktivasi *wild p53*

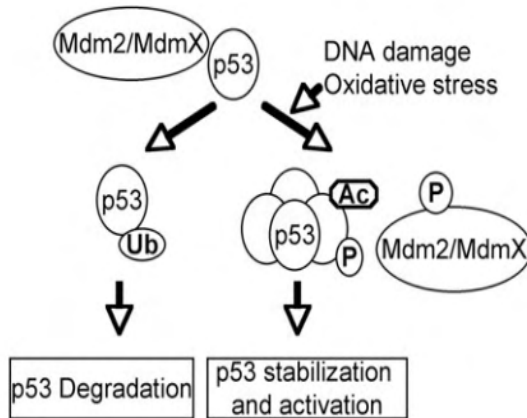
Terdapat 2 mekanisme inaktivasi gen *p53* pada tumor paru yaitu (Smith dan Jr, 1996) :

- (1) DNA *binding domain* mengalami mutasi perubahan asam amino

Efek inaktivasi *p53* pada mekanisme ini mengakibatkan *p53* terhalang dari *binding* pada deret DNA spesifik dan akan mengaktifkan gen-gen didekatnya.

- (2) Delesi gen *p14*

Pada mekanisme inaktivasi *p53* dengan adanya delesi pada gen *p14* ini mengakibatkan kegagalan menghambat MDM2 dan menahan degradasi *p53* tetap terkendali.



Gambar 5. Mekanisme inaktivasi gen p53 (Hui et al., 2004)

Wild p53 yang mengalami inaktivasi atau biasa disebut dengan mutasi gen *p53* dapat menyebabkan hilangnya kemampuan protein *wild p53*. Hilangnya kemampuan protein *wild p53* ini dapat mempengaruhi terjadinya proses proliferasi maupun proses apoptosis. Aktivitas dari *wild p53* ini dapat diinaktivasi oleh MDM2 (*Murine Double Minute 2*) (Hui et al., 2004).

MDM2 (*Murine Double Minute 2*) merupakan inhibitor potensial *p53* yang bekerja dengan cara mengikat domain aktivasi dari *p53* serta dapat menghambat fungsi *p53* yaitu dalam proses pengaturan gen serta proses proliferasi (Reles, 2001).

MDM2 dapat berikatan dengan N-terminal dari *wild p53* sehingga menyebabkan *wild p53* dapat dikeluarkan dari nukleus (inti sel) ke sitoplasma karena MDM2 yang mengikat N-terminal *wild p53* membuat *wild p53* menjadi tidak stabil. *Wild p53* yang telah dikeluarkan dari inti sel ke sitoplasma akan menyebabkan penekanan aktivitas dari *wild p53* yang kemudian menyebabkan terdegradasinya *wild p53* yang diperantai *proteosome* (Hui et al., 2004).

C. Penelitian terdahulu

Induksi benzopiren dengan secara peroral pada tikus dapat meningkatkan respon tumor yang diamati pada jaringan limfoid dan hematopoetik termasuk pada paru-paru (Estensen *et al.*, 2004). Tikus Swiss Albino yang diinduksi benzopiren secara intraperitoneal dengan dosis 100 mg/kgBB menggunakan pelarut minyak jagung menunjukkan terjadinya peningkatan Bcl-2 dan penurunan p53 pada CYP1A1 pada jaringan paru (Hussein *et al.*, 2016).

Dari hasil sebuah penelitian yang berjudul Mechanism of oral carcinogenesis induced by dibenzo[*a,l*]pyrene: An environmental pollutant and a tobacco smoke constituent menunjukkan bahwa pada lidah dan jaringan oral lainnya, ekspresi protein p53 dan COX-2 menurun dengan adanya induksi dibenzo[*a,l*]pyrene (Chen *et al.*, 2013).

D. Ekspresi gen p53 berdasarkan metode induksi benzopiren

Penelitian ini merupakan uji *preliminary* atau uji pendahuluan yang bertujuan untuk mendapatkan model atau cara penginduksian yang tepat berdasarkan prosedur penelitian sebelumnya untuk melihat terjadinya stres oksidatif yang akan mempengaruhi dari ekspresi gen p53 dari jaringan paru tikus *Sprague Dawley*. Pada penelitian (Sehgal *et al.*, 2011) dosis benzopiren sebesar 125 mg/kgBB diberikan sebagai dosis tunggal dan diinduksikan secara peroral pada mencit *Swiss albino* berumur 6-8 minggu yang kemudian hewan uji akan dikorbankan dan organ paru hewan uji tersebut akan diambil 24 jam pasca perlakuan. Dari hasil penelitian tersebut organ paru hewan uji menunjukkan terjadinya penurunan kadar *Superoxide Dismutase* (SOD) yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol yang hanya diberi perlakuan minyak jagung saja. Pada penelitian

(Ali *et al.*, 2016) dengan menggunakan tikus *Wistar* berumur 8-10 minggu, penurunan kadar SOD juga terjadi pada jaringan paru kelompok hewan uji yang mendapatkan induksi benzopiren pada hari ke-7 secara intraperitoneal dengan dosis tunggal sebesar 50 mg/kgBB. Kadar SOD pada kelompok ini menunjukkan hasil penurunan yang signifikan jika dibandingkan pada kelompok kontrol yang diberi perlakuan minyak jagung pada hari ke-7.

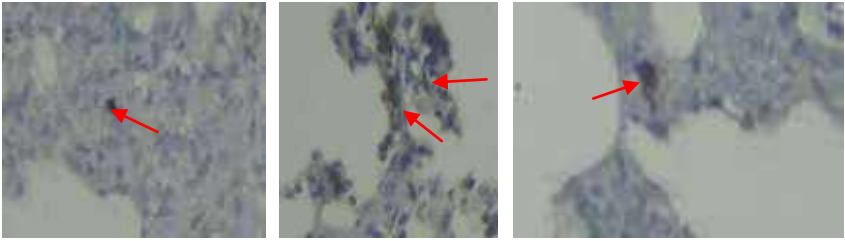
Benzopiren merupakan senyawa prokarsinogen yang dapat dimetabolisme di dalam tubuh untuk diubah menjadi senyawa karsinogen melalui aktivasi metabolik fase 1. Dalam aktivasi metabolik fase 1, benzopiren dioksidasi oleh enzim CYP 450 1A1 yang ada di hepar dan banyak diekspresikan di jaringan ekstrahepatik yaitu seperti paru, ginjal, mukosa saluran cerna, plasenta, limfosit dan kulit (Gil *et al.*, 2012; Fudholi *et al.*, 2017). Induksi benzopiren dapat menyebabkan terjadinya peningkatan *Lipid peroxidation* (LPO) akibat produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) meningkat atau dengan menurunkan aktivitas enzim antioksidan yang dapat menyebabkan kerusakan sel (Emre *et al.*, 2007). SOD merupakan salah satu enzim antioksidan intrasel yang berada pada bagian inti sel dan sitoplasma (Yunarsa dan Adiatmika, 2018). Penurunan kadar SOD ini membuktikan tingginya stres oksidatif yang terjadi sehingga radikal bebas (oksidan) tidak dapat dieliminasi dari dalam tubuh. Ekspresi gen *p53* yang memiliki peran sebagai *tumor suppressor gene* kemungkinan akan menurun atau mengalami mutasi akibat terjadinya stres oksidatif (Akrom, 2012; Winarsi *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2017)

Pada penelitian ini jaringan paru dipilih untuk diamati ekspresi gen *p53 wild type*. Organ paru merupakan salah satu organ tubuh yang memiliki laju aliran darah (perfusi) yang baik, sehingga di dalam organ tersebut xenobiotika akan sangat cepat terdistribusi secara homogen (Weiss, 1990). Benzopiren yang diinduksikan secara

intraperitoneal disuntikkan ke bagian rongga peritoneum, yang mana pada bagian tersebut terdapat banyak pembuluh darah. Banyaknya pembuluh darah pada bagian tersebut menyebabkan terabsorpsinya benzopiren langsung ke sirkulasi porta dan langsung dimetabolisme oleh hati (Wirasuta, 2006). Sedangkan pada induksi benzopiren secara oral, benzopiren terlebih dahulu harus melewati lambung serta usus sebelum masuk ke sirkulasi darah. Benzopiren yang diinduksi secara oral dapat didetoksifikasi secara efisien oleh enzim CYP 1A1 yang berada di dalam sel epitel saluran gastrointestinal (Nebert *et al.*, 2013).

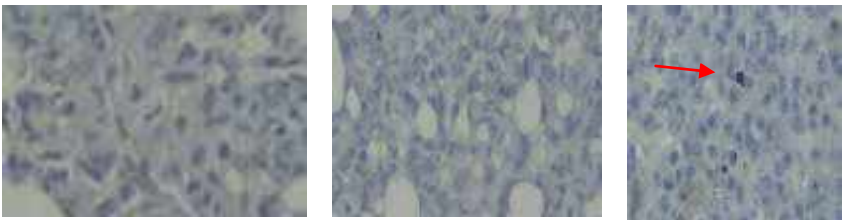
Hewan uji yang telah diinduksi kemudian dikorbankan dan diambil organ parunya. Organ paru yang diambil kemudian dipotong secara melintang yang selanjutnya dibuat menjadi blok parafin untuk persiapan pembuatan preparat jaringan paru untuk prosedur pengecatan imunohistokimia p53 *wild type*. Prosedur pembuatan preparat dan pengecatan imunohistokimia p53 *wild type* pada penelitian ini dilakukan sesuai dengan prosedur tetap yang ada di bagian Patologi Anatomi FK-KMK UGM. Pengecatan imunohistokimia merupakan metode pewarnaan dengan menggunakan prinsip perpaduan antara reaksi imunologi dan reaksi kimiawi. Reaksi imunologi yaitu reaksi antara antigen dan antibodi sedangkan reaksi kimiawi yaitu reaksi antara enzim dengan substrat (Setijanto, 2002).

Hasil pengecatan imunohistokimia pada preparat jaringan paru ditunjukkan dengan perubahan warna pada inti sel. Inti sel yang mengekspresikan p53 *wild type* secara positif ditunjukkan dengan inti sel yang berwarna coklat sedangkan untuk sel yang negatif atau tidak mengekspresikan p53 *wild type*, inti sel akan berwarna biru. Gambaran perubahan ekspresi gen p53 disajikan pada gambar 1 dan data persentase ekspresi gen p53 *wild type* terdapat pada gambar 8 dan 9.



Gambar 8. Gambaran mikroskopis jaringan paru tikus kelompok I

Keterangan : Foto mikroskopis ekspresi gen *p53 wild type* dengan imunohistokimia *indirect methode* dengan perbesaran 400x. Jaringan paru tikus kelompok I yang diinduksi benzopiren secara oral dengan dosis 125 mg/kgBB. Tanda panah menunjukkan sel yang mengekspresikan gen *p53 wild type*.



Gambar 9. Gambaran mikroskopis jaringan paru tikus kelompok II

Keterangan : Foto mikroskopis ekspresi gen *p53 wild type* dengan menggunakan pengecatan imunohistokimia *indirect methode* dengan perbesaran 400x. Jaringan paru tikus kelompok II yang diinduksi benzopiren secara intraperitoneal dengan dosis 50 mg/kgBB. Tanda panah menunjukkan sel yang mengekspresikan gen *p53 wild type*.

Hasil ekspresi gen p53 *wild type* pada kelompok II yaitu kelompok yang mendapatkan induksi benzopiren secara intraperitoneal dengan dosis 50 mg/kgBB seperti disajikan pada gambar 1, terlihat bahwa terdapat 2 hewan uji dalam kelompok tersebut yang tidak terdapat satupun sel yang terpulas positif. Sedangkan untuk ekspresi gen p53 *wild type* pada kelompok I yang mendapatkan induksi benzopiren secara peroral dengan dosis 125 mg/kgBB pada ketiga hewan uji, masing-masing jaringan paru terdapat sebagian kecil sel yang terpulas positif. Terbentuknya warna coklat pada inti sel ini merupakan hasil interaksi dari ikatan antigen (bahan aktif) yaitu gen p53 yang terdapat pada preparat jaringan paru dengan antibodi primer (antibodi monoklonal anti-p53) dan antibodi sekunder (*conjugated to horse radish peroxidase / HRP enzim*) serta *substrate diamino benzidine (DAB)*. *3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)* merupakan kromogen yang digunakan dalam penelitian ini yang menghasilkan produk akhir berwarna serta tidak dapat terlarut karena terjadinya reaksi antara hidrogen peroksida yang terkandung di dalam DAB dengan enzim HRP (*Horse Radish Peroxidase*). Molekul *3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)* yang teroksidasi akan mengendap dan membentuk massa berwarna coklat gelap (Setijanto, 2002).

Perbedaan Perubahan Ekspresi Gen p53 Berdasarkan Rute Induksi Oral dan Intraperitoneal

Berdasarkan dari hasil pengamatan secara mikroskopis ekspresi gen p53 *wild type*, dilakukan perhitungan persentase ekspresi gen p53 *wild type pada* jaringan paru yang diamati pada lima lapang pandang yang berbeda. Teknik penghitungannya dilakukan dengan menghitung satu persatu sel secara keseluruhan. Sel yang mengekspresikan gen p53 *wild type* kemudian dirata-rata dan dilakukan analisis statistik

menggunakan *software SPSS 16.0*. Berdasarkan hasil rata-rata persentase ekspresi p53 seperti disajikan pada lampiran 5, rata-rata persentase ekspresi p53 pada kelompok I dengan induksi benzopiren secara oral diperoleh sebesar $1,600 \pm 3,104\%$. Pada kelompok II dengan perlakuan induksi benzopiren secara intraperitoneal diperoleh rata-rata persentase ekspresi p53 sebesar $5,33 \times 10^{-2} \pm 0,112\%$. Pada kelompok I yang diberikan induksi benzopiren secara peoral memiliki rata-rata persentase ekspresi p53 yang diperoleh lebih tinggi jika dibandingkan dengan rata-rata ekspresi p53 pada kelompok II yang diberi induksi benzopiren secara intraperitoneal.

Tabel III. Ekspresi p53 berdasarkan perbedaan metode induksi benzopyrene pada tikus SD

Kelompok	Rata-rata per kelompok (%) \pm SE	Rata-rata per kelompok (%) \pm SD
Kontrol	$2,071 \times 10^{-9} \pm 5,14 \times 10^{-10}$	-
Oral	$1,600 \pm 8,0155 \times 10^{-1}$	$1,600 \pm 3,104\%$
Intraperitoneal	$5,33 \times 10^{-2} \pm 2,906 \times 10^{-2}$	$5,33 \times 10^{-2} \pm 0,112\%$.

Data rata-rata persentase ekspresi gen p53 yang diperoleh dari perlakuan induksi peroral dan intraperitoneal pada penelitian ini dibandingkan dengan data kontrol untuk mengetahui ekspresi gen p53 yang diperoleh menurun atau meningkat dari keadaan normalnya. Pada penelitian (Hussein *et. al.*, 2016) kelompok kontrol merupakan kelompok yang tidak mendapatkan induksi benzopiren dan hanya diberi minyak jagung. Pada kelompok kontrol dengan menggunakan mencit *Swiss albino* ini diperoleh hasil ekspresi *p53 wild type* pada jaringan paru menunjukkan rata-rata persentase ekspresi p53 sebesar $2,071 \times 10^{-9} \%$. Dari data kelompok kontrol tersebut menunjukkan hasil ekspresi gen p53 yang lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok yang mendapatkan perlakuan induksi benzopiren secara oral maupun intraperitoneal pada penelitian ini. Hal ini menunjukkan bahwa dalam keadaan normal atau tidak terpapar oleh zat karsinogen maupun radikal bebas lainnya, p53 tidak aktif sehingga ekspresi gen p53 rendah (Prakoewa, 2008). Data persentase ekspresi gen p53 ini dapat dilihat pada lampiran 5. Selain itu, pada penelitian (Hussein *et.al.*, 2016) juga melakukan perlakuan induksi benzopiren pada hewan uji dengan dosis tunggal sebesar 100 mg/kgBB dengan rute pemberian secara intraperitoneal dan diperoleh hasil ekspresi gen p53 sebesar $1,0296 \times 10^{-8} \%$. Hasil ini juga menunjukkan bahwa ekspresi gen p53 pada kelompok dengan induksi benzopiren lebih besar dibanding dengan kelompok kontrol.

Peningkatan ekspresi gen p53 setelah diberikan induksi benzopiren ini dapat terjadi akibat gen p53 teraktivasi oleh adanya peristiwa stres sel antara lain kerusakan DNA, hipoksia, stres oksidatif maupun onkogen sehingga menginduksi mediator *upstream* seperti MDM2. Aktivasi gen p53 ini bertujuan untuk memperbaiki kerusakan DNA yang terjadi dan untuk mengontrol proses apoptosis apabila kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki. Namun proses

apoptosis ini tidak akan terjadi apabila gen p53 mengalami mutasi (Melnikova dan Ananthaswamy, 2006).

Setelah mendapatkan hasil persentase ekspresi gen p53 kemudian dilakukan uji normalitas yang bertujuan untuk mengetahui data yang diperoleh berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas yang digunakan dalam penelitian ini yaitu uji normalitas *Shapiro Wilk* menggunakan program *SPSS 16.0 for Windows*. Pada uji normalitas *Shapiro Wilk* jika signifikansi $<0,05$ maka terdapat perbedaan yang signifikan dan data berdistribusi tidak normal, dan jika signifikansi $>0,05$ maka data tersebut tidak terdapat perbedaan yang signifikan dan data yang diuji berdistribusi normal (Hidayat, 2013). Dari hasil uji normalitas seperti disajikan pada lampiran 6, didapatkan signifikansi sebesar 0,000 yang artinya $<0,05$. Maka data tersebut tidak berdistribusi normal sehingga untuk uji perbedaan rata-rata (uji komparatif) akan digunakan uji non parametrik yaitu uji *Mann Whitney*.

Sebelum dilakukan uji komparatif menggunakan uji *Mann Whitney*, perlu dilakukan uji kesamaan varian (homogenitas) terlebih dahulu dengan menggunakan F tes (*Levene's Test for F*). Uji homogenitas ini diperlukan untuk melihat kedua varian sama atau tidak dilihat dari nilai *P value*. Jika nilai *P value* $<0,05$ kedua varian berbeda, namun jika *P value* $>0,05$ maka kedua varian sama. Berikut ini merupakan hasil uji homogenitas yang disajikan pada lampiran 7. Dari hasil uji homogenitas tersebut didapatkan nilai *P value* $<0,05$ yang artinya pada data ekspresi p53 *wild type* antara perlakuan induksi secara peroral dengan perlakuan induksi secara intraperitoneal memiliki varian yang berbeda (tidak homogen).

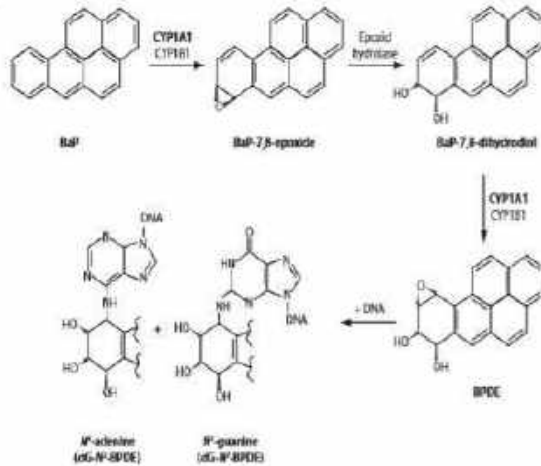
Berdasarkan data dari uji normalitas yang menunjukkan data tidak berdistribusi normal dan data homogenitas yang menunjukkan data tidak homogen, maka untuk uji perbedaan rata-rata (uji komparatif)

menggunakan uji non parametrik *Mann Whitney*. Pada hasil uji *Mann Whitney U* diperoleh nilai Asymp. Sig sebesar 0,017 atau $<0,05$ maka H_0 ditolak dan H_1 diterima. Sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata ekspresi p53 *wild type* yang signifikan antara kelompok perlakuan induksi benzopiren secara peroral dengan kelompok perlakuan induksi benzopiren secara intraperitoneal.

Pada induksi dengan rute pemberian secara intraperitoneal, benzopiren akan mengalami fase metabolisme yang lebih cepat dan menghasilkan metabolit yang lebih banyak dibandingkan dengan induksi secara oral. Hal ini disebabkan oleh perbedaan kecepatan benzopiren untuk mencapai sirkulasi darah. Induksi benzopiren secara intraperitoneal akan lebih cepat untuk mencapai ke sirkulasi darah untuk selanjutnya didistribusikan dan dimetabolisme di hati karena pada rute induksi intraperitoneal ini, benzopiren akan disuntikkan ke rongga peritoneum. Pada rongga peritoneum banyak terdapat pembuluh darah sehingga membantu benzopiren untuk cepat terabsorpsi ke sirkulasi darah dan terdistribusi hampir ke seluruh organ tubuh. Sedangkan benzopiren yang diinduksikan secara oral harus melalui jalur yang lebih panjang sebelum mencapai duodenum untuk diabsorpsi (Anonim, 2002; Wirasuta, 2006; Nebert *et al.*, 2013).

Benzopiren yang masuk ke tubuh akan dimetabolisme di hepar oleh enzim CYP 450 1A1. Metabolisme benzopiren oleh enzim CYP 450 1A1 terjadi akibat senyawa benzopiren yang masuk ke dalam tubuh berikatan dengan regulator transkripsi gen CYP 450 1A1 yaitu AhR yang berada di sitosol sehingga produksi enzim CYP 450 1A1 meningkat. Hasil oksidasi benzopiren oleh enzim CYP 1A1 akan membentuk molekul epoksida yaitu benzo(α)piren-7,8-epoksida. Kemudian senyawa tersebut dikatalisis oleh enzim epoksida hidrolase sehingga cincin epoksida terbuka dan membentuk senyawa benzo(α)

piren-7,8-diol. Senyawa ini kemudian bereaksi dengan enzim CYP 450 1A1 sehingga terbentuk suatu metabolit reaktif yang bersifat karsinogen yaitu benzo(α)piren-7,8-dihidrodiol-9,10-epoksida (BPDE).



Gambar 10. Jalur aktivasi metabolik BPDE merusak ikatan DNA
(Moseroová et al., 2009)

Metabolit benzopiren tersebut merupakan karsinogen ultimate yang bersifat sangat reaktif sehingga dapat masuk ke inti sel dan mampu bereaksi dengan DNA yang kemudian membentuk senyawa kompleks antara BPDE dengan DNA yaitu BPDE-DNA *adduct*. Senyawa kompleks inilah yang mampu menghambat replikasi DNA dengan cara berikatan dengan N²-deoksiganosin DNA dan menyebabkan mutasi gen, salah satunya mutasi gen p53. Akibat adanya interaksi antara metabolit reaktif dari benzopiren dengan DNA maka menyebabkan perubahan genetika yaitu mengakibatkan proliferasi sel normal yang berlebihan. Tahapan tersebut merupakan tahapan awal karsinogenesis yaitu tahap inisiasi. Semakin banyak senyawa metabolit reaktif yang terbentuk, maka fungsi dari p53 sebagai gen supresor tumor akan semakin berkurang (Boysen dan

Hecht, 2002; Moserová *et al.*, 2009). Proses inisiasi yang terjadi akibat terbentuknya metabolit reaktif dari benzopiren inilah yang menyebabkan mutasi atau inaktivasi p53 sebagai gen supresor tumor (Fischer, 2017).

Hasil pada penelitian ini dari dua kelompok perlakuan menunjukkan persentase ekspresi gen p53 yang meningkat dibandingkan dengan data kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa hasil metabolit benzopiren dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif sehingga mengaktivasi gen p53. Dari hasil penelitian ini belum menunjukkan terjadinya inaktivasi atau mutasi dari gen p53 yang disebabkan oleh hasil metabolit benzopiren. Tidak terjadinya mutasi gen p53 ini dimungkinkan terjadi akibat faktor paparan benzopiren yang tidak terlalu lama. Dan dari hasil induksi benzopiren dengan dosis 125 mg/kgBB yang diberikan secara peroral dan dosis 50 mg/kgBB yang diberikan secara intraperitoneal belum menunjukkan terbentuknya nodul pada organ paru yang diambil dari masing-masing hewan uji. Menurut penelitian (Fudholi *et al.*, 2008), nodul pada organ paru tikus terbentuk setelah 6 bulan pasca induksi dengan benzopiren.

Pada kelompok dengan perlakuan induksi benzopiren secara peroral menunjukkan hasil ekspresi gen p53 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok yang mendapat perlakuan induksi benzopiren secara intraperitoneal. Hasil ini tidak sesuai dengan hipotesis yang disimpulkan pada penelitian ini walaupun perbedaan rata-rata antara kedua kelompok perlakuan tersebut berbeda secara signifikan. Ketidakesesuaian dengan hipotesis ini dimungkinkan terjadi akibat lama waktu paparan benzopiren itu sendiri atau tidak tepat pada saat melakukan pengirisan pada organ paru untuk dibuat menjadi preparat jaringan paru. Ketidaktepatan dalam proses pengirisan ini dapat disebabkan akibat belum terlihatnya perbedaan secara fisiologi dari

organ paru itu sendiri serta belum terbentuknya nodul akibat waktu paparan yang kurang lama.

Selain itu, ekspresi gen p53 pada kelompok dengan induksi peroral yang lebih tinggi dari kelompok dengan induksi intraperitoneal dapat disebabkan akibat benzopiren yang masuk secara peroral dimetabolisme oleh enzim CYP 450 1A1 yang berada pada sel epitel saluran gastrointestinal sehingga metabolit yang terbentuk lebih banyak. Metabolit benzopiren yang banyak terbentuk akan menyebabkan produksi ROS meningkat dan penurunan SOD yang lebih rendah sehingga gen p53 lebih banyak teraktivasi pada kelompok dengan induksi secara peroral.

BAB V

PENUTUP

Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian induksi benzopiren secara intraperitoneal memberi perubahan ekspresi pada gen caspase dan p53 lebih kecil dibandingkan pemberian induksi secara oral. Metode induksi benzopiren per oral lebih direkomendasikan dalam penelitian kanker paru secara in vivo metode induksi benzopiren.

DAFTAR PUSTAKA

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2009). Case Studies in Environmental Medicine - Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). In *Course: WB 1519*.
- Aklillu, E., Ovrebo, S., Botnen, I. V., Otter, C., & Ingelman-Sundberg, M. (2005). Characterization of common CYP1B1 variants with different capacity for benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol epoxide formation from benzo[a]pyrene. *Cancer Research*.
- Ali Hussein, S., Amin, A., & Atef Khalaf, H. (2016). Caspase-3, Bcl-2, p53, CYP1A1 and COX -2 as a potential target in chemoprevention of Benzo (a) pyrene-induced lung carcinogenesis in mice: Role of thymoquinone. *International Journal of Chemical and Natural Science*.
- Ali, R., Shahid, A., Ali, N., Hasan, K. S., Majed, M., & Sultana, S. (2017). *Amelioration of Benzo[a]pyrene-induced oxidative stress and pulmonary toxicity by Naringenin in Wistar rats: A plausible role of COX-2 and NF-κB*. 36, 349–364.
- Bintari, G. I. (2016). *Deteksi Aeromonas hydrophila Pada Ginjal Mencit (Mus musculus) dengan Teknik Imunohistokimia*. Universitas Airlangga.
- Biologi, B., Kedokteran, F., Kristen, U., & Bandung, M. (n.d.). *Peran Kaspase pada Apoptosis sebagai Salah Satu Usaha dalam Kemoterapi Kanker*. 95–103.

- Bire, I. R., Bagus, I., Winaya, O., Agung, A., & Mirah, A. (2018). *Perubahan Histopatologi Hati dan Paru Mencit Pascainduksi dengan Zat Karsinogenik Benzo (a) piren. 7(November), 634–642.*
- Donauer, J., Schreck, I., Liebel, U., & Weiss, C. (2012). Role and interaction of p53, BAX and the stress-activated protein kinases p38 and JNK in benzo(a)pyrene-diolepoxide induced apoptosis in human colon carcinoma cells. *Archives of Toxicology.*
- Guo, N., Faller, D. V., & Vaziri, C. (2002). Carcinogen-induced S-phase arrest is Chk1 mediated and caffeine sensitive. *Cell Growth and Differentiation.*
- Hidayat, A., Wiradisastra, K., Herwono, B. S., & Achmad, T. H. (2011). Ekspresi Bcl-2 dan Caspase-3 Pascapaparan Hipoksia Hipobarik Intermiten Bcl-2 and Caspase-3 Expression Post Exposure of Intermittent Hypobaric Hypoxia. *Mkb*, **43**(4), 166–170.
- IARC. (2012). Chemical agents and related occupations - Volume 100 F: A review of human carcinogens. *International Agency for Research on Cancer.*
- Magesh, V., Venugopal, R., Bhavani, K. D., & Sakthisekaran, D. (2007). Effect of crocetin on Benzo (a) pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *International Journal of Cancer Research.*
- Malhotra, A., Nair, P., & Dhawan, D. K. (2014). Study to evaluate molecular mechanics behind synergistic chemo-preventive effects of curcumin and resveratrol during lung carcinogenesis. *PLoS ONE.*
- Mehdizadeh, S. (1991). Understanding cell toxicology: Principles and practice. E. Walum, K. Stenberg and D. Jenssen. Series in Biochemistry and Biotechnology. Ellis Horwood Ltd.:

- Chichester, England, 206 pages. (1990). *Cell Biochemistry and Function*.
- Moningka, M. E. W. (2019). Perkembangan Terapi Kanker Terkait Senyawa Terpeneol, P53 dan Caspase 3. *Jurnal E-Biomedik*.
- Moserová, M., Kotrbová, V., Aimová, D., Šulc, M., Frei, E., & Stiborová, M. (2009). Analysis of benzo[a]pyrene metabolites formed by rat hepatic microsomes using high pressure liquid chromatography: Optimization of the method. *Interdisciplinary Toxicology*.
- Muhartono, M., & Subeki, S. (2017). Ekspresi *Caspase-3* pada Kanker Payudara Tikus Setelah Pemberian Antikanker Brusein-A. *Global Medical & Health Communication (GMHC)*.
- Prakosa, A. G., Ratnawati, R., & Prabawati, R. K. (2017). PENGARUH ANTOSIANIN UBI UNGU (*Ipomoea batatas* L.) KULTIVAR GUNUNG KAWI TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 PADA JARINGAN OTAK TIKUS MODEL DM TIPE 2. *Majalah Kesehatan*, 4(2), 52–58.
- Rahayu, M., & Solihat, M. F. (2018). Toksikologi Klinik. In *Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatan*.
- Sagredo, C., Mollerup, S., Cole, K. J., Phillips, D. H., Uppstad, H., & Øvrebø, S. (2009). Biotransformation of benzo[a]pyrene in ahr knockout mice is dependent on time and route of exposure. *Chemical Research in Toxicology*.
- Sari, L. M. (n.d.). *Cakradonya Dent J*; 10(2): 65-70. 10(2), 65–70.
- Sattar, A., Hewer, A., Phillips, D. H., & Campbell, F. C. (1999). Metabolic proficiency and benzo[a]pyrene DNA adduct formation in APC(Min) mouse adenomas and uninvolved mucosa. *Carcinogenesis*.

- Scientific Committee on Food. (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food SCF/CS/CNTM/PAH/29 ADD1. *Annex*.
- Sehgal, A., Kumar, M., Jain, M., & Dhawan, D. K. (2012). Synergistic effects of piperine and curcumin in modulating benzo(a)pyrene induced redox imbalance in mice lungs. *Toxicology Mechanisms and Methods*.
- Selvendiran, K., Senthilnathan, P., Magesh, V., & Sakthisekaran, D. (2004). Modulatory effect of Piperine on mitochondrial antioxidant system in Benzo(a)pyrene-induced experimental lung carcinogenesis. *Phytomedicine*.
- Sissung, T. M., Price, D. K., Sparreboom, A., & Figg, W. D. (2006). Pharmacogenetics and regulation of human cytochrome P450 1B1: Implications in hormone-mediated tumor metabolism and a novel target for therapeutic intervention. In *Molecular Cancer Research*.
- Sofyan, R., Sumpena, Y., Lukita, M., & Fitrissari, A. (2011). The use of Micronucleus Assay on Swiss-Webster Mice (*Mus Musculus*) Bone Marrow for the Mutagenicity Test of γ -Irradiation. *Atom Indonesia*.
- Stoner, G. D., Greisiger, E. A., Schut, H. A. J., Pereira, M. A., Loeb, T. R., Klaunig, J. E., & Branstetter, D. G. (1984). A comparison of the lung adenoma response in strain A/J mice after intraperitoneal and oral administration of carcinogens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **72**(2), 313–323.
- Uno, S., Dalton, T. P., Derkenne, S., Curran, C. P., Miller, M. L., Shertzer, H. G., & Nebert, D. W. (2004). Oral exposure to benzo[a]pyrene in the mouse: Detoxication by inducible

cytochrome P450 is more important than metabolic activation.
Molecular Pharmacology, **65**(5), 1225–1237.

Wenzlaff, A. S., Cote, M. L., Bock, C. H., Land, S. J., Santer, S. K., Schwartz, D. R., & Schwartz, A. G. (2005). CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers: A population-based study. *Carcinogenesis*.

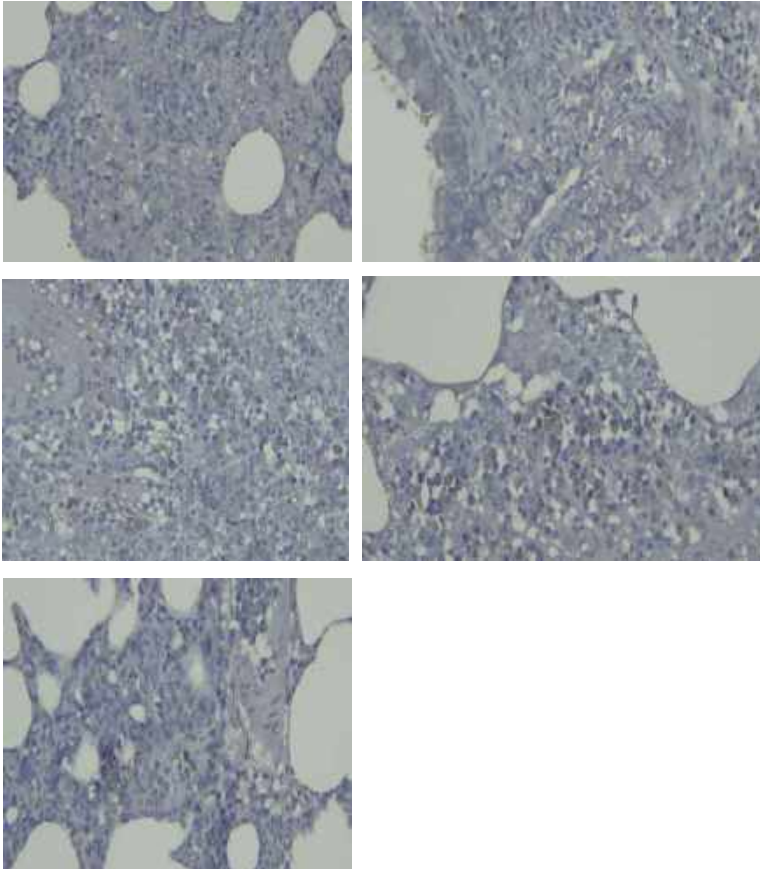
Daftar lampiran

Lampiran 1. Data Hasil Perhitungan Ekspresi Caspase 3 Mikroskopis dengan Metode Imunohistokimia

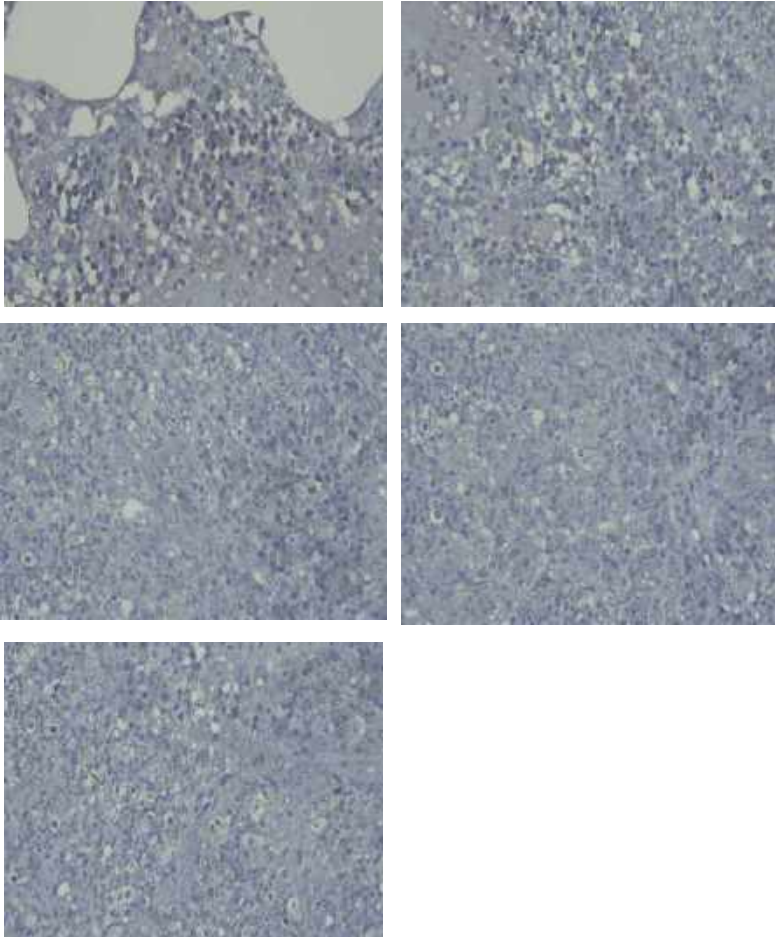
Rute Pemberian dan Kode Slide	Terpulas Negatif	Terpulas Positif	Jumlah Sel	% Ekspresi	Rata-rata 5 Lapang Pandang \pm SD
Peroral A1	156	8	164	4,9 %	1,7 % \pm 1,93
	357	6	363	1,7 %	
	276	4	280	1,4 %	
	284	1	285	0,4 %	
	302	0	302	0,0 %	
Peroral A2	675	0	675	0,0 %	0,5 % \pm 0,58
	703	3	706	0,4 %	
	651	0	651	0,0 %	
	611	7	618	1,1 %	
	167	2	169	1,2 %	
Peroral A3	456	12	468	2,6 %	2,6 % \pm 2,72
	512	4	516	0,8 %	
	632	4	636	0,6 %	
	248	5	253	2,0 %	
	356	28	384	7,3 %	
Intraperitoneal A1	558	0	558	0,0 %	0,3 % \pm 0,45
	148	0	148	0,0 %	
	198	1	199	0,5 %	
	98	1	99	1,0 %	
	68	0	68	0,0 %	
Intraperitoneal A2	761	0	761	0,0 %	0,1 % \pm 0,13
	569	0	569	0,0 %	
	331	0	331	0,0 %	
	228	1	229	0,3 %	
	241	0	241	0,0 %	
Intraperitoneal A3	753	0	753	0,0 %	0,2 % \pm 0,26
	544	1	545	0,2 %	
	324	2	326	0,6 %	
	68	0	68	0,0 %	
	45	0	45	0,0 %	

Lampiran 2. Gambaran Mikroskopis Paru-Paru tikus yang diinduksi Senyawa Benzopiren

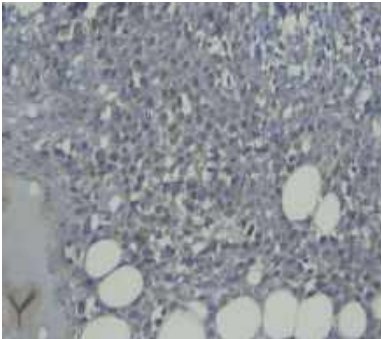
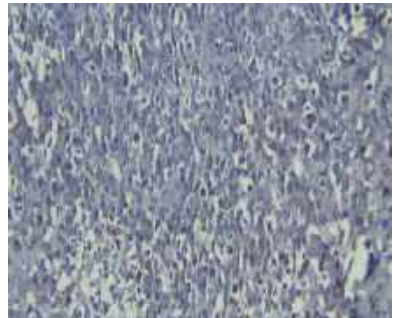
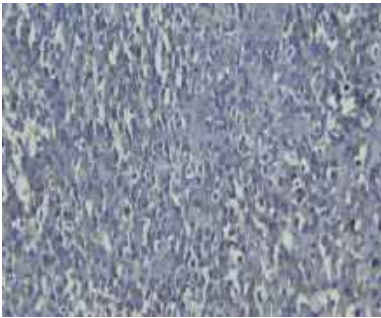
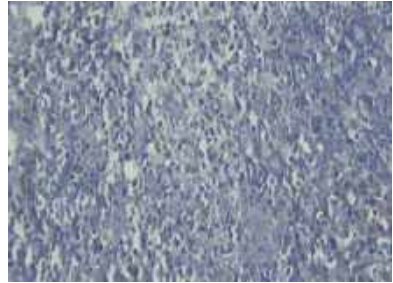
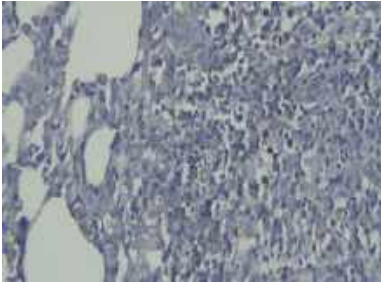
1. Perlakuan oral replikasi 1



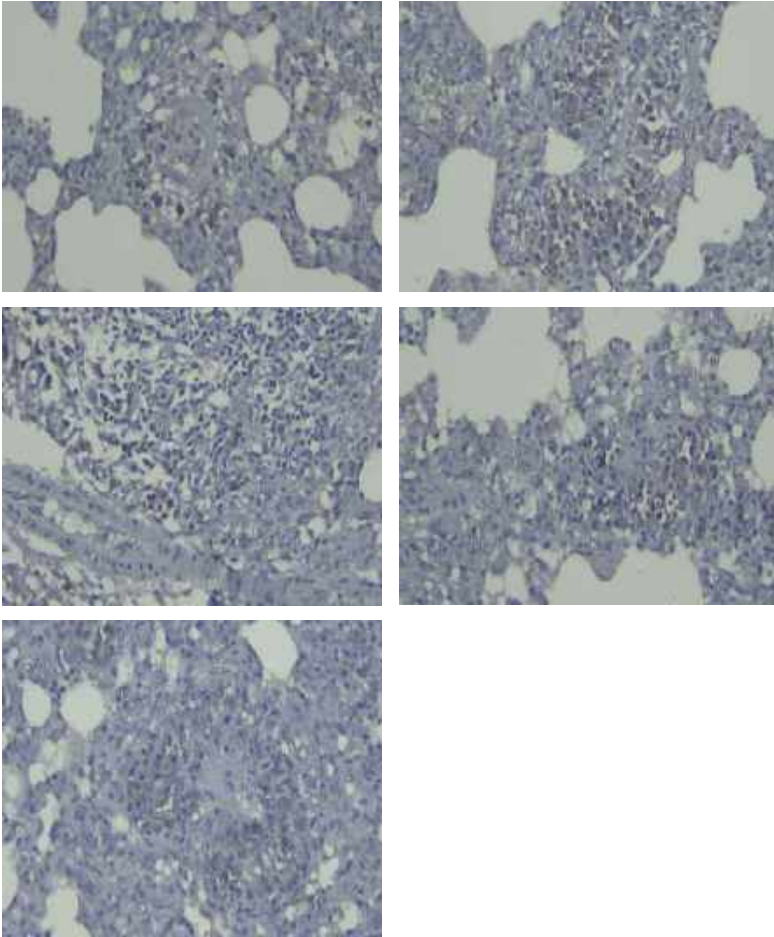
2. Perlakuan oral replikasi 3



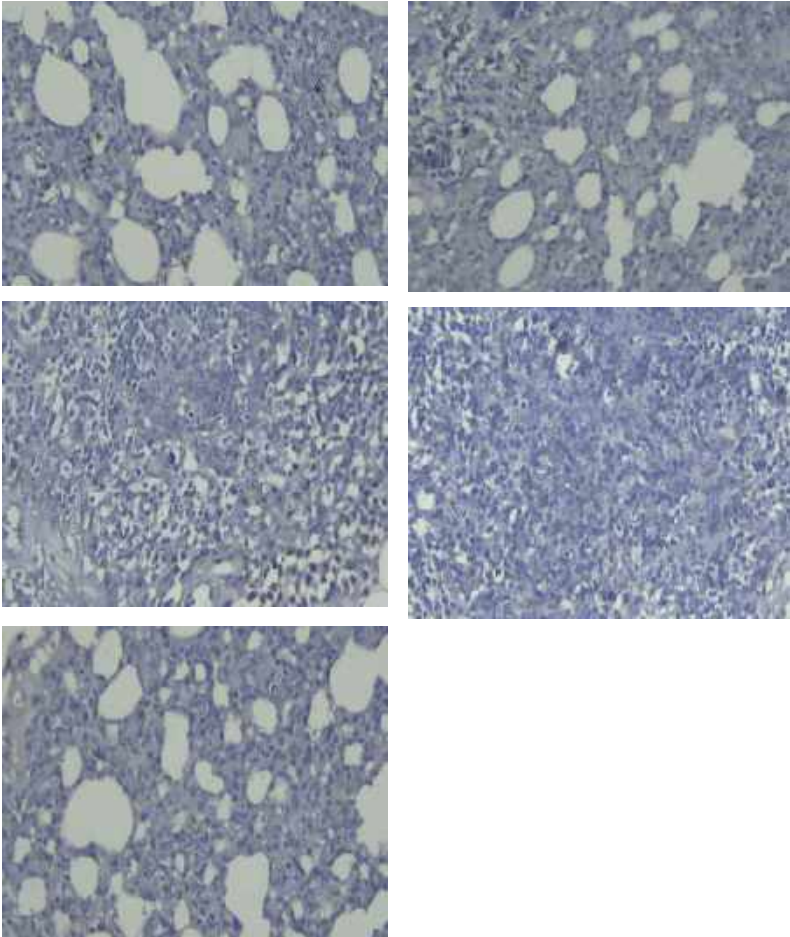
3. Perlakuan oral replikasi 4



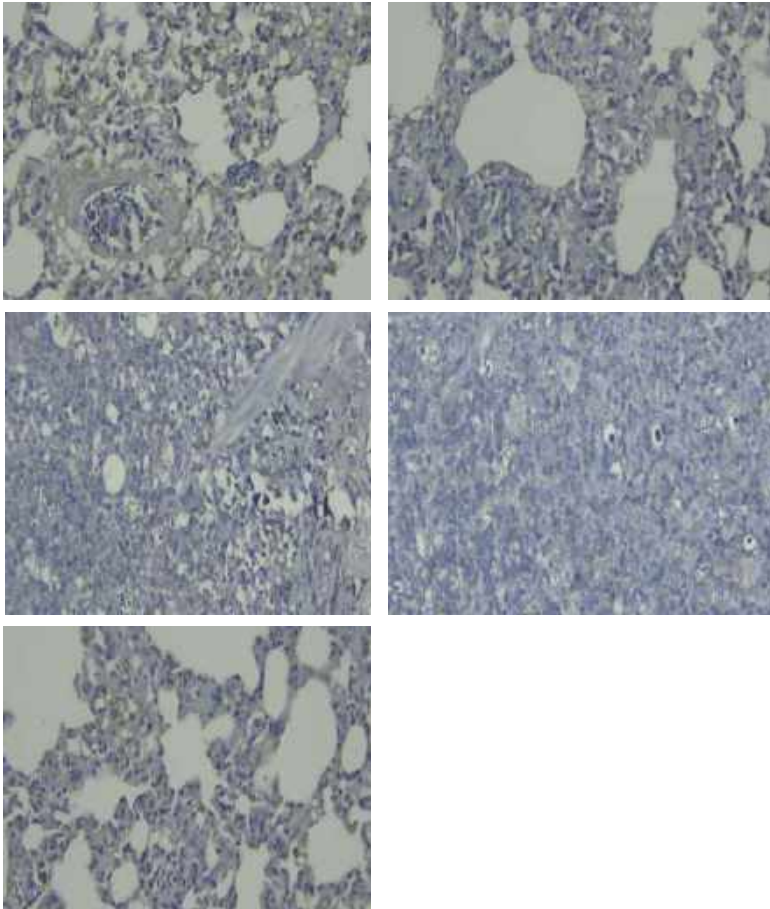
4. Perlakuan intraperitoneal replikasi 5



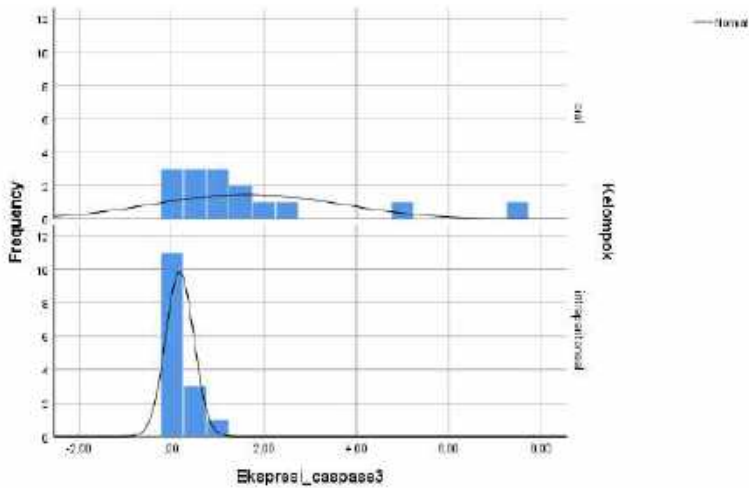
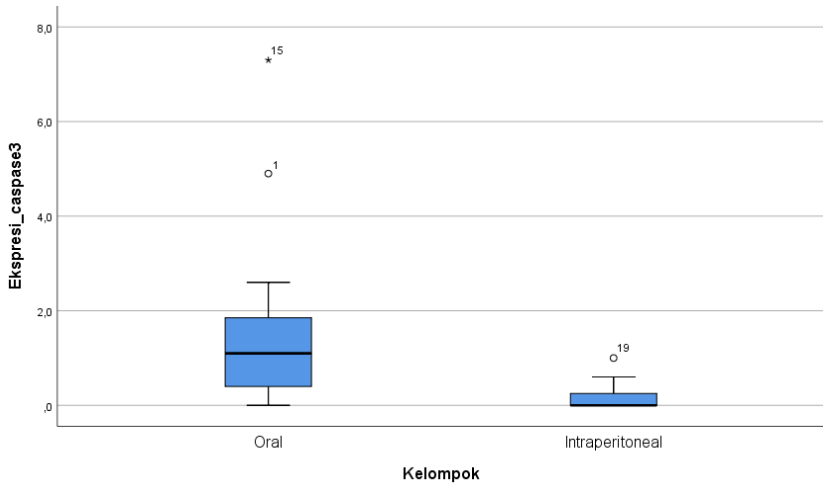
5. Perlakuan intraperitoneal replikasi 6



6. Perlakuan intraperitoneal replikasi 7



Lampiran 8. Hasil Box Plot Kelompok Oral dan Kelompok Intraperitoneal



Lampiran 9. Uji Homogenitas dengan *Levene's Test*

Uji homogenitas bertujuan untuk melihat data yang diperoleh homogen atau tidak

Hipotesis

Ho : data ekspresi caspase 3 tiap kelompok terdistribusi homogen

Ha : data ekspresi caspase 3 tiap kelompok tidak terdistribusi homogen

Penarikan kesimpulan

Ho ditolak jika nilai signifikansi $< 0,05$

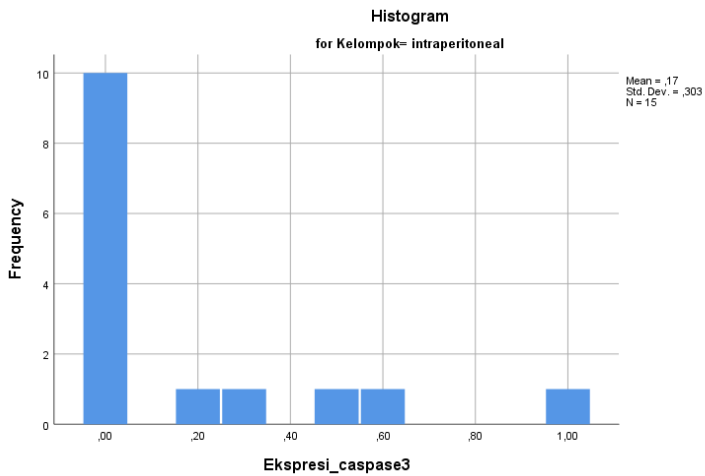
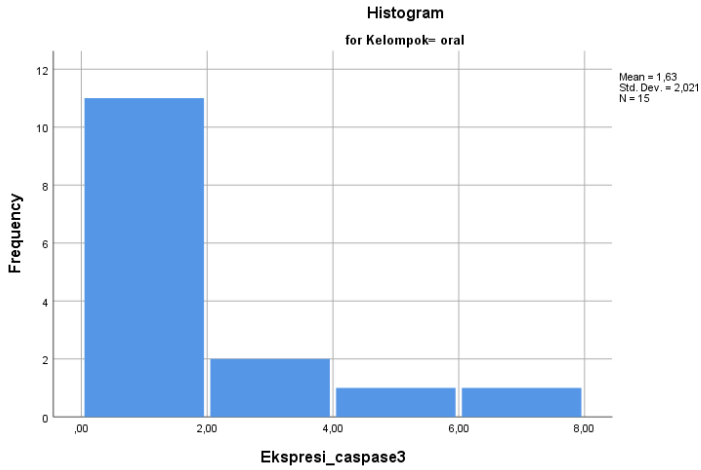
Ha diterima jika nilai signifikansi $> 0,05$

Test of Homogeneity of Variance					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ekspresi_caspase3	Based on Mean	9,589	1	28	,004
	Based on Median	6,387	1	28	,017
	Based on Median and with adjusted df	6,387	1	14,961	,023
	Based on trimmed mean	7,559	1	28	,010

Kesimpulan :

Diperoleh nilai sig pada Based on Mean sebesar $0,004 < 0,005$ yang artinya ekspresi caspase 3 pada perlakuan oral dan perlakuan induksi intraperitoneal tidak memiliki varian yang sama.

Lampiran 10. Histogram



Lampiran 11. Hasil Uji *Mann-Withney*

Mann-Whitney Test

Ranks				
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ekspresi_caspase3	Oral	15	20,43	306,50
	intraperitoneal	15	10,57	158,50
	Total	30		

Uji hipotesis ini dilakukan menggunakan bantuan SPSS Statistics 25

H_0 : Tidak terdapat perbedaan ekspresi caspase 3 yang signifikan pada tikus SD yang diinduksi benzopiren secara peroral dan intraperitoneal.

H_a : Terdapat perbedaan ekspresi caspase 3 yang signifikan pada tikus SD yang diinduksi benzopiren secara peroral dan intraperitoneal.

Penarikan kesimpulan

H_0 diterima jika nilai signifikansi $< 0,05$

H_a diterima jika nilai signifikansi $> 0,05$

Test Statistics ^a	
	Ekspresi_caspase3
Mann-Whitney U	38,500
Wilcoxon W	158,500
Z	-3,203
Asymp. Sig. (2-tailed)	<u>,001</u>
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001 ^b
a. Grouping Variable: Kelompok	
b. Not corrected for ties.	

Kesimpulan :

Diperoleh nilai sig < 0,05 (0,001<0,05) yang artinya terdapat perbedaan ekspresi caspase 3 secara signifikan pada tikus SD yang diinduksi dengan benzopiren secara oral dan intraperitoneal.

Lampiran 12. Data Kelompok Kontrol

Parameter	Control Normal Group
Caspase-3 (ng/g)	0,59 ± 0,05

Data are presented as (Mean ± S.E). S.E = Standard error. Mean values with different superscript letters in the same row are significantly different at ($P < 0.05$).

Lampiran 12. Foto Hasil Penelitian



Terminasi hewan uji



Hewan uji



Ruang penyimpanan hewan uji

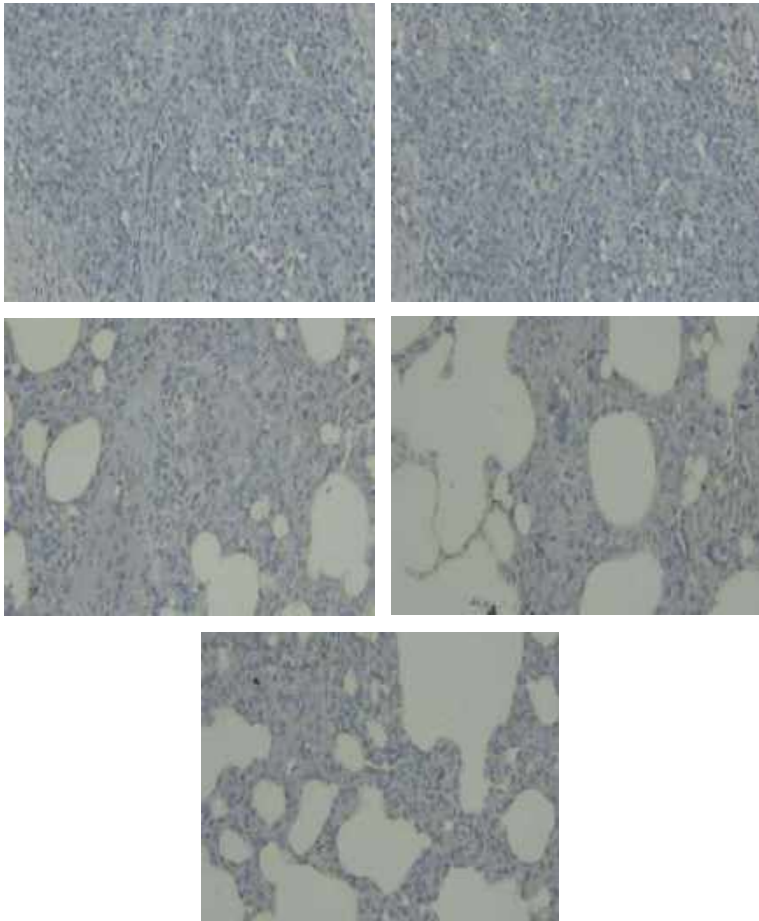


Organ paru yang telah dipotong
untuk membuat preparat

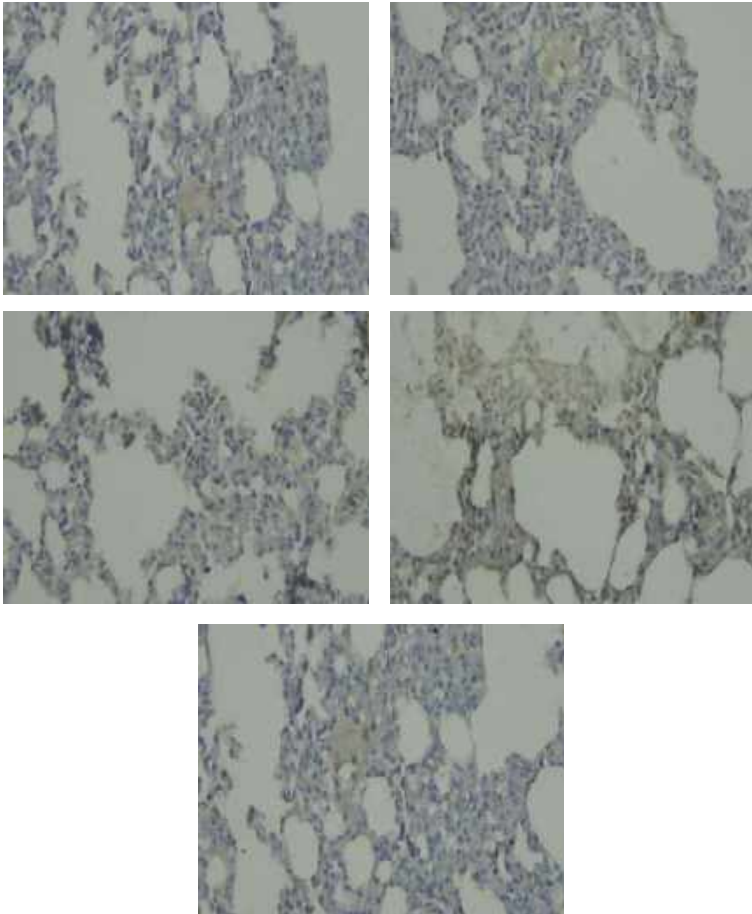
Lampiran 4. Gambaran Mikroskopis Jaringan Paru Tikus *Sprague Dawley*

Kelompok oral

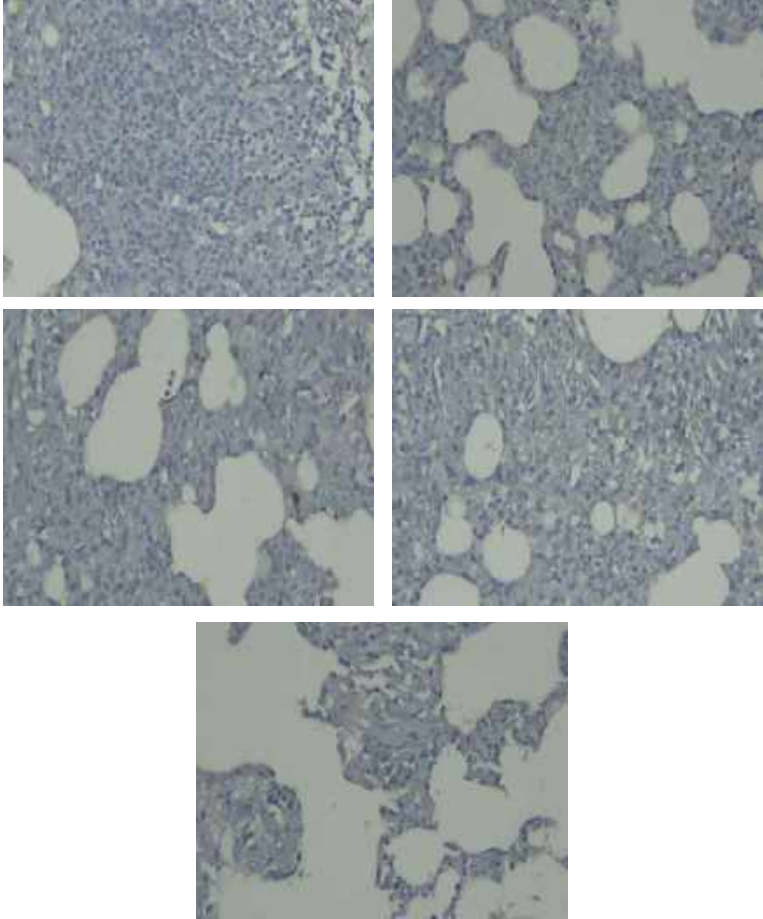
Replikasi 1



Replikasi 2

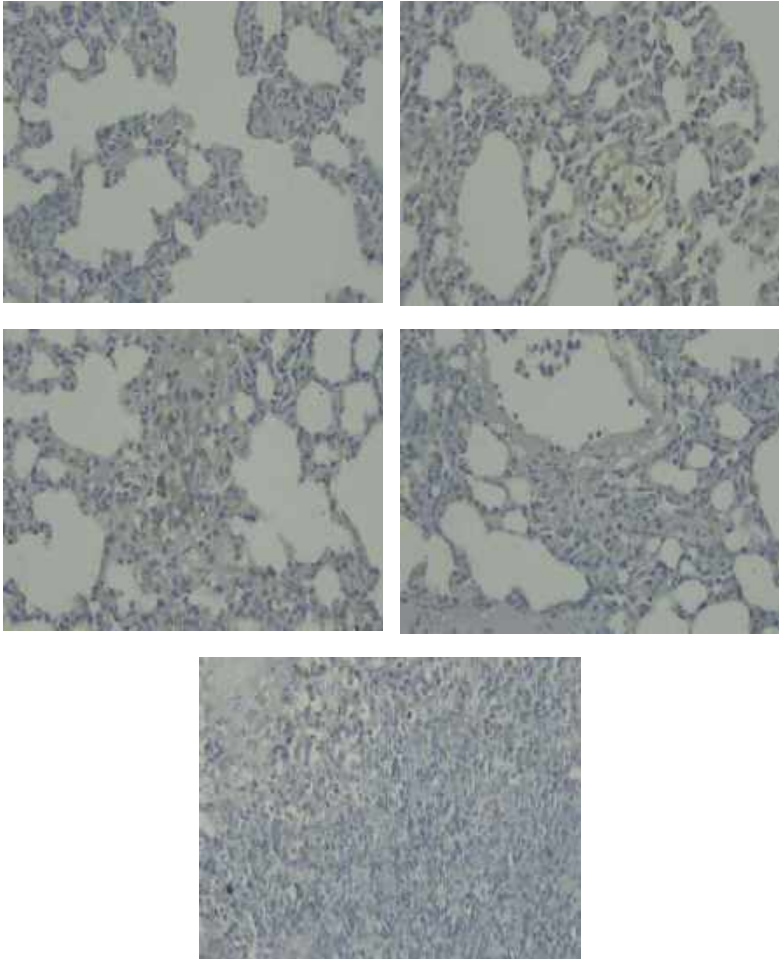


Replikasi 3

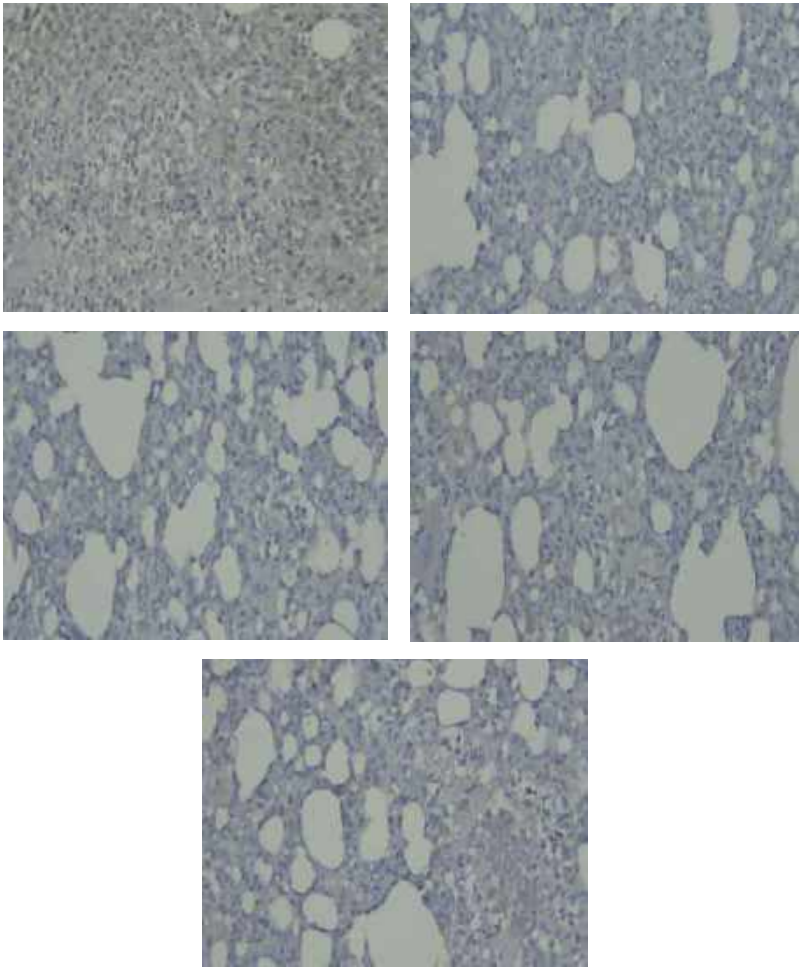


Kelompok intraperitoneal

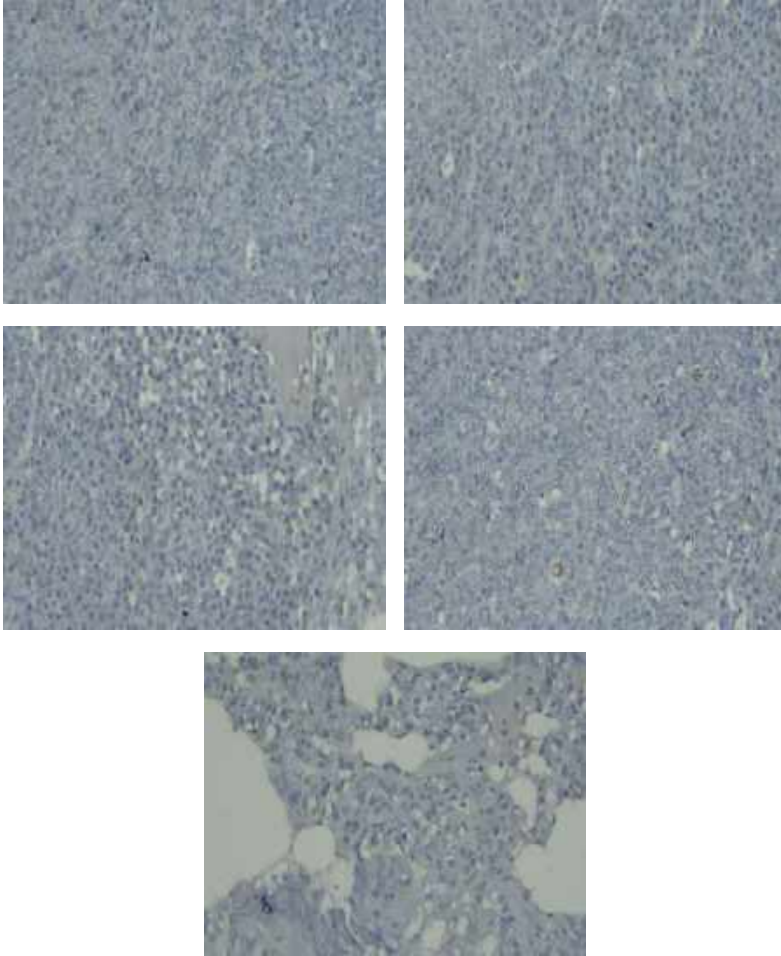
Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3



Lampiran 5. Data Hasil Penghitungan Ekspresi p53 Secara Mikroskopis

Rute Pemberian dan Kode Slide	Jumlah sel yang terekspresi positif	Jumlah Sel seluruhnya	Persentase ekspresi (%)	Rata-rata 5 Lapang pandang (Perbesaran 400x)
Oral (A1)	0	773	0,0%	0,2%
	0	801	0,0%	
	0	382	0,0%	
	0	206	0,0%	
	2	213	0,9%	
Oral (A2)	1	120	0,8%	4,1%
	2	242	0,8%	
	18	193	9,3%	
	16	178	9,0%	
	1	140	0,7%	
Oral (A3)	0	603	0,0%	0,5%
	0	72	0,0%	
	1	99	1,0%	
	2	130	1,5%	
	0	58	0,0%	
Intraperitoneal (A4)	0	89	0,0%	0,0%
	0	55	0,0%	
	0	80	0,0%	
	0	61	0,0%	
	0	491	0,0%	
Intraperitoneal (A5)	0	203	0,0%	0,0%
	0	188	0,0%	
	0	96	0,0%	
	0	162	0,0%	
	0	214	0,0%	

Intraperitoneal (A6)	0	727	0,0%	0,2%
	1	657	0,2%	
	2	632	0,3%	
	2	600	0,3%	
	0	54	0,0%	

Kelompok	Rata-rata per kelompok (%) ± SE	Rata-rata per kelompok (%) ± SD
Kontrol	$2,071 \times 10^{-9} \pm 5,14 \times 10^{-10}$	-
Oral	$1,600 \pm 8,0155 \times 10^{-1}$	$1,600 \pm 3,104\%$
Intraperitoneal	$5,33 \times 10^{-2} \pm 2,906 \times 10^{-2}$	$5,33 \times 10^{-2} \pm 0,112\%$.

Lampiran 6. Uji Normalitas *Shapiro Wilk*

Tests of Normality							
	KELOMPOK	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
EKSPRESI P53	ORAL	.380	15	.000	.543	15	.000
	INTRAPERITONEAL	.482	15	.000	.520	15	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Tujuan uji normalitas :

Untuk mengetahui apakah data ekspresi p53 yang diperoleh terdistribusi normal atau tidak.

Hipotesis :

Ho (data ekspresi p53 pada kelompok terdistribusi normal)

Ha (data ekspresi p53 pada kelompok tidak terdistribusi normal)

Kesimpulan diambil dengan melihat nilai signifikansi

Ho ditolak jika nilai signifikansi $<0,05$

Ha diterima jika nilai signifikansi $>0,05$

Kesimpulan hasil uji normalitas : data ekspresi p53 pada kelompok tidak terdistribusi normal.

Lampiran 7. Uji Homogenitas *Levene's Test*

ANOVA

EKSPRESI P53					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	17.941	1	17.941	3.718	.064
Within Groups	135.097	28	4.825		
Total	153.039	29			

Lampiran 8. Uji *Mann-Whitney U*

Ranks

	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
EKSPRESI P53	ORAL	15	18.80	282.00
	INTRAPERITONEAL	15	12.20	183.00
Total		30		

Test Statistics ^b	
	EKSPRESI P53
Mann-Whitney U	63.000
Wilcoxon W	183.000
Z	-2.377
Asymp. Sig. (2-tailed)	.017
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.041 ^a
a. Not corrected for ties.	

b. Grouping Variable: KELOMPOK

Case Processing Summary

	KELOMPOK	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
EKSPRESI P53	ORAL	15	100.0%	0	.0%	15	100.0%
	INTRAPERITONEAL	15	100.0%	0	.0%	15	100.0%

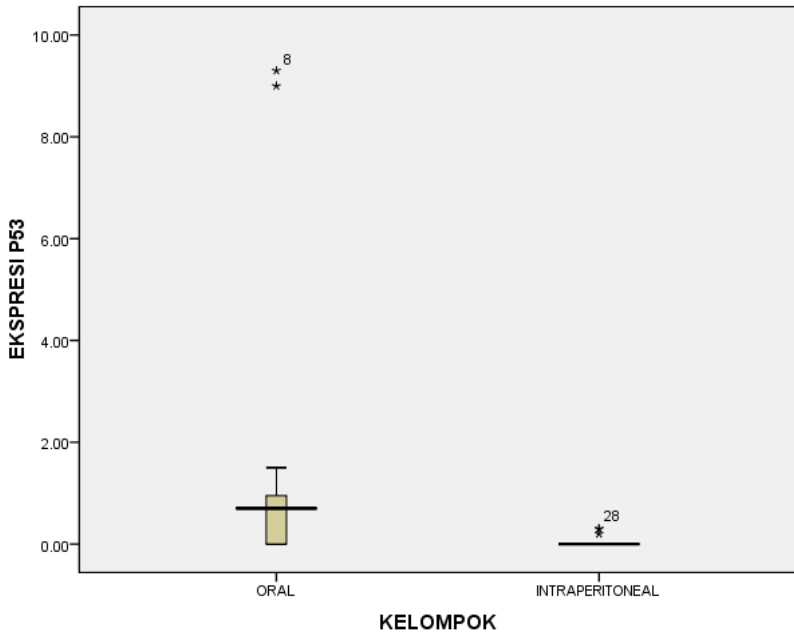
Lampiran 8. Jumlah Ekspresi p53 Pada Jaringan Paru Tikus SD

Descriptives

	KELOMPOK		Statistic	Std. Error	
EKSPRESI P53	ORAL	Mean	1.6000	.80155	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-.1191	
			Upper Bound	3.3191	
		5% Trimmed Mean		1.2611	
		Median		.7000	
		Variance		9.637	
		Std. Deviation		3.10437	
		Minimum		.00	
		Maximum		9.30	
		Range		9.30	
		Interquartile Range		1.00	
		Skewness		2.289	.580
		Kurtosis		3.995	1.121
		INTRA-PERITONEAL	Mean	.0533	.02906
	95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	-.0090	
			Upper Bound	.1157	
	5% Trimmed Mean		.0426		
	Median		.0000		
	Variance		.013		
	Std. Deviation		.11255		
	Minimum		.00		
	Maximum		.30		
	Range		.30		
	Interquartile Range		.00		
	Skewness		1.813	.580	
	Kurtosis		1.685	1.121	

Lampiran 9. Boxplot Median pada 2 Kelompok Perlakuan

EKSPRESI P53



BIODATA PENULIS



Dr. dr. Titiek Hidayati M. Kes. Sp. DLP.,Sp. KKLP. FISPH.,FISCM.

Penulis setelah menyelesaikan pendidikan di SMA Negeri I kotamadya Yogyakarta, kemudian menyelesaikan pendidikan kedokteran dan profesi di Fakultas Kedokteran UGM. Saat ini menjadi dosen tetap di prodi kedokteran fakultas kedokteran dan ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Penulis telah menempuh pendidikan S2 Field Epidemiology Training Program (FETP) dan S3 di Fakultas Kedokteran UGM dengan spesialisasi di bidang Epidemiologi, public genomik, pencegahan, kedokteran keluarga dan masyarakat. Penulis pernah mendapatkan beasiswa *Sandwich-Like* DIKTI untuk Mahasiswa S3 (PKPI) di National Cheng Kung University/ NCKU, Taiwan, departemen epidemiologi molekuler.

Penulis juga merupakan lulusan Program studi Pendidikan spesialis/ PPDS DLP/ dokter layanan primer, fakultas kedokteran Universitas Padjajaran/UNPAD di Bandung.

Penulis menekuni penelitian dengan topik epidemiologi, public genomik, kedokteran pencegahan, kedokteran keluarga dan masyarakat, imunomodulator herbal, kemopreventif.

Selain buku ini, penulis juga telah menulis beberapa judul buku dan telah mempublikasikan hasil-hasil penelitiannya pada beberapa jurnal nasional terakreditasi maupun jurnal internasional bereputasi.



Dr. dr. Akrom, M.Kes

Penulis menempuh Pendidikan di SMA negeri I kota Pati, Jawa Tengah, Indonesia, menyelesaikan Pendidikan kedokteran dan profesi di fakultas kedokteran UGM. Saat ini menjadi dosen tetap di fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan.

Menempuh pendidikan S2 dan S3 di FK UGM dengan spesialisasi kajian pada imunofarmakologi fitokimia, imunomodulator dan antioksidan.

Penulis menekuni penelitian dengan topik imunofarmakologi, imunomodulator fitokimia, kemopreventif, farmakoepidemiologi, farmasi komunitas dan farmasi klinis.

Penulis juga telah menulis beberapa judul buku dan juga telah mempublikasikan hasil-hasil penelitiannya pada beberapa jurnal nasional terakreditasi maupun jurnal internasional bereputasi.



dr. Indrayanti, Sp. PA

Penulis setelah menyelesaikan pendidikan di SMA Negeri I kotamadya Yogyakarta, kemudian menyelesaikan pendidikan kedokteran dan profesi di Fakultas Kedokteran UGM. Saat ini menjadi dosen tetap di prodi kedokteran fakultas kedokteran dan ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penulis juga merupakan lulusan Program studi Pendidikan spesialis/ PPDS Patologi Anatomi, fakultas kedokteran Universitas Gadjah Mada. Penulis menekuni penelitian dengan topik kanker

TAMBAH KOLEKSI BUKU ANDA!!!



KAMI MENYEDIAKAN :

Jasa penulisan buku, ghostwriter, cowriter, jasa layout buku dan desain sampul buku, jasa penerbitan buku.

Untuk Informasi : **Nyuwan S. Budiana** (0815-8980-006)
Nenny Makmun (0816-641-454)



Perum Bukit Golf, Arcadia Housing Blok E 5 No 21 dan F6 No 10
Leuwintangung, Gunung Putri, Bogor, 16963
Email : nennyrho2@yahoo.com
www.noorhanilaksmi.wordpress.com