

Dr. apt. Laela Hayu Nurani, M.Si.
Prof. Dr. apt. Nurkhasanah, M.Si.
apt. Lalu Muhammad Irham, M.Farm., Ph.D.

KANKER dan KARSINOGENESIS



Dr. apt. Laela Hayu Nurani, M.Si.
Prof. Dr. apt. Nurkhasanah, M.Si.
apt. Lalu Muhammad Irham, M.Farm., Ph.D.

KANKER DAN KARSINOGENESIS



**Sanksi Pelanggaran Pasal 113
Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014
Tentang Hak Cipta**

1. Setiap orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk penggunaan secara komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 100.000.000 (seratus juta rupiah).
2. Setiap orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk penggunaan secara komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).
3. Setiap orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/atau huruf g untuk penggunaan secara komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).
4. Setiap orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan, dipidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah).

Kanker dan Karsinogenesis

Dr. apt. Laela Hayu Nurani, M.Si.

Prof. Dr. apt. Nurkhasanah, M.Si.

apt. Lalu Muhammad Irham, M.Farm., Ph.D.



KANKER DAN KARSINOGENESIS

Copyright © 2023 Laela Hayu Nurani, Nurkhasanah,
Lalu Muhammad Irham

Penulis : Dr. apt. Laela Hayu Nurani, M.Si.
Prof. Dr. apt. Nurkhasanah, M.Si.
apt. Lalu Muhammad Irham, M.Farm., Ph.D.
Editor : Ratih Purwandari
Layout :
Desain Cover : Irfana Hafidz

Diterbitkan oleh:

UAD PRESS
(Anggota IKAPI dan APPTI)

Alamat Penerbit:

Kampus II Universitas Ahmad Dahlan
Jl. Pramuka No. 46, Sidikan, Umbulharjo, Yogyakarta.
Telp. (0274) 563515, Phone (+62) 882 3949 9820

ISBN: 978-623-5635-89-7
16 x 24 cm, xiv + 118 hlm
Cetakan Pertama, Mei 2023

All right reserved. Semua hak cipta © dilindungi undang-undang. Tidak diperkenankan memproduksi ulang atau mengubah dalam bentuk apa pun melalui cara elektronik, mekanis, fotocopy, atau rekaman sebagian atau seluruh buku ini tanpa izin tertulis dari pemilik hak cipta.

Kata Pengantar

Perkembangan ilmu Biologi Sel yang semakin maju memberikan tuntutan kepada mahasiswa, terutama mahasiswa farmasi, untuk memahami berbagai perkembangan penyakit, terutama penyakit kanker yang saat ini menjadi masalah akibat tingginya prevalensi kematian yang diakibatkan oleh penyakit tersebut di Indonesia. Mahasiswa farmasi yang nantinya akan berhadapan langsung dengan masalah ini, baik dengan pasien maupun dalam laboratorium, diharuskan untuk memahami konsep-konsep dasar penyakit kanker hingga terapinya.

Buku ajar *Kanker dan Karsinogenesis* ini sangat direkomendasikan sebagai salah satu media dalam pembelajaran mahasiswa farmasi untuk memudahkan dalam menyelesaikan perkuliahan pada matakuliah Biologi Sel. Buku ini dilengkapi dengan tahapan penelitian yang dilakukan oleh penulis hingga tahap pengujian dan hasilnya, sehingga dapat dijadikan acuan dan contoh bagi mahasiswa yang membacanya. Di sisi lain, buku ini berisi teori-teori kanker dan karsinogenesis dari dasar hingga terapi pengobatannya serta menggunakan referensi yang mendukung dan bereputasi sehingga memudahkan mahasiswa untuk memahaminya.

Oleh karena itu, buku ajar *Kanker dan Karsinogenesis* ini diharapkan dapat memberikan manfaat bagi pembaca, khususnya para mahasiswa farmasi.

Prakata

Dalam menyelesaikan perkuliahannya, mahasiswa dituntut untuk mampu memahami, mengerti, dan menguasai ilmu kanker dan karsinogenesis secara benar untuk mencapai derajat kesarjanaaan doktor. Terutama untuk mahasiswa Ilmu Farmasi S3, mahasiswa diharapkan dapat menjelaskan materi kanker dan karsinogenesis.

Buku ajar kanker dan karsinogenesis ini diterbitkan untuk dapat dipakai oleh mahasiswa sebagai acuan dalam mata perkuliahan Biologi Sel. Buku ini berisikan materi untuk 14 kali tatap muka. Pertemuan pertama dan kedua dengan materi pokok pendahuluan berisikan definisi DNA sebagai material genetik, transkripsi, translasi; mutasi DNA, tipe-tipe mutasi, penyebab mutasi dan akibatnya; dan karsinogen. Pertemuan ketiga sampai kelima membahas poliferasi sel yang meliputi siklus sel, mekanisme poliferasi dan gen-gen yang berperan dalam poliferasi; apoptosis yang meliputi definisi, gen-gen yang berperan dalam apoptosis, kecacatan apoptosis dan akibatnya; serta mengenai polimorfisme yang meliputi definisi, mekanisme, dan akibatnya. Pertemuan keenam dan ketujuh melakukan *review* artikel dan presentasi. Pertemuan kesembilan dan kesepuluh membahas percobaan kemopreventif dan kemoterapi, serta rancangan *in vitro* dan *in vivo*. Pertemuan kesebelas sampai keempat belas membahas teknik analisis protein: imunohistokimia, teknik-teknik deteksi apoptosis, dan teknis analisis DNA: flowcytometri, elektroforesis, pewarnaan AO-ETBr, AgNOR.

Penyusun mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penyusunan buku ini. Namun, buku ini masih jauh dari sempurna, sehingga diharapkan adanya saran atau kritik dari berbagai pihak yang akan penulis terima dengan tangan terbuka.

Yogyakarta, 28 November 2022

Penyusun

Daftar Isi

KATA PENGANTAR — *v*

PRAKATA — *vii*

DAFTAR ISI — *ix*

DAFTAR GAMBAR — *xiii*

BAB 1 DNA — *1*

A. Tujuan Pembelajaran — *1*

B. DNA — *1*

C. Sintesis Protein — *3*

D. Sel Normal — *5*

E. Evaluasi/Soal Latihan — *6*

BAB 2 KARSINOGEN DAN KARSINOGENESIS — *7*

A. Tujuan Pembelajaran — *7*

B. Karsinogen dan Karsinogenesis — *7*

C. Evaluasi/Soal Latihan — *12*

BAB 3 MUTASI DAN POLIMORFISME — *13*

A. Tujuan Pembelajaran — *13*

B. Mutasi dan Polimorfisme — *13*

C. Evaluasi/Soal Latihan — *22*

BAB 4 PATOFISIOLOGI PENYAKIT KANKER — *23*

A. Tujuan Pembelajaran — *23*

B. Transformasi Bakteri dan Materi Genetik — *23*

C. Virus Bakteri T2 dan Materi Genetik — *25*

D. Transkripsi — *25*

E. Translasi — *26*

F. Mutasi DNA, tipe-tipe mutase, penyebab mutase, dan akibatnya — *28*

- G. Karsinogen, jenis-jenis karsinogen, dan metabolisme senyawa karsinogen — 33
 - H. Proliferasi sel: Siklus sel, Mekanisme proliferasi, dan gen-gen yang berperan dalam proliferasi — 35
 - I. Apoptosis: gen-gen yang berperan dalam apoptosis, kecacatan apoptosis, dan akibatnya — 38
 - J. Uji Kemoterapi — 39
 - K. Uji Ko Kemoterapi — 41
 - L. Uji Kemopreventif — 44
 - M. Uji Ko Kemopreventif — 51
 - N. Evaluasi / Soal Latihan — 52
- BAB 5 APOPTOSIS — 53
- A. Tujuan Pembelajaran — 53
 - B. Apoptosis dan Nekrosis — 53
 - C. Regulator Apoptosis — 59
 - D. Evaluasi / Soal Latihan — 62
- BAB 6 DESAIN PENELITIAN PENELUSURAN ANTIKANKER — 63
- A. Tujuan Pembelajaran — 63
 - B. Pendahuluan — 63
 - C. Desain penelitian *In Vitro* dan *In Vivo* — 64
 - D. Evaluasi/Soal Latihan — 83
- BAB 7 TEKNIK PENGUJIAN DALAM PENELUSURAN ANTIKANKER — 85
- A. Tujuan Pembelajaran — 85
 - B. Sitotoksitas (MTT assay, Methylene Blue Assay): prinsip dan teknik pengujian — 85
 - C. Deteksi apoptosis: pengecatan AO-EtBr, TUNEL assay, AgNO₃, dll — 86
 - D. Deteksi siklus sel: flow cytometri — 91
 - E. Deteksi regulator Apoptosis — 94
 - F. Evaluasi / Soal Latihan — 96
- BAB 8 IMUNOHISTOKIMIA — 97
- A. Tujuan Pembelajaran — 97
 - B. Prinsip Imunohistokimia — 97
 - C. Metode Pewarnaan Imunohistokimia — 98
 - D. Evaluasi/ Soal Latihan — 100

BAB 9	HASIL PENGECATAN — 101
	A. Tujuan Pembelajaran — 101
	B. Pendahuluan — 101
	C. Pengecatan etidium bromid-akridin oranye — 102
	D. Pengecatan AgNOR — 103
	E. Evaluasi/ Soal Latihan — 105

DAFTAR PUSTAKA — 107

GLOSARIUM — 113

INDEKS — 115

BIOGRAFI PENULIS — 117

Daftar Gambar

- Gambar 1. Bentuk DNA seperti double helix/untaian ganda yang tersusun oleh kode unik A-T G-C — 2
- Gambar 2. Central Dogma proses DNA ditranskripsi menjadi RNA dan ditranslasi menjadi sebuah protein — 3
- Gambar 3. Tahap-tahap Sintesis Protein — 5
- Gambar 4. Inisiasi, Promosi, Progresi, dan Metastasis — 11
- Gambar 5. Metabolisme DMBA oleh CYP1A1 dan mEH. Epoksid dibentuk oleh P450s dihidrolisasi oleh mEH transdihidrodiol atau secara langsung di dihidrolisasi oleh air menjadi fenol. Metabolit 2-fenol, 10, 11-diol dan metabolit metil hidroksi tidak terlihat. — 12
- Gambar 6. Sifat germline dapat diturunkan, sedangkan somatic cenderung diperoleh dan tidak diturunkan. — 15
- Gambar 7. Ilustrasi kemiripan susunan DNA antarmanusia sebesar 99,9%. Uniknya, 0,1% sisanya cukup membuat manusia satu sama lain berbeda, baik perbedaan warna kulit, warna rambut, maupun kerentanan. — 16
- Gambar 8. Hasil penelitian SNP yang dicari dengan *keyword* SNP di database PubMed pada tgl 23 November 2022. — 19
- Gambar 9. SNP atau variasi gen sangat mungkin terjadi pada setiap individu, tetapi efeknya masih belum banyak diketahui. [Nomor Copyright: SW24OJG2IX] — 21
- Gambar 10. Masing-masing SNP memiliki tingkat keparahan berdasarkan *scoring system* pada jenis mutasinya — 22
- Gambar 11. Mutasi Titik. — 30
- Gambar 12. Mutasi Kromosomal — 30
- Gambar 13. Copy Number Variation (CNV) — 31
- Gambar 14. Ilustrasi jenis mutasi pada sekuensing DNA yang dapat menyebabkan perubahan pada protein — 32
- Gambar 15. Siklus Sel — 37
- Gambar 16. Perbedaan apoptosis dan nekrosis — 55
- Gambar 17. Jalur mekanisme apoptosis — 57

- Gambar 18. Bagan Penelitian Efek Kemopreventif Ekstrak Etanol terstandard isolat aktif Akar Pasak Bumi terhadap Kanker Payudara pada Tikus Betina Galur Sparague Dawley yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA) — 78
- Gambar 19. Skema proses preparasi jaringan pada pemeriksaan histopatologi organ — 80
- Gambar 20. Skema pengecatan haematocyllin dan eosin pada pemeriksaan histopatologi — 80
- Gambar 21. Hasil pengujian menggunakan TUNEL assay pada sel HeLa yang diberi perlakuan eurikomanon 2 ug/ml — 88
- Gambar 22. Pengamatan sel Hela yang diberi perlakuan eurikomanon a. sel HeLa diberi perlakuan eurikomanon selama 24 jam pada kepekatan 2 µg/mL (b), 4 µg/mL (c) dan 8 µg/mL (d). Sel-sel yang apoptosis (tanda panah hitam) semakin banyak dengan meningkatnya kepekatan. Jasad apoptotik (tanda panah merah) nampak sangat banyak pada kepekatan tinggi. Perbesaran asal 100x. — 90
- Gambar 23. Sitogram siklus sel HeLa tanpa perlakuan (a), dengan perlakuan eurikomanon selama 24 jam pada kepekatan 2 µg/ml (b), 4 µg/mL (c), dan 8 µg/mL (d). Perlakuan eurikomanon menyebabkan meningkatnya sel pada fasa G1 dan menurunnya jumlah sel pada fasa S, menandakan penahanan kitar sel pada fasa G1. — 93
- Gambar 24. Fotomikroskopi hasil staining dengan etidium bromide pada sel T47D dengan perlakuan isolate 1 pada konsentrasi 6,8 µg/mL 6(A) dan Kontrol (B). (-> = sel apoptosis. - -> = sel tidak mengalami apoptosis) — 102
- Gambar 25. Hasil pengecatan menggunakan acridin orange dan etidium bromide pada sel HeLa yang diberi perlakuan fraksi-fraksi ekstrak tapak liman (*Elephantopus scaber*) — 103
- Gambar 26. Fotomikroskopis hasil pengecatan AgNOR pada sel T47D (A) kontrol sel (tanpa sampel) (B) isolate 1 pasak bumi konsentrasi 6,8 µg/mL (perbesaran 400x) Jumlah noktah menunjukkan aktivitas proliferasi sel. — 105

Bab 1

DNA

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa mampu menguraikan konsep molekuler patologi penyakit kanker.

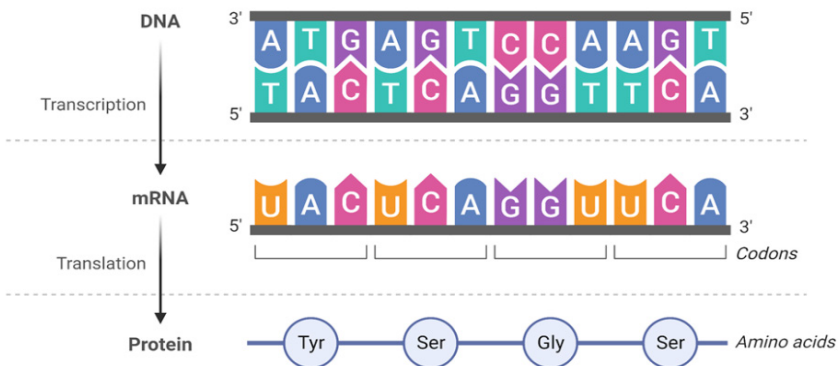
B. DNA

Penemuan *deoksiribonucleic acid*/asam deoksiribonukleat (DNA) berawal dari bentuknya yang berupa *double helix*. Watson dan Crick adalah penemu bentuk DNA tersebut pada tahun 1953. Saat itu, mereka mempublikasikan hasil observasinya di Jurnal *Nature* dengan judul “Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid”. Beberapa dekade setelahnya, tepatnya pada tahun 1966, penemuan tersebut disempurnakan oleh penemuan dari Holley, Khorana, dan Nirenberg yang menyatakan bahwa DNA yang berbentuk *double helix* tersebut disusun oleh kode-kode basa A-T-G-C.

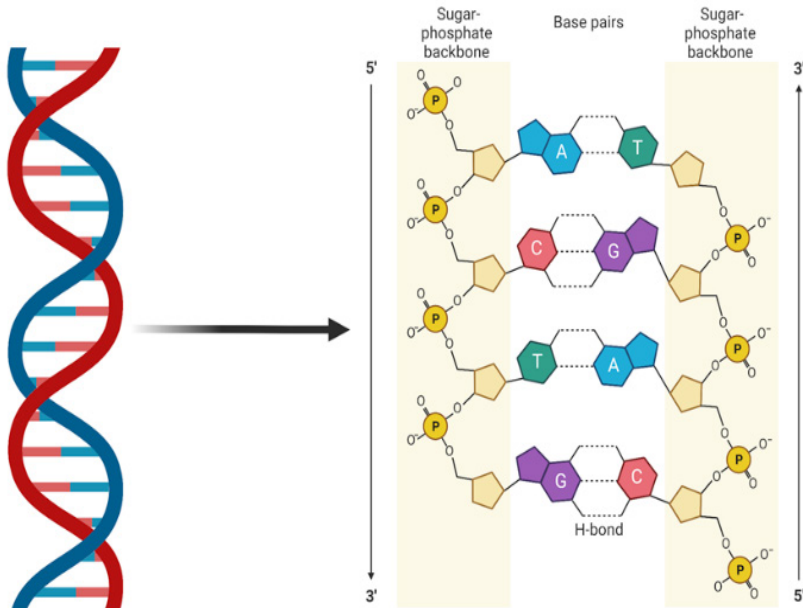
Manusia terdiri atas organ-organ. Di dalam organ kita terdapat miliaran sel; di dalam sel itu sendiri terdapat Nukleus; di dalam nukleus terdapat kromosom; dan di dalam kromosom inilah terdapat komponen terkecil dalam tubuh kita yang disebut dengan DNA. Kromosom terdiri atas DNA dan protein. Informasi genetik yang mengatur fungsi sel berada dalam struktur DNA dan bukan dalam protein. Semakin banyak kromosom, semakin tinggi kandungan DNA.

DNA adalah polimer asam nukleat pembawa informasi genetik yang terdiri atas urutan spesifik unit berulang deoksiribonukleotida yang dihubungkan oleh ikatan 3',5'-fosfodiester.

DNA dapat ditemukan di dalam nukleus sel eukariotik dan nukleoid bakteri. Sejumlah kecil DNA juga ditemukan dalam organel (seperti mitokondria dan kloroplas). DNA terdiri atas dua untai polimer panjang yang susunannya adalah gula 2-deoksiribosa, fosfat, serta basa purin dan pirimidin. Setiap untai terdiri atas 2-deoksiribosa dan fosfat bergantian yang dihubungkan bersama melalui ikatan fosfodiester. DNA memiliki empat basa, yaitu adenin (A), sitosin (C), guanin (G), dan timin (T). Adenin akan membentuk dua ikatan hidrogen dengan timin, sedangkan guanin akan membentuk tiga ikatan hidrogen dengan sitosin. Perpaduan jumlah dan susunan yang terbuat di antara ikatan-ikatan basa ini memberikan kemungkinan setiap individu mempunyai *blueprint* genetik yang khusus daripada organisme lain (Burton, 1962; Rettner, 2017).



Gambar 1. Bentuk DNA seperti double helix/untaian ganda yang tersusun oleh kode unik A-T G-C
[Nomor Copyright: GT240J6TN9]



Gambar 2. Central Dogma proses DNA ditranskripsi menjadi RNA dan ditranslasi menjadi sebuah protein
[Nomor Copyright: NM240J4BZ3]

C. Sintesis Protein

Proses sintesis protein menyediakan sel dengan molekul pengatur penting untuk fungsi seluler dan kelangsungan hidup. Sintesis protein berperan penting dalam semua aspek kehidupan seluler. Menerjemahkan informasi genetik yang dikodekan dalam molekul mRNA menjadi rantai polipeptida adalah prosedur multistep yang kompleks dan melibatkan banyak faktor pengatur dan komponen tambahan (mRNA (RNAd), rRNA, tRNA, enzim RNA polimerase, enzim aminoasil tRNA sintetase, dan enzim peptidil transferase). RNA yang dikodekan dimanfaatkan untuk melakukan sintesis protein pada proses yang dinamakan ekspresi gen.

Terdapat dua proses ekspresi gen, yaitu transkripsi dan translasi di sel eukariotik, dengan informasi dalam gen mengalir ke protein:

DNA → RNA → protein. Jalur sintesis protein disebut translasi karena bahasa susunan nukleotida pada mRNA diartikan ke dalam bahasa susunan asam amino. Proses translasi membutuhkan kode genetik: informasi yang terkandung dalam urutan asam nukleat diekspresikan untuk menghasilkan urutan asam amino tertentu. Sementara itu, transkripsi terjadi di nukleus, dengan DNA digunakan sebagai cetakan untuk membuat RNA pembawa pesan. Informasi yang terkandung dalam *messenger* RNA digunakan untuk membuat polipeptida selama transkripsi. DNA dan gen dimanfaatkan sebagai tempat untuk membentuk untai *messenger* RNA dengan bantuan enzim RNA polimerase.

Terdapat tiga tahap proses sintesis protein, yaitu inisiasi, elongasi, dan terminasi (Young, 1962; Chezhiyan, 2021; Meisenberg & Simmons, 2012):

1. Inisiasi

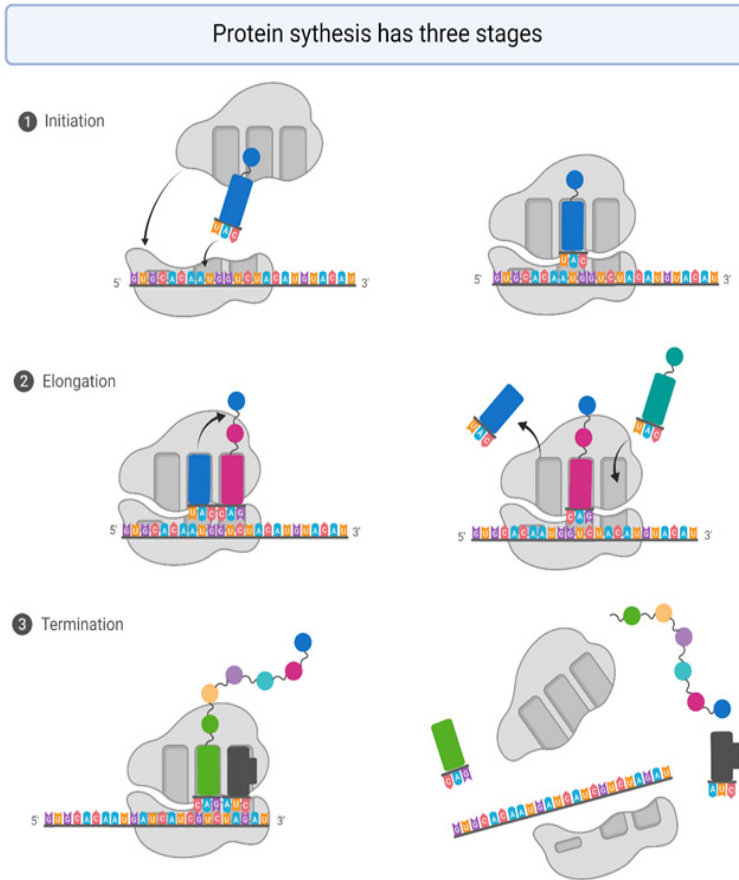
Inisiasi melibatkan reaksi yang mendahului pembentukan ikatan peptida antara dua asam amino pertama protein. Tahap ini membutuhkan ribosom untuk mengikat mRNA pembentuk kompleks inisiasi yang memiliki kandungan aminoasil-tRNA pertama. Tahap ini terjadi relatif lama dan biasanya menetapkan tingkat mRNA diterjemahkan.

2. Elongasi

Elongasi merupakan cakupan semua reaksi dari sintesis ikatan peptida pertama hingga adisi asam amino terakhir. Asam amino dimasukkan ke rantai satu demi satu. Penambahan asam amino adalah langkah paling cepat dalam sintesis protein.

3. Terminasi

Terminasi meliputi tahapan yang dibutuhkan untuk mengurai rantai polipeptida yang lengkap, dan pada saat yang sama, ribosom memisahkan diri dari mRNA.



Gambar 3. Tahap-tahap Sintesis Protein
[Nomor Copyright: DU24OPS8P4]

D. Sel Normal

Sel normal yang terdapat dalam tubuh bertindak sebagai blok bangunan utama tubuh dan mempunyai ciri spesifik yang dapat memberikan kemungkinan fungsi jaringan, organ, dan sistem organ dipertahankan dengan benar. Sel normal dalam tubuh bersifat aktif dan dinamis: mereka terus tumbuh dan berspesialisasi, berfungsi, mati, dan mengisi kembali diri mereka sendiri, hingga berjumlah jutaan setiap detik. Sel memberikan struktur untuk tubuh, menyerap

nutrisi dari makanan, mengubah nutrisi tersebut menjadi tenaga, dan menjalankan tugas khusus. Sel juga memiliki kandungan gen tubuh dalam bentuk DNA dan membentuk *copy* dari dirinya sendiri.

Sebagian besar sel tubuh kita memiliki tiga bagian utama, yaitu:

1. Sitoplasma

Sitoplasma terdiri atas sitosol (zat cair seperti jeli) dan susunan lain yang mengitari nucleus.

2. Sitoskeleton

Sitoskeleton merupakan kerangka struktural sel yang dibentuk oleh jaringan serat panjang. Sitoskeleton mempunyai berbagai manfaat penting, yaitu pembentukan sel, ikut berperan pada pembelahan sel, memberikan ruang untuk pergerakan sel, serta memberikan jalur dan mengarahkan organel dalam bergerak dan zat lain di dalam sel.

3. Inti sel

Inti sel terdiri atas beberapa organel, seperti retikulum endoplasma, badan golgi, lisosom, mitokondria, nucleus, membrane plasma, dan ribosom.

E. Evaluasi/Soal Latihan

1. Jelaskan perbedaan struktural DNA dan RNA.
2. Uraikan tahap-tahap sintesis protein dan jelaskan peran DNA pada proses tersebut.
3. Informasi genetik dalam DNA disampaikan melalui proses transkripsi dan translasi. Uraikan kedua proses tersebut.

Bab 2

Karsinogen dan Karsinogenesis

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa mampu menguraikan konsep molekuler patologi penyakit kanker.

B. Karsinogen dan Karsinogenesis

Karsinogen adalah zat yang dapat mengakibatkan tumor, baik dalam bentuk senyawa induknya maupun hasil metabolismenya (Tjay and Rahardja, 2002). Terdapat tiga penggolongan senyawa karsinogen, yaitu:

1. senyawa karsinogen primer

Senyawa karsinogen primer adalah senyawa yang sudah bersifat karsinogen tanpa memerlukan proses aktivasi. Senyawa jenis ini membuat sel normal berubah menjadi sel kanker.

2. senyawa karsinogen sekunder

Senyawa karsinogen sekunder adalah senyawa karsinogen yang membutuhkan metabolisme aktivasi yang dapat berinteraksi dengan makromolekuler sehingga mengalami perubahan dan selanjutnya menjadi kanker.

3. senyawa karsinogen tersier

Senyawa karsinogen tersier adalah zat non-karsinogen secara mandiri, tetapi jika ada zat lain dapat menjadi karsinogen. (Mulyadi, 1996).

Contoh zat karsinogenik yang membutuhkan metabolisme untuk menjadi metabolit karsinogen aktif adalah Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH). PAH dapat menyebabkan terjadinya kanker kulit apabila dioleskan pada kulit, atau kanker paru apabila seseorang menghisap asap tembakau yang mengandung PAH. Asap tembakau mengandung banyak bahan yang memiliki sifat karsinogen, dan yang paling penting adalah senyawa 3,4 benzo(a)piren (Velde *et al*, 1999). Metabolit aktif dari senyawa PAH yang menyebabkan kanker kulit, kanker payudara, dan kanker paru pada tikus terjadi karena adanya ikatan kovalen metabolit aktif dengan protein (Woodard, 2001). Oleh karena itu, tahapan penting dari terbentuknya kanker oleh senyawa karsinogen adalah terjadinya ikatan kovalen dari metabolit aktif senyawa karsinogen dengan makromolekul (Pitot and Dragan, 2001). Contoh senyawa PAH antara lain benzoapiren, benz(a)antrasen, asetilaminofluoren, dan benzidin (Mulyadi, 1996).

Senyawa karsinogen dapat berupa senyawa kimia organik maupun anorganik. Berdasarkan struktur dan kerjanya, senyawa karsinogen dapat dibagi dalam beberapa golongan, yaitu golongan polisiklik, amina aromatik, nitrosamin, nitrosamida, karsinogen pengalkil, logam karsinogen, serta karsinogen alamiah. Karsinogen lain dapat berupa radiasi, misalnya radiasi bom atom, radiasi sinar pengion (radioterapi agresif), sinar X, sinar alfa dan gamma, atau pun sinar ultraviolet dari matahari. Virus juga dapat menyebabkan kanker yang biasa disebut virus onkogenik, antara lain virus Pappiloma, virus Epstein barr, virus hepatitis B (VHB), dan virus hepatitis C (VHC) (Velde *et al.*, 1999).

Karsinogenesis merupakan proses pertumbuhan kanker secara mikroevolusioner dari suatu sel normal akibat akumulasi kesalahan genetik yang berlangsung lama dan melalui berbagai tahapan menuju bentuk progresif dan akhirnya menjadi ganas (Hanahan and Weinberg, 2002). Dasar selular yang berubah dan membuat terbentuknya kanker (karsinogenesis) yaitu basa DNA yang berubah dari sel target yang disebut sebagai mutasi (King, 2000).

Karsinogenesis dibagi menjadi empat tahap, yakni inisiasi, promosi, progresi (perkembangan), dan metastasis (Farombi, 2004).

1. Inisiasi

Genom sel akan berubah permanen di tahap inisiasi karena kerusakan DNA hingga berujung pada mutagenesis. Perubahan-perubahan esensial di dalam sel terjadi dalam tahapan ini (Valde *et al.*, 1996). Sel yang mengalami perubahan ini akan secepatnya bertumbuh daripada sel normal di sekitarnya.

2. Promosi

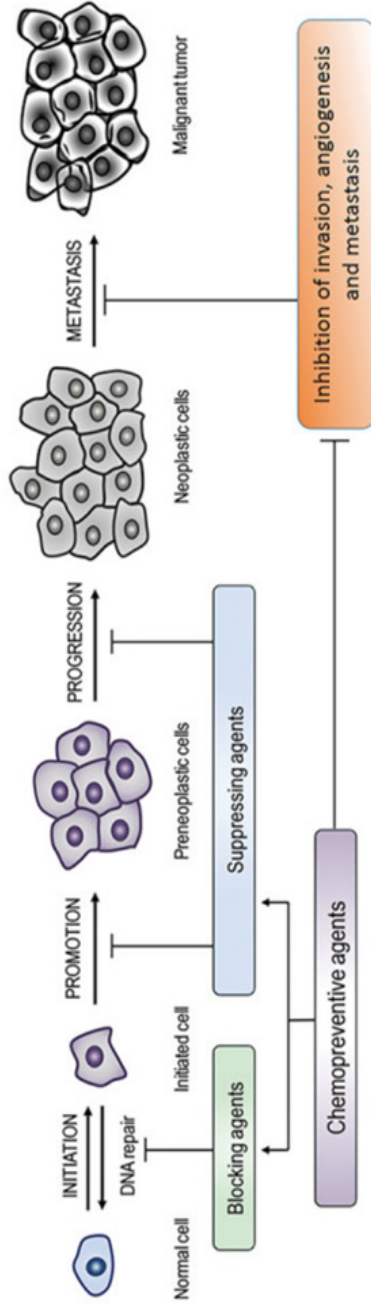
Tahap promosi terjadi lebih lama hingga mencapai lebih dari 10 tahun. Panjangnya tahapan ini disebabkan oleh rusaknya materi genetik di dalam sel. Dalam tahap promosi dari cara epigenetik akan terjadi perpindahan sel yang rusak menjadi premalignansi dari jumlah sel multiseluler tumor yang mengalami proliferasi oleh pengaruh enzim telomerase (Hana, 2002). Tahap promosi merupakan tahap yang menentukan, karena di tahap ini, proses detoksifikasi karsinogen aktif ke produk yang mudah dimetabolisme menjadi produk yang tidak berbahaya dapat terjadi. Dengan demikian, tidak dapat terbentuk kanker seperti digambarkan pada Gambar 4. Walaupun demikian, dalam praktiknya, sering kali tidak mudah untuk membedakan secara tegas antara inisiasi dan promosi karena banyak inisiator yang juga mempunyai daya promotor.

3. Progresi (perkembangan)

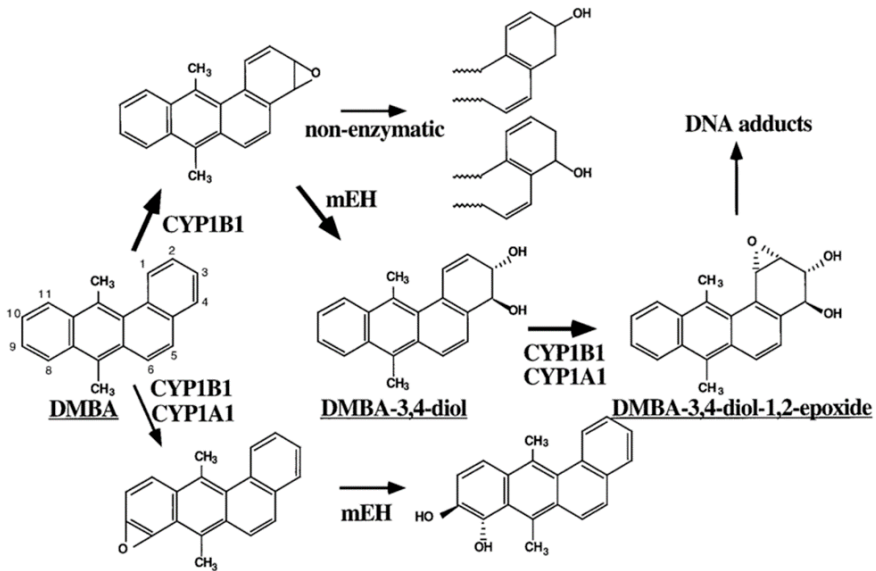
Progresi adalah proses perubahan tumor menjadi berturut-turut semakin meningkat dan subpopulasi menjadi ganas. Mutasi dan penyimpangan atau paparan berulang terhadap rangsangan karsinogenik atau tekanan seleksi yang mendukung otonomi turunan klon. Sel-sel yang diinisiasi berkembang biak, menghasilkan pertumbuhan tumor yang cepat. Dengan meningkatnya ukuran tumor, sel dapat terus berubah, menyebabkan peningkatan heterogenitas populasi sel. Tahap perkembangan sel kanker pada akhirnya dapat mengalami metastasis (Farombi, 2004).

4. Metastasis

Metastasis adalah pertumbuhan kanker ke dalam kelenjar limfe dan organ yang berjarak, baik melalui jalur limfogen maupun hematogen. Pembentukan metastasis secara klinis merupakan sifat terpenting dari pertumbuhan kanker karena metastasis ini biasanya tidak dapat ditangani dan sangat menentukan prognosis.



Gambar 4. Inisiasi, Promosi, Progresi, dan Metastasis



Gambar 5. Metabolisme DMBA oleh CYP1A1 dan mEH. Epoksid dibentuk oleh P450s dihidrolisisasi oleh mEH transdihidrodiol atau secara langsung dihidrolisisasi oleh air menjadi fenol. Metabolit 2-fenol, 10, 11-diol dan metabolit metil hidroksi tidak terlihat.

C. Evaluasi/Soal Latihan

1. Jelaskan pengertian karsinogen dan karsinogenesis.
2. Uraikan dan berikan contoh karsinogen primer, karsinogen sekunder, dan karsinogen tersier.
3. Uraikan tahap perkembangan kanker.

Bab 3

Mutasi dan Polimorfisme

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa mampu menguraikan konsep terapi dan sifat-sifat obat-obat antikanker.

B. Mutasi dan Polimorfisme

Setiap perubahan langka dalam urutan nukleotida biasanya dihubungkan dengan penyebab penyakit dan disebut dengan mutasi. Mutasi dan polimorfisme tersebut pada dasarnya berbeda makna: mutasi cenderung mengarah kepada suatu keadaan yang menimbulkan penyakit atau cenderung dikonotasikan negatif, sedangkan polimorfisme belum tentu selalu menyebabkan suatu penyakit, atau dengan kata lain, dapat berkonotasi negatif, dan dapat pula berkonotasi positif. Perubahan urutan nukleotida dapat menyebabkan perubahan fenotipik. Mutasi dapat diturunkan dari orang tua (mutasi germline), atau diperoleh semasa hidup seseorang (mutasi somatic) yang merupakan penyebab utama penyakit pada manusia seperti kanker.

Mutasi gen pencetus/pendorong terjadinya kanker dapat terjadi secara bawaan (germline, sejak lahir) atau secara somatic (barusan).

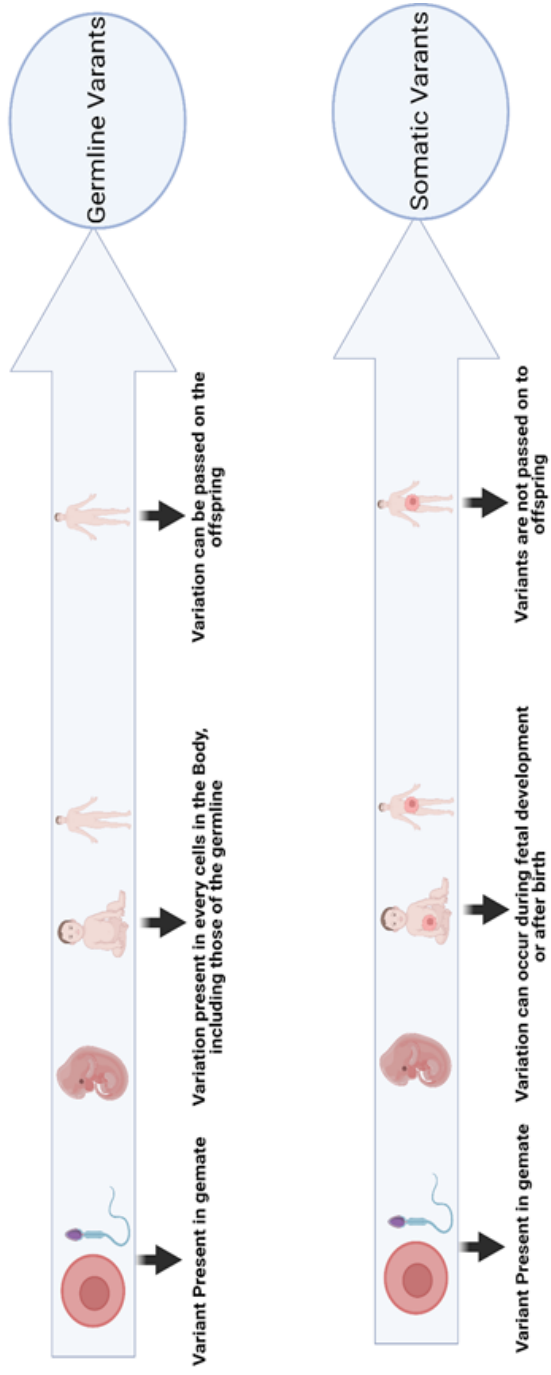
Mutasi gen penekan tumor pun dapat terjadi secara germline (berguna untuk evaluasi risiko kanker pada keluarga) atau secara somatic. Mutasi onkogen tidak pernah terlihat secara germline dan eksklusif terjadi secara somatic karena dapat menimbulkan kematian embryo. Sumber pemeriksaan mutasi germline dapat berasal sel apa saja dari tubuh (sel darah tepi, *buccal swab*, saliva), sedangkan sumber pemeriksaan mutasi somatic harus menggunakan jaringan tumor (FFPE, apusan sitologi, atau plasma).

Menariknya, sekitar 90% kanker disebabkan oleh mutasi jenis somatik. Namun, akhir-akhir ini, para peneliti juga sedang meneliti kecenderungan mutasi jenis germline yang dapat bersifat patogenesis pada kanker. Penelitian beberapa tahun terakhir, yang melaporkan kecenderungan mutasi jenis germline tersebut menimbulkan kanker, diterbitkan dengan judul artikel “*Germline variants impact on somatic events during tumorigenesis*” [PMID: 31128889]. Terjadinya mutasi germline adalah pada gamet. Oleh karena keturunannya berasal dari peleburan sel telur dan sperma, mutasi germline ayah dan ibu dapat juga diperoleh di setiap sel yang memiliki inti dari keturunannya. Munculnya mutasi disebabkan rusaknya DNA yang tidak dibetulkan, kesalahan pada replikasi, atau elemen gen.

Terdapat 3 jenis mutasi DNA, yaitu mutasi titik, mutasi kromosomal, dan CNV (*copy of number variation*). Mutasi titik terjadi ketika satu nukleotida ditambahkan, dihapus, atau diganti. Pada mutasi kromosomal, seiring dengan mutasi titik, seluruh struktur kromosom dapat diubah dengan daerah kromosom dibalik, dihapus, diduplikasi, atau ditranslokasi. Pada CNV, ekspresi gen diperkuat (atau dikurangi) melalui peningkatan (penurunan) jumlah salinan alel lokus.

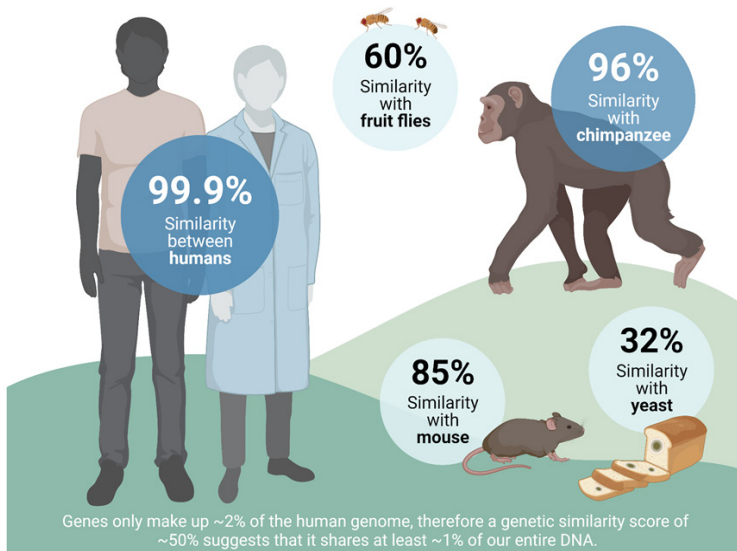
Sementara itu, variasi susunan DNA yang ada di populasi dengan angka 1% atau lebih dinamakan polimorfisme. Umumnya, polimorfisme ini sering disebut dengan *Single Nucleotide Polymorphism*

Perbedaan antara Germline dan Somatic Variants



Gambar 6. Sifat germline dapat diturunkan, sedangkan somatic cenderung diperoleh dan tidak diturunkan.
[Nomor Copyright: AJ240NQMHF]

(SNP). SNP juga sering disebut dengan istilah variasi gen. Insiden yang lebih tinggi dalam populasi menunjukkan bahwa polimorfisme terjadi secara alami dengan efek netral atau menguntungkan. Polimorfisme juga dapat berupa satu atau lebih perubahan nukleotida, seperti halnya mutasi (Karki *et al.*, 2015). Polimorfisme ini sangat umum ditemukan pada susunan DNA manusia yang jumlahnya kurang lebih 3.2 miliar pasang huruf. Beberapa laporan menyatakan bahwa setiap 1000 sekuensing susunan DNA terdapat 1 SNP. Dapat dibayangkan jika jumlah susunan DNA tersebut berjumlah 3.2 miliar pasang atau 6.4 miliar huruf susunan DNA. Namun, hingga hari ini, para ilmuwan masih mencoba untuk mencari tahu dampak dari SNP karena ada yang bersifat merugikan, tetapi ada pula yang bersifat tidak mengubah protein, sehingga tidak sampai menimbulkan kerugian pada tubuh manusia.



Gambar 7. Ilustrasi kemiripan susunan DNA antarmanusia sebesar 99,9%. Uniknya, 0,1% sisanya cukup membuat manusia satu sama lain berbeda, baik perbedaan warna kulit, warna rambut, maupun kerentanan.

Gambar di atas menunjukkan bahwa SNP sangat menarik. Jika kita telusuri, hingga hari ini sangat banyak publikasi yang melaporkan implikasi dari SNP. Dengan memasukkan *keyword* “(((SNP) AND (Variants)) AND (Polymorphism)) AND (gene)” saja di *database* PubMed, sudah ada lebih dari 14 ribu publikasi yang muncul. Tentu banyaknya jumlah publikasi yang tersedia hingga hari ini menuntut kita untuk dapat memanfaatkannya, termasuk untuk memperbaiki kesehatan manusia. SNP hari ini bukan hanya dimanfaatkan untuk membantu mendiagnosis penyakit, melainkan juga dapat dimanfaatkan sebagai biomarker, diagnosis dini, diagnosis prognostik, bahkan trennya hari ini digunakan untuk target obat (*genomic variants driven drug discovery*). Berikut ini beberapa penelitian dari penulis yang telah dipublikasikan untuk tujuan biomarker maupun untuk tujuan penemuan obat baru.

1. Potential Biomarkers for Childhood Asthma by Utilizing an Established Bioinformatic Analysis
2. Integration of genomic variants and bioinformatic-based approach to drive drug repurposing for multiple sclerosis
3. Genomic variants-driven drug repurposing for tuberculosis by utilizing the established bioinformatic-based approach
4. Genomic-Analysis-Oriented Drug Repurposing in the Search for Novel Antidepressants
5. Integration of genomic databases and bioinformatic approach to identify genomic variants for sjogren’s syndrome on multiple continents
6. The use of genomic variants to drive drug repurposing for chronic hepatitis B
7. Identification of Druggable Genes for Asthma by Integrated Genomic Network Analysis
8. Identification of SNP rs1799853 of *CYP2C9* Gene and Blood Sugar Levels in Diabetic Patients

9. Drug repurposing for Atopic Dermatitis by Integration of Gene Networking and Genomic Information
10. Genetic Association of the Functional WDR4 Gene in Male Fertility
11. Variation of *CYP2C9* Gene and Glycemic Control in Diabetic Patients: A Literature Review
12. Evaluation for the Genetic Association Between Store-Operated Calcium Influx Pathway (STIM1 and ORAI1) and Human Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis B Infection.
13. Integration of Genetic Variants and Gene Network for Drug Repurposing in Colorectal Cancer
14. Genetic variants that influence SARS-CoV-2 receptor *TMPRSS2* expression among population cohorts from multiple continents
15. Single-Nucleotide Polymorphism of rs7944135 (*MPEG1*) is Associated with Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Seroclearance in Chronic Hepatitis B Infection: A cohort study

Fenotipe organisme hidup dikendalikan oleh DNA. Variasi urutan DNA atau polimorfisme dapat menciptakan perbedaan individu, seperti perbedaan fenotipe, risiko berbagai penyakit, serta respon terhadap obat, vaksin, kimia, dan patogen. Polimorfisme umumnya terjadi di alam dan memiliki keterkaitan dengan keanekaragaman hayati, variasi genetik, dan penyesuaian diri, serta dapat membantu untuk mempertahankan berbagai perubahan di dalam populasi yang tinggal di lingkungannya agar memiliki variasi (Sukhumsirichart, 2018). Polimorfisme muncul melalui mutasi yang dapat disebabkan oleh perubahan dari satu jenis nukleotida ke yang lain, insersi atau delesi, atau penataan ulang nukleotida. Setelah terbentuk, polimorfisme dapat diwarisi seperti urutan DNA lainnya, memungkinkan pewarisannya dilacak dari orang tua hingga anak.

pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=%28%28SNP%29+AND+%28Variants%29+AND+%28Polymorphism%29%29+AND+%28gene%29&sort=...

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

PubMed.gov

Search

Log in

Advanced Create alert Create RSS

Sorted by: Best match

Display options

Save Email Send to

按分数排序

14,209 results

Page 1 of 1,421

RESULTS BY YEAR

1998 2023

TEXT AVAILABILITY

Abstract

Free full text

Full text

ARTICLE ATTRIBUTE

Associated data

ARTICLE TYPE

Clin Pharm Ther

1 Guan ZW, Wu KR, Li R, Yin Y, Li XL, Zhang SF, Li Y.
DOI: 10.1111/cpt.13025
PMID: 31430349

Pharmacogenetics of statins treatment: Efficacy and safety.

METHODS: We searched the databases including PharmGKB and PubMed (published before June 2019) using the keywords such as 'statin', 'gene polymorphism' and 'SNP' and obtained more than 100 articles. In this review, we described the clinical studies of **genet** ...

Role of the 5-HTTLPR and SNP Promoter Polymorphisms on Serotonin Transporter Gene Expression: a Closer Look at Genetic Architecture and In Vitro Functional Studies of Common and Uncommon Allelic Variants.

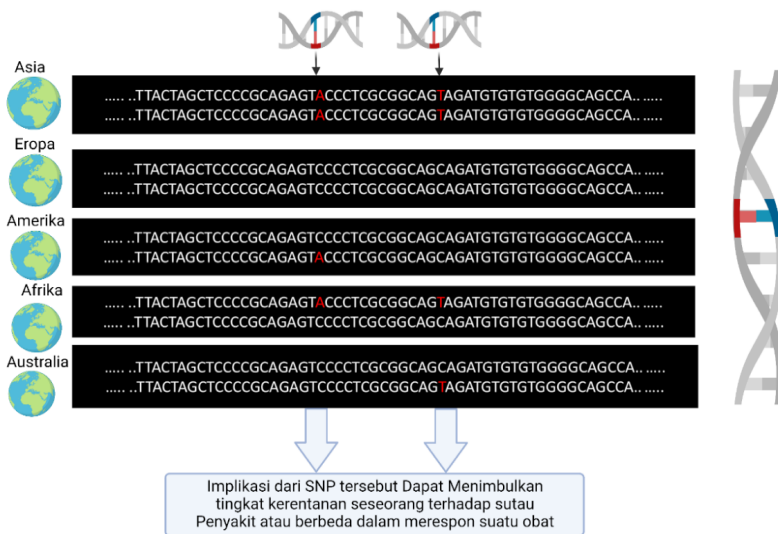
2 Iurescia S, Serpa D, Rinaldi M.
DOI: 10.1007/s12035-015-9409-6
PMID: 26464328

This length **polymorphism** gives rise to different promoter **variants**, variously influencing SLC6A4 expression. ...In this review, we detail the **ometic** architecture of the 5-HTTLPR allelic **variants** reported

Gambar 8. Hasil penelitian SNP yang dicari dengan **keyword** SNP di database PubMed pada tg/ 23 November 2022. [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/]

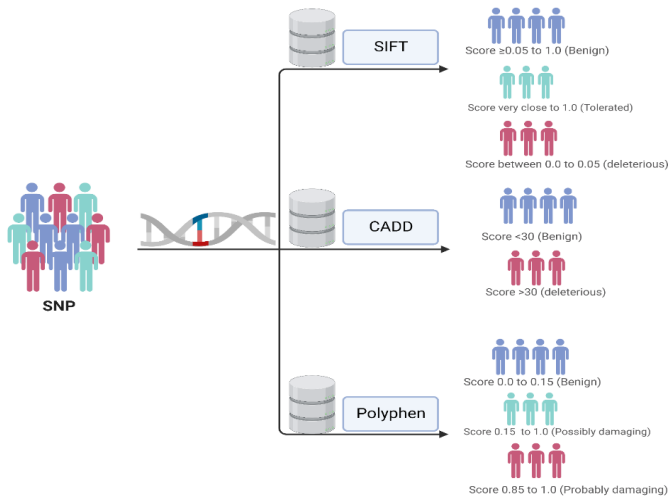
Terdapat empat jenis variasi genetik, yaitu polimorfisme nukleotida tunggal (SNP), varian nomor salinan (CNV), insersi atau delesi (indel), dan varian struktural. Polimorfisme yang paling umum dalam gen manusia yaitu polimorfisme nukleotida tunggal (*single nucleotide polymorphism* (SNP)) (Banday & Nissar, 2021).

SNP berada di situs nukleotida tertentu. Molekul DNA dalam populasi sering berbeda pada identitas pasangan nukleotida yang menempati situs tersebut. Misalnya, beberapa molekul DNA dalam populasi yang sama memiliki pasangan basa T-A di situs nukleotida tertentu, sedangkan molekul DNA lain dalam populasi yang sama memiliki pasangan basa C-G di situs yang sama. Perbedaan ini merupakan sebuah SNP. SNP didefinisikan sebagai dua alel yang memiliki tiga genotipe di antara individu-individu dalam populasi, kromosom homozigot, atau kromosom heterozigot dengan T-A dalam satu kromosom dan C-G dalam kromosom homolog (Ismail & Essawi, 2012). SNP berbeda dari varian substitusi yang menggantikan satu blok bangunan DNA (nukleotida) dengan yang lain. Varian substitusi biasanya menyebabkan penyakit dan umumnya tidak ditemukan pada 1 % populasi mana pun. Selain itu, SNP berbeda dari *Copy Number Varian* (CNV) yang terjadi ketika seluruh gen (atau bagian besar DNA lainnya) diduplikasi atau dihapus. Paling umum, SNP ditemukan dalam DNA di antara gen dan bertugas sebagai pemberi tanda biologis untuk memperoleh gen yang terkait dengan penyakit. SNP membantu memprediksi respons individu pada obat tertentu (farmakogenomik), kerentanan terhadap faktor lingkungan seperti racun, dan risiko perkembangan penyakit. SNP dapat dimanfaatkan untuk mengetahui pewarisan varian genetik terkait penyakit dalam keluarga dan penyakit rumit seperti penyakit jantung, diabetes, dan kanker (MedlinePlus Genetics, 2020).



Gambar 9. SNP atau variasi gen sangat mungkin terjadi pada setiap individu, tetapi efeknya masih belum banyak diketahui. [Nomor Copyright: SW240JG2IX}

Hingga hari ini, pemanfaatan SNP dalam bidang klinis masih belum banyak diaplikasikan. Perdebatan terkait dengan fungsinya sampai mengubah protein (SNP *protein coding gene*) masih menjadi persoalan. Mungkin teori-teori terdahulu banyak yang menyatakan bahwa hanya jenis variasi gen yang bersifat *missense* atau *nonsense* saja yang dapat dimanfaatkan di bidang klinis. Namun, kemudian banyak ilmuwan yang justru memanfaatkan variasi gen *noncoding region* atau tidak memiliki sifat *missense* dan *nonsense*. Untuk memprediksi perubahannya sampai pada level protein, dapat digunakan beberapa *scoring system* yang sudah *established*, antara lain parameter SIFT, POLYPHEN, dan CADD. Ketiganya menggunakan metode *scoring system* untuk memprioritaskan peran SNP pada perubahan protein dan mencoba mengklasifikasikan SNP yang bersifat jinak maupun berdampak pada kerentanan yang menimbulkan suatu penyakit.



Gambar 10. Masing-masing SNP memiliki tingkat keparahan berdasarkan scoring system pada jenis mutasinya. [Nomor Copyright: GF240L84T1]

C. Evaluasi/Soal Latihan

1. Mutasi gen pencetus tumor dapat terjadi pada germline atau somatic. Uraikan perbedaan keduanya.
2. Polimorfisme pada susunan DNA dapat menimbulkan fenotipe yang berbeda, tetapi dapat juga tidak mempengaruhi. Uraikan penyebab hal ini dapat terjadi.
3. Uraikan cara polimorfisme pada gen pengkode Cytochrom P450 dapat memengaruhi dosis obat yang diberikan.

Bab 4

Patofisiologi Penyakit Kanker

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa mampu menguraikan konsep terapi dan sifat-sifat obat-obat antikanker.

B. Transformasi Bakteri dan Materi Genetik

Pada tahun 1927, Griffith melakukan serangkaian percobaan pada *Streptococcus pneumoniae*, organisme penyebab pneumonia pada beberapa vertebrata, termasuk manusia dan tikus. Beberapa *strain* organisme ini bersifat virulen dan menyebabkan penyakit pada tikus, sementara yang lain bersifat virulen dan tidak menyebabkan penyakit. Perbedaan ini disebabkan oleh *strain* avirulen yang tidak memiliki kapsul polisakarida. Ketika disuntikkan ke hewan, bakteri yang tidak berkapsul dapat ditelan dan dihancurkan oleh sel darah putih, sedangkan bakteri yang berkapsul resisten terhadapnya.

Berdasarkan hal ini, dimungkinkan untuk melihat perbedaan dalam kapsulasi ketika *strain* ditumbuhkan pada media padat. Bakteri avirulen *unencapsulated* memiliki penampilan kasar-kusam, sedangkan bakteri enkapsulasi virulen memiliki penampilan mengkilap halus. Griffith menggunakan dua galur dalam eksperimennya, yaitu IIR (serotipe II, kasar, avirulen) dan IIIS (serotipe III, halus, virulen).

Hanya sel bakteri hidup yang mematikan dari *S. pneumonia* yang dapat membunuh tikus. Sel-sel virulen yang dibunuh dengan panas, sel-sel avirulen yang hidup, dan sel-sel yang avirulen yang dimatikan dengan panas tidak menyebabkan pneumonia pada tikus. Griffith menyuntikkan campuran sel virulen yang dimatikan panas dan sel avirulen hidup ke dalam tikus. Tikus-tikus ini mati karena pneumonia dan bakteri yang diisolasi darinya halus dan ganas. Kontrol yang tepat menunjukkan bahwa hanya interaksi antara sel IIS virulen halus yang mati dan sel IIR virulen kasar yang hidup yang menghasilkan sel IIS virulen halus yang hidup yang dapat menjelaskan hasil ini. Karya Dawson pada tahun 1931 menunjukkan bahwa transformasi ini dapat terjadi dalam tabung reaksi: panas yang dimatikan IIS dicampur dengan IIR hidup menghasilkan IIS hidup pada pelat. Alloway pada tahun 1933 menunjukkan bahwa ekstrak kasar sel IIS sudah cukup untuk memungkinkan transformasi genetik sel IIR hidup oleh bahan genetik dari sel IIS mati untuk menghasilkan IIS hidup.

Avery, MacLeod, dan McCarty pada tahun 1944 adalah tokoh-tokoh pertama yang secara jelas menempatkan materi genetik sebagai molekul yang menyebabkan fenomena transformasi dan mengidentifikasi molekul tersebut. Untuk melakukan ini, ekstrak kasar difraksinasi secara efektif sehingga dapat menyebabkan peristiwa transformasi. Mereka menggunakan tiga enzim: protease yang menghancurkan protein, ribonuclease yang menghancurkan RNA, dan deoxyribonuclease yang menghancurkan DNA. Penghancuran RNA atau protein tidak menghancurkan faktor transformasi dalam ekstrak sel, tetapi penghancuran DNA-lah yang melakukannya. Hal tersebut menunjukkan bahwa DNA berinteraksi dengan sel dan mengubah karakteristik sel bakteri yang diwariskan, yaitu materi genetik (Kirby, 2011).

C. Virus Bakteri T2 dan Materi Genetik

Pada tahun 1952, Hershey dan Chase menerbitkan serangkaian percobaan tentang cara virus bakteri atau bakteriofag T2 bereproduksi di inangnya, *Escherichia coli*. T2 terdiri atas lapisan protein yang mengelilingi inti DNA. Sekitar 1:1 protein menjadi DNA, T2 bereproduksi dengan mengikat melalui ekor ke permukaan *E. coli*, dan bakteriofag baru diproduksi di dalam sel. DNA tidak mengandung atom sulfur dan protein biasanya tidak mengandung atom fosfat. Hershey dan Chase menggunakan fakta ini untuk membedakan kedua biomolekul. Mereka menambahkan fosfor radioaktif P32 atau sulfur radioaktif S35 untuk mereproduksi bakteriofag T2, sehingga partikel T2 yang dihasilkan diberi label P32 dalam DNA atau S35 dalam protein.

Dalam dua percobaan terpisah, kedua jenis partikel dibiarkan bereproduksi dalam waktu singkat pada sel bakteri yang tidak berlabel, kemudian partikel bakteriofag kosong dan bakteri terinfeksi dipisahkan. Dapat ditunjukkan bahwa DNA berlabel masuk ke dalam sel bakteri, sedangkan protein berlabel tetap berada di luar. Ketika generasi baru partikel bakteriofag diproduksi, partikel ini hanya diberi label P32 yang membuktikan bahwa DNA membawa informasi genetik dari generasi ke generasi (Kirby, 2011).

D. Transkripsi

Transkripsi merupakan pesan genetik yang tersimpan dalam untaian ganda DNA yang dibuat salinan atau dibuat cetakan ke dalam bentuk molekul RNA beruntai tunggal seperti mRNA, tRNA, dan rRNA. Fase pertama pesan yang disampaikan dari DNA ke polipeptida yaitu transkripsi susunan nukleotida DNA ke susunan nukleotida RNA. Dasar dalam Biologi Molekuler adalah terbentuknya RNA dari DNA dan kemudian perubahan RNA menjadi protein. Pesan genetik DNA

pada tiap individu (geneotipe) yang diganti menjadi protein akan membawa sifat khusus individu (fenotipe) (Krause, 1995).

Transkripsi memiliki tiga proses utama, yaitu:

a. Inisiasi

Selama inisiasi, enzim mengikat urutan DNA dan melepaskan heliks ganda untuk mengekspos untai nukleotida.

b. Elongasi

Saat molekul DNA terlepas, enzim yang disebut RNA polimerase memasang nukleotida RNA komplementer dengan nukleotida DNA pada salah satu untai yang terbuka. Adenin (A) pada DNA berpasangan dengan urasil (U) pada RNA, sitosin (C) bersanding dengan guanin (G), dan timin (T) berpasangan dengan adenin (A). Misalnya, jika untai DNA membaca 'ACG,' untai RNA komplementer akan membaca 'UGC.'

c. Terminasi

Setelah gen ditranskripsi, molekul RNA baru pecah dan untai DNA dililitkan kembali. Ketika transkripsi selesai, molekul RNA bergerak ke sitoplasma sel, tempat ia akan diterjemahkan menjadi protein.

E. Translasi

Translasi merupakan pesan yang dibawa oleh gen yang di-*copy* ke dalam RNA dengan transkripsi, kemudian akan diganti menjadi rantai protein atau polipeptida. Dengan demikian, translasi dapat dijelaskan sebagai ekspresi pesan/informasi genetik yang berbentuk molekul protein. Sintesis protein memiliki tiga penyusun penting, yaitu *messenger* RNA (mRNA), transfer RNA (tRNA), dan ribosom. Selama translasi, untai mRNA digunakan untuk mensintesis rantai residu asam amino yang disebut polipeptida. Ketika mRNA meninggalkan nukleus, ia berjalan sampai mencapai ribosom. Setiap segmen tiga

basa dari untai mRNA disebut kodon. Polipeptida dibentuk dengan mencocokkan antikodon dari molekul RNA transfer (tRNA) yang masing-masing membawa asam amino spesifik ke kodon yang sesuai pada untai mRNA. Nantinya, polipeptida akan terlipat menjadi protein fungsional (Krause, 1995).

Terdapat tiga tahapan translasi, yaitu inisiasi, elongasi, dan terminasi.

a. Inisiasi

Pada tahap inisiasi, ribosom berkumpul di area mRNA untuk diterjemahkan dan tRNA pertama membawa asam amino metionin yang cocok dengan kodon awal (AUG). Pengaturan yang disebut kompleks inisiasi ini diperlukan agar translasi dapat dimulai.

b. Elongasi

Elongasi merupakan tahapan saat ikatan asam amino semakin panjang. Kodon dalam mRNA dikenali oleh tRNA yang membawa asam amino yang sesuai ke mesin translasi. Pengenalan kodon melibatkan pasangan basa antara kodon dalam mRNA dan antikodon dalam tRNA. Terdapat dua situs fungsional pada ribosom yang ditempati oleh tRNA dan yang memfasilitasi pembentukan ikatan peptide, yaitu situs P (peptidil) dan situs A (aminoasil). Setelah pembentukan ikatan peptida, tRNA yang tersisa di situs P pergi dan kompleks tRNA-peptidil pindah ke situs P. Sebuah aminoasil-tRNA baru, yang ditentukan oleh kodon mRNA, kemudian bergerak ke situs A dan pemanjangan rantai peptida berlanjut.

c. Terminasi

Terminasi adalah tahap pelepasan rantai polipeptida yang telah selesai. Tahap ini terjadi ketika kodon stop (UAG, UAA, atau UGA) masuk ke ribosom, memicu serangkaian peristiwa yang

memisahkan rantai dari tRNA, dan memungkinkannya keluar dari ribosom. Setelah terminasi, kemungkinan polipeptida harus terlipat menjadi bentuk 3D yang tepat, menjalani pemrosesan (seperti penghilangan asam amino), diantarkan ke lokasi yang sesuai di dalam sel, atau bersatu dengan polipeptida lain sebelum dapat melakukan tugasnya sebagai protein fungsional.

F. Mutasi DNA, tipe-tipe mutase, penyebab mutase, dan akibatnya

Mutasi adalah perubahan urutan genetik yang merupakan penyebab utama keanekaragaman organisme. Perubahan-perubahan ini terjadi pada banyak tingkat yang berbeda dan dapat memiliki konsekuensi yang berbeda jauh jangkauannya. Perubahan ini terjadi karena faktor genetik atau epigenetik. Perubahan-perubahan tersebut kemungkinan dapat menyebabkan perubahan fenotipik pada manusia yang berkembang menjadi suatu kelainan atau evolusi. Khususnya, genetika kita dapat memperbaiki mutasi yang tidak diinginkan selama replikasi di sebagian besar waktu (Banoon, Salih, & Ghasemian, 2022).

Dalam organisme multiseluler, terdapat dua kategori mutasi, yaitu mutasi somatik dan mutasi germline. Mutasi somatik muncul pada jaringan somatik yang tidak menghasilkan gamet. Mutasi ini diteruskan ke sel lain melalui proses mitosis yang mengarah ke populasi sel yang identik secara genetik (klon). Efek dari mutasi ini tergantung pada banyak faktor, termasuk jenis sel tempat mereka terjadi dan tahap perkembangan saat mereka muncul. Banyak mutasi somatik tidak memiliki efek yang jelas pada fenotipe organisme, karena fungsi sel mutan (bahkan sel itu sendiri) digantikan oleh fungsi sel normal. Namun, sel dengan mutasi somatik yang merangsang pembelahan sel dapat bertambah banyak dan menyebar. Jenis mutasi ini dapat menimbulkan sel dengan keunggulan selektif dan merupakan dasar

untuk semua kanker. Mutasi garis germinal muncul dalam sel yang pada akhirnya menghasilkan gamet. Mutasi ini dapat diturunkan ke generasi mendatang, menghasilkan organisme individu yang membawa mutasi di semua sel somatik dan garis germinalnya (Al-nuaimi, 2016).

1. Tipe-tipe Mutasi

Mutasi gen dapat diklasifikasikan berdasarkan pada sifat efek fenotipik (mutasi mengubah urutan asam amino protein), agen penyebab mutasi, dan yang lain fokus pada sifat molekuler dari cacat. Berikut ini merupakan beberapa tipe mutasi.

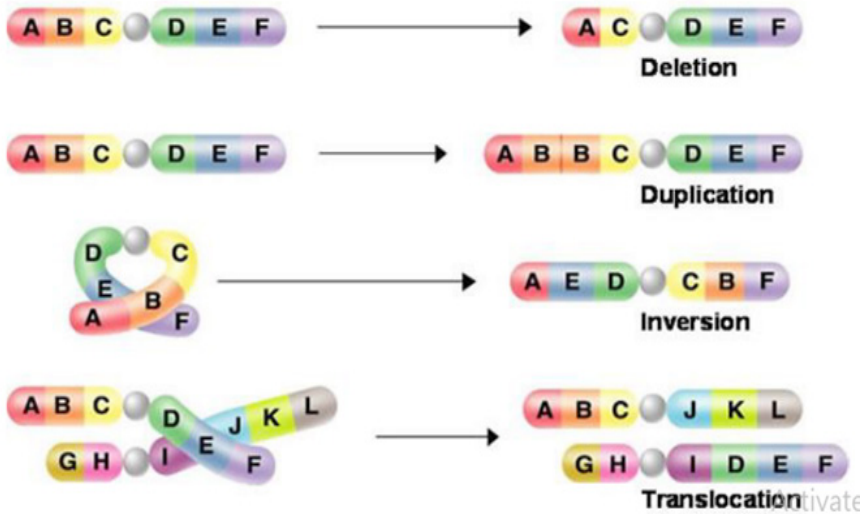
Tabel 1. Tipe-tipe Mutasi (Banoon *et al.*, 2022)

Kelas Mutasi	Tipe Mutasi	Deskripsi	Penyakit yang berhubungan
Mutasi Titik (Gambar)	Substitusi	Satu basa salah ditambahkan selama replikasi dan menggantikan pasangan pada posisi yang sesuai pada untai komplementer	Anemia sel sabit
	Inseri	Satu atau lebih nukleotida tambahan dimasukkan ke dalam DNA yang bereplikasi, sering kali menghasilkan pergeseran bingkai	Beta-thalassemia
	Delesi	Satu atau lebih nukleotida "dilewati" selama replikasi atau dihilangkan, sering mengakibatkan pergeseran bingkai	Cystic fibrosis
Mutasi Kromosomal	Inversi	Satu area kromosom dibalik dan dimasukkan kembali	Opitz-Kaveggia syndrome Cri
	Delesi	Area kromosom hilang, mengakibatkan tidak adanya semua gen di daerah itu	Cri du chat syndrome
	Duplikasi	Suatu area kromosom diulang, menghasilkan peningkatan dosis dari gen di area tersebut	Kanker
	Translokasi	Suatu kromosom secara menyimpang melekat pada kromosom lain	Salah satu bentuk Leukimia

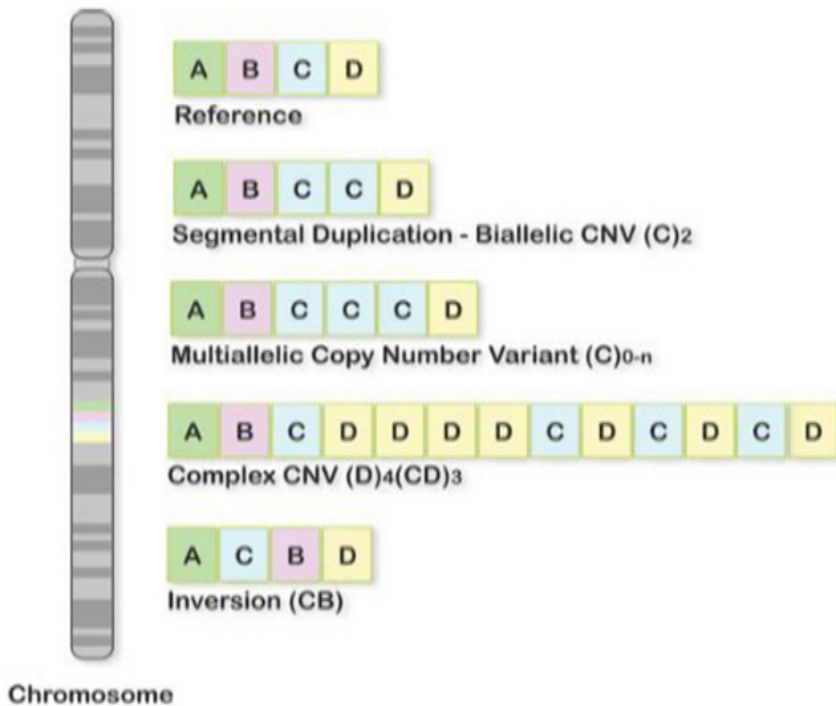
Copy Number Variation (CNV)	Amplifikasi gen	Jumlah salinan tandem dari sebuah lokus meningkat	Beberapa kanker payudara
	Memperluas pengulangan trinukleotida	Jumlah normal urutan trinukleotida berulang diperluas	Fragile X syndrome, Huntington's disease



Gambar 11. Mutasi Titik.
[Nomor Copyright: IU24OPTG48]



Gambar 12. Mutasi Kromosomal
[Nomor Copyright:UY24OPTOPG]



Gambar 13. Copy Number Variation (CNV)
[Nomor Copyright: XE24OPTYFP]

2. Penyebab Mutasi dan akibatnya

Mutasi terjadi karena faktor internal dan eksternal. Mutasi akibat perubahan alami dalam struktur DNA disebut mutasi spontan, sedangkan mutasi akibat perubahan yang disebabkan oleh bahan kimia lingkungan atau radiasi disebut mutasi induksi.

a. Perubahan Kimia Spontan

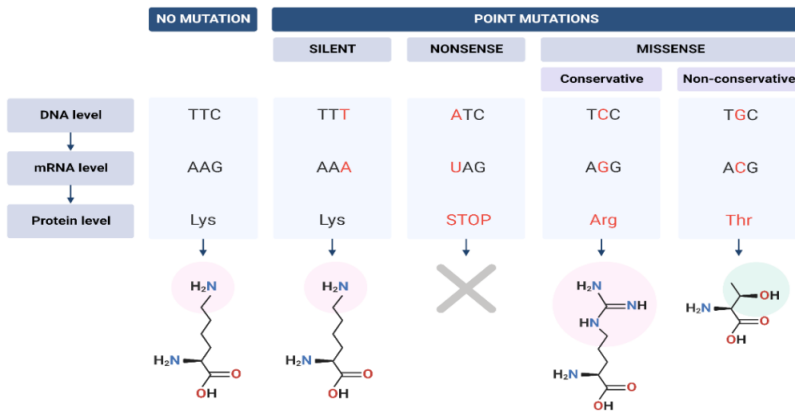
Contoh perubahan kimia spontan:

- 1) Depurinasi: hilangnya basa purin dari nukleotida. Depurinasi terjadi ketika ikatan kovalen yang menghubungkan purin dengan atom karbon 1' dari gula deoksiribosa putus.

- 2) Deaminasi: hilangnya gugus amino (NH₂) dari basa. Deaminasi dapat terjadi secara spontan atau diinduksi oleh bahan kimia mutagenik.
- b. Mutasi induksi
- 1) Disebabkan oleh bahan Kimia

Meskipun banyak mutasi muncul secara spontan, sejumlah agen lingkungan dapat merusak DNA, termasuk bahan kimia dan radiasi tertentu. Setiap agen lingkungan yang secara signifikan meningkatkan laju mutasi di atas laju spontan disebut mutagen. Agen kimia yang dapat menjadi mutagen adalah analog basa, agen alkilasi, deaminasi, hidrosilamina, reaksi oksidatif, dan agen interkalasi.
 - 2) Disebabkan oleh radiasi

Energi tinggi sinar-X, sinar gamma, dan sinar kosmik mampu menembus jaringan dan merusak DNA. Sinar ultraviolet menyebabkan mutase, terutama dengan memproduksi dimer pirimidin yang mengganggu replikasi dan transkripsi (Al-nuaimi, 2016).



Gambar 14. Ilustrasi jenis mutasi pada sekuensing DNA yang dapat menyebabkan perubahan pada protein [Nomor Copyright: PX240J9DUW]

G. Karsinogen, jenis-jenis karsinogen, dan metabolisme senyawa karsinogen

Karsinogen merupakan senyawa kimia atau gabungan zat kimia yang dapat menyebabkan kanker atau membuat kejadiannya meningkat. Zat yang menyebabkan tumor jinak dan tumor ganas pada penelitian eksperimental yang dilakukan pada hewan dianggap juga sebagai karsinogen pada manusia, kecuali terdapat bukti kuat bahwa proses terbentuknya tumor tidak sesuai untuk manusia.

Karsinogen dapat menyebabkan kanker dengan tindakan langsung dalam DNA seluler atau melalui mekanisme yang menghasilkan spesies kimia (seperti radikal bebas, spesies oksigen reaktif, metabolit karsinogenik) yang masuk ke dalam inti sel yang menyebabkan mutasi pada DNA seluler. Kanker yang disebabkan oleh bahan kimia umumnya berkembang bertahun-tahun setelah terpapar agen karsinogenik (Valavanidis & Vlachogianni, 2010).

1. Jenis-jenis karsinogen

Terdapat dua jenis karsinogen, yaitu:

- a. pro-karsinogen: karsinogen proximate tidak aktif yang memiliki peran yang penting dan metabolismenya terjadi di dalam tubuh
- b. karsinogen ultimate: karsinogen yang sangat reaktif. Karsinogen ultimate masuk ke dalam sel dan bersama DNA menjadi senyawa rumit DNA-karsinogen yang dapat membuat perubahan atau memberikan kerusakan transkripsi atau translasi genetik.

2. Metabolisme senyawa karsinogen

Berbagai bahan kimia menggunakan aktivasi metabolik untuk menerapkan potensi karsinogeniknya. Karsinogen kimia dapat diserap dalam banyak cara (oral, inhalator, kulit, dan injeksi) dan tersebar

di antara berbagai jaringan. Penyerapan ini bergantung pada sifat fisikokimia zat dan terjadi melalui mekanisme transpor aktif atau pasif. Zat-zat yang diserap secara oral melewati hati dan kemudian tersebar di dalam tubuh yang diserap di paru-paru didistribusikan oleh darah sebelum mencapai hati pada tahap selanjutnya. Semua bahan kimia menjalani metabolisme melalui jalur enzim yang berbeda kinetika dan tingkat saturasinya. Jalur metabolisme tersebut membantu memroses dan mendetoksifikasi bahan kimia berbahaya.

Reaksi-reaksi ini telah dikategorikan ke dalam metabolisme fase I dan fase II.

- a. Fase I mengekspos dan memperkenalkan gugus fungsi ke dalam molekul dengan tujuan untuk mengurangi toksisitas xenobiotik. Namun, reaksi fase I ini menyebabkan aktivasi pro karsinogen menjadi karsinogen yang aktif. Enzim yang dihasilkan pada fase I berkontribusi dalam reaksi oksidasi, reduksi, dan hidrolisis, dan dengan demikian dikatalogkan sebagai oksidoreduktase (monooksigenase tergantung sitokrom P450, monooksigenase flavin, siklooksigenase, dan alkohol dehidrogenase) dan hidrolase (epoksida hidrolase).
- b. Fase II melibatkan serangkaian reaksi konjugasi dengan molekul endogen ditambahkan ke bahan kimia xenobiotik. Metabolisme fase II mengkonjugasikan turunannya dengan molekul asam polar yang larut dalam air dan endogen. Namun, jalur metabolisme detoksifikasi ini memiliki kemampuan untuk secara kebetulan melakukan bioaktivasi karsinogen kimia. Enzim fase II mengambil bagian dalam konjugasi dan inaktivasi karsinogen kimia dan terdiri atas transferase (glutathione S transferases, N-acetyltransferases, UDP-glucuronosyltransferases, sulphotransferases).

Isoenzim sitokrom 450 adalah kelompok enzim yang paling umum terlibat dalam metabolisme karsinogen. Dalam peroksidasi

juga terjadi analog dengan reaksi metabolik dengan produksi konstan ROS yang berkorelasi dengan banyak penyakit kronis dan dengan karsinogenesis kimia. ROS merusak DNA, RNA, dan protein melalui reaksi kimia spesifik seperti oksidasi, nitrasi/nitrosasi, dan halogenasi yang menyebabkan peningkatan mutasi dan perubahan fungsi enzim dan protein penting. Prokarsinogen yang lebih banyak diaktifkan oleh mekanisme yang mencakup dua elektron reaksi metabolik yang dimediasi terutama dikatalisis oleh sistem enzim oksidase fungsi campuran, sering kali termasuk enzim sitokrom P-450 (CYP). Mutasi pada gen yang setara dan sesuai mempromosikan karsinogenesis dan perkembangan tumor. Sistem enzim lain yang dapat berkontribusi dalam reaksi aktivasi satu elektron ini menggabungkan peroksidase konstitutif seperti myeloperoksidase dan lactoperoksidase (keduanya dapat mengaktifkan xenobiotik) (Kabirai *et al.*, 2020).

H. Proliferasi sel: Siklus sel, Mekanisme proliferasi, dan gen-gen yang berperan dalam proliferasi

1. Siklus sel

Terjadinya peristiwa seluler & molekuler antara satu pembelahan sel ke pembelahan sel selanjutnya dinamakan 'siklus sel'. Rincian peristiwa dapat bervariasi dari organisme ke organisme dan juga pada waktu yang berbeda dalam siklus hidup organisme. Siklus sel terdiri atas serangkaian proses minimum yang harus dilakukan sel untuk menyelesaikan tugas paling mendasarnya, yaitu untuk menyalin dan meneruskan informasi genetik ke generasi sel berikutnya. Untuk menyelesaikan tugas ini, DNA harus direplikasi dengan tepat dan kromosom yang diduplikasi harus dipisahkan secara akurat menjadi dua sel anak sehingga setiap sel menerima salinan seluruh genom. Sel (sel induk) tumbuh dan membelah, untuk membentuk sel baru (sel anak) yang berisi semua informasi genetik dari sel induk. Oleh karena

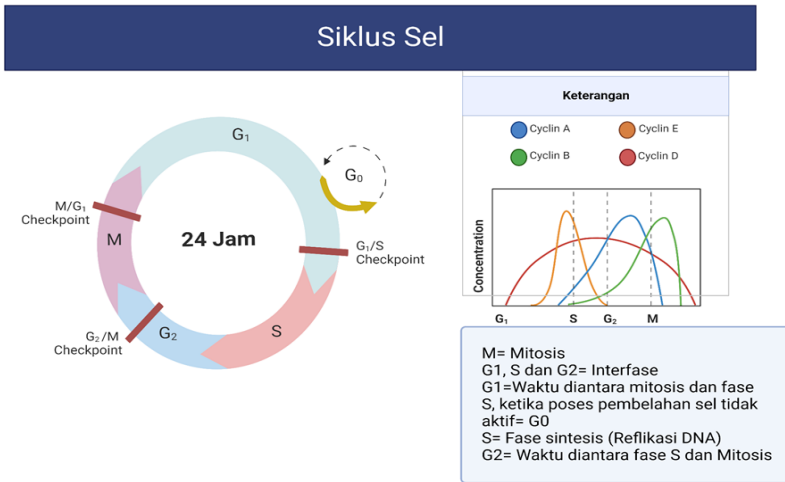
itu, semua DNA sel induk harus diduplikasi dan didistribusikan secara hati-hati ke sel anak selama proses normal pembelahan sel untuk keseragaman genetik. Dalam melakukan ini, sel melewati serangkaian tahapan diskrit yang secara kolektif dikenal sebagai siklus sel yang dapat dilihat di Gambar 15. Siklus sel pada dasarnya terdiri atas dua fase, yaitu (Toteja, 2016):

a. Interfase

Interfase sitologis muncul sebagai fase istirahat dan mempersiapkan sel untuk masuk ke fase M. Interfase dibagi menjadi G1 (Gap periode 1) = Pertumbuhan dan persiapan kromosom untuk replikasi, S (Periode Sintesis) = Sintesis DNA (dan entrosom), dan G2 (Periode Celah 2) = Persiapan untuk mitosis. Selama G2 sel mengandung dua kali (4C), jumlah DNA yang ada pada tahap diploid asli (2C). Setelah mitosis, sel anak kembali memasuki periode G1 dan kembali memiliki kandungan DNA yang setara dengan 2C.

b. Mitosis atau meiosis atau fase M

Mitosis atau meiosis atau fase M sebagai sel adalah mitosis pada sel somatik dan meiosis pada sel germinal. Fase M dibagi menjadi dua fase, yaitu proses mitosis saat kromosom yang digandakan dipisahkan menjadi dua inti, dan proses sitokinesis saat seluruh sel membelah menjadi dua sel anak.



Gambar 15. Siklus Sel
[Nomor Copyright: BT240JAV6N}

2. Mekanisme proliferasi

Proliferasi sel diartikan sebagai jumlah sel yang meningkat akibat sel yang bertumbuh dan membelah. Proliferasi sel memiliki laju yang bervariasi dari satu sel ke sel lainnya, tergantung pada asal dan stadium sel. Keberadaan lebih lanjut dari berbagai faktor pertumbuhan, agen farmakologis, polutan, dan sebagainya juga turut memengaruhinya (Yadav *et al.*, 2014). Faktor pertumbuhan atau *growth factor* memanfaatkan beberapa jalur persinyalan untuk memulai tahap proliferasi sel.

3. Gen-gen yang berperan dalam proliferasi

Gen-gen yang berperan dalam memberikan kode pesan untuk kemajuan ekspresi *growth factors* (GFs) dan *growth factors receptors* (GFRs) untuk terbentuknya autokrin *loop* sehingga menuju peristiwa selanjutnya, yaitu E-26 (ET) yang mengkode faktor-faktor transkripsi. Jun dan Myc memulai transkripsi gen hilir seperti *cyclin D*, yang berasosiasi dengan kinase yang bergantung pada *cyclin* (CDK) untuk

memfosforilasi protein Rb. Proses pertama dimulai pada fase G1, kemudian jalur pensinyalan mengirim informasi ke nukleus untuk memulai kaskade transkripsi yang diakhiri dengan fosforilasi protein retinoblastoma (Rb) di situs restriksi. Jalur pensinyalan yang bergantung pada sinyal terlibat dalam penurunan faktor pertumbuhan selama fase G1 berfungsi untuk memicu proses penyelesaian siklus sel bertahap, kemudian siklus sel endogen melalui mekanisme pensinyalan berbasis *cyclin* (Berridge, 2014).

I. Apoptosis: gen-gen yang berperan dalam apoptosis, kecacatan apoptosis, dan akibatnya

Apoptosis adalah urutan kematian sel yang terjadi secara teratur untuk memastikan keseimbangan homeostatis antara laju pembentukan sel dan kematian sel. Namun, fungsi penyeimbang yang salah dapat berkontribusi pada pertumbuhan/proliferasi sel abnormal atau gangguan autoimun dan lain-lain. Oleh karena itu, apoptosis dikatakan penting dari sudut perkembangan embrio sepanjang pertumbuhan organisme yang berkontribusi pada pembaruan jaringan dan juga menyingkirkan sel-sel inflamasi (Obeng, 2021).

1. Gen-gen yang berperan dalam apoptosis

Pada manusia, teridentifikasi bahwa gen CED protein homolog apoptosis protease *activating* (Apaf) menjadi pencetus terjadinya apoptosis di tubuh. Gen manusia Apaf homolog dengan CED-3, dan selanjutnya menghasilkan caspase 9 (yang merupakan gabungan antara apaf 1 dan apaf 2). Apaf 1 homolog dengan protein CED-4 di nematode. Apaf 2 merupakan kofaktor ke Apaf 1 mengaktifkan caspase 9. Apaf 3 yang homolog serupa dengan CED-3 ternyata adalah caspase 9. Caspase bukan merupakan enzim proteolitik yang diaktifkan pada tahap awal apoptosis, melainkan bertugas sebagai pencetus pada tahap pelaksanaan apoptosis (Wulandari, 2011).

2. Kecacatan apoptosis dan akibatnya

Terjadinya kecacatan atau ketidaktepatan pada proses apoptosis individu dapat menyebabkan beberapa penyakit seperti kanker, gangguan neurodegeneratif, serta beberapa jenis gangguan autoimun. Terjadinya apoptosis yang berlebihan dan regulasi aktivitas caspase yang tidak sehat berhubungan dengan penyakit tertentu seperti Alzheimer, Parkinson, dan Huntington. Peningkatan aktivitas caspase-8 dan caspase-9 telah diamati pada sel mononuklear darah perifer dan jaringan otak penderita Alzheimer serta pasien Parkinson dan Huntington.

Gangguan neurodegeneratif juga disebabkan oleh peningkatan aktivitas caspase-10 dengan cara yang mirip dengan caspase-8. Hilangnya ekspresi caspase-14 dikaitkan dengan perkembangan kanker ovarium dan mutasi pada gen p53 dapat menyebabkan penyakit neoplastik. Oleh karena itu, jalur apoptosis memiliki keterkaitan dengan beberapa proses biologis dan memainkan peran penting dalam mengatur berbagai penyakit (Rastogi *et al.*, 2009).

J. Uji Kemoterapi

Kemoterapi adalah penggunaan obat untuk menghancurkan sel kanker. Obat ini dapat diberikan melalui suntik, infus vena, sediaan pil, atau cairan sebagai terapi adjuvant, konsolidasi, induksi, intensifikasi, pemeliharaan, neoadjuvant, atau paliatif. Obat ini tidak hanya menghancurkan sel kanker, tetapi juga akan menghancurkan sel normal, sehingga menimbulkan efek samping. Prosedur pemberian obat kemoterapi ialah sebagai berikut:

1. Persiapan obat (kemoterapi dan obat *emergency* dan *extravasation kit*)
 - a. Dosis

Kecuali ada persyaratan data khusus, dosis ditentukan dengan menggunakan luas permukaan tubuh (BSA) yang dikenal dengan mengukur TB dan BB.
 - b. Penyimpanan dan Stabilitas

Baca petunjuk penyimpanan dan penyimpanan masing-masing obat agar obat tetap dalam kondisi baik. Obat yang tidak mengandung *post-opening/reconstitution retention* (oplos) harus dibuang dalam waktu 8-24 jam.
 - c. Persiapan (pelarut)

Pelarut untuk setiap obat biasanya disebutkan dalam pernyataan penggunaan untuk setiap obat. Terkadang ada pelarut yang tidak cocok dengan obat tertentu. Pelarut yang biasa digunakan adalah Dekstrosa 5% atau NaCL fisiologis. Pembubaran/persiapan dilakukan di lokasi tertentu oleh tenaga terlatih (dokter, perawat) atau apoteker.
2. Persiapan penyedia layanan
 - a. Kenakan jas atau jas khusus
 - b. Gunakan masker sekali pakai
 - c. Penggunaan sarung tangan karet
 - d. Kenakan topi untuk melindungi kepala Anda
 - e. Gunakan kaca mata pengaman untuk melindungi dari percikan obat tanpa menghalangi bidang pandang Anda (kaca *goggle*)
 - f. Berpendidikan baik.
3. Persiapan peralatan dan penyiapan cairan
 - a. Alat suntik halus, abbocath/surflo nomor 20 atau 22, alat suntik *disposable* 5 cc, 20 cc, dan 30 cc
 - b. Satu set infus khusus digunakan untuk obat-obatan dari kelas taxane

- c. Larutan NaCl 0,9% 100 cc, NaCl 0,9% 500 cc, dan Aquadest 25 cc
 - d. *Syringe pump* (jika ada)
 - e. Alas penyuntikan untuk menghindari obat terkena alas tempat tidur
4. Teknik pemberian kemoterapi
- a. Preterapi diawali dengan injeksi deksametason 10-20 mg/iv (berfungsi sebagai antiemetik), simetidine 300 mg/ranitidine 50 mg, dan ondansetron 8mg/tropisetron 5 mg/granisetron 3 mg.
 - b. Agen kemoterapi dimasukkan sesuai dengan jenis keganasan dan praktek manajemennya.

K. Uji Ko Kemoterapi

Ko-kemoterapi atau kombinasi kemoterapi merupakan terapi dengan kombinasi dari zat dengan obat kemoterapi. Tujuan dikombinasi adalah supaya menambah efektivitas pengobatan dan mengurangi efek yang terjadi karena agen kemoterapi. Kombinasi obat pada ko kemoterapi memiliki efek sinergisme terhadap sel kanker dan dapat menoleransi toksisitas menjadi lebih efisien daripada agen tunggal secara klinik. Oleh karena itu, rancangan kombinasi yang sesuai dibutuhkan untuk mendapatkan manfaat yang maksimal.

Prosedur yang dilakukan ialah sebagai berikut (CCRC, 2010):

1. Ikuti arahan Persiapan Kerja *In Vitro* di Laboratorium.
2. Ambil cawan berisi sel dari inkubator CO₂, cermati kondisi sel pada mikroskop.
3. Saat sel sudah waktunya untuk diambil, siapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
4. Sel dipanen seperti protokol Pemanenan Sel.
5. Hitung jumlah sel sesuai protokol pemanenan sel.

6. Encerkan suspensi sel sehingga konsentrasi akhir sel menjadi 5×10^3 sel/100 μ l MK.
7. Pindahkan sel ke sumur, masing-masing 100 μ l.
8. Biarkan 3 sumur kosong (jangan isi sel) untuk kontrol media.
9. Amati keadaan sel di bawah mikroskop untuk melihat pembelahan sel. Foto dengan kamera.
10. Inkubasi sel dalam inkubator, dokumentasikan setelah 2 jam dan laporkan kepada staf atau manajemen jika sel siap untuk perawatan.
11. Saat sel kembali normal, segera tentukan rentang konsentrasi sampel dan obat kemoterapi (misdoksorubisin) untuk pengobatan.
12. Lepaskan pelat sel dari inkubator
13. Buang media sel dengan membalikkan pelat 180° di atas area pembuangan, lalu ketuk perlahan pelat dengan handuk kertas untuk mengalirkan kelebihan cairan.
14. Cuci sel pada setiap well dengan 100 μ l PBS.
15. Buang PBS, tiriskan kelebihan cairan dengan tisu.
16. Kelompok terapi gabungan: tempatkan seri konsentrasi sampel @ 50 μ l dalam sumur dalam rangkap tiga (*triplicate*), kemudian tambahkan seri konsentrasi doxorubicin @ 50 μ L untuk kombinasinya.
17. Kelompok perlakuan individu: tambahkan seri konsentrasi sampel atau agen kemoterapi ke dalam sumur sebanyak 50 μ L dalam tiga ulangan (tiga kali lipat) dan kemudian tambahkan MK sebanyak 50 μ L ke dalam sumur.
18. Untuk manajemen sel: tambahkan MK ke sumur sel sebanyak 100 μ L dalam 3 kali ulangan (tiga ulangan).
19. Pengendalian Lingkungan: Tambahkan MK ke sumur kosong (tanpa sel) @ 100 μ l dalam tiga ulangan (tiga kali lipat).
20. Inkubasi dalam inkubator CO₂.

21. Dokumentasikan dengan kamera pada akhir masa inkubasi untuk melihat kondisi sel dengan masing-masing perlakuan.
22. Siapkan larutan MTT 5 mg/mL dengan menimbang 50 mg bubuk MTT dan larutkan (dengan vorteks) dalam 10 mL PBS. Siapkan reagen terapeutik MTT (0,5 mg/mL) dengan mengambil 1 mL larutan MTT 5 mg/mL dan encerkan dengan 10 mL MK-ad.
23. Buang media sel, cuci masing-masing satu kali dengan 100 μ l PBS
24. Tambahkan 100 μ l MTT Reagent 0,5 mg/ml ke dalam 100 μ l tiap well, termasuk media kontrol (tanpa sel).
25. Inkubasikan sel dalam inkubator selama 2-4 jam hingga terbentuk kristal formazan berwarna ungu.
26. Setelah 2-4 jam, periksa kondisi sel dengan mikroskop terbalik. Bila formazan sudah terbentuk dengan jelas, tambahkan sumbat SDS 10° dalam HCl 0,1N.
27. Bungkus piring dengan kertas atau aluminium foil dan inkubasikan di tempat gelap pada suhu kamar hingga semalam.
28. Keesokan harinya, piring dikocok selama 10 menit untuk melarutkan formazan.
29. Nyalakan ELISA *reader* dan tunggu proses progresif selesai.
30. Buka penutup disk dan tutup disk. Colokkan ke ELISA *reader*.
31. Baca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA *reader* =550-600 nm (595 nm) dengan menekan tombol START.
32. Setelah semua lubang terbaca, tekan tombol STOP dan matikan ELISA *reader*.
33. Catat hasil ELISA dan lampirkan pada *log book*. Mentransfer hasil ELISA ke Excel secara instan.
34. Hitung persentase sel hidup yang dihasilkan dari pengobatan dengan senyawa gabungan.
35. Hitung harga CI (Indeks Kombinasi).

36. Setelah setiap pekerjaan, lakukan sanitasi di laboratorium sesuai protokol persiapan untuk pekerjaan *in vitro*.

L. Uji Kemopreventif

Kemopreventif kanker merupakan penggunaan agen kimia alami, sintetis, atau biologis untuk membalikkan, menekan, atau mencegah perkembangan karsinogenik menjadi kanker invasif. Ada dua golongan obat kemopreventif berdasarkan tujuan mencegah perkembangan sel kanker, yaitu:

1. agen antitumor atau antimutagenesis

Agen antitumor atau antimutagenesis bertujuan untuk melindungi sel normal dari paparan atau efek negatif karsinogen, sehingga mencegah kerusakan sel dan mutasi sel

2. *tumour-suppressing agents* atau antikarsinogenesis

Agen ini disebut pula antikarsinogenesis karena mencegah perkembangan proses neoplastik setelah terjadi kerusakan sel akibat paparan karsinogen.

Agen kemopreventif kanker dapat diklasifikasikan dalam empat kategori utama, yaitu hormonal, obat-obatan, agen terkait diet, dan vaksin.

1. Agen Kemopreventif hormonal

Agen kemopreventif hormonal diklasifikasikan dalam dua subkategori, yaitu antiestrogen dan antiandrogen.

- a. Antiestrogen

- 1) Modulator reseptor estrogen selektif (SERM)

SERM membentuk kelompok senyawa beragam yang menunjukkan tingkat aktivitas reseptor estrogen spesifik jaringan (ER) yang bervariasi: dapat bersifat antagonis maupun agonis, tergantung pada jaringan target. SERM mengerahkan aktivitas antagonis pada jaringan payudara dan aktivitas agonis

pada sistem kerangka. Beberapa SERM telah dilaporkan menunjukkan efek agonis ER pada vagina dan efek antagonis pada endometrium, yang terakhir bila dikombinasikan dengan estrogen.

2) Inhibitor Aromatase

Inhibitor aromatase (AIs) menghambat enzim aromatase yang mengkatalisasi prosedur aromatisasi yang mengubah androgen menjadi estrogen. Data terbaru menunjukkan bahwa anastrozole dan exemestane terkait dengan penurunan kejadian kanker payudara di kalangan wanita yang berisiko tinggi terkena penyakit ini. Mereka ditoleransi dengan baik, meskipun beberapa peneliti menunjukkan bahwa pemantauan yang cermat terhadap efek samping yang terkait dengan nyeri sendi dan gejala menopause harus diterapkan dalam uji klinis besar. AIs juga dapat digunakan sebagai agen kemoprevensi alternatif untuk wanita pascamenopause berisiko tinggi yang menginginkan kemoprevensi dan memiliki kontraindikasi untuk penggunaan SERM.

b. Antiandrogen

Testosteron dan dihidrotestosteron (DHT) sangat penting untuk pertumbuhan normal dan fungsi prostat. Peran antiandrogen dalam pencegahan kanker prostat bergantung pada hipotesis bahwa androgen mungkin terlibat dalam etiologi kanker prostat dan menekan sintesis DHT, sehingga dapat menghambat karsinogenesis. Enzim 5-alpha-reductase dapat mengubah testosteron menjadi DHT androgen intraseluler yang lebih aktif, dan antiandrogen 5-alpha-reductase inhibitors (5-ARIs) memblokir proses dengan menghambat enzim ini. 5-ARIs, finasteride, dan dutasteride telah diuji sebagai agen kemopreventif untuk kanker prostat.

2. Obat-obatan

Sebelumnya, aspirin dan obat antiinflamasi lainnya dapat digunakan sebagai agen kemopreventif. Namun, potensi peran kemopreventif kanker yang berkembang saat ini adalah statin dan metformin.

a. Aspirin dan obat antiinflamasi lainnya

Obat antiinflamasi nonsteroid (NSAID) dapat memiliki sifat kemopreventif kanker, salah satunya aspirin. Senyawa lainnya yaitu indometasin dan piroksikam. Berbagai hipotesis telah diajukan untuk menjelaskan sifat kemopreventif NSAID. Hipotesis yang paling menonjol di antara mereka adalah tentang penghambatan siklooksigenase (COX). COX-1 dan COX-2 adalah enzim yang diperlukan untuk sintesis prostaglandin inflamasi dari asam arakidonat, dan NSAID menghambat enzim ini. COX-2 diyakini diekspresikan secara berlebihan pada tahap awal karsinogenesis usus besar.

b. Statin

Statin (3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktase inhibitor) dimanfaatkan sebagai obat penurun kolesterol, tetapi juga menarik perhatian sebagai agen kemopreventif kanker. Pengurangan sintesis mevalonat dengan menghambat 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktase telah dimanfaatkan untuk mekanisme yang mungkin menekan pertumbuhan tumor yang diinduksi statin, induksi apoptosis, dan penghambatan angiogenesis.

c. Metformin

Metformin adalah obat yang biasa diresepkan untuk diabetes tipe 2 dan termasuk dalam kelas biguanide. Peran penting metabolisme energi dalam pertumbuhan dan proliferasi sel menyiratkan bahwa obat antidiabetes atau pengubah

metabolisme dapat memiliki nilai pencegahan dan terapeutik.

3. Agen diet Kemopreventif

Beberapa mikronutrien dapat menjadi sebagai agen pencegah kanker yang potensial. Salah satunya adalah antioksidan karena dapat melindungi dari stres oksidatif. Efek kemopreventif antioksidan dan zat gizi mikro lainnya adalah sebagai berikut:

a. Karotenoid

Karotenoid ditemukan dalam sayuran dan termasuk xanthophylls (misalnya, lutein) dan karoten (misalnya, beta-karoten dan likopen). Betakaroten dan karotenoid lainnya dapat diubah menjadi retinol dan karena itu disebut oleh beberapa orang sebagai “pro-vitamin A”.

b. Vitamin A dan retinoid

Retinoid diperlukan untuk pemeliharaan pertumbuhan dan diferensiasi sel normal. Uji coba ATBC dan CARET menemukan peningkatan yang signifikan dalam penyembuhan kejadian kanker paru-paru yang diberi retinol/beta-karoten.

c. Asam Folat

Asam folat atau vitamin B yang larut dalam air, merupakan kofaktor penting dalam metabolisme satu karbon. Folat memiliki efek modulasi ganda pada karsinogenesis kolorektal yang tergantung pada waktu dan dosisnya. Suplementasi asam folat tingkat sedang dapat menekan perkembangan kanker, sedangkan dosis tambahan yang tinggi dapat meningkatkannya. Defisiensi folat menghambat perkembangan neoplasma kolorektal yang sudah mapan, sedangkan suplementasi folat memiliki efek mempromosikannya.

d. Vitamin C

Vitamin C adalah antioksidan yang larut dalam air dan kofaktor enzim. Vitamin C memiliki dua bentuk kimia, yaitu

bentuk tereduksi (asam askorbat) dan bentuk teroksidasi (asam dehidroaskorbat). World Cancer Research Fund (WCRF) dan American Institute for Cancer Research menyimpulkan bahwa diet vitamin C dapat mengurangi risiko perut serta kanker mulut, kanker faring, kanker kerongkongan, kanker paru-paru, kanker pankreas, dan kanker serviks. Namun, dalam laporan mereka yang diperbarui pada tahun 2007, hanya bukti yang berkaitan dengan kanker kerongkongan yang dianggap mungkin terjadi dan tidak ada bukti bahwa suplementasi vitamin C mengubah risiko kanker.

e. Vitamin D

Vitamin D memainkan peran penting dalam metabolisme kalsium serta memberikan berbagai fungsi fisiologis lainnya. Studi eksperimental telah menunjukkan bahwa banyak jenis sel, termasuk sel kolorektal, mengekspresikan reseptor vitamin D dan memiliki efek antitumor.

f. Vitamin E

Vitamin E adalah vitamin yang larut dalam lemak dengan aktivitas antioksidan, di antaranya kelompok senyawa yang mencakup tokotrienol dan α -tokoferol. α -tokoferol adalah yang paling aktif secara biologis.

g. Kalsium

Kalsium diketahui efektif untuk pencegahan kekambuhan adenoma pada populasi dengan riwayat adenoma, tetapi tidak ada hubungan yang ditemukan untuk kanker kolorektal.

h. Selenium

Selenium adalah kofaktor penting untuk enzim antioksidan utama glutathione peroksidase, yang melindungi dari kerusakan oksidatif pada lipid, lipoprotein, dan DNA.

i. Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa polifenol yang menghambat enzim pengaktif karsinogen dan memiliki berbagai sifat antioksidan. Buah-buahan dan sayuran, bersama dengan teh dan anggur, merupakan sumber makanan utama flavonoid.

j. Suplemen Multivitamin/multimineral

National Institutes of Health, dalam pernyataan State-of-the-Science tentang suplemen multivitamin/multimineral dan pencegahan penyakit kronis, menunjukkan data yang langka tentang kemanjuran dan keamanan penggunaan suplemen multivitamin dan mineral dalam pencegahan primer penyakit kronis di populasi dewasa.

4. Vaksin untuk pencegahan kanker

Beberapa infeksi telah dikaitkan dengan peningkatan risiko kanker, tetapi hanya dua vaksin melawan agen infeksi yang saat ini digunakan dalam praktik klinis untuk pencegahan kanker, yaitu vaksin melawan virus hepatitis B (HBV) dan vaksin melawan virus papiloma manusia (HPV).

Uji Kemopreventif dapat dilakukan secara *in vivo* dengan langkah sebagai berikut:

- a. Preparat jaringan yang diperoleh dari hasil pembedahan hewan uji dideparafinasi dengan xylol (pa) dua kali masing-masing selama 3 menit, kemudian direhidrasi dengan alkohol bertingkat (absolut, 95, 90, 80, dan 96%) dan air masing-masing selama 5 menit.
- b. Preparat dicuci di bawah kran sebentar, kemudian dicuci dengan PBS. Untuk menghilangkan aktivitas peroxidase endogen, preparat direndam dalam peroxidase *blocking solution* (1:9) pada temperatur kamar selama 10 menit atau di bawah air kran selama 5 menit.
- c. Preparat diinkubasikan dalam *prediluted blocking serum* selama 10 menit pada suhu 25° C. Antibodi primer antibodi monoklonal yang telah

- dipersiapkan ditambahkan sebanyak 100 μL dengan konsentrasi 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ per preparat (d disesuaikan sampai semua bagian tergenang), kemudian diinkubasikan pada nampan lembab pada temperatur kamar (25°C). Preparat sampel berturut-turut diinkubasikan dengan antibodi monoklonal yang digunakan untuk uji.
- d. Preparat selanjutnya dicuci dengan PBS (segar) selama 5 menit. *Biotinylated universal secondary antibody* sebanyak 100 μL (siap pakai) ditambahkan ke tiap preparat, kemudian preparat tersebut diinkubasikan pada temperatur kamar (25°C) selama 5 menit. Cuci dengan PBS segar selama 5 menit.
 - e. Preparat diinkubasikan dengan *ready-to-use* streptavidin/ peroxidase complex reagen selama 10 menit. Cuci hasil tersebut selama 5 menit dengan PBS.
 - f. Preparat diinkubasikan dalam peroxidase *substrate solution* (DAB) 100 μL (1:9) per preparat selama 2-10 menit (semakin tebal preparat, waktu inkubasi semakin lama), kemudian dicuci dengan air kran.
 - g. Mayer hematoxylin (counterstain) sebanyak 100 μL ditambahkan, diinkubasikan selama 1-3 menit, kemudian dicuci di bawah air kran.
 - h. Preparat kemudian dicelupkan ke dalam alkohol, dibersihkan, dicelupkan ke dalam ksilol. Preparat selanjutnya ditetesi dengan *mounting* media kemudian ditutup dengan *glass*.
 - i. Setelah kering, preparat siap diperiksa di bawah mikroskop pada pembesaran 400 kali dan 1000 kali. Preparat yang memperlihatkan warna coklat berarti protein yang diekspresikan dari gen, sedangkan preparat yang menunjukkan warna biru berarti tidak mengandung protein yang diekspresikan (Anonim, 2004). Antibodi yang digunakan adalah COX-2, Bcl-2, kaspase-3, P53, P21, GADD45, dan Ras.

M. Uji Ko Kemopreventif

Salah satu cara untuk meningkatkan efikasi kemopreventif adalah penggunaan kombinasi yang mengandung dua atau lebih obat. Akan lebih menguntungkan apabila obat memiliki mekanisme aksi dan potensi toksisitas yang berbeda. Salah satu cara untuk meningkatkan kemanjuran dan mencegah terjadinya atau berkembangnya kanker adalah dengan menggunakan agen ko-kemopreventif. Obat kemopreventif diperlukan untuk mengurangi efek samping dan meningkatkan efektivitas pengobatan. Pencarian agen kemopreventif sangat penting mempertimbangkan selektivitasnya untuk mengurangi efek samping. Agen ko-kemopreventif bekerja selektif pada sel kanker dan aman untuk sel normal.

Agen ko-kemopreventif dapat mencakup senyawa yang memiliki aktivitas kemopreventif serta yang memiliki kemanjuran minimal atau tidak sama sekali, tetapi bila diberikan bersama dengan agen kemopreventif yang efektif dapat meningkatkan kemanjurannya dalam mencegah tumor dan kanker. Atorvastatin (statin yang menghambat 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA reduktase) kemungkinan merupakan agen kemopreventif, karena memiliki aktivitas minimal dalam mencegah tumor paru-paru tikus, sekaligus meningkatkan aktivitas Polyphenon E.

Uji ko-kemopreventif dapat dilakukan dengan uji MTT, yaitu sebagai berikut:

1. Sel-sel dibagi menjadi sumuran (10.000 sel/sumur untuk MCF7, sel HeLa dan Vero, 5.000 sel/sumur untuk 4T1) kemudian diinkubasi hingga kondisi normal kembali.
2. Sel kemudian diinkubasi dengan berbagai konsentrasi senyawa uji selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C. Pada akhir inkubasi, 100 µl media MTT 5 mg/ml ditambahkan ke masing-masing sumur.

3. Inkubasi lagi selama 4 jam. Sel hidup bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen stop (HCl 10 μ M SDS) dan diinkubasi semalaman pada suhu kamar. Absorbansi dibaca menggunakan ELISA *reader* pada λ 595 nm. Parameter yang didapat dari pengujian adalah IC50. Indeks selektivitas dihasilkan dari rasio IC50 zat pada sel kanker tertentu dibandingkan dengan sel normal.

N. Evaluasi / Soal Latihan

1. Mutasi adalah penyebab kanker. Uraikan cara mutasi dapat menyebabkan terjadinya proliferasi sel yang tidak terkendali.
2. Apoptosis adalah proses fisiologis yang terjadi pada individu. Apoptosis yang tidak normal berkorelasi dengan kejadian penyakit. Jelaskan efek yang terjadi jika apoptosis terjadi berlebihan. Uraikan juga akibatnya jika apoptosis terjadi minimal.
3. Uraikan tahapan pada proliferasi sel dan gen-gen yang berperan di dalamnya.

Bab 5

Apoptosis

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa mampu menguraikan konsep terapi dan sifat-sifat obat-obat antikanker.

B. Apoptosis dan Nekrosis

Secara umum, terdapat dua cara kematian sel, yaitu apoptosis dan nekrosis. Apoptosis adalah suatu bentuk kematian sel terjadwal dan berupa serangkaian reaksi biokimia yang terkoordinasi dan bertahap yang menghasilkan pembongkaran sel secara berurutan dari suatu organisme. Proses biologis normal ini diperlukan untuk perkembangan organ tertentu selama embriogenesis dan pembuangan sel-sel abnormal, seperti sel-sel yang rusak akibat paparan patogen atau mengalami transformasi onkogenik. Peralihan antara kelangsungan hidup sel dan apoptosis penting untuk perkembangan dan kelangsungan hidup suatu organisme.

Sedangkan nekrosis adalah perubahan kondisi fisik, dapat mengakibatkan kerusakan sel yang terjadi setelah kehilangan aliran darah atau kematian jaringan akibat penyumbatan pembuluh darah yang biasa dikenal dengan *peripheral arterial disease* (PAD), pada suatu segmen darah. pembuluh ke dalam tubuh sehingga aliran darah berhenti, jaringan tidak menerima nutrisi dari aliran darah. Cangkok

bypass arteri perifer dipicu oleh stenosis (penyempitan) arteri, yang menyebabkan reaksi aterosklerosis (penumpukan lemak, kolesterol dan zat lain di dalam dan di dinding arteri) atau reaksi jaringan akibat rangsangan fisik pada arteri dapat menyebabkan aliran darah menyempit. Penyebab penyakit arteri perifer antara lain merokok, diet tinggi lemak atau kolesterol, stres, penyakit jantung, serangan jantung, stroke, obesitas, diabetes. (Dekroli, 2015)

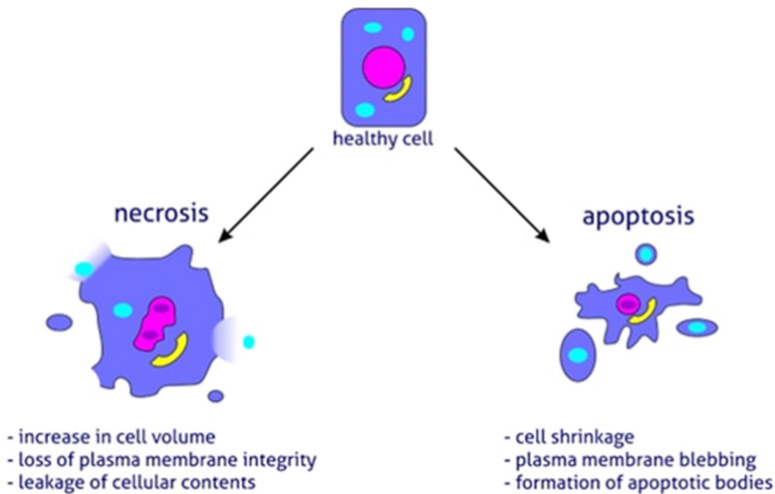
Terjadinya kecacatan pada jalur apoptosis hingga mencegah kematian sel dapat menyebabkan kelainan perkembangan atau pertumbuhan jaringan yang tidak diatur, seperti yang terjadi pada kanker. Sebaliknya, apoptosis yang tidak teratur atau prematur dapat mengakibatkan hilangnya sel-sel fungsional, berkontribusi pada gangguan autoimun, neurologis, dan kardiovaskular. Oleh karenanya, manipulasi proses apoptosis sangat penting untuk lebih memahami perkembangan berbagai penyakit dan untuk menemukan target terapi potensial (Novus Biologicals, 2016).

Apoptosis dapat dipicu oleh berbagai rangsangan dari luar atau dalam sel, misalnya oleh ligasi reseptor permukaan sel, kerusakan DNA sebagai penyebab cacat pada mekanisme perbaikan DNA, pengobatan dengan obat sitotoksik atau iradiasi, oleh kurangnya sinyal kelangsungan hidup, sinyal siklus sel yang kontradiktif, atau oleh sinyal kematian perkembangan. Namun, beragam sinyal kematian pada akhirnya mengaktifkan mesin kematian sel umum yang mengarah ke ciri khas kematian sel apoptosis (Carella, 2003).

Apoptosis yang dialami oleh sel memiliki perbedaan morfologinya. Sel yang mengalami apoptosis akan mengecil dan ikatan antarselnya hilang, kemudian terkondensasi dengan kromatin di dalam nukleus. Tahap berikutnya yaitu terurainya nukleus menjadi partikel-partikel terikat membran yang dikenal sebagai jasad *apoptotic* (*apoptotic body*).

Apoptosis sel mempunyai ciri morfologi dan biokimia yang sangat

berbeda dari sel nekrosis. Sel nekrosis ditandai dengan pembengkakan sitoplasma dan organel lain seperti mitokondria, diikuti dengan pelepasan isi sel keluar sel yang akan mengakibatkan terjadinya inflamasi. Selain itu, proses nekrosis adalah pasif (tidak memerlukan ATP/energy) dan tidak melibatkan jalur kaspase seperti yang terjadi pada apoptosis. Mekanisme yang terjadi ketika nekrosis adalah terjadinya kerusakan membran, kemudian lisosom mengeluarkan enzim ke sitoplasma dan menghancurkan sel, lalu isi sel keluar karena kerusakan membran plasma dan mengakibatkan reaksi inflamatori. Nekrosis secara umum terjadi pada kematian sel yang diakibatkan oleh Ischemia, keracunan, infeksi, dan trauma.



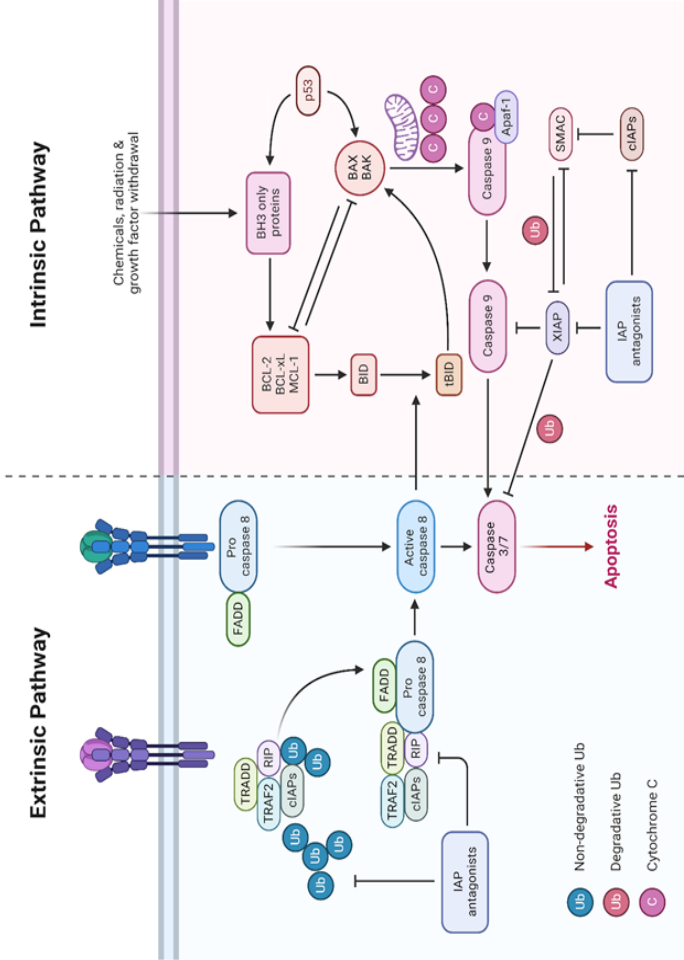
Gambar 16. Perbedaan apoptosis dan nekrosis

Apoptosis mempunyai cara kerja yang begitu kompleks dan rumit. Secara umum, apoptosis dibagi menjadi empat tahap, yaitu adanya sinyal kematian (induser apoptosis) yang bersifat fisiologis (hormon dan sitokin), biologis (virus, bakteri, parasit), kimia (obat), atau fisik (radiasi dan racun). Fase kedua adalah fase integrasi atau pengaturan

(transduksi sinyal, induksi gen apoptosis terkait), kemudian fase eksekusi apoptosis dengan perubahan morfologis dan kimiawi (degradasi DNA, lisis sel, pembentukan badan apoptosis). Langkah terakhir adalah fagositosis atau penghapusan sel apoptosis oleh makrofag, sel dendritik atau sel tetangga.

Peristiwa apoptosis meliputi pepadatan inti sel, pepadatan dan pembagian sitoplasma dalam membran konjungtiva badan apoptosis, dan fragmentasi kromosom menjadi fragmen yang mengandung nukleosom berbeda (Rastogi *et al.*, 2009).

Ada dua jalur berbeda yang dapat memulai kaskade caspase dan menyebabkan apoptosis, yaitu jalur intrinsik (atau mitokondria) dan jalur ekstrinsik (atau reseptor kematian). Ada jalur lain yang melibatkan sitotoksitas yang dimediasi sel-T dan pembunuhan sel yang bergantung pada perforin granzim. Ketiga cara ini ditunjukkan pada Gambar 8. Jalur perforin/granzim dapat menginduksi apoptosis melalui granzim B atau granzim A. Ekstrinsik, Intrinsik, dan Granzim B bertemu di terminal atau jalur eksekusi yang sama. Pembelahan Caspase-3 mempromosikan jalur ini, menghasilkan fragmentasi DNA, degradasi protein sitoskeletal dan nuklir, ikatan silang protein, pembentukan badan apoptosis, ekspresi ligan reseptor fagositik, dan akhirnya serapan fagositik. Jalur Granzyme mengaktifkan jalur kematian sel paralel independen caspase melalui kerusakan DNA beruntai tunggal (Sivamani, 2015).



Gambar 17 . Jalur mekanisme apoptosis
(Nomor Copyright: TJ240PUTKF)

1. Jalur intrinsik apoptosis

Jalur ini melibatkan serangkaian peristiwa intraseluler yang terjadi di dalam mitokondria. Sejumlah faktor seperti hormon, faktor pertumbuhan, radiasi, racun, kekurangan oksigen, infeksi virus, dan hipertermia yang menyebabkan permeabilitas intermembran mitokondria dapat memicu jalur ini. Proses ini mengarah pada pelepasan protein pro-apoptosis melalui intermembran menuju sitosol. Kehadiran sitokrom c dalam sitosol mengikat Apaf-1 dan caspase 9 untuk pembentukan sistem yang dinamakan “apoptosom” (Obeng, 2021).

2. Jalur ekstrinsik apoptosis

Jalur ekstrinsik dimulai dengan pengikatan ligan pada salah satu dari beberapa reseptor kematian, yaitu semua anggota superfamili reseptor TNF. Interaksi ini memicu oligomerisasi reseptor dan pengikatan protein adaptor yang mengandung domain kematian (DD), seperti TRADD dan FADD. Kompleks yang dihasilkan mengikat dan mengaktifkan pro-caspases-8 dan pro-caspases-10. Ligan termasuk FASL, TNF- α , TRAIL, dan TWEAK dapat berada di membran plasma sel yang lain atau dapat bertindak sebagai sitokin terlarut (Novus Biologicals, 2016).

3. Jalur Perforin/ Granzim B

Selama respon imun terhadap virus dan transformasi seluler, sel sitotoksik, termasuk limfosit T sitotoksik (CTL) dan sel pembunuh alami (NK), mengidentifikasi sel yang terkena dan melepaskan protease serin yang dikenal sebagai granzim ke dalam sitosol sel yang ditargetkan. Granzim B memicu apoptosis baik dengan membelah BID untuk menginduksi permeabilisasi membran luar mitokondria (MOMP) atau dengan langsung memproses caspases efektor (Novus Biologicals, 2016).

C. Regulator Apoptosis

Apoptosis diatur oleh beberapa protein dan gen. Famili protein tertentu terlibat dalam regulasi apoptosis dalam berbagai langkah. IAP dan Bcl-2 adalah dua protein terpenting yang terlibat dalam apoptosis yang memutuskan selesai atau terhambatnya apoptosis. Jalur ekstrinsik apoptosis dicegah oleh protein yang dinamakan c-FLIP yang nantinya mengikat FADD dan caspase-8. Mekanisme lain dari regulasi apoptosis di jalur ekstrinsik melibatkan protein yang disebut Toso, yang memblokir apoptosis yang diinduksi Fas dalam sel T dengan menghambat aktivasi caspase-8.

Pada jalur intrinsik, anggota family Bcl-2 memainkan peran penting dalam regulasi dan kontrol jalur. Famili protein Bcl-2 mengontrol permeabilitas membran mitokondria sehingga protein dapat bersifat pro-apoptosis atau anti-apoptosis. Protein dari famili Bcl-2 mengatur apoptosis dengan mengontrol lepasnya sitokrom c melalui mitokondria melewati permeabilitas membran mitokondria yang berubah. Protein seperti Puma dan Noxa adalah anggota faktor pro-apoptosis yang memfasilitasi aktivasi apoptosis dengan mencegah aksi faktor anti-apoptosis. Sekelompok protein yang dilepaskan dari mitokondria yaitu Smac, mempromosikan apoptosis dengan menghambat aksi IAP di jalur mitokondria (Pleyer *et al.*, 2007).

1. Bcl-2 family

Famili protein Bcl-2 pada mamalia terdiri atas setidaknya 30 protein terkait, ditandai dengan adanya domain homologi Bcl-2 (BH). Famili Bcl-2 dibagi menjadi tiga subkelas yang berbeda berdasarkan fitur struktural dan fungsional. Kelas pertama adalah anggota famili Bcl-2 yang pro-apoptosis yang kehilangan sebagian domain BH, yaitu Bax, tBid, Bak, Bax, Bik, Bok, Bim, Krk, Mtd, dan lain-lain. Kelas kedua adalah subfamili anti-apoptosis yang mengandung semua (empat) domain BH, yaitu Bcl-2,

Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1(Bfl-1), dan Bcl-B. Kelas ketiga adalah anggota famili yang memiliki domain BH-3 saja. Fungsi utama anggota keluarga Bcl-2 adalah untuk secara langsung mengatur permeabilitas membran mitokondria dan dengan demikian mengatur pelepasan faktor apoptogenik dari ruang antarmembran ke dalam sitoplasma.

Faktor-faktor apoptosis yang diketahui dilepaskan termasuk sitokrom c, Smac Diablo, AIF, *heat shock* protein 60, dan endonuklease G. Smac Diablo dan sitokrom c terlibat dalam aktivasi kaspase. AIF dan endonuklease G dianggap berperan dalam menginduksi perubahan apoptosis independen caspase pada nukleus. Anggota anti-apoptosis dari keluarga Bcl-2 mencegah pelepasan faktor-faktor apoptogenik ini, sedangkan anggota pro-apoptosis mempromosikannya.

Kerusakan pada gen Bcl-2 telah diidentifikasi sebagai penyebab sejumlah kanker, termasuk leukemia limfositik kronis, penyakit neurodegeneratif dan autoimunitas, juga merupakan penyebab resistensi terhadap pengobatan kanker. Pengetahuan tentang mekanisme pengaruh protein Bcl-2 pada apoptosis dapat membantu mengembangkan terapi baru untuk mengobati kanker, kondisi autoimun, dan penyakit neurologis (Hussar, Žuravskaja, & Kärner, 2013).

2. P53

P53 adalah protein supresor tumor yang ada sebagai tetramer dengan ukuran protein sekitar 53 kDa, sehingga dinamakan p53. Mereka terlibat dalam regulasi dan pengembangan siklus sel, induksi anggota BCL-2, terlibat dalam permeabilisasi membran luar mitokondria (MOMP), mediasi stres oksidatif dan stres endoplasma, jalur pensinyalan reseptor, dan lain-lain. Namun, kondisi bahan kimia seperti virus infeksi Human papillomavirus

(HPV) dapat membuat p53 tidak aktif atau mengurangi aktivitasnya, sehingga mengurangi intensitas penekanan proliferasi. Setelah aktivasi, mereka mengaktifkan penghentian siklus sel dalam fase G atau kerusakan DNA yang tidak dapat diperbaiki menyebabkan mereka memicu aktivasi beberapa protein penginduksi apoptosis (Bak, Bcl-10, Bax, Bad, Bid, Bim, Bik, dan Hrk) dan pada saat yang sama menghambat protein anti-apoptosis (Bcl-x, Bcl-w, Bf-1, Bcl-XL, B-XS, Bcl-w, dan BAG).

Selain itu, ketidakmampuan proses ini terjadi memungkinkan tumorigenesis. Penelitian terbaru telah membuktikan bahwa flavonoid mampu memberikan induksi apoptosis kepada sel kanker payudara melalui *down*-regulasi beberapa molekul hilir p53 (Bcl-2 dan Bcl-xl). Hilangnya aktivitas P53 dapat menurunkan regulasi Bax/Noxa/Puma membuka jalan untuk *up*-regulasi Bcl-2 sehingga mencegah pembentukan MAC, dan regulasi negatif p53 oleh *mouse double minute 2 homolog* MDM2 mampu menghalangi tindakannya (Obeng, 2021).

3. IAP

IAP terdiri atas 8 anggota keluarga caspase inhibitor dengan domain baru sekitar 70-80 asam amino yang dikenal sebagai baculovirus IAP repeat (BIR) dan termasuk *X-linked Inhibitors of Apoptosis Protein* (XIAP), *IAP-like protein 2* (ILP2) termasuk BIR *ubiquitin-conjugating enzyme* (BRUCE)/(Apollon), livin, survivin, IAP1 seluler (cIAP1), IAP seluler 2 (cIAP2), dan protein inhibitor apoptosis neuronal (NAIP). IAP biasanya terlibat dalam penghambatan langsung beberapa caspase seperti caspase 3, dan mampu memberikan perlindungan dari Fas/caspase 8 yang menginduksi apoptosis melalui penangkapan kaskade proteolisis. Mereka melakukannya dengan mengikat domain yang dikonservasi (BIR) ke target caspase. XIAP, c-IAP1, dan c-IAP2 telah ditemukan

dalam penghambatan langsung caspase-3,7 dan caspase-9. XIAP misalnya terlibat dalam perlindungan sel dari penghancuran diri dan ekspresi berlebihan terlihat pada tahap perkembangan kanker prostat. CIAP juga ditemukan untuk memediasi *ubiquitination* dan degradasi caspase (Obeng, 2021).

Penghambatan langsung aktivitas caspase oleh c-IAPs tentu saja merupakan sarana regulasi yang sangat penting ketika dianggap bahwa kaskade pensinyalan yang dimediasi oleh enzim proteolitik seperti caspases tidak dapat diubah setelah diaktifkan dan oleh karena itu harus diatur secara tepat untuk mencegah kematian sel yang tidak tepat secara lokal dan temporal. Ketika dilepaskan dari ruang intermembran mitokondria selama peristiwa apoptosis mitokondria, Smac/Diablo mampu melawan efek penghambatan IAP pada caspases karena dapat mengikat XIAP dengan cara menggantikan caspases dari XIAP dan mengaktifkan aktivasinya. Dengan demikian, Smac/Diablo adalah regulator negatif dari IAP (Carella, 2003).

D. Evaluasi / Soal Latihan

1. Kematian sel dapat terjadi melalui proses nekrosis dan apoptosis. Jelaskan perbedaan keduanya berdasarkan morfologinya dan biokimiawinya.
2. Uraikan perbedaan apoptosis yang melewati jalur intrinsik dan ekstrinsik.
3. Jelaskan fungsi p53 dalam proses apoptosis.
4. Protein keluarga Bcl-2 adalah protein penting yang mengatur terjadinya apoptosis. Jelaskan peran dari keluarga Bcl-2 ini dalam proses apoptosis.

Bab 6

Desain Penelitian Penelusuran Antikanker

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa mampu menginterpretasikan dan menyampaikan kembali artikel ilmiah tentang karsinogenesis.

B. Pendahuluan

Penelitian yang dilakukan terbagi atas empat bagian. Bagian pertama adalah mengetahui cara isolasi senyawa aktif sitotoksik yang terdapat pada akar tanaman pasak bumi terhadap *cell line* T47D dengan cara *in vitro* dengan metode *bioassay guided isolation*. Ini merupakan penelitian non-eksperimental. Desain penelitian yang dipakai yaitu eksploratif, bertujuan untuk menemukan suatu senyawa aktif sitotoksik. Penelitian dilanjutkan dengan pemeriksaan apoptosis dengan menggunakan parameter jumlah AgNOR oleh pengaruh isolat aktif.

Bagian kedua adalah mengetahui struktur senyawa aktif sitotoksik yang terdapat pada akar pasak bumi terhadap *cell line* T47D dan merupakan penelitian non-eksperimental. Rancangan penelitian yang digunakan adalah eksploratif, bertujuan untuk menemukan struktur senyawa aktif sitotoksik.

Pada bagian ketiga, mekanisme antikanker diselidiki secara *in vitro* dengan menghambat peradangan, mempromosikan apoptosis, dan menghambat pembelahan sel. Anti peradangan dilakukan dengan mengurangi ekspresi COX-2. Stimulasi apoptosis diselidiki melalui mekanisme penurunan ekspresi bcl-2 dan peningkatan caspase 3. Mekanisme antiproliferasi didasarkan pada mekanisme peningkatan ekspresi p53, p21, GADD45, dan penurunan ras setelah pemberian isolat teraktif ke sel T47D garis *in vitro*. Penelitian ini termasuk dalam jenis eksperimen. Hanya desain kontrol *post-test* yang digunakan sebagai desain penelitian, yaitu penelitian dengan pengumpulan data setelah perlakuan, tetapi tetap dengan variabel kontrol.

Bagian keempat adalah menentukan aktivitas kemopreventif *in vivo* dari ekstrak etanol standar dari isolat aktifnya terhadap tikus yang diinduksi DMBA. Penelitian ini bersifat eksperimental. Rancangan penelitian menggunakan *post-test control group design*, yaitu penelitian saat data dikumpulkan sebelum dan sesudah perlakuan dengan menggunakan variabel kontrol. Selain itu, dilakukan penelitian untuk mengetahui mekanisme efek kemopreventif ekstrak etanol terstandar dari isolat aktif terhadap tikus yang diinduksi DMBA secara *in vivo* dengan menguji ekspresi COX-2, Bcl2, Caspase-3, P53, P21, GADD45, dan Ras.

C. Desain penelitian *In Vitro* dan *In Vivo*

1. Alat Penelitian

- a. Uji sitotoksistas, apoptosis, dan mekanisme aksi secara *in vitro*

Alat penelitian yang dibutuhkan dalam uji sitotoksistas, apoptosis, dan mekanisme aksi secara *in vitro* meliputi:

- Tangki nitrogen cair
- mikroskop fluoresensi
- mikroskop kontras fase (Olympus, Jepang)

- penangas air
 - centrifuge Sigma 3K12 (B.Braun Biotech International)
 - inkubator CO₂ (inkubator mantel) (autoflow IR Nuaire™)
 - pembaca ELISA (SLT 340 ATC)
 - hemositometer (Nova Bauer)
 - tabung kerucut steril (Nunclone)
 - labu kultur jaringan (Nunclone)
 - vial
 - piring
 - aliran udara laminar (Nuaire)
 - pelat mikro 96 lubang (Nunclone)
 - mikropipet (Soccorex)
 - vortex (Genie)
 - kamera digital (Canon).
- b. Uji kemopreventif ekstrak terstandard isolat aktif secara *in vivo*
- Tahapan ini terbagi menjadi dua bagian, yaitu standarisasi ekstrak dengan isolat aktif dan uji kemopreventif dari ekstrak terstandar.
- 1) Uji kemopreventif ekstrak terstandard isolat aktif
- Alat penelitian yang dibutuhkan dalam uji kemopreventif dan mekanisme aksi secara *in vivo* meliputi:
- suntikan oral 1 mL dan 3 mL
 - *microscopical slides*
 - *deck-glass* atau *cover slips*
 - alat pengecatan histopatologi
 - seperangkat alat bedah (pinset, *scalpel*, *blader*, gunting bedah, papan lilin, dan alat fiksasi)
 - *cassette* untuk proses pembuatan blok jaringan
 - *guillotine*
 - *bedding*

- *staining jars*
 - neraca elektrik
 - mikroskop binokuler
 - kamera digital (Canon)
 - labu takar (Pyrex)
 - pipet volume (Pyrex).
- 2) Uji mekanisme kemopreventif ekstrak terstandar
- Alat penelitian yang dibutuhkan dalam uji kemopreventif dan mekanisme aksi secara *in vivo* meliputi:
- suntikan oral 1 mL dan 3 mL
 - *microscopical slides*
 - *deck-glass* atau *cover slips*
 - alat pengecatan histopatologi
 - seperangkat alat bedah (pinset, scalpel, blader, gunting bedah, papan lilin, dan alat fiksasi)
 - *cassette* untuk proses pembuatan blok jaringan
 - *guillotine*
 - *bedding*
 - *staining jars*
 - neraca elektrik
 - mikroskop binokuler
 - kamera digital (Canon)
 - labu takar (Pyrex)
 - pipet volume (Pyrex).

2. Bahan Penelitian

- a. Uji sitotoksitas, apoptosis, dan mekanisme aksi secara *in vitro*

Bahan yang dibutuhkan dalam uji sitotoksitas, uji antiproliferatif, apoptosis, dan uji mekanisme aksi sitotoksitas meliputi *cell line* T47D (ATCC), sel Vero, medium RPMI 1640 (GIBCO BRL), DMEM (GIBCO BRL), factor pertumbuhan 10%,

20% FBS (*Fetal Bovine Serum*), penicilin-streptomisin 2%, fungison 0,5% (Sigma Chem. CO. St. Louis. USA), hepes, tripsin (Sigma Chem. CO. St. Louis. USA), DMSO, natrium karbonat, RNAase, etidium bromid, akridin oranye (Merck), AgNOR, antibodi untuk protein-protein meliputi: serum kambing normal, antibodi primer terhadap p53: NCL-p53-DO7, serta p21 (Novo Castra), GADD45, ras, COX-2, kaspase-3, bcl2, *Phosphat Buffer Saline* (PBS), dan hematoksilin (Dako), akuades, dan *Phosphat Buffer Saline* (PBS).

b. Uji kemopreventif ekstrak terstandar isolat aktif secara *in vivo*

1) Uji kemopreventif ekstrak etanol akar pasak bumi terstandar isolat aktif

Bahan yang dibutuhkan dalam uji aktivitas kemopreventif *in vivo* dari ekstrak standar isolat aktif yaitu tikus betina galur SD umur satu bulan, DMBA, *corn oil*, akuades, formalin 10 %, etanol 100%, etanol 95%, etanol 80%, etanol 70 %, ekstrak etanol, parafin, *mounting media*, *xylene*, dan *haematoxyllin eosin* sebagai pewarna pengecatan histopatologi.

2) Uji Mekanisme kerja ekstrak etanol standar kemopreventif dari isolat aktif

Bahan yang dibutuhkan dalam uji mekanisme aksi kemopreventif, meliputi jaringan tumor payudara, RNAase, etidium bromid, akridin oranye (Merck), akuades, antibodi untuk protein-protein meliputi: serum kambing normal, antibodi primer terhadap p53: NCL-p53-DO7, serta p21 (Novo Castra), GADD45, ras, COX-2, kaspase-3, bcl2, larutan standar fosfat (PBS), dan hematoksilin (Dako).

3. Cara Kerja

a. Uji sitotoksitas menggunakan Metode MTT

Sterilisasi alat

Gelas steril yang digunakan dicuci dengan hati-hati dan dikeringkan dalam oven. Setelah kering, barang yang mudah pecah dibungkus dengan kertas payung atau aluminium foil agar tetap steril saat digunakan. Alat yang dikemas disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Tekanan autoklaf dinaikkan agar dicapai suhu 121°C. Semua alat-alat gelas diperlakukan sama, kecuali pipet Pasteur dan pipet ukur yang pangkalnya disumbat dengan kapas, kemudian dibungkus dengan kertas payung atau aluminium foil.

Media RPMI disterilisasi menggunakan cara aseptis dengan membran filter 0,2 µm. Ukuran filter ini dipilih agar tidak dapat dilewati bakteri (diameter bakteri terkecil adalah 0,2 µm) untuk menjamin sterilisasi media. Untuk mengefektifkan waktu penyaringan, digunakan bantuan penghisap.

Penyiapan kultur sel T47D

1) Pembuatan Media RPMI dan penumbuhan sel

Media pencuci dibuat dengan melarutkan 10,4 gram (per 1 liter) RPMI ditambah 2,0 g NaHCO₃ dan 2,0 g HEPES. Larutan kemudian dicampur hingga homogen, kemudian ditambahkan HCl 1N hingga pH 7,2-7,4 menggunakan pH meter. Larutan kemudian disaring secara aseptik melalui filter polietilen sulfon steril 0,2 µm.

Siapkan media RPMI 1640 per 100 mL dengan mencampurkan 10 mL FBS 10%, 0,5 mL jamur dan 2 mL larutan Penstrep. Larutan kemudian disaring secara aseptik melalui filter polietilen sulfon steril 0,2 µm.

2) Persiapan sel T47D

Sel dorman dalam vial dikeluarkan dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan pada suhu 37°C, kemudian vial disemprot dengan etanol 70%. Vial dibuka dan sel dipindahkan ke tabung berbentuk kerucut steril yang berisi media RPMI 1640. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama lima menit, kemudian supernatan dibuang. 1 ml medium pertumbuhan yang mengandung 10 µS ditambahkan ke dalam pelet dan disuspensikan kembali secara perlahan hingga homogen.

Sel-sel tersebut kemudian ditumbuhkan dalam beberapa labu kecil kultur jaringan (3-4 buah) dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO₂. Setelah 24 jam, media diganti dan sel-sel ditumbuhkan lagi sampai konfluen dan cukup untuk penelitian.

3) Panen sel

Setelah jumlah sel mencukupi, media biakan dibuang dan koloni dicuci dengan penambahan PBS. Jika perlu meresuspensi secara perlahan, buang larutannya, tambahkan 1 mL larutan tripsin-EDTA ke dalam sel. Untuk memastikan pemerataan, tambahkan 3 mL larutan PBS. Biarkan sel berdiri selama 2-3 menit agar tripsin-EDTA bekerja dengan baik dan lepaskan sel dari dinding labu kultur jaringan. Sel-sel dipindahkan ke tabung kerucut steril dan PBS ditambahkan ke volume 10 ml dan disentrifugasi pada 1500 rpm selama 15 menit. Pelet putih adalah koloni sel yang mengendap akibat sentrifugasi saat supernatan dibuang. Pelet dicuci dengan menambahkan sedikit medium, diresuspensi, dan kepadatan sel dihitung dengan hemositometer.

Sel yang dihitung adalah sel yang terletak di empat ruang

hitung yang masing-masing terdiri atas 16 kotak. Jika sel berada di garis batas dan lebih dekat ke kotak hitung, sel dihitung. Jumlah sel dapat dihitung sebagai berikut: (Jumlah sel dalam 4 sumur/4) x 10⁴ sel/ml.

Penyiapan Kultur Sel Vero

1) Pembuatan Media Kultur Sel Vero

Media kultur sel Vero adalah M 199, dibuat dengan melarutkan 11 g bubuk M 199 dalam kira-kira 800 ml air suling, kemudian menambahkan 2,2 g natrium bikarbonat dan 2 g HEPES. Larutan disiapkan pada pH 7,2. Jika terlalu basa, tambahkan HCl 1N, dan jika terlalu asam, tambahkan NaOH 1N, lalu tambahkan aquabidistalate hingga volume 1 liter. Larutan disterilkan dengan penyaringan melalui filter berdiameter 0,2 µm, kemudian disimpan dalam lemari es pada suhu 4°C dalam botol tertutup. Media biakan M 199 yang akan digunakan harus mengandung serum. Media biakan M 199 yang mengandung serum dibuat dengan mencampurkan 10 ml serum janin sapi (FBS), 2 ml penisilin-streptomisin, dan 0,5 ml Fungizone dalam 100 ml media biakan M 199 (CCRC, 2009).

2) Pengadaan Sel Vero

Sel Vero dikeluarkan dari tangki Thermolyne (tangki nitrogen cair) yang ditempatkan dalam penangas air pada suhu 37°C. Sel Vero kemudian dikumpulkan dalam tabung centrifuge 1 mL, perlakuan dilakukan pada *laminar air flow* (LAF), kemudian ditambahkan media M 199-serum sebanyak 20 mL, dengan penambahan 2 mL pertama dilakukan perlahan-lahan. Larutan ini disentrifus pada kecepatan 1667 rpm atau kecepatan 500 G selama 5 menit. Endapan sel vero disuspensikan dalam media M 199-serum.

Suspensi sel ditempatkan dalam labu kultur jaringan, kemudian

dimasukkan ke dalam inkubator 37°C yang dialiri CO₂ 5% dengan tutup *flask* yang dikendorkan. Perkembangbiakan sel Vero diamati setiap hari di bawah mikroskop sampai sel memenuhi *flask* (sel konfluen). Bila terjadi perubahan warna media dari merah menjadi agak kekuningan, maka perlu dilakukan penggantian dengan media baru (CCRC, 2009).

3) Panen Sel

Apabila jumlah sel Vero yang dikembangkan dalam *flask* telah mencukupi untuk penelitian, maka siap untuk dilakukan pemanenan sel Vero. Pemanenan sel Vero dilakukan dengan membuang media kultur M 199-serum, kemudian dilakukan penyemprotan sejumlah media M 199-serum untuk melepaskan sel Vero. Sifat dari sel normal ini melekat kuat, sehingga diharapkan pemanenan dapat lebih maksimal. Jumlah sel Vero setelah pemanenan dihitung menggunakan *haemocytometer* di bawah mikroskop. Suspensi sel Vero dalam uji ini dibuat dengan jumlah sel sebesar 3×10^4 sel/100 μ L dalam sejumlah media kultur M 199-serum.

Preparasi Bahan untuk Uji MTT

1) Persiapan PBS sebagai Larutan Pencuci

Bubuk PBS (tanpa CaCl dan MgCl₂) dicairkan ke dalam aqua bidestilata kira-kira 800 ml. Selanjutnya, larutan di-*stirer* sampai homogen, diberi tambahan aqua bidestilata add 1 liter, kemudian ditambahkan HCl 1 N sampai pH 7,2-7,4 yang diukur dengan pH meter. Cairan disimpan di dalam lemari es dalam botol tertutup (Tada *et al.*, 1991).

2) Pembuatan Larutan MTT

Serbuk MTT sebanyak 50 mg dilarutkan dalam 15 mL PBS sehingga kadarnya 3,33 mg/mL. Tiap sumuran diberi larutan MTT sebanyak 10 μ L (Tada *et al.*, 1991).

3) Pembuatan *Stop Solution*

Larutan yang dipakai adalah 10% SDS dalam 0,01 N HCl. Tiap sumuran diberi *stop solution* sebanyak 100 μ L (Tada *et al.*, 1991).

Persiapan membuat larutan uji

1) Larutan uji yang dibuat untuk uji sitotoksitas dan antiproliferatif terhadap sel T47D

Sebelum dilakukan uji sitotoksitas, dibuat larutan stok dengan cara mencampurkan sampel 12,8 mg ekstrak akar pasak bumi dengan media RPMI 1640 dengan volume 3,2 ml sehingga konsentrasi larutan uji menjadi 4.000 μ g./ml. Larutan kemudian dipekatkan dalam rangkaian 1.000 langkah; 500; dan 250 μ g/ml. Larutan dengan konsentrasi berbeda kemudian diuji pada sel T47D. Larutan uji ini disiapkan secara aseptis di bilik aliran udara laminar. Uji isolasi dengan sel T47D dilakukan pada level 1; 10; dan 100 μ g/ml.

2) Persiapan cairan uji untuk uji sitotoksitas terhadap sel Vero. Pembuatan larutan uji untuk uji sitotoksitas terhadap sel Vero sama dengan sel T47D, yaitu dibuat larutan stok terlebih dahulu. Pembuatan larutan uji untuk uji sitotoksitas dan uji antiproliferasi terhadap sel Vero sama dengan sel T47D, yaitu larutan stoknya dibuat lebih dulu. Cara pembuatan larutan stok yaitu dengan menambahkan 12,8 mg fraksi larut etanol ekstrak air akar pasak bumi dengan media M 199 sampai volumenya menjadi 3,2 mL, sehingga konsentrasi larutan uji menjadi 4000 μ g/ml, kemudian konsentrasi larutan tersebut diubah menjadi deret kadar 1000; 500; dan 250 μ g/ml dan larutan dengan konsentrasi berbeda diuji pada sel Vero.

Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas terhadap sel T47D dilakukan dengan menginkubasikan 100 μL cairan kental sel yang berjumlah 3×10^4 sel/mL di dalam alat inkubator CO_2 5% bersama 100 μL variasi kadar awal ekstrak akar pasak bumi 2.000; 1.000; dan 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dengan demikian, kadar larutan uji setelah ditambah suspensi sel adalah 1.000; 500; dan 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Kontrol sampel sebanyak 100 μL larutan uji dengan beberapa seri kadar dengan 100 μL media RPMI, serta kontrol sel yang berisi 100 μL sel dan 100 μL media RPMI dan kontrol media memiliki 200 μL media RPMI. Kadar untuk uji isolat aktif adalah 1; 10; dan 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Sel T47D diuji sitotoksitasnya dan dilakukan dalam media RPMI dan diamati setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C (aliran CO_2 5%), dalam *mikroplate* 96 sumuran. Setelah diinkubasi, ditambahkan 10 μL larutan MTT dalam PBS pada setiap lubang. Sel T47D diinkubasi selama empat jam di suhu 37°C (aliran CO_2 5%), kemudian ditambahkan 100 μL larutan SDS dalam HCl 0,01 N dan diinkubasi selama semalam pada suhu kamar. Perlakuan dilanjutkan dengan pembacaan absorbansi pada ELISA *reader*.

Uji sitotoksitas terhadap sel Vero sama seperti sel T47D, yaitu dengan menginkubasikan 100 μL cairan kental sel dengan berjumlah 3×10^4 sel/mL di dalam inkubator CO_2 5% bersama 100 μL seri kadar awal ekstrak akar pasak bumi 2.000; 1.000; dan 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dengan demikian, kadar larutan uji ekstrak etanol akar pasak bumi setelah ditambah suspensi sel adalah 1.000; 500; dan 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Kadar untuk uji isolat aktif adalah 1; 10; dan 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Seri kadar tersebut dibuat dengan pengenceran larutan stok menggunakan media RPMI 1640. Dibuat kontrol sampel sebanyak 100 μL berisi larutan uji dengan beberapa seri kadar dengan media

RPMI 1640, serta kontrol sel yang berisi sel 100 μL dan media RPMI dan kontrol media berisi 200 μL media RPMI 1640 untuk mengetahui sejauh mana pengaruhnya terhadap uji yang dilakukan.

Uji sitotoksitas terhadap sel Vero dilaksanakan dalam media M199 dan diamati selepas diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (aliran CO_2 5%), dalam *mikroplate* 96 sumuran. Setelah inkubasi, ditambahkan 10 μl MTT dalam PBS pada masing-masing well, kemudian diinkubasi selama empat jam pada suhu 37 °C (aliran 5% CO_2), kemudian ditambahkan 100 μl SDS dalam HCl 0,01 N dan dibiarkan selama semalam diinkubasi pada suhu kamar. Perlakuan dilanjutkan dengan membaca absorbansi dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm.

Data yang diperoleh dihitung persentase inhibisinya dengan menggunakan rumus $\{(A-B)/(C-D)\} \times 100\%$, dengan A = absorbansi perlakuan (sel + medium + senyawa), B = absorbansi sampel kontrol (medium + senyawa), C = serapan sel kontrol (sel + medium), dan D = serapan kontrol medium (medium).

Analisis statistik dilanjutkan dengan uji korelasi regresi menggunakan metode persamaan linier hubungan antara konsentrasi log dan probit untuk memperoleh nilai IC50. Nilai IC50 yang rendah menunjukkan efek sitotoksik senyawa yang tinggi, sedangkan nilai IC50 yang tinggi menunjukkan efek sitotoksik yang rendah.

b. Pengecatan dengan etidium bromide-akridin oranye

200 μl sel (densitas 3×10^4 sel/sumur) disemaikan pada kaca penutup dalam lempeng mikro 24-sumur, kemudian menunggu 15 menit dan kemudian ditambahkan 300 μl media RPMI, diinkubasi 24 jam dalam inkubator CO_2 . Tambahkan ekstrak etanol akar pasak bumi yang diisolasi dengan konsentrasi 1; 10; dan 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator

CO₂. Media kultur diambil dan ethidium bromide acridine orange ditambahkan ke kaca penutup. Kaca penutup yang mengandung sel dikeluarkan, ditempatkan pada *slide* kaca, dan segera dilihat di bawah mikroskop menggunakan program Optilab (Zeiss MC 80). Sel hidup berpendar hijau (dengan akridin jingga) dan sel mati berpendar jingga (dengan etidium bromida).

c. Pengecatan AgNOR

Pewarnaan AgNOR dilakukan dengan pelapisan sel (kepadatan $1,5 \times 10^4$ sel/sumur) pada kaca penutup pelat pada pertemuan 24-50%. Satu hari sebelum perlakuan, media diganti dengan media PRF RPMI 1640 (Tsai *et al.*, 2001), dan kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan senyawa uji. Media dihilangkan dan sel pada kaca penutup difiksasi dengan etanol absolut selama 30 menit. Sel-sel pada kaca penutup kemudian diinkubasi dalam larutan pewarna AgNOR selama 45 menit pada suhu kamar di tempat gelap. Larutan pewarnaan AgNOR adalah campuran 1 bagian gelatin dalam asam format 0,5% 1 dan 2 bagian larutan perak nitrat 45%. Kemudian, preparat dicuci dengan air suling dan secara bertahap dihidrasi dengan etanol. Kaca penutup dengan sel dilepas dan ditempatkan pada *slide* dengan menambahkan cairan pemasangan. Sediaan dibersihkan dengan xylene (Melanisa, 2005).

4. Uji Mekanisme Aksi *In vitro*

Pemeriksaan mekanisme kerja zat aktif *in vitro* difokuskan pada ekspresi p53, p21, GADD45, caspase-3, bcl2, ras, COX-2. Sel (kepadatan $1,5 \times 10^4$ sel/sumur) ditumbuhkan pada pelat yang konfluen 24-80%. Satu hari sebelum perlakuan, media diganti dengan media RPMI 1640 (Tsai *et al.*, 2001). Sel kemudian diinkubasi dengan senyawa uji (isolat aktif akar pakbum 1; 10; dan 100 $\mu\text{g/ml}$) selama 24 jam dalam sumur penutup. Sediaan difiksasi dengan aseton dan ditempatkan dalam serum tikus normal (1:50) selama 15 menit. Cairan

serum dibuang (tanpa dicuci), kemudian primer antibodi monoklonal anti protein (pengenceran 1:50) selama 60 menit dan dicuci tiga kali dalam PBS. Sediaan diinkubasi dalam biotin selama 10 menit dan dicuci dua kali dengan PBS selama 5 menit.

Langkah selanjutnya adalah inkubasi 10 menit dalam streptavidin-peroksidase dan dua kali pencucian dengan PBS selama 5 menit. DAB ditambahkan ke preparat dan diinkubasi selama 3-8 menit dan dicuci dengan air suling. Preparat direndam dalam hematoxylin selama 3-4 menit untuk *counterstaining* dan dicuci dengan air suling. Ekspresi protein dideteksi menggunakan mikroskop cahaya. Sel yang mengekspresikan protein memberi warna coklat tua atau hitam pada sel, sedangkan sel yang tidak mengekspresikan protein memberikan warna biru. Persentase ekspresi dihitung (jumlah sel yang mengekspresikan protein/jumlah total sel) x 100%. Ekspresi protein antar kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif kemudian dianalisis dengan SPSS menggunakan uji *one way* ANOVA.

5. Uji Aktivitas kemopreventif *in vivo*

a. Persiapan hewan uji

Tikus SD umur satu bulan dipelihara di ruangan berventilasi baik, suhu ruangan 28-32° C, kelembaban relatif 98%, di tempat gelap dan terang masing-masing selama 12 jam, dengan makanan dan minuman normal yang cukup. Hewan diaklimatisasi dalam kandang selama satu minggu sebelum perlakuan.

b. Pembuatan larutan karsinogen DMBA dalam minyak jagung

Menurut Susilowati (2004), larutan DMBA karsinogenik dapat dibuat dengan menggunakan pelarut minyak jagung. Larutan DMBA kemudian diberikan secara oral pada hewan uji dengan dosis 20 mg/kg dua kali seminggu selama lima minggu. Larutan DMBA dibuat dengan cara melarutkan DMBA dalam jumlah tertentu dalam minyak jagung, tergantung dosisnya, hingga

diperoleh larutan dengan konsentrasi 0,5-1,5 ml bila diberikan pada hewan percobaan. Volume dosis ini tidak melebihi volume maksimum yang diizinkan untuk pemberian oral pada hewan percobaan (volume maksimum untuk tikus adalah 4 ml). Larutan DMBA selalu baru disiapkan sebelum diberikan pada hewan percobaan (Gear *et al.*, 2007; Meiyanto *et al.*, 2007).

- c. Persiapan membuat larutan uji ekstrak dalam CMC Na 0,5 %

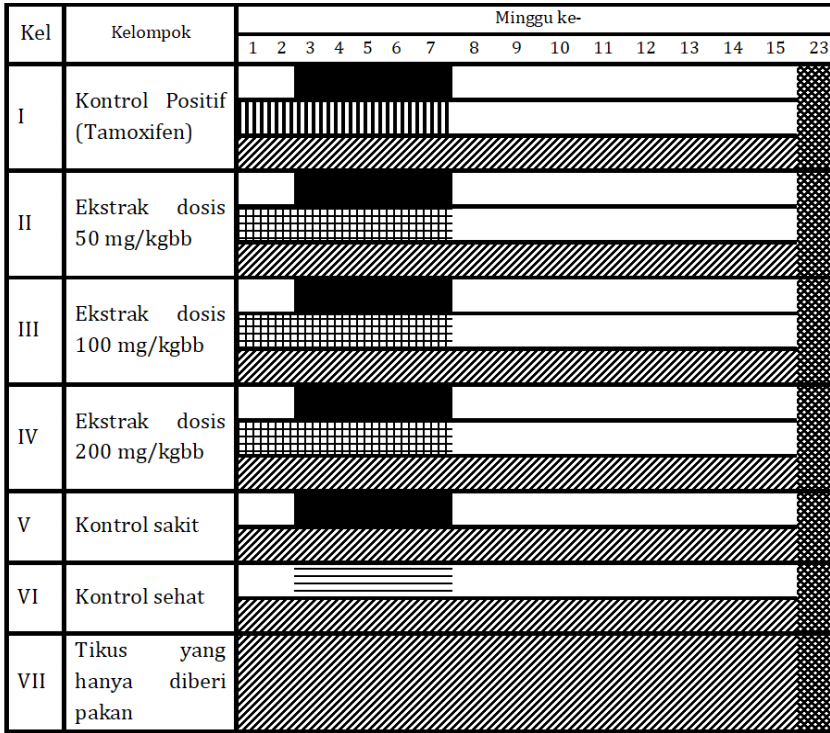
Larutan uji ini dibuat dengan cara melarutkan ekstrak etanol sejumlah tertentu sesuai dosis dan disuspensikan dalam beberapa ml larutan CMC Na 0,5%, sehingga pada saat larutan ini diberikan secara oral pada hewan percobaan tidak melebihi jumlah maksimum yang diizinkan. Larutan uji ini selalu baru disiapkan sebelum diberikan pada hewan uji.

- d. Induksi karsinogenesis dengan DMBA dan perlakuan larutan uji

Tikus berjenis betina galur *Sparague Dawley* usia empat pekan dibagi menjadi tujuh grup secara acak. Setiap grup berisi sepuluh ekor tikus.

- 1) Grup I yaitu kontrol positif yang diberi tamoxifen dosis 20 mg/kg BB setiap hari selama tujuh pekan.
- 2) Grup II, grup III, dan grup IV merupakan kelompok perlakuan yang diberi larutan uji ekstrak etanol akar tanaman pasak bumi dengan tiga peringkat dosis setiap hari selama tujuh minggu (pekan ke-1 hingga pekan ke-7) sebelum dan selama diinduksi dengan DMBA.
- 3) Grup V merupakan kelompok kontrol kanker. Dua minggu pertama dan sampai minggu ke-16, tikus hanya diberi pakan.
- 4) Grup VI merupakan kelompok kontrol sehat, tidak diberi DMBA.
- 5) Grup VII merupakan kelompok tikus yang hanya diberi pakan. Tikus diukur BB-nya setiap minggu untuk memperoleh data

BB yang berkembang, dimulai pekan pertama hingga minggu ke-16. Secara skematis, tahapan-tahapan tersebut terlihat pada Gambar 18.



Keterangan:

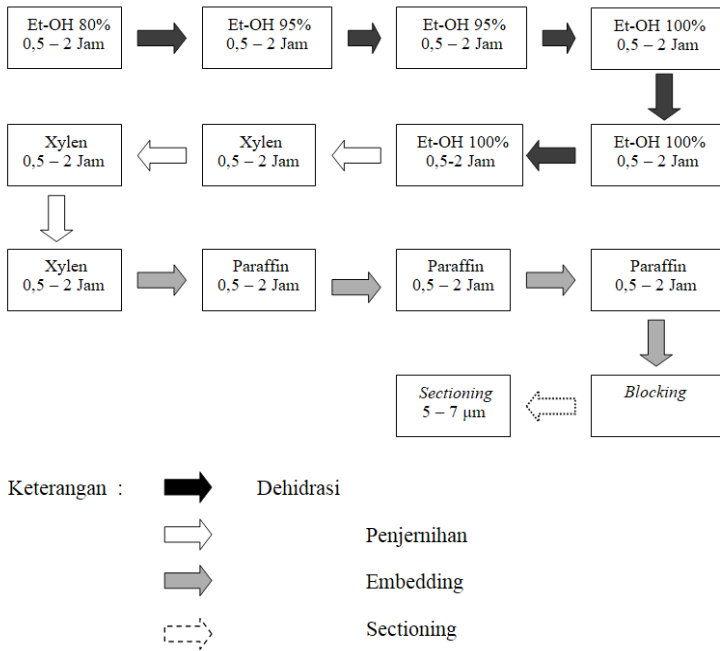
[Solid black bar]	diberi DMBA 20 mg/kgbb
[Vertical lines pattern]	diberi Tamoxifen
[Grid pattern]	diberi Ekstrak
[Horizontal lines pattern]	diberi <i>Corn Oil</i>
[Diagonal lines pattern]	diberi pakan BR II
[Diagonal lines pattern]	pengorbanan hewan uji

Gambar 18. Bagan Penelitian Efek Kemopreventif Ekstrak Etanol terstandar isolat aktif Akar Pasak Bumi terhadap Kanker Payudara pada Tikus Betina Galur Sparague Dawley yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA)

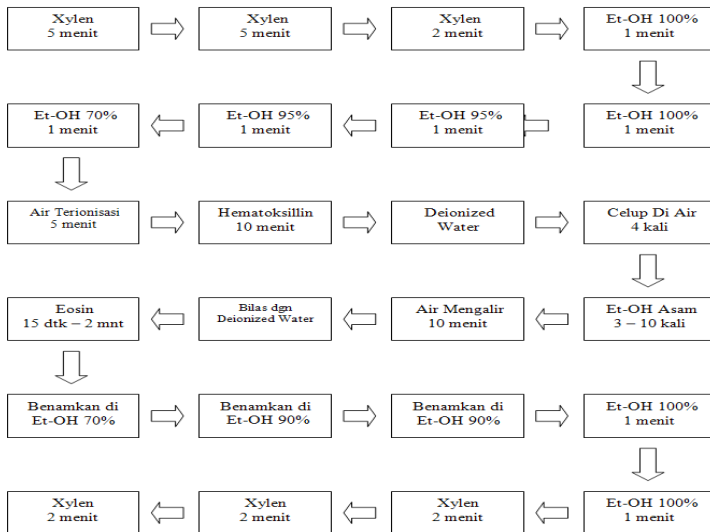
- e. Pemeriksaan histopatologi dengan pengecatan *haematocyllin* dan eosin

Metode pemeriksaan histopatologi ini seperti yang dilakukan oleh Lab Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan UGM. Pada akhir pengamatan (minggu ke-23), nekropsi akan diberlakukan kepada hewan coba. Pengamatan histopatologi diberlakukan terhadap organ payudara untuk mengetahui kondisi sitologinya serta seberapa parah kanker atau tumor tersebut. Adapun proses pembuatan preparat *haematocyllin* dan *eosin* meliputi proses jaringan dan pengecatan H & E. Skema kerja cara pembuatan preparat terlihat pada Gambar 19 dan Gambar 20.

Proses produksi preparat H&E, baik pengolahan jaringan maupun pewarnaan H&E, dilakukan sesuai standar prosedur pewarnaan yang dilakukan di Departemen Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pemeriksaan dilakukan dengan mikroskop binokular di laboratorium diagnostik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dengan perbesaran 100x hingga 1000x, dan hasilnya langsung terekam di komputer.



Gambar 19. Skema proses preparasi jaringan pada pemeriksaan histopatologi organ. (Laboratorium Patologi Anatomi, FK UGM, 2010)



Gambar 20. Skema pengecatan haematocyllin dan eosin pada pemeriksaan histopatologi (Laboratorium Patologi Anatomi, FK UGM, 2010)

Fiksasi Jaringan

Organ payudara yang diperoleh dari hasil pembedahan dipotong dengan ukuran sesuai untuk organ payudara berukuran 1x1x1 cm, kemudian difiksasi dengan formalin 10%. Kekuatan larutan fiksasi dan lama proses fiksasi akan mempengaruhi hasil analisis. Fiksasi dilakukan selama 24 jam. Kanker payudara difiksasi dengan formalin (tidak boleh lebih dari 4% formaldehid), kemudian didehidrasi menggunakan etanol 96; 80; 90; dan 95% tiap-tiap selama 2 jam. Hasil tersebut kemudian dijernihkan (*clearing*) dengan benzen 2 kali masing-masing selama 1,5 jam dan diinfiltrasi dengan parafin cair (58° C/tidak lebih dari 60° C), kemudian dikeringkan semalam pada suhu 37° C. Hasil pengeringan dipanaskan pada oven dengan suhu 50-56° C selama satu jam, kemudian diblok dan dipotong dengan mikrotom dengan ketebalan 4-5 µm. Hasil potongan selanjutnya dirambang menggunakan air hangat supaya permukaan merata dan dilapiskan pada kaca air hangat di atas *hot plate* (45° C) dalam waktu 0,5 jam (Laboratorium Patologi Anatomi, FK UGM, 2010).

Pembuatan Blok (*Parafin Section*) dan preparat

Untuk menjaga detail morfologis dan resolusi jaringan, dilakukan proses *blocking*. Jaringan yang sudah difiksasi dipotong dengan pas dan dicetak menjadi bentuk kubus berukuran 1x1x1 cm menggunakan parafin. Parafin yang dicairkan dapat menginfiltrasi rongga jaringan, sehingga saat padat dapat mempertahankan bentuk morfologis jaringan. Preparat dibuat dengan memotong blok parafin dengan ketebalan 4 µm dan dilekatkan pada *glass poly-l-lysine*, kemudian dilakukan pewarnaan.

6. Uji mekanisme aksi molekuler kemopreventif secara *in vivo*

Metode pewarnaan imunohistokimia

Sediaan kemudian dideparafinisasi dengan xilena (pa) dua kali selama tiga menit, kemudian direhidrasi dengan alkohol bertingkat (absolut, 95, 90, 80, dan 96%) dan air masing-masing selama lima menit. Sediaan dicuci sebentar dengan air mengalir, kemudian dicuci dengan PBS. Untuk menghilangkan aktivitas peroksidase endogen, sediaan ditempatkan dalam larutan penghambat peroksidase (1:9) selama 10 menit pada suhu kamar atau 5 menit di bawah air keran. Sediaan diinkubasi dalam serum penyekat yang telah diencerkan selama 10 menit pada suhu 25°C. Antibodi monoklonal yang disiapkan antibodi primer ditambahkan hingga 100 µl pada konsentrasi 4 µg/ml per preparasi (disesuaikan sampai semua bagian dibanjiri), dan kemudian diinkubasi pada media lembab pada suhu kamar (25° C).

Preparat sampel diinkubasi secara berurutan dengan antibodi monoklonal yang digunakan dalam pengujian, kemudian preparat dicuci dengan PBS (segar) selama lima menit hingga 100 µl *biotinylated universal secondary antibody* (siap pakai) ditambahkan ke setiap sediaan, kemudian sediaan diinkubasi pada suhu kamar (25°C) selama lima menit. Cuci dengan PBS segar selama lima menit. Sediaan diinkubasi dengan reagen kompleks streptavidin/peroksidase siap pakai selama 10 menit. Cuci produk dengan PBS selama lima menit .

Sediaan ditempatkan dalam 100 µl larutan substrat peroksidase (DAB) (1:9) dengan *slide* selama 2-10 menit (semakin tebal *slide*, semakin lama inkubasi) dan kemudian dicuci dengan air keran. 100 µl Mayer's hematoxylin (*counterstain*) ditambahkan, diinkubasi selama 1-3 menit, kemudian dicuci dengan air keran. Sediaan

selanjutnya direndam dalam alkohol, dibersihkan, direndam dalam xylene. Sediaan kemudian disemprot dengan fiksatif, kemudian ditutup dengan kaca.

Setelah kering, sampel dapat diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x dan 1000x. Sediaan berwarna coklat berarti protein diekspresikan oleh gen, sedangkan sediaan berwarna biru berarti tidak memiliki kandungan protein yang diekspresikan (Anonim, 2004). Antibodi yang digunakan adalah COX-2, Bcl-2, kaspase-3, P53, P21, GADD45, dan Ras.

D. Evaluasi/Soal Latihan

Lakukan *review* tentang metode penelitian penelusuran antikanker dan presentasikan di kelas.

Bab 7

Teknik Pengujian Dalam Penelusuran Antikanker

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa memahami desain penelitian *in vitro* dan *in vivo* untuk pengembangan obat antikanker.

B. Sitotoksitas (MTT assay, Methylene Blue Assay): prinsip dan teknik pengujian

Uji MTT digunakan untuk mengukur tingkat proliferasi sel dan sebaliknya ketika kejadian metabolik menyebabkan apoptosis atau nekrosis hingga viabilitas sel menurun. MTT Yellow Tetrazolium (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) direduksi oleh sel-sel yang aktif secara metabolik, sebagian oleh enzim dehidrogenase, untuk mereduksi ekuivalen seperti NADH dan NADPH. Formazan ungu intraseluler yang dihasilkan dapat dicairkan dan dihitung secara spektrofotometri.

Reagen MTT menghasilkan nilai absorbansi yang rendah tanpa adanya sel. Setiap jenis sel berhubungan linier antara jumlah sel dan sinyal yang dihasilkan, sehingga memungkinkan kuantifikasi yang akurat dari perubahan tingkat proliferasi sel (Patel *et al.*, 2013). Prinsip

uji MTT adalah kemampuan sel hidup mereduksi garam MTT menjadi kristal formazan. Pengurangan kapasitas ini ditunjukkan oleh enzim suksinat dehidrogenase mitokondria pada sel hidup/sel hidup yang masih melakukan proses respirasi. Senyawa MTT yang larut dalam air dan berwarna kuning setelah direduksi oleh suksinat dehidrogenase berubah menjadi formazan yang berwarna biru.

Teknik pengujian MTT adalah sebagai berikut (Yadav *et al.*, 2014):

1. Sel dikultur dalam pelat sumur 96 sampai mencapai konfluensi 80-90%, kemudian ditambahkan senyawa uji dalam konsentrasi yang diperlukan.
2. Sel diinkubasi pada 37°C sesuai kebutuhan percobaan.
3. Larutan MTT ditambahkan per sumur sampai konsentrasi akhir 0,45 mg/mL (simpan larutan MTT dalam botol gelap atau coklat).
4. Inkubasi selama 1-4 jam pada 37°C dalam gelap (bervariasi dari sel ke sel dan percobaan ke percobaan).
5. Tambahkan 100 mL larutan pelarut (mengandung 1 g SDS dalam 10 mL HCl 0,01M) ke setiap sumur untuk mencairkan kristal formazan dan mencampurnya dengan benar.
6. Ambil absorbansi pada 570 nm.
7. Media RPMI disterilisasi dengan cara aseptis, yaitu dengan dengan membran filter 0,2 µm yang tidak dapat dilewati bakteri (diameter bakteri terkecil adalah 0,2 µm) untuk menjamin sterilisasi media. Untuk mengefektifkan waktu penyaringan, digunakan bantuan penghisap.

C. Deteksi apoptosis: pengecatan AO-EtBr, TUNEL assay, AgNO₃, dll

Apoptosis merupakan proses seluler penting yang membantu mengatur pertumbuhan jaringan, perkembangan janin, respons imun, dan sejumlah proses biologis lainnya. Penyimpangan apoptosis

bertanggung jawab atas sejumlah penyakit dan masalah kesehatan. Selama bertahun-tahun, sejumlah metode telah ditemukan dan dikembangkan untuk mendeteksi apoptosis. Terdapat beberapa teknik standar, seperti mikroskop elektron, uji TUNEL, *flow cytometry*, dan lain-lain. Selain itu, dengan cepat muncul teknik-teknik baru, seperti perangkat mikrofluida, spektroskopi molekul tunggal, dan metode elektrokimia.

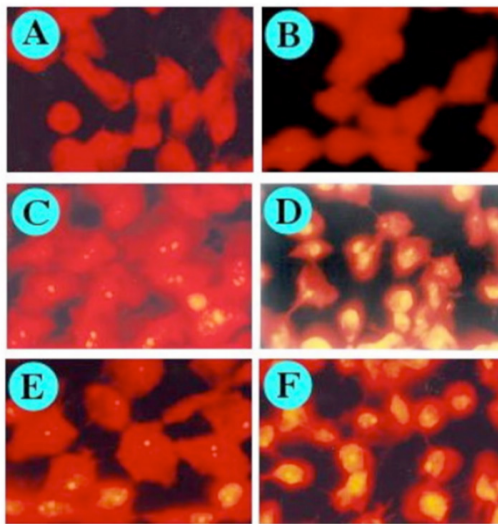
1. Pewarnaan TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*)

TUNEL adalah salah satu metode terbaik untuk mendeteksi fragmentasi DNA yang terjadi selama mekanisme apoptosis. Metode ini mengidentifikasi torehan yang ada dalam DNA setiap sel atau TdT, penambahan (2'-deoxyuridine 5' triphosphate) yang diberi label sekunder menggunakan penanda tertentu. Sel DNA yang rusak juga dapat diberi label menggunakan metode TUNEL. Metode TUNEL dapat diterapkan pada sel yang dikultur, jaringan, sampel darah, bahan yang mengandung sedikit sel apoptosis (Nambiar & Hegde, 2016).

Kinetika pewarnaan dari uji TUNEL tergantung pada konsentrasi reagen, fiksasi jaringan, tingkat proteolisis, dan aksesibilitas pemutusan untai DNA yang bervariasi antarjenis jaringan. Oleh karena itu, penting untuk melakukan standarisasi teknik menggunakan potongan jaringan dengan perlakuan DNase sebagai kontrol positif dan tanpa perlakuan TdT sebagai kontrol negatif apoptosis untuk menghindari hasil positif palsu atau negatif palsu. Harus diingat bahwa kerusakan DNA bukanlah ciri khas apoptosis, tetapi juga dapat terjadi pada nekrosis. Oleh karena itu, akurasi uji TUNEL sebagai metode untuk mendeteksi apoptosis telah dipertanyakan dalam beberapa penelitian. Dengan demikian, mungkin penting untuk menggunakan metode independen

lain bersama dengan uji TUNEL untuk mengonfirmasi dan mengkarakterisasi apoptosis. Metode tersebut termasuk pewarnaan imunohistokimia untuk protease caspase 3 yang diinduksi apoptosis, Western blots, deteksi phosphatidylserine pada permukaan sel dengan Annexin V, dan lain-lain (Kyrylkova *et al.*, 2012).

Contoh hasil pengecatan menggunakan TUNEL disajikan pada gambar 15.



Gambar 21. Hasil pengujian menggunakan TUNEL assay pada sel HeLa yang diberi perlakuan eurikomanon 2 ug/ml

Keterangan:

- a. Kontrol sel,
- b. diberi perlakuan DMSO,
- c. diberi perlakuan eurikomanon selama 24 jam,
- d. diberi perlakuan eurikomanon 72 jam,
- e. diberi tamoksifen 24 jam,
- f. diberi tamoksifen 72 jam

(Mahfudh & Pihie, 2008)

2. Pewarnaan AO-EtBr

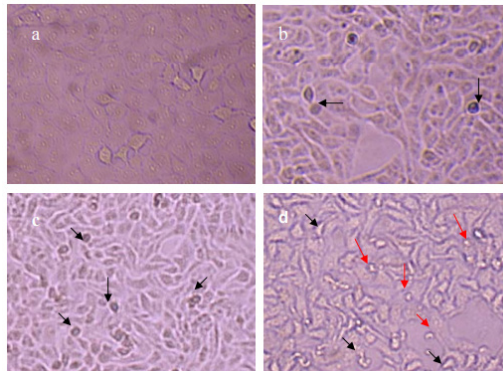
Pewarnaan acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) dipakai untuk memvisualisasikan perbedaan nukleus dan pembentukan tubuh apoptosis yang merupakan karakteristik dari apoptosis. Sel dilihat di bawah mikroskop fluoresensi dan dihitung untuk mengukur apoptosis. Acridine orange adalah pewarna vital dan akan menodai sel hidup dan mati. Etidium bromida hanya akan menodai sel-sel yang sudah kehilangan integritas membran. Sel hidup akan tampak hijau seragam. Sel-sel apoptosis awal akan berwarna hijau dan mengandung titik-titik hijau terang di inti sebagai akibat dari kondensasi kromatin dan fragmentasi inti. Sel-sel apoptosis akhir juga akan menggabungkan etidium bromida dan karenanya berwarna oranye. Namun, berbeda dari sel-sel nekrotik, sel-sel apoptosis akhir akan menunjukkan inti yang padat dan sering terfragmentasi. Sel nekrotik berwarna jingga, tetapi memiliki morfologi inti yang menyerupai sel hidup tanpa kromatin yang terkondensasi (Kasibhatla *et al.*, 2006).

Pada pewarnaan ganda Acridine orange/ethidium bromide (AO/EtBr), sel-sel ditempatkan dalam pelat 96-sumur dengan kepadatan sekitar 104 sel/sumur. Setelah inkubasi dengan betahistine selama 48 jam, sel-sel ditripsinisasi, dan suspensi sel 10-25 L dipindahkan ke *slide* kaca. Satu mikroliter larutan pewarnaan AO/EtBr (campuran pewarna yang mengandung 100 g/mL AO dan 100 g/mL EtBr) ditambahkan ke suspensi sel, dan kemudian sampel ditutup dengan kaca penutup. Morfologi sel diperiksa di bawah mikroskop fluoresen (Carl-Zeiss/Axio observer 3, perangkat lunak Zen 2.3 Blue Edition) dalam waktu 20 menit setelah penambahan pewarna Ao/EtBr. Untuk analisis statistik, setidaknya 200 sel dihitung, dan hasilnya dinyatakan sebagai nilai rata-rata yang diperoleh dari setidaknya tiga percobaan independen.

Dalam pengujian, sel hidup dan sel mati diwarnai dengan AO, sedangkan EtBr hanya mewarnai sel mati yang kehilangan integritas membran. Sel-sel hidup tampak hijau seragam, sedangkan sel-sel apoptosis awal menunjukkan titik-titik hijau di inti mereka. Sel-sel apoptosis akhir berwarna oranye dan menunjukkan inti yang padat dan/atau sering terfragmentasi. Sel-sel nekrotik berwarna jingga, dengan morfologi inti menyerupai sel-sel hidup, tetapi tanpa kromatin yang terkondensasi (Kepekçi *et al.*, 2021).

3. Mikroskop cahaya

Apoptosis biasanya melibatkan sel tunggal atau kelompok kecil sel yang dapat dilihat pada jaringan yang diwarnai dengan pewarnaan hematoxylin dan eosin rutin. Bahan kromatin terkondensasi menjadi massa granular yang digambarkan dengan tajam di sepanjang selubung inti, penyusutan sel, sel, dan garis inti menjadi berbelit-belit, dan fragmentasi inti dapat terlihat. Sel apoptosis pecah menjadi badan terikat membran yang hanya berisi sisa-sisa inti.



Gambar 22. Pengamatan sel HeLa yang diberi perlakuan eurykomanon a. sel HeLa diberi perlakuan eurykomanon selama 24 jam pada kepekatan 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b), 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (c) dan 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (d). Sel-sel yang apoptosis (tanda panah hitam) semakin banyak dengan meningkatnya kepekatan. Jasad apoptotik (tanda panah merah) nampak sangat banyak pada kepekatan tinggi. Perbesaran asal 100x.

(Nurkhasanah, 2009)

4. ISEL

Teknik ISEL memungkinkan identifikasi yang akurat dari sel-sel apoptosis tunggal pada ujung bebas DNA dengan menggunakan pelabelan radioaktif atau non-radioaktif. Kuantifikasi apoptosis dilakukan dengan mendeteksi fragmentasi DNA pada basis sel-ke-sel yang akan mempertahankan informasi topologi, bahkan dalam frekuensi yang sangat rendah.

5. FCM

FCM adalah teknik pilihan untuk kuantifikasi apoptosis yang tepat, prosedur yang memisahkan sel-sel apoptosis dan non-apoptosis lainnya dengan pewarnaan bahan DNA. Analisis multiparametrik ini dapat menghitung, memeriksa, dan menyortir partikel mikroskopis yang tersuspensi dalam aliran fluida. Alat pendeteksi elektronik yang merekam hamburan ke depan dan hamburan samping memungkinkan studi tentang karakteristik fisik dan kimia sel, sehingga memberikan perbedaan sel apoptosis dari sel lain.

6. PCR

Pola pembelahan DNA apoptosis dapat dipelajari dengan menggunakan teknik PCR yang memiliki sensitivitas yang lebih baik daripada uji DNA yang umum digunakan. Teknik ini efektif dalam mendeteksi, bahkan dalam kasus yang jarang yang memiliki <1% sel apoptosis. Ini adalah teknik semi kuantitatif yang memperkirakan dan membandingkan fragmentasi DNA dalam sampel yang diselidiki.

D. Deteksi siklus sel: flow cytometri

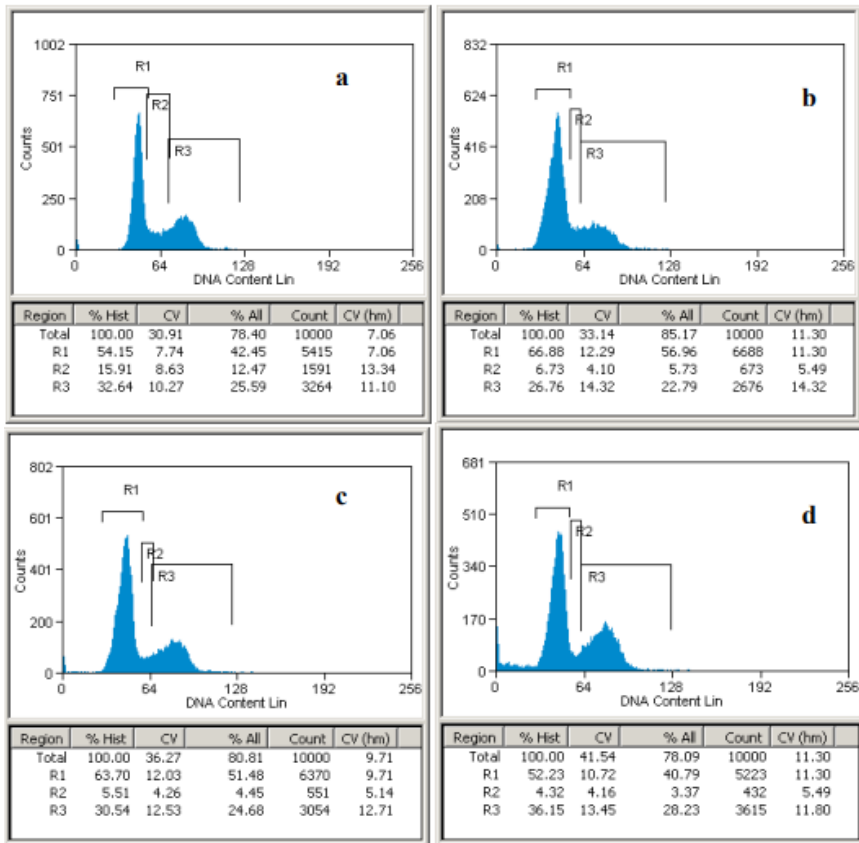
Analisis *flow cytometric* berdasarkan deteksi perubahan morfologi, fragmentasi DNA, kehilangan DNA, dan perubahan membran semakin banyak digunakan untuk penyelidikan kuantitatif apoptosis.

Dengan demikian, sifat hamburan cahaya sel dapat digunakan untuk menganalisis perubahan ukuran dan granularitas. Pada prinsipnya, analisis *flow cytometric* dari parameter morfologi adalah cara yang sangat cepat dan objektif untuk menghitung sel-sel apoptosis, tetapi perubahan ini tidak konsisten pada semua jenis sel. Oleh karena aktivasi endonuklease dalam sel apoptosis menyebabkan fragmentasi DNA dan selanjutnya kehilangan DNA yang ekstensif, apoptosis dapat ditentukan dengan pengukuran sederhana kandungan DNA menggunakan pewarna DNA interkalasi, seperti propidium iodida (PI), etidium bromide, akridin oranye, atau pewarna yang mengikat DNA secara eksternal seperti Hoechst 33342 (Ho342), DAPI (4-6-dimino-2-phenylindole), dan mithramycin. Sel-sel apoptosis yang tetap dan permeabilisasi atau nukleusnya yang terisolasi menunjukkan pewarnaan DNA yang rendah yang menghasilkan daerah yang berbeda dan dapat diukur di bawah puncak G0/G1. Metode termudah dan paling cepat untuk mengukur apoptosis adalah pewarnaan DNA dengan larutan PI hipotonik yang sangat cocok untuk studi *in vitro* skala besar (Sgonc & Gruber, 1998).

Dalam aplikasi apoptosis, *flow cytometry* memberikan informasi rasio sel apoptosis dan juga mengukur viabilitas sel dalam banyak kasus. Selain itu, *flow cytometry* dapat digunakan untuk menguji aktivitas caspase, pembelahan DNA, pewarna viabilitas, dinamika membran, dan sejumlah parameter apoptosis lainnya, seperti hamburan cahaya. Keuntungan utama *flow cytometry* adalah keluaran sel. Kebanyakan *flow cytometers* dapat mengukur 10.000 sel dalam beberapa detik, sedangkan metode lain, seperti mikroskop, hanya dapat mengukur beberapa lusin sel sekaligus dalam banyak kasus (Martinez, Reif, & Pappas, 2010).

Dalam deteksi sel sitometrik aliran, sel pertama kali diinkubasi selama 24 jam, kemudian sel dicuci dengan *buffer saline*, annexin V dan propidium iodide ditambahkan ke sel yang disuspensi dalam *buffer*

untuk diwarnai agar tercampur, dan kemudian divortex. Sel kemudian diinkubasi selama kurang lebih 10-15 menit di tempat gelap pada suhu kamar, setelah itu sel siap untuk dianalisis pada alat *flow cytometry*. Contoh hasil analisis siklus sel menggunakan *flow cytometry* disajikan pada Gambar 23.



Gambar 23. Sitogram siklus sel HeLa tanpa perlakuan (a), dengan perlakuan eurikomanon selama 24 jam pada kepekatan 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b), 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (c), dan 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (d). Perlakuan eurikomanon menyebabkan meningkatnya sel pada fasa G1 dan menurunnya jumlah sel pada fasa S, menandakan penahanan kitar sel pada fasa G1.

(Nurkhasanah, 2009)

E. Deteksi regulator Apoptosis

1. *Western blotting* dan uji kolorimetri caspase

Western blotting (*immunoblotting*, *protein blotting*) adalah teknik inti dalam studi molekuler yang mengenali protein spesifik dari campuran kompleks sel yang diekstraksi. Tiga faktor kunci *Western blotting* yaitu:

- a. Elektroforesis gel yang memisahkan campuran protein
- b. Protein terpisah yang akan ditransfer secara efisien ke penyangga padat
- c. Deteksi protein target spesifik dengan mencocokkan antibodi secara tepat.

Visualisasi protein target terlihat pada membran blotting, film sinar-X, atau sistem pencitraan sebagai pita. Ekspresi Bcl-2 dan Bax dapat diperiksa dan dianalisis dengan analisis *western blot*. Aktivitas caspase dapat dideteksi dengan ada atau tidak adanya inhibitor caspase dengan analisis *western blot* dan uji aktivitas protease fluorometrik. Uji protease kolorimetri Caspase-3 mengukur caspase berdasarkan urutan asam amino. Ini adalah cara yang sederhana dan efisien untuk menganalisis aktivitas caspase. Kit ini didasarkan pada deteksi kromofor p-nitroanilida (pNA), setelah pembelahan dari substrat berlabel DEVD-pNA (DEVD adalah urutan asam amino Asp-Glu-Val-Asp). Spektrofotometer atau pembaca pelat mikrotiter pada 400 nm atau 405 nm dapat digunakan untuk mengukur pNA. Penentuan peningkatan aktivitas caspase-3 yang efektif dapat dicapai dengan membandingkan jumlah pNA yang diserap dari sampel yang mengalami apoptosis.

Western blot memungkinkan identifikasi dan karakterisasi spesifik protein dan mampu mendeteksi protein spesifik yang terlibat dalam RCD untuk membedakan RCD. Prosesnya adalah protein dipisahkan melalui elektroforesis gel natrium dodesil

sulfat-poliakrilamida (SDS-PAGE), kemudian protein yang ditransfer membran polivinilidena (PVDF) diinkubasi dengan antibodi spesifik, dan protein yang diinginkan dideteksi dengan menggunakan agen fluoresen. Beberapa modifikasi protein yang terkait dengan RCD juga dapat dideteksi melalui *western blot*, seperti fosforilasi, asetilasi, ubiquitin, dan lain-lain (Hu *et al.*, 2021).

2. **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Teknik ELISA sering digunakan untuk mendeteksi protein terkait RCD seperti *up-regulation caspase-3/7* selama apoptosis atau DNA dan nukleosom bebas sel, tetapi masih ada beberapa kendala yang harus diperhatikan, seperti pengaruh suhu dan waktu pada penyimpanan sampel, karena sampel yang disimpan pada suhu 70°C menyebabkan kerugian tahunan sebesar 7% (Salgame *et al.*, 1997).

3. **Imunositokimia**

Deteksi komponen jaringan *in situ* melalui interaksi antigen-antibodi tertentu saat antibodi telah diberi label dengan label yang terlihat dikenal sebagai tes imunositokimia. Pewarnaan sel adalah pendekatan yang efektif untuk mengungkapkan keberadaan dan lokasi bahan kimia tertentu di dalam sel. Imunositokimia adalah metode yang menggunakan antibodi untuk mengidentifikasi protein atau molekul dalam sel yang dapat dilihat di bawah mikroskop. Menggunakan antibodi primer spesifik yang berikatan dengan protein atau antigen, imunositokimia mendeteksi ekspresi protein atau antigen dalam sel. Oleh karena kekhususannya, antibodi primer ini dapat dilihat di bawah mikroskop fluoresensi ketika berinteraksi dengan antibodi sekunder yang terkonjugasi ke fluorofor. Keuntungan dari metode ini adalah peneliti dapat mengamati sel-sel dalam sampel mengekspresikan antigen yang relevan atau tidak. Imunositokimia tidak memerlukan peralatan khusus, dapat dilakukan dengan mikroskop cahaya.

Dalam kebanyakan kasus, imunositokimia dilakukan dalam empat tahap. Sebelum *immunostaining*, masa inkubasi diperlukan supaya sel-sel melekat pada permukaan penopang yang kuat. Masa inkubasi berlangsung hingga 24 jam, tergantung pada jenis selnya. Langkah selanjutnya adalah inkubasi dan fiksasi antibodi, diikuti oleh permeabilisasi dan inkubasi antibodi. Selain mempertahankan lokasi protein di dalam sel, fiksasi juga mempertahankan keadaan kimiawi dan struktural protein. Alternatifnya, protein dapat diendapkan dengan menggunakan pelarut organik atau dengan mengikat silang protein. Larutan asam atau deterjen digunakan untuk menusuk membran sel, memungkinkan antibodi besar mengalir. Oleh karena fakta bahwa permeabilisasi bergantung pada imobilisasi, prosesnya terbatas pada sel-sel mati. Antibodi dibiarkan menempel pada antigen targetnya di dalam sel selama inkubasi antibodi, kemudian pelat dicuci untuk menghilangkan antibodi yang tidak terikat. Pada tahap ketiga, mikroskop digunakan untuk menentukan posisi sel dan antibodi yang menempel pada antigen target. Sebuah gambar diambil dengan kamera atau detektor lainnya, kemudian struktur sel dianalisis dan dianotasi pada fase akhir (Natassya & Bachtiar, 2022).

F. Evaluasi / Soal Latihan

1. Uraikan prinsip pengujian sitotoksitas dengan metode MTT.
2. Bagaimana pewarnaan menggunakan TUNEL assay dapat membedakan sel normal, sel apoptosis, dan sel nekrosis? Uraikan.
3. Bagaimana analisis dengan flow cytometry dapat menganalisis siklus sel? Uraikan.

Bab 8

Imunohistokimia

A. Tujuan Pembelajaran

Mahasiswa mampu menguraikan konsep dan teknik analisis dalam penelitian pengembangan obat kanker.

B. Prinsip Imunohistokimia

Imunohistokimia adalah teknik yang mengidentifikasi keberadaan antigen atau protein dalam jaringan berdasarkan reaksi antigen-antibodi spesifik dan label yang terlihat di bawah mikroskop. Teknik ini penting untuk membedakan penyakit yang secara morfologis mirip. Keuntungan dari teknik ini yaitu diperoleh *slide* permanen yang dapat dilihat dengan mikroskop dengan jumlah sampel yang sangat sedikit (Buchwaloe *et al.*, 2010).

Prosedur teknik ini diawali dengan prosedur teknik jaringan, yaitu penyiapan potongan jaringan (histologi) untuk diamati di bawah mikroskop. Bagian jaringan yang diperoleh kemudian dikenai metode imunohistokimia. Molekul tertentu menodai sel tertentu, seperti sel yang membelah atau sel mati, untuk membedakannya dari sel normal karena interaksi antara antigen dan antibodi merupakan reaksi yang tidak terlihat. Oleh karena itu, perlu untuk memvisualisasikan keberadaan ikatan ini dengan memberi label pada antibodi yang digunakan dengan enzim atau fluorokrom. Enzim (digunakan

untuk pelabelan) kemudian direaksikan dengan substrat kromogen. Kromogen merupakan reagen yang mempunyai kemampuan untuk menimbulkan warna yang dapat terlihat pada lokasi kompleks antibodi-antigen-enzim yang terlokalisir. Enzim yang sering dipakai adalah *horse-radish* peroksida. Salah satu metode analisis imunohistokimia adalah perhitungan kepositifan antigen dengan menghitung persentase sel positif dan negatif per paparan (Sofian and Kampono, 2006).

Pola imunohistokimia memungkinkan identifikasi asal jaringan yang lebih akurat daripada hematoxylin-eosin saja. Misalnya, ada beberapa tes imunohistokimia untuk membedakan adenokarsinoma endometrium dari adenokarsinoma serviks, yaitu vimentin, carcinoembryonic antigen (CEA), reseptor estrogen (ER), CK 7, CK 20, dan berat molekul sitokeratin 34x1012. Sensitivitas pewarnaan Vimentin imunohistokimia dalam identifikasi jaringan endometrium sangat tinggi dan mencapai 97%. Analisis imunohistokimia vimentin, yang mungkin mengidentifikasi dan membedakan kanker endometrium dari kanker serviks, dapat digunakan sebagai prosedur diagnostik pendahuluan dan menyederhanakan prosedur kuretase diagnostik (Sofian & Kampono, 2006). Metode pewarnaan imunohistokimia lain dilakukan dengan menggunakan metode TSA tidak langsung (NEN Life Science Products, RENAISSANCE) menggunakan antibodi monoklonal terhadap protein P53, pRb, dan c-myc (1:500). Anti-pewarnaan dilakukan dengan mengecat HE. Hasil foto mikroskopis diambil dengan pembesaran objektif 100x (Prayitno *et al.*, 2005).

C. Metode Pewarnaan Imunohistokimia

Sediaan kemudian dideparafinisasi dengan xilena (pa) dua kali selama tiga menit, kemudian direhidrasi dengan alkohol bertingkat (absolut, 95, 90, 80, dan 96%) dan air masing-masing selama lima menit. Sediaan dicuci sebentar dengan air mengalir, kemudian dengan

PBS. Untuk menghilangkan aktivitas peroksidase endogen, sediaan ditempatkan dalam larutan penghambat peroksidase (1:9) 10 menit pada suhu kamar atau 5 menit di bawah air keran. Sediaan diinkubasi dalam serum penyekat yang telah diencerkan selama 10 menit pada suhu 25°C. Antibodi monoklonal yang telah disiapkan Antibodi primer ditambahkan hingga 100 µl pada konsentrasi 4 µg/ml per preparat (d disesuaikan sampai semua bagian dibanjiri) dan kemudian diinkubasi di lingkungan yang lembab pada suhu kamar (25 °C). Preparat sampel diinkubasi secara berurutan dengan antibodi monoklonal yang digunakan dalam pengujian, kemudian preparat dicuci dengan PBS (segar) selama lima menit. Hingga 100 µl *biotinylated universal secondary antibody* (siap pakai) ditambahkan ke setiap sediaan, kemudian sediaan diinkubasi pada suhu kamar (25°C) selama lima menit. Cuci dengan PBS segar selama lima menit. Sediaan diinkubasi dengan reagen kompleks streptavidin/peroksidase siap pakai selama 10 menit. Cuci produk dengan PBS selama lima menit. Sediaan ditempatkan dalam 100 µl larutan substrat peroksidase (DAB) (1:9) dengan *slide* selama 2-10 menit (semakin tebal *slide*, semakin lama inkubasi) dan kemudian dicuci dengan air keran. 100 µl Mayer's hematoxylin (*counterstain*) ditambahkan, diinkubasi selama 1-3 menit, dan kemudian dicuci dengan air keran. Sediaan selanjutnya direndam dalam alkohol, dibersihkan, direndam dalam xylene. Sediaan kemudian disemprot dengan fiksatif, kemudian ditutup dengan kaca. Setelah kering, sampel dapat diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x dan 1000x. Sediaan berwarna coklat berarti protein yang diekspresikan oleh gen, sedangkan sediaan berwarna biru berarti tidak mengandung protein yang diekspresikan (Anonim, 2004). Antibodi yang digunakan adalah COX-2, Bcl-2, Caspase-3, P53, P21, GADD45, dan Ras.

D. Evaluasi/ Soal Latihan

1. Uraikan prinsip metode imunohistokimia.
2. Dalam analisis imunohistokimia akan digunakan antibody. Uraikan fungsi antibody ini.
3. Tahap akhir dari imunohistokimia adalah kopling dengan senyawa DAB (dimethyl amino benzidine). Uraikan fungsi tahap ini dalam rangkaian analisis imunohistokimia.

Bab 9

Hasil Pengecatan

A. Tujuan Pembelajaran

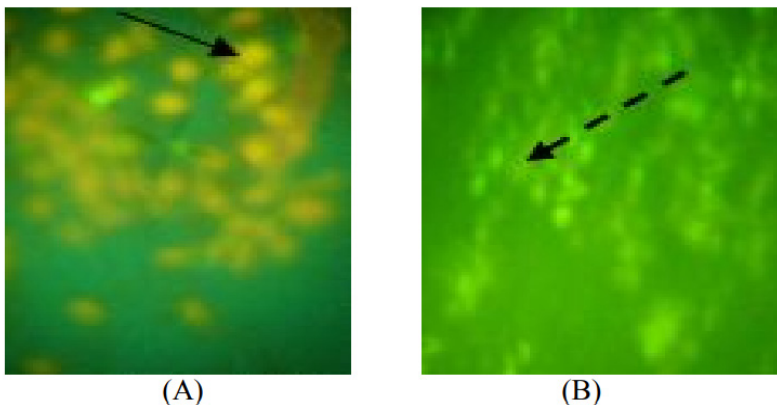
Mahasiswa mampu melakukan *review* dan menyampaikan kembali hasil-hasil penelitian pengembangan obat-obat kanker.

B. Pendahuluan

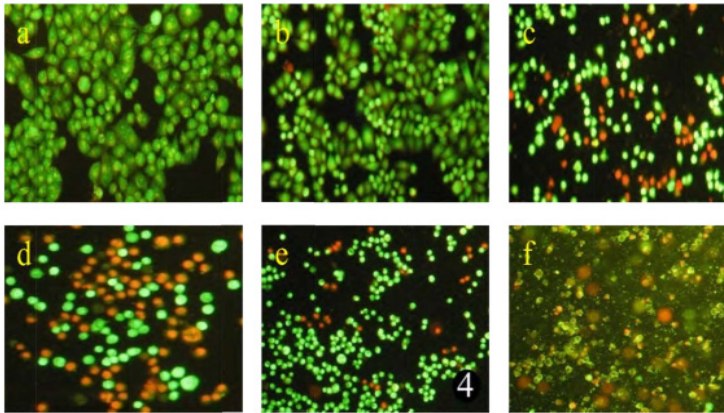
Sel yang mengalami apoptosis secara morfologi ditandai dengan terbentuknya badan apoptosis serta adanya NOR dalam inti. Badan apoptosis dapat diamati menggunakan pengecatan etidium bromid-akridin oranye yang akan berikatan dengan DNA. Keberadaan NOR dalam inti diuji dengan penambahan AgNOR. Pengecatan menggunakan etidium bromide serta AgNOR dilakukan pada jam ke-24 untuk memperoleh data kualitatif morfologi inti sel. Menurut Wyllie *et al.* (2000), sel yang mengalami apoptosis memiliki karakteristik vesikel membran sel, tetapi tidak kehilangan integritasnya, kromatin dan agregat membran nukleus, sitoplasma menyusut dan nukleus memadat, serta fragmentasi sel menjadi badan apoptosis (Wyllie *et al.*, 2000). Pengamatan kedua metode ini merupakan pengamatan terjadinya apoptosis atas dasar morfologi sel yang terbentuk serta terbentuknya NOR yang menunjukkan proliferasi sel. Hasil pengamatan menunjukkan secara morfologi terjadinya apoptosis dan proliferasi sel.

C. Pengecatan etidium bromid-akridin oranye

Pengecatan dengan etidium-bromida memperlihatkan fragmentasi DNA sel yang mengalami apoptosis. Pengecatan DNA dilakukan pada jam ke-24 untuk memperoleh data kualitatif morfologi inti sel. Identifikasi fragmentasi DNA dilakukan dengan etidium bromid yang akan berinterkalasi dengan DNA dan akan menghasilkan warna. Hasil pengecatan terhadap pengaruh pemberian isolat ditunjukkan pada Gambar 24. Gambaran morfologi pada kontrol menunjukkan bahwa DNA masih utuh, tidak terfragmentasi, dan tampak sebagai sel yang berbentuk lonjong dan tidak terlihat kematian sel atau fragmentasi. Warna DNA yang tidak terfragmentasi hasil pengecatan berwarna hijau. Jika terjadi fragmentasi DNA, maka terjadi warna oranye setelah dicat dengan etidium bromid-akridin oranye. Perlakuan isolat 1 memperlihatkan karakteristik apoptosis yang lebih kuat ditunjukkan oleh fragmentasi DNA yang berwarna oranye. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi apoptosis pada sel T47D oleh pengaruh isolat 1.



Gambar 24. Fotomikroskopi hasil staining dengan etidium bromide pada sel T47D dengan perlakuan isolate 1 pada konsentrasi 6,8 µg/mL 6(A) dan Kontrol (B). (-> = sel apoptosis. - -> = sel tidak mengalami apoptosis)



Gambar 25. Hasil pengecatan menggunakan acridin orange dan etidium bromide pada sel HeLa yang diberi perlakuan fraksi-fraksi ekstrak tapak liman (*Elephantopus scaber*)

Keterangan:

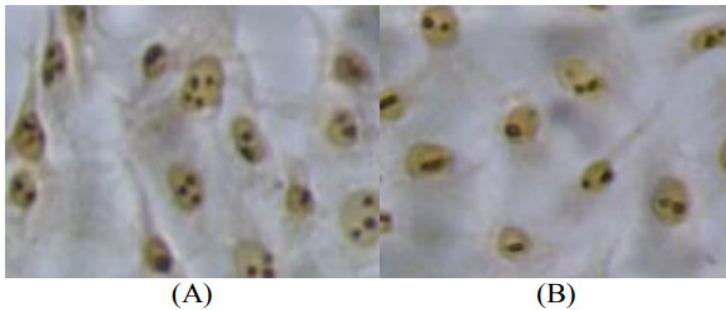
- a. control cell
 - b. sel yang diberi perlakuan DMSO
 - c. perlakuan fraksi petroleum ether 185 ug/ml
 - d. perlakuan fraksi kloroform 46,26 ug/ml
 - e. perlakuan fraksi etil asetat 96 ug/ml
 - f. perlakuan framsi methanol 650ug/ml
- (Nurkhasanah *et al.*, 2015)

D. Pengecatan AgNOR

Nilai AgNOR merupakan salah satu penanda terjadinya aktivitas proliferasi. Pengamatan dilakukan terhadap warna coklat kehitaman di dalam inti yang merupakan agriofil NOR yang terjadi akibat dari ikatan ion perak dengan argyrophilic. *Nuclear Organizer Region* (NOR) adalah lingkaran DNA pada lengan pendek kromosom akrosentrik 5 (13, 14, 15, 21, dan 22) di dalam nukleus dan terlibat dalam aktivitas gen ribosom, RNA, sintesis protein, dan proliferasi sel (Rizali dan Auerkari, 2003). Jumlah AgNOR per inti sel berhubungan dengan aktivitas pembelahan sel yang terjadi pada fase interfase (Bankfalvi *et al.*, 2002).

Penghitungan AgNOR dalam penelitian ini menggunakan teknik penghitungan mAgNOR (meanAgNOR). Cara ini dilakukan dengan mencari rata-rata jumlah titik hitam yang diamati terhadap jumlah sel yang ada, setidaknya 100.132 sel per pengamatan. Cara lain yang mungkin adalah pAgNOR, yang merupakan persentase jumlah sel dengan lebih dari lima titik hitam dari semua sel yang terdeteksi, minimal 100 sel per deteksi (Rizali and Auerkari, 2003). Isolat 1 ekstrak akar pasak bumi diuji pada konsentrasi 6,8 µg/mL pada pengujian AgNOR. Pengamatan dilakukan terhadap lima bidang pandang preparat uji di bawah mikroskop. Persentase nilai AgNOR pada inti sel T47D dihitung dengan cara membagi jumlah inti sel (berdasarkan jumlah AgNORnya) dengan jumlah sel total.

Pertambahan jumlah AgNOR menunjukkan terjadinya peningkatan aktivitas proliferasi sel. Jumlah NOR satu dianalogikan dengan jumlah NOR yang merupakan sel normal. Peningkatan jumlah NOR menunjukkan peningkatan proliferasi sel, sehingga tingkat keparahan kanker meningkat. Perhitungan NOR dalam penelitian ini menggunakan cara mAgNOR (mean = rata-rata) dengan jalan menentukan jumlah seluruh titik hitam dibagi dengan seluruh jumlah sel yang diamati. Isolat akar pasak bumi menunjukkan aktivitas menghambat proliferasi sel karena jumlah rata-rata NOR lebih besar dibandingkan dengan kontrol sel. Hasil pengamatan persentase AgNOR terlihat pada Tabel 10 dan Gambar 10.



Gambar 26. Fotomikroskopis hasil pengecatan AgNOR pada sel T47D (A) kontrol sel (tanpa sampel) (B) isolate 1 pasak bumi konsentrasi 6,8 µg/mL (perbesaran 400x) Jumlah noktah menunjukkan aktivitas proliferasi sel.

Hasil pengecatan dengan AgNOR menunjukkan bahwa persentase ekspresi NOR oleh pengaruh isolat lebih rendah dibanding kontrol dan perbedaan tersebut bermakna secara statistika dengan signifikansi = 0,011 ($p=95\%$). Titik hitam pada sel menunjukkan adanya ikatan Ag dengan NOR. Semakin banyak titik hitam tersebut menunjukkan proliferasi semakin terpacu. Hasil penurunan AgNOR sel T47D oleh pengaruh isolat 1 dalam penelitian ini menunjukkan bahwa isolat 1 dapat menurunkan proliferasi sel.

E. Evaluasi/ Soal Latihan

1. Uraikan perbedaan sifat pewarna acridine orange dan Etidium bromide.
2. Uraikan cara membedakan sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis dari sel normal pada analisis menggunakan AO-EtBr.
3. Uraikan prinsip pengecatan AgNOR.
4. Uraikan cara membedakan sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis dari sel normal pada analisis menggunakan AgNOR.

Daftar Pustaka

- Al-nuaimi, B. N. (2016). Gene Mutations. *Diagnostic Pathology: Molecular Oncology*, (March), 1-10-1–13. doi.org/10.1016/b978-0-323-37678-5.50010-4
- Adikusuma, W., Chou, W.-H., Lin, M.-R., Ting, J., Irham, L.M., Perwitasari, D.A., Chang, W.-P., Chang, W.-C. (2022). Identification of Druggable Genes for Asthma by Integrated Genomic Network Analysis. *Biomedicines*. 10. doi:10.3390/biomedicines10010113.
- Adikusuma, W., Irham, L.M., Chou, W.H., Wong, H.S., Mugiyanto, E., Ting, J., Perwitasari, D.A., Chang, W.P., Chang, W.C. (2021). Drug Repurposing for Atopic Dermatitis by Integration of Gene Networking and Genomic Information. *Front Immunol*. 12. doi:10.3389/fimmu.2021.724277.
- Banday, M. Z., & Nissar, S. (2021). Genetic Polymorphism and cancer susceptibility. *Genetic Polymorphism and Cancer Susceptibility*.
- Banoon, S. R., Salih, T. S., & Ghasemian, A. (2022). Genetic Mutations and Major Human Disorders: A Review. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(2), 571–589. doi.org/10.21608/EJCHEM.2021.98178.4575
- Berridge, M. J. (2014). Cell Cycle and Proliferation. *Cell Signalling Biology*, 6, csb0001009. doi.org/10.1042/csb0001009
- Burton, K. (1962). Deoxyribonucleic acid. *British Medical Bulletin*. 18(1). 3–9. doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a069930

- Carella, G. (2003). Introduction to apoptosis in ophthalmology. *European Journal of Ophthalmology*. 13. S5–S10. doi.org/10.1177/112067210301303S02
- Chezhiyan, J. E. (2021). A Review on Protein Synthesis and Genetic Code Abstract. *Biochemistry & Molecular Biology Journal*. 7(3–7).
- Hu, X. M., Li, Z. X., Lin, R. H., Shan, J. Q., Yu, Q. W., Wang, R. X., ... Xiong, K. (2021). Guidelines for Regulated Cell Death Assays: A Systematic Summary, A Categorical Comparison, A Prospective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9.1–28. doi.org/10.3389/fcell.2021.634690
- Hussar, P., Žuravskaja, M., & Kärner, M. (2013). Apoptosis regulator BCL-2. *Papers on Anthropology*. 22(63). doi.org/10.12697/poa.
- Ismail, S., & Essawi, M. (2012). Genetic Polymorphism Studies in Humans. *Middle East Journal of Medical Genetics*, 1(2), 57–63. doi.org/10.1097/01.mxe.0000415225.85003.47
- Irham, L.M.; Adikusuma, W.; Perwitasari, D.A. (2022). Genomic variants-driven drug repurposing for tuberculosis by utilizing the established bioinformatic-based approach. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 32, 101334, doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101334.
- Irham, L.M.; Adikusuma, W.; Perwitasari, D.A.; Dania, H.; Maliza, R.; Faridah, I.N.; Santri, I.N.; Phiri, Y.V.A.; Cheung, R. (2022). The use of genomic variants to drive drug repurposing for chronic hepatitis B. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 31, 101307, doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101307.
- Irham, L.M.; Chou, W.-H.; Calkins, M.J.; Adikusuma, W.; Hsieh, S.-L.; Chang, W.-C. (2020). Genetic variants that influence SARS-CoV-2 receptor TMPRSS2 expression among population cohorts from multiple continents. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 529. 263-269, doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.179.

- Irham, L.M.; Wong, H.S.; Chou, W.H.; Adikusuma, W.; Mugiyanto, E.; Huang, W.C.; Chang, W.C.(2020). Integration of genetic variants and gene network for drug repurposing in colorectal cancer. *Pharmacol Res.* 161, 105203, doi:10.1016/j.phrs.2020.105203.
- Irham, L.M.; Wong, H.S.; Perwitasari, D.A.; Chou, W.H.; Yang, H.I.; Chang, W.C. (2019). Single-nucleotide polymorphism of rs7944135 (macrophage-expressed gene 1) is associated with hepatitis B surface antigen seroclearance in chronic hepatitis B infection: A cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 98, e17936, doi:10.1097/md.00000000000017936.
- Kabirai, A., Alka Chahar, Chahar, N., & Gupta, J. (2020). Chemical carcinogenesis: A brief review on mechanism & metabolism. *Journal of Oral Medicine, Oral Surgery, Oral Pathology and Oral Radiology*, 6(3), 120–124. doi.org/10.18231/j.joooo.2020.027
- Karki, R., Pandya, D., Elston, R. C., & Ferlini, C. (2015). Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Medical Genomics*, 8(1), 1–7. doi.org/10.1186/s12920-015-0115-z
- Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, G. P., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzel, E., & Green, D. R. (2006). Acridine Orange/ Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. *Cold Spring Harbor Protocols*. (3), pdb.prot4493. doi.org/10.1101/pdb.prot4493
- Kepekçi, A. H., Gündoğan, G. İ., & Kig, C. (2021). In vitro physiological effects of betahistine on cell lines of various origins. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 18(2), 140–145. doi.org/10.4274/tjps.galenos.2020.88155
- Kirby, R. (2011). DNA as Genetic Material and Nucleic Acid Metabolism. *Fundamentals Of Biochemistry, Cell Biology And Biophysics*, I.

- Krause, M. (1995). Transcription and Translation. *Methods in Cell Biology*, 48(C), 483–512. doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61400-4
- Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M., & Kioussi, C. (2012). Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods in Molecular Biology*, 887, 41–47. doi.org/10.1007/978-1-61779-860-3_5
- Lectures, O. G. (2015). DNA Is the Genetic Material. In *DNA Is the Genetic Material* (pp. 1–4).
- Martinez, M. M., Reif, R. D., & Pappas, D. (2010). Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical Methods*, 2(8), 996–1004. doi.org/10.1039/c0ay00247j
- Mahfudh, N., & Pihie, A. H. L. (2008). Eurycomanone induces apoptosis through the up-regulation of p53 in human cervical carcinoma cells. *Journal of Cancer Molecules*, 4(4), 109–115.
- MedlinePlus Genetics. (2020). Help Me Understand Genetics Genomic Research. National Library of Medicine. Retrieved from <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/genomicresearch/snp/>
- Meisenberg, G., & Simmons, W. H. (2012). DNA, RNA, and Protein Synthesis. *Principles of Medical Biochemistry*. doi.org/10.1016/b978-0-323-07155-0.00006-x
- Nambiar, K. S., & Hegde, V. (2016). Apoptosis detection modalities: A brief review. *International Dental & Medical Journal of Advanced Research*. 2(1), 1–5. doi.org/10.15713/ins.idmjar.53
- Natassya, P., & Bachtiar, E. W. (2022). Immunocytochemistry and Western Blot Test for the In-situ Detection of Biomarkers of Osteogenesis. *Scientific Dental Journal*, 8(1), 10–17. doi.org/10.4103/SDJ.SDJ
- Nurani, L.H. (2012). Uji Sitotoksitas Dan Antiproliferatif Sel Kanker Payudara T47d Dan Sel Vero Biji Nigella Sativa, L. *Pharmaciana Nurkhasanah*, Trisnamurti, K. C., Gunaryanti, R. D., & Widyastuti, T.

- (2015). The Screening Of Cytotoxic Fraction From *Elephantopus scaber* Linn against Human Cervical Cancer (Hela) Cells. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 6(6), 1011–1014.
- Nurkhasanah, M. (2009). Kesan sitotoksik eurikomanon daripada *Eurycoma longifolia* Jack terhadap sel karsinoma serviks manusia (HeLa). University Kebangsaan Malaysia.
- Novus Biologicals. (2016). Apoptosis Handbook. Apoptosis Handbook.
- Obeng, E. (2021). Apoptosis (Programmed cell death) and its signals-a review. *Brazilian Journal of Biology*, 81(4), 1133–1143. doi.org/10.1590/1519-6984.228437
- Patel, N. R., Wong, M. L., Dragun, A. E., Mose, S., Donahue, B. R., Cooper, J. S., ... Mackay, M. K. (2013). MTT Assay. *Encyclopedia of Radiation Oncology*, 6597, 517–517. doi.org/10.1007/978-3-540-85516-3_613
- Pleyer, L., Tinhofer, I., Greil, R., Damia, G., & Marsoni, S. (2007). Regulation of apoptosis. In *ESMO Handbook on Principles of Translational Research* (pp. 67–80). doi.org/10.1201/9781420038156.ch2
- Rastogi, R. P., Richa, & Sinha, R. P. (2009). Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI Journal*, 8, 155–181.
- Rettner, R. (2017). DNA: Definition, Structure, and Discovery. Cornell Center for Materials Research, 1–2.
- Salgame, P., Varadhachary, A. S., Primiano, L. L., Fincke, J. E., Muller, S., & Monestier, M. (1997). An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Research*, 25(3), 680–681. doi.org/10.1093/nar/25.3.680
- Sgonc, R., & Gruber, J. (1998). Apoptosis detection: An overview. *Experimental Gerontology*, 33(6), 525–533. doi.org/10.1016/S0531-5565(98)00031-X

- Sivamani, B. kar and S. (2015). Apoptosis: Basic Concepts, Mechanisms and Clinical Implications. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(3), 940–950.
- Sukhumsirichart, W. (2018). Polymorphisms Polymorphisms, 3–24. doi.org/10.5772/intechopen.76728
- Toteja, R. (2016). Cell and molecular Biology Cell Cycle and Cell Cycle Regulation. Acharya Narendra Dev College, Univesity of Delhi, (January 2011).
- Valavanidis, P. A., & Vlachogianni, T. (2010). “Carcinogenic Chemicals : Classification and Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans by International Organizations and the European Union”.
- Wulandari, E. (2011). Apoptosis: Protein yang Terlibat dan Perannya dalam Sel Normal. *Medika Islamika*.
- Yadav, K., Singhal, N., Rishi, V., & Yadav, H. (2014). Cell Proliferation Assays. *ELS*, (April 2018). doi.org/10.1002/9780470015902.a0002566
- Young, F. G. (1962). Protein Synthesis. *Bmj*. 1(5272). 161–162. doi.org/10.1136/bmj.1.5272.161-b

Glosarium

Apoptosis

suatu bentuk kematian sel terjadwal dan berupa serangkaian reaksi biokimia yang terkoordinasi dan bertahap yang menghasilkan pembongkaran sel secara berurutan dari suatu organisme.

Caspase

protease sistein yang memiliki peran penting dalam apoptosis dan sangat penting untuk menginduksi apoptosis atau kematian sel.

Deoxyribonuclease

enzim yang mampu mengkatalisis hidrolisis DNA.

Double helix

bentuk untai ganda dari DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) yang membentuk model tiga dimensi dari molekul DNA.

Growth factors receptors (GFRs)

protein transmembran yang berikatan dengan faktor pertumbuhan spesifik dan mengirimkan instruksi yang disampaikan oleh faktor tersebut ke ruang intraseluler.

haematocyllin dan eosin

salah satu jenis pewarnaan jaringan yang umum digunakan dalam pewarnaan jaringan.

Imunohistokimia

aplikasi *immunostaining* dasar untuk mengidentifikasi ikatan antigen – antibodi pada suatu sel jaringan.

Karsinogen

zat yang berpotensi menyebabkan kanker.

Kemoterapi

prosedur pengobatan atau terapi kanker dengan memberikan obat-obatan untuk membunuh sel kanker.

Kromosom

sebuah molekul DNA panjang yang mengandung sebagian atau seluruh materi genetik suatu organisme.

Metastasis

kondisi ketika sel kanker telah menyebar ke beberapa jaringan tubuh.

Mutasi

perubahan yang terjadi pada urutan nukleotida.

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)

kelompok senyawa bersifat karsinogenik atau mutagenik.

Ribonucleic Acid (RNA)

salah satu materi genetik yang terdiri atas nukleotida.

Siklooksigenase (COX)

enzim yang berperan penting dalam proses inflamasi.

Sitotoksisitas

tingkat merusaknya suatu zat pada sel.

Indeks

A

Apoptosis vii, x, xiii, xiv, 38, 39, 46, 52, 53,
54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63,
64, 66, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92,
94, 95, 96, 101, 102, 105, 108, 109, 110,
111, 112, 113

D

DNA vii, ix, xiii, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 14, 16, 18, 20,
22, 24, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 33, 35,
36, 49, 54, 56, 61, 87, 91, 92, 95, 101,
102, 103, 109, 110, 111, 113, 114

I

Imunohistokimia vii, x, 82, 88, 97, 98, 100, 114

K

Kanker i, iii, iv, v, vii, ix, xiv, 1, 7, 8, 9, 10, 12,
13, 14, 20, 23, 29, 30, 33, 39, 41, 44,
45, 46, 47, 48, 49, 51, 52, 54, 60, 61,
62, 77, 78, 79, 81, 97, 98, 101, 104, 110,
114, 119

Karsinogen vii, ix, x, 7, 8, 9, 12, 33, 34, 44, 49,
76, 114, 119

Karsinogenesis i, iii, iv, v, vii, ix, 7, 9, 12, 35,
45, 46, 47, 63, 77

Kemopreventif x, xiv, 44, 45, 46, 47, 49, 51,
64, 65, 66, 67, 76, 78, 82

Kemoterapi vii, x, 39, 40, 41, 42, 114

M

Materi Genetik ix, 9, 23, 24, 25, 114

Metabolisme x, xiii, 7, 8, 12, 33, 34, 46, 47, 48

Mutasi vii, ix, xiii, 9, 10, 13, 14, 16, 18, 22, 28,
29, 30, 31, 32, 33, 35, 39, 44, 52, 114

P

Pengecatan x, xi, xiv, 65, 66, 67, 74, 75, 79,
80, 86, 88, 89, 101, 102, 103, 105

Polimorfisme vii, ix, 13, 14, 16, 18, 20, 22

R

RNA xiii, 3, 4, 6, 24, 25, 26, 27, 35, 67, 103,
110, 114

S

Sel v, vii, ix, x, xiii, xiv, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 14,
23, 24, 25, 26, 28, 29, 33, 35, 36, 37,
38, 39, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 48, 51,
52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62,
64, 66, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75,
76, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93,
94, 95, 96, 97, 98, 101, 102, 103, 104,
105, 110, 111, 112, 113, 114

Sitotoksitas x, 56, 66, 68, 72, 73, 74, 85,
96, 114

T

Transkripsi vii, ix, 3, 4, 6, 25, 26, 32, 33, 37,

38

Translasi vii, ix, 3, 4, 6, 26, 27, 33

Biografi Penulis



apt. Laela Hayu Nurani, apt., M.Si., Dr.,

Laela Hayu Nurani adalah dosen di Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan dengan penelitian utama pada kajian bahan alam terkait dengan obat dan kesehatan. Mata kuliah yang diampunya adalah Farmakognosi, Fitokimia, Fitoterapi, Kanker dan Karsinogen, Pengembangan Bahan Alam, dan Metodologi Penelitian. Penelitian bahan alam yang ditekuninya meliputi analisis kandungan kimia serta akvitasnya. Dia melakukan publikasi dari hasil penelitian dan review di beberapa jurnal internasional tentang analisis kimia bahan alam baik hewan maupun tumbuhan yang terkait dengan obat dan kesehatan. Disertasi yang dikerjakannya terkait dengan Isolasi dan Identifikasi Senyawa Bahan Aktif dari Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia*) sebagai Antikanker secara In Vitro dan In Vivo. Pelaksanaan pendidikan yang dikerjakannya meliputi bidang ilmu Farmakognosi, Fitokimia, Fitoterapi, dan Metodologi Penelitian. Dia dapat dihubungi di laela.farmasi@pharm.uad.ac.id.



Prof. apt. Dr. Nurkhasanah, apt., M.Si.

Nurkhasanah adalah dosen di Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta. Lahir di Magelang, 9 November 1972. Menyelesaikan studi S-1 di Fakultas Farmasi UGM tahun 1995, S-2 Fakultas Farmasi UGM tahun 2002, dan S-3 Biokimia di Universiti Kebangsaan Malaysia tahun 2009. Pada tahun 2020, dia dikukuhkan sebagai Guru Besar di bidang Ilmu Farmasi. Selain mengajar dan melakukan riset, dia aktif dalam kegiatan organisasi di dalam maupun di luar kampus. Saat ini, dia diamanahi jabatan Wakil Dekan bidang

Al-Islam dan Kemuhammadiyah, Akademik, dan Kemahasiswaan Fakultas Farmasi UAD. Di luar kampus, dia tergabung dalam Dewan Pakar Ikatan Cendekiawan Muslim Indonesia (ICMI) serta Lembaga Pemeriksa Halal dan Kajian Halal Thayyiban PP Muhammadiyah. Dia juga merupakan salah satu perintis dan aktif di Ahmad Dahlan Halal Centre. Selain itu, saat ini dia juga merupakan editor in chief Jurnal Pharmacia (jurnal nasional terakreditasi peringkat 2). Dia dapat dihubungi di nurkhasanah@pharm.uad.ac.id.



apt. Lalu Muhammad Irham, M.Farm., Ph.D.

Lalu Muhammad Irham lahir di Sakra, Lombok Timur, Nusa Tenggara Barat, pada tanggal 8 Agustus 1991. Saat ini dia adalah Dosen di Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta. Dia memperoleh gelar sarjana, profesi apoteker, dan magister bidang Farmasi Klinik di Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta. Sejak 2016, dia bergabung sebagai dosen di Universitas Ahmad Dahlan. Dia memperoleh gelar Ph.D. (S-3) pada tahun 2021 dari Program Pharmacogenomic and Pharmacoproteomic di School of Pharmacy, College of Pharmacy, Taipei Medical University, Taiwan. Saat ini, Lalu Irham menjadi editor in chief di Media Farmasi: Jurnal Ilmu Farmasi (Journal of Pharmaceutical Science). Hingga saat ini, dia menjadi reviewer aktif di jurnal internasional bereputasi, antara lain *Frontiers in Molecular Neuroscience*; *World Journal of Gastroenterology*; *World Journal of Hepatology*; *World Journal of Gastrointestinal Oncology*; *Cancers (MDPI)*; *International Journal of Molecular Sciences (MDPI)*; *Genes (MDPI)*; *Microorganisms (MDPI)*; *Journal of Personalized Medicine (MDPI)*; *BMC Public Health*; *BMC in Neurology*; *F1000 Research*; *Journal of Pharmacy Practice*; *Virology journal (Springer Nature)*; *BMC Complementary Medicine and Therapies*; *Genomics and Informatics*; dan *Scientific Report*.

Perkembangan ilmu Biologi Sel yang semakin maju memberikan tuntutan kepada mahasiswa, terutama mahasiswa farmasi, untuk memahami berbagai perkembangan penyakit, terutama penyakit kanker yang saat ini menjadi masalah akibat tingginya prevalensi kematian yang diakibatkan oleh penyakit tersebut di Indonesia. Mahasiswa farmasi yang nantinya akan berhadapan langsung dengan masalah ini, baik dengan pasien maupun dalam laboratorium, diharuskan untuk memahami konsep-konsep dasar penyakit kanker hingga terapinya.

Buku ajar *Kanker dan Karsinogenesis* ini sangat direkomendasikan sebagai salah satu media dalam pembelajaran mahasiswa farmasi untuk memudahkan dalam menyelesaikan perkuliahan pada matakuliah Biologi Sel. Buku ini dilengkapi dengan tahapan penelitian yang dilakukan oleh penulis hingga tahap pengujian dan hasilnya, sehingga dapat dijadikan acuan dan contoh bagi mahasiswa yang membacanya. Di sisi lain, buku ini berisi teori-teori kanker dan karsinogenesis dari dasar hingga terapi pengobatannya serta menggunakan referensi yang mendukung dan bereputasi sehingga memudahkan mahasiswa untuk memahaminya.

Oleh karena itu, buku ajar *Kanker dan Karsinogenesis* ini diharapkan dapat memberikan manfaat bagi pembaca, khususnya para mahasiswa farmasi.

