

BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Ekstraksi temulawak

Penelitian ini menggunakan rimpang temulawak (*Curcuma xanthorriza, Roxb*) yang didapatkan dari pasar Beringharjo sebanyak 3kg. Pengekstrakan rimpang temulawak (*Curcuma xanthorriza, Roxb*) dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu Universitas Gadjah Mada menggunakan metode maserasi. Hasil pengestrakan didapatkan ekstrak etanol rimpang temulawak berbentuk pasta kental seberat 52,13 gram dengan warna hitam kekuningan.



Gambar 6. Ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorriza, Roxb*)

2. Uji sitotoksitas rimpang temulawak pada sel HeLa

Parameter atau indikasi untuk menilai potensi kemopreventif antiproliferasi dari ekstrak temulawak yang diujikan pada kultur sel hela dengan melakukan uji sitotoksitas ekstrak temulawak terhadap sel HeLa. Pada uji sitotoksitas ini dilakukan dengan metode pengamatan dengan MTT (3 – (4–5 – dimetiltiazol-2-yl) – 2,5 – difenil tetrazolium bromid) yang merupakan garam tetrazolium yang sifatnya larut dalam air dengan menghasilkan larutan berwarna kuning. Sel hidup dapat mereduksi MTT, sedangkan sel mati tidak dapat mereduksi MTT karena enzim di dalam sel tidak berfungsi lagi. Prinsip dasarnya adalah kerja enzim mitokondria pada sel aktif yang memetabolisme garam tetrazolium, sehingga terjadi pemutusan cincin tetrazolium oleh enzim dehidrogenase yang menyebabkan tetrazolium berubah menjadi formazan yang tidak larut dan berwarna ungu (Mosmann, 1983). Intensitas warna ungu ini mempunyai korelasi langsung dengan jumlah sel yang hidup. Intensitas warna ungu dan besarnya absorbansi diukur dengan ELISA reader (*scanning multiwell spectrophotometer*). Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 550 nm, yaitu panjang gelombang optimum agar diperoleh pengukuran yang peka dan spesifik (Burgess, 1988). Intensitas warna ungu yang terbentuk sebanding dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme atau dengan kata lain sebanding dengan jumlah sel yang hidup. Semakin kuat intensitas warna ungu yang diperoleh absorbansi akan semakin besar. Hal ini menandakan bahwa banyak sel yang hidup

dan bereaksi dengan garam tetrazolium, sehingga formazan yang terbentuk juga banyak. Absorbansi yang didapat kemudian digunakan untuk menghitung persentase kehidupan. Data hasil uji MTT digunakan untuk menghitung persentase kehidupan sel Hela dengan menggunakan rumus sebagai berikut;

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{(A_p - A_{KM}) \times 100\%}{(A_{KP} - A_{KM})}$$

Keterangan : A_p = Absorbansi perlakuan
 A_{KM} = Absorbansi Kontrol Media
 A_{KP} = Absorbansi Kontrol Pelarut

Perhitungan sel hidup dapat dilihat pada lampiran. Hasil perhitungan dari rumus persentase sel hidup setelah diberi perlakuan disajikan pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengujian sitotoksisitas ekstrak temulawak terhadap persentase kehidupan sel Hela

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	A_p	% Sel Hidup
50	0,354	0.25
25	0,6946	0.75
12.5	0,6636	37.08
3.125	0,743	98.58
AKM	0,0795	
AKP	0,6795	

Keterangan : A_{KM} : Absorbansi Kontrol Media; A_p : Nilai Absorbansi Perlakuan; A_{KP} : Absorbansi Kontrol Pelarut

Berdasarkan data pada tabel dapat diketahui bahwa terdapat hubungan antara konsentrasi ekstrak temulawak dengan persentase sel hidup. Semakin rendah konsentrasi ekstrak temulawak maka persentase sel hidup semakin tinggi.

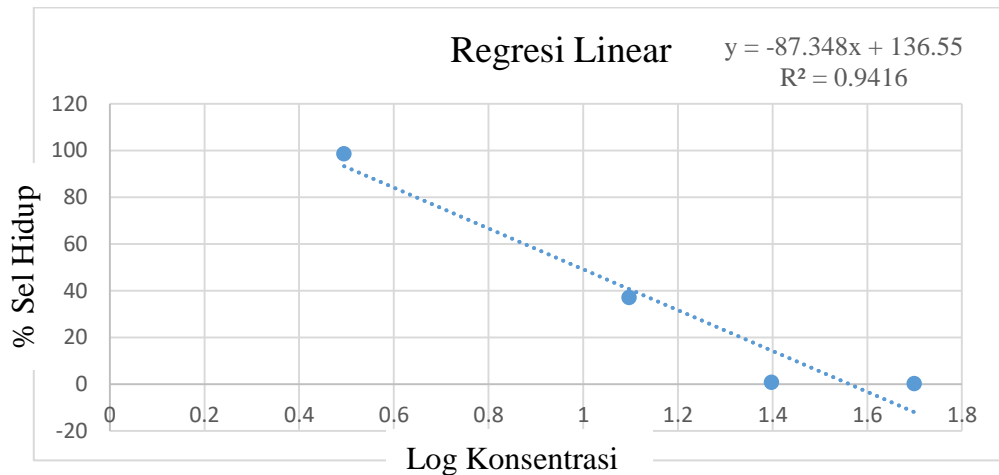
3. Penentuan Nilai IC50

IC50 adalah konsentrasi ekstrak temulawak yang dapat menghambat aktivitas proliferasi dari sel kanker sebesar 50% pada kultur sel HeLa kanker serviks. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza, Roxb*) berpotensi sebagai agen kemopreventif pada sel HeLa kanker serviks. Berdasarkan hasil dari pengujian MTT yang dilakukan pada kelompok konsentrasi 200µg/ml didapatkan hasil yang memenuhi syarat untuk melanjutkan ke tahap penentuan nilai IC50. Pengukuran nilai IC50 dapat dihitung dengan menggunakan nilai log konsentrasi ekstrak temulawak dengan persentasi sel hidup seperti dicantumkan dalam tabel 3.

Tabel 3. Hasil pengukuran uji regresi linear

Konsentrasi (µg/ml)	Log Konsentrasi	% Sel Hidup
50	1.69897	0.25
25	1.39794	0.75
12.5	1.09691	37.08
3.125	0.49485	98.58

Nilai Regresi Linier	$y = -87.348x + 136.55$ $R^2 = 0.9416$
----------------------	---



Gambar 7. Grafik uji regresi linear hasil uji MTT

Potensi kemopreventif pada uji MTT menunjukkan bahwa nilai IC50 dari ekstrak temulawak pada sel HeLa dapat diukur dari nilai $y=5$. Nilai IC50 dapat ditentukan melalui antilog dari nilai x pada persamaan regresi tersebut dimana $y=5$.

$$y = -87.348x + 136.55$$

$$50 = -87.348x + 136.55$$

$$x = \frac{50 - 136.55}{-87.348} = 0,99 \text{ -----} \rightarrow \text{Antilog IC50} = 9,77 \mu\text{g} / \text{ml}$$

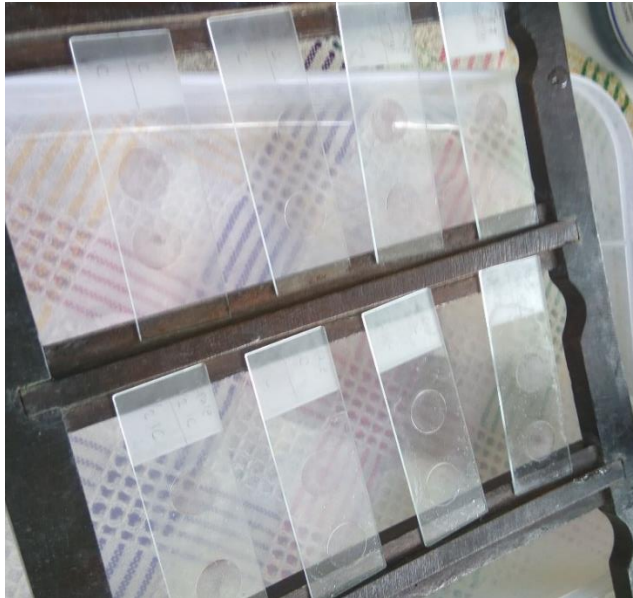
Menurut Kamuhabwa *et al.* (2000), jika suatu ekstrak memiliki nilai IC 50 <100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ maka dapat dikatakan memiliki potensi sebagai antiproliferasi, sedangkan menurut National Cancer Institute (NCI) mengelompokkan suatu senyawa tergolong antikanker jika IC 50 <20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa ekstrak rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza, Roxb*) berpotensi sebagai agen kemopreventif pada kanker serviks.

4. Mekanisme kemopreventif temulawak pada ekspresi p53

Uji Imunositokimia pada kultur sel HeLa

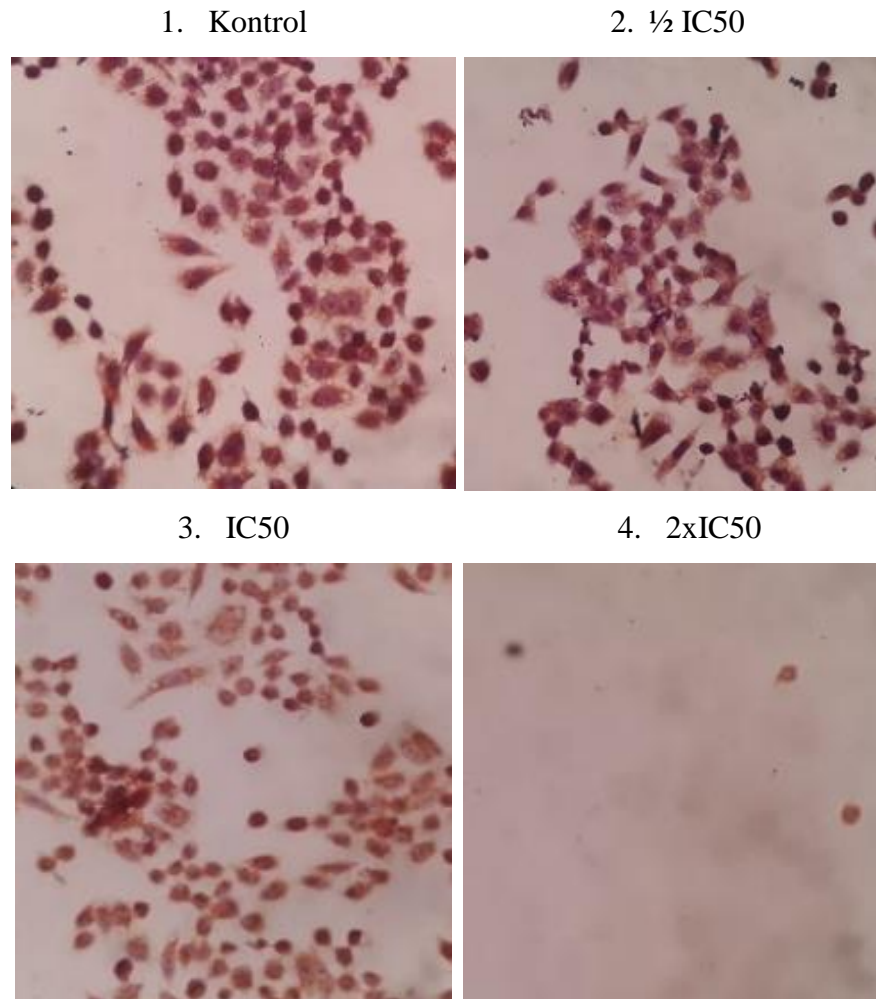
Mekanisme aksi proliferasi ekstrak temulawak pada sel HeLa kanker serviks dapat dipahami dengan menguji efektifitas ekstrak temulawak dilihat dari ekspresi p53 pada sel HeLa kanker serviks. Gen p53 adalah salah satu gen yang bertanggung jawab untuk mengaktifkan sistem apoptosis pada kanker serviks atau neoplasma.

Metode Imunositokimia digunakan untuk melihat adanya peningkatan ekspresi gen p53 pada sel HeLa kanker serviks. Penelitian ini menggunakan 3 nilai konsentrasi IC50 yaitu konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC50, konsentrasi sama dengan IC50 dan dua kali dari nilai IC50. Masing-masing kelompok konsentrasi ditetaskan pada *coverslip* dalam setiap sumuran. *Cover slip* dalam sumuran sebelumnya sudah tertanam sel HeLa kanker serviks. Antibodi monoklonal primer gene p53 ditetaskan pada setiap sumuran dengan penambahan antibodi sekunder biotin. Penambahan antibodi primer dan sekunder bertujuan untuk melihat adanya perbedaan ekspresi gene p53 pada setiap kelompok perlakuan yang ditunjukkan dengan adanya warna merah.



**Gambar 8. Objek glass dari hasil uji imunositokimia
Interpretasi uji imunositokimia**

Pengujian apoptosis dengan menggunakan uji ICC yang dilakukan dengan penambahan gen p53. Hasil dari uji ICC didapatkan penampakan sel hidup dalam *coverslip* pada *object glass* yang memperlihatkan ekspresi gen p53 setelah dilakukan pengecatan. Penampakan dari sel Hela pada uji ICC dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Hasil gambaran sel kanker serviks yang sudah dengan induksi gen p53 dengan pembesaran 100x.

- A. Proses apoptosis pada kelompok 1,2,3 dilihat dari perubahan morfologi sel Hela yang menampakkan kesan hiperpigmentasi oleh karena ekspresi p53.
- B. Proses apoptosis pada kelompok 1 termasuk katagori rendah dilihat dari perhitungan subjektif per lapang pandang.
- C. Proses apoptosis pada kelompok 2 termasuk katagori sedang dilihat dari perhitungan subjektif per lapang pandang.
- D. Proses apoptosis pada kelompok 3 termasuk katagori tinggi dilihat dari perhitungan subjektif per lapang pandang.
- E. Proses apoptosis pada kelompok 4 tidak dapat dihitung dikarenakan sel Hela mengalami lisis.

Berdasarkan hasil pengecatan dengan menggunakan metode ICC dapat dilihat adanya ekspresi p53 pada inti sel kanker Hela yang memiliki

warna lebih gelap. Hal tersebut dapat terjadi akibat gen p53 yang bekerja pada inti sel sebagai agen apoptosis pada sel. Selain itu perubahan morfologi pada sel HeLa yang semula berbentuk segitiga piramid menjadi bulat. Namun tidak terlihat adanya sel hidup pada kelompok 2xIC50.

5. Uji analitik ekspresi gen p53 pada sel hela kanker serviks

Analisis statistic dimulai dengan tes normalitas dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk karena jumlah sampel kurang dari 50. Selain itu tes ini bertujuan untuk mengetahui distribusi dan homogenitas dari masing-masing perlakuan. Hasil dari uji Shapiro-wilk $p > 0,05$. Sehingga pengolahan data selanjunya dapat menggunakan uji parametric Anova satu jalur.

Tabel 4. Ekspresi p53 dari hasil pengenceran ekstrak temulawak pada sel HeLa

Kelompok	Ekspresi +	Ekspresi -	Indeks p53 (ekspresi p53+/total cell)
1/2 IC50 (n=3)	118,33±30,56	21,00±7,00*	0.8067±0.05*
IC50 (n=3)	156,00±32,00*	23,00±1,00*	0.8833±0.03*
2xIC50 (n=3)	N.A.	N.A.	N.A.
Media (n=3)	77,33±7,50	55,67±10,01	0.5833±0.02

note:*=P<0.05 terhadap kelompok media

Berdasarkan tabel 4 diketahui bahwa ekstrak temulawak meningkatkan ekspresi p53 pada sel HeLa kanker serviks pada kedua kelompok konsentrasi. Hasil dari perhitungan ekspresi gen p53 pada konsentrasi 1/2 IC50 dan IC50 terjadi peningkatan index ekspresi p53 ($p < 0.05$). Ekspresi dari p53 pada kelompok konsentrasi =IC50 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok konsentrasi 1/2IC50. Pada kelompok

konsentrasi $2 \times IC_{50}$ tidak terdapat sel yang hidup sehingga ekspresi p53 tidak dapat dilihat. Hasil dari data tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi IC_{50} efektif untuk meningkatkan proses apoptosis pada sel HeLa kanker serviks.

Dari hasil pengukuran ekspresi p53 dari konsentrasi IC_{50} dan kontrol media akan dibandingkan satu sama lain menggunakan uji post hoc. Hasil yang didapatkan dicantumkan pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil Uji Post Hoc

Konsentrasi	Pembandingan	Sig.
$\frac{1}{2} IC_{50}$	$=IC_{50}$.042
	Media	.000
$=IC_{50}$	$=\frac{1}{2} IC_{50}$.042
	Media	.000
Media	$=\frac{1}{2} IC_{50}$.000
	$=IC_{50}$.000

Perbandingan setiap kelompok kontrol dan kelompok konsentrasi didapatkan hasil yang signifikan ($p < 0.05$). Hal ini dilihat dari perbandingan nilai $\frac{1}{2} IC_{50}$ dengan IC_{50} dengan hasil signifikansi 0.042, perbandingan nilai IC_{50} dengan kontrol media dengan hasil signifikansi 0.000, dan perbandingan nilai $\frac{1}{2} IC_{50}$ dengan kontrol media dengan hasil signifikansi 0.000.

B. Pembahasan

Penyebab utama kanker serviks adalah infeksi dari Human Papillomavirus (HPV), dengan identifikasi DNA dari HPV 95% yang menyebabkan keganasan dari lesi serviks. HPV akan menjadikan protein p53 sebagai target degradasi, menghilangkan siklus G1 atau terjadinya apoptosis

dan agen penghancuran DNA (dari etiologi). Gen p53 dan rb oleh protein dari virus HPV yang tidak aktif akan mengakibatkan kurangnya respon terapi kemo pada etiopathologi dari kanker serviks seperti infeksi virus HPV dan kurangnya fungsi dari gen penekan tumor. Terapi yang sudah teruji secara *evidence based* untuk kanker adalah dengan mematikan sel tumor seperti terjadinya apoptosis pada sel kanker.

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza, Roxb*) memiliki aktivitas anti tumor, anti inflamasi dan agen hepatoprotektif yang telah terbukti pada beberapa penelitian terdahulu (Sidik *et al*, 1992). Aktivitas tersebut diperankan oleh kandungan bahan aktif yang terkandung dalam temulawak yaitu kurkuminoid dan santhorizol yang telah diuji secara laboratotium (Aries, 2012; Oon *et al*, 2015). Kurkumin dan santhorizol yang berasal dari temulawak dapat dimanfaatkan sebagai senyawa antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Zat kurkuminoid memberikan warna kuning pada rimpang temulawak, bahkan makanan dan minuman. Senyawa kurkumin termasuk ke dalam fraksi kurkuminoid. Senyawa ini bersifat tidak dapat larut dalam air maupun dietileter, sehingga lebih mudah larut pada lemak. Kandungan lain dari temulawak adalah santorizol. Senyawa ini merupakan komponen dari minyak atsiri yang berarti mudah menguap dan tidak larut dalam air.

Pada penelitian ini, ekstrak etanol rimpang temulawak dilakukan uji sitotoksik menggunakan uji MTT untuk mendapatkan nilai IC50 dengan hasil yang didapatkan sebesar 32,36 µg/ml. Terdapat perbedaan nilai IC50 dengan

penelitian lain yang didapat pada ekstraks methanol rimpang temulawak dengan nilai IC50 sebesar 16,60 µg/ml (Udin, 2013). Perbedaan hasil yang didapat bisa disebabkan oleh jenis pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstraksi rimpang temulawak.

Kurkumin dapat menghambat degradasi serta fosforilasi dari p53, memblokir Mdm2, kemampuannya untuk mengikat DNA, dan transaktivasi gen yang berkorelasi dengan fungsinya sebagai penekan tumor (Das and Vinayak, 2015; Hallman *et al.*, 2017). Penghambatan proliferasi terkait dengan penghambatan perkembangan siklus sel. Penghambatan siklus sel yang terjadi berada pada fase G0, G1, G2, dan fase S. Kurkumin telah terbukti menginduksi penghambatan siklus sel dalam fase G1, dan tampaknya menurunkan persentase sel yang memasuki fase S karena terjadi penghambatan proses sintesis DNA (Aggarwal, 2003; Prayitno, 2005). Dalam sel-sel ini, kurkumin secara reversibel mengatur ekspresi Cip1 dan menginaktivasi pRB dan menginduksi ekspresi p53 sehingga menghambat aktivitas proliferaatif dengan demikian menghentikan siklus sel pada fase G0. Kurkumin telah terbukti juga menghambat perkembangan siklus sel pada fase G2 / M (Sa dan Das, 2008). Hal ini sejalan dengan hasil penelitian dimana terdapat peningkatan ekspresi p53 sehingga terjadi proses apoptosis pada sel hela melalui jalur siklus sel.

Kandungan aktif lain dari temulawak yaitu santhorizzol. Kandungan tersebut memiliki peran sebagai agen proapoptosis, kemopreventif, dan anti inflamasi. Senyawa santhorizzol mampu menginduksi terjadinya apoptosis

pada sel yang diawali dengan terjadi pengikatan oleh protein seperti Mdm2 melalui jalur proteasom ubiquitin-26S yang nantinya yang meningkatkan degradasi p53. Terjadinya proses degradasi diperankan oleh protein ubiquitin (Ub). Proses proteolitik bermula dengan terjadinya penempelan Ub pada protein target Mdm2. Protein Ub konjugasi akan dijadikan sinyal yang diberikan oleh Ub sehingga terjadi proses katabolisme oleh proteasome 26S (Das and Vinayak, 2015).

Peran lain dari santhorizol yaitu sebagai anti inflamasi dan agen kemopreventif dapat dibuktikan dengan menghambat jalur COX2 atau iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase), yang merupakan mediator penting dalam inflamasi dan karsinogenesis. Pemicuan aktivitas peradangan diatur oleh COX2 melalui sintesis prostaglandin E2 (PGE2) di berbagai jaringan. Ekspresi COX2 dan juga produksi PGE2 diatur oleh *Transforming growth factor β 1* (TGF- β 1) (Lin dan Hwang, 1991; Hishikawa *et al*, 1999; Ceraline *et al*, 1998). COX2 sering dinyatakan bersama dengan iNOS dan keduanya terlibat dalam perkembangan kanker sebagai pengatur proliferasi, apoptosis dan angiogenesis. iNOS mempunyai peran penting dalam mediasi peradangan melalui nitrat oksida (NO) biosintesis, yang akan memodulasi ekspresi COX2 dan sintesis PGE2 dalam kondisi inflamasi (Pestell *et al*, 2000). Tingkat ekspresi iNOS merupakan petunjuk pertumbuhan sel kanker. Terjadinya peningkatan sedang dari iNOS akan meningkatkan pertumbuhan tumor, sedangkan peningkatan tingkat lebih lanjut dilaporkan bersifat

sitotoksik untuk sel tumor, sehingga iNOS menunjukkan peran ganda selama pengembangan tumor (Nair dkk, 1999).

Banyak penelitian menunjukkan bahwa sebagian besar terapi untuk kanker adalah dengan cara apoptosis sel kanker. Oleh karena itu, protein p53, sebagai penjaga genom merupakan penghambat penting perkembangan tumor (Oon *et al*, 2015). Kapasitas p53 dalam beberapa fungsi biologis dapat dikaitkan dengan kemampuannya untuk bertindak sebagai faktor transkripsi spesifik untuk mengatur ekspresi lebih dari 100 gen target yang berbeda, dan juga untuk mengatur proses seluler termasuk apoptosis, penghentian siklus sel dan perbaikan DNA. Protein p53 dengan struktur terminal C dan N yang unik dimodulasi oleh beberapa proses biologis penting seperti fosforilasi, asetilasi, penjumlahan dan ubiquitinasi, yang melalui modulasi tersebut akan terjadi proses secara efektif sehingga mampu mengatur pertumbuhan sel dan kematian (Sa dan Das, 2008). Melalui aktivasi p53 kurkumin ini diharapkan bisa menghambat proses karsinogenesis pada kanker serviks (Zhou *et al*, 2016).

C. Kesulitan dan Keterbatasan Penelitian

- a. Peneliti hanya menggunakan dua kali replikasi pada masing-masing kelompok perlakuan sehingga tidak dapat dinilai standar defiasi pada tiap kelompok dan hanya didapatkan rerata saja.

- b. Cara menghitung ekspresi p53 yang terlalu subjektif karena menggunakan mata pengamat, tidak menggunakan mesin sehingga cenderung kurang valid.