

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Ekstraksi Temulawak

Rimpang Temulawak yang digunakan pada penelitian ini didapat dari pasar Beringharjo. Temulawak seberat 3kg diestrak di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu Universitas Gadjah Mada menggunakan metode maserasi. Dari proses pengestrakan didapatkan ekstrak etanol rimpang temulawak seberat 52,13 gram.



Gambar 4.1. Ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)

2. Uji Sitotoksitas

Hasil penelitian mengenai pengaruh ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) terhadap ekspresi gen *caspase3* pada sel hela kanker serviks menunjukkan adanya potensi temulawak sebagai agen *chemopreventive* pada sel kanker serviks.

Uji potensi kemo preventif ekstrak etanol rimpang temulawak menggunakan metode MTT kultur sel kanker serviks HeLa. Reduksi dari garam terazolium dari jernih menjadi sedikit berwarna menjadi larutan dengan turunan warna terang keunguan yang disebut dengan formazan, digunakan sebagai dasar penggunaan metode ini sebagai pewarna yang digunakan pada redox histokimia dan biokimia (Berridge, 2005). Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan reagen stopper (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader. Intensitas warna ungu yang terbentuk sebanding dengan jumlah sel hidup, jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak (CCRC UGM, 2012). Absorbansi yang didapatkan digunakan untuk menghitung presentase sel hidup dengan rumus sebagai berikut;

$$\text{Persentase sel hidup} = \frac{(\text{AP} - \text{AKM}) \times 100\%}{(\text{AKP} - \text{AKM})} \times 100\%$$

Keterangan : AP : Absorbansi Pelarut

AKM : Absorbansi Kontrol Media

AKP : Absorbansi Konrol Pelarut

Tabel 4.1. Hasil pengujian sitotoksitas ekstrak temulawak terhadap persentase kehidupan sel HeLa

Konsentrasi	Ap	% 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 : AKM : Absorbansi Kontrol Media
 AKP : Absorbansi Kontrol Pelarut
 Ap : Absorbansi Perlakuan

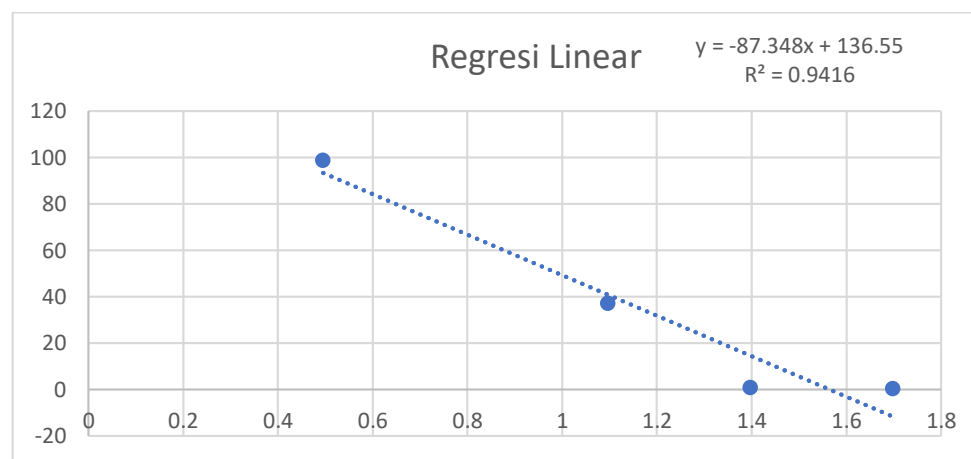
Berdasarkan data dari tabel 4.1 dapat disimpulkan bahwa semakin rendah konsentrasi ekstrak temulawak maka presentase sel hidup semakin tinggi

3. Perhitungan Nilai IC50

IC50 adalah konsentrasi suatu zat (ekstrak etanol rimpang temulawak) penghambat yang bisa menghambat fungsi biologis atau biokimiawi, pada penelitian ini yaitu aktivitas proliferasi sel HeLa kanker serviks sebesar 50%. Berdasarkan hasil uji sitotoksitas menggunakan metode MTT yang dilakukan pada kelompok konsentrasi 200 μ g/ml didapatkan hasil yang memenuhi syarat untuk bisa didapatkan nilai IC50. Hasil dan perhitungan nilai IC50 dapat dilihat pada tabel dan grafik.

Tabel 4.2. Data pengukuran uji regresi linear

Konsentrasi($\mu\text{g/ml}$)	Log Konsentrasi	% Sel Hidup
50	1,69897	0,25
25	1,39794	0,75
12,25	1,09691	37,08
3,125	0,49485	98,58
Nilai Regresi Linier		$y = -87.348x + 136.55$ $R^2 = 0.9416$

**Gambar 4.2. Perhitungan Regresi Linier**

Potensi kemopreventif pada uji MTT menunjukkan bahwa nilai IC50 dari ekstrak temulawak pada sel HeLa dapat diukur dari nilai $y=50$. Nilai IC50 dapat ditentukan melalui antilog dari nilai x pada persamaan regresi tersebut dimana $y=50$.

$$y = -87.348x + 136.55$$

$$50 = -87.348x + 136.55$$

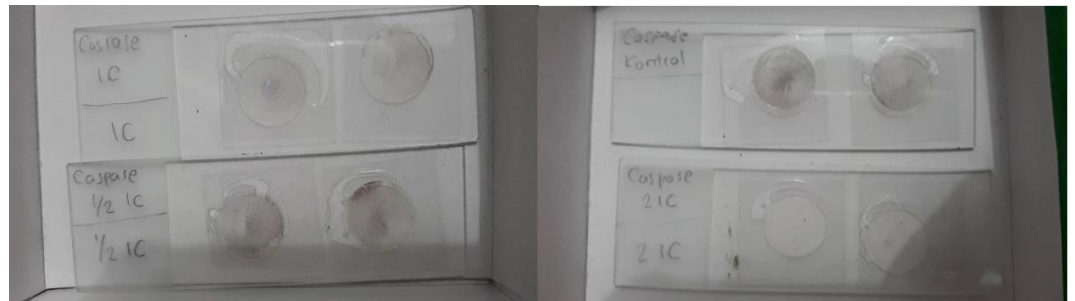
$$x = \frac{50 - 136.55}{-87.348} = 0.99 \text{ -----} \rightarrow \text{Antilog IC50} = 9,77 \mu\text{g / ml}$$

Jika suatu ekstrak memiliki nilai IC50 $<100 \mu\text{g/ml}$ maka dapat dikatakan memiliki potensi sebagai antiproliferasi (Kamuhabwa *et al.*,2000), sedangkan menurut National Cancer Institute (NCI) mengelompokkan suatu senyawa tergolong antikanker jika $\text{IC}_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa ekstrak rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) berpotensi sebagai agen antikanker atau kemopreventif pada kanker serviks.

4. Uji Imunositokimia

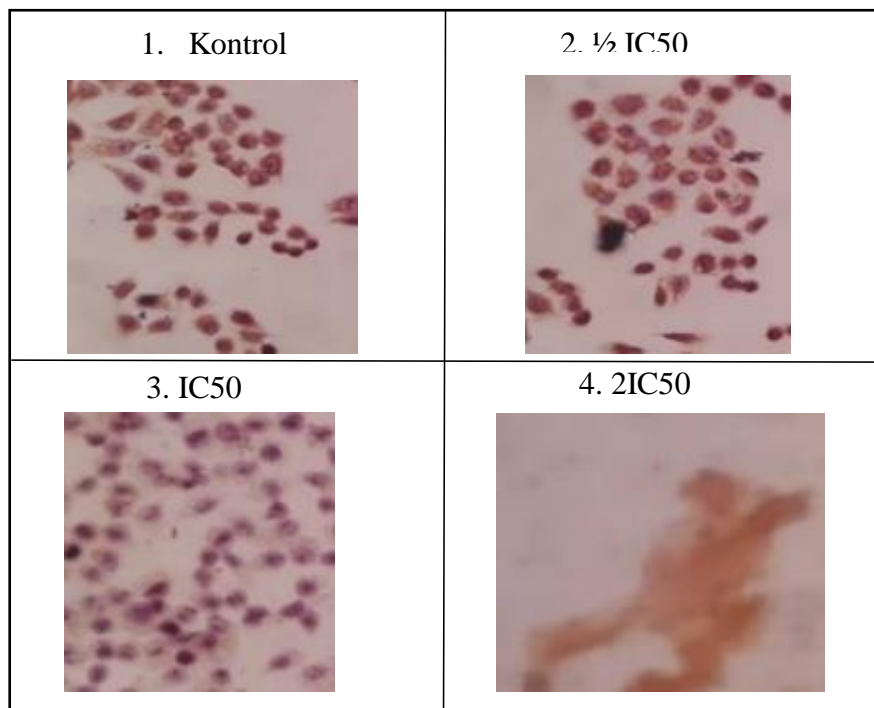
Metode imunositokimia dilakukan dengan tujuan melihat adanya ekspresi gen *caspase 3* pada sel HeLa kanker serviks. Setiap sumuran yang berisi sel HeLa yang telah ditanam pada *coverslip* diberi perlakuan dengan 3 kelompok konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrai $\frac{1}{2}\text{IC}_{50}$, IC_{50} , dan 2IC_{50} . Selanjutnya pada tiap sumuran ditetesi antibody primer gen *caspase 3* dan antibodi sekunder biotin (*biotinylated universal secondary antibody*). Kedua antibodi ini ditambahkan untuk

melihat adanya perbedaan ekspresi gen *caspase 3* pada setiap kelompok konsentrasi yang ditandai munculnya warna merah.



Gambar 4.3. Objek glass dari hasil uji imunositokimia

Perbandingan gambaran sel HeLa kontrol dan perlakuan dapat dilihat pada gambar 4.4.



Gambar 4.4 Ekspresi *caspase 3* pada sel HeLa dengan perbesaran 100x

A. Tingkat apoptosis pada sel HeLa di kelompok 1, 2, dan 3 dapat dilihat dengan adanya kesan hiperpigmentasi akibat adanya ekspresi *caspase 3*.

- B. Tingkat apoptosis pada sel HeLa di kelompok 1 nampak rendah berdasarkan perhitungan subjektif per lapang pandang.
- C. Tingkat apoptosis pada sel HeLa di kelompok 2 nampak sedang berdasarkan perhitungan subjektif per lapang pandang.
- D. Tingkat apoptosis pada sel HeLa di kelompok 3 nampak tinggi berdasarkan perhitungan subjektif per lapang pandang.
- E. Tingkat apoptosis pada sel HeLa di kelompok 4 tidak dapat dihitung karena seluruh sel telah lisis.

Hasil imunositokimia pada sel HeLa memperlihatkan ekspresi gen *caspase 3* pada nukleus sel ditandai dengan warna yang lebih gelap atau lebih merah. Ekspresi negative ditandai dengan sel yang berwarna lebih terang. Hal ini terjadi akibat aktivitas gen *caspase 3* yang berpengaruh pada nukleus sel sebagai agen apoptosis. Pada konsentrasi kelompok 2IC50 tidak didapatkan sel hidup sehingga ekspresi gen *caspase 3* tidak dapat dinilai.

5. Uji Analitik

Analisis statistic diawali menggunakan uji Shapiro-Wilk untuk menguji normalitas, distribusi, dan homgenitas data dari masing-masing perlakuan. Hasil uji Shapiro-Wilk didapatkan $p > 0,05$. Untuk selanjutnya data dapat diolah menggunakan One-Way ANOVA.

Tabel 4.3. Ekspresi *caspase 3* dari hasil pengenceran ekstrak temulawak pada sel HeLa

Kelompok	Ekspresi +	Ekspresi -	Indeks ekspresi <i>caspase 3</i> (ekspresi+/total sel)
1/2 IC50 (n=3)	138,33±33,36*	70,00±14,00*	0.66±0.01*
IC50 (n=3)	105,00±17,34*	32,00±8,80*	0.76±0.07*
2xIC50 (n=3)	n.a.	n.a.	N.A.
Media (n=3)	65,67±31,50	119,67±5,51	0.34±0.01

keterangan:*=P<0.05 terhadap kelompok media

Data dari tabel didapatkan dengan menghitung rata-rata sel yang menunjukkan adanya ekspresi gen caspase 3 dari 3 kali perhitungan pada tiap kelompok konsentrasi menggunakan mikroskop. Tiap sumuran berisi sel HeLa sebanyak 5×10^4 /1000 μ l Media Kontrol.

Data pada tabel menunjukkan bahwa ekstrak temulawak meningkatkan ekspresi caspase 3 pada kultur sel kanker serviks HeLa pada kelompok konsentrasi ≤ 5050 dan kelompok konsentrasi $=IC_{50}$ yang dibuktikan dengan peningkatan index ekspresi caspase 3. Ekspresi caspase 3 pada kelompok konsentrasi $\frac{1}{2}IC_{50}$ lebih tinggi dibandingkan pada kelompok konsentrasi IC_{50} . Pada kelompok konsentrasi $=2IC_{50}$ tidak terdapat sel yang nampak sehingga tidak bisa dinilai ekspresi dari caspase 3. Secara statistik konsentrasi ekstrak sebesar $\frac{1}{2}IC_{50}$ meningkatkan ekspresi caspase 3 dengan hasil yang bermakna,. Sedangkan konsentrasi ekstrak sebesar IC_{50} tidak bermakna secara statistik.

Dari hasil pengukuran ekspresi caspase 3 dari konsentrasi IC_{50} dan kontrol media akan dibandingkan satu dengan yang lain menggunakan uji post-hoc. Perbandingan setiap kelompok kontrol dan kelompok konsentrasi tidak semua didapatkan hasil yang signifikan. Hal ini dilihat dari perbandingan nilai $\frac{1}{2}IC_{50}$ dengan IC_{50} dengan hasil signifikansi 0.115, 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 0.001.

B. Pembahasan

Penyebab kanker serviks bisa berasal dari faktor internal maupun faktor eksternal. Faktor internal penyebab kanker serviks berasal dari gen-gen yang memiliki peran pada siklus sel. Terdapat dua golongan gen yang memiliki hubungan dengan pertumbuhan tumor, yaitu golongan pemicu tumor (onkogen) dan golongan penghambat tumor (tumor suppressor gene dan apoptosis). Faktor eksternal penyebab sek kanker serviks utamanya adalah infeksi Human Papilloma Virus (HPV) khususnya tipe 16 dan 18. HPV akan merusak gen-gen pengatur siklus sel dan apoptosis, salah satunya gen *caspase 3*. Untuk mengembalikan kendali apoptosis kembali, zat aktif dalam temulawak dianggap sebagai salah satu agen untuk mencapainya.

Kandungan zat aktif dalam temulawak seperti Xanthorrhizol memiliki peranan penting dalam menginduksi apoptosis. Xanthorrhizol menginduksi aktivasi *caspase*. *Caspase* memainkan peran penting dalam fase terminal apoptosis yang disebabkan oleh rangsangan pengobatan xanthorrhizol yang menyebabkan peningkatan yang tergantung waktu dalam aktivitas *caspase 3* dan -9 hal ini terbukti pada 24 jam dan secara bertahap meningkat lebih dari 72 jam. Aktivitas *caspase-7* tidak terpengaruh oleh pengobatan xanthorrhizol. Hasil ini menunjukkan bahwa *caspase 3* dan -9 terlibat dalam jalur kematian yang diinduksi xanthorrhizol (Handayani, 2007). Apoptosis merupakan proses yang diregulasi secara ketat di bawah kendali beberapa jalur penyinyalan, seperti jalur mitokondria dan kaskade *caspase* (Thornberry,1998). Xanthorrhizol menginduksi aktivasi protein penekan

tumor p53 yang menyebabkan protein anti-apoptosis Bcl-2 mengurangi waktu respon tanpa mempengaruhi ekspresi protein pro-apoptosis Bax. Secara khusus, protein anti-apoptosis Bcl-2 dan protein pro-apoptosis Bax telah dilaporkan dapat mengatur induksi apoptosis melalui kontrol fungsi mitokondria (Cory,2003). Kapasitas Bcl-2 dan Bax untuk bersaing satu sama lain melalui heterodimer menunjukkan hubungan timbal balik di mana Bcl-2 monomer atau homodimers mendukung kelangsungan hidup dan Bax homodimers mendukung kematian (Hou,2003). Aktivitas perforasi saluran ion Bcl-2 dan Bax dapat mengontrol apoptosis dengan mempengaruhi permeabilitas membran dan pelepasan sitokrom c dari mitokondria. Ekspresi berlebih Bcl-2 memblokir pelepasan sitokrom c sebagai respon terhadap berbagai rangsangan apoptosis (Kluck,97). *Downregulation* Bcl-2 memiliki kontribusi melepas sitokrom c dari mitokondria. Selain itu, Bcl-2 yang berheterodimerisasi dengan Bax memberikan penghambatan negatif dominan aktivitas Bax pro-apoptosis (Oltvai,1998). Oleh karena itu, ketika tingkat ekspresi Bcl-2 rendah dan tingkat ekspresi Bax dipertahankan, homodimer dari Bax akan selalu tersedia dan apoptosis akan dipicu (Teoh,1999). Setelah dilepaskan dari mitokondria, sitokrom c berinteraksi dengan Apaf-1 yang mendukung aktivasi *procaspase9*. *Caspase-9* dapat memodulasi aktivasi *caspases* eksekusi, *caspase 3* dan *caspase-7* oleh enzim proteolisis, sehingga mengirimkan sinyal apoptosis ke fase eksekusi (Srinivasula,2003). *Caspase7* sangat terkait dengan *caspase 3* dan menunjukkan spesifitas substrat sintesis yang sama, hal ini menunjukkan bahwa *caspase 3* dan *-7* mungkin memiliki peran tumpang tindih dalam apoptosis (Woo, 1998). Menurut

data saat ini, xanthorrhizol menyebabkan aktivasi p53 dan pengurangan Bcl-2 yang kemudian mengaktifkan aktivitas molekuler mitokondria yang diinduksi termasuk aktivasi *caspase-9* dan *caspase 3*. Induksi apoptosis oleh xanthorrhizol melibatkan aktivasi kaskade *caspase* diinduksi mitokondria dan penghambatan protein anti-apoptosis Bcl2. Hal ini sesuai dengan beberapa penelitian yang telah menunjukkan bahwa mitokondria dapat memainkan peran utama dalam apoptosis yang diinduksi obat. Namun, Bax dan *caspase-7* tidak terlibat dalam apoptosis yang diinduksi xanthorrhizol (Robertson,2000).

Kandungan zat aktif lain berupa curcumin yang memiliki banyak manfaat medis seperti, antioksidan, antiproliferatif, antiangiogenik, antitumorigenik, dan antiinflamasi (Wang,2018). Pada penelitian menggunakan sel kanker ganas, curcumin menunjukkan kemampuan menginduksi apoptosis dengan meningkatkan ekspresi *caspase 3* dan *caspase-9* juga faktor pro apoptosis lainnya (Shankar,2007). Curcumin juga ditemukan memiliki potensi menginduksi apoptosis sel kanker payudara. Ekspresi protein apoptosis sel, seperti BCL2, BAX dan *caspase 3*, juga telah dianalisis. BCL2 adalah protein anti-apoptosis, sedangkan BAX adalah protein pro-apoptosis. Tingkat BCL2 nyata menurun dan tingkat BAX meningkat pada *cell line* T47D dan MCF7 yang mendapat perlakuan dengan curcumin selama 12 jam dengan demikian, memicu pembelahan *caspase 3* yang meningkat, hal ini menunjukkan bahwa curcumin dapat meningkatkan apoptosis melalui jalur mitokondria.. Curcumin memberikan efek antitumor yang kuat pada kanker payudara dengan menginduksi penghentian siklus sel pada fase G2 / M, kemungkinan diinduksi oleh penurunan ekspresi CDC25, CDC2, dan peningkatan

ekspresi P21. Curcumin menghambat fosforilasi jalur sinyal Akt / mTOR, menurunkan ekspresi protein anti-apoptosis BCL2, meningkatkan ekspresi apoptosis BAX, dan memicu pembelahan protein *caspase* 3 yang menyebabkan apoptosis sel (Hu,2016).

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol temulawak tidak meningkatkan ekspresi gen *caspase* 3 secara signifikan. Hal ini dapat dilihat pada uji statistic One way ANOVA menunjukkan bahwa terdapat pengaruh pemberian ekstrak etanol temulawak terhadap ekspresi gen *caspase* 3 pada kultur sel kanker serviks HeLa tidak bermakna secara statistik dengan nilai $p=0,053$ ($p>0,05$).

Pada gambar 4.4 terlihat bahwa terdapat kenaikan jumlah sel HeLa yang mengalami apoptosis seiring dengan peningkatan dosis ekstrak etanol rimpang temulawak. Kematian yang terjadi mungkin tidak dominan pada jalur *capase* 3 melainkan melalui jalur *caspase* lain yang termasuk dalam jalur *caspase* eksekusi. Penelitian terdahulu oleh Pei-Ming Yang dan kawan-kawan menunjukkan bahwa pemberian flavonoid menyebabkan gen *caspase* 7 mengalami peningkatan pada kanker payudara sel MCF-7 yang menginduksi terjadinya apoptosis (Yang, 2012). Apoptosis melalui jalur *caspase* 7 inilah yang dianggap akan teraktivasi dengan adanya flavonoid.

C. Keterbatasan penelitian

1. Kandungan zat aktif ekstrak etanol rimpang temulawak

Pada penelitian ini peneliti tidak melihat kandungan aktif tertentu pada ekstrak etanol rimpang temulawak