



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK SPONGE *HALICLONA SP*
TERHADAP AKTIVITAS PROLIFERASI SEL DENGAN
METODE HITUNG AgNOR PADA SEL *ADENOCARCINOMA*
MAMMAE MENCIT C3H**

LAPORAN AKHIR PENELITIAN KARYA TULIS ILMIAH

Diajukan untuk Memenuhi Tugas dan Melengkapi Persyaratan
dalam Menempuh Program Pendidikan Sarjana
Fakultas Kedokteran

Disusun oleh:
LANCERIA SIJABAT
NIM : G2A 005 112

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2009

HALAMAN PENGESAHAN

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Sponge *Haliclona sp* terhadap
Aktivitas Proliferasi Sel dengan Metode Hitung AgNOR pada Sel
Adenocarcinoma Mammae Mencit C3H**

yang disusun oleh:

Lanceria Sijabat

NIM. G2A 005 112

Telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji Laporan Akhir Penelitian Karya Tulis Ilmiah Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang pada tanggal 24 Agustus 2009 dan telah diperbaiki sesuai dengan saran-saran yang diberikan.

TIM PENGUJI LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Penguji,

Pembimbing,

dr. Ika Pawitra Miranti, M.kes, Sp.PA

dr. Neni Susilaningsih,

M.Si

NIP. 131 875 465

NIP. 131 832 243

Ketua Penguji,

dr. Awal Prasetyo M.Kes, Sp.THT

NIP. 132 163 893

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL

HALAMAN PENGESAHAN

DAFTAR ISI.....iii

ABSTRAK.....v

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.....1

1.2 Rumusan Masalah.....3

1.3 Tujuan Penelitian.....3

1.4 Manfaat Penelitian.....4

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kelenjar Payudara.....5

2.2 Kanker Payudara.....7

2.3 Sponge *Haliclona sp.*.....11

2.4 Siklus Sel dan Pertumbuhan Sel Kanker.....13

2.5 Pengecatan AgNOR.....16

2.6 Mencit C3H dan *Adenocarcinoma Mammae* Mencit Transplantable.....19

2.7 Kerangka Teori.....21

2.8 Kerangka Konsep.....22

2.9 Hipotesis.....22

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian.....	23
3.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	23
3.3 Alat dan Bahan.....	25
3.4 Cara Kerja.....	26
3.5 Cara Pengumpulan Data.....	28
3.6 Alur Penelitian.....	30
3.7 Pengolahan dan Analisis Data.....	31
BAB 4 HASIL PENELITIAN.....	33
BAB 5 PEMBAHASAN.....	35
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	38
DAFTAR PUSTAKA.....	39
LAMPIRAN	

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Sponge *Haliclona sp* terhadap
Aktivitas Proliferasi Sel dengan Metode Hitung AgNOR pada Sel
Adenocarcinoma Mammae Mencit C3H**

Lanceria Sijabat¹, Neni Susilaningsih²

ABSTRAK

Latar Belakang: Kanker payudara merupakan keganasan yang paling sering dialami wanita di dunia. Sponge *Haliclona sp* merupakan salah satu biota laut yang kaya akan metabolit aktif, salah satunya sebagai antikanker yang telah diteliti secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian ekstrak sponge *Haliclona sp* dalam dosis bertingkat terhadap aktivitas proliferasi sel *adenocarcinoma mammae* mencit C3H yang direpresentasikan dalam hitung AgNOR.

Metode: Penelitian eksperimental *Post Test Only Control Group Design* dilakukan pada dua puluh mencit C3H yang dibagi secara random menjadi empat kelompok. Tiga kelompok perlakuan (H1, H2, dan H3) diberi pakan perlakuan sebanyak 500 mg yang masing-masing mengandung ekstrak etanol dari sponge *Haliclona sp* sebanyak 0,15; 1,5; dan 15 mg. Kelompok Kontrol (K) hanya menerima pakan standard. Setelah tiga minggu masa perlakuan, *adenocarcinoma mammae* diinokulasikan pada seluruh mencit. Perlakuan dilanjutkan selama tiga minggu berikutnya. Pemeriksaan hitung AgNOR dilakukan terhadap preparat jaringan tumor mencit dengan parameter rerata AgNOR (mAgNOR) dan persentase AgNOR (pAgNOR).

Hasil: Median dari mAgNOR kelompok H3 sebesar 3,190 paling rendah dibandingkan dengan kelompok lain, berturut-turut ke median yang tertinggi adalah H1(3,195); H2(3,450); K(4,070). Rerata dari pAgNOR kelompok H3 sebesar 19,80 paling rendah dibandingkan dengan kelompok lain, berturut-turut ke rerata yang tertinggi adalah H1(25,40); K(34,40); H2(38,40). Tidak terdapat perbedaan bermakna skor mAgNOR($p=0,062$) dan pAgNOR($p=0,152$) antar kelompok.

Simpulan: Ekstrak sponge *Haliclona sp* tidak terbukti secara bermakna menghambat aktivitas proliferasi sel dengan metode hitung AgNOR pada sel *adenocarcinoma mammae* mencit C3H.

Kata Kunci: Sponge *Haliclona sp*, aktivitas proliferasi, rerata AgNOR, persentase AgNOR, *adenocarcinoma mammae*

¹ Mahasiswa Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang

² Dosen pengajar Bagian Histologi, Universitas Diponegoro, Semarang

The Effects of Sponge *Haliclona sp* Extract on Proliferative Activity by AgNOR count of *Adenocarcinoma Mammae* cells in C3H Strain Mice

Lanceria Sijabat¹, Neni Susilaningih²

ABSTRACT

Backgrounds: Breast cancer is the most frequently common cancer in woman. Sponge *Haliclona sp* is one of marine organisms that rich in active metabolites with anticancer potency. This research aimed to investigate the effects of sponge *Haliclona sp* extract on the proliferative activity of *adenocarcinoma mammae* cells in C3H mice represented by AgNOR count.

Metode: This experimental study applied post test only control group design. Twenty C3H mice were divided into four groups. Three treatment groups (H1, H2 and H3) fed with 500 mg pellets containing 0.15, 1.5, and 15 mg *Haliclona sp* extract respectively; and one control group (K) received no treatment. After three weeks of treatment, mice were inoculated with *adenocarcinoma mammae*. The treatments were continued for another three weeks. AgNOR count was performed towards tumor sections applying mean of AgNOR (mAgNOR) and percentage of AgNOR (pAgNOR) as the parameters.

Results: Median of mAgNOR group H3 (3,190) was the lowest value of all median. Then to the highest median, respectively H1 (3,1950); H2 (3,4500); K (4,0700). Mean of pAgNOR group H3 (19,80) was the lowest value of all mean. Then to the highest mean, respectively H1 (25,40); K(34,40); H2(38,40). Kruskal Wallis presented no significant differences of mAgNOR (p=0,062) and pAgNOR(p=0,152).

Conclusion: Extract sponge *Haliclona sp* could not decrease proliferative activity by AgNOR count of *adenocarcinoma mammae* cells in C3H mice.

Key Words: Sponge *Haliclona sp*, proliferative activity, mean of AgNOR, percentage of AgNOR, *adenocarcinoma mammae*.

¹ Student of Faculty of Medicine, Diponegoro University, Semarang

² Lecturer of Histology Department, Diponegoro University, Semarang

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Kanker merupakan sel pada jaringan tubuh yang tumbuh tidak terkontrol. Kanker payudara adalah kanker yang paling sering dijumpai pada wanita di negara maju dan merupakan penyebab kematian nomor dua setelah kanker paru.¹ Dari berbagai jenis histologik kanker payudara, karsinoma duktus infiltratif adalah jenis histologik terbanyak yang ditemukan.²

Kemoterapi merupakan unsur yang penting dalam pengobatan kanker payudara baik sebagai terapi ajuvan, neo ajuvan maupun paliatif.^{3,4} Tujuan ajuvan adalah untuk membunuh sel kanker sisa setelah operasi, namun tidak semua pasien memerlukan terapi ajuvan. Terapi sistemik sebelum operasi bedah diperlukan untuk membunuh sel tumor, ini disebut terapi neoajuvan.⁵ Kemoterapi pada kanker payudara terutama diindikasikan pada pasien dengan tumor yang refrakter atau insensitif terhadap hormon. Munculnya kanker payudara yang resisten terhadap berbagai obat, memacu para peneliti menemukan obat dengan target molekular baru.³

Penelitian tentang potensi antikanker dari biota laut mengalami perkembangan pesat. Penelitian terakhir menyebutkan bahwa kira-kira 35 komponen telah diketahui mekanisme anti tumornya, dan setidaknya 12 diantaranya telah digunakan sebagai terapi berbagai macam kanker.^{6,7}

Pada sponge dan karang lunak terdapat senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai alat pertahanan diri dari musuh alaminya. Senyawa tersebut disebut metabolit sekunder yang ternyata berkhasiat obat antikanker dan kemudian dibuat sintesisnya.⁶⁻⁸

Pengembangan obat baru yang berasal dari biota laut, saat ini menjadi perhatian seluruh peneliti kimia bahan alam. Tingginya keanekaragaman hayati laut dan uniknya struktur metabolik sekunder yang dihasilkannya, merupakan dua hal yang menjadi daya tarik para ilmuwan., sponge merupakan sumber penghasil senyawa bioaktif terbesar diantara invertebrata laut lainnya. Salah satu penelitian yang telah pernah dilakukan terdahulu yaitu tentang khasiat sponge *Haliclona sp* dari perairan Labuan Bajo Flores Indonesia dan menunjukkan khasiat menghambat L1210 (turunan sel kanker leukemia).⁹ Berdasarkan nilai IC₅₀ yang didapatkan dari penelitian tersebut, telah dilakukan uji toksisitas terhadap ekstrak *Haliclona sp* secara *in vivo* pada dosis bertingkat oleh Trianto dkk.¹⁰ Hasil uji toksisitas pada penelitian tersebut membuktikan bahwa ekstrak *Haliclona sp* masih dalam batas-batas keamanan untuk pengobatan sehingga ekstrak *Haliclona sp* layak untuk dilakukan uji efikasi antikanker secara *in vivo*. Penelitian tentang efek antikanker ekstrak *Haliclona sp* terhadap *adenocarcinoma mammae* secara *in vivo* belum ada,¹¹ inilah yang mendorong peneliti untuk meneliti efek antikanker dari ekstrak *Haliclona sp* pada dosis bertingkat secara *in vivo* terhadap *adenocarcinoma mammae* pada mencit C3H.

Penelitian ini menggunakan pengecatan AgNOR untuk mengetahui aktivitas proliferasi sel kanker. Hal ini disebabkan karena ekspresi AgNOR dapat menggambarkan kecepatan siklus sel dan berkaitan dengan waktu penggandaan tumor. Aktivitas proliferasi sel kanker menentukan laju pertumbuhan dari masa tumor, sehingga AgNOR menjadi alat diagnostik dan prognostik terhadap *tumor behavior*. Peningkatan dan perbaikan teknik pengecatan AgNOR telah menjadikan AgNOR lebih terstandarisasi, reliabel, sederhana dan cepat.¹²

1.2 Rumusan masalah

Apakah pemberian ekstrak sponge *Haliclona sp* dapat berpengaruh terhadap aktivitas proliferasi sel dengan metode hitung AgNOR pada sel *adenocarcinoma mammae* pada mencit C3H ?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak sponge *Haliclona sp* terhadap aktivitas proliferasi sel dengan metode hitung AgNOR pada sel *adenocarcinoma mammae* pada mencit C3H

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Mengamati aktivitas proliferasi sel dengan metode hitung AgNOR pada sel *adenocarcinoma mammae* kelompok mencit C3H yang diberi ekstrak sponge *Haliclona sp* dan diinokulasi sel *adenocarcinoma mammae*

1.3.2.2 Mengamati aktivitas proliferasi sel dengan metode hitung AgNOR pada sel *adenocarcinoma mammae* kelompok mencit C3H yang hanya diinokulasi sel *adenocarcinoma mammae*

1.3.2.3 Membandingkan aktivitas proliferasi sel dengan metode hitung AgNOR pada sel *adenocarcinoma mammae* kelompok mencit C3H yang diberi ekstrak sponge *Haliclona sp* dan diinokulasi sel

adenocarcinoma mammae dengan kelompok mencit C3H yang hanya diinokulasi sel *adenocarcinoma mammae*

- 1.3.2.4 Mengetahui dosis ekstrak sponge *Haliclona sp* yang paling efektif di antara ketiga dosis yang diuji dalam menurunkan aktivitas proliferasi sel dengan metode hitung AgNOR pada sel *adenocarcinoma mammae* mencit C3H yang diberi ekstrak sponge *Haliclona sp* dan diinokulasi sel *adenocarcinoma mammae*.

1.4 Manfaat penelitian

- 1.4.1 Memberikan informasi mengenai pengaruh pemberian ekstrak sponge *Haliclona sp* terhadap aktivitas proliferasi sel dengan metode hitung AgNOR pada sel *adenocarcinoma mammae* mencit C3H
- 1.4.2 Dapat dijadikan sebagai landasan penelitian selanjutnya

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 KELENJAR PAYUDARA

Fungsi utama payudara adalah memproduksi dan mensekresi air susu. Lobulus merupakan unit sekresi payudara. Tiap lobulus terdiri atas sejumlah asinus, atau kelenjar, yang berada di dalam jaringan ikat longgar dan berhubungan dengan duktus intralobularis. Tiap asinus tersusun atas dua tipe sel, yaitu epitel dan mioepitel. Sel epitel merupakan sel sekresi. Sintesis air susu ibu hanya berlangsung selama masa akhir kehamilan dan post partum, sel tersebut mensekresi secara terus – menerus berbagai jenis glikoprotein yang dimasukkan kedalam lumen kelenjar. Sel epitel dikelilingi oleh sel mioepitel yang mengandung protein kontraktile yang mempunyai fungsi mekanik. Duktus intralobularis berhubungan dengan duktus ekstralobularis, dan bersama dengan lobulus disebut unit duktus lobular terminalis. Duktus ekstralobularis dalam satu daerah yang sama saling berhubungan untuk membentuk duktus segmental dan akan bermuara keduktus laktiferus, berhubungan dengan permukaan papila mammae melalui orifisium yang terpisah. Terdapat 15 – 20 duktus laktiferus, masing – masing mengalirkan satu segmen mammae. Duktus dilapisi oleh sel epitel yang dikelilingi oleh sel mioepitel. Stroma jaringan ikatnya lebih padat dibandingkan dengan lobulusnya, dan duktus dikelilingi oleh jaringan elastik yang membantu fungsi drainase duktus.¹⁴

Aliran limfe payudara langsung pada unilateral dari superficial ke profunda. Lalu menuju ke daerah pembuluh limfe regional setelah melewati pembuluh limfe pada duktus laktiferus, 97 % berkumpul di limfonodi axilar, dan 3 % menuju ke limfonodi mammae

interna,³ ini penting untuk mengetahui sel kanker yang menyebar ke pembuluh limfe, karena kalau sudah menyebar ke pembuluh limfe akan besar kemungkinan masuk ke aliran darah dan seluruh tubuh. Hal ini sangat mempengaruhi efek terapi.^{1,3}

Kelenjar payudara mencapai potensi penuh pada saat menarke. Kelenjar ini hanya berbentuk rudimenter pada bayi dan anak – anak dan pada pria.¹⁴ Kelenjar payudara pada wanita mengalami perubahan struktur yang ekstensif terkait dengan pubertas, kehamilan dan menopause. Pertumbuhan kelenjar payudara selama kehamilan terjadi akibat hormon estrogen, progesteron, prolaktin dan laktogen plasenta manusia. Hormon-hormon ini merangsang pertumbuhan bagian sekresi atau alveoli dari kelenjar payudara.¹⁵ Pertumbuhan sistem duktus disebabkan rangsangan akibat estrogen dan prolaktin. Hormon somatotropin dan glukokortikoid juga diperlukan untuk perkembangan duktus yang maksimal. Rangsangan hormon-hormon ini juga menyebabkan peningkatan jaringan penghubung dan jaringan adiposa selama pubertas.¹⁶ Struktur histologis kelenjar payudara bervariasi sesuai dengan jenis kelamin, usia dan status fisiologis.¹⁵

2.2 KANKER PAYUDARA

2.2.1 Karsinogenesis Kanker Payudara

Keseimbangan sel-sel di dalam tubuh dipengaruhi beberapa faktor yaitu proto onkogen, gen supresor dan gen apoptosis. Proto onkogen menyebabkan sel berproliferasi, sedangkan gen supresor memberi isyarat untuk menghentikan proliferasi. Gen apoptosis memberi isyarat untuk “bunuh diri” pada program kematian sel. Mutasi dan perubahan genetik lain dapat menyebabkan ketidakseimbangan dalam pengaturan ini. Mutasi dapat menyebabkan proto onkogen diekspresikan secara berlebihan dan berubah menjadi

onkogen. Onkogen menyebabkan proliferasi yang berlebihan. Mutasi juga menyebabkan rusaknya gen supresor sehingga menyebabkan ketidakmampuan untuk menghentikan siklus sel. Akibatnya, proliferasi sel berjalan terus dan menjadi kanker. Demikian juga kerusakan pada gen apoptosis akibat mutasi akan menyebabkan immortalisasi sel, sehingga memudahkan terjadinya pembentukan kanker.¹⁸

Mekanisme ini juga terjadi pada kanker payudara. Deregulasi siklus sel pada kanker payudara disebabkan oleh berbagai mekanisme. Kerusakan BRCA1 dan BRCA2 menyebabkan hilangnya kemampuan gen-gen ini dalam proses perbaikan kerusakan DNA.¹⁸ Estrogen dan progesteron seperti yang telah dijelaskan memacu proliferasi epitel. Estrogen dan progesteron menginduksi ekspresi cyclin D1 dan c-myc. Estrogen dalam hal ini bertindak sebagai mitogen dan faktor survival dari sel kanker.³ Estrogen bersama EGF, TGF α , FGF-2, insulin, matriks ekstraselular, Bcl-2, BclxL merupakan faktor-faktor yang meningkatkan survival sel dari mekanisme regulasi apoptosis pada kanker payudara. Sedangkan faktor yang meningkatkan kematian sel akibat mekanisme apoptosis adalah kemoterapi, antiestrogen, antiprogesterin, terapi radiasi, TGF β , TNF, Myc, p53, Cyclin A/CDK2, Bclxs, Bax dan ICE protease.¹⁹ Sementara itu, penemuan HER-2 pada kanker payudara merupakan hal penting dalam riset kanker payudara selama dua dekade yang lalu. HER-2 merupakan anggota dari keluarga reseptor *epidermal growth factor* (EGF). Reseptor ini penting dalam tumorigenesis kelenjar mammae. Reseptor ini berinteraksi dengan berbagai ligan meliputi *EGF*, *TGF α* , *hegulin* atau *Neu differentiation factor*, *heparin-binding EGF like growth factor*, *beta-cellulin* dan *epiregulin*.³

2.2.2 Klasifikasi Kanker Payudara

Berdasarkan temuan histopatologis, kanker payudara dikelompokkan menjadi empat tipe. (1) Tipe ductal terdiri dari intraductal (in situ), invasif dengan komponen intraduktal predominan, invasif tidak spesifik, schirrhous, tubular, meduler dengan infiltrat limfositik, musinous (koloid), papiler, inflamatoir, komedo dan yang lain. (2) Tipe lobuler terdiri dari in situ, invasif dengan komponen in situ predominan, dan invasif. (3) Tipe papilla meliputi penyakit paget tidak spesifik, penyakit paget dengan karsinoma intraduktal, dan penyakit paget dengan karsinoma duktal invasif. (3) Tipe ini merupakan karsinoma yang tak terdiferensiasi. (4) Tipe ini merupakan subtype-subtype tumor yang jarang ditemukan meliputi *cystosarcoma phyllodes*, angiosarkoma, limfoma primer.³ Hampir semua keganasan payudara berupa *adenocarcinoma*, sedangkan tipe yang lain, misalnya karsinoma sel skuamosa, tumor phyllodes, sarkoma dan limfoma, hanya sebesar 5% dari total keganasan payudara.²⁰

2.2.3 Faktor Prognostik Kanker Payudara

Faktor prognostik mayor merupakan prediktor kematian pada kanker payudara. Faktor-faktor tersebut meliputi karsinoma invasif, metastasis jauh, metastasis limfonodi, ukuran tumor, penyakit lokal lanjut dan karsinoma inflamatori. Faktor-faktor tersebut digunakan dalam sistem staging American Joint Committee on Cancer (AJCC).

Faktor prognostik minor digunakan untuk mempertimbangkan terapi sistemik dan untuk memutuskan penggunaan regimen kemoterapi dan/atau terapi hormonal. Faktor-faktor tersebut meliputi subtype histologis, grade tumor, reseptor estrogen dan progesteron, HER2/neu, invasi limfovaskuler, laju proliferaatif, dan komposisi DNA. Tiga

faktor, yaitu reseptor estrogen, progesteron dan HER2/neu adalah faktor prediktif paling berguna untuk menentukan respon agen terapeutik tertentu.²¹

2.2.4 Pengobatan Kemoterapi pada Kanker Payudara

Kemoterapi adalah membunuh sel kanker dengan menggunakan obat, secara peroral maupun parenteral. Obat kemoterapi masuk dalam peredaran darah menuju seluruh tubuh sehingga dapat membunuh sel kanker di luar payudara.⁵

Pengobatan mutakhir kanker payudara sekarang ini berdasarkan pada pendekatan multimodalitas yang mengkombinasikan operasi, kemoterapi, terapi hormon dan radioterapi.³ Kanker payudara merupakan salah satu tumor solid yang kemoresponsif. Oleh karena itu, kemoterapi menjadi unsur yang penting dalam pengobatan kanker payudara terutama sebagai pengobatan adjuvan, neo adjuvan dan paliatif.^{3,21} Salah satu tujuan pengobatan kemoterapi pada semua kanker, juga pada kanker payudara, adalah untuk mencegah dan menghambat multiplikasi sel kanker. Proses inhibisi proliferasi sel dan pertumbuhan kanker terjadi pada beberapa tingkat proses dalam sel. Obat kemoterapi sitotoksik pada proses tersebut mempunyai efek utama pada sintesis dan fungsi molekul makroseluler yaitu DNA, RNA, dan protein. Efek ini cukup untuk menimbulkan kematian sel kanker.²¹ Kemoterapi pada kanker payudara terutama diindikasikan pada pasien dengan tumor yang refrakter atau insensitif terhadap terapi hormon.³

Obat-obatan sitotoksik dengan struktur berbeda ketika diberikan baik dalam rejimen tunggal maupun dalam kombinasi dapat menginduksi remisi pada pasien kanker payudara yang belum pernah dilakukan kemoterapi. Namun, sekarang telah berkembang resistensi multipel terhadap obat-obat kemoterapi pada tumor payudara yang tadinya responsif terhadap obat-obat kemoterapi. Hal ini bertanggungjawab terhadap banyaknya

kegagalan rejimen pengobatan kemoterapi saat ini. Beberapa mekanisme mungkin terlibat meliputi resistensi kinetik, ekspresi gp170 (*PGP*, *Pglycoprotein*), *glutathione transferase*, *superoxide dismutase*, *topoisomerase* dan *multidrug resistance-associated protein (MRP)*.²²

Selain resistensi multipel terhadap obat kemoterapi, masalah yang menjadi perhatian dalam pengobatan kanker payudara saat ini adalah kanker payudara yang tidak mempunyai reseptor hormon estrogen, progesteron, dan protein HER-2. Para peneliti saat ini sedang bekerja keras menemukan obat dengan target molekular baru untuk mengobati bentuk kanker payudara "triple negatif" ini yaitu kanker yang tidak mempunyai reseptor hormon estrogen, progesteron, dan protein HER-2.¹

2.3 SPONGE *HALICLONA SP*

Sponge merupakan suatu hewan invertebrata laut, termasuk dalam filum Porifera, kelas Demospongia. Salah satu spesies dari kelas Demospongia adalah *Haliclona sp (Adocia)*.²³ Sponge umumnya hidup di laut dengan cara menempel pada permukaan batu atau benda lainnya mulai zona litoral (sekitar pantai) hingga kedalaman 8.500 meter permukaan laut. Di Indonesia, sponge dikoleksi dari perairan Jepara, perairan Labuhan Bajo, Flores, serta perairan pada provinsi NTB dan Sulawesi. Sponge merupakan sumber penghasil senyawa bioaktif terbesar diantara invertebrata lainnya.¹¹

Bentuk sponge seperti tabung, mempunyai bagian terbuka yang disebut *osculum* dan bagian dalam yang disebut *spongocoel*, sebagian jaringan spons sudah terdiferensiasi, tapi tidak memiliki otot, saraf, dan organ dalam. Sponge lebih mirip koloni sel ketimbang organisme bersel banyak. Sponge hanya mempunyai empat tipe sel,

yaitu *Choanocytes* yang berfungsi sebagai sistem pencernaan, *porocytes* untuk membuat pori – pori, flat epidermal yang berperan membentuk kulit, dan *amoebocyte* yang berperan sebagai alat transportasi makanan dan sekresi spikula.²³

Untuk menjaga kelangsungan hidup dan pertahanan dirinya, sponge menghasilkan metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer (DNA, lemak, protein, karbohidrat) digunakan untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup. Sedangkan metabolit sekunder (natural product) merupakan suatu senyawa kimia yang diproduksi sebagai respon terhadap lingkungannya, salah satunya sebagai sistem pertahanan diri. Metabolit sekunder yang diproduksi adalah *alkaloid, steroid, terpenoid, dan fenol*.⁸ Senyawa kimia yang dilepaskan ini bersifat toksik terhadap lingkungannya⁷, namun metabolit sekunder ini berpotensi sebagai anti virus, anti bakteri, anti malaria, anti inflamasi, anti oksidan, dan antikanker.^{6,7,24-28} Dalam 3 fraksi yang berbeda, sponge *Haliclona sp* menunjukkan aktivitas antikanker terhadap sel kanker leukemia (L1210 cell line) dengan IC₅₀ 3,25, 2,37, dan 2,90 µg/ml.⁹

Sponge dari genus *Haliclona*, *Xestospongia*, dan *Amphimedon spp* kaya akan kompleks struktural dari cytotoxic alkaloid turunan *3-alkalypiridine*. Variasi dan potensi biologik *3-alkalypiridine* akan meningkat sebanding dengan derajat polimerisasinya, dan akan menghasilkan suatu mekanisme toksisitas yang kompleks dan belum pernah terjadi sebelumnya.²⁹⁻³⁰

Dua jenis alkaloid yang diisolasi dari spesies *Haliclona sp* adalah *Haliclonacylamine A* dan *Haliclonacylamine B*.²⁹ Sumber lain menyebutnya *halicynone A* dan *halicynone B*.³¹ *Haliclonacylamine A* (C₃₂H₅₆N₂) tersusun atas 8 methine (4 diantaranya adalah alkena) dan 24 metylene. *Haliclonacylamine B* merupakan isomer

dari *Haliclonacylamine A*.²⁹ Kedua senyawa ini menunjukkan aktivitas biologik yang poten dan sitotoksisitas yang tidak biasanya seperti pada alkaloid jenis Porifera lain.^{29,31}

Haliclonacylamine A dan *Haliclonacylamine B* merupakan suatu *polyacetylen* rantai panjang yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel tumor. Mekanisme yang terjadi adalah induksi apoptosis pada sel tumor. Metabolit lain dari *Haliclona sp* adalah *Triangulyne A*, *Triangulyne E*, *Pellynol A*, *B*, *C*, *D*, *I*. *Pellynol A* menunjukkan aktivitas antitumor yang kuat terhadap *human colon tumor cell line* HCT-116 (IC₅₀ 0.026 µg/ml). *Polyacetylene* lebih berperan dalam uji toksisitas karena ambang toksisitasnya paling tinggi dibanding *triangulyne* dan *pellynol*.³¹ Renieramisin juga merupakan suatu metabolit yang dapat diekstrak dari *Haliclona sp*. Renieramisin mempunyai susunan identik dengan saframisin. Metabolit ini mempunyai sifat sitotoksik kuat terhadap *cultured cells* serta mempunyai aktivitas anti tumor terhadap beberapa sel tumor yang diujikan secara *in vitro*.³² Goldstein menemukan adanya senyawa lain yang berperan sebagai toksin. Senyawa tersebut adalah *adocia sulfate-2*(AS-2) yang menghambat kerja dari kinesin yang berfungsi dalam transpor seluler.³³

2.4 SIKLUS SEL DAN PERTUMBUHAN SEL KANKER

2.4.1 Siklus Sel

Proliferasi sel ditentukan oleh pengaturan siklus sel. Mekanisme siklus sel sangat kompleks. Mekanisme ini meliputi pembentukan protein, mekanisme aktivasi, mekanisme penghentian, mekanisme perbaikan protein atau gen yang rusak, mekanisme istirahat dan mekanisme lain. Siklus sel terdiri dari dua fase aktif yaitu fase M dan S serta fase persiapan yaitu fase G1 dan G2.³⁴

Urutan dalam siklus sel diarahkan oleh sistem pengontrolan yang jelas. Sistem ini berupa molekul yang beroperasi secara siklik dalam sel. Molekul ini memicu maupun mengkoordinasi kejadian-kejadian penting dalam siklus sel.³⁵ Molekul pengatur ini berupa enzim intrinsik disebut *cyclin dependent kinase (CDK)*.³⁴ Komponen protein kinase dari kompleks ini sebenarnya selalu berada dalam konsentrasi konstan dan inaktif. Pada keadaan aktifnya protein kinase tersebut dapat menggerakkan siklus sel. Protein kinase tersebut bekerja dengan memfosforilasi protein lain yang membuat protein lain tersebut menjadi aktif atau malah inaktif. Agar menjadi aktif protein kinase tersebut memerlukan perlekatan dengan siklin. Siklin, sesuai namanya, selalu dalam konsentrasi berfluktuasi secara siklik di dalam sel.³⁵ Setiap jenis siklin disintesis terutama pada akhir fase siklus sel. Perpindahan antara tahapan dalam siklus sel akan terjadi akibat sintesis siklin ini. Beberapa gen meregulasi siklus sel dengan bertindak sebagai faktor inhibisi terhadap CDK. Faktor-faktor inhibitor tersebut dikenal sebagai CDK inhibitor (CKI).³⁴

Gen ATM dan p53 berfungsi dalam penghentian siklus sel. Pengikatan gen Mdm2 pada gen p53 akan menyebabkan kerusakan gen p53 yang merupakan gen supresor tumor. Mekanisme ini terjadi pada beberapa jenis kanker. Mdm2 dapat mengikat p53 pada keadaan dimana protein pIgARF terganggu. Protein pIgARF berfungsi mengikat Mdm2. Mutasi pada gen INK4a yang mengkode protein tersebut menyebabkan gangguan fungsi protein yang dikodenya.³⁴

Faktor yang mempengaruhi aktivitas siklus sel tidak hanya berasal dari faktor intrinsik saja. Faktor ekstrinsik juga diketahui mempengaruhi aktivitas siklus sel dan pembelahan sel.^{34,35} Faktor pertumbuhan yang dikeluarkan sel tubuh tertentu diketahui dapat merangsang pembelahan sel lain. Penemuan faktor pertumbuhan dapat menjelaskan

fenomena inhibisi tergantung densitas pada pembelahan sel. Fenomena ketergantungan penempelan juga disebabkan oleh faktor eksternal yang melibatkan protein membran plasma dan unsur sitoskeleton yang berhubungan dengan protein membran plasma tersebut. Fenomena ketergantungan penempelan adalah fenomena dimana sel untuk membelah harus dilekatkan pada suatu substrat. Kanker terjadi karena lepasnya sel dari pengontrolan siklus sel baik oleh faktor intrinsik maupun faktor ekstrinsik.³⁵

2.4.2 Pertumbuhan Sel Kanker

Pertumbuhan dan maturasi sel merupakan kejadian normal dalam perkembangan organ selama embriogenesis, pertumbuhan dan perbaikan jaringan serta remodeling setelah perlukaan. Kelainan regulasi dari proses-proses ini dapat menyebabkan hilangnya kontrol terhadap pertumbuhan sel yang berlebihan, diferensiasi dan pembatasan spasial. Neoplasia secara umum mewakili sebuah spektrum penyakit yang mempunyai karakter berupa pertumbuhan sel yang abnormal dan invasi sel.³⁶

Perjalanan alami kebanyakan tumor maligna dapat dibagi menjadi empat fase yaitu perubahan malignan pada sel target yang disebut transformasi, pertumbuhan sel yang mengalami transformasi, invasi lokal, dan metastase jauh.²⁰ Faktor yang mempengaruhi laju pertumbuhan tumor ada tiga, yaitu waktu penggandaan sel tumor, fraksi pertumbuhan, dan laju lepas dan hilangnya sel-sel pada lesi yang sedang berkembang.^{20,37} Pertumbuhan tumor pada umumnya tidak terkait dengan pemendekan waktu siklus sel. Bagaimanapun juga sel-sel tumor dapat dipacu ke dalam siklus lebih mudah dan tanpa pengendalian normal karena kontrol siklus sel menjadi kacau pada kebanyakan sel tumor.²⁰ Fraksi pertumbuhan adalah proporsi sel-sel dalam populasi tumor yang sedang berproliferasi. Laju hilangnya sel dari tumor dapat sangat tinggi

mencapai 90% produksi sel, dan inilah alasan mengapa waktu penggandaan volume jauh lebih lama daripada waktu siklus sel rata-rata. Hilangnya sel terjadi terutama oleh kematian sel baik karena nekrosis atau apoptosis, juga karena eksfoliasi dan metastasis.³⁷ Jadi, pertumbuhan progresif tumor dan laju pertumbuhan tumor ditentukan oleh kelebihan produksi sel terhadap hilangnya sel.²⁰

2.5 PENGECATAN AgNOR

Nucleolar Organizer Region (NOR) merupakan bagian khusus DNA yang disebut rDNA. NOR mengandung gen ribosom. Dengan menggunakan enzim RNA polimerase-1 NOR mengkode transkripsi ribosomal RNA. rRNA merupakan bagian dari ribosom yang bertanggung jawab dalam sintesis protein. Hubungan antara NOR dan proliferasi sel karena sintesis protein merupakan tahap penting dalam proliferasi sel.¹²

NOR terletak pada lengan pendek kromosom akrosentrik manusia yaitu kromosom 13,14,15,21, dan 22. DNA NOR, protein terkait NOR dan rRNA terletak dalam nukleolus.¹² Sudah lama diketahui abnormalitas nukleolus, seperti hipertrofi dan bentuk ireguler, hampir selalu terdapat pada sel-sel kanker. Namun, morfologi nukleolus ini dulu hanya mempunyai nilai diagnostik yang kecil. Kurangnya parameter untuk penilaian yang obyektif terhadap perubahan nukleolus dalam sel-sel kanker merupakan penyebabnya.³⁸ Adanya NOR dalam nukleolus sebenarnya telah diidentifikasi oleh peneliti selama bertahun-tahun dengan hibridisasi insitu menggunakan rRNA yang dilabel radioaktif. Teknik ini memang reliabel tapi sangat menghabiskan waktu. Good pasture dan Bloom memperkenalkan metode impregnasi koloid perak untuk mengidentifikasi NOR dengan lebih mudah. Pada tahun 1986 metode ini dimodifikasi

oleh Ploton dkk. Jumlah, ukuran dan bentuk NOR dapat dipelajari dengan cepat dan sederhana dengan menggunakan AgNOR tidak hanya dalam spesimen jaringan segar yang dibekukan tapi juga dalam material yang *diembedding* dalam parafin dan difiksasi dengan formalin. Komponen nukleolus yang diketahui mengikat perak merupakan komponen protein argirofilik antara lain protein nukleolin (protein C23) dan protein B23. Protein-protein ini berperan dalam transkripsi rDNA.¹²

Untuk melakukan skoring jumlah deposit perak pada teknik ini digunakan metode-metode berbeda. Metode lama adalah dengan menghitung secara manual jumlah titik perak intra nuklear per sel pada setidaknya 100 sel dengan menggunakan mikroskop cahaya. Metode ini masih sering digunakan walaupun terdapat banyak kesulitan. Metode lain yang lebih mutakhir adalah dengan menghitung total area deposit perak dengan bantuan komputer.¹²

Rerata titik AgNOR per sel atau per nukleus disebut mAgNOR. Sedangkan persentase sel-sel dalam suatu tumor atau potongan jaringan yang mengandung titik AgNOR lebih dari jumlah tertentu per sel, sebagian besar lebih dari lima, disebut pAgNOR atau skor distribusi AgNOR atau indeks proliferasi AgNOR. Dalam sebuah penelitian diungkapkan bahwa terdapat korelasi antara pAgNOR dengan persentase sel-sel yang sedang dalam fase S pada siklus sel atau dengan aktivitas proliferasi. Sementara itu, mAgNOR berkorelasi dengan ploidi.¹²

Pola distribusi NOR selama interfase telah menjadi parameter yang sering digunakan dalam patologi diagnostik dan dilaporkan juga mempunyai nilai prognostik.³⁸ Pengecatan AgNOR telah banyak dipakai untuk membedakan tumor jinak dari tumor ganas pada berbagai jenis keganasan. Sel ganas mempunyai lebih banyak titik AgNOR

per nukleus dengan titik lebih kecil dan total area meningkat dan dilaporkan juga terdapat hubungan antara skor pAgNOR dan mAgNOR terhadap grading histologis karsinoma duktus infiltratif payudara.³⁹ Selain itu, dari penelitian cross sectional yang dilakukan oleh Miranti ditemukan korelasi positif antara hitung AgNOR dengan status HER-2 pada karsinoma duktus invasif payudara.⁴⁰ Sebagaimana telah diketahui bahwa status HER-2 adalah salah satu faktor prognostik penting pada kanker payudara.²⁰

Walaupun NOR diperkirakan mempunyai hubungan terhadap proliferasi sel, hubungan yang pasti antara proliferasi, sintesis protein dan ekspresi AgNOR belum diketahui dengan baik. Bahkan beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekspresi AgNOR bukan merupakan indikator untuk jumlah sel-sel yang sedang tumbuh maupun untuk fraksi pertumbuhan, namun ekspresi AgNOR dapat menggambarkan kecepatan siklus sel dan berhubungan dengan waktu penggandaan sel tumor. Berkembangnya teknik pengecatan AgNOR dan penggunaan komputer dalam melakukan skoring area, teknik pengecatan AgNOR menjadi lebih simpel, cepat, reliabel, dan terstandardisasi. Hal ini mendukung penggunaan AgNOR sebagai salah satu alat diagnostik untuk menentukan *tumor behavior*.¹²

2.6 MENCIT C3H DAN ADENOCARCINOMA MAMMAE YANG DITRANSPLANTASIKAN PADA MENCIT

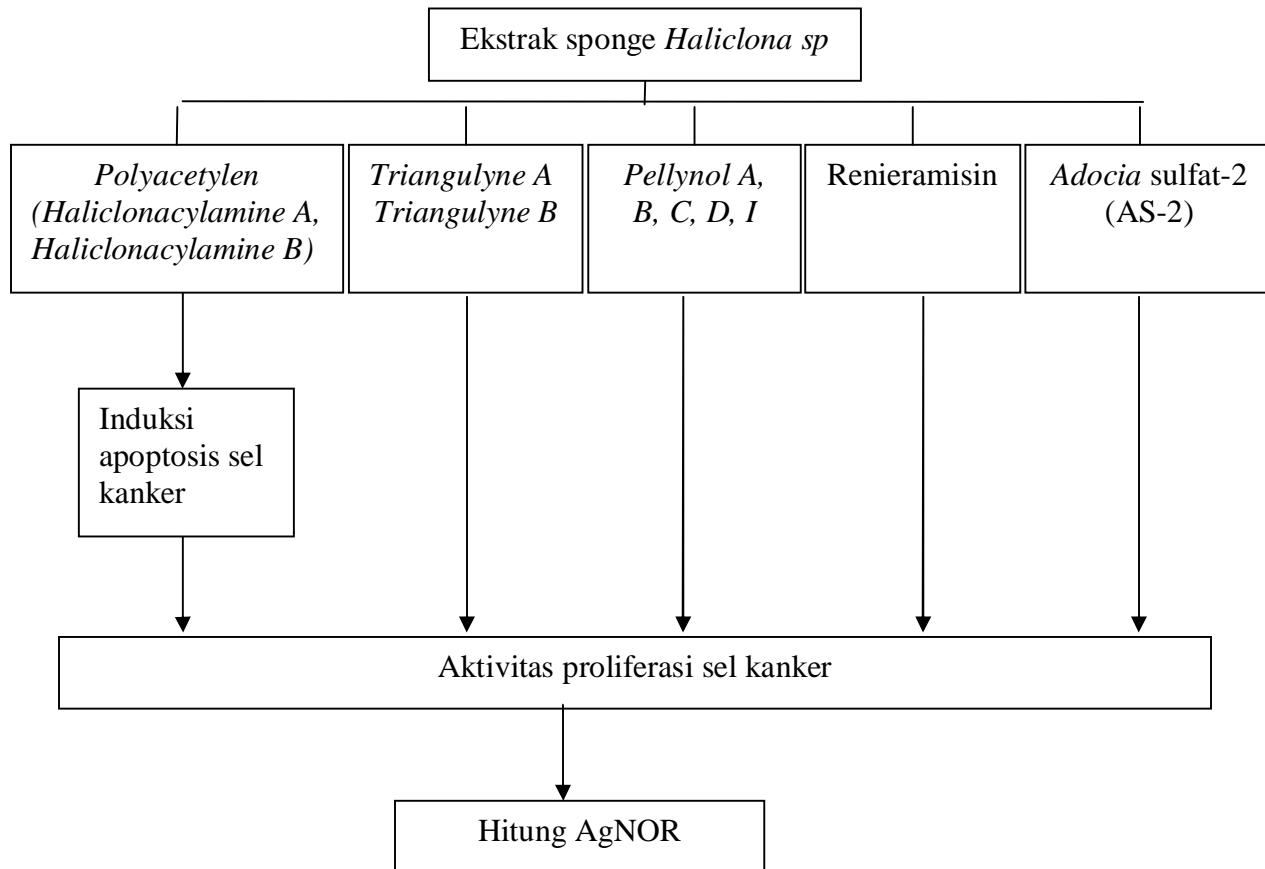
Mencit C3H merupakan hasil inbreeding mencit strain Agouti.^{41,42} Strain C3H dikembangkan oleh Strong pada tahun 1920 dari perkawinan silang mencit Bagg albino dan DBA jantan dengan seleksi yang mempunyai insidensi tinggi tumor payudara. Substrain yang tidak disapih mempunyai insidensi tumor payudara yang tinggi. Mencit

ini rentan terhadap virus tumor payudara yang dibawa dalam bentuk aktif dalam substrain yang tidak disapih.⁴² Virus tumor payudara mencit (*murine mammary tumor virus*/MuMTV) diketahui sebagai agen etiologik *adenocarcinoma mammae* mencit spontan pada beberapa strain mencit yang ditularkan lewat air susu. Mencit C3H menunjukkan titer tinggi MuMTV dalam air susunya, dan kira-kira 90% keturunan C3H yang disusui induk C3H mengembangkan tumor payudara antara umur tujuh dan sepuluh bulan.⁴³ Menyapih bayi-bayi mencit atau mentransfer sel telur yang telah difertilisasi ke strain yang bebas virus tumor payudara mengeliminasi virus pada keturunan mencit tersebut dan secara substansial mengurangi insidensi tumor payudara dan perkembangan tumor payudara terjadi lebih lambat.⁴² Tumor payudara yang lambat terjadinya ini diperkirakan hasil dari aktivasi MuMTV endogen. MuMTV endogen diekspresikan pada mencit C3Hf sejalan dengan meningkatnya usia dan jumlah paritas. Gen dominan tunggal, MTV-1, yang berada pada kromosom 7 mencit, bertanggungjawab terhadap ekspresi antigen viral MuMTV dalam air susu mencit C3Hf dan meningkatnya insidensi perkembangan tumor payudara. Semua substrain perkawinan dalam (*inbred*) mencit mengandung provirus MuMTV endogen. Mekanisme molekuler bagaimana provirus endogen diekspresikan dan menghasilkan tumor pada mencit C3Hf sampai sekarang masih belum diketahui.⁴³

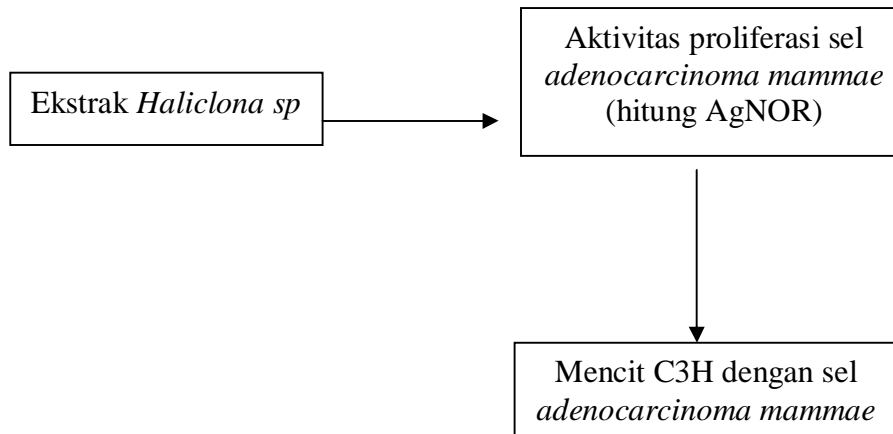
Proporsi tinggi dari tumor payudara yang terjadi adalah tipe asiner. Insidensi tumor payudara dapat dikurangi oleh bromokriptin dan interferon. Substrain yang tidak disapih digunakan secara luas dalam penelitian kanker terutama untuk tumor payudaranya. Mencit ini merupakan inang yang direkomendasikan untuk tumor

transplantabel terutama *adenocarcinoma mammae*. Mencit ini juga direkomendasikan sebagai model untuk skrining obat anti kanker potensial.⁴²

2.7 KERANGKA TEORI

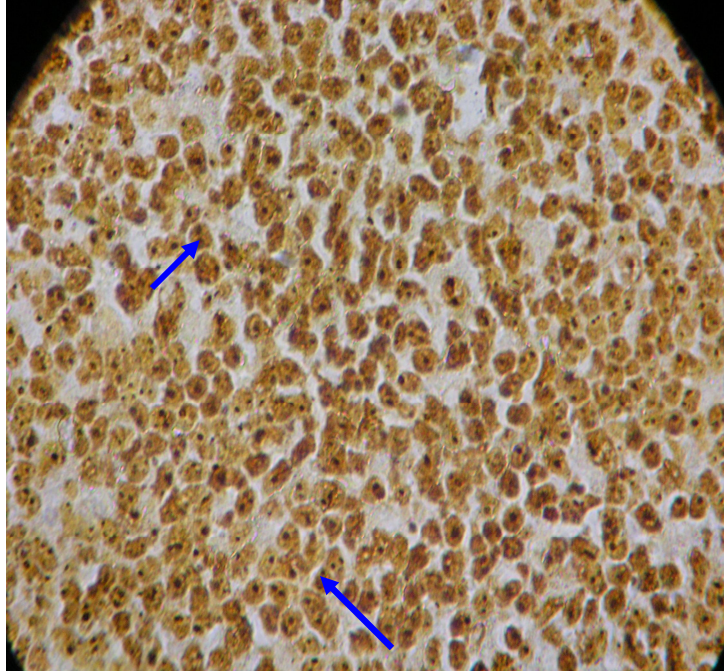


2.8 KERANGKA KONSEP

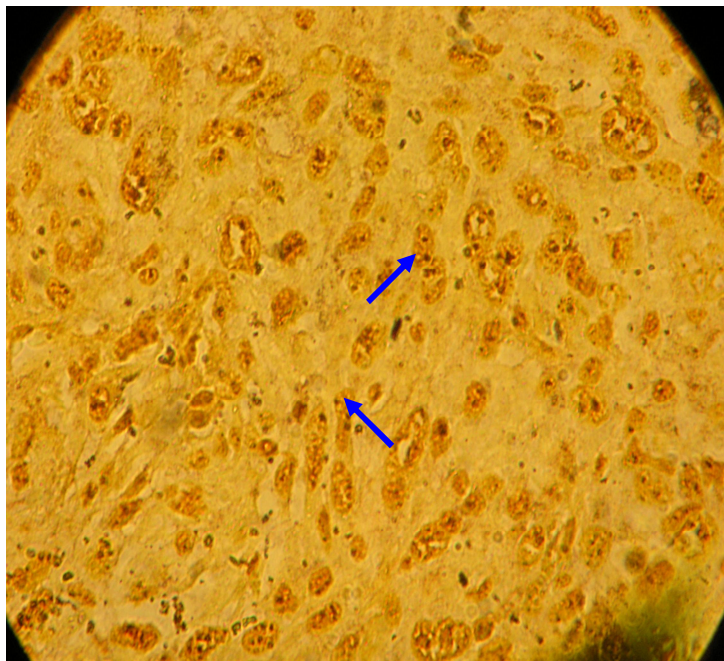


2.9 HIPOTESIS

1. Pemberian ekstrak sponge *Haliclona sp* dapat berpengaruh terhadap aktivitas proliferasi sel dengan metode hitung AgNOR pada sel *adenocarcinoma mammae* mencit C3H.
2. Dosis ekstrak sponge *Haliclona sp* yang paling efektif dalam menghambat aktivitas proliferasi sel dengan metode hitung AgNOR pada sel *adenocarcinoma mammae* pada mencit C3H adalah dosis tertinggi di antara ketiga kelompok perlakuan.



Gambar 6.2 Foto Preparat Kelompok H 2 (pembesaran 100 X Lensa Objektif)



Gambar 6.2 Foto Preparat Kelompok H 3(pembesaran 100 X Lensa Objektif)