

**INHIBISI AKTIVITAS PROLIFERASI SEL DAN PERUBAHAN  
HISTOPATOLOGIK EPITELIAL MUKOSA NASOFARING MENCIT C<sub>3</sub>H  
DENGAN PEMBERIAN EKTRAK BENALU TEH**

***THE INHIBITION ACTIVITY OF CELL PROLIFERATION AND  
HISTOPATHOLOGICAL CHANGES OF C<sub>3</sub>H MICE NASOPHARYNGEAL  
EPITHELIAL MUCOUS BY SCURULLA ATROPURPUREA EXTRACT***



**Tesis**

Untuk memenuhi sebagian persyaratan  
mencapai derajat sarjana S-2 dan memperoleh keahlian dalam bidang  
Ilmu Patologi Anatomi

Magister Ilmu Biomedik

**HIDAYAT SULISTYO  
G4A003019**

**PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
NOPEMBER  
2008**

**INHIBISI AKTIVITAS PROLIFERASI SEL DAN PERUBAHAN  
HISTOPATOLOGIK EPITELIAL MUKOSA NASOFARING MENCIT C<sub>3</sub>H  
DENGAN PEMBERIAN EKTRAK BENALU TEH**

***THE ACTIVITY INHIBITION OF CELL PROLIFERATION AND  
HISTOPATHOLOGICAL CHANGES OF C<sub>3</sub>H MICE'S NASOPHARYNGEAL  
EPITHELIAL MUCOUS BY SCURULLA ATROPURPUREA EXTRACT***

Oleh

**Hidayat Sulisty**

**G4A003019**

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji  
Pada tanggal 20 November 2008  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk diterima

Pembimbing Utama

Pembimbing Kedua

**Prof. Dr.dr. H. Tjahjono, Sp.PA(K),FIAC**  
NIP. 130 368 076

**dr. Awal Prasetyo, M.Kes**  
NIP. 132 163 893

Mengetahui:

Ketua Program Studi  
Patologi Anatomi  
Universitas Diponegoro

Ketua Program Studi  
Magister Ilmu Biomedik  
Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro

**dr. Indra Wijaya, SpPA(K)**  
NIP. 130 516 878

**Prof.dr. H. Soebowo, Sp.PA(K)**  
NIP. 130 352 549

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya.

Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka

Semarang, 20 November 2008

Hidayat sulistyono

G4A003019

## RIWAYAT HIDUP

Nama : dr. Hidayat Sulistyو  
Jenis Kelamin : Laki-Laki  
Tempat /tanggal lahir : Semarang, 5 Juni 1974  
Agama : Islam  
Kewarganegaraan : Indonesia  
Istri : Rr. Diyah Woro Dwi Lestari, SPsi  
Anak : Aisha Nurul Insani  
Muhammad Rasyid SW

### Riwayat Pendidikan

- SD PPSP Semarang, lulus tahun 1986
- SMP LAB IKIP Semarang, lulus tahun 1989
- SMA Negeri 5 Semarang lulus tahun 1992
- Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, lulus tahun 2002
- MS-PPDS PA FK.UNDIP dari Juli 2003

### Riwayat Pekerjaan

- Staf pengajar Bagian Patologi Anatomi FKIK UNSOED Purwokerto 2006-sekarang

## KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, oleh karena berkat rahmat dan karuniaNya, tesis ini dapat selesai. Tesis ini dilakukan untuk memenuhi sebagian persyaratan untuk mencapai derajat sarjana strata-2 di Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terimakasih dan penghargaan kepada:

1. Rektor Universitas Diponegoro yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk belajar, meningkatkan ilmu pengetahuan dan keahlian.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan keahlian.
3. Ketua Bagian Patologi Anatomi FK Undip, yang telah membimbing dan memberi pengarahan selama pendidikan.
4. Ketua Program Studi Patologi Anatomi FK Undip, yang telah memberikan perhatian, dorongan dan nasehat berharga.
5. Ketua Progran Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro, yang memacu penulis untuk segera menyelesaikan tesis.
6. Prof.DR.dr.Tjahjono,SpPA(K),FIAC, pembimbing pertama penelitian ini, yang telah meluangkan waktu untuk membimbing dan mendorong penulis agar segera menyelesaikan laporan ini.
7. Dr. Awal Prasetyo, M.Kes, pembimbing kedua penelitian ini, yang telah memberikan waktu, tenaga, arahan, pemikiran dan motivasi untuk maju.

8. Dr. Kasno, Sp.PA(K), yang mendorong penulis untuk segera menyelesaikan studi.
9. Prof.dr.Soebowo,SpPA(K), penguji dan narasumber di Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.
10. Prof.dr.Edi Dharmana,PhD,Sp.ParK, penguji dan narasumber di Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.
11. Dr. Bambang Endro Putranto,SpPA(K), penguji dan narasumber di Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.
12. Dr.Neni Susilaningsih,M.Si, penguji dan narasumber di Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.
13. Dr.Noor Wijayahadi,M.Kes, PhD, penguji dan narasumber di Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.
14. Dr. Kusmiyati DK,M.Kes, penguji dan narasumber di Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.
15. Drg.Henry Setyawan Susanto, M.Sc, penguji dan narasumber di Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.
16. Para Guru Besar dan Staf Pengajar di Bagian Patologi Anatomi FK Undip, yang telah memberikan dorongan dan saran dalam proses penyelesaian tesis ini.
17. Teman-teman residen Patologi Anatomi FK Undip, yang telah membantu dalam penyelesaian tesis ini.

18. Agung, Livia, Maryam, Bulan dan Anna yang telah bekerjasama dalam pelaksanaan penelitian ini, Pak Misran dan Mbak Yuli yang membantu dalam pemrosesan jaringan, serta semua pihak yang membantu terlaksananya penelitian ini.

19. Kepada keluargaku tercinta Bapak dr.Kasno,SpPA(K), Ibu Muntamah, Istriku Rr.Diyah Woro Dwilestari,S.Psi, Anakku Aisha Nurul Insani dan Muhammad Rasyid SW, terimakasih atas dukungan,kesabaran serta doa dalam penyelesaian tesis ini.

Semoga Allah SWT memberikan Rahmat dan hidayahNya, Khususnya atas budi baik yang diberikan kepada penulis.

Semarang, Nopember 2008

Penulis

## DAFTAR ISI

<u>HALAMAN JUDUL</u> .....	<u>i</u>
<u>LEMBAR PENGESAHAN</u> .....	<u>ii</u>
<u>LEMBAR PERNYATAAN</u> .....	<u>iii</u>
<u>DAFTAR RIWAYAT HIDUP</u> .....	<u>iv</u>
<u>KATA PENGANTAR</u> .....	<u>v</u>
<u>DAFTAR ISI</u> .....	<u>viii</u>
<u>DAFTAR TABEL</u> .....	<u>xi</u>
<u>DAFTAR GAMBAR</u> .....	<u>xii</u>
<u>DAFTAR SINGKATAN</u> .....	<u>xiii</u>
<u>ABSTRAK</u> .....	<u>xiv</u>
<u>ABSTRACT</u> .....	<u>xv</u>
<u>BAB 1_PENDAHULUAN</u> .....	<u>1</u>
1.1 Latar Belakang .....	<u>1</u>
1.2 Rumusan Masalah .....	<u>5</u>
1.3 Tujuan Penelitian .....	<u>6</u>
1.3.1 Tujuan umum.....	<u>6</u>
1.3.2 Tujuan khusus .....	<u>6</u>
1.4 Manfaat Penelitian .....	<u>7</u>
1.5 Orisinalitas Penelitian .....	<u>8</u>



BAB 2_TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. Gambaran Histologik Epitelial Mukosa Nasofaring.....	10
2.2. Potensi Formalin Terhadap Karsinogenesis Nasofaring.....	10
2.3. Induksi Formalin dan Patomekanisme Karsinoma Nasofaring .....	12
2.4. Kajian Karsinogenesis Epitel Mukosa Nasofaring .....	13
2.5. Berbagai Jenis dan Kadar Toksik <i>Formaldehyde</i> .....	15
2.6. Deteksi Proliferasi Sel dengan Metode AgNOR.....	19
2.7. Potensi <i>Scurrulla atropurpurea</i> Sebagai Anti Karsinogenesis.....	20
<u>2.8.</u> Kerangka Teori .....	<u>25</u>
2.9. Kerangka Konsep.....	26
2.10 Hipotesis .....	26
BAB 3 METODE PENELITIAN.....	27
<u>3.1</u> Rancangan Penelitian.....	<u>27</u>
<u>3.2</u> Sampel Penelitian.....	<u>27</u>
<u>3.3</u> Bahan dan Alat .....	<u>28</u>
<u>3.4</u> Data yang Dikumpulkan .....	<u>29</u>
<u>3.5</u> Cara Kerja .....	<u>29</u>
<u>3.6</u> Variabel Penelitian.....	<u>30</u>
<u>3.7</u> Alur Penelitian .....	<u>31</u>
<u>3.8</u> Pengumpulan Data.....	<u>31</u>
<u>3.9</u> Definisi Operasional .....	<u>32</u>
<u>3.10</u> Pengolahan Data .....	<u>33</u>

BAB 4 HASIL PENELITIAN .....	<a href="#"><u>34</u></a>
BAB 5 PEMBAHASAN.....	<a href="#"><u>37</u></a>
BAB 6 SIMPULAN DAN SARAN.....	<a href="#"><u>44</u></a>
6.1 Simpulan.....	<a href="#"><u>44</u></a>
6.2 Saran .....	<a href="#"><u>44</u></a>
DAFTAR PUSTAKA.....	<a href="#"><u>45</u></a>

## DAFTAR TABEL

[Tabel 1.](#) Skoring perubahan histopatologik nasofaring & hitung AgNOR\_.....[34](#)

[Tabel 2.](#) Nilai *mean* dan *median* perubahan skor histopatologik nasofaring\_.....[35](#)

## DAFTAR GAMBAR

<a href="#"><u>Gambar 1.</u></a> Aspek antero-lateral epitel respirasi cavum nasi tikus_ .....	<a href="#"><u>10</u></a>
<a href="#"><u>Gambar 2.</u></a> Skema patomekanisme karsinogenesis formalin_ .....	<a href="#"><u>18</u></a>
<a href="#"><u>Gambar 3.</u></a> <i>Boxplot</i> skor histopatologik_ .....	<a href="#"><u>36</u></a>
<a href="#"><u>Gambar 4.</u></a> <i>Boxplot</i> Hitung AgNOR_ .....	<a href="#"><u>36</u></a>
<a href="#"><u>Gambar 5.</u></a> Epitel mukosa normal .....	<a href="#"><u>37</u></a>
<a href="#"><u>Gambar 6.</u></a> Epitel mukosa hiperplasia .....	<a href="#"><u>37</u></a>
<a href="#"><u>Gambar 7.</u></a> Epitel mukosa displasia ringan.....	<a href="#"><u>37</u></a>
<a href="#"><u>Gambar 8.</u></a> Epitel mukosa displasia sedang.....	<a href="#"><u>37</u></a>
<a href="#"><u>Gambar 9.</u></a> Epitel mukosa displasia berat.....	<a href="#"><u>37</u></a>
<a href="#"><u>Gambar 10.</u></a> Epitel mukosa pengecatan AgNOR kontrol.....	<a href="#"><u>38</u></a>
<a href="#"><u>Gambar 11.</u></a> Epitel mukosa pengecatan AgNOR perlakuan.....	<a href="#"><u>38</u></a>

## DAFTAR SINGKATAN

KNF	: Karsinoma nasofaring
CO	: Carbon monoksida
DNA	: Deoxy nucleic acid
TNF- $\alpha$	: Tumor necrosis factor- $\alpha$
IL-2	: Interleukin-2
NOR	: Nucleolar Organizer Region
$p$	: probabilitas

## ABSTRAK

**Latar belakang:** Efek *Scurrulla atropurpurea* sebagai anti kanker telah banyak dibuktikan hingga tingkat molekuler, namun sebagian besar dilakukan secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan inhibisi aktivitas proliferasi sel dan perubahan histopatologik epitelial mukosa nasofaring mencit C<sub>3</sub>H dengan pemberian ekstrak *Scurrulla atropurpurea*

**Metode:** Penelitian eksperimental laboratorik dengan *post test only control group design*, menggunakan 15 mencit C<sub>3</sub>H sebagai sampel, dibagi tiga kelompok; kelompok kontrol (K) diinduksi dengan uap larutan formalin 10% dalam kotak semi tertutup, diberi diet standar AIN-93M mengandung 54 mg/kgBB formalin selama 9 minggu; kelompok P1 diinduksi uap formalin dan diet standar berformalin selama 6 minggu, lalu diberi 1,5 g/kgBB ekstrak *Scurrulla atropurpurea* selama 3 minggu per sonde; kelompok P2 diberi ekstrak *Scurrulla atropurpurea* selama 3 minggu, kemudian diinduksi uap formalin dan diet standar mengandung formalin selama 6 minggu. Di akhir penelitian dilakukan pemeriksaan histopatologik dan hitung AgNOR. Perubahan histopatologik epitelial mukosa nasofaring dan hitung AgNOR dilakukan oleh ahli patologi anatomi secara membuta. Data yang diperoleh dari semua kelompok diolah dengan *SPSS for Windows* 11.0.

**Hasil:** Skor perubahan histopatologik epitel nasofaring kelompok K (3,72±0,46), P1 (2,07±0,62), dan P2 (1,69±0,48). Rerata hitung AgNOR kelompok K (3±0,15), P1 (1,72±0,07), dan P2 (1,76±0,08). Uji Kruskal-Wallis terhadap variabel perubahan histopatologik adalah bermakna ( $p=0,00$ ). Uji Mann-Whitney terhadap variabel perubahan histopatologik antara P1 vs P2, K vs P2, dan P2 vs P3 juga bermakna ( $p=0,00$ ). Uji Kruskal-Wallis terhadap variabel hitung AgNOR adalah bermakna ( $p=0,008$ ). Uji Mann-Whitney terhadap variabel hitung AgNOR antara K vs P1 dan K vs P2 juga bermakna ( $p=0,009$ ), namun antara P1 vs P2 tidak bermakna ( $p=0,530$ ).

**Simpulan:** Ekstrak *Scurrulla atropurpurea* sebelum dan sesudah induksi formalin menimbulkan pengaruh berbeda bermakna pada perbaikan skor histopatologik dan aktivitas proliferasi sel epitel mukosa nasofaring mencit C<sub>3</sub>H. Efek profilaksis *Scurrulla atropurpurea* lebih kuat daripada efek kuratif.

**Kata kunci:** *Scurrulla atropurpurea*, formalin, skor histopatologik, AgNOR

## ABSTRACT

**Background:** The effect of *Scurrulla atropurpurea* as anti-cancer had been proved molecularly, but mostly in vitro. This study was aimed to prove the inhibition activity of cell proliferation and histopathological changes of C3H mice nasopharyngeal epithelial mucous by *Scurrulla atropurpurea*.

**Methods:** This was a laboratory study with post test only controlled group design, using 15 C<sub>3</sub>H mice as sample, divided into three groups; Control group (K) was exposed to formaline solution 10 % and standard dietary contains formaline 54 mg/kgBW for nine weeks; Treatment P1 group was exposed to formaline solution 10% and standard dietary contained formaline 54 mg/kgBB for six weeks then followed with 1.5 g/kgBW *Scurrulla atropurpurea* extract for 3 weeks; Treatment P2 group added with 1.5 g/kgBW *Scurrulla atropurpurea* extract for 3 weeks the induced by formaline solution 10% and standard dietary contained formaline 54 mg/kgBB for six weeks. In the end of the research, nasopharyng tissue was processed and examined by pathologist blindly to determine the histopathologic score of nasopharyngal mucous appearances as well as the AgNOR. The data was processed by SPSS for Windows 11.0.

**Result:** The histopathological mean score of K Group was (3,72±0,46), P1 (2,21±0,7), and P2 (1±0,73). The mean AgNOR count of K Group was (2,95±0,04), P1 (1,74±0,03), and P2 (1,75±0,04). The Kruskal-Wallis test for the histopathological score was significant (p=0,000). The Mann-Whitney test for the histopathological score between P1 vs P2, K vs P2, and P2 vs P3 were also significant (p=0,00). The Kruskal-Wallis test for AgNOR count was significant (p=0,008). The Mann-Whitney test for AgNOR count between K vs P1 and K vs P2 were also significant (p=0,009), but between P1 vs P2 was not significantly different (p=0,530).

**Conclusion:** The *Scurrulla atropurpurea* extract that given before and after formaline induction effected significantly on the histopathological score and AgNOR count. The profilactive effect of *Scurrulla atropurpurea* was stronger than curative one.

**Key words:** *Scurrulla atropurpurea*, formaline, histopathological score, AgNOR

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1. Latar Belakang

Kanker hidung dan tenggorok atau karsinoma nasofaring (KNF) masih menjadi masalah bagi masyarakat dan merupakan tantangan besar bagi para ahli kesehatan oleh karena menimbulkan morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Di dunia, insidensi KNF masih tinggi, sekitar 55,2% diantara seluruh keganasan di bidang THT. Di antara tumor ganas yang berasal atau terdapat di nasofaring, jenis karsinoma nasofaring merupakan yang terbanyak (90-97%). Berbagai kemungkinan penyebab, faktor risiko dan bahan karsinogenik yang berpotensi menimbulkan KNF telah diungkap para ahli, salah satu yang sudah dikenal adalah *formaldehyde*. Penelitian pada manusia dan hewan coba yang dilakukan oleh “U.S. Environmental Protection Agency's Integrated Risk Information System (IRIS) on Formaldehyde”, menyatakan adanya hubungan bermakna antara terjadinya KNF dengan *formaldehyde*.<sup>1-4</sup>

Model karsinogenesis traktus respiratorius bagian atas (kavum nasi & nasofaring), telah dikembangkan oleh Conolly (2003) pada tikus (*F344 rats*) yang dipapar hirupan uap *formaldehyde* secara kronik selama 6 minggu, sehingga terjadi karsinoma sel skuamosa.<sup>5</sup> *Formaldehyde* berefek langsung pada organ target karena bersifat korosif terhadap mukosa, sehingga dapat menimbulkan nekrosis hebat di daerah nasofaring dan kavum nasi bila terhisap terus menerus. Hal ini menyebabkan mukosa lebih peka terhadap karsinogen lain. Secara tidak langsung, *formaldehyde* mengandung gugus CO atau *aldehyde* bereaksi dengan gugus amina pada protein, menghasilkan



metenamin atau heksametilentetramin, masuk ke dalam tubuh bereaksi dengan DNA, memicu terjadinya mutasi DNA. Jika sisi aktif dari protein-protein vital (albumin, globulin) dalam tubuh dimatikan oleh *formaldehyde*, maka molekul-molekul itu akan kehilangan fungsi dalam metabolisme.<sup>4-7</sup>

Di antara tumor ganas yang berasal atau terdapat di nasofaring, jenis karsinoma nasofaring merupakan yang terbanyak (90-97%). Sampai saat ini hasil terapi KNF dengan radioterapi, kemoterapi, imunoterapi ataupun terapi kombinasi, masih belum memuaskan. Angka daya tahan hidup (*survival rate*) pasien KNF untuk 5 tahun adalah 30–40%, untuk 10 tahun menurun menjadi kurang dari 30%.<sup>1-4</sup>

*Scurrulla atropurpurea* telah dikenal berfungsi sebagai anti viral, anti mikroba, anti hipertensi, dan anti kanker. Suatu studi melaporkan bahwa penderita kanker yang diberi ekstrak *Scurrulla atropurpurea* dari spesies *Viscum album* menunjukkan perbaikan pada DNA dalam limfosit dan sel kekebalan tubuh lain (immunoglobulin, sitokin). Studi lain juga mengungkapkan bahwa penggunaan *Scurrulla atropurpurea* dalam bentuk jamu untuk mengobati penyakit seperti kanker dan penyakit kardiovaskuler. Banyak penelitian telah membuktikan efek *Scurrulla atropurpurea* sebagai anti kanker hingga tingkat molekuler, namun sebagian besar percobaan tersebut dilakukan secara *in vitro*. Sebagian besar penelitian tersebut membuktikan bahwa *Scurrulla atropurpurea* tidak membunuh kanker namun menghambat invasi kanker sehingga tidak terjadi metastasis.<sup>8-11</sup>

Daun dan batang *Scurrulla atropurpurea* mengandung berbagai senyawa aktif yang diduga berpotensi sebagai bahan anti kanker. Efek imunomodulator *Scurrulla atropurpurea* dibuktikan lewat perbaikan DNA limfosit dan sistem kekebalan tubuh. Studi terdahulu membuktikan bahwa efek sitotoksik *Scurrulla oortiana* terhadap

*fibrosarcoma* dan peningkatan sensitivitas sel tumor terhadap TNF- $\alpha$ . Daun dan batang *Scurrulla atropurpurea* mengandung bermacam senyawa aktif yaitu; enam senyawa asam lemak tak jenuh ((*Z*)-9-octadecenoic acid, (*Z,Z*)-octadeca-9,12- dienoic acid, (*Z,Z,Z*)-octadeca-9,12,15-trienoic acid, octadeca-8,10-diynoic acid, (*Z*)-octadec-12-ene-8,10-diynoic acid, octadeca-8,10,12-triynoic acid), dua senyawa xantin (*theobromine* dan *caffeine*), dua senyawa flavonol glikosida (*quercitrin* dan *rutin*), flavon ((+)-*catechin*, (-)-*epicatechin*, (-)-*epicatechin-3-O-gallate*, (-)-*epi-gallocatechin-3-O-gallate*, (+)-*gallocatechin*, (-)-*epigallo-catechin*), dan satu senyawa lignan glikosida (*aviculin*), dan satu senyawa monoterpene glukosida (*Icariside B*).<sup>11,12</sup>

Devehat dkk. (2002) membuktikan bahwa *quercitrin*, salah satu senyawa aktif yang terkandung dalam *Scurrulla atropurpurea*, memiliki efek sitotoksik pada kanker manusia.<sup>13</sup> Ekstrak *loranthaceae* (famili dari *S. atropurpurea*) terbukti berefek sitotoksik secara *in vitro* serta mengurangi tumor solid dan asites pada tikus.<sup>14</sup> Ohashi dkk. (2003) menunjukkan efek anti invasif sebesar 99,4% pada konsentrasi 10 mg/mL dan pengaruh *epigallocatechin-3-O-gallate* sebesar 72,8% terhadap invasi *melanoma maligna* pada tikus. *Octadeca-8,10,12-triynoic acid* juga merupakan *inhibitor COX* yang cukup poten.<sup>11</sup> *Epigallocatechin-3-gallate* juga merupakan *angiogenesis inhibitor oral* dan imunomodulator yang dapat meningkatkan sitokin IL-2 dan sitokin TNF- $\alpha$ .<sup>12</sup> *Scurrulla atropurpurea* memiliki aktivitas anti oksidan dan anti karsinogen karena kandungan selenium.<sup>15</sup> Suplementasi *lignan* selama tujuh minggu setelah 13 minggu induksi kanker, menurunkan 50% volume tumor. Senyawa *catechin*, *gallocatechin*, dan *quercitrin* memiliki efek inhibitor enzim *COX-2*.<sup>16</sup> Matsunaga dkk.(2001) menyatakan flavon berpotensi anti kanker dan meningkatkan aktivitas imun.<sup>15</sup> Proliferasi limfosit di lien

merupakan kondisi yang cukup mewakili peningkatan aktivitas imun dan rangsangan inflamasi lain.<sup>17</sup> Potensi senyawa aktif *Scurrulla atropurpurea* yang besar semakin memperkuat perkiraan tentang fungsinya sebagai anti karsinogenesis KNF.

Banyaknya bukti tentang pengaruh paparan *formaldehyde*, khususnya yang terkandung dalam larutan formalin terhadap insidensi KNF, serta terungkapnya fakta tentang merebaknya paparan larutan formalin dalam kehidupan manusia, menimbulkan rasa cemas akan meledaknya insidensi KNF kelak, sehingga diperlukan upaya mengeliminasi kejadian KNF dengan penggunaan *Scurrulla atropurpurea*. Penelitian tentang efek profilaksis dan kuratif *Scurrulla atropurpurea* pada mencit C<sub>3</sub>H yang diinokulasi adenokarsinoma mammae telah dilaporkan oleh Leksomono dkk.(2006). Studi itu melaporkan bahwa pemberian 1,5 g/kg BB/hari *Scurrulla atropurpurea* per oral selama 3 minggu dapat memberi efek profilaksis maupun kuratif terhadap karsinogenesis pada mencit C<sub>3</sub>H dengan *adenocarcinoma mammae*, dengan menilai formasi tubuler dan inti pleiomorfik berdasarkan sistim *Scarff-Bloom-Richardson*, sebaran sel mononuklear di sekitar jaringan kanker, dan proliferasi limfosit di lien. Sampai saat ini belum ditemukan informasi dan penelitian tentang efek *Scurrulla atropurpurea* terhadap karsinogenesis nasofaring.<sup>18</sup>

Nucleolar Organizer Region ( NOR ) adalah rangkaian DNA dengan lengan pendek kromosom akrosentrik yang mengkode ribosomal DNA, nukleoproteinnya bersifat agrofilik, terpulask perak memberikan gambaran bintik hitam atau coklat disebut agregatNOR(AgNOR). Aktivitas proliferasi suatu sel dapat dinilai dengan menghitung

agregat NOR (AgNOR), karena pada saat sel tersebut mengalami proliferasi dapat mengikat perak. Saat ini, NOR banyak dipakai untuk mengukur aktivitas proliferasi sel, karena cara mudah dan murah. Studi Schint *et al.* yang dikutip oleh Ghozali Adkk.(1997) menyatakan bahwa jumlah AgNOR dianggap dapat mendeteksi adanya perubahan seluler sebelum perubahan morfologi terjadi, yaitu berupa peningkatan aktifitas proliferasi pada mukosa mulut dekat karsinoma epidermoid.<sup>19</sup> Perubahan histopatologik epitel mukosa nasofaring akibat paparan *formaldehyde* telah dibuktikan oleh penelitian sebelumnya, dimana pemberian uap formalin 10% dan diet standar plus 54 mg/kgBB formalin selama 9 minggu dapat mengakibatkan perubahan epitel mukosa nasofaring menjadi karsinoma *in situ*.<sup>20</sup>

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan dan membandingkan potensi profilaksis dan kuratif *Scurrulla atropurpurea* dalam proses karsinogenesis nasofaring mencit C<sub>3</sub>H, yaitu menggunakan paparan uap dari larutan formalin 10% sesuai metode Conolly ditambah diet standar oral mengandung 54 mg/kgBB formalin.<sup>20</sup>

## **1.2. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perumusan masalah penelitian ini adalah; “Apakah terdapat perbedaan efek ekstrak *Scurrulla atropurpurea* terhadap aktivitas proliferasi dan perubahan epitelial mukosa nasofaring mencit C<sub>3</sub>H yang diinduksi formalin?”

## **1.3. Tujuan Penelitian**

### **1.3.1. Tujuan umum**

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan perbedaan efek ekstrak *Scurrulla atropurpurea* terhadap aktivitas proliferasi sel dan perubahan epitelial mukosa nasofaring mencit C<sub>3</sub>H yang diinduksi formalin.

#### 1.3.2. Tujuan khusus

- 1) Mengevaluasi efek ekstrak *Scurrulla atropurpurea* terhadap aktivitas proliferasi sel dan perubahan epitelial mukosa nasofaring mencit C<sub>3</sub>H sebelum dan sesudah diinduksi formalin.
- 2) Mengevaluasi efek ekstrak *Scurrulla atropurpurea* terhadap aktivitas proliferasi sel dan perubahan epitelial mukosa nasofaring mencit C<sub>3</sub>H sesudah diinduksi formalin.
- 3) Mengevaluasi perbedaan efek ekstrak *Scurrulla atropurpurea* terhadap aktivitas proliferasi sel dan perubahan epitelial mukosa nasofaring mencit C<sub>3</sub>H sebelum dan sesudah diinduksi formalin.

#### 1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan; 1) memberi informasi tentang potensi *Scurrulla atropurpurea* dalam karsinogenesis nasofaring, 2) sebagai dasar pengembangan alternatif pengelolaan KNF, 3) menjadi promosi tentang faktor risiko *formaldehyde* pada terjadinya KNF, dan 4) memberi landasan teoritik bagi penelitian selanjutnya.

#### 1.4. Orisinalitas Penelitian

Penelitian-penelitian yang sudah melaporkan induksi karsinogenesis nasofaring dengan *formaldehyde* dan potensi *Scurrulla atropurpurea*, sebagai berikut;

Peneliti (Tahun)	Judul	Variabel	Hasil
Prasetyo A, dkk. (2007)	Efek benalu teh ( <i>Scurrulla atropurpurea</i> ) terhadap karsinogenesis nasofaring mencit C3H yang terpapar <i>formaldehyde</i> .	<i>Scurrulla atropurpurea</i> <i>Formaldehyde</i> Gambaran histopatologi mukosa nasofaring	Pemberian uap formalin 10% dan diet standar plus 54 mg/kgBB formalin selama 9 minggu mengakibatkan perubahan epitel mukosa nasofaring menjadi karsinoma <i>in situ</i> .
Leksomono dkk.(2006)	Perbedaan efek profilaksis dan kuratif benalu teh ( <i>S.atropurpurea</i> ) terhadap gambaran histopatologi & sebaran sel mononuklear kelenjar payudara, proliferasi limfosit lien mencit C <sub>3</sub> H diinokulasi adenokarsinoma mammae.	<i>Scurrulla atropurpurea</i> <i>Adenocarcinoma mammae</i> Gambaran histopatologi kelenjar <i>mammae</i> Limfosit	Dosis 1,5 g/kg BB/hari <i>S. atropurpurea</i> per oral selama 3 minggu dapat memberi efek profilaksis maupun kuratif terhadap karsinogenesis pada mencit C3H dengan <i>adenocarcinoma mammae</i> .
Conolly dkk. (2003)	<i>Biologically motivated computational modeling of formaldehyde carcinogenicity in the F344 rat.</i>	<i>Formaldehyde</i> Gambaran histopatologi mukosa kavum nasi & nasofaring.	Paparan kronik hirupan 6, 10, dan 15 ppm <i>formaldehyde</i> selama 6 jam per hari & 5 hari per minggu menyebabkan karsinoma sel skuamosa cavum nasi pada model tikus F344.
Murwani (2001)	<i>Indonesian tea mistletoe (S. oortiana) stem extract increases tumor cell sensitivity to TNF-<math>\alpha</math>.</i>	<i>Scurrula oortiana</i>	<i>S. oortiana</i> berefek sitotoksik terhadap <i>fibrosarcoma</i> & peningkatan sensitivitas sel tumor terhadap TNF- $\alpha$ .

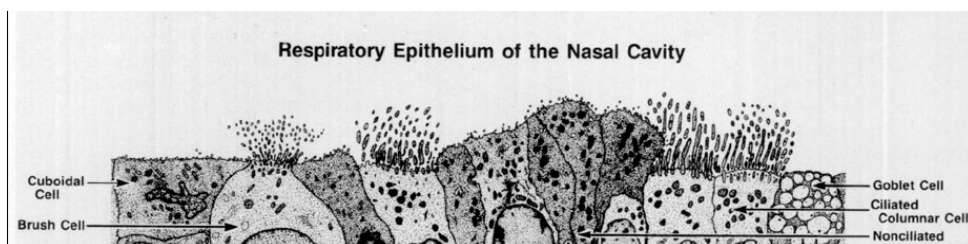
## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Gambaran Histologik Epitelial Mukosa Nasofaring

Saat lahir, epitel nasofaring utamanya tersusun atas epitel kolumner pseudokompleks yang melapisi sebagian besar jalan nafas atas. Saat bertambah usia, area epitel ini secara cepat digantikan epitel skuamous kompleks, sehingga sebelum berumur 10 tahun, sebagian besar mukosa nasofaring, kecuali yang melapisi dasar adenoid, telah diganti dengan epitel skuamous kompleks. Beberapa peneliti mengemukakan bahwa perubahan ini tidak secara intrinsik diprogram secara genetik, namun perubahan itu menggambarkan reaksi metaplastik terhadap pengaruh lingkungan. Sepanjang dinding nasofaring lateral, tersisa bercak-bercak kecil epitel kolumner pseudokompleks, saling bercampur dengan mukosa skuamous kompleks; di regio nasofaring, dimana dua jenis epitel ini bertemu, jenis ketiga berupa; epitel transisional atau intermedia. Epitel transisional berisi sel-sel kuboid atau globular dan dinamakan demikian karena kemiripan mikroskopiknya dengan epitel transisional vesica urinaria. Membran mukosa nasofaring juga berisi elemen-elemen jaringan limfoid dan kelenjar salivatorius minor, yang merupakan pertimbangan penting dalam membuat diagnosis banding suatu massa di tempat ini.<sup>2</sup>

Struktur histologik cavum nasi normal tikus hampir 90% dilapisi oleh epitel respirasi, sedangkan sekitar 10% dilapisi oleh epitel skuamous kompleks berkeratin.



**Gambar 1.** Aspek antero-lateral epitel respirasi cavum nasi tikus.<sup>29</sup>

Epitel respirasi septum nasi, meatus dorsal dan konka dalam berbagai bentuk dan variasi (Gambar 2). Gambar tersebut memperlihatkan adanya tiga tipe sel epitel, yaitu; 1) kolumnar non silia, kuboid dan sel *brush*.

## **2.2. Potensi Formalin Terhadap Karsinogenesis Nasofaring**

Penelitian di Inggris menetapkan kadar toksik *formaldehyde* yang berada di makanan atau minuman sebesar  $\geq 0,02 \text{ mg/m}^3$  (2 ppm); uap di tempat terbuka sebesar  $\geq 0,01 \text{ mg/m}^3$  (1 ppm) dan di tempat tertutup sebesar  $\geq 0,006 \text{ mg/m}^3$  (0,6 ppm), yang merupakan faktor risiko terjadinya KNF. Penelitian tentang pengaruh *formaldehyde* terhadap kejadian KNF di Amerika, menyatakan bahwa paparan *formaldehyde* berupa uap dan asap di industri cat mobil, kayu dan mekanik mesin dapat menyebabkan terjadinya KNF. Pada tahun 1986, penelitian di Denmark mencatat bahwa dari 759 kasus keganasan THT-kepala dan leher, terdapat 293 kasus KNF dengan riwayat paparan *formaldehyde* sebesar 4,2%. Penelitian itu juga menyimpulkan bahwa risiko relatif seseorang terkena KNF akibat terpapar *formaldehyde* adalah sebesar 2,3 kali lipat dibanding yang tidak terpapar, namun tidak dilaporkan seberapa kuantitas dan kualitas paparan. Studi lain yang mengevaluasi perubahan gambaran histopatologik biopsi



mukosa nasal para pekerja yang terpapar *formaldehyde* melaporkan bahwa dari 37 orang yang terpapar *formaldehyde* di tempat kerja selama lebih dari 5 tahun, 34 orang mengalami metaplasia skuamosa dan 3 orang mengalami displasia epitelial berat (karsinoma *in situ*). Penelitian untuk menilai efek toksik paparan *formaldehyde* pada mukosa nasal pada 75 pria pekerja melaporkan bahwa, hanya tiga orang yang memiliki mukosa nasal normal; 11% mengalami kerusakan silia mukosa nasal dan hiperplasia sel goblet; 78% dengan metaplasia skuamosa; 6 kasus (8%) terjadi displasia sedang. Suatu penelitian hewan coba dan klinis menyimpulkan bahwa *formaldehyde* dalam bentuk partikel debu yang dihirup (dalam kadar 3 ppm) memiliki efek yang lebih buruk dibandingkan dengan dalam bentuk uap atau asap.<sup>6, 20-25</sup>

Berbagai bukti epidemiologik tersebut telah menunjukkan potensi karsinogenik *formaldehyde* sebagai faktor risiko terjadinya keganasan traktus respiratorius, khususnya pada area nasofaring. Sebagaimana proses karsinogenesis yang terjadi di organ lainnya, mekanisme patologik *formaldehyde* dalam menyebabkan KNF juga melalui berbagai langkah (*multisteps*) dan tahapan (*multistage*) yang amat kompleks. Sampai saat ini, diduga bahwa *formaldehyde* mampu berperan sebagai inisiator karsinogenesis dengan langsung menyebabkan mutasi DNA (genotoksik dan mutagenik) lewat jalur sistemik metabolisme *xenobiotic*. Peran sebagai promotor karsinogenesis terjadi akibat efek toksisitas lokal dan kemampuan *formaldehyde* dalam mengubah protein jaringan, sehingga memacu proses perubahan sel menuju keganasan.<sup>26-29</sup>

### **2.3. Induksi Formalin dan Patomekanisme Karsinoma Nasofaring**

Conolly dkk. (2003) melakukan paparan kronik hirupan 6, 10, dan 15 ppm *formaldehyde* selama 6 jam per hari, dan 5 hari per minggu hingga menyebabkan

karsinoma sel skuamosa kavum nasi pada model tikus F344.<sup>5</sup> Larutan *formaldehyde* (formalin) dapat digolongkan sebagai *pro-carcinogen* yang berarti tidak langsung menimbulkan kanker, melainkan harus melalui proses metabolisme dulu oleh enzim-enzim tubuh menjadi *ultimate-carcinogen* (bersifat sangat reaktif dalam ikatan dengan DNA), menimbulkan reaksi toksik, epoksidasi dan hidroksilasi pada DNA, RNA dan protein sel tubuh, dan akhirnya menyebabkan terjadinya mutasi DNA. *Formaldehyde* juga sekaligus berperan sebagai *co-carcinogen*, yang dapat memperbesar (mempromosi) reaktifitas kelompok karsinogen *direct-acting carcinogen* (misalnya; gas *mustard*, *melfhalan*, *benzylchlorida*) atau *pro-carcinogen* lain (misalnya; asap rokok, tir/jelaga).<sup>30</sup> *Formaldehyde* bersifat korosif terhadap mukosa, bila terhirup  $\geq 6$  jam sehari dapat menyebabkan nekrosis mukosa dan apabila terhirup dalam waktu  $\geq 6$  jam per hari selama beberapa bulan dapat menyebabkan terjadinya nekrosis mukosa yang terus menerus di daerah kavum nasi atau nasofaring, menyebabkan mukosa kavum nasi dan nasofaring menjadi lebih peka terhadap zat karsinogen. *Formaldehyde* merupakan *xenobiotic* yang bersifat karsinogenik bagi tubuh melalui paparan hirupan maupun telanan.<sup>31-33</sup>

Formalin dapat mencapai nasofaring melalui inhalasi, per oral, sub kutan dan intra vena, dan sebagai salah satu senyawa *xenobiotic*, maka formalin lebih sering dan banyak masuk ke dalam tubuh lewat inhalasi dan per oral. Senyawa *xenobiotic* ini akan dimetabolisme atau didetoksikasi oleh hepar melalui dua reaksi; 1) reaksi metabolisme *xenobiotic* fase-1 (fase hidroksilasi), dimana senyawa *xenobiotic* diubah menjadi derivat *xenobiotic* terhidroksilasi yang lebih mudah larut air dengan dikatalisis oleh kelompok enzim monooksigenase atau sitokrom P450, dan 2) reaksi metabolisme *xenobiotic* fase-2 (fase konjugasi), dimana derivat *xenobiotic* terhidroksilasi (hasil metabolisme fase-1)

akan terkonjugasi dengan molekul asam glukuronat dan glutathione menjadi lebih mudah larut dalam air, selanjutnya diekskresi lewat urin atau asam empedu. Reaksi *xenobiotic* ini tidak akan menimbulkan paparan ke sel tubuh, namun apabila gagal maka senyawa *xenobiotic* ini akan bereaksi dengan sel tubuh melalui ikatan kovalen makromolekul sel (DNA, RNA dan protein). Ikatan kovalen dengan DNA akan mengawali fase inisiasi karsinogenesis, yang dimulai dengan terjadinya mutasi DNA (Gambar 2), dilanjutkan dengan aktivasi proliferasi sel yang terjadi pada awal progresifitas sel normal menjadi sel kanker.<sup>28,29,31,34</sup>

#### **2.4. Kajian Karsinogenesis Epitel Mukosa Nasofaring**

Struktur histologik mukosa dan jaringan limfoid sekitar nasofaring pada mencit sama dengan manusia, sehingga proses perubahan ke arah karsinogenesis yang terjadi pun serupa. Rangsangan kronik mukosa nasofaring oleh formalin menyebabkan perubahan sel ke arah ireversibel. Struktur mukosa nasofaring yang merupakan peralihan antara epitel skuamous dan kolumnar, dapat mengalami hiperplasia, yaitu pembesaran mukosa akibat bertambahnya jumlah sel. Perubahan bentuk dari satu jenis sel ke jenis yang lain yang serupa diferensiasinya dan masih bersifat reversibel, disebut metaplasia, juga bisa terjadi pada lapisan mukosa nasofaring yang terpapar formalin. Tahapan selanjutnya dari perubahan adaptif sel mukosa nasofaring akibat paparan formalin adalah displasia.<sup>35,36</sup>

Displasia merupakan kelainan proliferasi non neoplastik dari sel epitel, dimana sel epitel akan kehilangan uniformitas dan orientasi arsitekturnya. Sel-sel displastik menunjukkan pleomorfisme (variasi bentuk dan ukuran) dan nukleus yang seringkali tercat lebih gelap (hiperkromatik), dengan ukuran abnormal lebih besar. Selain itu, sel

displastik juga terdapat gambaran mitosis yang lebih banyak daripada biasanya. Mitosis sering terjadi di tempat abnormal dalam epitelium. Pada epitel skuamous kompleks yang displastik, mitosis tidak hanya terbatas pada lamina basalis saja, namun juga terjadi pada sel-sel yang lebih superfisial. Perubahan displastik merupakan kondisi premaligna dengan tiga derajat diferensiasi, yaitu; ringan, sedang dan berat. Penentuan derajat diferensiasi epitel yang mengalami displasia, didasarkan dengan penilaian terhadap; 1) adanya pertumbuhan jaringan berupa tonjolan atau permukaan yang berbenjol-benjol akibat dari penebalan lapisan epitel, disertai dengan bertambahnya mitosis, 2) ditemukannya sel atipik yang pleiomorfik, rasio inti-sitoplasma meningkat dan bertambahnya DNA inti, dan kelainan diferensiasinya. Displasia ringan sampai sedang menampakkan perubahan tidak di seluruh ketebalan epitel dan bisa bersifat reversibel, dimana dengan menghilangkan penyebabnya maka epitel akan kembali normal. Sedangkan, displasia berat ditandai dengan perubahan nyata pada seluruh ketebalan epitel, sehingga disebut karsinoma *in situ*.<sup>36</sup>

## **2.5. Berbagai Jenis dan Kadar Toksik *Formaldehyde***

“The Canadian Environmental Protection Act” (CEPA) menyatakan bahwa paparan *formaldehyde* bisa terjadi di semua tempat kerja dan di tempat dimana ada pembakaran. Secara umum, paparan *formaldehyde* pada tubuh dapat melalui dua jalur, yaitu; *inhalation* (hirupan) dan *ingestion* (telanan).<sup>33</sup> *Formaldehyde* jenis hirupan (inhalasi) dapat berbentuk uap, asap dan partikel debu.

*Formaldehyde* atau larutan uap formalin bisa dijumpai pada; cat, urea, larutan disinfektan, cairan pembalsam untuk pengawet kayu maupun jaringan/organ anatomi. *Formaldehyde* berbentuk asap berada di lingkungan sebagai hasil pembakaran berbagai

bahan, misalnya; rokok, karet, plastik, solar, bensin, kayu, dsb. Sedangkan *formaldehyde* berbentuk partikel debu dapat dijumpai pada penggergajian kayu/tripleks, *fiberglass*, penggilingan padi, bahan bangunan maupun bahan/bubuk pelindung tekstil.<sup>6,33</sup>

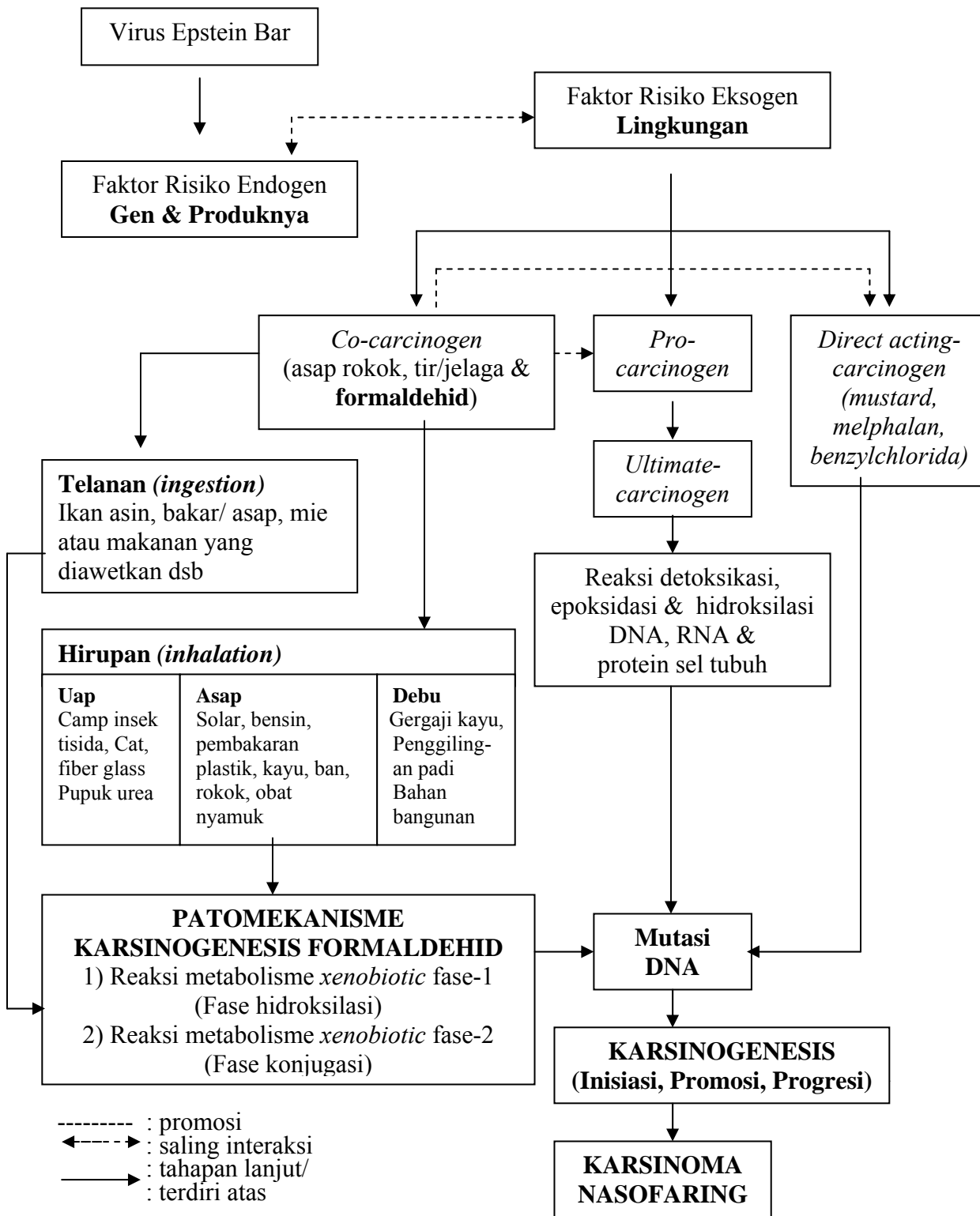
*Formaldehyde* jenis telanan (*ingestion*) dapat berupa; pengawet komponen minuman atau makanan (sirup, alkohol, makanan instan, saus tomat, minyak sayur, dsb), atau juga ditemukan pada makanan yang diasapkan atau dibakar. *The Concise International Chemical Assessment Documents* (CICAD) dan CEPA secara rinci menyebutkan bahwa paparan *formaldehyde* dapat terjadi pada; 1) sarana pelayanan kesehatan melalui sterilisasi ruangan/alat kesehatan, 2) pertanian melalui penyemprotan antihama, dan pupuk kimia, 3) peternakan ayam potong melalui penyemprotan antiseptik, 4) industri tekstil melalui penggunaan bahan pelindung (anti kusut, anti jamur, anti api), 5) industri plastik melalui proses pembuatan cetakan plastik, 6) industri perkayuan melalui pelapisan, pengawetan dan pengecatan, 7) kru (sopir, teknisi) mesin-mesin transportasi maupun industri, 8) proses pengawetan bulu/kulit binatang, pengawetan jaringan/organ/spesimen.<sup>33</sup>

*Formaldehyde* yang mencemari udara, terhirup paling sedikit 6 jam sehari secara terus menerus selama 6 bulan, dan *formaldehyde* yang mencemari makanan tertelan dalam seminggu paling sedikit 3 kali selama 6 bulan, adalah merupakan faktor risiko terjadinya KNF. Informasi dari CICAD menyebutkan bahwa berbagai bentuk *formaldehyde* (uap, asap, debu, makanan dan minuman) mempunyai batas ambang toksisitas yang berbeda.<sup>6,33</sup>

Secara jelas, CICAD menentukan ambang batas aman dikonsumsi, sebagai berikut;

1) ambang batas kadar *formaldehyde* yang berada di makanan atau minuman sebesar

0,02 mg/m<sup>3</sup> (2 ppm), makanan asap atau bakar sebesar 1 mg/mm<sup>3</sup> (1 ppm), bumbu makanan instan/awetan, minuman atau alkohol sebesar 0,02 mg/mm<sup>3</sup> (2 ppm), 2) ambang batas kadar *formaldehyde* berupa uap di tempat terbuka sebesar 0,001 mg/m<sup>3</sup> (0,1 ppm), dan di tempat tertutup sebesar 0,06 mg/m<sup>3</sup> (6 ppm), 3) ambang batas kadar *formaldehyde* berupa asap di tempat terbuka maupun tertutup sebesar 0,005 mg/m<sup>3</sup> (0,5 ppm), 4) ambang batas kadar *formaldehyde* berupa asap rokok sebesar 21 µg/rokok, 6) ambang batas kadar *formaldehyde* berupa partikel debu di tempat terbuka maupun tertutup sebesar 1 mg/m<sup>3</sup> (100 ppm).<sup>6,33</sup>



**Gambar 2.** Skema patomekanisme karsinogenesis *formaldehyde*

## 2.6. Deteksi Proliferasi Sel dengan Metode AgNOR

Progresifitas sel neoplastik merupakan cermin dari sifat dan perangai sel yang telah berubah menjadi ganas, dimana sel kanker yang tumbuh berlebihan juga mengalami proses aktifitas proliferasi sel yang berlebihan.<sup>37</sup> Peningkatan aktifitas proliferasi sel pada jaringan yang terinisiasi adalah perubahan yang sangat penting pada stadium awal dari promosi tumor yang merupakan tanda khas lesi prakanker. Deteksi aktifitas proliferasi pada lesi jinak maupun ganas dapat diamati dengan *thymidine uptake*, pelabelan *bromodeoxy-uridine*, sitometrik alur maupun imunohistokimia (misalnya dengan Ki-67, PCNA maupun MIB-1).<sup>38,39</sup>

Saat ini, NOR banyak dipakai untuk mengukur aktivitas proliferasi sel, karena cara pewarnaan AgNOR mudah dan murah, sehingga dapat dilakukan rutin. NOR merupakan metode reaksi Ag dengan NOR (AgNOR). NOR adalah suatu lengkungan DNA yang menempati area khusus kromosom 13,14,15,21 dan 22, yang merupakan tempat gen DNA ribosomal (rDNA). NOR penting dalam sintesa protein, membantu menjaga perpanjangan konfigurasi DNA dan mengatur proses transkripsi. NOR mempunyai struktur nukleoprotein khas yang dipakai sebagai identifikasinya. Protein tersebut selama transkripsi bersifat *argirofilik*, sehingga dapat dipulas dengan perak. Dengan mikroskop cahaya, preparat dengan pewarnaan perak menampilkan koloid NOR sebagai bercak gelap intra nukleus. Bercak-bercak itu disebut agregat *argirofilik* (AgNOR). Hasil perwarnaan AgNOR mempunyai korelasi tinggi dengan sitometrik alur dan pewarnaan imunohistokimia. Variasi jumlah AgNOR dapat membantu menegakkan diagnosis dan membedakan berbagai tingkatan lesi.<sup>40</sup>



Berdasarkan pendapat Schint *et.al* yang dikutip dari Ghozali A dkk.(1997), jumlah AgNOR dapat membedakan epitel mulut normal dengan epitel mulut di dekat karsinoma epidermoid yang masih terlihat normal dan belum menunjukkan tanda-tanda displasia. Studi itu menyebutkan bahwa jumlah AgNOR dianggap dapat mendeteksi adanya perubahan seluler sebelum perubahan morfologi terjadi, yaitu peningkatan aktifitas proliferasi pada mukosa mulut dekat karsinoma epidermoid.<sup>19</sup>

## **2.7. Potensi *Scurrulla atropurpurea* Sebagai Anti Karsinogenesis**

*Scurrulla atropurpurea* sebagai anti kanker memiliki berbagai mekanisme dalam menghambat kanker karena bermacam-macam kandungan zat aktifnya. Daun dan batang *Scurrulla atropurpurea* mengandung bermacam-macam senyawa aktif yaitu: enam senyawa asam lemak tak jenuh ((*Z*)-9-octadecenoic acid, (*Z,Z*)-octadeca-9,12- dienoic acid, (*Z,Z,Z*)-octadeca-9,12,15-trienoic acid, octadeca-8,10-diynoic acid, (*Z*)-octadec-12-ene-8,10-diynoic acid, octadeca-8,10,12-trynoic acid), dua senyawa xantin (*theobromine* dan *caffeine*), dua senyawa flavonol glikosida (*quercitrin* dan *rutin*), flavon ((+)-*catechin*, (-)-*epicatechin*, (-)-*epicatechin-3-O-gallate*, (-)-*epi-gallocatechin-3-O-gallate*, (+)-*gallocatechin*, (-)-*epigallo-catechin*), dan satu senyawa lignan glikosida (*aviculin*), dan satu senyawa monoterpene glukosida (*Icariside B*).<sup>11</sup>

Berbagai penelitian telah membuktikan bahwa banyak sel kanker yang mengandung infiltrasi sel mononuklear, dimana pada beberapa tumor dapat mengalami regresi spontan. Sel kanker lebih banyak berkembang pada individu dalam keadaan imunodefisiensi atau immunosupresi, dan di pihak lain sel kanker seringkali menyebabkan immunosupresi penderita. Modulasi sistem imun tersebut dapat mencegah karsinogenesis. Namun, apabila sudah terbentuk kanker, maka pertumbuhannya dapat dihambat. Zee

Cheng yang meneliti ekstrak *Scurrulla atropurpurea* dari spesies *Viscum album* menunjukkan perbaikan pada DNA limfosit dan sistem kekebalan tubuh. Fernandez (2003) yang meneliti benalu dari spesies *Ligaria cuneifolia* menunjukkan efek imunomodulator lewat penghambatan proliferasi dari *murine-mitogen activated lymphocytes*, leukemia limfosit, dan kanker payudara. Penelitian oleh Hargono (1998) memperlihatkan pola perkembangan Ig G yang meningkat setiap minggu pada pemberian 150 mg/100grBB *Scurrulla atropurpurea*.<sup>10,42</sup>

Efek sitotoksik *Scurrulla atropurpurea* pada konsentrasi tertentu diketahui spesifik terhadap sel kanker tanpa mempengaruhi sel normal. Hal ini dibuktikan oleh Muwarni (2001) dengan meneliti pengaruh ekstrak batang terhadap *fibrosarcoma* WEHI-164.<sup>12</sup> Studi tersebut membuktikan bahwa ekstrak *Scurrulla atropurpurea* bersifat sitotoksik terhadap WEHI-164 dan meningkatkan sensitivitas sel tumor terhadap *TNF- $\alpha$* , suatu molekul yang digunakan sistem kekebalan tubuh untuk membunuh sel tumor, dan bersifat sitotoksik terhadap sejumlah sel yang mengalami transformasi.<sup>12</sup> Devehat, dkk. (2002) membuktikan bahwa *quercetin* (golongan glikosida *flavonol*) dari *Scurrulla ferruginea* (famili *Loranthus*) memiliki efek sitotoksik pada empat lini kanker manusia.<sup>13</sup> Mary KT dkk. (1994) membuktikan bahwa ekstrak 15 tanaman dari famili *Loranthaceae* yang diberikan secara simultan selain berefek profilaksis juga berefek sitotoksik secara *in vitro*, dan mengurangi tumor solid dan asites pada tikus.<sup>14</sup>

*Scurrulla atropurpurea* mengandung selenium (Se), yang merupakan unsur toksik dan esensial sebagai komponen dan aktivator beberapa enzim penting, serta memiliki aktivitas anti oksidan dan anti karsinogen. Menurut Rayman (2002) yang dikutip oleh Hawab, peran Se sebagai antioksidan berhubungan dengan *glutathione peroksidase*, suatu

enzim yang mengandung empat atom Se, sehingga enzim ini menjadi komponen penting dalam ketahanan tubuh melawan proses degeneratif.<sup>8</sup>

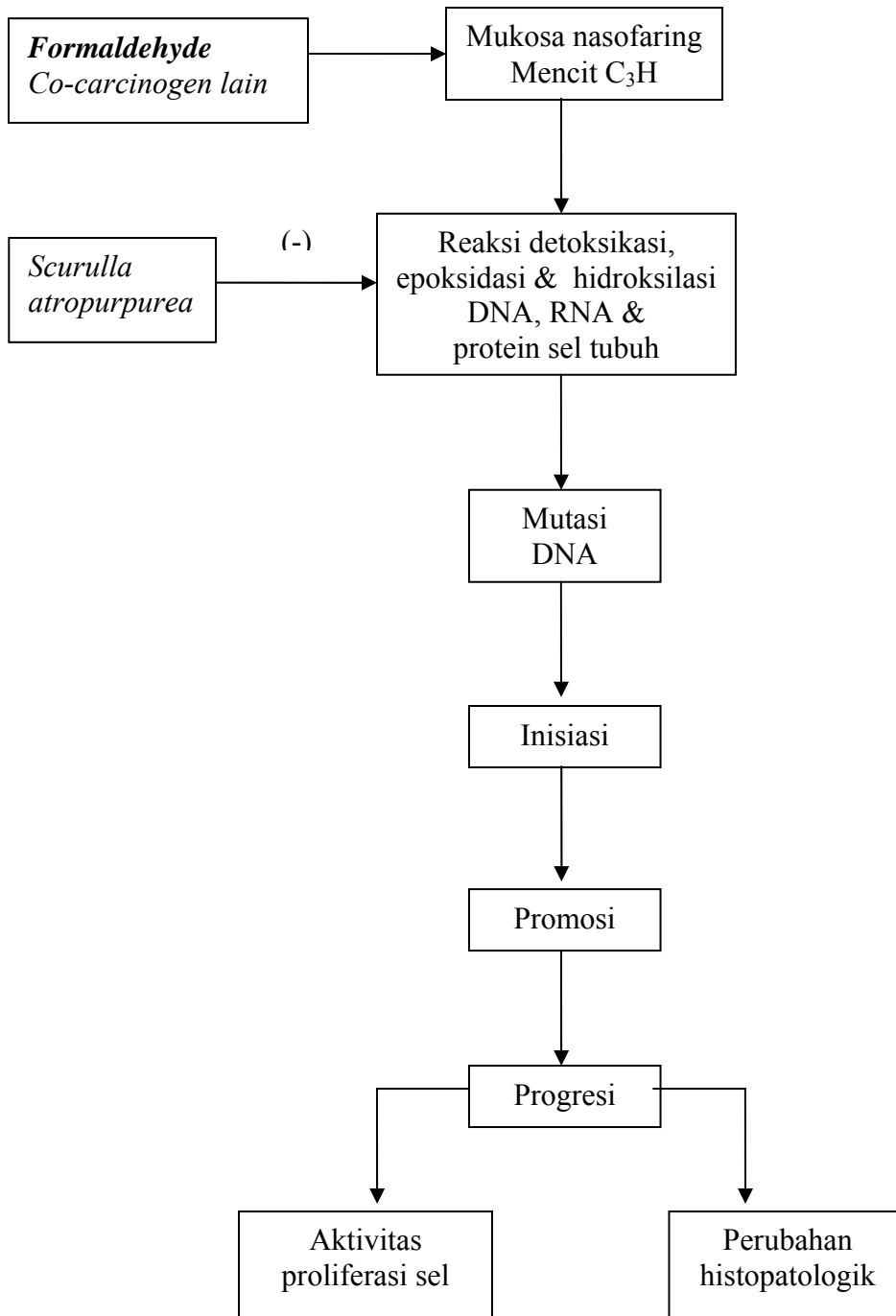
*Scurrulla atropurpurea* tidak secara cepat mematikan sel-sel tumor, tetapi dapat membantu mencegah meluasnya sel-sel tumor (Ohashi dkk. 2003), dan diantara senyawa aktif yang dikandung, terdapat dua senyawa yang menunjukkan efek hambatan terhadap invasi sel kanker *Melanoma maligna-1* (MM1) yang diisolasi dari sel *Ascites Hepatoma* (AH 130), yaitu senyawa *Octadeca-8,10,12-triynoic acid* yang mampu menghambat invasi sel kanker sebesar 99,4% pada konsentrasi 10 mg/ml, dan senyawa *Epigallocatechin-3-O-gallate* sebesar 72,8%. *Octadeca-8,10,12-triynoic acid* merupakan zat aktif anti kanker yang terkandung dalam *Scurrulla atropurpurea*. Namun, baik dengan metode pengujian *in vitro* maupun *in vivo* yang dikembangkan, diketahui bahwa zat ini tidak membunuh sel kanker, melainkan menghambat invasi sel kanker, sehingga sel tidak mengalami metastasis. Sampai saat ini belum ada obat anti kanker yang bekerjanya menghambat invasi sel, sehingga penemuan senyawa *Octadeca-8,10,12-triynoic acid* dalam *Scurrulla atropurpurea* yang struktur kimianya relatif sederhana, menjadi harapan akan dilakukannya sintesis senyawa anti kanker baru yang murah dan sangat dibutuhkan oleh penderita kanker di Indonesia.<sup>11</sup>

Di antara berbagai potensi *Scurrulla atropurpurea*, efek anti estrogen dan *aromatase inhibitor* *Scurrulla atropurpurea* mungkin merupakan efek paling poten dan terkait erat untuk terapi maupun profilaksis kanker yang pertumbuhannya dipengaruhi faktor hormonal. Kandungan *lignan* diduga mampu mengendalikan multiplikasi sel yang normal dan mengurangi risiko kanker, serta meminimalkan metastasis/penyebaran kanker. Diet *lignan* dari *flax* sebagai profilaksis kanker merupakan hal yang menjanjikan.

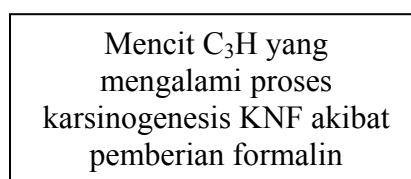
Efek proteksi *lignan* tampak pada fase promosi di mana kanker belum cukup terbentuk. Suplementasi *lignan* selama 7 minggu setelah 13 minggu induksi kanker juga mampu menurunkan 50% volume tumor pada kelompok perlakuan dan tidak ada perubahan pada kelompok plasebo. Lignan merupakan faktor proteksi bagi *hormone sensitive cancer*. Lignan dapat menstimulasi *hepatic synthesis of sex hormone (SHBG)*, yang akan meningkatkan *clearance* estrogen dari sirkulasi, lebih jauh lagi SHBG akan mencegah estrogen menempati reseptor estrogen.<sup>41</sup>

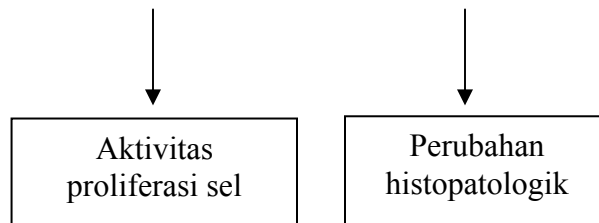
Senyawa aktif lain yaitu *(+)-catechin*, *(+)-gallo catechin*, dan *quercitrin* memiliki efek inhibitor terhadap enzim *COX-2*. Enzim *COX-2* menyebabkan agresifitas, potensi tumbuh cepat dan metastasis kanker. Senyawa *Octadeca-8,10,12-triynoic acid*, merupakan salah satu asetilen baru yang diisolasi dari kulit pohon *Heisteria acuminata*, ternyata merupakan *inhibitor COX* yang cukup poten. *Angiogenesis* berperan penting bagi kelangsungan pertumbuhan sel kanker, karena pembuluh darah adalah penyuplai nutrisi. Apabila neovaskularisasi sel kanker dihambat, tentu saja lambat laun sel kanker akan mati karena tidak tercukupinya bahan-bahan esensial yang dibutuhkan sel untuk terus tumbuh dan membelah. *Epigallocatechin-3-gallate* yang terkandung dalam teh hijau dan juga dapat ditemukan pada konsentrasi yang lebih rendah dalam *Scurrulla atropurpurea*, adalah *angiogenesis inhibitor oral*. *Epigallocatechin-3-gallate* merupakan senyawa potensial yang dapat digunakan sebagai prevensi dan terapi dari penyakit/gangguan yang tergantung dari adanya *angiogenesis (angiogenesis dependent disorder)* seperti misalnya; retinopati diabetikum, psoriasis, rheumatoid arthritis, kanker, dan, metastasis kanker.<sup>38,41</sup>

## 2.8. KERANGKA TEORI



## 2.9. KERANGKA KONSEP





## 2.9. HIPOTESIS

- 1) Aktivitas proliferasi sel lebih sedikit dan perubahan histopatologik epitel mukosa nasofaring mencit C<sub>3</sub>H lebih baik pada pemberian ekstrak *Scurrulla atropurpurea* sebelum dan sesudah diinduksi formalin, dibandingkan tanpa pemberian ekstrak *Scurrulla atropurpurea*.
- 2) Terdapat perbedaan aktivitas proliferasi sel dan perubahan histopatologik epitel mukosa nasofaring mencit C<sub>3</sub>H pada pemberian ekstrak *Scurrulla atropurpurea* antara sebelum dan sesudah diinduksi formalin.

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini adalah studi eksperimental laboratorik dengan *the post test only control group design* yang menggunakan mencit strain C<sub>3</sub>H sebagai hewan percobaan. Penelitian ini mencakup bidang ilmu biologi, kimia, biokimia, telinga hidung tenggorok dan patologi anatomi, dilakukan di laboratorium Biokimia dan laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro selama 12 minggu.

#### **3.2. Sampel Penelitian**

Sampel penelitian adalah mencit strain C<sub>3</sub>H yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut;

1) Kriteria Inklusi:

- a. Mencit jantan
- b. Strain C<sub>3</sub>H
- c. Umur 3 bulan
- d. Berat badan  $\pm$  20 gram
- e. Tidak ada abnormalitas anatomi yang tampak

2) Kriteria Eksklusi:

- a. Mencit tampak sakit (gerakan tidak aktif)
- c. Mencit mati selama perlakuan berlangsung (*drop out*)

Penentuan besar sampel menurut aturan WHO, yaitu minimal lima ekor tiap kelompok. Pada percobaan ini terdapat 3 (tiga) kelompok; kelompok kontrol (K), kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok perlakuan 2 (P2). Selama percobaan, hewan coba ditempatkan pada kandang dan diberi pakan dan minum secara *ad libitum*.

### 3.3. Bahan dan Alat

1) Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah:

- a. Ekstrak *S. atropurpurea* dengan dosis 1,5 g/kgBB mencit tiap hari.<sup>20</sup>
- b. Mencit C<sub>3</sub>H sesuai kriteria.
- c. Larutan formalin 10% yang dialirkan dalam ruang semi tertutup bervolume 1 m<sup>3</sup>, sehingga diperkirakan dapat menghasilkan uap formalin berkadar 10 mg/m<sup>3</sup>.<sup>20</sup>
- d. Pakan standar mencit.
- e. Pakan yang bercampur formalin dengan dosis 54 mg/kgBB.<sup>20</sup>
- f. Bahan untuk preparat histopatologik dengan pengecatan HE & AgNOR.

2) Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Kandang mencit dan perlengkapannya.
- b. Penutup kaca pada tiap kandang mencit dengan volume 1 m<sup>3</sup>.
- c. Seperangkat alat bedah minor.
- d. Ekstrak *Scurrulla atropurpurea*.
- e. Spuit khusus untuk memasukkan ekstrak *Scurrulla atropurpurea* per oral.

### 3.4. Data yang Dikumpulkan



Data yang dikumpulkan adalah data primer hasil perhitungan skor penilaian perubahan histopatologik epitel mukosa nasofaring mencit C<sub>3</sub>H dan aktivitas proliferasi sel (AgNOR).

### 3.5. Cara Kerja

Mencit jantan strain C<sub>3</sub>H sebanyak 15 ekor diaklimatisasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standar selama satu minggu secara *ad libitum*, kemudian dibagi menjadi tiga kelompok, tiap kelompok terdiri dari lima ekor mencit yang ditentukan secara acak. Masing-masing kelompok dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standar dan minum *ad libitum*, serta diberi perlakuan sebagai berikut;

Kelompok K : diinduksi uap formalin 10% dan diet standar AIN-93M mengandung 54 mg/kgBB formalin per hari selama 9 minggu.

Kelompok P1 : diberi 1,5 g/kgBB ekstrak *Scurrulla atropurpurea* selama 3 minggu, kemudian diinduksi uap formalin 10% serta diet standar AIN-93M mengandung 54 mg/kgBB formalin selama 9 minggu.

Kelompok P2 : diinduksi uap formalin 10% dan diet standar AIN-93M mengandung 54 mg/kgBB formalin selama 9 minggu, kemudian diberi diet 1,5 g/kgBB ekstrak *Scurrulla atropurpurea* selama 3 minggu.

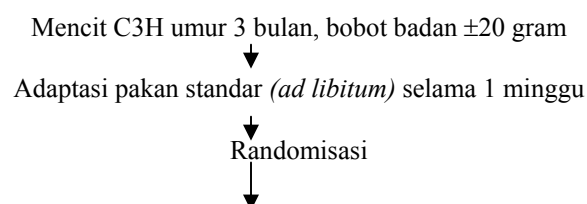
Kemudian mencit diterminasi, setelah sebelumnya dilakukan anestesi dengan eter, menurut kelompoknya. Selanjutnya diambil sediaan nasofaring dan dikirim ke laboratorium Patologi Anatomi untuk dilakukan pemeriksaan.

Teknik pemeriksaan aktifitas proliferasi sel dan perubahan histopatologik epitel mukosa nasofaring dengan cara sebagai berikut; (1) tikus didekapitasi, (2) diambil nasofaringnya dengan cara memotong bagian kepala, membuang mandibula, (3) dilakukan pemrosesan jaringan, (4) pengecatan HE untuk perubahan histopatologik dan AgNOR untuk aktivitas proliferasi sel. Pemeriksaan perubahan histopatologik epitel nasofaring dan hitung titik AgNOR dilakukan pada setiap blok parafin. Aktifitas proliferasi sel epitel nasofaring dinilai dengan menggunakan metode AgNOR. Hitung AgNOR dilakukan sesuai metode Ploton dengan menghitung jumlah AgNOR interfase per sel pada 100 sel tumor dengan pembesaran 1000x menggunakan minyak emersi, kemudian diambil rata-ratanya. Pada setiap sediaan dilakukan perhitungan pada daerah yang paling anaplastik, hindari bagian nekrotik dan sel yang bertumpuk. Kontrol internal reaksi dilakukan dengan perhitungan AgNOR pada limfosit yang hanya memiliki satu bintik AgNOR. Pengecatan AgNOR tampak sebagai titik coklat atau hitam dalam inti sel epitel.<sup>40,42</sup>

### 3.6. Variabel Penelitian

- 1) Variabel bebas adalah dosis ekstrak *Scurrulla atropurpurea*, paparan larutan formalin dan diet mengandung formalin yang diberikan pada setiap mencit setiap harinya.
- 2) Variabel tergantung adalah skor histopatologik epitel mukosa nasofaring dan hitung bercak AgNOR.

### 3.7. Alur Penelitian



Minggu ke-	Kel.K	Kel.P1	Kel.P2
1		V	
2		V	
3		V	
4	=	=	=
5	=	=	=
6	=	=	=
7	=	=	=
8	=	=	=
9	=	=	=
10	=	=	=
11	=	=	=
12	=	=	=
13			V
14			V
15			V

Terminasi mencit dengan anestesi eter

Pengambilan sampel, pembuatan, dan pemeriksaan preparat di laboratorium

### 3.8. Pengumpulan Data

Data yang dikumpulkan adalah data primer hasil pemeriksaan yang membedakan antar tiap kelompok.

Penilaian skor perubahan histopatologik epitel mukosa nasofaring yang telah dipulas *Hematoksilin eosin* di bawah mikroskop dengan perbesaran 400X. Aktifitas proliferasi sel epitel nasofaring dinilai dengan menggunakan metode AgNOR, dan pemeriksaan dilakukan oleh dua orang secara membuta.

### 3.9. Definisi Operasional

- 1) Pemberian ekstrak *Scurrulla atropurpurea* yang dimaksud adalah pemberian ekstrak daun dan batang *Scurrulla atropurpurea* telah yang dikeringkan dengan panas matahari dan kemudian dibuat ekstrak dengan dosis 1,5 g/kgBB, sesuai prosedur standar Bagian MIPA Universitas Gadjahmada Yogyakarta.

- 2) Induksi karsinogenesis nasofaring dilakukan dengan metode Conolly yang dimodifikasi, menggunakan uap dari larutan formalin 10% yang dialirkan ke dalam ruang semi tertutup bervolume 1 m<sup>3</sup> sehingga diharapkan dapat menghasilkan uap formalin 10 ppm, serta ditambah diet standar oral mengandung 54 mg/kgBB formalin per hari selama 9 minggu.<sup>20</sup>
- 3) Perubahan histopatologik mukosa epitel nasofaring dinilai dengan skor sebagai berikut;

Skor	Perubahan histopatologik mukosa epitel nasofaring
0	Normal
1	Hiperplasia: jumlah sel normal bertambah
2	Displasia ringan: tampak proliferasi atau hiperplasia sel dari lamina basalis dan parabasal, tidak meluas melebihi sepertiga epitelial. Secara sitologik tampak atipik, namun umumnya ringan dengan hanya ada sedikit sel atau inti yang pleomorfik. Mitosis tak tampak menonjol, dan biasanya terjadi di basal dan normal, dengan perubahan struktur sel yang minimal.
3	Displasia sedang: tampak proliferasi sel atipik yang meluas ke sepertiga tengah epitelial. Perubahan sitologik lebih hebat dibanding displasia ringan, misal tampak hiperkromatik, inti dan sel yang pleomorfik. Mitosis meningkat dan abnormal, namun biasanya terletak di lamina basalis. Perubahan struktur sel tampak di pertengahan bawah epitel, karena hilangnya polaritas sel. Namun, stratifikasi dan maturasi sel relatif normal, sering disertai hiperkeratosis.

Skor	Perubahan histopatologik mukosa epitel nasofaring
4	Displasia berat : tampak proliferasi abnormal di lapisan basalis sepertiga atas epitelial. Perubahan sitologik dan struktur sel sangat menonjol. Semua perubahan yang tampak pada displasia sedangkan multipel yang mencolok. Mitosis suprabasal terjadi mencolok, biasanya berbentuk bintang (tripolar) abnormal. Badan apoptotik terlihat nyata. Perubahan struktur sel hebat dan seringkali dengan keratinisasi abnormal. Kadang tampak akantolisis dengan disrupsi epitelial.

- 4) Perhitungan aktivitas proliferasi sel dengan cara menghitung bercak AgNOR sesuai dengan metode Ploton dengan menghitung jumlah bercak AgNOR per sel pada 100 sel dengan pembesaran 1000X menggunakan minyak emersi.<sup>40</sup>

### **3.10 ANALISIS DATA**

Data yang diperoleh dari semua kelompok sampel diolah dengan program komputer SPSS 10.0. dilakukan uji statistik non parametrik *Kruskal Wallis*, dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

Skor derajat histopatologik nasofaring mencit C<sub>3</sub>H merupakan data primer dengan skala rasio, disajikan secara deskriptif dengan tabel. Perbedaan skor derajat histopatologik antar variabel pada tiap kelompok dilakukan uji beda dengan perhitungan statistik non parametrik.

## BAB 4

### HASIL PENELITIAN

Selama penelitian menggunakan 15 ekor mencit untuk 3 kelompok berdasarkan jumlah sampel minimal menurut WHO tiap kelompok hanya digunakan 5 ekor mencit.

**Tabel 1.** Skoring perubahan histopatologik nasofaring & hitung AgNOR (n=5)

Kelompok	Skor Histopatologik Epitel Mukosa		Hitung AgNOR	
	Pemeriksa I	Pemeriksa II	Pemeriksa I	Pemeriksa II
<b>K (1)</b>				
Mencit-1	4	3	3,07	2,84
Mencit-2	3	4	2,63	3,02
Mencit-3	4	4	2,73	3,05
Mencit-4	4	4	2,89	3,15
Mencit-5	4	4	2,97	3,15
<b>P1 (2)</b>				
Mencit-1	2	2	1,79	1,87
Mencit-2	3	2	1,75	1,84
Mencit-3	2	3	1,61	1,72
Mencit-4	2	1	1,72	1,68
Mencit-5	1	2	1,59	1,82
<b>P2 (3)</b>				
Mencit-1	2	2	1,69	1,58
Mencit-2	1	2	1,66	1,78
Mencit-3	2	2	1,88	1,79
Mencit-4	2	1	1,7	1,77
Mencit-5	1	2	1,96	1,7

Kelompok K (1): diinduksi uap larutan formalin 10% dan diet standar AIN-93M mengandung 54 mg/kgBB formalin selama 9 minggu.

Kelompok P1(2): diinduksi uap larutan formalin 10% dan diet standar AIN-93M mengandung 54 mg/kgBB formalin selama 9 minggu, lalu diberi 1,5 g/kgBB ekstrak *Scurrulla atropurpurea* selama 3 minggu.

Kelompok P2(3): diberi 1,5 g/kgBB ekstrak *Scurrulla atropurpurea* selama 3 minggu, lalu diinduksi uap larutan formalin 10% dan diet standar AIN-93M selama 9 minggu.

**Tabel 2.** Nilai *mean* dan *median* perubahan skor histopatologik nasofaring dan hitung AgNOR pada tiap kelompok (n=5)

Kelompok		Skor Histopatologik Nasofaring <sup>1)</sup>	Hitung AgNOR <sup>2)</sup>
K (1)	Mean±SD	3,72±0,46	3±0,15
	Median	4	1,7
P1 (2)	Mean±SD	2,07±0,62	1,72±0,07
	Median	2	1,7
P2 (3)	Mean±SD	1,69±0,48	1,76±0,08
	Median	2	1,8

<sup>1)</sup>Kruskal Wallis,  $p=0,00*$   
( $p<0,05=$  signifikan)

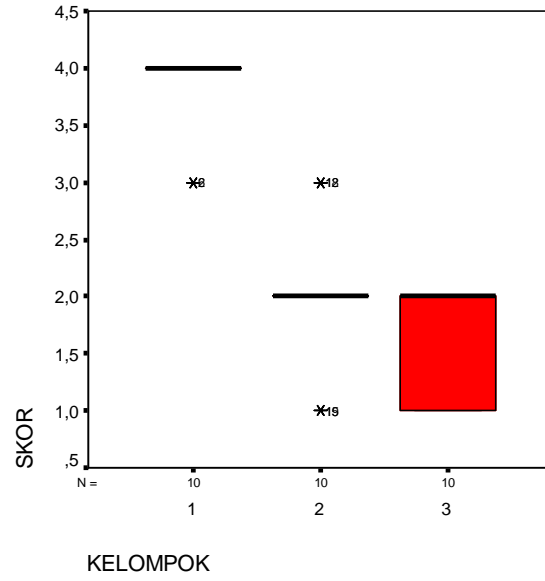
<sup>1)</sup>Mann Whitney:  $p<0,05=$  signifikan  
K vs P1;  $p=0,00$  (signifikan)  
K vs P2;  $p=0,00$  (signifikan)  
P1 vs P2;  $p=0,076$  (tidak signifikan)

<sup>2)</sup>Kruskal Wallis,  $p=0,008*$   
( $p<0,05=$  signifikan)

<sup>2)</sup>Mann Whitney:  $p<0,05=$  signifikan  
K vs P1;  $p=0,009$  (signifikan)  
K vs P2;  $p=0,009$  (signifikan)  
P1 vs P2;  $p=0,530$  (tidak signifikan)

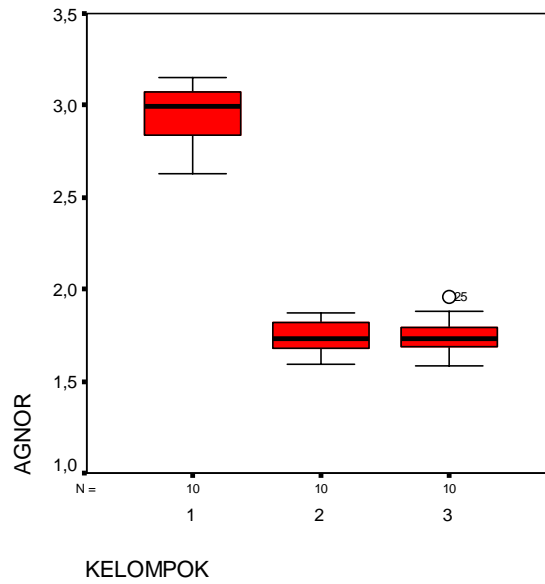
Tabel 1 dan tabel 2 memperlihatkan hasil skor perubahan histopatologik epitel nasofaring kelompok; K (1) dengan *mean* dan standar deviasi 3,72±0,46, kelompok P1 (2) 2,07±0,62, dan kelompok P2 (3) 1,69±0,48. Uji Kruskal-Wallis terhadap variabel perubahan histopatologik dalam kelompok perlakuan  $p=0,00$  atau terdapat perbedaan bermakna ( $p<0,05$ ). Uji Mann-Whitney antara kelompok K dan P1 ( $p=0,00$ ), antara kelompok K dan P2 ( $p=0,00$ ), antara kelompok P1 dan P2 ( $p=0,076$ ) atau berbeda tidak bermakna ( $p>0,05$ ).

Hasil penghitungan jumlah AgNOR kelompok K dengan *mean* dan standar deviasi 3,0±0,15, kelompok P1 1,72±0,07, dan kelompok P2 1,76±0,08. Uji Kruskal-Wallis terhadap variabel hitung AgNOR dalam kelompok perlakuan diperoleh  $p=0,008$  atau terdapat perbedaan bermakna ( $p<0,05$ ). Uji Mann-Whitney antara kelompok K dan P1 ( $p=0,009$ ), antara kelompok K dan P2 ( $p=0,009$ ) atau terdapat perbedaan bermakna ( $p<0,05$ ). Uji Mann-Whitney antara kelompok P1 dan P2 ( $p=0,530$ ) atau berbeda tidak bermakna ( $p>0,05$ ).



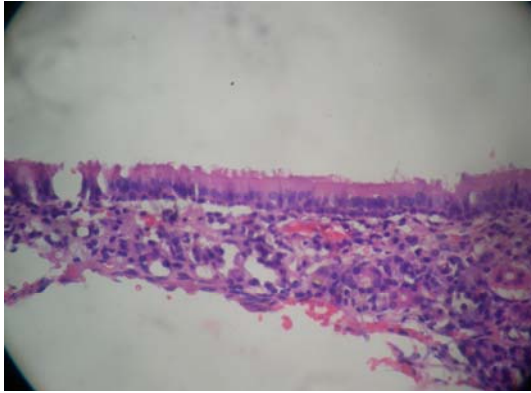
**Gambar 3.** Boxplot skor histopatologik

Gambar 1 dan 2 memperlihatkan perbedaan mencolok antara skor histopatologik nasofaring dan hitung AgNOR pada kelompok kontrol dan perlakuan (P1 dan P2).

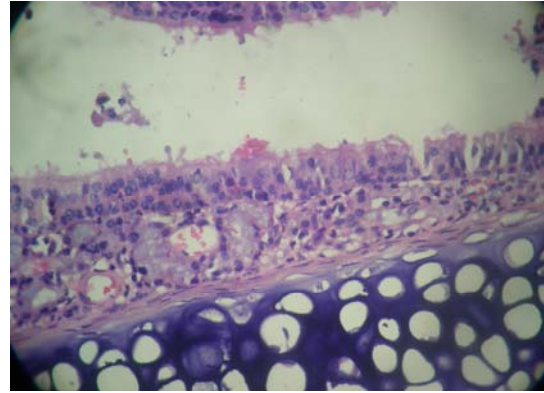


**Gambar 4.** Boxplot Hitung AgNOR

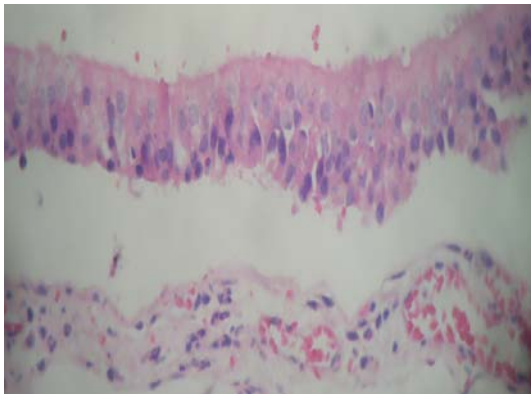




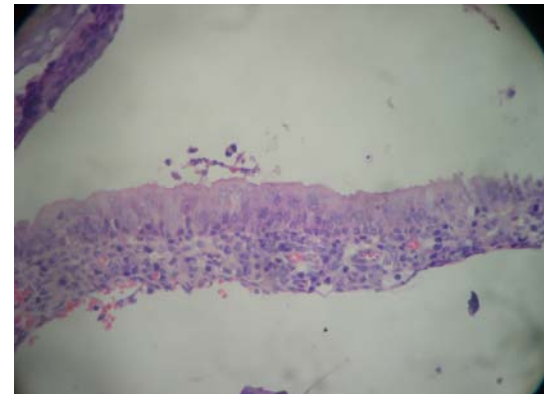
**Gambar 5.** Epitel mukosa normal (HE 100X)-Skor 0



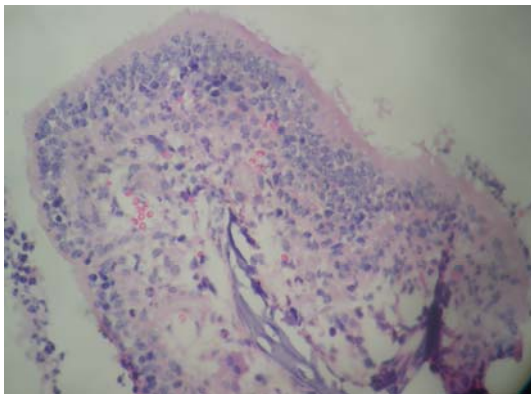
**Gambar 6.** Epitel mukosa hiperplasia (HE 400X)-Skor 1



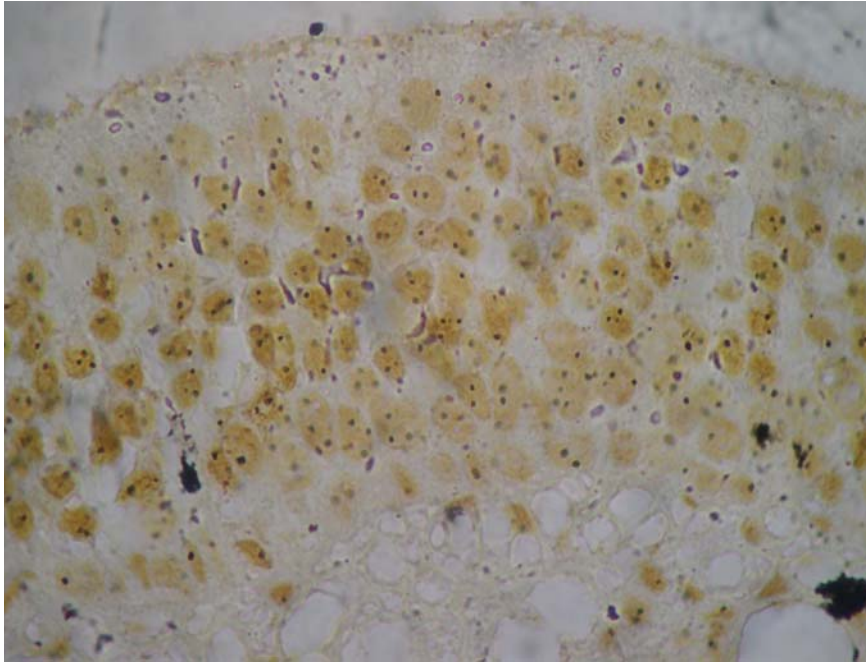
**Gambar 7.** Epitel mukosa displasia ringan (HE 400X)-Skor 2



**Gambar 8.** Epitel mukosa displasia sedang (HE 100X)-Skor 3



**Gambar 9.** Epitel mukosa displasia berat (HE 100X)-Skor 4



**Gambar 10.** Epitel mukosa kontrol pada pengecatan AgNOR (1000X)



**Gambar 11.** Epitel mukosa perlakuan pada pengecatan AgNOR (1000X)

## BAB 5

### PEMBAHASAN

*Scurrulla atropurpurea* mengandung bermacam senyawa aktif, dan berbagai penelitian telah membuktikan potensinya sebagai imunomodulator, sitotoksik terhadap sel kanker, antioksidan, inhibitor enzim COX-2, maupun angiogenesis inhibitor oral.<sup>13</sup> Penelitian ini dilakukan induksi karsinogenesis dengan paparan inhalasi formalin dan diet per oral mengandung formalin. Sebagai intervensi perlakuan diberikan ekstrak *Scurrulla atropurpurea*. Pemberian *Scurrulla atropurpurea* pada kelompok P1 dilakukan sebelum induksi karsinogenesis untuk membuktikan efek preventif dan pemberian *Scurrulla atropurpurea* pada kelompok P2 setelah induksi karsinogenesis untuk membuktikan efek kuratif. *Scurrulla atropurpurea* dikenal mengandung *octadecenoic acid*; *octadeca-9, 12-dienoic acid*; *octadeca-9,12,15-trienoic acid*; *octadeca-8,10-diynoic acid*; *octadec-12ene 8,10-diynoic acid*; *octadeca-8,10, 12-trynoic acid*, xantin (*theobromine* dan *caffeine*), flavonol glikosida (*quercitrin* dan *rutin*), flavon (*catechin*, *epicatechin*, *epicatechin-3-O-gallate*, *gallo catechin*, *epigallocatechin*), lignan glikosida (*aviculin*), monoterpen glukosida (*Icariside B*) sebagai anti kanker, antioksidan, anti estrogen, sitotoksik selektif, imunomodulator, anti invasivitas, dan anti metastasis.<sup>13</sup>

Dari hasil didapatkan adanya perbedaan tidak bermakna antara perubahan histopatologik dan hitung AgNOR pada kelompok P1 dan kelompok P2 (kelompok perlakuan preventif dan kuratif). Perubahan histopatologik kelompok P1 cenderung lebih baik daripada kelompok P2. Adanya perbedaan tidak bermakna antara kelompok P1 dan

kelompok P2 ini menunjukkan bahwa efek kemopreventif *Scurrulla atropurpurea* lebih baik daripada efek kuratifnya.

Perbedaan perubahan histopatologik dan AgNOR juga nampak nyata pada kelompok K yang memperlihatkan gambaran terjadinya karsinogenesis nasofaring akibat induksi formalin. Namun apabila kelompok K dibandingkan dengan kelompok P1 dan P2, maka jelas terdapat perbedaan yang bermakna. Hal ini menunjukkan efek inhibisi dan perbaikan proses karsinogenesis nasofaring. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa *Scurrulla atropurpurea* berpotensi sebagai anti kanker, dimana potensi kemopreventif diperankan oleh *lignan* dan *epigallocatechin-3-o-gallate*. Modulasi *Scurrulla atropurpurea* terhadap respon imun telah diperlihatkan oleh studi Ohashi dkk. (2003). Studi Ohashi membuktikan peran *Octadeca-8,10,12-triynoic acid* yang terkandung dalam *Scurrulla atropurpurea* mampu menghambat invasi sel kanker sebesar 99,4% pada konsentrasi 10 mg/ml dari hasil uji bioaktivitas terhadap invasi sel kanker secara *invitro*.<sup>10</sup> Kemampuan menghambat invasi sel kanker ini selain menghambat metastasis juga memungkinkan invasi sel ke jaringan sekitarnya terhambat, sehingga efek profilaktik *Scurrulla atropurpurea* lebih baik. *Selenium* berfungsi sebagai antioksidan bersama *quercitrin* mampu menekan mutasi gen. Antioksidan akan melawan radikal bebas yang akan berpengaruh pada fungsi sel normal.<sup>15</sup>

Efek sitotoksik selektif dibuktikan oleh Murwani (2000) di mana ekstrak *Scurrulla atropurpurea* mampu melisiskan sel kanker tanpa mempengaruhi sel normal, hal ini menunjukkan potensi lisis terhadap mutasi sel sebelum menjadi ganas dan menyebar ke sel sehat.<sup>12</sup> Hal ini disebabkan karena ekstrak *Scurrulla atropurpurea* meningkatkan sensitivitas sel kanker terhadap TNF- $\alpha$ , sehingga langsung

dikenali oleh sel imun dan dihancurkan. Di lain pihak potensi imunomodulator dibuktikan oleh Fernandez (2003) lewat perbaikan pada DNA limfosit dan sistem kekebalan tubuh.<sup>10</sup> Hargono (1998) memperlihatkan pola perkembangan Ig G yang meningkat setiap minggu pada pemberian *Scurrulla atropurpurea*.<sup>41</sup> Invasifitas kanker dapat ditekan oleh *Octadeca-8,10,12-trynoic acid* dan *Epigallocatechin-3-o-gallate*. *Octadeca-8,10,12-trynoic acid* juga merupakan inhibitor COX yang cukup poten. Seluruh potensi itu diperkuat dengan angiogenesis inhibitor dari *Epigallocatechin-3-o-gallate*. Jadi, sel sehat yang bermutasi menjadi sel kanker segera dilisiskan, sedangkan sel kanker yang lolos tumbuh ditekan pertumbuhannya melalui berbagai mekanisme baik oleh penekanan suplai nutrisi dan oksigen ke sel kanker, penekanan ekspresi COX-2, pengaturan hormon lewat estrogen maupun modulasi sistem imun, sehingga invasifitas, agresifitas, dan metastasis sel kanker dihambat.<sup>13,14,18</sup>

Peningkatan jumlah AgNOR mencerminkan progresifitas sel neoplastik, dimana sifat dan perangai sel mengalami perubahan menjadi ganas, atau sel kanker yang sudah muncul juga mengalami proses aktifitas proliferasi sel yang berlebihan.<sup>40</sup> Peningkatan aktifitas proliferasi sel pada jaringan yang terinisiasi adalah perubahan yang sangat penting pada stadium awal dari promosi tumor yang merupakan tanda khas lesi prakanker. Deteksi aktifitas proliferasi pada lesi jinak maupun ganas dapat diamati dengan *thymidine uptake*, pelabelan *bromodeoxy-uridine*, sitometrik alur maupun imunohistokimia (misalnya dengan Ki-67, PCNA maupun MIB-1).<sup>37</sup> Hasil perwarnaan AgNOR mempunyai korelasi tinggi dengan sitometrik alur dan pewarnaan imunohistokimia. Variasi jumlah AgNOR dapat membantu menegakkan diagnosis dan

membedakan berbagai tingkatan lesi. Penelitian ini menunjukkan bahwa hitung AgNOR pada mencit yang diinduksi karsinogenesis akan mengalami peningkatan yang signifikan dibanding kelompok yang mendapat *Scurrulla atropurpurea*.

Studi karsinogenesis pada kolon tikus wistar yang dilakukan oleh Aswiyanti terdapat perbedaan jumlah hitung AgNOR pada kolon tikus wistar kontrol dengan perlakuan. Kolon tikus wistar yang mendapat diet seledri mempunyai hasil hitungan lebih rendah dibandingkan kolon tikus wistar yang tidak mendapatkan diet seledri walaupun pada kolon tersebut belum timbul keganasan/adenokarsinoma. Sedangkan pada studi hubungan antara hitung AgNOR dan *grading* histopatologi pada karsinoma mammae oleh Padi menyatakan ada hubungan antara jumlah hitung AgNOR dengan *grading* histopatologi semakin tinggi *grading* histopatologik karsinoma mammae akan semakin tinggi jumlah hitung AgNOR.<sup>40,42</sup>

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka terbukti bahwa *Scurrulla atropurpurea* memiliki potensi profilaksis dan kuratif terhadap proses karsinogenesis nasofaring yang ditandai dengan perbaikan skor histopatologik dan penurunan jumlah AgNOR.

Keterbatasan penelitian ini adalah; 1) pengukuran dosis induksi karsinogenesis yang memapar mukosa nasofaring tidak dapat dipastikan, karena keterbatasan alat (tidak tersedia dosimeter untuk mencit), 2) *prone lesion* keganasan nasofaring di *fossa Rosenmuller* pada mencit, tidak bisa dilokalisasi secara akurat, 3) studi ini tidak memperlihatkan *dose effect relationship* dari *Scurrulla atropurpurea* terhadap proses profilaksis dan kuratif.

## **BAB 6**

### **SIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1 SIMPULAN**

Pemberian ekstrak daun dan batang *Scurrulla atropurpurea* per oral dengan dosis 1,5 g/kg BB/hari selama 3 minggu sebelum dan sesudah induksi *formaldehyde* menimbulkan pengaruh berbeda bermakna pada perbaikan skor histopatologik epitel mukosa nasofaring mencit C<sub>3</sub>H dan hitung AgNOR, sehingga jelas bahwa *Scurrulla atropurpurea* memberi efek profilaksis maupun kuratif terhadap karsinogenesis nasofaring pada mencit C<sub>3</sub>H. Efek profilaksis *Scurrulla atropurpurea* lebih kuat daripada efek kuratif.

#### **SARAN**

Penelitian yang sama perlu dilakukan dengan mempertimbangkan *dose-effect relationship* untuk *Scurrulla atropurpurea*, dengan memperlama masa induksi *formaldehyde* dan penggunaan dosimeter nasal.

## BAB 7

### DAFTAR PUSTAKA

1. Bailet JW, Mark Rj, Abemayor, Lee SP, Tran LM, Juillard G, Ward PH. Nasopharyngeal carcinoma: treatment result with primary radiation therapy. *Laryngoscope* 1992;102:965-972
2. Witte MC, H. Bryan Nell III. Nasopharyngeal cancer. In: Bailey, Byron J. (eds). *Head and neck surgery otolaryngology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p.1637-53.
3. Kencono WA. Pengaruh vaksinasi BCG dalam meningkatkan respons T helper 1 (Th1) dan respon tumor terhadap radiasi pada karsinoma nasofaring. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya 2001; p.18-36.
4. Kwarditawati M. Survival pasien karsinoma laring di bagian THT RSUP Dr. Kariadi Semarang. Kumpulan naskah KONAS XII PERHATI. Semarang 1999; p.1279-88.
5. Conolly RB, Kimbel JS, Janszen D, Schlosser PM, Kalisak D, Preston J, Miller FJ. Biologically motivated computational modeling of formaldehyde carcinogenicity in the F344 rat. [cited Feb 4, 2006]. Available from URL:[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=12857938&dopt=fulltext](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12857938&dopt=fulltext).
6. U.S. Environmental Protection Agency's Integrated Risk Information System (IRIS) on Formaldehyde. Formaldehyde. [cited Jan, 16, 2006]. Available from URL:<http://www.epa.gov/ngispgm3/iris> on the Substance File List as of March 15, 2000.
7. Gilman, A. G., L. S. Goodman, and A. Gilman. (eds.). Formaldehyde. In: Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 6th ed. New York: Macmillan; 1980.p.971
8. Hawab HM, Nurhidayat Novik, Junaedi II. Peningkatan kandungan selenium dalam seduhan teh daun *S. atropurpurea* (*Scurrulla atropurpurea* BL Danser) oleh fermentasi inokulum *Saccharomyces cerevisiae*. Prosiding Lokakarya dan Seminar Nasional Pengembangan dan Pemanfaatan Obat dari Bahan Tumbuhan. Semarang 2003:229-37.
9. Santosa. Pengaruh pemberian ekstrak *S. atropurpurea* terhadap kanker mamma. Karya Tulis Ilmiah FK Undip. Semarang 1996.
10. Fernandez T, Cerda Zolezzi. Immunobiological features of the galactoside lectin L-Lc isolated from the Argentine mistletoe *Ligaria cuneifolia* 2003. [cited June 17, 2005]. Available from URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?pubmed&cmd=Display&dopt=pubmedpubmed&from\\_uid:12576206](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?pubmed&cmd=Display&dopt=pubmedpubmed&from_uid:12576206).



11. Ohashi K, Winarno H, Mukai M. Indonesian medicinal plants XXV: cancer cell invasion inhibitory effects of chemical constituents in the parasitic plant *Scurrula atropurpurea* (Loranthaceae). Chem Pharm. Bull 2003;51:343-5.
12. Muwarni R. Indonesian tea mistletoe (*Scurrula oortiana*) stem extract increases tumor cell sensitivity to tumour necrosis factor alpha (TNF alpha). Phytotherapy Research. Phytother. Res 2003;17:407-9. [cited June 17, 2005]. Available from URL : <http://www.interscience.wiley.com> .
13. Devehat L, Tomasi S, Fontanel D, Boustie J. Flavonols from *Scurrula ferruginea danser* (Loranthaceae).2002. [cited Feb 4, 2006]. Available from URL:[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Display&doctpubmed\\_pubmed&from\\_uid:12562100](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Display&doctpubmed_pubmed&from_uid:12562100)
14. Mary KT, Giriya K, Ramadasan K. Partial purification of tumour reducing principle from *Helicanthis elasticus* (Fam Loranthaceae).1994. [cited June 17, 2005]. Available from URL:[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Display &doctpubmed\\_pubmed &from\\_uid:801998](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Display &doctpubmed_pubmed &from_uid:801998).
15. Matsunaga K. *Legionella pneumophila* replication in macrophages inhibited by selective immunomodulatory effects on cytokines formation by epigallocatechin gallate, a major substance from of tea catechin. Infect and Immunity 2001;69(6):3947-53
16. Noreen Y, Serrano G, Perera P, Bohlin L. Flavan-3-ols isolated from some medicinal plants inhibiting COX-1 and COX-2catalyzed prostaglandin biosynthesis. 1998. [cited June 17, 2005]. Available from URL:<http://www.fkogserver.bmc.uu.se/info/p1998.html>.
17. Ratna DP. Pengaruh *Ganoderma lucidum* dalam menurunkan derajat histopatologi *adenocarcinoma mammae* mencit C<sub>3</sub>H melalui peningkatan kapasitas ekspresi perforin oleh sel mononuklear. Tesis Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro. Semarang 2003.
18. Leksomono N, Wiratman W, Rubiyanti NS, Prasetyo A. Perbedaan efek profilaksis dan kuratif *S. atropurpurea* (*Scurrulla atropurpurea*) terhadap gambaran histopatologi dan sebaran sel mononuklear pada kelenjar payudara serta proliferasi limfosit di lien mencit C<sub>3</sub>H yang diinokulasi adenokarsinoma mammae. Artikel ilmiah FK Undip. Semarang 2006.
19. Ghozali A, Harijadi. Pewarnaan nucleolar organizer region AgNOR pada perubahan fibrokistik payudara. Berkala Ilmu Kedokteran1997;29(2): 47-51.
20. Prasetyo A, Sulistyio H, Amriyatun. Efek benalu teh (*Scurrulla atropurpurea*) terhadap karsinogenesis nasofaring mencit C<sub>3</sub>H yang terpapar *formaldehyde*. Prosiding Konggres Nasional PERHATI-KL XIV. Surabaya 2007.
21. Olsen JH, Asnaes S. A study of verified cancers and the relation occupational exposure to formaldehyde. Br J Ind Med 1986; 43 (11):769-74.
22. Boysen M. The histopathological evaluation on nasal biopsy of occupationally exposed to formaldehyde workers. Br J Ind Med 1990; 47 (2):116-21.

23. Green DJ. The effect of respirable particles and gaseous formaldehyde on pulmonary physiologic and inflammatory. *J Toxicol Environ Health* 1989; 28 (3):261-75.
24. Edling C. The comparison toxicity effect between formaldehyde and wood dust exposure. *Br J Ind Med* 1998; 45 (11):761-5.
25. Vaughan TL, Stewart Patricia A, Teschke Kay. Occupational exposure to formaldehyde and wood dust and nasopharyngeal carcinoma. *Occup Environ Med.* 2000; 57: 376-84.
26. Martoprawiro SS, Sandhika W, Fauziah D. Aspek patologi tumor THT-KL. Dalam: Naskah lengkap pendidikan kedokteran berkelanjutan III ilmu penyakit THT-KL dalam perkembangan terkini diagnosis dan penatalaksanaan tumor ganas THT-KL. Surabaya 2002.
27. Armstrong RW. Nasopharyngeal carcinoma in Malaysian chinese: occupational exposures to particles, formaldehyde and heat. *Inter Jour of Epid.* 2000; 29: 991-8.
28. Robert KM. Kanker, gen kanker dan faktor pertumbuhan. Dalam: *Biokimia Harper*. Edisi 25. Jakarta: EGC;2003. p.743-53.
29. Besari I, Sulistyowati E, Ishak M. Kimia organik untuk universitas. Edisi I. Bandung: CV. Armico;1982.p.77-132.
30. Mutschler E. Dinamika obat. Dalam: *Buku ajar farmakologi dan toksikologi*. Edisi ke-5. Bandung: Penerbit ITB;1991.p. 611-12.
31. *Anonymous*. Formaldehyde. [cited Dec 22, 2005] Available from URL: <http://www.monographs.iarc.fr/htdocs/monographs/vol88/formal.htm>.
32. Bernstein AC, Bernstein H, Payne CM, Garewal H. Fields defects in progression to adenocarcinoma of colon and esophagus. *Electronic journal of biotechnology* [ serial on the internet ]. 2000 July;3(3). [cited 2004 June 2]. Available from URL: <http://www.bioline.org.br/request/ej00018>.
33. Huff J. Sawmill chemicals and carcinogenesis. *Environ Health Persps.* 2001;109(3):209-11.
34. Roezin A. Food and background of nasopharyngeal cancer patients in Jakarta. *Nasopharyngeal Cancer* 1997;6 (4):249-53.
35. Heritage PL, Underdown BJ, Arsenault AL, Snider DP, McDermott MR. Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:1256-62.
36. Kumar V, Cotran, Robbins SL. Neoplasia. In: *Basic Pathology*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders;1997.p.133-74.
37. Kraus CM, Neszmelyi A, Holly S, Wiedermann B, Nenninger A, Torrsell KB. New acetylenes isolated from the bark of *Heisteria acuminata*. [cited Feb 4, 2006]. Available from URL: <http://www.farmacii.uu.se/-farmakog>
38. Brakenhielm, Ebba. Angiogenesis in obesity and cancer 2003. [cited Feb 4, 2006]. Available from URL:<http://www.diss.kib.ki.se/2003/91-7349-578-6/>

39. Fonseca LM, do Carmo MAV. AgNORS in hyperplasia, papilloma and oral squamous cell carcinoma. Universidade Federal de Minas Gerais. [on line]. 2000 [cited May 4 2002]. Available from URL: [http://www.forp.usp.br/bdj/bdj11\(2\)/t05112.html](http://www.forp.usp.br/bdj/bdj11(2)/t05112.html)
40. Padmi TH. Hubungan antara hitung AgNOR dengan grading histologi pada karsinoma duktus infiltratif payudara. Tesis PPDS-1 Patologi Anatomi FK Undip. Semarang 2002.
41. Hargono D. Penelitian aktivitas biologik infusum benalu eh (*Scurrulla atropurpurea*) (bl) danser terhadap aktivitas sistem imun pada mencit. 1998. [cited Feb 4, 2006] Available from URL: [http://digilib.litbang.depkes.go.id/go.php?id=jkpkbp\\_pk-gdl-grey-1998-djoko-139-benalu](http://digilib.litbang.depkes.go.id/go.php?id=jkpkbp_pk-gdl-grey-1998-djoko-139-benalu)
42. Asri A. Inhibisi aktivitas proliferasi sel dan perubahan histopatologik epithelial mukosa kolon wistar dengan pemberian perasan seledri. Tesis PPDS-1 Patologi Anatomi FK Undip. Semarang 2005.