



**PERBEDAAN AKTIVITAS PROLIFERASI SEL  
MUKOSA NASOFARING  
PADA PEMBERIAN DIVINE KRETEK  
Studi Eksperimental Laboratorik pada Mencit C3H  
yang Diinduksi Formaldehyde**

**LAPORAN HASIL PENELITIAN  
KARYA TULIS ILMIAH**

**Ditujukan sebagai syarat untuk mengikuti ujian hasil Karya Tulis Ilmiah  
mahasiswa Program Strata-1 Kedokteran Umum**

**RISA ARDIANI  
G2A008158**

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
TAHUN 2012**

**LEMBAR PENGESAHAN LAPORAN HASIL KTI**

**PERBEDAAN AKTIVITAS PROLIFERASI SEL MUKOSA NASOFARING  
PADA PEMBERIAN DIVINE KRETEK  
Studi Eksperimental Laboratorik pada Mencit C3H  
yang Diinduksi Formaldehyde**

Disusun oleh:

**RISA ARDIANI  
G2A008158**

Telah disetujui

Semarang, 1 Agustus 2012

**Penguji**

**Pembimbing**

**Prof. Dr. dr. Suprihati, M.Sc, Sp. THT-KL (K)  
19500621 197703 2 001**

**dr. Awal Prasetyo, M.Kes, Sp.THT-KL  
19671002 199702 1 001**

**Ketua Penguji**

**dr.Fanti Saktini, M.Si.Med  
19810324 201012 2 001**

## PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Yang bertanda tangan ini,

Nama : Risa Ardiani

NIM : G2A008158

Alamat : Jl Bergota no 536, Semarang

Mahasiswa : Program Pendidikan Sarjana Kedokteran Fakultas kedokteran  
UNDIP Semarang.

Dengan ini menyatakan bahwa,

- (a) Karya tulis ilmiah saya ini adalah asli dan belum pernah dipublikasi atau diajukan untuk mendapatkan gelar akademik di Universitas Diponegoro maupun di perguruan tinggi lain.
- (b) Karya tulis ini adalah murni gagasan, rumusan dan penelitian saya sendiri, tanpa bantuan orang lain, kecuali pembimbing dan pihak lain sepengetahuan pembimbing.
- (c) Dalam karya tulis ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dalam naskah dengan disebutkan nama pengarang dan judul buku aslinya serta dicantumkan dalam daftar pustaka.

Semarang, 7 Juli 2012

Yang membuat pernyataan,

Risa Ardiani

## KATA PENGANTAR

Puji syukur dipanjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas Karya Tulis Ilmiah ini. Penulisan Karya Tulis Ilmiah ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Penulis menyadari sangatlah sulit untuk menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak sejak penyusunan proposal sampai dengan terselesaikannya laporan hasil Karya Tulis Ilmiah ini. Bersama ini penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Rektor Universitas Diponegoro Semarang yang telah memberi kesempatan untuk menimba ilmu di Universitas Diponegoro.
2. Dekan Fakultas Kedokteran UNDIP yang telah memberikan sarana dan prasarana sehingga tugas ini dapat diselesaikan dengan baik.
3. dr. Awal Prasetyo, M.Kes, Sp.THT-KL selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk membimbing penulis dalam penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini.
4. Prof. Dr. dr. Sarjadi, Sp. PA (K) yang telah memberi dorongan, bantuan, dan saran dalam proses penyelesaian karya ilmiah ini.
5. dr. Udadi Sadhana, M. Kes, Sp. PA yang telah membantu dalam pembacaan prepat.
6. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (Dirjen Dikti) yang telah membiayai penelitian ini sesuai dengan surat pengumuman PKM-P 2012 No : 0071/E5.3/KPM/2012
7. Ketua bagian Biokimia FK UNDIP dan segenap staf, yang telah membantu penyediaan sarana dan prasarana penelitian ini.
8. Orang tua tercinta Ibunda Susri Surjo Amiranti, Ayahanda Budiarto, serta segenap keluarga yang senantiasa memberikan dukungan moral maupun material.

9. Niken, Widi, Vetty, yang telah bekerjasama dalam pelaksanaan penelitian ini, serta staf Laboratorium Patologi Anatomi yang telah membantu dalam pemrosesan jaringan.
10. Para sahabat yang selalu memberi dukungan dalam menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini.
11. Serta pihak lain yang tidak mungkin disebutkan satu-persatu atas bantuannya secara langsung maupun tidak langsung sehingga Karya Tulis ini dapat terselesaikan dengan baik.

Akhir kata, penulis berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga Karya Tulis Ilmiah ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Semarang, Juli 2012

Penulis

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN.....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR TABEL .....	viii
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
DAFTAR SINGKATAN .....	xi
DAFTAR ISTILAH.....	xii
ABSTRAK .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Permasalahan Penelitian .....	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan umum .....	5
1.3.2 Tujuan khusus.....	5
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
1.5. Keaslian Penelitian .....	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	9
2.1. Karsinoma Nasofaring .....	9
2.2. Induksi <i>Formaldehyde</i> dan Patomekanisme Karsinoma Nasofaring .....	12
2.3. Deteksi Proliferasi Sel dengan Metode AgNOR.....	17
2.4. Kompleksitas Sistem Sel dan Nanobiologi.....	17
2.5. <i>Divine</i> kretek .....	19
BAB 3. KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS....	22
3.1. Kerangka Teori.....	22

3.2. Kerangka Konsep .....	23
3.3. Hipotesis.....	23
BAB 4. METODE PENELITIAN .....	24
4.1. Ruang Lingkup Penelitian.....	24
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian .....	24
4.3. Jenis dan Rancangan Penelitian .....	24
4.4. Sampel Penelitian .....	24
4.4.1 Sampel.....	24
4.4.1.1 Kriteria inklusi .....	24
4.4.1.2 Kriteria eksklusi .....	25
4.4.2 Besar sampel .....	25
4.5. Variabel Penelitian.....	25
4.5.1 Variabel Bebas .....	25
4.5.2 Variabel Tergantung .....	25
4.6. Definisi Operasional Variabel.....	25
4.7. Cara Pengumpulan Data .....	27
4.7.1 Bahan .....	27
4.7.2 Alat .....	27
4.7.3 Jenis Data .....	27
4.7.4 Cara Kerja .....	27
4.8. Alur Penelitian.....	29
4.9. Pengolahan dan Analisa Data.....	30
4.10. Etika Penelitian.....	30
4.11. Jadwal Penelitian .....	31
BAB 5. HASIL PENELITIAN.....	32
BAB 6. PEMBAHASAN .....	36
BAB 7. SIMPULAN DAN SARAN.....	40
7.1. Simpulan .....	40
7.2. Saran .....	40
DAFTAR PUSTAKA .....	41
LAMPIRAN .....	50

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Keaslian penelitian .....	6
Tabel 2. Jadwal penelitian.....	31
Tabel 3. Skoring jumlah bercak AgNOR.....	33
Tabel 4. Nilai mean dan median jumlah bercak AgNOR per kelompok.....	33
Tabel 5. Uji normalitas skoring jumlah bercak AgNOR .....	34
Tabel 6. Uji Kruskal-Wallis jumlah bercak AgNOR.....	34
Tabel 7. Uji <i>post hoc</i> Mann-Whitney jumlah bercak AgNOR.....	34

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Skema patomekanisme karsinogenesis nasofaring.....	16
Gambar 2. Kerangka teori.....	22
Gambar 3. Kerangka konsep.....	23
Gambar 4. Alur penelitian.....	29
Gambar 5. Epitel Mukosa nasofaring pada pengecatan AgNOR (1000x).....	35

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Penelitian.....	50
Lampiran 2. Penghitungan bercak AgNOR pada 100 sel (K1 dan K2).....	52
Lampiran 3. Penghitungan bercak AgNOR pada 100 sel (P1 dan P2).....	55
Lampiran 4. Ethical Clearance .....	58
Lampiran 5. Output SPSS .....	59
Lampiran 6. Biodata Mahasiswa .....	62

## DAFTAR SINGKATAN

DNA	: <i>Deoxy nucleic acid</i>
EBV	: <i>Epstein Barr Virus</i>
IARC	: <i>International Agency For Research on Cancer</i>
IPCS	: <i>International Programme on Chemical Safety</i>
IRIS	: <i>Integrated Risk Information System (US)</i>
KNF	: <i>Karsinoma Nasofaring</i>
NOR	: <i>Nucleolar Organizer Region</i>
ppm	: <i>Part per million</i>
rDNA	: <i>Ribosomal Deoxy nucleic acid</i>
RNA	: <i>Ribonucleic acid</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

## DAFTAR ISTILAH

Interaksi *spin* (*spin-spin interaction*) : interaksi antara momen spin magnetik pada mikropartikel

**PERBEDAAN AKTIVITAS PROLIFERASI SEL MUKOSA  
NASOFARING PADA PEMBERIAN DIVINE KRETEK  
Studi Eksperimental Laboratorik pada Mencit C3H  
yang Diinduksi Formaldehyde**  
Risa Ardiani<sup>1</sup>, Awal Prasetyo<sup>2</sup>

**ABSTRAK**

**Latar Belakang:** Nanobiologi adalah metode yang potensial yang dapat digunakan untuk pengobatan kanker. Salah satu contoh produk yang berprinsip pada konsep nanobiologi di Indonesia adalah *divine* kretek. *Divine* kretek mengandung partikel berukuran nano yang memiliki densitas elektron tinggi, sehingga dapat mendonasikan elektron. Elektron-elektron ini diharapkan mampu mendorong perbaikan sel sakit, dan mendorong sel sehat untuk mengoptimalkan diri.

**Tujuan:** Membuktikan dan membandingkan potensi preventif dan kuratif *divine* kretek dalam proses karsinogenesis nasofaring (meliputi aktivitas proliferasi sel) pada mencit C3H.

**Metode:** Penelitian eksperimental dengan *post test only control group design*, menggunakan 20 ekor mencit strain C3H. Mencit dibagi menjadi empat kelompok, kelompok K1 diinduksi formalin dan diberi paparan asap rokok kretek biasa selama 18 minggu; kelompok K2 diinduksi formalin, dilanjutkan pemaparan asap rokok kretek biasa selama 9 minggu berikutnya; kelompok P1 diinduksi formalin dan diberi paparan asap *divine* kretek selama 18 minggu; kelompok P2 diinduksi formalin, dilanjutkan pemaparan asap *divine* kretek selama 9 minggu berikutnya. Di akhir penelitian, nasofaring mencit diproses dan diperiksa, untuk dinilai aktivitas proliferasi selnya.

**Hasil:** Uji Kruskal-Wallis terhadap variabel jumlah bercak AgNOR adalah bermakna ( $p=0,021$ ). Uji Mann-Whitney terhadap variabel jumlah bercak AgNOR antara K1 vs P1 ( $p=0,018$ ) dan P1 vs P2 ( $p=0,017$ ) juga bermakna, namun antara K2 vs P2 tidak berbeda ( $p=0,065$ ).

**Kesimpulan:** Paparan asap *divine* kretek selama induksi formalin menimbulkan pengaruh berbeda bermakna pada penurunan aktivitas proliferasi sel epitel mukosa nasofaring mencit C3H. Namun, paparan asap *divine* kretek sesudah induksi tidak terdapat perbedaan. Efek preventif paparan asap *divine* kretek lebih kuat daripada efek kuratif.

**Kata kunci:** *Divine* Kretek, formalin, proliferasi sel, AgNOR

<sup>1</sup> Mahasiswa program pendidikan S-1 kedokteran umum FK Undip

<sup>2</sup> Staf pengajar Bagian Patologi Anatomi FK Undip

**DISPARITY OF CELL PROLIFERATION ACTIVITY ON  
NASOPHARYNGEAL MUCOUS WITH DIVINE CIGARETTE  
Laboratoric Experimental Study on Formaldehyde Induced  
C3H Mice**

Risa Ardiani<sup>1</sup>, Awal Prasetyo<sup>2</sup>

**ABSTRACT**

**Background:** Nanobiology is a potential methode which can be used to treat cancer. The example of nanobiology product in Indonesia is divine cigarette. Divine cigarette contains nano sized particles which have high electron dense, therefore they will have capacity to donate electron. These nanoparticles will induce sick cell to repair it self, and optimize normal cell.

**Objectives:** This study was aimed to prove and compare curative and preventive potency of divine cigarette in nasopharyngeal cancer (based on cell proliferationactivuty) on C3H mice.

**Methods:** This was a laboratory study with post test only controlled group design, using 32 C3H mice as sample, which are divided into four groups; Control group 1 (K1) was exposed to formaline, and smoke of standard cigarette for 18 weeks; Control group 2 (K2) was exposed to formaline for nine weeks then followed with exposure of standard cigarette smoke for nine weeks; Treatment P1 group was exposed to formaline, and smoke of divine cigarette for 18 weeks; Treatment P2 group was exposed to formaline for nine weeks then followed with exposure of standard cigarette smoke for nine weeks. In the end of the research, nasopharyng tissue was processed and examined to determine the activity of cell proliferation.

**Result:** The Kruskal-Wallis test for AgNOR count was significantly different ( $p=0,021$ ). The Mann-Whitney test for AgNOR count between K1 vs P1 ( $p=0,018$ ) and P1 vs P2 ( $p=0,017$ ) were also significantly different, but between K2 vs P2 was not different ( $p=0,065$ ).

**Conclusion:**The exposure of divine cigarette smoke that given together with formaline induction had significant effect on AgNOR count. However, the exposure of divine cigarette after formaline induction did not have significant effect. The preventive effect of divine cigarette was stronger than its curative effect .

**Keywords:** Divine cigarette, formaline, cell proliferation, AgNOR

<sup>1.</sup> Student of faculty of medicine Diponegoro University

<sup>2.</sup> Teaching staff of Pathological Anatomy Department of faculty of medicine Diponegoro University

## BAB 1.

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan keganasan epitel kepala leher yang paling sering didapatkan, dan biasanya berkembang di sekitar *ostium tuba Eustachii* yang berada di dinding lateral nasofaring.<sup>1</sup> KNF mempunyai perangai berbeda dibandingkan dengan keganasan pada kepala leher yang lain, karena sifatnya yang sangat invasif dan sangat mudah bermetastasis.<sup>2</sup>

Kanker jenis ini jarang ditemukan pada kulit putih. Namun, di Asia angka kejadian KNF cukup tinggi, terutama di Cina Selatan dan Asia Tenggara dengan insiden antara 10-53 kasus per 100.000 penduduk per tahun.<sup>1,3</sup> Di Indonesia angka kejadian KNF adalah 5,68 kasus per 100.000 penduduk per tahun. Perbandingan antara pria dan wanita sebesar 2-3:1, 80% pasien terdiagnosis pada umur 30–59 tahun dan sudah pada stadium lanjut.<sup>2</sup>

*World Health Organization* (WHO) menggolongkan KNF menjadi tiga kriteria berdasarkan diferensiasi sel, yaitu tipe 1 (*Keratinizing Squamous Cell Carcinoma*), tipe 2 (*non-Keratinizing carcinoma*) dan tipe 3 (*undifferentiated carcinoma*).<sup>4</sup> KNF WHO tipe 3 menempati prosentase tertinggi dibanding dua tipe lainnya. Studi terdahulu menyebutkan bahwa KNF adalah kanker terbanyak di kepala dan leher berdasarkan diagnosis histopatologi di RSUP Dr. Kariadi tahun 2001-2005, dimana tipe histopatologis WHO 3 paling sering ditemukan.<sup>4</sup>

Etiologi dari kejadian KNF endemik merupakan kombinasi dari infeksi virus Epstein Barr (EBV), genetik, dan faktor lingkungan, termasuk berbagai

bahan karsinogenik.<sup>3,5</sup> Salah satu bahan karsinogenik yang telah diketahui dapat menimbulkan KNF adalah *formaldehyde*. Studi epidemiologi yang dilakukan oleh *International Agency For Research on Cancer (IARC)* membuktikan bahwa terdapat bukti yang kuat bahwa *formaldehyde* menyebabkan kanker nasofaring pada manusia.<sup>6</sup>

Kerns (1983) membuktikan bahwa terjadi tumor nasal (44 %) pada tikus F344 yang dipapar uap *formaldehyde* 14,3 ppm selama 24 bulan.<sup>7,8</sup> Kemudian, Conolly (2003) mengembangkan model karsinogenesis traktus respiratorius bagian atas (kavum nasi & nasofaring) pada tikus F344 yang dipapar hirupan uap *formaldehyde* secara kronik selama 6 minggu, sehingga terjadi karsinoma sel skuamosa kavum nasi.<sup>9</sup> Prasetyo, dkk (2008) memodifikasi model karsinogenesis Conolly, dan membuktikan bahwa paparan *formaldehyde* pada mencit C3H dapat menimbulkan keganasan pada nasofaring.<sup>10</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, akibatnya mukosa lebih peka terhadap karsinogen lain. Sifat merusak *formaldehyde* terletak pada CO atau aldehide yang bereaksi dengan gugus amina pada protein tubuh. Reaksi ini menghasilkan metenamin atau heksametilentetramin, yang dapat bereaksi dengan DNA, dan memicu terjadinya mutasi DNA. Jika sisi aktif dari protein-protein dalam tubuh dimatikan oleh *formaldehyde*, maka molekul-molekul itu akan kehilangan fungsi dalam metabolisme.<sup>9,11</sup> Disamping itu *formaldehyde* juga

memiliki peranan dalam pembentukan radikal bebas oksigen dan nitrogen dalam tubuh.<sup>12</sup>

Penggunaan merkuri sebagai katalisator dalam produksi *formaldehyde* menyebabkan radikal bebas ini masih terkandung dalam *formaldehyde*.<sup>13</sup> Merkuri diyakini sebagai penyebab masalah kesehatan utama karena memiliki kecenderungan membentuk senyawa biradikal serta mudah mengalami transisi elektron dan teraktifkan untuk membentuk berbagai gangguan terhadap sistem kehidupan.<sup>14</sup>

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%, dan untuk 10 tahun menurun menjadi kurang dari 30%.<sup>11</sup> Di kepala dan leher, reseksi bedah dibatasi oleh beberapa struktur penting yang berdekatan seperti mata, arteri karotis dan otak. Karena sisa kanker dapat tertinggal di dekat struktur vital atau telah menyebar ke luar margin bedah sehingga diperlukan terapi ajuvan untuk mencapai penyembuhan kanker yang tertinggal. Terapi radiasi memiliki tingkat kegagalan yang tinggi untuk tumor stadium lanjut, dan toksisitasnya membatasi dosis yang dapat diberikan pada tiap siklus pengobatan. Kemoterapi pada kanker kepala dan leher terbatas pada peran terapi kombinasi dengan radiasi.<sup>15</sup>

Nanobiologi adalah metode yang potensial yang dapat digunakan untuk pengobatan kanker. Nanobiologi merupakan disiplin ilmu baru, yang dapat merevolusi dunia kesehatan. Metode ini menggabungkan alat, ide dan bahan nanosains biologi untuk menangani masalah-masalah biologi yang dapat dipelajari

dan diselesaikan dalam nanoteknologi. Caranya dengan merancang dan membangun perangkat molekul menggunakan biomakromolekul, dan berupaya untuk membangun mesin molekuler yang memanfaatkan konsep alam.<sup>16</sup>

Salah satu contoh produk yang berprinsip pada konsep nanobiologi di Indonesia adalah *divine* kretek. Pengembangan *Divine* kretek didasarkan pada pemikiran bahwa berbagai masalah kesehatan dapat terjadi akibat radikal bebas khususnya atom-atom logam berat seperti merkuri. *Divine* kretek berisi nanostruktur yang kompleks yang dapat menghantarkan elektron sampai ke level miliVolt.<sup>17</sup> Hal ini dapat bermanfaat untuk mengikat dan membuang radikal bebas (berbentuk nano partikel) di dalam dan di luar sel, sehingga menjadi lebih bersih. Kemudian, partikel nano dapat memberi energi dan elektron pada sel sakit untuk mendorong perbaikan diri sel sehat, untuk mengoptimalkan diri.<sup>18</sup>

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan dan membandingkan potensi preventif dan kuratif *divine* kretek dalam proses karsinogenesis nasofaring (meliputi aktivitas proliferasi sel) pada mencit C3H yang dipapar *formaldehyde* menurut metode Conolly yang dimodifikasi. Aktivitas proliferasi sel diketahui dengan pengecatan AgNOR. 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 *tumour behavior*. Peningkatan dan perbaikan teknik pengecatan AgNOR telah menjadikan AgNOR lebih terstandarisasi, reliabel, sederhana dan cepat.<sup>19</sup>

## 1.2 Permasalahan Penelitian

Apakah terdapat perbedaan aktivitas proliferasi sel mukosa nasofaring mencit C3H yang diinduksi *formaldehyde* antara yang diberi *divine* kretek dibandingkan dengan yang diberi kretek biasa?

## 1.3 Tujuan

### 1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan perbedaan aktivitas proliferasi sel mukosa nasofaring mencit C3H yang diinduksi dengan *formaldehyde* antara yang diberi *divine* kretek dibandingkan dengan yang diberi kretek biasa.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

- 1) Menilai aktivitas proliferasi sel mukosa nasofaring mencit C3H yang diberi *divine* kretek selama diinduksi *formaldehyde*.
- 2) Menilai aktivitas proliferasi sel mukosa nasofaring mencit C3H yang diberi *divine* kretek sesudah diinduksi *formaldehyde*.
- 3) Mengevaluasi perbedaan aktivitas proliferasi sel mukosa nasofaring mencit C3H yang diberi *divine* kretek selama dan sesudah diinduksi *formaldehyde*.

## 1.4 Manfaat Penelitian

- 1) Memberi informasi mengenai kemampuan *divine* kretek dalam menghambat karsinogenesis nasofaring.
- 2) Sebagai dasar pengembangan alternatif pengelolaan KNF.
- 3) Memberi landasan teoritik bagi penelitian selanjutnya.

## 1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1. Keaslian penelitian

No.	Peneliti	Judul	Metode	Hasil
1	Sumitro B.S., dkk <sup>20</sup>	<i>Overcoming Cigarette for Health without Altering the Flavor.</i> Malang: Universitas Brawijaya.	Penelitian eksperimental dengan melakukan paparan asap <i>divine</i> kretek pada tikus dan mencit.	Berat badan tikus dan mencit yang dipapar asap <i>divine</i> lebih stabil dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak diberi paparan asap <i>divine</i> .
2	Ivan H. El – Sayed <sup>15</sup>	<i>Nanotechnology in Head and Neck Cancer : The Race Is On.</i> Dalam jurnal Curr Oncol Rep, tahun 2010, volume 12, halaman 121-128.	Penelitian eksperimental pada mencit secara in vivo. Mencit diinduksi dengan sel kanker kepala dan leher lalu diterapi dengan nanopartikel emas dan radiasi dengan tehnik fototermal. Hasil terapi dibandingkan dengan mencit yang hanya diterapi radiasi.	Mencit yang diterapi dengan nanopartikel emas dan fototermal memiliki 1 year survival rate yang lebih tinggi daripada mencit yang hanya diterapi dengan radiasi.

No.	Peneliti	Judul	Metode	Hasil
3	Awal Prasetyo dkk <sup>10</sup>	Efek Benalu Teh ( <i>Scurrulla Atropurpurea</i> ) terhadap Karsinogenesis Nasofaring Mencit C3H yang Terpapar <i>Formaldehyde</i>	Penelitian eksperimental laboratorik dengan the post test only control group design dengan 41 mencit C3H sebagai sampel. Variabel bebas : Efek Benalu Teh ( <i>Scurrulla Atropurpurea</i> ). Variabel tergantung: Karsinogenesis Nasofaring	Ekstrak <i>S.atropurpurea</i> menimbulkan pengaruh berbeda bermakna pada perbaikan skor histopatologik epitel mukosa nasofaring mencit C3H. Efek profilaksis <i>S. atropurpurea</i> lebih kuat daripada efek kuratif.
4	Hidayat Sulistyono <sup>11</sup>	Inhibisi Aktivitas Proliferasi Sel dan Perubahan Histopatologik Epitelial Mukosa Nasofaring Mencit C3H dengan Pemberian Ekstrak Benalu Teh. Semarang: Universitas; 2008.	Penelitian eksperimental laboratorik dengan post test only control group design, menggunakan 15 mencit C3H sebagai sampel. Variabel bebas: benalu teh. Variabel tergantung: Aktivitas proliferasi sel dan Perubahan Histopatologik.	Ekstrak <i>S.atropurpurea</i> menimbulkan pengaruh berbeda bermakna pada perbaikan skor histopatologik dan aktivitas proliferasi sel epitel mukosa nasofaring mencit C3H dengan profilaksis lebih kuat daripada efek kuratif.

No.	Peneliti	Judul	Metode	Hasil
5	Lanceria Sijabat <sup>19</sup>	Pengaruh Pemberian Ekstrak <i>Sponge haliclona Sp</i> terhadap Aktivitas Proliferasi Sel dengan Metode hitung jumlah bercak AgNOR Pada Sel Adenocarcinoma Mammae Mencit C3H. Semarang: Universitas Diponegoro; 2009.	Penelitian eksperimental Post Test Only Control Group Design dilakukan pada dua puluh mencit C3H yang dibagi secara random menjadi empat kelompok. Variabel bebas: Ekstrak <i>Sponge haliclona Sp</i> Variabel tergantung: Aktivitas Proliferasi Sel dengan Metode Hitung jumlah bercak AgNOR.	Ekstrak <i>Sponge haliclona sp</i> tidak terbukti secara bermakna menghambat aktivitas proliferasi sel dengan metode hitung jumlah bercak AgNOR pada sel adenocarcinoma mammae mencit C3H

Penelitian mengenai perbedaan aktivitas proliferasi sel mukosa nasofaring mencit C3H yang diinduksi *formaldehyde* pada pemberian *divine* kretek belum pernah dilakukan sebelumnya. Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium yang menggunakan mencit C3H sebagai hewan coba. Variabel bebas yang digunakan adalah pengasapan *divine* kretek, pengasapan kretek biasa, dan induksi karsinogenesis nasofaring dengan *formaldehyde*. Sedangkan variabel tergantung yang digunakan adalah aktivitas proliferasi sel epitel mukosa nasofaring dengan metode hitung jumlah bercak AgNOR.

## BAB 2.

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Karsinoma Nasofaring

Karsinoma nasofaring (KNF) adalah tumor ganas yang berasal dari sel – sel epitel yang melapisi permukaan nasofaring.<sup>21</sup> KNF sering tumbuh di dinding lateral nasofaring, termasuk *Fossa Rosenmuller* yang merupakan daerah transisional dimana epitel kuboid berubah menjadi epitel skuamosa. Kemudian KNF dapat menyebar ke ke sisi dinding lateral lain, posterosuperior, dasar tengkorak, palatum, hidung, dan orofaring.<sup>22</sup>

Penyebab KNF adalah kombinasi dari infeksi virus Epstein Barr (EBV), faktor lingkungan, dan genetik.<sup>3,5,23</sup> Ketiga faktor tersebut saling berinteraksi dan memicu inisiasi dan perkembangan kanker.<sup>23</sup> Salah satu bahan karsinogenik yang telah diketahui dapat menimbulkan KNF adalah *formaldehyde*. Studi epidemiologi yang dilakukan oleh IARC membuktikan bahwa terdapat bukti yang kuat bahwa *formaldehyde* menyebabkan kanker nasofaring pada manusia.<sup>6</sup> *US Environmental Protection Agency's Integrated Risk Information System (IRIS) on Formaldehyde* menyatakan adanya hubungan yang bermakna antara KNF dan *formaldehyde*.<sup>11</sup>

Secara global, kasus KNF jarang ditemukan, di negara maju terjadi sekitar 0,6 kasus per 100.000 penduduk per tahun pada pria, dan 0,2 kasus per 100.000 kasus per tahun pada wanita. Sedangkan di negara berkembang ditemukan sekitar 2,1 kasus per 100.000 penduduk per tahun pada pria, dan 1,0 kasus per 100.000 penduduk per tahun pada wanita.<sup>24</sup> Namun di Cina Selatan, Afrika Utara, Kanada, Alaska, dan Asia

Tenggara, mencakup Thailand, Vietnam, Filipina, Malaysia, dan Indonesia jenis keganasan ini sangat sering dijumpai.<sup>25,26</sup> Rata-rata didapatkan 65.000 kasus baru, dan 38.000 angka kematian akibat KNF pada tahun 2000.<sup>26</sup>

Insidensi tertinggi KNF ditemukan di Hongkong, dimana 1 dari 40 pria akan menderita KNF sebelum usia 75 tahun.<sup>26</sup> Dari penelitian terbaru didapatkan data insidensi KNF di Hong Kong adalah 20-30 kasus per 100.000 penduduk per tahun pada pria, dan 15-20 kasus per 100.000 penduduk per tahun pada wanita.<sup>27</sup>

Angka kejadian di Indonesia adalah 5,68 kasus per 100.000 penduduk per tahun. Perbandingan antara pria dan wanita sebesar 2-3:1. Sekitar 80% pasien terdiagnosis pada umur 30–59 tahun dan sudah pada stadium lanjut.<sup>2</sup>

Di samping Cina Selatan dan Asia Tenggara, insidensi tinggi juga ditemukan di Afrika Utara dan Alaska.<sup>27</sup> Insidensi KNF pada penduduk Eskimo di Alaska, Greenland dan Tunisia adalah sebanyak 15-20 kasus per 100.000 penduduk per tahun.<sup>1</sup> Di Eropa dan Amerika Utara angka kejadian KNF sangat rendah yaitu kurang dari 1 kasus per 100.000 penduduk.<sup>29</sup>

Akibat dari lokasi anatomi yang berada dalam nasofaring, KNF menjadi salah satu penyakit yang paling sulit didiagnosa pada stadium awal. Sekitar setengah dari pasien KNF menunjukkan beberapa gejala, tapi terdapat 10% penderita yang asimtomatik.<sup>26</sup> Beberapa gejala seperti post-nasal drip dengan bercak darah, obstruksi hidung, sputum dengan bercak darah, tinnitus, dan kurang pendengaran akan timbul pada stadium awal.<sup>23,26</sup> Gejala yang timbul akibat obstruksi tuba Eustachii (seperti otitis media serosa) juga sering terjadi.<sup>26</sup>

KNF dapat bermetastasis terutama ke kelenjar limfe servikal. Pembesaran kelenjar limfe servikal bagian atas tanpa disertai rasa sakit merupakan gejala yang paling sering ditemukan.<sup>26</sup> Limfonodi jugulodigastrik yang paling sering terkena dampak metastasis KNF, ditemukan membesar pada 50-70% dari keseluruhan pasien.<sup>23</sup>

Metastasis jauh dari KNF dapat terjadi secara limfogen atau hematogen, terutama ditemukan di tulang (48%), paru-paru (27%), hepar (11%) dan kelenjar getah bening supraklavikula (10%). Metastasis sejauh ini menunjukkan prognosis yang sangat buruk, biasanya 90% meninggal dalam waktu 1 tahun setelah diagnosis ditegakkan.<sup>28</sup>

Penegakan diagnosis KNF mencakup: evaluasi klinik untuk melihat ukuran dari limfonodi servikal, nasofaringoskopi indirek untuk menilai tumor primer, pemeriksaan neurologi untuk mengetahui kondisi nervus kranial, CT scan atau MRI dari daerah kepala dan leher sampai di bawah klavikula untuk menilai adanya erosi dasar tengkorak, foto thorax untuk melihat apakah KNF sudah bermatastase ke paru, scintigrafi tulang dengan Tc 99 difosfonat untuk melihat metastase tulang, pemeriksaan darah lengkap, pemeriksaan urea, creatinin, fungsi hati, Ca, PO<sub>4</sub>, dan alkaline phosphatase, pemeriksaan EBV viral kapsid antigen dan EBV DNA, biopsi kelenjar limfe atau tumor primer untuk pemeriksaan jaringan.<sup>21</sup>

Terapi standar KNF adalah radioterapi. Kendala yang dihadapi adalah sebagian besar penderita datang dengan stadium lanjut (stadium III dan IV), bahkan sebagian datang dengan keadaan yang sudah jelek.<sup>30</sup> Pengobatan tambahan yang diberikan dapat berupa diseksi leher, pemberian tetrasiklin, faktor transfer, interferon,

kemoterapi, seroterapi, vaksin dan anti virus. Semua pengobatan tambahan ini masih dalam pengembangan, sedangkan kemoterapi merupakan terapi adjuvant terbaik.<sup>31</sup>

Namun 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>11</sup> Di kepala dan leher, reseksi bedah dibatasi oleh beberapa struktur penting yang berdekatan seperti mata, arteri karotis dan otak. Karena sisa kanker dapat tertinggal di dekat struktur vital atau telah menyebar ke luar margin bedah sehingga diperlukan terapi adjuvan untuk mencapai penyembuhan kanker yang tertinggal. Terapi radiasi memiliki tingkat kegagalan yang tinggi untuk tumor stadium lanjut, dan toksisitasnya membatasi dosis yang dapat diberikan pada siklus pengobatan. Kemoterapi pada kanker kepala dan leher terbatas pada peran terapi kombinasi dengan radiasi.<sup>15</sup>

## **2.2 Induksi *Formaldehyde* dan Patomekanisme Karsinoma Nasofaring**

*Formaldehyde* adalah gas yang mudah terbakar dan tidak berwarna dengan bau yang menyengat. Studi epidemiologi yang dilakukan oleh IARC membuktikan bahwa: terdapat bukti yang kuat bahwa *formaldehyde* menyebabkan kanker nasofaring pada manusia, *formaldehyde* dapat menyebabkan leukemia walaupun belum ada bukti yang cukup kuat, dan beberapa bukti menyebutkan paparan *formaldehyde* menyebabkan kanker sinonasal.<sup>6</sup>

*International Programme on Chemical Safety* (IPCS) melaporkan bahwa paparan uap *formaldehyde* pada tikus jangka pendek dan menengah menyebabkan perubahan histopatologi (seperti hiperplasia, squamous metaplasia, inflamasi, erosi,

ulserasi, *disarrangement*), dan terjadi respon proliferasi di kavum nasi pada konsentrasi  $\geq 3,1$  ppm ( $3.7 \text{ mg/m}^3$ ).<sup>7</sup> Paparan kronis *formaldehyde* pada mencit dengan konsentasi 2 ppm ( $2.5 \text{ mg/m}^3$ ) selama 24 bulan mengakibatkan terjadinya rhinitis berat. Squamous metaplasia, displasia epitel dan seropurulent rhinitis terjadi setelah paparan selama 24 bulan dengan konsentrasi 5.6 ppm ( $6.9 \text{ mg/m}^3$ ).<sup>7</sup> Penelitian lain menyebutkan bahwa paparan uap *formaldehyde* pada tikus dengan konsentrasi 2 ppm selama 2 tahun dilaporkan tidak mengakibatkan tumor. Tumor baru terjadi jika dilakukan paparan dengan konsentrasi  $\geq 10$  ppm.<sup>32</sup> 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>9</sup> Prasetyo, dkk (2008) memodifikasi model karsinogenesis Conolly, dan membuktikan bahwa paparan *formaldehyde* pada mencit C3H dapat menimbulkan keganasan pada nasofaring.<sup>10</sup>

*Formaldehyde* merupakan *pro-carcinogen* yang tidak dapat langsung menimbulkan kanker. Dibutuhkan proses metabolisme terlebih dahulu oleh berbagai enzim tubuh agar menjadi *ultimate-carcinogen*. *Ultimate-carcinogen* memiliki sifat sangat reaktif dalam ikatan dengan DNA, serta dapat menimbulkan reaksi toksik, epoksidasi dan hidroksilasi pada DNA, RNA, protein sel tubuh, dan akhirnya menyebabkan terjadinya mutasi DNA.<sup>11</sup>

*Formaldehyde* sekaligus berperan sebagai *co-carcinogen*. *Formaldehyde* dapat memperbesar (mempromosi) reaktifitas kelompok karsinogen *direct-acting carcinogen* (misalnya; gas mustard, melphalan, benzylchlorida) atau *pro-carcinogen* lain.<sup>11</sup>

Penelitian mengenai toksikinetik dari *formaldehyde* inhalasi telah banyak dilakukan. Lebih dari 90% uap *formaldehyde* diabsorpsi di traktus respiratorius bagian atas. *Formaldehyde* yang telah diabsorpsi ini dapat dioksidasi menjadi format dan karbon dioksida atau dapat digabung menjadi makromolekul biologis.<sup>33</sup> Bila *formaldehyde* 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, serta menyebabkan mukosa kavum nasi dan nasofaring menjadi lebih peka terhadap zat karsinogen.<sup>11</sup>

Waktu paruh *formaldehyde* pada plasma tikus adalah 1 menit. Paparan secara oral akan diekskresikan melalui ginjal dan feses dalam 12 jam. Ekskresi *formaldehyde* lewat urin juga akan terjadi jika ada paparan *formaldehyde* di kulit.<sup>33</sup>

*Formaldehyde*, sebagai salah satu senyawa xenobiotik, akan dimetabolisme atau didetoksikasi oleh hepar melalui dua reaksi, yang bertujuan untuk meningkatkan kelarutan di dalam air sehingga akan mempermudah ekskresi melalui ginjal;

- 1) Fase I, reaksi utamanya berupa hidroksilasi, yang dikatalisis oleh beberapa monooksigenase atau sitokrom P450. Selain reaksi hidroksilasi terdapat beberapa reaksi lainnya seperti deaminasi, dehalogenasi, desulfurasi, epoksidasi, peroksigenasi dan reduksi.<sup>34</sup>
- 2) Fase-2, senyawa yang terhidroksilasi pada fase-1 kemudian dikonversi dengan enzim khusus menjadi beragam metabolit polar dengan konjugasi terhadap asam glukoronat, glutation, asam amino, atau metilasi.<sup>34</sup>

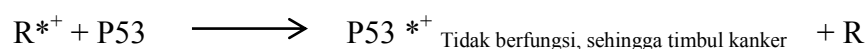
Reaksi xenobiotik ini tidak akan menimbulkan paparan ke sel tubuh, namun apabila gagal maka senyawa xenobiotik ini akan bereaksi dengan sel tubuh melalui ikatan kovalen makromolekul sel (DNA, RNA dan protein). Ikatan kovalen dengan DNA akan mengawali fase inisiasi karsinogenesis, yang dimulai dengan terjadinya mutasi DNA (Gambar 1), dilanjutkan dengan aktifasi proliferasi sel yang terjadi pada awal progresifitas sel normal menjadi sel kanker.<sup>11</sup>

*Formaldehyde* (CH<sub>2</sub>O) juga memiliki peran dalam pembentukan radikal bebas oksigen dan nitrogen di dalam tubuh.<sup>12</sup> Disamping itu, radikal bebas merkuri telah terbukti mengkontaminasi *formaldehyde*. Hal ini terjadi akibat dari penambahan merkuri sebagai katalisator selama produksi *formaldehyde*.<sup>13</sup> Radikal bebas sendiri adalah suatu senyawa aktif dalam fase gas dan bermuatan listrik. Senyawa ini memiliki manfaat untuk proses kehidupan, namun dalam keadaan berlebihan dapat mengganggu dan menyebabkan berbagai penyakit, dengan proses sebagai berikut:<sup>17</sup>

1) Otak dan saraf:



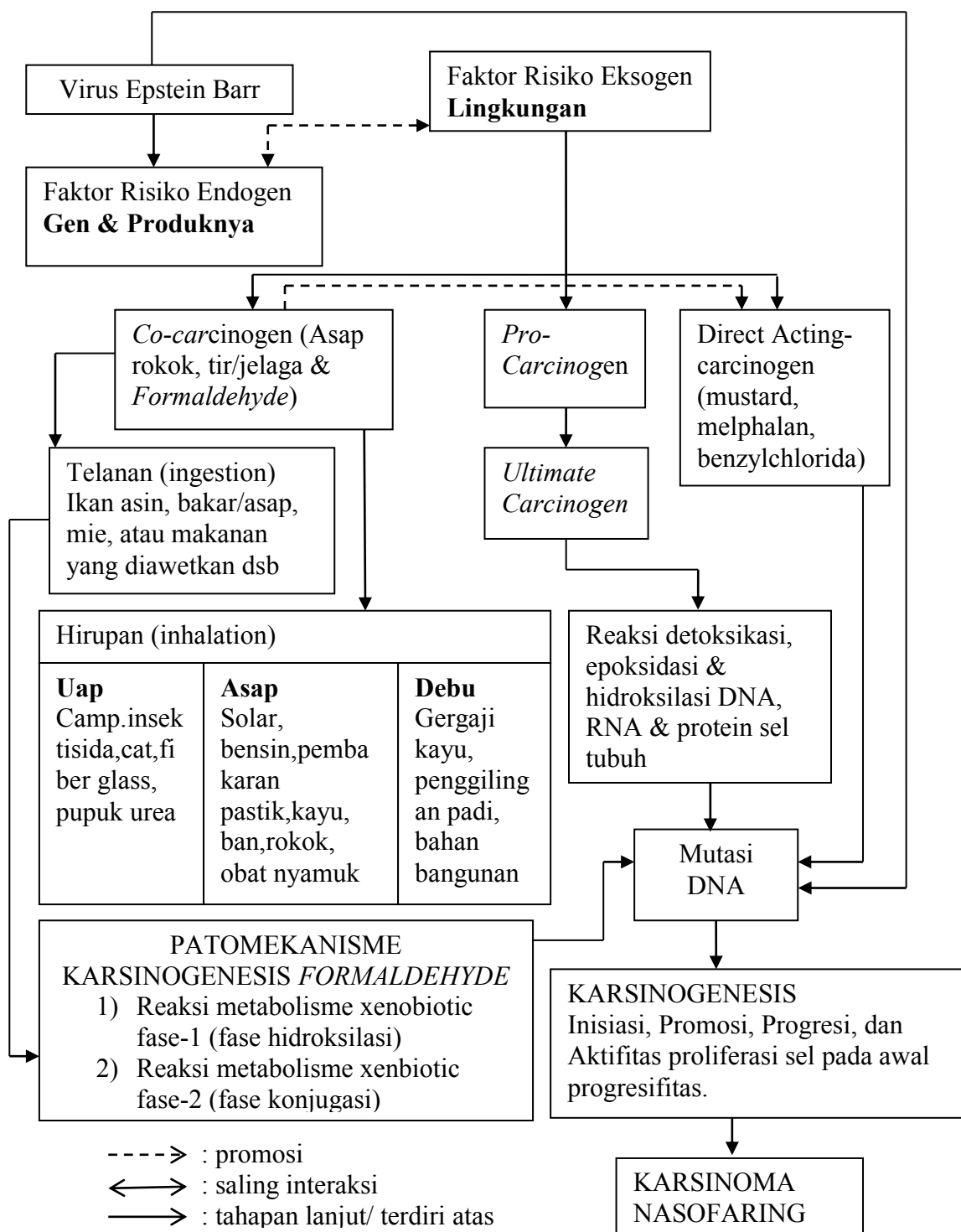
2) Protein pengendali pertumbuhan jaringan (P53):



3) Virus penyakit:



Beberapa jurnal mengenai toksisitas *formaldehyde* menyebutkan bahwa *formaldehyde* dapat mempengaruhi homeostasis nitrosothiol. Nitrosothiol selama ini dikaitkan dengan regulasi EBV dan virus yang lainnya. Sehingga, *formaldehyde* diduga mempengaruhi reaktivasi EBV dan juga mempengaruhi masa laten EBV untuk meningkatkan potensi transformasi sel epitel.<sup>35</sup>



Gambar 1. Skema patomekanisme karsinogenesis nasofaring<sup>11</sup>

### **2.3 Deteksi Proliferasi Sel dengan Metode AgNOR**

*Nucleolar Organizer Region* (NOR) merupakan lengkung DNA yang menempati area khusus dalam kromosom 13, 14, 15, 21, dan 22 yang diketahui sebagai tempat gen ribosomal DNA (rDNA). NOR berperan penting dalam sintesis protein, membantu menjaga perpanjangan konfigurasi DNA, dan mengatur transkripsinya.<sup>36</sup>

Visualisasi NOR dengan menggunakan pewarnaan perak diperkenalkan oleh Ploton dkk pada tahun 1986 yang kemudian dimodifikasi oleh Ofner dkk tahun 1994 dengan menambahkan formalin untuk fiksasi.<sup>37</sup> Untuk melakukan skoring jumlah deposit perak pada teknik ini digunakan metode-metode berbeda. Metode yang paling sering digunakan adalah dengan menghitung secara manual jumlah titik perak intra nuklear per sel pada setidaknya 100 sel dengan menggunakan mikroskop cahaya. Metode lain yang lebih mutakhir adalah dengan menghitung total area deposit perak dengan bantuan komputer.<sup>19</sup>

### **2.4 Kompleksitas Sistem Sel dan Nanobiologi**

Semenjak Rudolf Virchow mengemukakan teori sel, terjadi pergeseran fokus para pakar biologi dari organisme ke sel dengan berbagai struktur dan fungsinya tanpa memperhatikan bagaimana koordinasi aktivitas sel dan bagaimana mengintegrasikannya ke dalam keseluruhan fungsi sel. Seluruh fungsi biologi dijelaskan berdasarkan struktur dan mekanisme molekul, serta pola genetik dipetakan dengan huruf dan angka tapi tidak dipahami bagaimana cara komunikasi dan kerjasama antara angka dan huruf tersebut.

Eksplorasi lanjut tentang atom dan subatom tidak cukup menjelaskan hubungan atom dan sub atom itu sendiri dalam sel. Sifat organisme atau sel adalah suatu kesatuan yang utuh, tidak akan dapat dimengerti hanya dengan mempelajari masing-masing bagian secara terpisah.

Sistem dalam hidup, merupakan sistem yang terbuka dan dinamik, yang secara berkelanjutan merawat sel untuk mencapai kondisi optimum. Hal ini terjadi akibat interaksi di dalam sel dan atau dengan lingkungan dalam berbagai sistem yang independen untuk mencapai homeostatis.

Tubuh manusia sendiri terdiri dari 4 juta triliun atom yang mengikuti sifat aliran listrik. Sifat aliran listrik, antara lain: muatan listrik, voltage, tegangan listrik, aliran listrik, medan listrik, dan tahanan. Sifat tersebut membuat jaringan dapat menerima, mendorong, mengirim getaran atau gelombang, seperti elektrik, akustik, magnetik, mekanik, dan thermal.

Sel mempunyai kemampuan mengatur elektrisitas dan membentuk elektromagnetik yang berfungsi sebagai generator. Pada tubuh elektrisitas dilaksanakan oleh pembawa muatan yang aktif bergerak, yaitu:

- 1) Bermuatan negatif : elektron dan anion, terutama fosfat.
- 2) Bermuatan positif: Ion Hidrogen, Na, K, Ca.

Karena setiap proses biologik juga merupakan proses elektrik, maka sehat dan sakit pun berhubungan dengan aliran bio-elektrik tubuh. Pemanfaatan nanobiologi melalui *divine* kretok dalam pengobatan berbagai macam penyakit termasuk kanker adalah dengan memberi energi dan elektron pada sel sakit, untuk mendorong perbaikan diri sel sehat, dan mengoptimalkan diri. Terapi dengan *divine* kretok juga

dapat mengikat dan membuang radikal bebas (yang berbentuk nano partikel) di dalam dan di luar sel, sehingga menjadi lebih bersih.<sup>18,38</sup>

## **2.5 *Divine kretek***

Asap rokok sering dinilai sebagai penyebab berbagai masalah kesehatan karena dapat menimbulkan berbagai penyakit fisiologis maupun genetik. Kandungan asap rokok termasuk kretek adalah komponen kimiawi yang jenisnya dapat mencapai 4000 bahan campuran dan dalam analisis kimia dilaporkan telah teridentifikasi sedikitnya 50 jenis karsinogen.<sup>39</sup>

Komponen-komponen kimia yang terdapat dalam asap rokok terbukti membentuk partikulasi antara 1 sampai 10.000 nanometer (nm) yang terbentuk dari gabungan senyawa organik dalam asap. Senyawa-senyawa tersebut memiliki potensi gaya magnetik dan elektromagnetik, sehingga komponen-komponen kimia khususnya yang bersifat aromatik di ujung batang rokok yang bersuhu 400-600°C dapat membentuk partikel (polimer). Pembentukan polimer gabungan secara teoritis akan membentuk sifat gabungan yang berbeda dengan sifat masing-masing yang berbahaya. Inilah yang menjadi pandangan awal, bahwa kandungan asap kretek tidak dapat langsung dihubungkan dengan kesehatan sistem biologis pada umumnya.

Rokok kretek adalah rokok khas Indonesia yang berbeda dengan rokok dan cerutu yang sudah banyak diteliti di Barat. Belum pernah ada penelitian yang komprehensif secara khusus ditujukan untuk menakar dampak rokok kretek ini. Diduga kuat, efek asap rokok yang timbul terjadi akibat radikal bebas dari pembakaran tidak sempurna dan keberadaan merkuri dalam tembakau dan lingkungan.<sup>14,40</sup>

Sifat merkuri cenderung membentuk senyawa biradikal dan memiliki wilayah medan gaya sangat besar dan terus-menerus sehingga dapat membesar dalam bentuk gas. Ditambah lagi saat ini intensitas sinar Ultraviolet (UV) matahari jenis C yang semakin intensif sampai ke permukaan bumi akibat dari adanya kerusakan lapisan ozon di lapisan atas atmosfer. Akibat dari peningkatan intensitas UVC ini merkuri menjadi sangat mudah mengalami transisi elektron dan teraktifkan untuk membentuk berbagai inisiatif gangguan terhadap sistem kehidupan di bumi. Sehingga diyakini masalah kesehatan utama terjadi radikal bebas khususnya atom-atom logam berat seperti merkuri dan bukannya senyawa-senyawa organik dalam asap rokok.

Logam berat merkuri berperan dalam proses karsinogenesis dengan cara meningkatkan stress oksidatif, sehingga terjadi kerusakan DNA yang kemudian akan mempromosi terjadinya kanker. Mekanisme utama dari toksisitas merkuri adalah dengan deplesi glutation dan kemampuan merkuri untuk berikatan dengan gugus sulfhidril di protein. Kerusakan ikatan sulfida yang diakibatkan merkuri dapat mengubah sifat biologis protein dan juga mengubah fungsi fisiologis protein tersebut.<sup>41</sup>

*Divine* kretek dibuat dengan menghilangkan radikal bebas terutama unsur logam berat seperti merkuri dalam kretek. Setelah radikal bebas dapat dijinakkan dalam asap, keberadaan partikel yang merupakan polimer gabungan komponen organik diperkirakan cenderung menyehatkan. Partikel-partikel tersebut dapat berpeluang memberdayakan energi unsur merkuri yang terperangkap di dalamnya untuk didonasikan ke dalam system fisiologis tubuh dalam bentuk transport elektron skala *milli Volt*.<sup>14</sup>

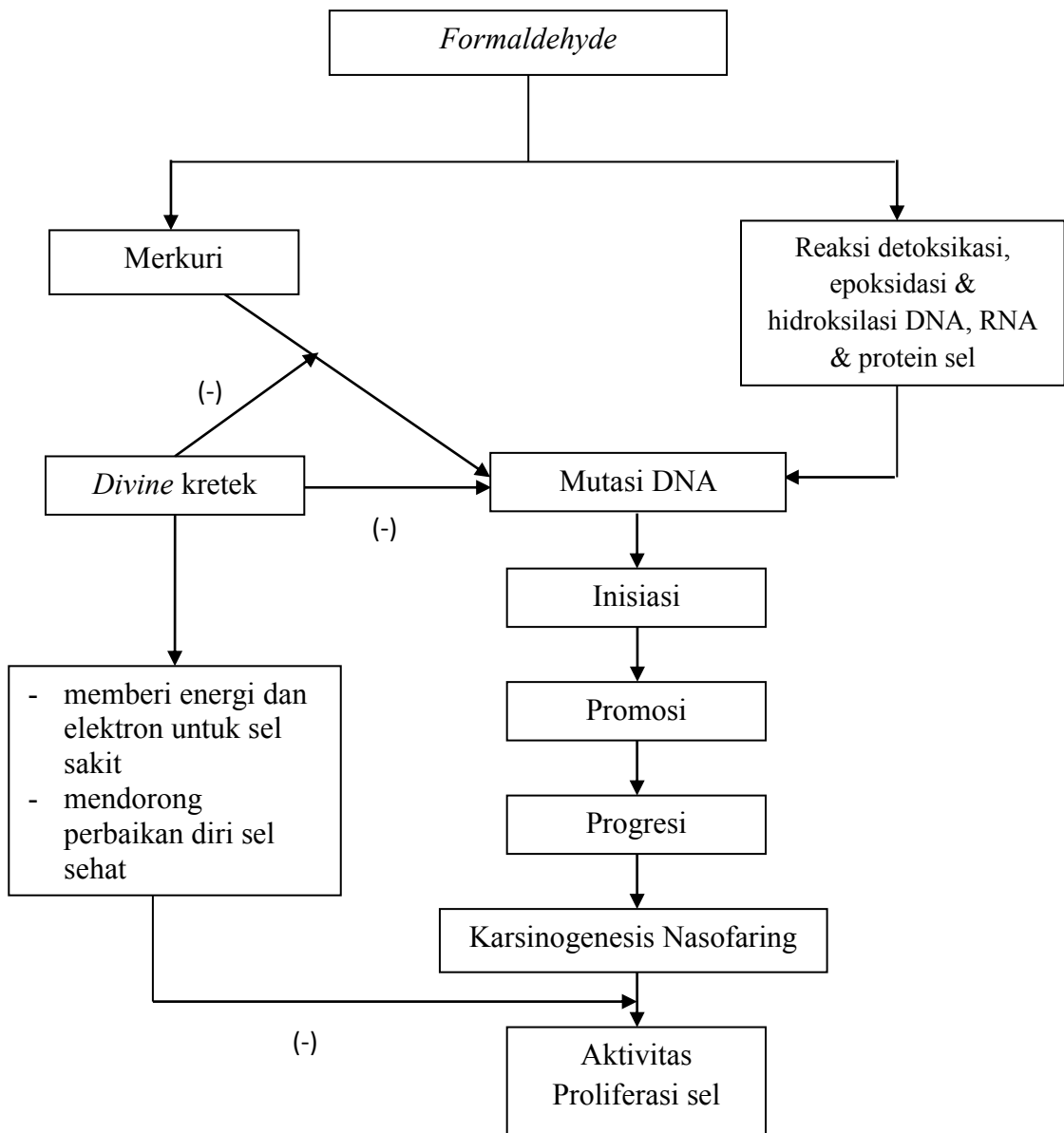
*Divine* kretek sendiri dalam pembuatannya telah ditambahkan suatu bahan kimia sebagai *scavenger* (pembawa radikal bebas dalam tubuh) yang kebanyakan adalah senyawa aromatik, sehingga mampu berkembang menjadi struktur biradikal yang kompleks bersama dengan komponen rokok lainnya ketika rokok tersebut dibakar. Struktur kompleks dalam rokok ini sangat kaya dengan densitas elektron, sehingga memiliki energi potensial tinggi untuk mentransfer elektron.<sup>42</sup>

*Divine* kretek, dengan energi potensial tinggi dan *scavenger* yang dimilikinya diharapkan dapat memberi energi dan elektron pada sel-sel di nasofaring yang sakit, untuk mendorong perbaikan diri sel sehat, dan mengoptimalkan diri, serta dapat menetralkan, mengikat dan membuang radikal bebas dari dalam tubuh.<sup>38</sup>

### BAB 3.

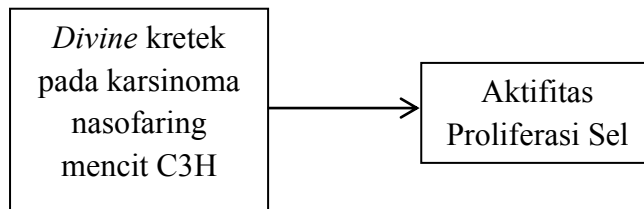
## KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

### 1.1 Kerangka Teori



Gambar 2. Kerangka teori

## 1.2 Kerangka Konsep



Gambar 3. Kerangka konsep

## 1.3 Hipotesis

1. Aktivitas proliferasi sel mukosa nasofaring mencit C3H yang diberi divine kretek selama diinduksi *formaldehyde* lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diberi kretek biasa.
2. Aktivitas proliferasi sel mukosa nasofaring mencit C3H yang diberi divine kretek sesudah diinduksi *formaldehyde* lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diberi kretek biasa
3. Mengevaluasi perbedaan aktivitas proliferasi sel mukosa nasofaring mencit C3H yang diberi divine kretek selama dan sesudah diinduksi *formaldehyde*.

## **BAB 4.**

### **METODE PENELITIAN**

#### **5.1. Ruang Lingkup Penelitian**

Ruang lingkup disiplin ilmu penelitian ini meliputi bidang ilmu patologi anatomi dan ilmu kesehatan THT-KL.

#### **5.2. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biokimia dan laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro selama 6 bulan dimulai dari bulan Februari 2012 sampai Juli 2012

#### **5.3. Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini adalah studi eksperimental laboratorik dengan *the post test only control group design* yang menggunakan mencit strain C3H sebagai hewan percobaan.

#### **5.4. Sampel Penelitian**

##### 4.4.1 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah mencit C3H yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor sebanyak 32 ekor yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

##### 4.4.1.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi penelitian ini adalah:

- 1) Mencit jantan.
- 2) Strain C3H.
- 3) Umur  $\pm$  3 bulan.

- 4) Berat badan  $\pm$  20gram.
- 5) Tidak ada abnormalitas anatomis.

#### 4.4.1.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi penelitian ini adalah:

- 1) Mencit tampak sakit (gerakan tidak aktif).
- 2) Mencit mati selama perlakuan berlangsung (drop out).

#### 4.4.2 Besar Sampel

Penentuan besar sampel menurut aturan WHO, yaitu minimal lima ekor tiap kelompok. Pada penelitian ini tiap kelompoknya digunakan 8 mencit. Keseluruhan sampel dibagi menjadi empat kelompok; kelompok kontrol 1 (K1), kelompok kontrol 2 (K2), kelompok perlakuan 1 (P1), dan kelompok perlakuan 2 (P2). Selama percobaan, hewan coba ditempatkan pada kandang dan diberi pakan dan minum secara *ad libitum*.

### 5.5. Variabel Penelitian

Klasifikasi variabel penelitian

4.5.1 Variabel bebas (independent): Pengasapan *divine* kretek, pengasapan kretek biasa.

4.5.2 Variabel tergantung (dependent): Aktivitas proliferasi sel.

### 5.6. Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel penelitian ini adalah:

- 1) Pengasapan *divine* kretek yang dimaksud adalah pemberian asap hasil pembakaran rokok kretek yang telah diberi cairan RDE yang mengandung asam amino fenil alanin dan metionin dalam bentuk partikel nano. Satu batang *divine* kretek dibakar untuk satu kelompok, kemudian di sekitar anus mencit juga disemprotkan asap

*divine* kretek sebanyak 2x20 cc dengan menggunakan spuit. Tujuan penyemprotan ke arah anus adalah agar asap dapat dengan mudah masuk ke mukosa, terutama mukosa saluran pencernaan, sehingga dapat meningkatkan dosis asap yang terserap ke dalam tubuh. Asap untuk penyemprotan didapatkan dengan cara menghubungkan rokok yang telah dibakar dengan pipa rokok, kemudian dihisap dari bagian belakangnya dengan spuit 60cc (Sarjadi 2012, komunikasi personal, 10 Januari).

Skala: Nominal

- 2) Pengasapan kretek biasa yang dimaksud adalah pemberian asap hasil pembakaran rokok kretek yang tidak diberi larutan RDE. Satu rokok digunakan untuk 1 kelompok mencit. Satu batang kretek biasa dibakar untuk satu kelompok, kemudian di sekitar anus mencit juga disemprotkan asap kretek biasa sebanyak 2x20 cc dengan menggunakan spuit. Tujuan penyemprotan ke arah anus adalah agar asap dapat dengan mudah masuk ke mukosa, terutama mukosa saluran pencernaan, sehingga dapat meningkatkan dosis asap yang terserap ke dalam tubuh. Asap untuk penyemprotan didapatkan dengan cara menghubungkan rokok yang telah dibakar dengan pipa rokok, kemudian dihisap dari bagian belakangnya dengan spuit 60cc (Sarjadi 2012, komunikasi personal, 10 Januari).

Skala: Nominal

- 3) Aktivitas proliferasi sel dinilai 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>11</sup>

Skala: Rasio

## 5.7. Cara Pengumpulan Data

### 4.7.1 Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah:

- 1) Rokok kretek biasa
- 2) Larutan RDE
- 3) Mencit C3H
- 4) Larutan Formalin 20%
- 5) Pakan standar mencit
- 6) Pakan yang telah dicampur dengan formalin 10% dengan dosis 54mg/kgBB
- 7) Bahan untuk pengecatan AgNOR

### 4.7.2 Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah:

- 1) Kandang mencit untuk induksi *formaldehyde* berukuran 50x30x20cm<sup>3</sup> dan perlengkapannya.
- 2) Kandang untuk paparan asap *divine* kretek dan kretek biasa serta perlengkapannya.
- 3) S spuit 60 cc.
- 4) Alat Bedah minor

### 4.7.3 Jenis Data

Data yang dikumpulkan adalah data primer hasil pemeriksaan laboratorium.

### 4.7.4 Cara Kerja

Mencit jantan strain C3H sebanyak 32 ekor diaklitimasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standar selama satu

minggu secara *ad libitum*, kemudian dibagi menjadi empat kelompok, tiap kelompok terdiri dari 8 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;

- 1) Kelompok K1 : diberi paparan asap kretek biasa, dan diinduksi karsinogenesis nasofaring dengan *formaldehyde* selama 18 minggu.
- 2) Kelompok K2 : diinduksi karsinogenesis nasofaring dengan *formaldehyde* selama 9 minggu, kemudian 9 minggu berikutnya diberi paparan asap kretek biasa.
- 3) Kelompok P1 : diberi paparan asap *divine* kretek, dan diinduksi karsinogenesis nasofaring dengan *formaldehyde* selama 18 minggu.
- 4) Kelompok P2 : diinduksi karsinogenesis nasofaring dengan *formaldehyde* selama 9 minggu, kemudian 9 minggu berikutnya diberi paparan asap *divine* kretek.

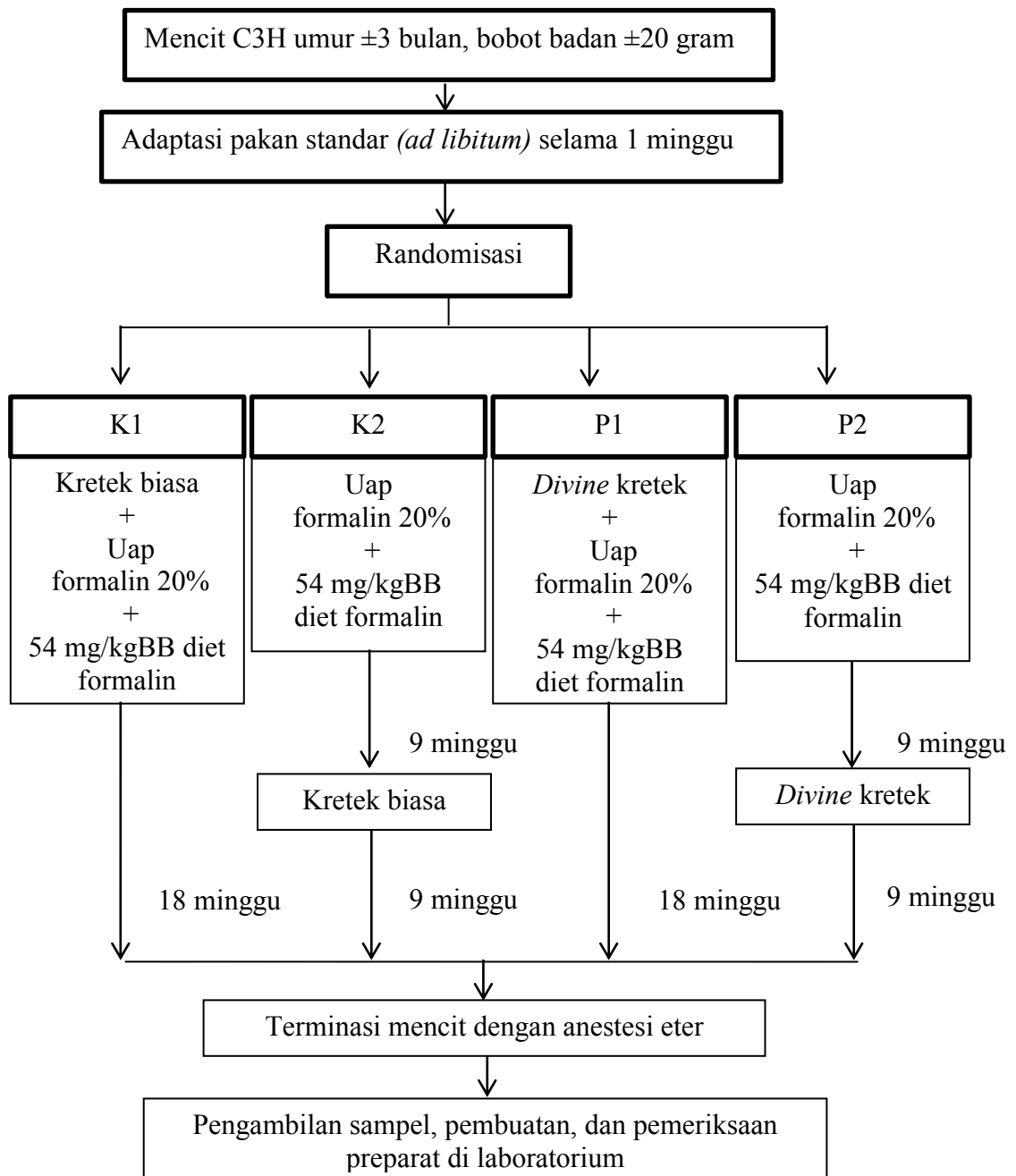
Induksi karsinogenesis nasofaring dengan *formaldehyde* di atas sesuai dengan metode Conolly yang dimodifikasi, yaitu dengan menggunakan uap dari larutan formalin 20% yang dialirkan ke dalam ruang semi tertutup berukuran 50x30x20 cm<sup>3</sup>, serta ditambah diet standar oral mengandung 54 mg/kgBB formalin 10% per hari selama minimal 9 minggu.<sup>10, 11</sup>

Di akhir penelitian seluruh mencit diterminasi dengan anestesi dengan eter. Selanjutnya diambil sediaan nasofaring dan dikirim ke laboratorium Patologi Anatomi untuk dilakukan pemeriksaan aktivitas proliferasi selnya.

Aktifitas proliferasi sel epitel nasofaring dinilai dengan menggunakan metode AgNOR. Metode hitung jumlah bercak 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. Pengecatan AgNOR tampak sebagai titik coklat atau hitam dalam inti sel epitel.<sup>11</sup> Pada penelitian ini pemeriksaan bercak AgNOR dilakukan oleh ahli Patologi Anatomi secara membuta.

#### 4.8 Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian

#### 4.9 Pengolahan dan Analisis Data

Data dikelompokkan berdasarkan variabelnya dalam skala nominal dan rasio. Kemudian dilakukan uji normalitas menggunakan Saphiro Wilk, apabila normal dan memenuhi syarat uji parametrik dilanjutkan dengan uji statistik *one way* ANOVA, dan apabila tidak memenuhi syarat dilanjutkan dengan uji statistik non parametrik Kruskal-Wallis. Data diolah dengan menggunakan komputer.

#### 4.10 Etika Penelitian

Ethical clearance penelitian ini diperoleh dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran UNDIP / RS Dr. Kariadi Semarang. Hewan coba akan dipelihara dengan baik, termasuk kandang, makanan, air minum, transportasi dan cara menanganinya sesuai tingkah laku dan kebutuhan biologik binatang coba.

Hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan strain C3H sebanyak 32 ekor. Satu minggu pertama hewan coba diaklimatisasi di laboratorium dengan dikandangkan secara individual dan diberi ransum pakan standar *ad libitum*, kemudian dibagi menjadi empat kelompok, tiap kelompok terdiri dari 8 ekor mencit yang ditentukan secara acak. Kelompok K1 diberi paparan asap kretek biasa, dan diinduksi uap formalin 20%, serta diberi diet standar mengandung 54 mg/kgBB formalin 10% per hari selama 18 minggu. Kelompok K2 diinduksi uap formalin 20% serta diet standar mengandung 54 mg/kgBB formalin 10% selama 9 minggu, kemudian 9 minggu berikutnya diberi paparan asap kretek biasa. Kelompok P1 diberi paparan asap *divine* kretek, dan diinduksi uap formalin 20%, serta diberi diet standar mengandung 54 mg/kgBB formalin 10% per hari selama 18 minggu. Kelompok P2

diinduksi uap formalin 20% serta diet standar mengandung 54 mg/kgBB formalin 10% selama 9 minggu, kemudian 9 minggu berikutnya diberi paparan asap *divine* kretek. Kemudian mencit diterminasi dengan dengan eter. Selanjutnya diambil sediaan nasofaring dan dikirim ke laboratorium Patologi Anatomi untuk dilakukan pemeriksaan aktivitas proliferasi selnya.

#### 4.11 Jadwal Penelitian

Tabel 2. Jadwal penelitian

Kegiatan	Bulan												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Penentuan Judul	■												
Penyusunan BAB 1	■												
Penyusunan BAB 2		■	■										
Penyusunan BAB 3		■	■	■									
Penyusunan BAB 4			■	■	■								
Ujian proposal						■							
Pelaksanaan penelitian dan pengumpulan data						■	■	■	■	■	■		
Analisa data										■			
Penyusunan laporan										■			
Ujian hasil											■		

## **BAB 5.**

### **HASIL PENELITIAN**

Penelitian ini menggunakan 32 mencit C3H yang dibagi menjadi empat kelompok. Kelompok K1 diberi paparan asap kretek biasa bersamaan dengan induksi KNF dengan *formaldehyde*, kelompok K2 diberi paparan asap kretek biasa setelah diinduksi KNF dengan *formaldehyde*, kelompok P1 diberi paparan asap *divine* kretek bersamaan dengan proses induksi KNF dengan *formaldehyde*, dan kelompok P2 diberi paparan asap *divine* kretek setelah diinduksi KNF dengan *formaldehyde*.

Selama penelitian, dua ekor mencit mati saat proses adaptasi sebelum perlakuan dimulai, serta terdapat dua ekor mencit yang berjenis kelamin betina sehingga dieksklusikan. Kemudian pada 9 minggu pertama penelitian, satu ekor mencit dari tiap kelompok diterminasi, untuk dinilai proses karsinogenesis nasofaringnya. Empat mencit lainnya dieksklusi karena mati. Di akhir penelitian, mencit yang tersisa sebanyak 20 ekor, dimana jumlah sampel minimal sebanyak 5 ekor per kelompok masih terpenuhi. Selanjutnya seluruh mencit yang tersisa diterminasi untuk diambil nasofaringnya.

Sediaan nasofaring yang telah dipisahkan diwarnai dengan pengecatan AgNOR. Aktivitas proliferasi sel mukosa nasofaring dapat dilihat dengan menghitung bercak AgNOR per sel pada 100 sel di tiap preparat. Pada penelitian ini penghitungan bercak AgNOR dikerjakan oleh ahli Patologi Anatomi secara membuta. Hasil dari perhitungan bercak AgNOR pada 100 sel dapat dilihat dalam Lampiran 2.

Dari hasil perhitungan jumlah bercak AgNOR pada 100 sel, kemudian dicari mediannya. Nilai median itulah yang menjadi skoring jumlah bercak AgNOR (Tabel 3).

Tabel 3. Skoring jumlah bercak AgNOR

Kelompok	Jumlah Bercak AgNOR				
	Nomor Mencit				
	1	2	3	4	5
Diberi paparan kretek biasa selama induksi <i>formaldehyde</i> (K1)	2	3	3	4	4
Diberi paparan kretek biasa sesudah induksi <i>formaldehyde</i> (K2)	3	2	2	2	2
Diberi paparan <i>divine</i> kretek selama induksi <i>formaldehyde</i> (P1)	2	2	2	2	2
Diberi paparan <i>divine</i> kretek sesudah induksi <i>formaldehyde</i> (P2)	4	3	2	3	3

Tabel 4. Nilai mean dan median jumlah bercak AgNOR per kelompok

Kelompok	Jumlah Bercak AgNOR	
	Mean±SD	Median
Diberi paparan kretek biasa selama induksi <i>formaldehyde</i> (K1)	3,2±0,84	3
Diberi paparan kretek biasa sesudah induksi <i>formaldehyde</i> (K2)	2,2±0,45	2
Diberi paparan <i>divine</i> kretek selama induksi <i>formaldehyde</i> (P1)	2±0,00	2
Diberi paparan <i>divine</i> kretek sesudah induksi <i>formaldehyde</i> (P2)	3±0,71	3

Dari Tabel 4 didapatkan rerata jumlah bercak AgNOR kelompok P1 yang diberi paparan *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* lebih rendah dibandingkan tiga kelompok lainnya, dan nilai rerata jumlah bercak AgNOR tertinggi ada pada kelompok yang diberi paparan kretek biasa selama induksi *formaldehyde* (K1). Didapatkan juga rerata AgNOR kelompok yang diberi *divine*

kretek sesudah induksi yang lebih tinggi dari kelompok yang diberi kretek biasa sesudah induksi *formaldehyde* (K2).

Tabel 5. Uji Normalitas skoring jumlah bercak AgNOR

Uji	<i>p</i>
Saphiro-Wilk	0,000

Distribusi data jumlah bercak AgNOR diuji dengan menggunakan uji normalitas Saphiro-Wilk, dan didapatkan nilai  $p < 0,05$  atau sebaran data tidak normal (Tabel 5). Kemudian data ditransformasikan dan dilakukan uji normalitas kembali. Hasil uji normalitas transformasi data juga menunjukkan nilai  $p < 0,05$ . Sehingga uji statistik yang dipilih adalah uji non parametrik Kruskal-Wallis.

Tabel 6. Uji Kruskal-Wallis jumlah bercak AgNOR

Variabel	Uji	<i>p</i>
Aktivitas Proliferasi Sel	Kruskal-Wallis	0,021

Dari Tabel 6 terlihat bahwa hasil uji Kruskal-Wallis terhadap variabel aktivitas proliferasi sel dengan metode hitung jumlah bercak AgNOR diperoleh nilai  $p = 0,021$  atau terdapat perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ). Selanjutnya dilakukan uji *post hoc* Mann-Whitney untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan.

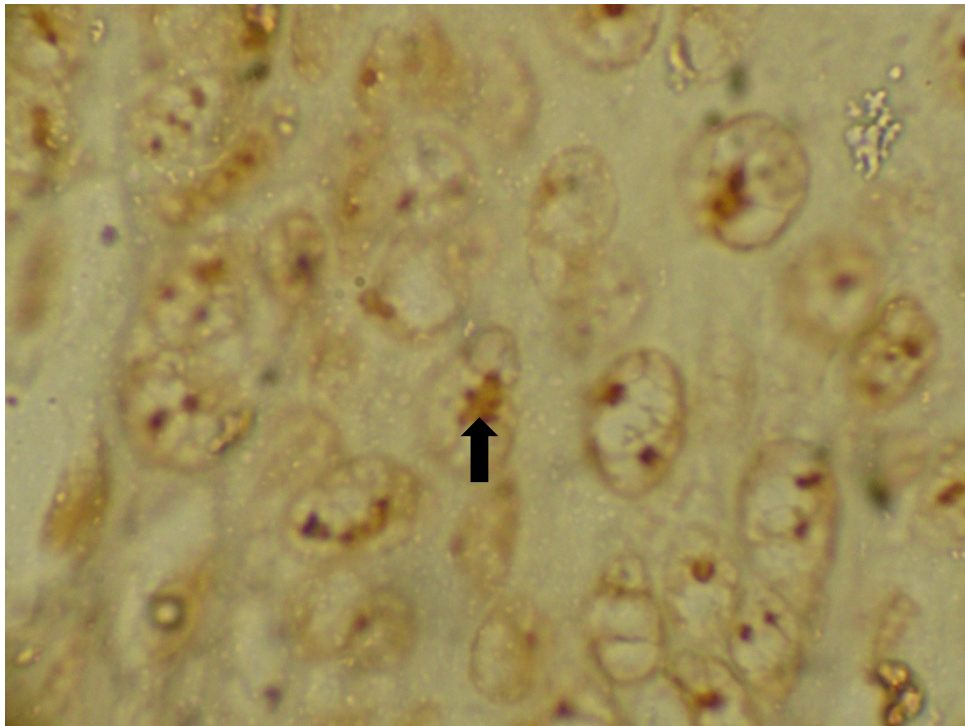
Tabel 7. Uji *post hoc* Mann-Whitney jumlah bercak AgNOR

Kelompok	Nilai <i>p</i> Uji Mann-Whitney
Kretek biasa dibanding <i>divine</i> kretek selama induksi (K1 –P1)	0,018*
Kretek biasa dibanding <i>divine</i> kretek sesudah induksi (K2 –P2)	0,065
<i>Divine</i> kretek selama induksi dibanding <i>divine</i> kretek sesudah induksi (P1-P2)	0,017*

Keterangan: \*: berbeda bermakna ( $p < 0,05$ )

Dari Tabel 7 terlihat bahwa terdapat perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) hasil uji Mann-Whitney antara kelompok yang diberi kretek biasa selama induksi *formaldehyde* dibanding yang diberi *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* (K1 dengan P1) dengan nilai  $p = 0,018$ , serta tampak pula perbedaan bermakna antara kelompok yang diberi *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* dibanding dengan yang diberi *divine* kretek sesudah induksi *formaldehyde* (P1 dengan P2 dengan nilai  $p = 0,017$ ).

Gambar 5 memperlihatkan epitel mukosa nasofaring pada pengecatan AgNOR. Bercak AgNOR tampak sebagai titik coklat atau hitam dalam inti sel epitel.



Gambar 5. Epitel Mukosa nasofaring pada pengecatan AgNOR (1000x).

Tanda panah menunjukkan bercak AgNOR

## **BAB 6.**

### **PEMBAHASAN**

*Divine* kretek dibuat dengan menghilangkan radikal bebas terutama unsur logam berat seperti merkuri dalam kretek, sehingga partikel yang tersisa adalah polimer gabungan komponen organik yang cenderung menyehatkan. Partikel-partikel tersebut memiliki densitas elektron tinggi, sehingga dapat menghantarkan elektron-elektron yang dapat mendorong perbaikan sel sakit, dan mendorong sel sehat untuk mengoptimalkan diri.<sup>43</sup> *Divine* kretek juga mengandung *scavanger* yang mampu membawa radikal bebas dari dalam tubuh.<sup>14</sup>

Dalam penelitian dilakukan induksi karsinogenesis nasofaring dengan paparan inhalasi formalin, dan diet per oral mengandung formalin. Sebagai intervensi perlakuan diberikan paparan asap *divine* kretek. Pemberian paparan asap kretek biasa pada kelompok kontrol bertujuan untuk menunjukkan bahwa yang berperan dalam inhibisi proses karsinogenesis adalah partikel-partikel nano dan *scavanger* yang terdapat dalam *divine* kretek. Pemberian paparan asap pada kelompok P1 dan K1 dilakukan selama induksi karsinogenesis untuk membuktikan efek preventif dan pemberian paparan asap pada kelompok P2 dan K2 setelah induksi karsinogenesis untuk membuktikan efek kuratif.

Dari hasil didapatkan adanya perbedaan bermakna jumlah bercak AgNOR ( $p=0,017$ ) pada kelompok yang diberi paparan *divine* kretek selama induksi *formaldehde* (P1) dan kelompok yang diberi paparan *divine* kretek sesudah induksi *formaldehde* (P2). Jumlah bercak AgNOR kelompok yang diberi

paparan *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* (P1) reratanya lebih rendah dari kelompok yang diberi paparan *divine* kretek sesudah induksi *formaldehyde* (P2). Adanya perbedaan bermakna antara kedua kelompok ini menunjukkan bahwa efek preventif *divine* kretek lebih baik daripada efek kuratifnya.

Perbedaan bermakna jumlah bercak AgNOR ( $p=0,018$ ) juga tampak nyata pada kelompok yang diberi paparan kretek biasa selama induksi *formaldehyde* (K1) dengan kelompok yang diberi paparan *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* (P1) yang menunjukkan efek inhibisi proses karsinogenesis nasofaring. Namun pada kelompok yang diberi paparan kretek biasa sesudah induksi *formaldehyde* (K2) dengan kelompok yang diberi paparan *divine* kretek sesudah induksi *formaldehyde* tidak menunjukkan perbedaan ( $p=0,065$ ), serta didapat rerata jumlah bercak AgNOR kelompok yang diberi *divine* kretek sesudah induksi *formaldehyde* (P2) lebih tinggi dari kelompok yang diberi kretek biasa sesudah induksi (K2). Hal ini menunjukkan *divine* kretek hanya memiliki efek preventif, sedangkan efek kuratifnya tidak terbukti.

Efek preventif dari *divine* kretek berasal dari partikel-partikel nano yang memiliki kemampuan interaksi *spin* yang berasal dari *di-HO-Phenanthrenedieryl* yang terkonjugasi. Partikel-partikel yang memiliki densitas elektron yang tinggi ini mampu mentransfer elektron ke dalam sel, sehingga dapat mengoptimalkan sel yang sehat.<sup>43</sup> Di samping itu, berbagai radikal bebas (yang dapat memutasi DNA) dalam tubuh seperti nitrogen, oksigen, dan merkuri yang dapat masuk ke dalam tubuh akibat paparan *formaldehyde* akan ditangkap oleh *scavanger* (asam amino metionin dan fenilalanin) yang terdapat dalam *divine* kretek.<sup>12,13,14</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.<sup>11</sup> Pada saat proliferasi, penambahan sintesis protein untuk pertumbuhan sel dipenuhi dengan cara merubah biogenesis ribosom. Biogenesis ribosom sendiri dapat ditunjukkan dengan kuantitas dari *nuclear organization region* (NOR) yang berada tepat pada struktur nukleolar dan diselubungi komponen fibriler yang tebal.<sup>37</sup>

Didapatkan nilai jumlah bercak AgNOR yang berbeda pada jaringan normal, jaringan yang mengalami proliferasi reaktif, proliferasi jinak, dan keganasan.<sup>44</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>11</sup> Studi karsinogenesis pada kolon tikus wistar yang dilakukan oleh Aswiyanti menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jumlah bercak 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.<sup>36</sup> Penelitian lain menyebutkan bahwa telah terbukti bahwa sel ganas pada karsinoma duktus infiltratif payudara memiliki lebih banyak titik AgNOR per nukleus.<sup>44</sup>

Jumlah bercak AgNOR memiliki korelasi dengan berbagai pemeriksaan patologi anatomi yang lain. Hasil pewarnaan AgNOR mempunyai korelasi yang tinggi dengan sitometrik alur dan pewarnaan imunohistokimia misalnya Ki-67.<sup>45</sup>

Hartini membuktikan bahwa terdapat korelasi positif antara nilai jumlah bercak AgNOR dengan grading histologi karsinoma duktus infiltratif payudara.<sup>44</sup> Sedangkan Khaisuntaha membuktikan bahwa jumlah bercak AgNOR memiliki korelasi negatif sebesar -0,008 dengan index apoptosis pada kanker serviks.<sup>46</sup>

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka terbukti bahwa *divine* kretek memiliki potensi preventif terhadap proses karsinogenesis nasofaring yang ditandai dengan penurunan jumlah AgNOR yang bermakna.

Keterbatasan penelitian ini adalah; 1) pengukuran dosis induksi karsinogenesis yang memapar mukosa nasofaring tidak dapat dipastikan, karena keterbatasan alat, sesuai teori seharusnya paparan yang diberikan untuk menimbulkan keganasan di nasofaring minimal 10 ppm, 2) keganasan nasofaring di *fossa Rosenmuller* pada mencit, tidak bisa dilokalisasi secara akurat, 3) studi ini tidak memperlihatkan mekanisme penangkapan radikal bebas oleh *divine* kretek secara jelas.

## **BAB 7.**

### **SIMPULAN DAN SARAN**

#### **7.1. Simpulan**

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Pemberian paparan asap *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* (untuk membuktikan efek preventif) dapat menurunkan aktivitas proliferasi sel secara bermakna.
2. Pemberian paparan asap *divine* kretek sesudah induksi *formaldehyde* (untuk membuktikan efek kuratif) tidak dapat menurunkan aktivitas proliferasi sel.
3. Pemberian paparan asap *divine* kretek selama induksi *formaldehyde* dapat menurunkan aktivitas proliferasi sel lebih baik dari pemberian paparan asap *divine* kretek sesudah induksi *formaldehyde* (efek preventif *divine* kretek lebih kuat daripada efek kuratifnya).

#### **7.2. Saran**

Untuk penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan pemeriksaan lebih lanjut mengenai kandungan lengkap dari asap *divine* kretek untuk dilihat perbedaan komponen asapnya dengan kretek biasa. Selain itu perlu diperhitungkan secara tepat konsentrasi uap *formaldehyde* dalam kandang dengan menggunakan *formaldehydometer*.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Yee PHC, Sim SP. High cell density and latent membrane protein 1 expression induce cleavage of the mixed lineage leukemia gene at 11q23 in nasopharyngeal carcinoma cell line. *Journal of Biomedical Science*. 2010 [cited 2011 November 14]; 17:77. Available from: <http://www.jbiomedsci.com/content/pdf/1423-0127-17-77.pdf>
2. Hariwiyanto B. Ekspresi LMP1 EBV pada keberhasilan terapi dan tiga tahun ketahanan hidup penderita karsinoma nasofaring. [homepage on teh internet]. c2005 [cited 2011 November 14]. Available from: <http://www.perhati.org/wp-content/uploads/2011/06/Ekspresi-LMP-Bambang-Hariwiyanto.doc>
3. Chou J, et al. Nasopharyngeal carcinoma review of the molecular mechanisms of tumorigenesis. *Head Neck* [serial online]. 2008 [cited 2012 February 28]; 30(7): 946–963. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3046044/?tool=pubmed>
4. Wiliyanto O. Insidensi kanker kepala leher berdasarkan diagnosis patologi anatomi di RS Dr Kariadi Semarang periode 1 Januari 2001 – 31 Desember 2005 [Undegraduate Thesis]. Semarang: Universitas Diponegoro; 2006. [cited 2012 January 16]. Available from: <http://eprints.undip.ac.id/20998/1/Onggo.pdf>

5. Vokes EE, Liebowitz DN, Weichselbaum RR. Nasopharyngeal carcinoma. *The Lancet* [serial online]. 1997 [cited 2011 November 16]; 1087-1091. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673697072693>
6. IARC. Formaldehyde. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans, formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxy-2-propanol [homepage on the internet] 2005 [cited 2012 February 3]; Volume 88. Available from:  
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol88/mono88-6A.pdf>
7. Purchase IFH, Paddle GM. Does formaldehyde cause nasopharyngeal cancer in man? *Cancer Letters* [serial online]. 1989 [cited 2012 January 20]; 46(1989): 79-85. Available from:  
<http://toxicology.usu.edu/endnote/2665934.pdf>
8. A. Schulte H, et. al. Assessment of the carcinogenicity of formaldehyde [homepage on the internet]. 2006 [updated 2006 February; cited 2012 January 29]. Available from:  
[http://www.bfr.bund.de/cm/350/assessment\\_of\\_the\\_carcinogenicity\\_of\\_formaldehyde.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/350/assessment_of_the_carcinogenicity_of_formaldehyde.pdf)
9. Conolly RB, et. al. Biologically motivated computational modeling of formaldehyde carcinogenicity in the F344 rat. *Toxicological Sciences* [serial online]. 2003 [cited 2012 February 3]; 75:432–447. Available from:  
<http://toxsci.oxfordjournals.org/content/75/2/432.full.pdf>

10. Prasetyo A, et al. Efek benalu teh (*scurrula atropurpurea*) terhadap karsinogenesis nasofaring mencit C3H yang terpapar formaldehide. Semarang: Universitas Diponegoro; 2007.
11. Sulisty H. Inhibisi aktivitas proliferasi sel dan perubahan histopatologik epitelial mukosa nasofaring mencit C3H dengan pemberian ekstrak benalu teh [Master Thesis]. Semarang: Universitas Diponegoro; 2008. Available from: [http://eprints.undip.ac.id/24718/1/HIDAYAT\\_SULISTYO.pdf](http://eprints.undip.ac.id/24718/1/HIDAYAT_SULISTYO.pdf)
12. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. nutrition [serial online]. 2002 [cited 2011 September 9]; 18:872–879. Available from: <http://www.sassit.co.za/Journals/Physiology/Nutrition/antioxidants/free%20radicals,%20antioxidants%20and%20nutrition.pdf>
13. Harvie J. Eliminating mercury use in hospital laboratories: a step toward zero discharge. Public Health Reports [serial online]. 1999 [cited 2012 February 3]; 114:353-358. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1308496/pdf/pubhealthrep00026-0063.pdf>
14. Pusat Studi Nanobiologi. Pengembangan teknologi kretek sehat tanpa kehilangan cita-rasa [homepage on the Internet]. 2011 [updated 2011 November 4; cited 2012 January 25]. Available from: <http://smartbio.org/research/pengembangan-teknologi-kretek-sehat-tanpa-kehilangan-cita-rasa/>

15. El-Sayed IH. Nanotechnology in head and neck cancer: the race is on. *Curr Oncol Rep* [serial online]. 2010 [cited 2011 July 27]; 12:121–128. Available from:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2842561/pdf/11912\\_2010\\_Article\\_87.pdf?tool=pmcentrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2842561/pdf/11912_2010_Article_87.pdf?tool=pmcentrez)
16. Nussinov R, Aleman C. Nanobiology: from physics and engineering to biology. *Physical Biology* [serial on the Internet]. 2006 [cited 2011 July 22]; volume 3. Available from: [http://iopscience.iop.org/1478-3975/3/1/E01/pdf/1478-3975\\_3\\_1\\_E01.pdf](http://iopscience.iop.org/1478-3975/3/1/E01/pdf/1478-3975_3_1_E01.pdf)
17. Saraswati. Upaya penanganan berbagai penyakit akibat radikal bebas dengan balur-divine kretek. Seminar Sehari Konsep Sehat Sakit dari Sudut Pandang Nanobiologi; 2011 July 23; Semarang: Universitas Diponegoro; 2011.
18. Sarjadi. Kompleksitas sistem sel. Seminar Sehari Konsep Sehat Sakit dari Sudut Pandang Nanobiologi; 2011 July 23; Semarang: Universitas Diponegoro; 2011.
19. Sijabat L. Pengaruh pemberian ekstrak *sponge haliclona sp* terhadap aktivitas proliferasi sel dengan metode hitung AgNOR pada sel adenocarcinoma mammae mencit C3H [Undergraduate Thesis]. Semarang: Universitas Diponegoro; 2009
20. Sumitro SB, Zahar G. Overcoming cigarette for health without altering the flavor (Brief illustration of scientific background and evidences) [homepage on the Internet]. c2011 [updated 2011 October 27; cited 2011 September 15]. Available from: <http://smartbio.org/publications/overcoming-cigarette-for->

health-without-altering-the-flavor-brief-illustration-of-scientific-background-and-evidences/

21. Brennan B. Nasopharyngeal carcinoma. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [serial on the Internet]. 2006 [cited 2011 October 1]; 1:23. Available from: <http://www.OJRD.com/content/1/1/23>
22. Dubrulle F, Souillard R, Hermans R. Extension patterns of nasopharyngeal carcinoma. *Eur Radiol* [serial online]. 2007 [cited: 2011 October 1]; 17: 2622–2630. Available from: Springerlink.
23. Nguyen-van D. EBV gene variation and epigenetic alterations in asian nasopharyngeal carcinoma and potential clinical applications [PhD thesis]. Stockholm: Karolinska Institutet; 2007.
24. American Cancer Society. Global cancer facts and figures 2007 [homepage on the Internet]. c2007 [cited 2012 February 7]. Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/gloglobalfactsandfigu2007rev2p.pdf>
25. Yu MC, Yuan JM. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Seminars in cancer biology* [serial online]. 2002 [cited 2011 October 24]; 12:421-429. Available from: Science Direct.
26. WHO. Pathology and genetics head and neck tumours [homepage on the Internet]. c2005 [cited 2012 February 3]. Available from: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb9/BB9.pdf>
27. Yoshizaki T, Ito M, Muro S, Wakisaka N, Kondo S, Endo K. Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma. *Auris nasus*

larynx [serial online]. 2011 [cited 2011 November 24]; 1534:8. Available from:

[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MiamiImageURL&\\_cid=271310&\\_user=7721414&\\_pii=S0385814611001386&\\_check=y&\\_origin=search&\\_zone=rslt\\_list\\_item&\\_coverDate=2011-05-17&wchp=dGLbVIV-zSkzV&md5=923383fcfe49989f2dabfd74fc9c0df6/1-s2.0-S0385814611001386-main.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=271310&_user=7721414&_pii=S0385814611001386&_check=y&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_coverDate=2011-05-17&wchp=dGLbVIV-zSkzV&md5=923383fcfe49989f2dabfd74fc9c0df6/1-s2.0-S0385814611001386-main.pdf)

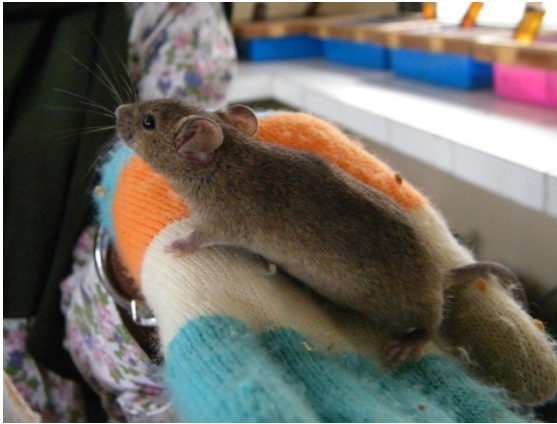
28. Astuty SJ. Hubungan ekspresi latent membrane protein 1 dengan berbagai stadium tumor dan jenis histopatologi pada karsinoma nasofaring [Master Thesis]. Medan: Universitas Sumatera Utara; 2010. Available from: <http://repository.usu.ac.id/handle/123456789/21920>
29. Spano JP, et. al. Nasopharyngeal carcinomas: an update. *European journal of cancer* [serial online]. 2003 [cited 2011 November 11]; 39:2121-2135. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804903003678>
30. Siregar SM. Epstein barr nuclear antigen-1 (EBNA-1) pada penderita karsinoma nasofaring di Rsup H. Adam Malik Medan [Master Thesis]. Medan: Universitas Sumatera Utara; 2010. Available from: <http://repository.usu.ac.id/handle/123456789/21907>
31. Darishini P. Gambaran karakteristik penderita karsinoma nasofaring di Rumah Sakit Umum Pusat Haji Adam Malik, Medan dari Januari Sampai Desember 2009 [Master Thesis]. Medan: Universitas Sumatera Utara; 2010. Available from: <http://repository.usu.ac.id/handle/123456789/21527>

32. Health and Safety Executive. The carcinogenicity of formaldehyde [homepage on the Internet]. c2004 [cited 2012 January 30]. Available from: <http://www.hse.gov.uk/aboutus/meetings/iacs/acts/watch/130105/p6annex2.pdf>
33. Cogliano VJ, et. al. Meeting report: summary of iarc monographs on *formaldehyde*, 2-butoxyethanol, and 1-tert-butoxy-2-propanol. *Environmental health perspectives* [serial online]. 2005 [2012 January 30]; 113:1205-1208. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2854792/pdf/ehp-118-a131b.pdf?tool=pmcentrez>
34. Setyawati AN. Metabolisme xenobiotik [homepage on the Internet]. c2011 [cited: 2012 January 30]. Available from: [http://staff.undip.ac.id/fk/amallia\\_setyawati/files/2011/10/xenobiotik\\_2011.pdf](http://staff.undip.ac.id/fk/amallia_setyawati/files/2011/10/xenobiotik_2011.pdf)
35. Thompson CM, Grafström RC. Commentary: mechanistic considerations for associations between formaldehyde exposure and nasopharyngeal carcinoma. *Environmental health* [serial online]. 2009 [cited 2012 January 29]; 8:53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2788541/pdf/1476-069X-8-53.pdf?tool=pmcentrez>.
36. Asri A. Pengaruh pemberian perasan seledri terhadap aktivitas proliferasi sel, indeks apoptosis, dan perubahan histopatologi mukosa kolon wistar [Master Thesis]. Semarang: Universitas Diponegoro; 2004.

37. Utami SA. Efek cyclophosphamid-transfer factor terhadap proliferasi sel (AgNOR) dan volume tumor adeno ca mammae mencit [Master Thesis]. Semarang: Universitas Diponegoro; 2008. Available from: [http://eprints.undip.ac.id/18278/1/Sri\\_Anidya\\_Utami.pdf](http://eprints.undip.ac.id/18278/1/Sri_Anidya_Utami.pdf)
38. Sumitro SB. Pengembangan pemahaman sistem kehidupan melalui pendekatan complexity science dan nanobiologi. Seminar sehari konsep sehat sakit dari sudut pandang nanobiologi; 2011 July 23; Semarang: Universitas Diponegoro; 2011.
39. Nasution IR. Hubungan merokok dengan karsinoma nasofaring [Master Thesis]. Medan: Universitas Sumatera Utara; 2007. Available from: <http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/6429/1/ibrahim.pdf>
40. Hu Q, Yang G, Ma J, Liu J. Simultaneous determination of tin, nickel, lead, cadmium and mercury in cigarette material by solid phase extraction and HPLC. Korean Chem. Soc. [serial online]. 2003 [cited 2011 September 15]; 24(10):1433-1436. Available from: [http://smartbio.ub.ac.id/files/Lead\\_dan\\_mercury\\_dlm\\_asap\\_rokok.pdf](http://smartbio.ub.ac.id/files/Lead_dan_mercury_dlm_asap_rokok.pdf)
41. Sircus M. Heavy metals, mercury and cancer [homepage on the Internet]. 2010 [updated 2010 March 23; cited 2012 February 10]. Available from: <http://smartbio.org/articles/heavy-metals-mercury-and-cancer/>
42. Zahar G. The balur and divine kretek therapy [homepage on the Internet]. 2011 [cited 2011 July 26]. Available from: [http://smartbio.org/files/The%20Balur%20and%20Divine%20Kretek%20The rapy.pdf](http://smartbio.org/files/The%20Balur%20and%20Divine%20Kretek%20The%20rapy.pdf)

43. Sumitro SB. Divine tobacco, a technology for kretek conservation [homepage on the Internet]. 2011 [cited 2012 July 22]. Available from: smartbio.org
44. Hartini PT. Hubungan antara hitung agnor dengan grading histologi pada karsinoma duktus infiltratif payudara [Master Thesis]. Semarang: Universitas Diponegoro; 2002
45. Sumarno. Pengaruh ekstrak sarang semut (*myrmecodia pendens merr. & perry*) terhadap aktifitas proliferasi sel dan indeks apoptosis kanker payudara mencit C3H [Master Thesis]. Semarang: Universitas Diponegoro; 2010. Available from: <http://eprints.undip.ac.id/29092/>
46. Khaisuntaha M. Korelasi antara AgNORs, MIB-1 dan apoptosis pada kanker serviks [Undegraduate Thesis]. Semarang: Universitas Negeri Semarang; 2012.

**Lampiran 1. Dokumentasi Penelitian**



Mencit C3H



Proses penyuntikan asap rokok ke arah anus



Proses pengasapan mencit dengan asap rokok



Kondisi kandang mencit, di dalam botol terdapat formalin 20%



Sprit, selang, pipa rokok, dan rokok yang telah dihubungkan



Sprit yang telah dipenuhi asap



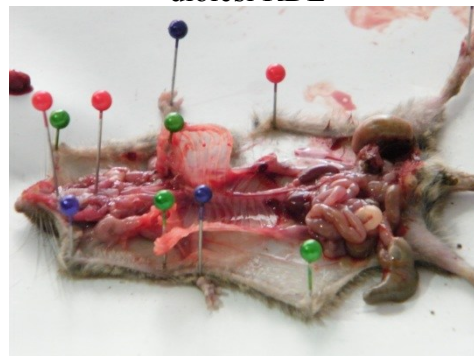
Larutan RDE yang mengandung asam amino dalam bentuk partikel nano



Kiri: kretek biasa  
Kanan: kretek yang telah diolesi RDE



Proses pengambilan nasofaring mencit



Proses pengambilan nasofaring mencit

**Lampiran 2.** Penghitungan bercak AgNOR pada 100 sel kelompok K1 dan K2

No	K1-1	K1-2	K1-3	K1-4	K1-5	K2-1	K2-2	K2-3	K2-4	K2-5
1	2	2	3	7	2	3	1	2	3	2
2	2	2	3	7	4	3	1	2	3	2
3	3	2	3	6	4	3	1	2	3	2
4	3	2	2	7	4	3	1	2	3	2
5	2	4	2	7	4	3	1	2	3	2
6	3	4	2	4	4	3	1	4	4	3
7	2	4	2	4	4	3	3	4	4	3
8	3	4	2	5	5	3	2	4	4	3
9	3	3	4	3	5	3	2	4	4	3
10	3	3	4	3	5	3	3	4	4	2
11	2	3	4	3	4	3	2	2	4	2
12	2	3	4	3	5	3	2	2	4	2
13	3	3	5	3	3	2	3	2	4	2
14	3	3	5	3	3	2	2	2	4	4
15	2	3	5	4	3	2	2	3	4	4
16	2	2	5	5	3	2	2	3	3	4
17	2	2	5	5	3	2	3	3	3	3
18	3	3	3	5	3	3	2	3	3	2
19	3	3	3	5	5	3	2	3	3	4
20	3	3	3	5	5	3	2	3	2	2
21	3	4	3	5	5	4	2	3	2	5
22	4	4	3	5	5	4	2	3	2	5
23	2	4	3	3	3	4	2	3	2	4
24	3	2	3	4	3	4	2	3	3	2
25	3	2	3	3	3	4	2	3	3	3
26	2	2	3	3	3	2	2	2	2	3
27	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2
28	2	3	3	3	2	2	2	2	2	2
29	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2
30	4	3	2	3	2	2	2	2	2	2
31	3	3	2	4	3	2	2	2	2	2
32	4	3	2	5	3	2	2	2	2	2
33	4	2	1	3	4	2	2	2	2	2
34	5	2	1	3	4	2	2	2	2	2
35	3	2	3	2	4	3	3	2	3	2
36	5	2	3	2	4	3	3	2	3	2

No	K1-1	K1-2	K1-3	K1-4	K1-5	K2-1	K2-2	K2-3	K2-4	K2-5
37	2	2	3	2	4	3	3	2	3	2
38	3	2	3	3	4	3	3	2	2	2
39	2	2	2	2	3	2	2	3	2	2
40	2	2	2	3	3	2	3	2	2	4
41	5	4	3	7	2	2	3	2	2	3
42	2	4	3	7	2	2	3	2	2	2
43	2	4	3	7	2	2	3	3	2	2
44	3	3	2	6	4	2	3	3	2	2
45	3	3	2	7	4	2	3	2	2	4
46	2	3	2	5	4	4	3	3	2	4
47	2	2	2	4	4	4	2	2	2	2
48	2	2	2	4	4	3	2	2	2	2
49	2	2	2	4	4	3	2	2	3	2
50	4	2	2	5	5	4	2	3	2	2
51	4	2	2	7	5	3	2	3	2	5
52	2	2	2	6	5	4	3	3	2	5
53	2	2	2	5	5	2	2	2	3	5
54	2	2	4	3	5	4	2	2	2	2
55	2	3	4	4	5	3	2	2	2	2
56	2	3	4	6	5	3	3	3	2	2
57	2	3	5	7	3	3	3	3	2	2
58	2	3	5	3	3	3	2	3	2	2
59	3	3	5	5	3	2	2	2	2	2
60	3	4	3	5	3	2	2	2	2	3
61	2	4	3	5	5	3	2	2	3	2
62	2	4	3	5	5	3	2	2	3	2
63	2	4	3	5	5	2	2	2	2	2
64	2	4	3	5	5	2	2	2	2	2
65	3	3	3	5	5	3	2	3	2	2
66	3	3	3	6	3	4	2	2	2	2
67	2	3	3	6	3	3	2	2	2	2
68	2	3	3	3	2	2	3	2	2	2
69	2	2	3	3	5	2	2	2	2	2
70	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2
71	2	2	2	4	2	2	2	2	2	2
72	2	2	5	4	3	2	2	2	2	2
73	2	2	4	3	3	2	2	2	2	3
74	3	3	4	3	3	2	2	2	2	3

No	K1-1	K1-2	K1-3	K1-4	K1-5	K2-1	K2-2	K2-3	K2-4	K2-5
75	3	3	5	2	3	2	3	2	2	3
76	3	3	1	2	4	2	3	3	3	2
77	2	2	5	3	4	2	2	3	2	2
78	2	2	4	3	4	3	2	3	2	2
79	3	2	3	4	4	2	2	3	3	2
80	3	3	3	4	4	3	2	2	4	2
81	2	2	3	3	3	3	3	2	4	3
82	2	2	5	5	3	4	4	2	2	2
83	2	2	5	5	3	4	2	2	2	2
84	2	4	5	7	3	4	3	3	2	2
85	3	3	2	2	3	4	2	2	2	2
86	2	4	3	7	2	2	2	2	2	3
87	2	4	3	7	2	2	2	2	3	2
88	3	4	3	7	2	2	2	2	3	3
89	3	3	3	7	4	2	2	2	3	2
90	2	3	3	7	4	2	2	3	2	2
91	2	3	2	4	2	2	2	2	2	2
92	2	3	2	4	4	2	2	2	2	2
93	2	4	2	4	4	2	2	2	2	2
94	2	4	2	4	4	3	2	2	2	4
95	3	4	2	4	5	3	3	3	2	2
96	2	2	4	5	4	3	2	2	2	2
97	2	2	4	5	5	2	2	3	3	3
98	3	3	4	5	5	3	2	2	3	2
99	2	3	5	3	3	2	3	2	3	2
100	2	4	5	3	3	2	2	2	2	2

\*Keterangan:

K1-x : Mencit nomor x dari kelompok K1

K2-x : Mencit nomor x dari kelompok K2

**Lampiran 3.** Penghitungan bercak AgNOR pada 100 sel kelompok P1 dan P2

No	P1-1	P1-2	P1-3	P1-4	P1-5	P2-1	P2-2	P2-3	P2-4	P2-5
1	2	3	4	3	3	6	3	7	4	4
2	2	3	4	3	3	6	3	2	4	4
3	2	3	4	3	3	6	3	2	4	4
4	2	2	4	3	2	5	4	2	3	4
5	2	2	2	4	2	5	4	2	3	4
6	2	2	2	4	2	5	4	2	3	4
7	2	2	2	4	2	5	4	2	3	3
8	2	4	3	3	2	6	5	2	5	3
9	3	4	3	2	3	6	5	2	5	3
10	3	3	2	2	3	4	3	2	5	4
11	2	2	4	2	3	4	3	2	3	3
12	2	2	4	2	2	3	3	2	3	3
13	2	2	3	2	2	3	3	2	3	2
14	2	2	3	2	2	3	3	2	2	2
15	2	2	2	4	2	4	3	2	2	2
16	2	3	3	4	2	4	3	2	2	2
17	2	3	3	3	3	4	3	2	2	2
18	2	3	2	2	3	4	3	5	6	2
19	2	2	2	2	2	4	3	5	6	2
20	2	2	2	5	3	5	5	5	6	2
21	2	2	2	5	3	5	5	2	3	2
22	2	2	3	5	2	5	5	2	3	2
23	2	2	2	5	2	4	3	2	3	2
24	2	2	2	2	2	4	3	2	3	3
25	2	2	2	4	2	4	3	4	3	3
26	4	3	3	2	2	4	3	4	3	3
27	4	3	2	2	2	4	3	3	3	3
28	3	3	2	2	2	4	3	3	3	3
29	3	2	2	2	2	3	4	3	3	3
30	3	2	4	2	3	4	4	2	3	3
31	3	2	3	2	3	4	4	2	2	3
32	3	2	2	2	3	5	4	2	3	3
33	3	2	2	2	2	6	4	2	3	2
34	2	2	2	2	3	7	3	2	3	2
35	2	2	2	2	2	7	3	2	3	2
36	2	4	2	2	3	7	3	3	3	2

No	P1-1	P1-2	P1-3	P1-4	P1-5	P2-1	P2-2	P2-3	P2-4	P2-5
37	2	4	3	2	2	6	3	3	3	2
38	4	4	2	2	2	6	3	3	3	2
39	4	2	2	2	2	7	3	3	3	2
40	4	3	2	3	3	7	4	2	3	2
41	4	3	4	2	3	6	4	2	3	2
42	4	3	2	2	2	6	4	2	4	3
43	4	3	2	3	2	3	3	3	2	3
44	2	3	3	3	3	3	3	3	2	3
45	2	2	3	3	2	3	3	2	2	3
46	2	2	2	2	3	6	3	2	2	3
47	2	2	2	2	3	6	3	3	3	2
48	3	2	3	3	3	6	3	3	3	2
49	3	2	2	2	2	6	3	3	3	2
50	3	2	2	2	2	6	3	3	3	2
51	3	2	3	3	3	4	3	3	2	2
52	3	2	2	4	3	4	4	3	2	2
53	2	2	2	3	3	4	4	3	2	2
54	2	3	2	2	3	4	4	3	2	2
55	2	3	3	3	4	4	4	3	2	2
56	2	2	2	2	4	4	4	2	3	2
57	2	2	2	2	4	4	4	2	3	2
58	2	3	2	2	3	4	4	2	3	3
59	2	3	3	2	3	3	4	2	4	3
60	2	3	2	2	2	3	3	2	3	2
61	2	3	3	2	3	3	3	2	4	2
62	2	3	3	2	2	3	3	2	4	2
63	2	3	3	2	2	3	3	2	4	2
64	2	3	3	2	2	3	3	2	4	3
65	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
66	2	2	3	2	2	3	3	3	2	2
67	2	2	3	2	2	3	3	3	2	3
68	2	2	2	3	2	6	3	3	3	3
69	2	2	3	3	2	6	4	3	3	3
70	2	2	3	3	3	6	4	2	3	4
71	3	2	3	3	2	6	4	2	2	4
72	2	3	2	2	2	6	4	2	3	4
73	2	2	2	2	3	6	3	2	3	3
74	2	2	4	3	3	6	3	2	3	4

No	P1-1	P1-2	P1-3	P1-4	P1-5	P2-1	P2-2	P2-3	P2-4	P2-5
75	4	2	3	2	2	4	3	3	3	4
76	4	2	4	2	2	4	3	3	2	4
77	4	3	4	2	2	4	3	3	2	4
78	2	3	3	2	3	4	3	2	2	3
79	3	4	2	2	2	4	3	2	2	3
80	4	3	3	2	2	6	2	2	2	4
81	4	2	3	2	2	6	3	2	3	3
82	4	4	3	2	2	6	3	2	3	2
83	3	2	3	2	3	4	3	2	3	2
84	3	3	2	2	2	4	2	3	3	2
85	3	3	2	2	3	4	2	3	2	3
86	3	3	2	2	3	4	2	3	2	3
87	3	3	2	2	2	4	2	2	2	3
88	3	4	2	3	2	7	3	3	6	3
89	3	3	2	2	3	6	3	3	6	3
90	3	2	2	2	3	5	5	3	4	3
91	3	2	2	2	2	6	5	3	5	3
92	2	2	2	2	4	6	5	3	4	4
93	2	2	2	2	3	6	4	3	4	4
94	2	2	2	2	2	5	4	3	4	4
95	2	2	3	2	2	0	5	5	5	4
96	2	3	3	2	3	5	4	5	5	3
97	2	2	2	2	2	4	4	5	4	3
98	2	2	2	3	4	4	4	5	4	2
99	3	3	2	2	2	3	5	4	5	2
100	3	3	2	2	3	3	5	4	6	2

\*Keterangan:

P1-x : Mencit nomor x dari kelompok P1

P2-x : Mencit nomor x dari kelompok P2

## Lampiran 4. Ethical Clearance



**KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO  
DAN RSUP dr KARIADI SEMARANG**  
Sekretariat : Kantor Dekanat FK Undip Lt.3  
Jl. Dr. Soetomo 18. Semarang  
Telp.024-8311523/Fax. 024-8446905



### **ETHICAL CLEARANCE** **No. 022/EC/FK/RSDK/2012**

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP. Dr. Kariadi Semarang, setelah membaca dan menelaah USULAN Penelitian dengan judul :

#### **UJI PAPARAN DIVINE KRETEK TERHADAP KARSINOGENESIS NASOFARING : STUDI EKSPERIMENTAL LABORATORIK PADA MENCIT C3H YANG DIINDUKSI FORMALDEHYDE**

Peneliti Utama : Risa Ardiani

Anggota Peneliti : Niken Maretasari Putri A.  
Widi Lestari

Penelitian : Dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan  
Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas  
Kedokteran Universitas Diponegoro  
Semarang

Setuju untuk dilaksanakan, dengan memperhatikan prinsip-prinsip yang dinyatakan dalam Deklarasi Helsinki 1975, dan Pedoman Nasional Etik Penelitian Kesehatan (PNEPK) Departemen Kesehatan RI 2004.

Pada laporan akhir peneliti harus melampirkan cara pemeliharaan & dekapitasi hewan coba.

Fakultas Kedokteran Undip  
Dekan



**dr. Endang Ambarwati, Sp.KFR**  
NIP. 19560806 198503 2 001

Semarang, 15 Februari 2012  
Komisi Etik Penelitian Kesehatan  
Fakultas Kedokteran Undip/RS. Dr. Kariadi  
Ketua



**Prof. Dr. dr. Tjahjono, Sp PA(K),FIAC**  
NIP. 19450514 197308 1 001

## Lampiran 5. Output SPSS

1. Dilakukan uji normalitas, didapatkan sebaran data tidak normal.

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Jumlah agnor	.337	20	.000	.740	20	.000

a. Lilliefors Significance Correction

2. Data ditransformasikan
3. Hasil transformasi data diuji normalitasnya.

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
agnor_trans	.346	20	.000	.742	20	.000

a. Lilliefors Significance Correction

4. Data tidak memenuhi syarat uji parametrik, kemudian dilakukan uji non parametrik Kruskal Wallis, dan uji *post hoc* Mann Whitney.

### Kruskal-Wallis Test

Ranks			
kelompok menci		N	Mean Rank
Jumlah agnor	k1	5	14.60
	k2	5	7.70
	p1	5	6.00
	p2	5	13.70
	Total	20	

Test Statistics <sup>a,b</sup>	
	Jumlah agnor
Chi-Square	9.782
Df	3
Asymp. Sig.	.021

## Mann-Whitney Test

**Ranks**

kelompok mencit	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah agnor k1	5	7.50	37.50
p1	5	3.50	17.50
Total	10		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Jumlah agnor
Mann-Whitney U	2.500
Wilcoxon W	17.500
Z	-2.372
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok mencit

**Ranks**

kelompok mencit	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah agnor k2	5	3.90	19.50
p2	5	7.10	35.50
Total	10		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Jumlah agnor
Mann-Whitney U	4.500
Wilcoxon W	19.500
Z	-1.848
Asymp. Sig. (2-tailed)	.065
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.095 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok mencit

**Ranks**

kelompok mencil	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah agnor p1	5	3.50	17.50
p2	5	7.50	37.50
Total	10		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Jumlah agnor
Mann-Whitney U	2.500
Wilcoxon W	17.500
Z	-2.390
Asymp. Sig. (2-tailed)	.017
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

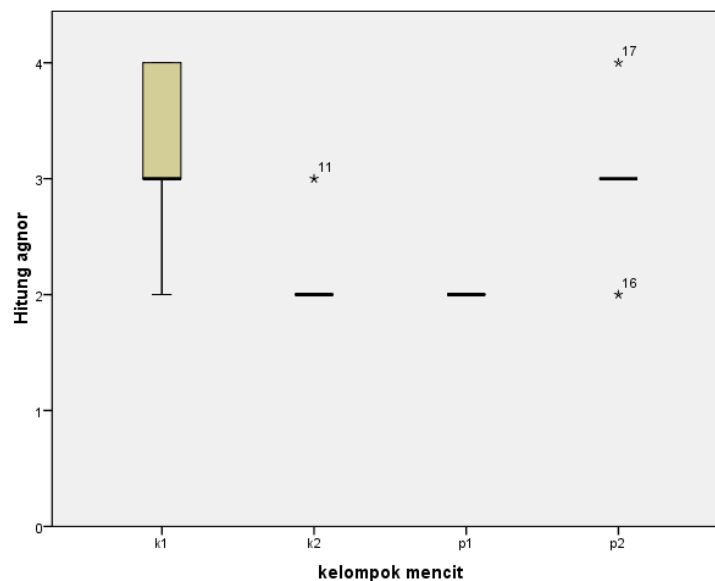
b. Grouping Variable: kelompok mencil

## 5. Mean dan median

**Statistics**

	k1	k2	p1	p2
N Valid	5	5	5	5
Missing	0	0	0	0
Mean	3.2000	2.2000	2.0000	3.0000
Median	3.0000	2.0000	2.0000	3.0000
Std. Deviation	.83666	.44721	.00000	.70711

## 6. Grafik Boxplot



**Lampiran 6. Biodata Mahasiswa****Identitas**

Nama : Risa Ardiani  
NIM : G2A008158  
Tempat/tanggal lahir : Purwakarta/8 Juni 1990  
Jenis kelamin : Perempuan  
Alamat : Jalan Bergota no.536, Semarang  
Nomor HP : 081803311123  
e-mail : ardiani.risa@gmail.com

**Riwayat Pendidikan Formal**

1. SD : SDN Jendral Sudirman 1 Purwakarta. Lulus tahun: 2002
2. SMP : SMP N 1 Purwakarta. Lulus tahun: 2005
3. SMA : SMA N 1 Purwakarta Lulus tahun: 2008
4. FK UNDIP : Masuk tahun : 2008

**Keanggotaan Organisasi**

1. BEM KU Bidang Kesejahteraan Mahasiswa UNDIP Tahun 2009 s/d 2010
2. SYIAR ROHIS KU UNDIP Tahun 2009 s/d 2010

**Pengalaman mengikuti lomba karya ilmiah**

1. Anisatusholihah, Andi Ayu Lestari, Risa Ardiani. The Effects of Gorgonian Isis Hipuris on Histologic Grade Score of Adenocarcinoma Mammae Tissue in C3H Strain Mice. Poster Ilmiah Scientific Fair FK UNDIP 2009, Juara 2.

2. Ayu Fitri Sekar Wulandari, Indi Himma Khairani, Risa Ardiani. Sahabat Diabetisi Dengan Kartu Evaluasi Penatalaksanaan Diabetisi Sebagai Perpanjangan Tangan Edukator Diabetes: dalam Rangka Menyukkseskan Program Edukasi Diabetes. DIKTI, Lolos PKM-GT 2010.
3. Andi Ayu Lestari, Jati Sumilih, Febrina Ernawati, Risa Ardiani. Optimalisasi Peran Usaha Kesehatan Sekolah (UKS) Melalui Program Gerakan oleh Siswa Berantas Sarang Nyamuk (GOSBASMUK) Guna Menurunkan Angka Kejadian Demam Berdarah Dengue (DBD) di Indonesia, TEMILNAS BAPIN ISMKI 2010, finalis lomba poster ilmiah.
4. Risa Ardiani, Niken Mareta, Widi Lestari. Uji Paparan Divine kretek Terhadap Karsinogenesis Nasofaring: Studi Eksperimental Laboratorik pada Mencit C3H yang Diinduksi Formaldehyde. DIKTI. Lolos PKM-P untuk didanai 2012.