

DISERTASI

**POTENSI KERANG POKEA (*Batissa violaceae celebensis*
Martens 1897) SEBAGAI IMUNOSTIMULAN DAN
ANTI PROLIFERASI SEL KANKER SECARA
IN VITRO DAN *IN VIVO* PADA MENCIT BALB/c**



**SRI ANGGARINI RASYID
C013191014**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**Potensi Kerang Pokea (*Batissa violacea celebensis* Marten 1897)
sebagai Immunostimulan dan Anti Proliferasi Sel Kanker secara *in*
Vitro dan *in Vivo* pada Mencit BALB/c**

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi
Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

Sri Anggarini Rasyid
C013191014

Kepada

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

DISERTASI

POTENSI KERANG POKEA (*Batissa Violaceae Celebensis* Martens 1897) SEBAGAI IMUNOSTIMULAN DAN ANTI PROLIFERASI SEL KANKER SECARA *IN VITRO* DAN *IN VIVO* PADA MENCIT BALB/C


Potential of Pokea Shellfish (*Batissa violacea celebensis* Marten 1897) as Immunosstimulant and Anti-Proliferation of Cancer Cells in Vitro and Vivo in BALB/c Mice

Disusun dan diajukan
Oleh

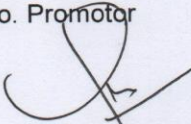
Sri Anggarini Rasyid
C013191041

Telah dipertahankan di hadapan Penilai Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal, 9 Desember 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan


Menyetujui
Promotor,


Prof. Dr. dr. Suryani As'ad, M.Sc, Sp.GK(K)
Nip. 19600504 198601 2 002


Co. Promotor


dr. Upik A. Miskad, Ph.D, Sp.PA(K)
Nip. 197403302005012001

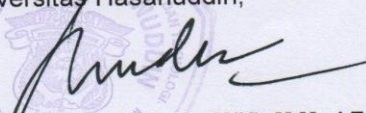
Co. Promotor


dr. Rahmawati Minhajati, Ph.D, Sp.PD-KHOM, FINASIM
Nip. 19680218 199903 2 002

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,


dr. Agussalim Bukhari, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)
Nip. 19700821 199903 1 001

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,


Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed
Nip. 19661213 199503 1 009

ABSTRAK

SRI ANGGARINI RASYID. *Potensi Kerang Pokea (Batissa violaceae celebensis Marten 1897) sebagai Imunostimulan dan Anti Proliferasi Kanker secara in Vitro dan in Vivo pada Mencit BALB/c.* (dibimbing oleh **Suryani As'ad, Upik A Miskad, dan Rahmawati Minhajat**)

Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat pengaruh intervensi ekstrak kerang pokea (*Batissa violaceae celebensis Marten 1897*) terhadap aktivitas imunostimulan dan penghambatan proliferasi sel kanker secara *in vitro* dan *in vivo* pada mencit BALB/c.

Hasil karakterisasi kerang pokea dari kandungan fitokimianya mengandung flavonoid, fenol, steroid dan triterpenoid, memiliki aktivitas antioksidan yang masih tergolong lemah, serta memiliki senyawa yang bersifat sitotoksik. Uji aktivitas ekstrak kerang pokea terhadap proliferasi sel limfosit secara *in vitro* menunjukkan bahwa ketiga ekstrak kerang pokea (Etanol, Etil asetat dan N-Hexana) mampu meningkatkan proliferasi sel limfosit pada konsentrasi 1000 µg/ml dan memiliki perbedaan signifikan ($P < 0,05$) dibanding dengan kontrol normal. Uji aktivitas anti proliferasi ekstrak kerang pokea (Etil asetat dan N-Hexana) memiliki perbedaan signifikan ($P < 0,05$) dalam menghambat proliferasi sel kanker A-549, tetapi tidak memiliki perbedaan signifikan ($P > 0,05$) dengan ekstrak etanol. Uji aktivitas anti proliferasi ekstrak N-Hexana menunjukkan perbedaan signifikan ($P < 0,05$) dalam menghambat proliferasi sel kanker Hepatoma, tapi tidak memiliki perbedaan signifikan ($P > 0,05$) pada sel kanker MCF-7. Uji Aktivitas anti proliferasi ekstrak terpurifikasi kerang pokea (ekstrak etanol (Et), fraksi etil asetat (FEa) dan Fraksi N-Hexana (FNH) juga menunjukkan perbedaan signifikan ($P < 0,05$) dalam menghambat proliferasi sel kanker WiDr.

Pada uji *in vivo* menunjukkan bahwa ekspresi Ki-67 pada kelompok perlakuan Et, FEa dan FNH memiliki perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) dengan kelompok kontrol positif, tetapi tidak berbeda signifikan dengan kontrol negatif dalam menghambat proliferasi sel epitel kolon mencit yang sudah mengalami colitis atau dysplasia ringan, sementara aktivitas imunostimulan terhadap ekspresi CD-8 menunjukkan bahwa ekstrak terpurifikasi (Et, FEa dan FNh) memiliki perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif dalam memicu proliferasi sel T sitotoksik. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak kerang pokea berpotensi sebagai anti proliferasi dan imunostimulan.

Kata kunci : Kerang Pokea, *in vitro*, *in vivo*, sel kanker, imunostimulan, IHC, Ki-67, CD-8



ABSTRACT

SRI AGGARINI RASYID. Potential of Pokea Shellfish (*Batissa violacea celebensis* Marten 1897) as Immunostimulant and Anti-Proliferation of Cancer Cells in Vitro and in Vivo in BALB/c Mice. (supervised by **Suryani As'ad, Upik A Miskad, and Rahmawati Minhajat**)

The purpose of this study was to examine the effect of interventional pokea shellfish extract (*Batissa violaceae celebensis* Marten 1897) on immunostimulant activity and inhibition of cancer cell proliferation in vitro and in vivo in BALB/c mice.

The results of the characterization of pokea shellfish from their phytochemical content contain flavonoids, phenols, steroids and triterpenoids, have weak antioxidant activity, and have cytotoxic compounds. Pokea shellfish extract activity test on lymphocyte cell proliferation in vitro showed that the three pokea shellfish extracts (Ethanol, Ethyl acetate and N-Hexane) were able to increase lymphocyte cell proliferation at a concentration of 1000 g/ml and had a significant difference ($P < 0.05$) compared to normal controls. Anti-proliferative activity test of pokea shellfish extract (Ethyl acetate and N-Hexane) had a significant difference ($P < 0.05$) in inhibiting the proliferation of A-549 cancer cells, but did not have a significant difference ($P > 0.05$) with ethanol extract. The anti-proliferative activity test of N-Hexane extract showed a significant difference ($P < 0.05$) in inhibiting the proliferation of hepatoma cancer cells, but no significant difference ($P > 0.05$) in MCF-7 cancer cells. Anti-proliferative activity test of purified extract of pokea shellfish (ethanol extract (Et), ethyl acetate (FEa) fraction and N-Hexane (FNH) fraction) also showed significant differences ($P < 0.05$) in inhibiting WiDr cancer cell proliferation.

In vivo showed that the expression of Ki-67 the Et, FEa and FNH treatment groups had a significant difference ($P < 0.05$) with the positive control group, but not significantly different from the negative control in inhibiting the proliferation of colonic epithelial cells in mice that had colitis or mild dysplasia, while immunostimulant activity on CD-8 expression showed that purified extracts (Et, FEa and FNh) had a significant difference ($P < 0.05$) compared to positive and negative controls in triggering cytotoxic T cell proliferation. It can be concluded that Pokea shellfish extract has the potential as an anti-cancer cell proliferation and immunostimulant.

Key words : Pokea shellfish, in vitro, in vivo, cancer cells, immunostimulant, IHC, Ki-67, CD-8





KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
Jl. Perintis Kemerdekaan Kampus Tamalanrea Km. 10 Makassar 90245
Telp. (0411) 586010 EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Sri Anggarini Rasyid
NIM : C013191014
Program studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

Potensi Kerang Pokea (*Batissa violacea celebensis* Marten 1897) sebagai Imunostimulan dan Anti Proliferasi Kanker secara *in Vitro* dan *in Vivo* pada Mencit BALB/c

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambil alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 10 Desember 2021

Yang Menyatakan,



Sri Anggarini Rasyid

DAFTAR TIM PENGUJI

- Promotor : Prof. Dr. dr. Suryani As'ad, M.Sc., Sp.GK(K)
- Co-Promotor : dr. Upik A. Miskad, Ph.D., Sp.PA(K)
- Co-Promotor : dr. Rahmawati Minhajat, Ph.D, Sp.PD-KHOM
- Anggota : 1. Prof. Oslan Jumadi, S.Si., M.Phil, Ph.D
2. Prof. Dr. Dirayah R. Husain, DEA
3. dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K)
4. Dr. dr. Ika Yustisia., S.Ked, M.Sc
5. Dr. Eddyman W. Ferial., S.Si., M.Si
6. Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS

PRAKATA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat, nikmat kesempatan dan kesehatan serta karuniaNya sehingga dapat menyelesaikan penulisan disertasi dengan judul “Potensi Kerang Pokea (*Batissa violacea celebensis* Marten 1897) sebagai Imunostimulan dan Anti Proliferasi Kanker secara *in Vitro* dan *in Vivo* pada Mencit BALB/c”. Disertasi ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar Doktor di Universitas Hasanuddin, Program Studi Ilmu kedokteran.

Selesainya penulisan disertasi ini berkat bantuan berbagai pihak, sehingga penulis ingin menyampaikan rasa hormat, terimakasih dan penghargaan yang tak terhingga pada Prof. Dr. dr. Suryani As"ad, M.Sc, Sp.Gk(K) sebagai Promotor, dr. Upik A Miskad, Ph.D, Sp.PA(K) dan dr. Rahmawati Minhajat, Ph.D., Sp.PD-KHOM sebagai Co-Promotor yang telah banyak memberikan inspirasi, membantu mengatasi masalah, memberikan bimbingan dan motivasi sampai penulis dapat menyelesaikan disertasi ini.

Terimakasih juga kepada tim penguji eksternal, Prof. Oslan Jumadi, S.Si., M.Phil, Ph.D yang senantiasa membimbing memberikan saran dan masukan yang sangat berarti dalam penyusunan disertasi, Prof. Dr. Diraya R. Husain, DEA, dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K), Dr. dr. Ika Yusticia, S.Ked, M.Sc, Dr. Eddyman W. Ferial, S.Si., M.Si dan Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS yang banyak memberi saran dan masukan dalam penulisan ini mulai dari penyempurnaan judul, memberi dukungan dalam penelitian ini, serta bersedia meluangkan waktu untuk berdiskusi.

Di kesempatan ini penulis juga menyampaikan ucapan terimakasih yang sangat dalam sebagai wujud penghargaan yang tulus kepada kedua orang tua tercinta ayahanda Abdul Rasyid Latief, SKM (alm) semoga beliau mendapat tempat yang mulia disisi Allah SWT dan ibunda Hj. Dahriaty Rasyid (alm) yang semasa hidupnya beliau selalu memberikan

kasih sayang yang tulus dalam memelihara dan membesarkan serta selalu memberi dorongan, semangat, bantuan dan doa selama ini kepada penulis, semoga beliau mendapat tempat yang mulia disisi Allah SWT, kepada Kakanda Mariyatni Rasyid, SKM., M.Kes, yang selalu memberi semangat dan motivasi untuk segera menyelesaikan studi, serta kepada bapak mertua Ir. H. Sirajuddin Taora yang memberi semangat, dan dukungan serta ibu Mertua Hj. Hasto Kirmani (alm) yang memberi semangat, dukungan dan doa semasa hidupnya semoga beliau mendapat tempat yang mulia di sisi Allah SWT.

Teristimewa kepada suami tercinta Dr. Ridwan Adi Surya, S.Si., M.Si, terimakasih yang tak terhingga atas segala kesabaran, semangat, motivasi dan dukungan moril dan material serta curahan doa selama penulis menempuh pendidikan dan kepada anak kami tersayang Zahra Althafunnisa, Zaki Abqary Ridwan, dan Zayn Raffasya Ridwan terimakasih atas pengorbanan, dukungan, pengertian dan doa kalian selama ibu mengikuti pendidikan.

Kepada Adinda Dr. Rahmawati, SKM., M.Kes terimakasih banyak selalu siap menemani mulai dari awal proses menjadi calon mahasiswa S3 Ilmu Kedokteran sampai tahap penyelesaian. Terimakasih juga kepada dr. Olive PPDS Patologi Anatomi yang telah banyak membantu penulis dalam proses belajar secara otodidak dalam hal pembacaan sampel HE dan IHC.

Terimakasih juga kepada staf dan Laboran Laboratorium Kultur Jaringan Divisi Patologi Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan (FKH) IPB University, dan Pusat Studi Satwa Primata IPB, Laboratorium Fitofarmaka Prodi Farmasi UMW, dan Laboratorium Patologi anatomi Lt. 1 RSP. Universitas Hasanuddin (UNHAS) yang telah banyak membantu dalam proses penelitian.

Melalui kesempatan ini juga penulis menyamp aikan ucapan terimakasih yang setinggi-tingginya kepada :

1. Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, MA selaku rektor Universitas Hasanuddin Makassar yang telah memberikan kesempatan bagi penulis untuk mengikuti program pendidikan Doktor di Universitas Hasanuddin.
2. Kementerian Ristek dan DIKTI yang telah memberikan bantuan Hibah Disertasi Doktor selama penulis mengikuti pendidikan di Universitas Hasanuddin.
3. Prof. dr. Budu, Ph.D., Sp.M.,KVR sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin yang telah memberikan kesempatan bagi penulis untuk mengikuti program pendidikan Doktor.
4. dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K) selaku ketua program studi S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hassanuddin yang telah memberikan fasilitas dan kemudahan demi kelancaran penyelesaian disertasi ini.
5. Ketua Badan Pengurus Yayasan Mandala Waluya Kendari dan Rektor Universitas Mandala Waluya yang telah memberikan izin kepada penulis untuk mengikuti pendidikan program S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin dan bantuan biaya Pendidikan dan penelitian serta dukungan sehingga penulis dapat menyelesaikan masa studi.
6. Seluruh dosen pengajar S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hassanuddin yang telah memberikan bekal ilmu yang sangat bermanfaat bagi penulis.
7. Pengelola Prodi S3, Pak Akmal, Pak Mumu dan Pak Rahmat yang sangat banyak membantu mulai dari proses perkuliahan sampai pada tahap penyelesaian disertasi.
8. Kepada adik-adik mahasiswa Prodi D4 TLM Universitas Mandala Waluya. Renaldi, Andika, Dewa, Yayan, Rio, Resfita, Ilma, Ainun, Yusmar dan Dini, kalian adik-adikku yang luar biasa, serta teman-teman mahasiswa S3 angkatan 2019 terimakasih atas kebersamaan dalam suka dan duka, bantuan dan dukungan selama perkuliahan.

9. Teman-teman dosen dan staf Universitas Mandala Waluya terima kasih, atas dorongan, dukungan dan doa selama peneliti mengikuti masa studi Doktor di Universitas Hasanuddin Makassar.
10. Semua pihak yang telah ikut membantu dalam kelancaran penulisan disertasi ini.

Tiada kata yang dapat kami ucapkan selain ungkapan terimakasih yang tak terhingga serta doa kepada Allah SWT, semoga seluruh bantuan, simpati dan doa yang disampaikan untuk penulis mendapat balasan dan pahala yang berlipat dari yang Maha kuasa. Semoga disertasi ini dapat bermanfaat bagi semua masyarakat. Aamiin.

Makassar, Oktober 2021

Penulis

Sri Anggarini Rasyid

ABSTRAK

SRI ANGGARINI RASYID. *Potensi Kerang Pokea (Batissa violacea celebensis Marten 1897) sebagai Imunostimulan dan Anti Proliferasi Kanker secara in Vitro dan in Vivo pada Mencit BALB/c.* (dibimbing oleh **Suryani As'ad, Upik A Miskad,** dan **Rahmawati Minhajat**)

Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat pengaruh intervensi ekstrak kerang pokea (*Batissa violaceae celebensis Marten 1897*) terhadap aktivitas Imunostimulan dan penghambatan proliferasi sel kanker secara *in vitro* dan *in vivo* pada mencit BALB/c.

Hasil karakterisasi kerang pokea dari kandungan fitokimianya mengandung flavonoid, fenol, steroid dan triterpenoid, memiliki aktivitas antioksidan yang masih tergolong lemah, serta memiliki senyawa yang bersifat sitotoksik. Uji aktivitas ekstrak kerang pokea terhadap proliferasi sel limfosit secara *in vitro* menunjukkan bahwa ketiga ekstrak kerang pokea (Etanol, Etil asetat dan N-Hexana) mampu meningkatkan proliferasi sel limfosit pada konsentrasi 1000 µg/ml dan memiliki perbedaan signifikan ($P < 0,05$) dibanding dengan kontrol normal. Uji aktivitas anti proliferasi ekstrak kerang pokea (Etil asetat dan N-Hexana) memiliki perbedaan signifikan ($P < 0,05$) dalam menghambat proliferasi sel kanker A-549, tetapi tidak memiliki perbedaan signifikan ($P > 0,05$) dengan ekstrak etanol. Uji aktivitas anti proliferasi ekstrak N-Hexana menunjukkan perbedaan signifikan ($P < 0,05$) dalam menghambat proliferasi sel kanker Hepatoma, tapi tidak memiliki perbedaan signifikan ($P > 0,05$) pada sel kanker MCF-7. Uji Aktivitas anti proliferasi ekstrak terpurifikasi kerang pokea (ekstrak etanol (Et), fraksi etil asetat (FEa) dan Fraksi N-Hexana (FNH) juga menunjukkan perbedaan signifikan ($P < 0,05$) dalam menghambat proliferasi sel kanker WiDr.

Pada uji *in vivo* menunjukkan bahwa ekspresi Ki-67 pada kelompok perlakuan Et, FEa dan FNH memiliki perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) dengan kelompok kontrol positif, tetapi tidak berbeda signifikan dengan kontrol negatif dalam menghambat proliferasi sel epitel kolon mencit yang sudah mengalami colitis atau dysplasia ringan, sementara aktivitas imunostimulan terhadap ekspresi CD-8 menunjukkan bahwa ekstrak terpurifikasi (Et, FEa dan FNh) memiliki perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif dalam memicu proliferasi sel T sitotoksik. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak kerang pokea berpotensi sebagai anti proliferasi dan imunostimulan.

Kata kunci : Kerang Pokea, *in vitro*, *in vivo*, sel kanker, imunostimulan, IHC, Ki-67, CD-8



ABSTRACT

SRI AGGARINI RASYID. Potential of Pokea Shellfish (*Batissa violacea celebensis* Marten 1897) as Immunostimulant and Anti-Proliferation of Cancer Cells in Vitro and in Vivo in BALB/c Mice. (supervised by **Suryani As'ad, Upik A Miskad,** and **Rahmawati Minhajat**)

The purpose of this study was to examine the effect of interventional pokea shellfish extract (*Batissa violaceae celebensis* Marten 1897) on immunostimulant activity and inhibition of cancer cell proliferation in vitro and in vivo in BALB/c mice.

The results of the characterization of pokea shellfish from their phytochemical content contain flavonoids, phenols, steroids and triterpenoids, have weak antioxidant activity, and have cytotoxic compounds. Pokea shellfish extract activity test on lymphocyte cell proliferation in vitro showed that the three pokea shellfish extracts (Ethanol, Ethyl acetate and N-Hexane) were able to increase lymphocyte cell proliferation at a concentration of 1000 g/ml and had a significant difference ($P < 0.05$) compared to normal controls. Anti-proliferative activity test of pokea shellfish extract (Ethyl acetate and N-Hexane) had a significant difference ($P < 0.05$) in inhibiting the proliferation of A-549 cancer cells, but did not have a significant difference ($P > 0.05$) with ethanol extract. The anti-proliferative activity test of N-Hexane extract showed a significant difference ($P < 0.05$) in inhibiting the proliferation of hepatoma cancer cells, but no significant difference ($P > 0.05$) in MCF-7 cancer cells. Anti-proliferative activity test of purified extract of pokea shellfish (ethanol extract (Et), ethyl acetate (FEa) fraction and N-Hexane (FNH) fraction) also showed significant differences ($P < 0.05$) in inhibiting WiDr cancer cell proliferation.

In vivo showed that the expression of Ki-67 the Et, FEa and FNH treatment groups had a significant difference ($P < 0.05$) with the positive control group, but not significantly different from the negative control in inhibiting the proliferation of colonic epithelial cells in mice that had colitis or mild dysplasia, while immunostimulant activity on CD-8 expression showed that purified extracts (Et, FEa and FNh) had a significant difference ($P < 0.05$) compared to positive and negative controls in triggering cytotoxic T cell proliferation. It can be concluded that Pokea shellfish extract has the potential as an anti-cancer cell proliferation and immunostimulant.

Key words : Pokea shellfish, in vitro, in vivo, cancer cells, immunostimulant, IHC, Ki-67, CD-8



DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI.....	iv
LEMBAR PENGUJI.....	v
PRAKATA.....	vi
ABSTRAK.....	xi
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	7
1.2. Rumusan Masalah.....	8
1.3. Tujuan Penelitian.....	9
1.4. Manfaat Penelitian.....	10
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1. Tinjauan Umum tentang Kerang Pokea.....	11
2.2. Senyawa Aktif pada Moluska.....	15
2.3. Mekanisme Molusca dalam aktivitas penghambatan sel kanker.....	18
2.4. Mekanisme Molusca dalam Aktivitas Imunostimulan.....	26
2.5. Patogenesis Kanker.....	37
2.6. Anti Kanker.....	45
2.7. Kerangka Teori.....	46
2.8. Kerangka Konsep dan Variabel Penelitian.....	47
2.9. Variabel Penelitian.....	48

2.10. Definisi Operasional.....	49
2.11. Hipotesis Penelitian.....	50
BAB III METODE PENELITIAN.....	50
3.1. Jenis Penelitian, tempat dan waktu penelitian.....	50
3.2. Ruang Lingkup Penelitian dan tahapan penelitian.....	52
3.2.1. Tahap Pertama Penelitian.....	53
3.2.2. Tahap Kedua Penelitian.....	58
3.2.3. Tahap Ketiga Penelitian.....	65
3.3. Analisis Data.....	65
3.7. Etika Penelitian.....	66
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	66
4.1. Hasil Penelitian.....	88
4.2. Pembahasan Hasil Penelitian.....	121
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	121
5.1. Kesimpulan.....	122
5.2. Saran.....	123
DAFTAR PUSTAKA.....	141
LAMPIRAN-LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel 1	Hasil uji fitokimia ekstrak kasar daging kerang pokea	66
Tabel 2	Hasil uji Kuantitatif ekstrak terpurifikasi (ekstrak etanol, fraksi Etil asetat, dan fraksi N-Hexan kerang pokea)	67
Tabel 3	Indeks stimulasi proliferasi sel limfosit ekstrak Kerang pokea (ekstrak etanol (EM), ekstrak etil asetat (EEA), ekstrak N-Hexane	69
Tabel 4	Aktivitas antiproliferasi ekstrak etanol (Em), Ekstrak etil asetat (EEA) dan Ekstrak Hexana (ENH) kerang Pokea terhadap sel lestari kanker A549	71
Tabel 5	Aktivitas antiproliferasi ekstrak N-Hexana kerang pokea terhadap sel lestari kanker MCF-7 dan Hepatoma	73
Tabel 6	Aktivitas antiproliferasi ekstrak terpurifikasi kerang pokea (ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan Fraksi N-Hexana terhadap sel lestari kanker WiDr	76
Tabel 7	Data Morfologi Hati Mencit	78
Tabel 8	Profil kolon mencit BALB/c dengan pewarnaan HE	81
Tabel 9	Ekspresi KI-67 pada Lesi Pra Kanker Kolon Mencit BALB/c Pasca Pemberian Ekstrak Terpurifikasi	83
Tabel 10	Ekspresi CD-8 pada Lesi Pra Kanker Kolon Mencit BALB/c Pasca Pemberian Ekstrak Terpurifikasi	86

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Morfologi kerang pokea (<i>B. violacea celebensis</i> Martens 1897)	10
Gambar 2	Mekanisme kerja peptida antikanker melalui jalur mitokondria dan jalur yang diinduksi oleh death reseptor (Apoptosis).	16
Gambar 3	Representasi skematis dari mekanisme aksi apoptosis yang diinduksi Kerang air tawar <i>Corbicula fluminea</i> Muller yang diekstraksi dengan metanol kemudian dipartisi dengan etil asetat (FME) dalam sel HL-60.	17
Gambar 4	Mekanisme kerja Hidrolisat Protein sebagai Imunomodulator	19
Gambar 5	Respon Imun terhadap Tumor	21
Gambar 6	Priming dan Inaktivasi sel T CD-8	24
Gambar 7	Skema Dasar Molekuler Penyakit Kanker	28
Gambar 8	Hallmarck of Cancer	31
Gambar 9	Reaksi MTT (3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide).	43
Gambar 10	Kerangka Teori	46
Gambar 11	Kerangka Konsep	47
Gambar 12	Bagan Alir Ruang Lingkup Penelitian	51
Gambar 13	Diagram Alir Penelitian Uji <i>in vivo</i>	61
Gambar 14	Nilai LC50 ekstrak kasar kerang pokea	68
Gambar 15	Indeks stimulasi proliferasi sel limfosit ekstrak Kerang pokea	68
Gambar 16	Profil sel limfosit pada perbesaran dengan lensa obyektif <i>inverted microscope</i> 100 kali.	70
Gambar 17	Profil Penghambatan proliferasi sel lestari kanker A-549	71
Gambar 18	Profil sel A549 pada perbesaran dengan lensa obyektif <i>inverted microscope</i> 100 kali.	72

Gambar 19	Profil proliferasi sel lestari kanker Hepatoma dan MCF-7 setelah pemberian Ekstrak N-Hexan Kerang poka	73
Gambar 20	Profil penghambatan sel kanker oleh ekstrak N-Hexana kerang poka	74
Gambar 21	Profil penghambatan proliferasi sel lestari kanker WiDr setelah pemberian Ekstrak terpurifikasi kerang poka (Ekstrak Etanol (EM), Fraksi Etil Asetat (FEA) dan Fraksi N-Hexan	75
Gambar 22	Profil sel WiDr pada perbesaran dengan lensa obyektif <i>inverted microscope</i> 100 kali.	77
Gambar 23	Profil Makroskopis Organ Hati mencit (<i>Mus musculus</i>)	78
Gambar 24	Profil Makroskopis Organ kolon mencit (<i>Mus musculus</i>)	79
Gambar 25	Profil Mikroskopis Organ Hati mencit (<i>Mus musculus</i>)	79
Gambar 26	Profil Mikroskopis Organ Kolon mencit (<i>Mus musculus</i>)	80
Gambar 27	Grafik Rata-Rata Ekspresi Ki-67	82
Gambar 28	Gambaran Mikroskopis Ekspresi Ki-67 pada Sel Epitel Kolon Mencit dengan Perbesaran 400X.	84
Gambar 29	Grafik Rata-Rata Ekspresi CD-8	85
Gambar 30	Gambaran Mikroskopis Ekspresi CD-8 pada Sel Epitel Kolon Mencit dengan Perbesaran 400X	87

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Saat ini, permintaan untuk memperoleh zat yang aman dan tidak beracun serta dapat meningkatkan respon imun seluler dan humoral terhadap kanker semakin meningkat. Di antaranya immunostimulan, hemocyanin, glikoprotein pengangkut oksigen, banyak ditemukan dalam moluska, yang telah terbukti mampu memicu dengan kuat respon seluler dan humoral terhadap kanker tertentu, tidak memiliki efek samping yang toksik, sehingga ideal untuk perawatan dalam jangka panjang (Arancibia *et al.* 2014)

Kerang pokea (*Batissa violacea celebensis* Marten 1897) merupakan jenis bivalvia dari Famili *Corbiculidae* yang ditemukan di Sungai Pohara Kabupaten Konawe, Sulawesi Tenggara (Nur Irawati 2014). Kerang pokea mendiami dasar perairan dengan tekstur substrat berpasir. Kerang ini juga menyukai perairan dengan arus kuat dan hidup berkelompok sebagai bentuk adaptasi (Bahtiar *et al.* 2018)

Kerang pokea telah menjadi salah satu sumber mata pencaharian masyarakat disekitar Sungai Pohara, masyarakat sering menjuluki kerang pokea dengan akronim nama sungai "Pohara" yaitu Pokea Harapan Rakyat. Kerang pokea biasa diperdagangkan dalam bentuk segar utuh, segar kupas, dan sate. Selama proses pengolahan, kandungan gizi suatu bahan dapat hilang atau rusak karena kepekaan terhadap panas, pH, oksigen, cahaya, maupun kombinasi dari beberapa faktor tersebut. Kerang pokea dimanfaatkan oleh masyarakat setempat, yaitu dikonsumsi sehari-hari dengan cara direbus. Hal ini diduga dapat berpengaruh terhadap kandungan gizinya. (Yenni, 2012).

Kerang pokea secara empiris dipercaya mampu mengobati berbagai penyakit seperti penyakit kuning, malaria, asma, menurunkan tekanan darah dan demam. Penyakit tersebut terjadi akibat infeksi oleh bahan asing maupun mikroorganisme. Pada saat tubuh terinfeksi mikroorganisme, tubuh akan merespon dengan mekanisme aktivitas makrofag dan netrofil (Winarsi 2007).

Kerang dapat hidup di lingkungan yang bersih maupun tercemar. Bila hidup di lingkungan perairan yang tercemar maka ia akan memiliki sistem pertahanan tubuh yang spesifik termasuk melawan zat-zat yang bersifat racun dan karsinogenik. Kerang mengandung senyawa glikoprotein yang dapat berperan sebagai zat imunomodulator dengan aktivitas tinggi (Chi et al. 2015). Penelitian tentang kerang pokea sampai saat ini masih sangat terbatas, penelitian-penelitian terkait moluska sebagai imunomodulator dan anti kanker diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya pada jenis-jenis kerang yang berbeda.

Penelitian yang dilakukan oleh Waranmaselembun (2007), melaporkan bahwa kerang mas ngur dalam bentuk kering memiliki kandungan air sebesar 7,84%; protein 56,08 %; lemak 5,95 %; karbohidrat 21 %; dan juga mempunyai aktivitas sebagai inhibitor topoisomerase I dengan mekanisme poison. Enzim topoisomerase berfungsi dalam replikasi DNA dan ditemukan dalam jumlah berlebihan pada sel kanker, sehingga inhibitor enzim tersebut berpotensi sebagai senyawa antikanker.

Ruditapes philippinarum adalah genus moluska kerang laut, dalam keluarga Veneridae. *R. philippinarum* adalah endemik di perairan Asia Timur, dan sangat umum di pantai berpasir dan dataran pasang surut di sepanjang pantai Asia Timur. Ini adalah salah satu spesies budidaya kerang laut utama di Asia Timur dan Mediterania, dan telah digunakan sebagai makanan. Beberapa penelitian telah melaporkan turunan peptida sebagai antikanker yang berasal dari

sumber makanan laut dan potensinya untuk digunakan sebagai antikanker alternatif (Kim et al. 2013)

Baru-baru ini telah dikembangkan cara untuk mempelajari sifat struktural, komposisi dan sekuensial dari peptida bioaktif dan bioaktivitas seperti efek antioksidan, antihipertensi dan imunomodulator. Beberapa penelitian baru-baru ini melaporkan pembentukan peptida antioksidan secara *in vitro* dari sumber makanan laut dan kemungkinannya untuk digunakan sebagai antioksidan alternatif. Antioksidan juga telah diusulkan sebagai kandidat yang berpotensi cocok untuk pencegahan dan pengobatan penyakit terkait dengan spesies oksigen aktif, terutama berlaku untuk penyakit kanker (Chi et al. 2015).

Selama beberapa dekade terakhir, beberapa penelitian yang mengeksplorasi potensi biomassa laut banyak dilakukan, yaitu Peptida biofungsional adalah fragmen protein yang biasanya berukuran mulai dari 2 hingga 20 residu asam amino dan berhubungan dengan berbagai fungsi fisiologis potensial termasuk imunomodulator, antimikroba, antitrombotik, agonis opioid atau antagonis dan aktivitas antihipertensi. Selanjutnya, biopeptida antikanker diisolasi dari organisme laut seperti sepon, ascidia, moluska dan karang lunak (Chen et al. 2018).

Beberapa peptida bioaktif telah menunjukkan aktivitas multifungsi berdasarkan komposisi asam aminonya, urutannya, strukturnya dan faktor-faktor lain termasuk hidrofobisitas, muatan atau sifat pengikat unsur mikro. Beberapa peptida biofungsional telah dilaporkan berasal dari sumber ikan, tetapi sumber krustasea dan moluska belum diteliti secara luas. Hidrolisat Protein dan peptida dari moluska dan krustasea telah menunjukkan aktivitas antioksidan secara *in vitro*. Saat ini, senyawa alami yang diekstraksi bersumber dari moluska laut ada empat jenis agen antikanker yang berbeda secara struktural dalam uji klinis pada kelas polypeptides, terpene,

steroid dan peptida. Peptida biofungsional laut dapat dibuat dengan salah satu dari tiga metode seperti ekstraksi pelarut, hidrolisis enzimatis, dan fermentasi mikroba protein makanan (Zhang et al. 2013).

Dalam suatu penelitian, hidrolisis proteolitik dan fraksinasi pada jenis kerang biru, *Mytilus edulis*, dilakukan dengan metode yang dikembangkan di pusat fraksinasi Merinov, Gaspé. Fraksi berbeda yang diperoleh diuji aktivitas anti-proliferasi terhadap empat sel kanker yaitu: sel epitel paru tipe A549 II, sel karsinoma usus HCT15, sel karsinoma payudara BT549 dan sel kanker prostat PC3. Penghambatan pertumbuhan sel ditentukan oleh metode pengukuran pendaran. Tujuannya adalah untuk menargetkan fraksi dengan aktivitas penghambatan tertinggi pada sel kanker yang berbeda dan untuk melakukan karakterisasi awal fraksi (Beaulieu et al. 2013).

Tegillarca L. granosa adalah jenis kerang Malaysia. Ekstrak *TL granosa* adalah komponen dari formula pengobatan Tiongkok yang digunakan untuk mengobati banyak jenis kanker dan kondisi inflamasi selama beberapa abad. Baru-baru ini, aktivitas biologis beberapa protein yang dimurnikan dari *TL granosa* telah dievaluasi secara *in vitro* dan *in vivo*. Penelitian sebelumnya mengisolasi protein kerang baru dengan berat molekul sekitar 15 kDa (15-23 kDa) dari *TL granosa* dan menamainya *Haishengsu* (HSS). Mereka menemukan bahwa HSS memiliki efek penghambatan substansial pada beberapa jenis sel kanker, termasuk sel kanker ovarium manusia SKOV-3 dan OVCAR-3 dan sel leukemia manusia K562 dan multidrug resistansi (MDR) rekannya sel K562 / A02.4-6 Namun, efek penghambatan HSS pada invasi tumor dan metastasis belum diselidiki secara menyeluruh (Liu et al. 2011).

Liu et al. 2011 pertama kali mengevaluasi efek penghambatan *in vitro* dari HSS pada pertumbuhan dan aktivitas MMP-2 dan MMP-9 dalam sel line karsinoma paru-paru manusia A549 dan NCI-H292,

kemudian memverifikasi efek penghambatan *in vitro* menggunakan model xenografts mouse A549. Hasil pengamatan yang diperoleh, terutama setelah verifikasi *in vivo*, memberikan bukti ilmiah bahwa HSS bisa menjadi agen terapi antikanker yang menjanjikan setelah hasilnya direproduksi dalam uji klinis.

Odeleye, *et al* 2019. Meneliti efek sitotoksik yang berasal dari 3 jenis spesies kerang Surf yang berasal dari New Zealand (NZ) yaitu, kerang Diamond, Kerang Storm dan Spesies Kerang Tua-tua. Efek sitotoksik diperoleh dari empat jenis fraksi (fraksi etanol, Petroleum eter, etil asetat dan air) yang diperoleh dari ketiga spesies kerang tersebut menunjukkan hasil yang paling signifikan terlihat pada jenis sel WiDr (Kolon).

Kerang air tawar adalah makanan laut yang lebih populer, dan secara tradisional digunakan sebagai obat Cina untuk makanan, penyakit hati, dan hepatitis kronis. (Huang, *et al* 2006). Ekstrak Etil asetat Kerang air tawar *Corbicula fluminea*, memiliki kemampuan antioksidan dan efektif menghambat proliferasi sel dan menginduksi apoptosis Colangiocarcinoma (QBC939) dan hepatocarcinoma (SMMC-7721) secara *in vitro* dengan metode MTT (Han *et al.* 2009) (Qiu *et al.*,2009).

Studi terkini menunjukkan bahwa beberapa produk pangan yang mengandung suplemen tertentu seperti asam amino, bioaktif peptida, asam lemak, antioksidan, dan flavonoid terbukti dapat mencegah terjadinya berbagai penyakit. Kondisi ini yang kemudian memunculkan pengembangan produk pangan fungsional, yaitu pangan yang memenuhi kebutuhan zat makanan, bermanfaat untuk mengurangi resiko penyakit, dan diterima secara organoleptic (Grienke, Silke, dan Tasdemir 2014)(Xu *et al.* 2013)

Komponen fitokimia yang terdapat pada ekstrak kerang pokea meliputi flavonoid, saponin, steroid, dan triterpenoid. Senyawa tersebut mempunyai kelarutan berbeda berdasarkan tingkat kepolaran

pelarut dan lebih terkonsentrasi pada ekstrak metanol. Semakin tinggi total fenol yang terdapat pada ekstrak kerang pokea semakin tinggi kemampuan menangkap radikal bebas (Rasyid et al. 2018)

Kerang sebagai salah satu makanan produk hasil laut (*seafood*) yang banyak dikonsumsi manusia karena memiliki nilai gizi yang tinggi dan nilai proteinnya dikategorikan protein kompleks karena kadar asam amino yang tinggi, berprofil lengkap, dan sekitar 85-95% mudah dicerna tubuh (Widowati, 2008). Oleh sebab itu kerang mempunyai prospek yang baik bagi penambahan konsumsi protein hewani di Indonesia.

Hasil analisis komposisi proksimat menunjukkan bahwa kerang pokea dapat digolongkan sebagai hasil perikanan berprotein tinggi (lebih dari 50%), lemak rendah (dibawah 5%) serta karbohidrat tinggi (lebih dari 20%). Primadhani (2006) melaporkan bahwa makanan yang memiliki kandungan protein tinggi, lemak rendah, dan karbohidrat tinggi baik dikonsumsi oleh penderita penyakit hati. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian (Rasyid, *et al* 2018) (Yenni, 2012) menjelaskan bahwa kerang pokea secara empiris dan ilmiah mampu mengobati penyakit hati.

Berdasarkan pengalaman empiris dan hasil beberapa penelitian tersebut diatas, kerang Pokea kemungkinan sangat berpotensi digunakan sebagai bahan baku produk menjadi salah satu target penemuan obat baru dalam bentuk *nutraceutical*. Pengembangan produk pangan yang memadukan antara fungsi nutrisi dan kesehatan (pangan fungsional) disebut sebagai *nutraceutical*.

Studi epidemiologi telah memberikan bukti yang meyakinkan bahwa faktor makanan dapat memodifikasi proses karsinogenesis, termasuk inisiasi, promosi, dan perkembangan beberapa jenis kanker pada manusia (Kelloff, *et al* 1994). Karena keamanan yang diharapkan dan tidak dianggap sebagai "obat", produk derivative dari makanan dapat digunakan secara luas dan berjangka panjang pada

populasi dengan risiko normal; dengan demikian, perlu dilakukan pengujian untuk mengembangkan produk derivatif makanan sebagai agen kemopreventif. Banyak bahan derivatif makanan merupakan ekstrak yang mengandung banyak senyawa atau golongan senyawa, misalnya, teh, kurkuminoid, dan fraksi kedelai.

Merujuk pada manfaat di atas, crude ekstrak dari kerang pokea perlu lebih dikembangkan menjadi lebih murni dalam bentuk fraksi atau ekstrak yang terpurifikasi. Selain memiliki kandungan protein yang tinggi, Hasil penelitian diharapkan dapat menghasilkan produk derivatif makanan sebagai agen kemopreventif, yang dapat dikemas dalam bentuk *nutraceutical*.

Data dan informasi di atas memotivasi peneliti untuk meningkatkan peranan kerang pokea sebagai pangan fungsional pencegah penyakit kanker, dengan mengeksplor kerang pokea yang merupakan kerang air tawar endemic di Sulawesi Tenggara dalam sediaan ekstrak terpurifikasi yang memiliki potensi sebagai imunostimulan dan anti kanker, sehingga peneliti ingin mengkaji lebih dalam potensi ekstrak kerang pokea, dalam penghambatan sel kanker dan pengujian sistem imun secara *in vitro* dan *in vivo* pada mencit BALB/c.

12. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana pengaruh efek ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi kerang pokea (*Batissa violaceae celebensis Marten 1897*) terhadap aktivitas Imunostimulan dan penghambatan proliferasi sel kanker secara *in vitro* dan *in vivo* pada mencit BALB/c. Adapun uraian lengkap rumusan masalah adalah :

- a. Bagaimana pengaruh ekstrak kasar kerang pokea dalam meningkatkan proliferasi sel limfosit secara *in vitro* ?

- b. Bagaimana pengaruh ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi kerang pokea dalam penghambatan proliferasi sel lestari kanker secara *in vitro*?
- c. Bagaimana hasil evaluasi aktivitas ekstrak terpurifikasi kerang pokea secara *in vivo* pada mencit BALB/c yang diinduksi karsinogen azoksimetana (AOM) dan dekstran sodium sulfat (DSS) terhadap penghambatan lesi pra kanker kolon?
- d. Bagaimana aktivitas ekstrak terpurifikasi kerang pokea secara *in vivo* pada mencit BALB/c yang diinduksi karsinogen azoksimetana (AOM) dan dekstran sodium sulfat (DSS) sebagai imunostimulan yang dapat meningkatkan proliferasi limfosit T CD8?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk melihat pengaruh intervensi ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi kerang pokea (*Batissa violaceae celebensis Marten 1897*) terhadap aktivitas Imunostimulan dan penghambatan proliferasi sel kanker secara *in vitro* dan *in vivo* pada Mencit BALB/c.

1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Untuk menguji pengaruh ekstrak kerang pokea dalam meningkatkan proliferasi sel limfosit secara *in vitro*.
- b. Untuk menguji pengaruh ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi kerang pokea penghambatan proliferasi sel lestari kanker secara *in vitro*.
- c. Untuk menguji pengaruh aktivitas ekstrak terpurifikasi kerang pokea secara *in vivo* pada mencit BALB/c yang diinduksi karsinogen azoksimetana (AOM) dan dekstran sodium sulfat (DSS) terhadap penghambatan lesi pra kanker kolon.
- d. Untuk menguji pengaruh aktivitas ekstrak terpurifikasi kerang pokea secara *in vivo* pada mencit BALB/c yang diinduksi karsinogen

azoksimetana (AOM) dan dekstran sodium sulfat (DSS) sebagai imunostimulan yang dapat meningkatkan proliferasi limfosit T CD8.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Bidang Akademik

- a. Menggali potensi kerang pokea sebagai bahan obat-obatan (*Nutraceutical*) dan memberikan bukti ilmiah tentang pemanfaatan kerang pokea secara empiris oleh masyarakat untuk mengobati beberapa penyakit.
- b. Memberi informasi ilmiah tentang aktivitas ekstrak kerang pokea dalam meningkatkan sel imun melalui proliferasi sel limfosit dan menghambat proliferasi sel kanker.
- c. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memperkuat nilai ilmiah dari khasiat kerang pokea (*Batissa violacea celebensis* Marten 1897) dan menjadi dasar untuk penelitian selanjutnya.

1.4.2. Manfaat Praktis

- a. Hasil penelitian ini dapat mendukung masyarakat yang selama ini telah mengkonsumsi kerang pokea agar dapat mengolah kerang pokea tanpa mengurangi nilai gizi yang terkandung dalam kerang pokea tersebut serta memberikan kontribusi pada pemerintah daerah khususnya peningkatan pangan fungsional.
- b. Di sisi lain akan dapat membuka peluang usaha bagi masyarakat lokal untuk mengembangkan budidaya kerang pokea dan pengembangan pengolahan hasil bahan pangan ini, sebagai salah satu alternatif untuk meningkatkan pendapatan masyarakat.
- c. Sebagai informasi mengenai aktivitas kerang pokea (*Batissa violacea celebensis* Marten 1897) sebagai bahan imunomodulator alami.

d. Menunjang berkembangannya berbagai industri terkait di Indonesia, khususnya pangan fungsional dan *nutraceutical* yang berasal dari Moluska.

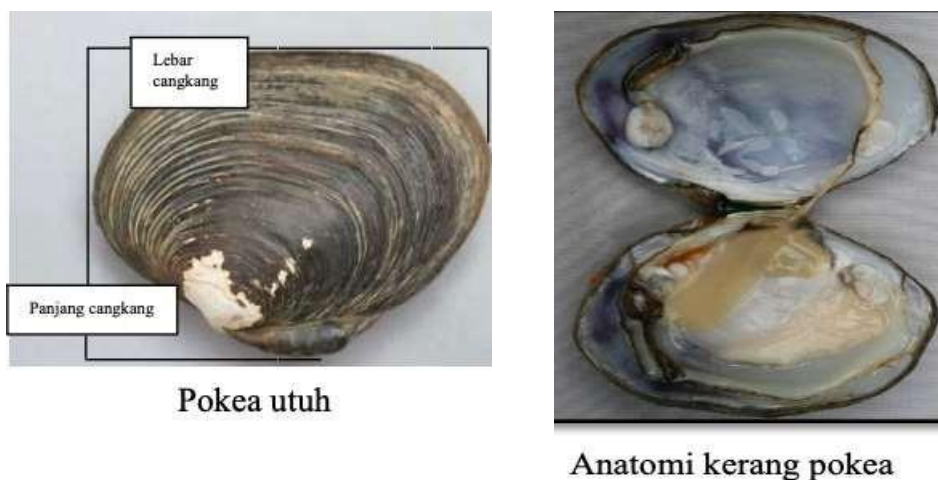
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Umum tentang Kerang Pokea

Kerang berada dalam filum moluska, memiliki tubuh lunak dan setangkup cangkang bilateral simetris yang dinamakan “*valve*”, sehingga kerang dinamakan dengan bivalvia. Umbo yang terdapat pada bagian dorsalnya, merupakan pusat pertumbuhan cangkang. Penghubung dua cangkang ini adalah ligamen yang berada pada posisi dorsal di belakang apeks. Cangkang kerang pokea (*B. violacea celebensis* Martens 1897) berwarna coklat tua hingga ungu kehitam-hitaman (Dan Hari, H 2015) Bentuknya sedikit pipih dan membulat (Gambar 1). Taksonomi kerang *B. violacea celebensis* Martens (1897) menurut Jutting (1954) adalah sebagai berikut:

Filum : Moluska
Kelas : Bivalvia
Bangsa : Veneroida
Suku : Corbiculidae
Marga : *Batissa*
Spesies : *Batissa violacea celebensis* Martens (1897)



Gambar 1. Morfologi kerang pokea (*B. violacea celebensis* Martens 1897)

Beberapa jenis moluska merupakan komoditi perikanan yang potensial sebagai kandidat sumber senyawa bioaktif baru untuk berbagai aplikasi bioteknologi. Senyawa bioaktif yang ditemukan dalam moluska antara lain peptida, depsipeptid, seskuiterpen, skualen, terpen, polipropionat, senyawa nitrogen, makrolides, prostaglandin dan turunan asam lemak, senyawa-senyawa lain dan alkaloid yang memiliki jenis aktivitas tertentu. Produk alami yang diisolasi dari bivalvia maupun gastropoda telah dimanfaatkan antara lain sebagai antioksidan, antitumor, antivirus, antibakteri, antijamur, antikanker, sitotoksik, dan penghambat enzim (Defer, Bourgougnon, dan Fleury 2009) (Zhou et al. 2012)

Batissa violacea adalah moluska air tawar yang tersebar di Asia Tenggara dan Australia Utara. Di Indonesia hewan tersebut tersebar di Sumatra, Jawa, Papua Barat, dan Sulawesi. Khusus di Sulawesi Tenggara, kerang pokea *B. violacea celebensis* Martens (1897) ditemukan di Sungai Pohara pada kedalaman sekitar 1-9 m pada bagian tepi maupun tengah sungai dengan sedimen pasir dan kerikil. Sungai Pohara merupakan Daerah Aliran Sungai (DAS) Konawehea yang menjadi sumber bahan baku air milik PDAM (Perusahaan Daerah Air Minum) Kota Kendari. Sungai ini termasuk salah satu sungai besar yang melalui tiga kabupaten di Sulawesi Tenggara. Kerang pokea hanya ditemukan di dua kecamatan yang dilalui oleh sungai tersebut, yaitu Kecamatan Sampara dan Kecamatan Bondoala (Bahtiar 2005).

2.2. Senyawa Aktif pada Moluska

Beberapa jenis moluska merupakan komoditi perikanan yang potensial sebagai kandidat sumber senyawa bioaktif baru untuk berbagai aplikasi bioteknologi. Senyawa bioaktif yang ditemukan dalam moluska antara lain peptida, depsipeptid, seskuiterpen, skualen, terpen, polipropionat, senyawa nitrogen, makrolides, prostaglandin dan turunan asam lemak, senyawa-senyawa lain dan alkaloid yang memiliki jenis aktivitas tertentu (Balcázar et al. 2006; Blunt et al. 2006). Produk alami

yang diisolasi dari bivalvia maupun gastropoda telah dimanfaatkan antara lain sebagai antioksidan, antitumor, antivirus, antibakteri, antijamur, antikanker, sitotoksik, dan penghambat enzim (Tadesse *et al.* 2008; Defer *et al.* 2009; Zhou *et al.* 2011). Beberapa metabolit sekunder yang dimiliki organisme perairan menunjukkan adanya aktivitas farmakologi (Pringgenies, 2010).

Penelitian mengenai komponen bioaktif pada moluska, khususnya bivalvia dan gastropoda yang berpotensi sebagai *nutraceutical* maupun *pharmaceutical* telah banyak dilakukan. Beberapa diantaranya adalah lintah laut (*Discodoris* sp.); keong ipong-ipong (*Fasciolaria salmo*); kerang darah (*Anadara granosa*); kerang pisau (*Solen* spp); kijing lokal (*Pilsbryconcha exilis*), kijing taiwan (*Anodonta woodiana* Lea.) (Salamah *et al.* 2008); kerang mas ngur (*Atactodea striata*); *Cerastoderma edule* (*Cardiidae*), *Ruditapes philippinarum* (*Veneridae*), *Ostrea edulis* (*Ostreidae*), *Crepidula fornicata* (*Calyptraeidae*), *Buccinum undatum* (*Buccinidae*); *Cyclina sinensis*; dan abalon (*Haliotis discus hannai* Ino) (Zhou *et al.* 2011).

Salamah *et al.* (2008) melaporkan bahwa komponen bioaktif yang terdapat dalam ekstrak kijing taiwan (*Anodonta woodiana* Lea.) termasuk kelompok alkaloid dan flavonoid. Hasil pengujian dengan *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil* (DPPH) sebagai radikal bebas menunjukkan nilai IC50 ekstrak kijing taiwan adalah sebesar 201,52 ppm.

Penelitian terhadap kerang-kerangan juga dilakukan Defer *et al.* (2009) terhadap kerang jenis *Cerastoderma edule* (*Cardiidae*), *Ostrea edulis* (*Ostreidae*). Hasil fraksinasi dengan fase padat menunjukkan adanya aktivitas antibakteri pada fraksi *C. edule* dan aktivitas antibakteri tertinggi ditemukan pada ekstrak *O. edulis*. Fraksi yang paling aktif sebagai antivirus ditemukan pada ekstrak *C. edule*. Sementara pada kerang jenis *Cyclina sinensis* (CSPS) dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan dan antikanker secara *in vitro* dari ekstrak kasar maupun fraksi yang dimurnikan. Hasilnya menunjukkan bahwa CSPS kasar dan

CSPS-3 fraksi 3) memiliki aktivitas *scavenging* kuat terhadap radikal superoksida dan radikal hidroksil. Semua polisakarida dari CSPS memperlihatkan aktivitas antikanker dengan kisaran konsentrasi 50-400 µg/mL. Hasil penelitian menunjukkan bahwa CSPS dapat menjadi sumber baru antioksidan alami dengan nilai potensi sebagai makanan kesehatan dan terapi (Jiang, *et al* 2011).

Radikal bebas adalah senyawa kimia yang berisi satu atau lebih elektron tidak berpasangan karena sangat tidak stabil dan menyebabkan kerusakan molekul lain dengan mengekstraksi elektron dari molekul untuk mencapai stabilitas. Senyawa ini diproduksi dalam tubuh manusia dan berperan sebagai pemasok energi, detoksifikasi, isyarat kimia, dan fungsi kekebalan tubuh. Pembentukan ROS diatur oleh endogen superoksida dismutase, glutathion peroksidase, dan katalase. Pembentukan yang tidak terkontrol karena adanya paparan zat oksidan dari lingkungan atau akibat kegagalan mekanisme pertahanan tubuh, kerusakan struktur sel, DNA, lipid, dan protein (Valko *et al.* 2006) dapat meningkatkan resiko lebih dari 30 penyakit yang berbeda (Aruoma 1998).

Akhir-akhir ini banyak muncul penyakit degeneratif, yaitu kanker, jantung, artritis, diabetes, dan liver. Penyakit degeneratif ini disebabkan karena antioksidan yang ada di dalam tubuh tidak mampu menetralkan peningkatan konsentrasi radikal bebas. Radikal bebas merupakan molekul yang pada orbit terluarnya satu atau lebih elektron tidak berpasangan, sifatnya sangat labil dan sangat reaktif sehingga dapat menimbulkan kerusakan pada komponen sel seperti DNA, lipid, protein, dan karbohidrat. Kerusakan tersebut dapat menimbulkan berbagai kelainan biologis seperti arterosklerosis, kanker, diabetes dan penyakit degeneratif lainnya (Chen *et al.* 1996).

Prakash *et al.* (2011) mengungkapkan bahwa senyawa antioksidan dalam makanan memegang peranan penting sebagai faktor pelindung kesehatan. Bukti ilmiah menunjukkan bahwa antioksidan mengurangi resiko penyakit kronis termasuk kanker dan penyakit jantung. Ciri utama

antioksidan adalah kemampuan untuk menjebak radikal bebas. Senyawa antioksidan, asam fenolik, polifenol dan flavonoid menangkap radikal bebas sehingga menghambat mekanisme oksidatif yang merupakan penyebab penyakit degeneratif.

Tubuh mempunyai sistem antioksidan termasuk superoksida dismutase, katalase dan glutathione, tetapi jika terjadi paparan oksidasi yang berlebihan antioksidan tubuh ini tidak akan mampu mengatasinya sehingga tubuh memerlukan pasokan antioksidan dari luar (flavonoid, vitamin A, vitamin C, vitamin E, selenium, seng, dan L-sistein) (Nordmann, 1993).

Antioksidan adalah zat kimia yang dapat mengikat radikal bebas dan terlibat dalam pencegahan penyakit jantung, kanker, penuaan, dan lain-lain. Antioksidan merupakan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif. Antioksidan yang dikenal ada yang berupa enzim dan ada yang berupa mikronutrien. Enzim antioksidan dibentuk dalam tubuh, yaitu superoksida dismutase (SOD), glutathione peroksida, katalase, dan glutathione reduktase, sedangkan antioksidan yang berupa mikronutrien dikenal tiga yang utama, yaitu β -karoten, vitamin C dan vitamin E (Hariyatmi 2004; Pavlovic *et al.* 2005).

Antioksidan sintetik telah ditemukan, diuji untuk toksisitas akut dan diusulkan sebagai tambahan antioksidan alami. Sayangnya, laporan terbaru mengungkapkan bahwa antioksidan sintetik ini mungkin terkait dengan efek toksik dan karsinogenik (Zhang *et al.*, 2010). Sebagai bagian dari tuntutan masyarakat akan gaya hidup yang lebih baik dan peningkatan umur panjang, konsumen telah mengembangkan minat yang meningkat terhadap konsumsi '*nutraceuticals*' dan makanan fungsional

yang kaya akan senyawa bioaktif alami (Fung, Hamid, & Lu, 2013). Dalam upaya untuk mengatasi minat ini, telah terjadi peningkatan penyelidikan dalam jumlah dramatis yang bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa makanan dari sumber alami yang mungkin efektif dalam mencegah penyakit yang disebabkan oleh kerusakan oksidatif (Tierney, Croft, & Hayes, 2010).

Aktivitas antioksidan pada ekstrak kasar kerang pokea kering mempunyai nilai aktivitas antioksidan (IC_{50}) tertinggi pada pelarut methanol yaitu 1298,29 ppm (Yenni, 2012), sedangkan Nilai aktivitas antioksidan (IC_{50}) dari ekstrak kasar kerang pokea segar dengan pelarut ethanol yaitu 2483,74 ppm (Unpublish data, 2020). Meski demikian tidak berbeda dibandingkan dengan nilai IC_{50} dari beberapa jenis moluska lainnya, seperti keong pepaya (*Melo sp.*) 1156-2799 ppm (Suwandi *et al.* 2010), keong ipong-ipong (*Fasciolaria salmo*) 994,47-9210 ppm (Nurjanah *et al.* 2011a), dan kerang pisau (*Solen spp*) 1391,08-2008,52 ppm (Nurjanah *et al.* 2011b).

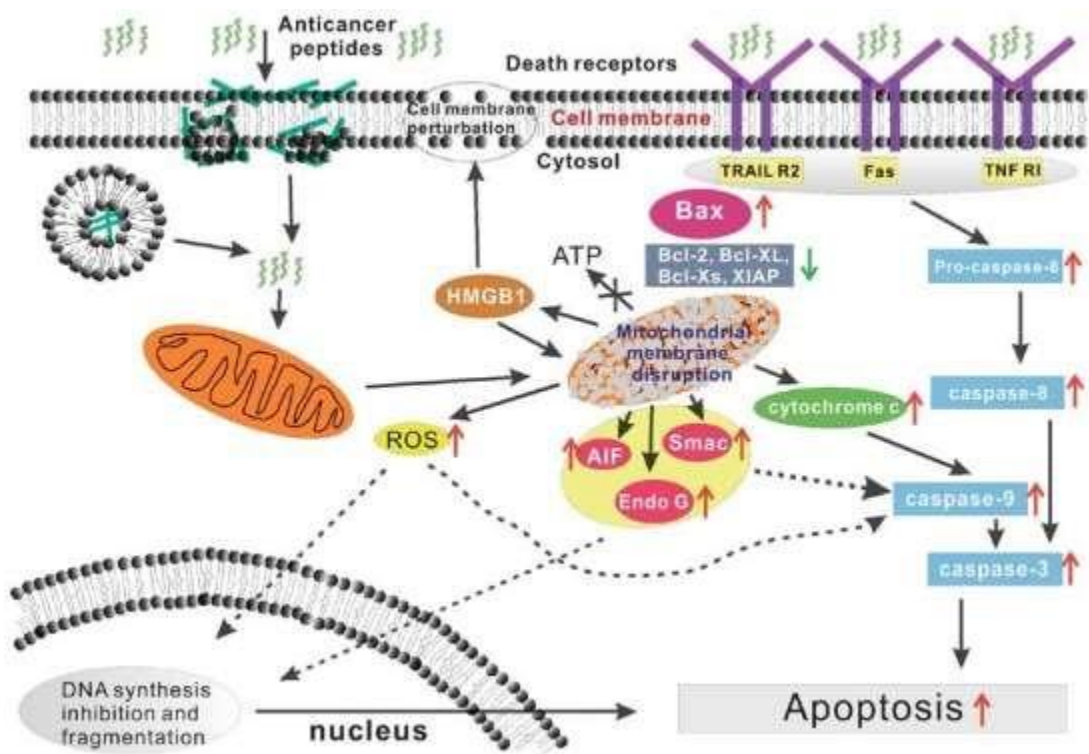
2.3. Mekanisme Moluska dalam aktivitas penghambatan sel kanker

Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa moluska, seperti kerang, siput laut, dan kelinci laut, merupakan sumber peptida bioaktif yang kaya dan menunjukkan aktivitas antikanker. Wang *et al.* 2017 telah mengisolasi hidrolisat yang diperkaya oligopeptida dari tiram dengan menggunakan protease dan telah menunjukkan bahwa hidrolisat ini secara nyata dan bergantung pada dosis menghambat pertumbuhan sel tumor sarkoma-S180 pada mencit BALB/c.

Kahalalides adalah keluarga peptida yang diisolasi dari *Elysia rufescens*. Diantaranya, *Kahalalide F* dianggap sebagai kandidat antikanker yang penting untuk terapi tumor, karena sitotoksitasnya yang tinggi. Namun, mekanisme kerja *Kahalalide F* tidak dipahami dengan baik, dan *Kahalalide F* telah diamati mengganggu fungsi lisosom dan berpotensi mengakibatkan pengasaman intraseluler dan kematian sel.

Dengan demikian, peptida ini dapat secara efektif memerangi sel kanker yang menunjukkan aktivitas lisosom tinggi, seperti sel kanker prostat dan serviks.

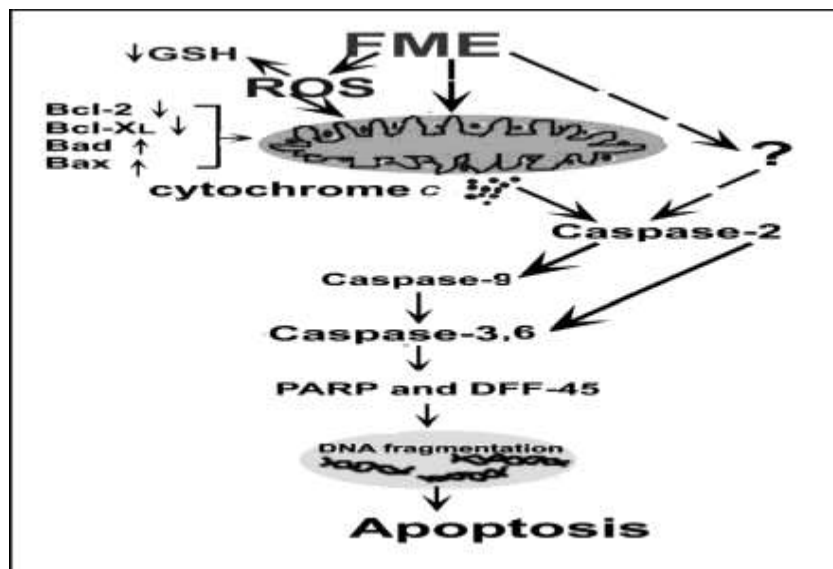
Keenamide A adalah heksapeptida siklik sitotoksik yang diisolasi dari moluska *notaspidean Pleurobranchus forskalii* yang secara signifikan menghambat proliferasi sel P-388, A-549, dan HT-29.



Gambar 2. Mekanisme kerja peptida antikanker melalui jalur mitokondria dan jalur yang diinduksi oleh death reseptor (Apoptosis).

Pada gambar tersebut menjelaskan bahwa adanya gangguan pada membran mitokondria dan apoptosis bergantung pada mitokondria. Selain menyebabkan kematian sel dengan mengganggu membran plasma, beberapa peptida antikanker menginduksi apoptosis melalui jalur mitokondria, dan apoptosis yang disebabkan gangguan membran mitokondria memainkan peran penting dalam karsinogenesis dan terapi kanker.

Salah satu contoh kerang air tawar yang sudah diisolasi sebagai agen kemopreventif untuk kanker adalah jenis kerang *Corbicula fluminea* Muller. Kerang air tawar adalah makanan laut yang lebih populer, dan secara tradisional digunakan untuk makanan sebagai obat Cina, penyakit hati, dan hepatitis kronis. Kerang air tawar *Corbicula fluminea* Muller yang diekstraksi dengan metanol kemudian dipartisi dengan etil asetat (FME) memiliki pengaruh pada sel kanker, sehingga diperoleh perkiraan mekanisme apoptosis yang diinduksi oleh ekstraksi kerang dengan methanol dan yang dipartisi dengan etil asetat sebagai berikut : (Huang et al. 2006).



Gambar 3. Representasi skematis dari mekanisme aksi apoptosis yang diinduksi Kerang air tawar *Corbicula fluminea* Muller yang diekstraksi dengan metanol kemudian dipartisi dengan etil asetat (FME) dalam sel HL-60 Huang et al. 2006).

Peristiwa awal yang diinduksi oleh FME mungkin untuk menginduksi deplesi GSH, produksi ROS, dan modulasi koordinatif keluarga Bcl-2, selanjutnya menghilangkan Dwm, menghasilkan pelepasan sitokrom c, dan mengakibatkan aktivasi caspase-9, caspase-3, dan caspase-6. Caspase-2 mungkin langsung mengaktifkan inisiator caspase-9. Caspase-3 aktif selanjutnya membelah inhibitor dari caspase-activated DNase (ICAD), memungkinkan caspase-activated DNase (CAD) untuk memasuki nukleus dan menurunkan DNA kromosom.

2.4. Mekanisme Moluska dalam Aktivitas Immunostimulan

Beberapa metode klinis secara *in vitro* dan *in vivo* telah berhasil digunakan untuk menilai efek imunomodulator dari hidrolisat atau peptida protein yang diturunkan dari beberapa jenis kerang. Uji *in vitro* dan *in vivo* adalah metode umum yang digunakan untuk mengevaluasi efek imunomodulator dari derivative jenis makanan.

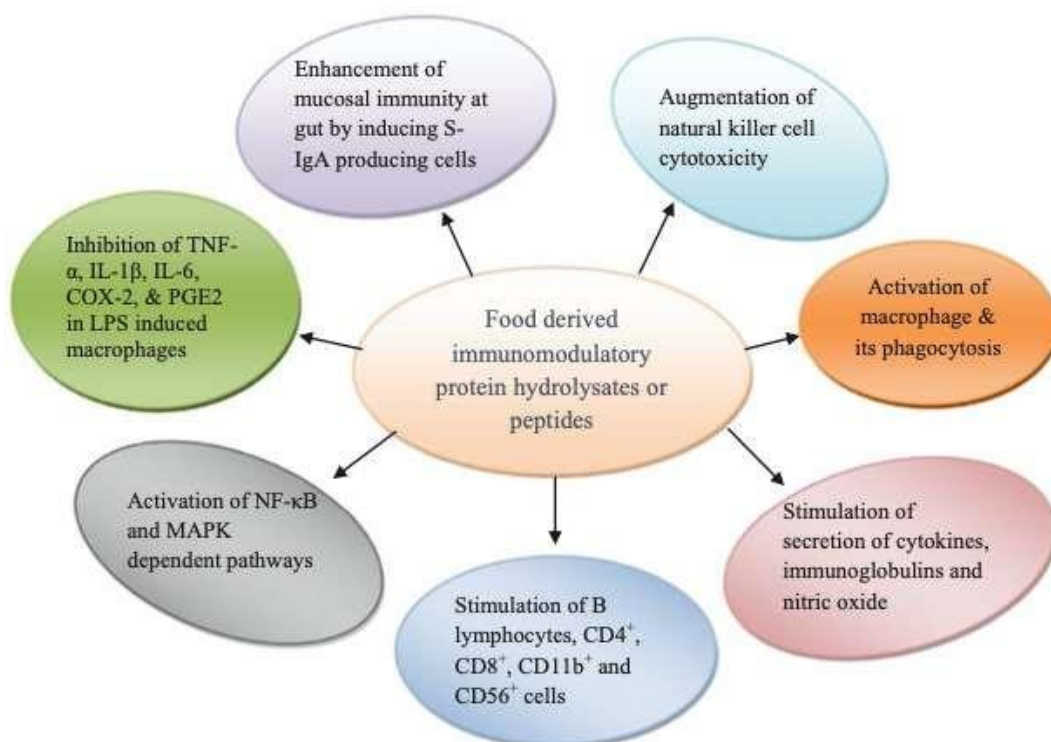
Pengujian peptida imunomodulator *in vitro* umumnya dilakukan dengan menggunakan sel lestari. Di antara berbagai sel lestari, sel lestari makrofag tikus yaitu RAW 264.7 telah menjadi model sel yang paling banyak digunakan untuk menentukan kapasitas imunomodulator hidrolisat protein makanan. Sebagian besar studi kultur sel *in vitro* memperkirakan molekul penting pensinyalan seperti sitokin, termasuk tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), IL-1 β dan IL-6, dan nitric oxide (NO) yang memainkan peran kunci dalam modulasi respon imun.

Beberapa peneliti telah melakukan percobaan pada hewan untuk menunjukkan efek imunomodulator dari hidrolisat protein atau peptida yang diturunkan dari makanan secara *in vivo*. Sebagian besar percobaan imunomodulator *in vivo* dengan peptida yang berasal dari makanan dilakukan pada model hewan coba seperti mencit/tikus.

Beberapa pemeriksaan imunologi *in vivo* dan *ex vivo* seperti proliferasi limfosit, fagositosis makrofag peritoneum, aktivitas sel NK, pengukuran subpopulasi limfosit T limpa (CD4+ & CD8+), penentuan sekretori-immunoglobulin-A (S-IgA) (imunitas mukosa)), untuk pengukuran serum imunoglobulin (IgA, IgM, & IgG), dan sitokin (IL-2, IFN- γ , IL-5 dan IL-6) paling sering digunakan dalam metode *in vivo* untuk evaluasi efek imunomodulator peptida yang diturunkan dari makanan.

Beberapa penelitian yang dilakukan pada manusia dengan hidrolisat atau peptida protein makanan telah mengukur perubahan IgM, IgG dan IgA, CD4/CD8 rasio, sel CD11b+ dan CD56+, dan aktivitas sel NK dalam darah untuk menentukan efek imunomodulator.

Beberapa jenis moluska yang menunjukkan aktivitas imunomodulator antara lain, protein kerang leher pendek (*Ruditapes philippinarum*) : Aktivitas imunomodulator menunjukkan aktivitas penghambatan NO pada makrofag RAW 264.7 yang dirangsang LPS, Protein kerang (*M. coruscus*): Aktivitas imunomodulator menunjukkan Secara efektif menghambat produksi NO yang diinduksi LPS dalam makrofag RAW 264,7, Protein tiram (*Crassostrea gigas*) : Aktivitas imunomodulator menunjukkan proliferasi limfosit limpa yang meningkat secara signifikan, fagositosis makrofag, dan sitotoksisitas sel NK pada tikus dan Protein tiram (*Crassostrea hongkongensis*) : Aktivitas imunomodulator menunjukkan Peningkatan proliferasi limfosit limpa dan aktivitas sel pembunuh alami (NK) pada tikus BALB/c.



Gambar 4. Mekanisme kerja hidrolisat protein imunomodulator atau peptida yang berasal dari derivative Moluska.

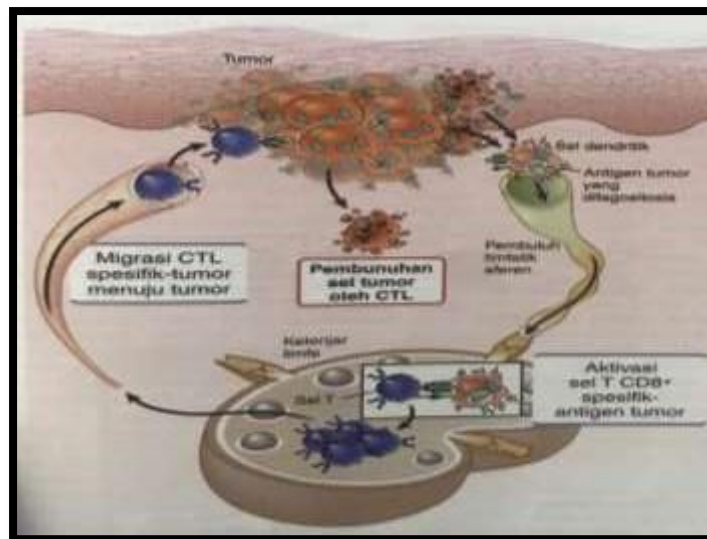
Saat ini, mekanisme yang tepat dari efek imunomodulator dari peptida yang berasal dari makanan tidak sepenuhnya dipahami, tetapi mekanisme aktivitas imunomodulasi terjadi terutama melalui aktivasi makrofag, stimulasi fagositosis, peningkatan jumlah leukosit, peningkatan induksi modulator imun seperti sitokin, NO dan imunoglobulin, stimulasi sel NK, efek stimulasi pada splenosit sel, CD4+, CD8+, CD11b+ dan CD56+, mengaktifkan faktor transkripsi Nuclear factor- κ B (NF- κ B) dan jalur dependen protein kinase (MAPK) yang diaktifkan mitogen dan penghambatan mediator pro-inflamasi seperti yang terdapat pada gambar 4.

2.4.1. Mekanisme Imun Penolakan Tumor/Kanker

Prinsip mekanisme imun eradikasi tumor adalah pembunuhan sel tumor oleh CTL yang spesifik untuk antigen tumor. Sebagaimana besar antigen tumor yang menimbulkan respon imun pada individu yang terkena tumor adalah protein sitolitik atau protein inti yang disintesa secara endogen dan dipresentasikan sebagai peptida yang berikatan dengan MHC kelas I. Oleh karena itu antigen ini dikenali oleh CD8⁺ terbatas MHC kelas I, yang berfungsi membunuh sel yang menghasilkan antigen tersebut. Peranan CTL pada reaksi penolakan tumor telah dibuktikan dengan jelas pada hewan coba, transplan tumor dapat dihancurkan dengan mentransfer sel T CD8⁺ yang bersifat reaktif terhadap tumor ke hewan yang mempunyai tumor tersebut.

Respon CTL terhadap tumor dipicu oleh pengenalan antigen yang disajikan oleh *antigen-presenting cells* (APCs) inang. APC menangkap sel tumor atau antigennya lalu menyajikan antigen tersebut kepada sel T (gambar 4). Pada hakekatnya, tumor dapat berasal dari semua jenis sel berinti, dan seperti halnya semua sel berinti, mereka mengekspresikan kostimulator atau MHC kelas II. Akan tetapi, kita tahu bahwa aktivasi sel T CD4⁺ naif supaya berproliferasi dan diferensiasi menjadi CTL aktif memerlukan pengenalan antigen (peptida yang berikatan dengan MHC kelas I) pada sel dendritik dan juga kostimulasi dan /atau pertolongan dari

sel T CD4⁺ terbatas MHC kelas II. Sel tumor yang berbeda-beda jenisnya dapat merangsang respon CTL adalah dengan cara sel tumor atau proteinnya ditangkap oleh sel dendritik inang, dan antigen tumor tersebut diproses dan disajikan oleh molekul MHC kelas I sel dendritik inang tersebut. Proses ini dinamakan presentasi-silang (cross-presentation) atau cross priming. Sel dendritik juga dapat menyajikan peptida yang ditangkapnya dari antigen tumor pada molekul MHC kelas II. Jadi antigen tumor dapat dikenali oleh sel T CD8⁺ dan sel T CD4⁺.



Gambar 5. Respon imun terhadap tumor

Pada saat yang sama ketika sel dendritik menyajikan antigen tumor, mereka mengekspresikan kostimulator yang memberikan sinyal untuk aktivasi sel T. Belum diketahui bagaimana tumor dapat memicu ekspresi kostimulator pada APC, karena rangsangan fisiologis untuk induksi kostimulator biasanya adalah mikroba dan tumor biasanya steril. Salah satu kemungkinan adalah bahwa sel tumor akan mati jika pertumbuhannya melebihi pasokan darah dan nutrienya, dan sel yang mati ini melepaskan produk yang dapat merangsang respon imun bawaan (*damage-associated molecular patterns*). Aktivasi APC untuk mengekspresikan kostimulator adalah bagian dari respon tersebut.

Ketika sel T CD8⁺ naif telah berdiferensiasi menjadi CTLs efektor, mereka mampu untuk membunuh sel tumor yang mengekspresikan antigen yang relevan tanpa kostimulasi atau pertolongan sel T. Jadi, diferensiasi CTL dapat dipicu oleh presentasi silang antigen tumor oleh sel dendritik inang, tetapi CTL efektif melawan tumor itu sendiri.

Mekanisme imun lain selain CTL juga memainkan peran dalam penolakan tumor. Respon antitumor sel T CD4⁺ dan antibodi telah dijumpai pada pasien, namun apakah sesungguhnya respon ini melindungi individu terhadap tumor atau tidak. Masih belum jelas. Penelitian eksperimental menunjukkan bahwa makrofag teraktivasi dan sel natural killer (NK) mampu membunuh sel tumor *in vitro*, tetapi peran protektif mekanisme efektor tersebut pada individu pasien tumor masih sangat belum diketahui (Abbas, 2017).

2.4.2. Limfosit T

Limfosit adalah sel darah putih atau leukosit yang berbentuk bulat berdiameter 7-15 μm . Sel limfosit selain terdapat di dalam darah perifer, terdapat juga pada organ limfoid seperti limfa, kelenjar limfe dan thymus. Limfosit manusia berjumlah sekitar 30% dari persentasi normal sel darah putih. Sel limfosit memiliki fungsi yang kompleks dengan fungsi utama adalah memproduksi antibodi atau sebagai sel efektor khusus dalam menanggapi antigen yang terikat oleh makrofag, sel limfosit mampu menghasilkan respon imun spesifik terhadap berbagai jenis antigen yang berbeda. Sel limfosit merupakan sel kunci dalam proses respon imun spesifik, Sel limfosit dapat mengenali antigen melalui reseptor antigen dan mampu membedakannya dari komponen tubuhnya sendiri (Roitt & Delves 2001).

Limfosit T merupakan 65-80% dari total limfosit yang beredar disirkulasi darah. Limfosit T berasal dari sum-sum tulang. Tidak seperti limfosit B yang matang dalam sum- sum tulang, limfosit T bermigrasi ke kelenjar timus untuk menjadi matang. Selama proses pematangan di

timus, limfosit T mengekspresikan molekul untuk mengikat antigen (antigen binding molecule) pada membrannya, disebut reseptor sel T (T-cell receptor). Receptor limfosit T ini hanya dapat mengenali antigen yang terikat pada protein membran sel yang disebut molekul MHC (Major histocompatibility complex).

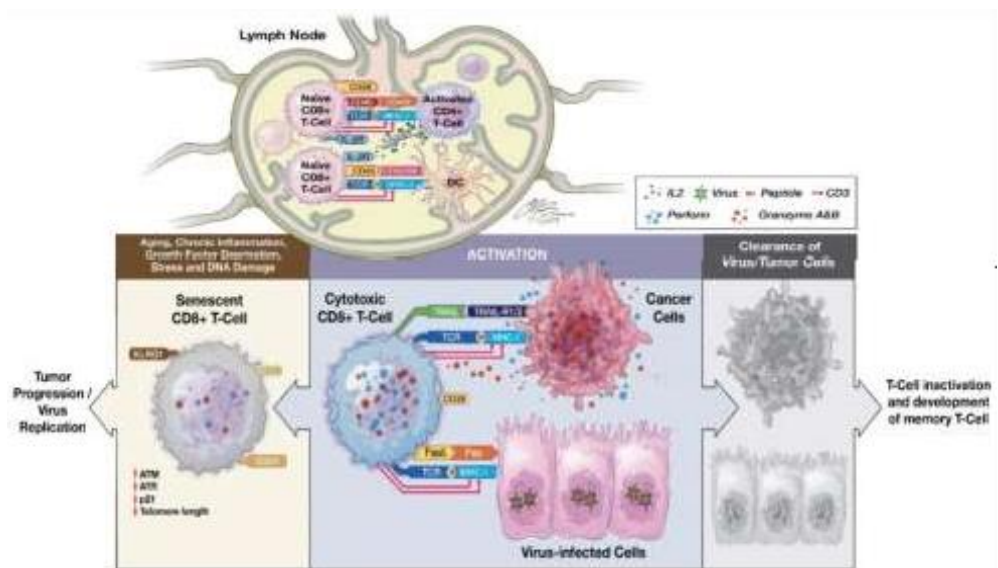
Fungsi utama limfosit T adalah limfosit Th dan limfosit Tc. Limfosit T aktif mensekresi IL-2 (T cell growth factor), yang merangsang produksi reseptor IL-2 dan proliferasi limfosit T. Limfosit Th juga mensekresi IL-4, IL-5 dan IL-6 (B cell growth factor) yang meningkatkan proliferasi dan maturasi limfosit B. Limfosit Tc dapat membunuh sel host yang mengekspresikan antigen endogen dipermukaan seperti virus dan tumor. Limfosit T mempunyai rentang aktivitas yang luas antara lain: (1) mengontrol pertumbuhan limfosit B dan produksi antibodi, (2) berinteraksi dengan fagosit, membantu memusnakan patogen, dan (3) mengenal sel yang terinfeksi virus dan memusnakannya (Baratawidjaja, 2002).

Dua kelas besar limfosit T dibedakan satu dengan lain berdasarkan ekspresi penanda permukaan CD4 dan CD8. Limfosit helper adalah limfosit T CD4⁺, limfosit T sitotoksik adalah limfosit T CD8. CD4 dan CD8 adalah glikoprotein permukaan yang berfungsi sebagai molekul adesi dan sebagai co-receptors limfosit T untuk antigen. Limfosit Th (CD4⁺) mengenal antigen yang dipresentasikan pada permukaan makrofag dalam bentuk peptida- antigenik yang berbentuk kompleks dengan molekul MHC kelas II. Sel Tc (CD8⁺) mengenali antigen yang dipresentasikan dipermukaan dalam bentuk peptida-antigenik yang membentuk kompleks dengan molekul MHC kelas I (Baratawidjaja, 2002).

2.4.3.1. Peran Sel T CD8⁺ dalam Immunologi Kanker

Sel T CD8⁺ adalah bagian dari limfosit yang berkomitmen untuk mendeteksi antigen peptida yang disajikan oleh Sel T CD8⁺ adalah bagian dari limfosit yang berkomitmen untuk mendeteksi antigen peptida oleh molekul kelas I major histocompatibility complex (MHC). Sel T CD8⁺ muncul dari molekul kelas I major histocompatibility complex (MHC). Sel T

CD8⁺ muncul dari limfoid umum yang bermigrasi dari sumsum tulang ke timus tempat mereka lewat melalui serangkaian fase pematangan yang berbeda. Kumpulan sel T CD8⁺ yang naif terdiri dari melalui serangkaian fase pematangan yang berbeda. Kumpulan sel T CD8⁺ yang naif terdiri dari sel T poliklonal yang mengekspresikan CD28, CCR7, dan CD62L. CCR7, dan CD62L memungkinkan mereka untuk bersirkulasi ulang antara organ-organ, darah dan organ limfoid sekunder. Priming awal sel T CD8⁺ melibatkan pengenalan reseptor sel T (TCR) dari kompleks peptida / MHC yang disajikan oleh antigen profesional. Pengenalan reseptor (TCR) dari kompleks peptida / MHC yang disajikan oleh sel penyajian antigen profesional (APC), seperti sel dendritik (DC). DC juga mengekspresikan penanda permukaan CD70 dan sel (APC), seperti sel dendritik (DC). DC juga mengekspresikan tanda permukaan untuk CD70 dan CD80 / CD86 untuk mengikat reseptor CD27 dan CD28 yang diekspresikan pada sel T CD8⁺, Ini Memberikan sinyal sekunder penting untuk aktivasi Sel T. Sel Inang termasuk sel kanker, dapat berfungsi sebagai target untuk Sel T CD8 yang sebelumnya diaktifkan dengan memproses dan menyajikan peptida tumor antigenik dengan MHC kelas 1.



Gambar 6. Priming dan inaktivasi sel T CD8⁺.

Selain itu, sel pembantu (sel T CD4⁺) berinteraksi dengan sel T CD8⁺ dan memodulasi aktivasi sel T CD8⁺. Sel pembantu (sel T CD4⁺) yang teraktivasi dapat mensekresi berbagai sitokin, seperti interferon-gamma (IFN- γ) dan IL-2, dan memfasilitasi proliferasi dan aktivasi optimal sel T CD8⁺. Sel T CD4⁺ juga dapat membantu pematangan DC untuk ekspresi molekul kostimulatori dan sekresi sitokin yang berkontribusi pada priming sel T CD8⁺. Mekanisme serupa juga dilakukan oleh sel natural killer (NK), menunjukkan adanya kolaborasi antara sel T CD4⁺ dengan NK dan DC untuk induksi priming sel T CD8⁺.

Setelah aktivasi, CD8⁺ CTL efektor menghancurkan sel kanker yang mengekspresikan antigen terutama menggunakan dua jalur utama: eksositosis granula (seperti perforin dan granzim) dan ligan kematian / apoptosis yang dimediasi reseptor (seperti Fas ligan dan TRAIL). Selain itu, sel T CD8⁺ yang diaktifkan melepaskan IFN- γ dan tumor necrosis factor alpha (TNF- α) untuk menginduksi sitotoksitas dalam sel target dan merangsang respon anti-tumor M1 yang dimediasi makrofag. Pada beberapa tumor padat, CD8⁺ CTL yang menginfiltrasi tumor dapat digunakan sebagai faktor prognostik. Misalnya, pada kanker payudara, peningkatan sel T CD8⁺ secara signifikan di lokasi tumor telah terbukti memiliki korelasi terbalik dengan stadium tumor lanjut dan korelasi positif dengan hasil klinis. Temuan serupa dari prognosis yang menguntungkan terkait dengan akumulasi sel T CD8⁺ yang menginfiltrasi tumor dilaporkan pada karsinoma kolorektal, sel skuamosa oral, pankreas, dan ovarium.

Eksperimen pada tikus dan studi klinis pada manusia baru-baru ini dengan jelas menunjukkan kontribusi limfosit T CD8⁺ dalam pengendalian perkembangan tumor. Limfosit T CD8⁺ adalah komponen konstitutif dari respon imun selama perkembangan kanker. Dalam model murine, efisiensi berbagai vaksin kanker bergantung pada kemampuannya untuk menginduksi limfosit CD8⁺ T. Respon klinis pada pasien kanker yang diobati dengan imunoterapi telah dikaitkan dengan adanya limfosit T

CD8⁺ antitumor spesifik. Pada melanoma regresif spontan, sel T sitotoksik spesifik antigen intratumor berkembang menunjukkan keterlibatan mereka dalam penyusutan tumor. Pemberian klon T sitotoksik spesifik antitumor pada tikus menghasilkan respons antitumor yang secara langsung menunjukkan efisiensi terapeutik sel-sel ini. Namun, dalam kebanyakan kasus selama perkembangan kanker, keberadaan limfosit T antitumor CD8 tidak terkait dengan respons klinis. Kelainan fungsional intrinsik sel-sel ini atau cacat migrasi sel CD8⁺ T ke tumor mungkin sebagian menjelaskan kegagalan mereka untuk menghambat perkembangan tumor. Di sisi lain, tumor juga mengembangkan mekanisme kekebalan *runaway* (modulasi turun antigen tumor, sekresi faktor immunosupresif, ekspresi molekul anti-apoptosis oleh tumor, atau faktor pro-apoptosis yang menyebabkan kematian sel T) untuk melawan sel T CD8⁺ menyerang. Untuk menghindari mekanisme *runaway* tumor ini, vaksin kanker yang efisien harus merekrut sel T CD8⁺ yang terkait dengan efektor kekebalan lainnya.

2.5. Patogenesis Kanker

Tubuh terdiri dari berbagai jenis sel. Sebagai unit dasar kehidupan, penting untuk menjaga tubuh agar selalu dalam kondisi sehat sehingga sel-sel tersebut tumbuh dan membelah secara terkontrol. Sel-sel baru bertugas menggantikan sel-sel yang tua, rusak dan mati. Namun jika ada mutasi atau kerusakan DNA maka sel dapat mengalami pertumbuhan yang tidak terkendali, dan kanker akan mulai terbentuk. Gen bertugas mengatur pembentukan protein melalui proses transkripsi dan translasi, hanya terekspresi jika menghasilkan protein. Proses pertumbuhan dan diferensiasi sel juga tak kalah penting karena menentukan ekspresi gen. Kedua proses tersebut berfungsi „menghidupkan' dan „mematikan' gen.

Kanker adalah pertumbuhan jaringan yang baru sebagai akibat dari proliferasi (pertumbuhan berlebihan) sel abnormal secara terus menerus yang memiliki kemampuan untuk menyerang dan merusak jaringan

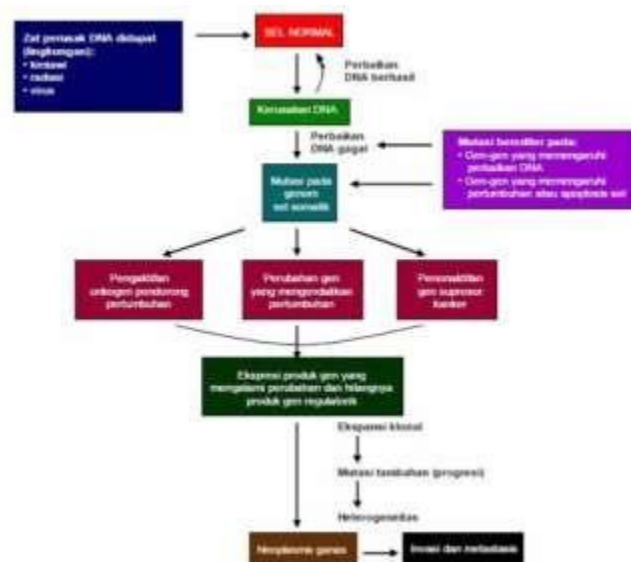
lainnya. Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel yang tidak terkendali. Sel kanker memiliki kemampuan untuk menyerang jaringan biologis lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan yang bersebelahan (invasi) atau dengan migrasi sel ke tempat yang jauh (metastasis). Pertumbuhan yang tidak terkendali tersebut disebabkan adanya kerusakan DNA, menyebabkan mutasi di gen vital yang mengontrol pembelahan sel. Beberapa buah mutasi dibutuhkan untuk mengubah sel normal menjadi sel kanker. Mutasi tersebut dapat diakibatkan oleh agen kimia maupun agen fisik yang disebut karsinogen, salah satu contoh senyawa karsinogen adalah Azoksimetana (AOM).

Senyawa karsinogen tersebut adalah suatu karsinogen genotoksik kolon yang digunakan untuk menginvestigasi karsinogenesis pada hewan rodensia. DSS merupakan karsinogen non genotoksik polisakarida sulfat sintesis yang menyebabkan inflamasi usus (*ulcerative colitis*) pada hewan rodensia (Suzuki *et al.* 2006). Dimetilhidrazin (DMH) dan azoksimetana (AOM) merupakan karsinogen eksogen yang mengalami proses detoksifikasi di hati oleh enzim-enzim mikrosomal. Tahap pertama merupakan aktivasi, yaitu mengkondisikan xenobiotik agar bersifat lebih mudah larut dalam sirkulasi darah sehingga mudah diberi perlakuan pada tahap selanjutnya. Sedangkan pada tahap kedua yaitu tahap konjugasi yang membuat xenobiotik tersebut dapat diekskresikan (Levi 2000). Mutasi dapat terjadi secara spontan ataupun diwariskan (mutasi germline) (Kumar dan Robin, 1995).

Kanker disebabkan adanya genom abnormal, terjadi karena adanya kerusakan gen yang mengatur pertumbuhan diferensiasi sel. Gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel disebut *protooncogen* dan *tumor suppressor genes*, dan terdapat pada semua kromosom dengan jumlah yang banyak. *Protooncogen* yang telah mengalami perubahan hingga dapat menimbulkan kanker disebut onkogen. Suatu pertumbuhan normal diatur oleh kelompok gen, yaitu *growth promoting protooncogenes*, *growth inhibiting cancer supresor genes (antioncogenes)*

dan gen yang berperan pada kematian sel terprogram (apoptosis). Selain ketiga kelompok gen tersebut, terdapat juga kelompok gen yang berperan pada DNA repair yang berpengaruh pada proliferasi sel. Ketidakmampuan dalam memperbaiki DNA yang rusak menyebabkan terjadinya mutasi pada genom dan menyebabkan terjadinya keganasan. Proses karsinogenesis merupakan suatu proses multi tahapan dan terjadi baik secara fenotip dan genetik. Pada tingkat molekuler, suatu progresi merupakan hasil dari sekumpulan *lesi netic* (Maramis, 2005).

Ada tiga jenis karsinogen, pertama yaitu karsinogen kerja-langsung, umumnya tidak stabil dan cepat rusak sehingga tidak banyak berperan dalam karsinogenesis. Kedua, pro-karsinogen, merupakan karsinogen *proximate* tidak aktif, berperan sangat besar dan dimetabolisasi di dalam tubuh menjadi jenis yang ketiga yaitu karsinogen *ultimate* yang sangat reaktif. Karsinogen ketiga ini masuk ke inti sel dan bereaksi dengan DNA, membentuk senyawa kompleks DNA-karsinogen yang mampu mengubah atau merusak transkripsi atau translasi genetic (Maramis, 2005).



Gambar 7. Skema sederhana dasar molekuler penyakit kanker.

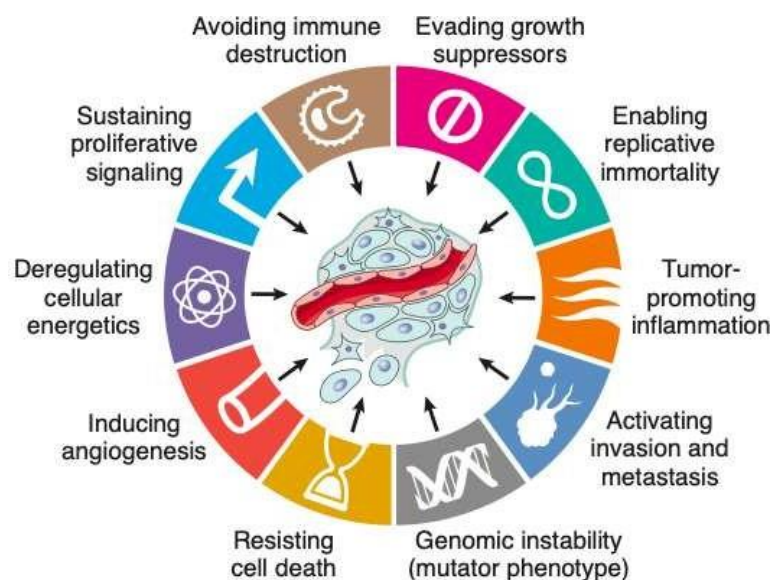
The hallmark of cancer (karakter sel kanker) adalah konteks perubahan mendasar dalam fisiologi sel yang secara bersama-sama menentukan fenotipe keganasan yang ditunjukkan pada Gambar 8.

1. *Sustaining proliferative signaling*: Sel normal memerlukan sinyal eksternal untuk pertumbuhan dan pembelahannya, sedang sel kanker mampu memproduksi *growth factors* dan *growth factor receptors* sendiri. Dalam proliferasinya sel kanker tidak tergantung pada sinyal pertumbuhan normal. Mutasi yang dimilikinya memungkinkan sel kanker untuk memperpendek *growth factor pathways*. Ekspresi Ki-67 berkorelasi dengan proliferasi sel dan merupakan penanda prognostik untuk berbagai kanker.
2. *Evading Growth suppressor* : Sel normal merespon sinyal penghambatan pertumbuhan untuk mencapai homeostasis. Jadi ada waktu tertentu bagi sel normal untuk proliferasi dan istirahat. Sel kanker tidak mengenal dan tidak merespon sinyal penghambatan pertumbuhan, keadaan ini banyak disebabkan adanya mutasi pada beberapa gen (protoonkogen) pada sel kanker.
3. *Avoiding Imune destruction* : Mekanisme kerja agen biologis berbasis imun ini berada di dalam sistem imun inang.
4. *Enabling replicative Immortality* : Sel normal mengenal dan mampu menghentikan pembelahan selnya bila sudah mencapai jumlah tertentu dan mencapai pendewasaan. Penghitungan jumlah sel ini ditentukan oleh pemendekan telomere pada kromosom yang akan berlangsung setiap ada replikasi DNA. Sel kanker memiliki mekanisme tertentu untuk tetap menjaga telomere yang panjang, hingga memungkinkan untuk tetap membelah diri. Kecacatan dalam regulasi pemendekan telomere inilah yang memungkinkan sel kanker memiliki *unlimited replicative potential*.

5. *Tumor promoting inflammation* : Respon inflamasi memainkan peran yang menentukan pada berbagai tahap perkembangan tumor, termasuk inisiasi, promosi, konversi ganas, invasi, dan metastasis.
6. *Activating Invasion and metastasis*: Sel normal berpindah ke lokasi lain di dalam tubuh. Perpindahan sel kanker dari lokasi primernya ke lokasi sekunder atau tertier merupakan faktor utama adanya kematian yang disebabkan karena kanker. Mutasi memungkinkan peningkatan aktivitas enzim yang terlibat invasi sel kanker (MMPs). Mutasi juga memungkinkan berkurangnya atau hilangnya adhesi antar sel oleh molekul-molekul adhesi sel, meningkatnya *attachment*, degradasi membran basal, serta migrasi sel kanker (Karsono, 2006).
7. *Inducing Angiogenesis (formation of blood vessel)*: sel normal memiliki ketergantungan terhadap pembuluh darah untuk mendapatkan suplai oksigen dan nutrient yang diperlukan untuk hidup. Namun bentuk dan karakter pembuluh darah sel normal lebih sederhana atau konstan sampai dengan sel dewasa. Sel kanker mampu menginduksi angiogenesis, yaitu pertumbuhan pembuluh darah baru di sekitar jaringan kanker. Pembentukan pembuluh darah itu baru diperlukan untuk *survival* sel kanker dan ekspansi ke bagian lain dari tubuh (metastase). Kecacatan pada pengaturan keseimbangan *inducer angiogenik* dan inhibitorynya dapat mengaktifkan *angiogenic switch*.
8. *Genome Instability and Mutation* : Mutasi adalah perubahan urutan DNA suatu organisme. Ketidakstabilan genom adalah karakteristik sebagian besar sel kanker. Ini adalah kecenderungan peningkatan perubahan genom selama pembelahan sel. Kanker sering terjadi akibat kerusakan pada beberapa gen yang mengendalikan pembelahan sel dan penekan tumor.
9. *Resisting Cell Death* : Kemampuan sel untuk melawan kematian sel di bawah kondisi hipoksia merupakan pusat perkembangan kanker dan perolehan resistensi terhadap kemoterapi yang sering ditemui pada tumor. Hipoksia dalam lingkungan mikro tumor memberikan tekanan

selektif yang mendukung sel-sel yang telah kehilangan fungsi gen apoptosis dan dapat berkembang tak terkendali.

10. *Deregulating Cellular energetics* : Deregulasi Energi Seluler adalah salah satu elemen kunci dari Ciri-ciri Kanker. Pertumbuhan yang tidak terkendali mendefinisikan kanker. Pertumbuhan membutuhkan sel kanker untuk mereplikasi semua komponen selulernya; DNA, RNA, protein, dan lipidnya semuanya harus digandakan agar dapat membelah menjadi sel anak.



Gambar 8. Hallmarks of cancer. (Modified from Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*)

Kanker digolongkan berdasarkan jaringan dan jenis sel asal : (1) Sarkoma, yang tumbuh dari jaringan penyambung dan penyokong, seperti tulang, tulang rawan, saraf, pembuluh darah, otot dan lemak; (2) Karsinoma, bentuk kanker yang paling umum menyerang manusia, tumbuh dari jaringan epitelial (jaringan bersel yang menutupi permukaan), seperti kulit dan lapisan rongga dan organ tubuh, dan jaringan kelenjar, seperti jaringan payudara dan prostat. Karsinoma dengan struktur berlapis-lapis yang menyerupai kulit disebut sebagai karsinoma sel skuamosa (sel tanduk), sedangkan yang menyerupai jaringan kelenjar disebut sebagai adenokarsinoma; (3) Leukemia dan limfoma, merupakan

bentuk kanker yang menyerang jaringan pembentuk darah dan dicirikan oleh pembesaran kelenjar getah bening, penyerangan terhadap limpa dan sumsum tulang, dan produksi sel darah putih yang belum matang secara berlebihan.

Faktor-faktor penyebab kanker belum diketahui secara pasti. Pola makan dan gaya hidup yang salah dapat memicu pertumbuhan sel kanker yang meningkat. Selain itu, faktor seperti radiasi serta adanya virus disinyalir dapat turut berkontribusi terhadap pertumbuhan sel kanker (Dalimartha 1999).

2.5.1.1. Siklus Sel dan Proliferasi Sel

Siklus sel terbagi atas empat fase, yaitu fase Gap G1, fase S (fase sintesis DNA), fase Gap G2 dan fase M (fase pembelahan inti dan sel. Selain empat fase tersebut, terdapat sebuah fase lain yaitu fase G0. Pada fase ini sel berada pada kondisi istirahat dan tidak melakukan pembelahan. Sel pada fase G0 dapat beristirahat dalam waktu yang cukup lama bahkan permanen (Pelengaris dan Khan, 2006).

Fungsi mendasar dari siklus sel adalah untuk menduplikasi dengan akurat keseluruhan DNA pada kromosom sel induk kemudian membagikan salinan tersebut secara tepat kepada dua sel anakan sehingga genetiknya identik dengan sel induk, dimana tiap-tiap sel anakan tersebut mendapatkan salinan dari keseluruhan genom induk. Proses duplikasi kromosom terjadi selama fase S (sintesis DNA) kemudian dilanjutkan dengan proses pembagian kromosom dan pembelahan sel yang terjadi pada fase M (mitosis) (Alberts *et al.*, 2008).

Fase gap memberi waktu kepada sel untuk tumbuh sekaligus memonitor kondisi lingkungan internal dan eksternal untuk memastikan kondisi tersebut cocok dan persiapan telah lengkap sebelum sel berkomitmen untuk memasuki fase S maupun M. Jika kondisi lingkungan eksternal menguntungkan dan terdapat sinyal pertumbuhan, sel dari fase G1 atau G0 akan bergerak menuju start/restriction point. Setelah melewati

titik ini, sel berkomitmen untuk melakukan replikasi DNA dan proses tersebut akan tetap berlangsung meskipun sinyal ekstraseluler yang menstimulasi pertumbuhan tersebut dihilangkan (Alberts *et al*, 2008).

Supaya siklus sel berjalan secara benar dan terkendali maka terdapat dua macam mekanisme kontrol siklus sel yang menyertainya. Mekanisme control tersebut merupakan suatu jalur atau cascade fosforilasi protein yang memungkinkan sel berjalan dari satu tahap ke tahap berikutnya. Jalur ini melibatkan famili kinase yang diregulasi dengan ketat (Collins, *et al* 1997). Menurut Pelengaris dan Khan (2006) setiap fase dari siklus sel dipengaruhi oleh aktivasi cyclin-dependent kinase (CDK) yang terkait dengan protein regulator subunitnya, yaitu Cyclin. Ikatan antara kedua jenis protein ini menentukan kelangsungan dari siklus sel. Mekanisme kontrol siklus sel yang kedua adalah satu set checkpoints yang memonitor kelengkapan dari peristiwa kritis pada siklus sel seperti replikasi DNA dan segregasi kromosom. Jika checkpoints ini diaktivasi oleh adanya replikasi yang belum tepat ataupun kerusakan DNA, maka kemajuan siklus sel ke tahap berikutnya akan mengalami penundaan (Collins, *et al* 1997).

Menurut Kumar, *et al* (2005) dan Robin & Cotran (2007) terdapat beberapa jenis cyclin, yaitu cyclin A, B, C, D, E yang masing-masing akan diekspresikan secara periodik pada tahap tertentu dari siklus sel. Cyclin D memiliki peran sentral karena ekspresinya diregulasi oleh faktor pertumbuhan dan kompleks cyclin D-CDK ini akan memfosforilasi protein retinoblastoma (pRB). Fosforilasi pRB mengakibatkan lepasnya faktor transkripsi E2F yang akan memediasi transkripsi dari beberapa gen yang mengkode protein-protein yang menentukan kelangsungan dari siklus sel. Hal ini menunjukkan bahwa cyclin D merupakan starter dari siklus sel (Alison, 2001).

Senyawa bioaktif polifenol yang terkandung dalam bahan alam diketahui mempunyai efek memblok reseptor growth factor, dan menghambat Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), pada jalur sinyal

Receptor Tirosin Kinase (RTKs). Pada penelitian yang dilakukan terhadap kanker payudara ditemukan bahwa senyawa polifenol yang terkandung dalam herbal medicine mempunyai efek inhibisi pada MAPK. Polifenol juga mampu memblokir berbagai RTKs, seperti Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGF), Fibroblast Growth Factor Receptor (FGF) yang sangat berperan dalam mitosis sel (Hiroko, *et al* 2002).

Kandungan flavonoid pada suatu bahan alam merupakan senyawa inhibitor spesifik terhadap CDKs (Cyclin Dependent Kinases) yang dapat merubah aktivitas proliferasi sel. Seperti yang diketahui progresi siklus sel dikontrol oleh aktivitas CDKs sehingga senyawa flavonoid dapat berperan sebagai agen anti tumor. Penelitian mengenai potensi flavonoid terhadap siklus sel dimana diteliti kompleks CDK2 - L868276 (flavopiridol analog) menunjukkan bahwa ikatan tersebut memiliki afinitas yang kuat dibanding ikatan kompleks CDK – ATP sehingga memiliki potensi inhibitor yang lebih kuat dengan IC50 : 0,4 μ M (De Padua, *et al.* 1996). Penelitian lain yang dilakukan pada siklus sel glioblastoma ditemukan bahwa senyawa Flavonoid berupa Jaceosidin dapat menginduksi arrest pada fase G2/M pada sel U87 Glioblastoma, upregulation gen p53 dan p21, downregulation cyclin B1 dan CDK1 yang memungkinkan terjadinya repair kerusakan DNA sebelum mitosis (Khan, *et al* 2011). Penelitian mengenai inhibisi CDK sebagai terapi anti kanker menunjukkan bahwa kandungan flavonoid pada berbagai bahan alam dapat berperan dalam proses antikarsinogenesis yang disebabkan mekanisme inhibisi Tyrosine kinase.

2.5.1.2. Kanker Kolorektal

Kanker kolorektal (CRC) adalah kanker di bagian kolon dan rektum. Kolon atau usus besar adalah bagian usus sesudah usus halus, terdiri dari kolon sebelah kanan (*kolon asenden*), kolon sebelah tengah atas (*kolon transversum*) dan kolon sebelah kiri (*kolon desenden*). Bagian kolon yang berhubungan dengan usus halus disebut sekum, sedangkan bagian kolon

yang berhubungan dengan rektum disebut kolon sigmoid. Mukosa kolon terdiri dari epitel selapis silindris dengan sel goblet. Otot bagian sebelah dalam sirkuler dan sebelah luar longitudinal yang terkumpul pada tiga tempat membentuk taenia coli. Lapisan serosa membentuk tonjolan tonjolan kecil yang sering terisi lemak yang disebut *appendices epiploicae*. Kolon adalah tempat utama bagi absorpsi air dan pertukaran elektrolit. Sebanyak 90% kandungan air diserap di kolon yaitu sekitar 1 - 2 liter per hari. Perkembangan kanker kolon merupakan sebuah proses yang bertahap, dimana proses dimulai dari hiperplasia sel mukosa, pembentukan adenoma, perkembangan dari displasia menuju transformasi maligna dan invasif kanker. Aktifasi onkogen, inaktivasi gen penekan tumor dan DCC (*deleted in colorectal cancer*) memungkinkan perkembangan dari formasi adenoma, perkembangan dan peningkatan displasia dan invasif karsinoma (Suzuki, *et al* 2006).

2.5.1.3. Model Tumor Kolon Rodensia dengan Senyawa Karsinogen Azoxymetana (AOM) dan Dekstran Sodium Sulfat (DSS) sebagai model induksi kanker

Model rodensia pada studi kanker kolon telah dilakukan sejak 80 tahun yang lalu. Keuntungan menggunakan hewan model rodensia diantaranya adalah induksinya berlangsung cepat, dapat direproduksi dan menggambarkan proses perubahan adenoma ke karsinoma seperti yang terjadi pada manusia. Kemampuan untuk menginduksi tumor kolorektal model *in vivo* merupakan cara untuk mempelajari berbagai aspek karsinogenesis atau metastasis seperti yang terlihat dalam CRC (*colorectal cancer*) manusia. Model *in vivo* dapat digunakan untuk studi kemopreventif untuk mengevaluasi imunologi, kimia, dan terapi. Model hewan rodensia CRC hasil rekayasa genetika (mencit strain Min/APC) sering dipakai sebagai hewan model reproduksi perkembangan tumor (Robertis, *et al* 2011).

Penggunaan karsinogen sebagai model induksi pertama kali dilakukan pada mencit yang diberi pangan yang mengandung hidrokarbon polisiklik aromatik (PAH), metilkolantren (MCA) yang menghasilkan tumorigenesis pada lambung dan usus mencit setelah pemberian. Kemudian dilaporkan pemberian ytrium radioaktif pada tikus menghasilkan tumor kolon yang cukup tinggi. Laporan lain menyebutkan hal yang sama terjadi pada tikus putih setelah diinjeksi 4-aminodifenil dan 3,2-dimetil-4-aminodifenil (Rosenberg, *et al* 2009).

Penelitian eksperimental karsinogenesis kolon pada rodensia seperti mencit dan tikus telah banyak diteliti. Kripta abberan mula-mula ditemukan pada kolon tikus pada penelitian eksperimental menggunakan model hewan percobaan yang dipapari bahan karsinogen seperti azoksimetana (AOM) dan 1,2 dimetilhidrazin (1,2 DMH). Target utama induksi karsinogen ini adalah intestinum, khususnya kolon dan rektum. Spesies hewan coba, rute pemberian dan dosis mempengaruhi karsinogenisitas AOM dan 1,2 DMH. Selektifitas organ target berdasarkan rute pemberian AOM untuk menginduksi kanker kolon pada tikus dan mencit. Sensitifitas karsinogen yang diinduksi tergantung pada strain dari hewan rodensia tersebut. Tikus yang menjadi model untuk karsinogen DMH/AOM adalah strain *F344*, *Sprague Dawley*, atau Wistar. Pemberian DMH/AOM berulang pada subkutan merupakan cara yang dapat diandalkan untuk menginduksi kanker kolon pada hewan pengerat khususnya tikus. Secara mikroskopis, terdapat gambaran hiperplasia dan kadang ditemukan fokus displasia. Kripta yang menyimpang (ACF) merupakan bentuk awal dari suatu adenoma ditemukan 8 – 12 minggu pasca induksi untuk studi jangka pendek atau kuantitatif jumlah tumor kolon setelah 40 minggu pasca induksi untuk studi jangka panjang (Bird & Forrester 1981).

Karsinogen 1,2-dimetilhidrazin (DMH), azoksimetan (AOM), dan dekstran sodium sulfat banyak dipakai untuk menghasilkan kanker kolorektal sporadik. Strain mencit yang ditemukan sensitif terhadap

karsinogenesis kolon yang diinduksi AOM/DSS yaitu BALB/c, C3H/Hen, C57BL dan DBA/2N. Pengujian sensitivitas AOM/DSS terhadap beberapa strain mencit dilaporkan oleh Suzuki *et al.* (2006). Induksi AOM intraperitoneal dengan dosis tunggal 10mg/kg BB yang diikuti dengan pemberian 1% DSS yang ditambahkan pada air minum selama 4 hari. Insiden adenokarsinoma kolon mencapai 100% dengan multifikasi $11,4 \pm 5,9$ pada mencit BALB/c, pada mencit C57BL/6N dengan multifikasi $2,5 \pm 2,1$ adenokarsinoma mencapai 50%, adenoma kolon insidennya dijumpai sedikit pada mencit strain C₃H/HeN (29% dengan multifikasi $0,7 \pm 1,5$).

Penggunaan dosis tunggal AOM 10 mg/kg berat badan yang diinjeksi melalui intraperitoneal dan 2 % DSS yang dicampurkan bersama air minum selama seminggu diujikan pada mencit jantan BALB/c. Setelah 20 minggu perlakuan dijumpai neoplasma kolon (adenokarsinoma, insiden 100% dengan multifikasi $5,60 \pm 2,42$) dan adenoma (insiden 38% dengan multifikasi $0,20 \pm 0,40$ dijumpai lesi displasia).

Karsinogenesis yang berhubungan dengan inflamasi pada mencit yang diberikan dosis tunggal berbagai karsinogen yaitu AOM, PhIP dan DMH yang dilanjutkan oleh pemberian selama satu minggu 2% DSS pada air minum. Pada studi dosis DSS sebagai promotor tumor, mencit ICR jantan diberi dosis tunggal AOM melalui intraperitoneal (10 mg/kg BB) yang dilanjutkan dengan pemberian DSS (BM 40000) dengan dosis bervariasi dari 0.1 sampai 2% (berat/volume) pada air minum selama satu minggu. Pada minggu ke-14, mencit yang menerima AOM dan 2% DSS menghasilkan insiden paling tinggi dengan multiplikasi adenoma kolon tubular (75%) dan adenokarsinoma (100%). Tumor kolon tidak tumbuh pada mencit yang menerima AOM + 0.25% DSS dan AOM + 0.1% DSS walaupun masih ditemukan displasia kriptas (Suzuki, *et al* 2006)

2.5.2. Anti Kanker

Antikanker adalah zat yang dapat menghambat atau membunuh sel kanker. Penelitian untuk pengobatan penyakit kanker telah banyak

dilakukan. Hasil penelitian yang telah digunakan pada terapi kanker antara lain terapi radiasi, pembedahan dan terapi dengan bahan kimia (kemoterapi). Terapi kanker dapat dilakukan dengan satu macam terapi atau dikombinasikan. Kesulitan pada kemoterapi terutama untuk menghasilkan dosis letal yang bersifat sitotoksik pada sel tumor tapi tidak merusak sel normal (Mycek, *et al* 2000).

Akhir-akhir ini kemoterapi menjadi salah satu terobosan dalam pengendalian kanker. Meskipun penemuan dan pemakaian kemoterapi menunjang hasil yang bagus tetapi toksisitas dan efek sampingnya sangat besar (Siswandono 1993). Terapi kanker seperti kemoterapi maupun radiasi kerap membuat sel yang sehat ikut terbunuh, sehingga daya tahan tubuh bisa melemah. Upaya pendukung yang banyak dilakukan oleh penderita kanker adalah menggunakan obat-obatan alami. Obat-obatan tersebut mempunyai kemampuan meningkatkan sistem imun.

Rivory (2002) menyatakan bahwa kerja obat anti antikanker dibagi dalam beberapa mekanisme yaitu :

- a Merusak DNA secara langsung (agen pengkelat), melalui protein (misalkan topoisomerase poison) dan kehilangan siklus basa (nukleosida analog).
- b Mengganggu sintesis kofaktor penting dan prekursor protein/DNA/RNA (antimetabolit, asparaginase).
- c Mengganggu struktur seluler dan proses (obat antimikrotubul seperti *docetaxel*, *paclitaxel* dan *vinca alkaloid*)

Penghambatan pertumbuhan/penanda anti kematian (inhibitor tirosin kinase). Mekanisme ini menyebabkan kematian sel-sel akut (nekrosis), kematian sel terprogram (apoptosis), penghentian pertumbuhan atau diferensiasi.

2.5.2.1. Uji Bioaktivitas

Uji bioaktivitas adalah uji pendahuluan untuk mengamati aktivitas farmakologi suatu senyawa. Prinsip uji bioaktivitas adalah suatu komponen senyawa bioaktif selalu bersifat toksik jika diberikan pada dosis yang tinggi dan menjadi obat pada dosis rendah. Oleh karena itu daya bunuh *in vivo* dari senyawa dapat digunakan untuk menapis ekstrak tumbuhan yang mempunyai bioaktivitas. Salah satu organisme yang sangat sesuai untuk uji tersebut adalah larva udang atau *Artemia salina*.

Metode uji *Brine Shrimp Lethality Test* (Uji BSLT) ini menggunakan larva *Artemia salina*. Kemampuan bioaktivitas diketahui berdasarkan jumlah kematian larva udang akibat pemberian ekstrak. Ekstrak bersifat sitotoksik bila harga LC50-nya < 1000 ppm (Meyer *et al.* 1982). Metode ini mempunyai beberapa keuntungan antara lain, waktu pelaksanaan cepat, biaya relatif murah, pengerjaan sederhana, tidak memerlukan teknik aseptik, tidak memerlukan peralatan khusus, menggunakan sampel dalam jumlah relatif sedikit dan tidak memerlukan serum hewan seperti pada uji sitotoksik (Meyer, *et al* 1982). Hasil bioassay terhadap senyawa-senyawa tersebut menggunakan udang *Artemia salina* menunjukkan sifat sitotoksik yang tinggi. *Artemia salina* Leach merupakan hewan coba yang digunakan untuk praskrining aktivitas antikanker di *National Cancer Institute*, Amerika Serikat.

2.5.2.2. Uji Anti Kanker

Ada empat jenis uji daya antikanker suatu senyawa, yaitu *prescreen test*, *screen test*, *monitor test*, dan *secondary test* (Sufness dan Pezzuto 1991). *Prescreen* digunakan untuk mengetahui apakah suatu senyawa merupakan senyawa bioaktif. Uji ini harus memiliki kapasitas yang tinggi dengan biaya yang rendah dan waktu yang cepat. Dalam *screen test* dipilih ekstrak untuk digunakan pada *secondary test*, sedangkan *monitor test* berguna sebagai panduan pada pemisahan ekstrak pekat melalui isolasi ekstrak murni sebagai senyawa bioaktif. Uji ini harus cepat, murah, berkapasitas tinggi, dan mudah diperoleh.

Secondary test dilakukan untuk menguji ekstrak murni yang diperoleh pada beberapa model dan kondisi untuk memilih ekstrak yang akan dikembangkan sebagai obat pada terapi antikanker. Uji ini berkapasitas rendah, lambat dan mahal. *Prescreen test* dilakukan untuk mendapatkan nilai LC50, yaitu konsentrasi yang dapat mematikan 50% hewan uji dalam waktu 24 jam. Uji yang paling sering dilakukan adalah uji kematian larva udang (BSLT= *brine shrimp lethality test*).

Uji antikanker dapat dilakukan secara *in vivo* dan *in vitro*. Uji *in-vivo* secara spesifik dapat dilakukan secara mekanik maupun seluler, untuk mencari kemampuan sitotoksik, antimitotik dan antimetastatik. Uji ini juga dapat dilakukan dengan melihat interaksinya dengan DNA (Suffnes dan Pezzuto 1991). Salah satu uji yang didasarkan pada interaksi dengan DNA adalah dengan cara melihat kemampuan senyawa uji untuk menghambat topoisomerase I dan II yang digunakan pada replikasi DNA.

Kultur sel dari jaringan sel kanker diperbanyak dibawah kondisi yang sesuai sampai sel dapat menggunakan semua substrat, menjadi sangat padat (terlihat dekat satu sama lain) atau mencapai konfluen. Setelah mencapai konfluen, sel harus dipindahkan ke dalam wadah yang baru dengan medium yang baru untuk mendukung pertumbuhannya kembali, istilah ini disebut sub kultur (*passage*). *Cell lines* adalah sel yang berasal dari kultur primer yang telah dibiakkan secara berkala, ditumbuhkembangkan, dipelihara, dan disimpan dalam nitrogen cair. *Cell lines* yang telah disubkultur umumnya mempunyai fraksi pertumbuhan yang cukup tinggi (lebih dari 80%). Salah satu keistimewaan dari *cell lines* ini adalah bersifat abadi (*immortal*), sel ini masih dapat hidup dalam kondisi media seminimal mungkin. *Cell line* tertentu dapat mengalami transformasi sehingga dapat berkembang secara immortal seperti sel tumor, ini disebut *continuous cell line*. *Continuous cell line* yang diklon dan dikarakterisasi akan menurunkan *continuous cell strain* (Freshney 1994).

Sel yang telah dikultur akan tumbuh dan bertambah banyak dalam kondisi *in vitro* dan tidak akan memiliki fungsi *in vivo*-nya lagi. Sel yang

berasal dari jaringan atau organ yang diuraikan secara mekanis ataupun enzimatis menjadi suspensi sel dibiakkan diatas permukaan yang keras seperti botol, tabung, cawan ataupun *multiwell*, atau menjadi suspensi sel dalam media pertumbuhan. Untuk pertumbuhan sel dalam kultur dibutuhkan lingkungan yang kompleks seperti di dalam tubuh. Sel memerlukan media penumbuh yang dapat membuat sel tetap bertahan hidup, berkembang dan berdiferensiasi (Cartwright & Shah, 1994).

Jumlah dan kualitas media menentukan jumlah sel yang dapat ditumbuhkan dalam kultur. Pemilihan media harus didasarkan pada kebutuhan sel yang ditumbuhkan dan disesuaikan dengan tujuan studi yang menggunakan sel tersebut. Teknik kultur sel memiliki kelebihan karena lingkungan tempat hidup sel seperti pH, tekanan osmosis, tekanan CO₂ dan O₂ dapat dikontrol dan diatur sehingga kondisi fisiologis dari kultur relatif konstan (Freshney, 1994).

Fungsi utama media pada teknik kultur sel adalah untuk mempertahankan pH dan osmolalitas esensial untuk viabilitas sel serta penyedia nutrisi dan energi yang dibutuhkan untuk multiplikasi dan pertumbuhan sel (Cartwright & Shah, 1994). Media untuk pertumbuhan sel harus mengandung asam amino, vitamin, glukosa, garam berbagai suplemen organik seperti protein, peptide, nukleosida dan lipid serta hormon dan faktor pertumbuhan. Media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) dan *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) adalah media kultur sel terbaik untuk menumbuhkan sel limfosit dan alur sel kanker manusia untuk jangka pendek.

Ada dua jenis kultur sel kanker, yaitu kultur dalam bentuk suspensi dan kultur dalam bentuk selapis atau monolayer. Kultur sel dalam bentuk suspensi diturunkan dari sel yang dapat bertahan hidup atau mampu berproliferasi dalam media tanpa memerlukan *support* atau faktor pembantu untuk menempel. Kultur sel dalam bentuk selapis memerlukan *support* untuk menempel pada permukaan tempat kultur. Dalam perkembangbiakannya, sel akan memenuhi permukaan tempat

tumbuhnya. Sel-sel yang dibiakkan dalam bentuk monolayer ini biasanya untuk sel-sel yang berasal dari jaringan (Freshney, 1994).

Alur sel A549 diisolasi pertama kali oleh Giard, *et al* (1973) berasal dari sel karsinoma paru-paru dari pria berumur 58 tahun dengan morfologi menyerupai epithelial. Sel kanker hepatoma atau dikenal juga dengan *Hepatocellular carcinoma* (HCC) adalah jenis kanker hati, Kanker hepar dapat bermula dari organ bagian hepar (hepatocellular cancer) atau dapat juga berasal dari organ lain, misalnya dari kolon, yang menyebar ke hati (metastatic liver cancer), dan Sel MCF-7 merupakan salah satu model sel kanker payudara, Sel tersebut diambil dari jaringan payudara seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif, berupa sel adherent (melekat). Ketiga jenis sel tersebut secara morfologis merupakan sel epitel yang berbentuk poligonal dan menempel pada sel monolayer. Sel WiDr adalah sel kanker kolon manusia yang diisolasi dari kolon seorang wanita berusia 78 tahun. Sel WiDr merupakan turunan sel kanker kolon yang lain yakni sel HT-29. Sel WiDr memproduksi antigen karsinoembrionik dan memerlukan rentang waktu sekitar 15 jam untuk dapat menyelesaikan 1 daur sel (Chen, et al 1987).

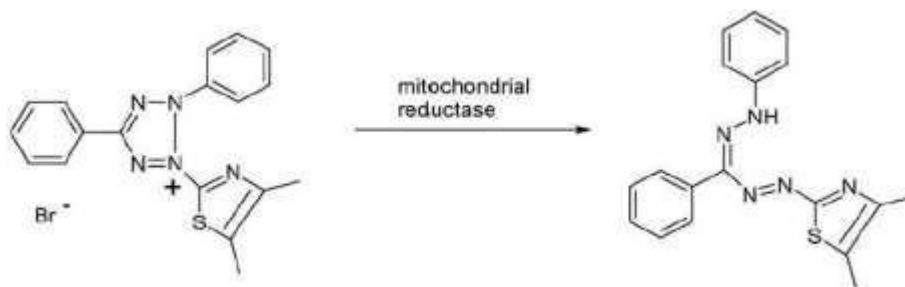
2.5.2.3. Metode Mengukur Proliferasi Sel

Proliferasi adalah fase sel saat mengalami pengulangan siklus sel tanpa hambatan. Istilah proliferasi sel secara khusus berlaku untuk peningkatan jumlah sel, yang diukur sebagai jumlah sel sebagai fungsi waktu. Tes proliferasi sel digunakan dalam berbagai aplikasi penelitian ilmiah – dari pengujian obat hingga efek faktor pertumbuhan, dari pengujian sitotoksitas hingga analisis aktivitas sel. Jadi tes proliferasi sel adalah tes yang mendeteksi perubahan dalam jumlah sel dalam suatu divisi atau perubahan dalam populasi sel. Pengujian proliferasi sel dibagi menjadi empat metode yaitu : Uji aktivitas metabolik, Uji penanda proliferasi sel, tes konsentrasi ATP dan uji sintesis DNA. Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

a. Aktivitas Metabolisme sel dan Mendeteksi Proliferasi Sel.

Mendeteksi aktivitas metabolisme populasi sel dapat mencerminkan kondisi proliferasi sel itu sendiri. Aktivitas dehidrogenase laktat meningkat selama proliferasi sel, yang menyebabkan garam Tetrazolium atau Alamar Blue secara bertahap menurun di lingkungan sel yang aktif secara metabolik. Akibatnya, pewarna formazan yang dapat mengubah warna media pertumbuhan terbentuk. Kemudian kita dapat membaca absorbansi media yang mengandung pewarna tersebut dengan spektrofotometer dan dengan plate reader yang dapat mengukur aktivitas metabolisme sel dan mendeteksi proliferasi sel.

Proliferasi sel merupakan karakteristik kehidupan penting suatu organisme yang mengganti sel yang menua atau mati di dalam tubuh. MTT Assay kit (Proliferasi sel) telah banyak digunakan secara luas untuk mendeteksi proliferasi sel dan sitotoksitas. Kit uji proliferasi dan toksisitas sel mengandung MTT, MTT assay merupakan metode yang penggunaannya sudah banyak diaplikasikan dalam berbagai bidang. Metode ini berdasarkan pada perubahan garam tetrazolium (MTT) menjadi formazan dalam mitokondria sel hidup.



Gambar 9. Reaksi MTT (3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

Konsentrasi dari formazan yang berwarna ungu dapat ditentukan secara spektrofotometri visibel dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup. Kristal formazan berwarna ungu yang terbentuk terlarut dengan adanya penambahan isopropanol asam (100 μ l 0,04 N HCl dalam

isopropanol) atau SDS 10% dalam HCl 0,01N. Selanjutnya dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 550 - 595 nm. Intensitas warna ungu yang terbentuk berbanding lurus dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme (Mosmann, 1983).

Empat garam tetrazolium yang paling umum digunakan adalah: MTT, XTT, MTS dan WST1. MTT tidak larut dalam media kultur sel standar, dan kristal formazan yang dibentuknya perlu dilarutkan dalam dimetil sulfoksida (DMSO) atau isopropanol. Oleh karena itu, MTT terutama digunakan sebagai metode deteksi akhir. Tiga garam lainnya, seperti Alamar Blue, larut dan tidak beracun. Reagen garam ini dapat berfungsi sebagai alat pemantauan terus menerus untuk melihat perubahan dinamis dalam proliferasi sel. Di antara keempat garam tersebut, efisiensi XTT rendah, dan faktor tambahan perlu ditambahkan. WST1, di sisi lain, lebih sensitif dan efektif, menghasilkan pengembangan warna lebih cepat dibandingkan garam lainnya. Alamar Blue juga sangat sensitif, dapat mendeteksi meski hanya ada 100 sel saja di dalam well plate. Garam tetrazolium dan pewarna redoks Alamar Blue tersebut dapat digunakan pada berbagai instrumen. MTT atau Thiazolyl blue tetrazolium bromide atau nama lainnya (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide banyak digunakan untuk penentuan proliferasi sel dan sitotoksitas. MTT berkurang dengan adanya suksinat dehidrogenase pada mitokondria sel hidup untuk membentuk kristal ungu gelap yaitu formazan. Formazan dapat dilarutkan dalam dimetil sulfoksida (DMSO). Absorbansi (nilai OD) diukur pada panjang gelombang 490 nm atau 570nm. Jumlah atau aktivitas sel hidup dapat ditentukan oleh nilai OD tersebut. Dalam rentang jumlah sel tertentu, jumlah pembentukan kristal MTT sebanding dengan jumlah atau aktivitas sel hidup.

b. Uji Penanda Proliferasi Sel

Beberapa antigen hanya ada dalam sel yang sedang mengalami proliferasi, sedangkan sel yang tidak berproliferasi memiliki sedikit

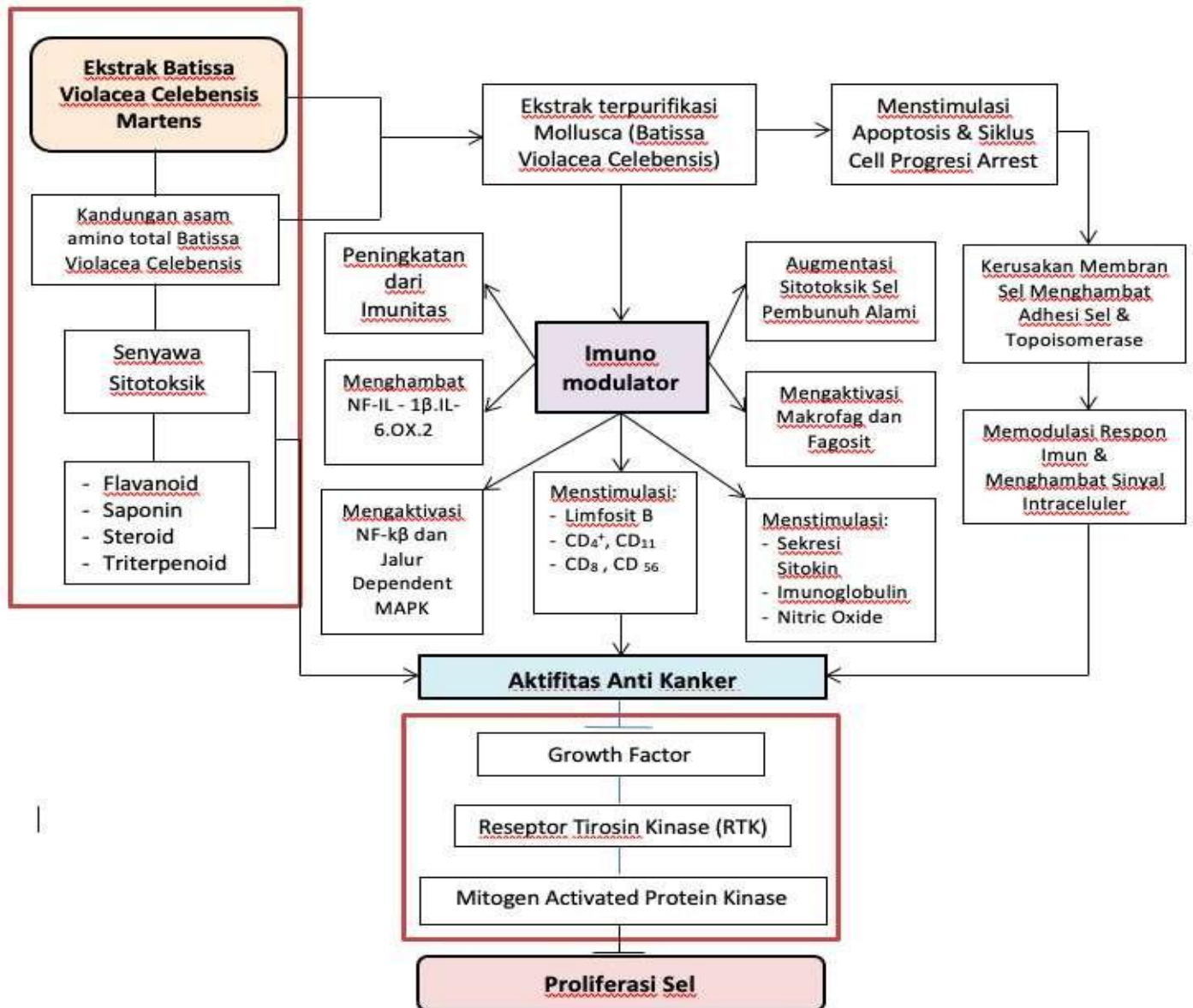
antigen tersebut dapat juga mendeteksi proliferasi sel dengan antibody monoclonal spesifik. Sebagai contoh, dalam sel manusia, antibody Ki-67 mengenali protein dengan nama yang sama dan diekspresikan dalam fase S-, G2-, dan M-dari siklus sel, tetapi tidak dalam fase G0- dan G1 (non fase proliferaatif). Proliferasi sel dapat dideteksi menggunakan antibody terhadap protein Ki-67. Karena perlunya pengirisan jaringan, metode ini tidak memungkinkan untuk analisis berkinerja tinggi. Namun demikian, metode ini sangat populer di kalangan peneliti kanker karena dapat digunakan untuk mendeteksi proliferasi sel tumor *in vivo* dan *in vitro*. Marker proliferasi atau pengatur siklus sel yang umum digunakan termasuk diantaranya PCNA (proliferating cell nuclear antigen), topoisomerase IIB, dan histone terfosforilasi H3.

2.5.3. Kerangka Teori

Kerangka teori yang mendasari penelitian ini tersaji pada Gambar 10. Penentuan kerangka teori didasarkan pada kajian pustaka yang telah dilakukan. Berdasarkan literatur diketahui bahwa ekstrak kerang pokea mengandung beberapa senyawa bioaktif.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak atau protein dari filum moluska atau kelas Bivalvia dapat dimanfaatkan sebagai bahan baru dalam pengembangan makanan fungsional yang mampu meningkatkan kesehatan dengan potensi antikanker dan kapasitas antioksidan (Chalamaiah, Yu, dan Wu 2018).

Aktivitas imunostimulan dan antikanker belum ditinjau sejauh itu. Asam amino total dan senyawa sitotoksik yang terkandung didalam ekstrak Kerang Pokea diharapkan memiliki kemampuan tentang bagaimana produksi dan mekanisme aksi imunostimulan dan antikanker yang berasal dari ekstrak kerang pokea (*Batissa violacea celebensis* Marten 1897) dengan konsep teori tergambar pada Gambar 10.

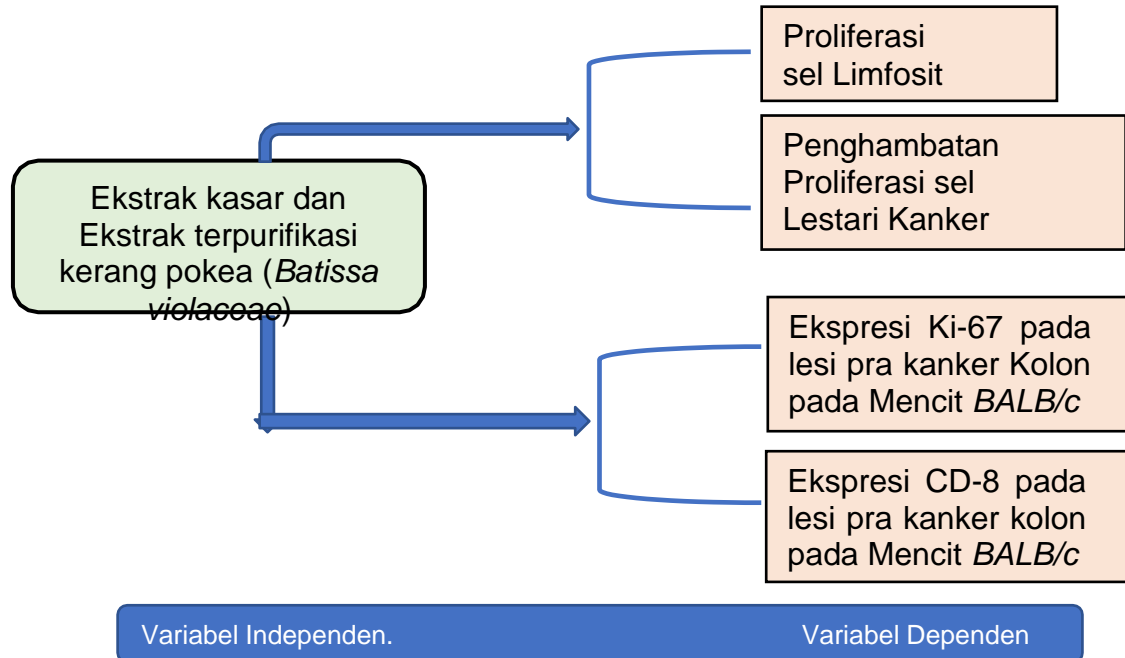


Gambar 10. Kerangka Teori

2.6. Kerangka Konsep dan Variabel

Pada Gambar 11 menunjukkan kerangka konsep dan variabel penelitian yang dibuat berdasarkan variabel yang digunakan dalam penelitian ini, dengan menggunakan ekstrak Kerang poka sebagai variabel independent, dan Proliferasi sel limfosit serta penghambatan Proliferasi

sel kanker secara *in vitro* dan ekspresi Ki-67, Ekspresi CD-8 pada Lesi pra kanker kolon secara *in vivo* sebagai variabel dependen.



Gambar 11. Kerangka Konsep

2.6.1. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas/Independen: merupakan variabel yang mempengaruhi nilai variable dependen, yaitu ekstrak dari kerang pokea (*Batissa violaceae celebensis*)
- b. Variabel terikat/dependen: merupakan variabel yang nilainya dipengaruhi oleh variable lain yaitu aktivitas proliferasi sel limfosit dan penghambatan proliferasi sel lestari kanker secara *in vitro* dan aktivitas ekstrak kerang pokea secara *in vivo* pada mencit BALB/c yang diinduksi karsinogen azoksimetana (AOM) dan dekstran sodium sulfat (DSS) terhadap ekspresi Ki-67 pada lesi pra kanker kolon dan ekspresi CD-8 pada lesi pra kanker kolon.

2.6.2. Definisi Operasional

- a. Ekstrak kasar kerang pokea (*Batissa violacea celebensis*) adalah hasil proses pemisahan/penyaringan zat-zat aktif dengan menggunakan pelarut etanol, etil asetat dan N-Hexana.
- b. Ekstrak terpurifikasi adalah proses fraksinasi lanjutan terhadap ekstrak kasar dari pelarut tertentu dengan indicator pelarut menjadi bening dan bebas dari pengotor.
- c. Aktivitas proliferasi sel limfosit adalah kemampuan sel limfosit yang ditumbuhkan dalam kultur sel jangka pendek yang mengalami proliferasi klonal ketika dirangsang secara *in vitro* oleh aktivitas biologi suatu ekstrak dengan menggunakan metode MTT untuk perhitungan jumlah sel yang berproliferasi, dan dikonversi dengan menggunakan rumus persen proliferasi.
- d. Aktivitas penghambatan proliferasi sel kanker adalah Aktivitas biologi suatu ekstrak yang bekerja menghambat terjadinya proliferasi sel kanker dengan menggunakan metode MTT, dengan hasil analisis ditentukan dengan membaca optical density (OD) pada ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm, dan dikonversi dengan menggunakan rumus persen penghambatan proliferasi sel.
- e. Sel line A549 adalah sel kanker paru. Sel ini merupakan jenis sel NSCLC yang merupakan derivat sel karsinoma epitel yang didapat dari pasien laki-laki ras kaukasia berumur 58 tahun (Franklin, 2016).
- f. Sel line hepatoma atau kanker hepatoma disebut juga kanker hati atau karsinoma hepatoseluler atau karsinoma hepato primer.
- g. Sel line MCF-7 atau disebut juga sel kanker payudara. Sel tersebut diambil dari jaringan payudara seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif, berupa sel adherent (melekat) yang dapat ditumbuhkan dalam media penumbuh DMEM atau RPMI yang mengandung fetal bovine serum (FBS) 10% dan antibiotik Penicilin-Streptomycin 1%.

- h. Sel line WiDr adalah sel kanker kolon manusia yang diisolasi dari kolon seorang wanita berusia 78 tahun. Sel WiDr merupakan turunan sel kanker kolon yang lain yakni sel HT-29.
- i. Mencit strain BALB/c adalah hewan coba jenis jantan, yang sehat, berusia 8-10 minggu, berat badan 25-30 gram, yang dijadikan sebagai hewan model dengan induksi senyawa karsinogen AOM dan DSS, sebagai model hewan kanker kolon.
- j. Azoximethana (AOM) adalah suatu karsinogen genotoksik kolon yang digunakan untuk menginvestigasi karsinogenesis pada hewan rodensia.
- k. Dextran Sodium Sulfat (DSS) adalah karsinogen non genotoksik polisakarida sulfat sintetis yang menyebabkan inflamasi usus (*ulcerative colitis*) pada hewan rodensia (Suzuki *et al.* 2006).
- l. Ekspresi Ki-67 adalah marker penanda laju proliferasi sel yang dihitung dengan menilai kuantitas sel yang terwarnai coklat pada inti sel, dan diperoleh melalui pewarnaan IHC yang dilihat dengan mikroskop cahaya.
- m. Ekspresi CD-8 adalah marker penanda sel-T sitotoksik dengan menilai kuantitas sel yang terwarnai coklat pada membran sel, dan diperoleh melalui pewarnaan IHC yang dilihat dengan mikroskop cahaya.

2.7. Hipotesis Penelitian

1. Terdapat pengaruh ekstrak kasar kerang pokea dalam meningkatkan proliferasi sel limfosit secara *in vitro*.
2. Terdapat pengaruh ekstrak kasar dan ekstrak terpurifikasi kerang pokea dalam penghambatan proliferasi sel lestari kanker secara *in vitro*.
3. Terdapat pengaruh aktivitas ekstrak terpurifikasi kerang pokea secara *in vivo* pada mencit BALB/c yang diinduksi karsinogen azoksimetana (AOM) dan dekstran sodium sulfat (DSS) terhadap penghambatan lesi pra kanker kolon.

4. Terdapat pengaruh aktivitas ekstrak terpurifikasi kerang pokea secara *in vivo* pada mencit BALB/c yang diinduksi karsinogen azoksimetana (AOM) dan dekstran sodium sulfat (DSS) sebagai imunostimulan yang dapat meningkatkan proliferasi limfosit T CD8.