

**LAPORAN AKHIR TAHUN KE-1
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI**



**POTENSI ANTIKANKER SENYAWA FLAVONOID DARIMINYAK DAUN
CENKIH MELALUI EKSPRESI MIRNA-16, MIRNA-196B DALAM MEKANISME
MOLEKULER PROLIFERASI, APOPTOSIS DAN METASTASIS PADA
PENGOBATAN KANKER HATI**

TAHUN KE 1 DARI RENCANA 3 TAHUN

TIM PENELITIAN

**Ketua
Anggota**

Dr. Maya Tejasari, dr., M.Kes

NIDN 0417077001

1. Dr. Titik Respati, drg., M.Sc.PH

NIDN 0405096505

2. Siti Annisa Devi Trusda, dr., M.Kes

NIDN 0430127005

3. Eka Hendryanny, dr., M.Kes

NIDN 0412037103

**UNIVERSITAS ISLAM BANDUNG
NOVEMBER
2018**

HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI

Judul Penelitian : POTENSI ANTIKANKER SENYAWA FLAVONOID DARI MINYAK DAUN CENKIH MELALUI EKSPRESI MIRNA-16, MIRNA-196B DALAM MEKANISME MOLEKULER PROLIFERASI, APOPTOSIS DAN METASTASIS PADA PENGOBATAN KANKER HATI

Bidang Fokus : Kesehatan dan Obat

Kode>Nama Rumpun Ilmu : 307/Ilmu Kedokteran Dasar & Biomedis

Bidang Unggulan PT : Sains Ilmu Kedokteran (Akademik)

Topik Unggulan : Onkologi dan Farmasi

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Dr. MAYA TEJASARI, dr., M.Kes

b. NIDN : 0417077001

c. Jabatan Fungsional : Lektor

d. Program Studi : Kedokteran

e. Nomor HP/Surel : 087823299766/mayatejasari@gmail.com

Anggota Peneliti (1)

a. Nama Lengkap : Dr. TITIK RESPATI, drg, M.Sc.PH

b. NIDN : 0405096505

c. Perguruan Tinggi : Universitas Islam Bandung

Anggota Peneliti (2)

a. Nama Lengkap : SITI ANNISA DEVI TRUSDA, dr., M.Kes.

b. NIDN : 0430127005

c. Perguruan Tinggi : Universitas Islam Bandung

Anggota Peneliti (3)

a. Nama Lengkap : EKA HENDRYANNY, dr., M.Kes

b. NIDN : 0412037103

c. Perguruan Tinggi : Universitas Islam Bandung

Lama Penelitian Keseluruhan : 3 tahun

Usulan Penelitian Tahun ke- : 1

Biaya Penelitian Keseluruhan : Rp 317,000,001.00

Biaya Penelitian

- diusulkan ke DRPM : Rp 112,000,001.00

- dana internal PT : Rp 20,000,000.00

- dana institusi lain : Rp 0.00 /in kind tuliskan: 0

Biaya Luaran Tambahan : Rp 0.00

Kota Bandung, 05-07-2017

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran UNISBA



(Prof. Dr. Hj. Ieva B. Akbar, dr., AIF)
NIP/NIK D.09.0.506

Ketua Peneliti

(Dr. MAYA TEJASARI, dr., M.Kes)
NIP/NIK D.03.0.377

Menyetujui,

Ketua LPPM-UNISBA



(Prof. Dr. Edi Setiadi, SH.,MH)
NIP/NIK 195911101987031002

RINGKASAN

Kanker hati merupakan jenis kanker keenam yang paling umum di dunia dan merupakan penyebab kematian tertinggi ketiga akibat kanker. Kebanyakan penderita kanker hati datang dalam stadium lanjut, namun selama beberapa dekade terakhir tidak ada terapi sistemik yang efektif untuk penderita kanker hati dengan *unresectable stage*, sehingga prognosis penderita kanker hati stadium lanjut masih buruk. Dalam hepatokarsinogenesis, disregulasi proliferasi, apoptosis, invasi dan metastasis yang melibatkan ekspresi MiRNA-16 dan MiRNA-196b serta gen targetnya berhubungan dengan perkembangan tumor, progresivitas, serta resistensi tumor terhadap terapi. Wawasan ini memacu dikembangkannya strategi terapi yang ditargetkan untuk mengaktifkan apoptosis dan menghambat proliferasi, invasi dan metastasis sehingga dapat membunuh sel kanker dan mencegah progresivitasnya. Senyawa turunan flavonoid diketahui memiliki aktivitas antikanker pada berbagai jenis kanker. Untuk mendapatkan obat antikanker yang efektif dan spesifik diperlukan identifikasi protein target pada jaringan tumor yang terekspresidalamdarah. Senyawa yang terkandung dalam minyak cengkih diharapkan akan mampu mengintervensi jalur tersebut.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis potensi antikanker senyawa turunan flavonoid dari minyak daun cengkih melalui ekspresi MiRNA dan gen targetnya untuk merumuskan teori yang tepat sebagai dasar mekanisme molekuler pada proses proliferasi, apoptosis, invasi dan metastasis dalam upaya penemuan target molekuler baru dan agen terapi baru yang lebih efektif untuk pengobatan kanker hati.

Penelitian ini terdiri atas beberapa tahap dengan menggunakan material yang akan diuji adalah senyawa turunan flavonoid yang diisolasi dari minyak cengkih sebagai kandidat agen terapi untuk kanker hati. Penelitian tahap awal adalah eksperimental in vitro menggunakan kultur sel kanker hati (HepG2). Metode uji yang digunakan adalah uji pemberian senyawa untuk menilai kemampuannya dalam menginduksi apoptosis, menghambat proliferasi, invasi dan metastasis serta diteliti mekanisme kerjanya melalui analisis ekspresi MiRNA-16 dan MiRNA-196b dan gen targetnya untuk menganalisis jalur potensial sebagai target molekuler terapi kanker hati yang baru. Penelitian tahap berikutnya merupakan penelitian lanjutan berupa eksperimental in vivo menggunakan hewan model kanker hati.

Luaran yang diharapkan dari penelitian ini adalah publikasi ilmiah baik di jurnal Internasional yakni Journal of Hepatology dan Internasional Journal of Cancer maupun jurnal nasional terakreditasi, presentasi di forum ilmiah nasional dan internasional serta pengajuan paten sederhana.

Rencana Induk Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Islam Bandung (Unisba) adalah **Pemanfaatan Hasil Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat bagi Percepatan Pembangunan berkelanjutan di Indonesia** dengan 6 bidang unggulan yang diantaranya adalah; **point 1 dan point 3 bidang unggulan Renstra LPPM Unisba yakni Optimasi pemanfaatan sumber daya untuk mewujudkan pembangunan berkelanjutan berwawasan lingkungan dan Pengembangan bahan alami untuk kebutuhan alat diagnosis, obat, vaksin untuk meningkatkan derajat kesehatan masyarakat Indonesia**, karena pada penelitian ini dilakukan eksplorasi terhadap bahan alam yang memiliki potensi dalam pengobatan sehingga berperan dalam peningkatan pembangunan di Indonesia khususnya bidang kesehatan dan berkontribusi dalam khasanah *drugs discovery* secara umum.

Keyword : kanker hati, MiRNA-16, MiRNA-196b, flavonoid minyak daun cengkih, target terapi

PRAKATA

Bismillahirrahmanirahim

Segala puji bagi Allah Subhanahu wata'ala, Tuhan Semesta Alam, yang atas berkat rahmat-Nya lah kegiatan penelitian yang berjudul POTENSI ANTIKANKER SENYAWA FLAVONOID DARIMINYAK DAUN CENKIH MELALUI EKSPRESI MIRNA-16, MIRNA-196B DALAM MEKANISME MOLEKULER PROLIFERASI, APOPTOSIS DAN METASTASIS PADA PENGOBATAN KANKER HATI ini telah berhasil dilaksanakan.

Hingga bulan November 2018, pelaksanaan penelitian sudah mencapai tahap penumbuhan kultur sel HepG2 cell line, uji sitotoksik terhadap kultur HepG2 cell line yang merupakan sel kanker hati Hepatocellular carcinoma dengan menggunakan metoda MTT, perhitungan IC_{50} dari bahan uji dan obat standar, perbandingan IC_{50} antara bahan uji dengan obat standar, uji kombinasi aktivitas sitotoksik bahan uji dengan obat standar, dan telah mendapatkan hasil.

Tahapan lain yang telah dilaksanakan adalah eksplorasi uji sitotoksik kombinasi senyawa flavonoid dengan obat standar doxorubicin dan cisplatin terhadap kultur sel kanker hati HepG2 cell line, melakukan Isolasi RNA total dari kultur sel kanker hati HepG2 cell line yang telah diberi senyawa flavonoid minyak daun cengkih, Doksorubisin, dan Cisplatin dilanjutkan reverse RNA menjadi cDNA dari kultur sel kanker hati HepG2 cell line. Berikutnya, melakukan amplikasi miRNA 16 dan 196-b dari kultur sel kanker hati HepG2 cell line menggunakan real-time PCR, dengan menggunakan inter kontrol house keeping gene U6, lalu melakukan pengukuran ekspresi untuk masing-masing sampel.

Penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat bagi dunia pengobatan, khususnya kanker, karena itu kami akan mempublikasikan hasil penelitian ini di Jurnal Internasional.

Demikian prakata dari kami sebagai tim peneliti, semoga bermanfaat.

Bandung, November 2018

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	Hal
RINGKASAN	1
PRAKATA	2
DAFTAR ISI	3
DAFTAR TABEL	4
DAFTAR GAMBAR	5
DAFTAR LAMPIRAN	6
BAB 1 PENDAHULUAN	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	13
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	18
BAB 4 METODE PENELITIAN	19
BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	29
BAB 6 RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	43
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	
- Letter Of Acceptance SIREs 2018	47
- Full Paper Artikel 1	48
- Draft Artikel 2	54

DAFTAR TABEL

	Hal	
Tabel 1.1	Rencana Target Capaian Tahunan	11
Tabel 4.1	Penentuan Indeks Kombinasi	20
Tabel 5.1	Efek Senyawa EPI terhadap Kultur Sel HepG2	32
Tabel 5.2	Efek DOX terhadap Kultur Sel HepG2	33
Tabel 5.3	Nilai Indeks Kombinasi (IK) Senyawa EPI dan DOX terhadapSel HepG2	33
Tabel 5.4	Ekspresi MiRNA-196b dan MiRNA-16 pada kultur HepG2	37
Tabel 5.5	Uji normalitas seluruh kelompok pada kultur sel kanker hati HepG2 <i>cell line</i>	37
Tabel 5.6	Hasil perhitungan ANOVA Nilai Mean Ekspresi MiRNA	38



DAFTAR GAMBAR

	Hal	
Gambar 2.1	Peta Jalan Penelitian	17
Gambar 5.1	Kultur Sel HepG2	29
Gambar 5.2	Grafik IC50 senyawa Epoksi, Doxorubicin dan Cisplatin	32
Gambar 5.3	Kurva Sitotoksik Kombinasi Senyawa EPI dan DOX	34
Gambar 5.4	Kurva Normalisasi Isobologram Kombinasi EPI dan DOX	35
Gambar 5.5	Analisis dan Uji Statistik Ekspresi MiR-16 pada Kultur Sel HepG2	38
Gambar 5.6	Analisis dan Uji Statistik Ekspresi MiR-196b pada Kultur Sel HepG2	39



DAFTAR LAMPIRAN

		Hal
Lampiran 1	Letter Of Acceptance SIRES 2018	47
Lampiran 2	Full Paper Artikel 1	48
Lampiran 3	Draft Artikel 2	54



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker hati atau *Hepatocellular carcinoma* (HCC) atau sering disebut hepatoma merupakan jenis kanker yang paling banyak ditemukan pada organ hati. Penyakit ini merupakan salah satu jenis kanker paling umum ditemukan di dunia dan termasuk yang banyak menyebabkan kematian. (Cha Cet al,2005, Ho Het al,2009, Huynh H et al,2010, Robotin Met al,2009, Lencioni Ret al,2008, Cardoso Aet al,2010). Kanker hati ini dilaporkan menyebabkan setengah juta kematian setiap tahunnya: *American Cancer Society* tahun 2010 memperkirakan bahwa insidensi dan angka kematian HCC akan terus meningkat hingga tahun 2020. (Jemal A et al,2011, Ho H et al,2009)

Pada tahun 2002 IR kanker hati di Indonesia pada pria 20 per 100.000 penduduk dengan *sex spesific death rate* (SSDR) 17 per 100.000 penduduk, sedangkan pada wanita IR 6 per 100.000 penduduk dengan SSDR 5 per 100.000 penduduk. Berdasarkan sepuluh peringkat utama penyakit kanker di beberapa rumah sakit di Indonesia tahun 2005, pada penderita rawat inap kanker hati berada di urutan ketiga dengan jumlah penderita kanker hati 4.177 orang (12,22%) sedangkan pada penderita rawat jalan kanker hati berada di urutan kelima dengan jumlah penderita 1364 orang (4,55%). (Litbandkes,2008)

Angka kematian pada HCC yang tinggi terjadi karena pada umumnya penderita datang dengan fase lanjut sehingga sulit ditangani. Rekomendasi terapi berdasarkan klasifikasi *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) untuk HCC dengan stadium lanjut adalah dengan pendekatan paliatif berupa pemberian kemoterapi sistemik. Pendekatan kuratif seperti reseksi dan transplantasi hanya dapat dilakukan secara terbatas pada penderita HCC stadium awal. Kemoterapi masih menjadi pilihan terbaik untuk penderita HCC stadium lanjut, namun demikian sampai saat ini efektivitas kemoterapi pada penderita HCC juga masih tetap berada dalam perdebatan malah sering dinilai relatif tidak efektif. Pilihan terapi untuk penderita HCC yang masih sangat terbatas ini juga yang menjadi salah satu sebab prognosis kanker hati ini termasuk buruk. (Park S et al,2006, Ghassan K et al,2004, Wirth T et al,2005)

Kanker terjadi karena perubahan mendasar dalam fisiologi sel yang akhirnya tumbuh menjadi tidak terkendali serta mempunyai ciri-ciri umum sebagai berikut: (1) mandiri dalam sinyal pertumbuhan, (2) tidak peka terhadap sinyal pertumbuhan, (3) menghindari apoptosis, (4) memiliki potensi replikasi yang tidak terbatas, (5) angiogenesis, (6) invasi dan metastasis ke jaringan lain, oleh karena itu target pengembangan antikanker diarahkan pada induksi/pemacuan apoptosis, penghambatan

angiogenesis terutama untuk kanker solid seperti kanker payudara, faktor pertumbuhan, dan sinyal faktor pertumbuhan yang meregulasi siklus sel serta kontrol *checkpoint*. (Cha C *et al*,2005, Ho H *et al*,2009)

Akumulasi sel neoplastik dapat terjadi tidak saja karena aktivasi onkogen yang mendorong pertumbuhan tumor atau inaktivasi gen penekan tumor yang menekan pertumbuhan, tetapi juga karena disregulasi pada gen yang mengendalikan apoptosis. Seperti pertumbuhan sel yang dikendalikan oleh gen pendorong dan penekan pertumbuhan, kelangsungan hidup sel juga dikendalikan oleh gen yang mendorong dan menghambat apoptosis. (Cha C *et al*,2005, Ho H *et al*,2009, Huynh H *et al*,2010)

Pada proses karsinogenesis HCC terjadi disregulasi apoptosis yang menyebabkan inhibisi apoptosis pada fase inisiasi, baik jalur ekstrinsik maupun intrinsik sehingga sel tidak mengalami kematian. Insidensi HCC berhubungan dengan rendahnya ekspresi *Fas* yang merupakan suatu reseptor kematian sel, sehingga dapat menghambat inisiasi apoptosis jalur ekstrinsik. Pada HCC juga terjadi peningkatan molekul inhibitor apoptosis (IAP) dan peningkatan ekspresi Bcl2 yang merupakan suatu protein antiapoptosis yang menghambat inisiasi apoptosis jalur intrinsik. (Lu X *et al*,2005, Bassiouny A *et al*,2008, Liu Q *et al*,2011, He H *et al*,2010, Hsieh S *et al*,2009, Yildiz L *et al*,2008)

Selain adanya disregulasi pada gen-gen yang telah disebutkan di atas, patogenesis kanker hati juga berhubungan dengan tingkat ekspresi dari beberapa microRNA diantaranya miRNA-16 dan miRNA-196b. MiRNA adalah RNA endogenus yang tidak mengkode protein, dengan ukuran relatif kecil yaitu sekitar 19-24 nukleotida. (Calin dan Croce, 2006). Gangguan ekspresi MiRNA pada akhirnya akan memengaruhi gen target MiRNA. Disregulasi MiRNA menginduksi mekanisme yang berimplikasi pada patogenesis beberapa penyakit termasuk malignansi. Jumlah miRNAs dikodekan oleh genom organisme yang berbeda bervariasi secara dramatis, dan lebih dari 2000 miRNAs telah diidentifikasi pada manusia. Beberapa miRNAs ini telah menarik perhatian khusus karena keterlibatan mereka dalam inisiasi, progresi dan metastasis dari kanker pada manusia. Salah satu contoh yang dipelajari dengan baik adalah mir-16, salah satu miRNAs pertama yang dikaitkan dengan keganasan sel pada manusia. Bukti menunjukkan bahwa mir-16 dapat memodulasi siklus sel, menghambat proliferasi sel, meningkatkan apoptosis sel dan menekan tumorigenicity baik *in vitro* dan *in vivo*. (Xin Yan *et al*,2013)

MiRNA16 diketahui terekspresi secara abnormal pada karsinoma hepatoseluler (HCC), dan overekspresi miRNA-16 menghambat proliferasi, invasi dan metastasis dari berbagai sel-sel kanker. Hasil penelitian menunjukkan bahwa overekspresi miRNA-16

menghambat proliferasi, invasi dan metastasis sel HepG2, dan bahwa efek ini berkaitan dengan jalur sinyal PI3K yang / Akt.(Wu WL et al,2015)

Kedua microRNA (mir) -196a dan mir-196b sama-sama terlibat dalam diferensiasi sel normal, proliferasi, dan dalam tumorigenesis dari berbagai jenis kanker. (Changyi C et al,2011). Tinggi ekspresi mir-196a dan ekspresi mir-196b yang tinggi, sendiri atau dalam kombinasi, secara statistik terkait dengan terjadinya metastasis ke kelenjar getah bening dan tahap TNM pada CRC. (Jie G et al,2014)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi mir-196b menurunkan ekspresi RNA IGF2BP1 dan tingkat proteinnya. Penurunan ekspresi IGF2BP1 siRNA menyebabkan peningkatan apoptosis, penurunan viabilitas sel dan proliferasi pada kultur sel normal. Kesimpulannya IGF2BP1 merupakan target langsung dan fungsional dari mir-196b dan menunjukkan bahwa ekspresi mir-196b yang berlebih dapat mengembalikan keadaan kemoresisten yang disebabkan oleh hipoksia. (Rebucci M et al,2015)

Selain keberhasilan terapi standar untuk kanker yang belum maksimal, efek samping dari pengobatan kanker pada umumnya juga belum dapat diatasi. Efek samping dari cisplatin dan obat kanker lain diduga karena selain membunuh sel kanker, obat tersebut juga membunuh sel-sel yang normal. Belum maksimalnya terapi kanker dan masih banyaknya efek samping serta harga obat yang mahal mendorong para peneliti untuk mencari obat kanker yang efektif dan selektif (Friyadi dan Askandar, 2013).

Pemantauan perkembangan dan keberhasilan pengobatan kanker selama ini membutuhkan biaya yang tinggi karena menggunakan pemeriksaan radiologis menggunakan MRI atau CT Scan(Kim *et al.*, 2007). Pemeriksaan lain adalah dengan biomarker yang diambil dari darah, pemeriksaan ini bersifat minimal invasif, hanya saja belum ada yang spesifik untuk kanker hati. Deteksi kadar MiRNA dalam plasma dan serum berpotensi untuk diagnosis awal suatu keganasan, prediksi prognosis dan dapat melihat respon terapi karena MiRNA dalam darah sangat stabil (Wang *et al.*, 2013).

Senyawa aktif potensial yang sering diisolasi dari tanaman obat adalah flavonoid, Isoflavon merupakan salah satu bentuk flavonoid. Studi *in vitro* menunjukkan aktivitas antikanker ginestein disebabkan oleh efek antioksidan dan efek antiproliferatif melalui modulasi ekspresi gen yang terlibat dalam siklus sel dan apoptosis. (Hussain *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2005).

Isolasi genistein dari kedelai membutuhkan kedelai dalam jumlah banyak dan biaya mahal sehingga tidak ekonomis, oleh karena itu beberapa peneliti mencoba

mensintesis genistein dan turunannya untuk mendapatkan senyawa dalam jumlah besar yang lebih ekonomis. Salah satu senyawa aktif turunan flavonoid yang sedang diteliti sebagai antikanker adalah senyawa yang berasal dari minyak daun cengkeh (eugenol) yang banyak tersedia di Indonesia (Herwiyanti, 2015).

Untuk mendapatkan obat antikanker yang efektif dan spesifik diperlukan identifikasi protein target pada jaringan tumor dan molekul yang berperan di hulu sebagai regulator dari protein-protein di hilir. Ekspresi gen atau protein yang berperan pada perkembangan sel kanker dapat dilihat dari patogenesis kanker, karena setiap kanker memiliki patogenesis yang berbeda sehingga gen-gen dan protein yang berperanpun berbeda (Malinowsky *et al*, 2011).

1.2 Urgensi (Keutamaan Penelitian)

Keberhasilan pengobatan kanker sangat ditentukan oleh efektifitas dan selektivitas pengobatan, untuk antikanker yang efektif dan spesifik diperlukan identifikasi protein target pada jaringan tumor dan molekul yang berperan di hulu sebagai regulator dari protein-protein di hilir. Ekspresi gen atau protein yang berperan pada perkembangan sel kanker dapat dilihat dari patogenesis kanker. Adanya peningkatan ekspresi miRNA yang menarget gen penekan tumor dan gen yang memicu apoptosis serta menurunkan ekspresi miRNA yang menarget onkogen dapat dijadikan marker dari suatu perjalanan penyakit kanker dan keberhasilan terapi.

Senyawa flavonoid dari minyak daun cengkeh diharapkan dapat mempengaruhi kadar miRNA-16 dan miRNA-196b dan kemudian akan mempengaruhi ekspresi gen-gen targetnya yang menghambat proliferasi sel, memicu apoptosis, serta menghambat invasi dan metastasis sel kanker hati. miRNA-16 menyebabkan peningkatan ekspresi Bax, penurunan ekspresi Bcl-2, ekspresi MMP-2 dan MMP-9. Selain itu ekspresi E-cadherin meningkat dan ekspresi vimentin menurun. Overekspresi miRNA-16 berlebih juga menghambat ekspresi PI3K dan Akt fosforilasi. Peningkatan ekspresi mir-196b menurunkan ekspresi RNA IGF2BP1 dan tingkat proteinnya. Penurunan ekspresi IGF2BP1 siRNA menyebabkan peningkatan apoptosis, penurunan viabilitas sel dan proliferasi. IGF2BP1 merupakan target langsung dan fungsional dari mir-196b dan menunjukkan bahwa ekspresi mir-196b yang berlebih dapat mengembalikan keadaan kemoresisten pada sel kanker.

Pemantauan perkembangan dan keberhasilan pengobatan kanker yang terjangkau, spesifik, akurat, cepat dan minimal invasif sangat dibutuhkan dan dapat mengurangi beban

penderita kanker. Deteksi kadar MiRNA dalam plasma dan serum berpotensi untuk melihatperkembangan dan respon terapi kanker karena MiRNA dalam darah sangat stabil.

1.3 Hasil yang Diharapkan (Luaran)

1. Aspek Ilmiah

Dapat ditemukan mekanisme obat antikanker dengan pendekatan regulasi MiRNA dan protein targetnya yang dapat menjadi landasan *drug discovery* pengobatan kanker di kemudian hari. Khususnya potensi dan mekanisme kerja senyawa flavonoid sebagai agen terapi baru untuk kanker hati, target molekuler terapi yang tepat dalam pengobatan kanker hati, teori dasar bagi penelitian lanjutan berupa penelitian klinik pengembangan obat anti kanker dengan target molekuler yang efektif dan spesifik

2. Jurnal internasional

Publikasi berupa artikel pada jurnal internasional dan Publikasi berupa presentasi oral pada seminar International.

3. Paten sederhana

Drug discovery untuk pengobatan kanker hati

Tabel.1.1 Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran		Indikator capaian		
			TS	TS+1	TS+2
1	Publikasi ilmiah	Internasional	Accepted	Accepted	Accepted
		Nasional terakreditasi	Tidak ada	Submitted	Accepted
2	Pemakalah dalam temu ilmiah	Internasional	terdaftar	terdaftar	dilaksanakan
		Nasional	Tidak ada	terdaftar	draf dilaksanakan
3	<i>Invited speaker</i> dalam temu ilmiah	Internasional	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Nasional	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
4	<i>Visiting Lecturer</i>	Internasional	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
5	Hak kekayaan intelektual (HKI)	Paten	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Paten sederhana	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Hak cipta	Tidak ada	Ada	Ada

		Merk dagang	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Rahasia dagang	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Desain produk industri	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Indikasi geografis	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Perlindungan varietas tanaman	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
		Perlindungan topografi sirkuit terpadu	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
6	Teknologi tepat guna		Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
7	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/Rekayasa sosial		Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
8	Buku Ajar (ISBN)		Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
9	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT)		3	3	3

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

Kanker terjadi karena perubahan mendasar dalam fisiologi sel yang akhirnya tumbuh menjadi tidak terkendali serta mempunyai ciri-ciri umum sebagai berikut: (1) mandiri dalam sinyal pertumbuhan, (2) tidak peka terhadap sinyal pertumbuhan, (3) menghindari apoptosis, (4) memiliki potensi replikasi yang tidak terbatas, (5) angiogenesis, (6) invasi dan metastasis ke jaringan lain, oleh karena itu target pengembangan antikanker diarahkan pada induksi/pemacuan apoptosis, penghambatan angiogenesis terutama untuk kanker solid seperti kanker payudara, faktor pertumbuhan, dan sinyal faktor pertumbuhan yang meregulasi siklus sel serta kontrol *checkpoint*. (Cha C *et al*,2005, Ho H *et al*,2009)

Akumulasi sel neoplastik dapat terjadi tidak saja karena aktivasi onkogen yang mendorong pertumbuhan tumor atau inaktivasi gen penekan tumor yang menekan pertumbuhan, tetapi juga karena disregulasi pada gen yang mengendalikan apoptosis. Seperti pertumbuhan sel yang dikendalikan oleh gen pendorong dan penekan pertumbuhan, kelangsungan hidup sel juga dikendalikan oleh gen yang mendorong dan menghambat apoptosis. (Cha C *et al*,2005, Ho H *et al*,2009, Huynh H *et al*,2010)

Pada proses karsinogenesis HCC terjadi disregulasi apoptosis yang menyebabkan inhibisi apoptosis pada fase inisiasi, baik jalur ekstrinsik maupun intrinsik sehingga sel

tidak mengalami kematian. Insidensi HCC berhubungan dengan rendahnya ekspresi *Fas* yang merupakan suatu reseptor kematian sel, sehingga dapat menghambat inisiasi apoptosis jalur ekstrinsik. Pada HCC juga terjadi peningkatan molekul inhibitor apoptosis (IAP) dan peningkatan ekspresi Bcl2 yang merupakan suatu protein antiapoptosis yang menghambat inisiasi apoptosis jalur intrinsik. (Lu X et al, 2005, Bassiouny A et al, 2008, Liu Q et al, 2011, He H et al, 2010, Hsieh S et al, 2009, Yildiz L et al, 2008)

Selain adanya disregulasi pada gen-gen yang telah disebutkan di atas, patogenesis kanker hati juga berhubungan dengan tingkat ekspresi dari beberapa microRNA diantaranya miRNA-16 dan miRNA-196b. MiRNA adalah RNA endogenus yang tidak mengkode protein, dengan ukuran relatif kecil yaitu sekitar 19-24 nukleotida. Lebih dari 50% MiRNA berlokasi pada region genomik yang berhubungan dengan kanker atau *fragile site*. Hal ini memperkuat anggapan bahwa MiRNA menjadi penting pada pembentukan kanker. Fungsi utama dari MiRNA adalah menekan ekspresi gen mRNA target melalui *cleavage* atau *translational silencing*, yang bergantung pada komplementasinya dengan 3-*untranslated region* (3'UTR) dari mRNA target (Calin dan Croce, 2006).

Selain onkogen yang dapat berpengaruh langsung pada MiRNA, kerusakan P53 juga akan menyebabkan gangguan ekspresi MiRNA yang pada akhirnya akan memengaruhi gen target MiRNA. Disregulasi MiRNA menginduksi mekanisme yang berimplikasi pada patogenesis beberapa penyakit termasuk malignansi. MiRNA dapat berperan sebagai *tumor suppressor* ketika menekan ekspresi atau menghilangkan fungsi yang mendorong perkembangan fenotif sel tumor (Lu et al., 2005). MiRNA juga dapat bertindak sebagai onkogen ketika meningkatkan ekspresi gen atau meningkatkan fungsi yang mendorong perkembangan fenotif sel tumor. Ekspresi MiRNA sering menurun pada jaringan kanker manusia, oleh sebab itu banyak MiRNA yang berpotensi untuk *tumor suppressor*.

Jumlah miRNAs dikodekan oleh genom organisme yang berbeda bervariasi secara dramatis, dan lebih dari 2000 miRNAs telah diidentifikasi pada manusia. Beberapa miRNAs ini telah menarik perhatian khusus karena keterlibatan mereka dalam inisiasi, progresi dan metastasis dari kanker pada manusia. Salah satu contoh yang dipelajari dengan baik adalah mir-16, salah satu miRNAs pertama yang dikaitkan dengan keganasan sel pada manusia. Bukti menunjukkan bahwa mir-16 dapat memodulasi siklus sel, menghambat proliferasi sel, meningkatkan apoptosis sel dan menekan tumorigenicity baik in vitro dan in vivo. Efek ini dapat dijelaskan oleh beberapa sasaran mir-16 yaitu: gen anti-

apoptosis Bcl-2 (sel B limfoma 2); banyak gen yang terlibat dalam transisi G1-S, seperti cyclin D1, cyclin D3, cyclin E1 dan CDK6 (cyclin-dependent kinase 6); dan gen yang terlibat dalam jalur pensinyalan Wnt, seperti WNT3A.(Xin Yan t al,2013). Ekspresi Cyclin D1 (CCND1) diatur oleh mir-16, selain itu, beberapa gen yang berperan dalam siklus sel lainnya juga diatur oleh mir-16, termasuk Cyclin D3 (CCND3), Cyclin E1 (CCNE1) dan CDK6. Secara bersama-sama, keluarga mir-16 memicu akumulasi sel di G0/G1 dengan menghambat beberapa gen pada siklus sel secara bersamaan. (Qin Liu et al.) MicroRNAs (miRNAs atau Mirs) terkait erat dengan proliferasi, invasi dan metastasis kanker hati. miRNA16 diketahui terekspresi secara abnormal pada karsinoma hepatoseluler (HCC), dan overekspresi miRNA-16 menghambat proliferasi, invasi dan metastasis dari berbagai sel-sel kanker. Telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya, suatu penelitian yang mengeksplorasi efek dari miRNA-16 pada proliferasi, invasi dan metastasis sel HCC, serta menjelaskan mekanisme yang terlibat. Penelitian tersebut menggunakan beberapa lini sel kanker hati dengan tingkat ekspresi mir 16 yang moderat, yaitu lini sel SMMC-7721, HepG2, SK-Hep-1 dan Huh 7 dan divalidasi dengan reverse transkripsi-PCR (RT-PCR). Hasilnya terdapat tingkat ekspresimiRNA-16 yang tertinggi terdapat pada sel SMMC-7721 dan terendah pada SK-Hep 1 dan Huh 7 sel; tingkat ekspresi sedang ditemukan pada sel HepG2. Lini sel HepG2 terpilih sebagai garis sel untuk digunakan dalam percobaan tindak lanjut, di mana dilakukan pengukuran viabilitas sel, dan ekspresi PI3K / Akt, Bax, Bcl-2, MMP-2 dan MMP-9, dan E- cadherin dan vimentin. Overekspresi miRNA-16 secara signifikan menghambat proliferasi, invasi dan metastasis sel HepG2, seperti yang ditunjukkan oleh analisis western blot. Hal ini dicapai melalui peningkatan ekspresi Bax, penurunan ekspresi Bcl-2, ekspresi MMP-2 dan MMP-9. Selain itu ekspresi E-cadherin meningkat dan ekspresi vimentin menurun. Overekspresi miRNA-16 berlebih juga menghambat ekspresi PI3K dan Akt fosforilasi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa overekspresi miRNA-16 menghambat proliferasi, invasi dan metastasis sel HepG2, dan bahwa efek ini berkaitan dengan jalur sinyal PI3K yang / Akt.(Wu WL et al,2015)

Kedua microRNA (mir) -196a dan mir-196b sama-sama terlibat dalam diferensiasi sel normal, proliferasi, dan dalam tumorigenesis dari berbagai jenis kanker. (Changyi C et al,2011). Terutama, mir-196a memberikan pengaruh pro-onkogenik pada kanker kolorektal (CRC) sel dan ekspresi mir-196b diregulasi dalam jaringan CRC. Tingkat ekspresi mir-196a dan mir-196b dalam jaringan CRC secara signifikan lebih tinggi daripada di mukosa usus yang berdekatan (baik $P < 0,002$). Menariknya, tingkat ekspresi

mir-196a dalam jaringan CRC berkorelasi positif dengan orang-orang dari mir-196b. Kemudian, tinggi ekspresi mir-196a dan ekspresi mir-196b tinggi, sendiri atau dalam kombinasi, secara statistik terkait dengan terjadinya metastasis ke kelenjar getah bening dan tahap TNM pada CRC. (Jie Gie et al,2014)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi mir-196b yang berlebih, meningkatkan proses apoptosis yang diinduksi etoposid dan mengembalikan proteksi terhadap kematian sel dalam kondisi hipoksia. Dengan pendekatan proteomik dikombinasikan dengan analisis bioinformatika, penelitian tahun 2015 mengidentifikasi IGF2BP1 sebagai target potensial dari mir-196b. Peningkatan ekspresi mir-196b menurunkan ekspresi RNA IGF2BP1 dan tingkat proteinnya. Penurunan ekspresi IGF2BP1 siRNA menyebabkan peningkatan apoptosis, penurunan viabilitas sel dan proliferasi pada kultur sel normal. Kesimpulannya IGF2BP1 merupakan target langsung dan fungsional dari mir-196b dan menunjukkan bahwa ekspresi mir-196b yang berlebih dapat mengembalikan keadaan kemoresisten yang disebabkan oleh hipoksia. (Rebucci M et al,2015)

Pemantauan perkembangan dan keberhasilan pengobatan kanker selama ini membutuhkan biaya yang tinggi karena menggunakan pemeriksaan radiologis menggunakan MRI atau CT Scan (Kim *et al.*, 2007). Pemeriksaan lain adalah dengan biomarker yang diambil dari darah, pemeriksaan ini bersifat minimal invasif, hanya saja belum ada yang spesifik untuk kanker hati. Deteksi kadar MiRNA dalam plasma dan serum berpotensi untuk diagnosis awal suatu keganasan, prediksi prognosis dan dapat melihat respon terapi karena MiRNA dalam darah sangat stabil (Wang *et al.*, 2013).

Senyawa aktif potensial yang sering diisolasi dari tanaman obat adalah flavonoid, Isoflavon merupakan salah satu bentuk flavonoid. Studi *in vitro* menunjukkan aktivitas antikanker genistein disebabkan oleh efek antioksidan dan efek antiproliferatif melalui modulasi ekspresi gen yang terlibat dalam siklus sel dan apoptosis. (Hussain *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2005).

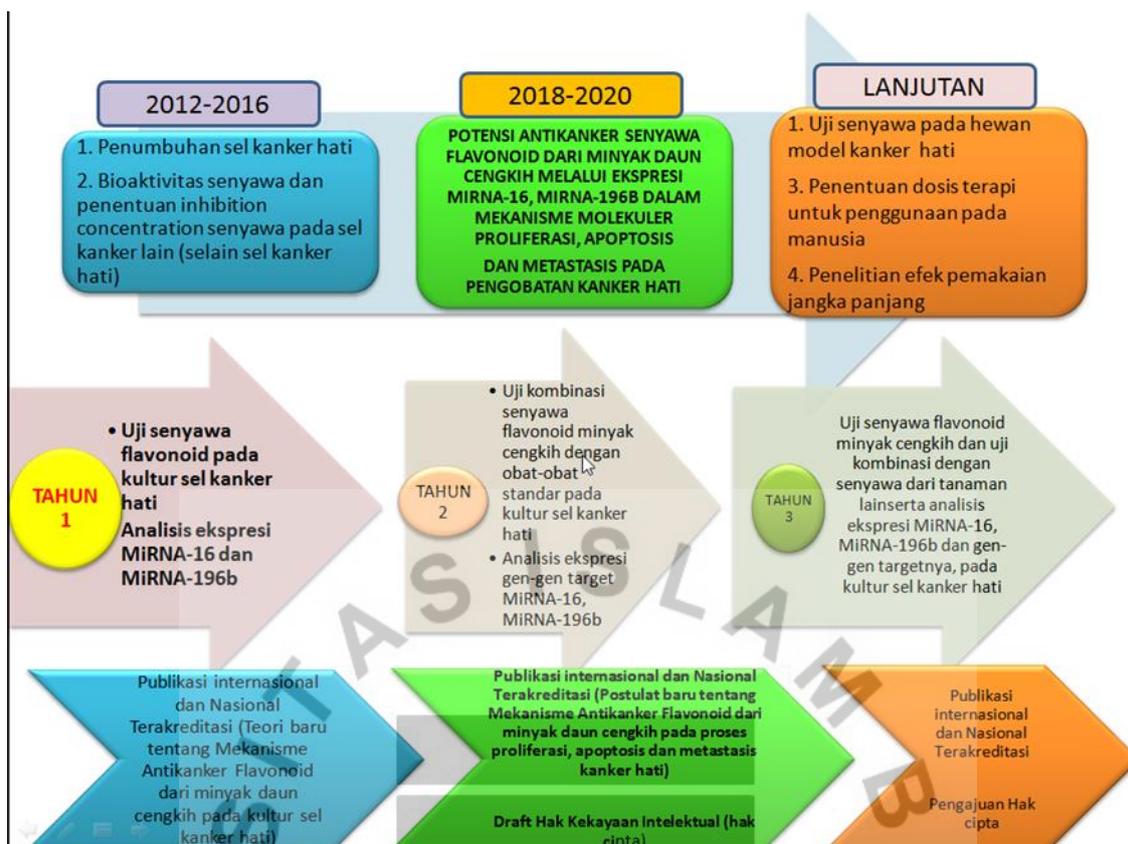
Isolasi genistein dari kedelai membutuhkan kedelai dalam jumlah banyak dan biaya mahal sehingga tidak ekonomis, oleh karena itu beberapa peneliti mencoba mensintesis genistein dan turunannya untuk mendapatkan senyawa dalam jumlah besar yang lebih ekonomis. Salah satu senyawa aktif turunan flavonoid yang sedang diteliti sebagai antikanker adalah senyawa yang berasal dari minyak daun cengkeh (eugenol) yang banyak tersedia di Indonesia (Herwiyanti, 2015).

Penelitian untuk mencari pengobatan yang efektif untuk kanker hati sampai saat ini masih terus dikembangkan. Pendekatan kuratif seperti pembedahan dan transplantasi hanya dapat dilakukan secara terbatas karena berbagai sebab seperti donor yang kurang dan mempertimbangkan pengaruhnya terhadap fungsi hati. Rekomendasi terapi berdasarkan klasifikasi *Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)* untuk kanker hati dengan stadium lanjut adalah dengan pendekatan paliatif berupa pemberian kemoterapi sistemik. Pendekatan kuratif seperti reseksi dan transplantasi hanya dapat dilakukan secara terbatas pada penderita stadium awal. Kemoterapi masih menjadi pilihan terbaik untuk penderita stadium lanjut, namun demikian sampai saat ini efektivitas kemoterapi pada penderita kanker juga masih tetap berada dalam perdebatan, malah sering dinilai relatif tidak efektif. Pilihan terapi untuk penderita kanker hati yang masih sangat terbatas ini juga yang menjadi salah satu sebab prognosis kanker hati ini termasuk buruk. (Ho H *et al*,2009, Huynh H *et al*,2010, Robotin *Met al*,2009, Lencioni *Ret al*,2008, Bruix *et al*,2005, Wirth T *et al*,2005)

Umumnya kemoterapi sistemik dinyatakan relatif tidak efektif pada kanker hati. *Hepatocellular Carcinoma* resisten terhadap kemoterapi karena beban mutasi tinggi dan juga adanya mekanisme resistensi terhadap obat. Mekanisme resistensi yang timbul berhubungan dengan pemberian kemoterapi dalam dosis rendah karena mempertimbangkan disfungsi hati dan juga dilakukan untuk mengurangi toksisitas. (Bruix *et al*,2005, Wirth T *et al*,2005)

Strategi terapi berdasarkan target molekuler melalui intervensi jalur transmisi sinyal dan regulasi apoptosis, menawarkan harapan baru bagi pilihan terapi yang lebih efektif. Target potensial untuk strategi kemoterapi sistemik pada HCC di antaranya mekanisme stres oksidatif dan inflamasi, faktor pertumbuhan, *checkpoint* siklus sel, virus onkogen, pemendekan telomer, karsinogenesis, sel punca, angiogenesis dan antiapoptosis. (Bruix *et al*,2005, Wirth T *et al*,2005)

PETA JALAN PENELITIAN



Gambar 2.1 Peta Jalan Penelitian

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan khusus penelitian ini adalah:

1. Menganalisis pengaruh senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih terhadap ekspresi MiRNA-16, MiRNA-196b, dan gen targetnya pada kultur sel kanker hati
2. Menganalisis pengaruh senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih terhadap ekspresi MiRNA-16, MiRNA-196b, dan gen targetnya pada hewan model kanker hati
3. Menganalisis hubungan antara ekspresi MiRNA-16 dan Mi-196b dengan ekspresi gen targetnya pada kultur sel kanker hati
4. Menganalisis hubungan antara ekspresi MiRNA-16 dan Mi-196b dengan ekspresi gen targetnya pada hewan model kanker hati

Adapun tujuan khusus penelitian tahap pertama adalah :

1. Menganalisis kekuatan aktivitas sitotoksik senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih (Epoksi) terhadap sel kanker hati
2. Menganalisis sifat sinergi senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih (Epoksi) sebagai antikanker dengan doxorubicin pada sel kanker hati
3. Menganalisis pengaruh senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih (Epoksi) dan kombinasinya dengan doxorubicin (Epi-Dox) terhadap ekspresi MiRNA-196b
4. Menganalisis pengaruh senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih (Epoksi) dan kombinasinya dengan doxorubicin (Epi-Dox) terhadap ekspresi MiRNA-16

3.2 Manfaat Penelitian

1. Dapat ditemukan mekanisme obat anti kanker dengan pendekatan regulasi MiRNA dan protein targetnya yang dapat menjadi landasan *drug discovery* pengobatan kanker di kemudian hari. Khususnya potensi dan mekanisme kerja senyawa flavonoid sebagai agen terapi baru untuk kanker hati, target molekuler terapi yang tepat dalam pengobatan kanker hati, teori dasar bagi penelitian lanjutan berupa penelitian klinik pengembangan obat anti kanker dengan target molekuler yang efektif dan spesifik
2. Menjadi dasar pengembangan senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih sebagai obat kanker hati dengan target terapi yang lebih jelas, spesifik, biomarker yang lebih stabil, minimal invasi dan hasil pemeriksaan yang cepat dan valid.

BAB 4. METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan tahap pertama dari rencana tiga tahun penelitian. Penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni in vitro. Adapun tahapan dari penelitian ini adalah: Penelitian tahun I dilakukan dalam beberapa tahap, tahap pertama yang dilakukan adalah melakukan pembiakan kulturel sel kanker hati (HepG2), tahap kedua adalah melakukan uji antikanker senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih dan menentukan konsentrasi IC_{50} (dengan Metode MTT) untuk menganalisis konsentrasi yang dapat membunuh 50% sel kanker dilanjutkan dengan uji kombinasi senyawa flavonoid dengan obat standar. Tahap berikutnya adalah isolasi MiRNA 196b, MiRNA16 dan apoptosis, hasil isolasi lalu diubah menjadi cDNA dan dilakukan kuantifikasi PCR menggunakan qPCR Real Time PCR, sedangkan apoptosis dengan menggunakan pemeriksaan TUNEL. Data kemudian dianalisis menggunakan uji statistik. Tahap ini dilaksanakan terhadap 4 kelompok perlakuan yaitu :

1. Kultursel HepG2 dalam DMEM sebagai kontrol
2. Kultursel HepG2 dalam DMEM + senyawa flavonoid konsentrasi IC_{50}
3. Kultursel HepG2 dalam DMEM + doxorubicin konsentrasi IC_{50}
4. Kultursel HepG2 dalam DMEM + kombinasi senyawa flavonoid & doxorubicin

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni *in vitro* dengan rancangan penelitian adalah *randomized post-test only control group design* untuk mengetahui pengaruh senyawa senyawa 1,2-epoksi-3(3-(3,4-dimetoksifenil)-4H-1-benzopiran-4on) propana (EPI) terhadap ekspresi miR-196b dan miR-16. Rancangan penelitian menggunakan *simple randomized design* yaitu alokasi perlakuan secara acak untuk dimasukkan sebagai kelompok eksperimen dan kontrol (*randomly allocated to groups*).

B. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah kultur sel kanker serviks uteri HepG2. Sampel pada uji aktifitas antikanker adalah kultur sel kanker serviks urteri HepG2. Sampel yang digunakan adalah 100 μ L sel HepG2 dalam 16 sumuran dengan kepadatan $1,5 \times 10^6$ sel/mL. Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah sel HepG2 yang tidak terkontaminasi, telah *subconfluent* dan tidak terjadi perubahan morfologi.

C. Variabel Penelitian

Variabel penelitian pada penelitian ini adalah variabel bebas, variabel terikat dan variabel terkendali.

- A. Variabel bebas adalah: konsentrasi senyawa 1,2-epoksi-3(3-(3,4 dimetoksifenil) -4H-1-benzopiran-4on) propana dan konsentrasi doksorubisin
- B. Variabel terikat adalah : Ekspresi miR-196b dan miR-16
- C. Variable terkendali adalah: temperatur inkubasi, kadar CO_2 , komposisi medium, waktu inkubasi, tempat inkubasi.

D. Definisi Operasional

Aktivitas sitotoksik senyawa 1,2-epoksi-3(3-(3,4-dimetoksifenil)-4H-1-benzopiran-4on)propana (EPI) dan doksorubisin (DOX) pada cell HepG2 sebagai senyawa uji dinyatakan dengan nilai IC_{50} .

Analysis sinergisme obat ditentukan dengan menentukan *Combination Index (CI)* / Index Kombinasi.(IK) untuk melihat interaksi obat. Interpretasi sinergisme sesuai Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Penentuan Indeks Kombinasi

CI value	Interpretasi
<0.1	Sinergi sangat kuat
0.1-0.3	Sinergi kuat
0.3-0.7	Sinergi
0.7-0.9	Sinergi lemah
0.9-1.1	Aditif
1.1-1.45	Antagonis lemah sedang
1.45-3.3	Antagonis
>3.3	Antagonis sangat kuat

E. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan untuk uji *in vitro* yaitu *laminar air flow* (Hood), inkubator 95%, 0.5% CO₂, pipet sonde, vortex, autoklaf, magnetik stirer, tabung erlemeyer, tabung ependorf, spuit *disposable*, pipet pasteur, pipet volumetrik, botol medium, sintrifuge, cawan kultur 98 sumuran, conus, mikroskop cahaya, qRT-PCR, mikropipet, mikroskop *inverted*, ELISA *reader*.

2. Bahan Penelitian

a. Senyawa uji

Bahan uji berupa senyawa tersebut disintesis oleh Dr. Andi Hairil di Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Sebagai kontrol positif digunakan doksorubisin (sigma Chem Co St Louis, USA).

b. Bahan uji aktivasi sitotoksik pada sel HepG2

Kultur sel kanker serviks HepG2 yang diperoleh dari laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. DMEM (Sigma Chem Co St Louis, USA), *fetal bovine serum* (Sigma Chem Co St Louis, USA), penisilin, streptomisin (Gibco), fungizon (Gipco), natrium bikarbonat (E Merck) dan kertas saring 0,2 μ m (Whatman), *phosphate buffer saline*, (PBS), reagen MTT dan stopper SDS 10%.

c. Bahan uji mekanisme aksi sitotoksik *in vitro*

Bahan Uji untuk pengukuran ekspresi gen adalah miReasy mini kit, miScript II RT kit, miScript SYBR green PCR kit, MiScript primer miR-196b dan miScript primer miR-16 (Qiagen)

F. Prosedur Penelitian

Uji pendahuluan untuk aktivitas sitotoksik senyawa 1,2-Epoksi-3[3-(3,4-dimetoksifenil)-4H-1-benzopiran-4on]propana

2. Kultur Sel

Sel HepG2 disuspensi dalam media kultur yang mengandung $1,5 \times 10^4$ sel /100 μ L, suspensi dimasukan kedalam masing masing sumuran (*microwell plate*) 96 dan diinkubasi pada inkubator suhu 37°C dan 5% CO₂ selama 24 jam. Media pertumbuh yang digunakan adalah DMEM, yaitu medium yang digunakan secara luas untuk menumbuhkan sel mamalia, dengan penambahan 10% FBS (*fetal bovine serum*), fungison 0,5%, dan 1% penisilin-streptomisin.

Larutan senyawa uji selalu dibuat baru sebelum uji aktivitas dilakukan. Larutan stok senyawa EPI, cisplatin, dan doksorubisin yang diujikan pada sel HepG2, selanjutnya dibuat berbagai konsentrasi larutan uji mulai 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125; 3,906 μ g/mL. Sebanyak 100 μ L larutan senyawa uji, cisplatin, dan doksorubisin dari masing masing konsentrasi dimasukkan ke dalam suspensi sel dalam sumuran 96 yang telah diinkubasi terlebih dulu. Sebagai kontrol negatif ditambahkan media kultur sebanyak 100 μ L ke dalam sumuran. Uji dilakukan secara tripikal untuk tiap perlakuan dan diulangi 3 kali. Kultur yang telah diberi bahan uji diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator 5% CO₂.

2. Uji Sitotoksik dengan MTT

Setelah diinkubasi media kultur dibuang dan dicuci dengan PBS dan ditambahkan 100 μ L larutan MTT (1 mL MTT dalam 10 mL, media kultur) ke dalam setiap sumuran dan kemudian diinkubasikan kembali pada suhu 37°C 5% CO₂ selama 4 jam. Setelah 4 jam ditambahkan 100 μ L *stopper* SDS 10% dalam HCl 0.1 N ke dalam setiap sumuran (untuk melarutkan purple formazan).Kemudian diseker selama 5 menit dan dibungkus rapat dibiarkan dalam suhu kamar semalam. Setelah semalam dalam suhu kamar dilakukan

pembacaan absorpsi dengan *microplate* ELISA *reader* pada panjang gelombang (λ) 595 nm.

3. Penetapan Aktivitas Sitotoksik

Dari hasil analisis absorbansi maka dapat dihitung viabilitas sel dengan rumus % hidup (viabilitas) = $(c-b)/(a-b) \times 100$. Huruf a adalah absorbansi kontrol sel; b adalah absorbansi kontrol media dan c adalah absorbansi sample. Aktivitas sitotoksik setiap senyawa uji doksorubisin dan cisplatin dinyatakan dengan nilai IC_{50} yakni kadar yang mampu menghambat pertumbuhan sel hingga 50% yang dihitung dengan analisis probit berdasarkan hubungan antara kadar penghambat pertumbuhan sel.

4. Uji Kombinasi

Metode yang umum digunakan untuk mengevaluasi kombinasi obat adalah Isobologram dan Combination Index (CI). Analisis CI menghasilkan suatu nilai parameter kuantitatif yang menggambarkan efikasi kombinasi menggunakan persamaan : $CI = (D)1/(Dx)1 + (D)2/(Dx)2$.

Dx adalah konsentrasi satu senyawa tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek sebesar efek kombinasi, yaitu IC_{50} terhadap pertumbuhan sel HepG2, dan $(D)1$, $(D)2$ adalah besarnya konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama. Nilai CI digunakan untuk menentukan efek aditif yang diberikan dua kombinasi senyawa, apakah berupa efek sinergis, aditif atau antagonis.

Tahapan pengerjaan:

Seluruh proses dilakukan sesuai protokol "Persiapan Kerja *In Vitro*" di Laboratorium. *Dish* berisi sel diambil dari inkubator CO_2 , kondisi sel diamati di bawah mikroskop. Kultur sel digunakan dalam kondisi 70-80% konfluen untuk dipanen.

Setelah sel dipanen lalu dihitung jumlah sel, untuk uji kombinasi dibutuhkan sebanyak 5×10^4 sel/sumuran (5×10^4 sel/100 μ l media kultur). Pengenceran suspensi sel dibuat sehingga konsentrasi sel akhir 5×10^3 sel/100 μ l media kultur. Setelah itu sel ditransfer ke dalam sumuran, masing-masing 100 μ l (sesuai desain *plate*) dan setiap kali mengisi 12 sumuran, sel diresuspensi agar tetap homogen. Sebanyak 3 sumuran dibiarkan kosong (jangan diisi sel) untuk kontrol media, keadaan sel diamati dengan mikroskop untuk melihat distribusi sel, didokumentasikan dengan menggunakan kamera dan dipastikan sel dalam setiap sumuran homogen. Sel diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam. Inkubasi ini dilakukan agar sel pulih dan kembali ke keadaan normal (*subconfluent*).

Zat uji dibuat seri konsentrasi sampel dan agen kemoterapi untuk perlakuan dengan seri konsentrasi terdiri dari 4 konsentrasi: $\frac{1}{2}IC_{50}$, $\frac{3}{8}IC_{50}$, $\frac{1}{4}IC_{50}$, dan $\frac{1}{8}IC_{50}$. *Plate* yang

telah berisi sel diambil dari inkubator, lalu media sel dibuang dengan cara *plate* dibalikkan 180° di atas tempat buangan, kemudian *plate* ditekan secara perlahan di atas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan. Untuk kelompok perlakuan kombinasi: seri konsentrasi dimasukkan sampel ke dalam sumuran @50µl dengan replikasi 3 kali (triplo), kemudian tambahkan seri konsentrasi (doxorubisin) untuk kombinasi @ 50µl. Untuk kelompok perlakuan tunggal: seri konsentrasi dimasukkan sampel atau agen kemoterapi (EPI) ke dalam sumuran @ 50µl dengan replikasi 3 kali (triplo), kemudian ditambahkan @ 50 µl media kultur ke dalam sumuran. Untuk kontrol sel: media kultur ditambahkan ke dalam sumuran yang berisi sel @ 100 µl dengan replikasi 3 kali (triplo). Untuk kontrol media: media kultur ditambahkan ke dalam sumuran yang kosong (tanpa sel) @ 100µl dengan replikasi 3 kali (triplo).

Sel di inkubasi di dalam incubator CO₂ selama 24 jam, menjelang akhir waktu inkubasi, sel didokumentasikan dengan kamera untuk melihat kondisi sel pada setiap perlakuan. Stok MTT 5 mg/mL dibuat dengan cara 50 mg serbuk MTT ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL PBS (dengan bantuan vortex). Reagen MTT dibuat untuk perlakuan (0,5 mg/mL) dengan cara diambil 1 mL stok MTT 5 mg/mL lalu diencerkan dengan media kultur ad 10 mL.

Media sel dibuang lalu sebanyak 100 µl reagen MTT 0,5 mg/mL ditambahkan ke setiap sumuran, termasuk kontrol media. Sel diinkubasi selama 2-4 jam di dalam inkubator sampai terbentuk kristal formazan yang ungu. Setelah 2-4 jam, kondisi sel diperiksa dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan *stopper* SDS 10% dalam HCl 0,1 N. *Plate* dibungkus dengan kertas atau aluminium foil lalu diinkubasikan di tempat gelap dan suhu kamar selama semalam dalam suhu ruangan. Keesokan harinya, *plate* diseker selama 10 menit untuk melarutkan formazan. Absorbansi sel diperiksa dengan ELISA reader. ELISA reader dihidupkan dan tunggu proses *progressing* hingga selesai. Pembungkus *plate* dan tutup *plate* dibuka, lalu *plate* dimasukkan ke dalam ELISA reader.

Absorbansi masing-masing sumuran dibaca dengan ELISA reader dengan $\lambda=550-600$ nm (λ 595 nm) dengan cara tekan tombol START. Setiap kali pembacaan di ELISA reader, catat di buku catatan pemakaian ELISA reader. Prosentase sel hidup dihitung lalu data dianalisis dan diinterpretasi. Analisis dan Interpretasi Data. Nilai CI (*Combination Index*).

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{A_{\text{treatment}} - A_{\text{kontrol media}}}{A_{\text{kontrol sel}} - A_{\text{kontrol media}}} \times 100\%$$

5. Deteksi Ekspresi Gen dengan *Real Time Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase Chain Reaction merupakan teknik cepat untuk mengamplifikasi fragmen DNA spesifik secara *in vitro* dengan menggunakan 2 primer untai tunggal pendek. Dengan teknik ini sejumlah kecil fragmen DNA yang diinginkan akan diamplifikasi secara eksponensial (*DNA template*), sampai jutaan kali dalam beberapa jam. Komponen-komponen yang digunakan untuk pemeriksaan PCR antara lain fragmen DNA yang diamplifikasi (sepasang primer oligonukleotida sintetik, enzim DNA Polimerase yang tahan panas (*Taq polymerase*), semua jenis nukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) dan buffer reaksi yang mengandung MgCl_2 serta *thermocycle* yang merupakan tempat berlangsungnya reaksi PCR (Kubista dan Sindelka, 2007).

Pertama-tama asam nukleat (RNA) diekstraksi/diisolasi dari spesimen yang diinginkan, kemudian dilakukan pemanasan untuk denaturasi untai DNA. Selanjutnya dilakukan pendinginan untuk *annealing* primer dilanjutkan dengan ekstensi (perpanjangan sekuen DNA yang diinginkan). Siklus diulang 25-40 kali dan pada akhir siklus setiap sekuen DNA yang baru dibentuk bertindak sebagai target baru siklus berikutnya sehingga akan terbentuk jutaan kopi DNA target awal. Proses denaturasi, *annealing* dan ekstensi berjalan secara otomatis dengan menggunakan mesin yang sudah diprogram. Deteksi hasil PCR kemudian dapat dianalisis dan dikuantifikasi menggunakan densitometer atau secara langsung menggunakan *Real-time* PCR (Kubista *et al.*, 2006).

a. Isolasi RNA Sel HepG2

Total RNA diisolasi menggunakan *miR-Neasy Mini Kit* (cat #217004). Sampel diambil dari kira 1×10^6 sel dan dimasukkan ke dalam tabung 1,5 mL, kemudian sampel disentrifugasi 3000 g, selama 5 menit. Sebanyak 200 μL sampel dipindahkan ke dalam tabung baru, lalu, ditambahkan 60 μL *LysisSolution* BF, vortex selama 5 detik. Sebanyak 20 μL *Protein Precipitation Solution* BF ditambahkan lalu divorteks selama 5 detik kemudian diinkubasi dalam suhu ruang selama 1 menit. Supernatan bening dipindahkan ke dalam tabung koleksi baru (2 mL dengan tutup), sebanyak 270 μL isopropanol ditambahkan, lalu divorteks selama 5 detik.

MikroRNA *Mini Spin Column* BF dipasang pada tabung koleksi, sebanyak 300 μL sampel dimasukkan dalam kolom, lalu diinkubasi 2 menit pada suhu ruang, kemudian

disentrifugasi 11.000 g, selama 30 detik. Cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi dibuang, kemudian tabung koleksi dipasang kembali. Sebanyak 700 μL *Wash Solution 2 BF* ditambahkan ke dalam kolom. Kemudian disentrifugasi 11.000 g, selama 30 detik. Cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi dibuang, kemudian tabung koleksi dipasang kembali. 250 μL *Wash Solution 2BF* ditambahkan ke dalam kolom. Lalu, disentrifugasi 11.000 g, selama 2 menit. Cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi dibuang, kemudian pasang kembali tabung koleksi. 50 μL rDNase ditambahkan langsung ke dalam membran kolom. Inkubasi pada suhu ruang, selama 15 menit.

Sebanyak 100 μL *Wash Solution 1BF* ditambahkan ke dalam kolom, kemudian disentrifugasi 11.000 g, selama 30 detik. Cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi dibuang, kemudian tabung koleksi dipasang kembali. Sebanyak 700 μL *Wash Solution 2BF* ditambahkan ke dalam kolom, lalu disentrifugasi 11.000 g, selama 30 detik. Cairan yang masuk ke dalam tabung koleksi dibuang, kemudian tabung koleksi dipasang kembali. Sebanyak 250 μL *Wash Solution 2BF* ditambahkan ke dalam kolom. Kemudian disentrifugasi 11.000 g, selama 2 menit. Tabung koleksi dibuang dan diganti dengan tabung 1,5 mL untuk menampung RNA. Sebanyak 25 μL *RNAse free water* ditambahkan lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, kemudian disentrifugasi 11.000 g selama 1 menit. Sebanyak 25 μL *RNAse free water* ditambahkan kembali, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit, kemudian disentrifugasi 11.000 g selama 1 menit.

Saat ini RNA terlarut dalam *RNAse free water* di dalam tabung koleksi 1,5 mL. Kolom dibuang, kemudian tabung koleksi ditutup. Total RNA disimpan dalam lemari pendingin -20°C untuk penyimpanan beberapa hari, akan tetapi jika akan disimpan dalam waktu lama RNA disimpan di lemari pendingin -80°C .

b. Pembuatan cDNA

Pembuatan cDNA menggunakan *Qiagen miScript II RT Kit* (cat#218161). Langkah untuk pembuatan cDNA adalah: RNA yang telah diisolasi dikeluarkan dari lemari pendingin -80°C . Kemudian diletakkan pada wadah tabung yang telah dialasi dengan *ice pack*. RNA dibiarkan mencair secara perlahan lalu homogenisasi dengan vorteks dan *spin down*.

Pembuatan *master mix* dilakukan dengan mencampur 4 μL 5x reaction *buffer*, 9 μL *nuclease free water*, 2 μL *enzym mix*, dan 1 μL *spike in* (sp6), hingga total 16 μL . Kemudian dihomogenisasi dengan vorteks dan *spin down*. *Master mix* dibagi ke dalam masing-masing tabung sebanyak 16 μL per reaksi. Sebanyak 4 μL sampel RNA

dimasukkan ke masing-masing tabung, kemudian *spin down*. Tabung dimasukkan dalam *thermal cycler* Biorad C1000 dan dijalankan sesuai dengan program CDNAMIRN (inkubasi 60 menit pada suhu 42°C, inaktivasi *reverse transcriptase* 5 menit pada suhu 95°C, dan didinginkan pada suhu 4°C). Selanjutnya cDNA yang dihasilkan disimpan pada suhu 4°C atau disimpan pada suhu -20°C.

c. Protokol Real time qPCR MiRNA

Bahan untuk real time qPCR adalah *Qiagen miScript SYBR Green PCR Kit* (cat#218073), primer set miRNA, cDNA yang telah dibuat sebelumnya. Langkah untuk qRT-PCR untuk hsa-miR-196 dan miR-16 adalah: Sampel cDNA yang telah dibuat dikeluarkan dari lemari pendingin -20°C. Sampel diletakkan pada wadah tabung yang telah dialasi dengan *ice pack*. Sampel dibiarkan mencair secara perlahan, kemudian dihomogenisasi dengan vortex lalu *spin down*, cDNA diencerkan dengan *RNAse free water* dengan perbandingan 1:80, yaitu 1 µL cDNA dengan 80 µL *RNAse free water*, lalu dihomogenisasi dengan vorteks kemudian *spin down*.

Primer yang diambil adalah *Ctrl_miRTC_1 miScript Primer Assay* (MS00000001) sebagai internal kontrol dan U6 sebagai primer *host keeping gene*. Primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Hs_miR-196b_2 *miScript Primer Assay*(MS00009079): targets hsa-miR-196b-5p

Hs_miR-16_1 *miScript Primer Assay*(MS00003318): target hsa-miR-16-5p

Primer dicairkan dalam suhu ruang dan dihomogenisasi dengan vorteks kemudian *spin down*. Sebanyak 5 µL *SYBR Green master mix*, dan 1µL *PCR primer mix* dicampurkan (untuk masing-masing campuran dibedakan). Kemudian dihomogenisasi dengan vorteks kemudian *spin down*. Larutan dibagi ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 6 µL *master mix*. Sebanyak 4 µL sampel cDNA yang telah diencerkan sebelumnya dimasukkan. Set program real time qPCR pada mesin Biorad CFX 96, sebagai berikut : *initial activation step* denaturasi 95°C selama 15 menit, amplifikasi 40 siklus, denaturasi 94°C selama 15 detik, *annealing* 55°C selama 30 detik, dan ekstensi 70°C selama 34 detik, *ramp-rate* 1,6°C/s *optical read* dan analisa kurva leleh.

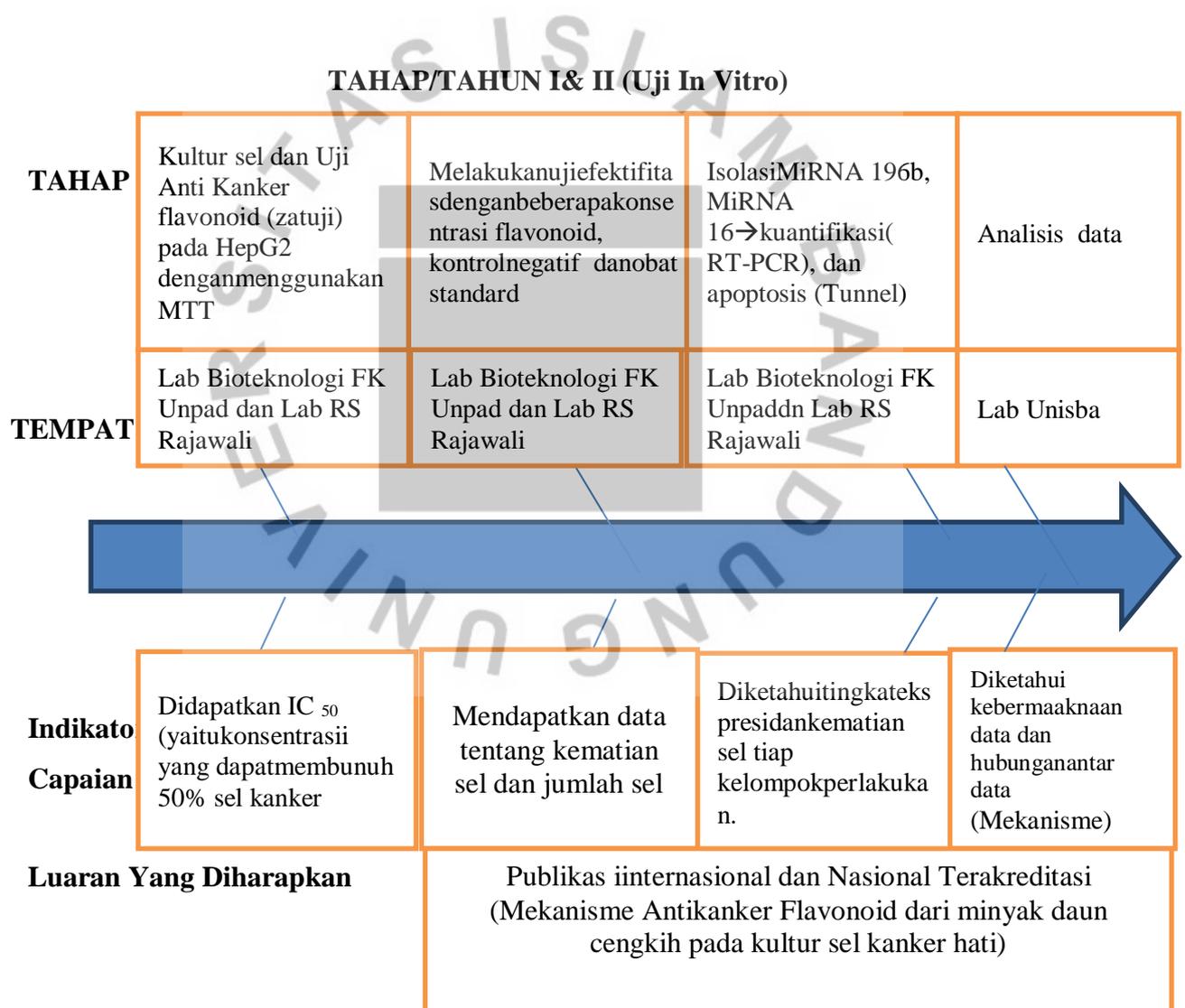
Tempat Penelitian

Tempat penelitian adalah di Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Penelitian Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

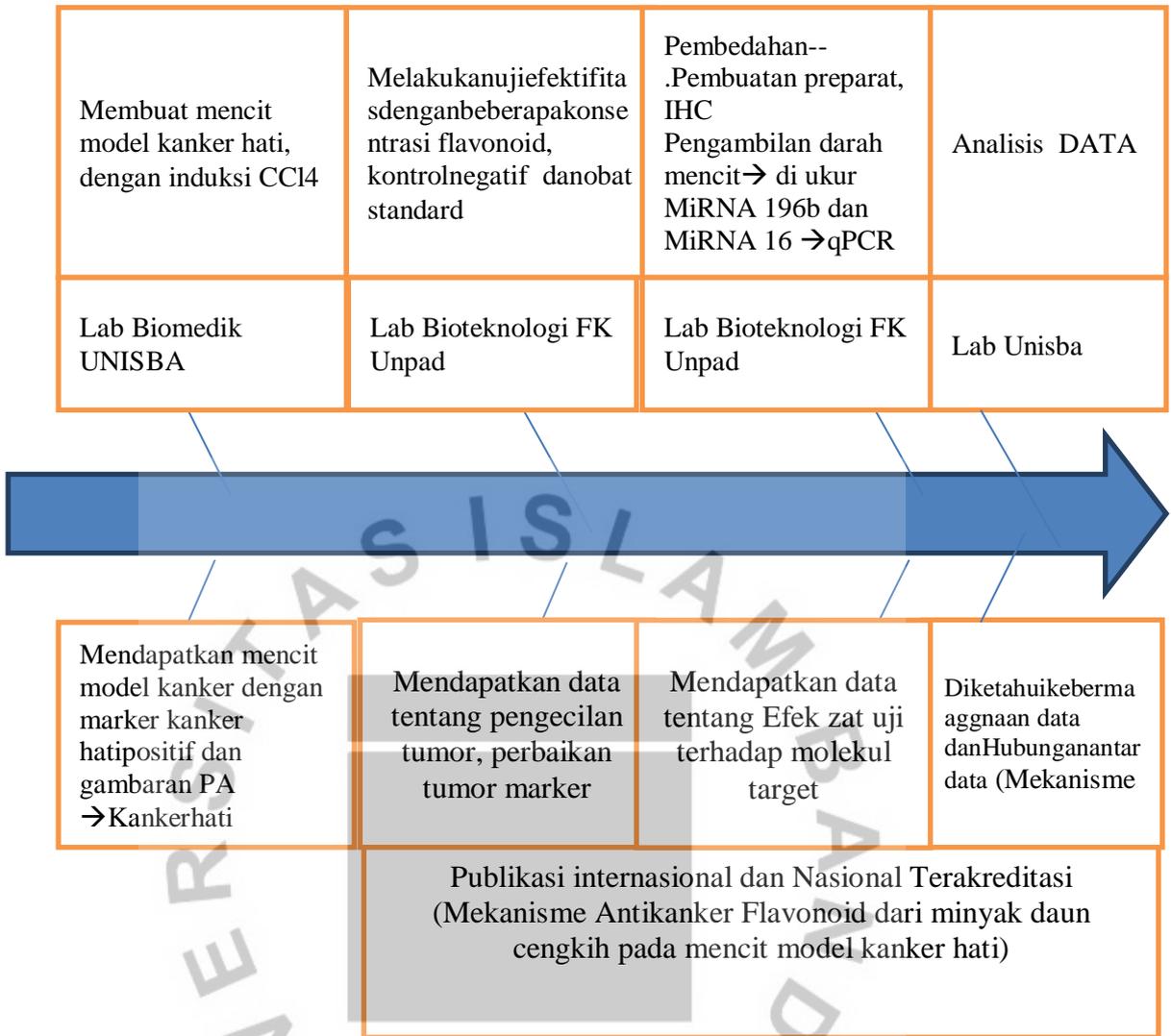
Analisis Hasil

Sebelum dilakukan analisis statistik, dilakukan uji normalitas dengan menggunakan Shapiro Wilk Test untuk melihat distribusi data. Hasil uji normalitas ternyata data berdistribusi normal, maka dilakukan analisis data menggunakan uji parametrik yaitu ANOVA (*Analysis of Varians*). Hasil uji statistik menggunakan ANOVA menunjukkan hasil bermakna, maka dilakukan uji statistik lanjutan dengan menggunakan Post Hoc Test (Tukey HSD) untuk mengetahui pada kelompok perlakuan mana yang menunjukkan hasil paling bermakna.

Tahapan Penelitian



TAHUN/TAHAP 3 (In Vivo Pada Mencit Model Kanker Hati)



Gambar 4. 1 Tahapan Penelitian

BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

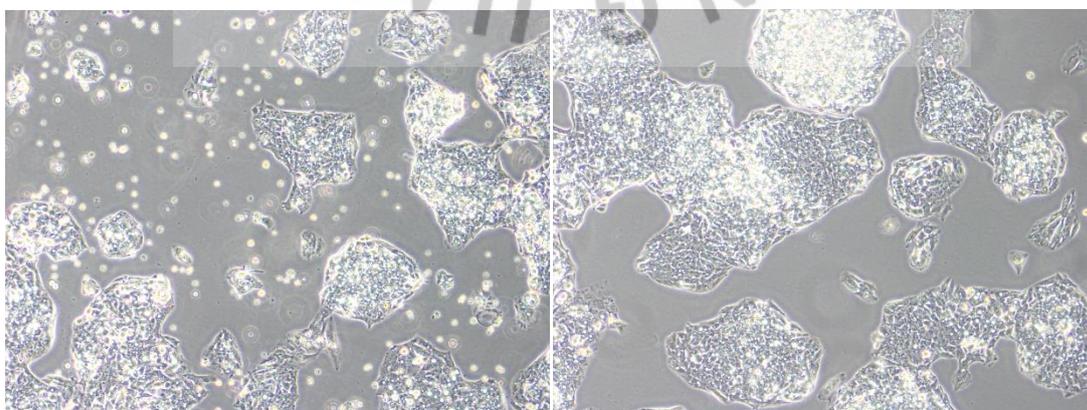
5.1. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Penelitian tahun pertama ini secara garis besar terdiri atas beberapa tahap, tahap pertama ini lebih ditujukan untuk menguji senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih sebagai model ideal agen terapi kanker yang potensial yaitu senyawa bioaktif dari bahan alam yang memiliki potensi untuk membunuh sel kanker. Tahap pertama ini dilakukan melalui uji sitotoksik senyawa terhadap kultur sel kanker hati serta perbandingannya dengan aktivitas sitotoksik obat standar untuk kanker.

Adapun bahan yang diuji meliputi senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih yaitu (1,2-epoksi-3(3-(3,4-dimetoksifenil)-4H-1-benzopiran-4on)propana yang selanjutnya disebut senyawa "Epoksi", sedangkan obat standar untuk kanker yang digunakan adalah doxorubicin dan cisplatin untuk perbandingan. Tujuan dari Uji sitotoksik adalah untuk mengeksplorasi aktivitas anti kanker dari bahan yang diuji yang dalam penelitian ini yang dinilai adalah aktivitasnya terhadap sel kanker hati. Pemeriksaan dilakukan menggunakan metoda MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide*)

a. Penumbuhan sel kanker hati HepG2 cell line

Prosedur kultur sel HepG2 dilakukan sesuai dengan protokol standar dari ATCC. Pasase (P1) hingga P5 Kultur sel HepG2 pada penelitian ini memerlukan waktu 13 hari untuk sampai pada tahap konfluens namun pasase selanjutnya berlangsung lebih cepat untuk sampai konfluens yaitu 6–7 hari. Gambaran pertumbuhan sel HepG2 diobservasi menggunakan inverted microscopy dapat dilihat pada gambar 5.1 berikut :



A : 7 hari (pembesaran 100x)

B : 13 hari (pembesaran 100x)

Gambar 5.1. KulturSel HepG2

Rasio kultivasi untuk penelitian ini disesuaikan dengan rekomendasi ATCC yaitu 1:4 sampai 1:6. Proses subkultur dilakukan sampai jumlah persediaan sel diperhitungkan mencukupi untuk seluruh tahapan penelitian.

b. Uji Aktivitas Sitotoksik Terhadap HepG2 Cell Line Metode MTT (3-4- 5-dimethylthiazol-2yl-2,5-difenil tetrazolium bromide)

Pemeriksaan aktivitas sitotoksik senyawa murni yang diisolasi dari minyak daun cengkih dilakukan terhadap kultur *HepG2 cell line* dengan metoda MTT. Absorbansi tiap sumuran diukur dengan *spectrophotometer microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Hasil absorbansi masing-masing kemudian dihitung menggunakan rumus di bawah ini untuk membuat kurva sitotoksik.

$$\text{Survival sel} = \frac{\text{Abs sampel} - \text{Abs blank}}{\text{Abs kontrol} - \text{Abs blank}} \times 100\%$$

Perhitungan IC₅₀ menggunakan analisis Probit dengan perangkat lunak SPSS. (Hasil perhitungan terlampir)

Berdasarkan kurva sitotoksik pada kultur sel HepG2 diperoleh nilai IC₅₀ senyawa flavonoid minyak daun cengkih sebesar 50,62 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa flavonoid ini memiliki aktivitas antikanker kuat terhadap sel kanker hati.

Untuk menilai kekuatannya kemudian dilakukan perbandingan dengan IC₅₀ obat standar yaitu doxorubicin dan cisplatin.

Berdasarkan kurva sitotoksik pada kultur sel HepG2 diperoleh nilai IC₅₀ doxorubicin sebesar 20,25 µg/mL.

Berdasarkan kurva sitotoksik pada kultur sel HepG2 diperoleh nilai IC₅₀ cisplatin sebesar 15,42 µg/mL.

Dalam pengembangan obat antikanker baru sebagai kandidat agen terapi kanker, evaluasi preklinik merupakan salah satu hal yang penting untuk mengetahui potensi aktivitas sitotoksiknya. Evaluasi ini tidak hanya digunakan untuk obat-obat antikanker, tetapi juga untuk obat-obat lainnya, kosmetik, zat tambahan makanan, pestisida dan lainnya. Evaluasi yang telah terstandarisasi untuk menentukan apakah suatu material mengandung bahan yang toksik secara biologis disebut uji sitotoksik.

Uji sitotoksik digunakan sebagai skrining tahap awal untuk mengetahui pengaruh suatu bahan alam dalam menghambat pertumbuhan sel tumor. Suatu senyawa dianggap aktif bila mampu menghambat pertumbuhan 50% populasi sel tumor pada konsentrasi tertentu. Syarat yang harus dipenuhi untuk sistem uji sitotoksitas di antaranya adalah sistem

pengujian harus dapat menghasilkan kurva dosis-respon yang reproduibel dengan variabilitas yang rendah, kriteria respon harus menunjukkan hubungan linier dengan jumlah sel serta informasi yang didapat dari kurva dosis-respon harus sejalan dengan efek yang muncul. Salah satu metode yang umum digunakan untuk menilai aktivitas sitotoksik ini adalah metode MTT. Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas sitotoksik kuat bila mampu menghambat pertumbuhan 50% populasi sel pada konsentrasi di bawah 200 µg/mL (IC_{50} : 200 µg/mL). (Fajarningsih dkk, 2008; Adina, dkk 2009)

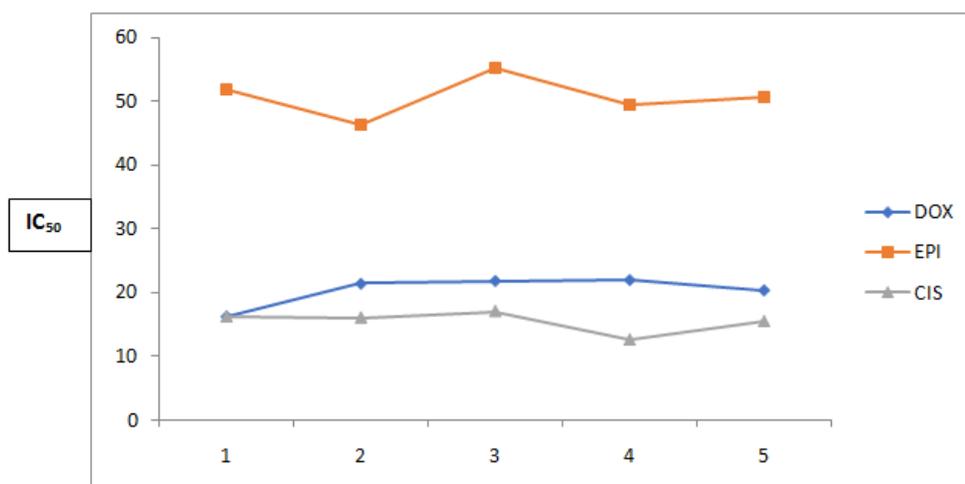
Pada penelitian ini hasil uji sitotoksik senyawa flavonoid minyak daun cengkih terhadap sel kanker hati *HepG2 cell line* dengan metode MTT menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 50,62 µg/mL. Dengan nilai IC_{50} ini dapat disimpulkan bahwa senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih ini termasuk kategori senyawa aktif dengan potensi antikanker yang kuat, sehingga senyawa ini dapat digunakan pada uji-uji selanjutnya dalam evaluasi preklinik untuk meneliti potensi antikanker dan menganalisis mekanisme kerjanya dengan menggunakan acuan nilai IC_{50} tersebut. Nilai IC_{50} ini lebih kuat dibandingkan dengan nilai IC_{50} senyawa yang diisolasi dari teh hijau sebesar 57,53 serta penelitian lain dengan nilai IC_{50} 65,7 pada sel kanker payudara manusia Hs579T. (Muharni, dkk 2009).

c. Perhitungan IC_{50} senyawa flavonoid dan obat standar

Berdasarkan kurva sitotoksik pada kultur sel HepG2 diperoleh nilai IC_{50} doxorubicin sebesar 20,25 µg/mL. Berdasarkan kurva sitotoksik pada kultur sel HepG2 diperoleh nilai IC_{50} cisplatin sebesar 15,42 µg/mL.

d. Perbandingan IC_{50} senyawa flavonoid minyak daun cengkih dengan doxorubicin dan cisplatin

Dari nilai IC_{50} senyawa flavonoid minyak daun cengkih yaitu sebesar 50,62 µg/mL dibandingkan dengan nilai IC_{50} doxorubicin yaitu sebesar 24,25 µg/mL dan IC_{50} cisplatin sebesar 15,42 µg/mL maka dapat diartikan bahwa aktivitas antikanker senyawa flavonoid minyak daun cengkih lebih rendah dibandingkan dengan doxorubicin maupun cisplatin yang merupakan obat standar untuk kanker. Grafik perbandingan IC_{50} senyawa flavonoid minyak daun cengkih, doxorubicin dan cisplatin dapat dilihat pada gambar 5.2.



Gambar 5.2 Grafik IC50 senyawa Epoksi, Doxorubicin dan Cisplatin

Hasil perbandingan ini tidak mempengaruhi senyawa Epoksi sebagai kandidat anti kanker yang poten terutama dari sisi selektifitasnya karena doxorubicin dan cisplatin memiliki IC50 yang rendah terhadap sel normal sehingga pemberian kedua obat tersebut menimbulkan efek samping berupa kerusakan sel normal.

d. Uji aktivitas sitotoksik kombinasi senyawa flavonoid dengan doxorubicin

Uji kombinasi bertujuan untuk memperoleh kombinasi obat dengan dosis yang lebih rendah namun memiliki hasil yang efektif sehingga dapat mengurangi kemungkinan efek samping yang berat.

Berdasarkan nilai IC₅₀ masing-masing senyawa uji, maka konsentrasi EPI yang digunakan pada uji kombinasi adalah: 25,31 µg/mL, 18,98 µg/mL, 12,65 µg/mL dan 6,33 µg/mL, sedangkan DOX : 12,13 µg/mL, 9,09 µg/mL, 6,06 µg/mL dan 3,03 µg/mL.. Efek sinergi obat diukur menggunakan isobologram dengan mengukur indeks kombinasi/IK (*combination index/CI*) dengan *software* CompuSyn. Hasil uji sitotoksik kombinasi senyawa EPI dan DOX dapat dilihat dalam Tabel 5.1, Tabel 5.2, dan Tabel 5.3.

Tabel 5.1. Efek Senyawa EPI terhadap Kultur Sel HepG2

Dosis µg/mL	Viabilitas (%)
25,31	15
18,98	14
12,65	23
6,33	34

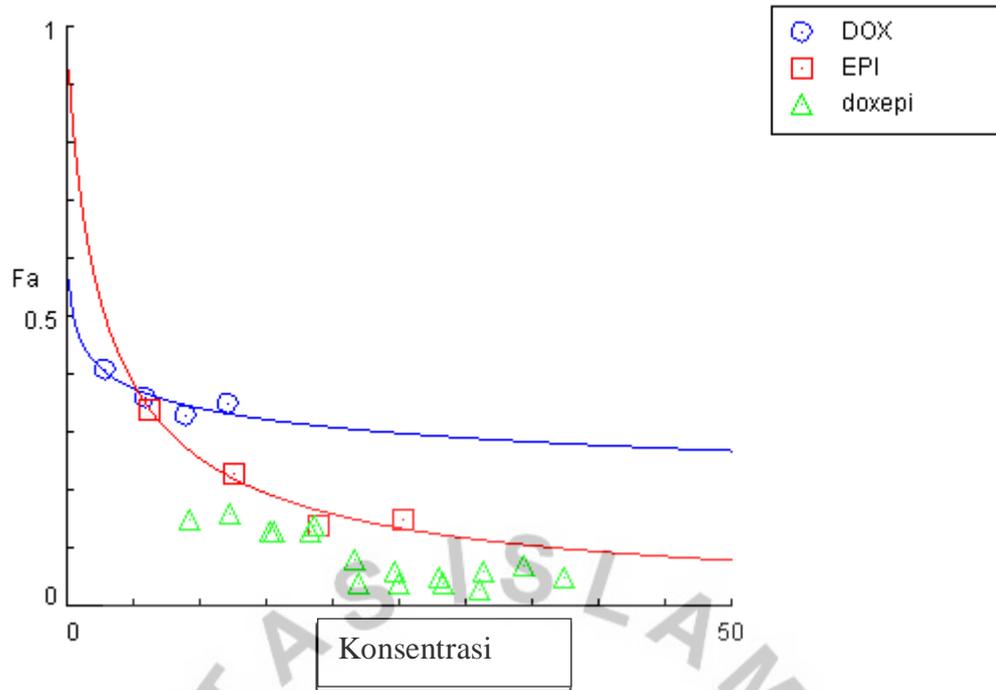
Tabel 5.2. Efek DOX terhadap Kultur Sel HepG2

Dosis $\mu\text{g/mL}$	Viabilitas (%)
12,13	35
9,09	33
6,06	36
3,03	41

Tabel 5.3. Nilai Indeks Kombinasi (IK) Senyawa EPI dan DOX terhadap Sel HepG2

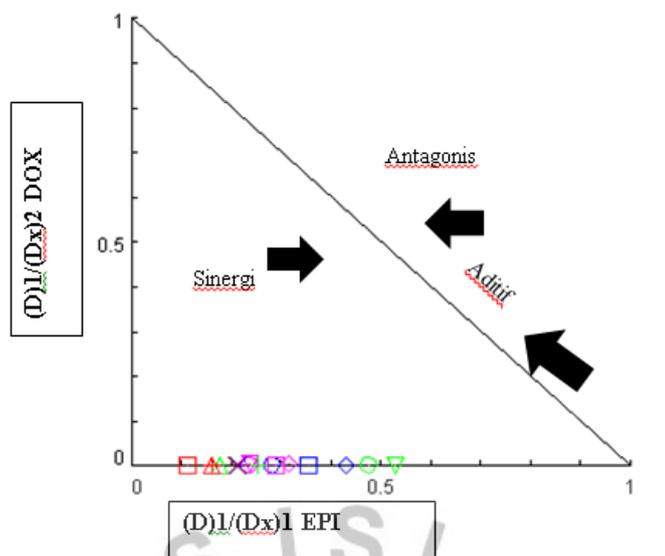
Konsentrasi EPI $\mu\text{g/mL}$	Konsentrasi DOX $\mu\text{g/mL}$	Viabilitas %	IK (indeks kombinasi)
25,31	12,13	5	0,28
18,98	12,13	3	0,11
12,65	12,13	6	0,18
6,33	12,13	13	0,24
25,31	9,09	7	0,43
18,98	9,09	5	0,21
12,65	9,09	8	0,25
6,33	9,09	13	0,24
25,31	6,06	6	0,35
18,98	6,06	4	0,16
12,65	6,06	14	0,53
6,33	6,06	16	0,32
25,31	3,03	4	0,21
18,98	3,03	4	0,16
12,65	3,03	13	0,48
6,33	3,03	15	0,29

Kurva dosis-efek EPI, DOX, dan kombinasinya pada kultur sel HepG2 dapat dilihat pada Gambar 3, sedangkan nilai IK dari kombinasi EPI dan DOX dari normalisasi isobologram dapat dilihat pada Gambar 5.3.



Gambar 5.4. Kurva Sitotoksik Kombinasi Senyawa EPI dan DOX

- Kelompok HeLa yang diberi Epoksi
- Kelompok HeLa yang diberi Doksorubisin
- △ Kelompok HeLa yang diberi Epoksi + Doksorubisin



Gambar 5.5. Kurva Normalisasi Isobogram Kombinasi EPI dan DOX

○	25,31 EPI + 12,13DOX	+	12,65 EPI + 9,09DOX	×	25,31 EPI + 3,03DOX
□	18,98 EPI + 12,13DOX	○	6,33 EPI + 9,09DOX	+	18,98 EPI + 3,03DOX
△	12,65 EPI + 12,13DOX	□	25,31 EPI + 6,06DOX	○	12,65 EPI + 3,03DOX
▽	6,33 EPI + 12,13DOX	△	18,98 EPI + 6,06DOX	□	6,33 EPI + 3,03DOX
◇	25,31 EPI + 9,09DOX	▽	12,65 EPI + 6,06DOX		
×	18,98 EPI + 9,09DOX	◇	6,33 EPI + 6,06DOX		

Berdasarkan Tabel 5.3 dan Gambar 5.4 disimpulkan bahwa konsentrasi kombinasi yang menghasilkan viabilitas sel paling rendah (3%) adalah kombinasi konsentrasi EPI 18,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan DOX 12,13 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sedangkan Gambar 5.5. menunjukkan bahwa sebagian besar kombinasi senyawa EPI dan DOX bersifat sinergik sangat kuat.

e. Pengukuran ekspresi MiRNA-196b dan MiRNA-16 pada kultur sel kanker hati

Sampel adalah suspensi sel HepG2 yang berasal dari pasase yang sama. Sel kanker hati *HepG2 cell line* dikultur dalam Medium (DMEM) yang mengandung 10% *Fetal Bovine Serum*. Sebelumnya dilakukan tripsinasi sel menggunakan tripsin 0,05% - EDTA 0,53 mM, kemudian ditambahkan medium pertumbuhan hingga menjadi suspensi sel. Suspensi sel dimasukkan ke dalam medium kultur dan dikultur pada *plate* dengan perlakuan sesuai kelompoknya sebanyak 3 ulangan. Senyawa yang digunakan untuk

perlakuan adalah senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih (Epoxy) yang telah diuji aktivitas sitotoksiknya dengan metoda MTT. Konsentrasi senyawa yang digunakan adalah konsentrasi IC₅₀ yaitu 50,62µg/mL.

Pengukuran ekspresi MiRNA secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan *real time qPCR* pada suhu yang didapatkan dari hasil optimasi. Data yang didapatkan dianalisis dengan metode kuantifikasi relatif metode *comparative threshold cycle analysis* atau perbandingan *delta delta threshold* ($\Delta\Delta C_T$ atau DDC_T) karena belum ada kurva yang dapat dijadikan standar sehingga tidak digunakan perhitungan secara absolut. Metode ini membandingkan target dengan nilai referensi yang dipilih yaitu level ekspresi *housekeeping gene* yang sesuai yang pada penelitian ini menggunakan gen RNU6. Agar nilai CT valid, efisiensi pada saat amplifikasi dari gen target harus sama dengan saat amplifikasi gen referensi dalam penelitian ini sama dengan 100%. Nilai yang diperoleh merupakan nilai perbandingan relatif terhadap kontrol menggunakan perhitungan berdasarkan rumus Livak berikut:

$$\Delta C_T \text{ eksperimen} = CT_{\text{target pada eksperimen}} - CT_{\text{housekeeping gene pada eksperimen.}}$$

$$\Delta C_T \text{ kontrol} = CT_{\text{target pada kontrol}} - CT_{\text{housekeeping gene pada kontrol.}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ kontrol} - \Delta C_T \text{ eksperimen}$$

Perbandingan level ekspresi didapat dengan menggunakan persamaan : Perbandingan level ekspresi = $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Pada penelitian ini perhitungan dilakukan menggunakan *software Thermo Scientific PikoReal 2.2.248.601*.

f. Analisis dan uji statistik ekspresi MiRNA-196b dan MiRNA-16

Uji normalitas dilakukan menggunakan Uji Kesesuaian Kolmogorov-Smirnov dan hasil uji dengan $\alpha=5\%$ menunjukkan bahwa pada derajat kepercayaan 95% seluruh data

berdistribusi normal ($p > 0,05$ sehingga data dapat dianalisis menggunakan uji parametrik. (perhitungan terlampir)

Untuk mengetahui adanya perbedaan ekspresi MiRNA-196b dan MiRNA-16 setelah pemberian senyawa flavonoid minyak daun cengkih pada seluruh kelompok, digunakan uji beda dengan analisis of varians (ANOVA). Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa rerata ekspresi MiRNA 196b dan MiRNA-16 pada kelompok yang diberi senyawa flavonoid tunggal, doxorubicin tunggal maupun kombinasi flavonoid dan doxorubicin, semuanya lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan dan hasil uji statistik menggunakan ANOVA pada derajat kepercayaan 95% menunjukkan bahwa ekspresi MiRNA 196b dan MiRNA-16 berbeda secara signifikan pada seluruh kelompok dengan nilai $p < 0,000$. (tabel 5.4)

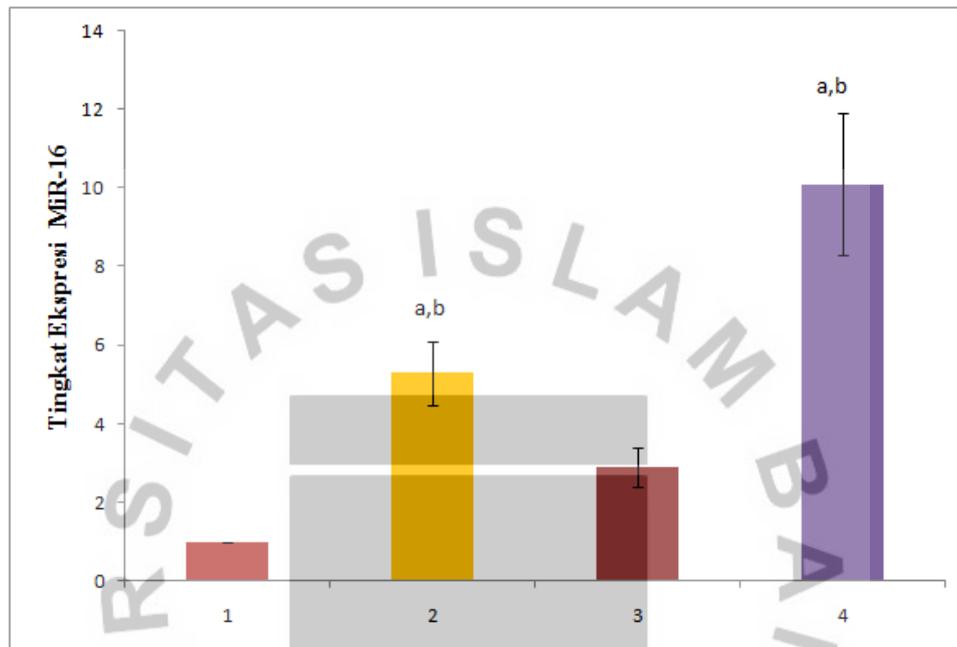
Tabel 5.4. Uji beda ekspresi MiRNA-196b dan MiRNA-16 antar kelompok pada kultur sel kanker hati

Kelompok	Nilai <i>Mean</i> Ekspresi		Nilai $p^{*)}$
	MiRNA-196b	MiRNA-16	
			0,000
Kelompok 1	1,000	1,000	
Kelompok 2	23,090	5,290	
Kelompok 3	4,848	2,928	
Kelompok 4	7,643	10,109	

Analisis lanjut perbedaan paling bermakna ekspresi MiRNA 196b serta MiRNA-16 antar seluruh kelompok dilakukan menggunakan uji posthoc Tukey. Hasil uji beda lanjut menunjukkan bahwa terdapat peningkatan ekspresi MiRNA-196b secara bermakna pada kelompok yang diberi senyawa flavonoid (Epoksi) tunggal dibandingkan kelompok kontrol maupun kelompok yang diberikan doxorubicin. Peningkatan ekspresi MiRNA-196b secara bermakna juga terlihat pada kelompok yang diberi kombinasi senyawa

flavonoid (Epoksi) dan doxorubicin dibandingkan dengan ekspresi pada kelompok kontrol maupun kelompok yang diberi doxorubicin tunggal.(gambar 5.6).

Profil ekspresi MiRNA-196b dan MiRNA-16 pada kultur sel kanker hati HepG2 di seluruh kelompok dapat dilihat pada gambar 5.6 dan 5.7 berikut,



Gambar 5.6. Analisis dan Uji Statistik Ekspresi MiR-16 pada Kultur Sel HepG2

Keterangan:

Kelompok 1: Kelompok HepG2 tanpa perlakuan (kontrol negatif)

Kelompok 2: Kelompok HepG2 yang diberi EPI IC_{50}

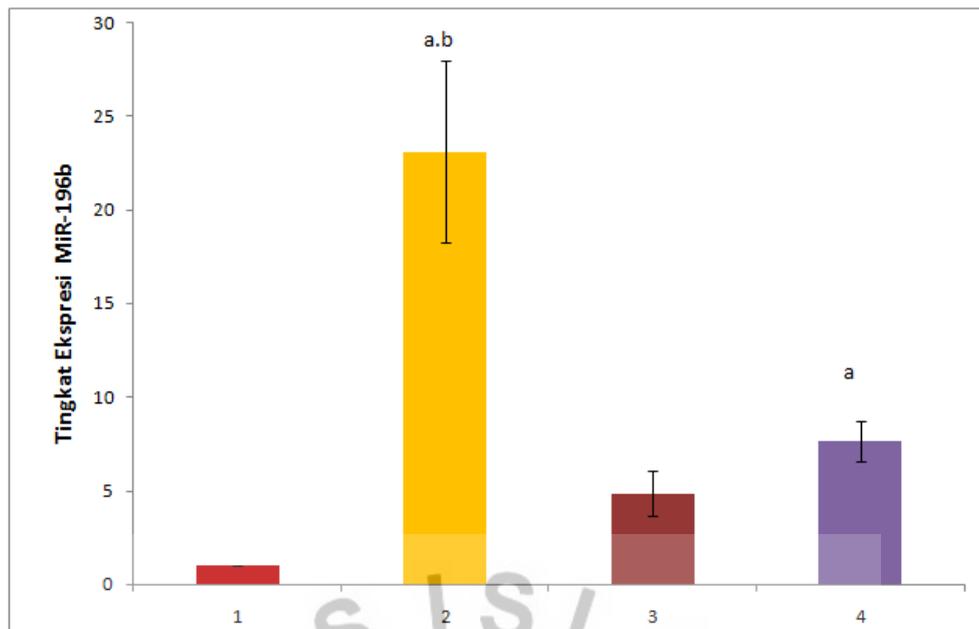
Kelompok 3: Kelompok HepG2 yang diberi DOX IC_{50}

Kelompok 4: Kelompok HepG2 yang diberi EPI $\frac{1}{2} IC_{50}$ + DOX $\frac{1}{2} IC_{50}$

Uji Post Hoc menggunakan Uji Tukey

a= kelompok yang berbeda bermakna dengan kelompok 1

b= kelompok yang berbeda bermakna dengan kelompok 3



Gambar 5.7. Analisis dan Uji Statistik Ekspresi MiR-196b pada Kultur Sel HepG2

Keterangan:

Kelompok 1: Kelompok HepG2 tanpa perlakuan (kontrol negatif)

Kelompok 2: Kelompok HepG2 yang diberi EPI IC₅₀

Kelompok 3: Kelompok HepG2 yang diberi DOX IC₅₀

Kelompok 4: Kelompok HepG2 yang diberi EPI ½ IC₅₀ + DOX ½ IC₅₀

Uji Post Hoc menggunakan Uji Tukey

a = kelompok yang berbeda bermakna dengan kelompok 1

b = kelompok yang berbeda bermakna dengan kelompok 3

Kemoterapi sistemik dinyatakan relatif tidak efektif pada kanker hati karena jenis kanker ini resisten terhadap agen kemoterapi. Resistensi ini disebabkan oleh beban mutasi tinggi dan juga adanya mekanisme resistensi terhadap obat. Mekanisme resistensi yang timbul berhubungan dengan pemberian kemoterapi dalam dosis rendah karena mempertimbangkan disfungsi hati dan juga dilakukan untuk mengurangi toksisitas. (Bruix et al, 2005, Wirth T et al, 2005)

MiRNA-196b terlibat dalam diferensiasi sel normal, proliferasi, dan dalam karsinogenesis dari berbagai jenis kanker (Changyi C et al, 2011). Pada penelitian ini pengukuran ekspresi MiRNA-196b pada kultur sel kanker hati setelah pemberian senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih menunjukkan hasil berupa peningkatan ekspresi hampir 24 kali dari tingkat ekspresi kelompok kontrol (tabel 5.1). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa ini memiliki kemampuan untuk meningkatkan proses apoptosis dan dapat mengembalikan keadaan kemoresisten pada sel kanker hati sesuai dengan penelitian Rebutti tahun 2015. Penelitian ini juga membandingkan tingkat ekspresi MiRNA-196b

pada kultur sel kanker hati setelah pemberian senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih dengan pemberian obat standar doxorubicin. Hasil perbandingan menunjukkan bahwa tingkat ekspresi MiRNA-196b pada pemberian senyawa flavonoid lebih tinggi 5 kali lipat dibandingkan dengan tingkat ekspresi pada pemberian doxorubicin (tabel. 5.1). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa flavonoid memiliki kemampuan untuk menginduksi apoptosis pada sel kanker hati lebih kuat dibandingkan dengan doxorubicin.

Penelitian ini juga mengukur ekspresi MiRNA-196b pada sel kanker hati setelah pemberian kombinasi senyawa flavonoid dengan doxorubicin. Hasil pengukuran memperlihatkan tingkat ekspresi MiRNA pada kelompok tersebut lebih rendah dibandingkan dengan ekspresi pada pemberian senyawa flavonoid tunggal namun lebih tinggi dibandingkan ekspresi pada pemberian doxorubicin tunggal. Hasil pengukuran ekspresi ini diperkuat dengan uji statistik menggunakan ANOVA dan tes *Posthoc* yang menunjukkan hasil bermakna (gambar 5.3).

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Rebucci tahun 2015 yang menunjukkan bahwa overekspresi mir-196b pada sel kanker hati meningkatkan proses apoptosis melalui mekanisme penurunan kapasitas cell survival dalam kondisi hipoksia. Dengan pendekatan proteomik dikombinasikan dengan analisis bioinformatika, penelitian tahun 2015 mengidentifikasi IGF2BP1 sebagai target potensial dari mir-196b. Peningkatan ekspresi mir-196b menurunkan ekspresi RNA IGF2BP1 dan tingkat proteinnya. Penurunan ekspresi IGF2BP1 siRNA menyebabkan peningkatan apoptosis, penurunan viabilitas sel dan proliferasi pada kultur sel normal. Kesimpulan dari penelitian tersebut adalah IGF2BP1 merupakan target langsung dan fungsional dari mir-196b dan menunjukkan bahwa overekspresi mir-196b dapat mengembalikan keadaan kemoresisten yang disebabkan oleh hipoksia pada sel kanker hati. (Rebucci M et al,2015)

Pada penelitian ini juga dilakukan pengukuran ekspresi MiRNA-16 pada kultur sel kanker hati setelah pemberian senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih. Hasil pengukuran menunjukkan hasil berupa peningkatan ekspresi hampir 5 kali dari tingkat ekspresi kelompok kontrol (tabel 5.1). Penelitian ini juga membandingkan tingkat ekspresi MiRNA-16 pada kultur sel kanker hati setelah pemberian senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih dengan pemberian obat standar doxorubicin. Hasil perbandingan menunjukkan bahwa tingkat ekspresi MiRNA-16 pada pemberian senyawa flavonoid lebih tinggi 2 kali lipat dibandingkan dengan tingkat ekspresi pada pemberian doxorubicin (tabel. 5.1). Penelitian ini juga mengukur ekspresi MiRNA-16 pada sel kanker hati setelah pemberian kombinasi senyawa flavonoid dengan doxorubicin. Hasil pengukuran

memperlihatkan tingkat ekspresi MiRNA-16 pada kelompok tersebut lebih tinggi 2 kali lipat dibandingkan dengan ekspresi pada pemberian senyawa flavonoid tunggal dan 5 kali lipat pada pemberian doxorubicin tunggal. Hasil pengukuran ekspresi ini diperkuat dengan uji statistik menggunakan ANOVA dan tes *Posthoc* yang menunjukkan hasil bermakna (gambar 5.4).

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Wu dkk tahun 2015 yang menyimpulkan bahwa overekspresi miRNA-16 menghambat proliferasi, invasi dan metastasis sel HepG2. MiRNA16 diketahui terekspresi secara abnormal pada karsinoma hepatoseluler (HCC), dan overekspresi miRNA-16 menghambat proliferasi, invasi dan metastasis dari berbagai sel-sel kanker. Telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya, suatu penelitian yang mengeksplorasi efek dari miRNA-16 pada proliferasi, invasi dan metastasis sel HCC, serta menjelaskan mekanisme yang terlibat. Penelitian tersebut menggunakan beberapa lini sel kanker hati dengan tingkat ekspresi mir 16 yang moderat. Hasilnya terdapat tingkat ekspresimiRNA-16 yang tertinggi terdapat pada sel SMMC-7721 dan terendah pada SK-Hep 1 dan Huh 7 sel; tingkat ekspresi sedang ditemukan pada sel HepG2. Lini sel HepG2 terpilih sebagai garis sel untuk digunakan dalam percobaan tindak lanjut, di mana dilakukan pengukuran viabilitas sel, dan ekspresi PI3K / Akt, Bax, Bcl-2, MMP-2 dan MMP-9, dan E-cadherin dan vimentin. Overekspresi miRNA-16 secara signifikan menghambat proliferasi, invasi dan metastasis sel HepG2, seperti yang ditunjukkan oleh analisis western blot. Hal ini dicapai melalui peningkatan ekspresi Bax, penurunan ekspresi Bcl-2, ekspresi MMP-2 dan MMP-9. Selain itu ekspresi E-cadherin meningkat dan ekspresi vimentin menurun. Overekspresi miRNA-16 berlebih juga menghambat ekspresi PI3K dan Akt fosforilasi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa overekspresi miRNA-16 menghambat proliferasi, invasi dan metastasis sel HepG2, dan bahwa efek ini berkaitan dengan jalur sinyal PI3K yang / Akt. (Wu WL et al, 2015)

Pemantauan perkembangan dan keberhasilan pengobatan kanker selama ini membutuhkan biaya yang tinggi karena menggunakan pemeriksaan radiologis menggunakan MRI atau CT Scan (Kim *et al.*, 2007). Pemeriksaan lain adalah dengan biomarker yang diambil dari darah, pemeriksaan ini bersifat minimal invasif, hanya saja belum ada yang spesifik untuk kanker hati. Deteksi kadar MiRNA dalam plasma dan serum berpotensi untuk diagnosis awal suatu keganasan, prediksi prognosis dan dapat melihat respon terapi karena MiRNA dalam darah sangat stabil (Wang *et al.*, 2013).

5.2. Luaran yang dicapai

Luaran yang sudah dicapai dari penelitian ini adalah berupa Artikel ilmiah yang telah dipresentasikan di Seminar Internasional yaitu Science and Technology Research Symposium (SiRes) yang diselenggarakan pada 22-23 Oktober 2018. dengan judul "Comparison of Flavonoid Compound from Clove Leaf Oil Cytotoxic Activities with Doxorubicin and Cisplatin on Liver Cancer Cell Culture" yang diterbitkan dalam Prosiding Internasional terindex Scopus .(Artikel dan sertifikat terlampir)

Luaran lain berupa artikel yang akan disubmit di Jurnal Internasional dengan judul "MiRNA-196b and MiRNA-16 as new molecular targets of 1,2-epoxy-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one propane compound isolated from clover leaf oil in the treatment of liver cancer". (draft artikel terlampir)

BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Rencana tahapan berikutnya dari penelitian ini adalah sesuai dengan peta jalan penelitian yang telah direncanakan. Tahun ke-2 direncanakan tema penelitian berupa Uji kombinasi senyawa flavonoid minyak daun cengkih dengan obat-obat standar kemoterapi kanker hati serta analisis ekspresi gen-gen target MiRNA-16 dan MiRNA-196b. Gen-gen yang menjadi target adalah gen Insulin like growth factor (IGF), Transforming growth factor (TGF), Bcl2 dan Fas yang berperan dalam mekanisme apoptosis, proliferasi, invasi dan metastasis kanker hati.

BAB 7. KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari aktivitas penelitian sampai tahap ini adalah :

1. Senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih (Epoksi) memiliki tingkat aktivitas sitotoksik sedang terhadap sel kanker hati
2. Senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih (Epoksi) bersifat sinergi kuat dengan doxorubicin pada sel kanker hati
3. Senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih (Epoksi) dan kombinasinya dengan doxorubicin (Epi-Dox) dapat meningkatkan ekspresi MiRNA-196b
4. Senyawa flavonoid dari minyak daun cengkih (Epoksi) dan kombinasinya dengan doxorubicin (Epi-Dox) dapat meningkatkan ekspresi MiRNA-16

DAFTAR PUSTAKA

- Adina A, Handoko F, Setyarini I, Septisetyani, Riyanto S, Meyranto E. Ekstrak etanolik kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (crism.) Swingle) meningkatkan sensitivitas sel MCF-7 terhadap doxorubicin. 2009.
- Badan Litbangkes. Resume hasil riset kesehatan dasar Indonesia. In: Indonesia DKR, Jakarta: Badan LitBangKes; 2008.
- Bassiouny A, Bassiouni N, Nosseir M, Zoheiry M, El-Ahwany G, F FS, dkk. Circulating and hepatic Fas expression in HCV-induced chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Medscape J Med* 2008;10(6):130.
- Calin, G. a, & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews. Cancer*, 6(11), 857–66. <http://doi.org/10.1038/nrc1997>
- Cardoso A, Moucari R, Mendes C, Ripault M, Giully N, Castelnau C, dkk. Impact of peginterferon and ribavirin therapy on hepatocellular carcinoma: incidence and survival in hepatitis C patients with advanced fibrosis. *Jhep*. 2010;52:652–7.
- Cha C, DeMatteo R. Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development. *Practise Research Clin Gastroenterol*. 2005;19(1):25–37.
- Chen C, Zhang Y, Zhang L, Weakley SM, Yao Q. MicroRNA-196: critical roles and clinical application in development and cancer. *J Cell Mol Med*;2011;15(1):14-23
- Fajarningsih N, Nursid M, Wikanta T, Marraskuranto E. Bioaktivitas Ekstrak *Turbinaria decurrens* sebagai antitumor serta efeknya terhadap proliferasi limfosit. *J Pascapanen Bioteknologi Kelautan Perikanan*. 2008;3(1).
- Ghassan K, Abou-alfa M. Current and novel therapeutics for hepatocellular carcinoma: *Am Society Clin Oncol*.2004.
- Ge J, Chen Z, Li R, Lu T, Xiao G. Upregulation of microRNA-196b cooperative correlate with aggressive progression and unfavorable prognosis in patients with colorectal cancer. *Cancer Cell International*;2014:128
- Herwiyanti S. (2015). *Potensi senyawa 1,2-Epoksi-3(3-(3,4-Dimetoksifenil)-4H-1-Benzopiran-4on)Propane sebagai antikanker*.
- He H, Wu X, Yu B, Liu K, Zhou G, Qian G, dkk. The effect of desacetyluvaricin on the expression of TLR4 and P53 protein in Hepg 2.2.15. *J Hepatitis*. 2010;11(5):364–7.
- Hsieh S, Hsu C, He J, Liu C, Lo S, Chen Y, dkk. Identifying apoptosis-evasion protein/pathway in human hepatoma cells via induction of cellular hormesis by UV radiation. *J Proteome Res*. 2009;8(8):3977–86.
- Ho H, Pok S, Streit S, Ruhe JE, Hart S, Lim K, dkk. Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation, anti-apoptosis and alpha-fetoprotein secretion during hepatocellular carcinoma progression and represents a potential target for therapeutic intervention. *Jhep*. 2009;50:118–27.
- Huynh H, Ngo V, Koong H, Poon D, Choo S, Toh H, dkk. AZD6244 enhances the anti-tumor activity of sorafenib in ectopic and orthotopic models of HCC. *Jhep*. 2010;52:79–87.
- Hussain, A., Harish, G., Prabhu, S. A., Mohsin, J., Khan, M. A., Rizvi, T. a, & Sharma, C. (2012). Inhibitory effect of genistein on the invasive potential of human cervical cancer cells via modulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1 expression. *Cancer Epidemiology*, 36(6), e387–93. <http://doi.org/10.1016/j.canep.2012.07.005>
- Jemal A, Brey F, Mellisa M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *Ca Cancer J Clin*. 2011;61:69–90.
- Kim, H., Kim, W., Lee, M., Song, E., & Loh, J. J. K. (2007). Tumor volume and uterine

- body invasion assessed by MRI for prediction of outcome in cervical carcinoma treated with concurrent chemotherapy and radiotherapy. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 37(11), 858–66. <http://doi.org/10.1093/jjco/hym109>
- Lencioni R, Crocetti L, Petruzzi P, Vignali C, Bozzi W, Pina C, dkk. Doxorubicin-eluting bead-enhanced radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: a pilot clinical study. *Jhep*. 2008;49:217–22.
- Lu X, M ML, Tran T, Block T. High level expression of apoptosis inhibitor in hepatoma cell line expressing hepatitis B virus. *Int J Med Sci*. 2005;2(1):30-5.
- Liu Q, Fu H, Sun F, Zhang H, Tie Y, Zhu J, Xing R, et al. miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleid Acid Research*;2008;Vol.36.No.165391-5404
- Malinowsky, K., Wolff, C., Gündisch, S., Berg, D., & Becker, K. F. (2011). *Journal of Cancer Targeted therapies in cancer - challenges and chances offered by newly developed techniques for protein analysis in clinical tissues*, 26–35.
- Muharni, Supriyatna, Husein H, Bahti, Dachriyanus. Phenolic compound from the stem bark of manggis hutan (*Garcinia bancana* Miq.) and their antioxidant activity. *Indo J Chem*. 2009;9 (2), 321–327.
- Park S, Lee Y, Han S, Kwon S, Kwon O, Kim S, dkk. Systemic chemotherapy with doxorubicin, cisplatin and capecitabine for metastatic hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2006;6(3):10.1186/471-2407-6-3.
- Rebucci M, Sermeus A, Leonard E, Delaive E, Dieu M, Fransoler M, Arnould T, Michiels C. miRNA-196b inhibits cell proliferation and induces apoptosis in HepG2 cells by targeting IGF2BP1. 2015;14:79
- Sherman M, Burak K, Maraun J, Metrakos P, Myers R, Guindi M, dkk. Multidiciplinary Canadian Concensus Recommendations for the Management and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Current Oncol*;18(5).
- Wang, F., Liu, M., Li, X., & Tang, H. (2013). MiR-214 reduces cell survival and enhances cisplatin-induced cytotoxicity via down-regulation of Bcl2l2 in cervical cancer cells. *FEBS Letters*, 587(5), 488–495. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.016>
- Wirth T, Kuhnel F, Fleischmann-Mundt B, Woller N, Djojotubroto M, Rudolph K, dkk. Telomerase-dependent virotherapy overcomes resistance of hepatocellular carcinomas against chemotherapy and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand by elimination of Mcl-1. *Cancer Resacr J*. 2005;65:7393.
- Wu WL, Wang WY, Yao WQ, Li GD. Suppressive effects of microRNA-16 on the proliferation, invasion, and metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Med*;2015;1713-9
- Xin Y, Liang H, Deng T, Zhu K, Zhang S, Wang N, Jiang X, et al. The identification of novel targets of miR-16 and characterization of their biological functions in cancer cells. *Molecular Cancer*;2013;12:92
- Yildiz L, Baris S, Aydin O, Kefeli M, Kandemir B. Bcl-2 positivity in B and C hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroeneterology*; 2008;55(88):2207–10