

**PENGARUH EKSTRAK ETHANOL PROPOLIS TERHADAP
EKSPRESI PROTEIN *Bcl2*, *CYCLIN D1* DAN APOPTOSIS
PADA KULTUR SEL KANKER KOLON**

TESIS

**Disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister
Program Studi Magister Kedokteran Keluarga
Minat Utama Ilmu Biomedik**



Oleh:

Haryono Yuniarto

S501202029

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
SURAKARTA**

2016

**PENGARUH EKSTRAK ETHANOL PROPOLIS TERHADAP
EKSPRESI PROTEIN *Bcl2*, *CYCLIN D1* DAN APOPTOSIS
PADA KULTUR SEL KANKER KOLON**

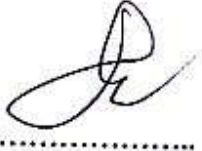

TESIS

Oleh

Haryono Yuniarto

S501202029

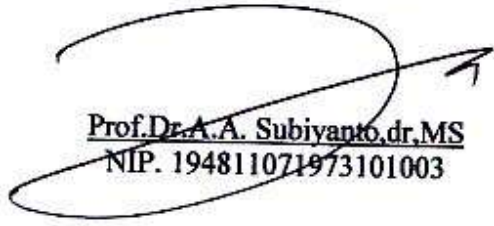
Telah disetujui oleh Tim Pembimbing

Komisi Pembimbing	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Pembimbing I	dr. H. Suradi Maryono, SpPD,KHOM, FINASIM NIP. 194708121973101001	17/16..
Pembimbing II	Prof.Dr.dr. H.M.Bambang Purwanto, SpPD,KGH, FINASIM NIP.194807191976091001	17/16..

Telah dinyatakan memenuhi syarat

Pada tanggal17/16....

Ketua Program Studi Magister Kedokteran Keluarga
Program Pascasarjana UNS


Prof. Dr. A. A. Subiyanto, dr. MS
NIP. 194811071973101003

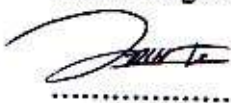

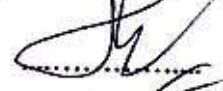

**PENGARUH EKSTRAK ETHANOL PROPOLIS TERHADAP
EKSPRESI PROTEIN *Bcl2*, *CYCLIN D1* DAN APOPTOSIS
PADA KULTUR SEL KANKER KOLON**

TESIS

Disusun untuk kualifikasi mencapai derajat Magister Kesehatan
Program Studi Magister Kedokteran Keluarga
Minat Utama Ilmu Biomedik

Oleh:
Haryono Yuniarto
S501202029

Tim Penguji

Jabatan	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Ketua	Dr.dr. Ida Nurwati, MKes NIP. 196502031997022001		17/11/16
Sekretaris	Dr.dr. Hj. Noer Raachma, SpKFR NIP. 195506281983122001		17/11/16
Anggota Penguji	1. dr. H. Suradi Maryono, SpPD,KHOM, FINASIM NIP. 194708121973101001		17/11/16
	2. Prof.Dr.dr. H.M.Bambang P, SpPD,KGH,FINASIM NIP.194807191976091001		17/11/16

Mengetahui

Direktur Program Pascasarjana UNS



Prof. Dr. M. Furqon Hidayatullah, M.Pd
NIP. 196007271987021001

Ketua Program Studi

Magister Kedokteran Keluarga

Prof. Dr. A. A. Subiyanto, dr. MS
NIP. 194811071973101003

PERNYATAAN KEASLIAN DAN PERSYARATAN PUBLIKASI

Penulis menyatakan dengan sebesar-besarnya bahwa:

1. Tesis yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Ethanol Propolis Terhadap Ekspresi Protein *Bcl2*, *Cyclin D1* dan Induksi Apoptosis Pada Mencit Kultur Sel Kanker Kolon” ini adalah karya penelitian penulis sendiri dan tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik serta tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang tertulis dengan acuan yang disebutkan sumbernya, baik dalam naskah karangan dan daftar pustaka. Apabila ternyata di dalam naskah tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, maka penulis bersedia menerima sanksi, baik tesis beserta gelar magister saya dibatalkan serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.
2. Publikasi sebagian atau keseluruhan isi tesis pada jurnal forum ilmiah harus menyertakan tim promotor sebagai *author* dan PPs UNS sebagai institusinya. Apabila penulis melakukan pelanggaran dari ketentuan publikasi ini, maka penulis bersedia mendapatkan sanksi akademik yang berlaku.

Surakarta, Juli 2016



Haryono Yuniarto

S501202029

KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillah Alhamdulillah penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala limpahan kasih sayang, rahmat dan hidayah-Nya sehingga penyusunan tesis yang berjudul: Pengaruh Ekstrak Ethanol Propolis Terhadap Ekspresi Protein *Bcl2*, *Cyclin D1* dan Apoptosis Pada Kultur Sel Kanker Kolon ini dapat terselesaikan dengan baik. Penelitian ini untuk memenuhi sebagian persyaratan dalam memperoleh Gelar Magister Kesehatan Program studi Magister Kedokteran Keluarga minat utama Biomedik Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang tulus dan penghargaan yang tinggi kepada:

1. Prof. Dr. Ravik Karsidi, M.S., selaku Rektor Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah memberikan kemudahan penulis dalam melaksanakan pendidikan Pascasarjana Program studi Magister Kedokteran Keluarga minat utama Biomedik.
2. Prof. Dr. M. Furqon Hidayatullah, M.Pd, selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah memberikan kemudahan penulis dalam melaksanakan pendidikan Pascasarjana Program studi Magister Kedokteran Keluarga minat utama Biomedik.
3. Prof. Dr. A. A. Subiyanto, dr. MS selaku Kepala Program Studi Magister Kedokteran Keluarga Universitas Sebelas Maret Surakarta, yang telah memberikan kemudahan penulis dalam melaksanakan pendidikan Pascasarjana Program studi Magister Kedokteran Keluarga minat utama Biomedik.
4. dr. H. Suradi Maryono, SpPD-KHOM-FINASIM selaku Pembimbing I yang telah memberikan ijin, bimbingan dan pengarahan dalam penyusunan tesis ini, serta memberikan kemudahan penulis dalam melaksanakan program pendidikan Pascasarjana.
5. Prof. Dr. dr. HM. Bambang Purwanto, SpPD-KGH-FINASIM selaku Pembimbing II yang telah membimbing dan memberikan pengarahan dalam

penyusunan tesis ini, serta memberikan kemudahan penulis dalam melaksanakan program pendidikan Pascasarjana.

6. Drs. Sumardi, MM selaku pembimbing/ konsultan statistik penelitian, yang dengan kesabaran telah membimbing dan memberikan pengarahan dalam penyusunan tesis.
7. Dr. dr. Ida Nurwati. Mkes sebagai ketua tim penguji Magister Kedokteran Keluarga yang telah memberikan dorongan dan arahan kepada penulis untuk pelaksanaan dan penulisan tesis ini.
8. Dr. dr. Hj. Noer Rachmah, SpKFR sebagai tim penguji Magister Kedokteran Keluarga yang telah memberikan dorongan dan arahan kepada penulis untuk pelaksanaan dan penulisan tesis ini.
9. Ayahanda dan Ibunda tercinta Bapak Mukahar dan Ibu Sri Indriyani, Mertua yang kami sayangi Bapak Miskun Widiyanto dan Ibu Dwi Rahmayanti, Istriku tercinta dr. Desi Widiyanti, buah hatiku Denia Zahra Qonita, saudara kandung, saudara ipar yang telah memberikan kasih sayang dan semangat dengan sabar dan tulus memberikan dorongan moril dan materiil dalam penyelesaian tesis ini dan proses menjalani program pendidikan Pascasarjana dan PPDS I Ilmu Penyakit Dalam.
10. Seluruh Staf Pengajar Ilmu Penyakit Dalam FK UNS/ RSUD Dr Moewardi Surakarta. Prof. Dr. dr. H A Guntur Hermawan SpPD-KPTI-FINASIM (alm), Prof.Dr.dr. Djoko Hardiman, SpPD-KEMD-FINASIM, dr. Suradi Maryono, SpPD-KHOM-FINASIM, dr. Sumarmi Soewoto SpPD-KGER-FINASIM, dr. Tatar Sumandjar, SpPD-KPTI-FINASIM, dr. Tantorono Harmono, SpPD-KGEH-FINASIM, dr. Tri Yuli Pramana SpPD-KGEH-FINASIM, dr. Supriyanto Kartodarsono, SpPD-KEMD-FINASIM, dr. Supriyanto Muktiatmojo, SpPD-FINASIM, dr. Dhani Redhono, SpPD-KPTI-FINASIM, dr. Wachid Putranto, SpPD-KGH-FINASIM, dr. Arifin, SpPD-KIC-FINASIM, dr. Fatichati Budiningsih, SpPD-Kger-FINASIM, dr. Agung Susanto SpPD-FINASIM, dr. Arief Nurudin SpPD-FINASIM, dr. Agus Joko Susanto SpPD-FINASIM, dr. Yulyani Werdiningsih, SpPD-FINASIM, dr.Sri Marwanta SpPD-Mkes, dr.Aritantri D SpPD-MSc, dr. Bayu Basuki Wijaya

SpPD-Mkes, dr.R. Satriyo SpPD-Mkes, dr. Evi Nurhayatun SpPD-Mkes, dr. Eva N SpPD-Mkes, dr. Ratih Tri K SpPD, dr. Yudhi Hadjianto SpPD-Mkes, dan dr. Agus Jati, SpPD yang telah memberi dorongan, bimbingan dan bantuan dalam segala bentuk sehingga penulis bisa menyelesaikan penyusunan tesis.

11. Seluruh teman sejawat seperjuangan Residen Penyakit Dalam yang telah memberikan dukungan dan bantuan kepada penulis dalam penelitian ini dan selama menjalani pendidikan.
12. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu, yang telah membantu penulis baik dalam menjalani pendidikan maupun dalam persiapan penelitian ini.

Penyusun menyadari bahwa dalam penyusunan dan penulisan tesis ini masih banyak terdapat kekurangan, untuk itu penyusun mohon maaf dan sangat mengharapkan saran serta kritik dalam rangka perbaikan penulisan tesis ini.

Surakarta, Juli 2016

Penyusun

Haryono Yuniarto. S501202029. 2016. Pengaruh Ekstrak Propolis Terhadap Ekspresi Protein *Bcl2*, *cyclin D1* Dan Apoptosis Pada Kultur Sel Kanker Kolon. TESIS. Pembimbing I : dr. Suradi Maryono, SpPD-KHOM, FINASIM, Pembimbing II : Prof. Dr. dr. Bambang Purwanto, SpPD-KGH, FINASIM. Program Studi Kedokteran Keluarga, Program Pascasarjana, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

ABSTRAK

Latar Belakang

Kanker kolorektal adalah jenis keganasan di bagian gastroenterohepatologi yang menempati urutan kedua sesudah kanker hepatoseluler di Indonesia. Berbagai strategi terapi pengobatan kanker kolorektal relatif belum optimal. Oleh karena itu, terdapat suatu kebutuhan untuk mengembangkan complementary therapy pengelolaan kanker. Salah satu produk natural yang potensial untuk dikembangkan adalah propolis. Pada berbagai penelitian *in vitro*, propolis menunjukkan aktivitas proapoptosis pada berbagai jenis sel kanker.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian propolis dari Kerjo, Karanganyar, Indonesia terhadap apoptosis dan aktivitas antiproliferasi, terkait ekspresi protein *Bcl2* dan *cyclin D1* pada kultur sel kanker kolon.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan *post test with control group design*. Penelitian dilakukan pada kultur sel *WiDr* (sel kanker kolon) dengan pemberian propolis. Pengamatan ekspresi protein *cyclin D1* dan *Bcl2* dilakukan dengan metode imunositokimia, sedangkan pengamatan apoptosis dilakukan dengan *flowcytometry*. Analisis statistik signifikan bila $p < 0,05$.

Hasil Penelitian

Hasil uji sitotoksik didapatkan dosis IC_{50} hambatan proliferasi sel *WiDr* EEP 140 ug/mL dan 5Fu 500 ug/mL. Rata-rata ekspresi *Bcl2* pada kelima kelompok yaitu kontrol 83.40 ± 0.69 %, EEP 70 ug/mL 24.28 ± 1.91 %, EEP 140 ug/mL 33.77 ± 1.08 %, EEP 280 ug/mL 60.63 ± 0.40 %, 5fluorouracil 500 ug/mL 12.74 ± 2.19 %. Terdapat perbedaan bermakna ekspresi *Bcl2* antara kelompok uji dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0,001$). Rata-rata ekspresi *cyclin D1* pada kelima kelompok yaitu kontrol 83.77 ± 0.39 %, EEP 70 ug/mL 61.44 ± 0.41 %, EEP 140 ug/mL 36.67 ± 1.18 %, EEP 280 ug/mL 24.50 ± 0.38 %, 5fluorouracil 500 ug/mL 13.42 ± 1.04 %. Terdapat perbedaan bermakna ekspresi *cyclin D1* antara kelompok uji dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0,001$). Hasil rata-rata induksi apoptosis sel dengan flowcitometry pada kelima kelompok yaitu kontrol $1,55 \pm 0,05$ %, EEP 70 ug/mL $35,37 \pm 1,2$ %, EEP 140 ug/mL $21,88 \pm 0,67$ %, EEP 280 ug/mL $3,11 \pm 0,13$ % dan 5fluorouracil 500 ug/mL $43,16 \pm 0,45$ %.

Kesimpulan

Pemberian ekstrak etanol propolis mempunyai pengaruh mampu menekan ekspresi protein *Bcl2*, *cyclin D1*, dan menginduksi apoptosis pada kultur sel kanker kolon.

Kata kunci : Ekstrak Ethanol Propolis, Bcl2, cyclin D1, Sel WiDr

Haryono Yuniarto. S501202029. 2016. Effect of Propolis Extract Protein Expression Of Bcl-2, cyclin D1 and Apoptosis In Colon Cancer Cell Culture. THESIS. Supervisor I: dr. Suradi Maryono, SpPD-KHOM, FINASIM, Supervisor II: Prof. Dr. dr. Bambang Purwanto, SpPD-KGH, FINASIM. Study Program of Family Medicine, Graduate School, University of March Surakarta.

ABSTRACT

Background

Colorectal cancer is a type of malignancy at the gastroenterohepatologi which ranks second in Indonesia after hepatocellular cancer. Various therapeutic strategies for colorectal cancer treatment less favorable. Therefore, there is a need to develop complementary therapy of cancer management. One natural product with the potential to be developed is propolis. In various studies in vitro, propolis showed proapoptosis activity on various types of cancer cells.

Research purposes

This study aims to determine the effect of propolis from Kerjo, Karanganyar, Indonesia to apoptosis and anti-proliferation activities, related Bcl2 protein expression and cyclin D1 in cultured colon cancer cells.

Research methods

This study was an experimental study with post-test with control group design. The study was conducted on cell cultures *WiDr* (colon cancer cells) by administering propolis. Observation of cyclin D1 protein expression and Bcl-2 was conducted using immunocytochemistry, whereas apoptosis observations made by flowcytometry. Statistical analysis was significant when $p < 0.05$.

Research result

The test results obtained cytotoxic IC50 dose constraints *WiDr* cell proliferation EEP 140 ug / mL and 5FU 500 ug / mL. The average expression of Bcl-2 in five groups: control $83.40 \pm 0.69\%$, EEP 70 ug / mL $24.28 \pm 1.91\%$, EEP 140 ug / mL $33.77 \pm 1:08\%$, EEP 280 ug / mL $60.63 \pm 12:40\%$, 5fluorouracil 500 ug / mL $2:19 \pm 12.74\%$. Bcl2 expression significantly different between the test group than the control group ($p < 0.001$). The average expression of cyclin D1 in five groups: control $83.77 \pm 12:39\%$, EEP 70 ug / mL $61.44 \pm 12:41\%$, EEP 140 ug / mL $36.67 \pm 1:18\%$, EEP 280 ug / mL $24.50 \pm 00:38\%$, 5fluorouracil 500 ug / mL $13:42 \pm 1.04\%$ out. There is a significant difference between the expression of cyclin D1 test group than the control group ($p < 0.001$). The average yield induction of apoptosis by flowcitometry in five groups: control $1.55 \pm 0.05\%$, EEP 70 ug / mL $35.37 \pm 1.2\%$, EEP 140 ug / mL $21.88 \pm 0.67\%$, EEP 280 ug / mL of $3.11 \pm 0.13\%$ and 5fluorouracil 500 ug / mL $43.16 \pm 0.45\%$.

Conclusion

Ethanol extract of propolis has an effect capable of suppressing the expression of Bcl-2 protein, cyclin D1 and induces apoptosis in cultured colon cancer cells.

Keywords: Ethanol Propolis Extract, Bcl-2, cyclin D1, Colon Cancer Cells

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	vi
ABSTRAK	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian.....	4
1. Tujuan umum	4
2. Tujuan khusus.....	4
D. Manfaat Penelitian.....	4
1. Manfaat teoritis.....	4
2. Manfaat terapan	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. Kajian Teori.....	6
1. Kanker	6
2. Kanker kolon	8
a. Etiopatogenesis Kanker Kolon.....	9
b. Terapi Kanker Kolon.....	12
3. Sel <i>WiDr</i>	12
4. Siklus sel dan proliferasi sel.....	13
5. Apoptosis.....	16
6. Propolis.....	20
B. Penelitian yang Relevan	24
C. Kerangka Pikir.....	26
D. Hipotesis Penelitian.....	28

BAB III. METODE PENELITIAN.....	29
A. Tempat dan Waktu Penelitian	29
B. Jenis Penelitian	30
C. Subjek Penelitian	30
D. Identifikasi Variabel Penelitian.....	31
E. Definisi Operasional	31
F. Instrumen Penelitian	33
G. Alur Penelitian.....	35
H. Teknik Analisis	42
BAB IV. ANALISIS HASIL PENELITIAN	44
A. Analisis Penelitian.....	44
1. Uji sitotoksisitas dengan <i>MTT assay</i>	44
2. Pengamatan ekspresi protein <i>cyclin D1</i>	48
3. Pengamatan ekspresi protein <i>Bcl2</i>	51
4. Uji induksi apoptosis EEP pada sel WiDr dengan <i>flowcytometry</i>	55
B. Pembahasan	60
1. Berdasarkan Prinsip Ontologi	60
2. Berdasarkan Pendekatan Prinsip Epistemologi	61
3. Berdasarkan Pendekatan Prinsip Aksiologi	63
4. Nilai Kebaruan Penelitian	64
5. Keterbatasan Penelitian	64
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	63
A. Kesimpulan	65
B. Saran	65
DAFTAR PUSTAKA	66
LAMPIRAN.....	76

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Skema dasar molekuler kanker	7
Gambar 2. Siklus Sel.....	14
Gambar 3. Peran <i>cyclin dependent kinase</i> pada siklus sel	15
Gambar 4. Jalur Apoptosis.....	18
Gambar 5. Diagram jalur p53 dalam meregulasi siklus sel dan apoptosis	20
Gambar 6. Propolis Mentah	22
Gambar 7. Kerangka Pikir.....	26
Gambar 8. Kerangka Konsep	26
Gambar 9. Skema pengisian plat mikrokultur uji sitotoksitas.....	37
Gambar 10. Skema pengisian plat mikrokultur ekspresi <i>Cyclin D1</i> dan <i>Bcl2</i>	39
Gambar 11. Alur Penelitian.....	41
Gambar 12. Morfologi Sel <i>WiDr</i>	45
Gambar 13. Hasil pengecatan imunositokimia ekspresi <i>cyclin D1</i>	49
Gambar 14. Grafik hubungan EEP dengan rata-rata ekspresi <i>cyclin D1</i>	50
Gambar 15. Hasil pengecatan imunositokimia ekspresi protein <i>Bcl2</i>	52
Gambar 16. Grafik hubungan EEP dengan rata-rata ekspresi <i>Bcl2</i>	53
Gambar 17. Gambar sel <i>WiDr</i> dengan perbesaran 100 kali, untuk uji apoptosis	55
Gambar 18. Hasil <i>flowcytometry</i> sel <i>WiDr</i> setelah perlakuan.....	57

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Senyawa Kandungan Propolis.....	24
Tabel 2.	Jadwal Penelitian.....	29
Tabel 3.	Absorbansi sel <i>WiDr</i> setelah pemberian bahan uji dengan metode <i>MTT assay</i>	46
Tabel 4.	Nilai rata-rata persentase hambatan proliferasi sel <i>WiDr</i>	47
Tabel 5	Persentase ekspresi protein <i>Cyclin D1</i> pada sel <i>WiDr</i> pada kelompok perlakuan dan kontrol setelah inkubasi 24 jam.....	50
Tabel 6.	Persentase ekspresi <i>Bcl2</i> pada sel <i>WiDr</i> pada kelompok perlakuan dan kontrol setelah inkubasi 24 jam	53
Tabel 7.	Rata-rata persentase sel <i>WiDr</i> yang mengalami apoptosis.....	59

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Ethical clearance
- Lampiran 2. Sertifikat Kursus Kultur Sel
- Lampiran 3. Analisis regresi linear dengan Ms Excel untuk menentukan IC50 EEP
- Lampiran 4. Analisis statistik untuk eksoresi *cyclin D1* dan *Bcl2*
- Lampiran 5. Hasil *flowcytometry*
- Lampiran 6. Analisis statistik untuk uji apoptosis
- Lampiran 7. Dokumentasi penelitian

DAFTAR SINGKATAN

WHO	: <i>World Health Organization</i>
NFkB	: <i>Nuclear factor kappa B</i>
<i>Bcl</i>	: <i>B-cell lymphoma</i>
DNA	: <i>Deoksiribonukleat Acid</i>
RB	: <i>Retinoblastoma</i>
CDK	: <i>Cyclin dependent kinase</i>
CIN	: <i>Cromosomal Instability</i>
MIN	: <i>Microsatellite Instability</i>
MMR	: <i>Missmatch repair</i>
APC	: <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
DCC	: <i>Deleted in Colon Cancer</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothel Growth Factor</i>
EGFR	: <i>Endotheal Growth Factor Receptor</i>
COX2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
pGP	: <i>P-glikoprotein</i>
TNFR	: <i>Necrosis FactorReceptor</i>
TRADD	: <i>TNF receptor-associated death domain</i>
FADD	: <i>Fas-associated death domain</i>
DISC	: <i>Death-inducing singnalling complex</i>
PS	: <i>phosphatidylserine</i>
CAPE	: <i>Caffeic Acid Phenethyl Ester</i>
EEP	: <i>Ekstrak ethanol propolis</i>
NFAT	: <i>Nuclear factor of activated cells</i>
AP-1	: <i>Activator protein-1</i>
DCC	: <i>Deleted in Colon Cancer</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kanker sampai saat ini tercatat sebagai salah satu masalah kesehatan utama, baik di negara maju maupun negara berkembang. Kanker merupakan penyakit dengan karakteristik adanya gangguan atau kegagalan mekanisme pengaturan multiplikasi pada organisme multiseluler sehingga terjadi perubahan perilaku sel yang tidak terkontrol. Menurut *National Cancer Institute* (2009) kanker adalah suatu istilah untuk penyakit yang melibatkan pembelahan sel secara abnormal, tanpa kontrol dan dapat menyerang jaringan sekitarnya. Sel-sel yang mengalami transformasi terus-menerus berproliferasi dan menekan pertumbuhan sel normal (Abdullah., 2014; *National Cancer Institute.*, 2009).

Angka kematian disebabkan oleh kanker termasuk tinggi. Di seluruh dunia sekitar 14,1 juta kasus baru dan 8,2 juta kematian akibat kanker (Torre dkk., 2015). Data *Global action against cancer* (2005) dari WHO (*World Health Organization*) menyatakan bahwa kematian akibat kanker dapat mencapai angka 45 % dari tahun 2007 hingga 2030, yaitu sekitar 7,9 juta jiwa menjadi 11,5 juta jiwa kematian. Kanker merupakan salah satu masalah utama kesehatan di masyarakat dengan angka kejadian 4,3 per 1000 penduduk dan menjadi penyebab kematian kelima setelah stroke, tuberculosis, diabetes melitus dan trauma kepala di Indonesia (Depkes RI., 2009).

Kanker kolorektal atau dikenal dengan kanker usus besar adalah penyakit keganasan yang terjadi pada kolon, rektum, dan appendix (usus buntu). Kanker kolorektal menempati urutan kejadian kanker ketiga di seluruh dunia, dengan lebih dari 1 juta angka kejadian tiap tahunnya. Kanker kolorektal adalah salah satu kanker dengan angka kematian tertinggi di dunia (Firlay dkk., 2013; Siegel dkk., 2014). Kanker kolorektal adalah jenis

keganasan di bagian gastroenterohepatologi yang menempati urutan kedua sesudah kanker hepatoseluler di Indonesia (Kurniawati dan Tenggara, 2011).

Mortalitas yang tinggi pada pasien kanker kolorektal dipengaruhi oleh kemampuan kanker tersebut untuk metastasis ke organ yang jauh (Ottaiano dkk., 2006). Sekitar 20% dari kasus kanker kolorektal yang telah metastasis ini pada umumnya *inoperable* dan relatif tidak dapat disembuhkan dengan *5-year survival rate* sebesar 12% (Wang dan Zhang, 2014). Terdapat enam perubahan mendasar dalam fisiologi sel yang menentukan fenotif ganas suatu kanker diantaranya. Menghasilkan sendiri sinyal pertumbuhan, insensitivitas terhadap sinyal penghambat pertumbuhan, menghindari apoptosis, kemampuan replikasi tanpa batas, kemampuan angiogenesis yang berkelanjutan, kemampuan invasi dan metastasis ke jaringan lain. (Robin dan Cotran., 2007). Meskipun berbagai upaya telah dicapai pada penanganan kanker, namun masih ditemui rendahnya laju ketahanan hidup pasien. Terapi konvensional pada perawatan kanker terbatas dan sering menimbulkan efek samping yang tidak kecil ditimbulkannya. Hal ini mendasari pengembangan penelitian agen-agen lain sebagai terapi pendamping terapi standart untuk menurunkan efek samping tersebut.

Propolis adalah suatu zat yang dihasilkan oleh lebah madu, mengandung resin dan lilin lebah, bersifat lengket yang dikumpulkan dari sumber tanaman, terutama dari bunga dan pucuk daun, untuk kemudian dicampur dengan air liur lebah (Marcucci dkk., 2001; Salatino dkk., 2005; dan Nakajima dkk., 2009). Saat ini, propolis dilaporkan telah digunakan secara aman dalam pengobatan kanker di Brazil, Jepang dan beberapa negara lain sebagai terapi suportif yang menyertai terapi standar (Paulino dkk., 2009). Propolis telah dibuktikan mempunyai berbagai aktivitas biologis seperti antibakteri, antijamur, antivirus, anestetik lokal, antiinflamasi, antioksidan, hepatoprotektor, imunostimulator, serta berperan pada proses penyembuhan luka (Paulino dkk., 2009; Vatansever dkk., 2010; Kubina dkk., 2015).

Propolis terdiri dari campuran resin, serbuk sari dan lilin tanaman yang dikumpulkan lebah dari berbagai jenis tanaman dan digunakan untuk proteksi

sarang lebah dari mikroba (Ananda dkk., 2013 ; Watanabe dkk., 2011). Propolis mengandung berbagai senyawa kimiawi, seperti *polyphenol* (flavonoids, asam fenolat dan esternya, aldehid fenolat, alkohol dan keton), terpenoid, steroid, asam amino dan berbagai komponen in organik (Kartal dkk., 2003). Komposisi senyawa kimiawi dan aktivitas biologi propolis bervariasi tergantung lokasi geografi, asal tanaman, musim dan spesies lebah (Paulino dkk., 2009 dan Syamsudin dkk., 2009).

Salah satu hal yang menjanjikan dari propolis, yaitu terkait dengan aktivitas antikanker yang dimilikinya. Peran propolis di dalam terapi keganasan terkait dengan kemampuannya dalam aktivitas antiproliferasi dan menginduksi apoptosis. Pada berbagai penelitian *in vitro* propolis menunjukkan aktivitas anti kanker pada berbagai jenis sel kanker, meliputi : kanker laring, kanker paru, kanker pankreas, kanker thyroid, kanker kolorektal, kanker payudara, kanker prostat dan glioma (Kubina dkk., 2015).

Mekanisme apoptosis terjadi melalui dua jalur utama, jalur ekstrinsik dan intrinsik. Apoptosis jalur intrinsik diregulasi oleh sekelompok protein. Protein *Bcl2* adalah protein yang bersifat anti apoptosis, bekerja di dalam mitokondria, dikode oleh gen *Bcl2*, berperan pada fase inisiasi apoptosis pada jalur intrinsik. Penurunan aktivitas *Bcl2* akan menyebabkan peningkatan apoptosis dan sebaliknya. Apoptosis merupakan mekanisme untuk mengontrol proliferasi sel (Ghobrial dkk., 2005). Proliferasi sel bergantung pada kelangsungan siklus sel. Cyclin *D1* adalah protein regulator cyclin D kinase, berperan sentral pada siklus sel. Cyclin D1 akan berikatan dengan *cyclin D kinase*, kompleks *cyclin D-CDK* ini akan memfosforilasi protein *retinoblastoma* (pRB) yang mengkode protein-protein untuk kelangsungan dari siklus sel. Cyclin *D1* aktif bila berikatan dengan CDk. Hal ini menunjukkan bahwa *cyclin D1* merupakan *starter* dari siklus sel (Alison, 2001).

Berdasarkan fakta-fakta yang diuraikan di atas, mendorong peneliti untuk mengetahui pengaruh pemberian propolis yang berasal dari Kerjo, Karanganyar, Indonesia terhadap aktivitas anti kanker, terkait dengan

ekspresi protein *Cyclin D1* dan *Bcl2* serta apoptosis pada kultur sel *WiDr* (*cell line* kanker kolorektal). Penelitian ini sebagai upaya penemuan dan pengembangan strategi baru dalam menangani kanker, khususnya kanker kolorektal dengan memanfaatkan kekayaan hayati lokal.

B. Rumusan Masalah

1. Adakah pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap ekspresi protein *cyclin D1* pada kultur sel *WiDr*.
2. Adakah pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap ekspresi protein *Bcl2* pada kultur sel *WiDr*.
3. Adakah pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap apoptosis pada kultur sel *WiDr*.

C. Tujuan Penelitian :

1. Tujuan umum :

Membuktikan dan mengetahui pengaruh pemberian ekstrak ethanol propolis pada ekspresi protein *cyclin D1*, ekspresi protein *Bcl2* dan apoptosis pada kultur sel *WiDr*.

2. Tujuan khusus :

- a. Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak ethanol propolis terhadap ekspresi protein *cyclin D1* pada kultur sel *WiDr*.
- b. Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak ethanol propolis dalam menekan ekspresi protein *Bcl2* pada kultur sel *WiDr*.
- c. Menganalisis pengaruh pemberian ekstrak ethanol propolis dalam apoptosis pada kultur sel *WiDr*.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoritis

Memberikan informasi dan masukan dalam ilmu pengetahuan tentang aktivitas antikanker propolis pada sel *WiDr* dan informasi

ilmiah mengenai mekanisme aktivitas propolis sebagai antikanker pada sel *WiDr*.

2. Manfaat Terapan

Penelitian ini diharapkan sebagai dasar penelitian lebih lanjut dalam pengembangan kajian ilmiah khasiat dan manfaat penggunaan propolis sebagai strategi terapi *complementary* untuk kanker padat, khususnya pada kanker kolon.

BAB 2

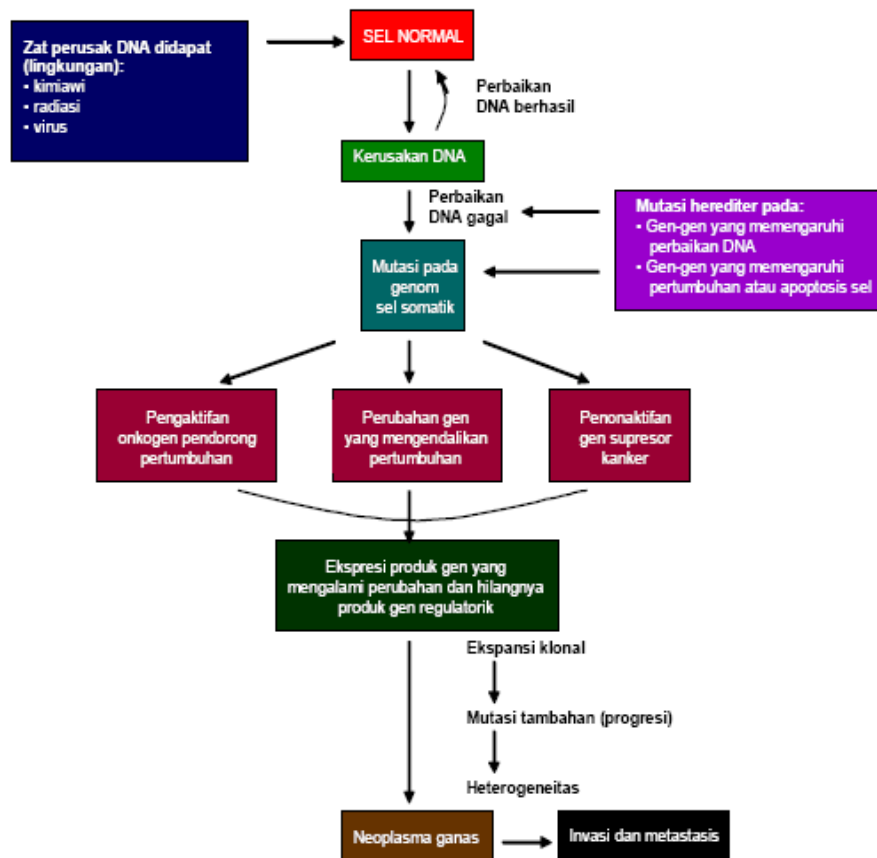
TINJAUAN PUSTAKA

A. Kajian Teori

1. Kanker

Kanker adalah pertumbuhan sel tidak beraturan yang muncul dari satu sel. Kanker merupakan pertumbuhan jaringan secara otonom dan tidak mengikuti aturan dan regulasi sel yang tumbuh normal. Tumor adalah istilah umum yang menunjukkan massa dari pertumbuhan jaringan abnormal. *National Cancer Institute* (2009) mendefinisikan kanker adalah istilah suatu penyakit yang melibatkan pembelahan sel secara abnormal, tanpa kontrol dan dapat menyerang jaringan sekitarnya. Dasar dari karsinogenesis yaitu adanya kerusakan genetik nonlethal pada sel. Kerusakan genetik ini dapat disebabkan oleh pengaruh lingkungan atau herediter (Kumar, 2005).

Pada tahun 2000, kanker telah didiagnosis pada sepuluh juta orang dan menyebabkan kematian sekitar 6,2 juta di seluruh dunia, terjadi peningkatan sekitar 22% sejak tahun 1990. Kanker menjadi penyebab kematian 10% dari morbiditas total di seluruh dunia dan berada pada urutan kedua setelah penyakit kardiovaskular dan menjadi penyebab utama kematian di negara-negara maju. Meskipun kanker dianggap sebagai masalah di negara-negara maju, sekitar dua pertiga dari semua kanker terjadi ditiga perempat penduduk dunia yang hidup di negara-negara yang sedang berkembang. Di seluruh dunia, terdapat sekitar 22 juta orang penderita kanker. Jumlah kasus kanker di seluruh dunia diprediksi akan mengalami peningkatan 5 juta hingga 15 juta kasus baru setiap tahun pada tahun 2020 (WHO, 2003). Hal ini berhubungan dengan bertambahnya masa hidup penduduk, kemajuan ilmu kedokteran dalam mengobati penyakit tidak menular lain, dan juga gaya hidup tidak sehat.



Gambar 1. Skema dasar molekuler kanker (Kumar, 2005)

Seperti yang dipahami sebelumnya bahwa terjadinya mutasi pada gen penyebab kanker ditentukan oleh peran gen-gen yang terkait dalam proses perbaikan DNA yang dimiliki sel. Jika gen-gen yang secara normal berfungsi mendeteksi dan memperbaiki kerusakan DNA ini terganggu, maka dapat mengakibatkan terjadinya instabilitas genome dan akhirnya cenderung memudahkan terjadinya keganasan. Mutasi pada gen-gen yang mengendalikan sifat-sifat tersebut ditemukan pada semua kanker (Kumar, 2005).

Sejalan dengan hal tersebut, abnormalitas sel kanker umumnya terjadi karena adanya mutasi pada gen-gen yang mengkode protein yang berperan mengatur pembelahan sel. Gen-gen yang mengalami malfungsi dan terlibat dengan kanker ini diklasifikasikan ke dalam 3 kelompok. Pertama, *proto-onkogen* yaitu gen yang mengkode protein yang secara normal memicu pembelahan sel dan

menghambat kematian sel yang terprogram (apoptosis). Mutasi pada gen-gen ini disebut sebagai *onkogen*. Kelompok kedua adalah *tumor suppressor genes* yang mengkode protein yang secara normal menghambat pembelahan sel dan memicu apoptosis. Kelompok ketiga merupakan gen-gen yang berperan pada proses DNA *repair* yang akan meminimalisasi mutasi-mutasi yang bisa berakibat sebagai kanker (*Cell Biology and Cancer*, 2008).

Perlindungan utama dalam perkembangan kanker pada manusia, diperantarai oleh dua jalur utama yang melibatkan protein retinoblastoma (RB) dan protein p53. Kedua jalur tersebut lebih sering berada dalam kondisi terinaktivasi pada sel kanker. Jalur RB melibatkan protein *cyclin D 1*, CDK4, p16 dan RB. Jalur ini merupakan faktor penting dalam transisi fase G1/S pada siklus sel. Jalur kedua adalah protein p53 yang merupakan protein penekan tumor. Protein ini berfungsi sebagai pertahanan alami terhadap kanker (Pelengaris dan Khan, 2006). Protein p53 bekerja dengan cara menghentikan siklus sel untuk memperbaiki kerusakan DNA dan akan menginduksi proses apoptosis jika perbaikan DNA yang rusak tersebut mengalami kegagalan (Mc.Donald dan Pilgram, 1999). Mutasi pada gen yang mengkode p53 merupakan mutasi penyebab kanker yang tersering pada manusia (Sherr, 1996).

2. Kanker Kolon

Kanker kolon atau kanker usus besar adalah suatu bentuk keganasan yang terdapat pada saluran pencernaan bawah (kolon, rectum, dan appendix), bagian sistem pencernaan atau yang disebut juga traktus gastrointestinal, lebih jelasnya kolon berada di bagian proksimal usus besar dan rektum di bagian distal sekitar 5-7 cm di atas anus. Kolon dan rektum mempunyai fungsi untuk menghasilkan energi bagi tubuh dan membuang zat-zat yang tidak berguna (Pezzoli, 2007).

Kanker ini berasal dari sel glandula yang terdapat di lapisan dinding kolon dan rektum. Kanker kolon dilihat dari frekuensinya menempati urutan nomor 3 dan merupakan penyebab kematian nomor 5 yang diakibatkan oleh kanker di dunia. Berdasarkan estimasi *World Health Organization* (WHO), setiap

tahun terjadi sekitar 945.000 kasus baru kanker kolon dengan kematian sebesar 492.000 (*World Cancer Report*, 2003).

Kanker kolon terjadi lebih sering pada negara maju dibandingkan dengan negara berkembang. Di negara maju, kanker kolon adalah penyebab tersering kedua dari seluruh tumor dengan insiden pada semua usia sebesar 5% (Russo, 2004), kejadiannya relatif tinggi pada negara dengan tingkat konsumsi daging tinggi seperti Kanada dan Australia sedangkan negara-negara di Mediterania lebih rendah kejadiannya karena tingkat konsumsi buah, sayuran, dan ikan tinggi (Nkondjk, 2003).

Berdasarkan survei WHO, di USA, kanker kolon merupakan penyebab kematian akibat kanker kedua terbanyak. Pada tahun 2002 ditemukan 139.534 orang dewasa yang didiagnosa menderita kanker usus besar, sebanyak 56.603 diantaranya meninggal dunia (Seeff, 2006). Survival di seluruh dunia sangat bervariasi tergantung dari fasilitas dan obat-obatan yang tersedia. Ketahanan hidup sampai 5 tahun (*5 years survival rates*) di USA lebih dari 60% dan kurang dari 40% di negara berkembang (Jemal, 2004). Begitu juga insiden di negara-negara asia yang kecenderungannya juga meningkat. Insiden paling tinggi di Jepang dan Korea dibandingkan negara-negara asia lainnya (Leung, 2006). Di Indonesia, menurut data dari rumah sakit kanker Dharmais, pada tahun 2010 karsinoma kolorektal tetap masuk dalam 10 besar kanker tersering.

a. Etiopatogenesis Kanker Kolon

Secara umum kanker selalu dihubungkan dengan bahan-bahan kimia, bahan-bahan radioaktif, dan virus. Kanker usus besar umumnya terjadi dihubungkan dengan faktor genetik dan lingkungan serta dihubungkan juga dengan faktor predisposisi diet rendah serat, kenaikan berat badan, dan *intake* alkohol (Dorundi, 2006).

Kanker kolon timbul melalui interaksi yang kompleks antara faktor genetik dan faktor lingkungan. Kanker kolon sporadik muncul setelah melewati rentang masa yang lebih panjang sebagai akibat faktor lingkungan yang menimbulkan berbagai perubahan genetik. Kedua jenis kanker kolorektal (herediter dan

sporadik) tidak muncul secara mendadak melainkan melalui proses yang diidentifikasi pada mukosa kolon (seperti displasia, adenoma). Kanker kolon terjadi sebagai akibat dari kerusakan genetik pada lokus yang mengontrol pertumbuhan sel. Perubahan dari kolonosit normal menjadi jaringan adenomatosa dan akhirnya karsinoma kolon menimbulkan sejumlah mutasi yang mempercepat pertumbuhan sel. Terdapat 2 mekanisme yang menimbulkan instabilitas genom dan berujung pada kanker kolorektal yaitu : instabilitas kromosom (*Chromosomal Instability* atau CIN) dan instabilitas mikrosatelit (*Microsatellite Instability* atau MIN). Umumnya sel kanker kolon melalui mekanisme CIN yang melibatkan penyebaran materi genetik yang tak berimbang sehingga timbulnya aneuploidi. Instabilitas mikrosatelit (MIN) disebabkan oleh hilangnya perbaikan ketidakcocokan atau *missmatch repair* (MMR).

Proses terjadinya kanker kolon pada awalnya melibatkan mutasi somatik terjadi pada gen *Adenomatous Polyposis Coli* (APC). Gen APC mengatur kematian sel dan mutasi pada gen ini menyebabkan pengobatan proliferasi yang selanjutnya berkembang menjadi adenoma. Mutasi pada onkogen K-RAS yang biasanya terjadi pada adenoma kolon yang berukuran besar akan menyebabkan gangguan pertumbuhan sel yang tidak normal.

Transisi dari adenoma menjadi karsinoma merupakan akibat dari mutasi gen supresor tumor p53. Dalam keadaan normal protein dari gen p53 akan menghambat proliferasi sel yang mengalami kerusakan DNA, mutasi gen p53 menyebabkan sel dengan kerusakan DNA tetap dapat melakukan replikasi yang menghasilkan sel-sel dengan kerusakan DNA yang lebih parah. Replikasi sel-sel dengan kehilangan sejumlah segmen pada kromosom yang berisi beberapa alele (misal *loss of heterizyosity*), hal ini dapat menyebabkan kehilangan gen supresor tumor yang lain seperti DCC (*Deleted in Colon Cancer*) yang merupakan transformasi akhir menuju keganasan.

Pada kebanyakan kasus, kanker kolon berkembang perlahan-lahan selama beberapa tahun. Sebeum menjadi kanker, perkembangan dimulai dari polip nonkarsinomatous yang selanjutnya berubah menjadi kanker. Polip merupakan jaringan yang tumbuh pada kolon atau rektum. Beberapa jenis polip disebut polip

adenomatous atau adenoma yang paling sering menjadi kanker. Terdapat jenis lain dari polip yang disebut polip hiperplastik atau polip inflamasi. Polip inflamasi bukan prekanker. Demikian pula polip hiperplastik. Namun apabila polip hiperplastik tumbuh pada kolon asenden atau sisi sebelah kanan maka dapat terjadi kanker. Hal lain yang menjadi prekanker adalah displasia, yang biasanya terdapat pada penderita kolitis ulserativa di mana terjadi inflamasi yang terus-menerus pada kolon. Begitu sebuah kanker terbentuk dari polip, maka akan tumbuh dari mukosa dinding kolon atau rektum, kemudian menembus dinding dan sel kanker akan tumbuh menyebar melalui aliran darah dan limfe yang akan menyebar ke seluruh tubuh yang disebut metastase (Winawer, 1996).

Vogelstein dkk. mengemukakan model genetik dari proses karsinogenesis kolorektal yang umumnya mulai dari penampilan point mutation K-ras dan kehilangan *allele* berturut-turut pada kromosom 5q (pada kasus kelainan APC), 18 q (DCC), dan 17 p (p53). Beberapa kelainan gen yang sekuensial menunjukkan peran yang penting dalam perkembangan kanker kolon (Kazama, 2002).

Gen yang berimplikasi pada perkembangan kanker kolon dapat dibagi menjadi dua kategori atas dasar fungsi mereka. Jalur tersebut yaitu jalur replikasi gen (K-ras, APC, dan DCC) dan gen yang berperan dalam mempertahankan keutuhan struktur DNA selama replikasi (hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, dan p53). APC dan mutasi gen berguna untuk skrining familial adenomatous poliposis dan kanker herediter nonpoliposis. Kehilangan *allele* pada kromosom 18q dan mutasi pada p53 telah dihubungkan dengan prognosis yang buruk. Reaksi berantai polimerase dapat mendeteksi titik mutasi ras onkogenik pada sampel feses pasien. Prosedur ini belum berguna pada pemeriksaan klinis namun menunjukkan kemaknaan molekular yang tinggi. Pada eksperimen invitro terlihat perkembangan neoplasia dapat ditekan dengan introduksi (transfeksi) gen fungsional p53 dan hMLH1 ke dalam sel kanker kolon yang berpotensi untuk diterapkan sebagai modus gen terapi dikemudian hari (Yamada, 2001).

b. Terapi Kanker Kolon

Terapi dasar kanker kolon adalah operasi, yaitu eksisi total. Sebagian besar pasien kanker kolon masih memerlukan terapi adjuvan. Terapi adjuvan radiokemoterapi ini merupakan standar untuk pasien dengan stage II dan III kanker kolorektal. Neoadjuvan radiokemoterapi dicadangkan untuk kanker kolorektal yang sudah lanjut (Adam, 2004). *The National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* memperkenalkan 2 rejimen kemoterapi baru yaitu oxaliplatin plus 5-FU infus serta leukovorin dan oxaliplatin plus capecitabine sebagai terapi adjuvan kanker kolon. Selain itu ada regimen targeting terapi yang bisa dibunakan sebagai terapi standart kanker yaitu Bevacizumab adalah suatu monoklonal anti-VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) antibodi, dan cetuximab suatu monoklonal anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) antibodi (NCCN, 2015).

Terapi kemoterapi didasarkan pada kerusakan DNA sehingga menyebabkan kematian sel baik melalui apoptosis maupun nekrosis (Hakem dan Harrington, 2005). Selain itu, terapi dengan kemoterapi belum memberikan hasil yang optimal dan sering menimbulkan efek samping yang serius karena pada umumnya tidak bekerja spesifik pada sel kanker tetapi juga pada sel normal (Goldie, 2001).

3. Sel WiDr

Sel WiDr merupakan 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 (Chen dkk, 1987). Sel *WiDr* memproduksi antigen karsinoembrionik dan memerlukan rentang waktu sekitar 15 jam untuk dapat menyelesaikan satu daur sel. *WiDr* merupakan salah satu sel yang memiliki sensitivitas yang rendah terhadap perlakuan dengan *5-fluorouracil* (5-FU), agen kemoterapi golongan antimetabolit. Transfeksi *WiDr* dengan p53 normal pun tidak menyebabkan peningkatan sensitivitasnya terhadap 5-FU (Giovannetti dkk, 2007). Resistensi sel *WiDr* terhadap 5-FU salah satunya diperantarai dengan terjadinya peningkatan ekspresi enzim *timidilat sintetase* yang merupakan target penghambatan utama dari 5-FU (Sigmond dkk, 2003). P-glikoprotein (Pgp) pada sel *WiDr* tidak diekspresikan tinggi sehingga kemungkinan terdapat mekanisme

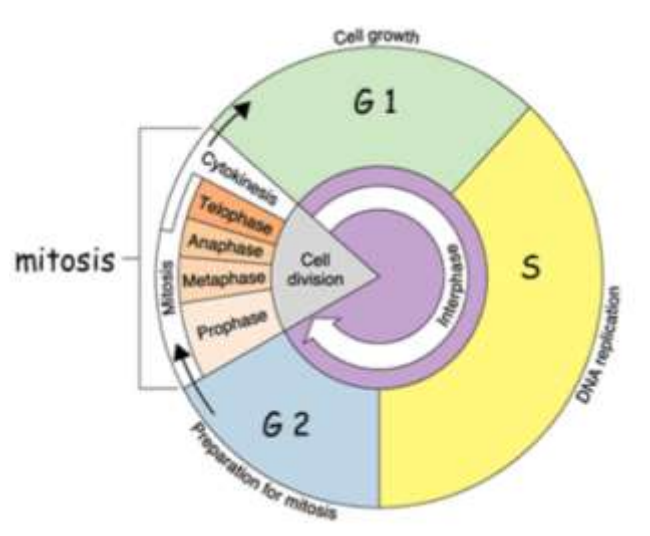
lain yang memperantarai resistensi *WiDr* terhadap 5-FU (Jansen, 1997). Secara keseluruhan sel *WiDr* merupakan sel yang sesuai untuk digunakan sebagai model dalam skrining suatu senyawa baru sebagai agen kemoterapi dengan 5-FU.

4. Siklus Sel dan Proliferasi Sel

Fibrosis Sel memperbanyak diri melalui suatu peristiwa berurutan yang terdiri dari proses duplikasi kromosom dan dilanjutkan dengan proses pembelahan sel. Suatu siklus yang terdiri dari duplikasi dan pembelahan sel ini dikenal dengan siklus sel (Alberts dkk., 2008). 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 dkk., 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 dkk, 2008).

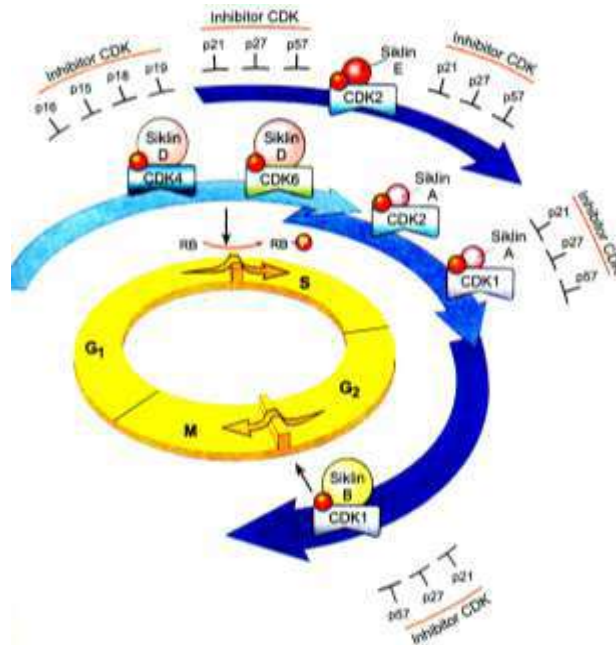


Gambar 2. Siklus Sel (Alberts dkk., 2008)

Supaya siklus sel berjalan secara benar dan terkendali maka terdapat dua macam mekanisme kontrol siklus sel yang menyertainya. Mekanisme kontrol 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 dkk., 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 dkk, 1997).

Menurut Kumar dkk. (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). Untuk memberikan gambaran peran cyclin dependent kinase pada siklus sel dapat dilihat pada gambar di bawah.



Gambar 3. Peran cyclin dependent kinase pada siklus sel
(Robin & Cotran, 2007)

Berhentinya siklus sel dapat terjadi karena adanya CDK inhibitor (CKI), diantaranya famili INK4. Protein INK4 khususnya p16 akan berkompetisi dengan *cyclin D* untuk berikatan dengan CDK sehingga akan mencegah fosforilasi pRB. Jalur Rb-*cyclin D*-CDK-p16 merupakan jalur utama yang mengontrol pertumbuhan sel. Di samping itu, faktor transkripsi p53 juga dapat berperan dalam berhentinya siklus sel. Peningkatan ekspresi p53 dipicu oleh berbagai stres seluler yangselanjutnya akan menginduksi ekspresi p21 yang merupakan inaktivator yang kuat terhadap kompleks *cyclin*-CDK (Alison, 2001).

Sel normal tumbuh secara seimbang dengan pengendalian antara sinyal pertumbuhan dan sinyal yang menimbulkan kematian. Secara umum jumlah sel yang ada pada suatu jaringan merupakan fungsi kumulatif antara masuknya sel baru dan keluarnya sel yang ada pada populasi. Masuknya sel baru ditentukan oleh kecepatan proliferasinya, sedangkan yang keluar karena kematian sel atau berdiferensiasi menjadi jenis sel lain. Oleh karena itu, meningkatnya jumlah sel

dapat dikarenakan peningkatan proliferasi atau karena penurunan kematian atau diferensiasi sel. Proliferasi sel dapat dirangsang oleh faktor pertumbuhan intrinsik, jejas, kematian sel, atau bahkan oleh deformasi mekanisme jaringan (Kakizoe, T., 2003). Pusat proses kompleks proliferasi sel ialah pengendalian terhadap proses yang melibatkan siklus sel. Siklus sel melibatkan sejumlah kejadian yang menghasilkan duplikasi dan pembelahan sel. Proses tersebut sangat terkontrol dalam sel normal, namun pada sel tumor adanya mutasi pada gen yang berhubungan dengan siklus sel akan menghasilkan bertambahnya sel dengan kerusakan DNA pada siklus sel (Chang L.C, 2001). Proliferasi siklus sel pada kondisi normal melalui tahapan : faktor pertumbuhan terikat pada reseptor spesifik membran sel, aktivasi reseptor faktor pertumbuhan yang bersifat sementara dan terbatas, kemudian akan mengaktivasi beberapa protein transduksi sinyal pada bagian membran plasma, transmisi sinyal transduksi melintasi sitosol menuju inti *second messenger*, induksi dan aktivasi faktor pengendali pada inti yang menginisiasi transkripsi DNA dan sel kemudian memasuki siklus sel, menghasilkan pembelahan sel (Budiyastomo, 2010).

Proliferasi sel yang tinggi dan bersifat tidak terkendali terjadi karena adanya gangguan keseimbangan faktor protoonkogen dan gen penekan tumor sehingga terjadi peningkatan produksi *growth factors* dan jumlah reseptor permukaan sel yang dapat memacu transduksi sinyal *intercelluler* untuk meningkatkan produksi faktor transkripsi. Kerusakan DNA menyebabkan berhentinya siklus sel pada fase G₁ dan selanjutnya akan terjadi proses perbaikan, jika kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki maka sel tersebut akan mengalami apoptosis.

5. Apoptosis

Kematian sel dapat terjadi minimal melalui dua mekanisme, yaitu nekrosis maupun apoptosis. Nekrosis merupakan proses kematian sel patologis yang terjadi secara pasif, katabolik dan umumnya merupakan respon terhadap faktor-faktor toksik eksternal, seperti inflamasi, iskemia maupun *toxic injury*. Nekrosis ditandai dengan adanya pembengkakan mitokondria, ruptur membran plasma, pemisahan kromatin dan destruksi struktur sel yang semula utuh (Wu dkk., 2001). Menurut

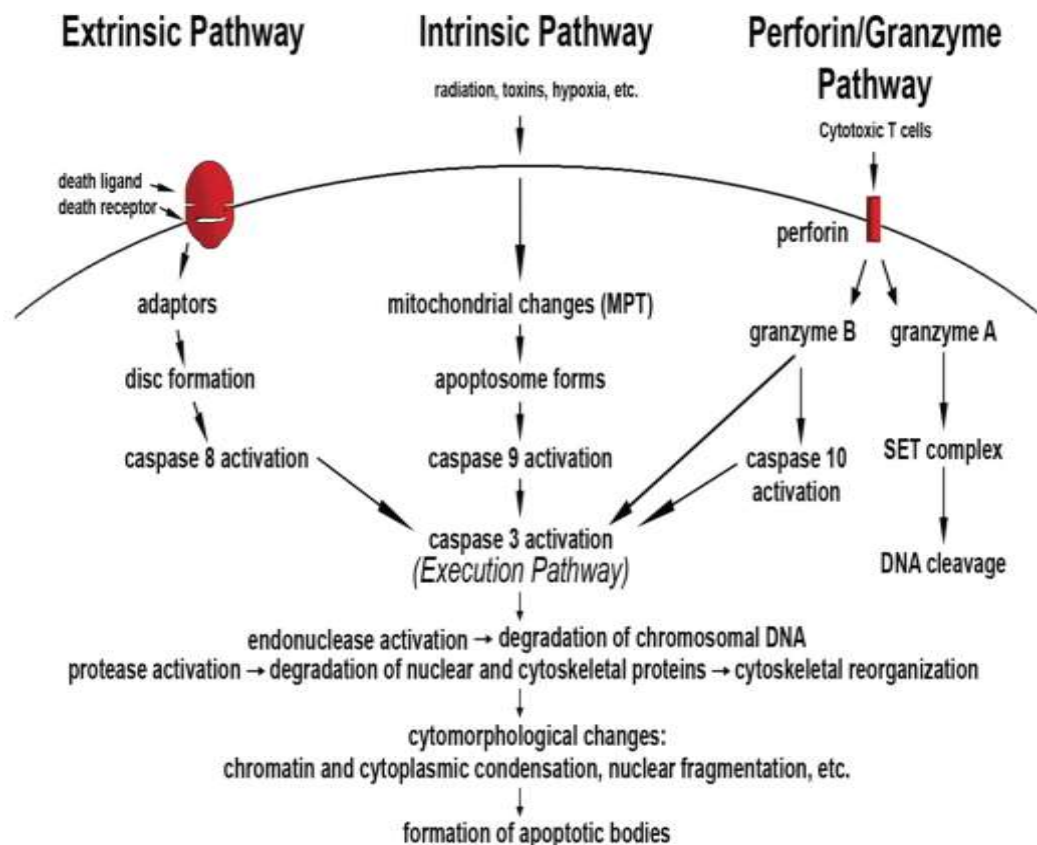
Kumar dkk (2005), pada proses nekrosis terjadi pelepasan komponen sitoplasma sehingga mencetuskan respon inflamasi.

Berbeda dengan nekrosis, apoptosis merupakan mekanisme kematian sel yang terprogram dan terjadi secara aktif, metabolik serta dikode secara genetik. Apoptosis ditandai dengan adanya *membran blebbing*, kondensasi kromatin, dan aktivasi proses endonukleotik yang menyebabkan fragmentasi DNA sehingga sel mengecil dan terbentuk *apoptotic bodies* (Wu dkk., 2001). Pollard dan Earnshaw (2008) menyatakan bahwa di jaringan, *apoptotic bodies* ini akan difagositosis oleh sel-sel di sekelilingnya yang mengenali *phosphatidylserine* dan penanda lain yang terdapat di permukaannya. Proses eliminasi sel-sel yang mengalami apoptosis ini tanpa disertai kebocoran komponen sitoplasma ke dalam celah interseluler sehingga meminimalisasi inflamasi, mencegah kerusakan sel-sel yang berdekatan dan secara efisien mendegradasi DNA (Wu dkk., 2001).

Apoptosis terjadi selama perkembangan yang normal dari organisme multiseluler. Kombinasi dari apoptosis dan proliferasi sel bertanggung jawab pada proses pembentukan jaringan dan organ pada embrio yang sedang berkembang (Dash, 2003). Apoptosis merupakan mekanisme untuk mengontrol proliferasi sel sebagai bagian dari proses perkembangan yang normal dan juga akan mengakibatkan kematian sel jika terdapat kerusakan DNA yang tidak dapat diperbaiki (Ghobrial dkk., 2005).

Mekanisme apoptosis terjadi melalui dua jalur utama. Pertama, jalur ekstrinsik atau jalur sitoplasma yang dipicu oleh ikatan antara *Fas death receptor* dengan *Fas ligan (FasL)* maupun ikatan antara *Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 (TNFR1)* dengan ligannya yaitu TNF. *Death receptor* ini memiliki *death domain* intraseluler yang akan merekrut protein-protein adaptor seperti TNF *receptor-associated death domain (TRADD)* dan *Fas-associated death domain (FADD)* sehingga akan terbentuk kompleks antara ligan-reseptor-protein adaptor yang dikenal dengan *death-inducing signalling complex (DISC)*. Selanjutnya DISC akan mengaktivasi *pro-caspase 8* menjadi *caspase 8* yang merupakan *caspase* inisiator. *Caspase 8* ini akan menginisiasi proses apoptosis dengan memecah *caspase* esksekutor yang berada di bawahnya (Wong, 2011).

Jalur kedua adalah jalur intrinsik atau jalur mitokondria. Jalur ini dipicu oleh adanya stimulus internal seperti kerusakan genetik yang tidak dapat diperbaiki, hipoksia, konsentrasi Ca^{2+} di sitosol yang sangat tinggi dan stres oksidatif yang berat. Stimulus internal ini akan meningkatkan permeabilitas mitokondria dan menyebabkan pengeluaran molekul-molekul pro-apoptosis seperti *cytochrome-c* ke dalam sitoplasma. Pengeluaran *cytochrome-c* ini akan memicu pembentukan suatu kompleks yang dikenal sebagai apoptosom yang merupakan gabungan dari *cytochrome-c*, *Apaf-1* dan *caspase 9* (Wong, 2011). Pembentukan apoptosom ini selanjutnya akan mengaktifasi *caspase 3* dan menginduksi terjadinya apoptosis (Dash, 2003). Gambar 4 menunjukkan apoptosis jalur ekstrinsik dan intrinsik beserta komponen-komponen yang terlibat di dalamnya.

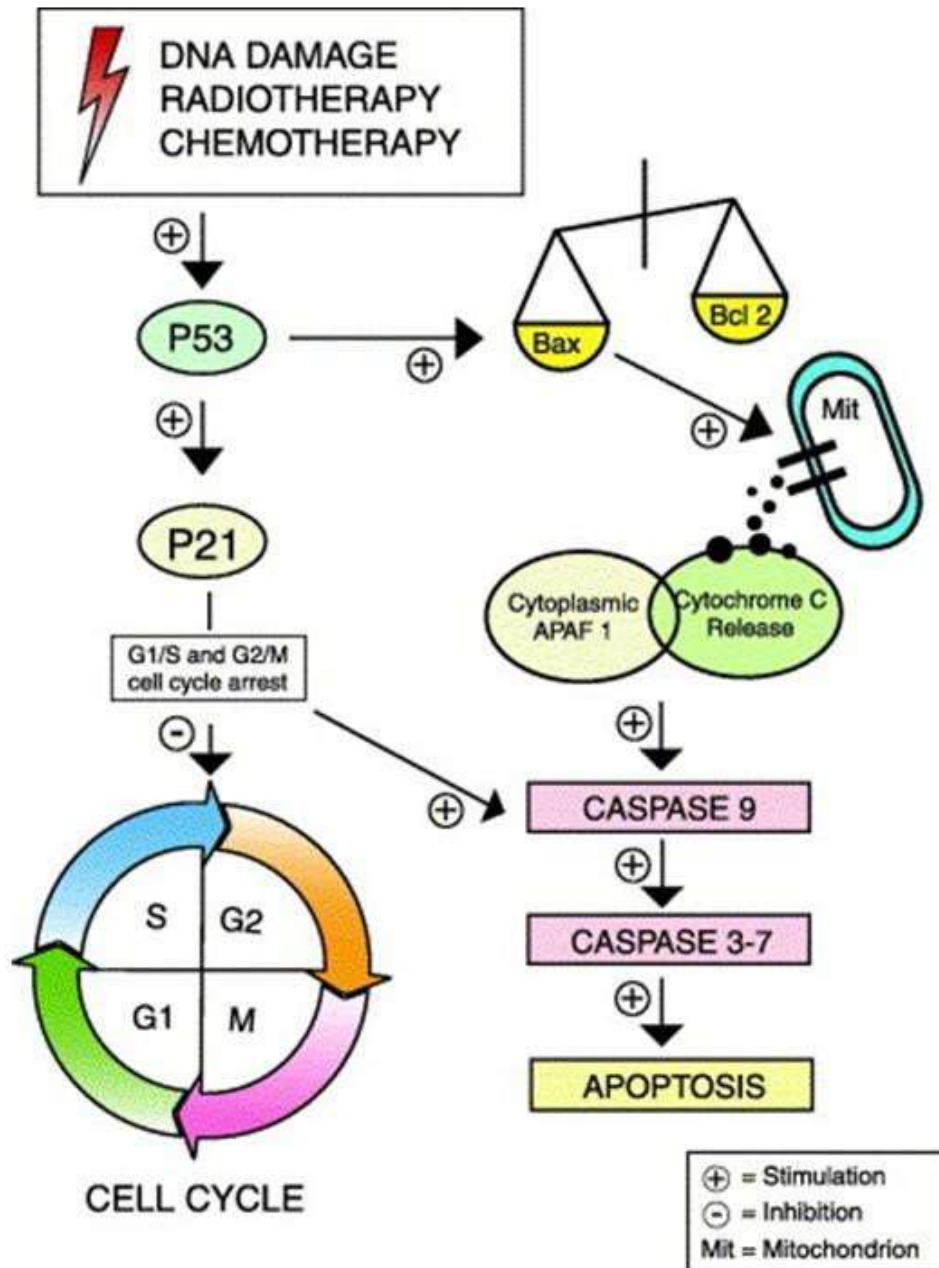


Gambar 4. Jalur Apoptosis (Elmore, 2007)

Apoptosis jalur intrinsik diregulasi oleh sekelompok protein. Terdapat dua kelompok utama, yaitu kelompok protein pro-apoptosis seperti Bax, Bak, Bad,

Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, dan Hrk. Kelompok kedua merupakan kelompok protein anti-apoptosis seperti Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bfl-1 dan Mcl-1 (Wong, 2011). Sensitivitas sel terhadap stimulus apoptosis tergantung pada keseimbangan antara protein pro-apoptosis dan anti-apoptosis. Adanya peningkatan protein pro-apoptosis mengakibatkan sel lebih sensitif terhadap apoptosis. Peningkatan protein ini pada permukaan mitokondria akan memicu terbentuknya *Permeability Transition pore* (PT pore) yang diikuti dengan pengeluaran *cytochrome-c*, sedangkan peningkatan protein anti-apoptosis mengakibatkan sel resisten terhadap apoptosis (Dash, 2003). Di samping itu, apoptosis jalur ekstrinsik maupun intrinsik diregulasi oleh beberapa komponen, seperti protein p53, NFκB, sistem *ubiquitin* proteosom dan jalur PI3K (Ghobrial dkk., 2005).

Protein p53 merupakan tumor *suppressor* protein yang dikode oleh *tumor suppressor gene* TP53 yang berlokasi pada lengan pendek kromosom 17 (17p13.1) (Wong, 2011). Protein p53 berfungsi sebagai faktor transkripsi gen-gen yang berperan penting pada penghentian siklus sel, perbaikan DNA dan apoptosis (Ghobrial dkk, 2005). Setelah kerusakan DNA, p53 akan mempertahankan sel pada *checkpoints* sampai kerusakan DNA dapat diperbaiki dan jika kerusakan DNA tersebut *irreversibel* maka p53 akan menginduksi proses apoptosis. Hilangnya fungsi p53 pada beberapa kanker menyebabkan terjadinya instabilitas genomik, kegagalan regulasi siklus sel dan hambatan apoptosis (Ghobrial dkk., 2005). Hal ini sejalan dengan penelitian Wong (2011) yang mengemukakan bahwa kelainan pada *p53* terkait dengan lebih dari 50 % kanker yang diderita manusia.



Gambar 5. Peran *p53* pada siklus sel dan apoptosis (Gillham dkk, 2007)

Berkurangnya proses apoptosis maupun resistensi sel terhadap apoptosis berperan penting pada proses karsinogenesis. Hal ini bisa terjadi melalui beberapa mekanisme, yaitu gangguan keseimbangan antara protein pro-apoptosis dan anti-apoptosis, penurunan fungsi *caspase* dan kegagalan proses *death receptor signalling* (Wong, 2011).

6. Propolis

Propolis adalah suatu zat yang dihasilkan oleh lebah madu, mengandung resin dan lilin lebah, bersifat lengket yang dikumpulkan dari sumber tanaman, terutama dari bunga dan pucuk daun, untuk kemudian dicampur dengan air liur lebah (Marcucci dkk, 2001, Salatino dkk, 2005, Nakajima dkk., 2009). Asal tanaman penghasil propolis belum dapat diketahui semuanya, yang saat ini diketahui adalah berasal dari getah resin tanaman kelompok pinus dan akasia. Propolis digunakan untuk menutup sel-sel atau ruang heksagonal pada sarang lebah. Biasanya, propolis menutup celah kecil berukuran 4-6 mm, sedangkan celah yang lebih besar diisi oleh lilin lebah. Dahulu peternak lebah di Amerika Serikat menganggap propolis sebagai bahan pengganggu, sebab melekat di tangan, pakaian, dan sepatu ketika cuaca panas, serta berubah keras dan berkerak ketika dingin (Salatino dkk, 2005).

Propolis mempunyai nama lain lem lebah (*bee glue*), hal ini karena bentuknya seperti lem yang digunakan oleh lebah merekat dan memperkuat sarang dan merekat pintu-pintu lubang angin yang tidak diperlukan pada rumah lebah. Propolis merupakan bagian dari sebuah mekanisme pertahanan hidup lebah madu. Hal ini diperlukan oleh lebah karena lebah memerlukan tinggal di dalam sarang dengan suhu yang stabil lebih kurang 32-33 C. Fungsi propolis yang sangat vital terhadap koloni lebah adalah merupakan disinfektan alamiah untuk mencegah timbulnya berbagai penyakit (Dimov, 1992).

Propolis bersifat lembut, elastis dan sangat lengket pada suhu 25-45C. Propolis semakin lengket seperti karet pada atas suhu 45C. Propolis akan mencair pada suhu 60 -100 C (Krell, 1996).

Penelitian farmakologi propolis mencakup efek propolis sebagai antinyeri, antialergi, antibiotik, antijamur, antiinflamasi, antiradiasi, antioksidan dan pengawet, antiseptik, antikanker dan imunostimulator (menstimulasi daya tahan tubuh) (Ang ESM dkk, 2001).

Lebah menghasilkan beberapa produk seperti madu, royal jeli, polen dan propolis. Propolis adalah produk alami berasal dari resin tanaman yang dikumpulkan oleh lebah madu. Propolis digunakan lebah dalam pembuatan,

pemeliharaan, perlindungan dan mensterilkan sarang lebah (Marcucci dkk, 2001). Komposisi propolis sangat kompleks. Unsur utamanya adalah lilin lebah, resin dan senyawa volatil (Pereira dkk, 2009). Beberapa penelitian melaporkan bahwa komposisi propolis dipengaruhi oleh banyak faktor, seperti sumber bunga (jenis tanaman) untuk madu, musim dan faktor-faktor lingkungan (seperti jenis tanah dan iklim, faktor genetik, dan metode pengolahan) (Baltrusaityte V dkk, 2007).



Gambar 6. Propolis Mentah

Propolis terdiri dari resin (50%), wax (30%), *essential oils* (10%), pollen (5%), dan komponen organik (5%) (Gomez dkk., 2006). Resin mengandung flavonoid, fenol, dan berbagai bentuk asam (Borelli dkk., 2002). Salah satu ikatan fenol yang ada dalam propolis yaitu *Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE)* (Viuda dkk, 2008). CAPE merupakan sisi aktif flavonoid yang bekerja untuk memaksimalkan aktivitas *scavenger* terhadap radikal bebas, dengan cara menurunkan aktivitas radikal hidroksil (OH) sehingga tidak terlalu reaktif lagi (Cadenas and Packer, 2002).

Hasil penelitian menunjukkan perbedaan ketinggian wilayah tidak mempengaruhi kandungan CAPE. Perbedaan jenis tanaman lebih berpengaruh pada kandungan CAPE. Propolis wilayah Kerjo, Karanganyar memiliki

kandungan CAPE lebih tinggi dibandingkan wilayah Sragen dan Wonogiri. Hal ini kemungkinan lebih dipengaruhi oleh jenis tanaman yang berbeda. Propolis Karanganyar berasal dari tanaman sekitar berupa durian, matoa, serta rambutan. Wilayah Wonogiri, jenis tanaman utamanya adalah pinus dan randu. Wilayah Sragen berupa pohon karet (Sarsono dkk, 2012). Hasil ini dimungkinkan karena faktor-faktor biologik, zona geografis dan lingkungan dapat mempengaruhi jumlah dan kualitas produksi propolis (Pereira dkk, 2009).

Propolis digunakan oleh lebah dalam pembuatan, pemeliharaan, perlindungan dan mensterilkan sarang lebah (Marcucci dkk, 2001). Lebih dari 200 komponen propolis telah diidentifikasi. Senyawa yang terkandung dalam propolis, secara garis besar dikelompokkan menjadi (i) flavonoid (flavonol, flavon, flavanon, dan dihidroflavonol), (ii) turunan cinnamic acid, dan (iii) terpenoid. Turunan cinnamic acid (ferulic acid, p-coumaric acid dan caffeic acid, termasuk *Caffeic Acid Phenethyl Ester* (CAPE) (Sivasubramaniam L & Seshadri M, 2005; Lotfy M, 2006).

Komponen utama dari propolis adalah flavonoid dan asam fenolat, termasuk *caffeic acid phenylethylester* (CAPE) yang kandungannya mencapai 50 % dari seluruh komposisi (Santos dkk, 2005). Flavonoid terdapat hampir di semua spesies bunga. Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang terbesar. Golongan flavonoid mencakup banyak pigmen yang paling umum dan terdapat pada seluruh dunia tumbuhan. Jenis flavonoid yang terpenting dalam propolis adalah pinocembrin dan galangin. Kandungan kimia flavonoid dalam propolis sedikit berbeda dengan flavonoid dari bunga karena adanya suatu proses yang dilakukan oleh lebah. Kandungan flavonoid dalam propolis bervariasi sekitar 10 - 20 %. Kandungan tersebut merupakan yang terbanyak dibandingkan kandungan flavonoid dalam produk lebah lain (Marcucci, 1994). Galangin adalah flavonol yang umum ditemukan dalam propolis.

Tabel 1. Senyawa utama dari propolis

Kelas komponen	Grup komponen
Resin (45-55 %)	Flavonoid (<i>flavonoles, flavon, flavonones, dihydroflavonoles, dan chalcones</i>), asam fenolik dan esternya
Lilin dan asam lemak (25-53 %)	Kebanyakan berasal dari lilin lebah, tetapi beberapa diantaranya berasal dari tanaman.
Minyak esensial (10 %)	Mudah menguap, senyawa Volatine
Serbuk sari (5 %)	Banyak mengandung asam amino, terutama argini dan prolin
Senyawa organik & mineral lainnya (5 %)	Pada umumnya Fe dan Zn, mineral lainnya adalah Au, Ag, Cs, Hg, La, Sb. Keton, Lakton, Quinon, Steroid, asam benzoic & ester, Vitamin B ₃ , gula

Penggunaan propolis sebagai terapi penyakit baik penunjang maupun standart dimungkinkan karena propolis memiliki sejumlah aktivitas biologis antara lain antimikrobal, antifungal, antiprotozoa, antiparasit, antiinflamasi, anti-oksidan, dan imunomodulator (Orsi dkk, 2000; Raso dkk, 2001; Borelli dkk., 2002; Koo dkk, 2002; Ahn dkk, 2004; Lotfy, 2006; Nakajima dkk, 2009; Mot dkk, 2009; El-Bassuony & Abouzid, 2010; Zaeemzadeh dkk, 2011).

B. Penelitian yang Relevan

Berbagai penelitian *in vitro* propolis menunjukkan aktivitas anti kanker pada berbagai jenis sel kanker, meliputi : kanker laring, kanker paru, kanker pankreas, kanker thyroid, kanker kolorektal, kanker payudara, kanker prostat dan glioma (Kubina dkk., 2015). Komponen polyphenolic diketahui mempunyai aktivitas antikanker pada tikus model tumor (Orsolich dkk., 2005), dan juga caffeic acid, CAPE, quercetin dapat menghambat pertumbuhan sel kanker (Galati dkk., 2000).

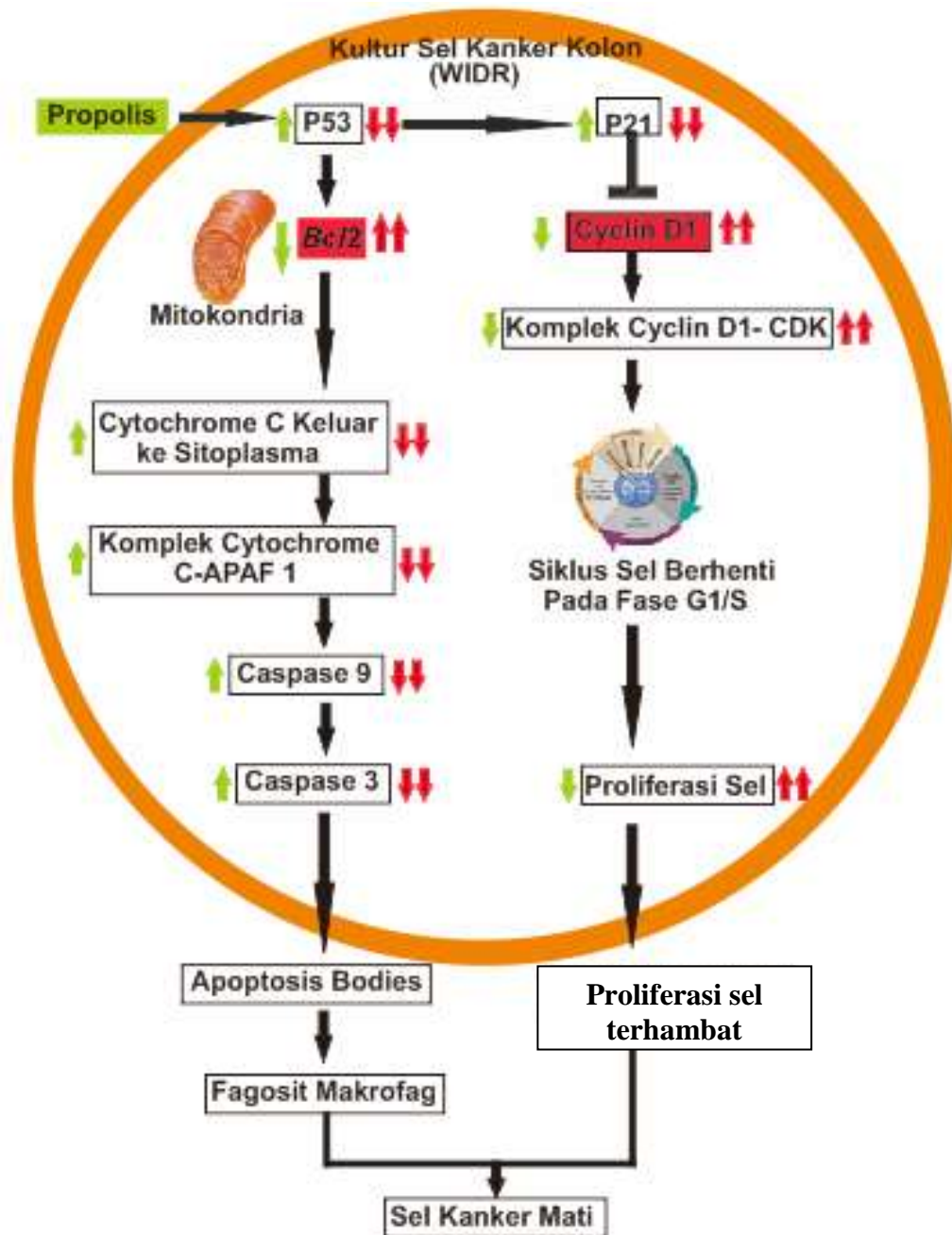
Komponen polyphenolic diketahui mempunyai aktivitas antikanker pada tikus model tumor (Orsolich dkk., 2005) dan juga caffeic acid, CAPE, quercetin dapat menghambat pertumbuhan sel kanker (Galati dkk., 2000). Penelitian Ishihara dkk., memberikan informasi yang lengkap mengenai efek anti proliferasi ekstrak etanol propolis yang berasal dari Cina dan Brazil pada *cell line* kanker kolorektal dimana ekstrak etanol propolis menghambat pertumbuhan dari cell line kanker kolorektal.

Mekanisme apoptosis terjadi melalui dua jalur utama, jalur ekstrinsik dan intrinsik. Apoptosis jalur intrinsik diregulasi oleh sekelompok protein. Terdapat dua kelompok utama, yaitu kelompok protein pro-apoptosis seperti Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, dan Hrk. Kelompok kedua merupakan kelompok protein anti-apoptosis seperti Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bfl-1 dan Mcl-1 (Wong, 2011). Protein *Bcl2* adalah protein yang bersifat anti apoptosis, bekerja di dalam mitokondria, dikode oleh gen *Bcl2*, berperan pada fase inisiasi apoptosis pada jalur intrinsik. Penurunan aktivitas *Bcl2* akan menyebabkan peningkatan apoptosis dan sebaliknya (Ghobrial dkk., 2005). Motomura dkk., (2008) melaporkan bahwa ekstrak methanol propolis mampu meningkatkan apoptosis *cell line* U-937 (sel kanker leukemia) melalui aktivasi *caspase-3* dan penekanan *Bcl-2*. Propolis diketahui dapat menginduksi aktivitas protein lain yang terlibat dalam proses pro-apoptosis, seperti *Bax*, dan mengurangi ekspresi *Bcl-2* yang merupakan inhibitor apoptosis. (Diana dkk., 2012 dan Kubina dkk., 2015).

Proliferasi sel bergantung juga pada kelangsungan siklus sel. *Cyclin D1* adalah protein regulator *cyclin D kinase*, berperan sentral pada siklus sel. *Cyclin D1* akan berikatan dengan *cyclin D kinase*, kompleks *cyclin D-CDK* ini akan memfosforilasi protein retinoblastoma (pRB) yang mengkode protein-protein untuk kelangsungan dari siklus sel. *Cyclin D* aktif bila berikatan dengan CDk. Hal ini menunjukkan bahwa *cyclin D* merupakan *starter* dari siklus sel (Alison, 2001). Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa propolis dapat menghambat proliferasi sel atau menginduksi apoptosis dengan menekan kompleks *cyclin* dan protein yang terkait dengan *cyclin*, meningkatkan kadar *cyclin-dependent kinase* (Cdk) inhibitor seperti p16, p21 dan p27 protein dan aktivasi Bax, p53 dan p21 protein, p38MAPK, JNK dan kinase ERK, melepaskan sitokrom C ke dalam

sitosol dan aktivasi kaskade caspase pada sel tumor. (Amini-Sarteshnizi N dkk., 2015).

C. Kerangka Pikir



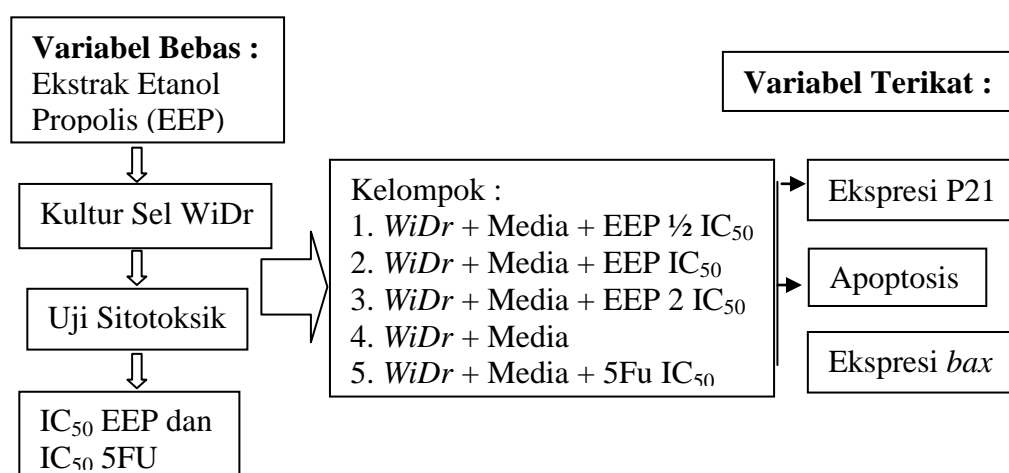
Gambar 7. Kerangka Pikir

Sel kanker berkembang dikarenakan adanya proliferasi sel yang tinggi dan bersifat tidak terkendali terjadi karena adanya gangguan keseimbangan faktor protoonkogen dan gen penekan tumor sehingga terjadi peningkatan produksi *growth factors* dan jumlah reseptor permukaan sel yang dapat memacu transduksi sinyal *intercelluler* untuk meningkatkan produksi faktor transkripsi. Kerusakan DNA menyebabkan berhentinya siklus sel pada fase G₁ dan selanjutnya akan terjadi proses perbaikan, jika kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki maka sel tersebut akan mengalami apoptosis. Proliferasi dihubungkan dengan kelangsungan siklus sel. 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*. Menurut Kumar dkk. (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* terutama *cyclin D1* memiliki peran sentral karena ekspresinya diregulasi oleh faktor pertumbuhan dan kompleks *cyclin D-CDK* ini akan memfosforilasi protein retinoblastoma (pRB).

Apoptosis merupakan mekanisme untuk mengontrol proliferasi sel sebagai bagian dari proses perkembangan yang normal dan juga akan mengakibatkan kematian sel jika terdapat kerusakan DNA yang tidak dapat diperbaiki (Ghobrial dkk., 2005). Apoptosis melalui dua jalur utama, jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik. Jalur intrinsik diregulasi oleh sekelompok protein yang termasuk ke dalam famili protein *B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)*. Terdapat dua kelompok utama dari protein Bcl-2. Pertama, yaitu kelompok protein pro-apoptosis seperti *Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim*, dan *Hrk*. Kelompok kedua merupakan kelompok protein anti-apoptosis seperti *Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bfl-1* dan *Mcl-1* (Wong, 2011). Sensitivitas sel terhadap stimulus apoptosis tergantung pada keseimbangan antara protein pro-apoptosis dan anti-apoptosis. Penelitian sebelumnya propolis mencakup efek propolis sebagai antinyeri (anestetik), anti-alergi, antibiotik, antijamur, anti inflamasi, antiradiasi, antioksidan dan pengawet, antiseptik, antikanker dan imunostimulator (menstimulasi daya tahan tubuh) (Ang ESM dkk, 2001).

Pada sel kanker juga terjadi proliferasi sel yang berlebihan. Apoptosis merupakan mekanisme untuk mengontrol proliferasi sel sebagai bagian dari proses perkembangan yang normal. Namun, pada sel kanker terjadi ketidakseimbangan antara protein proapoptosis (*Bax*) dan antiapoptosis (*Bcl2*) dimana kadar *Bcl2* lebih tinggi sehingga proses apoptosis terhambat. Penelitian ini dengan pemberian ekstrak etanol propolis pada sel kanker dalam hal ini ca colon (*WiDr*), diharapkan dapat menekan ekspresi protein *Bcl2* sehingga diharapkan dapat menginduksi apoptosis. Selain itu dengan pemberian ekstrak etanol propolis pada sel kanker diharapkan dapat menekan ekspresi *cyclin D1* sehingga siklus sel terhambat dan proliferasi sel kanker juga terhambat. Adanya induksi apoptosis dan penghambatan proliferasi maka sel kanker akan mati.

D. Kerangka Konsep



Gambar 8. Kerangka Konsep

E. Hipotesis Penelitian

1. Ada pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap ekspresi protein *cyclin D1* pada kultur sel *WiDr*.
2. Ada pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap ekspresi protein *Bcl2* pada kultur sel *WiDr*.
3. Ada pengaruh pemberian ekstrak propolis terhadap apoptosis pada kultur sel *WiDr*.

BAB III METODE PENELITIAN

A. Tempat dan waktu penelitian

Tempat penelitian:

1. Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM untuk uji sitotoksik penetapan IC₅₀ EEP dan pengecatan imunositokimia.
2. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UNS untuk pengamatan ekspresi protein *Cyclin D1* dan *Bcl2*.
3. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran UNS untuk uji induksi apoptosis dengan *flowcytometry*.

Waktu yang diperlukan dalam penelitian ini selama 5 bulan dengan jadwal penelitian sebagai berikut:

Tabel 2. Jadwal penelitian

Jenis Kegiatan	Bulan ke-				
	1	2	3	4	5
1) Persiapan : memesan bahan-bahan, mengumpulkan kepustakaan, diskusi, membuat log book					
2) Pelaksanaan Penelitian: Uji sitotoksisitas, Induksi apoptosis dengan flowcytometry, pembuatan dan interpretasi imunohistokimia dan analisis data					
3) Penyusunan Laporan Penelitian					

B. Jenis Penelitian

Penelitian ini bersifat penelitian *experimental post test with control group design*. Penelitian dilakukan pada kultur sel *WiDr* (sel kanker kolon) dengan

perlakuan pemberian dosis ekstrak propolis dengan kontrol positif (5 FU) dan kontrol negatif (tanpa obat).

Pengamatan ekspresi protein *cyclin D1* dan *Bcl2* dilakukan dengan metode imunositokimia, sedangkan pengamatan induksi apoptosis dilakukan dengan *flowcytometry* menggunakan pewarnaan *annexin V* dan *propidium iodida* (PI).

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah sel kanker kolon (*Cell Line WiDr*) yang berasal dari sel kanker kolon yang diambil dari seorang penderita kanker kolon, diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada yang dipesan langsung melalui *American Type Culture Collection* (ATCC).

Penelitian ini menggunakan 24 well kultur sel *WiDr* pada medium RPMI 1640, masing-masing well berisi 2×10^5 sel/200 μ l. 3 well pengulangan pada perlakuan dengan ekstrak propolis atau 5 Fluorouracil, pada konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC 50, IC 50, 2 IC 50. Penelitian ini setiap kelompok dibuat *triplicate*.

D. Identifikasi Variabel

Klasifikasi variabel diukur menurut tujuan penelitian dan digolongkan dalam beberapa variabel sebagai berikut:

1. Variabel bebas:

Variabel bebas yaitu : ekstrak etanol propolis

2. Variabel tergantung:

Variabel tergantung yang akan diteliti, yaitu :

- a. Ekspresi protein *cyclin D1*
- b. Ekspresi protein *Bcl2*.
- c. Apoptosis sel.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak Etanol Propolis (EEP)

Ekstrak Etanol Propolis (EEP) adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari propolis menggunakan pelarut /

cairan penyari etanol 80 % (Depkes, 2000). Propolis lebah pada penelitian ini diperoleh dari peternak lebah di Daerah Kecamatan Kerjo, Kabupaten Karanganyar, Surakarta, Jawa Tengah. Dosis EEP yang digunakan pada penelitian ini adalah $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀, 2IC₅₀ dengan satuan ukur ug/ml, skala nominal.

2. Ekspresi Protein *Cyclin D1*

Protein *cyclin D1* adalah protein regulator *cyclin-dependent kinase* D yang berperan sentral pada perkembangan siklus sel. Ekspresi protein *cyclin D1* ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel dan sitoplasma dengan bantuan mikroskop cahaya. Hal ini berdasarkan penelitian De Falcodkk, pada tahun 2004 yang menyatakan bahwa ekspresi *cyclin D1* bisa dijumpai pada inti dan sitoplasma sel yang sedang aktif membelah. Warna biru pada inti selmaupun sitoplasma menunjukkan tidak adanya ekspresi *cyclin D1* pada sel atau level ekspresi yang rendah sehingga tidak terdeteksi. Penilaian ekspresi *cyclin D1* dengan metode *Immunostaining Quantitation* (Dougherty dkk., 2011). Ekspresi *cyclin D1* dinilai sebagai persentase dari keseluruhan sel pada 5 lapangan pandang dan penilaiannya dilakukan pada 3 slide dari tiap-tiap kelompok perlakuan. Satuan ukur % dengan skala rasio.

3. Ekspresi protein *Bcl2*

Protein *Bcl2* adalah salah satu protein anti apoptosis yang dikode oleh gen *Bcl2*. Penekanan protein anti apoptosis mengakibatkan sel lebih sensitif terhadap apoptosis. Penekanan ekspresi protein *Bcl2* diamati dengan menggunakan metode imunositokimia. Ekspresi protein *Bcl2* ditunjukkan dengan warna coklat pada membran luar mitokondria atau sitosol dengan bantuan mikroskop cahaya. Warna biru pada membran luar mitokondria atau sitosol menunjukkan tidak adanya ekspresi *Bcl2* pada sel atau level ekspresi yang rendah sehingga tidak terdeteksi. Penilaian ekspresi *Bcl2* dengan metode *Immunostaining Quantitation* (Dougherty dkk., 2011). Ekspresi *Bcl2* dinilai sebagai persentase dari keseluruhan sel pada 5 lapangan pandang dan penilaiannya dilakukan pada 3 slide.

Peningkatan ekspresi protein *Bcl2* diketahui dengan membandingkan persentase sel yang mengekspresikan protein *Bcl2* pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol positif maupun negatif. Satuan ukur % dengan skala rasio.

4. Induksi Apoptosis sel

Apoptosis merupakan mekanisme kematian sel yang terprogram dan terjadi secara aktif, metabolik serta dikode secara genetik. Apoptosis ditandai dengan adanya *membran blebbing*, kondensasi kromatin, dan aktivasi proses endonukleotik yang menyebabkan fragmentasi DNA sehingga sel mengecil dan terbentuk *apoptotic bodies* (Wu dkk., 2001).

Induksi apoptosis diamati dengan metode *flowcytometry*, menggunakan pewarnaan *annexin V* dan propidium iodida, untuk melihat distribusi sel yang hidup, mengalami apoptosis dan juga nekrosis. Induksi apoptosis diketahui dengan membandingkan persentase sel yang mengalami apoptosis pada kelompok perlakuan dengan bahan uji dan kelompok kontrol. Satuan ukur % dengan skala rasio.

F. Instrumen Penelitian

1. Bahan Penelitian :

- a. Propolis lebah pada penelitian ini diperoleh dari peternak lebah di Daerah Kecamatan Kerjo, Kabupaten Karanganyar, Surakarta, Jawa Tengah.

Tehnik pembuatan ekstrak etanol propolis :

Ekstraksi dilakukan dengan metode perkolasi dengan alat perkolator. Sekitar 1 gr (akurasi penimbangan sampai 0,0001 gr) bubuk propolis mentah diekstraksi dengan 10 mL cairan penyari etanol 80 %. Bubuk propolis diletakkan di tengah bejana silinder yang bagian bawahnya diberi sekat berpori kemudian etanol 80 % dialirkan dari atas ke bawah melalui bubuk propolis tersebut. Etanol 80 % akan melarutkan zat aktif sel-sel yang dilalui sampai keadaan jenuh. Selanjutnya setelah proses tersebut dihasilkan perkolat yang nantinya akan dipekatkan dengan alat

evaporator. Perkolat yang sudah kental dibuat hingga 25 mL dengan etanol 80 % dan disimpan dalam botol sampai analisis (Fu dkk, 2005).

- b. Sel kanker kolon (sel *WiDr*) diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM.
 - c. Bahan perbandingan yang digunakan adalah senyawa obat 5 FU (5-fluorourasil).
 - d. Kultur Sel : serbuk media RPMI 1640 (Gibco ®), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% (Gibco ®), AmEoterisin B (Gibco ®), Penisilin + Streptomisin (Penstrep; Gibco ®), Tripsin EDTA 0,25% (Gibco ®), kertas saring 0,2 µm (Whatman ®), 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-ethane sulphonic acid (HEPES) (Sigma-Aldrich ®), Natrium bikarbonat (Nacalai Tesque), *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Invitrogen ®).
 - e. Bahan untuk uji aktivitas sitotoksik (untuk menetapkan IC₅₀ EEP) : medium komplet (media RPMI 1640 + Penstrep 2% + AmEoterisin 0,5% + PBS 10%), pereaksi *yellow* MTT ((3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromida) (Bio Basic Inc.®), Sodium Dodesil Sulfat (SDS) (Merck®), Asam Klorida (Merck ®).
 - f. Bahan untuk pengamatan penekanan *cyclin D1* dan *Bcl2* : sampel sel, medium komplet (media DMEM + Penstrep 2% + Amfoterisin 0,5 % + PBS 10 %), metanol, PBS, aquadest, larutan Hidrogen Peroksida (H₂O₂), Antibodi primer (anti *Bcl2* dan anti-*cyclin D1*) (Biocare ®), Antibodi sekunder, streptavidin (HRP), DAB, H₂O, larutan Mayer Hematoxilin, etanol absolut, xylol, etelen.
 - g. Bahan untuk uji apoptosis dengan *flowcytometry*: *Phosphat Buffer Saline* (PBS) 1x (Invitrogen ®), Media komplet (media RPMI 1640 + Penstrep 2% + AmEoterisin 0,5% + FBS 10%), *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS) (Merck ®), Tripsin-EDTA 0,25% (Gibco ®), Annexin V Fluos (Roche ®).
- 2. Alat Penelitian.**
- a. Uji aktivitas sitotoksik (untuk menetapkan nilai IC₅₀ EEP) : tangki nitrogen cair (BioCane™ 47), Penangas air, Inkubator CO₂ (Heraeus HERAcCell),

lemari *laminar air flow* (Lobconco Purifier Class II Biosafety Cabinet), lemari es pendingin (National NR-B22AF Deodorizer), plat mikrokultur 24 sumuran (SPL®), *Beaker glass* 1 L (Pyrex®), *screw-capped conical tube* (Becton-Dickinson®), botol kaca steril 250 ml (Schott-Duran®), Mikropipet 10, 20, 200, 1000 µL (Gilson®), *inverted microscope* (Olympus CKX41 dan Carl Zeiss Axiovert 25C), hemositometer (Assistant Germany), gelas objek (Sail Brand®), penyampur (Thermolyne Maxi Mix II), mikroskop cahaya (Nikon YS100), *Cover slip* (NUNC®), tip kuning, putih dan biru.

- b. Uji imunositokimia untuk pengamatan *cyclin D1* dan *Bcl2* : botol kaca steril 250 ml (Schott-Duran®), *Beaker glass* 1 L (Pyrex®), Mikropipet 20, 200, 1000 µL (Gilson®), Vortex, *Cover slip*(NUNC®), gelas objek (*Sail Brand*®), plat mikrokultur 24 sumuran (SPL®), Inkubator CO₂ (Heraeus HERA cell), lemari *laminar air flow* (Lobconco Purifier Class II Biosafety Cabinet), lemari es pendingin (National NR-B22AF Deodorizer), penyampur (Thermolyne Maxi Mix II), mikroskop cahaya (Nikon YS100), tip kuning, putih dan biru.
- c. Uji induksi apoptosis dengan *flowcytometry*: *plate* 6 sumuran (SPL®), Mikropipet 10, 20, 200, 1000 µL (Gilson®), Tabung sentrifugasi 1,5 mL (Eppendorf®), Rak tabung kecil, Sentrifugator (Eppendorf Centrifuge 5415D), Inkubator CO₂ (Heraceus HERA cell), Penangas air, FACS-Calibur (Becton-Dickinson®), Penyampur (Thermolyne Maxi Mix II).

G. Alur Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan dengan melewati tahapan sebagai berikut :

1. Pembuatan media RPMI 1640

Serbuk media RPMI 1640 dilarutkan dalam aquabides 800 ml dalam *becker glass*, ditambah dengan natrium bikarbonat 2 gr dan HEPES 2 gr, ditambahkan akuabides sampai 1L, diaduk dengan *magnetic stirrer*. Larutan dibuat dengan pH antara 7,2-7,4 dengan menambahkan 1 M NaOH atau 1 M HCL. Larutan dimasukkan ke dalam botol tertutup dan

steril dengan disaring menggunakan filter 0,2 μm dalam *laminary airflow*. Medium diberi label dan disimpan dalam lemari es suhu 4°C. Untuk membuat media RPMI 1640-serum, disiapkan sebanyak 100 mL media RPMI 1640 ditambah dengan FBS 10%, antibiotika pinisilin-streptomisin 3% dan fungison 1%.

2. Pengaktifan sel *WiDr*

Sel diambil dari tangki nitrogen cair, lalu dicairkan dalam *waterbath* pada suhu 37°C sampai mencair, kemudian disemprot alkohol 80%. Selanjutnya, sel dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi yang berisi 10 mL medium RPMI-serum, dalam ruang *laminar airflow* dan disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, endapan yang terbentuk ditambah dengan RPMI 1640-serum. Selanjutnya didiamkan selama 20 menit, setelah itu sel disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan disisakan 1 mL untuk dilakukan resuspensi. Suspensi sel dimasukkan dalam TCF dengan media penumbuh yang mengandung FBS 20% dan sel diamati menggunakan *inverted microscope*. TCF yang berisi sel diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C dengan tutup yang dilonggarkan.

3. Pembiakan sel *WiDr*

Sel diamati setiap hari dengan *inverted microscope* dan media penumbuh diganti setiap hari. Apabila pertumbuhan sel telah berwarna kuning dan sel telah memenuhi TCF, maka sel didistribusikan ke dalam beberapa TCF. Prosedur ini dilakukan di dalam *laminar airflow*, media lama dibuang dan sel yang melekat disemprot pelan-pelan dengan media yang baru. Suspensi sel yang didapat dimasukkan ke dalam beberapa TCF kemudian disimpan dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C dengan tutup TCF dilonggarkan.

4. Panen sel *WiDr*

Setelah jumlah sel cukup, sel dilepaskan dari dinding TCF kemudian medium diganti dengan medium RPMI baru. Dengan bantuan pipet pasteur, media disemprotkan berulang-ulang sampai sel lepas. Selain itu dilakukan

tripsinisasi, yaitu menambahkan tripsin 0,05 % untuk membantu melepaskan sel. Sel yang telah lepas dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan dilakukan penambahan RPMI 1640 kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan medium 1 mL untuk resuspensi sel. Selanjutnya suspensi sel dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ suhu 37°C.

Kerapatan sel dihitung dengan mengambil suspensi sel sebanyak 20 µL, kemudian sel dihitung dengan bantuan hemositometer pada mikroskop fase kontras. Jumlah sel total diperoleh dengan mengalikan faktor pengenceran dengan bilangan 10⁴/mL (Frenshey, 2000). Uji sitotoksik untuk tiap sumuran memerlukan 2x10⁴ /100 µL media RPMI atau 2x10⁵ /mL (Ghadek, 2002), sedangkan untuk uji penekanan ekspresi *cyclin* D1, aktivasi p53 dan induksi apoptosis memerlukan 2 x 10⁵ tiap sumuran (Luo dkk., 2012).

5. Preparasi bahan uji

Uji sitotoksitas dibuat lima seri konsentrasi EEP yaitu 12,5 ug/mL, 25 ug/mL, 50 ug/mL, 100 ug/mL, dan 200 ug/mL, berdasarkan seri konsentrasi yang digunakan dalam penelitian Syamsudin., dkk pada tahun 2009. Pertama, dibuat EEP dengan konsentrasi tertinggi. Proses selanjutnya, EEP konsentrasi 12,5 ug/mL, 25 ug/mL, 50 ug/mL, 100 ug/mL, dan 200 ug/mL diperoleh melalui pengenceran bertingkat dengan media RPMI. Keenam konsentrasi tersebut, digunakan dalam uji sitotoksitas dengan *MTT assay* untuk penetapan IC₅₀ EEP. Proses selanjutnya konsentrasi EEP yang digunakan dalam penelitian ini sebesar setengah IC₅₀, IC₅₀ dan dua kali IC₅₀. Proses selanjutnya juga dibuat lima seri konsentrasi 5 Fu yaitu 12,5 ug/mL, 25 ug/mL, 50 ug/mL, 100 ug/mL, dan 200 ug/mL. Kelima seri konsentrasi tersebut digunakan dalam uji sitotoksitas dengan *MTT assay* untuk penetapan IC₅₀ 5Fu yang akan digunakan sebagai kontrol positif,

6. Uji aktivitas sitotoksik untuk menetapkan IC₅₀ EEP dengan *MTT assay*

Uji sitotoksitas dilakukan dengan menggunakan plat mikrokultur 96 sumuran. Skema pengisian mikrokultur dapat dilihat pada Gambar 9.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EEP	EEP	EEP	5Fu	5Fu	5Fu						
B	EEP	EEP	EEP	5Fu	5Fu	5Fu						
C	EEP	EEP	EEP	5Fu	5Fu	5Fu						
D	EEP	EEP	EEP	5Fu	5Fu	5Fu						
E	EEP	EEP	EEP	5Fu	5Fu	5Fu						
F	KS	KS	KS	KS	KS	KS						
G	KM	KM	KM	KM	KM	KM						

Gambar 9. Skema pengisian plat mikrokultur uji sitotoksisitas untuk penetapan IC_{50} . Ekstrak Etanol Propolis (EEP) dan 5-Fluorourasil (5FU) direplikasi tiga kali. Konsentrasi tertinggi bahan uji (EEP/5FU) berada pada baris A, sedangkan konsentrasi terendah berada pada baris E. Baris F untuk Kontrol Sel (KS), baris G untuk Kontrol Media (KM).

Keterangan :

EEP : Sel *WiDr* + media + EEP

5FU : Sel *WiDr* + media + 5FU

KS : Sel *WiDr* + media

KM : Media

Sumuran pada plat mikrokultur masing-masing diisi suspensi sel *WiDr*, kecuali pada jalur G (1-6) yang hanya diisi media RPMI 1640. Sel kemudian diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO_2 pada suhu $37^{\circ}C$. Setelah inkubasi, media setiap sumuran dibuang, lalu diganti dengan media baru yang mengandung FBS 10% dan selanjutnya diberi perlakuan sesuai dengan skema pada Gambar 8. Mikrokultur tersebut kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam dalam inkubator CO_2 pada suhu $37^{\circ}C$.

Setelah itu, media dibuang, lalu setiap sumuran ditambah dengan 100 μL media baru dan 10 μL reagen MTT (10 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ per sumuran), kemudian diinkubasi selama 4-6 jam *dalam* inkubator CO_2 pada suhu 37°C . Setelah itu, setiap sumuran ditambah dengan 100 μL *sodium dodecyl sulfate* (SDS) 10% dalam HCl 0,01%. Selanjutnya, plat mikrokultur digoyang pada suhu kamar selama 5 menit, dibungkus dengan aluminiumium *foil* dan diinkubasi pada suhu kamar selama 12 jam atau semalaman. Plat mikrokultur tersebut kemudian dibaca absorbansinya menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm. Persentase viabilitas sel diperoleh dengan rumus :

$$\% \text{ Viabilitas Sel} = \frac{(\text{Absorbansi Perlakuan} - \text{Absorbansi Media})}{(\text{Absorbansi Kontrol Sel} - \text{Absorbansi Media})} \times 100 \%$$

(CCRC, 2009)

7. Pengamatan ekspresi protein *Cyclin D1* dan *Bcl2* dengan imunositokimia

Pengamatan ekspresi *Cyclin D1* dan protein *Bcl2* dengan menggunakan 24 sumuran 2 buah. Jumlah sumuran dibagi menjadi 3 baris (A, B, C). Pada setiap baris terdapat 6 sumuran (1, 2, 3, 4, 5, 6). Konsentrasi EEP yang digunakan sebesar $\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$, IC_{50} dan 2IC_{50} yang diperoleh dari uji sitotoksitas. Skema pengisian mikrokultur dapat dilihat pada gambar 10.

	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
A	P _{1/2}	P _{1/2}	P _{1/2}	P	P	P	A	P _{1/2}	P _{1/2}	P _{1/2}	P	P	P
B	2P	2P	2P	KN	KN	KN	B	2P	2P	2P	KN	KN	KN
C	KP	KP	KP				C	KP	KP	KP			

A

B

Gambar 10. Skema pengisian plat mikrokultur untuk pengamatan ekspresi *Cyclin D1*(A) dan protein *Bcl2* (B)

Keterangan :

$P_{1/2}$: *WiDr* + Media + EEP $\frac{1}{2}$ IC₅₀

P : *WiDr* + Media + EEP IC₅₀

2P : *WiDr* + Media + EEP 2 IC₅₀

KN : *WiDr* + Media

KP : *WiDr* + Media + 5Fu IC₅₀

Setiap sumuran plat mikrokultur yang akan diisi, diberi *coverslip*. Selanjutnya, semua sumuran pada plat mikrokultur diisi suspensi sel *WiDr*, kemudian diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, media setiap sumuran dibuang, lalu diganti dengan media baru yang mengandung FBS 10% dan selanjutnya diberi perlakuan sesuai dengan skema pada Gambar 9. Mikrokultur tersebut kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C.

Langkah selanjutnya, sampel sel *WiDr* ditambah dengan metanol dingin sebanyak 300 µL selama 10 menit, lalu buang dengan mikropipet. Selanjutnya sel dicuci dengan PBS 2 kali, setiap pencucian menggunakan PBS sebanyak 500 µL, buang PBS dengan mikropipet. Langkah selanjutnya sel dicuci dengan akuades 2 kali, setiap pencucian menggunakan akuades 500 µL, lalu buang akuades dengan mikropipet, kemudian sel ditambah dengan larutan H₂O₂ (dengan perbandingan 1 : 9 H₂O) sebanyak 300 µL selama 5-10 menit, lalu buang larutan H₂O₂.

Proses selanjutnya, sel pada plat mikrokultur ditambah dengan antibodi primer, inkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C. Langkah berikutnya sel dicuci dengan PBS 2 kali, tiap pencucian menggunakan PBS sebanyak 500 µL, lalu buang PBS. Sel ditambah dengan antibodi sekunder dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang, lalu buang dan dicuci dengan PBS 2 kali, tiap pencucian menggunakan PBS 500 µL. Sel tersebut ditambah 100 µL streptavidin (HRP), inkubasi selama 10 menit pada suhu ruang dan dicuci PBS 2 kali, tiap pencucian selama 5 menit dengan 500 µL PBS. Langkah berikutnya sel ditambah 100 µL DAB dan diinkubasi selama 2 menit atau dihentikan setelah timbul warna coklat, lalu cuci dengan H₂O

sebanyak 2 kali, tiap pencucian sebanyak 500 μL . Langkah selanjutnya, genangi sel dengan mayer hematoxilin 100 μL selama 5 menit, lalu cuci dengan H_2O sampai bersih (sampai warna biru hilang). Setelah itu, celupkan sel pada etanol absolut, celup xylol dan dikeringkan. Langkah terakhir, sel ditambah dengan etelen dan ditutup dengan *deck glass*.

8. Uji apoptosis senyawa EEP terhadap sel *WiDr* dengan *flowcytometry*

a. Panen sel *WiDr* dan hitung kerapatan sel *WiDr*

Panen sel *WiDr* dan hitung kerapatan sel *WiDr* dilakukan sesuai dengan prosedur yang telah diuraikan di atas. Uji apoptosis dalam penelitian ini memerlukan 2×10^5 sel tiap sumuran yang ditanam pada plat 6 sumuran (Luo dkk., 2012). Langkah selanjutnya, inkubasi plat 6 sumuran tersebut dalam inkubator CO_2 dengan suhu 37°C selama 24 jam.

b. Preparasi bahan uji

Uji apoptosis ini terdiri dari lima kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan), kelompok dengan $\text{EEP} \frac{1}{2} \text{IC}_{50}$, IC_{50} dan 2IC_{50} serta kelompok dengan 5Fu konsentrasi IC_{50} yang semuanya diperoleh dari uji sitotoksisitas sebelumnya. Tiap-tiap kelompok pada uji apoptosis ini dibuat *duplo* sehingga membutuhkan 2 plat 6 sumuran.

c. Perlakuan sel *WiDr* untuk uji apoptosis dengan bahan uji

Sel *WiDr* pada plat 6 sumuran yang telah diinkubasi sebelumnya diamati dengan mikroskop *inverted*. Jika sel telah siap untuk diberi perlakuan, buang media dari tiap sumuran dengan bantuan pipet, lalu cuci dengan PBS sebanyak 1 mL/sumuran. Buang PBS dari tiap sumuran, selanjutnya tambahkan larutan bahan uji yang telah dipreparasi sebelumnya sebanyak 2 mL/sumuran, sesuai dengan label pada plat 6 sumuran. Inkubasi kembali ketiga plat tersebut selama 48 jam dalam inkubator CO_2 dengan suhu 37°C .

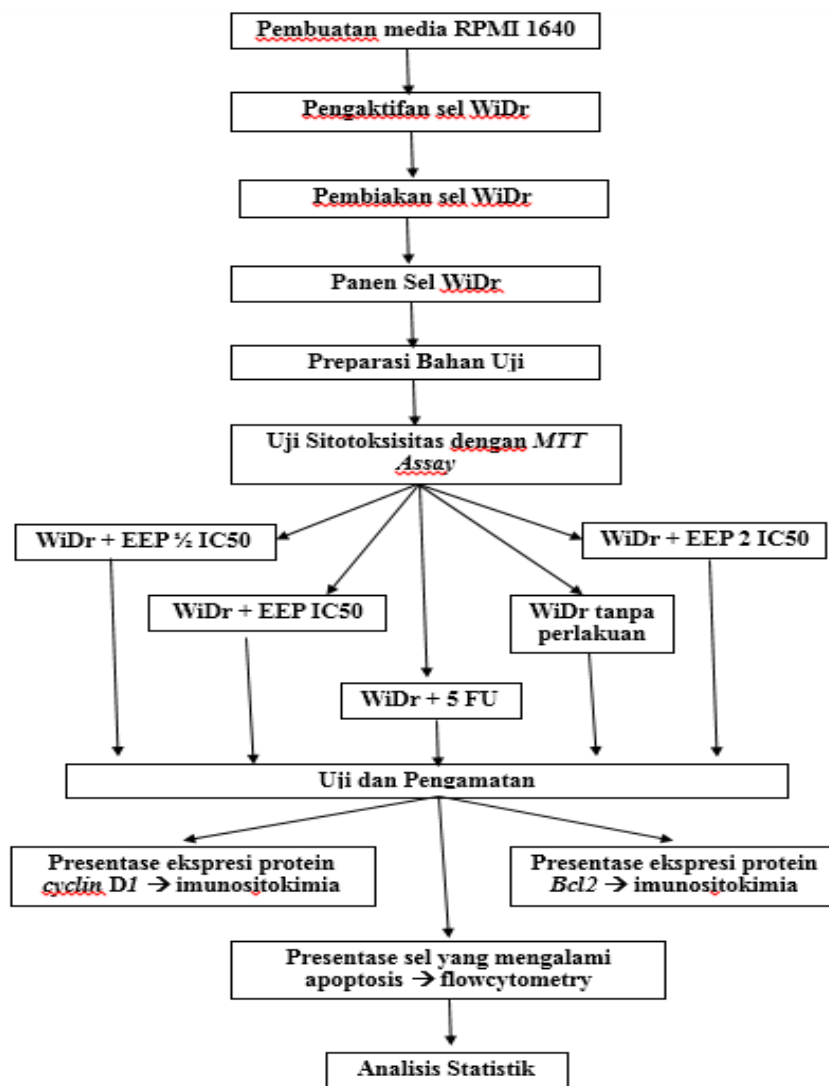
d. Preparasi sel *WiDr* dari perlakuan sebelumnya untuk *running flowcytometry*

Pindahkan semua media dari tiap sumuran ke dalam tabung conical yang telah dilabeli sebelumnya dengan bantuan pipet. Cuci dengan PBS 1 mL untuk tiap sumuran. Sedot PBS tersebut dengan pipet lalu tambahkan ke dalam tabung conical. Lakukan tripsinisasi untuk melepaskan sel yang masih melekat di dasar sumuran, inkubasi plat selama ± 5 menit sampai sel lepas. Amati dengan mikroskop *inverted*, jika sel telah lepas, sedot sel dari tiap sumuran dengan pipet lalu tambahkan ke dalam tabung conical sesuai dengan label. Sentrifugasi tabung conical tersebut dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit dan buang supernatannya. Tambahkan PBS dingin 1mL/tabung conical dan lakukan resuspensi.

Pindahkan suspensi tersebut ke dalam mikrotube 1,5 mL yang telah dilabeli sebelumnya. Sentrifugasi kembali microtube tersebut dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Sel siap dibawa ke laboratorium untuk dilakukan *running flowcytometry*.

e. *Running flowcytometry* untuk uji apoptosis dengan *Annexin V-PI*

Siapkan larutan *buffer* inkubasi yang terdiri dari 10 mM HEPES/NaOH pH 7,4; 140 mM NaCl dan 5 mM CaCl₂. Siapkan *labelling solution* untuk 15 sampel yang terdiri dari 30 μ L *Annexin V* ditambah 1,5 mL *buffer* inkubasi dan 30 μ L PI. Cuci sel dengan PBS, lalu sentrifugasi selama 5 menit dan buang supernatan. Tambahkan *labelling solution* sebanyak 100 μ L/sampel lalu lakukan resuspensi. Inkubasi sel pada ruang gelap selama 10-15 menit pada suhu 15-25°C. Analisis sel dengan menggunakan *flowcytometry*. Sel yang hidup (sehat) memberi gambaran propidium iodida negatif dan *annexin V* negatif, sel yang mengalami apoptosis, propidium iodida negatif dan *annexin V* positif. Sel yang nekrosis memberi gambaran positif pada propidium iodida maupun *annexin V*.



Gambar 11. Alur Penelitian

H. Teknik Analisis Data

Hasil penelitian akan dianalisis sebagai berikut :

1. Uji sitotoksik dengan *MTT assay* untuk menetapkan nilai IC_{50} senyawa EEP dan 5FU

Persentase viabilitas sel diperoleh dengan rumus :

$$\frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi media}) - (\text{absorbansi sampel} - \text{absorbansi media})}{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi media})} \times 100\%$$

Data tersebut digunakan untuk menetapkan nilai IC_{50} senyawa EEP maupun 5 Fu menggunakan excel.

2. Pengamatan ekspresi protein *Cyclin D1* dan *Bcl2*

Diamati dengan menggunakan metode imunositokimia. Ekspresi *cyclin D1* ditunjukkan dengan warna coklat pada inti sel dengan bantuan mikroskop cahaya, sedangkan warna biru pada inti sel menunjukkan tidak adanya ekspresi *cyclin D1* pada sel ataupun level ekspresi yang rendah sehingga tidak terdeteksi. Ekspresi protein *Bcl2* ditunjukkan dengan warna coklat pada membran luar mitokondria dan sitosol dengan bantuan mikroskop cahaya, sedangkan warna biru pada membran luar mitokondria dan sitosol menunjukkan tidak adanya ekspresi protein *Bcl2* pada sel atau level ekspresi yang rendah sehingga tidak terdeteksi. Penilaian ekspresi *cyclin D1* dan protein *Bcl2* dilakukan dengan metode *Immunostaining Quantitation* (Dougherty dkk., 2011). Ekspresi *cyclin D1* maupun protein *Bcl2* dinilai sebagai persentase dari keseluruhan sel pada 5 lapangan pandang dan penilaiannya dilakukan pada 6 slide dari tiap-tiap kelompok perlakuan.

Data persentase sel yang mengekspresikan *cyclin D1* maupun protein *Bcl2* pada kelima kelompok (sel *WiDr* dengan tiga variasi konsentrasi EEP, kontrol negatif tanpa perlakuan, dan kontrol positif dengan 5Fu) dibandingkan dengan uji *ANOVA* jika data normal dan uji *Kruskal Wallis* jika data tidak normal.

3. Uji induksi apoptosis sel senyawa EEP terhadap sel *WiDr* dengan *flowcytometry*

Apoptosis dianalisis dengan program *Cell Quest* untuk melihat distribusi sel yang hidup, mengalami apoptosis maupun nekrosis. Data yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk tabel terkait konsentrasi bahan uji ($1/2 IC_{50}$, IC_{50} , $2 IC_{50}$) dengan rata-rata persentase sel *WiDr* yang mengalami apoptosis.

Kemampuan induksi apoptosis dinilai dengan membandingkan persentase sel *WiDr* yang mengalami apoptosis pada kelompok perlakuan bahan uji, kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif dengan uji *ANOVA* jika data normal dan uji *Kruskal Wallis* jika tidak normal.

BAB IV

ANALISIS HASIL PENELITIAN

A. Analisis Penelitian

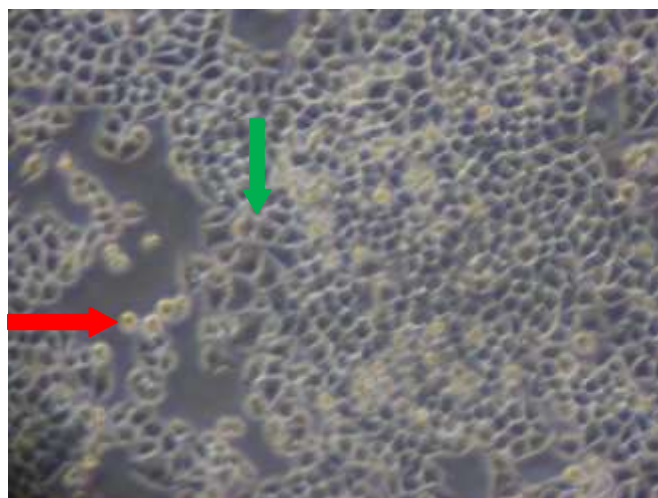
Data pada penelitian ini diperoleh dengan uji sitotoksik ekstrak ethanol propolis (EEP) pada sel WiDr (*cell line* kanker kolon) untuk menentukan dosis IC₅₀ yang digunakan. Pengamatan ekspresi protein *cyclin D1* dan *Bcl2* dilakukan dengan metode imunohistokimia. Pengamatan induksi apoptosis dilakukan dengan menggunakan *flowcitometry*. Data-data yang diperoleh selanjutnya dilakukan uji statistic untuk memperoleh kemaknaan.

Sebelum sampai pada pengujian hipotesis penelitian itu, terlebih dahulu dilakukan penjelasan deskripsi variabel penelitian yaitu ekspresi protein *cyclin D1* dan *Bcl2* pada sel *WiDr* yang dibagi dalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok perlakuan EEP dosis $\frac{1}{2}$ IC₅₀, 1 IC₅₀, 2 IC₅₀ dan kelompok perlakuan 5Fu (*fluorouracil*) sebagai kontrol positif. Penjelasan deskriptif obyek penelitian dimaksudkan untuk mendapatkan gambaran yang lebih lengkap berkenaan dengan karakteristik obyek yang diteliti. Proses selanjutnya dilakukan pengujian normalitas data-data variabel penelitian untuk memastikan apakah distribusi data variabel benar-benar berdistribusi normal atau tidak. Pada penelitian ini didapatkan data-data variabel pada uji imunositokimia tidak berdistribusi normal, sedangkan data pada uji apoptosis sel dengan *flowcitometry* berdistribusi normal.

Langkah berikutnya dilakukan uji variasi atau beda rata-rata antar masing-masing kelompok sampel, dapat menggunakan uji statistik ANOVA dilanjutkan dengan uji *post hoc test* pada pengamatan ekspresi protein *Cyclin D1*, *Bcl2* dan uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* pada pengamatan apoptosis sel.

1. Uji sitotoksitas dengan *MTT assay* untuk menetapkan nilai IC_{50} EEP dan 5 Fluorouracil.

Sel *WiDr* dibiakan dalam media komplet, selanjutnya diberikan perlakuan dengan menggunakan EEP. Sel *WiDr* yang hidup memiliki morfologi epitel gepeng lonjong dan menempel pada dasar sumuran, sedangkan sel yang mati memiliki morfologi bulat kecil, tersebar dan tidak menempel pada dasar sumuran. Morfologi sel *WiDr* ditunjukkan pada Gambar 12.



Gambar 12. Morfologi Sel *WiDr*, sel hidup ditunjukkan panah hijau dan sel mati ditunjukkan panah merah. Sel diamati dengan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 100 x

Data yang didapat dari uji sitotoksitas dengan *MTT assay* berupa absorbansi dari tiap sumuran yang merupakan hasil pembacaan dengan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Data absorbansi ini ditampilkan pada tabel 3.

Tabel 3. Absorbansi sel *WiDr* setelah pemberian bahan uji dengan metode *MTT assay*

Konsentrasi EEP (mM)	Nilai Absorbansi		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
200	0,200	0,218	0,207
100	0,350	0,356	0,317
50	0,580	0,571	0,560
25	0,795	0,857	0,805
12,5	0,961	0,970	0,994
Kontrol Sel	0,825	0,790	0,764
Kontrol Media	0,104	0,104	0,101

Konsentrasi 5FU (mM)	Nilai Absorbansi		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
200	0,723	0,708	0,727
100	0,801	0,817	0,823
50	0,880	0,857	0,847
25	0,867	0,893	0,857
12,5	0,909	0,908	0,887
Kontrol Sel	0,749	0,803	0,783
Kontrol Media	0,109	0,113	0,112

Langkah selanjutnya untuk mendapatkan persentase viabilitas sel, data tersebut kemudian diolah lebih lanjut dengan cara membandingkan nilai absorbansi antara sel yang diberi perlakuan EEP, 5Fu dan kontrol (sel tanpa perlakuan) setelah masing-masing dikurangi dengan kontrol media.

Persentase viabilitas sel ini kemudian digunakan untuk mendapatkan persentase hambatan proliferasi sel yang diperoleh melalui pengurangan nilai 100 % dengan persentase viabilitas sel tersebut. Data persentase hambatan proliferasi sel *WiDr* setelah perlakuan dengan bahan uji, secara lengkap ditampilkan pada tabel 4.

Langkah berikutnya data tersebut digunakan untuk menetapkan dosis IC_{50} bahan uji, nilai rata-rata persentase hambatan proliferasi sel *WiDr*. Dosis IC_{50} dari bahan uji ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai rata-rata persentase hambatan proliferasi sel *WiDr* dan nilai IC_{50} senyawa bahan uji dengan metode *MTT assay*

Bahan Uji	Konsentrasi (ug/ml)	Rata-rata viabilitas sel <i>WiDr</i> (% \pm SD)	$IC_{50} \pm$ SD (ug/ml)
Ekstrak Etanol Propolis (EEP)	12,5	126,60 \pm 7,92	139,61 \pm 49,48
	25	103,93 \pm 7,23	
	50	67,78 \pm 1,63	
	100	34,48 \pm 2,10	
	200	15,31 \pm 1,75	
5-Fluorouracil (5-FU)	12,5	118,57 \pm 5,57	502,33 \pm 60,52
	25	114,17 \pm 3,83	
	50	112,61 \pm 6,86	
	100	105,37 \pm 3,09	
	200	91,27 \pm 4,86	

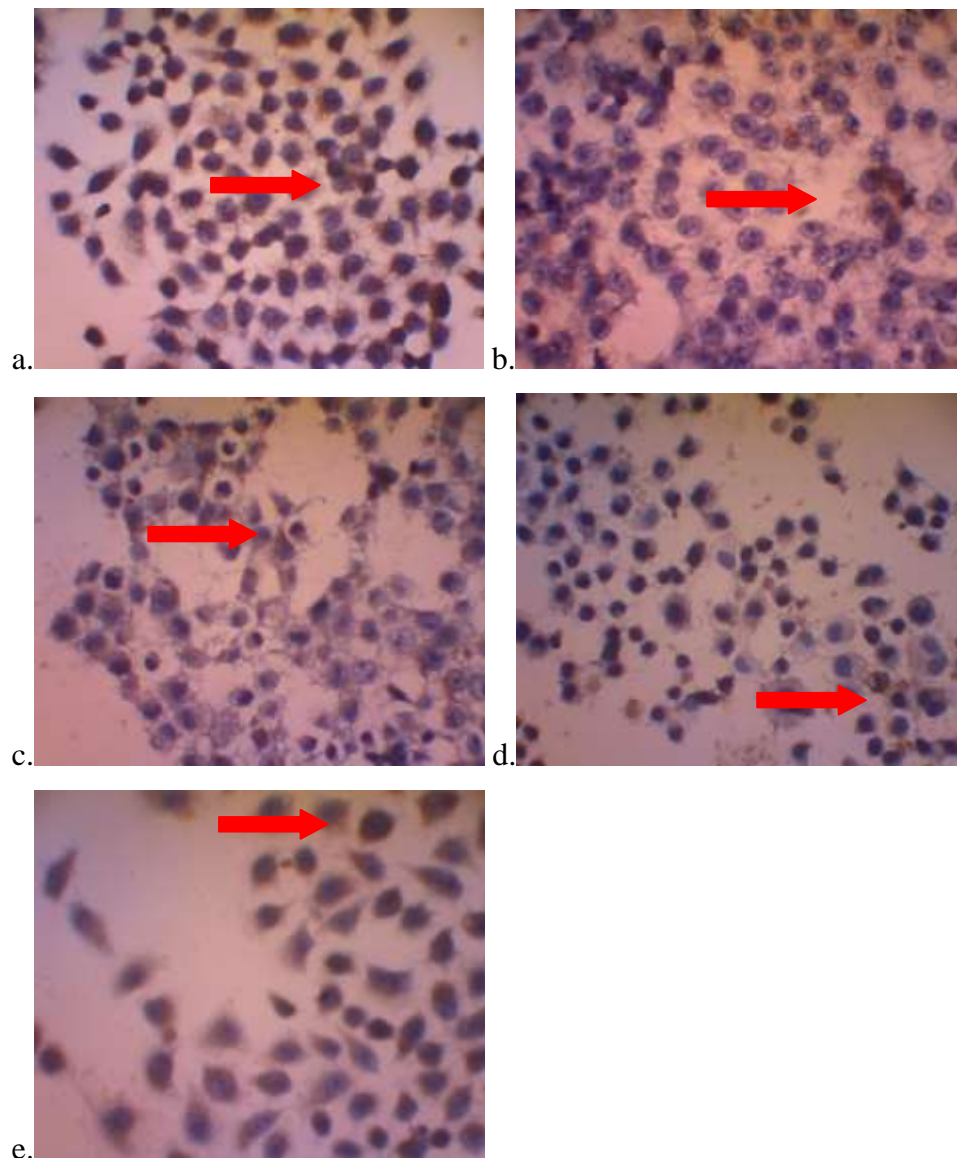
Tabel 3 menampilkan bahwa secara umum peningkatan konsentrasi bahan uji, baik EEP maupun 5FU mengakibatkan penurunan persentase viabilitas sel *WiDr*. Pada konsentrasi EEP yang terendah (12,5 ug/ml), diperoleh persentase viabilitas sel *WiDr* yang tertinggi (126,60%). Pada konsentrasi 5FU yang terendah (12,5 ug/ml) juga diperoleh persentase viabilitas sel *WiDr* yang tertinggi (118,57%).

Secara umum bahan uji baik EEP maupun 5Fu mampu menghambat proliferasi sel *WiDr*. Hal ini ditunjukkan dengan semakin meningkatnya konsentrasi bahan uji semakin sedikit persentase viabilitas sel *WiDr*. Aktivitas sitotoksitas bahan uji ini dinyatakan dengan nilai IC_{50} yang didapatkan melalui analisis regresi linear antara logaritma konsentrasi bahan uji dengan persentase

viabilitas sel *WiDr*. Dari analisis regresi linear diperoleh IC_{50} EEP adalah 139,61 ug/ml yang selanjutnya dalam penelitian ini digunakan pembulatan dosis 140 ug/ml. Nilai IC_{50} EEP ini selanjutnya digunakan untuk dasar penentuan konsentrasi EEP yang digunakan pada uji penelitian selanjutnya, yaitu sebesar 70, 140, dan 280 ug/ml ($1/2 IC_{50}$, IC_{50} , dan $2 IC_{50}$). Nilai IC_{50} 5FU akan digunakan sebagai pembanding pada uji imunositokimia dan induksi apoptosis dengan *flowcitometry*, yaitu sebesar 502,33 ug/ml yang selanjutnya dalam penelitian ini digunakan pembulatan dosis 500 ug/ml.

2. Pengamatan ekspresi protein *cyclin D1*

Pengamatan ekspresi protein *cyclin D1* pada sel *WiDr* dilakukan dengan menggunakan metode pengecatan imunositokimia. Pengamatan dengan pengecatan imunositokimia untuk *cyclin D1* dilakukan pada 5 kelompok perlakuan (Kontrol negatif, $1/2 IC_{50}$, IC_{50} , $2 IC_{50}$ dan IC_{50} 5 Fu), dan masing-masing kelompok perlakuan tersebut dibuat *triplicate*. Data yang didapatkan berupa persentase sel yang mengekspresikan protein *cyclin D1* (terlihat sebagai warna coklat pada inti sel maupun sitoplasma) dari keseluruhan sel pada 5 lapangan pandang dan penilaiannya dilakukan 3 kali dari tiap-tiap kelompok perlakuan. Hasil pengecatan imunositokimia untuk ekspresi protein *cyclin D1* pada sel *WiDr* masing-masing kelompok ditampilkan pada Gambar 13.



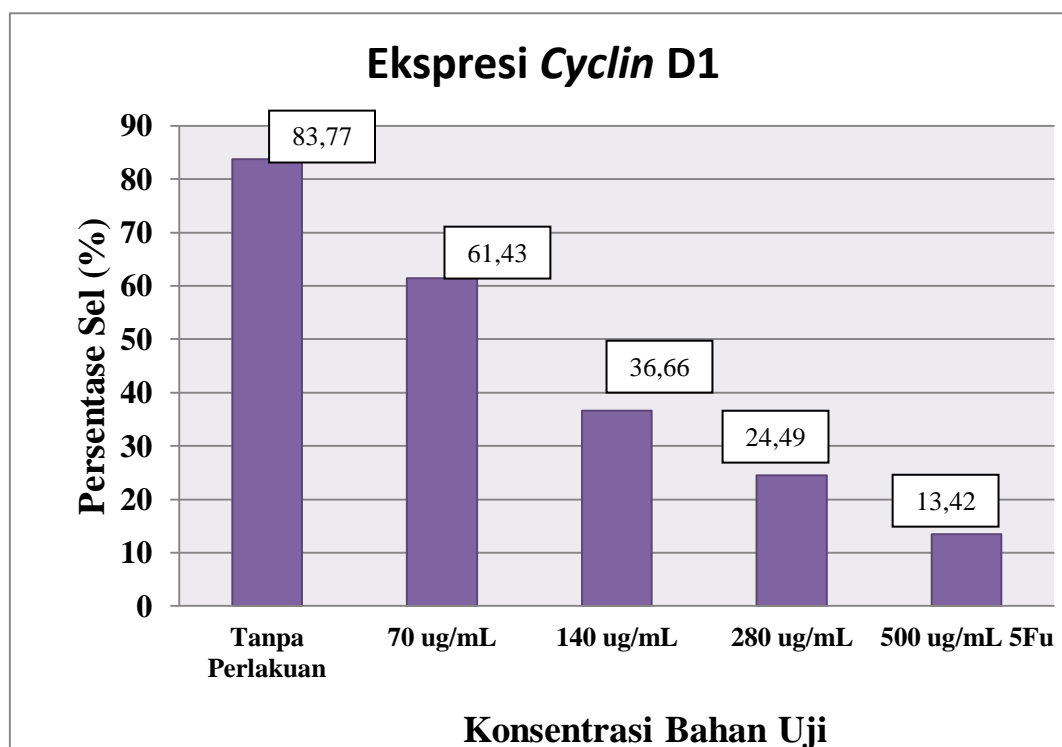
Gambar 13. Hasil pengecatan immunositokimia perbesaran 400 X untuk ekspresi *cyclin D1* pada sel *WiDr* setelah perlakuan dan inkubasi selama 24 jam pada kelompok tanpa perlakuan (a), kelompok dengan EEP konsentrasi 70 ug/mL (b), 140 ug/mL (c), 280 ug/mL (d) dan 5FU 500 ug/mL (IC_{50}). Sel yang mengekspresikan *cyclin D1* ditunjukkan dengan panah warna merah

Data keseluruhan untuk persentase ekspresi protein *cyclin D1* pada sel *WiDr* dengan pemberian EEP, 5Fu maupun kelompok kontrol, ditampilkan pada tabel 5.

Tabel 5. Persentase ekspresi protein *Cyclin D1* pada sel *WiDr* pada kelompok perlakuan dan kontrol setelah inkubasi 24 jam

Persentase Sel dengan Ekspresi protein <i>Cyclin D1</i> Positif (%)					
Perlakuan	1	2	3	Rata-rata	SD
Kontrol sel	83.7	84.19	83.42	83.77	0.39
70 (1/2 IC50)	60.99	61.52	61.8	61.44	0.41
140 (IC50)	36.92	35.38	37.7	36.67	1.18
280 (2IC50)	24.15	24.45	24.9	24.50	0.38
5FU 500	13.19	14.55	12.51	13.42	1.04

Grafik hubungan antara konsentrasi EEP dengan rata-rata persentase ekspresi *cyclin D1* pada sel *WiDr* dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Grafik hubungan konsentrasi EEP dengan rata-rata persentase ekspresi *cyclin D1* pada sel *WiDr* setelah inkubasi 24 jam

Diagram di atas, tampak bahwa dengan pemberian EEP selama 24 jam dapat menekan ekspresi protein *cyclin D1*. Penekanan ekspresi protein *cyclin D1* ini sebanding dengan peningkatan konsentrasi EEP yang diberikan. Langkah selanjutnya untuk mengetahui apakah perbedaan ekspresi protein *cyclin D1* diantara kelima kelompok tersebut bermakna secara statistik atau tidak maka dilakukan uji statistik. Hasil uji statistik didapatkan rata-rata ekspresi *cyclin D1* pada kelima kelompok yaitu tanpa perlakuan $83.77 \pm 0.39 \mu\text{g/ml}$, EEP 70 $\mu\text{g/ml}$ $61.44 \pm 0.41 \mu\text{g/ml}$, EEP 140 $\mu\text{g/ml}$ $36.67 \pm 1.18 \mu\text{g/ml}$, EEP 280 $\mu\text{g/ml}$ $24.50 \pm 0.38 \mu\text{g/ml}$, 5 fluorouracil 500 $\mu\text{g/ml}$ $13.42 \pm 1.04 \mu\text{g/ml}$. Terdapat perbedaan bermakna ekspresi protein *cyclin D1* antara kelompok dengan pemberian EEP dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0,001$).

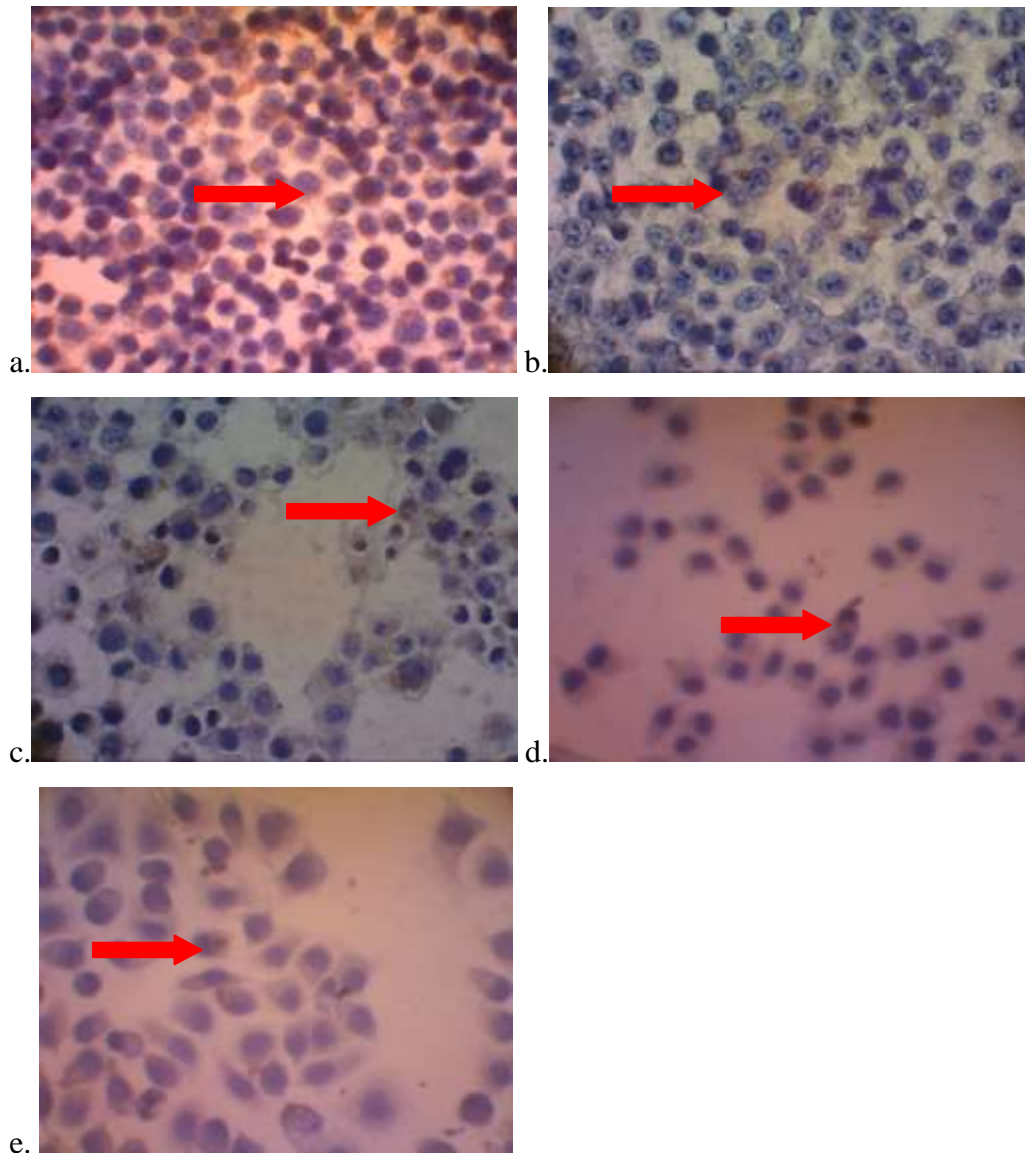
Hasil uji statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi protein *cyclin D1* yang bermakna diantara kelima kelompok perlakuan. Dari hasil uji statistik tersebut juga menunjukkan bahwa perbedaan ekspresi protein *cyclin D1* yang bermakna diantara kelompok perlakuan yang mendapatkan EEP konsentrasi 70 $\mu\text{g/ml}$, 140 $\mu\text{g/ml}$ dan 280 $\mu\text{g/ml}$ dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil ini membuktikan hipotesis “ *EEP mampu menekan ekspresi cyclin protein D1 pada kultur sel WiDr* ” secara meyakinkan.

3. Pengamatan ekspresi protein *Bcl2*

Apakah induksi apoptosis sel *WiDr* oleh EEP terkait dengan penekanan aktivitas protein antiapoptosis *Bcl2*, maka dilakukan pengamatan aktivitas protein *Bcl2* pada sel *WiDr* setelah pemberian bahan uji dan inkubasi selama 24 jam. Pengamatan ini dilakukan dengan menggunakan pengecatan imunositokimia terhadap protein *Bcl2* pada 5 kelompok perlakuan (Kontrol, $1/2 \text{ IC}_{50}$, IC_{50} , 2 IC_{50} dan 5Fu dosis IC_{50}). Masing-masing kelompok perlakuan tersebut dibuat *triplicate*.

Data yang didapatkan berupa persentase sel yang mengekspresikan protein *Bcl2* (terlihat sebagai warna coklat pada inti sel maupun sitoplasma) dari keseluruhan sel pada 5 lapangan pandang dan penilaiannya dilakukan pada 3 slide

dari tiap-tiap kelompok perlakuan. Hasil pengecatan imunositokimia untuk protein *Bcl2* pada sel *WiDr* tampak pada Gambar 15.



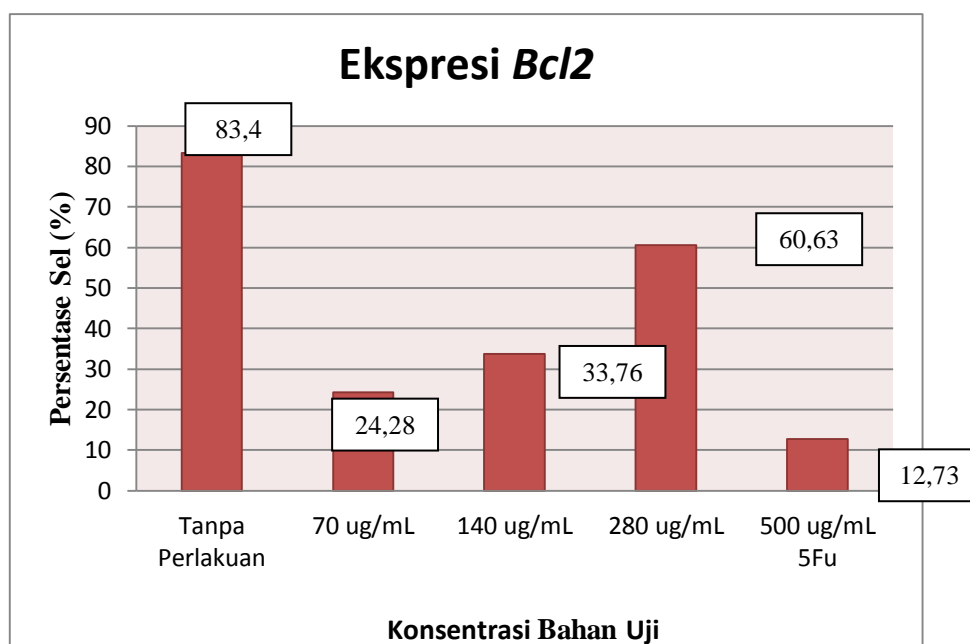
Gambar 15. Hasil pengecatan imunositokimia perbesaran 400 kali untuk ekspresi protein *Bcl2* pada sel *WiDr* setelah perlakuan dan inkubasi selama 24 jam pada kelompok tanpa perlakuan (a), kelompok dengan pemberian EEP dengan konsentrasi 70 ug/mL (b), 140 ug/mL (c), 280 ug/mL (d) dan 5Fu dosis 500 ug/mL. Sel yang mengekspresikan protein *Bcl2* ditunjukkan dengan panah warna merah

Data keseluruhan persentase ekspresi protein *Bcl2* pada sel *WiDr* dengan pemberian EEP maupun kelompok kontrol, ditampilkan pada tabel 6.

Tabel 6. Persentase ekspresi *Bcl2* pada sel *WiDr* pada kelompok perlakuan dan kontrol setelah inkubasi 24 jam.

Persentase Sel dengan Ekspresi protein <i>Bcl2</i> Positif (%)					
Perlakuan	1	2	3	Rata-rata	SD
Kontrol sel	83.36	82.73	84.11	83.40	0.69
70 (1/2 IC50)	22.92	23.46	26.46	24.28	1.91
140 (IC50)	33.78	32.68	34.84	33.77	1.08
280 (2IC50)	60.33	60.49	61.08	60.63	0.40
5FU 500	10.94	15.17	12.1	12.74	2.19

Grafik hubungan antara konsentrasi EEP dengan rata-rata persentase ekspresi protein *Bcl2* pada sel *WiDr* dapat dilihat pada Gambar 16.



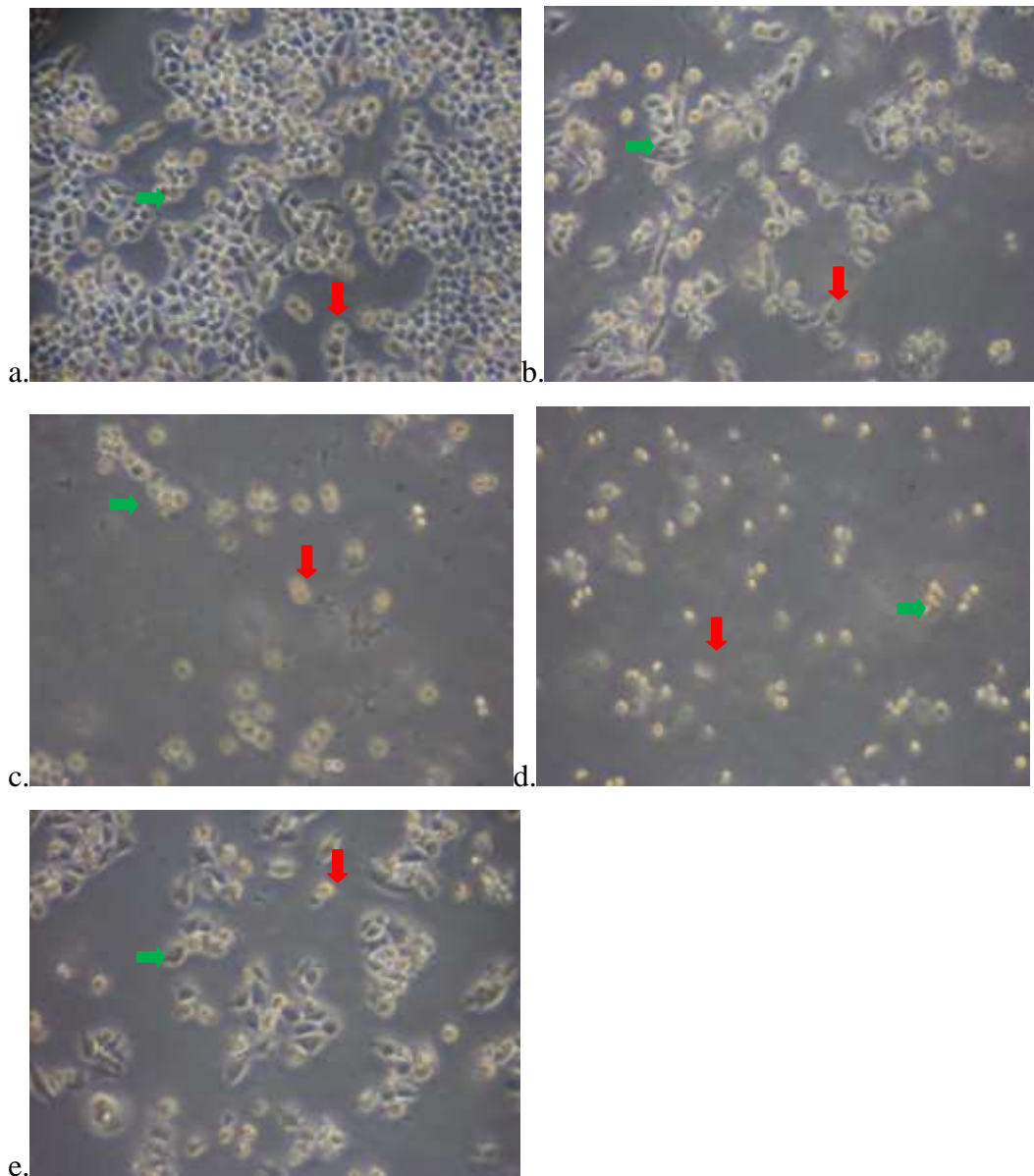
Gambar 16. Grafik hubungan konsentrasi EEP dengan rata-rata persentase ekspresi *Bcl2* pada sel *WiDr* setelah inkubasi 24 jam

Diagram di atas, menunjukkan bahwa dengan pemberian EEP selama 24 jam dapat menurunkan persentase protein *Bcl2* positif pada sel *WiDr*. Penurunan persentase protein *Bcl2* positif pada sel *WiDr* ini didapatkan paling banyak pada pemberian EEP dosis $\frac{1}{2}$ IC₅₀. Langkah selanjutnya untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan ekspresi protein *Bcl2* diantara kelima kelompok tersebut bermakna atau tidak secara statistik maka dilakukan uji statistik. Hasil uji statistik didapatkan rata-rata ekspresi *Bcl2* pada kelima kelompok yaitu tanpa perlakuan 83.40 ± 0.69 $\mu\text{g/ml}$, EEP 70 ug/mL 24.28 ± 1.91 $\mu\text{g/ml}$, EEP 140 ug/mL 33.77 ± 1.08 $\mu\text{g/ml}$, EEP 280 ug/mL 60.63 ± 0.40 $\mu\text{g/ml}$, 5 fluorouracil 500 ug/mL 12.74 ± 2.19 $\mu\text{g/ml}$. Terdapat perbedaan bermakna ekspresi *Bcl2* antara kelompok dengan pemberian EEP dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0,001$).

Hasil uji statistik menunjukkan ada perbedaan ekspresi protein *Bcl2* yang bermakna diantara kelompok perlakuan yang mendapatkan EEP konsentrasi 70, 140 maupun 280 ug/ml dibanding dengan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa hipotesis “*EEP mampu menekan ekspresi protein Bcl2 pada sel WiDr*” telah terbukti secara meyakinkan.

4. Uji induksi apoptosis EEP pada sel *WiDr* dengan *flowcytometry*

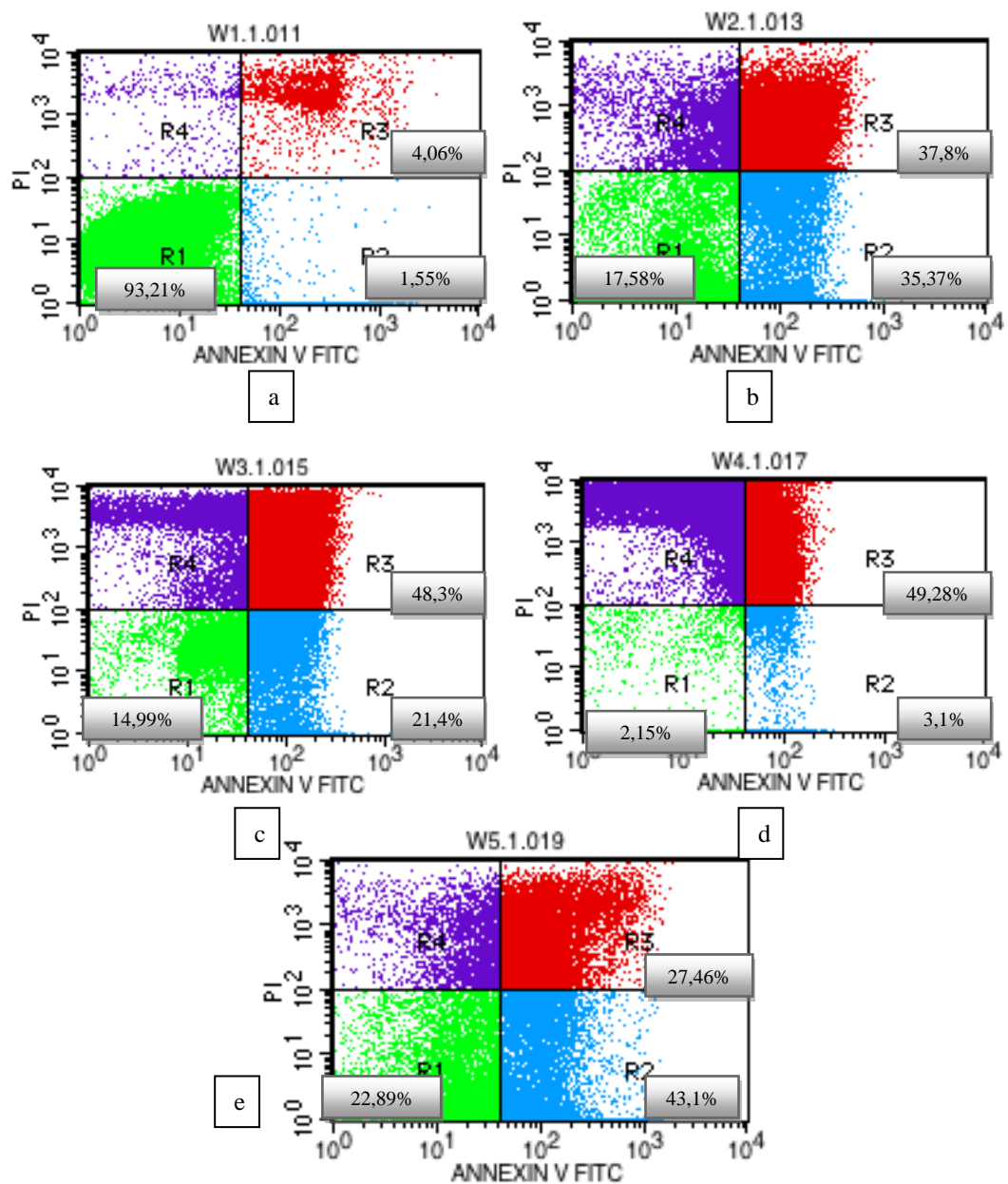
Pengamatan uji induksi apoptosis dilakukan untuk mengetahui kemampuan EEP dalam menghambat proliferasi sel *WiDr* terkait dengan kemampuannya dalam menginduksi apoptosis. Uji ini dilakukan pada lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok dengan pemberian EEP dosis 70 ug/mL ($1/2$ IC₅₀), 140 ug/mL (IC₅₀) dan 280 ug/mL (2 IC₅₀), kelompok dengan pemberian 5 Fu dosis 500 ug/mL (IC₅₀), dan kelompok kontrol tanpa perlakuan. Morfologi sel *WiDr* pada kelima kelompok tersebut setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam tampak pada Gambar 17.



Gambar 17. Gambar sel WiDr dengan perbesaran 100 kali, untuk uji apoptosis setelah inkubasi 24 jam pada kelompok tanpa perlakuan (a), kelompok dengan pemberian EEP konsentrasi 70 ug/ml (b), 140 ug/ml (c), 280 ug/ml (d), serta kelompok dengan pemberian 5Fu 500 ug/ml (e). Sel hidup ditunjukkan dengan panah warna hijau, sedangkan sel mati dengan panah warna merah.

Setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam, selanjutnya dilakukan uji apoptosis dengan metode *flowcytometry* dan tiap-tiap kelompok dibuat *duplicate*. Data hasil *flowcytometry* yang didapatkan berupa persentase sel *WiDr* yang hidup,

yang mengalami apoptosis, maupun yang mengalami nekrosis pada kelima kelompok (Gambar 18). Rata-rata persentase sel *WiDr* yang mengalami apoptosis pada kelima kelompok ditampilkan pada tabel 7.



Gambar 18. Hasil *flowcytometry* sel *WiDr* setelah perlakuan dan inkubasi selama 24 jam pada kelompok tanpa perlakuan (a), kelompok dengan pemberian EEP konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC_{50} (b), IC_{50} (c) dan $2 IC_{50}$ (d) serta kelompok dengan pemberian 5FU konsentrasi IC_{50} (e)

Keterangan untuk tiap-tiap kuadran :

Kiri Bawah (Anexin negatif, PI negatif) : Sel Hidup

Kanan Bawah (Anexin positif, PI negatif) : Sel Apoptosis

Kanan Atas (Anexin positif, PI positif) : Sel Nekrosis

Tabel 7. Rata-rata persentase sel *WiDr* yang mengalami apoptosis setelah inkubasi selama 24 jam dengan bahan uji (EEP dan 5FU) maupun pada kelompok kontrol.

Perlakuan	Konsentrasi (ug/mL)	Rata-rata Apoptosis Sel <i>WiDr</i> (%) \pm SD
Kontrol Sel	0	1,55 \pm 0,05
EEP	70($1/2$ IC ₅₀)	35,37 \pm 1,2
	140 (IC ₅₀)	21,88 \pm 0,67
	280 (2 IC ₅₀)	3,11 \pm 0,13
5FU	500 (IC ₅₀)	43,16 \pm 0,45

Data yang ditunjukkan pada tabel 6 menunjukkan bahwa rata-rata persentase apoptosis pada sel *WiDr* yang diberikan perlakuan EEP lebih kecil dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yang diberikan 5FU dosis IC₅₀. Konsentrasi EEP pada dosis 70 ug/mL ($1/2$ IC₅₀) mampu menginduksi apoptosis paling tinggi pada sel *WiDr* dibandingkan dengan konsentrasi EEP yang lain yaitu dosis 140 ug/mL (IC₅₀) dan 280 ug/mL (2 IC₅₀).

Selanjutnya data persentase sel *WiDr* yang mengalami apoptosis pada kelima kelompok perlakuan tersebut dianalisis dengan uji statistik untuk mengetahui apakah perbedaan yang terjadi bermakna secara statistik atau tidak dan dilanjutkan dengan *multiple comparisons test*.

Hasil uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan persentase apoptosis sel yang bermakna diantara kelima kelompok perlakuan dengan $p < 0,001$. Hasil *multiple comparisons* menunjukkan bahwa ada perbedaan rata-rata persentase apoptosis sel yang bermakna secara statistik pada semua kelompok dengan $p < 0,001$. Perbedaan yang tidak bermakna secara statistik terdapat diantara kelompok perlakuan yang mendapat EEP konsentrasi 280 ug/mL (2IC₅₀) dibanding dengan

kelompok kontrol positif (5FU). Hasil ini menunjukkan bahwa hipotesis “ *EEP mampu menginduksi apoptosis pada sel WiDr*” telah terbukti secara meyakinkan.

B. Pembahasan

1. Berdasarkan Pendekatan Prinsip Ontologi

Berdasarkan pendekatan prinsip **ontologi**, sel kanker umumnya terjadi karena adanya mutasi pada gen-gen yang mengkode protein yang berperan mengatur pembelahan sel. Gen-gen yang mengalami malfungsi dan terlibat dengan kanker ini diklasifikasikan ke dalam 3 kelompok. Pertama, *proto-onkogen* yaitu gen yang mengkode protein yang secara normal memicu pembelahan sel dan menghambat kematian sel yang terprogram (apoptosis). Mutasi pada gen-gen ini disebut sebagai *onkogen*. Kelompok kedua adalah *tumor suppressor genes* yang mengkode protein yang secara normal menghambat pembelahan sel dan memicu apoptosis. Kelompok ketiga merupakan gen-gen yang berperan pada proses DNA *repair* yang akan meminimalisasi mutasi - mutasi yang bisa berakibat sebagai kanker. Sel kanker berkembang dikarenakan adanya proliferasi sel yang tinggi dan bersifat tidak terkendali terjadi karena adanya gangguan keseimbangan faktor protoonkogen, gen penekan tumor dan kerusakan DNA *repair* (*Cell Biology and Cancer*, 2008).

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*. Menurut Kumar dkk. (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* terutama *cyclin D1* memiliki peran sentral karena ekspresinya diregulasi oleh faktor pertumbuhan dan kompleks *cyclin D-CDK* ini akan memfosforilasi protein *retinoblastoma (pRB)*.

Apoptosis merupakan mekanisme untuk mengontrol proliferasi sel sebagai bagian dari proses perkembangan yang normal dan juga akan mengakibatkan kematian sel jika terdapat kerusakan DNA yang tidak dapat diperbaiki (Ghobrial dkk., 2005). Apoptosis melalui dua jalur utama, jalur ekstrinsik dan jalur

intrinsik. Jalur intrinsik diregulasi oleh sekelompok protein yang termasuk ke dalam famili protein *B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)*. Terdapat dua kelompok utama dari protein Bcl-2. Pertama, yaitu kelompok protein pro-apoptosis seperti *Bax*, *Bak*, *Bad*, *Bcl-Xs*, *Bid*, *Bik*, *Bim*, dan *Hrk*. Kelompok kedua merupakan kelompok protein anti-apoptosis seperti *Bcl-2*, *Bcl-X_L*, *Bcl-W*, *Bfl-1* dan *Mcl-1* (Wong, 2011). Sensitivitas sel terhadap stimulus apoptosis tergantung pada keseimbangan antara protein pro-apoptosis dan anti-apoptosis.

Proliferasi sel yang berlebihan juga terjadi pada sel kanker. Apoptosis merupakan mekanisme untuk mengontrol proliferasi sel sebagai bagian dari proses perkembangan yang normal. Namun, pada sel kanker terjadi ketidakseimbangan antara protein proapoptosis (*Bax*) dan antiapoptosis (*Bcl2*) dimana kadar *Bcl2* lebih tinggi sehingga proses apoptosis terhambat. Pada penelitian ini dengan pemberian ekstrak ethanol propolis pada sel kanker dalam hal ini kanker kolon (*WiDr*), diharapkan dapat menekan ekspresi protein *Bcl2* sehingga diharapkan dapat menginduksi apoptosis. Pemberian ekstrak ethanol propolis pada sel kanker diharapkan dapat menekan ekspresi *cyclin D1* sehingga siklus sel terhambat dan proliferasi sel kanker juga terhambat. Adanya induksi apoptosis dan penghambatan proliferasi maka sel kanker akan mati.

2. Berdasarkan Pendekatan Prinsip Epistemologi

Berdasarkan pendekatan prinsip **epistemologi**, pada penelitian ini diawali dengan uji sitotoksisitas EEP pada sel *WiDr* menggunakan metode *MTT assay*. Uji sitotoksisitas ini dilakukan untuk menetapkan nilai IC_{50} EEP yang selanjutnya akan digunakan sebagai dasar penetapan konsentrasi EEP untuk pengamatan penekanan ekspresi *cyclin D1*, *Bcl2* maupun uji induksi apoptosis pada sel *WiDr*. Uji sitotoksisitas ini juga digunakan untuk menetapkan IC_{50} 5 *fluorouracil* pada sel *WiDr* sebagai senyawa pembanding pada uji induksi apoptosis.

Hasil uji sitotoksisitas ini didapatkan persentase hambatan proliferasi sel *WiDr* semakin meningkat sebanding dengan peningkatan konsentrasi EEP yang diberikan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian EEP konsentrasi 70-280 ug/mL pada penelitian ini selama 24 jam mampu menghambat proliferasi sel *WiDr*. Hal

ini sesuai dengan penelitian Ishihara dkk., (2009) mengenai efek anti proliferasi dari ekstrak etanol propolis yang berasal dari Cina dan Brazil pada *cell line* kanker kolorektal dimana ekstrak etanol propolis menghambat pertumbuhan dari *cell line* kanker kolorektal. Selain itu Szliszka dkk., 2012 melaporkan bahwa pemberian EEP dengan konsentrasi 5 ug/mL, 25 ug/mL, 50 ug/mL selama 48 jam mampu menghambat proliferasi *cell line* HeLa yang merupakan turunan kanker servik.

Hasil analisis diperoleh IC_{50} EEP pada sel *WiDr* dipenelitian ini sebesar 139,32 ug/mL dimana untuk selanjutnya dibulatkan menjadi dosis 140 ug/mL. Szliszka dkk., (2011) melaporkan bahwa konsentrasi EEP 50 ug/mL dari negara Polandia bagian selatan mempunyai efek sitotoksitas 25 % pada *cell line* kanker prostat. Vatansever dkk., (2010) menunjukkan bahwa EEP konsentrasi 125 ug/mL mempunyai efek sitotoksik pada sel MCF-7 (*cell line* kanker payudara). Vatansever dkk., (2010) juga melaporkan bahwa terdapat perbedaan efek sitotoksik dari tujuh sampel EEP yang berbeda yang dikumpulkan dari lokasi yang sama. Penelitian ini mengindikasikan bahwa komposisi kimia dan farmakokinetik EEP berbeda-beda. Hal ini selain dipengaruhi oleh geografis juga dipengaruhi jenis tanaman, asal propolis tersebut diperoleh.

Diagram hubungan antara konsentrasi EEP dengan rata-rata persentase ekspresi *cyclin D1* pada sel *WiDr* menunjukkan bahwa pemberian EEP selama 24 jam menekan ekspresi *cyclin D1* yang sebanding dengan peningkatan konsentrasi EEP yang diberikan. Hasil uji statistik menunjukkan perbedaan ekspresi *cyclin D1* yang bermakna secara statistik terdapat diantara kelompok perlakuan yang mendapatkan EEP dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penekanan *cyclin D1* mengakibatkan penurunan pembentukan kompleks *cyclin D1-CDK* sehingga siklus sel berhenti pada fase G0/G1 dan terjadi penghambatan proliferasi sel *WiDr*.

Hasil ini sejalan dengan penelitian Amini-Sarteshnizi N dkk, (2015) yang menunjukkan bahwa senyawa propolis dapat menghambat proliferasi sel atau menginduksi apoptosis dengan menekan kompleks *cyclin* dan protein yang terkait dengan kompleks *cyclin*.

Diagram hubungan antara konsentrasi EEP dengan rata-rata persentase protein *Bcl2* pada sel *WiDr* (Gambar 13) terlihat bahwa dengan pemberian EEP selama 24 jam dapat menurunkan persentase protein *Bcl2* positif pada sel *WiDr*. Penurunan persentase protein *Bcl2* positif pada sel *WiDr* ini didapatkan paling banyak pada pemberian EEP dosis $\frac{1}{2}$ IC₅₀. Hasil uji statistik menunjukkan adanya perbedaan ekspresi *Bcl2* yang bermakna secara statistik diantara semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penekanan ekspresi protein *Bcl2* dimana yang berfungsi sebagai protein antiapoptosis selanjutnya akan menginduksi terjadinya apoptosis.

Hasil ini sesuai dengan penelitian Motomura dkk., (2008) yang melaporkan bahwa ekstrak methanol propolis mampu meningkatkan apoptosis *cell line* U-937 (sel kanker leukemia) melalui aktivasi *caspase-3* dan penekanan *Bcl-2*. Penelitian lain oleh Diana dkk., (2012) dan Kubina dkk., (2015), menunjukkan propolis diketahui dapat menginduksi aktivitas protein lain yang terlibat dalam proses proapoptosis seperti *Bax* dan menekan ekspresi *Bcl2* yang merupakan inhibitor apoptosis.

Hasil uji apoptosis sel menggunakan flowcitometry menunjukan dengan pemberian konsentrasi EEP pada dosis 70 ug/mL ($\frac{1}{2}$ IC₅₀) mampu menginduksi apoptosis paling tinggi pada sel *WiDr* dibandingkan dengan konsentrasi EEP yang lain yaitu dosis 140 ug/mL (IC₅₀) dan 280 ug/mL (2 IC₅₀). Hal ini dimungkinkan karena dengan semakin bertambahnya dosis EEP yang diberikan maka sel *WiDr* akan semakin banyak mengalami nekrosis, selain itu juga dikarenakan kemungkinan dosis optimal EEP yang dapat menginduksi apoptosis berda pada dosis 70 ug/mL.

3. Berdasarkan Pendekatan Prinsip Aksiologi

Berdasarkan prinsip **aksiologi**, secara keseluruhan manfaat hasil penelitian ini adalah EEP memiliki kecenderungan mampu menginduksi apoptosis dan menghambat proliferasi sel *WiDr*. Hasil ini membuka peluang untuk mengembangkan EEP ke arah kombinasi dengan kemoterapi standar untuk terapi kanker, khususnya kanker kolon. Kombinasi kemoterapi bertujuan meningkatkan

efektifitas terapi dan menurunkan efek samping kemoterapi. Desain kombinasi yang tepat diperlukan untuk memperoleh manfaat terapi yang lebih optimal.

4. Nilai Kebaruan penelitian

Nilai-nilai kebaruan dari penelitian ini adalah :

- a. **Solusi baru.** Kerangka konsep dan hasil penelitian ini merupakan solusibaru dengan penggunaan ekstrak ethanol propolis akan menurunkan proliferasi sel dan meningkatkan induksi apoptosis pada kultur sel kanker kolon, melalui penekanan ekspresi protein *cyclin D1* dan *Bcl2*.
- b. **Strategi baru.** Dari hasil penelitian ini akan memberikan suatu informasi, bahwa ekstrak ethanol propolis dengan dosis yang tepat dapat digunakan sebagai *complementary therapy* dalam penatalaksanaan kanker kolon sehingga efek antikarsinogenesis maksimal dan untuk mengurangi terjadinya efek samping.
- c. **Perspektif baru.** Hasil penelitian ini dapat digunakan, dikembangkan lebih lanjut dalam usaha mengobati kanker, khususnya kanker kolon, yang berdasarkan patogenesis biomolekuler.
- d. **Kondisi baru.** Hasil penelitian ini diharapkan dapat sebagai acuan pengembangan penelitian lanjutan untuk memperbaiki prognosis dan kondisi penderita kanker kolon.

5. Keterbatasan Penelitian

Dalam penelitian ini masih ada keterbatasannya, yaitu

- a. Penelitian ini menggunakan ekstrak propolis murni menggunakan ethanol 80 % tanpa memisahkan komponen-komponen senyawa yang ada di dalam propolis, sehingga tidak diketahui secara pasti komponen senyawa mana dari kandungan propolis yang memiliki efek antikanker.
- b. Belum adanya standarisasi komponen senyawa yang terkandung di dalam propolis yang diakui baik secara nasional maupun internasional. Hal ini dikarenakan Komposisi senyawa kimiawi dan aktivitas biologi propolis

bervariasi tergantung lokasi geografi, asal tanaman, musim dan spesies lebah

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil-hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak ethanol propolis mampu menekan ekspresi protein *cyclin D1* pada kultur sel *WiDr*.
2. Pemberian ekstrak ethanol propolis mampu menekan ekspresi protein *Bcl2* pada kultur sel *WiDr* secara optimal pada dosis 70 ug/mL.
3. Pemberian ekstrak propolis mampu menginduksi apoptosis pada kultur sel *WiDr* secara optimal pada dosis 70 ug/mL.
4. Berdasarkan hasil pada penelitian ini direkomendasikan pemberian ekstrak ethanol propolis dosis 70 ug/mL sebagai *complementary therapy* pada kanker kolon.

B. SARAN

Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka ada beberapa saran, yaitu:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait mekanisme molekuler aktivitas antikanker EEP pada kultur sel *WiDr*, selain penekanan ekspresi protein *cyclin D1* maupun *Bcl2* dan induksi apoptosis yang telah ditunjukkan pada penelitian ini.
2. Perlu dilakukan penelitian menggunakan ekstrak propolis dengan memisahkan komponen-komponen senyawa yang ada di dalamnya, sehingga diketahui secara pasti komponen senyawa mana dari kandungan propolis tersebut yang memiliki efek antikanker.
3. Perlu adanya standarisasi kandungan komponen senyawa propolis yang diakui, untuk digunakan pada penelitian selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M. 2014. *Tumor Kolorektal*. Dalam : Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S, Fahrial Syam A (eds). Buku Ajar Penyakit Dalam. Edisi VI. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI. Jakarta. Hal.564 - 568.
- Ahn MR, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang KS, Nakayama T, 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(24):p.7286-92
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. *Molecular Biology of The Cell*. Fifth Edition. Garland Science, New York
- Adam, R., Lucidi, V., Bismuth, H. 2004. Hepatic colorectal metastases: methods of improving resectability. *Surg Clin N Am*. 84:659-71.
- Alison, M.R. 2001. *Cancer*. In :Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group. London. United Kingdom.
- American Cancer Society. 2014. *Colorectal Cancer*. Surveillance and Health Policy Research.
- Ananda, S.K., Tragoolpua, K., Chantawannakul, P., Tragoolpua, Y. 2013. Antioxidant and anticancer cell proliferation of propolis extracts from two extraction methods. *Asian Pac J Cancer Prev*. 14(11): 6991-6995.
- Ang ESM, Pavlos NJ, Chai LY, Qi M, Cheng TS, Steer JH et al, 2009. Caffeic acid phenethyl ester, an active component of honeybee propolis attenuates osteoclastogenesis and bone resorption via the suppression of RANKL-induced NF- κ B and NFAT activity. *Journal of cellular physiology*:p.642-9
- Amnsel HC, 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*, Edisi IV. Jakarta : Penerbit Universitas Indonesia.p.605-07
- Aso, K., Kanno, S., Tadano, T., Satoh, S., Ishikawa, M. 2004. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. *Biol Pharm Bull*. 27:727-730.

- Baltrusaityte V, Rimantas-Venskutonis P, Ceksteryte V, 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Journal of Food Chem.* p.502–14
- Barbara C. 2008. *Cell Biology and Cancer*. National Cancer Institute.
- Berki, T., Boldizsár, F., Szabo, M., Talaber, G., Varecza, Z., 2011. *Signal Transduction*. Manifestation of Novel Social Challenges of the European Union in The Teaching Material of Medical Biotechnology Master's Programmes at the University of Debrecen.
- Borrelli, F., Maffia, P., Pinto, L., Ianaro, A., Russo, A., Capasso, F., Ialenti, A. 2002. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Journal of Fitoterapia* 73(1):53–63
- Budiyastomo, H. 2010. *Pengaruh Pemberian Fraksi Etanolik Bawang Dayak Terhadap Tingkat Ekspresi Cyclin-e Galur Sel Kanker Serviks Uteri HeLa*. Tesis. Program Pendidikan Dokter Spesialis I Obstetri Ginekologi. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC). 2009. *Prosedur Tetap Pengamatan Ekspresi Protein dengan Metode Imunositokimia*. Fakultas Farmasi UGM. Yogyakarta.
- Cadenas, E., Packer, L. 2002. *Expanded Caffeic Acid and Related Antioxidant Compound: Biochemical and Cellular Effects*. Handbook of Antioxidants. Second edition. California : Marcel Dekker, Inc. p. 279-303.
- Chang, L.C., Kinghorn, A.D., 2001, Flavonoid as Chemopreventive Agent, Bioactive Compound from Natural Sources, Isolation, Characterization and Biological *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 209(9):p.45-20.
- Chen, T.R., Drabkowski, D., Hay, R.J., Macy, M. and Peterson, W. Jr., 1987, WiDr is a Derivative of Another Colon Adenocarcinoma Cell Line, HT-29, *Journal of Cancer Genet Cytogenet.*, 27(1):125-34.
- Chen, J.H., Shao, Y., Huang, M.T., Chin, C.K., Ho, C.T. 1996. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on human leukemia HL-60 cells. *Journal of Cancer Lett.* 108:211-214.

- Collins, K., Jacks, T., Pavletich, N.P. 1997. The cell cycle dan cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 2776-2778.
- Cushnie TP & Lamb AJ, 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*.26(5):p.343-56
- Dash, P. 2003. *Apoptosis*. Handbook of immunology. Second edition. New York. Basic Medical Sciences.
- Departemen Kesehatan RI (Depkes RI). 2009. *Profil Kesehatan Indonesia 2008*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Depkes, 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta : Depkes RI;p.6-10
- Depkes, 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*: Jakarta. Departemen Kesehatan RI;p.23-38
- Diana S, Halina C, Maria H, Jacek N.2012. The anticancer activity of propolis. *Folia hisyochemica et cytobiologica*. Vol 50, No 1,pp 25-37
- Dimov V, Ivanovska N, Bankova V, Nikolov N, Popov S, 1992. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of water-soluble derivative. *Vaccine 10*;p.817-23
- Dorundi, S and Banerjea, A. 2006. Colorectal Cancer: early diagnosing and predisposing causes. *Surgery*. 24:131-136.
- Dougherty, U., Mustafi, R., Wang, Y., Musch, M.W., Wang, C.H., Konda, V.J., *et al.* 2011. American ginseng suppresses Western diet-promoted tumorigenesis in model of inflammation-associated colon cancer: role of EFGR. *BMC*. 11(111): 1-11.
- El-Bassuony A & Abou Zid S, 2010. A new prenylated flavanoid with antibacterial activity from propolis collected in Egypt. *Natural Product Communications*.5(1):p.43-5
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.

- Eom, H.S., Lee, S.J., Yoon, B.S., Yoo, B.S. 2010. Propolis inhibit the proliferation of human leukemia HL-60 cells by inducing apoptosis through the mitochondrial pathway. *Nat Prod Res.* 24:375-386.
- Eray, M., Matto, M., Kaartinen, M., Anderson, L. C., Pelkonen, J. 2001. Flow cytometric analysis of apoptotic subpopulations with a combination of annexin V-FITC, propidium iodide, and SYTO 17. *Cytometry.* 43: 134-142.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. 2013. *Global cancer burden rises to 14,1 million new cases in 2012. Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base.* Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Fitzpatrick LR, Wang J, Le T, 2001. Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear transcription factor NF- κ B, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide- induced colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 299(3):p.915-20.
- Freshney, R.I. 2000. *Culture of Animal Cells : A Manual of Basic Techniques.* 4th Ed. Wiley-Lies. New York.
- Fu SH, Yang MH, Wen HM, Chern JC, 2005. Analysis of flavonoids in propolis by capillary electrophoresis. *Journal of Food and Drug Analysis.* 13(1):p.43-50
- Galati, G., Teng, S., Moridani, M.Y., Chan, T.S., O'Brien, P.J. 2000. Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metabol Drug Interact.* 17: 311-349.
- Gartel, A.L dan Radhakrishnan, S.K. 2005. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms and consequences. *Cancer Res.* 65 (10): 3980-3985.
- Gillham, C.M., Reynolds, J., Hollywood, D. 2007. Predicting the response of localised oesophageal cancer to neo-adjuvant chemoradiation. *WJSO.* 5(97): 1-11.
- Giovannetti, E., Backus, H.H.J., Wouters, D., Ferreira, C.G., van Houten, V.M.M. and Brakenhoff, R.H., 2007, Changes in the Status of p53 Affect Drug Sensitivity to Thymidylate Synthase (TS) Inhibitors by Altering TS Levels. *British J. Can.* 96:769-775.

- Goldie, J.H., 2001. Drug resisten in cancer: A Perspective. *Cancer dan Metastasis Rev.* 20:63-68.
- Gomez, C.A.M., Gómez, R.M., Arráez, R.D., Segura, C.A., Fernández, G.A. 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmac Bio Anal* 41:1220–34.
- Green, D.R and Reed, J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281(5381): 1309-1312.
- Hakem, R and Harrington, L. Cell death in Tannock, I.F., Hill, R.P., Bristow, R.G., Harrington, L. 2005. *The Basic Science of Oncology.* 4th Ed. McGraw-Hill.New York.
- Hoesada, I.,Sugiwantono, R., Theodora, I.,Saptojono, B, 2000. *Rahasia Kekayaan Alam Untuk Kesehatan.* Jakarta: High Desert:p.33-42.
- Ishiara M, Naoi K, Hashita M, Itoh Y, Suzui M. 2009.Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese andBrazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. *Oncol Rep.* 22: 349–354.
- Jansen, W.J.M., Zwart, B., Hulscher, S.T.M., Giaccone, Pinedo, H.M. and Boven, E., 1997. CPT-11 in Human Colon-Cancer Cell Lines and Xenografts: Characterization of Cellular Sensitivity Determinants. *Int. J. Cancer.* 70:335-340.
- Jemal, A., Tiwari, R.C., Murray, T., 2004. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 54:8-29.
- Kakizoe, T., 2003, *Chemoprevention of Cancer Focusing on Cinical Trial*, Nationa Cancer Center, *Jpn.J.Clin.Oncol*, 33(9): 421-442
- Kartal, M.,Yildiz, S.,Kaya, S.,Kurucu, S.,Topcu, G. 2003. Anti-microbial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *J Ethnopharmacol.* 86:69–73.
- Kazama, S., Ajioka, Y., Watanabe, H., *et al.* 2002. Not infrequent K-ras mutations in depressed type early colorectal carcinomas larger than 10 mm. *Jpn J Cancer Res.* 93:178-183.

- Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH, 2002. Effects of Compounds Found in Propolis on *Streptococcus mutans* Growth and on Glucosyl transferase Activity. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*;p.1302–9
- Krell, R. 1996. Propolis. Value Added Products From Bee keeping.*FAO Agricultural Service Bulletin*. Food and Agricultural Organization of The United Nation, number 124. P. 157-194.
- Kurniawati, A dan Tenggara, R. 2011. Pengaruh Asam Asetil Salisilat terhadap Penurunan Prevalensi Kanker Kolorektal. *CDK*. 186: 38(5): 350-352.
- Kubina, R., Dzik, A.K., Dziedzic, A., Bielec, B., Wojtczka, R.D., Buldok, R.J., Wyszynska, M., et al. 2015. The ethanol extract of polish propolis exhibits anti-proliferative and/or pro-apoptotic effect on HCT 116 colon cancer and Me45 malignant melanoma cell in vitro conditions. *Adv Clin Exp Med*. 24(2): 203-212.
- Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T, 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origin. *Food Chemistry*. 84:p.329-39
- Kumar, V., Cotran, R.S., Collins, T. 2005. *Neoplasia In Robins Pathologic Basis of Disease*, 7th ed. Philadelphia : W.B. Saunders, p.269-342.
- Leung, WK., Ho, KY., Kim WH., Lau Jy., Ong E., Hilmi I., et al. 2006. Colorectal neoplasia in Asia: a multicenter colonoscopy survey in symptomatic patients. *Gastrointestinal Endoscopy*. 64:751-759.
- Levrero, M., Laurenzi, V. De, Constanzo, A., Sabatini, S., Gong, J., Wang, J.Y.J. and Melino, G., 2000, The p53/p63/p73 Family of Transcription Factors: Overlapping and Distinct Functions. *Journal of Cell Science*. 113:1661-1670.
- Lie, H., Kapur, A., Yang, J.X., Srivastava, S., McLeod, D.G., Paredes-Guzman, J.F et al. 2007. Antiproliferation of human prostat cancer cell by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *Int J Oncol*; 31:601-06
- Liu, H.C., Chen, G.G., Vlantis, A.C., Leung, B.C.S., Tong, M.C.E. and van Hasselt, C.A., 2006, 5-Fluorouracil Mediates Apoptosis and G1/S Arrest in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma via a p53-Independent Pathway. *The Cancer Journal*. 12(6):482-493.

- Lotfy M, 2006. Review. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. *Asian Pacific Journal Cancer Preventions*. 7;p.22-31
- Luo, Q., Hu, D., Hu, S., Yan, M., Sun, Z., Chen, F. 2012. In vitro and In vivo anti-tumor effect of metformin as a novel therapeutic agent in human oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 12(517): 1-10.
- Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP *et al*, 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol*;74:p.105–12.
- McDonald, J. W and Pilgram, T.K. 1999. Nuclear expression of p53, p21 and cyclin D1 is increased in bronchioloalveolar carcinoma. *Histopathology*. 34: 439-446.
- Muli, E.M and Maingi, J.M. 2007. Antibacterial activity of *Apis mellifera* L. propolis collected in three regions of Kenya. *J. Venom Anim Toxins Trop*. 13(3):655-663.
- Mot, A.C., Damian, G., Sarbu, C., Silaghi, D.R. 2009. Redox reactivity in propolis: direct detection of free radicals in basic medium and interaction with hemoglobin. Department of Chemistry and Chemical Engineering, 'Babes-Bolyai' University, Cluj-Napoca, Romania. *Journal Medicine Food*. 14(6):267-74
- Motomura, M., Kwon, K.M., Suh, S.J. 2008. Propolis induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl-2/Bax regulation. *Environ Toxicol Pharmacol*. 26:61-67.
- Mouse, H.A., Tilaoui, M., Jaafari, A., M'barek L.A., Aboufatima, R., Chait A., *etal*. 2012. Evaluation of the in vitro and in vivo anticancer properties of Moroccan propolis extracts. *Rev Bras Farmacogn*; 22: 558-567.
- Nagata, S and Golstein, P. 1995. The Fas death factor. *Science*. 267:1449-1456.
- Nakajima, Y., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Mishima.S., Hara, H. 2009. Comparison of Bee Products Based on Assays of Antioxidant Capacities. Nagaragawa Research Center. Department of Biofunctional Evaluation, Molecular Pharmacology, Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1 Mitahora-higashi, Gifu 502-8585. Japan. Published online by *Journal BioMed Central Medicine*, 1472- 6882/9:4

- National Cancer Institute, 2009. *What is cancer?*. National Institute of Health. United States.
- Naithani, R., Huma, L.C., Moriarty, R.M., McCormick, D.L., Mehta, R.G. 2008. Comprehensive review of cancer chemopreventive agents evaluated in experimental carcinogenesis models and clinical trials. *Curr Med Chem.* 15: 1044-1071.
- NCCN Guidelines Version 3. 2015. *Colon Cancer.*
- Nkondjok, A., Shatenstein, B., Maisonnueuve, P., Ghadirian, P. 2003. Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. *Cancer Detection and Prevention.* 27:55-66.
- Noguchi, P., Wallace, R., Johnson, J., Early, E.M., O'Brien, S. and Ferrone, S. 1979. Characterization of the WiDr: a Human Colon Carcinoma Cell Line. *In Vitro.* 15(6):401-408.
- Okura, T., Gang, L., Kamitami, T., Wada, T., Okura, I., Wei, C.F., et al. 1996. Protection against Fas/Apo 1 and tumor necrosis factor mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol.* 157:4277-4281.
- Orsi RO, Funari SR, Soares A, Salvi SA, Oliveira SL, Sforcin JM *et al*, 2000. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous Animals and Toxins.* 6(2):205-19.
- Orsolich N, Terzic S, Sver L, Basic I. 2005. Honey-bee products in prevention and/or therapy of murine transplantable tumours. *J Sci Food Agric.* 85: 363-370.
- Ottaiano, A., Franco, R., Aiello, T.A., Liguori, G., Tatangelo, F., Delrio, P., Nasti, G., et al. 2006. Overexpression of both CXCR4 chemokine receptor 4 and vascular endothelial growth factor proteins predicts early distant relapse in stage II-III colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 12: 2795-2803.
- Palozza, P., Serini, S., Maggiano, N., Giuseppe, T., Navarra, P. and Ranelletti, F.O. 2005, β -Carotene Downregulates the Steady-State and Heregulin-Induced COX-2 Pathways in Colon Cancer Cells. *J.Nutr.* 135:129-136.

- Paulino, N., Abreu, S.R.L., Machado, G., Silveira, E. 2009. Scientific evidences to pharmacological anticancer action of *Baccharisdracunculifolia* Brazilian propolis. *Rev PesqInov Farm.* 1(1): 15-26.
- Pelengaris, S and Khan, M. 2006. *The Molecular Biology of Cancer*. Blackwell Publishing, Victoria.
- Pereira GCOR, Barchuk AR and Teixeira IRV, 2009. Environmental factors influencing propolis production by the honey bee *Apis mellifera* in Minas Gerais State, *Brazil. IBRA* 48 (3): p.176–80
- Pezzoli A., Matarese V., Rubini M., Simoni M., Caravelli GC., Stockbrugger R., *et al.* 2007. Colorectal cancer screening: Result of a 5-year program in asymptomatic subjects at increased risk. *Digestive and Liver Disease.* 39:33-39.
- Pollard, T.D and Earnshaw, W.C. 2008. *Cell Biology*, Elsevier Inc., Philadelphia.
- Pongsathon P and Chanpen C. 2014. Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pac J Trop Biomed.* 4(5): 337-344
- Popova MP, 2007. Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie* 38:p.306–11
- Premratanachai, P., Chanchao, C., 2014. Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 4(5): 337–344
- Raso, G.M., Meli, R., Carlo, G., Pacilio, M., Carlo, R. 2001. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci* 68(8):921–31.
- Robbins and Cotran. 2005. *Pathologic Basis of Disease*. 7th ed. WB Saunders Co. Philadelphia, p:309-13
- RS Kanker Dharmais, 2010. *Kanker tersering 2010*. Jakarta.
- Russo MW., Wei JT., Thiny MT., Gangarosa LM., Brown A., Ringel Y., *et al.* 2004. Digestive and liver diseases statistics. *Gastroenterology.* 126:1448-53.

- Salatino A, Teixeira EW, Negri G, and Message D, 2005. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2(1): p.33–8
- Santos, V.R., Vimenta, F.J., Aquirar, M.C., Carmo, Naves, M.D., 2005. *Oral Candidiasis Treatment with Brazilian Ethanol Propolis Extract. Department of Clinical Pathology and Surgery, Laboratory of Microbiology, Dentistry School, Minas Gerais Federal University. Brazil;p.128-34*
- Sarsono,SyarifahI dan Prasetyo DH, 2012. Identifikasi caffeic acid phenethyl ester ekstrak etanol propolis isolat gunung lawu. *Jurnal Bahan Alam Indonesia;p.12-19*
- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Maedows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., et al. 1997. Structure of BcL-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*. 275:983-986.
- Scapagnini, G., Foresti, R., Calabrese, V., Stella, G., Green, C.J., 2002. Caffeic Acid Phenethyl Ester and Curcumin: A Novel Class of Heme Oxygenase-1 Inducers. *Molecular Pharmacology Journal*. 61(3):554-561
- Schwartzman, R.A and Cidlowski, J.A. 1993. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*. 14: 133-151.
- Seeff, L.C., Pollack, L.A., Williams, K.N. 2006. Increased Use of Colorectal Cancer Tests-United States, 2002 and 2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 55:308-310.
- Sherr, C.J. 1996. Cancer Cell Cycles. *Science*. 274: 1672-1677.
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., Jemal, A. 2014. Cancer statistics.*CA Cancer J Clin*.64: 9-29.
- Sigmond, J., Backus, H.H., Wouters, D., Temmink, O.H., Jansen, G. and Peters, G.J. 2003. Induction of Resistance to the Multitargeted Antifolate Pemetrexed (ALIMTA) in WiDr Human Colon Cancer Cells is Associated with Thymidilate Synthase Overexpression, *Biochem. Pharmacol*.
- Sivasubramaniam L & Seshadri M, 2005. Bee PropolisAnd Its Medicinal Uses. *Pharmaceutical Reviews;p.3-6*

- Stellar, H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. 267: 1445-1449.
- Syamsudin, Wiryowidagdo, S., Simanjuntak, P., Heffen, W.L. 2009. Chemical composition of propolis from different region in java and their cytotoxic activity. *AJBB*. 5(4): 180-183.
- Torre, L.A., Bay, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Tieulent, J.L., Jemal, A. 2015. Global Cancer Statistic. *Ca Cancer J Clin*. 65: 87-108.
- Van Engeland, M., Nieland, L. J. W., Ramaekers, F. C. S., Schutte, B., Reutelingsperger, C. P. M. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 31: 1-9.
- Vatansever, H.S., Sorkun, K. Gurhan, S.I.D., Ozdal-Kurt, F., Turkoz, E., Gencay, O., Salih, B. 2010. Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochem*. 112: 546-556.
- Viuda MM, Ruiz-Navajas Y, Fern´andez-L´opez J, and P´erez-´Alvarez JA, 2008. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *Journal Of Food Science*;73(9):p.117-24
- Voight R, 1971. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Yogyakarta .UGM;p.560
- Wang, X dan Zhang, Y. 2014. Targeting mTOR network in colorectal cancer therapy. *World J Gastroenterol*. 20(15): 4178-4188.
- Watanabe, M.A.E., Amarante, M.K., Conti, B.J., Sforcin, J.M. 2011. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effect: a review. *JPP*. 63: 1378-1386.
- Winawer, S.J., Zauber, A.G., Gerdes, H., O'Brien, M.J., 1996. Risk of colorectal cancer in the families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*. 334:82-87.
- World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2003. *Human cancers by organ site; colorectal cancer*. In: Stewart BW, Kleihues P, eds. World cancer report. Lyon, France: IARC Press, p:198–202.

- Wyllie, A.H., Bellamy, C.O., Bubb, V.J., Clarke, A.R., Corbet, S., Curtis, L., et al. 1999. Apoptosis and carcinogenesis. *Br J Cancer*. 80(Suppl.1): 34-37.
- Wu, M., Ding, H.F., Fisher, D.E. 2001. *Apoptosis: Molecular Mechanisms*. In :Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group. London. United Kingdom.
- Wong, R.S.Y. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *JECCR*. 30(87): 1-14.
- Yamada, S., Ajioka, Y., Watanabe, H., 2001. Heterogeneity of p53 mutational status in intramucosal carcinoma of the colorectum. *Jpn J Cancer Res*. 92:161-166
- Zaeemzadeh, N, Hemmati, A., Arzi, A., Jalali, M., Rashidi, I.,2011. Protective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on Amiodarone-Induced Pulmonary Fibrosis in Rat. *Iranian Jour of Pharm Research*;10 (2):p. 321-8

Lampiran 1.
Ethical Clearance

HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
Dr. Moewardi General Hospital
RSUD Dr. Moewardi

School of Medicine SebelasMaret University
Fakultas Kedokteran Universitas sebelas Maret

ETHICAL CLEARANCE
KELAIKAN ETIK

Nomor : 363/ IV / HREC /2016

The Health Research Ethics Committee Dr. Moewardi General Hospital / School of Medicine Sebelas
Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi / Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret

Maret University Of Surakarta, after reviewing the proposal design, herewith to certify
Surakarta, setelah menelaah rancangan penelitian yang diusulkan, dengan ini menyatakan:

That the research proposal with topic:
Bahwa usulan penelitian dengan judul

PENGARUH EKSTRAK PROPOLIS TERHADAP PENEKANAN EKSPRESI PROTEIN CYCLIN D1, PENEKANAN EKSPRESI PROTEIN BCL2 DAN INDUKSI APOPTOSIS PADA KULTUR SEL KANKER KOLON (CELL LINE WDR)

Principal investigator : dr. Haryono Yunianto
Peneliti Utama : 5501202029

Location Of Research : Lab. Parasitologi FK UGM
Lokasi Tempat Penelitian

Is ethically approved
Dinyatakan laik etik

Issued on : 22 April 2016


Drs. Hani Wulandari, dr. Sc.F.M.M.
NIP. 19621022 199503 1 001

Lampiran 2

Sertifikat Kursus Kultur Sel

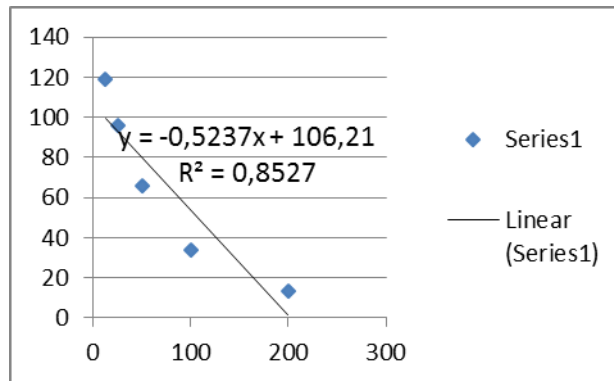


Lampiran 3.

Analisis regresi linear dengan Ms Excel untuk menentukan IC50 EEP

1. Menentukan IC50 EEP untuk setiap ulangan.

12,5	25	50	100	200
118,86	95,84	66,02	34,12	13,31

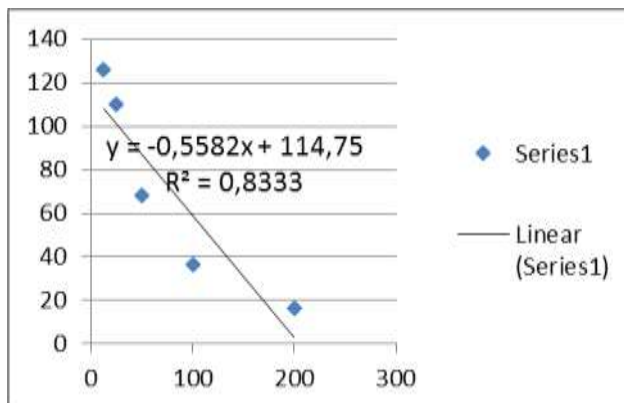


$$y = -0,523x + 106,2$$

$$50 = -0,523x + 106,2$$

$$x = 107,46$$

12,5	25	50	100	200
126,24	109,77	68,08	36,73	16,62

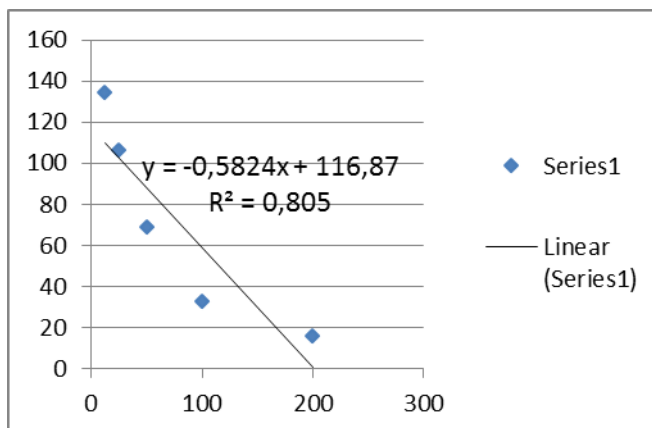


$$y = -0,558x + 114,7$$

$$50 = -0,558x + 114,7$$

$$x = 196,59$$

12,5 25 50 100 200
 134,69 106,18 69,23 32,58 15,99



$$Y = -0,582x + 116,8$$

$$50 = -0,582x + 116,8$$

$$X = 114,77$$

2. Menghitung rata-rata IC50 dari tiga pengulangan

Konsentrasi (mM)		200	100	50	25	12,5	KS	IC50
Ulangan	1	13,31	34,12	66,02	95,84	118,86	100,00	107,46
	2	16,62	36,73	68,08	109,77	126,24	100,00	196,59
	3	15,99	32,58	69,23	106,18	134,69	100,00	114,77
	Rata-rata	15,31	34,48	67,78	103,93	126,60	100,00	139,61
	SD	1,75	2,10	1,63	7,23	7,92	0,00	49,48

Lampiran 4.

Analisis statistik untuk memastikan kemaknaan perbedaan ekspresi cyclin D1 dan protein *Bcl2* pada sel *WiDr* pada kelima kelompok.

Kelompok

Case Processing Summary

Kelompok		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
ekspresiBcl2	dosis 1/2	15	100,0%	0	,0%	15	100,0%
	dosis 1	15	100,0%	0	,0%	15	100,0%
	dosis 2x	15	100,0%	0	,0%	15	100,0%
	kontrol positif	15	100,0%	0	,0%	15	100,0%
	kontrol negatif	15	100,0%	0	,0%	15	100,0%
ekspresiCyclinD1	dosis 1/2	15	100,0%	0	,0%	15	100,0%
	dosis 1	15	100,0%	0	,0%	15	100,0%
	dosis 2x	15	100,0%	0	,0%	15	100,0%
	kontrol positif	15	100,0%	0	,0%	15	100,0%
	kontrol negatif	15	100,0%	0	,0%	15	100,0%

Descriptives

Kelompok			Statistic	Std. Error
ekspresiBcl2	dosis 1/2	Mean	24,2793	,73686
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	22,6989
		Upper Bound	25,8597	
		5% Trimmed Mean	24,1531	
		Median	23,8100	
		Variance	8,145	
		Std. Deviation	2,85386	
		Minimum	20,83	
		Maximum	30,00	
		Range	9,17	

	Interquartile Range		4,35	
	Skewness		,681	,580
	Kurtosis		-,369	1,121
dosis 1	Mean		33,7600	,62119
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	32,4277	
		Upper Bound	35,0923	
	5% Trimmed Mean		33,5911	
	Median		33,3300	
	Variance		5,788	
	Std. Deviation		2,40587	
	Minimum		30,56	
	Maximum		40,00	
	Range		9,44	
	Interquartile Range		2,73	
	Skewness		1,346	,580
	Kurtosis		2,287	1,121
dosis 2x	Mean		60,6360	,55370
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	59,4484	
		Upper Bound	61,8236	
	5% Trimmed Mean		60,5772	
	Median		60,6700	
	Variance		4,599	
	Std. Deviation		2,14445	
	Minimum		57,94	
	Maximum		64,39	
	Range		6,45	
	Interquartile Range		3,98	
	Skewness		,370	,580
	Kurtosis		-1,020	1,121
kontrol positif	Mean		12,7353	1,35779

		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	9,8232	
			Upper Bound	15,6475	
		5% Trimmed Mean		12,2854	
		Median		11,1100	
		Variance		27,654	
		Std. Deviation		5,25871	
		Minimum		5,00	
		Maximum		28,57	
		Range		23,57	
		Interquartile Range		4,29	
		Skewness		1,961	,580
		Kurtosis		5,872	1,121
	kontrol negatif	Mean		83,3987	,32916
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	82,6927	
			Upper Bound	84,1046	
		5% Trimmed Mean		83,5130	
		Median		83,7200	
		Variance		1,625	
		Std. Deviation		1,27483	
		Minimum		79,50	
		Maximum		85,24	
		Range		5,74	
		Interquartile Range		1,07	
		Skewness		-2,029	,580
		Kurtosis		6,451	1,121
ekspresiCyclinD1	dosis 1/2	Mean		61,4380	,74240
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	59,8457	
			Upper Bound	63,0303	
		5% Trimmed Mean		61,3889	

	Median		61,5400	
	Variance		8,267	
	Std. Deviation		2,87529	
	Minimum		56,62	
	Maximum		67,14	
	Range		10,52	
	Interquartile Range		1,72	
	Skewness		-,127	,580
	Kurtosis		,302	1,121
dosis 1	Mean		36,6640	,95177
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	34,6227	
		Upper Bound	38,7053	
	5% Trimmed Mean		36,5739	
	Median		36,0000	
	Variance		13,588	
	Std. Deviation		3,68619	
	Minimum		31,71	
	Maximum		43,24	
	Range		11,53	
	Interquartile Range		7,21	
	Skewness		,414	,580
	Kurtosis		-1,255	1,121
dosis 2x	Mean		24,4980	1,19478
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	21,9355	
		Upper Bound	27,0605	
	5% Trimmed Mean		24,2400	
	Median		22,7300	
	Variance		21,412	
	Std. Deviation		4,62735	

	Minimum		19,64	
	Maximum		34,00	
	Range		14,36	
	Interquartile Range		5,08	
	Skewness		1,040	,580
	Kurtosis		,055	1,121
kontrol positif	Mean		13,4160	,93801
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	11,4042	
		Upper Bound	15,4278	
	5% Trimmed Mean		13,6100	
	Median		14,2900	
	Variance		13,198	
	Std. Deviation		3,63291	
	Minimum		6,67	
	Maximum		16,67	
	Range		10,00	
	Interquartile Range		4,17	
	Skewness		-1,215	,580
	Kurtosis		,124	1,121
kontrol negatif	Mean		83,7713	,37990
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	82,9565	
		Upper Bound	84,5861	
	5% Trimmed Mean		83,7781	
	Median		83,3300	
	Variance		2,165	
	Std. Deviation		1,47136	
	Minimum		80,91	
	Maximum		86,51	
	Range		5,60	

Interquartile Range	1,90	
Skewness	,291	,580
Kurtosis	,141	1,121

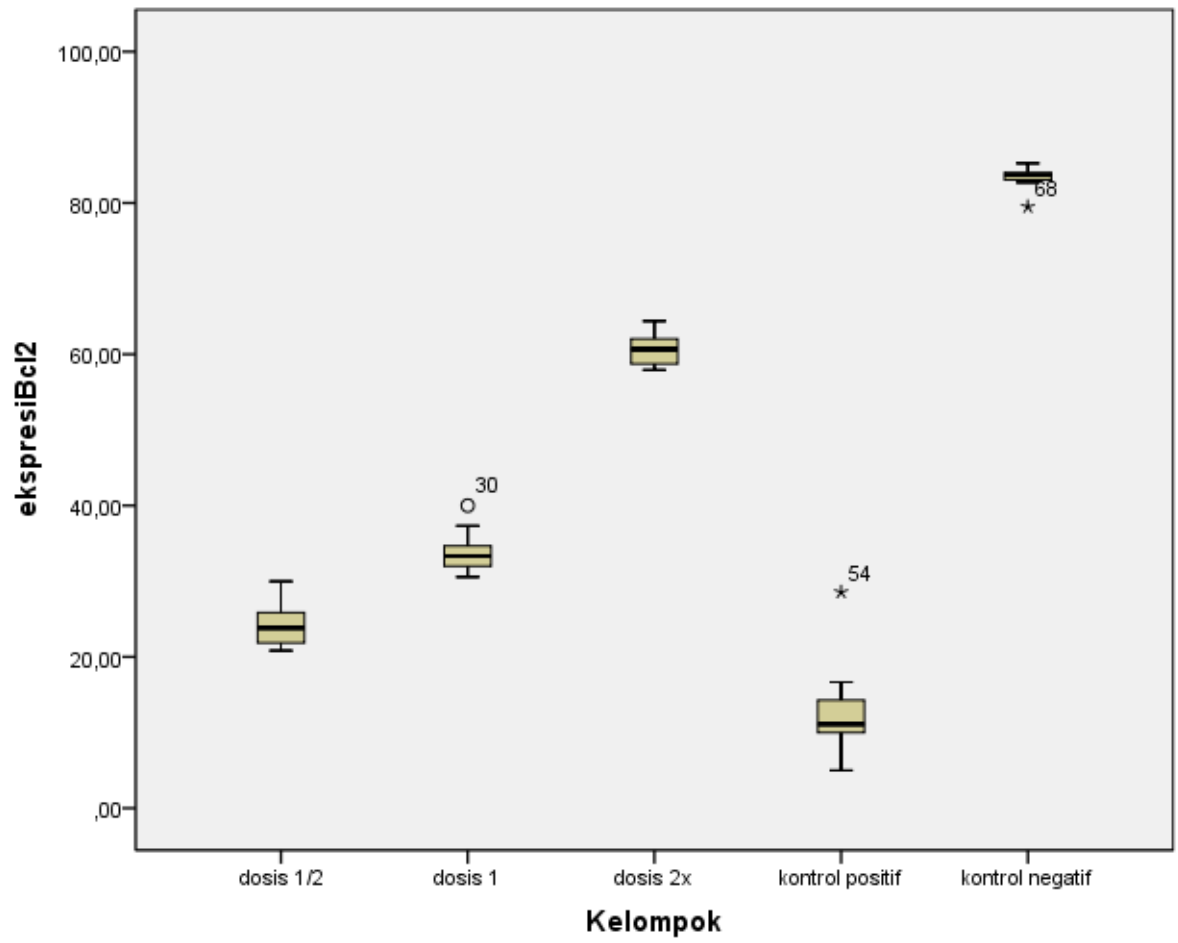
Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
ekspresiBcl2	dosis 1/2	,165	15	,200*	,914	15	,155
	dosis 1	,212	15	,069	,890	15	,067
	dosis 2x	,139	15	,200*	,931	15	,282
	kontrol positif	,204	15	,094	,797	15	,003
	kontrol negatif	,228	15	,035	,801	15	,004
ekspresiCyclinD1	dosis 1/2	,223	15	,044	,904	15	,108
	dosis 1	,219	15	,051	,910	15	,135
	dosis 2x	,212	15	,069	,863	15	,027
	kontrol positif	,262	15	,007	,778	15	,002
	kontrol negatif	,156	15	,200*	,951	15	,538

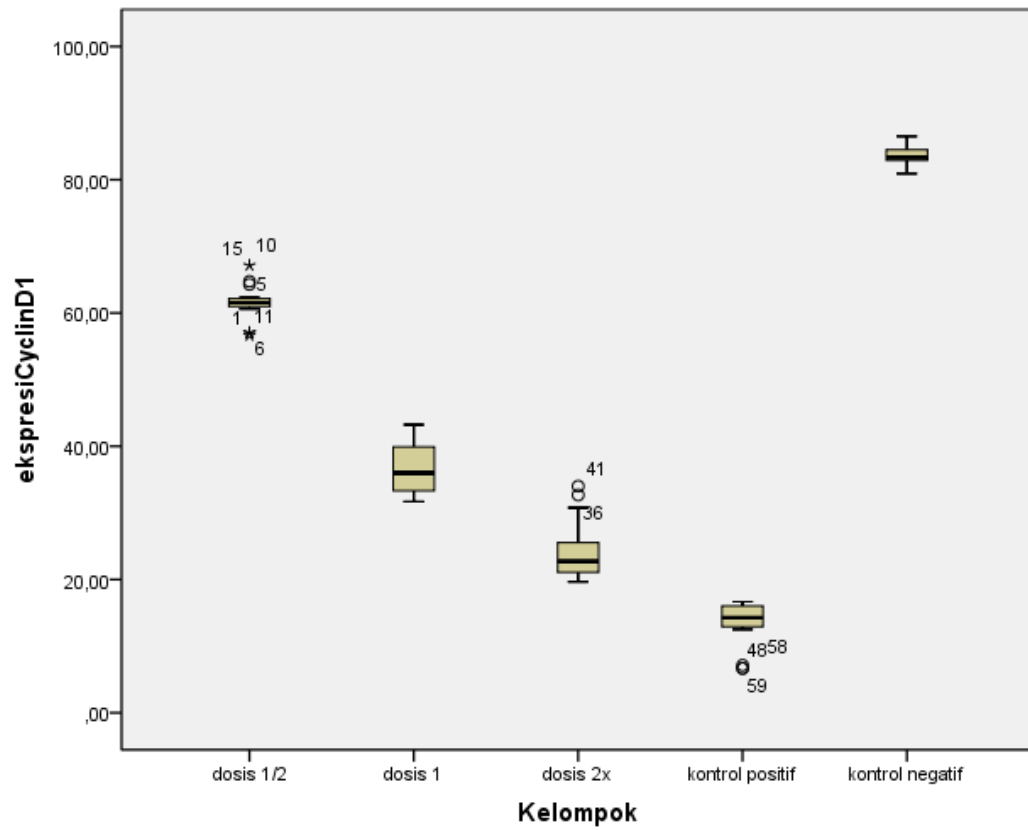
a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Ekspresi *Bcl2*



Ekspresi *Cyclin D1*



	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
ekspresiBcl2	75	42,9619	26,01775	5,00	85,24
ekspresiCyclinD1	75	43,9575	25,90294	6,67	86,51
Kelompok	75	3,0000	1,42374	1,00	5,00

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank
ekspresiBcl2	dosis 1/2	15	22,13
	dosis 1	15	38,00
	dosis 2x	15	53,00
	kontrol positif	15	8,87
	kontrol negatif	15	68,00
	Total	75	
ekspresiCyclinD1	dosis 1/2	15	53,00
	dosis 1	15	37,60
	dosis 2x	15	23,40
	kontrol positif	15	8,00
	kontrol negatif	15	68,00
	Total	75	

Test Statistics^{a,b}

	ekspresiBcl2	ekspresiCyclinD 1
Chi-Square	70,305	70,727
df	4	4
Asymp. Sig.	,000	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

Mann-Whitney Test

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ekspresiBcl2	dosis 1/2	15	8,00	120,00
	dosis 1	15	23,00	345,00

	Total	30		
ekspresiCyclinD1	dosis 1/2	15	23,00	345,00
	dosis 1	15	8,00	120,00
	Total	30		

Test Statistics^b

	ekspresiBcl2	ekspresiCyclinD 1
Mann-Whitney U	,000	,000
Wilcoxon W	120,000	120,000
Z	-4,669	-4,676
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Mann-Whitney Test

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ekspresiBcl2	dosis 1/2	15	8,00	120,00
	dosis 2x	15	23,00	345,00
	Total	30		
ekspresiCyclinD1	dosis 1/2	15	23,00	345,00
	dosis 2x	15	8,00	120,00
	Total	30		

Test Statistics^b

	ekspresiBcl2	ekspresiCyclinD 1
Mann-Whitney U	,000	,000
Wilcoxon W	120,000	120,000
Z	-4,667	-4,673
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a

Test Statistics^b

	ekspresiBcl2	ekspresiCyclinD 1
Mann-Whitney U	,000	,000
Wilcoxon W	120,000	120,000
Z	-4,667	-4,673
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Mann-Whitney Test**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ekspresiBcl2	dosis 1/2	15	22,13	332,00
	kontrol positif	15	8,87	133,00
	Total	30		
ekspresiCyclinD1	dosis 1/2	15	23,00	345,00
	kontrol positif	15	8,00	120,00
	Total	30		

Test Statistics^b

	ekspresiBcl2	ekspresiCyclinD 1
Mann-Whitney U	13,000	,000
Wilcoxon W	133,000	120,000
Z	-4,134	-4,678
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Mann-Whitney Test

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ekspresiBcl2	dosis ½	15	8,00	120,00
	kontrol negatif	15	23,00	345,00
	Total	30		
ekspresiCyclinD1	dosis ½	15	8,00	120,00
	kontrol negatif	15	23,00	345,00
	Total	30		

Test Statistics^b

	ekspresiBcl2	ekspresiCyclinD 1
Mann-Whitney U	,000	,000
Wilcoxon W	120,000	120,000
Z	-4,669	-4,671
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Mann-Whitney Test

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ekspresiBcl2	dosis 1	15	8,00	120,00
	dosis 2x	15	23,00	345,00
	Total	30		
ekspresiCyclinD1	dosis 1	15	22,60	339,00
	dosis 2x	15	8,40	126,00
	Total	30		

Test Statistics^b

	ekspresiBcl2	ekspresiCyclinD 1
Mann-Whitney U	,000	6,000
Wilcoxon W	120,000	126,000
Z	-4,670	-4,426
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Mann-Whitney Test**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ekspresiBcl2	dosis 1	15	23,00	345,00
	kontrol positif	15	8,00	120,00
	Total	30		
ekspresiCyclinD1	dosis 1	15	23,00	345,00
	kontrol positif	15	8,00	120,00
	Total	30		

Test Statistics^b

	ekspresiBcl2	ekspresiCyclinD 1
Mann-Whitney U	,000	,000
Wilcoxon W	120,000	120,000
Z	-4,676	-4,681
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Mann-Whitney Test**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ekspresiBcl2	dosis 1	15	8,00	120,00

	kontrol negatif	15	23,00	345,00
	Total	30		
ekspresiCyclinD1	dosis 1	15	8,00	120,00
	kontrol negatif	15	23,00	345,00
	Total	30		

Test Statistics^b

	ekspresiBcl2	ekspresiCyclinD 1
Mann-Whitney U	,000	,000
Wilcoxon W	120,000	120,000
Z	-4,671	-4,674
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Mann-Whitney Test

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ekspresiBcl2	dosis 2x	15	23,00	345,00
	kontrol positif	15	8,00	120,00
	Total	30		
ekspresiCyclinD1	dosis 2x	15	23,00	345,00
	kontrol positif	15	8,00	120,00
	Total	30		

Test Statistics^b

	ekspresiBcl2	ekspresiCyclinD 1
Mann-Whitney U	,000	,000
Wilcoxon W	120,000	120,000
Z	-4,675	-4,678
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a

Test Statistics^b

	ekspresiBcl2	ekspresiCyclinD 1
Mann-Whitney U	,000	,000
Wilcoxon W	120,000	120,000
Z	-4,675	-4,678
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Mann-Whitney Test**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ekspresiBcl2	dosis 2x	15	8,00	120,00
	kontrol negatif	15	23,00	345,00
	Total	30		
ekspresiCyclinD1	dosis 2x	15	8,00	120,00
	kontrol negatif	15	23,00	345,00
	Total	30		

Test Statistics^b

	ekspresiBcl2	ekspresiCyclinD 1
Mann-Whitney U	,000	,000
Wilcoxon W	120,000	120,000
Z	-4,670	-4,671
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Mann-Whitney Test**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
ekspresiBcl2	kontrol positif	15	8,00	120,00

	kontrol negatif	15	23,00	345,00
	Total	30		
ekspresiCyclinD1	kontrol positif	15	8,00	120,00
	kontrol negatif	15	23,00	345,00
	Total	30		

Test Statistics^b

	ekspresiBcl2	ekspresiCyclinD 1
Mann-Whitney U	,000	,000
Wilcoxon W	120,000	120,000
Z	-4,676	-4,676
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	,000 ^a

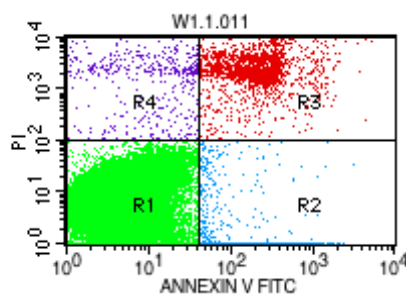
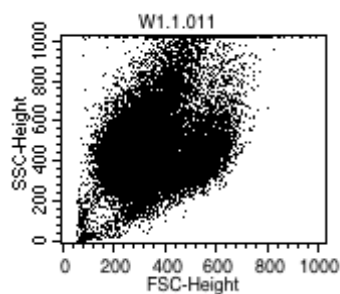
a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

Lampiran 5.

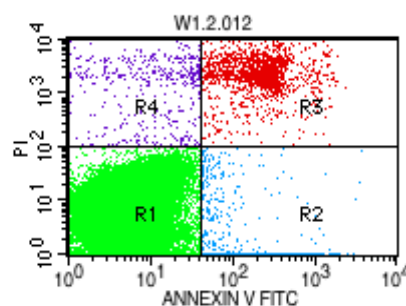
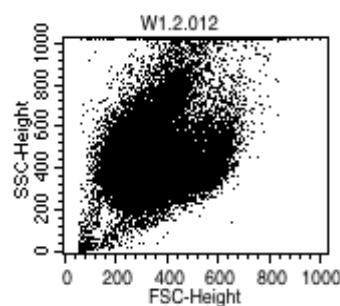
Hasil *flowcytometry* distribusi sel *WiDr* pada kelima kelompok perlakuan setelah inkubasi 48 jam

Kontrol Sel



Sample ID: W1.1
Patient ID: 0616.16
Acquisition Date: 16-Jun-16
Total Events: 50000

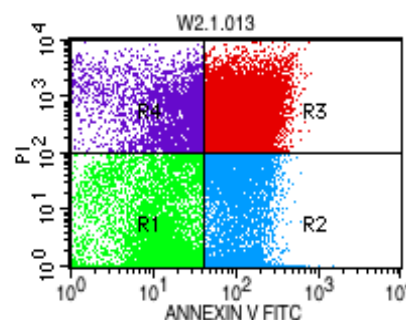
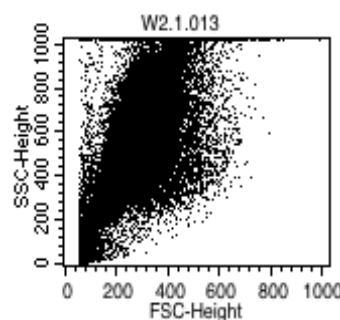
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	602	1.20	1.20
UR	2108	4.22	4.22
LL	46495	92.99	92.99
LR	795	1.59	1.59



Sample ID: W1.2
Patient ID: 0616.16
Acquisition Date: 16-Jun-16
Total Events: 50000

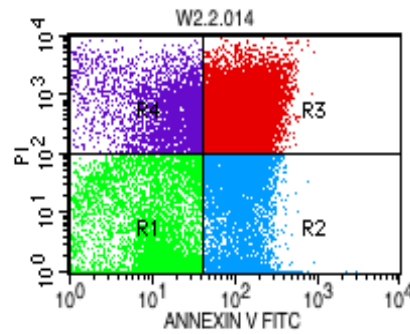
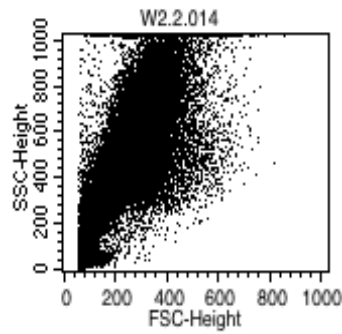
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	577	1.15	1.15
UR	1945	3.89	3.89
LL	46718	93.44	93.44
LR	760	1.52	1.52

$\frac{1}{2}$ IC₅₀



Sample ID: W2.1
Patient ID: 0616.16
Acquisition Date: 16-Jun-16
Total Events: 50000

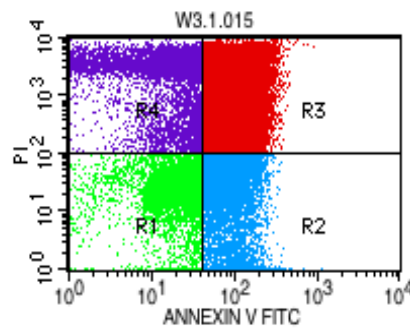
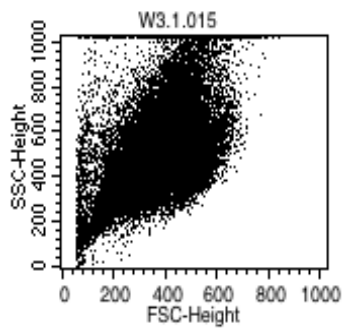
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	4553	9.11	9.11
UR	18771	37.54	37.54
LL	9417	18.83	18.83
LR	17259	34.52	34.52



Sample ID: W2.2
 Patient ID: 0616.16
 Acquisition Date: 16-Jun-16
 Total Events: 50000

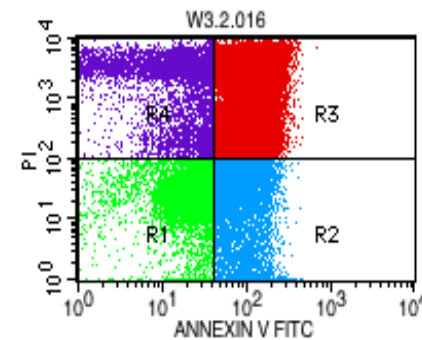
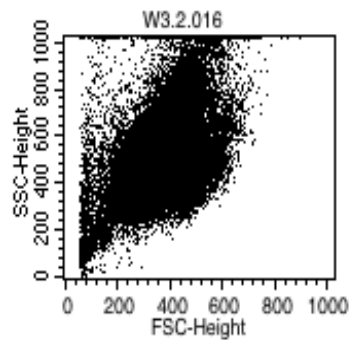
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	4646	9.29	9.29
UR	19073	38.15	38.15
LL	8172	16.34	16.34
LR	18109	36.22	36.22

IC₅₀



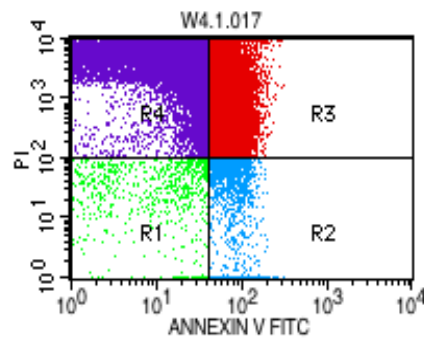
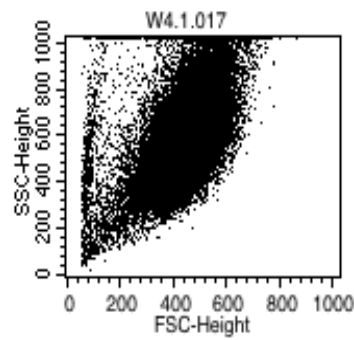
Sample ID: W3.1
 Patient ID: 0616.16
 Acquisition Date: 16-Jun-16
 Total Events: 50000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	7788	15.58	15.58
UR	24048	48.10	48.10
LL	7699	15.40	15.40
LR	10465	20.93	20.93



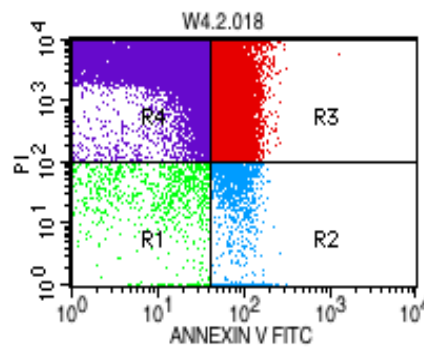
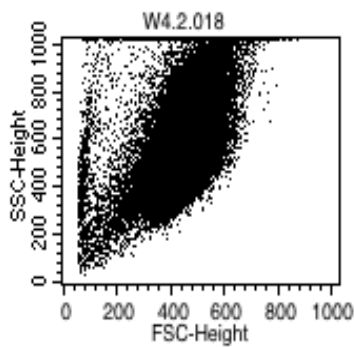
Sample ID: W3.2
 Patient ID: 0616.16
 Acquisition Date: 16-Jun-16
 Total Events: 50000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	7521	15.04	15.04
UR	24251	48.50	48.50
LL	7288	14.58	14.58
LR	10940	21.88	21.88

2IC₅₀

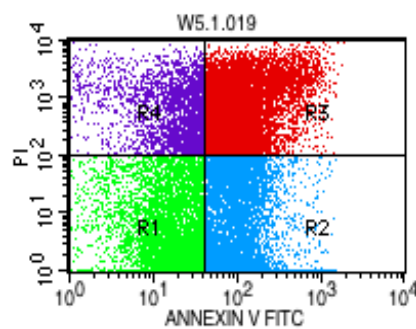
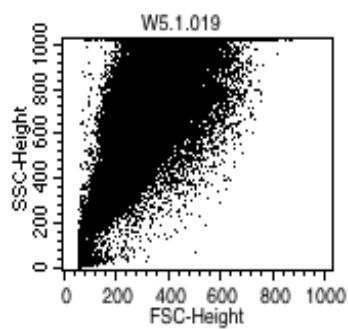
Sample ID: W4.1
 Patient ID: 0616.16
 Acquisition Date: 16-Jun-16
 Total Events: 50000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	22675	45.35	45.35
UR	24682	49.36	49.36
LL	1038	2.08	2.08
LR	1605	3.21	3.21



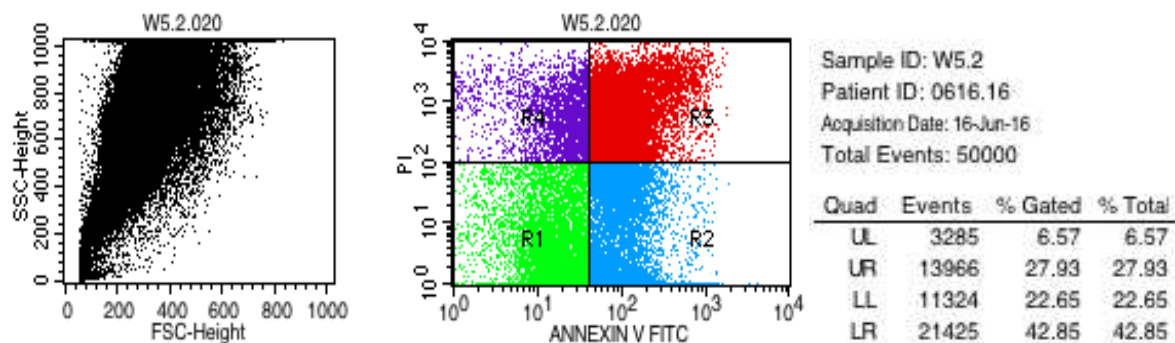
Sample ID: W4.2
 Patient ID: 0616.16
 Acquisition Date: 16-Jun-16
 Total Events: 50000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	22773	45.55	45.55
UR	24600	49.20	49.20
LL	1115	2.23	2.23
LR	1512	3.02	3.02

5FU IC₅₀

Sample ID: W5.1
 Patient ID: 0616.16
 Acquisition Date: 16-Jun-16
 Total Events: 50000

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	3198	6.40	6.40
UR	13496	26.99	26.99
LL	11568	23.14	23.14
LR	21738	43.48	43.48



Ringkasan persentase morfologi Sel *WiDr* pada kelima kelompok perlakuan dengan metode *flowcytometri*.

	Konsentrasi	Persentase jumlah sel <i>WiDr</i> (%)											
		Hidup				Apoptosis				Nekrosis			
		1	2	Rata-rata	SD	1	2	Rata-rata	SD	1	2	Rata-rata	SD
Kontrol Sel	0	92,99	93,44	93,215	0,32	1,59	1,52	1,555	0,05	4,22	3,89	4,06	0,23
EEP	70 (1/2 IC ₅₀)	18,83	16,34	17,585	1,76	34,52	36,22	35,37	1,20	37,5	38,2	37,85	0,43
EEP	140 (IC ₅₀)	15,4	14,58	14,99	0,58	20,93	21,88	21,405	0,67	48,1	48,5	48,30	0,28
EEP	280 (2 IC ₅₀)	2,08	2,23	2,155	0,11	3,21	3,02	3,115	0,13	49,4	49,2	49,28	0,11
5FU	500 (IC ₅₀)	23,14	22,65	22,895	0,35	43,48	42,85	43,165	0,45	27	27,9	27,46	0,66

Lampiran 6.

Analisis statistik untuk memastikan kemaknaan perbedaan persentase apoptosis sel *WiDr* pada kelima kelompok perlakuan.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
apoptosis	10	100.0%	0	0.0%	10	100.0%
nekrosis	10	100.0%	0	0.0%	10	100.0%
hidup	10	100.0%	0	0.0%	10	100.0%

Descriptives

		Statistic	Std. Error	
apoptosis	Mean	20.9220	5.57167	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	8.3180	
		Upper Bound	33.5260	
	5% Trimmed Mean	20.7467		
	Median	21.4050		
	Variance	310.435		
	Std. Deviation	17.61916		
	Minimum	1.52		
	Maximum	43.48		
	Range	41.96		
	Interquartile Range	35.21		
	Skewness	.058	.687	
	Kurtosis	-1.935	1.334	
nekrosis	Mean	33.3880	5.55926	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	20.8121	
		Upper Bound	45.9639	
	5% Trimmed Mean	34.1394		
	Median	37.8450		

	Variance		309.054	
	Std. Deviation		17.57992	
	Minimum		3.89	
	Maximum		49.36	
	Range		45.47	
	Interquartile Range		27.38	
	Skewness		-.922	.687
	Kurtosis		-.430	1.334
hidup	Mean		30.1680	10.75287
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	5.8433	
		Upper Bound	54.4927	
	5% Trimmed Mean		28.2133	
	Median		17.5850	
	Variance		1156.242	
	Std. Deviation		34.00355	
	Minimum		2.08	
	Maximum		93.44	
	Range		91.36	
	Interquartile Range		29.11	
	Skewness		1.573	.687
	Kurtosis		1.048	1.334

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
apoptosis	.243	10	.098	.847	10	.053
nekrosis	.199	10	.200	.828	10	.032
hidup	.382	10	.000	.696	10	.001

Descriptives

Kelompok			Statistic	Std. Error
apoptosis	EEP70	Mean	35.3700	.85000

	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	24.5697	
		Upper Bound	46.1703	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		35.3700	
	Variance		1.445	
	Std. Deviation		1.20208	
	Minimum		34.52	
	Maximum		36.22	
	Range		1.70	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		.	.
	Kurtosis		.	.
EEP140	Mean		21.4050	.47500
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	15.3696	
		Upper Bound	27.4404	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		21.4050	
	Variance		.451	
	Std. Deviation		.67175	
	Minimum		20.93	
	Maximum		21.88	
	Range		.95	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		.	.
	Kurtosis		.	.
EEP280	Mean		3.1150	.09500
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.9079	
		Upper Bound	4.3221	
	5% Trimmed Mean		.	

	Median		3.1150	
	Variance		.018	
	Std. Deviation		.13435	
	Minimum		3.02	
	Maximum		3.21	
	Range		.19	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		.	.
	Kurtosis		.	.
Kontrol Sel	Mean		43.1650	.31500
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	39.1625	
		Upper Bound	47.1675	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		43.1650	
	Variance		.198	
	Std. Deviation		.44548	
	Minimum		42.85	
	Maximum		43.48	
	Range		.63	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		.	.
	Kurtosis		.	.
5FU500	Mean		1.5550	.03500
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.1103	
		Upper Bound	1.9997	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		1.5550	
	Variance		.002	
	Std. Deviation		.04950	

		Minimum	1.52	
		Maximum	1.59	
		Range	.07	
		Interquartile Range	.	
		Skewness	.	.
		Kurtosis	.	.
nekrosis	EEP70	Mean	37.8450	.30500
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 33.9696 Upper Bound 41.7204	
		5% Trimmed Mean	.	
		Median	37.8450	
		Variance	.186	
		Std. Deviation	.43134	
		Minimum	37.54	
		Maximum	38.15	
		Range	.61	
		Interquartile Range	.	
		Skewness	.	.
		Kurtosis	.	.
	EEP140	Mean	48.3000	.20000
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 45.7588 Upper Bound 50.8412	
		5% Trimmed Mean	.	
		Median	48.3000	
		Variance	.080	
		Std. Deviation	.28284	
		Minimum	48.10	
		Maximum	48.50	
		Range	.40	
		Interquartile Range	.	
		Skewness	.	.

	Kurtosis		.	.
EEP280	Mean		49.2800	.08000
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	48.2635	
		Upper Bound	50.2965	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		49.2800	
	Variance		.013	
	Std. Deviation		.11314	
	Minimum		49.20	
	Maximum		49.36	
	Range		.16	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		.	.
	Kurtosis		.	.
Kontrol Sel	Mean		27.4600	.47000
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	21.4881	
		Upper Bound	33.4319	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		27.4600	
	Variance		.442	
	Std. Deviation		.66468	
	Minimum		26.99	
	Maximum		27.93	
	Range		.94	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		.	.
	Kurtosis		.	.
5FU500	Mean		4.0550	.16500
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.9585	
		Upper Bound	6.1515	
	5% Trimmed Mean		.	

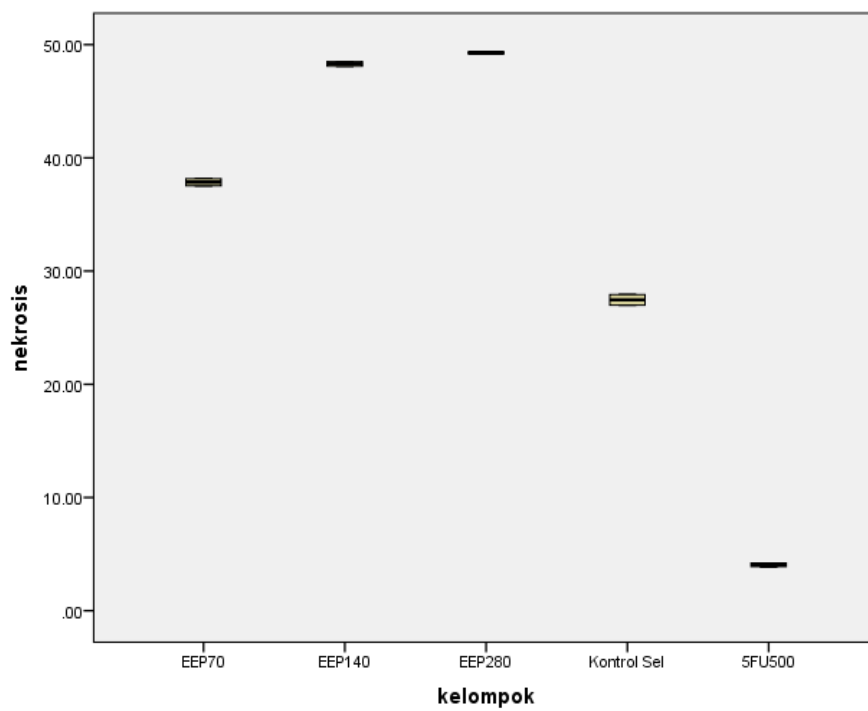
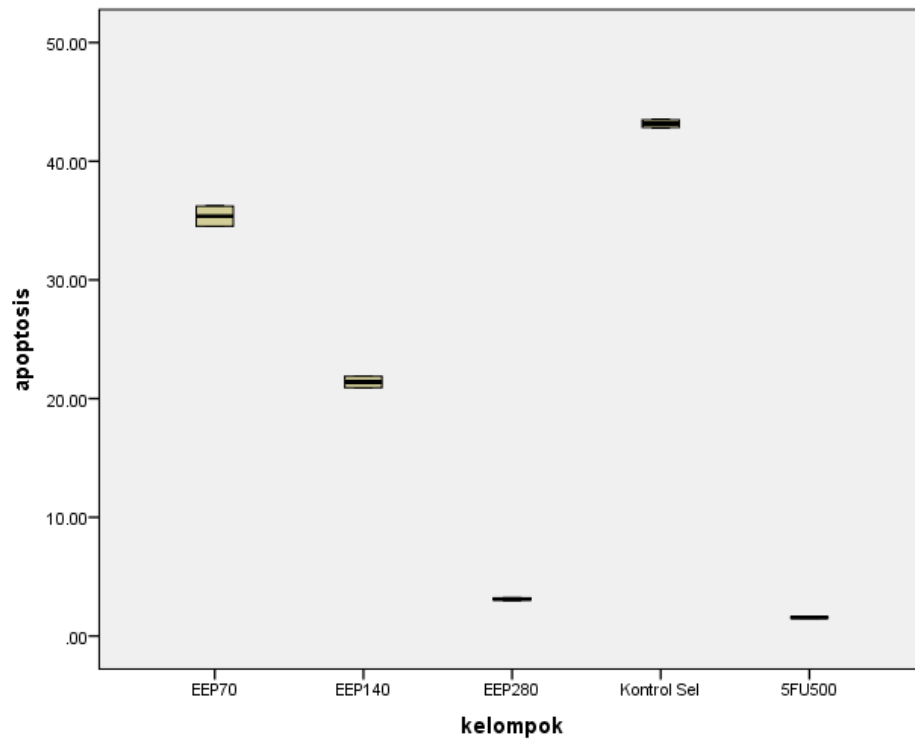
		Median	4.0550	
		Variance	.054	
		Std. Deviation	.23335	
		Minimum	3.89	
		Maximum	4.22	
		Range	.33	
		Interquartile Range	.	
		Skewness	.	.
		Kurtosis	.	.
hidup	EEP70	Mean	17.5850	1.24500
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 1.7658 Upper Bound 33.4042	
		5% Trimmed Mean	.	
		Median	17.5850	
		Variance	3.100	
		Std. Deviation	1.76070	
		Minimum	16.34	
		Maximum	18.83	
		Range	2.49	
		Interquartile Range	.	
		Skewness	.	.
		Kurtosis	.	.
	EEP140	Mean	14.9900	.41000
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 9.7805 Upper Bound 20.1995	
		5% Trimmed Mean	.	
		Median	14.9900	
		Variance	.336	
		Std. Deviation	.57983	
		Minimum	14.58	

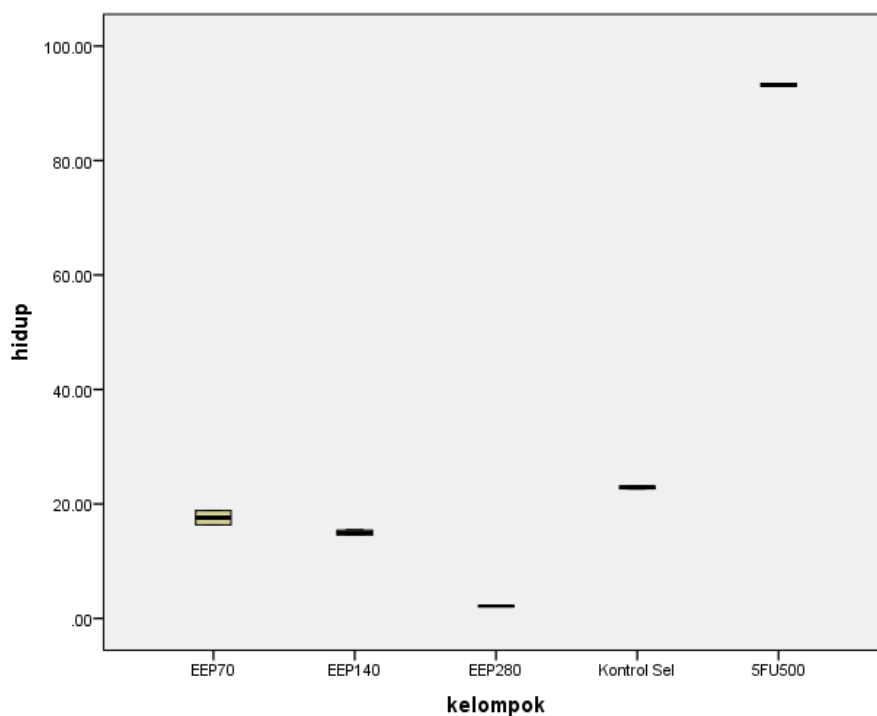
	Maximum		15.40	
	Range		.82	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		.	.
	Kurtosis		.	.
EEP280	Mean		2.1550	.07500
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.2020	
		Upper Bound	3.1080	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		2.1550	
	Variance		.011	
	Std. Deviation		.10607	
	Minimum		2.08	
	Maximum		2.23	
	Range		.15	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		.	.
	Kurtosis		.	.
Kontrol Sel	Mean		22.8950	.24500
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	19.7820	
		Upper Bound	26.0080	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		22.8950	
	Variance		.120	
	Std. Deviation		.34648	
	Minimum		22.65	
	Maximum		23.14	
	Range		.49	
	Interquartile Range		.	

	Skewness		.	.
	Kurtosis		.	.
5FU500	Mean		93.2150	.22500
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	90.3561	
		Upper Bound	96.0739	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		93.2150	
	Variance		.101	
	Std. Deviation		.31820	
	Minimum		92.99	
	Maximum		93.44	
	Range		.45	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		.	.
	Kurtosis		.	.

Tests of Normality

	kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a		
		Statistic	Df	Sig.
apoptosis	EEP70	.260	2	.
	EEP140	.260	2	.
	EEP280	.260	2	.
	Kontrol Sel	.260	2	.
	5FU500	.260	2	.
nekrosis	EEP70	.260	2	.
	EEP140	.260	2	.
	EEP280	.260	2	.
	Kontrol Sel	.260	2	.
	5FU500	.260	2	.
hidup	EEP70	.260	2	.
	EEP140	.260	2	.
	EEP280	.260	2	.
	Kontrol Sel	.260	2	.
	5FU500	.260	2	.





ANOVA

apoptosis

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2791.798	4	697.949	1649.843	.000
Within Groups	2.115	5	.423		
Total	2793.913	9			

Post Hoc Tests

Dependent Variable: apoptosis

LSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
EEP70	EEP140	13.96500	.65042	.000	12.2931	15.6369
	EEP280	32.25500	.65042	.000	30.5831	33.9269
	Kontrol Sel	-7.79500	.65042	.000	-9.4669	-6.1231
	5FU500	33.81500	.65042	.000	32.1431	35.4869
EEP140	EEP70	-13.96500	.65042	.000	-15.6369	-12.2931
	EEP280	18.29000	.65042	.000	16.6181	19.9619
	Kontrol Sel	-21.76000	.65042	.000	-23.4319	-20.0881
	5FU500	19.85000	.65042	.000	18.1781	21.5219
EEP280	EEP70	-32.25500	.65042	.000	-33.9269	-30.5831

	EEP140	-18.29000*	.65042	.000	-19.9619	-16.6181
	Kontrol Sel	-40.05000*	.65042	.000	-41.7219	-38.3781
	5FU500	1.56000	.65042	.062	-.1119	3.2319
Kontrol Sel	EEP70	7.79500	.65042	.000	6.1231	9.4669
	EEP140	21.76000*	.65042	.000	20.0881	23.4319
	EEP280	40.05000*	.65042	.000	38.3781	41.7219
	5FU500	41.61000*	.65042	.000	39.9381	43.2819
5FU500	EEP70	-33.81500	.65042	.000	-35.4869	-32.1431
	EEP140	-19.85000*	.65042	.000	-21.5219	-18.1781
	EEP280	-1.56000	.65042	.062	-3.2319	.1119
	Kontrol Sel	-41.61000*	.65042	.000	-43.2819	-39.9381

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank
Nekrosis	EEP70	2	5.50
	EEP140	2	7.50
	EEP280	2	9.50
	Kontrol Sel	2	3.50
	5FU500	2	1.50
	Total	10	
Hidup	EEP70	2	5.50
	EEP140	2	3.50
	EEP280	2	1.50
	Kontrol Sel	2	7.50
	5FU500	2	9.50
	Total	10	

Test Statistics^{a,b}

	nekrosis	hidup
Chi-Square	8.727	8.727
Df	4	4
Asymp. Sig.	.068	.068

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kelompok

Lampiran 7.

Dokumentasi Penelitian

1. Dokumentasi uji sitotoksisitas ekstrak etanol propolis dan 5-Fluorouracil.



Plate 96 sumuran untuk uji sitotoksisitas EEP dan 5-FU dengan MTT assay

2. Dokumentasi uji pengaruh protein *Bcl2* dan *cyclin D1*



Plate 24 sumuran untuk uji pengaruh protein *Bcl2* dan *cyclin D1*

Proses Imunositokimia

3. Dokumentasi uji apoptosis dengan flowcytometry



Sampel untuk *running* flowcytometry

flowcytometry

