

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR
UNTUK SARJANA UNGGUL
(PMDSU)**



**POTENSI POLISAKARIDA OKRA (*Abelmoschus esculentus* L) SEBAGAI
AGEN ANTI KANKER PADA LIVER CANCER CELL-LINE, HUH7IT**

TAHUN KE-1 DARI RENCANA 3 TAHUN

**Prof. WIN DARMANTO, M.Si., Med.Sci. Ph.D / 0016066103
Dr. SRI PUJI ASTUTI WAHYUNINGSIH, M.Si / 0021026604
SUHAILAH HAYAZA, S.Si, M.Si**

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDRAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 145/SP2H/LT/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR
UNTUK SARJANA UNGGUL
(PMDSU)**



KKc
KK
LP-30/19
Dan
P

**POTENSI POLISAKARIDA OKRA (*Abelmoschus esculentus* L) SEBAGAI
AGEN ANTI KANKER PADA LIVER CANCER CELL-LINE, HUH7IT**

TAHUN KE-1 DARI RENCANA 3 TAHUN

**Prof. WIN DARMANTO, M.Si., Med.Sci. Ph.D / 0016066103
Dr. SRI PUJI ASTUTI WAHYUNINGSIH, M.Si / 0021026604
SUHAILAH HAYAZA, S.Si, M.Si**

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDRAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 145/SP2H/LT/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Potensi Polisakarida Okra (*Abelmoschus esculentus*) sebagai Agen Anti Kanker pada Breast Cancer Cell-line, T47D

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : Drs WIN DARMANTO, M.Si, Ph.D
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 NIDN : 0016066103
 Jabatan Fungsional : Guru Besar
 Program Studi : Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
 Nomor HP : 085648283644
 Alamat surel (e-mail) : darmanto2000@yahoo.com; windarmanto@fst.unair.ac.id

Anggota (1)

Nama Lengkap : Dr. Dra SRI PUJI ASTUTI WAHYUNINGSIH M.Si
 NIDN : 0021026604
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)

Nama Lengkap : Suhailah Hayaza, S.Si
 NIDN :
 Perguruan Tinggi :

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : -
 Alamat : -
 Penanggung Jawab : -
 Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
 Biaya Tahun Berjalan : Rp 60,000,000
 Biaya Keseluruhan : Rp 180,000,000



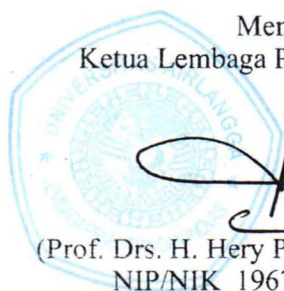
Mengetahui,
 Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

(Prof. Win Darmanto, M.Si., Med.Sci. Ph.D)
 NIP/NIK 196106161987011001

Kota Surabaya, 28 - 11 - 2018
 Ketua,

(Drs WIN DARMANTO, M.Si, Ph.D)
 NIP/NIK 196106161987011001

Menyetujui,
 Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi



(Prof. Drs. H. Hery Purnobasuki, M.Si, Ph.D)
 NIP/NIK 196705071991021001



RINGKASAN

Penelitian ini bertujuan mengeksplorasi potensi ekstrak polisakarida buah okra (*Abelmoschus esculentus* L.) yang ditumbuhkan di Surabaya, Indonesia, sebagai agen antikanker, guna membantu upaya penyembuhan penyakit kanker hati yang aman dan terjangkau. Terapi kanker menggunakan bahan alam jarang dijumpai. Sejauh ini, operasi dan kemoterapi masih merupakan metode terapeutik utama tumor. Pemanfaatan polisakarida buah okra tahun lalu telah diuji oleh Astutik (2017) yang membuktikan bahwa ekstrak polisakarida buah okra mampu berfungsi sebagai immunomodulator pada mencit *Mus musculus* yang dipapar bakteri *Staphylococcus aureus*. Selain sebagai immunomodulator, polisakarida juga berpotensi sebagai antikanker. Potensi polisakarida sebagai antikanker sudah diteliti sejak tahun 1946 oleh Nauts *et al.* Xu *et al.* (2016) juga telah menemukan bahwa polisakarida mampu menginduksi apoptosis melalui sinyal caspase-3 dan menghambat proliferasi sel kanker dengan mentargetkan protein p53. Namun, pemanfaatan kandungan polisakarida tanaman sebagai anti kanker belum pernah dilakukan oleh peneliti di Indonesia. Sehingga dalam penelitian kali ini, peneliti mencoba menggali manfaat ekstrak buah okra sebagai antikanker dengan memanfaatkan kandungan polisakarida yang terdapat di dalamnya.

Desain penelitian adalah *post test with control group design*. Dengan menggunakan kultur sel Huh7it (sel kanker hati). Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hewan Coba dan Laboratorium Genetika Molekuler Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Laboratorium SATREP *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga, pada bulan Mei 2018 hingga Oktober 2018.

Sel kanker Huh7it akan ditumbuhkan dalam media DMEM. Sel tersebut kemudian dibagi menjadi kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif *doxorubicin*, kelompok perlakuan okra dosis 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, dan 600 µg/mL. Semua kelompok kemudian diuji pertumbuhan sel Huh7it dan aktivasi sel *Natural Killer* (NK) menggunakan MTT assay. Persentase apoptosis sel Huh7it didapatkan dengan uji menggunakan *flowcytometry*.

Hasil dari penelitian ini berupa data pertumbuhan sel kanker Huh7it, data persentase apoptosis sel kanker Huh7it, data aktivasi sel NK, serta penentuan dosis polisakarida okra (*Abelmoschus esculentus*) yang paling baik dalam inaktivasi sel kanker Huh7it. Data uji MTT dianalisis dengan uji statistik menggunakan program *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) 21.00 for Windows, sedangkan data *flowcytometry* dianalisis dengan *software* BD *CellQuest*. Data diuji normalitas Kolmogorov-Smirnov dan uji homogenitas Levene. Apabila data homogen dan distribusinya normal maka diuji analisis varian satu arah (One Way ANOVA) untuk mengetahui ada beda pengaruh antar kelompok perlakuan. Apabila terjadi perbedaan yang bermakna nyata, dilanjutkan dengan uji Duncan dengan $\alpha = 0,05$.



PRAKATA

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh. Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, karunia, dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian tahun pertama program Pendidikan Magister Menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU) Batch III berjudul "Potensi Polisakarida Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) sebagai Agen Anti Kanker pada *Liver Cancer Cell-line*, Huh7it" dengan lancar. Penelitian ini merupakan penelitian yang dipromotori oleh Prof. Win Darmanto, M.Si, Med.Sci, Ph.D dan di ko-promotori oleh Dr. Sri Puji Astuti Wahyuningsih, M.Si. Penulis menyadari banyak kekurangan dalam penyusunan laporan ini, sehingga memerlukan perbaikan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Penulis berharap semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membaca.

Surabaya, 28 November 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 <i>Roadmap</i> Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Kanker Hati	5
2.1.1 Epidemiologi kanker hati	5
2.1.2 Penyebab kanker serviks	5
2.1.3 Gejala dan upaya penyembuhan kanker hati	5
2.2 Tinjauan Mekanisme Kematian Sel Kanker	6
2.2.1 Mekanisme tumorigenesis sel kanker	6
2.2.2 Mekanisme apoptosis sel kanker	6
2.2.3 Mekanisme <i>immunosurveillance</i> sel <i>natural killer</i>	7
2.3 Tinjauan sel Huh7it sebagai model studi <i>in vitro</i>	9
2.4 Tinjauan Tanaman Okra (<i>Abelmoschus esculentus</i> L.)	9
2.4.1 Karakteristik tanaman okra (<i>Abelmoschus esculentus</i> L.)	9
2.4.2 Kandungan dan manfaat tanaman okra	10
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
3.1 Tujuan Penelitian	12
3.1.1 Tujuan jangka Panjang	12
3.1.2 Tujuan khusus	12
3.2 Manfaat Penelitian	12
BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	13
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	13
4.2.1 Alat penelitian	13
4.2.2 Bahan penelitian	13
4.3 Rancangan Penelitian	14
4.4 Cara Kerja	15



4.4.1 Pembuatan serbuk polisakarida dari buah okra	15
4.4.2 Penentuan konsentrasi polisakarida okra	15
4.4.3 Isolasi splenosit mencit	15
4.4.4 Pengukuran pertumbuhan sel Huh7it	16
4.4.5 Pengukuran persentase apoptosis sel Huh7it	16
4.4.6 Pengukuran aktivasi sel NK	17
4.5 Variabel dan Definisi Operasional	17
4.5.1 Variabel bebas	17
4.5.2 Variabel terikat	17
4.5.3 Variabel kendali	17
4.6 Analisis Data	17
4.7 Bagan Alir Penelitian	18
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Hasil Penelitian	19
5.1.1 Pengaruh pemberian variasi dosis ekstrak ORPE terhadap persentase pertumbuhan sel kanker hati Huh7it	19
5.1.2 Pengaruh pemberian variasi dosis ORPE terhadap persentase apoptosis sel kanker hati Huh7it	21
5.1.3 Pengaruh pemberian variasi dosis ekstrak ORPE terhadap aktivasi sel <i>Natural Killer</i> mencit (<i>Mus musculus</i>)	23
5.2 Luaran yang Dicapai	24
BAB VI RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	25
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan	26
7.2 Saran	26
DAFTAR PUSTAKA	27

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
5.1	Data persentase pertumbuhan, apoptosis, nekrosis, dan aktivasi sel NK pada masing- masing kelompok perlakuan	19
5.2	Data luaran yang dicapai pada penelitian tahun ke-I	24

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
1.1	<i>Roadmap</i> penelitian	4
2.1	Dua jalur dari proses apoptosis sel tumor	7
2.2	Proses lisis sel tumor oleh sel NK	8
2.3	Tanaman okra (<i>Abelmoschus esculentus</i> L.)	9
4.1	Kerangka operasional penelitian	14
4.2	Bagan Alir Penelitian	18
5.1	Perbandingan persentase pertumbuhan sel kanker hati Huh7it pada masing-masing kelompok perlakuan	20
5.2	Perbandingan persentase sel yang mengalami apoptosis awal, apoptosis akhir, dan nekrosis pada masing-masing kelompok	21
5.3	Distribusi sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis pada masing-masing kelompok perlakuan	22
5.4	Perbandingan persentase sel NK yang teraktivasi pada masing-masing kelompok perlakuan.	23

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Bukti keikutsertaan sebagai <i>oral speaker</i> pada University of Malaya Symposium	L-1
Lampiran 2. Bukti submit manuskrip di <i>Tropical Journal of Pharmaceutical Research</i>	L-2



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan salah satu penyakit yang paling mengancam dalam dunia kesehatan. *World Health Organization* (2012) melaporkan bahwa dua jenis kanker yang menelan korban paling banyak di dunia adalah kanker paru- paru (1,69 juta korban) dan kanker hati (788.000 korban). Kanker hati atau secara ilmiah dikenal dengan nama *Hepatoceleular Carcinoma* (HCC) adalah pertumbuhan yang tidak terkontrol dari sel-sel ganas di hati yang dihasilkan dari sel-sel abnormal pada hati (primer) maupun akibat dari penyebaran kanker dari bagian tubuh lain (sekunder). Perhimpunan Peneliti Hati Indonesia (2013) menyebutkan bahwa 80% kasus HCC di dunia berada di negara sedang berkembang seperti Afrika Tengah, Asia Timur, dan Asia Tenggara, salah satunya di Indonesia.

Kematian sel terprogram (apoptosis) pada sel kanker terjadi melalui 2 jalur yaitu, jalur ekstrinsik atau jalur *death receptor* (DR) yang melibatkan sistem imun dan jalur intrinsik atau jalur mitokondria. Pada jalur mitokondria, apoptosis disebabkan oleh pelepasan sitokrom-c melalui pembentukan *channel* oleh *mitochondrial permeability transition pore* (PTP) dan bax. Sitokrom-c yang dilepas ke sitosol akan membentuk kompleks apoptosom dengan Apaf-1, ATP, dan caspase 9 (Zhang *et al.*, 2017). Apoptosom inilah yang akan mengaktifkan caspase-3 yang berperan dalam pemotongan sitoskeleton dan pembelahan gelsolin, suatu protein dilibatkan dalam pemeliharaan morfologi sel, hingga sel mengalami apoptosis. Selain itu, adanya mutasi pada bagian DNA *binding domain* (DBD) protein p53 sel tumor menyebabkan protein ini tidak mampu berikatan dengan *sequence target* (Sigal dan Rotter, 2001). Sehingga fungsi p53 sebagai transkripsi faktor untuk menghasilkan protein- protein yang berperan dalam *cycle arrest*, apoptosis, maupun perbaikan DNA tidak dihasilkan.

Apoptosis secara ekstrinsik salah satunya diperankan oleh peran dari sel *Natural Killer* (sel NK). Sel NK merupakan bagian dari sistem imun non-spesifik atau *innate immune system*. Sel NK tidak dapat melisiskan sel yang mengekspresikan *Major Histocompatibility Complex* (MHC), tetapi sebaliknya sel tumor yang tidak mengekspresikan MHC yang biasanya lolos dari *Cytotoxic T lymphocytes* (CTL), menjadi target dari sel NK. Sel NK dapat diaktivasi langsung melalui pengenalan antigen tumor atau sebagai akibat aktivitas sitokin yang diproduksi oleh limfosit T spesifik tumor, seperti IFN- γ , IL-2, dan IL-12 (Topham dan

Hewitt, 2009). Aktivasi dari sel NK ini akan menyebabkan sekresi perforin dan granzyme yang akan merusak membrane sel kanker dan menyebabkan sel tersebut mengalami apoptosis.

Dalam dunia pengobatan kanker, sejauh ini operasi dan kemoterapi masih merupakan metode terapeutik utama pasien HCC, disamping metode pencegahan seperti imunisasi Hepatitis B. Namun, penerapan obat terapeutik memiliki beberapa keterbatasan, seperti efek samping, penekanan hemopoietik (*hemopoietic suppression*), efikasi yang terbatas, imunotoksitas dan resistensi obat (Xu *et al.*, 2016). Kondisi ini kemudian memunculkan berbagai pengembangan strategi pengobatan baru yang tidak toksik dan memiliki tingkat efikasi atau kemanjuran yang cukup tinggi untuk mengobati kanker, yaitu dengan imunoterapi.

Imunoterapi, termasuk pemberian vaksin dan *immunecheckpoint*, seperti memblok limfosit T sitotoksik-4 (CTL-4) dan *programmed death-1*, adalah langkah terbaru dalam terapi kanker sistemik (Emens dan Middleton, 2015). Pengobatan kanker dengan cara imunoterapi diresmikan pada bulan Maret 2011 di Amerika Serikat untuk pengobatan melanoma yang metastasis (Xu *et al.*, 2016). Keberhasilan *immunecheckpoint* ini merupakan awal era pemberantasan kanker, di mana pemanfaatan sistem kekebalan tubuh untuk mengobati kanker menjadi strategi kunci dalam perawatan secara klinis. Namun, ada beberapa kekurangan dalam imunoterapi tumor. Pertama, walaupun ada banyak antigen tumor yang telah diidentifikasi, kondisi imunogenisitas penderita kanker yang lemah juga melemahkan respon imunitas mereka terhadap kanker. Kedua, imunoterapi juga bisa menyebabkan respons autoimun pada jaringan normal. Selain itu, baik imunoterapi maupun kemoterapi membutuhkan biaya pengobatan yang sangat tinggi yang tidak bisa dijangkau oleh masyarakat di negara berkembang seperti Indonesia, dimana mayoritas penduduknya berstatus ekonomi menengah ke bawah.

Kondisi ini mengakibatkan para ahli mulai mencari opsi pengobatan yang lebih aman dan terjangkau, yaitu dengan memanfaatkan kandungan bahan alam. Salah satu senyawa yang berpotensi sebagai antikanker adalah polisakarida pada tanaman. Penggunaan polisakarida sebagai anti kanker telah dimulai sejak tahun 1946 dengan ditemukannya kemampuan polisakarida dalam menginduksi remisi komplis pasien penderita kanker (Zhang *et al.*, 2017). Meng *et al.* (2016) menjelaskan bahwa polisakarida mampu menghambat pertumbuhan tumor melalui mekanisme: (a) pencegahan tumorigenesis melalui pemberian polisakarida secara oral; (b) aktivitas anti kanker langsung, seperti induksi apoptosis sel tumor, *cell cycle arrest*, anti-angiogenesis, menekan sintesis protein dan asam nukleat, peningkatan ekspresi tumor *suppressor gene* (seperti p53, Rb, p16) pada sel tumor, efek jalur transfer sinyal pada sel

tumor, dan efek anti radikal; (c) aktivitas imunopotensi dalam kombinasi dengan kemoterapi; (d) menghambat invasi tumor, adhesi, dan metastasis. Hal ini didukung oleh Xu *et al.* (2016) yang membuktikan bahwa polisakarida mampu menginduksi apoptosis melalui sinyal caspase-3 dan menghambat proliferasi sel kanker dengan menargetkan protein p53.

Indonesia, sebagai negara megabiodiversitas, memiliki beragam flora dan fauna yang dapat dimanfaatkan untuk pengobatan. Okra (*Abelmoschus esculentus* L.), juga dikenal sebagai kacang lendir di Riau dan kacang arab di Kalimantan Barat, merupakan salah satu tanaman yang kaya akan kandungan polisakarida, vitamin C, maupun senyawa metabolit sekunder. Tanaman ini populer di Indonesia sebagai bahan makanan.

Buah okra memiliki struktur berlendir dan mengandung kalori yang rendah, serta kaya akan nutrisi, mineral, dan serat. Kandungan aktif buah okra adalah senyawa flavonoid berupa oligomer catechin dan quercetin serta vitamin C yang merupakan antioksidan (Shui dan Peng, 2004). Komponen ini berkaitan dengan aktivitas *scavenging* terhadap radikal bebas. Selain itu okra juga memiliki komponen fenolik berupa tanin. Senyawa tanin dapat bersifat antibakteri dengan cara merusak membran dan antivirus dengan cara menghambat aktivitas enzim virus. Wahyuningsih *et al.* (2017) juga telah membuktikan bahwa polisakarida okra (*Abelmoschus esculentus* L.) mampu berperan sebagai immunomodulator ditunjukkan dengan adanya peningkatan pada berat limpa serta proliferasi limfosit-B mencit (*Mus musculus*) yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*. Peran ini diakibatkan oleh kemampuan polisakarida okra dalam mengaktifasi faktor transkripsi *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) dari sel normal. Aktivasi NF- κ B meningkatkan transkripsi gen yang terkait dengan produksi sitokin yang diperlukan untuk aktivasi sel NK. Sel NK yang teraktivasi akan mensekresikan perforin dan granzyme yang dapat mengakibatkan apoptosis pada sel dengan antigen asing, seperti sel kanker.

Komponen utama polisakarida okra adalah ramnosa dan galaktosa. Tomsik *et al.* (2011) telah membuktikan bahwa pemberian L-ramnosa sintetis sebanyak 3g/kg berat badan per hari secara intraperitoneal pada mencit dengan tumor Ehrlich (kanker pada *mammary gland*) mampu menghambat pertumbuhan sel tumor hingga 62%. Dengan dosis yang lebih sedikit, L-ramnosa bekerja lebih baik dibandingkan dengan pemberian L-fukosa sintetis yang sebanyak 5g/kg berat badan per hari hanya mampu menghambat pertumbuhan tumor sebanyak 34% saja. Selain ramnosa, peran galaktosa sebagai agen antikanker juga telah dibuktikan oleh Zang *et al.* (2017) yang menggunakan biji tanaman peonia untuk meningkatkan apoptosis sel kanker. Biji peonia yang mengandung 34,43% galaktosa mampu meningkatkan apoptosis sel kanker MCF-7 (*breast cancer*) hingga 38,73% dengan dosis

pemberian sebanyak 300 $\mu\text{L}/\text{mg}$. Jika dibandingkan dengan peonia, okra memiliki kandungan galaktosa yang sedikit lebih tinggi, yaitu sebesar 40% dari seluruh kandungan polisakaridanya. Namun, potensi antikanker okra juga didukung oleh kandungan rhamnosa yang tinggi, yaitu sebesar hampir 30%, sedangkan pada peonia hanya 3,39% saja. Kombinasi kandungan galaktosa dan rhamnosa ini tidak hanya menjadikan okra berpotensi sebagai agen antikanker, tetapi juga diperkirakan mampu menghambat pertumbuhan kanker dengan pemberian dosis yang lebih rendah dibandingkan dengan tanaman lain.

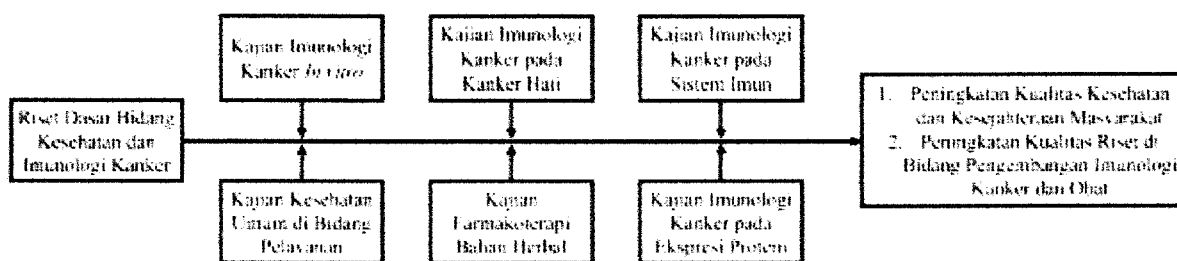
Penelitian tahun pertama ini akan mengungkapkan potensi polisakarida okra sebagai antikanker ditinjau dari tiga parameter: a) penghambatan terhadap pertumbuhan sel kanker hati Huh7it; b) pemicu terjadinya apoptosis sel Huh7it; c) pengaruhnya terhadap aktivitas dari sel NK. Penelitian ini merupakan penelitian pertama mengenai fungsi farmakologi okra di ranah imunologi kanker. Sehingga, hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi tolak ukur awal untuk penelitian selanjutnya dalam upaya penyembuhan penyakit kanker yang aman dan terjangkau.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan, dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimanakah perbedaan pemberian variasi dosis ekstrak polisakarida buah okra (*Abelmoschus esculentus* L.) terhadap pertumbuhan sel kanker hati Huh7it?
2. Bagaimanakah perbedaan pemberian variasi dosis ekstrak polisakarida buah okra (*Abelmoschus esculentus* L.) terhadap apoptosis sel kanker hati Huh7it?
3. Bagaimanakah perbedaan pemberian variasi dosis ekstrak polisakarida buah okra (*Abelmoschus esculentus* L.) terhadap aktivasi sel *Natural Killer* mencit (*Mus musculus*)?

1.3 Roadmap Penelitian



Gambar 1.1 Roadmap penelitian



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Kanker Hati

2.1.1 Epidemiologi kanker hati

Karsinoma hepatoselular atau *Hepatocellular Carcinoma* (HCC) meliputi 5,6% dari seluruh kasus kanker pada manusia serta menempati peringkat ke-5 pada laki-laki dan ke-9 pada perempuan sebagai kanker yang paling sering dialami di dunia. Tingkat kekerapan tertinggi HCC (lebih dari 10 kasus per 100000 penduduk) terdapat pada Asia Timur dan Tenggara. 80% kasus HCC di dunia berada di negara sedang berkembang seperti Asia Timur dan Asia Tenggara serta Afrika Tengah yang merupakan wilayah prevalensi tinggi (Sulaiman, 2007). World Health Organization (2012) melaporkan bahwa lima kanker yang paling sering memakan korban adalah kanker paru-paru (1.69 juta kematian), kanker hati (788.000 kematian), kanker colon (774.000 kematian), kanker lambung (754.000 kematian), dan kanker payudara (571.000 kematian). Di Indonesia, diperkirakan terdapat sekitar 18.000 kasus baru kanker hati setiap tahunnya. Selain itu, terdapat 7 juta orang yang menderita hepatitis C dimana sekitar 50% berpotensi menjadi penyakit hepatitis kronis, bila tidak diobati secara baik maka 10% diantaranya dapat menjadi kanker hati (Kementrian Kesehatan, 2012).

2.1.2 Penyebab kanker hati

Penyebab kanker hati secara umum adalah infeksi virus hepatitis B dan C, aflatoksin B1, sirosis hati, infeksi parasit, alkohol serta faktor keturunan (Llovet *et al.*, 2003). Sekitar 83% kasus kanker hati di dunia terjadi di negara-negara yang masih berkembang. Penyebab tingginya kasus kanker hati di negara-negara yang masih berkembang adalah tingginya kasus hepatitis B dan C di negara-negara tersebut, termasuk di Indonesia. Sedangkan di negara-negara yang sudah maju seperti negara-negara di Eropa, penyebab utama kanker hati adalah konsumsi alkohol yang tinggi dan obesitas yang meningkat. Obesitas dapat meningkatkan risiko kanker hati karena berkaitan erat dengan penyakit perlemakan hati non alkoholik atau *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* (Sulaiman *et al.*, 2007).

2.1.3 Gejala dan upaya penyembuhan kanker hati

Gejala kanker hati pada awalnya tanpa keluhan atau hanya sedikit keluhan seperti lesu, nafsu makan berkurang dan penurunan berat badan. Gejala lain adalah munculnya sakit kuning (kulit dan bagian putih mata yang menguning akibat meningkatnya kadar bilirubin

dalam tubuh manusia). Kanker hati dapat diketahui dengan diagnosis menggunakan radiologi, biopsi hati, dan serologi (Bruix dan Sherman, 2005). Pengobatan yang telah dilakukan sampai saat ini adalah dengan kemoterapi, embolisasi, radioimunoterapi dan transplantasi hati. Salah satu cara yang efektif untuk menurunkan kekerapan kanker hati adalah dengan imunisasi hepatitis B. Terapi pengobatan hepatitis C juga dilakukan dengan pemberian *pegylated interferon alfa* (PEG-IFN α) yang dikombinasikan dengan ribavirin yang diberikan selama 12—72 minggu. Namun, terapi ini hanya berhasil pada penderita yang terinfeksi hepatitis C dengan genotip tertentu saja. Selain itu, terapi ini menimbulkan efek samping seperti depresi, anemia, dan mual (Moradpour *et al.*, 2007).

2.2 .Tinjauan Mekanisme Kematian Sel Kanker

2.2.1 Mekanisme tumorigenesis sel kanker

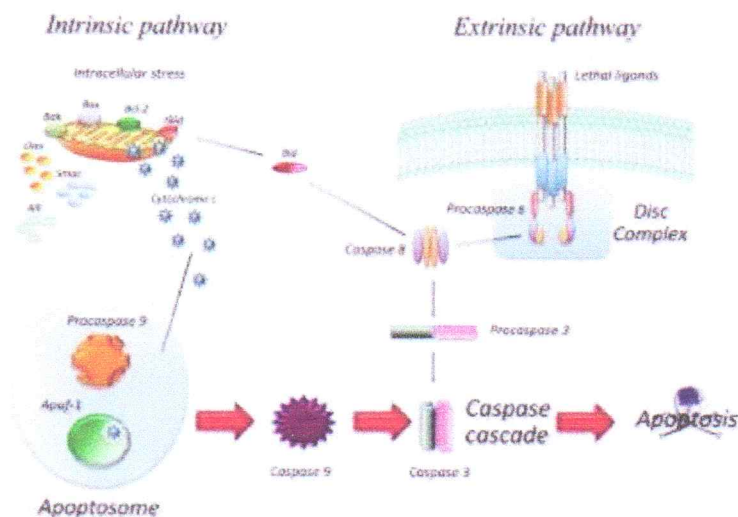
Mutasi pada gene p53 biasanya ditemukan pada sel tumor. Mutasi ini menyebabkan protein p53 yang dihasilkan bersifat mutan. Protein p53 mutan akan mengalami mutasi pada bagian DNA *binding domain* (DBD) merupakan bagian penting bagi p53 untuk dapat berikatan dengan *sequence gene* sehingga mutasi pada DBD menyebabkan protein p53 tidak mampu berikatan dengan *sequence target* sehingga fungsi p53 sebagai transkripsi faktor untuk menghasilkan protein-protein yang berperan dalam *cycle arrest*, apoptosis, maupun perbaikan DNA tidak dihasilkan. Akibatnya kerusakan tidak dapat diperbaiki, sel yang rusak tidak diapoptosis, dan siklus sel dapat masuk ke fase S, terjadi replikasi dan seterusnya hingga terjadi proliferasi sel tumor (Sigal dan Rotter, 2001).

Uji viabilitas sel menggunakan MTT *assay* adalah uji kolorimetri yang didasarkan pada reduksi 3,4,5-*dimethylthiazol-2-yl*)-2,5-*diphenyltetrazolium bromida* (MTT) berwarna kuning oleh *succinate dehydrogenase* dalam mitokondria menghasilkan produk formazan berwarna ungu. Reduksi MTT hanya terjadi pada sel yang aktif bermetabolisme sehingga dapat digunakan untuk mengukur viabilitas sel (Yu *et al.*, 2014).

2.2.2 Mekanisme apoptosis sel kanker

Apoptosis adalah tipe kematian sel yang terprogram melalui serangkaian perubahan struktural sebagai hasil dari rangsang fisiologis atau patologis. Ciri morfologi apoptosis adalah pengkerutan sel, penonjolan membran (*membrane blebbing*), mitokondria bersegregasi, ribosom bersegregasi, sitoplasma berkondensasi, kondensi kromatin, dan fragmentasi inti sel (Zhang *et al.*, 2017). Apoptosis terjadi melalui 2 jalur yaitu, jalur ekstrinsik atau *death receptor* (DR) dan jalur intrinsik atau jalur mitokondria (Han *et al.*, 2013). Pada jalur mitokondria, apoptosis disebabkan oleh pelepasan sitokrom-c dari

mitokondria melalui porus yang dibentuk oleh *mitochondrial permeability transition pore* (PTP) dan protein Bax. Asosiasi PTP dan bax akan membentuk suatu *channel* spesifik untuk sitokrom c. *Channel* ini menjadi tempat masuknya ion Ca^{2+} dan keluarnya sitokrom-c. Skema jalur apoptosis ditunjukkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Dua jalur dari proses apoptosis sel tumor (Favaloro *et al.*, 2017).

Sitokrom c yang dilepas ke sitosol akan membentuk kompleks dengan Apaf-1, ATP, dan caspase 9 yang dinamakan apoptosom, yaitu suatu holoenzim yang merupakan gabungan beberapa protein. Kompleks ini adalah suatu protease yang bertugas memotong atau mendegradasi protein lain. Salah satunya adalah mendegradasi procaspase-3 menjadi caspase-3. Caspase-3 yang jumlahnya berlimpah akan memotong sitoskeleton (kerangka sel) dan PARP yang akan menyebabkan pemecahan substrat dan akhirnya apoptosis (Zhang *et al.*, 2017).

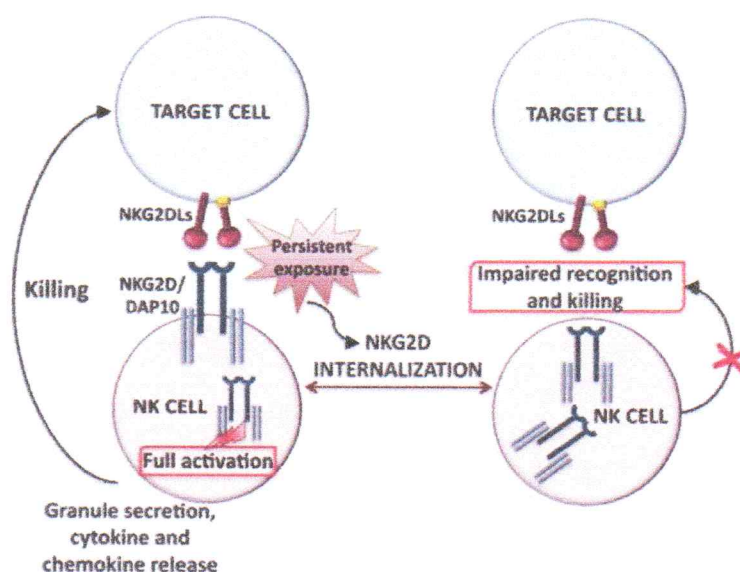
2.2.3 Mekanisme *immunosurveillance* sel natural killer

Immunosurveillance adalah suatu mekanisme yang digunakan oleh tubuh untuk bereaksi melawan setiap antigen yang diekspresikan oleh neoplasma. Konsep *immune surveillance* dikembangkan pertama kali oleh Paul Ehrlich pada awal abad ke-20 dan dikembangkan lebih lanjut oleh Burnet dan Thomas pada tahun 1950 dan 1960-an. Konsep itu menyatakan bahwa sistem imun mempunyai peran mencegah dan membatasi pertumbuhan tumor. Keasingan antigen tumor disebabkan adanya mutasi dan disregulasi gen yang menyebabkan diproduksi protein baru (neoantigen) yang tidak pernah diekspresikan dalam keadaan normal (Waldhauer dan Steinle, 2008).

Natural killer cell atau sel NK adalah bagian dari sistem imun non-spesifik atau *innate immune system*. Sitotoksitas sel NK tidak bergantung pada *Major Histocompatibility*

Complex (MHC). Sel NK dapat diaktivasi langsung melalui pengenalan antigen tumor atau sebagai akibat aktivitas sitokin. Sitokin yang diproduksi oleh monosit (IL-15, IL-12, 1L-10) maupun sel T (IL-2) akan menyebabkan sel NK mengalami aktivasi dan proliferasi. Interleukin-2 merupakan salah satu *growth factor* dan *costimulator* bersama sel target untuk menginisiasi proliferasi sel NK. (Warren, 1996).

Sel NK memiliki dua tipe reseptor yang berperan penting dalam lisis sel yaitu *inhibitory receptor* yang mengenali molekul MHC I dan *activating receptor* atau juga dikenal sebagai *natural cytotoxicity receptors* (NCRs) (Topham dan Hewitt, 2009). Sel NK tidak dapat melisis sel yang mengekspresikan MHC, tetapi sebaliknya sel tumor yang tidak mengekspresikan MHC yang biasanya lolos dari *Cytotoxic T lymphocytes* (CTL), menjadi target dari sel NK (Abbas dan Lichtman, 2010).



Gambar 2.2. Proses lisis sel tumor oleh sel NK (Molfetta *et al.*, 2017).

Salah satu *activating receptor* penting yang dimiliki oleh sel NK adalah reseptor NKG2D yang merupakan glikoprotein transmembran. Ligan NKG2D sering diekspresikan pada permukaan sel tumor yang menyebabkan sel tumor sensitif untuk pembunuhan oleh sel NK. Aktivasi dari sel NK ini akan menyebabkan sekresi perforin dan granzyme. Perforin akan menimbulkan lubang pada membrane sel tumor yang akan menjadi pintu masuknya granzyme ke sitosol sel tumor dan mengakibatkan sel tumor mengalami apoptosis (Osińska *et al.*, 2014). Proses lisis sel oleh sel NK ditunjukkan pada Gambar 2.2.

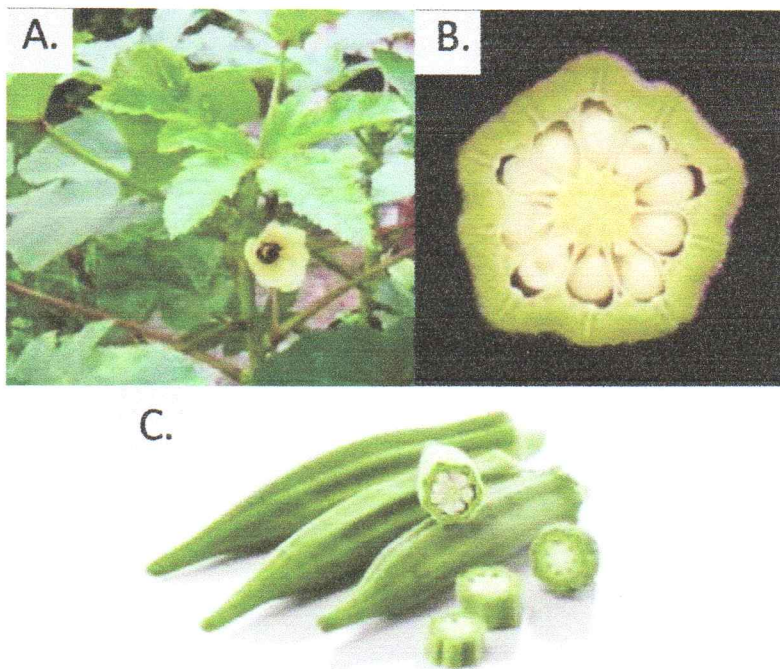
2.3 Tinjauan sel Huh7it sebagai model studi *in vitro*

Huh7it adalah galur sel kanker hepatosit karsinoma yang diambil dari tumor hati pria Jepang berusia 57 tahun pada tahun 1982. Sel ini merupakan hasil temuan Nakabayshi, H. dan Sato, J. Sel ini bersifat immortal, artinya dapat membelah secara terus menerus dan merupakan sel epitel. Sel Huh7it melekat pada permukaan petridisk dalam bentuk monolayer 2D. Sel Huh7it mengalami mutasi pada gen p53. Sel Huh7it dikultur pada media DMEM yang diberi 10% FBS. Sel ditumbuhkan pada suhu 37°C dengan kadar CO₂ 5% (Sainz *et al.*, 2009).

2.4 Tinjauan Tanaman Okra (*Abelmoschus esculentus* L.)

2.4.1 Karakteristik tanaman okra (*Abelmoschus esculentus* L.)

Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) adalah tanaman herba *annual* yang bisa mencapai tinggi 1 – 2 m. Daun tanaman ini berbentuk bulat, tepi daun berlekuk dan susunan tulang menjari. Bunga tanaman ini adalah bunga tunggal yang berada di ketiak daun dan memiliki lima mahkota berwarna putih sampai kuning dengan bagian dalam bunga berwarna gelap. Buahnya berwarna hijau, berbentuk bulat beralur dan meruncing ke ujung. Buah okra masak setelah 60 – 180 hari penanaman atau 5 – 10 hari setelah tanaman berbunga (Jain *et al.*, 2012). Gambar tanaman okra dan buah okra disajikan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 A. Tanaman okra (*Abelmoschus esculentus* L.); B. Bagian dalam polong okra; C. Buah okra (sumber: wikipedia).

Tanaman okra tumbuh dengan baik di tanah yang subur dan kaya humus serta terpapar sinar matahari secara penuh. Tumbuh optimal pada kadar pH 6 hingga 6.7, namun tanaman ini masih dapat mentoleransi pH mulai 5,5 hingga 8,0. Buah dari okra matang setelah 60-180 hari persemaian (Jain *et al.*, 2012). Buah okra berkembang sangat cepat dan sudah dapat dipanen seminggu setelah tumbuh bunga. Tong (2016) menyebutkan bahwa okra berasal dari Afrika. Namun, saat ini okra sudah banyak dibudidayakan di daerah tropis, subtropis dan daerah dengan zona iklim hangat. Tanaman ini sangat populer di Brasil, India, Spanyol, Thailand, Filipina, Amerika Serikat, Turki, dan Afrika Barat (Tong, 2016).

Berdasarkan Jain *et al.* (2012), klasifikasi dari tanaman ini adalah sebagai berikut.

Kingdom	: Plantae
Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Order	: Malvales
Family	: Malvaceae
Genus	: <i>Abelmoschus</i>
Species	: <i>Abelmoschus esculentus</i> L.

2.4.2 Kandungan dan manfaat tanaman okra *Abelmoschus esculentus* L.

Buah dan biji okra yang belum matang dikonsumsi sebagai sayuran. Penambahan buah okra ditujukan untuk meningkatkan konsistensi masakan agar kuah lebih kental (*mucilaginous*) akibat dari lendir yang dihasilkan oleh buah tanaman ini. Biji okra adalah sumber minyak dan protein. Biji okra dapat dipanggang dan digiling sebagai pengganti kopi yang bebas kafein (Roy *et al.*, 2014).

Infus lendir buah okra digunakan untuk mengobati disentri dan diare pada peradangan akut dan iritasi di lambung, usus, dan ginjal. Biji digunakan sebagai antispasmodik, cordial, dan stimulant. Buah okra berlendir, rendah kalori, kaya nutrisi, mineral, dan serat. Buah okra mengandung senyawa bioaktif seperti karoten, asam folat, tiamin, riboflavin, niacin, vitamin C, asam oksalat dan asam amino (Lim, 2012). Roy *et al.* (2014) mengatakan bahwa dalam 100 gram buah okra terdapat 31 kcal energi, 2,00 g protein, 0,10 g lemak, 7,03 g karbohidrat, dan 1,2 g total gula.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT

PENELITIAN



3.1 Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan Jangka Panjang

1. Pencegahan metastatis kanker hati pada manusia
2. Penghambatan pertumbuhan kanker hati pada manusia
3. Peningkatan aktivitas sel imun pada pasien kanker hati
4. Peningkatan aktivasi protein pro apoptosis pada pasien kanker hati
5. Alternatif pengobatan herbal untuk yang aman dan terjangkau oleh masyarakat menengah ke bawah.
6. Mewujudkan segera kerjasama yang harmonis dan sinergis antara Perguruan Tinggi sebagai Center of Excellent; Pemerintah; Industri strategis di bidang obat-obatan dan masyarakat pengguna

3.1.2 Tujuan khusus

Tujuan dari penelitian ini adalah mengungkapkan potensi polisakarida okra sebagai agen anti kanker ditinjau dari tiga parameter: a) penghambatan terhadap pertumbuhan sel kanker hati Huh7it; b) pemicu terjadinya apoptosis sel Huh7it; c) pengaruhnya terhadap aktivitas dari sel NK. Penelitian ini merupakan penelitian pertama mengenai fungsi farmakologi okra di ranah imunologi kanker. Sehingga, hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi tolak ukur awal untuk penelitian selanjutnya dalam upaya penyembuhan penyakit kanker yang aman dan terjangkau.

3.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang potensi ekstrak polisakarida buah okra (*Abelmoschus esculentus* L.) sebagai antikanker, guna membantu upaya penyembuhan penyakit kanker hati yang aman dan terjangkau. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini berupa publikasi ilmiah di jurnal Internasional terindex Scopus, serta menjadi upaya awal dalam pemanfaatan okra sebagai obat herbal yang dapat dikonsumsi oleh masyarakat di negara berkembang seperti Indonesia, khususnya di kalangan menengah ke bawah.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hewan Coba dan Laboratorium Genetika Molekuler Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Laboratorium SATREP *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga, pada bulan Mei 2018 hingga September 2018.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat penelitian

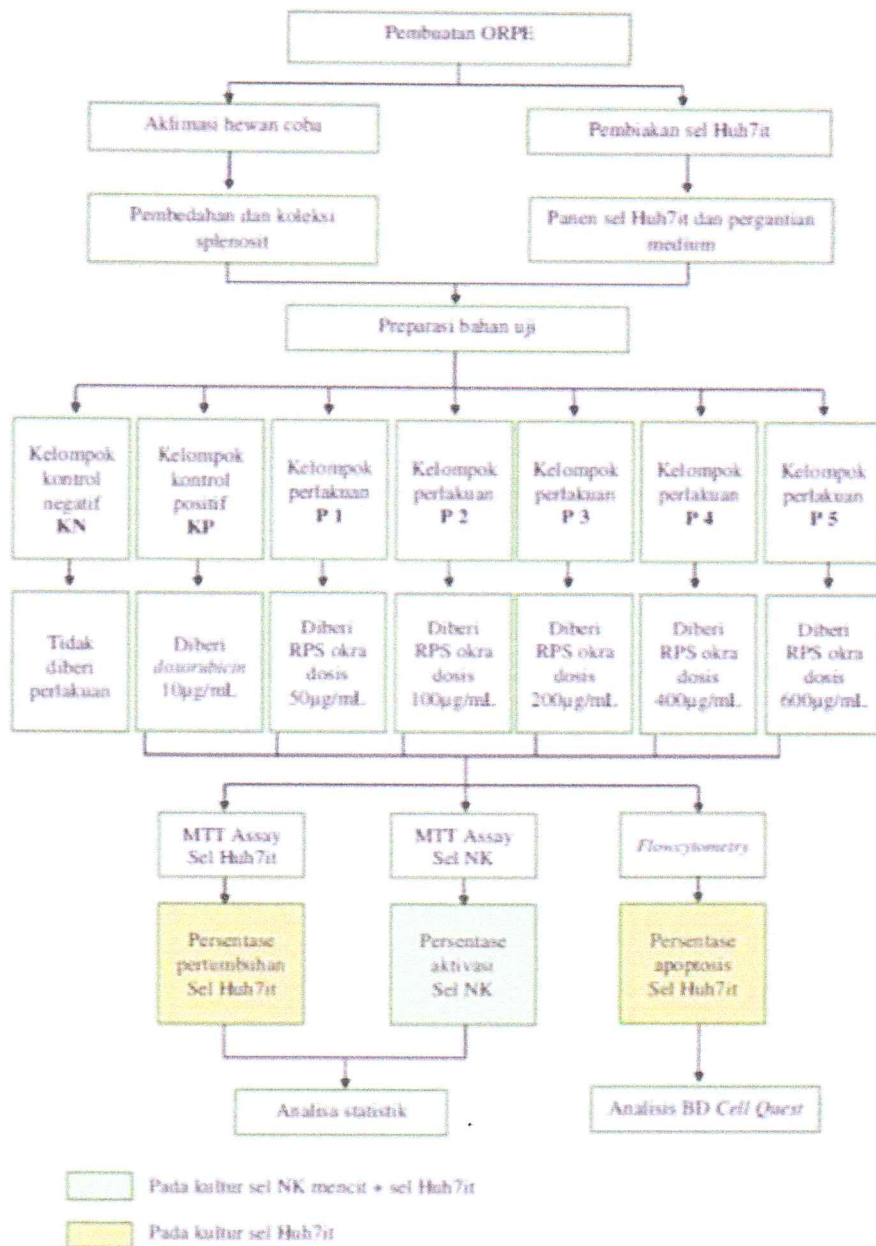
Alat yang digunakan adalah alat bedah, meja bedah, autoclave, *luminar flow cabinet*, inkubator CO₂, *inverted microscope*, tissue culture flask/dish diameter 10 cm, 96-well plate, neraca analitik, mikropipet, mikroskop cahaya, *microplate reader*, *freeze dryer*, pipet, mikro pipet (10P, 100P dan 1000P), tips (10P, 100P dan 1000P), pengaduk, gelas obyek, gelas penutup, *aluminium foil*, *plastic wrap*, masker, sarung tangan, konikal 15 ml steril, konikal 15 ml steril, kertas tisu, alat-alat gelas, coverslip diameter 13 mm, slide, *hemocytometer*, *cell counter*, *ELISA reader*, *shaker*, *vortex*, *microtube* steril, kamera digital.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan adalah buah okra (*Abelmoschus esculentus* L.) yang diperoleh dari pasar tradisional di Surabaya. Untuk ekstraksi polisakarida okra digunakan akuades dan etanol absolut. Bahan yang digunakan sebagai media penumbuh sel kanker adalah Tripsin EDTA 0,25 %, kultur sel kanker hati Huh7it koleksi *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga dengan media kultur Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) dalam Foetal Bovine Serum (FBS) 10% (v/v) dan penisilin-streptomisin 1% (v/v), reagen MTT {3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida}, BioLegend's *Cell Staining Buffer*, *Annexin V Binding Buffer*, FITC Annexin V, *Propidium Iodide Solution*, Dimetil Sulfoxide (DMSO) sebagai pelarut ekstrak okra dan *stopper MTT solution*, medium RPMI untuk sel splenosit, pereaksi stopper yang mengandung Sodium Dodesil Sulfat (SDS) 10% dalam 0,1 N HCl, dan larutan pencuci Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7,4 dengan penisilin-streptomisin 1% (v/v).

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan rancangan *posttest with control group design*. Penelitian dilakukan pada kultur sel Huh7it (sel kanker hati) dan kultur sel *Natural Killer* dengan pemberian ekstrak kasar polisakarida okra berbagai dosis. Kerangka operasional dari penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 4.1



Gambar 4.1 Kerangka operasional penelitian. Keterangan: kelompok kontrol normal (KN), kelompok kontrol positif dengan pemberian doxorubicin dosis 10 µg/ ml (KP), kelompok ORPE dosis 50 µg/ ml (P1), kelompok ORPE dosis 100 µg/ ml (P2), kelompok ORPE dosis 200 µg/ ml (P3), kelompok ORPE dosis 400 µg/ ml (P4), kelompok ORPE dosis 600 µg/ ml (P5).

4.4 Cara Kerja

4.4.1 Pembuatan serbuk polisakarida dari ekstrak buah okra

Buah okra didapatkan dari pasar tradisional di Surabaya. Buah okra dibersihkan dengan akuades, dipotong-potong dan ditimbang sebanyak 500 g. Potongan buah okra dimasukkan dalam *blender* dan dihaluskan. Kemudian buah okra yang sudah halus ditambahkan akuades sampai 500 mL hingga terendam dan dimaserasi semalaman. Ekstrak okra kemudian disaring dan diperas, kemudian ampasnya dimaserasi lagi dua kali menggunakan akuades 300 mL. Hasil penyaringan dari ketiga maserasi dikoleksi dan disentrifugasi pada kecepatan 4300 rpm selama lima menit. Supernatan dipresipitasi dengan penambahan etanol absolut 1X volume sampel dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C kemudian disentrifugasi pada kecepatan 4300 rpm selama lima menit. Presipitat dilarutkan dalam akuades dan disentrifugasi lagi pada kecepatan 4300 rpm selama lima menit. Kemudian supernatan diambil dan dilyophilisasi sehingga didapatkan serbuk polisakarida kasar dari buah okra yang disebut *Raw Polysaccharide* (Chen *et al.*, 2016). Stok ekstrak kasar polisakarida okra (ORPE) dibuat dengan menambahkan 5 mg ORPE dengan 50 µL DMSO. Larutan ekstrak kemudian disonikasi selama 11 menit hingga 90% ekstrak larut.

4.4.2 Penentuan konsentrasi polisakarida okra

Penentuan konsentrasi polisakarida okra menggunakan metode *phenol sulfuric acid assay*. Ekstrak okra yang telah diliofilisasi kemudian dilarutkan dengan konsentrasi 10mg dalam 1mL DMSO sebagai larutan stok. Untuk uji konsentrasi polisakarida, 10 µL stok polisakarida okra diambil dan ditambahkan 90 µL akuades. Kemudian ditambahkan 50 µL fenol 5% dan divortex selama satu menit. Sebanyak 2 mL larutan asam sulfat ditambahkan, kemudian larutan diinkubasi dalam suhu kamar selama 10 menit. Larutan blanko dibuat dari 50 µL fenol 5% dan 100 µL akuades. Nilai *optical density* (OD) dibaca menggunakan spektrofotometer pada $\lambda = 490$ nm. Nilai OD dimasukkan ke persamaan regresi $y=0,008x + 0,079$ dimana y = nilai OD dan x = konsentrasi polisakarida (Wahyuningsih *et al.*, 2017). Hasil menunjukkan bahwa ekstrak ORPE mengandung polisakarida dengan konsentrasi 7,125 mg/mL.

4.4.3 Isolasi splenosit mencit

Limpa diangkat dari tubuh mencit menggunakan alat bedah steril. Kemudian, limpa dibersihkan dari sisa darah dan jaringan lain yang tidak digunakan dengan menggunakan NaCl fisiologis. Limpa ditempatkan pada PBS yang berisi Penicillin dan Streptomycin (PBS-PS) dan disimpan dalam *ice box*. Limpa dipotong-potong dalam ukuran kecil dan ditempatkan

dalam petri dish 10 cm yang berisi 5 mL PBS-PS. Potongan limpa ditekan dengan menggunakan 2 *micro slide* steril hingga hancur. Sisa-sisa potongan limpa yang melekat pada *micro slide* dibilas menggunakan PBS-PS dalam petri dish. Suspensi limpa dikoleksi di dalam *conical tube* 50 mL melewati mesh 200. Suspensi disentrifugasi pada 1000 rpm, 5 menit. Pelet ditambahkan buffer Tris-NH₄Cl pH 7,2 10 mL untuk melisiskan sel darah merah. Sentrifugasi 1000 rpm, 5 menit. Apabila suspensi masih terlihat berwarna merah, tambahkan kembali buffer Tris-NH₄Cl pH 7,2 5 mL, kemudian disentrifugasi kembali 1000 rpm, 5 menit. Setelah suspensi terlihat berwarna putih, pellet dicuci menggunakan PBS-PS 10 mL. Sel diresuspensi dalam medium RPMI-1640 + FBS 10% 15 mL. Jumlah sel ditentukan dengan menggunakan hemositometer dengan densitas 3×10^5 sel/mL.

4.4.4 Pengukuran pertumbuhan sel Huh7it

Uji pertumbuhan sel Huh7it menggunakan metode MTT [3-4, 5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromida]. Sel diambil dari inkubator CO₂, kemudian diamati kondisinya untuk memastikan tidak ada kontaminasi. Kultur sel yang digunakan dalam kondisi 80% konfluen untuk dipanen. Sel dipanen dan dihitung jumlahnya, lalu membuat pengenceran sel dengan media DMEM. Kemudian sel ditransfer ke dalam 96-well plate dengan jumlah 5×10^3 sel/ sumuran dilanjutkan dengan menginkubasi sel selama semalam. Ekstrak RPS okra ditambahkan dengan berbagai konsentrasi menggunakan kosolven DMSO dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂ 5 % selama 48 jam. Setelah inkubasi berakhir ditambahkan 15 µl reagen MTT konsentrasi (0,5 mg/ ml) dalam 135 µl DMEM ke dalam setiap sumuran. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam sampai terbentuk formazan. Pengamatan kondisi sel dilakukan dengan mikroskop inverted. Jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan stopper 50 µl DMSO tiap *well* dan dibaca nilai OD dengan dengan ELISA reader pada λ 560 nm dan 750 nm.

4.4.5 Pengukuran persentase apoptosis sel Huh7it

Sebanyak 1×10^5 sel Huh7it pada 24 *well plate* diinkubasi CO₂ 5% pada suhu 37°C. Setiap *well* diberi ekstrak polisakarida okra sesuai kelompok dosis dan diinkubasi selama 48 jam. Sel dicuci dengan PBS dan diletakkan pada *microtube* serta dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Sel pada masing-masing *microtube* dicuci dua kali dengan BioLegend's *Cell Staining Buffer* dan disentrifugasi sel pada kecepatan 1500 rpm pada suhu 4°C. Sel diresuspensi pada Annexin V *Binding Buffer* dengan konsentrasi $0.25-1.0 \times 10^6$ cells/ml. Sebanyak 100 µl suspense sel dipindahkan dalam 5 ml *test tube*. Sebanyak 5 µl FITC Annexin V dan 10 µl Propidium Iodide *Solution* ditambahkan, lalu di-*vortex*. Inkubasi

selama 15 menit pada suhu ruang (25°C) dalam kondisi gelap. Sebanyak 400 µl Annexin V *Binding Buffer* ditambahkan pada masing- masing *test tube*. Sel kemudian dianalisa dengan BD FACS Verse *flow cytometer* FACS Calibur Flow Cytometer (*Becton Dickinson Bio Science*).

4.4.6 Pengukuran aktivasi sel NK

Splenosit bertindak sebagai sel efektor (SE) dan sel Huh7it sebagai sel target (ST). SE sebanyak 3×10^5 *cell/well* ditambahkan ke ST sebanyak 6×10^3 *cell/well* dengan perbandingan 50:1. Sel dikultur dalam 96 *well plate* dalam media RPMI-1640 dan diinkubasi pada suhu 37 °C dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam. 10 µL MTT *solution* (5mg/ml PBS) ditambahkan dalam tiap *well*. Sel kemudian diinkubasi selama 4 jam. Sebanyak 100 µL *acidified SDS solubilizer* (10% SDS + 0,01 N HCl) ditambahkan dalam tiap *well*, lalu diinkubasi selama semalam (16 jam). Setelah melalui proses inkubasi, OD dibaca dengan *microplate reader* pada λ 560 nm dan 750nm. Persentase aktivasi sel NK dihitung dengan rumus: (%) aktivasi sel NK = (OD sel target kontrol – (OD perlakuan – OD sel efektor kontrol))/ OD sel target kontrol × 100%.

4.5 Variabel dan Definisi Operasional

4.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak polisakarida okra (*Abelmoschus esculentus* L.).

4.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah persentase pertumbuhan sel Huh7it, apoptosis sel Huh7it, dan aktivasi sel NK.

4.5.3 Variabel kendali

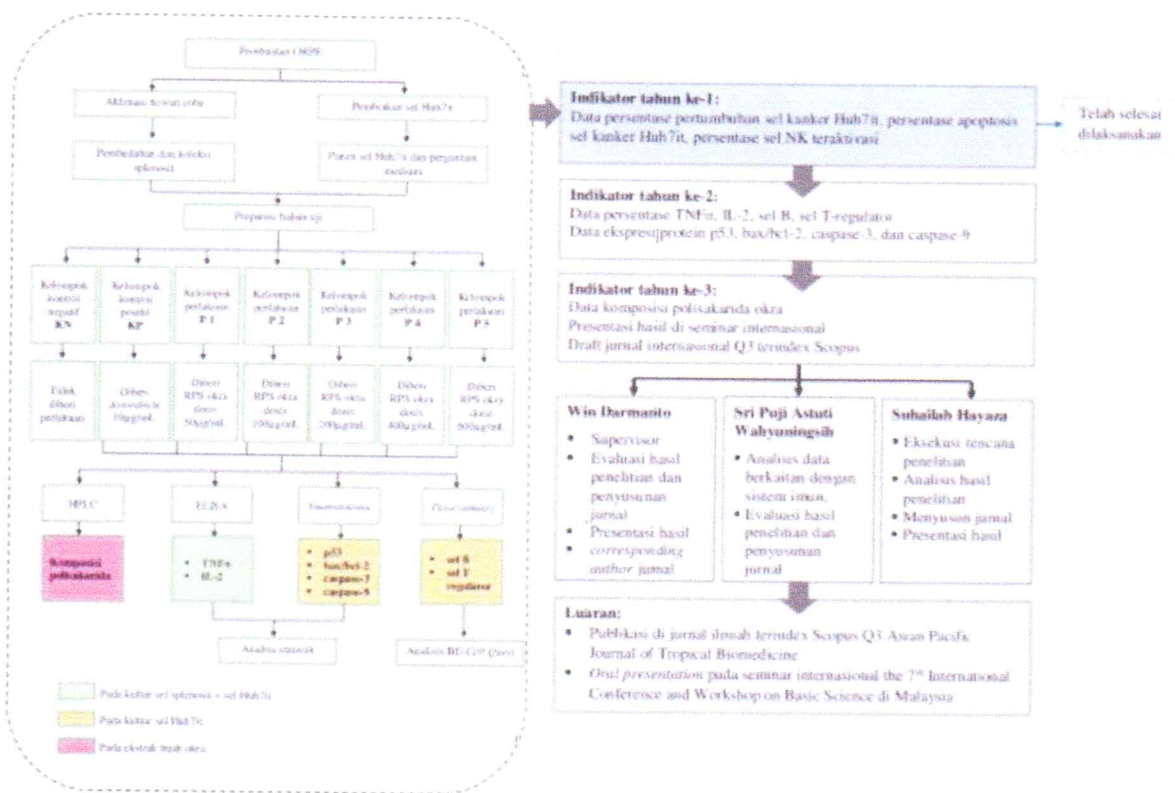
Variabel kendali dalam penelitian ini adalah sel Huh7it (galur sel kanker hati), sel *Natural Killer*, dosis pemberian *doxorubicidin*, suhu dan kelembapan ruangan.

4.6 Analisis Data

Pembacaan hasil apoptosis sel dengan menggunakan *Flowcytometry* di analisis dengan program BD *Cell Quest*. Data OD pertumbuhan sel Huh7it dan sel NK dianalisis dengan program SPSS 22.0. Seluruh data dilakukan uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* dan uji homogenitas *Levene*. Apabila data homogen dan distribusinya normal maka diuji analisis varian satu arah (*One Way ANOVA*) untuk mengetahui ada beda pengaruh antar kelompok perlakuan. Apabila terjadi perbedaan yang bermakna nyata, dilanjutkan dengan uji *Duncan*

dengan $\alpha = 0,05$. Apabila data tidak berdistribusi normal maka data dianalisis dengan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

4.7 Bagan Alir Penelitian



Gambar 4.2 Bagan Alir Penelitian



BAB V

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1 Hasil Penelitian

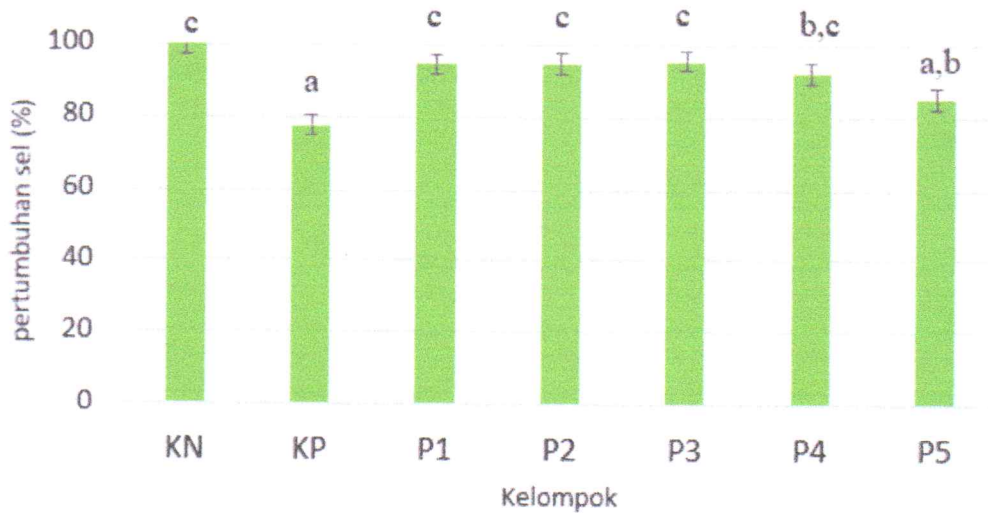
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antikanker Okra *Raw Polysaccharide Extract* (ORPE) secara *in vitro*. Parameter antikanker yang digunakan adalah persentase pertumbuhan dan apoptosis sel Huh7it, serta aktivitas sel NK yang diisolasi dari mencit (*Mus musculus*) jantan.

5.1.1 Pengaruh pemberian variasi dosis ekstrak ORPE terhadap persentase pertumbuhan sel kanker hati Huh7it

Persentase pertumbuhan sel kanker diukur pada kultur sel Huh7it yang telah di *seeding* selama semalam dan berada pada kondisi 80% konfluen untuk dipanen. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan metode MTT [3-4, 5-dimetiltiazol-2-il-2,5 difeniltetrazolium bromida]. Data hasil pengukuran *optical density* (OD) dan presentase pertumbuhan dari masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat pada Lampiran 1. Perbandingan rata-rata hasil persentase pertumbuhan sel Huh7it dari setiap kelompok disajikan pada Gambar 5.1. Data persentase pertumbuhan, apoptosis awal, apoptosis akhir, dan nekrosis sel Huh7it serta persentase aktivasi sel NK pada masing- masing kelompok perlakuan disajikan dalam Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Data persentase pertumbuhan, apoptosis, nekrosis sel Huh7it, serta aktivasi sel NK pada masing- masing kelompok perlakuan

Kel.	Pertumbuhan (%)	Apoptosis awal (%)	Apoptosis akhir (%)	Nekrosis (%)	Aktivasi sel NK (%)
KN	100,00±0,00	1,19	0,78	6,82	77,54±0,87
KP	77,57±6,42	5,67	5,74	6,97	18,61±0,31
P1	94,48±3,55	2,78	5,35	9,05	83,00±2,85
P2	94,71±3,99	3,84	5,82	10,92	85,00±3,14
P3	95,46±5,50	4,50	4,44	8,31	86,14±3,48
P4	91,97±4,33	3,00	2,00	12,61	86,30±3,58
P5	84,85±4,14	5,62	3,51	13,35	87,55±2,59



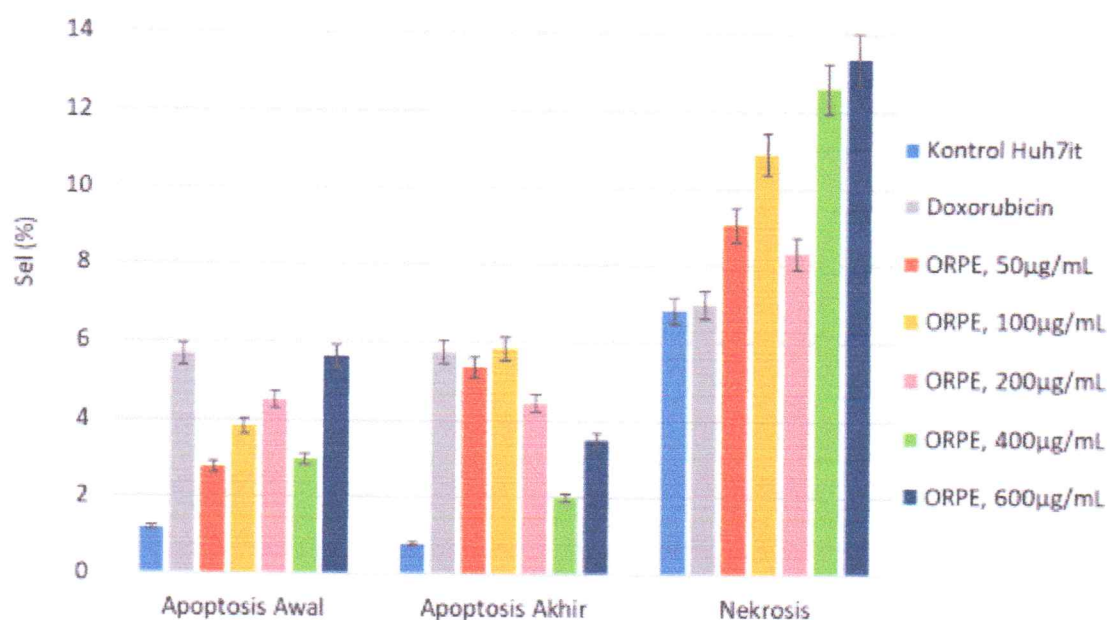
Gambar 5.1. Perbandingan persentase pertumbuhan sel kanker hati Huh7it pada masing-masing kelompok perlakuan. Huruf di atas grafik menunjukkan hasil uji Duncan ($\alpha=0,05$). KN: kontrol sel Huh7it, KP: kontrol positif doxorubicin 10 $\mu\text{g/mL}$, P1: pemberian ORPE dosis 50 $\mu\text{g/mL}$, P2: pemberian ORPE dosis 100 $\mu\text{g/mL}$, P3: pemberian ORPE dosis 200 $\mu\text{g/mL}$, P4: pemberian ORPE dosis 400 $\mu\text{g/mL}$, P5: pemberian ORPE dosis 600 $\mu\text{g/mL}$.

Hasil uji normalitas dengan uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan bahwa data persentase pertumbuhan sel Huh7it berdistribusi normal ($\alpha=0,20$), sedangkan uji homogenitas dengan uji Levene menunjukkan variansi data homogen ($\alpha=0,12$). Selanjutnya, uji ANOVA satu arah digunakan untuk menentukan adanya beda signifikan di antara kelompok perlakuan. Dari analisis ANOVA satu arah ditemukan adanya perbedaan bermakna ($\alpha=0,00$), sehingga analisis dilanjutkan dengan uji Duncan. Uji statistik persentase pertumbuhan sel Huh7it setelah pemberian perlakuan dapat dilihat pada Lampiran 4.

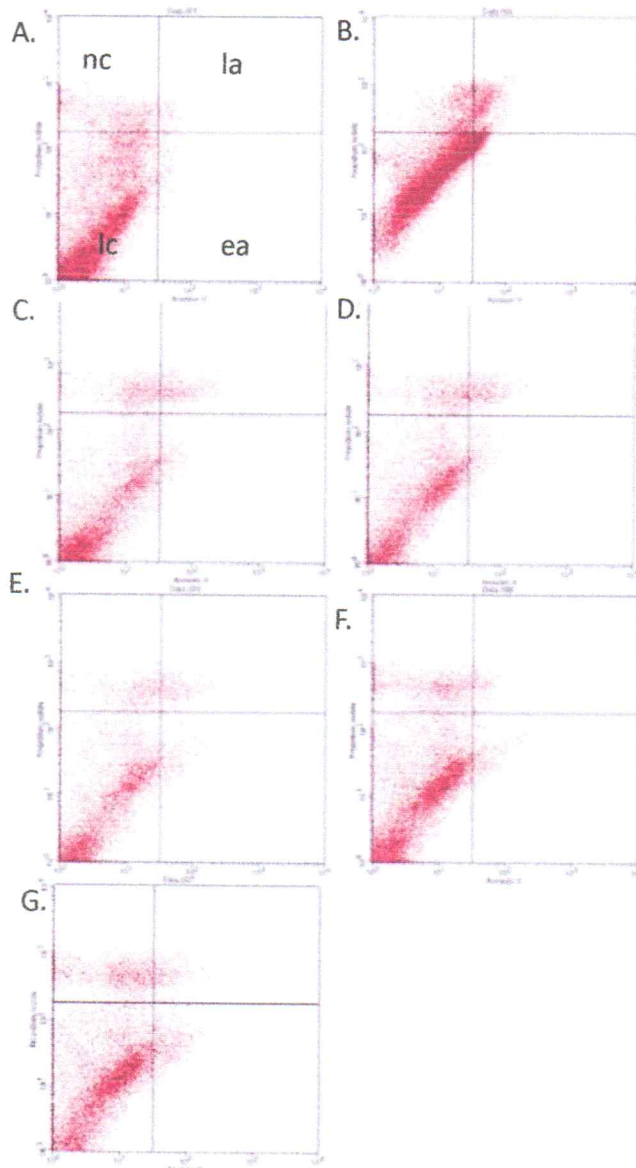
Dari hasil pengukuran persentase pertumbuhan sel Huh7it, dapat dilihat bahwa kelompok P5 memiliki persentase pertumbuhan paling rendah (84,85%) jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain. Kelompok P1 hingga P3 memiliki persentase pertumbuhan yang masih tinggi dengan persentase masing-masing sebesar 94,47%, 94,71%, dan 95,45%, tidak memiliki beda yang signifikan dengan kelompok KN (100%). Hasil uji statistik menunjukkan bahwa kelompok P4 dan P5 berbeda signifikan dari kelompok KN, P1, P2, dan P3. Namun, kelompok ini belum menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok KP doxorubicin.

5.1.2 Pengaruh pemberian variasi dosis ORPE terhadap persentase apoptosis sel kanker hati Huh7it

Persentase apoptosis dianalisis menggunakan *flowcytometry*. Sel Huh7it dikultur selama semalam dan dipanen pada kondisi 80% konfluen. Setelah pemberian doxorubicin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pada kelompok KP dan pemberian ORPE pada kelompok P1 hingga P5 sesuai dosis yang telah ditentukan, masing- masing kelompok diberi antibodi FITC Annexin V dan PI pada suspensi untuk mendeteksi sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis. Interpretasi data hasil *flowcytometry* dilakukan dengan menggunakan program BD CellQuest™ Pro. Seluruh data nilai persentase apoptosis dan nekrosis dapat dilihat pada Lampiran 1. Perbandingan hasil persentase apoptosis awal, apoptosis akhir, dan nekrosis dari setiap kelompok disajikan pada Gambar 5.2. Sebaran sel pada uji *single cell basis* dengan *flowcytometry* dapat dilihat pada Gambar 5.3 dan keseluruhan hasil *flowcytometry* dapat dilihat pada Lampiran 3.



Gambar 5.2. Perbandingan persentase sel yang mengalami apoptosis awal, apoptosis akhir, dan nekrosis pada masing-masing kelompok perlakuan.



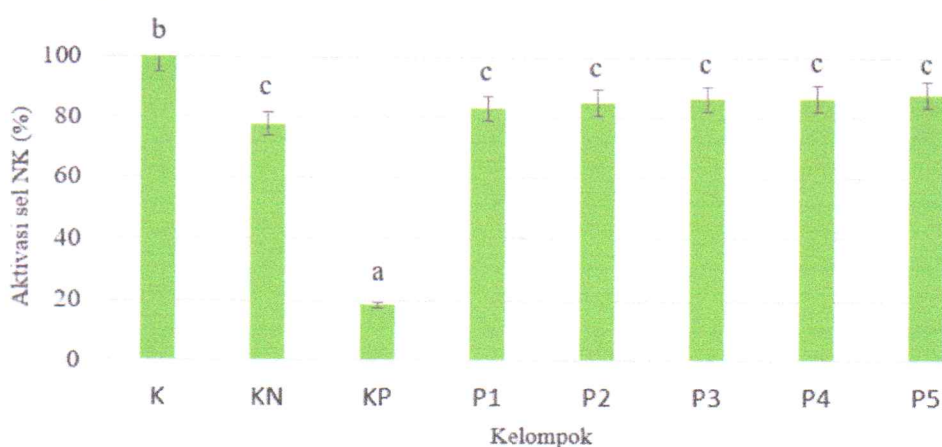
Gambar 5.3. Distribusi sel yang mengalami apoptosis dan nekrosis pada masing-masing kelompok perlakuan. nc: nekrosis, la: apoptosis akhir, ea: apoptosis awal, lc: sel hidup. A: kontrol normal, B: kontrol positif doxorubicin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, C: pemberian ORPE dosis 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, D: pemberian ORPE dosis 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, E: pemberian ORPE dosis 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, F: pemberian ORPE dosis 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, G: pemberian ORPE dosis 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Dari hasil pengukuran persentase apoptosis sel Huh7it, didapatkan kelompok P5 dengan persentase apoptosis awal tertinggi (5,62%) jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain, sedangkan persentase terendah dimiliki oleh dosis P1 (2,78%). Fase apoptosis akhir tertinggi dimiliki oleh dosis P2 (5,82%), sedangkan persentase terendah dimiliki oleh kelompok dosis P4 (2,00%). Fase nekrosis tertinggi dimiliki oleh kelompok P5 (13,35%), sedangkan persentase terendah dimiliki oleh kelompok P3 (8,31%).

5.1.3 Pengaruh pemberian variasi dosis ekstrak ORPE terhadap aktivasi sel *Natural Killer* mencit (*Mus musculus*)

Kematian sel kanker juga disebabkan oleh hasil kinerja dari sistem imun tubuh. Salah satunya adalah akibat aktivasi sel NK yang akan menyebabkan sel NK mensekresikan perforin dan granzyme untuk melisis sel kanker target. Dalam penelitian ini, pengukuran dilakukan dengan menggunakan metode MTT [3-4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazolium bromida]. Persentase sel NK yang teraktivasi diukur pada kultur sel Huh7it yang telah di *seeding* selama semalam dan berada pada kondisi 80% konfluen untuk dipanen. Sel NK diperoleh dari splenosit yang diisolasi dari limpa mencit *Mus musculus* jantan. Sel splenosit kemudian dikultur bersama dengan sel Huh7it di medium RPMI dan dinkubasi selama 48 jam. Data hasil pengukuran *optical density* (OD) dan presentase aktivasi sel NK dari masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat pada Lampiran 2. Perbandingan rata-rata hasil persentase sel NK yang teraktivasi dari setiap kelompok disajikan pada Gambar 5.4.

Hasil uji normalitas dengan uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan bahwa data persentase sel NK yang teraktivasi tidak berdistribusi normal ($\alpha=0,000$), sehingga dilakukan uji nonparametric Kruskal-Wallis. Dari uji Kruskal-Wallis data menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($\alpha=0,008$), sehingga dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Uji statistik persentase aktivasi sel NK dapat dilihat pada Lampiran 5. Perbandingan persentase sel NK yang teraktivasi pada masing-masing kelompok perlakuan dan hasil uji Mann-Whitney disajikan pada Gambar 5.4



Gambar 5.4. Perbandingan persentase sel NK yang teraktivasi pada masing-masing kelompok perlakuan. Huruf di atas grafik menunjukkan hasil uji Duncan ($\alpha=0,05$). K: sel splenosit, KN: kontrol normal, KP: kontrol positif doxorubicin 10 $\mu\text{g/mL}$, P1: pemberian ORPE dosis 50 $\mu\text{g/mL}$, P2: pemberian ORPE dosis 100 $\mu\text{g/mL}$, P3: pemberian ORPE dosis 200 $\mu\text{g/mL}$, P4: pemberian ORPE dosis 400 $\mu\text{g/mL}$, P5: pemberian ORPE dosis 600 $\mu\text{g/mL}$.

Dari hasil pengukuran persentase aktivasi sel NK, dapat dilihat bahwa pada kelompok dengan perlakuan ORPE, kelompok P1 memiliki persentase aktivasi sel NK paling rendah (83,00%) jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan ORPE yang lain. Sedangkan kelompok P5 memiliki persentase aktivasi sel NK tertinggi (87,55%). Persentase sel NK yang teraktivasi pada kelompok P1 hingga P5 tidak memiliki perbedaan yang signifikan satu sama lain, begitu pula jika dibandingkan dengan kelompok normal. Seluruh kelompok perlakuan ORPE memiliki persentase aktivasi sel NK yang berbeda signifikan dengan kontrol positif doxorubicin. Pada kelompok kontrol positif doxorubicin, persentase sel NK yang teraktivasi sangat rendah, yaitu hanya sebesar 18,61%.

5.2 Luaran yang Dicapai

Tabel 5.2 Data luaran yang dicapai pada penelitian tahun ke-1

No.	Jenis Luaran	Status
1	Jurnal Q3 Tropical Journal of Pharmaceutical Research	<i>Submit</i> (30 November 2018)
2	Seminar internasional University of Malaya	<i>Oral speaker</i> 8-9 November 2018

BAB VI
RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Rencana kerja pada tahapan tahun ke dua (2) sesuai dengan tabel berikut :

Bulan ke-	Rencana Capaian	Persentase (%)
1	Melakukan pembelian alat dan bahan untuk uji ELISA, <i>flow cytometry</i> , dan imunositokimia	10
2	Melakukan pembelian buah okra, melakukan ekstraksi polisakarida okra dengan 2 metode: direbus dan tanpa direbus, freeze drying ekstrak polisakarida okra	20
3	Melakukan sub-kultur sel kanker Huh7it, <i>seeding</i> sel, Uji MTT sel Huh7it dengan ekstrak polisakarida metode perebusan	25
4	Melakukan uji kadar TNF α dan IL-2 dengan metode ELISA	35
5	Melakukan uji persentase T-reg dan sel B dengan <i>flow cytometry</i>	45
6	Melakukan uji ekspresi protein p53, bax-bcl2, caspase-2, caspase-9 dengan imunositokimia	55
7	Melakukan uji metilasi DNA	65
8	Melakukan uji komposisi polisakarida okra	75
9	Analisis data dan pembahasan	85
10	Melakukan seminar hasil, menyusun <i>draft</i> manuskrip jurnal, serta mengunggah laporan akhir penelitian tahun ke-2	95
11	Melakukan konferensi internasional dan submit manuscript ke-2 di jurnal internasional terindeks Scopus	100

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian tahun pertama yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut.

1. Pemberian variasi dosis ekstrak polisakarida buah okra (*Abelmoschus esculentus* L.) memiliki perbedaan pengaruh terhadap pertumbuhan sel kanker hati Huh7it. Dosis yang mampu menghambat pertumbuhan sel Huh7it tertinggi adalah dosis 600 µg/ml, dengan persentase pertumbuhan sel 84,85%.
2. Pemberian variasi dosis ekstrak polisakarida buah okra (*Abelmoschus esculentus* L.) memiliki perbedaan pengaruh terhadap apoptosis sel kanker hati Huh7it, baik pada fase awal maupun akhir apoptosis. Dosis 600 µg/ml mampu menyebabkan sel mengalami fase apoptosis awal tertinggi. Sedangkan fase apoptosis akhir tertinggi dialami oleh sel dengan pemberian dosis 100 µg/ml.
3. Pemberian variasi dosis ekstrak polisakarida buah okra (*Abelmoschus esculentus* L.) tidak berpengaruh terhadap penurunan aktivasi sel *Natural Killer*. Penurunan aktivitas sel NK terjadi pada pemberian doxorubicin 10µg/ml, dimana sel NK yang teraktivasi hanya 18,61%.
4. Dosis paling optimal sebagai anti kanker pada pemberian polisakarida buah okra (*Abelmoschus esculentus* L.) secara *in vitro* adalah dosis 600 µg/ml.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian tahun pertama ini, penulis menyarankan untuk dilakukannya penelitian mengenai pengaruh pemberian ORPE terhadap ekspresi masing-masing protein pro apoptosis pada sel kanker hati Huh7it. Hal ini untuk mengetahui jalur yang menyebabkan ORPE mampu menginduksi apoptosis pada sel kanker. Selain itu, berdasarkan temuan mengenai tingginya angka nekrosis pada pemberian dosis 600 µg/ml, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kombinasi obat yang mampu mencegah terjadinya nekrosis, misalnya pemberian kombinasi ORPE dengan doxorubicin. Fungsi ORPE secara maksimal sebagai anti kanker maupun anti inflamasi dapat diketahui dengan mengetahui komposisi polisakarida yang terkandung serta mengukur kadar dari masing-masing zat penyusun tersebut, sehingga diketahui peran zat tersebut secara langsung terhadap sel kanker yang ditargetkan.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., dan Lichtman AH. 2010. *Immunity of tumor in: Cellular and molecular immunology*. 5th edition:391-403. Elsevier.
- Alamri, Mohammed S., Abdellatif Mohamed, Shahzad Hussain, dan Jingyuan Xu. 2012. Effect of okra extract on properties of wheat, corn and rice starches. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 10 (1): 217-222.
- Bruix, S. dan Sherman, M. 2005. Management of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 42(5):1208-36. AASLD.
- Burke, Shannon, Tadepally Lakshmikanth, Francesco Colucci, dan Ennio Carbone. 2010. New views on natural killer cell-based immunotherapy for melanoma treatment. *Trends in Immunology*. 31(9): 339-345.
- Cao, W., X.Q. Li, X. Wang, H.T. Fan, X.N. Zhang, Y. Hou, S.-B. Liu, dan Q.B. Mei. 2010. A novel polysaccharide, isolated from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels induces the apoptosis of cervical cancer HeLa cells through an intrinsic apoptotic pathway. *Phytomedicine*. 17: 598-605.
- Chen, Huricha, Hanwei Jiao, Ying Cheng, Kailian Xu, Xiaoxiao Jia, Qiaoyun Shi, Shiyu Guo, Manchuriga Wang, Li Du, dan Fengyang Wang. 2016. In Vitro and In Vivo Immunomodulatory Activity of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) Polysaccharides. *Journal of Medicinal Food*. 19(3):253-265.
- Demchenko, Alexander P. 2013. Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology*. 65(2): 157-172.
- Dunn, Gavin P., Catherine M. Koebel, dan Robert D. Schreiber. 2005. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*. 6: 836-848.
- Emens L.A. dan G. Middleton. 2015. The Interplay of Immunotherapy and Chemotherapy: Harnessing Potential Synergies. *Cancer Immunology Research*. 3(5):436-443.
- Favaloro, B., N. Allocati, V. Graziano 1,2, C. Di Ilio dan V. De Laurenzi. 2012. Role of Apoptosis in disease. *Aging*. vol. 4.
- Han, Dae Jong, Jong Bin Kim, Seo Young Park, Man Gil Yang, dan Hyuncheol Kim. 2013. Growth Inhibition of Hepatocellular Carcinoma Huh7 Cells by *Lactobacillus casei* Extract. *Yonsei Med J* 54(5):1186-1193.
- Jadapalli, Jeevan Kumar, Griffin M. Wright, Vasundhara Kain, Mohammad Asif Sherwani, Nabiha Yusuf, dan Ganesh V. Halade. 2018. Doxorubicin triggers splenic contraction and irreversible dysregulation of COX and LOX that alters inflammation-resolution program in the myocardium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*.
- Jain, N., Jain, R., Jain, V., dan Jain, S. 2012. A Review on: *Abelmoschus esculantus*. *Pharmacia*. 3: 84-89.
- Jawapos, 2017. Miris, Indonesia Peringkat Pertama di Dunia untuk Penderita Kanker Serviks. <https://www.jawapos.com/read/2017/02/21/111127/miris-indonesia-peringkat-pertama-di-dunia-untuk-penderita-kanker-mematikan-ini>. Diakses tanggal 15 April 2018.

- Karnjanapratum, Supatra, dan SangGuan You. 2011. Molecular characteristics of sulfated polyssacharides from *Monostroma nitidum* and their in vitro anticancer and immunomodulatory activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 48: 311-318.
- Lim, T.K. 2012. *Abelmoschus esculentus*. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. 160-167. Springer, Dordrecht.
- Llovet, Josep M, Andrew Burroughs, dan Jordi Bruix. 2003. Hepatocellular Carcinoma. *The Lancet* 362: 1907-1917. Elsevier.
- Meng, X., Liang, H., dan Luo, L. 2016. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydrate Research*. 424: 30-41.
- Minotti, Giorgio, Stefania Recalcati, Alvaro Mordente, Giovanni Liberi, Antonio Maria Calafiore, Cesare Mancuso, Paolo Preziosi, dan Gaetano Cairo. 1998. The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium. *The FASEB Journal*. 12(7):541-52.
- Molfetta, Rosa, Linda Quatrini, Angela Santoni, dan Rossella Paolini. 2017. Regulation of NKG2D-Dependent NK Cell Functions: The Yin and the Yang of Receptor Endocytosis. *International Journal of Molecular Science*. 18:1677. MDPI.
- Moradpour, D., Penin F, dan Rice CM. 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5:453-463.
- Osińska, Iwona, Katarzyna Popko, dan Urszula Demkow. 2014. Perforin: an important player in immune response. *Central European Journal of Immunology*. 39:109-115.
- Rieger AM, Kimberly L. Nelson, Jeffrey D. Konowalchuk, dan Daniel R. Barreda, 2011. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiment*. 50: 2597.
- Roy, Anupam, Shanker Lal Shrivastava, dan Santi M. Mandal. 2014. Functional properties of Okra *Abelmoschus esculentus* L. (Moench): traditional claims and scientific evidences. *Plant Science Today*. 1(3):121-130.
- Sabitha, V., S. Ramachandran, K. R. Naveen, dan K. Panneerselvam. 2011. Antidiabetic and antihyperlipidemic potential of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*. 3(3).
- Sainz, Bruno Jr., Veronica TenCate, dan Susan L Uprichard. 2009. Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study of Hepatitis C virus infection. *Virology Journal* 6:103. BioMed Central Ltd.
- Sarangi, Itisam, Dipanjan Ghosh, Sujit Kumar Bhutia, Sanjaya Kumar Mallick, dan Tapas K. Maiti, 2006. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *International Immunopharmacology*. 6(8): 1287-1297.
- Shui, Guanghou, dan Leong Lai Peng. 2004. An improved method for the analysis of major antioxidants of *Hibiscus esculentus* Linn. *Journal of Chromatography A*. 1048(1):17-24. Elsevier.

- Sigal, A. dan Rotter, V. 2001. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Research* 60:6788-6793. AACR Publication.
- Sulaiman, Akbar, Lesmana dan Noer. 2007. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Hati*. Jakarta: Jayabadi.
- Sun, Yaoyao, Mofei Guo, Yuanjie Feng, Huifang Zheng, Ping Lei, Xiande Ma, Xiaowei Han, Hongquan Guan, dan Diandong Hou. 2016. Effect of ginseng polysaccharides on NK cell cytotoxicity in immunosuppressed mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 12(6): 3773-3777.
- Tomsik, Pavel, Tomas Soukup, Eva Cermakova, Stanislav Micuda, Mohamed Niang, Lenka Sucha, dan Martina Rezacova. 2011. L-rhamnose and L-fucose suppress cancer growth in mice. *Central European Journal of Biology*. 6(1): 1-9. Springer.
- Tong, P.S. 2016. Okra (*Abelmoschus esculentus*) – a popular crop and vegetable. *Agriculture Science Journal*. 2(3). Malaysia.
- Topham, Nicola J., dan Eric W. Hewitt. 2009. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger. *Immunology*. 128:7-15.
- Wahyuningsih, S. P. A., M. Pramudya, I. P. Putri, N. I. I. Savira, D. Winarni, L. Suhargo, W. Darmanto. 2017. Okra Polysaccharides Improves Spleen Weight and B-Lymphocytes Proliferation in Mice Infected by *Staphylococcus aureus*. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*. 9 (3): 460-465.
- Waldhauer, I., dan A. Steinle. 2008. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*. 27:5932-5943.
- Warren, Hilary S. 1996. NK cell proliferation and inflammation. *Immunology and Cell Biology*. 74:473-480.
- Xia, Linjing, Xiaofei Liu, Huiyuan Guo, Hao Zhang, Jun Zhu, dan Fazheng Rena. 2012. Partial characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from the stem of *Dendrobium officinale* (Tiepishihu) in vitro. *Journal of Functional Foods*. 4: 294-301.
- Xu, F., Liao K., Wu Y., Pan Q., Wu L., dan Jiao H. 2016. Optimization, characterization, sulfation and antitumor activity of neutral polysaccharides from the fruit of *Borojoa sorbilis* cuter. *Carbohydrate Polymer*. 151:364-372.
- Yu, Jie, Ruilin Sun, Zhongquan Zhao, dan Yingyu Wang. 2014. *Auricularia polytricha* polysaccharides induce cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer A549 cells. *International Journal of Biological Micromolecules*. 68: 67-71.
- Zhang, Fang, Jun-Jun Shi, Kiran Thakur, Fei Hu, Jian-Guo Zhang dan Zhao-Jun Wei. 2017. Anti-Cancerous Potential of Polysaccharide Fractions Extracted from Peony Seed Dreg on Various Human Cancer Cell Lines Via Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Frontiers in Pharmacology*. 8(102): 1-13.
- Zhang, Tong, Bethany A. Lemoi, dan Charles L. Sentman. 2005. Chimeric NK receptor-bearing T cells mediate anti-tumor immunotherapy. *Blood Journal*. 106 (5): 1544-1551.

Lampiran 1. Bukti keikutsertaan sebagai *oral speaker* pada University of Malaya Symposium



Reference Number : UM S/P/636/1/UMInd 2018
Date : 15th October 2018

Suhallah Hayaza,
Universitas Airlangga

NOTIFICATION OF PRESENTATION MODE

On behalf of the Scientific Committee, I am pleased to inform that your abstract entitled:

"In vivo Assessment of Antidiabetic Activity of Ketapang (*Terminalia catappa* L.) Leaves Extract on Streptozotocin-Induced Diabetic Mice"

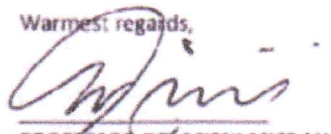
has been recommended for **ORAL PRESENTATION** at the *University of Malaya-Indonesian Universities Symposium 2018 (UMInd 2018)* scheduled on 8th – 9th November 2018 at University of Malaya, Malaysia.

Kindly complete the online registration via the conference website (umconference.um.edu.my) and proceed payment if you have yet to do so. Please email us the proof of payment once it has been done.

UMInd 2018 endeavors to be an exciting event, both scientifically and culturally through sharing of regional knowledge, resources and technologies for advancement of science. We look forward to welcoming you to the beautiful campus of our university!

Thank you very much for your contribution to UMInd 2018.

Warmest regards,


PROFESSOR DR. MISNI MISRAN
Chairperson
UMInd 2018 Symposium

***SHARING REGIONAL KNOWLEDGE, RESOURCES AND TECHNOLOGIES
FOR ADVANCEMENT OF SCIENCE***

FACULTY OF SCIENCE, UNIVERSITY OF MALAYA, 50603 KUALA LUMPUR, MALAYSIA
Tel: +603-79674201; Fax: +03-7956 6343
Website: <https://umconference.um.edu.my/UMIND2018>
Contact e-mail: umind2018@um.edu.my (Secretariat UMInd 2018)

