

Artikel Penelitian

Pemberian Kombinasi 5FU-Leucovorin dengan *Phaleria macrocarpa* terhadap Proliferasi Sel dan Diameter Adenokarsinoma Kolon Tikus *Sprague dawley*

Administration of 5FU-Leucovorin and Phaleria macrocarpa on Cell Proliferation and Adenocarcinoma Colon Diameter of Sprague dawley Rat

¹Luqman Alwi, ²Selamat Budijitno, ³Edwin Basyar

¹Laboratorium Bedah Umum Fakultas Kedokteran Rumah Sakit dr. Kariadi Semarang

²Laboratorium Onkologi Bedah Tumor dan Kepala Leher Fakultas Kedokteran Rumah Sakit dr. Kariadi Semarang

³Laboratorium Bedah Anak Fakultas Kedokteran Rumah Sakit dr. Kariadi Semarang

ABSTRAK

Insidensi kanker kolon di seluruh dunia masih tinggi dan menjadi penyebab kematian terbanyak kategori penyakit tidak menular. Pembedahan tetap merupakan pilihan utama dengan modalitas lainnya berupa kemoterapi, radiasi dan imunoterapi seperti *P. macrocarpa* (Mahkota Dewa). Penelitian dilakukan dengan desain eksperimental laboratorik dengan desain *post test only* menggunakan tikus putih betina strain *Sprague dawley* dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok K (kontrol), P1 (kelompok kemoterapi), P2 (kelompok *P. macrocarpa*), dan P3 (Kelompok kombinasi). Tumor kolon diperoleh dengan induksi 1,2-DMH subkutan. Kemoterapi yang diberikan 5FU-Leucovorin sebanyak 6 siklus sesuai *Rosswell Park Regiment*. *P. macrocarpa* diberikan dengan dosis 0,495mg/hari (0,99mL/hari) per oral. Proliferasi sel dinilai dengan pengecatan IHC Ki-67 sedangkan diameter massa tumor diukur menggunakan caliper tumor. Proliferasi sel dan diameter massa tumor didapatkan rerata kelompok K, P1, P2, P3 berturut-turut 37,150±8,878, 28,567±12,531, 35,533±8,982, 22,567±3,445 dan 1,403±0,265, 1,135±0,154, 1,339±0,111, 1,074±0,164. Analisis statistik menunjukkan terdapat perbedaan bermakna pada proliferasi sel antara kelompok K vs P3 ($p=0,011$), P2 vs P3 ($p=0,022$) dan pada diameter massa tumor antara kelompok K vs P1 ($p=0,020$), K vs P3 ($p=0,005$), P2 vs P3 ($p=0,021$). Analisis korelasi proliferasi sel dengan diameter massa tumor didapatkan korelasi tidak bermakna ($p=0,405$). *P. macrocarpa* mempunyai potensi sebagai imunostimulator yang dapat meningkatkan efektivitas kemoterapi 5FU-Leucovorin dalam hal penurunan proliferasi sel dan penurunan diameter adenokarsinoma kolon tikus *Sprague dawley*.

Kata Kunci: Adenokarsinoma kolon, *P. macrocarpa*, proliferasi sel

ABSTRACT

The incidence of colon cancer worldwide is still high and becomes the highest cause of death of non-communicable disease category. Surgery remains the primary choice with other modalities such as chemotherapy, radiation, and immunotherapy using P macrocarpa. This study was conducted with laboratory experimental design with post test only design using female Sprague Dawley strain rats that were divided into 4 groups, namely, K (control), P1 (chemotherapy), P2 (P macrocarpa), and P3 (combination). Colon tumors were obtained by inducing 1,2-DMH subcutaneously. 5FU-leucovorin chemotherapy was given as much as 6 cycles according to ROSSWELL Park Regiment. P macrocarpa was given orally at a dose of 0,495mg/day (0,99mL/day). Cell proliferation was assessed using Ki-67 IHC staining while the diameter of the tumor mass was measured using a tumor caliper. Mean value of Cells proliferation and the diameter of the tumor mass obtained from group K, P1, P2, P3 were 37,150±8,878, 28,567±12,531, 35,533±8,982, 22,567±3,445 and 1,403±0,265, 1,135±0,154, 1,339±0,111, 1,074±0,164 respectively. The statistical analysis showed that there were significant differences in cell proliferation between groups K vs P3 ($p=0,011$), P2 vs P3 ($p=0,022$) and the diameter of the tumor mass between the groups K vs P1 ($p=0,020$), K vs P3 ($p=0,005$), P2 vs P3 ($p=0,021$). Correlation analysis of cell proliferation by the diameter of tumor mass showed insignificant correlation ($p=0,405$). P. macrocarpa has a potential as immunostimulatory to increase the effectiveness of 5FU-leucovorin chemotherapy in terms of decreasing cell proliferation and decreasing colonic adenocarcinoma diameter of Sprague Dawley rats.

Keywords: Cell proliferation, colon adenocarcinoma, *P. macrocarpa*

Korespondensi: Luqman Alwi. Laboratorium Bedah Umum di Fakultas Kedokteran Rumah Sakit dr. Kariadi Semarang, Jl. dr. Soetomo No. 16, Semarang Tel. 08882509343 Email: luqman.alwi@gmail.com

DOI: <http://dx.doi.org/10.21776/ub.jkb.2017.029.03.7>

PENDAHULUAN

Insidensi kanker kolon di seluruh dunia tahun 2008 sebanyak 1.233.700 jiwa, dengan angka kematian sebanyak 608.700 jiwa. Data dari *United States Cancer Statistic* menunjukkan sebanyak 142.950 penduduk di US menderita kanker kolon dan sebanyak 52.857 kematian terjadi akibat kanker kolon (1). Profil Kesehatan Indonesia tahun 2008 menunjukkan bahwa kanker kolon menempati urutan ke 8, di Semarang berdasarkan profil kesehatan kota Semarang tahun 2009 kanker kolon menjadi penyebab kematian terbanyak kedua setelah penyakit jantung dan pembuluh darah pada kategori penyakit tidak menular.

Pembedahan tetap merupakan pilihan utama kanker kolon, modalitas lainnya berupa terapi *adjuvant* dalam bentuk kemoterapi, dan radiasi. Regimen yang sering digunakan yaitu 5FU-Leucovorin. Modalitas terapi kanker kolon lainnya yaitu imunoterapi yang bekerja dengan cara memodulasi sistem kekebalan tubuh. Penggunaan terapi alternatif terhadap kanker menjadi kecenderungan umum di dunia, data dari US sebanyak 74,3% dari total responden 31.044 menggunakan minimal satu macam terapi alternatif (2). Di Indonesia *Phaleria macrocarpa* telah banyak digunakan dan dijual di pasaran sebagai pengobatan anti kanker.

Phaleria macrocarpa memiliki zat aktif *alkaloid*, *saponin*, *tannin*, dan terutama *flavonoid* dan *polifenol* (3). Senyawa *polifenol* yang terkandung dalam *herbal medicine* juga mempunyai efek memblok reseptor *growth factor*, dan menghambat *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), pada jalur sinyal *Receptor Tyrosin Kinase* (RTKs) (4-6). Pada penelitian terhadap kanker payudara ditemukan bahwa senyawa *polifenol* yang terkandung dalam *herbal medicine* (teh hijau) mempunyai efek inhibisi pada MAPK (7). *Polifenol* juga akan memblok berbagai RTKs, seperti *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* (PDGFR), *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR) yang sangat berperan dalam proliferasi sel (8,9). Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan efek pemberian *crude extract Phaleria macrocarpa* pada tikus *Sprague dawley* yang diinduksi dengan adenokarsinoma kolon dan mendapatkan kemoterapi 5FU-Leucovorin dalam hal proliferasi sel dan perubahan diameter massa tumor serta hubungan antara proliferasi dan diameter massa tumor.

METODE

Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih betina strain *Sprague dawley* dengan berat 200-250gram yang diperoleh dan dirawat di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 4 (LPPT4), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Besar sampel sebanyak 6 ekor untuk masing-masing kelompok sesuai alur kerja WHO (10). Hewan coba diberi pakan standar pellet jenis AD II. Sebelum diberi perlakuan hewan coba diadaptasikan terhadap kondisi laboratorium selama 1 minggu. *Ethical Clearance* untuk hewan coba diperoleh dari KEPK Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro-RS Dr. Kariadi, Semarang.

Bahan

Bahan induksi yang digunakan adalah 1,2-Dimethylhidrazine (DMH) diperoleh dari Santa Cruz

Biotechnology, Inc. 2145 Delaware Avenue (Santa Cruz, California). Kemoterapi dilakukan dengan 5FU dan *Leucovorin* dengan merk dagang *Fluorouracyl* dan *Rescuvolin* dari PT. Kalbe Farma. Dosis 5FU dan *Leucovorin* telah disesuaikan dengan BSA tikus (0,03m²) sehingga diberikan dosis masing-masing 0,27mg intravena, sesuai *Rosswell Park Regiment* (11,12).

Phaleria macrocarpa adalah *crude extract* yang diekstraksi dengan pelarut etanol menggunakan metoda sokletasi, pada konsentrasi larutan hasil ekstrak 0,5mg/mL, yang mengandung 3,4,5-*trihydroxybenzoic acid* 10%, diberikan dengan dosis 0,495mg/hari (0,99mL/hari) per oral. Dosis yang diberikan sudah disesuaikan dari dosis manusia menjadi dosis tikus. *Crude extract Phaleria macrocarpa* didapat dari Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro, Semarang

Desain dan Prosedur

Penelitian ini menggunakan 28 ekor tikus strain *Sprague Dawley* yang diinduksi dengan 1,2-dimethylhidrazine dilarutkan dalam 1 mM EDTA-normal saline (pH 6,5) dosis 30mg/kgBB tiap minggu (13). Pada minggu ke-5 dilakukan terminasi 2 ekor tikus didapatkan tumor dengan hasil PA *displasia* berat, pada minggu ke-7 dilakukan terminasi 2 ekor tikus didapatkan hasil PA adenokarsinoma. Selanjutnya dilakukan alokasi acak dengan metode *simple random sampling* dikelompokkan menjadi 4 kelompok. Kelompok I sebagai kontrol positif (K), kelompok perlakuan I (P1) diberi kemoterapi 5FU-Leucovorin, perlakuan II (P2) diberi *Phaleria macrocarpa*, dan perlakuan III (P3) dengan kombinasi kemoterapi 5FU-Leucovorin dan *Phaleria macrocarpa*.

Pada minggu ke-19 dilakukan terminasi, dilanjutkan isolasi dan pengukuran jaringan kanker kolon. Dilanjutkan pembuatan blok paraffin di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Masing-masing sediaan dipotong setebal 4 mikron dan dikonfirmasi patologinya. Semua sediaan terkonfirmasi adenokarsinoma dengan pengecatan H&E oleh 2 orang ahli patologi. Sediaan blok paraffin diambil kembali setebal 4 mikron untuk dilakukan pengecatan IHC Ki-67, lalu diperiksa aktivitas proliferasi sel. Pengecatan IHC dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi RS Dr. Sardjito, Yogyakarta.

Massa tumor diukur menggunakan *caliper* tumor dengan ketepatan 10⁻³ cm. Tumor diukur pada diameter terlebar dengan ukuran satu dimensi. Aktivitas proliferasi sel dihitung dengan melihat jumlah sel yang mengekspresikan antibodi monoklonal Ki-67 ditandai dengan inti sel yang berwarna coklat pada 100 sel. Tiap *slide* dinilai 10 lapangan pandang dimulai dari kiri ke kanan, kemudian ke bawah dimulai dari kiri lagi, kemudian diambil rata-rata hasilnya, menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Dilakukan penilaian jumlah/persentase sel yang terekspressi positif.

Analisis statistik

Data yang didapat diuji normalitas data, dilanjutkan uji parametrik menggunakan *one way ANOVA* dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* menggunakan uji *LSD*. Uji korelasi antara variabel proliferasi sel dengan diameter massa tumor menggunakan uji *Pearson's*. Batas derajat kemaknaan $p \leq 0,05$ dengan interval kepercayaan 95%. Analisa data dilakukan dengan software SPSS Ver. 17.0 for Windows.

HASIL

Hasil menunjukkan rerata proliferasi sel dan diameter tumor paling tinggi ditemukan pada kelompok Kontrol, sedangkan rerata proliferasi sel dan diameter tumor paling rendah ditemukan pada kelompok P3 (kemoterapi 5FU-*Leucovorin* dan *Phaleria macrocarpa*). Jumlah proliferasi sel dan ukuran diameter tumor menurun bila dibandingkan antara kelompok K dengan kelompok P3 yang diberikan kombinasi kemoterapi dengan *Phaleria macrocarpa*. Proliferasi sel dan ukuran diameter tumor pada kelompok P1 yang diberikan kemoterapi lebih rendah dibandingkan kelompok P2 yang diberi *Phaleria macrocarpa*, akan tetapi kedua kelompok tersebut tetap lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kelompok P3 memiliki jumlah proliferasi sel dan ukuran diameter tumor paling rendah dibandingkan seluruh kelompok. Hal ini sesuai dengan hipotesis awal penelitian bahwa pemberian kombinasi akan menurunkan baik proliferasi sel dan diameter tumor. Pemberian *Phaleria macrocarpa* tunggal memiliki efek penurunan terhadap kedua variabel tersebut bila dibandingkan pemberian kemoterapi tunggal.

Uji normalitas Shapiro-Wilk didapatkan distribusi data normal. Analisis dilanjutkan untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok menggunakan *One Way ANOVA* dan *post hoc LSD* (Tabel 1). Hasil uji *post hoc* proliferasi sel didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K dengan kelompok P3 (kombinasi) dan antara kelompok P2 (*Phaleria macrocarpa*) dengan kelompok P3 (kombinasi). Kelompok kombinasi menunjukkan penurunan proliferasi sel yang bermakna dibandingkan kelompok kontrol dan *Phaleria macrocarpa*, tetapi tidak bermakna dibandingkan kelompok kemoterapi. Artinya efek penurunan proliferasi pemberian kombinasi kemoterapi 5FU-*Leucovorin* dan *Phaleria macrocarpa* secara statistik bermakna bila dibandingkan pemberian *Phaleria macrocarpa* saja namun tidak berbeda dengan kemoterapi 5FU-*Leucovorin*.

Hasil uji *post hoc* diameter tumor didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok K dengan kelompok P1 (kemoterapi), antara kelompok K dengan kelompok P3 (kombinasi), dan antara kelompok P2 (*Phaleria macrocarpa*) dengan P3 (kombinasi). Kelompok kemoterapi dan kombinasi mempunyai diameter tumor lebih rendah dan bermakna secara statistik dibanding kelompok lain. Pada kelompok *Phaleria macrocarpa* didapatkan diameter tumor lebih kecil tetapi tidak bermakna dibandingkan kelompok kontrol.

Uji korelasi antara proliferasi sel dan diameter massa tumor diuji menggunakan uji *Pearson* didapatkan korelasi yang lemah dan secara statistik tidak bermakna ($r=0,178$; $p=0,405$). Penurunan proliferasi sel tidak berhubungan dengan penurunan diameter massa tumor pada penelitian ini.

DISKUSI

Pemeriksaan tumor pada kolon secara makroskopis, berhasil tumbuh 100% dari masing-masing kelompok dan bersifat multipel dengan rerata multiplikasi dari kelompok K, P1, P2, dan P3 berturut-turut yaitu 2,5, 2,8, 2,5, dan 2,6. Pemberian kombinasi 5FU-*Leucovorin* + *Phaleria macrocarpa*, mampu memberikan penurunan proliferasi yang secara statistik signifikan bila dibandingkan kontrol positif dan *Phaleria macrocarpa* saja, tetapi tidak berbeda dengan kemoterapi saja. Dalam hal diameter tumor pemberian kombinasi 5FU-*Leucovorin* + *Phaleria macrocarpa* memberikan gambaran diameter yang lebatu *flavonoid* merupakan inhibitor spesifik terhadap CDKs (*Cyclin-dependent kinases*), menginduksi *arrest* pada fase G2/M, *upregulation* gen p53 dan p21, *downregulation* cyclin B1 dan CDK1 yang dapat merubah aktivitas proliferasi sel (15). Pada penelitian ini pemberian 5FU-*Leucovorin* saja atau *Phaleria macrocarpa* saja tidak dapat menurunkan proliferasi sel secara bermakna, dengan pemberian kombinasi mekanisme kerja satu sama lain saling memperkuat penurunan proliferasi sel.

Analisis perbedaan diameter massa tumor antar kelompok perlakuan didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok yang diberi kemoterapi 5FU-*Leucovorin* atau kelompok yang diberi kombinasi 5FU-*Leucovorin* + *Phaleria macrocarpa*. Selain itu terdapat perbedaan bermakna antara kelompok yang diberi *Phaleria macrocarpa* saja dengan kelompok yang diberi kombinasi 5FU-*Leucovorin* + *Phaleria macrocarpa*. Pada kelompok yang diberi kemoterapi regimen standar 5FU-*Leucovorin* dapat menurunkan diameter massa tumor seperti pada kelompok kombinasi 5FU-*Leucovorin* + *Phaleria macrocarpa* tetapi tidak didapatkan perbedaan bermakna. Pada penelitian ini perlu pertimbangan adanya mekanisme *tumor shrinkage* akibat pemberian zat yang dapat mengecilkan tumor karena jaringan tumor memiliki properti 3 dimensi sehingga diperlukan metode pengukuran yang lebih baik untuk menilai penurunan massa tumor.

Kriteria evaluasi respon terapi pada tumor solid yang digunakan kelompok peneliti kanker di Eropa

Tabel 1. Karakteristik data, perbedaan proliferasi sel dan diameter tumor

Karakteristik data	Kontrol (n=6)	Perlakuan 1 (n=6)	Perlakuan 2 (n=6)	Perlakuan 3 (n=6)	Analisis statistik
Multiplikasi tumor (mean tumor/tikus)	2,5	2,8	2,5	2,6	
Proliferasi (median)	37,150	28,300	33,300	23,450	
Proliferasi sel (rerata ± SD)	37,150±8,878	28,567±12,531	35,533±8,982	22,567±3,445	0,041* 0,011** (K vs P3) 0,022** (P2 vs P3) 0,015*
Diameter tumor (rerata ± SD)	1,403±0,265	1,135±0,154	1,339±0,111	1,074±0,164	0,020** (K vs P1) 0,005** (K vs P3) 0,021** (P2 vs P3)

Keterangan: * Diuji dengan *One Way ANOVA* (signifikan $p < 0,05$) ** Diuji dengan *LSD* (signifikan $p < 0,05$)

menggunakan diameter tumor maksimum. Perlu dipertimbangkan juga *tumor load* yang dalam hal ini sering diwakili oleh volume tumor yang secara klinis merupakan faktor penting yang mempengaruhi prognosis (16). Pada penelitian lain diameter maksimal tumor berhubungan dengan jumlah limfonodi positif yang berarti ada hubungan dengan metastasis limfatik dan metastasis jauh (17).

Penelitian ini menggunakan regimen kemoterapi *Rosswell Park* yang menggunakan sitostatika kemoterapi agen tunggal yaitu *5-Fluorouracil* sebanyak 6 siklus. Berdasarkan rekomendasi *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* tahun 2013 regimen kemoterapi pada kanker kolon yang saat ini digunakan dalam bentuk kombinasi seperti *mFOLFOX 6*, *FLOX*, *CapeOx*. Hasil penelitian menunjukkan tidak ada perbedaan antara kemoterapi saja dengan *Phaleria macrocarpa* saja, maupun dengan kombinasi. Temuan ini bukan berarti agen kemoterapi gagal menurunkan proliferasi sel atau menurunkan diameter massa tumor, juga tidak dapat diasumsikan pemberian *Phaleria macrocarpa* sama baiknya dengan pemberian kemoterapi. Hal tersebut dikarenakan saat ini pemberian kemoterapi agen tunggal telah ditinggalkan berdasarkan rekomendasi terbaru yang lebih menyarankan penggunaan kombinasi agen kemoterapi seperti protokol *De Gramont*, *Mayo clinic*, *FOLFOX*, *FLOX*, *CapeOx*, dan sebagainya. Pemberian kombinasi 5FU-Leucovorin + *Phaleria macrocarpa* lebih baik dari semua kelompok, begitu pula dibanding kelompok yang diberi 5FU-Leucovorin saja bukan berarti dikarenakan efek *Phaleria macrocarpa* yang dapat meningkatkan efektivitas. Hal ini kemungkinan dikarenakan adanya sinergi dari semua bahan kimia yang terkandung di dalamnya sehingga tampak lebih baik dari semua kelompok. *Phaleria macrocarpa* yang digunakan bukan dari ekstrak murni tetapi dari *crude extract* sehingga harus dilakukan purifikasi zat aktif di dalamnya untuk mengetahui efek yang lebih jelas terhadap sel tumor.

Pada penelitian terdahulu yang dilakukan Faried dkk ditemukan bahwa zat aktif kandungan *polifenol* dari *Phaleria macrocarpa* berupa *gallic acid* dapat menghambat proliferasi sel kanker kolon HT-29 dengan konsentrasi CPI_{50} 0,24mg/ml dan kanker kolon Colo201 dengan konsentrasi CPI_{50} 0,18mg/ml (14). Penelitian yang dilakukan Riwanto dkk menemukan bahwa suplementasi *Phaleria macrocarpa* terhadap kemoterapi *adriamycin-*

cyclofosfamid pada kanker payudara dapat menurunkan pertumbuhan tumor dan meningkatkan indeks apoptosis secara signifikan dibandingkan kelompok lain (18). Begitu pula penelitian yang dilakukan Budijitno menemukan bahwa *Phaleria macrocarpa* dapat meningkatkan ekspresi perforin oleh CTL dan sel NK serta meningkatkan indeks apoptosis pada adenokarsinoma mamma (19).

Analisis korelasi proliferasi sel terhadap diameter massa tumor pada penelitian ini didapatkan korelasi yang lemah dan tidak signifikan. Pengukuran diameter massa tumor pada penelitian ini menggunakan metode diameter terlebar satu dimensi, sedangkan proliferasi sel memiliki 3 dimensi sehingga terjadi ketidakakuratan untuk menghitung dimensi tumor. Perlu dipertimbangkan pada penelitian selanjutnya untuk mengukur *tumor load* yang sering diwakili oleh volume tumor. Hal ini bertujuan sebagai acuan klinis dalam menentukan prognosis (16). Pada penelitian penilaian proliferasi dengan marker Ki-67 berkorelasi signifikan dengan keterlibatan metastasis limfonodi regional dan digunakan untuk mengevaluasi derajat agresivitas dan potensi metastasis, pada penelitian lain ekspresi Ki-67 sebagai faktor prognosis pada penderita GIST (20,21). Saleh *et al*, menunjukkan bahwa ekspresi Ki-67 menggambarkan derajat diferensiasi sel neoplasma, makin rendah derajat diferensiasi makin tinggi ekspresi Ki-67 pada sel neoplasma (22), sedangkan Ingolf dkk menunjukkan bahwa ekspresi Ki-67 dapat memprediksi respon kemoterapi neoadjuvan sebagai fungsi sub tipe molekular (23). Kalogeraki *et al* menunjukkan bahwa proliferasi sel adenokarsinoma paru berkorelasi positif dengan peningkatan apoptosis sejalan dengan penurunan *grading* diferensiasi, yang menggambarkan kecepatan "turn over" sel tumor dengan diferensiasi rendah (24). Perlu diketahui juga bahwa marker proliferasi harus dinilai pada aspek yang spesifik terhadap penilaian pertumbuhan tumor, karena adanya korelasi yang bervariasi antar aspek pada setiap siklus sel (25). Diameter tumor kolon terbukti sebagai parameter prognosis independen karena berhubungan signifikan dengan *progression-free* dan *cancer-specific survival* (26), akan tetapi diameter tumor maksimum dan volume tumor tidak dapat memprediksi prognosis *overall survival* (27).

Penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak *Phaleria macrocarpa* mempunyai potensi sebagai imunostimulator yang penggunaannya bersifat suplementatif bagi terapi primer, sehingga dapat dikaji lebih lanjut sebagai sumber alternatif penggunaan obat-obatan tradisional.

DAFTAR PUSTAKA

1. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. *U.S. Cancer Statistics Working Group*. (Online) Apr. 2011. <http://www.cdc.gov/cancer/npcr/uscs/about.htm> [accessed on 17 April 2013]
2. Committee on the Use of Complementary and Alternative Medicine by The American Public. *Complementary and Alternative Medicine in the United States*. Washington: The National Academic Press; 2005.
3. Gangga E, Asriani H, dan Novita L. *Analisis Pendahuluan Metabolit Sekunder dari Kalus Mahkota Dewa (Phaleria Macrocarpa [Scheff.] Boerl.)*. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. 2007; 5(1): 17-22.
4. Harmanto N. *Mahkota Dewa Obat Pusaka Para Dewa: A Medicine the Legacy of the Gods*. 7th edition. Jakarta: Agro Media Pustaka; 2007.
5. Lisdawati V. *Mahkota Dewa: Toksisitas, Efek Antioksidan dan Efek Antikanker Berdasarkan Uji Penapisan Farmakologi*. (Online) April 2012. <http://www.indonetwork.phalerindofarma/34716.htm> [accessed on 18 April 2013].
6. Hendra R, Ahmad S, Oskoueian E, Sukari A, and Shukur MY. *Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxicity of Phaleria macrocarpa (Boerl.) Scheff Fruit*. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2011; 11: 110-119.

7. Deguchi H, Fujii T, Nakagawa S, Koga T, and Shirouzu K. *Analysis of Cell Growth Inhibitory Effect of Cathechin Through MAPK in Human Breast Cancer Cell Line T47D*. International Journal Oncology. 2002; 21(6): 1301-1305.
8. Kusmardiyani S, Nawawi A, dan Rahmi K. *Isolasi Benzofenon dari Daun Mahkota Dewa [Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl.]*. Acta Pharmaceutica Indonesia. 2005; 4: 150-152.
9. Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, and Scholzen T. *Ki-67 Protein is Associated with Ribosomal RNA Transcription in Quiescent and Proliferating Cells*. Journal of Cellular Physiology. 2006; 206(3): 624-635.
10. World Health Organization Regional Office for the Western Pacific. *Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicine*. Manila: WHO Regional Office for the Western Pacific; 1993.
11. Boyiadzis MM, Lebowitz PF, Frame JN, Fojo T. *Hematology-oncology Therapy*. New York: McGraw-Hill; 2006.
12. Saltz and LB and Kemeny NE. *Adjuvant Chemotherapy for Colorectal Cancer*. The Oncologist. 1996; 1(1-2): 22-29.
13. Dani V, Goel A, Vaiphei K, Dhawa DK. *Chemopreventive Potential of Zinc in Experimentally Induced Colon Carcinogenesis*. Toxicology Letters. 2007; 171(1-2): 10-18.
14. Faried A, Kurnia D, Faried LS et al. *Anticancer Effects of Gallic Acid Isolated from Indonesian Herbal Medicine Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl on Human Cancer Cell Lines*. International Journal of Oncology. 2007; 30(3): 605-613.
15. De Azevedo WF, Mueller-Dieckmann HJ, Schulze-Gahmen U, Worland PJ, Sausville E, and Kim SH. *Structural Basis for Specificity and Potency of a Flavonoid Inhibitor of Human CDK2, a Cell Cycle Kinase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996; 93(7): 2735-2740.
16. Therasse P, Arbutk SG, Eisenhauer EA, et al. *New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors*. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. Journal of the National Cancer Institute. 2000; 92(3): 205-216.
17. Balta AZ, Ozdemir Y, Sucullu I, et al. *Can Horizontal Diameter of Colorectal Tumor Help Predict Prognosis?* Ulusal Cerrahi Dergisi. 2014; 30(3): 115-119.
18. Riwanto I, Budijitno S, Dharmana E, et al. *Effect of Phaleria macrocarpa Supplementation on Apoptosis and Tumor Growth of C3H Mice with Breast Cancer Under Treatment with Adriamycin-Cyclophosphamide*. International Surgery. 2011; 96(2): 164-170.
19. Budijitno S, Issakh B, Handojo D, Pudjonarko D, dan Riwanto I. *Pengaruh Ekstrak Mahkota Dewa terhadap Skor Ekspresi Perforin CTL dan Sel NK serta Indeks Apoptosis pada Adenokarsinoma Mamma Mencit C3H*. Jurnal Kedokteran Media Medika Indonesia. 2007; 42(1).
20. Guzińska-Ustymowicz K, Stepień E, and Kemon A. *MCM-2, Ki-67 and PCNA Protein Expressions in pT3G2. Colorectal Cancer Indicated Lymph Node Involvement*. Anticancer Research. 2008; 28(1B): 451-457.
21. Lu C, Liu L, Wu X, and Xu W. *CD133 and Ki-67 Expression is Association with Gastrointestinal Stromal Tumor Prognosis*. Oncology Letters. 2013; 6(5): 1289-1294.
22. Saleh HA, Jackson H, Khatib G, Banerjee M. *Correlation of Bcl-2 Oncoprotein Immunohistochemical Expression with Proliferation Index and Histopathologic Parameters in Colorectal Neoplasia*. Pathology Oncology Research. 1999; 5(4): 273-279.
23. Ingolf J, Russalina M, Simona M, et al. *Can Ki-67 Play a Role in Prediction of Breast Cancer Patients' Response to Neoadjuvant Chemotherapy?* BioMed Research International. 2014; 2014: 7.
24. Kalogeraki A, Tzardi M, Zoras O, et al. *Apoptosis and Cell Proliferation Correlated with Tumor Grade in Patients with Lung Adenocarcinoma*. In Vivo. 2010; 24(5): 667-670.
25. Lee LH, Yang H, and Bigras G. *Current Breast Cancer Proliferative Markers Correlate Variably Based on Decoupled Duration Cell Cycle Phases*. Scientific Reports. 2014; 4: 8.
26. Komprat P, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, Langner C. *Value of Tumor Size as a Prognostic Variable in Colorectal Cancer: A Critical Reappraisal*. American Journal of Clinical Oncology. 2011; 34(1): 43-49.
27. Todosi A, Hutanu I, Gavrilesco MM, Moscalu M, Ferariu D, and Scripcariu V. *Assessment of Tumor Parameters as Factors of Aggressiveness in Colon Cancer*. Journal of Surgery [Jurnalul de Chirurgie]. 2015; 10(4): 291-295.