

**PENGARUH FRAKSI AIR EKSTRAK RIMPANG TEMU MANGGA  
TERHADAP EKSPRESI Ki67  
PADA GALUR SEL KARSINOMA KOLON HT-29**

**DiahAndriana**

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang  
E-mail : andriana\_2209@yahoo.com

**ABSTRACT**

*The incidence rate of colon carcinoma in Indonesia has recently showed significant increase. The management of colon carcinoma has gained a lot from the result of bimolecular studies. This study is aimed as determining the effect of extracted fraction of Temu Mango (Curcuma Mango, Val) on the suppression of Ki67 expression, a protein known as cell proliferation marker. This study was conducted in vitro on HT-29 colon cancer by observing the expression of Ki67.*

*HT-29 colon cancer cell was cultured with the mixture of RPMI 1640 media, 1% fungi zone, and 1% antibiotic on 37°C and 5% CO<sub>2</sub> concentration. Samples were divided into two groups: the TemuMangga group as a positive control and 5-FU group as a negative control. Each group was cultured with 1640 RPMI added with extracted fraction of TemuMangga or 5-FU with concentration series each under LC<sub>50</sub>. Quantification of culture result was done by observing the Ki67 expression presented in cell percentage.*

*This study demonstrated that 5-FU on 150 µg/ml; 75 µg/ml; 37,5 µg/ml; and 18,75 µg/ml concentration and extracted fraction of Temu Mango on 0,125 µg/ml; 0,0625 µg/ml; 0,03125 µg/ml and 0,015625 µg/ml express the suppression of Ki67 expression respectively. Extracted fraction of Temu Mango and 5-FU has the potential of suppressing Ki67 expression. The Ki67 suppression between Temu Mango extract and 5-FU showed no significant difference.*

**Key words:** *Temu Mango extract (Curcuma mangga, Val); 5-FU; Ki67 expression.*

## ABSTRAK

Angka kejadian kanker kolon di Indonesia dewasa ini menunjukkan peningkatan yang cukup berarti. Penatalaksanaan kanker kolon telah banyak memanfaatkan temuan ilmiah hasil kajian molekuler. Penelitian ini dilaksanakan untuk mengetahui pengaruh fraksi air ekstrak temu mangga (*Curcuma mangga*, Val) terhadap penekanan ekspresi Ki67 yaitu suatu protein yang berfungsi sebagai marker proliferasi sel. Penelitian ini dilakukan *in vitro* terhadap kanker kolon HT-29 dengan melihat ekspresi Ki67.

Kultur sel kanker kolon HT-29 dilaksanakan dengan media RPMI 1640, 1% fungizone dan 1% antibiotik pada suhu 37° C dan konsentrasi CO<sub>2</sub> 5%. Sampel dibedakan dalam 2 kelompok perlakuan yaitu kelompok temu mangga sebagai kontrol (+) dan kelompok 5-FU sebagai kontrol (-). Masing-masing kelompok dikulturkan dengan RPMI 1640 lengkap ditambah dengan ekstrak temu mangga fraksi air atau 5-FU dengan serial konsentrasi masing-masing dibawah LC<sub>50</sub>. Dari hasil kultur kemudian dilihat ekspresi Ki67 yang ditampilkan dalam bentuk prosentase sel.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian 5-FU pada konsentrasi 150 µg/ml, 75 µg/ml, 37,5 µg/ml, 18,75 µg/ml dan pemberian temu mangga fraksi air pada konsentrasi 0,125 µg/ml, 0,0625 µg/ml, 0,03125 µg/ml, 0,015625 µg/ml menunjukkan ekspresi Ki67 yang makin menurun dengan meningkatnya dosis. Dapat disimpulkan bahwa fraksi air ekstrak temu mangga dan 5-FU berpotensi menurunkan tingkat ekspresi Ki67.

**Kata kunci :** *Ekstrak temu mangga (Curcuma mangga, Val), 5-FU, ekspresi Ki67*

## PENDAHULUAN

Karsinoma kolon merupakan keganasan ketertinggi di dunia dan sebagai penyebab kematian ketertinggi (terlepas dari gender) di Amerika Serikat.

Karsinoma kolon memiliki insidensi dan angka kematian yang cukup tinggi di negara-

negara berkembang. Angka kejadian yang pasti dari karsinoma kolon di Indonesia belum ada,

tetapi karsinoma kolon masuk dalam 10 jenis kanker tertinggi. Evaluasi data Departemen Kesehatan Republik

Indonesia pada tahun 1986 mendapatkan angka kejadian 1,8 setiap 100.000 penduduk. Berdasarkan data histopatologi kanker di Indonesia tahun 1996 dan 1999,

karsinoma kolon menempati urutan ke-9 yaitu sebanyak 3,11% dan 3,33%. (KKAK, 2004., YKI, 1999., Helena, 1997., Alfred, 1997., Kodner, 1999).

Kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi di

bidang kedokteran khususnya bidang biologi molekuler yang sangat pesat, mempengaruhi tata cara penanganan karsinoma kolon, mulai dari deteksi dini, diagnostik, terapi, prediksi tingkat keganasan, prognosis dan penanganan tindak lanjut.

Pemeriksaan imunohistokimia dapat memberi informasi mengenai kandungan berbagai unsur protein di dalam sel normal maupun neoplastik. Pemeriksaan imunohistokimia sebagai kelanjutan pemeriksaan rutin semakin meningkat penggunaannya, karena informasi berbagai ekspresi protein spesifik dalam sel neoplastik dapat dipakai sebagai salah satu cara untuk menentukan keganasan,

pemilihan metode terapi serta prognosisnya (Ashariati, 2004., Allen 1995., Norton, 2000). Salah satu petanda tumor adalah Ki67. Ki67 merupakan protein spesifik yang

keberadannya melimpah pada saat terjadi pembelahan sel, sehingga Ki67 mudah dideteksi pada pertumbuhan sel normal maupun pada sel tumor. Pemeriksaan secara imunohistokimi terhadap Ki67 pada karsinoma kolon dengan menggunakan metoda Ki-67 labeling index menunjukkan bahwa peningkatan level Ki67 berhubungan dengan kualitas hidup yang buruk, dan pada karsinoma kolon bisa digunakan sebagai petunjuk untuk menentukan perkembangan tumor (Maltzman, 2002., Vilar, 2007., Oshima, 2007).

Selain prosedur baku secara medis, banyak cara yang dilakukan penderita untuk mencari sembuh dari penyakit kanker, salah satunya dengan menggunakan tanaman obat. Meskipun secara empiris potensi darinya manobattersebut dalam menghambat proliferasi sel kanker belum teruji secara ilmiah. Banyak jenis temumangga yang sudah lama dikenal sebagai obat anti kanker, beberapa sudah diisolasi kandungannya menjadi obat kemopreventif dan kemoterapi (Adijaya, 2006., Katzung, 2001). Temumangga mengandung senyawa protein mirip ribosome inactivating protein (RIPs) yang mempunyai aktifitas memotong DNA superkoil. Secara in vitro ekstrak kasar Curcuma mangga mempunyai efek sitotoksik terhadap B-LCL (B-lymphoblastoid Cell Lines) dan limfosit normal yang diberikan ekstrak kasar temumanggan menunjukkan bahwa persentase efek sitotoksik pada sel kanker lebih tinggi secara signifikan dibandingkan sel Normal (Sismindari, 2003). 5-FU merupakan agen kemoterapi yang poten untuk karsinoma kolon dan saat ini sudah secara luas digunakan baik sebagai agent tunggal maupun kombinasi dengan agen

kemoterapi yang lain. 5-FU merupakan senyawa anti metabolit, yaitu senyawa yang secara struktural memiliki kemiripan dengan molekul endogenus. Dalam hal ini molekul endogenus yang mirip dengan 5-FU adalah basa nitrogen dari DNA. Senyawa ini mampu berperan dalam jalur metabolisme yang diperankan oleh senyawa yang ditirunya. 5-FU berperan dalam menghambat sintesa asam nukleat (Polymerase DNA) pada fase S (Pecorino, 2005). Berdasarkan uraian di atas dianggap perlu dilakukan penelitian uji laboratorium potensi fraksi air ekstrak rimpang temumangga (Curcuma mangga, Val) dalam menghambat ekspresi Ki67 suatu marker proliferasi sel, dengan menggunakan galur sel karsinoma kolon HT2-9 secara in vitro. 5-FU sebagai kemoterapi tentu digunakan sebagai pembandingan secara deskriptif terhadap ekstrak temumangga. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang berguna bagi kajian terapi komplementer molecular target therapy di masa yang akan datang atau penemuan kandidat anti tumor yang berasal dari ekstrak temumangga.

**METODE PENELITIAN**

### Rancangan penelitian

Penelitian ini berupa penelitian analitik eksperimental laboratorium. Subyek penelitian adalah galur sel kanker kolon HT-29. Penelitian dilakukan selama 3 bulan

### Kultur Sel

Kultur sel HT-29 dilakukan setelah thawing dari tangki nitrogen cair, sel selanjutnya dikultur pada media RPMI 1640, FBS 10%, Penstrep 2%, Fungizone 0,5% setelah konfluent sel dipanen dengan tripsin 0,25%.

### Starvasi

Tujuan langkah ini adalah mencapai keseragaman umur sel HT-29 dalam kultur. Dalam menggunakan RPMI 1640, FBS 0,5%, Penstrep 2%, Fungizone 0,5%, selama 7 hari setiap 3 hari sekali media diganti dengan yang baru.

### Imunositokimia

Biakan sel HT-29 pada media murni dan setelah diberi perlakuan dengan ekstrak rimpang temu mangga serta 5-FU pada konsentrasi dibawah LC<sub>50</sub>, dan 3 serial di bawahnya dikulturkan pada media RPMI 1640. 1% Amphotricin, 2% penstrep, 10% FBS diteteskan dengan 24 well yang dilengkapi dengan *plastic cover slips* dengan diameter 1,3 cm. Setelah 3 hari diperlakukan dengan konsentrasi temu mangga 0,125 ug/ml, 0,0625ug/ml, 0,03125µg/ml, 0,0151625µg/ml dan 5-FU dengan konsentrasi 150ug/ml, 75ug/ml, 37,5ug/ml, 18,75ug/ml, pada konsentrasi 5% CO<sub>2</sub> dan suhu 37°C (dalam inkubator). Setelah itu media diambil dan diganti dengan PBS formalin 10% selama 30 menit. Kemudian PBS diambil dan dicucudenganAquadestkemudianditambah metanol dan 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>selama 30 menit. PBS formalinselanjutnyadiambil dan dicucudenganAquadestkemudianditambahkan metanol selama 30 menit.Welldicucudengan PBS 2x5 menit. Dilakukanblockingdengan normal serumselama 20 menit, diinkubasidenganantibodi Ki67 selama 18 jam pada 4°C. Dicucudenganwashing buffer (PBS) 2 kaliselanjutnyadiinkubasi 20 menitdengan*polyvalent universal HRP conjugate*. Dicucudengan PBS 2 kaliselanjutnyadiinkubasidengan DAB (*DeaminoBenzidin*) sebagai substratensim. Pewarnaantanding (*counterstain*) digunakan*Hematoxilin Mayer*. Pengamatandilakukandenganmikrosko

pcahayaOlympus DP40. Penilaianmaknatampilanekspresi Ki67 dinyatakansebagai prosentasesel yang dihitungberdasarkantampilanpositifdari ki67.

### Pembuatan Temu mangga fraksi air

ekstraksi temu mangga fraksi air berbentuk larutan. Dalam penelitian digunakan temu mangga fraksi air murni (*Curcuma mangga,Val*), yang dibuat dari 100gr serbuk rimpang temu mangga yang dioven selama 3 jam dengan suhu 60° sehingga kadar air 0%, kemudian diencerkan dengan 1000 ml aquabidest dan dipanaskan sehingga mendidih selama 15 menit sehingga tinggal 200 cc dan disaring dengan filter paper mesh dengan porositas 20 µm dan ditimbang sekitar 90 gr.

### Ekspresi Ki67

ekspresi protein Ki67 yang terdapat pada inti sel kanker kolon HT29 sebagai hasil pengecatan *imunostaining* dengan metode *avidin-biotin-complex* menggunakan mouse anti human Mo Ab *Ki67*. Sistem enzimatik yang digunakan adalah peroksidase substrat enzim DAB. Nilai tampilan Ki67 dinyatakan sebagai prosentase sel.

### Proliferasi sel

Proliferasi sel dihitung setelah 24 jam inkubasi pada suhu 37°C dan dilakukan penghitungan jumlah sel secara *direct counting* menggunakan mikroskop *inverted* dan bilik hitung *Improved Neubauer* haemocytometer. Prosentase sel mati ditentukan dengan banyaknya prosentase sel yang menyerap warna *Triphan blue*.

### Analisis data

Data yang diperoleh dalam penelitian, dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Untuk mengetahui kemampuan fraksi air ekstrak rimpang temu mangga (*Curcuma mangga,Val*) dan 5-FU dalam menghambat pertumbuhan sel kanker kolon HT-29 menggunakan uji statistik

korelasi regresi. Uji korelasi regresi dilaksanakan untuk mengetahui:

1. pengaruh pemberian baik 5-FU maupun ekstrak temu mangga fraksi air terhadap penghambatan proliferasi sel kanker kolon HT-29.
2. Pengaruh pemberian 5-FU maupun ekstrak temu mangga fraksi air terhadap tingkat ekspresi Ki67 sel kanker kolon HT-29.

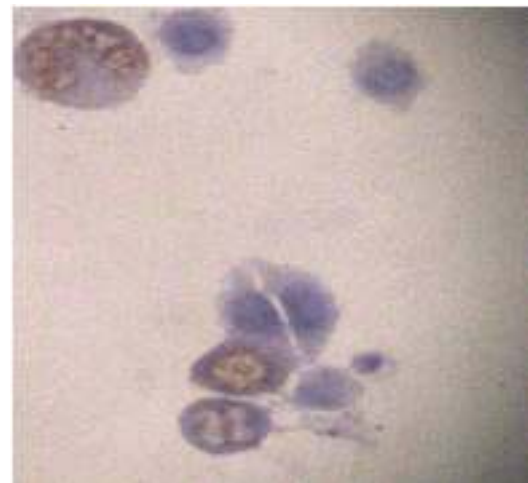
Untuk mengetahui profil perbedaan pengaruh penekanan ekspresi Ki67 antara fraksi air ekstrak temu mangga (*Curcuma mangga, Val*) dengan 5-FU dilakukan secara deskriptif, karena konsentrasi fraksi air temu mangga dan 5-FU tidak sama sehingga tidak dapat dibandingkan secara analitik.

**HASIL PENELITIAN**

**Penentuan Level Ekspresi Ki67 Akibat Pemberian Fraksi air Ekstrak Temu Mangga (*Curcuma mangga, Val*) pada Kultur Sel Karsinoma Kolon HT-29**

Kultur dengan perlakuan fraksi air temu mangga (*Curcuma mangga, Val*) setelah ditentukan konsentrasi LC<sub>50</sub>, selanjutnya dilakukan kultur sel karsinoma kolon HT-29 pada konsentrasi LC<sub>50</sub> yaitu 0,125 µg/ml dan 3 serial konsentrasi di bawahnya sehingga perlakuan yang diberikan menggunakan konsentrasi fraksi air temu mangga sebagai berikut: 0,125 µg/ml, 0,0625ug/ml, 0,03125ug/ml, 0,01563 ug/ml, Pemeriksaan imunositokimia dengan menggunakan *monoklonal antibodi primer anti-Ki67*. Ekspresi positif kuat dari Ki67 ditunjukkan dengan adanya granula kecoklatan pada inti sel, sedangkan sel yang negatif tidak menampilkan adanya granula kecoklatan tersebut. Prosentase sel karsinoma kolon HT-29 yang positif mengekspresikan Ki67 ditentukan dengan melakukan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya

OLYMPHUS BX-41 dengan pembesaran 400x pada 9 lapang pandang. Hasil pengamatan sebagaimana ditampilkan dalam gambar berikut ini:



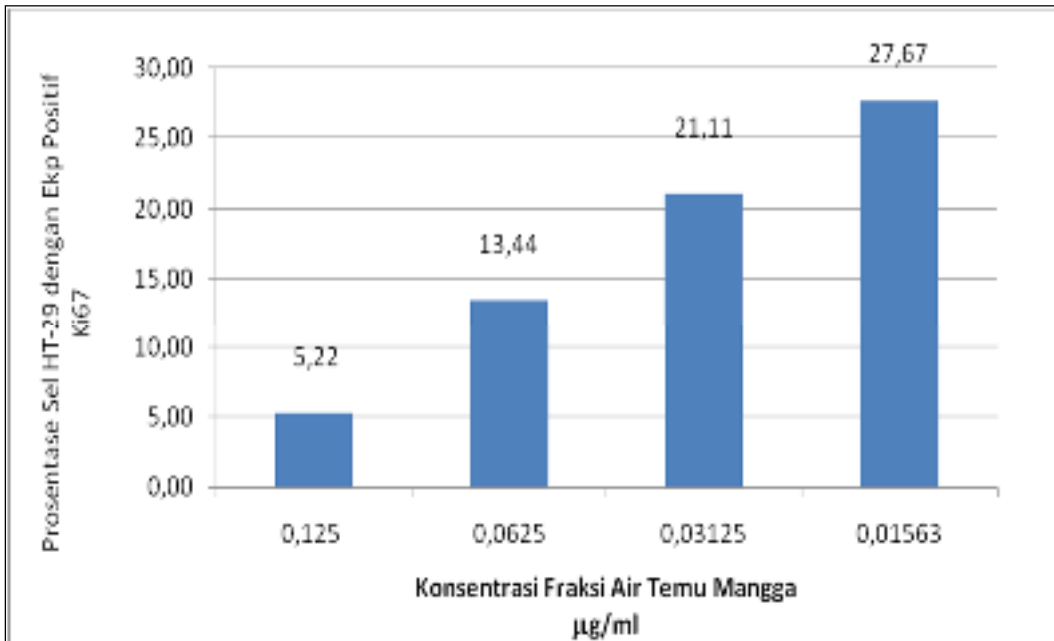
**Ekspresi Ki67 dengan pemberian *Curcuma mangga* (pembesaran 1000x).**

Berdasarkan hasil pengamatan sitologi tersebut dapat ditentukan nilai kuantitatif ekspresi Ki67 yang dinyatakan dengan prosentase sel, untuk masing-masing sampel adalah sebagai berikut:

**Prosentase tampilan Ki67 pada sel karsinoma kolon HT29 dengan perlakuan fraksi air ekstrak temu mangga (*Curcuma mangga, Val*).**

No	SAMPEL	%
1	Temu mangga 0,125 ug/ml	5,22
2	Temu mangga 0,0625 ug/ml	13,44
3	Temu mangga 0,03125 ug/ml	21,11
4	Temu mangga 0,01563 ug/ml	27,67

Data tersebut ditampilkan dalam bentuk histogram sebagai berikut:

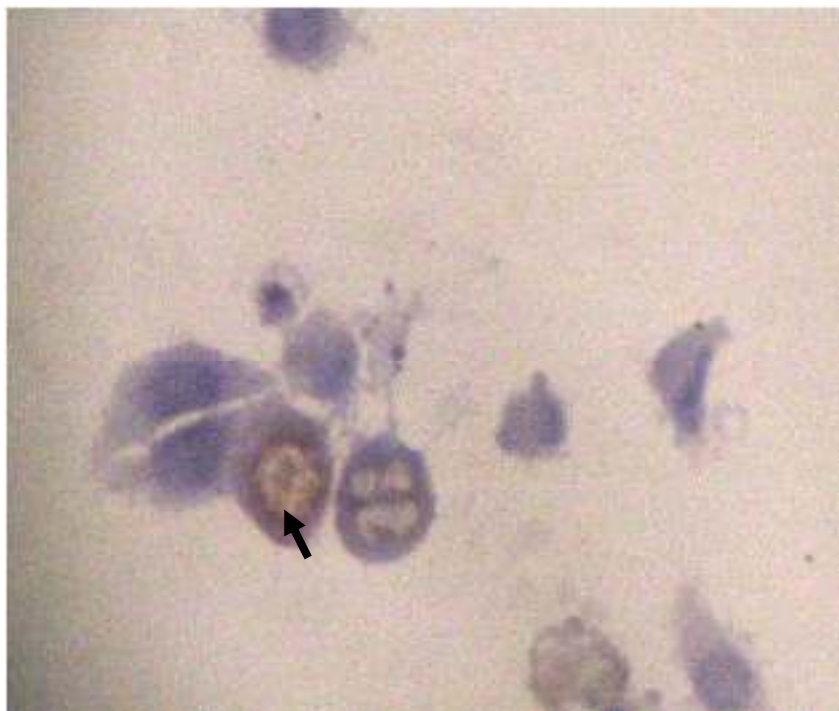


tampilan ekspresi Ki67 pada sel karsinoma kolon HT-29 pada berbagai serial konsentrasi perlakuan dengan ekstrak temu mangga (*Curcuma mangga, Val*).

**Penentuan Level Ekspresi Ki67 akibat Pemberian 5-FU pada Kultur Sel Karsinoma Kolon HT-29.**

Konsentrasi 5-FU yang digunakan dalam kultur sel karsinoma kolon HT-29

adalah: 150 µg/ml, 75 µg/ml, 37,5 µg/ml dan 18,75 µg/ml. Hasil kultur kemudian dilakukan pemeriksaan imunositokimia dengan menggunakan monoklonal antibodi primer anti-Ki67. Deteksi ekspresi Ki67 dilaksanakan dengan metode ABC (*Avidin biotin Complex*) dengan hasil sebagaimana ditampilkan pada gambar berikut ini:



Tampilan ekspresi Ki67 pada sel karsinoma kolon HT-29 pada berbagai serial konsentrasi perlakuan dengan ekstrak temu mangga (*Curcuma mangga*, Val).

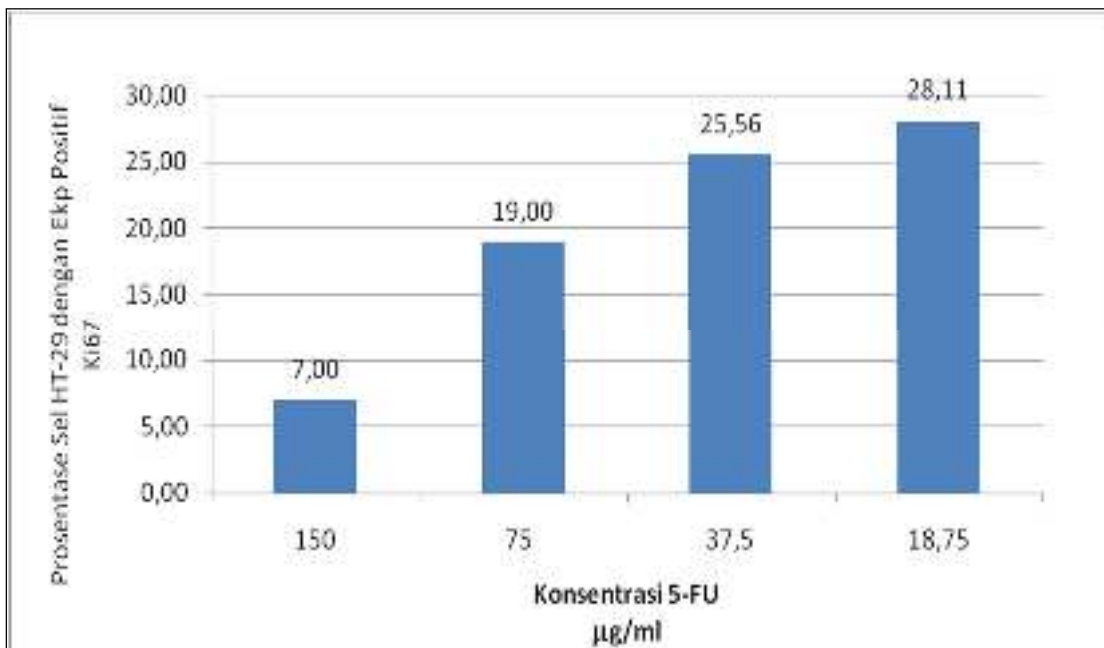
Prosentase tampilan Ki67 pada sel karsinoma kolon HT-29 dengan perlakuan 5-FU

Ekspresi Ki67 dengan pemberian 5-FU ditunjuk anak panah (perbesaran 1000x).

No	SAMPEL	%
1	5-FU 150 ug/ml	7,00
2	5-FU 75 ug/ml	19,00
3	5-FU 37,5 ug/ml	25,56
4	5-FU 18,75 ug/ml	28,11

Berdasarkan hasil pengamatan imunositokimia tersebut dapat ditentukan nilai kuantitatif ekspresi Ki67 yang dinyatakan dengan prosentase sel, untuk masing-masing sampel adalah sebagai berikut:

Hasil di atas ditampilkandalambentuk histogram sebagaiberikut:



Profil tampilan ekspresi Ki67 pada sel karsinoma kolon HT-29 pada perlakuan dengan 5-FU.

**PEMBAHASAN**

Ki67 adalah protein inti, bisa dideteksi dengan mudah pada sel sedang aktif membelah, sehingga keberadaan protein ini bisa digunakan untuk mendeteksi kecepatan pertumbuhan tumor (Maltzman, 2002). Ki67 bisa digunakan sebagai marker untuk proliferasi sel (Kanai, 2009). Antigen Ki67 bisa

dideteksi dalam inti sel pada fase interfase. Fase mitosis sebagian besar protein direlokasi ke permukaan khromosom. Ki67 didapatkan pada semua fase pada siklus sel (G1, S, G2, dan mitosis), tetapi tidak didapatkan pada fase *resting cells* (G0) (Scholzen, 2000)

Zat aktif dari temu mangga adalah minyak atsiri, amilum, tanin, gula dan damar (Anonim, 1988). Minyak atsiri *Curcuma mangga* Terdiri dari 4 komponen utama yaitu yang

teridentifikasi sebagai  $\alpha$ -pinene (1,71%),  $\beta$ -myrcene (19,74%), geranyl alcohol (76,24%) dan bicyclo 3.1.1 heptan 3-ol (2,31%) (Khasanah, 2002). *Curcuma mangga* mengandung senyawa protein mirip ribosome inactivating protein (RIPs) yang mempunyai aktifitas memotong DNA superkoil (Sisindari, 2003). Beberapa tumbuhan mengandung protein yang disebut sebagai (RIPs) yang merangsang aktifitas dari enzim RNA N-glycosidase dan adenosine glikosidase, sehingga mampu menghentikan siklus sel.

Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penurunan prosentase sel karsinoma kolon HT-29 yang positif mengekspresikan Ki67 berasosiasi dengan pengikatan konsentrasi fraksi air temu mangga (*Curcuma mangga, Val*). Hasil uji korelasi regresi terhadap peran fraksi air ekstrak temu mangga (*Curcuma mangga, Val*) terhadap ekspresi ki67 mengikuti persamaan linier  $Y=22,092-0,105X$  dengan koefisien korelasi  $R=0,994$  yang menunjukkan bahwa fraksi air ekstrak temu mangga mampu menurunkan ekspresi Ki67 secara signifikan. Pengembangan obat antikanker yang didasarkan pada regulasi siklus sel selanjutnya diarahkan pada penghambatan terjadinya proses pembelahan sel sehingga senyawa atau protein yang diberikan pada penderita dapat mencegah sintesis DNA dan mitosis sehingga menghentikan proliferasi sel kanker.

RIPs protein memiliki aktivitas enzim N-glikosidase, dan polinucleotide: adenosine glycosidase (PAG), serta memiliki aktifitas DNase like dan phosphatase, dan mampu meningkatkan aktifitas enzim RNA N-glikosidase pada konsentrasi yang sangat rendah sehingga mampu menghentikan siklus sel terutama pada fase G1 (Willy, 2001). Hal ini kemungkinan terjadi juga pada kultur sel karsinoma kolon HT-29 dengan perlakuan fraksi air

ekstrak temu mangga, sehingga terjadi penghentian siklus sel pada fase G1 sebelum terbentuk cyclin E, sehingga siklus sel tidak bisa berlanjut sampai ke fase S dan fase selanjutnya.

Penurunan prosentase sel karsinoma kolon HT-29 yang positif mengekspresikan Ki67 berasosiasi dengan pengikatan konsentrasi 5-FU mengikuti persamaan  $Y=31,335-24,375$  dengan koefisien korelasi  $R=1,00$ , menunjukkan bahwa terjadi penurunan ekspresi Ki67, yang menggambarkan terjadinya penurunan proliferasi sel. 5-FU digunakan pada penelitian ini karena 5-FU merupakan agen kemoterapi yang poten untuk karsinoma kolon dan saat ini sudah secara luas digunakan baik sebagai agen tunggal maupun kombinasi dengan agen kemoterapi yang lain.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat penurunan ekspresi Ki67 yang bermakna pada perlakuan menggunakan fraksi air ekstrak temu mangga maupun 5-FU dan pemberian 5-FU maupun fraksi air ekstrak temu mangga dengan konsentrasi yang berbeda memberikan pengaruh yang nyata dalam penurunan ekspresi Ki67 pada sel karsinoma kolon HT-29 secara *in vitro*.

Penurunan proliferasi sel ini disebabkan oleh penghambatan sintesis DNA. 5-FU adalah agen kemoterapi yang bersifat anti metabolit, artinya secara biologis 5-FU berfungsi menghalangi terbentuknya dTMP (deoxyThymidin mono Phosphat) suatu monomer DNA yang pembentukannya melibatkan enzim Thymidilat Sintetase. Karena adanya 5-FU maka dTMP tidak terbentuk, enzim Thymidilat Sintetase terhambat oleh 5-FU sehingga terbentuk F-deoxyuridylate (F-dUMP).

Telah diketahui bahwa monomer DNA butuh dTTP (deoxyThymidin Tri-phosphat), dAMP (deoxyAdenosine Tri-Phosphat),



*dCTP*(*deoxyCytosineTri-Phosphat*) dan *dGTP*(*deoxyGuanidineTri-Phosphat*) sehingga akan menghalangi polimerisasi NTP menjadi DNA. (Pecorino, 2005). Dengan tidak terbentuknya DNA maka tidak ada transkripsi RNA sehingga sintesis protein tidak berlangsung, tidak terbentuk selanakan baru, dengan kata lain tidak ada proliferasi sel. Hal ini sesuai dengan menurunnya tingkat ekspresi Ki67 pada pemberian 5-FU pada kultur sel, mampu menghambat proliferasi sel karsinoma kolon HT-29.

### **Kesimpulan**

Ekstrak temu mangga fraksi air menekan ekspresi Ki67 pada sel kanker kolon HT-29 secara *in vitro*. Semakin tinggi dosis yang diberikan ekspresi Ki67 semakin menurun.

### **Saran**

1. Disarankan untuk dilakukan penelitian terhadap ekspresi Ki67 pada galur sel karsinoma kolon yang lain atau penelitian secara *in vivo* dengan konsentrasi pada  $LC_{50}$  dan atau di bawahnya.
2. Disarankan untuk dilakukan penelitian dalam bidang biologi molekuler lebih lanjut mengenai pengaruh ekstrak temu mangga khususnya fraksi lain terhadap penghambatan proliferasi sel karsinoma kolon HT-29.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alfred M.C., Bruce D.M., 1997, *Cancer of The Colon*, In : *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 5<sup>th</sup> Ed, Editors : Devita V.T., Lippincott - Raben, Philadelphia, pp. 1144 – 85
- Allen J.I., 1995, *Molecular Biology of Colorectal Cancer : a Clinician's View*, *Perspect Colon Rectal Surgery*, 8, pp. 181 – 202
- American Joint Committee on Cancer (AJCC), 1992, *Manual for Staging of Cancer*, 4<sup>th</sup> Edition, Philadelphia, pp. 82
- Arief T.Q.M., 2004, *Pengantar Metodologi Penelitian untuk Ilmu Kesehatan*, Cetakan Kedua, Penerbit CSGF, Klaten
- Ashariati A., 2004, *Adjuvant Chemotherapy of Colorectal Cancer*, In: *Recent Advances and Challenges In General Surgeons in Indonesia*, Surabaya
- Budiani D.R. 2006, *Expression of LMP1 in Javanese Colon Carcinoma Patient's with Duke's Classification System : Indicated The Association of Epstein-Barr Virus Infection In Colon Malignancies*, Department of Patology Anatomy, Medicine Faculty of Sebelas Maret University, UNS Press, Surakarta
- Cancer Research UK, 2007, *Chemotherapy Drugs For Bowel Cancer*, <http://survey.cancerresearchuk.org>
- Carlos C.C., 2004, *p53 and RB : Simple Interesting Correlates or Tumors Markers of Critical Predictive Nature?*, *Journal of Clinical Oncology*. Vol. 22. No. 8, Memorial-Kettering Cancer Center, New York, pp. 975 – 7
- Chung-Faye G.A., Kerr J.D., 2000, *ABC of Colorectal Cancer : Innovative Treatment for Colon Cancer*, *BMJ* : 321, pp. 1397 – 99
- Compton C.C., 2005, *The Staging of Colorectal Cancer : 2004 and Beyond*, *Ca Cancer Journal for Clinicians*, Vol. 54. No. 6, pp. 295 – 308
- Helena R.C., Kirby I.B., 1997, *Tumors of the Colon*, In: *Maingot's Abdominal Operations*, Volume II, 10<sup>th</sup> Ed, Editors : Zinner M.J., et al., Appleton & Lange, Connecticut, pp. 1281 – 301
- Irene M.G., Thomas E.W., 2005, *Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy*,
- Janne P.A., 2000, *Chemoprevention of Colorectal Cancer*, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 342. No. 26, pp. 1960 – 66
- Katzung B.G., 2001, *Basic & Clinical Pharmacology*, 8<sup>th</sup> Ed, McGraw-Hill Companies, Philadelphia
- Kelompok Kerja Adenokarsinoma Kolorektal, 2004, *Panduan Pengelolaan Adenokarsinoma Kolorektal*, pp. 1 – 49
- King M.W., 2004, *Tumor Suppressors and Cancer*, IU School of Medicine, Sergio Marchesini, pp. 1 – 11
- Kodner I.J., Robert D.F., 1999, *Colon, Rectum, and Anus*, In : *Principles of Surgery*, 7<sup>th</sup> Ed, Vol. 2, Editors : Schwartz I.S., McGraw-Hill Health Professions Division., New York, pp. 1265 – 380
- Murti B., 1996, *Penerapan Metode Statistik Nonparametrik untuk Ilmu-ilmu Kesehatan*, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, pp. 37
- Murti B., 2006, *Desain dan Ukuran Sampel untuk Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif di Bidang Kesehatan*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta
- Norton J.A., et al., 2000, *Surgery Basic Science and Clinical Evidence*, Part 1, Springer, New York, pp. 702 – 4
- Phillips J., 1997, *The Biology of the Disease*, Blacwell Science, Oxford, pp. 429 – 587

- Priyanto, 2007. Toksisitas Obat, Zat Kimia dan Terapi Antidotum, I:1-31
- Pusztai L., et al., 1996, *Cell Proliferation in Cancer ; Regulatory Mechanisms of Neoplastic Cell growth*, Oxford University Press, New York
- Rickwood D., Harris J.R., 1996, *Cell Biology, Essential Techniques*, Jhon Willey & Sons Ltd, Chichester, pp. 38 – 66
- Shengli C., 2001, *Cell Cycle and Tumor Suppressor Genes*, Charles Cai Tech, edit Tom Beron, pp. 1 – 36
- Sigma A, 2007, HT29 Cell Line Human Colon Adenocarcinoma, <http://sigmaaldrich.com>
- Sjamsuhidayat R., de Jong W., 1997, *Buku Ajar Ilmu Bedah*, EGC, Jakarta, pp. 876 - 99
- Soetanto W.P., 2004, *Pembedahan Karsinoma Kolon dan Rektum*, In : *Recent Advance and Challenges in General Surgeon in Indonesia*, pp. 12 – 9
- Sudigdo S.A., Ismael S., 2002, *Dasar - Dasar Metodologi Penelitian Klinis*, Ed. 2, Sagung Seto, Jakarta
- Suryadi H., Malik S.G., Sudoyo H., Marzuki S., 2004, *Mitochondrial Medicine*, Eijkman Lecture Series 2, Lembaga Eijkman, Jakarta, pp. 145 – 64
- Tannock I.E., Hill R.P., 1998, *The Basic Science of Oncology*, 3<sup>rd</sup> Edition, McGraw Hill, Singapore
- Teich N.M., 1997, *Oncogenes and Cancer*, In : *Cellular and Molecular Biology of Cancer* 3<sup>rd</sup> Ed, Editors : Franks L.M., Teich N.M., Oxford University Press, New York, pp. 169 – 201
- Tjarta A., 2001, *Neoplasia*, Dalam : *Patologi Umum*, Sagung Seto, Jakarta, pp. 198 – 9
- Tjokronegoro A., Sudarsono S., 1999, *Metodologi Penelitian Bidang Kedokteran*, Cetakan ketiga, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta
- Trigan, 2007, 5 Flurouracil ( 5-FU ), <http://www.trigan.com/contact.htm>
- Yayasan Kanker Indonesia, 1999, *Rangkuman Hasil Seluruh Pusat Patologi di Indonesia*, Dalam : *Kanker di Indonesia, Data Histopatologi*
- Yuwono T., 2005, *Biologi Molekular*, Penerbit Erlangga, Jakarta