

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**



**AKTIVITAS ALKALOID *ACHYRANTHES ASPERA LINN* PENYEBAB
KEMATIAN SEL KANKER PAYUDARA TERHADAP TERBENTUKNYA
APOPTOSOME PADA MITOKONDRIA DAN
FRAGMENTASI CHROMOSOM**

TAHUN KE 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

TIM PENELITI :

Prof. Dr.Dewa Ketut Meles,MS,drh : 0013125402

Prof.Dr. Imam Mustofa,MKes,drh : 0027046003

Prof.Dr.Wurlina,MS.,drh : 0018095405

DIBIYAI OLEH:

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOPEMBER, 2018**

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**



Kcc
KK
LP 51/19
Mel
a

**AKTIVITAS ALKALOID *ACHYRANTHES ASPERA* LINN PENYEBAB
KEMATIAN SEL KANKER PAYUDARA TERHADAP TERBENTUKNYA
APOPTOSOME PADA MITOKONDRIA DAN
FRAGMENTASI CHROMOSOM**

TAHUN KE 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

TIM PENELITI :

Prof. Dr.Dewa Ketut Meles,MS,drh : 0013125402

Prof.Dr. Imam Mustofa,MKes,drh : 0027046003

Prof.Dr.Wurlina,MS.,drh : 0018095405

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOPEMBER, 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : AKTIVITAS ALKALOID ACHYRANTHES ASPERA
LINN PENYEBAB KEMATIAN SEL KANKER
PAYUDARA TERHADAP TERBENTUKNYA
APOPTOSOME PADA MITOKONDRIA DAN
FRAGMENTASI CHROMOSOM

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : Dr. drh. DEWA KETUT MELES,
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0013125402
Jabatan Fungsional : Guru Besar
Program Studi : Sains Veteriner
Nomor HP : 081332186692
Alamat surel (e-mail) : dewa-k-m@fkh.unair.ac.id

Anggota (1)

Nama Lengkap : Dr. drh. IMAM MUSTOFA M.Kes
NIDN : 0027046003
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)

Nama Lengkap : Dr. drh. WURLINA M.S
NIDN : 0018095405
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 100,000,000



Mengetahui,
Dekan FKH Unair

(Prof. Dr. Pudji Sianto, MKes, drh)
NIP/NIK 195601051986011001

Kota Surabaya, 5 - 11 - 2018
Ketua,

(Dr. drh. DEWA KETUT MELES,)
NIP/NIK 195412131979011002



Menyetujui,
Ketua LPI Unair

(Prof. H. Hery Purnobasuki, MSi., PhD)
NIP/NIK 19670507 199102 1001



RINGKASAN

**AKTIVITAS ALKALOID *ACHYRANTHES ASPERA LINN* PENYEBAB
KEMATIAN SEL KANKER PAYUDARA TERHADAP TERBENTUKNYA
APOPTOSOME PADA MITOKONDRIA DAN FRAGMENTASI CHROMOSOM****Dewa Ketut Meles, Imam Mustofa dan Wurlina**

Salah satu tanaman yang potensial untuk dikembangkan menjadi bahan baku obat antikanker payudara adalah jarong (*Achyranthes aspera linn*). Penelitian *in vivo* menunjukkan bahwa alkaloid *Achyranthes aspera Linn* menyebabkan apoptosis dan penyembuhan pada kanker payudara mencit yang diinduksi benzopyrene. Alkaloid daun *Achyranthes aspera Linn* sebagai antikanker telah terdaftar pada Hak Kekayaan Intelektual (HKI) sejak 12 Oktober tahun 2012 dengan nomor P00201299839. Hasil penelitian tahun pertama adalah alkaloid *Achyranthes aspera linn* dapat meningkatkan secara signifikan terhadap terbentuknya apoptosome (sitokrom C dan APAF-1) pada mitokondria sel kanker, Meningkatkan Caspase 9 dan caspase 3 serta meningkatkan respon Nk sel pada kanker payudara mencit.

Tahun kedua dilakukan penelitian terhadap fragmentasi kromosom, yaitu sebanyak 50 ekor mencit betina berumur 4 bulan yang menderita kanker payudara, dibagi dalam 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor, dan 10 ekor tikus betina sehat sebagai kontrol negatif. Kelompok penelitian tersebut sebagai berikut :

- Kelompok 1. (kontrol negatif) yaitu mencit sehat hanya diberi larutan (carboxy methyl cellulosa=CMC) 0,5% sebagai bahan suspensi, sebanyak 0,5 ml secara peroral.
- Kelompok 2. (kontrol positif) yaitu mencit menderita kanker payudara diberi metotreksat (standart obat antikanker) dosis 15 mg/kg. bb, sebanyak 0,5 ml secara peroral.
- Kelompok 3. Mencit menderita kanker payudara diberi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dosis 0 mg/kgbb (hanya pelarut cmc 0,5%) sebanyak 0,5 ml secara peroral.
- Kelompok 4. Mencit menderita kanker payudara diberi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dosis 75 mg/kgbb , sebanyak 0,5 ml secara peroral.
- Kelompok 5 Mencit menderita kanker payudara diberi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dosis 100 mg/kgbb, sebanyak 0,5 ml secara peroral.
- Kelompok 6. Mencit menderita kanker payudara diberi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dosis 125 mg/kgbb, sebanyak 0,5 ml secara peroral.

Semua kelompok mendapat perlakuan sama setiap hari selama 8 minggu. Parameter yang diamati fragmentasi kromosom sel kanker

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas alkaloid *Achyranthes aspera lin* uji batas keamanan alkaloid *Achyranthes aspera linn* melalui uji toksisitas akut dan uji toksisitas kronis, sedangkan uji stabilitas bahan dilakukan untuk menentukan bentuk sediaan bahan yang cocok setelah melalui uji pemanasan dan penyinaran dengan ultraviolet dalam kurun waktu 90 hari.

Hasil penelitian tahun kedua adalah alkaloid *Achyranthes aspera linn* menyebabkan fragmentasi kromosom sel kanker payudara melalui peningkatan caspase 9 dan caspase 3. Pada uji toksisitas akut dan uji toksisitas kronis alkaloid *Achyranthes aspera linn* tidak terdapat kerusakan baik kongesti, degenerasi maupun nekrosis yang bermakna pada hati dan ginjal mencit. Dosis yang menyebabkan kematian 50% alkaloid *Achyranthes aspera linn* pada mencit lebih dari 15 gram/ kg bb, hal ini menunjukkan alkaloid *Achyranthes aspera*



linn termasuk bahan obat tidak berbahaya. Alkaloid *Achyranthes aspera linn* merupakan bahan obat yang stabil terhadap suhu panas 100° C dan sinar ultraviolet selama 90 hari.

Diharapkan Alkaloid *Achyranthes aspera linn* sebagai obat antikanker masa depan sebagai "*suicide gen therapy*" dengan harga murah, aman dan nyaman.

Keywords: Alkaloid *Achyranthes aspera*, kanker payudara, fragmentasi kromosom uji tosisitas, uji stabilitas

PRAKATA

Berkat Rahmat Tuhan Yang Maha Esa, kegiatan Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi berjudul **AKTIVITAS ALKALOID ACHYRANTHES ASPERA LINN PENYEBAB KEMATIAN SEL KANKER PAYUDARA TERHADAP TERBENTUKNYA APOPTOSOME PADA MITOKONDRIA DAN FRAGMENTASI CHROMOSOM** dapat terselenggara dengan baik.

Tujuan penelitian ini adalah membuktikan aktivitas antikanker dan induksi apoptosis alkaloid daun *Achyranthes aspera linn* terhadap terbentuknya apoptosome pada mitokondria dan fragmentasi chromosom terhadap sel kanker payudara mencit secara invivo.

Sistimatika penelitian ini dilakukan dalam 2 tahap. **Tujuan penelitaan tahun pertama** yaitu membuktikan alkaloid *Achyranthes aspera linn* yang memiliki aktivitas terbentuknya apoptosom pada mitokodria sel kanker payudara penginduksi terbentuknya enzim caspase 9 dan caspase 3 penyebab dari fragmentasi chromosom sel kanker payudara, serta peran respon imun Nk sel penyebab kematian sel kanker payudara. Hasilnya adalah alkaloid *Achyranthes aspera linn* yang memiliki aktivitas terbentuknya apoptosom pada mitokodria sel kanker payudara dapat meningkatkan terbentuknya enzim caspase 9 dan caspase 3 penyebab dari fragmentasi chromosom, serta meningkatkan respon imun Nk sel penyebab kematian sel kanker payudara. **Tujuan penelitian tahun kedua** membuktikan alkaloid *Achyranthes aspera linn* dapat menyebabkan Fragmentasi kromosom sel kanker payudara yang menyebabkan kematian sel kanker payudara dan membuktikan batas keamanan alkaloid *Achyranthes aspera linn* melalui uji toksisitas akut dan kronis dengan menentukan dosis lethal 50% (LD50) dan dosis efektif 50% (ED50) serta Uji stabilitas bahan alkaloid melalui pemanasan dan penyinaran sinar ultraviolet dalam kurun waktu 1- 6 bulan. Hasil yang diperoleh adalah kematian sel kanker payudara pada penggunaan alkaloid *Achyranthes aspera linn* akibat terjadi fragmentasi kromosom melalui peningkatan caspase 9 dan caspase 3. Uji toksisitas akut dan uji toksisitas kronis alkaloid *Achyranthes aspera linn* tidak menyebabkan kerusakan baik kongesti, degenerasi maupun nekrosis yang bermakna pada hati dan ginjal mencit. Dosis yang menyebabkan kematian 50% alkaloid *Achyranthes aspera linn* pada mencit lebih dari 15 gram/ kg bb, hal ini menunjukkan alkaloid *Achyranthes aspera linn* termasuk bahan obat tidak berbahaya. Alkaloid *Achyranthes aspera linn*

merupakan bahan obat yang stabil terhadap suhu panas 100° C dan sinar ultraviolet selama 90 hari.

Hasil yang diharapkan adalah Alkaloid tanaman *Achyranthes aspera linn* sebagai obat antikanker masa depan "*suicide gen Therapy*" dengan harga murah, aman dan nyaman.

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan April sampai dengan Oktober 2017, dilakukan Staf pengajar dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kami sampaikan atas terlaksananya kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi, disampaikan kepada :

- Rektor Universitas Airlangga
- Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Unair

DAFTAR ISI

RINGKASAN	i
PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA ..	3
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	11
BAB 4. METODE PENELITIAN	12
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	18
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	29
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN	31
Personalia tenaga pelaksana	
Artikel ilmiah (draft, bukti submission atau reprint)	
- Journal	:Advances in Natural and Applied Sciences. Vo. 11No.9, July 2017
- Seminar	: Veterinary Medicine International Conference



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.2. Rata rata perubahan histologi hati pada mencit selama 24 jam	19
Tabel 5.3. Rata rata perubahan histologi hati pada mencit selama 90 jam	21
Tabel 5.4. Rata rata perubahan histologi ginjal pada mencit selama 24 jam	24
Tabel 5.5. Rata rata perubahan histologi ginjal pada mencit selama 90 jam	25

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 5.1. Fragmentasi DNA sel kanker payudara	18
Gambar 5.2. Mikroskopis hati mencit setelah pemberian alkaloid <i>Achyranthes aspera</i> linn dalam waktu 24 jam	20
Gambar 5.3. Mikroskopis hati mencit setelah pemberan alkaloid <i>Achyranthes aspera</i> linn dalam waktu 90 hari	22
Gambar 5.4. Mikroskopis ginjal mencit setelah pemberan alkaloid <i>Achyranthes aspera</i> linn dalam waktu 24 jam	24
Gambar 5.5. Mikroskopis ginjal mencit setelah pemberan alkaloid <i>Achyranthes aspera</i> linn dalam waktu 90 hari	25

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Personalia tenaga pelaksana	32
Lampiran 2. <i>Achyranthes aspera</i> linn, ekstraksi dan fraksinasi	33
Lampiran 3. Hewan coba dikelompokkan dan ditimbang berat badannya	34
Lampiran 4. Membuat hewan coba mencit menderita kanker payudara	35
Lampiran 5. Pemberian obat, pengambilan darah dan kanker payudara	36

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Salah satu obat antikanker yang berasal dari tanaman dan telah digunakan secara empiris dimasyarakat adalah *Achyranthes aspera* linn. WHO sebagai organisasi kesehatan telah menyetujui penggunaan obat tradisional dari tanaman terutama tanaman tropis, karena ketersediaan hayati, biaya produksi serta efek samping yang rendah. Ekstrak daun *Achyranthes aspera* linn telah dibuktikan mempunyai efek antimitosis dapat menghambat pembelahan dan perkembangan sel embrio mencit dan tikus (Wurlina, 2006). Alkaloid *Achyranthes aspera* sebagai antimitosis dan antitelomerase pada sel myeloma mencit P3UI berhenti pada stadium metaphase. Alkaloid sebagai antimitosis dan antitelomerase mempunyai kemampuan mengikat tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus dengan menghambat atau memblokir polimerisasi protein kedalam mikrotubulus sehingga terjadi penghancuran dari mikrotubulus berakibat sel akan berhenti membelah sehingga akan diikuti dengan terjadinya kematian sel kanker melalui mekanisme apoptosis, (Wurlina dkk, 2008; Wurlina, 2006, Wurlina, 2005, Meles, 2007).

Salah satu proses kematian sel melalui mekanisme apoptosis adalah akibat adanya kelainan pada fungsi mitokondria. Seperti diketahui mitokondria sangat berperan dalam proses reaksi oksidasi dan reduksi sel dalam menghasilkan energi (Adenosin triphosphat =ATP), disamping mitokondria berperan dalam proses metabolisme sel juga sebagai tempat sintesis lemak dan protein yang diperlukan oleh sel. Pendekatan molekular menunjukkan bahwa adanya kerusakan pada mitokondria dapat memicu terjadinya peningkatan sintesis sitokrom C yang dihasilkan pada matriks mitokondria, selanjutnya akan menstimulasi ribosome pada retikulum endoplasmik mensintesis *Apoptotic Activating Factor 1* (APAF 1), dan secara bersama-sama dATP membentuk apoptosome. Terbentuknya apoptosome akan menyebabkan terbukanya permeability transient porus (PT pore) pada mitokondria. Akibat perubahan ini akan menginduksi caspase inisiator yakni caspase 9, selanjutnya akan mengaktifasi caspase 3 yang bertindak sebagai caspase eksekutor, sehingga caspase c3 ini yang merangsang sintesis enzim DNAase yang berlebihan sehingga terjadi fragmentasi kromosom yang menyebabkan kematian sel dalam bentuk apoptosis (Wurlina dkk, 2010, Lantuejoul dkk., 2004).

Uji toksisitas akut sebagian besar dirancang untuk menentukan dosis letal median (LD_{50}) toksik. Dalam hal tertentu terkadang tidak perlu menentukan LD_{50} secara tepat apabila toksisitas akutnya rendah. Uji toksisitas akut dapat menunjukkan organ sasaran yang mungkin di rusak dan efek toksik spesifiknya (Lu, 1995). Pemilihan hati sebagai organ sasaran yang dirusak efek toksik dari obat, hal ini disebabkan karena hati memiliki peranan penting dalam proses metabolisme tubuh karena memiliki enzim yang dapat mengubah zat berbahaya menjadi zat yang secara fisiologis tidak aktif. Hati merupakan organ metabolisme tubuh yang terbesar dan berfungsi pada proses detoksifikasi bahan yang bersifat toksik maupun tidak toksik (Koeman, 1987). Pemilihan Ginjal sebagai organ sasaran karena mempunyai fungsi yang vital dan kompleks dalam tubuh, yaitu mengatur keseimbangan air dan elektrolit, mengatur konsentrasi osmolalitas cairan tubuh dan elektrolit, mengatur keseimbangan asam-basa, ekskresi produk sisa metabolik dan bahan kimia asing seperti obat-obatan serta zat yang bersifat toksik, mengatur tekanan arteri, sekresi hormon dan juga glukoneogenesis. Pada keadaan terjadinya kerusakan ginjal akibat pengaruh bahan-bahan atau obat-obatan yang bersifat toksik maka akan menyebabkan peran dan fungsi ginjal dalam proses kelangsungan hidup organisme mengalami kegagalan. Batas keamanan suatu bahan obat yang akan dipergunakan dalam pengobatan sangat mutlak harus diketahui, agar tidak merugikan bagi kesehatan dalam penggunaannya (Kocman, 1987).

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan landasan secara empiris, teoritik dan hasil penelitian alkaloid *Achyranthes aspera linn* perlu dibuktikan mekanisme kerjanya dalam menyebabkan fragmentasi kromosom sebagai penyebab kematian sel kanker payudara dan melindungi sel normal, serta menentukan batas keamanan alkaloid *Achyranthes aspera linn* melalui uji toksisitas akut dan kronis dengan menentukan dosis lethal 50% (LD_{50}) dan dosis efektif 50% (ED_{50}), dan diharapkan alkaloid *Achyranthes aspera linn* dapat digunakan sebagai obat antikanker masa depan.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Penyakit Kanker

Kanker merupakan penyakit yang banyak menimbulkan kesengsaraan dan kematian pada manusia. Di negara barat, kanker merupakan penyebab kematian nomor 2 setelah penyakit kardiovaskular. Diperkirakan kematian akibat kanker di dunia mencapai 4,3 juta per tahun dan 2,3 juta di antaranya ditemukan di negara berkembang. Jumlah penderita baru per tahun 5,9 juta di seluruh dunia dan 3 juta di antaranya ditemukan di negara sedang berkembang (Ama dan Faisol, 2005). Kanker payudara sering ditemukan di seluruh dunia dengan insiden relatif tinggi, yaitu 20% dari seluruh keganasan. Dari 600.000 kasus kanker payudara baru yang didiagnosis setiap tahunnya, sebanyak 350.000 ditemukan di negara maju, sedangkan 250.000 di negara yang sedang berkembang. Di Amerika Serikat, diperkirakan 175.000 wanita menderita kanker payudara yang mewakili 32% dari semua kanker yang menyerang wanita. Disebutkan dari 150.000 penderita kanker payudara yang berobat ke rumah sakit, 44.000 orang di antaranya meninggal setiap tahunnya. *American Cancer Society* memperkirakan kanker payudara di Amerika akan mencapai 2 juta dan 460.000 di antaranya meninggal antara 1990-2000 ((Tjahjadi dan Gunawan, 2006).

Kanker leher rahim dan kanker payudara tetap menduduki tempat teratas, namun. kanker payudara merupakan kanker terbanyak sesudah kanker leher rahim, lebih dari 70% penderita kanker payudara ditemukan pada stadium lanjut. Data dari Dirjen Pelayanan Medik Depkes menunjukkan bahwa *Case Fatality Rate* (CFR) akibat kanker payudara menurut golongan penyebab sakit menunjukkan peningkatan dari tahun 1999-2005, yaitu dari 3,9 menjadi 7,8 (Tjahyadi dan Gunawan, 2006). Pengobatan pada stadium dini kanker payudara menghasilkan kesembuhan 75%. Pengobatan kanker dapat dilakukan dengan berbagai cara antara lain pembedahan, radiasi, kemoterapi, endokrinoterapi dan imunoterapi. Dengan metode pengobatan terkini, sepertiga penderita kanker dapat disembuhkan dengan pembedahan atau terapi radiasi, yang cukup efektif bila belum terjadi metastase. Adanya mikrometastase yang merupakan karakteristik dari neoplasma, merupakan indikasi dibutuhkan terapi sistemik, yaitu kemoterapi yang berguna untuk membunuh neoplasma primer maupun mikrometastase yang tersembunyi sebelum penyebarannya dapat dideteksi oleh pemeriksaan fisik atau sinar X (Gao dkk.,2000). Tolak ukur keberhasilan pengobatan kanker payudara, biasanya adalah *5 year survival* (ketahanan hidup 5 tahun).

Faktor yang mempengaruhi prognosis dan ketahanan hidup penderita kanker payudara adalah besar tumor, status kelenjar getah bening regional, *skin oedema* 'pembengkakan kulit', status menopause, perkembangan sel tumor, residual tumor burden (tumor sisa), jenis patologinya, dan metastase, terapi, serta reseptor estrogen. Selain itu, ditambahkan pula dengan umur dan besar payudara. Obat antikanker yang ideal adalah yang mampu membunuh sel kanker dan dapat melindungi sel normal dan hingga saat ini belum ada obat yang memenuhi kriteria tersebut, belum lagi terjadi resisten terhadap obat tersebut. Oleh karena itu pengembangan obat antikanker dilakukan melalui skrining empirik, desain rasional senyawa obat baru maupun terapi genetik. Salah satu obat antikanker yang berasal dari tanaman dan digunakan secara empiris dimasyarakat adalah *Achyranthes aspera linn*. WHO sebagai organisasi kesehatan telah menyarankan, mensponsori dan menyetujui penggunaan obat tradisional dari tanaman terutama tanaman tropis, karena ketersediaan hayati, biaya produksi dan toksisitas yang rendah serta efek samping yang terbatas. Dalam dekade tahun terakhir telah mencapai kemajuan dalam pengenalan metabolit sekunder dan derivat dari metabolit ini sebagai bahan antikanker yang bermanfaat (Roya dan Rao, 2000)

2.2. Tanaman *Achyranthes aspera linn*

Tanaman *Achyranthes aspera linn* mengandung berbagai macam zat kimia diantaranya adalah alkaloid akirantin dan betain, terpenoid, saponin, ramnose, glukosa, galaktosa, reilosa, hentriacontan, α spinasterol, β sitosterol, cryopenol, dibutylphtalate, asam palmitat, α spinasterol-3 β -D glikosida, daukosterol, ecdysterol, achyranthoside E dan F. Ekstrak metanol dari daun *Achyranthes aspera linn* mempunyai aktivitas antimitosis dengan menghambat pembelahan sel dan proliferasi (Mitaine dkk., 2001)

Menurut Wurlina dkk. (2005) efek antimitosis *Achyranthes aspera linn* disebabkan oleh kandungan alkaloid daun tersebut yang menyebabkan sel berhenti membelah pada stadium metafase. Alkaloid tanaman dapat menghambat sintesis protein dengan cara mencegah polimerisasi DNA dan menghambat transkripsi DNA. Meles (2004) melakukan pengukuran kadar total alkaloid daun *Achyranthes aspera linn* menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ternyata telah berhasil memisahkan fraksi alkaloid dengan konsentrasi 97,5%. Wurlina dkk (2006) meneliti alkaloid *Achyranthes aspera linn* sebagai antitelomerase pada kultur sel mieloma secara in vitro, hasilnya adalah terjadi hambatan pertumbuhan sel mieloma. Disimpulkan bahwa obat yang mempunyai efek antimitosis juga mempunyai efek antitelomerase yang dapat menghambat pembelahan dan

perkembangan sel yang sangat cepat seperti sel kanker dan berakibat terjadi kematian sel melalui mekanisme apoptosis

Alkaloid pada tanaman bekerja pada siklus sel dengan menghambat proses mitosis. Alkaloid sebagai antimitosis mempunyai kemampuan mengikat tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus dengan menghambat atau memblokir polimerisasi protein ke dalam mikrotubulus sehingga terjadi penghancuran dari mikrotubulus. Akibatnya terjadi gangguan fungsi mikrotubulus dan gangguan enzim telomerase berakibat proses mitosis dan pembelahan sel terhenti pada metafase. Tidak terbentuknya benang mitosis yang utuh menyebabkan kromosom masuk dalam sitoplasma sehingga kromosom bergerombol seperti bola atau bintang disebut dengan *explode mitotic*. sehingga akan diikuti dengan terjadinya kematian sel melalui mekanisme apoptosis. Mikrotubulus berfungsi membentuk benang-benang mitosis dan berperan untuk pergerakan sel, fagositosis dan transportasi makanan dan hasil metabolisme dalam sel. Obat antikanker sebaiknya membunuh sel kanker secara tercluster melalui antimitosis dan antitelomerase dengan menginduksi apoptosis melalui hambatan pada suppressor gen p53 dan CDK inhibitor gen p21 dan p27. tetapi dapat melindungi sel normal (Kresno,2005).

2.3. Apoptosis

Apoptosis adalah suatu proses fisiologis yang dikendalikan dengan kontrol genetik berlangsung melalui proteolisis, kondensasi dan fragmentasi DNA disusul dengan pengerutan sel. Secara biokimiawi terjadi aktivasi berbagai endonuklease dan protease, DNA dipecah menjadi fragmen-fragmen dengan panjang berbeda. Proses ini berakhir dengan di"makan"nya sel-sel tersebut oleh sel-sel yang berada di sekitarnya misalnya makrofag, tanpa merangsang respons inflamasi. Apoptosis dapat terjadi pada masa pertumbuhan, inflamasi jaringan, penuaan atau pada proses mekanisme imun, dan hanya mempengaruhi sekelompok kecil atau satu sel saja. Hal ini yang membedakan apoptosis dengan nekrosis. Nekrosis merupakan proses kematian sel yang bersifat pasif, tidak terkontrol, yang disebabkan oleh adanya perubahan mendadak pada lingkungan disekitar sel, seperti terkena bahan toksik (Anom dkk, 2012, Bogler dan Mikkelson,2005, Freuhauff dkk,2006).

Dalam pengendalian tumorigenesis, apoptosis merupakan mekanisme penting untuk mencegah proliferasi sel yang mengalami kerusakan DNA, agar sel dengan lesi DNA tersebut tidak dilipat gandakan, maka apoptosis berfungsi sebagai salah satu kontrol *checkpoint* dalam siklus sel. Kegagalan sel-sel tumor untuk melaksanakan mekanisme apoptosis merupakan

salah satu faktor penyebab pertumbuhan tumor makin besar, instabilitas genetik sel-sel bersangkutan dan resistensi terhadap khemoterapi. Defek mekanisme apoptosis dapat meningkatkan ketahanan hidup sel dan menambah kemungkinan ekspansi sel ganas. Akibat defek mekanisme apoptosis yang lain adalah memperbesar kemungkinan terjadinya keganasan selain akibat instabilitas genetik dan akumulasi kelainan genetik, juga akibat ketidak taatan terhadap aturan yang ditentukan pada checkpoint siklus sel untuk menginduksi apoptosis (Freuhauff dkk, 2006, Kresno, 2005, Kocki dkk.,2004, Yalon dkk.,2004).

Proses apotosis dapat dibagi dalam tiga fase, yaitu: fase inisiasi atau induksi, fase efektor atau komitmen pada saat mana diambil keputusan untuk “bunuh diri”, dan fase degradasi atau eksekusi di mana sel tersebut memperlihatkan gambaran biokimia dan morfologi apoptosis. Selama fase induksi atau inisiasi, sel menerima stimulus yang menginduksi kematian, kehilangan salah satu faktor yang menunjang ketahanan hidup, kekurangan suplai untuk metabolisme dan terjadi pengikatan reseptor yang meneruskan sinyal kematian. Fase efektor merupakan reaksi metabolik dengan pola yang lebih teratur, dan sel mengambil keputusan atau komitmen untuk “bunuh diri”. Fase degradasi atau fase eksekusi terjadi peningkatan berbagai aktivitas, termasuk peningkatan aktivasi enzim katabolik dan produksi reactive oxygen species (ROS). Pada fase ini terjadi perubahan morfologi dan biokimiawi sel, di antaranya fragmentasi DNA, degradasi berbagai jenis protein. Semua sel mengalami apoptosis menurut pola tertentu dan menunjukkan bahwa sel tersebut mengekspresikan semua komponen protein yang diperlukan untuk meng-eksekusi kematian sel (Anom dkk. 2012, Kocki dkk.,2004, Yalon dkk.,2004).

Salah satu proses apoptosis dapat terjadi akibat adanya kerusakan pada mitokondria. Seperti diketahui mitokondria sangat berperan dalam proses reaksi oksidasi dan reduksi sel dalam menghasilkan energi dalam bentuk adenoin triphosphat, disamping berperan dalam proses metabolisme sel juga sebagai tempat sintesis lemak dan protein yang diperlukan oleh sel. Pendekatan molekular menunjukkan bahwa adanya kerusakan pada mitokondria akan memicu terjadinya peningkatan sintesis sitokrom C. Adanya peningkatan sitokrom C akan menstimulasi terbentuknya *apoptosis activating faktor 1* (APAF 1) dan terbukanya PT pore. Akibat perubahan ini akan teraktivasi caspase 3 yang merupakan caspase eksekutor yang berasal dari caspase inisiator yakni caspase 9. Aktivasi caspase 3 akan menyebabkan sintesis enzim DNA ase yang berlebihan yang menyebabkan terjadinya fragmentasi DNA. Hal ini akan menyebabkan kematian sel dalam bentuk apoptosis (Lantuejoul dkk., 2004, Meles.2007).

Jalur apoptosis yang melibatkan caspase terjadi saat ada rangsangan apoptosis yang selanjutnya menyebabkan pelepasan sitokrom-c kedalam sitosol, kemudian bersama adaptor Apaf-1 merangsang dimerisasi dan aktivasi caspase-9, selanjutnya akan mengaktifkan caspase-3 dan satu dari efektor caspase membelah, sejumlah target sel termasuk ICAD yang selanjutnya akan terjadi apoptosis. Jalur lain terjadinya apoptosis adalah pelepasan AIF dari mitokondria kedalam sitosol. Yang berperan terjadinya pelepasan sitokrom-c melalui faktor sistolik yang selanjutnya akan mengaktifasi caspase 7 dan 8 yang merupakan caspase inisiator untuk selanjutnya mengaktifasi caspase-3 yang merupakan caspase eksekutor yang menentukan terjadinya apoptosis (Bogler dan Mikkelson, 2005)

Apoptosis dapat pula terjadi melalui ribonukleoprotein atau telomerase. Telomerase terdiri dari beberapa nukleotida yang tersusun secara berulang, terdiri dari beberapa nukleotida yang tersusun secara berulang, terdiri dari C4-A3 dan G4-T2. Telomerase berfungsi untuk mempertahankan ukuran telomer dari kromosom dan telomer akan mengalami pemendekan pada waktu sel melakukan pembelahan di. Apabila telomer tersebut mencapai ukuran tertentu (level kritis) sebagai akibat terjadi pembelahan sel secara berulang, maka sel tersebut tidak akan dapat melanjutkan pembelahannya yang pada akhirnya sel akan mengalami kematian yang disebut apoptosis. Adanya aktivitas enzim telomerase menyebabkan ukuran telomer pada ujung kromosom akan dapat dipertahankan secara terus menerus, sehingga kromosom sel selalu terlindungi. Telomerase akan tetap aktif pada sel benih dan tidak aktif pada sel somatik, namun telomerase akan terinduksi kembali bila sel normal mengalami transformasi menjadi sel kanker (Freuhauff dkk, 2006, Kresno, 2005,).

Pengendalian apoptosis dihubungkan dengan gen yang mengatur siklus sel, termasuk di antaranya gen p53, Rb, myc dan lain-lain. Fungsi produk gen p53 dan Rb terkait erat dengan peristiwa dalam siklus sel pada fase G1. Mekanisme kerja p53 sangat kompleks yaitu dapat berikatan dengan berbagai jenis protein dan terlibat dalam mengatur ekspresi berbagai gen. Diduga protein gen p53 dapat mengatur proliferasi sel maupun apoptosis. Sel yang kehilangan gen p53 baik karena mutasi, infeksi virus atau sebab lain, mengakibatkan sel kehilangan kemampuan apoptosis yang diinduksi oleh kemoterapi, radiasi, kehilangan Rb, ekspresi c-myc dan anoksia, namun gen p53 yang *wild type* dapat mengkompensasi kehilangan Rb sehingga dapat mencegah terjadinya transformasi. (Bogler dan Mikkelson, 2005, Kresno, 2005)

2.4. Uji Toksisitas atau Uji Keamanan

Toksikologi adalah studi tentang efek zat kimia atas material biologi dengan penekanan khusus pada efek yang membahayakan (Loomis, 1978). Tujuan pelaksanaan uji toksikologi ialah memberikan penerangan, agar kerugian kesehatan manusia dan lingkungan oleh zat kimia dapat dicegah atau dibatasi. Dari hasil tersebut, dapat dilakukan evaluasi terhadap suatu obat dalam bidang medis dan organ sasaran yang membutuhkan penelitian lebih lanjut (Lu, 1995). Toksikologi juga mempunyai arti pencegahan terjadinya kerugian oleh zat baru yang diperkenalkan, seperti obat-obatan, pestisida, zat tambahan untuk makanan dan hasil industri, untuk memperkecil bahaya zat dipakai, yang berupa zat pencemaran lingkungan atau zat yang ada secara alamiah (Koeman, 1987). Menurut Lu (1995) uji toksikologi biasanya dibagi menjadi tiga kategori, yaitu toksisitas akut, toksisitas subkronis, dan toksisitas kronik.

2.4.1. Uji Toksisitas Akut

Berdasarkan Center for Drug Evaluation and Research (CDER) dari Badan Obat dan Makanan Amerika Serikat (US FDA's) uji toksisitas akut dilakukan dengan memberikan zat kimia atau suatu senyawa yang sedang diuji dengan dosis tunggal atau berulang dalam jangka waktu tidak lebih dari 24 jam. Penelitian ini dirancang untuk menentukan dosis letal median (LD_{50}). Zat tertentu seperti bahan obat herbal yang memiliki toksisitas rendah tidak memerlukan penentuan nilai LD_{50} secara tepat. Pengujian ini juga dapat menunjukkan organ sasaran yang mungkin akan dirusak dan efek toksik spesifiknya (Lu, 1995).

Pada penelitian uji toksisitas akut dilakukan dengan 2 cara pemberian obat yakni (1) cara yang disarankan untuk dipakai di klinik dan (2) cara pemberian intra vena bila memungkinkan, hal ini dimaksudkan untuk mengetahui efek sistemik bahan uji. Uji toksisitas akut dilaksanakan sedikitnya pada dua spesies mamalia, termasuk spesies non roden bila memungkinkan. Pada umumnya menggunakan tikus dan mencit. Hewan itu dipilih selain itu kedua jenis hewan tersebut siklus hidupnya pendek untuk cepat berulang dan makan bisa segala macam pakan, serta mencit dan tikus secara fisiologis paling mendekati fisiologis manusia. Pelaksanaan uji toksisitas akut sebaiknya dilakukan pada kedua jenis kelamin, juga pada hewan dewasa yang masih muda, karena kerentanannya mungkin berbeda (Lu, 1995).

Cara pemberian sediaan obat dilakukan melalui jalur per oral dan parenteral. Biasanya hewan coba menerima dosis tunggal atau dosis berulang dalam jangka waktu tidak

lebih dari 24 jam. Waktu pengamatan harus cukup panjang yakni berkisar 7-14 hari atau dapat lebih lama lagi sehingga efek yang mula kerjanya lambat dapat diketahui, termasuk yang harus diamati adalah terjadinya kematian.

Pada akhir percobaan semua hewan coba dilakukan otopsi untuk menentukan perubahan makroskopis dan mikroskopis yang terjadi selama percobaan dalam kurun waktu tertentu. Hasil otopsi dapat memberikan informasi yang sangat penting tentang organ sasaran, terutama bila kematian tidak terjadi segera setelah pemberian obat. Selain itu diperlukan pemeriksaan histopatologi organ tubuh dan jaringan tertentu (Meles, 2007).

2.4.2. Uji Toksisitas subkronis

Uji toksisitas subkronis dilakukan berdasarkan Berdasarkan Center for Drug Evaluation and Research (CDER) dari Badan Obat dan Makanan Amerika Serikat (US FDA's) Uji Toksisitas subkronis dilakukan dengan memberikan bahkan uji sebanyak satu kali atau beberapa kali dalam dalam sehari dalam jangka waktu 90 hari. Cara pemberian bahan uji dilakukan berdasarkan cara pemberian yang disarankan untk dipakai di klinik. Seperti halnya pengujian toksisitas akut, pada pengujian toksisitas subkronis menggunakan 2 spesies mamalia yang berbeda termasuk nonrodent bila memungkinkan. Parameter yang diamati pada pengujian subkronis adalah selama masa percobaan 90 hari terhadap perubahan berat badan yang dilakukan setiap minggu, adanya tanda-tanda keracunan seperti diare, nausea, sesak nafas.

2.4.3. Toksisitas Pada Jaringan

Toksisitas pada jaringan pada pemeriksaan histopatologi tampak berupa kongesti, degenerasi sel bersama dengan pembentukan vakuola besar, penimbunan lemak dan nekrosis. Aktivitas toksik ini tidak mengubah fungsi sel tetapi struktur sel langsung dirusak. Efek toksik sering terlihat dalam jaringan hati dan ginjal segera setelah senyawa toksik mencapai konsentrasi yang tinggi. Hal ini dapat memberikan petunjuk bahwa disini terjadi lesi kimia pada biopolimer organel sel (Robbins dkk. 1995).

Kelompok utama nefrotoksik adalah logam berat, antibiotik, analgesik dan hidrokarbon berhalogen tertentu. Semua bagian nefron secara potensial dapat dirusak oleh efek toksikan. Beratnya efek beragam dari satu perubahan biokimia atau lebih sampai kematian sel, dan efek ini dapat muncul sebagai perubahan kecil pada fungsi ginjal atau gagal ginjal total (Lu, 1995).

2.4.4. Tinjauan Tentang Pemeriksaan Mikroskopis

Pemeriksaan mikroskopis dilakukan dengan pengamatan histopatologis yang dapat mengungkapkan tempat, luas dan sifat morfologi lesi pada organ. Pemeriksaan histopatologi lebih peka daripada uji fungsional untuk menilai kerusakan akut dan kronis. Pada perubahan seluler dapat diamati perubahan sel dari degenerasi sampai nekrosis, tak jarang juga didapatkan kongesti. Degenerasi dapat berupa bengkak keruh (*cloudy swelling*) dan hidrofik, degenerasi lemak dengan droplet hialin. Bila jejas terjadi hebat dan berlangsung lama maka sel tidak lagi dapat melangsungkan metabolisme, biasanya akan terjadi nekrosis.

Nekrosis adalah perubahan morfologi akibat degradasi progresif oleh enzim pada sel yang mengalami jejas letal. Secara morfologi nekrosis adalah kematian jaringan yang ditandai oleh destruksi inti sel, yang meliputi piknosis yakni pengerutan inti sel, karyoreksis yakni pecahnya inti sel dan kariolisis yakni penghancuran inti sel. Kongesti pada sel terjadi karena jejas pada pembuluh darah sehingga aliran darah terganggu dan darah terkonsentrasi pada bagian tertentu, berakibat terjadi gangguan suplai darah pada bagian lain. Kondisi tersebut jika berlangsung lama dapat menyebabkan degenerasi sel bahkan terjadi nekrosis (Robins dkk, 1995, Meles, 2007).

BAB 3**TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN****3.1. Tujuan Penelitian**

1. Membuktikan alkaloid *Achyranthes aspera linn* dapat menyebabkan Fragmentasi kromosom sel kanker payudara yang menyebabkan kematian sel kanker payudara.
2. Membuktikan batas keamanan alkaloid *Achyranthes aspera linn* melalui uji toksisitas akut dengan menentukan dosis lethal 50% (LD50) dan uji toksisitas kronis dalam penggunaan jangka panjang yakni 90 hari, serta Uji stabilitas dengan pemanasan langsung dan penyinaran sinar ultra violet selama 90 hari.

3.2. Manfaat Penelitian

Jika penelitian ini terbukti alkaloid *Achyranthes aspera linn* dapat digunakan sebagai bahan obat antikanker khususnya kanker payudara. Manfaat ilmiah diharapkan dapat menambah informasi baru mengenai obat fitofarmaka alkaloid *Achyranthes aspera linn* sebagai antikanker masa depan sebagai "*suicide gen Therapy*" dengan harga murah, aman dan nyaman



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Dosis alkaloid *Achyranthes aspera* linn

Penentuan dosis alkaloid daun *achyranthes aspera* linn sebagai obat antikanker berdasarkan hasil penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Wurlina dkk.(2003) yaitu 60 mg/kgbb secara *invitro*, sehingga pada penelitian secara *invivo* yang dihubungkan dengan volume cairan tubuh mencit yang terdiri dari cairan ekstraseluler dan cairan intraseluler yang berkisar 60% dari berat tubuh. Apabila seluruh dosis obat yang diberikan terdistribusi ke cairan ekstraseluler dan intraseluler maka dosis efektif untuk pemakaian secara *invivo* menjadi $100/60 \times 60$ mg/kg. bb = 100 mg/kg. bb. Berdasarkan Wolf and Wagner (1977), dosis obat untuk penelitian berdasarkan dosis batas bawah dan dosis batas atas berdasarkan logaritma dosis obat yakni log, 10, log 30, log 100, log 300, log 1000 dan seterusnya. Dosis efektif 100 mg/kg bb berada diantara dosis 30 dan 300, sehingga dosis batas bawah = $\log 30 / \log 100 \times 100$ mg/kg bb. = 75 mg/kg bb, dosis efektif = $\log 100 / \log 100 \times 100$ mg/kg bb = 100 mg/kg.bb, sedangkan dosis batas atas = $\log 300 / \log 100 \times 100$ mg/kg bb. = 125 mg/ kg bb. Sehingga dosis *invivo* yang digunakan pada penelitian ini adalah dosis batas bawah sebesar 75 mg/kgbb, dosis efektif sebesar 100 mg/kgbb dan dosis batas atas sebesar 125 mg/kgbb.

4.2. Pemeriksaan Fragmentasi kromosom

- Jaringan/ sel kanker payudara ditambahkan media, disentrifugasi 2000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang dan sisakan supernatan dan endapan sebanyak 1 ml. Ditambahkan lagi media, dilakukan berkali-kali dengan cara yang sama sampai terlihat endapan dan supernatan terlihat bersih dan bening.
- Tambahkan lar. Hipotonis KCl 0,07% sebanyak 5 ml selanjutnya disentrifugasi untuk merusak dinding inti sel), sambil dikocok dan diaduk secara merata perlahan-lahan dengan aspirasi menggunakan pipet,, kemudian dibiarkan dalam suhu kamar selama 15 menit.
- Sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, cairan bagian atas dibuang , sisakan cairan dan endapan sebanyak 1 ml.

- Fiksasi dengan lar. Cuka glasial (as. Asetat) dan metanol dengan perbandingan 1: 3 sebanyak 5 ml sambil dikocok secara merata dan perlahan lahan menggunakan pipet aspirasi, biarkan dalam suhu kamar selama 1 jam.
- Lakukan ulang sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, cairan bagian atas dibuang, sisakan cairan dan endapan sebanyak 1 ml.
- Fiksasi kembali sebanyak 4 kali hingga endapan yang terbentuk terlihat bening.
- Endapan tersebut teteskan pada objek preclin sebanyak 2-3 tetes secara merata, selanjutnya dikeringkan dalam suhu 56-60⁰ C selama 3 hari.
- Selanjutnya dilakukan pengecatan dengan Giemsa losung yang telah dilarutkan dengan aquadest perbandingannya 1 : 3 selama 10 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir, dan dikeringkan. Dilihat di bawah mikroskop cahaya mulai pembesaran 100 X sampai 400 X untuk melihat fase mitosis, kemudian tutup dengan *cover glass* yang telah diberi *canada balsam*.

4.3.Pemeriksaan Uji toksisitas akut dan subakut

4.3.1.Dosis Alkaloid *Achyranthes aspera* linn

Pada penelitian tahun pertama diketahui dosis maksimal yang efektif untuk antikanker adalah 100 mg atau 0,1 gram/kg bb mencit. Parameter yang diukur pada uji toksisitas akut adalah menentukan dosis yang dapat membunuh 50% (LD50) dan perubahan fungsional maupun patologis terhadap organ vital seperti hati dan ginjal yang dilakukan dalam waktu tidak lebih dari 24 jam. Dosis obat yang diuji pada uji toksisitas akut adalah dimulai dari dosis efektif yang memberikan efek maksimal sampai dosis yang mampu membunuh diatas 50% hewan coba yaitu 100 mg atau 0,1 gram/kg bb sampai diatas 15 gram/kg bb yang dibagi dalam 5 tahapan dosis dan satu kelompok perlakuan (Loomis, 1978). Selanjutnya dibuat minimal dalam tahapan lima dosis berdasarkan rumus Reeds and Moons (1978) yang dikutip oleh Meles dkk. (2009). Sedangkan uji toksisitas kronis dimaksudkan untuk mengetahui perubahan fungsional dan perubahan yang bersifat patologis terhadap organ hati dan ginjal dalam jangka waktu pemakaian obat minimal 3 bulan (90 hari) sampai dengan 6 bulan. Dosis yang digunakan pada uji toksisitas kronis adalah dosis efektif yang mampu memberikan efek maksimal yakni 0,1 gram/ kgbb mencit.

4.3.2. Uji toksisitas akut

Tujuannya adalah untuk menentukan dosis yang menyebabkan kematian 50% (LD50) dan mendapatkan gambaran keamanan alkaloid *Achyranthes aspera linn* yang digunakan dalam jangka maksimal 24 jam dibuktikan secara *in vivo* pada 70 ekor mencit (*Mus musculus*) yang masing-masing dibagi menjadi 7 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 10 ekor. Kelompok tersebut adalah sebagai berikut :

- Kelompok 1 yakni kelompok Kontrol : PO, digunakan mencit betina yang hanya diberi pelarut alkaloid cmc 0,5% sebanyak 1 ml dalam waktu maksimal 24 jam.
- Kelompok 2 : Kelompok perlakuan 1 (P1), mencit betina diberikan alkaloid *Achyranthes aspera linn* dengan dosis 0,1 gram/kg bb sebanyak 1 ml dalam waktu 24 jam.
- Kelompok 3 : Kelompok perlakuan 2 (P2), mencit betina diberikan alkaloid *Achyranthes aspera linn* dengan dosis 0,3 gram/kg bb sebanyak 1 ml dalam waktu 24 jam.
- Kelompok 4 : Kelompok perlakuan 3 (P3), mencit betina diberikan alkaloid *Achyranthes aspera linn* dengan dosis 1 gram/kg bb sebanyak 1 ml secara oral dalam waktu 24 jam
- Kelompok 5 : Kelompok perlakuan 4 (P4), mencit betina diberikan alkaloid *Achyranthes aspera linn* dengan dosis 3 gram/kg bb sebanyak 1 ml secara oral dalam waktu 24 jam
- Kelompok 6 : Kelompok perlakuan 5 (P5), mencit betina diberikan alkaloid *Achyranthes aspera linn* dengan dosis 10 gram/kg bb, sebanyak 1 ml secara oral dalam waktu 24 jam.
- Kelompok 7 : Kelompok perlakuan 6 (P6), mencit betina diberikan alkaloid *Achyranthes aspera linn* dengan dosis 15 gram/kg bb, sebanyak 1 ml perhari secara oral selama 24 jam.

Pengamatan dilakukan terhadap jumlah terjadinya kematian dalam tiap kelompok perlakuan dan pada kelompok mencit yang belum menunjukkan tanda kematian diikuti perkembangan fungsi fisiologis tubuh seperti perubahan berat badan, nafsu makan dan tanda-tanda awal toksisitas seperti adanya diare, nausea, konvulsi, sesak nafas sampai dalam waktu 14 hari. Setelah 14 hari semua kematian dihitung dan ditentukan LD50 nya, serta dibuat preparat hitopatologis terhadap organ hati sebagai organ metabolisme dan ginjal

sebagai organ ekskresi untuk menentukan tingkat kerusakan sel atau kematian sel yang terjadi.

4.3.3. Uji toksisitas kronis digunakan satu kelompok kontrol dan satu kelompok perlakuan. Dosis alkaloid *Achyranthes aspera linn* yang digunakan pada uji toksisitas kronis adalah dosis efektif yang memberikan efek maksimal, yaitu berdasarkan penelitian pendahuluan sebesar 100 mg/kg bb per hari yang diberikan secara peroral. Jangka waktu pengujian minimal selama 90 hari (3 bulan). Parameter yang diamati adalah perubahan fungsional fisiologis yang dilakukan setiap minggu, terhadap adanya diare, nausea, konvulsi, perubahan pernafasan, maupun perubahan terhadap fungsi kardiovaskuler, serta mungkin terjadi kematian selama pemberian alkaloid 90 hari. Selanjutnya setelah hari ke 90 masa percobaan semua mencit dikorbankan untuk dibuat preparat histologis terhadap hati sebagai organ metabolisme dan ginjal sebagai organ ekskresi untuk menentukan tingkat kerusakan organ yang mungkin timbul akibat pemakaian alkaloid *Achyranthes aspera linn* dalam jangka panjang. Jumlah mencit yang digunakan sebanyak 60 ekor yang dibagi menjadi 2 kelompok, sehingga tiap kelompok terdiri dari 30 ekor. Kelompok tersebut adalah sebagai berikut :

Kelompok kontrol : PO, digunakan mencit betina yang hanya diberi air kemasan sebanyak 1 ml dalam waktu 90 hari.

Kelompok perlakuan : P1, mencit betina diberikan alkaloid *Achyranthes aspera linn* dengan dosis 0,1 gram/kg bb sebanyak 1 ml dalam waktu 90 hari.

Perubahan makroskopis dan mikroskopis dari organ tubuh yang bertanggung jawab terhadap proses metabolisme obat yaitu hati dan organ ekskresi obat yaitu ginjal, Penentuan perubahan patologis dan mikroskopis berdasarkan metode Scoring histopatologi hepar (Knodell, 1981) dan metode scoring histopatologi ginjal (Klopfleisch, 2013).

Metode Scoring histopatologi hepar (Knodell dkk, 1981)

Kerusakan	Skor	Perubahan histopatologi
Nekrosis	0	Tidak terjadi nekrosis
	4	< 25% dari seluruh Lapangan Pandang (LP)
	6	26-50% dari seluruh Lapangan Pandang
	8	> 50% dari seluruh Lapangan Pandang
	10	25-50% dari seluruh LP disertai <i>bridging necrosis</i>
	12	>50 dari seluruh LP disertai <i>bridging necrosis</i>
	14	> 76 % merata hampir semua lobulus (<i>Multilobular</i>)

Degenerasi	0	<i>necrosis</i>) Tidak terjadi degenerasi
	1	< 25 dari seluruh Lapangan Pandang
	2	26 – 50% dari seluruh Lapangan Pandang
	3	51 - 75% dari seluruh Lapangan Pandang
	4	>76 dari seluruh Lapangan Pandang
Portal inflamasi	0	Tidak terdapat sel radang
	1	<1/3 total area segitiga Kiernan's (<i>portal area</i>)
	2	1/3 – 2/3 total area segitiga Kiernan's
	3	>2/ total area segitiga Kiernan's
Fibrosis	0	Tidak Terjadi intra sinusoidal/periportal fibrosis
	2	< 25% dari seluruh Lapangan Pandang
	4	26-50 % dari seluruh Lapangan Pandang
	6	51-75 % dari seluruh Lapangan Pandang
	8	> 76 % dari seluruh Lapangan Pandang

Metode scoring histopatologi ginjal (Klopfleisch,2013)

Kerusakan	Skor	Perubahan histopatologi
Degenerasi Epitel tubular	0	tidak terdapat degenerasi pada lapangan pandang
	1	< 25% terdapat degenerasi pada lapangan Pandang
	2	26-50% terdapat degenerasi pada lapangan Pandang
	3	51 – 75% terdapat degenerasi pada lapangan Pandang
	4	>76% terdapat degenerasi pada lapangan Pandang
Nekrosis Epitel tubular	0	tidak terdapat nekrosis pada epitel tubulus
	2	< 25% terdapat nekrosis pada epitel tubulus
	4	26-50% terdapat nekrosis pada epitel tubulus
	6	51 – 75% terdapat nekrosis pada epitel tubulus
	8	>76% terdapat nekrosis pada epitel tubulus
Nekrosis Glomerulus	0	tidak terdapat nekrosis pada sel glomerular
	3	< 25% terdapat nekrosis glomerular dari seluruh Glomerulus
	5	26-50% terdapat nekrosis glomerular dari seluruh Glomerulus
	7	51-75% terdapat nekrosis glomerular dari seluruh Glomerulus
	9	>76 terdapat nekrosis glomerular dari seluruh Glomerulus
Infiltrasi Glomerulus	0	Tidak terdapat sel radang pada glomerulus
	1	< 25% terdapat sel radang dari seluruh glomerulus
	2	26-50% terdapat sel radang dari seluruh glomerulus
	3	51-75% terdapat sel radang dari seluruh glomerulus
	4	>76 terdapat sel radang dari seluruh glomerulus

Analisis data

Data perubahan gambaran imunohistokimia hati dan ginjal mencit di analisis menggunakan uji statistik non parametrik dengan menggunakan uji Kruskal Wallis karena data diperoleh berdasarkan nilai skoring. Bila terdapat perbedaan yang nyata di lanjutkan dengan uji perbandingan berganda (Uji Z) 5%. Dari hasil uji toksisitas akut akan diperoleh LD50 (dosis yang menyebabkan kematian hewan coba sebanyak 50%),

4.3.4. Uji stabilitas alkaloid *Achyranthes aspera* linn

Uji stabilitas terhadap alkaloid *Achyranthes aspera* linn meliputi uji pemanasan langsung yakni pemanasan dalam air mendidih diatas 100 ° C selama 30 menit, dan penyinaran dengan sinar ultraviolet selama 90 hari. Para meter yang diamati adalah perubahan terhadap warna alkaloid, dan tekstur/ bentuk alkaloid dan aktivitas farmakologi dari alkaloid *Achyranthes aspera* linn.

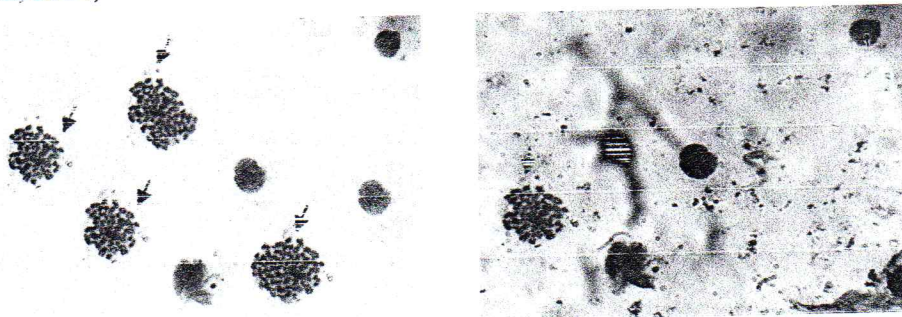
BAB 5.

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Pengaruh pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* linn terhadap Fragmentasi kromosom penyebab kematian sel kanker

Pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* Linn pada mencit menderita kanker payudara menyebabkan fragmentasi DNA pada gambar 5.1 dan tidak terdeteksi secara kuantitatif.

Apoptosis yang bersifat patologis yang terjadi akibat peningkatan aktivitas protein gen P53 dapat terjadi melalui aktivasi protein Bax. Protein Bax akan merangsang mitokondria memproduksi Cytokrom-C secara berlebihan sehingga terjadi apoptosis. Cytokrom-C akan mengaktivasi apoptotic protease activating factor 1 (APAF1) yang menyebabkan aktivasi caspase inisiasi (caspase 9) dan bekerjasama dengan caspase 8 untuk menstimulir terbentuknya caspase executor (caspase 3). Selanjutnya caspase 3 akan mengaktivasi enzim deoxyribo nucleotidase (DNA ase) untuk mencernakan DNA sehingga terjadi fragmentasi DNA yang menyebabkan kematian sel (apoptosis) (Choi dkk. 2004, Yalon dkk., 2004)



Gambar 5.1. Fragmentasi DNA sel kanker payudara mencit

Mekanisme apoptosis yang bersifat patologi dapat pula terjadi melalui proses sitotoksik sel. Keracunan sel tubuh oleh suatu bahan-bahan yang bersifat toksik akan menyebabkan terlepasnya berbagai macam protein dari sel tersebut seperti perforin dan granzim. Kedua enzim ini akan menyebabkan perforasi sel kanker dan aktivasi dari caspase inisiator (caspase 9) selanjutnya caspase 9 akan bekerjasama dengan caspase 8 untuk membentuk caspase executor (caspase 3). Selanjutnya caspase 3 akan mengaktivasi enzim DNAase yang akan mencernakan DNA sehingga terjadi fragmentasi dari DNA, dan berakibat kematian sel secara apoptosis, (Freuhauff dkk,2006, Yalon dkk., 2004).

5.2. Uji toksisitas Akut alkaloid *Achyranthes aspera linn* selama 24 jam pada mencit terhadap perubahan histologi hati dan ginjal.

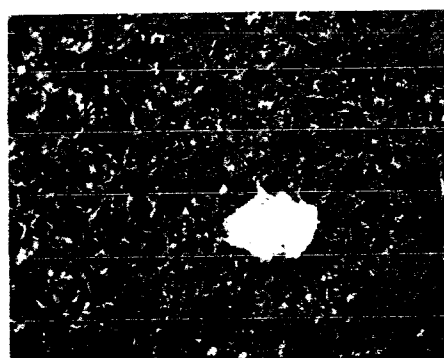
Hasil pemeriksaan perubahan histologi sel hati pada mencit setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera linn* selama 24 jam, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Rata rata perubahan histologi sel hati pada mencit selama 24 jam

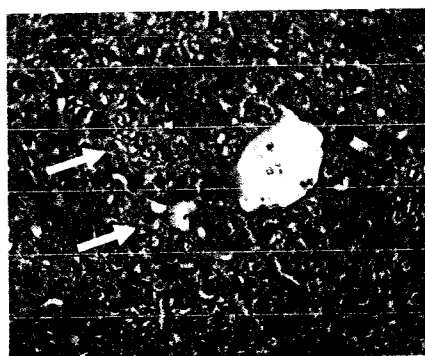
Perlakuan	Kongesti	Degenerasi	Nekrosis
P0	0,04 ^a ± 0,084	0,30 ^a ± 0,270	0,14 ^a ± 0,189
P1	0,04 ^a ± 0,084	0,32 ^a ± 0,252	0,12 ^a ± 0,252
P2	0,06 ^a ± 0,096	0,32 ^a ± 0,252	0,14 ^a ± 0,250
P3	0,04 ^a ± 0,084	0,32 ^a ± 0,252	0,12 ^a ± 0,252
P4	0,06 ^a ± 0,096	0,32 ^a ± 0,252	0,14 ^a ± 0,231
P5	0,04 ^a ± 0,084	0,32 ^a ± 0,25	0,14 ^a ± 0,250

superskrip huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan terdapat perbedaan ($\alpha > 0,05$)

Pada table 5.2. dapat dilihat hasil pengamatan secara mikroskopik melalui lima lapangan pandang yang berbeda pada tiap preparat hati mencit menunjukkan ($\alpha < 0,05$) sehingga tidak terdapat perbedaan yang nyata pada gambaran histopatologi sel hati yang mengalami kongesti, degenerasi dan nekrosis ringan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Ini berarti mencit yang diberi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dengan dosis 0,3 gram/kgbb, 1 gram/kgbb, 3 gram/kgbb, 10 gram/kgbb dan 15 gram/kg.bb secara per oral dalam pengamatan 24 jam, menampakkan sel hati dalam keadaan normal, walau ada beberapa sel hati mencit yang menampakkan adanya perubahan dalam bentuk kongesti, degenerasi dan nekrosis ringan.

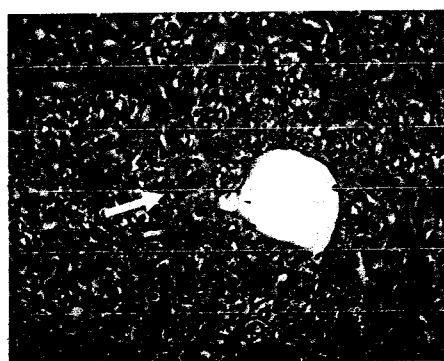


Kontrol (P0)



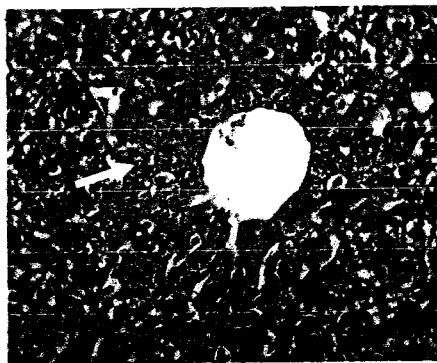
P1

→ menunjukkan kongesti, degenerasi hidropik, degenerasi lemak



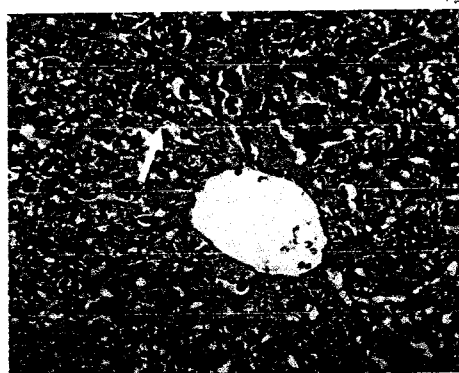
P2

→ menunjukkan degenerasi



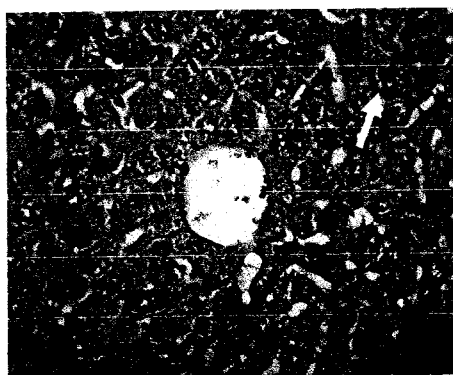
P3

→ menunjukkan degenerasi dan nekrosis ringan



P4

→ menunjukkan kongesti, degenerasi dan nekrosis ringan



P5

→ menunjukkan kongesti, degenerasi dan nekrosis ringan

Gambar 5.2. Mikroskopis hati mencit setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* linn dalam waktu 24 jam

Perubahan mikroskopis hati dalam bentuk kongesti antara kelompok kontrol dan perlakuan secara per oral dalam waktu 24 jam tidak terdapat perbedaan bermakna ($\alpha < 0.05$). Demikian pula perubahan mikroskopis dalam bentuk degenerasi maupun nekrosis antara kelompok kontrol dengan perlakuan yang diberikan secara per oral tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($\alpha < 0.05$).

Hal ini menunjukkan bahwa bahan alkaloid *Achyranthes aspera* linn pada uji toksisitas akut tidak menimbulkan efek toksik pada hati. Meskipun hati merupakan organ yang peka terhadap zat toksik tetapi hati memiliki fungsi sangat penting terhadap metabolisme bahan toksik. Hal ini sesuai dengan pernyataan Koeman (1987) bahwa hati merupakan organ tubuh yang paling tahan atau resisten terhadap pengaruh bahan toksik. Hal ini disebabkan karena hati disamping mempunyai fungsi detoksifikasi, juga hati mempunyai daya regenerasi cukup besar apabila terjadi proses kerusakan sel hati baik dalam bentuk

kongesti maupun terjadi degenwerasi yang bersifat reversibel. Setelah diabsorpsi oleh hati, zat toksik maupun bahan obat akan masuk ke dalam peredaran darah, selanjutnya didetoksifikasikan dalam hati menjadi bentuk non toksik dan lebih polar agar mudah untuk di ekskresikan.

Dari hasil penelitian diketahui bahwa dosis yang dapat menyebabkan kematian mencit sebesar 50% lebih dari 15 gram. Hal ini menunjukkan bahwa bahan aktif alkaloid *Achyranthes aspera* linn termasuk bahan obat tidak berbahaya. Adapun menggunakan bahan dalam bentuk ekstrak etanol yaitu ekstrak total *Achyranthes aspera* linn dosis yang menyebabkan kematian 50% pada mencit lebih dari 15 gram/ kg bb. Menurut Loomis (1978) menyatakan bahwa bahan obat dengan LD 50 lebih dari 15 gram termasuk dalam kategori bahan yang tidak berbahaya. Jika dengan dosis yang besar ternyata tidak menimbulkan kematian dapat dianggap bahwa toksisitas akut bahan tersebut rendah dan nilai LD₅₀ tidak perlu ditentukan secara tepat, suatu angka perkiraan sudah dapat memberi manfaat (Lu, 1995)

5.3. Uji Toksisitas Kronis alkaloid *Achyranthes aspera* linn selama 90 hari pada mencit terhadap perubahan histologi hati dan ginjal.

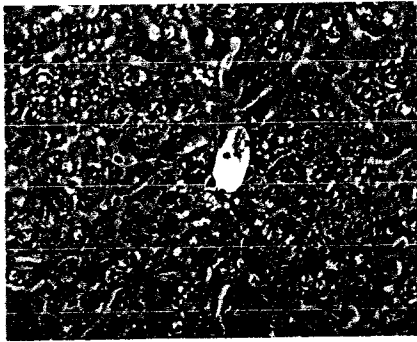
Hasil pemeriksaan perubahan histologi sel hati pada mencit setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* linn selama 90 hari, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3. Rata rata perubahan histologi hati pada mencit selama 90 hari

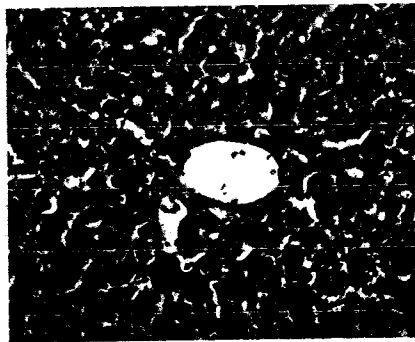
Perlakuan	Kongesti	Degenerasi	Nekrosis
Po	0.066 ^a ± 0.109	0.327 ^a ± 0.237	0.133 ^a ± 0.242
P1	0.073 ^a ± 0.111	0.313 ^a ± 0.244	0.146 ^a ± 0.245

superskrip huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan terdapat perbedaan (p<0,05)

Pada perlakuan selama 90 hari (3 bulan) dengan cara per oral tidak menunjukkan efek toksik pada hati, tetapi di peroleh adanya kerusakan berupa kongesti, degenerasi, nekrosis dalam kategori ringan.



P0 selama 90 hari



P1 selama 90 hari

Gambar 5.3. Mikroskopis hati mencit setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* linn dalam waktu 90 hari

Kerusakan berupa kongesti pada hati mungkin dapat disebabkan oleh bahan bukan obat seperti eter yang digunakan sebagai anestesi sebelum mencit di outopsi sehingga dapat terjadi pembendungan darah dengan adanya darah yang terkonsentrasi dalam suatu pembuluh darah. Menurut Price and Wilson (1988) Kongesti adalah pembendungan darah atau meningkatnya volume darah dalam pembuluh yang mengalami dilatasi akibat rangsangan syaraf parasimpatis yang menyebabkan vasodilatator atau hambatan saraf simfatis yang menyebabkan hambatan mekanisme vasokonstriksi pada bagian tubuh tertentu. Kongesti adalah proses pasif yang dihasilkan dari kerusakan vena pada jaringan. Kongesti bisa bersifat sistemik seperti pada kegagalan jantung atau bisa bersifat lokal yang disebabkan karena obstruksi vena sehingga jaringan berwarna merah kebiruan (*cyanosis*) karena kekurangan oxygen (Kumar dkk., 2002).

Kerusakan berupa degenerasi pada hati ditandai dengan adanya ruang kosong pada sitoplasma, bentukan bulat seperti butiran lemak. Menurut Maretnowati (2005) bahwa perubahan tersebut menunjukkan bahwa sewaktu air tertimbun dalam sitoplasma, menyebabkan organel-organel sel dalam sitoplasma juga ikut menyerap cairan tersebut sehingga menyebabkan pembengkakan pada seluruh bagian sitoplasma. Tampak pula butiran lemak yang menutupi inti sel. Jenis kerusakan hati ini termasuk degenerasi melemak. Degenerasi sel merupakan kerusakan yang terjadi pada sitoplasma tetapi tidak sampai merusak inti sel sehingga kerusakan tersebut dapat pulih kembali menjadi normal bila penyebab kerusakannya dihilangkan (Price, 1988). Degenerasi umumnya disebabkan oleh kerusakan mitokondria dan mitokondria mempunyai fungsi sebagai penghasil energi dalam sel yang dihasilkan dalam bentuk ATP. Apabila mitokondria terganggu, maka pembentukan ATP akan terganggu, sehingga proses transfer sel mengalami gangguan juga. Salah satu

proses transfer sel yang terpenting adalah mekanisme pompa natrium yang berguna untuk mempertahankan tekanan osmotik dalam sel. Apabila mekanisme terganggu maka akan berakibat sel tidak mampu memompa ion natrium keluar sehingga terjadi peningkatan konsentrasi ion natrium dalam sel sehingga menyebabkan air masuk ke dalam sel. Perubahan pembengkakan sel secara mikroskopik kurang nyata dan hanya menyebabkan sedikit pembesaran sel dan sedikit perubahan susunan (Thomson dan Cotton, 1997, Price dan Wilson, 1995). Menurut Robbins dan Kumar (1995) menyatakan macam-macam dari degenerasi sesuai tingkat keparahan yaitu degenerasi keruh (*Cloudy swelling*) yaitu pembengkakan sel oleh penimbunan air dan metabolit dalam sitoplasma yang tampak keruh, degenerasi hidrofilik yaitu pembengkakan sel dengan penimbunan lebih banyak air dan metabolit dimana tampak vakuola yang terbentuk dalam sitoplasma, degenerasi melemak adalah pembengkakan sel dengan penimbunan lemak dalam sitoplasma.

Kerusakan berupa nekrosis pada hati pada penelitian ini masih dalam kategori yang ringan dan masih dianggap dalam batas wajar karena hati mempunyai kemampuan regenerasi sel yang tinggi. Rippey (1994) menyatakan bahwa nekrosis hati merupakan suatu manifestasi toksik yang berbahaya tetapi tidak selalu kritis karena hati mempunyai kapasitas pertumbuhan atau mekanisme pembelahan sel (mitosis) sangat baik. Terdapatnya akumulasi zat toksik menyebabkan gangguan fungsi mitokondria. Mitokondria berfungsi merubah zat makanan yang masuk ke dalam tubuh baik dalam bentuk karbohidrat, protein dan juga lemak menjadi ATP (adenosin trifosfat, karbondioksida dan air). Akibat gangguan pada fungsi mitokondria akan menyebabkan terjadinya gangguan produksi adenosin trifosfat, begitu juga dengan proses fosforilasi oksidatif sehingga banyak ion Na^+ yang masuk sel hati akibat pH dalam sel menurun dan bersifat asam. Karena pH rendah maka aktifitas enzim lisosom dan proteolitik lebih tinggi dalam sel sehingga menyebabkan lisosom pecah sehingga menyebabkan enzim hidrolitik keluar dan melarutkan sel. Terlihatnya kematian sel hati tergantung pada lama dan jenis nekrosis. Tahapan nekrosis meliputi piknosis, karioreksis, kariolisis. Piknosis ditandai dengan terjadinya penggumpalan kromatin dan tidak dikenali lagi anak inti (nukleus), inti tampak lebih padat dan berwarna gelap hitam. Karioreksis ditandai dengan terjadinya kerusakan pada inti yaitu inti pecah sehingga warna menjadi lebih gelap setelah dilakukan pewarnaan. Kariolisis ditandai dengan inti yang mulai hilang hingga sulit dikenali secara mikroskopis, bentuk sel lebih memanjang dan warnanya menjadi tidak jelas setelah dilakukan pewarnaan (Himawan, 1994).

5.4. Uji toksisitas Akut alkaloid *Achyranthes aspera linn* selama 24 jam pada mencit terhadap perubahan histologi sel ginjal

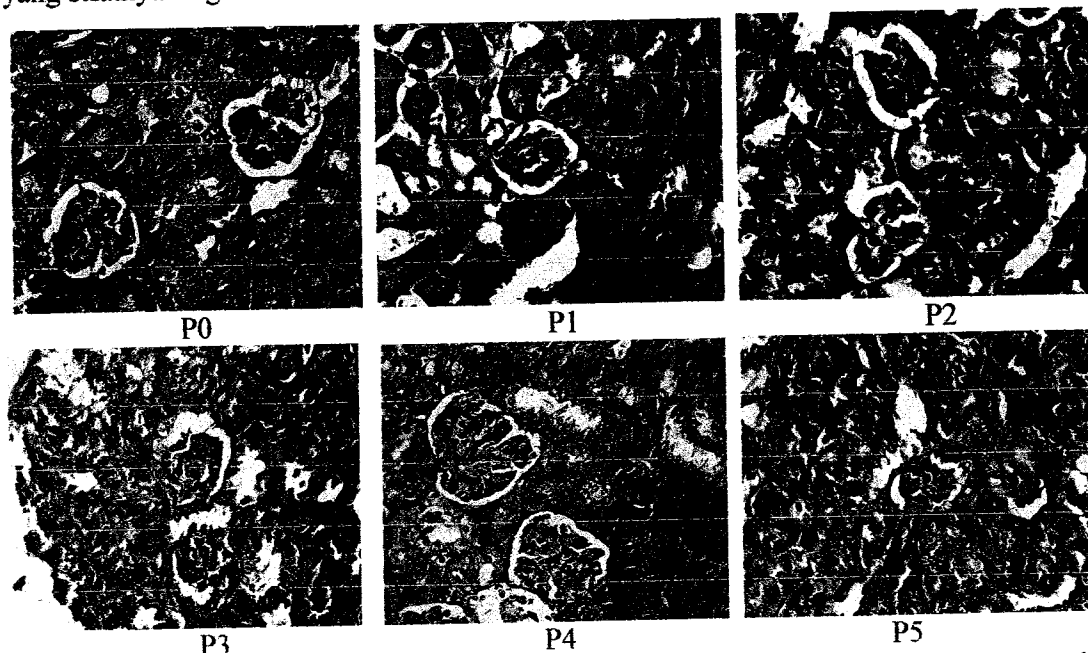
Hasil pemeriksaan perubahan histologi sel ginjal pada mencit setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera linn* selama 24 jam, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4. Rata rata perubahan patologi ginjal pada mencit selama 24 jam

Perlakuan	Kongesti /infiltrasi	Degenerasi	Nekrosis
P ₀	0.22 ^a ± 0.121	0.21 ^a ± 0.138	0.22 ^a ± 0.113
P ₁	0.23 ^a ± 0.134	0.22 ^a ± 0.126	0.23 ^a ± 0.117
P ₂	0.23 ^a ± 0.145	0.22 ^a ± 0.114	0.22 ^a ± 0.118
P ₃	0.24 ^a ± 0.153	0.23 ^a ± 0.147	0.22 ^a ± 0.204
P ₄	0.23 ^a ± 0.113	0.22 ^a ± 0.121	0.24 ^a ± 0.110
P ₅	0.22 ^a ± 0.127	0.23 ^a ± 0.132	0.23 ^a ± 0.114

superskrip huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan terdapat perbedaan ($\alpha > 0,05$)

Pada tabel 5.4. dapat dilihat hasil pengamatan secara mikroskopik melalui lima lapangan pandang yang berbeda pada tiap preparat ginjal mencit menunjukkan ($\alpha < 0,05$) sehingga tidak terdapat perbedaan yang nyata pada gambaran histopatologi ginjal yang mengalami kongesti, degenerasi dan nekrosis ringan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Ini berarti mencit yang diberi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dengan dosis 0,3 gram/kgbb, 1 gram/kgbb, 3 gram/kgbb, 10 gram/kgbb dan 15 gram/kg bb secara per oral dalam pengamatan 24 jam, menampakkan sel ginjal dalam keadaan normal, walau ada beberapa mencit yang menampakkan adanya perubahan kongesti, degenerasi dan nekrosis yang sifatnya ringan.



Gambar 5.4. Mikroskopis ginjal mencit setelah pemberan alkaloid *Achyranthes aspera linn* dalam waktu 24 jam

5.5. Uji Toksisitas Kronis alkaloid *Achyranthes aspera linn* selama 90 hari pada mencit terhadap perubahan histologis sel ginjal

Hasil pemeriksaan perubahan histologi sel ginjal pada mencit setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera linn*) selama 90 hari, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.5.

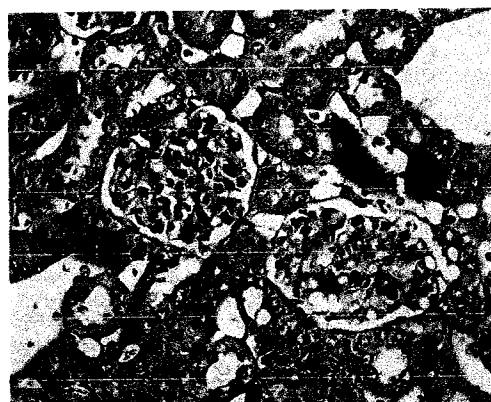
Tabel 5.5. Rata rata perubahan histologi sel ginjal pada mencit selama 90 hari

Perlakuan	Kongesti/infiltrasi	Degenerasi	Nekrosis
Po	$0.23^a \pm 0.138$	$0.23^a \pm 0.124$	$0.23^a \pm 0.112$
Pi	$0.24^a \pm 0.128$	$0.24^a \pm 0.129$	$0.22^a \pm 0.142$

Pada perlakuan selama 90 hari (3 bulan) dengan cara per oral tidak menunjukkan efek toksik pada ginjal, tetapi di peroleh adanya kerusakan berupa kongesti, degenerasi, nekrosis dalam kategori ringan.



P0 selama 90 hari



P1 selama 90 hari

Gambar 5.4. Mikroskopis ginjal mencit setelah pemberan alkaloid *Achyranthes aspera linn* dalam waktu 90 hari

Berdasarkan hasil pengamatan secara mikroskopis melalui lima lapang pandang yang berbeda pada setiap preparat histopatologi ginjal mencit menunjukkan adanya perubahan kemudian dilakukan skoring. Data yang didapat selanjutnya dianalisis dengan uji statistik Kruskal Wallis, diperoleh hasil tidak adanya perubahan yang nyata antara kelompok perlakuan, sehingga tidak perlu dilanjutkan dengan uji pasangan berganda (uji Z). Kerusakan berupa kongesti pada ginjal, ditandai dengan adanya darah yang terkonsentrasi dalam suatu pembuluh darah. Kongesti adalah bendungan darah atau meningkatnya volume darah dalam pembuluh yang berdilatasi akibat rangsangan syaraf vasodilatator atau kelumpuhan vasokonstriktor pada bagian tubuh tertentu (Price dan Wilson 1985). Kongesti terjadi bila aliran darah pada pembuluh darah terhalang, dapat juga disebabkan oleh obstruksi pembuluh darah kecil atau besar, kegagalan dari jantung maupun akumulasi darah pada kapiler dan

vena. Jaringan tampak biru karena vena mengandung sedikit oksigen. Dikatakan pula jika kongesti yang terus-menerus dan kuat dapat terjadi nekrosis, kongesti aktif akut pada ginjal dapat terjadi dikarenakan keracunan zat toksik (Robbins *et al*, 1995).

Kerusakan berupa degenerasi pada ginjal, ditandai dengan sel membengkak keruh pada glomerulus. Glomerulus merupakan bagian yang sangat penting dalam unit fungsional ginjal, fungsi glomerulus yaitu membentuk ultrafiltrat plasma dan membebaskannya ke dalam segmen tubulus. Perubahan yang terjadi pada glomerulus yaitu bertambahnya permeabilitas glomerulus, akibatnya akan terjadi penyerapan kembali zat-zat ke dalam epitel tubuli. Hal ini dapat menyebabkan degenerasi sel-sel epitel yang dinamakan nefrosa primer, sebagian nefrosa primer disebabkan oleh fungsi sekretorik epitel tubuli karena reabsorpsi dan sekresi bahan-bahan toksik (Robbins *et al*, 1995). Degenerasi sel merupakan kerusakan yang terjadi pada sitoplasma tetapi tidak sampai merusak inti sel sehingga kerusakan tersebut dapat kembali menjadi normal apabila penyebab kerusakan dihilangkan (Price dan Wilson, 1995). Degenerasi biasanya disebabkan oleh kerusakan mitokondria yang nyata. Mitokondria berfungsi sebagai sumber tenaga dalam sel yang dihasilkan dalam bentuk ATP. Apabila mitokondria terganggu maka pembentukan ATP juga akan terganggu. Akibatnya proses transfer sel mengalami gangguan. Salah satu proses transfer sel yang penting adalah mekanisme pompa natrium. Mekanisme ini penting untuk mempertahankan tekanan osmotik dalam sel. Apabila mekanisme ini terganggu, maka akan mengakibatkan sel tidak mampu memompa ion natrium yang cukup keluar sel. Akibat peningkatan ion natrium dalam sel adalah masuknya air ke dalam sel. Perubahan pembengkakan sel tidak nyata secara mikroskopis dan hanya menyebabkan sedikit pembesaran sel dan sedikit perubahan susunan (Price dan Wilson, 1995). Macam degenerasi sesuai dengan tingkat keparahan adalah degenerasi keruh (*cloudy swelling*) yaitu pembengkakan sel oleh penimbunan air dan metabolit dalam sitoplasma yang tampak keruh, degenerasi hidrofilik yaitu pembengkakan sel dengan penimbunan lebih banyak air dan metabolit dimana tampak vakuola-vakuola yang terbentuk dalam sitoplasma, dan degenerasi lemak yaitu pembengkakan sel dengan penimbunan lemak dalam sitoplasma (Robbins *et al*, 1995).

Kerusakan berupa nekrosis pada ginjal mencit, tampak inti sel memadat berwarna gelap. Nekrosis yang terjadi merupakan nekrosis tahap awal yaitu tahap piknosis dan berdasarkan uji statistik tidak terdapat perbedaan yang bermakna dibanding dengan kontrol, artinya nekrosis yang terjadi pada uji toksisitas akut alkaloid *Achyranthes aspera* Linn (*Momordica charantia*) masih bersifat ringan. Tampak atau tidaknya kematian sel tergantung

pada lama dan jenis nekrosis, tahap-tahap nekrosis meliputi piknosis, karioreksis dan kariolisis. Piknosis ditandai dengan penggumpalan kromatin dan tidak lagi dikenali anak inti (*nukleus*), inti tampak lebih padat dan berwarna gelap hitam. Karioreksis ditandai dengan terjadinya kerusakan pada inti yaitu inti pecah berkeping-keping sehingga bentuknya tidak teratur. Sitoplasma mulai memanjang dan menyerap zat warna lebu banyak sehingga warna lebih gelap setelah pewarnaan. Kariolisis ditandai dengan inti yang mulai hilang hingga sulit dikenali secara mikroskopis, bentuk sel lebih memanjang dan warna menjadi tidak jelas setelah dilakukan pewarnaan (Himawan, 1994).

Ginjal merupakan organ dengan berat kurang dari 1% berat badan, namun menerima sekitar 20% curah jantung. Aliran darah ginjal didistribusikan ke korteks ginjal melalui cabang arteri ke glomerulus yang melekat pada tubulus. Fungsi glomerulus sebagai penyaring dan tubulus sebagai tempat mengumpulkan bahan buangan dan kelebihan air. Ginjal memiliki kapasitas yang lebih tinggi mengikat zat kimia, karena pada proses filtrasi toksikan akan mengalami absorpsi pasif dalam sel-sel tubuler bila koefisien partisi lipidnya tinggi, toksikan akan tetap berada dalam lumen tubuler dan dikeluarkan bila merupakan senyawa polar (Lu, 1995).

Koeman (1987) menyatakan bahwa hati dan ginjal merupakan organ tubuh yang paling rentan terhadap pengaruh bahan toksik. Bila ada bahan toksik yang ikut aliran darah masuk ke ginjal, sel-sel glomerulus akan berkontak dengan zat-zat toksik tersebut, akibatnya sel ini akan mengalami perubahan dari degenerasi sampai nekrosis. Bahan toksik yang merupakan infiltrasi glomerulus akan direabsorpsi oleh sel tubulus sehingga menyebabkan degenerasi sel, bila hal ini terjadi dalam jangka waktu lama atau dosis yang lebih besar dapat terjadi nekrosis. Walaupun demikian menurut Robbins *et al* (1995) tubulus ginjal mempunyai daya regenerasi yang cukup besar, sehingga kerusakan sel tubulus akan diganti oleh sel baru yang terjadi karena pembelahan sel.

Hasil penelitian ini dapat dikatakan bahwa penggunaan alkaloid *Achyranthes aspera* linn dosis besar relatif aman. Karena dengan dosis yang besar yaitu 15 g/kg bb terbukti tidak menyebabkan kematian pada hewan coba sehingga termasuk kedalam golongan zat tidak berbahaya. Perubahan yang terjadi pada gambaran mikroskopis yaitu kongesti, degenerasi dan nekrosis masih dalam tahap ringan, dan bersifat reversibel jika penyebabnya dihilangkan, selain itu ginjal mempunyai daya regenerasi sel yang tinggi.

Dosis untuk pengujian LD₅₀ alkaloid *Achyranthes aspera* linn menggunakan dosis tinggi yakni 15 g/kgbb yang relatif tidak berbahaya karena tidak terjadi kematian. Lu (1995)

menyatakan jika dengan dosis yang besar ternyata tidak menimbulkan kematian dapat dianggap bahwa toksisitas akut bahan tersebut rendah, dan harga LD₅₀ tidak perlu ditentukan secara tepat, suatu angka perkiraan sudah dapat memberi manfaat. Dosis yang menyebabkan kematian 50% dari hewan percobaan (LD₅₀) sebesar lebih dari 15 gram/ kg bb alkaloid *Achyranthes aspera* linn. Sehingga dapat disimpulkan bahwa bahan alkaloid *Achyranthes aspera* linn termasuk bahan obat praktis tidak toksik, dan apabila digunakan dalam bentuk alkaloid maka menurut Loomis, T.A. (1978), alkaloid *Achyranthes aspera* linn termasuk ke dalam bahan obat tidak berbahaya.

5.6. Uji stabilitas alkaloid *Achyranthes aspera* linn

Uji stabilitas terhadap alkaloid *Achyranthes aspera* linn meliputi uji pemanasan langsung dengan pemanasan dalam air mendidih diatas 100 ° C selama 30 menit dan uji penyinaran dengan sinar ultra violet selama 90 hari. Dengan uji diatas diperoleh alkaloid *Achyranthes aspera* linn tidak menunjukkan perubahan terhadap warna alkaloid, dan tekstur/ bentuk alkaloid dan aktivitas farmakologi dari alkaloid *Achyranthes aspera* linn.



BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Alkaloid *Achyranthes aspera linn* menyebabkan kematian sel kanker melalui fragmentasi DNA dengan meningkatkan enzim caspase 9 dan caspase 3.
2. Uji toksisitas akut dan uji toksisitas kronis alkaloid *Achyranthes aspera linn* tidak menimbulkan kerusakan berupa kongesti, degenerasi dan nekrosis yang bermakna pada hati dan ginjal mencit.
3. Dosis yang menyebabkan kematian 50% alkaloid *Achyranthes aspera linn* pada mencit lebih dari 15 gram/ kg bb, hal ini menunjukkan alkaloid *Achyranthes aspera linn* termasuk bahan obat tidak berbahaya.
4. Alkaloid *Achyranthes aspera linn* merupakan bahan obat yang stabil terhadap suhu panas 100° C selama 30 menit dan penyinaran dengan sinar ultraviolet selama 90 hari.

Saran

1. Perlu dilakukan uji farmakokinetik alkaloid *Achyranthes aspera linn* untuk menentukan prosentase absorpsi setelah pemberian secara peroral, distribusi alkaloid ke jaringan payudara dan jaringan lainnya, serta metabolit biotransformasi dan ekresi alkaloid setelah memberikan respon di dalam tubuh.
2. Perlu dilakukan Isolasi dan identifikasi alkaloid daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) untuk mengetahui rumus kimia
3. Perlu dilakukan tahapan uji klinik alkaloid *Achyranthes aspera linn* sebagai obat antikanker payudara dalam berbagai fase uji yakni uji klinik fase satu sampai fase empat dengan melibatkan penderita kanker payudara.



DAFTAR PUSTAKA

- Ama dan Faisol, 2005. Masalah Kanker Payudara dan pemecahannya. *Majalah Kesehatan Masyarakat Indonesia*. Tahun XIX. Nomor 1 Maret. Jakarta.
- Anom D.P, Meles D.K and Wurlina. 2012. Alkaloid Fraction of Jarong (*Achyranthes aspera* linn) Leaf Induced Apoptosis Breast Cancer Cell Through p53 Pathway. *J. Advances in Natural and Applied Sciences*. Vol 6(2) : 124-127.
- Bogler O dan Mikkelson T.2005. Angiogenesis and apoptosis in glioma: two areas for promising new therapies. *J. Cell Biochem*. Vol 9 .p.16-24
- Choi S.H, S.Y.Lyu and W.B.Park. 2004. Mistietoe Lectin Induce Apoptosis and Telomerase Inhibition In Human A253 cancer Cells Through Dephosphorylation of Akt.Arc.Pharm Res. Jan 27(1)68-76.
- Freuhauff, Brem,H, Brem S.2006 In vitro drug Response and molecular markers associated drug resistance in malignant biliomas. *Clin Cancer Res*.Vol.12.p.4523-32
- Gao,X.Y; D.W.Wang and F.M. Li.2000. Determination of Ecdysterone in *Achyranthes Bidentata* and its Activity Promoting Proliferation of Osteoblast-Like Cell. *Yao Xue Xue Bao*. Nov;35(11): 868-70.
- Lantuejoul,S,J.C.Soria, D.Moro-Sibilot, L.Morat, S.Veyrenc, P.Lorilier, P.Y.Brichon, L.Sabatier, C.Brabilia and E.Brambilla.2004. Differential Expression of Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) in Lung Tumors. *J. Cancer Mar 22: 90(6): 1222 - 1229*.
- Klopfleisch, R (2013). Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the Evaluation of mouse model histopathology –a systematic review,*BMC Vet Res*,9,123.
- Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. 1981. Formulation and Application of a Numerical Scoring System for Assessing Histological Activity in Asymptomatic Chronic Active Hepatitis. *Hepatology*. 1(5):431-435
- Kresno.S.B. 2005. Disregulasi Apoptosis pada Keganasan. Telaah khusus pada astrocytome. *Symposium Apoptosis Charming to Death*. Jakarta. Desember. 9-10.
- Kocki J, J. Kolano, M.Cloch,A.Dmoszynsk and J. Wojclerowski. 2004. The Activity of Human Telomerase In The Cells of Acut Leukemia. *Folia Morphol*. Feb 83(1): 127-129.
- Koeman, J.H. 1987. *Pengantar Umum Toksikologi*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Loomis, T., 1978. *Essential of Toxicology*, 3rd edition, Lea & Febringer, Philadelphia, hal 195-235.



- Lu, F.C. 1995. *Asas, Organ Sasaran, dan Penilaian Resiko (Terjemahan)*. Edisi II. VI. Press. Jakarta, hal 85-100.
- Meles, D.K. 2004. Kandungan Bahan Pada Daun *Achyranthes aspera* Linn. Lab. Farmakologi. FK. Unair.
- Meles. D.K. 2007. Alkaloid *Achyranthes aspera* Linn Menyebabkan Nekrosis dan Apoptosis Sel Mieloma. *Media Kedokteran Hewan*. Vol. 23.1.
- Mitaine A.C; A.Marouf; B.Hanquet; N.Bilirakis; M.A.Lacaille. 2001. Two Triterpenoid and Saponin From *Achyranthes Aspera*.
- Robbins L.S., Kumar V., S. Rmzi, 2007. *Buku Ajar Patologi Robbins*, Ed.7, Vol. 2. Alih Bahasa: dr. Bramh U.P. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Roya G and P.S. Rao. 2000. Anticancer Compounds from Tissue Culture of Medical Plants. *J.of Herbs.Spices ang Medical Plants*. Vol 7(2):71-96.
- Tjahjadi dan Gunawan, 2006 *Patologi Tumor Ganas Payudara*. Bagian Patologi Anatomi. FKUI. Jakarta.
- Wurlina. 2005. The Influence of Antimitotic of *Achyranthes Aspera* Linn Extract in Embryonal Cleavage in Orde to Produce Post Coital Contraception. Celebration of 50th Anniversary of CATCM.. Development of Traditional Chine Medicine and People's health. Publishing House of Ancient Chine Medical Books. Beijing. China.
- Wurlina. 2006. Pengaruh Antimitosis *Achyranthes Aspera* Linn Pada Pembelahan Sel Embrio (*Cleavage*) Tikus. HAYATI. Journal og Biological Researches). Vol.11 No.2.
- Wurlina, W. Sastrowardoyo dan S. Zakaria. 2008. Efek Antitelomerase alkaloid *Achyranthes Aspera* Linn Terhadap Pembelahan Kromosom dan Induksi Apoptosis Pada Kultur Sel Mieloma. *Lemlit Unair*.
- Wurlina, Sastrowardoyo, W; Zakaria, S ; Meles, D.K.; Putra, MS dan Suwasanti, N. 2010. Aktivitas Alkaloid *Achyranthes aspera* L. Penyebab apoptosis pada sel kanker mammae. *Veterinaria medika* 3 : 169-176.
- Wurlina, Meles DK, Sastrowardoyo dan Zakaria S. 2010. The Activity of Alkaloid *Achyranthes aspera* Linn on Apoptotic and Necrotic Induction of Breast Cancer and Influenced on the Natural Killer Cells. *Media Kedokteran Hewan*. Vol 26 (1) : 1-7.
- Yalon M, S.Gal, Y.Segev and K.L.Skorecki. 2004. Sister Chromatid Separation at Human Telomeric Region. *J.Cell Sci*. Mar 23

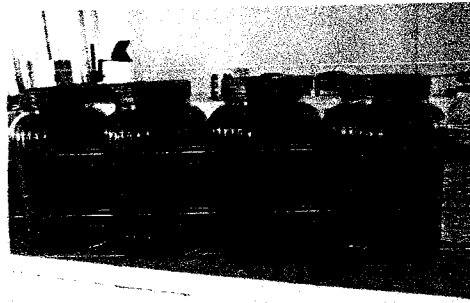
Lampiran 1. Personalia tenaga pelaksana

No	Nama/NIDN	Instansi Asal	Bidang Ilmu	Alokasi Waktu (jam/minggu)	Uraian Tugas
1.	Prof. Dewa Ketut Meles, MS, drh NIDN. 0013125402	FKH Unair	Kedokteran Hewan/ Farmakologi & Toksikologi, molekuler dan TIM	10 jam	Koordinator, membuat hewan coba menderita kanker payudara, pemeriksaan imunohistokimia
2.	Prof. Dr. Imam Mustofa, MKes, drh NIDN. 0027046003	FKH Unair	Kedokteran Hewan/ Reproduksi/ Molekuler	10 jam	Analisis data fragmentasi chromosom. Uji toksisitas, akut, kronis, stabilitas
3.	Prof. Dr. Wurlina, MS, drh NIDN. 0018095405	FKH Unair	Kedokteran Hewan/ Reproduksi dan TCM	10 jam	Diagnosa kanker payudara, pemeriksaan imunohistokimia hepar dan ginjal

Lampiran 2. *Achyranthes aspera* linn, ekstraksi dan fraksinasi



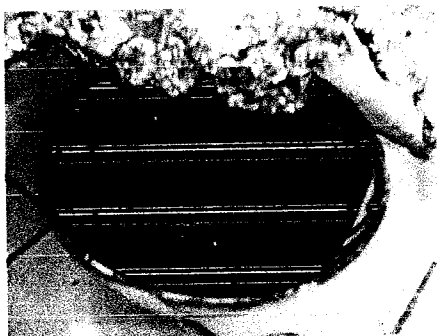
***Achyranthes aspera* linn (AAL)**



Serbuk AAL dalam etanol asam



Ekstraksidan fraksinasi

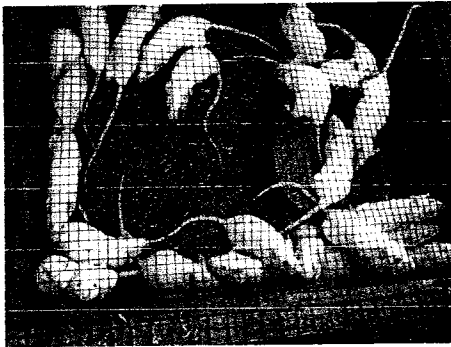


Alkaloid *Achyranthes aspera* linn

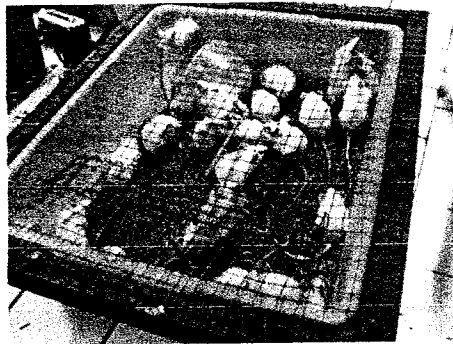


Larutan AAL

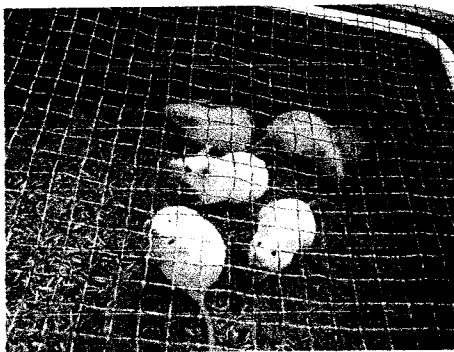
Lampiran 3. Hewan coba dikelompokkan dan diimbang berat badannya



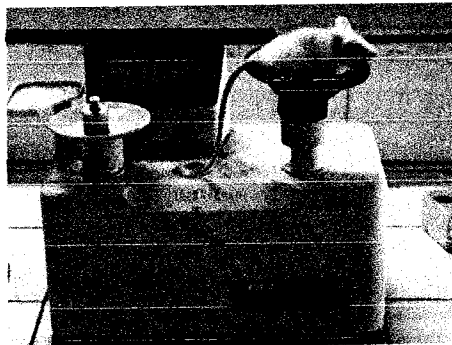
Hewan coba



Hewan coba

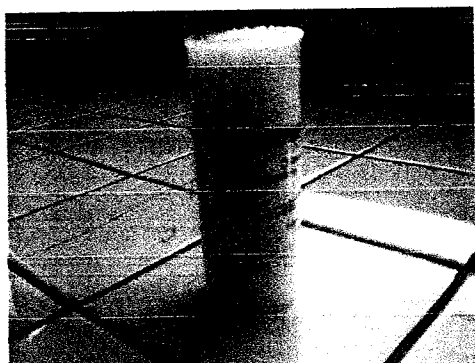


Hewan coba dikelompokkan



Hewan coba ditimbang

Lampiran 4. Membuat hewan coba mencit menderita kanker payudara



Benzopirine



Penyuntikan benzopirine



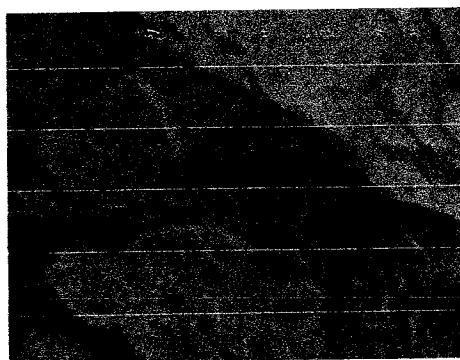
Nodul pada payudara mencit



Nodul pada payudara mencit



Proliferasi payudara mencit



Proliferasi payudara mencit

Lampiran 5, Pemberian obat, pengambilan darah dan kanker payudara



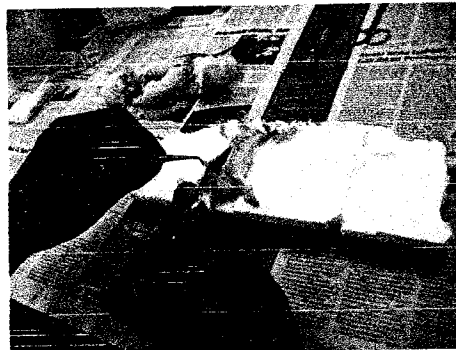
Pemberian obat



Melibatkan mahasiswa



Pengambilan darah



Pengambilan payudara, hati dan ginjal mencit

The PHILIPPINE JOURNAL OF
Veterinary Medicine

Volume 55

Special Issue

December 2018

**Published by the College of Veterinary Medicine
University of the Philippines Los Baños**

ISSN 0031-7705



The 2nd Veterinary Medicine
International Conference
Surabaya, Indonesia
4-5 July 2018

The Philippine Journal of Veterinary Medicine

Volume 55

Special Issue

December 2018

The Philippine Journal of Veterinary Medicine is a peer-reviewed international journal of basic and applied research in veterinary medicine and science. It is published semi-annually, for the periods January-June and July-December each year, by the College of Veterinary Medicine, University of the Philippines Los Baños. All articles are subjected to double-blind review.

Authors of articles appearing in the journal are solely responsible for opinions expressed therein.

All rights reserved. No article of the journal may be reproduced in any form and by any means without a written permission from the publisher or the Editor-in-Chief.

EDITORIAL BOARD:

Jezie A. Acorda, DVM, MAgr, PhD
Editor-in-Chief

Dennis V. Umali, DVM, PhD
Associate Editor

Joseph F. dela Cruz, DVM, MS, PhD
Remil L. Galay, DVM, PhD
Technical Editors

Jesalyn L. Constante, DVM, MS
Business Manager

SUPPORT STAFF:

Ms. Jocelyn E. Arcinas
Mr. Fernando P. Micos

The annual subscription price is US\$100.00 (net) for foreign subscribers (inclusive of mailing cost) and Philippine PhP1,500.00 plus mailing cost for local subscribers. Prices for current single issue and back issues are available on request. Subscriptions are accepted on a prepaid basis only and are entered on a calendar year basis. Issues are sent by air delivery to foreign subscribers.

All communications should be addressed to:

The Editor-in-Chief

Philippine Journal of Veterinary Medicine

College of Veterinary Medicine

University of the Philippines Los Baños

Laguna, Philippines 4031

Telefax Nos. +63-49-536-2727, +63-49-536-2730

Email: pjvm1964@gmail.com, vetmed_uplb@yahoo.com.ph

This journal is Abstracted/Indexed by: SCOPUS, Biological Abstracts, Focus on: Veterinary Science & Medicine, Zoological Records, CAB Abstracts, Index Veterinarius, Veterinary Bulletin, Parasitology Database, Helminthological Abstracts, Protozoological Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology, EBSCO, ASEAN Citation Index, Prescopus Russia, *i-journals* (www.ijournals.my), *i-focus* (www.ifocus.my), *i-future* (www.ifocus.my), Philippine E-Journals (<https://ejournals.ph>) and UPLB Journals Online (<http://journals.uplb.edu.ph/index.php/PJVM>).

© 2018 College of Veterinary Medicine, University of the Philippines Los Baños

The Philippine Journal of Veterinary Medicine

Volume 55

Special Issue

December 2018

CONTENTS

Original Articles

Medicine

- Viability of Rabbit Adipocyte Stem Cells Cultured Under Different Oxygen Concentrations *In Vitro*.....1
E Safitri, P Srianto, TV Widiyatno, W Sandhika and RH Prasetyo

Microbiology

- Antigenic Site of Glycoprotein Encoding Gene in Rabies Virus Isolate from Indonesia.....9
J Rahmahani, S Suwarno and FA Rantam
- Characterization of Newcastle Disease Virus Lentogenic Strain Infected Native Chickens from Surabaya, Indonesia.....17
FA Rantam, R Ernawati, AP Rahardjo, IL Rahmawati, D Kartika, NS Widjaja and J Rahmahani

Nutrition

- Effect of Concentrate to Forage Ratio on Milk Urea Nitrogen, Milk Production and Reproductive Performance of Dairy Cows.....25
S Utama, S Mulyati, W Wurlina and I Mustofa

Pathology

- Toxicity, Stability and Renal Histopathology of Alkaloid of Jarong (*Achyranthes aspera* Linn.) (Caryophyllales: Amaranthaceae) Leaf on Mice.....35
DK Meles, W Wurlina, I Mustofa, S Zakaria, A Basori, M Hariadi, E Safitri, DKSC Putri and N Suwasanti
- Histochemical Expression of Transforming Growth Factor Beta and Tumor Necrosis Factor Alpha in Rabbits Infected with *Sarcoptes scabiei*.....43
SM Rizki, LT Suwanti and NDR Lastuti

Pharmacology

- Effect of Alkaloid of *Achyranthes aspera* Linn. (Caryophyllales: Amaranthaceae) on Increasing Caspase 9, Caspase 3 and Apoptosis in Mice with Breast Cancer.....51
W Wurlina, DK Meles, I Mustofa, E Safitri, S Zakaria, A Basori, DKSC Putri and N Suwasanti

Theriogenology

- Effect of Aluminum Silicate on the Spermatozoa, Plasma Membrane and Seminiferous Tubules of Mice Exposed to *Fusarium graminearum* (Sordariomycetes: Hypocreales: Nectriaceae).....59
Samik, S Mulyati, T Hernawati and E Safitri

Research Notes

Microbiology

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from the Digestive Tract of Kampung Chicken (*Gallus gallus domesticus*).....67
B Yulianto, WP Lokapirnasari

In Vitro pH Tolerance, Bile Salt Resistance and Antimicrobial Activity of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Crossbred Cattle.....73
WP Lokapirnasari, AM Sahidu, L Maslachah, K Soepranianondo, AB Yulianto, D Afkasari, TB Pribadi and I Hariyati

Nutrition

Amino Acid Sequence of Signal Transducers and Activators Transcription Proteins From Broilers.....79
A Ma'ruf, NMR Widjaja, N Hidajati and R Damayanti

Parasitology

Antigenic Protein Profile of *Anisakis* spp. Larvae Isolated from Mackerel Tuna Fish (*Euthynnus* sp.).....85
ZN Wastomi, NDR Lastuti, R Ernawati, LT Suwanti, S Koesdarto, M Mufasirin and HM Raharjo

Morphological Detection of the Intestinal Parasite *Blastocystis* sp. in Fresh and Cultured Feces of Pet Sugar Glider (*Petaurus breviceps*) in Surabaya, Indonesia.....91
F Natalia, LT Suwanti, E Suprihati, Kusnoto, S Koesdarto and P Srianto

Pathology

Comparative Histopathologic Changes in Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) Skin in Relation to Degree of Infestation with *Sarcoptes scabiei*.....97
A Azhimah, NDR Lastuti, A Arimbi, D Legowo, P Hastutiek and LR Yustinasari

Pharmacology

Effect of Sapogenin from Sambiloto (*Andrographis paniculata*) (Lamiales: Acanthaceae) on Creatinine and BUN Levels and on Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats.....103
S Zakaria, W Wurlina, DK Meles, I Mustofa, M Hariadi, S Susilowati, E Safitri, A Basori, DKSC Putri and N Suwasanti

Public Health

Identification of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Raw Milk Samples from Dairy Cows in Surabaya, Indonesia.....109
MH Effendi, N Harijani, SM Yanestria and P Hastutiek

Tetracycline Resistance Gene in *Streptococcus agalactiae* Isolated from Bovine Subclinical Mastitis in Surabaya, Indonesia.....115
MH Effendi, A Oktavianto and P Hastutiek

Theriogenology

Bacterial Isolates from the Cervical Mucus of Dairy Cattle at Follicular and Luteal Phases.....121
K Sudrajad, SP Madyawati, W Tyasningsih, R Rimayanti, P Srianto and OS Widodo

Human Chorionic Gonadotropin (hCG) from Urine of Pregnant Women for <i>In Vitro</i> Maturation of Madura Cattle Oocytes.....	127
<i>HA Hermadi, RTS Adikara, M Hariadi and E Safitri</i>	
Effect of Bovine Seminal Protein on the Quality of Frozen Spermatozoa from Goats.....	133
<i>S Susilowati, IN Triana, TW Suprayogi, A Arimbi and W Wurlina</i>	
Editorial Policies.....	139
Guidelines for Authors.....	141

ORIGINAL ARTICLE**TOXICITY, STABILITY AND RENAL HISTOPATHOLOGY OF ALKALOID OF JARONG (*Achyranthes aspera* Linn.) (CARYOPHYLLALES: AMARANTHACEAE) LEAF ON MICE**

Dewa Ketut Meles¹, Wurlina Wurlina¹, Imam Mustofa¹, Sunarni Zakaria², Achmad Basori², Mas'ud Hariadi¹, Erma Safitri¹, Desak Ketut Sekar Cempaka Putri² and Niluh Suwasanti²

¹Faculty of Veterinary Medicine; ²Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, East Java, Indonesia

ABSTRACT

The aim of this research was to conduct toxicity tests, both acute and chronic, to determine the lethal dose (LD50) of the alkaloid of jarong leaf (*Achyranthes asperara*) and characterize histopathologic renal damage on mice (*Mus musculus*) in terms of congestion, degeneration and necrosis. Acute toxicity test was performed for 24 h on thirty 3-month old adult female mice, divided randomly into six groups, while chronic toxicity test was done for 90 days using 60 adult female mice, divided into two groups. Results showed that acute toxicity test at 15 g/kg bw did not cause death in rats and, overall, no major or irreversible histopathological changes were found in renal organs, suggesting that *Achyranthes asperara* alkaloid can be considered a non-hazardous substance. Direct heating stability test with UV rays and heating test with boiling water suggested no changes in the alkaloid's color, texture/shape and pharmacological activity.

Key words: *Achyranthes aspera*, degeneration, kidney, mice, necrosis, toxicity

Philipp. J. Vet. Med., 55(SI): 35-42, 2018

INTRODUCTION

One of the plant-derived anticancer drugs being used today is *Achyranthes aspera* Linn. The World Health Organization (WHO) has approved the use of traditional medicines from plants, especially from tropical plants, due to their availability, low production costs and minimal side effects. *A. aspera* leaf extract has antimitotic effect and has been proven to inhibit the development of mice and rat embryo cells (Wurlina, 2006). Its alkaloid has been shown to promote antimitotic and antitelomeric activities in P3UI mice myeloma cells at metaphase stage. This is associated with its ability to bind tubulin, a protein

that makes microtubules, by inhibiting or blocking the polymerization of proteins into microtubules, resulting to its disruption, and eventually leading to cell death or apoptosis (Wurlina, 2005; Wurlina, 2006; Meles, 2007; Wurlina *et al.*, 2008).

Apoptosis may occur due to mitochondrial damage. Mitochondria are responsible for protein and fat syntheses as well as in cell oxidation and reduction in producing ATP. Molecular approach indicates that mitochondrial damage can lead to increased synthesis of cytochrome c, which stimulates formation of apoptotic protease-activating factor 1 (APAF-1) and apoptosome, which cause the PT pore to open. This induces the caspase initiator, caspase 9, to activate the

*FOR CORRESPONDENCE:

(email: dewa.meles@yahoo.co.id)

caspase executor, caspase 3, and produce excessive DNase, leading to chromosomal fragmentation and cell death (Lantuejoul *et al.*, 2004; Wurlina *et al.*, 2010; Andyana *et al.*, 2012).

Acute toxicity tests are mainly designed to determine the median lethal dose (LD_{50}). However, this becomes unnecessary to determine accurately when the acute toxicity is low. Acute toxicity test may show damaged target organ and their specific toxic effects (Kacew and Lee, 2018). Renal organ was selected as the target organ because it has vital and complex functions in the body through regulating the balance of water and electrolytes, osmolality and concentration of body fluids and electrolytes, balance of acids and bases, excretion of metabolic waste products and foreign chemicals (drugs and toxic substances), artery pressure, secretion of hormones, and gluconeogenesis. Toxic substances or drugs can lead to renal system malfunction. Thus, it is imperative to determine drug dosage limit to ensure safety in humans (Koeman, 1987).

This study hypothesizes that long-term application of *A. aspera* at a dosage of no more than 15 g/kg bw cannot induce significant histopathologic changes in renal organs of rats. Likewise, it is deemed to have stable physical properties and pharmacological activity.

Research on *A. aspera* alkaloid considered it as an anti-cancer substance, making it necessary to investigate its safety limits through acute and chronic toxicity tests on the renal organs by determining the median lethal dose (LD_{50}) and its stability.

MATERIALS AND METHODS

A. aspera alkaloid dose

The maximum effective dose of *A. aspera* alkaloid as an anti-cancer agent is 100 mg/kg body weight in mice. In acute toxicity test, median lethal dose (LD_{50}) was performed (but unnecessary when acute toxicity is low). Functional or pathological changes to the renal organs were also noted within 24 h. Drug dosage was initiated from effective dose that gives maximal effect, killing more than

50% of lab animals, *i.e.*, 100 mg or 0.1 g/kg up to 15 g/kg, divided into 5 increasing dosage and 1 treatment group (Loomis, 1978). After that, another 5 stages of minimal dosage were done. Chronic toxicity test was performed to determine the functional and pathological changes to the renal organs within a medication period of at least 90 days. Dose used is the effective dose, capable of giving the maximum effect, *i.e.* 0.1 g/kg body weight of the rat.

Acute toxicity test

Dose that will induce 50% death (LD_{50}) in lab mice was identified and performed for 24 h to ensure safety of *A. aspera* alkaloid. Sixty female mice (*Mus musculus*) were equally divided into six groups and each received the same oral treatment for 24 h: Control group (T0) was given only 1 ml distilled H_2O orally. Treatments, T1, T2, T3, T4 and T5 were given *A. aspera* alkaloid doses of 0.1, 0.3, 1, 10 and 15 g/kg body weight, respectively.

The number of deaths in each treatment was noted, and groups that failed to manifest signs of death and physiological changes were observed for 14 days for changes in weight, appetite and early signs of toxicity, such as diarrhea, nausea, convulsion and shortness of breath. Afterwards, all deaths were counted, LD_{50} was determined and renal histopathology was done to characterize the extent of damage to the renal organs in terms of congestion, degeneration and necrosis.

Chronic toxicity test

A. aspera alkaloid dose used in the chronic toxicity test is the effective dose that produced the maximum results, based on early studies that used a daily dose of 100 mg/kg body weight for at least 90 days. Sixty female mice were divided into two groups, where each received the same treatment orally for 90 days. Control group (T0) was given only 1 ml distilled H_2O , while treatment 1 (T1) was given *A. aspera* dose of 1 g/kg body weight.

Observations on physiological changes were performed weekly, specifically on respiratory and cardiovascular function changes, signs of diarrhea, nausea, convulsion and occurrence of death within 90 days of

administration. Subsequently, all mice were sacrificed to examine the renal organs for signs of renal damage, such as congestion, degeneration and necrosis. Determination of pathological and microscopic changes (Table 1) was based on renal histopathology scoring method by Klopffleisch (2013).

Data analysis

Histopathological images of changes in the renal organs of mice were analyzed using Kruskal-Wallis test, a non-parametric

statistic test, since the data were obtained based on scoring values. Presence of significant differences necessitated multiple comparison test (Z-test, $z=0.05$). LD_{50} was obtained from acute toxicity test.

Alkaloid stability

Stability test of the alkaloid includes direct heating test with UV rays for seven days and direct heating test in boiling water above 100°C for 30 min. Observed parameters were changes in color, texture, shape and pharmacological activity of the alkaloids.

Table 1. Renal histopathology scoring method based on Klopffleisch (2013).

Damage	Score	Histopathologic changes
Degeneration of tubular epithelium	0	no degeneration in the field of view
	1	<25% of degeneration in the field of view
	2	26-50% of degeneration in the field of view
	3	51-75% of degeneration in the field of view
	4	>76% of degeneration in the field of view
Necrosis of tubular epithelium	0	no necrosis in the field of view
	2	<25% of necrosis in the field of view
	4	26-50% of necrosis in the field of view
	6	51-75% of necrosis in the field of view
Necrosis of glomerulus	0	no necrosis in the field of view
	3	<25% of necrosis in the field of view
	5	26-50% of necrosis in the field of view
	7	51-75% of necrosis in the field of view
Glomerular infiltration	0	no inflammatory cells in the field of view
	1	<25% of inflammatory cells in the field of view
	2	26-50% of inflammatory cells in the field of view
	3	51-75% of inflammatory cells in the field of view
	4	>76% of inflammatory cells in the field of view

RESULTS AND DISCUSSION

Histological changes on renal cells of mice after alkaloid treatment for 24 h are shown in Table 2. Microscopic examination through five different fields of view on each preparation of renal cells shows no significant difference ($\alpha>0.05$) on histological changes between control and treatment groups (Fig. 1). This means that mice given *A. aspera* alkaloid at all

doses (0.3, 1, 3, 10 and 15 g/kg body weight) for 24 h showed normal renal cells, although there were a number of mice whose renal cells showed signs of congestion, degeneration and mild necrosis. Similarly, histological changes for chronic toxicity test also did not show toxic effect on renal cells but showed signs of congestion, degeneration and mild necrosis (Table 3 and Fig. 2).

Data on histological changes from acute

Table 2. Mean scores of renal histopathologic changes in mice 24 h after treatment with *A. aspera*.

Treatment	Congestion/infiltration	Degeneration	Necrosis
T0	0.23±0.196 ^a	0.21±0.168 ^a	0.20±0.147 ^a
T1	0.21±0.161 ^a	0.22±0.173 ^a	0.23±0.157 ^a
T2	0.22±0.145 ^a	0.23±0.117 ^a	0.24±0.179 ^a
T3	0.20±0.183 ^a	0.24±0.147 ^a	0.22±0.204 ^a
T4	0.21±0.206 ^a	0.22±0.157 ^a	0.22±0.190 ^a
T5	0.22±0.178 ^a	0.23±0.137 ^a	0.22±0.184 ^a

Means with different superscript letters in one column differ significantly ($\alpha > 0.05$). T0: given only 1 ml dH₂O; T1: given 0.1 g/kgbw *A. aspera* alkaloid; T2: given 0.3 g/kgbw *A. aspera* alkaloid; T3: given 1 g/kgbw *A. aspera* alkaloid; T4: given 10 g/kgbw *A. aspera* alkaloid; and T5: given 15 g/kgbw *A. aspera* alkaloid.

Table 3. Mean scores of renal histopathologic changes in mice 90 days after treatment with *A. aspera*.

Treatment	Congestion/infiltration	Degeneration	Necrosis
T0	0.23±0.220 ^a	0.23±0.179 ^a	0.23±0.190 ^a
T1	0.24±0.217 ^a	0.24±0.192 ^a	0.22±0.204 ^a

T₀: given only 1 ml dH₂O; T₁: given 0.1 g/kgbw *A. aspera* alkaloid

toxicity tests analyzed by Kruskal-Wallis test showed no apparent difference between treatment groups, so it was unnecessary to proceed with multiple comparison test (Z-test). However, it can be noted that some mice showed signs of congestion, *e.g.*, blood concentration in a blood vessel. Congestion is the accumulation of blood or an increase in blood volume in dilated vessels due to nerve stimulation of vasodilators or vasoconstrictor paralysis in certain sections (Price and Wilson, 1985). Congestion occurs when the blood flowing in the vessels is blocked, when there is obstruction in small or large blood vessels or when blood accumulates in capillaries and veins. This can be evident in tissues that appear blue due to low levels of oxygen. If severe congestion persists due to toxic substances, this can lead to acute renal congestion and necrosis (Kumar *et al.*, 2005).

Furthermore, degeneration in renal cells was also noticeable, characterized by swollen and murky cells. Glomerulus plays a critical role in renal cells as it forms ultrafiltrate plasma

and releases it into the tubular segment. This increases the glomerulus' permeability, stimulating reabsorption of nutrients into the tubular epithelium and degenerating the epithelium cells (primary nephrosis) due to the tubular epithelium secretory function that reabsorb and secrete toxic substances. Cell degeneration, however, is reversible since it only damages the cytoplasm but not the nucleus (Kumar *et al.*, 2005).

Degeneration is usually caused by damage to the mitochondria. Mitochondrial damage affects ATP formation, thus disrupting critical transfer cell processes, one of which is the Na⁺ pump mechanism. This mechanism is key to maintaining osmotic pressure in the cell. When the cell fails to pump sufficient Na⁺ ions out of the cell, this leads to swelling. However, this change is not too evident under the microscope as it only causes minimal cell enlargement and change in structural arrangement (Price and Wilson, 1995).

There are different types of degeneration based on severity: cloudy swelling, wherein

A



B

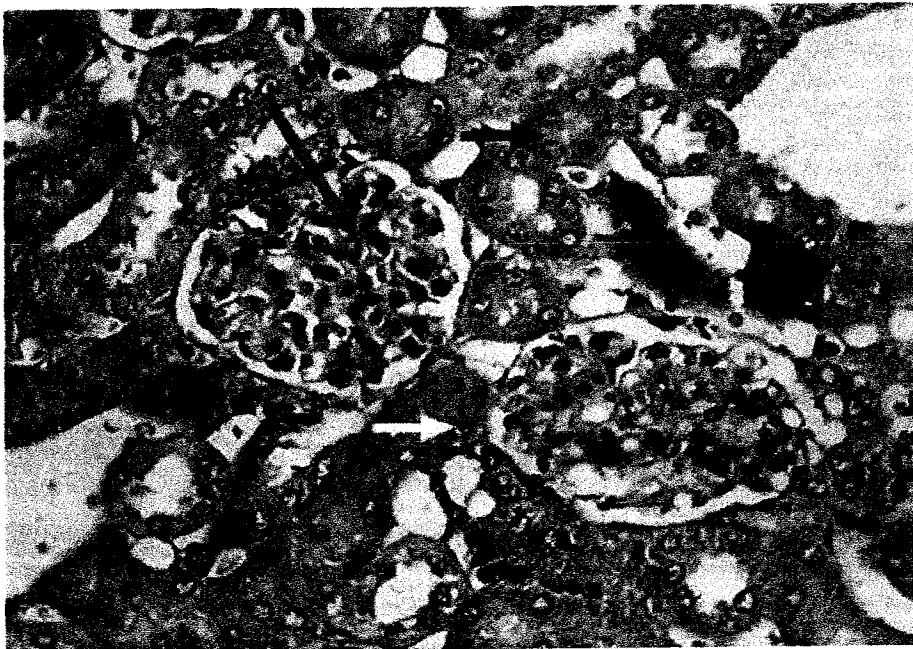


Fig. 2. Microscopic appearance of renal cells in mice after 90-day treatment with *A. aspera* alkaloid. (Black arrow) tubular epithelial cells, (red arrow) glomerulus, (yellow arrow) degeneration of tubular epithelial cells. A: T0 (given only 1 ml distilled H₂O) during 90 days; B: T1 (given 0.1 g/kg body weight *A. aspera* alkaloid) during 90 days.

TOXICITY OF JARONG LEAF *A. aspera* ON MICE

39

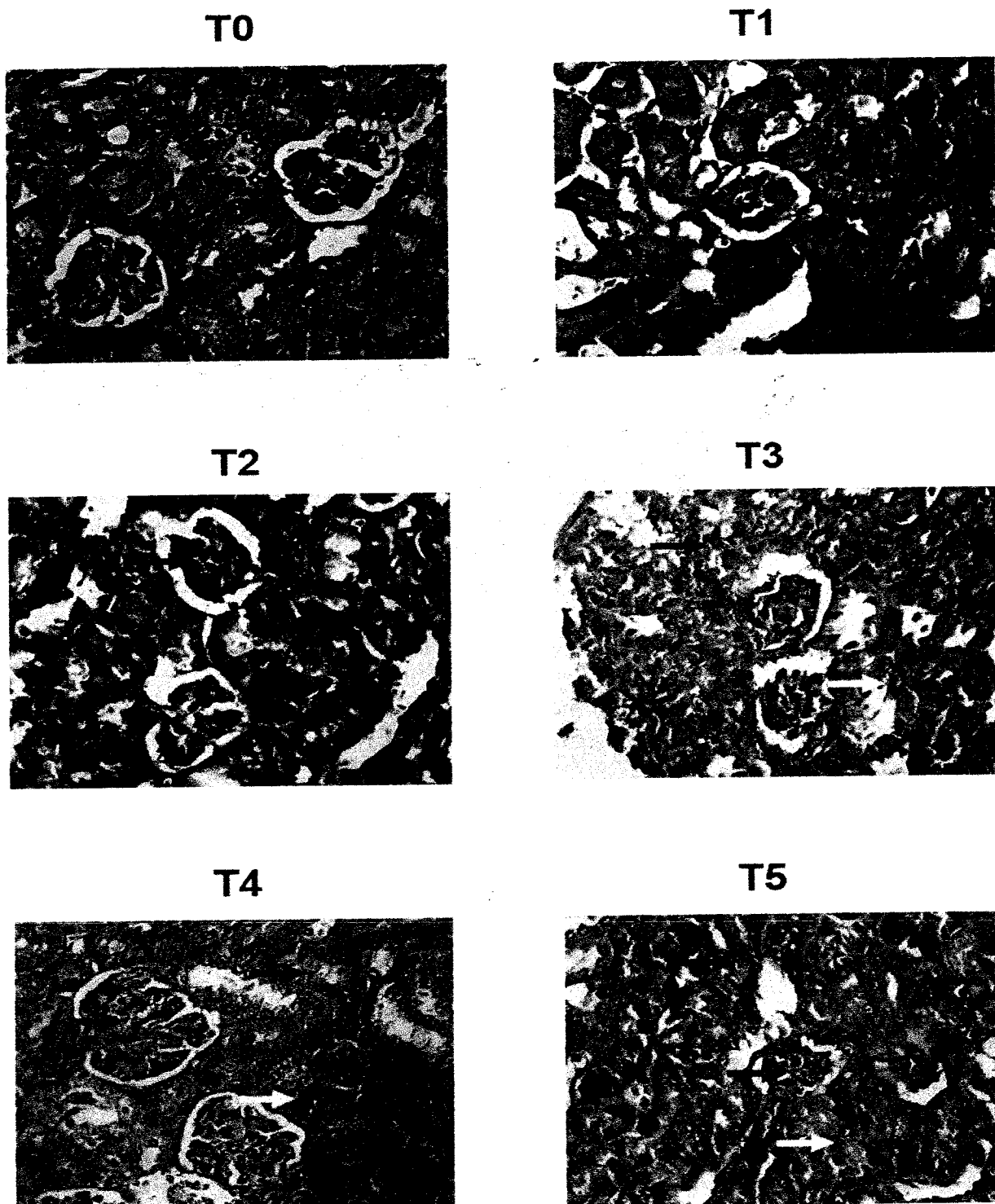


Fig. 1. Microscopic appearance of renal cells in mice after 24-h treatment with *A. aspera* alkaloid. (Black arrow) tubular epithelial cells, (red arrow) glomerulus, (yellow arrow) degeneration of tubular epithelial cells). T0: given only 1 ml dH₂O; T1: given 0.1 g/kgbw *A. aspera* alkaloid; T2: given 0.3 g/kgbw *A. aspera* alkaloid; T3: given 1 g/kgbw *A. aspera* alkaloid; T4: given 10 g/kgbw *A. aspera* alkaloid; and T5: given 15 g/kgbw *A. aspera* alkaloid.

the cells accumulate water and metabolites in the cytoplasm; hydropic degeneration happens when the cells gain more water and metabolites, forming vacuoles in the cytoplasm; and fat degeneration occurs when cells accumulate fat in the cytoplasm (Kumar *et al.*, 2005).

Another form of renal damage is necrosis, manifested as condensed dark-colored nucleus. Necrosis was observed in its pyknotic stage (early stage), and based on statistical test, there was no significant difference between the control and treatments, suggesting that the alkaloid caused only mild necrosis. Determination of cell death can only be confirmed by duration and type of necrosis, including pyknosis, karyorrhexis and karyolysis. Pyknosis is marked by condensation of the chromatin and a non-recognizable nucleus, *i.e.*, nucleus appears black and more condensed. Karyorrhexis is defined by fragmented nucleus, and the cytoplasm starts to elongate and turn dark when stained. Karyolysis occurs when the nucleus starts to disappear until it cannot be seen under the microscope, and the cell elongates and appears obscure after staining (Himawan, 1994).

The renal system only comprises about 1% of the body weight, but it can accept about 20% of cardiac output. Renal blood flow is distributed to the cortex by arterial branches to glomerulus attached to the tubular cells. Glomerulus functions as a filter and 'container' for excretion and excess water. It has a higher capacity to bind chemical substances, because during the filtration process, toxic substances are absorbed passively into tubular cells when the coefficient of lipid is high. Toxic substances then stay in the tubular lumen and are released as polar compounds (Kacew and Lee, 2018).

Koeman (1987) stated that the renal system is susceptible to the effects of toxic substances. When a toxic substance is in the blood flowing into the renal organ, glomerulus cells come into contact with the toxic substances, which cause the cells to degenerate and die (necrosis). Toxic substances that infiltrate the glomerulus are reabsorbed by the tubular cells and cause degeneration, leading to necrosis if

this persists or when it is exposed to higher doses. Nevertheless, renal tubular cells can regenerate, such that damaged cells can be replaced by new ones (Kumar *et al.*, 2005).

This study shows that mice were kept alive even at a dose of 15 g/kg body weight, suggesting that a high dose of *A. aspera* alkaloid is relatively safe. Minimal damage, even reversible ones, was limited to congestion, degeneration and mild necrosis. This can be attributed to high regeneration capacity of renal organs.

Median lethal dose (LD₅₀) of *A. aspera* alkaloid was as much as 15 g/kg body weight, which can be considered relatively harmless. Kacew and Lee (2018) stated that the higher the dose, the lesser the amount of toxin and lesser occurrence of death. Furthermore, LD₅₀ level need not be precisely determined when it can be sufficiently approximated.

A. aspera alkaloid is considered as practically non-toxic. Based on heating test, no changes were observed in terms of color, texture/shape and pharmacological activity of the alkaloid. This result is in agreement with the study of Loomis (1978) which classified the alkaloid as a non-hazardous substance.

Overall, this study illustrates no major or irreversible histopathological changes found in renal organs of mice after toxicity tests, suggesting that *Achyranthes aspera* alkaloid can be considered as a non-hazardous substance. Direct heating stability test with UV rays and heating test with boiling water suggested no changes in the alkaloid's color, texture/shape and pharmacological activity.

REFERENCES

- Andyana DPA, Meles IDK and Meles W. 2012. Alkaloid fraction of jarong (*Achyranthes aspera* Linn) leaf induced apoptosis breast cancer cell through p53 pathways. *Advances in Natural and Applied Sciences* 6(2): 124-127.
- Himawan S. 1994. *Patologi*. Yogyakarta: Indonesia University Press.
- Kacew S and Lee BM. 2018. *Lu's Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs, and Risk Assessment* (6th ed.). CRC Press.
- Klopfleisch R. 2013. Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology—a systematic review. *BMC Veterinary Research*

- 9(1): 123.
- Koeman JH. 1987. *Introduction to General Toxicology*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Kumar V, Abbas AK and Fausto N. 2005. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease* (7th ed.). USA: Elsevier.
- Lantuejoul S, Soria JC, Moro-Sibilot D, Morat L, Veyren S, Lorimier P, Brichon PY, Sabatier S, Brambilla C and Brambilla E. 2004. Differential expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in lung tumours. *British Journal of Cancer* 90(6): 1222-1229.
- Loomis T. 1978. *Essentials of Toxicology* (3rd ed.). Philadelphia: Lea and Febiger.
- Meles D, Wurlina and Andyana DPA. 2017. Measurement of alkaloids *Achyranthes aspera* Linn level using thin layer chromatography method and high-performance liquid chromatography. *KnE Life Sciences* 3(6): 378-385.
- Meles DK. 2007. Alkaloid *Achyranthes aspera* Linn causes necrosis and apoptosis in myeloma cells. *Veterinary Medicine* 23(1): 61-67.
- Meles W. 2005. *The Antimitotic Effect of Achyranthes aspera Linn Extract in Embryonal Cleavage to Induce Post Coital Contraception*. Publishing House of Ancient China Medical Books.
- Price SA and Wilson LM. 1995. *Pathophysiology of Clinical Concept - Epidemiology of Disease - Jakarta*: EGC Medical Book Publisher.
- Wurlina W, Sastrowardoyo W and Zakaria S. 2008. The antitelomeric effect of alkaloid *Achyranthes aspera* Linn in chromosome division and apoptotic induction in myeloma cell culture. *Lemlit Unair*.
- Wurlina, Meles DK, Sastrowardoyo W and Zakaria S. 2010. The role of *Achyranthes aspera* Linn alkaloid in inducing apoptosis and necrosis in breast cancer cells and its influence on natural killer cells. *Media Kedokteran Hewan* 26(1): 1-7.
- Wurlina, Zakaria S, Meles DK, Putra DMS and Suwasanti N. 2010. The role of *Achyranthes aspera* L. alkaloid in inducing apoptosis in breast cancer cells. *Veterinaria Medika* 3: 169-176.
- Wurlina. 2006. The effect of antimitotic *Achyranthes aspera* Linn in embryonic cell division (cleavage) in mice. *Journal of Biological Researches* 11(2): 161-166.

