

Kesehatan

**LAPORAN  
HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL  
TAHUN ANGGARAN 2010**



**AKTIVITAS ALKALOID *ACHYRANTHES ASPERA* LINN  
PENYEBAB APOPTOSIS DAN PRAGMENTASI DNA  
PADA SEL KANKER MAMAE MELALUI EKSPRESI  
CASPASE 3 (*CASPASE EXECUTOR*)**

Tim Peneliti :

Prof. Dr. Wurlina, drh, MS  
Sunarni Zakaria, MKes., dr.  
Widayat Sastrowardoyo, SpFK, dr.

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional sesuai dengan surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian Strategis Nasional Tahun 2010. Kontrak nomor : 509/SP2H/PP/DP2M/VII/2010  
Tanggal 24 Juli 2010

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2010**



**LAPORAN  
HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL  
TAHUN ANGGARAN 2010**



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

kk  
kcc  
LP.158/11  
x/ur  
01

**AKTIVITAS ALKALOID *ACHYRANTHES ASPERA* LINN  
PENYEBAB APOPTOSIS DAN PRAGMENTASI DNA  
PADA SEL KANKER MAMAE MELALUI EKSPRESI  
*CASPASE 3 (CASPASE EXECUTOR)***

Tim Peneliti :

Prof. Dr. Wurlina, drh, MS  
Sunarni Zakaria, MKes., dr.  
Widayat Sastrowardoyo, SpFK, dr.

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional sesuai dengan surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian Strategis Nasional Tahun 2010. Kontrak nomor : 509/SP2H/PP/DP2M/VII/2010  
Tanggal 24 Juli 2010

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2010**



## HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul : **AKTIVITAS ALKALOID *ACHYRANTHES ASPERA* LINN  
PENYEBAB APOPTOSIS DAN PRAGMENTASI DNA  
PADA SEL KANKER MAMME MELALUI EKSPRESI  
CASPASE 3 (*CASPASE EXECUTOR*)**

## 2. Ketua Peneliti

- a. Nama lengkap : Prof. Dr. Wurlina,MS,Drh.  
b. Jenis Kelamin : Perempuan  
c. N I P : 131 257 033  
d. Jabatan Fungsional : Pembina Utama /IV-b  
e. Jabatan Struktural : -  
f. Bidang Keahlian : Reproduksi dan *Traditional China Medicine* (TCM)  
f. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan /Departemen Reproduksi  
g. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

## Tim Peneliti

No	Nama Peneliti	Bidang Keahlian	Fakultas/Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Prof.Dr.Wurlina,MS,Drh	Reproduksi dan TCM	FKH/ Reproduksi	Unair
2.	Sunarni Zakaria, MKes,dr	Farmakologi dan toksikologi serta TCM	FK/ Farmakologi	Unair
3.	Widayat Sastrowardoyo, SpFK,dr	Farmakologi dan toksikologi serta TCM	FK/ Farmakologi	Unair

## 3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 Tahun  
b. Biaya yang diusulkan : Rp. 100.000.000,-  
c. Biaya yang disetujui tahun 2010 : Rp. 87.500.000,-

Surabaya, Nopember 2010

Ketua peneliti,

Prof.Dr.Wurlina,MS,Drh.  
NIP. 131 257 033

Mengetahui  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga

Prof. Hj. Romziah Sidik, PhD, Drh.  
NIP. 130 687 305

Mengetahui  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Universitas Airlangga



Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si  
NIP. 1959085198711001

## RINGKASAN

**AKTIVITAS ALKALOID *ACHYRANTHES ASPERA LINN* PENYEBAB APOPTOSIS DAN PRAGMENTASI DNA PADA SEL KANKER MAMAE MELALUI EKSPRESI CASPASE 3 (*CASPASE EXECUTOR*)**

Wurlina, S. Zakaria dan W. Sastrowardoyo

*Achyranthes aspera linn* yang dikenal dengan nama jarong, remek getih atau pulutan secara empirik telah digunakan oleh masyarakat untuk mengobati penyakit kanker terutama kanker payudara dan kanker uterus.. Telah dibuktikan secara ilmiah fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera linn* menyebabkan kematian sel kanker (apoptosis), diduga peran sitokrom C mitokondria yang menstimulasi caspase-9 (caspase inisiator) akan merangsang terbentuknya caspase 3 (*caspase executor*) berakibat fragmentasi DNA sel kanker. Sebagai obat antikanker perlu dibuktikan secara *in vivo* bahwa fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera linn* dapat membunuh sel kanker mammae secara apoptosis melalui expresie caspase 3 (*caspase executor*) yang berakibat fragmentasi DNA tetapi dapat melindungi sel normal.

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit betina berumur 2 bulan sebanyak 60 ekor yang dibuat menderita kanker mammae dengan menyuntikan benzopyrin degan dosis 10 mg/kgbb secara subkutan di sekitar mammae selama 8 minggu dengan interval penyuntikan 3 hari. Terjadinya kanker mammae pada mencit dibuktikan secara makroskopis dengan terdapat benjolan pada mammae dan secara mikroskopis melalui biopsi mammae yaitu terdapat sel yang mengalami proliferasi. Mencit dibagi menjadi 6 kelompok sehingga tiap kelompok terdiri dari 10 ekor. Kelompok tersebut adalah sebagai berikut : Kelompok kontrol negatif yaitu mencit tidak menderita kanker mammae diberi larutan CMC, Kelompok kontrol positif yaitu mencit menderita kanker mammae diberi Colcemid 30 mg/kgbb, Kelompok perlakuan P0, P1, P2 dan P3 adalah mencit yang menderita kanker mammae diberi fraksi alkaloid *achyranthes aspera linn* berturut turut dengan dosis 0 mg/kgbb, 10 mg/ kg.bb; 30 mg/ kg.bb dan 100 mg/ kg. bb. Semua kelompok mendapat perlakuan setiap hari selama 8 minggu. Parameter yang diamati melalui nekropsi sel kanker mammae adalah 1) Prosentase viabilitas sel kanker mammae 2) Jumlah sel natural killer (Nk cell) 3), Jumlah sel kanker yang mengalami nekrosis dan apoptosis. 4) mengukur *Optical Density* Caspase 3 menggunakan Elisa . Data yang didapat dianalisis dengan menggunakan analisis varian, apabila terdapat perbedaan yang nyata, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil.

Hasilnya adalah fraksi alkaloid *Achyranthes aspera Linn* pada dosis 30 mg/kgbb menyebabkan kematian sel kanker mammae (Viabilitas) pada mencit sebesar  $88,90 \pm 5,56$  % , jumlah sel NK sebesar  $21,10 \pm 5,48$ , kematian sel kanker melalui mekanisme apoptosis sebesar  $34,40 \pm 3,86$  % dan nekrosis sebesar  $57,80 \pm 3,20$  % serta menyebabkan fragmentasi DNA secara kualitatif Berdasarkan uji ELISA, *optical density* Caspase mulai terlihat pada pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dosis 10 ppm (besar caspase > 2x COV).

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* pada dosis 30 mg/kg berat badan yang diberikan pada mencit yang menderita kanker mammae dapat menyebabkan kematian sel kanker. Mekanisme kematian sel kanker melalui proses nekrosis dan apoptosis serta fragmentasi DNA dengan meningkatkan viabilitas dan

apoptosis, NK sel dan fragmentasi DNA serta semakin besar dosis fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* semakin besar pula optical density caspase. Alkaloid tanaman *Achyranthes aspera linn* dapat digunakan sebagai obat masa depan "*suicide gen Therapy*" pada penyakit kanker dengan harga murah, aman dan nyaman.

Kata kunci : Alkaloid, apoptosis, caspase 3, DNA, kanker mammae

## SUMMARY

### THE ACTIVITY OF ACHYRANTHES ASPERA LINN ALKALOID TO CAUSE APOPTOTIC ABF DNA FEAGMENTATION ON BREAST CANCER BY CASPASE 3 EXPRESION (EXECUTOR CASPASE)

**Wurlina, S. Zakaria and W. Sastrowardoyo**

*Achyranthes aspera* linn that known by the name of jarong, remek getih or pulutan according to empirically used by society to cure cancerous especially breast cancer and cervic cancer. Proved scientifically fraction of alkaloid leaf *Achyranthes aspera* linn causes cell death breash cancer guessed the cytochrome c in mitochondria was stimulation of caspae 9 ( initiator caspae) to stimulation form of caspase 3 (executor caspase) by DNA fragmentation of cancer cell. Scientificcally as antikanker necessary be proved according to in vivo that faction alkaloid leaf *Achyranthes aspera* linn can used in therapeutics cancer cell mammae according to apoptosis and DNA fragmentation by expresie caspase 3 (caspase executor) and protect normal cell.

This research uses animal experiment female mouse 2 months of age as much as 60 tail that are made to suffer cancers mammae with benzopyrin dose 10 mg/kgbw according to subkutan around mammae during 8 weeks with inoculation interval 3 days. The happening of cancer mamae in mouse is proved according to makroskopis with found nodule in mamae and microscopicy by necropsy mamae that is found cell that experience proliferasi. Mouse is divided to be 6 groups so that each group consist of 10 tail. This group: Negative control group that is mouse doesn't suffer cancer mamae given solution cmc, Positive control group that is mouse suffers cancer mamae given Colcemid 30 mg/kgbw, Treatment group P0, P1, P2 and P3 mouse that suffer cancer mamae given fraction alkaloid *Achyranthes aspera* Linn, continously in with dose 0 mg/kgbw, 10 mg/kg. bw; 30 mg/ kg. bw and 100 mg/ kg. bw. All groups gets treatment every day during 8 weeks. Parameter that watched by cancer cell biopsy mamae 1) prosentase viabilitas cancer cell mamae, 2) cell total natural killer (Nk cell), 3) Cancer cell total that experience necrotic and apoptotic 4) DNA fragmentation and 5) *Optical Density* Caspase 3.(caspase executor).

The result of this research fraction alkaloid *Achyranthes aspera* linn in dose 30 mg/kb.bw causes cancer cell death mamae (viabilitas) in mouse as big as  $88,90 \pm 5,56 \%$ ,



total NK cell as big as  $21,10 \pm 5,48$ , cancer cell death by mechanism apoptotic as big as  $34,40 \pm 3,86$  % and nekrotic as big as  $57,80 \pm 3,20$  %. The optical density of caspase by Elisa test to begin at dose 10 mg/kg.bw concentration of alkaloid *Achyranthes aspera* linn (value of caspase  $> 2x$  COV).and quality od DNA fragmentation.

Conclusion the fraction alkaloid *Achyranthes aspera* linn in dose 30 mg/kg bw body that given in mouse that suffer breast cancer cause death cancer cell. Mechanism of breast cancer death by necrosis , apoptotic and DNA fragmentation by increase viability and apoptotic, NK cell and DNA fragmentation and to increase dose of alkaloid fraction of *Achyranthes aspera* Linn to cause increase of optical density of caspase. The alkaloid of *Achyranthes aspera* Linn can used as “ suicide gen therapy” in furure on cancer which cheap, safety and healty.

Key word : Alkaloid, apoptotic, caspase 3, DNA fragmentation, cancer breast

## ABSTRAK

### AKTIVITAS ALKALOID *ACHYRANTHES ASPERA* LINN PENYEBAB APOPTOSIS DAN PRAGMENTASI DNA PADA SEL KANKER MAMAE MELALUI EKSPRESI CASPASE 3 (*CASPASE EXECUTOR*)

### THE ACTIVITY OF *ACHYRANTHES ASPERA* LINN ALKALOID TO CAUSE APOPTOTIC ABF DNA FEAGMENTATION ON BREAST CANCER BY CASPASE 3 EXPRESION (*EXECUTOR CASPASE*)

Wurlina, S. Zakaria dan W. Sastrowardoyo

*Achyranthes aspera* linn that known by the name of jarong, remek getih or pulutan according to empirically used by society to cure cancerous especially breast cancer and cervic cancer. Proved scientifically fraction of alkaloid leaf *Achyranthes aspera* linn causes cell death breast cancer guessed the cytochrome c in mitochondria was stimulation of caspae 9 ( initiator caspae) to stimulation form of caspase 3 (executor caspase) by DNA fragmentation of cancer cell. Scientifically as antikanker necessary be proved according to in vivo that faction alkaloid leaf *Achyranthes aspera* linn can used in therapeutics cancer cell mammae according to apoptosis and DNA fragmentation by expresie caspase 3 (caspase executor) and protect normal cell.

This research uses animal experiment female mouse 2 months of age as much as 60 tail that are made to suffer cancers mammae with benzopyrin dose 10 mg/kgbw according to subkutan around mammae during 8 weeks with inoculation interval 3 days. The happening of cancer mammae in mouse is proved according to makroskopis with found nodule in mammae and microscopically by necropsy mammae that is found cell that experience proliferasi. Mouse is divided to be 6 groups so that each group consist of 10 tail. This group: Negative control group that is mouse doesn't suffer cancer mammae given solution emc, Positive control group that is mouse suffers cancer mammae given Colcemid 30 mg/kgbw, Treatment group P0, P1, P2 and P3 mouse that suffer cancer mammae given fraction alkaloid *Achyranthes aspera* Linn, continously in with dose 0 mg/kgbw, 10 mg/kg. bw; 30 mg/ kg. bw and 100 mg/ kg. bw. All groups gets treatment every day during 8 weeks. Parameter that watched by cancer cell biopsy mammae 1) prosentase viabilitas cancer cell mammae, 2) cell total natural killer (Nk cell), 3) Cancer cell total that experience necrotic and apoptotic 4) DNA fragmentation and 5) *Optical Density* Caspase 3.(caspase executor).

Conclusion the fraction alkaloid *Achyranthes aspera* linn in dose 30 mg/kg bw body that given in mouse that suffer breast cancer cause death cancer cell. Mechanism of breast cancer death by necrosis , apoptotic and DNA fragmentation by increase viability and apoptotic, NK cell and DNA fragmentation and to increase dose of alkaloid fraction of *Achyranthes aspera* Linn to cause increase of optical density of caspase. The alkaloid of *Achyranthes aspera* Linn can used as " suicide gen terapiy" in furure on cancer which cheap, safety and healty.

Key word : Alkaloid, apoptotic, caspase 3, DNA fragmentation, cancer breast

## PRAKATA

Puji syukur Kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan karunia-Nya yang telah dilimpahkan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan laporan penelitian dengan judul : **AKTIVITAS ALKALOID *ACHYRANTHES ASPERA LINN* PENYEBAB APOPTOSIS DAN PRAGMENTASI DNA PADA SEL KANKER MAMAE MELALUI EKSPRESI CASPASE 3 (*CASPASE EXECUTOR*)** yang dibiayai Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional sesuai dengan surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian Strategis Nasional Tahun 2010. Kontrak nomor : 509/SP2H/PP/DP2M/VII/2010 Tanggal 24 Juli 2010

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan secara *in vivo* fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) yang dibuat menderita kanker mammae menggunakan benzopirine terhadap :1) Prosentase viabilitas sel kanker , 2).Jumlah sel natural killer (sel NK), 3) Jumlah sel kanker mengalami nekrosis dan apoptosis, 4) Jumlah fraksinasi DNA dan 5) *Optical Density* Caspase 3. Manfaat penelitian adalah memberi informasi tentang alkaloid *Achyranthes aspera linn* dapat menyebabkan apoptosis sehingga dapat digunakan obat antikanker "*suicide gen therapy*".

Pada kesempatan ini kami mengucapkan terima kasih atas kesempatan dan kepercayaan yang telah diberikan kepada kami untuk meneliti *Achyranthes aspera linn* sebagai bahan antikanker mammae kepada :

1. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional
2. Rektor Universitas Airlangga
3. Ketua LPPM Universitas Airlangga
4. Dekan FKH Universitas Airlangga
5. Mahasiswa dan semua pihak yang terlibat dalam penelitain ini

Semoga hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai bahan informasi ilmiah dalam pengembangan ilmu pengetahuan pada umumnya dan khususnya dibidang pengembangan obat tradisional yang berkaitan dengan bahan antikanker untuk dapat dikembangkan sebagai bahan obat pada kanker payudara yang aman, nyaman dan murah agar penderita kanker dapat hidup secara produktif.

## DAFTAR ISI

**M I L I K  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
S U R A B A Y A**

## Halaman

<b>LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN .....</b>	<b>i</b>
<b>RINGKASAN DAN SUMMARY .....</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>vi</b>
<b>PRAKATA .....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xi</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
<b>BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT .....</b>	<b>12</b>
<b>BAB 4. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>13</b>
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>20</b>
<b>BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>33</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>34</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>37</b>



**DAFTAR TABEL**

	<b>Halaman</b>
Tabel 5.1. Rerata viabilitas sel kanker mamae setelah pemberian alkaloid alkaloid <i>Achyranthes aspera linn</i> .....	22
Tabel 5.2. Rerata jumlah NK sel pada sel kanker mamae setelah pemberian alkaloid <i>Achyranthes aspera linn</i> .....	24
Tabel 5.3. Rerata sel kanker apoptosis sel kanker mamae setelah pemberian alkaloid <i>Achyranthes aspera linn</i> .....	26
Tabel 5.4. Rerata <i>Optical density</i> caspase pada berbagai dosis alkaloid <i>Achyranthes aspera linn</i> .....	30

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 5.1. Rerata viabilitas sel kanker mammae setelah pemberian alkaloid <i>Achyranthes aspera linn</i> .....	23
Gambar 5.2. Viabilitas sel kanker mammae.....	23
Gambar 5.3. Rerata jumlah NK sel pada sel kanker mammae setelah pemberian alkaloid <i>Achyranthes aspera linn</i> .....	24
Gambar 5.4. NK sel berwarna ungu .....	25
Gambar 5.5. Rerata sel kanker apoptosis sel kanker mammae setelah pemberian alkaloid <i>Achyranthes aspera linn</i> .....	27
Gambar 5.6. Sel kanker yang mengalami apoptosis dan nekrosis .....	26
Gambar 5.7. Fraksinasi DNA sel kanker mammae .....	31

**DAFTAR LAMPIRAN****Halaman**

Lampiran 1. Gambar nodul dan proliferasi sel pada mammae mencit setelah Pemberian Benzopirine .....	36
---	----



## BAB I PENDAHULUAN

M I L I K  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
S U R A B A Y A

### Latar Belakang

Kanker payudara merupakan kanker terbanyak sesudah kanker leher rahim, lebih dari 70% penderita kanker payudara ditemukan pada stadium lanjut. Data dari Dirjen Pelayanan Medik Depkesmenunjukkan 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).

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 telah digunakan secara empiris di masyarakat adalah *Achyranthes aspera linn*. WHO sebagai organisasi kesehatan telah menyetujui penggunaan obat tradisional dari tanaman terutama tanaman tropis, karena ketersediaan hayati, biaya produksi dan toksisitas yang rendah serta efek samping yang terbatas. Pelaksanaan program *High Throught Screening* (HTS) untuk pencarian obat antikanker dari tanaman asli Indonesia dengan molekul target enzim DNA *Topoisomerase II* telah dilakukan terhadap tanaman berdasarkan penggunaan secara empiris di masyarakat, diantaranya adalah tanaman *Achyranthes aspera linn* yang dikenal dengan nama jarong, jarongan atau remek getih digunakan sebagai antikanker pada payudara dan kandungan (Sutawidja,2001).

Ekstrak daun *Achyranthes aspera linn* mempunyai efek antimitosis yaitu menghambat pembelahan dan perkembangan sel embrio mencit dan tikus, ( Wurlina dkk.,2003), menghambat pembelahan dan pertumbuhan sel spermatogenik (Meles dkk.,2004). Alkaloid tanaman tersebut sebagai antimitosis sel mieloma berhenti pada metaphase (Wurlina dkk,2004) dan sebagai anti telomerase sel mielomna (Wurlina dkk, 2006). Alkaloid sebagai antimitosis dan antitelomerase mempunyai kemampuan mengikat tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus dengan menghambat atau memblokode polimerisasi protein kedalam mikrotubulus sehingga terjadi penghancuran



dari mikrotubulus berakibat sel akan berhenti membelah sehingga akan diikuti dengan terjadinya kematian sel (apoptosis).

Ada tiga kelompok utama gen yang terlibat dalam regulasi pertumbuhan sel yaitu proto-onkogen, gen penekan tumor (*tumor suppressor gen* = TSG) dan *gatekeeper*. Proto-onkogen menstimulasi dan meregulasi pertumbuhan dan pembelahan sel. Gen penekan tumor biasanya menghambat pertumbuhan sel atau menginduksi apoptosis (kematian terprogram). Kelompok gen ini dikenal sebagai anti-onkogen, karena berfungsi melakukan kontrol negatif (penekanan) pada pertumbuhan sel. Gen p53 merupakan salah satu dari TSG yang menyandi protein dengan berat molekul 53 kDa. Gen p53 juga berfungsi mendeteksi kerusakan DNA dan menginduksi reparasi DNA. Gen *gatekeeper* berfungsi mempertahankan integritas genomik dengan mendeteksi kesalahan pada genom dan memperbaikinya. Mutasi pada gen-gen ini dapat menyebabkan kelainan siklus sel berakibat sel berkembang tanpa kontrol terutama mutasi pada suppressor gen p53 dan CDK inhibitor p21 dan p27 yang berakibat terjadi pertumbuhan sel yang tidak terkendali sehingga terjadilah kanker (Kresno, 2008).

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. Gen p53 dapat mengatur proliferasi sel maupun apoptosis, sehingga sel yang kehilangan gen p53 akan mengakibatkan sel kehilangan kemampuan apoptosis namun gen p53 yang *wild type* dapat mengkompensasi kehilangan Rb1 sehingga dapat mencegah terjadinya transformasi.

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 (Adenin triphosphat =ATP), 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 Aktifating Faktor 1 (APAF 1) dan terbukanya PT pore. Akibat perubahan ini akan berakibat aktivasi caspase 3 yang merupakan caspase eksekutor yang berasal dari caspase inisiator (Caspase 9). Aktivasi caspase 3 akan menyebabkan enzim DNA ase yang berlebihan yang berakibat

terjadinya fragmentasi DNA yang menyebabkan kematian sel dalam bentuk apoptosis (Lantuejoul dkk., 2004, Meles dkk, 2006).

Berdasarkan landasan secara empiris, teoritik dan hasil penelitian pendahuluan alkaloid *Achyranthes aspera* linn patut diduga dan dibuktikan mekanisme kerjanya melalui peningkatan ekspresi caspase-3 dan fragmentasi DNA penyebab apoptosis pada sel kanker dan melindungi sel normal, diharapkan 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 insidens 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, 2005).

Di Indonesia diperkirakan terdapat 100 penderita kanker baru untuk setiap 100.000 penduduk per tahunnya. Prevalensi penderita kanker terus meningkat akibat peningkatan angka harapan hidup, sosial ekonomi, serta perubahan pola penyakit. Data Profil Kesehatan RI 2005 menunjukkan bahwa proporsi kanker yang dirawat inap di rumah sakit di Indonesia mengalami peningkatan dari 5,0% menjadi 6,1%. (Tjindarbumi,2005)

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 Depkesmenunjukkan 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, 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,  $\alpha$  spinasterol,  $\beta$  sitosterol, cryopenol, dibutyl phtalate, asam palmitat,  $\alpha$  spinasterol-3  $\beta$ -D glikosida, daukosterol, ecdysterol, achyranthoside E dan F. Ekstrak metanol dari daun *Achyranthes aspera linn* mempunyai aktivitas antimetosis dengan menghambat pembelahan sel dan proliferasi (Mitaine dkk., 2001; Chakraborty dkk., 2002).

Ekstrak *Achyranthes aspera linn* mempunyai efek antimitosis yaitu menghambat pembelahan dan perkembangan sel embrio (*cleavage*) pada mencit dan tikus. dan menghambat pembelahan dan pertumbuhan sel spermatogenik (Wurlina dkk. 2003, Meles dkk., 2004). Menurut Wurlina dkk 2004 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 (Apoptosis). Mikrotubulus berfungsi membentuk benang-benang mitosis dan berperan untuk pergerakan sel, pagositosis 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, 2008).

### 2.3. Siklus Sel

Menurut Scott dkk. (2000) dan Ward dkk.(2001) proses pembelahan sel dibagi menjadi 2 fase yaitu interfase dan pembelahan mitosis. Pada stadium interfase disebut pula dengan stadium persiapan yaitu fase persiapan pembelahan sel yang meliputi : 1) periode G1 yaitu periode sel yang akan membelah sedang aktif mensintesa RNA. Untuk berlangsungnya periode ini diperlukan kerjasama protein dan enzim yaitu Siklin D dan E dengan dependen kinase 4 dan 6 yang disebut dengan fase *S promoting factor* (fase SPF). Setelah sel melaksanakan sintesis RNA, maka siklus akan masuk dalam periode S. 2) periode S atau disebut dengan periode sintesis yaitu suatu periode yang aktif mensintesis DNA membutuhkan waktu 8 jam. Periode ini memerlukan kerjasama antara protein dan enzim yaitu siklin A dan silin E dependen kinase 2.. Pada periode S dari siklus pembelahan sel tidak hanya terjadi sintesis DNA tetapi juga terjadi sintesis RNA. Selanjutnya akan masuk dalam periode G2 3) periode G2 yaitu persiapan sitoplasma untuk membelah dengan memerlukan kerjasama antara siklin A, B dan siklin dependen kinase 1 yang disebut fase *mitosis promoting factor* (MPF). Pada periode ini juga terjadi sintesis RNA membutuhkan waktu 5 jam. Menurut Sthanathan dan Trouson (2000), stadium interfase membutuhkan waktu paling lama yaitu 23 jam. Setelah periode G2 selesai dilanjutkan dengan pembelahan sel secara mitosis yang terdiri dari 4 fase yaitu : 1) Profase adalah kromosom terlihat halus dan panjang yang terdiri dari kromatid rangkap dua, sentrosom mengganda menjadi 2 dan meregang untuk menuju ke kutub berseberangan dengan inti selanjutnya akhir dari profase selaput inti mulai hancur, kromosom mengantung pada sentromer tersebar seimbang pada kedua kutub 2) Metafase yaitu kromosom pindah kebidang equator 3) Anafase yaitu kromatid dari setiap kromosom lepas karena sentromer membelah dua lalu berpindah ke kutub berseberangan dan 4) Telofase yaitu kromosom mulai berubah menjadi kromatin kemudian terbentuk cekungan dibagian equator dan akhir telofase terbentuk 2 sel yang masing-masing memiliki inti dan sentrosom yang mengandung sepasang sentriol.

### 2.4. 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 (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, Yaion dkk., 2004).

Proses apoptosis 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 (Kocki dkk., 2004, Yaion 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 (Adenin triphosphat =ATP), 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 aktifating faktor 1 (APAF 1) dan terbukanya PT pore. Akibat perubahan ini akan berakibat aktivasi caspase 3 yang merupakan kaspase eksekutor yang berasal dari caspase inisiator (Caspase 9). Aktivasi caspase 3 akan menyebabkan enzim DNA ase yang berlebihan yang berakibat terjadinya fragmentasi DNA yang menyebabkan kematian sel dalam bentuk apoptosis (Lantuejoul dkk., 2004, Meles dkk, 2006).

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 (Reed dkk,1999, 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 G4-72. 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 anzim 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,2008,).

Ada tiga kelompok utama gen yang terlibat dalam regulasi pertumbuhan sel yaitu proto-onkogen, gen penekan tumor (*tumor suppressor gen* = TSG) dan gatekeeper. Proto-onkogen menstimulasi dan meregulasi pertumbuhan dan pembelahan sel. Gen penekan tumor biasanya menghambat pertumbuhan sel atau menginduksi apoptosis (kematian terprogram). Kelompok gen ini dikenal sebagai anti-onkogen, karena berfungsi melakukan kontrol negatif (penekanan) pada pertumbuhan sel. Gen p53 merupakan salah satu dari TSG yang menyandi protein dengan berat molekul 53 kDa. Gen p53 juga berfungsi mendeteksi kerusakan DNA dan menginduksi reparasi DNA. Gen *gatekeeper* berfungsi mempertahankan integritas genomik dengan mendeteksi kesalahan pada genom dan memperbaikinya. Mutasi pada gen-gen ini dapat menyebabkan kelainan siklus sel sehingga berakibat sel berkembang tanpa kontrol terutama mutasi pada suppressor gen p53 dan CDK inhibitor p21 dan p27 yang berakibat terjadi pertumbuhan sel yang tidak diperlukan tanpa kendali sehingga terjadilah kanker (Kresno,2008).

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 Rb1 sehingga dapat mencegah terjadinya transformasi. (Bogler dan Mikkelsen, 2005, Kresno, 2008)

#### **2.4.1. Apoptosis dalam regulasi respon imun**

Ada 2 cara yang menyebabkan kematian sel berinti yaitu melalui nekrosis dan apoptosis. Nekrosis terjadi melalui peningkatan permeabilitas dinding sel sehingga berakibat perubahan tekanan osmotik dan air dapat masuk kedalam sel dan kromatin nukleus mengembang, dimana awalnya merupakan proses reversibel tetapi lama-lama ireversibel dan integritas dinding sel menjadi rusak permanen. Cara kematian sel ini terjadi karena aktivitas komplemen akibat trauma fisik atau bahan kimia., yang pada apoptosis

disebut dengan programmed cell death, terjadi perusakan sel atau jaringan secara terorganisasi. Apoptosis merupakan bagian integral dari sistem imun. Untuk sel T, sel autoreaktif atau sel yang tidak berguna disingkirkan melalui apoptosis sebagai respon terhadap sinyal dari reseptor. Apoptosis diduga merupakan mekanisme yang terjadi pada proses kematian sel CD4CD8 dalam pematangan sel T menjadi CD4 atau CD8 dalam kelenjar Thymus. Pembentukan reseptor sel B (BCR) dan reseptor T (TCR) merupakan strategi yang digunakan oleh sistem imun untuk membentuk repertoire sel B dan sel T dalam jumlah besar, namun berakibat terbentuk sel autoreaktif. Untuk menyingkirkan sel autoreaktif maka tubuh melakukan apoptosis yang merupakan mekanisme self tolerance. (Bogler dan Mikkelson, 2005, Freuhauff dkk, 2006 dan Kresno, 2008)

Apoptosis pada sel T terhambat bila jalur Fas dan TNF diblok. Ekspresi bcl2, c-myc dan Nur77 mencegah terjadinya apoptosis. Proses apoptosis yang dihubungkan dengan TNF dan reseptor TNF adalah interaksi TNF-TNFR mengawali berbagai jalur sinyal termasuk aktivator transkripsi NF- $\kappa$ B melalui TNFR-associated factor (TRAF) namun NF- $\kappa$ B dapat melawan apoptosis yang diperantarai oleh TNF. Hal ini membuktikan bahwa TNFR membutuhkan berbagai faktor transduksi sinyal yang berbeda untuk memodulasi kepekaan sel terhadap sinyal apoptosis. Stimulasi Fas dan reseptor TNF oleh ligannya terjadilah kaskade aktivasi protease seperti protease cystein yang disebut interleukin-1 $\beta$  converting enzyme (ICE) merupakan protease penting dalam proses apoptosis. (Bogler dan Mikkelson, 2005, Freuhauff dkk, 2006)

Pada apoptosis sel sasaran menunjukkan degradasi kromatin menjadi fragmentasi yang terdiri dari beberapa pasang DNA. Fragmentasi DNA terjadi sebelum lisis sel dan dipengaruhi Ca, Zn dan K. Diduga fragmentasi DNA terjadi akibat aktivasi endonuklease yang terdapat dalam nukleus sel sasaran yang merupakan proses bunuh diri (*suicide*) sel sasaran. Apoptosis juga dapat diinduksi pada sel sasaran yang bergantung pada sitokin untuk hidupnya dengan menyingkirkan sitokin yang diperlukan. Apoptosis yang terjadi pada sel progenitor sumsum tulang atau sel yang tergantung pada GM-CSF dan IL-3 yang mempunyai sifat antiapoptosis. Diduga IL-3 berperan dalam mengatur ekspresi bcl2 yang merupakan protein antiapoptosis (Freuhauff dkk, 2006)

#### 2.4.2. Natural Killer sel (Sel NK)

Sel NK adalah sel efektor dengan sitotoksitas spontan terhadap berbagai jenis sel sasaran, sel ini tidak memiliki sifat klasik dari makropag, granulosit maupun CTL dan

sitotoksitasnya tidak tergantung pada MHC. Sitotoksitas alami yang diperankan oleh sel NK merupakan mekanisme efektor yang sangat penting dalam melawan kanker. Sel NK berperan pada respon imun non spesifik maupun spesifik terhadap kanker, dapat diaktivasi langsung melalui pengenalan antigen tumor atau sebagai akibat aktivasi sitokin yang diproduksi oleh limfosit T spesifik kanker. Mekanisme lisis yang dilakukan oleh sel NK sama mekanisme yang digunakan oleh sel T CD8 untuk membunuh sel, tetapi sel NK tidak mengekspresikan TCR. Sel NK tidak dapat melisis sel yang mengekspresikan MHC, tetapi sebaliknya sel kanker tidak mengekspresikan MHC, biasanya terhindar dari lisis oleh CTL, justru merupakan sasaran untuk dilisis oleh sel NK. Sel NK dapat diarahkan untuk melisis sel yang dilapisi imunoglobulin karena sel NK mempunyai reseptor Fc (Fcγ RIII atau CD 16) untuk molekul IgG. Pengikatan sel NK pada sel sasaran juga dapat terjadi melalui reseptor khusus yang berbeda dengan reseptor Fc yaitu reseptor NKR-PI yang mengikat molekul semacam lektin. Kemampuan sel NK untuk membunuh sel kanker ditingkatkan oleh sitokin, termasuk IFN, TNF, IL-2 dan IL-12, sehingga peran sel NK dalam aktivitas anti kanker tergantung dari rangsangan yang terjadi bersamaan pada sel T dan makrofag yang memproduksi sitokin tersebut. (Bogler dan Mikkelsen, 2005)

IFN ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) dapat meningkatkan fungsi sel NK dengan jalan mengubah pre NK menjadi sel NK yang mampu mengenal dan melisis sel sasaran, mempermudah interaksi dengan lisis sel sasaran. Sel NK diduga berperan dalam *immune surveillance* terhadap kanker yang sedang tumbuh, khususnya kanker yang mengekspresikan antigen virus. Aktivitas sel NK sering dihubungkan dengan prognosis, terdapat korelasi antara penurunan kemampuan sitotoksitas sel NK dengan metastasis. Peran sel NK yang diaktifkan dengan IL-2 dapat membunuh sel kanker, sel tersebut disebut *lymphokine activated killer cells (LAK cells)* yang didapat secara *in vitro* dengan memberikan IL-2 dosis tinggi pada biakan sel limfosit darah perifer atau sel *tumor infiltrating lymphocytes (TIL)* berasal dari penderita kanker. IL-2 berperan menginduksi ekspresi rantai  $\alpha$  reseptor IL-2 pada tingkat transkripsi, hal ini yang dapat memperkuat kemampuan IL-2 untuk meningkatkan pertumbuhan sel NK. Sel yang diaktifkan oleh limfokin (LAK cells) menunjukkan peningkatan aktivitas sitotoksik sangat jelas sehingga kemungkinan sel LAK dapat digunakan sebagai imunoterapi adoptif. Sel NK berperan penting dalam mencegah metastasis dengan eliminasi sel kanker yang terdapat dalam sirkulasi darah dengan bukti bahwa sel kanker yang dimasukkan secara intravena akan hilang dalam waktu 24

jam pertama yang berhubungan erat dengan sel NK. Sel NK yang diaktivasi dengan cyclophosphamide (Cy) menunjukkan bahwa sel tersebut gagal mencegah metastasis. (Bogler dan Mikkelson, 2005, Freuhauff dkk, 2006 dan Kresno,2008)

Disebut NK sel karena populasi sel ini dapat membunuh sel sasaran secara spontan tanpa sensitisasi terlebih dahulu dan tanpa tergantung dan tidak dikendalikan oleh produk MHC. NK sel juga tidak berinteraksi dengan sel sasaran melalui reseptor T (TCR) seperti sel T. Reseptor untuk MHC diidentifikasi sebagai C type lectin like receptor yang spesifik untuk MHC. Selain itu NK sel juga memiliki reseptor lain yaitu immunoglobulin like receptor yang berfungsi sebagai penghambat pembunuhan sehingga disebut sebagai sel killer inhibitory receptor. NK sel berperan penting untuk pertahanan alamiah terhadap pertumbuhan sel kanker dan berbagai infeksi seperti virus, tanpa sensitisasi sebelumnya. (Kresno,2008)

Sel NK sebagian besar (95%) dapat berfungsi sebagai sel membunuh sel sasaran yang terinfeksi virus dan sel sasaran lain yang dilapisi IgG sehingga sel NK berfungsi sebagai sitotoksik yang tergantung pada antibodi 9antibody dependent cell mediated cytotoxicity =ADCC). Sel NK diduga berkembang dalam sumsum tulang, namun belum ditemukan tanda pada permukaan bagi sel induknya. Diduga sel NK dan sel T berasal dari sel induk yang sama (*common thymocyte precursor*). Sel NK mempunyai peran penting dalam melawan kanker walau mekanisme belum diketahui secara pasti. Pada penderita kanker aktivitas sel NK menurun dan penurunannya menunjukkan korelasi dengan stadium penyakit.(Freuhauff dkk, 2006 dan Kresno,2008)

Sel NK dalam melisis sel sasaran (sitolisis) berlangsung beberapa menit dalam 4 tahap yaitu 1) pengikatan sel sasaran 2) aktivasi sel efektor melalui sinyal dan transduksi sinyal 3) melancarkan lethal kit kepada sel sasaran dan 4) pelepasan sel NK dari sel sasaran dan siklus akan berulang. Reseptor sel NK untuk pengikatan pada sel sasaran yaitu pengenalan sel sasaran terjadi melalui reseptor yang mengikat molekul semacam lektin yang disebut NKR-PI. Ligan NKR-PI ini diekspresikan hampir pada semua jaringan normal sehingga perlu ada mekanisme untuk mencegah lisis sel normal ini oleh NK sel .Faktor yang dapat menghambat lisis sel sasaran oleh sel NK yaitu prostaglandin dengan jalan meningkatkan kadar c-AMP (Freuhauff dkk, 2006 dan Kresno,2008)



### BAB 3

## TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### Tujuan Penelitian :

1. Membuktikan alkaloid *Achyranthes aspera linn* pada sel kanker mamae mencit secara *in vivo* terhadap viabilitas sel melalui jumlah natural killer (Nk sel)
2. Membuktikan alkaloid *Achyranthes aspera linn linn* pada sel kanker mamae mencit secara *in vivo* yang mengalami apoptosis dan nekrosis
3. Membuktikan alkaloid *Achyranthes aspera linn linn* pada sel kanker mamae mencit secara *in vivo* terhadap fragmentasi DNA
4. Mengukur *Optical Density* Caspase 3 (*Caspase Executor*) sel kanker

#### Manfaat Penelitian

Alkaloid tanaman *Achyranthes aspera linn* dapat digunakan sebagai obat masa depan "suicide genTherapy" pada penyakit kanker dengan harga murah, aman dan nyaman.



## BAB 4 METODE PENELITIAN

### **Pembuatan Faksi Alkaloid**

Serbuk daun *Achyranthes aspera linn* ditimbang sebanyak yang diperlukan, kemudian direndam dengan n-heksan dalam bejana dalam suhu kamar selama 2 X 24 jam. Kemudian disaring dengan penyaring Buchner dengan bantuan pompa vakum. Ampas yang didapat dilakukan maserasi lagi dengan pelarut yang sama yaitu n-heksan, kemudian dilakukan berulang-ulang sampai diperoleh larutan bening.. Tujuan dari proses maserasi adalah untuk melarutkan lemak dan klorofil yang terdapat dalam daun. Selanjutnya dilakukan maserasi dengan metanol asam tartrat 10%, disaring dan endapan dimaserasi lagi. Filtrat yang didapat dipekatkan, kemudian dibasakan dengan NH<sub>4</sub>OH, sehingga alkaloid terdapat dalam bentuk garam polar, selanjutnya ditarik dengan kloroform dan diuapkan sehingga diperoleh masa kental

### **Eksplorasi Dosis**

Penentuan dosis fraksi alkaloid daun *achyranthes aspera linn* sebagai obat antikanker berdasarkan hasil penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Wurlina (2000), Wurlina dan Sastrowardoyo (2002), Wurlina dkk.(2003) yaitu dosis yang digunakan fraksi alkaloid 100 ppm secara *invito*, sehingga pada penelitian secara *in vitro* yang dihubungkan dengan cairan tubuh mencit, sehingga dosis yang digunakan adalah konsentrasi adalah 10 mg/kgbb, 30 mg/kgbb dan 100 mg/kgbb.

### **Membuat mencit menderita kanker mammae**

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit betina berumur 2 bulan sebanyak 60 ekor yang dibuat menderita kanker mammae dengan menyuntikan benzopyrin dengan dosis 10 mg/kgbb secara subkutan di sekitar mammae selama 8 minggu dengan interval penyuntikan 3 hari. Terjadinya kanker mammae pada mencit dibuktikan secara makroskopis dengan terdapat benjolan pada mammae dan secara mikroskopis melalui biopsi sel mammae yaitu terdapat sel yang mengalami proliferasi.

### Perlakuan Hewan Coba

Alkaloid daun *Achyranthes aspera linn* dibuktikan secara *in vivo* pada 60 ekor mencit yang dibagi menjadi 6 kelompok, sehingga masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor. Kelompok tersebut adalah sebagai berikut :

Kelompok 1 : (Kontrol negatif), digunakan mencit yang tidak menderita kanker mammae

Dan hanya diberi CMC, untuk memastikan bahwa bila terjadi efek sitotoksik maka efek ini tidak disebabkan oleh hewan coba

Kelompok 2 : (Kelompok perlakuan), digunakan mencit yang menderita kanker mammae

diberi fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dengan dosis 0 mg/kgbb.

Kelompok 3 : (Kelompok perlakuan), digunakan mencit yang menderita kanker mammae

Diberi fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dengan dosis 10 mg/kgbb

Kelompok 4 : (Kelompok perlakuan), digunakan mencit yang menderita kanker mammae

Diberi fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dengan dosis 30 mg/kgbb.

Kelompok 5 : (Kelompok perlakuan), digunakan mencit yang menderita kanker mammae

Diberi fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dengan dosis 100 mg/kgbb.

Kelompok 6 : (Kontrol positif), digunakan mencit yang menderita kanker mammae diberi

obat antikanker colsemid 30 mg/kgbb (Standart obat antikanker)

Pemberian perlakuan dilakukan setiap hari sesuai masing-masing dosis selama 1 bulan (30 hari) sambil dilakukan pengamatan terhadap benjolan mammae (kanker mammae). Setelah perlakuan selesai semua mencit dibunuh untuk diambil darah dan mammae, yang selanjutnya dibuat preparat imunohistokimia. Para meter yang diamati adalah :

1. Prosentase viabilitas sel kanker melalui sel natural killer (NK cell)
2. Jumlah sel kanker yang mengalami apoptosis dan nekrosis
3. Jumlah sel kanker yang mengalami fragmentasi DNA
4. Mengukur *Optical density* Caspase 3 (*Caspase Executor*)

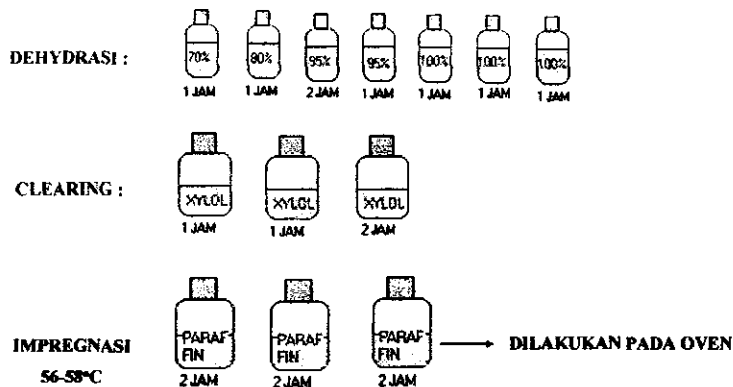
**Jaringan mammae mencit yang diambil harus segera difiksasi menggunakan larutan buffer formalin, larutan Zenker atau metanol untuk tujuan**

- Mempertahankan sel seperti semula
- Mencegah sel mengalami otolisis
- Mencegah kontaminasi bakteri atau jamur

Untuk mendapatkan hasil yang optimal maka jaringan mammae harus terlebih dahulu diproses melalui beberapa tahap : Dehidrasi, Clearing, Impregnasi dan embedding

**ADAPUN TAHAPAN YANG DILAKUKAN PADA TEKNIK PEMEROSAN JARINGAN ADALAH SEBAGAI BERIKUT :**

**TEKNIK PEMEROSAN JARINGAN**

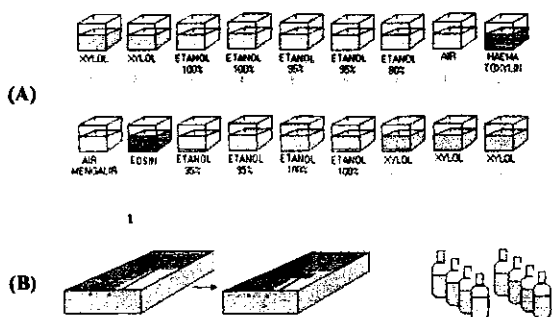


**Menghitung Persentase Viabilitas sel kanker mammae**

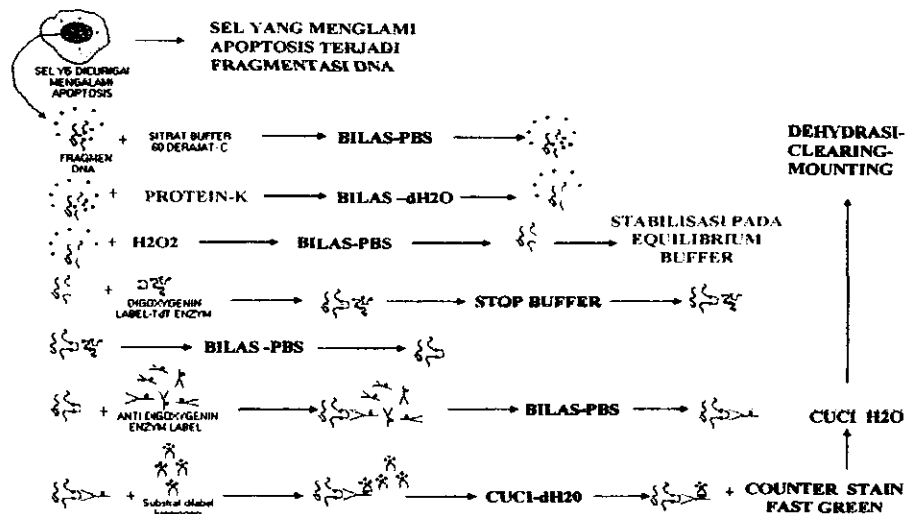
Hasil biopsi kanker mammae menciit, digerus dan disaring, selanjutnya dilakukan pewarnaan menggunakan *tripan blue*, kemudian dilakukan penghitungan dengan mikroskop cahaya pada pembesaran 400 kali. Pada pemeriksaan mikroskop cahaya sel yang hidup tidak menyerap warna, sehingga tidak berwarna, sedangkan sel yang mati akan terlihat berwarna biru.

**Menghitung hambatan supressor gen p53 dan CDK pada sel kanker mammae menciit**

**CARA PEWARNAAN**



## TEKNIK PEMERIKSAAN SEL APOPTOSIS DENGAN METODA TUNEL ASSAY

**Cara Penilaian**

Sel kanker yang mengekspresikan caspase 3 menunjukkan warna biru sedangkan sel yang lain (sel normal) tidak berwarna.

**Menghitung Persentase sel nekrosis dan apoptosis pada sel kanker mammae**

Kanker mammae mencit yang telah mengalami perlakuan dilakukan pembedahan dibuat preparat imunohistokimia dengan pewarnaan dengan campuran *etidium bromid* dan *acridin orange*. Caranya adalah sebagai berikut :

1. Dibuat lar. AO 100 ppm dan lar. EB 100 ppm dalam lar. PBS.
2. Campur kedua zat warna sama banyak dalam vial
3. Campurkan sebanyak 25 uL suspensi sel dengan 1 uL campuran zat warna (2) dalam vial segera diamati.
4. Pipet sebanyak 10 uL, tempatkan objek glass, tutup dengan cover glass, amati minimal 300 sel dengan mikroskop floresens pembesaran 400 kali.
5. Sel apoptosis : berwarna oranye dengan bintik2 terang karena kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA, dan sel Nekrosis berwarna oranye tanpa bintik terang, sedangkan sel hidup berwarna hijau.

$$\% \text{ Sel apoptosis} = \frac{\Sigma \text{ sel Apoptosis}}{\Sigma \text{ sel Apoptosis} + \Sigma \text{ sel Nekrosis} + \Sigma \text{ sel hidup}} \times 100\%$$

### Menghitung fragmentasi DNA melalui kromosom

- Darah/ jaringan/ serum ditambahkan media, selanjutnya disentrifugasi 2000 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang dan sisakan supernatan dan endapan sebanyak 1 ml.
- 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 secara berulang 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 56-60<sup>0</sup> C selama 3 hari.
- Pengecatan dengan giemsa selama 10 menit, kemudian dibilas dengan air, selanjutnya dikeringkan dan dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran 100 X dan 400X untuk melihat kromosom.

Data yang didapat dianalisis dengan menggunakan analisis varian satu arah untuk mengetahui peran fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* terhadap kejadian apoptosis sel kanker mammae yang diinduksi dengan benzopirin terhadap jumlah sel NK, caspase 3, apoptosis dan nekrosis serta fragmentasi DNA. Apabila terdapat perbedaan yang nyata, dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil.

### Pengukuran *Optical Density* Caspase

Pengukuran *Optical Density* Caspase menggunakan Elisa melalui tahapan sebagai berikut

1. Sel Mieloma mencit dalam media RPMI dipersiapkan
2. Sel mieloma dalam media dimasukkan kedalam tabung sentrifugasi.
3. Dilakukan sentrifuge kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C.

4. Supernatan dipisahkan dari endapan ( dalam Laminar air flow = LAF))
5. Sel ditanam dalam media ditambah FBS 10% dalam botol kultur sampai volume 10 ml. Tahap ini dikerjakan pada LAF.
6. Kultur disimpan dalam inkubator 95% O<sub>2</sub> dan 5% CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C.
7. Kultur dikeluarkan dari inkubator, dihomogenkan, kemudian dihitung jumlah sel (hemositometer) sampai mendekati 2 x 10<sup>6</sup> sel / ml.
8. Bila jumlah sel telah mencukupi, pindahkan kultur sel ke dalam lubang *microwell plate* sampai volume 0,5 ml. Masing-masing *microwell plate* telah diisi sebelumnya sejumlah 0,1 ml larutan uji, lar kontrol positif dan lar. kontrol negatif.
9. Inkubasikan dalam inkubator selama CO<sub>2</sub> 95% selama 4 jam
10. Diberi pereaksi anticaspase 25 ul
11. Inkubasikan dalam inkubator selama 1 jam
12. Diberi pelarut DMSO 50ul
13. Selanjutnya disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit
14. pembacaan nilai absorbansi dengan menggunakan Elisa *reader* pada panjang gelombang 630 nm

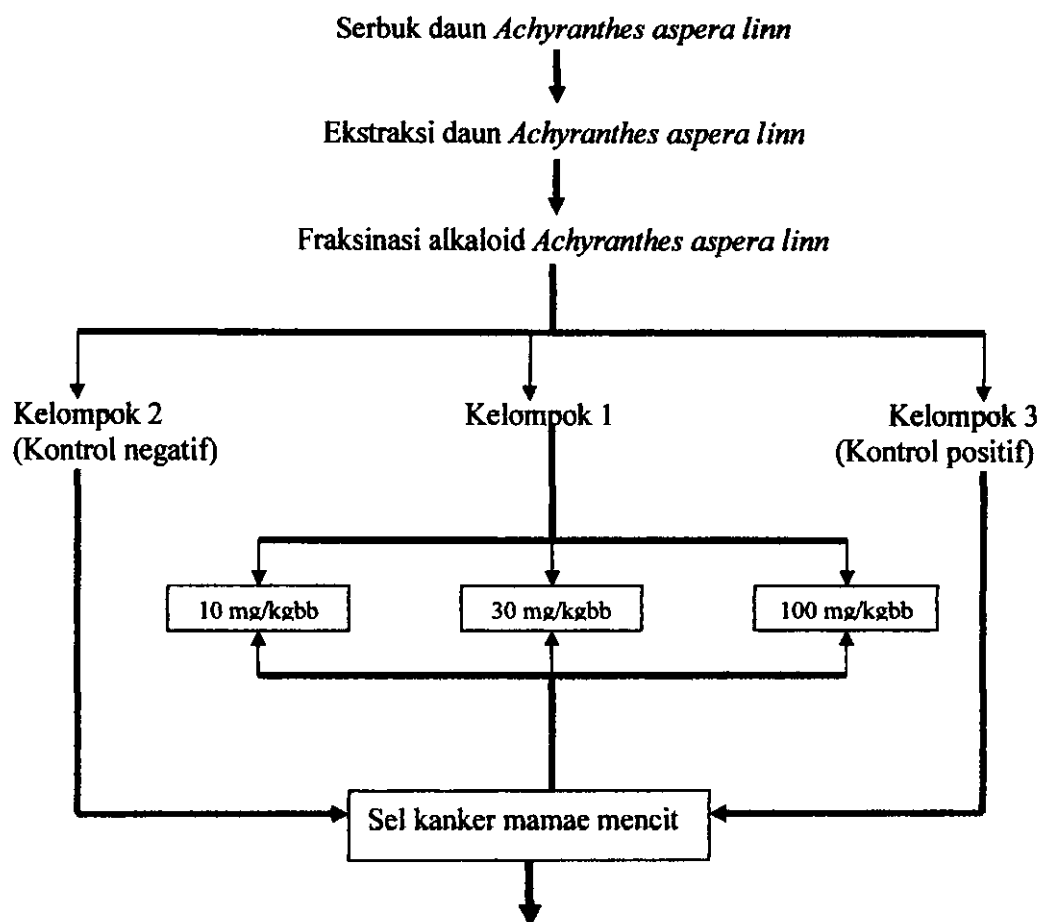
#### **Luaran Penelitian**

1. Bahan Obat antikanker mamme yang berasal dari alkaloid tanaman *Achyranthes aspera linn* yang murah, aman dan nyaman dan dapat dipatenkan
2. Publikasi artikel ilmiah yang diterbitkan dalam Jurnal Nasional terakreditasi.

#### **Indikator capaian yang terukur adalah**

1. Prosentase viabilitas sel kanker mamme dengan menentukan sel natural killer (Nk cell)
2. Jumlah sel kanker mamme yang mengalami apoptosis dan nekrosis
3. Jumlah sel kanker mamme yang mengalami fragmentasi DNA
4. Mengukur *Optical Density* Caspase sel kanker menggunakan Elisa

**Kerangka Penelitian adalah sebagai berikut :**



Parameter :

- 1) Prosentase viabilitas sel kanker
- 2) Jumlah sel natural killer (sel NK)
- 3) Jumlah sel kanker mengalami nekrosis dan apoptosis
- 4) Jumlah fraksinasi DNA
- 5) *Optical Density* Caspase 3

## BAB 5

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Pengaruh alkaloid *Achyranthes aspera* linn terhadap Viabilitas sel kanker mamae

Hasil nekropsi kanker mamae mencit, setelah pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* linn. setelah dilakukan pemeriksaan viabilitas sel kanker, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.1. Pada Tabel 5.1, menunjukkan semakin besar dosis fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn yang diberikan menyebabkan peningkatan persentase sel kanker mamae yang mati dan penurunan persentase viabilitas sel kanker.

Setelah dilakukan uji statistik menggunakan Anava, pada kontrol negatif terdapat perbedaan yang bermakna terhadap semua perlakuan termasuk kontrol positif ( $p < 0,05$ ), sedangkan kontrol positif tidak terdapat perbedaan dengan perlakuan pemberian fraksi alkaloid 30 mg/kgbb (P2) dan 100 mg/kgbb (P3) namun terdapat perbedaan dengan kontrol negatif, P0 (fraksi alkaloid 0 mg/kgbb) dan P1 (fraksi alkaloid 10 mg/kgbb). Viabilitas sel kanker mamae antara pemberian fraksi alkaloid 0 mg/kgbb (P0) dengan 10 mg/kgbb (P1) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ( $p > 0,05$ ) dan viabilitas sel kanker antara pemberian fraksi alkaloid 30 mg/kgbb (P2) dan 100 mg/kgbb (P3) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ( $p > 0,05$ ).

Tabel 5.1. Rerata viabilitas sel kanker mamae setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* linn

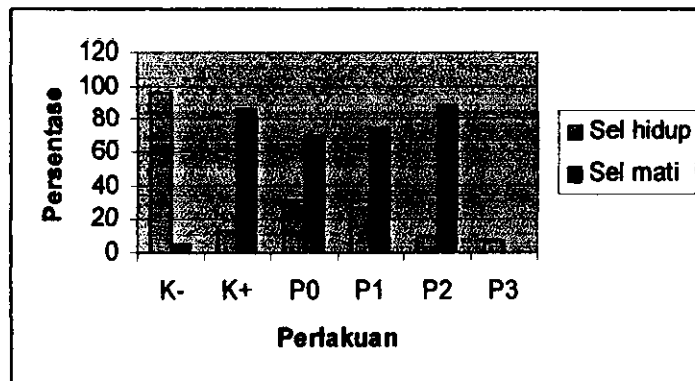
Perlakuan	Sel hidup (%)	Sel mati (%)
Kontrol negatif	95,70 <sup>a</sup> ± 1,41	4,30 <sup>c</sup> ± 1,41
Kontrol positif (colcemid 30 mg/kgbb)	13,00 <sup>c</sup> ± 2,49	87,00 <sup>a</sup> ± 2,49
P0 (alkaloid 0 mg/kgbb)	31,00 <sup>b</sup> ± 3,29	70,00 <sup>b</sup> ± 5,65
P1 (alkaloid 10 mg/kgbb)	26,90 <sup>b</sup> ± 1,66	74,10 <sup>b</sup> ± 3,55
P2 (alkaloid 30 mg/kgbb)	10,10 <sup>cd</sup> ± 3,17	88,90 <sup>a</sup> ± 5,56
P3 (alkaloid 100 mg/kgbb)	7,30 <sup>d</sup> ± 1,15	92,90 <sup>a</sup> ± 1,52

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

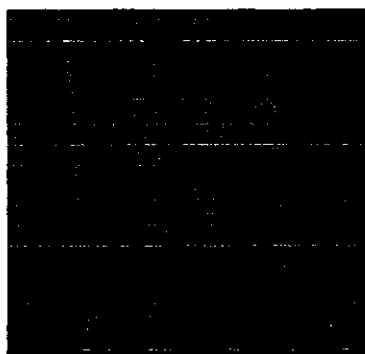
Pada kontrol negatif tidak memiliki hambatan pertumbuhan terhadap sel kanker mamae seperti pada kelompok perlakuan, hal ini dapat ditunjukkan dengan tingginya



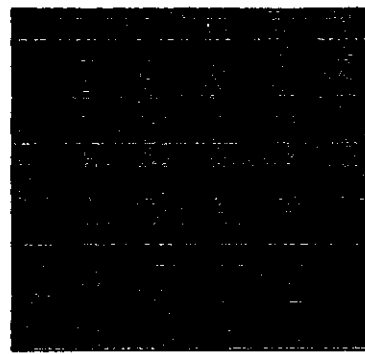
persentase viabilitas sel kanker kelompok kontrol negatif ( $95,70 \pm 1,41$ ). Perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan terhadap viabilitas sel kanker adalah semakin besar konsentrasi alkaloid, maka semakin kecil persentase viabilitas sel tersebut. Berdasarkan hasil penelitian dapat dikatakan bahwa fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn memiliki aktivitas yang dapat menyebabkan kematian sel kanker secara *in vivo*. Efek kematian pada sel kanker pada pemberian fraksi alkaloid dengan konsentrasi 30 mg/kgbb melebihi efek colchicin (kontrol positif) pada konsentrasi yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi alkaloid sangat efektif dalam membunuh sel kanker secara *in vivo*.



Gambar 5.1. Rerata viabilitas sel kanker mammae setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* linn



(1) Hemositometer



(2) pembesaran 400 X

Gambar 5.2. Viabilitas sel kanker mammae

## 5.2. Pengaruh fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn terhadap sel NK

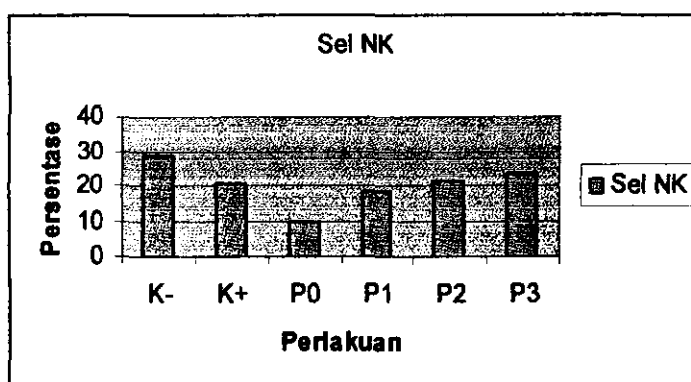
Pemeriksaan terhadap jumlah sel NK pada sel kanker setelah pemberian berbagai dosis fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Pada Tabel 5.2, terlihat semakin besar dosis fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn yang diberikan menyebabkan peningkatan jumlah NK sel yang berfungsi untuk membunuh sel kanker mammae sehingga sel NK berfungsi sebagai sel sitotoksik terhadap sel kanker.

Tabel 5.2. Rerata jumlah sel NK pada sel kanker mammae setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* linn

Perlakuan	Jumlah NKsel
Kontrol negatif	28,70 <sup>a</sup> ± 5,27
Kontrol positif (colcemid 30 mg/kgbb)	20,40 <sup>c</sup> ± 3,68
P0 (alkaloid 0 mg/kgbb)	9,50 <sup>e</sup> ± 2,36
P1 (alkaloid 10 mg/kgbb)	18,20 <sup>c</sup> ± 3,91
P2 (alkaloid 30 mg/kgbb)	21,10 <sup>bc</sup> ± 5,48
P3 (alkaloid 100 mg/kgbb)	23,60 <sup>d</sup> ± 5,39

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



Gambar 5.3. Rerata jumlah sel NK pada sel kanker mammae setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* linn

Setelah dilakukan uji statistik menggunakan anava terhadap jumlah sel NK yang berfungsi sebagai pembunuh sel kanker mammae ternyata antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan semua kelompok perlakuan (P0, P1, P2 dan P3) terdapat perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* linn dan colcemid. Antara kontrol positif dengan

perlakuan P1 tidak ada perbedaan ( $P > 0,05$ ) namun terdapat perbedaan dengan P2 dan P3, sedangkan P2 dan P3 tidak terdapat berbeda ( $p > 0,05$ ). Hal ini berarti bahwa pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* linn pada konsentrasi 10 mg/kgbb memberikan efek yang sama dengan penggunaan colcemid pada konsentrasi 30 mg/kgbb secara *in vivo*, sedangkan pada pemberian konsentrasi 30 mg/kgbb memberikan efek lebih baik daripada kelompok kontrol positif.



Gambar 5.4. Sel NK berwarna ungu

Aktivitas sel NK sering dihubungkan dengan prognosis., terdapat korelasi antara penurunan kemampuan sitotoksitas sel NK dengan metastasis. Peran sel NK yang diaktifkan dengan IL-2 dapat membunuh sel kanker, Sel NK berperan penting dalam mencegah metastasis dengan mengeliminasi sel kanker yang terdapat dalam sirkulasi darah dengan bukti bahwa sel kanker yang dimasukkan secara intravena akan hilang dalam waktu 24 jam pertama yang berhubungan erat dengan sel NK. Sel NK yang diaktivasi dengan cyclophosphamide (Cy) menunjukkan bahwa sel tersebut gagal mencegah metastasis. (Bogler dan Mikkelson, 2005, Freuhauff dkk, 2006 dan Kresno,2008)

Disebut NK sel karena populasi sel ini dapat membunuh sel sasaran secara spontan tanpa sensitisasi terlebih dahulu dan tanpa tergantung dan tidak dikendalikan oleh produk MHC. NK sel juga tidak berinteraksi dengan sel sasaran melalui reseptor T (TCR) seperti sel T. Reseptor untuk MHC diidentifikasi sebagai C type lectin like receptor yang spesifik untuk MHC. Selain itu NK sel juga memiliki reseptor lain yaitu immunoglobulin like receptor yang berfungsi sebagai penghambat pembunuhan sehingga disebut sebagai sel killer inhibitory receptor. NK sel berperan penting untuk pertahanan alamiah terhadap

pertumbuhan sel kanker dan berbagai infeksi seperti virus, tanpa sensitisasi sebelumnya. (Kresno,2008) Sel NK sebagian besar (95%) dapat berfungsi sebagai sel membunuh sel sasaran yang terinfeksi virus dan sel sasaran lain yang dilapisi IgG sehingga sel NK berfungsi sebagai sitotoksik yang tergantung pada antibodi antibody dependent cell mediated cytotoxicity =ADCC). Sel NK mempunyai peran penting dalam melawan kanker walau mekanisme belum diketahui secara pasti. Pada penderita kanker aktivitas sel NK menurun dan penurunannya menunjukkan korelasi dengan stadium penyakit.(Freuhauff dkk, 2006 dan Kresno,2008)

Sel NK dalam melisis sel sasaran (sitolisis) berlangsung beberapa menit dalam 4 tahap yaitu 1) pengikatan sel sasaran 2) aktivasi sel efektor melalui sinyal dan transduksi sinyal 3) melancarkan lethal kit kepada sel sasaran dan 4) pelepasan sel NK dari sel sasaran dan siklus akan berulang. Reseptor sel NK untuk pengikatan pada sel sasaran yaitu pengenalan sel sasaran terjadi melalui reseptor yang mengikat molekul semacam lektin yang disebut NKR-PI. Ligan NKR-PI ini diekspresikan hampir pada semua jaringan normal sehingga perlu ada mekanisme untuk mencegah lisis sel normal ini oleh NK sel. Faktor yang dapat menghambat lisis sel sasaran oleh sel NK yaitu prostaglandin dengan jalan meningkatkan kadar c-AMP (Freuhauff dkk, 2006 dan Kresno,2008)

### 5.3. Pengaruh fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn terhadap sel kanker yang mengalami apoptosis

Pemeriksaan terhadap sel kanker mammae yang mengalami apoptosis pada pemberian berbagai dosis fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.3.

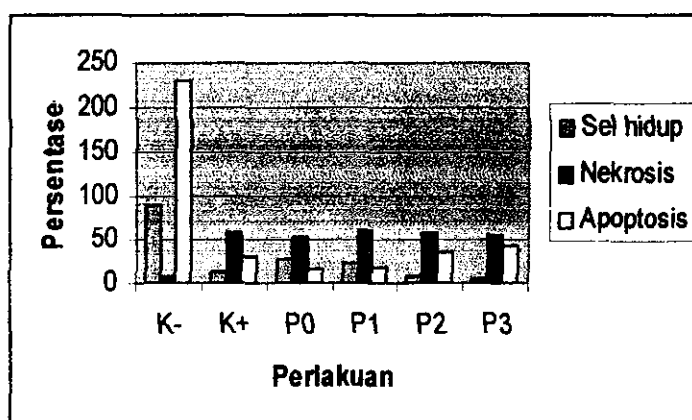
Tabel 5.3. Rerata sel kanker apoptosis setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* Linn

Perlakuan	Sel hidup (%)	Sel nekrosis (%)	Sel apoptosis (%)
Kontrol negatif	90,30 <sup>a</sup> ± 2,75	7,40 <sup>b</sup> ± 2,22	2,30 <sup>d</sup> ± 1,15
Kontrol positif (Cosemid 30 mg/kgbb)	11,50 <sup>c</sup> ± 1,84	57,60 <sup>a</sup> ± 3,02	30,90 <sup>b</sup> ± 2,18
P0 (alkaloid 0 mg/kgbb)	27,80 <sup>b</sup> ± 2,20	53,50 <sup>a</sup> ± 7,23	15,30 <sup>c</sup> ± 2,67
P1 (alkaloid 10 mg/kgbb)	23,50 <sup>b</sup> ± 5,01	59,50 <sup>a</sup> ± 5,03	17,9 <sup>c</sup> ± 1,96
P2 (alkaloid 30 mg/kgbb)	7,80 <sup>cd</sup> ± 2,14	57,80 <sup>a</sup> ± 3,20	34,40 <sup>a</sup> ± 3,86
P3 (alkaloid 100 mg/kgbb)	5,10 <sup>d</sup> ± 0,87	54,10 <sup>a</sup> ± 5,56	41,80 <sup>a</sup> ± 5,47

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

Pada Tabel 5.3, terlihat semakin besar dosis fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn yang diberikan menyebabkan peningkatan persentase sel kanker yang mengalami nekrosis dan apoptosis

Setelah dilakukan uji statistik menggunakan anava terhadap kejadian nekrosis sel kanker antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan semua kelompok perlakuan (P0, P1, P2 dan P3) terdapat perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat kematian sel kanker pada pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* linn dan colcemid. Antara kontrol positif dengan semua perlakuan tidak ada perbedaan yang bermakna ( $P > 0,05$ ). Hal ini berarti bahwa pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* linn mulai dari konsentrasi 0 mg/kgbb sampai 100 mg/kgbb memberikan efek yang sama dengan penggunaan colcemid pada konsentrasi 30 mg/kgbb secara *in vivo*.

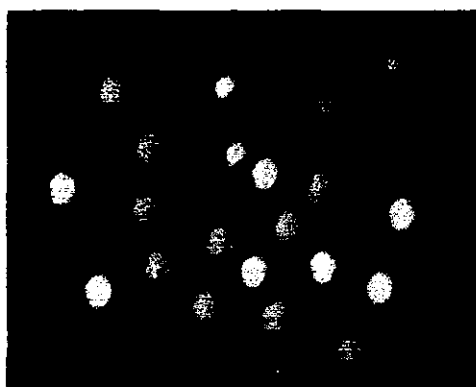


Gambar 5.5. Rerata sel kanker apoptosis setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* linn

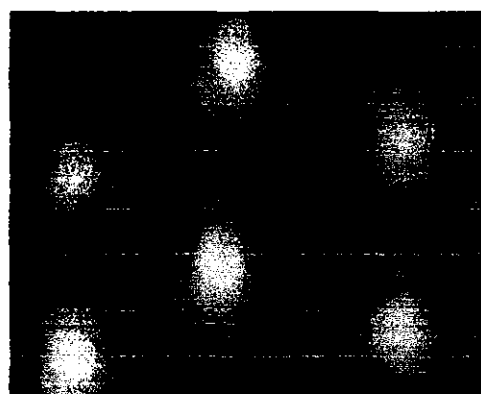
Terhadap kejadian apoptosis sel kanker setelah dilakukan uji statistik menggunakan Anava, antara kontrol negatif dengan kontrol positif dan semua perlakuan (P0, P1, P2 dan P3) terdapat perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ). Hal ini menunjukkan ada pengaruh terjadinya apoptosis sel kanker pada pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* linn maupun pada pemberian colcemid. Antara kelompok kontrol positif dengan P2 dan P3 terdapat perbedaan bermakna ( $p < 0,05\%$ ), namun antara kejadian apoptosis sel kanker pada konsentrasi fraksi alkaloid 30 mg/kgbb dan 100 mg/kgbb tidak terdapat perbedaan ( $p > 0,05$ ).

Pada kontrol negatif terjadi kematian sel melalui mekanisme nekrosis sebesar  $7,40 \pm 2,22\%$  dan apoptosis sebesar  $2,30 \pm 1,15\%$ . Hal ini dapat terjadi pada sel yang normal

yang tumbuh dan berkembang akan selalu terjadi kematian baik secara fisiologis maupun secara patologis. Berdasarkan penelitian hampir jutaan sel didalam tubuh yang sedang tumbuh dan berkembang baik sel muda maupun sel yang tua akan mengalami kematian dengan mekanisme apoptosis yang bersifat fisiologis maupun nekrosis yang bersifat patologis akibat terpapar oleh bahan-bahan kimia, sinar ultraviolet maupun proses mekanisme tubuh yang bersifat respon imun dan kegagalan proses pembelahan sel secara mitosis dan miosis.



Sel hidup berwarna hijau, sel nekrosis berwarna coklat dan sel apoptosis berwarna kuning ditengahnya



Sel mengalami apoptosis

Gambar 5.6. Sel kanker yang mengalami apoptosis dan nekrosis

Kematian sel dapat terjadi melalui proses nekrosis dan apoptosis. Terjadinya kematian sel melalui mekanisme nekrosis dimulai dari adanya pembengkakan sel (degenerasi sel) yang berakibat terganggunya aliran darah kedalam sel atau terganggunya keseimbangan cairan intrasel dan cairan ekstraseluler yang menyebabkan terjadi pembengkakan dan terjadi gangguan dalam penyediaan energi (ATP) yang berasal dari proses metabolisme sehingga berpengaruh pada pembentukan enzim ATPase terutama pada pembentukan Na-K-ATPase sehingga terjadi gangguan fungsi pompa ion Natrium Kalium (Na-K Pump) didalam sel. Akibatnya terjadi penumpukan ion Natrium didalam sel dan peningkatan ion K diluar sel, hal ini yang menyebabkan terjadi pembengkakan sel. Pada keadaan ini sel masih dapat mengalami perbaikan secara reversibel didalam sel dengan mekanisme fisiologis, sel akan berusaha untuk mencapai keseimbangan. Apabila proses gangguan pada pembentukan ATPase berlanjut terus maka akan menyebabkan seluruh organel sel seperti mitokondria, golgi aparatus, lisosom, ribosom, nukleus dan

komponen-komponen didalam nukleus akan mengalami pembengkakan yang mengarah pada kematian sel. Sel akan membengkak dimana seluruh organel sel akan bengkak mencapai optimal. Proses kebengkakan sel yang telah mencapai optimal akan menyebabkan terjadi kebocoran sel, yang diawali adanya kerusakan pada membran sel, selanjutnya sel mengalami lisis dan diikuti dengan nekrosis sel yang ditandai dengan inti sel mengalami piknosis, karioreksis dan kariolisis (Meles, dkk..2004; Yalon dkk, 2004).

Proses nekrosis sel setelah pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dapat terjadi akibat aktivasi dari lisosom. Lisosom didalam sel akan menghasilkan lisozim yaitu enzim yang berfungsi mencernakan membran sel sehingga menyebabkan kerusakan membran sel seperti sel akan pecah, maka semua organel sel termasuk cairan didalam sel akan keluar sehingga sel mengalami reksis berakibat sel lisis dan menyebabkan sel nekrosis (Yalon dkk, 2004).

Proses kematian sel melalui proses apoptosis yakni proses kematian sel yang terjadi secara terprogram tanpa didahului oleh proses pembengkakan pada sel, atau proses peradangan sel. Apoptosis dimulai dari pengkerutan sel dan sel akan pecah yang diikuti pecahnya inti sel dan kromosom yang membentuk suatu badan sel yang disebut dengan *apoptotic bodies* (badan apoptosis). Selanjutnya *apoptotic bodies* akan mengalami lisis dan terserap oleh sel sekitarnya melalui proses fagositosis (Meles, dkk. 2004; Lantuejoul dkk., 2004)

Apoptosis yang terjadi *secara* fisiologis melibatkan peran dan fungsi dari telomer. Telomer adalah suatu protein yang berfungsi melindungi kromosom. Telomer terbentuk dari proses aktivasi enzim telomerase. Adanya hambatan pada pembentukan enzim telomerase akan menyebabkan hambatan pembentukan telomer. Akibatnya kromosom tidak ada yang melindungi sehingga terjadi proses fragmentasi kromosom (pecahnya kromosom), hal ini akan menyebabkan sel mati yang dikenal sel mengalami apoptosis (Freuhauff dkk, 2006 dan Kresno,2008).

#### **5.4. Optical Density Caspase fraksi Alkaloid *Achyranthes aspera linn***

Pembacaan hasil *optical density* dengan ELISA reader pada panjang gelombang 630 nm. Pembacaan *Optical Density* caspase bisa dipakai sebagai patokan apabila *optical density* pada kelompok kontrol <0,2 (Suwarno,2000). *Optical density* caspase yang dibaca melalui reader dari ELISA dinyatakan positif bila sampel memberikan nilai absorban diatas nilai rata-rata kontrol negatif (COV/Cut Of Value). COV ditentukan dengan rata

kontrol negatif ditambah 2-3 simpangan baku ( $X + 2-3 SD$ ), pada penelitian ini adalah 0,191. Terdapatnya caspase pada pemberian berbagai dosis alkaloid *Achyranthes aspera* linn dapat dilihat pada tabel 5.3.

Tabel 5.4. Rerata *Optical density* caspase pada berbagai dosis alkaloid *Achyranthes aspera* Linn

Perlakuan	N	Rentangan	Rerata <i>Optical Density</i>
Kontrol -	8	0,171 - 0,192	0,181 <sup>a</sup> ± 0,005
Kontrol +	8	0,396 - 0,474	0,433 <sup>c</sup> ± 0,036
Alkaloid P0	8	0,279 - 0,387	0,362 <sup>b</sup> ± 0,036
Alkaloid P1	8	0,396 - 0,483	0,432 <sup>c</sup> ± 0,038
Alkaloid P2	8	0,424 - 0,543	0,448 <sup>cd</sup> ± 0,059
Alkaloid P3	8	0,541 - 0,675	0,628 <sup>d</sup> ± 0,068

Nilai dengan superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,01$ )

Berdasarkan hasil pemeriksaan *Optical Density* caspase dengan uji Elisa *indirect* maka diperoleh data bahwa pada perlakuan alkaloid *Achyranthes aspera* linn dosis 10 mg/kgbb sudah menunjukkan *Optical Density* positif adanya caspase yaitu diatas nilai dua kali COV (0,382).

Salah satu proses kematian sel dapat terjadi melalui mekanisme apoptosis dengan melibatkan peran dan fungsi mitokondria. Adanya kerusakan pada mitokondria menyebabkan kematian sel melalui mekanisme apoptosis. Seperti diketahui mitokondria sangat berperan dalam proses reaksi oksidasi dan reduksi sel dalam menghasilkan energi (Adenosin triphosphat =ATP), 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 menyebabkan terjadinya peningkatan enzim caspase terutama caspase-9 yang disebut dengan caspase inisiator. Peningkatan caspase-9 akan merangsang terbentuknya caspase-3 sebagai caspase executor yang menyebabkan pelepasan beberapa enzim endonuclease seperti deoksi ribonuclease (DNase). Peningkatan enzim ini akan menyebabkan terjadinya fragmentasi DNA sehingga terjadi induksi apoptosis pada sel kanker (Lantuejoul dkk., 2004, Freuhauff dkk, 2006 dan Kresno,2008)



### 5.5. Pengaruh fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn terhadap fraksinasi DNA

Akibat pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* Linn berakibat sel kanker mammae mengalami frakmentasi DNA pada gambar 5.7 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) 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 5.7. Fraksinasi DNA sel kanker mammae

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 aktivasi darai caspase inisiator (Caspase 9) selanjutnya Caspase 9 akan bekerjasama dengan Caspase 8 untk membentuk Caspase executor (caspase 3) dan Caspase 3 mengaktivasi enzim DNAase yang selanjutnya anzim DNAase akan mencernakan DNA yang mengakibatkan fragmentasi dari DNA, dan berakibat kematian sel (apoptosis) (Freuhauff dkk,2006, Yalon dkk., 2004).

## BAB 6

### KESIMPULAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

1. Alkaloid *Achyranthes aspera* Linn menyebabkan kematian sel kanker mammae pada mencit sebesar  $88,90 \pm 5,56$  % dengan konsentrasi 30 mg/kgbb
2. Jumlah NK sel pada sel kanker mammae setelah pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* Linn 10 mg/kgbb sebesar  $21,10 \pm 3,91$  %
3. Kematian sel kanker mammae terjadi melalui mekanisme apoptosis sebesar  $34,40 \pm 3,86$  % dan nekrosis sebesar  $57,80 \pm 3,20$  % dengan konsentrasi alkaloid *Achyranthes aspera* linn sebesar 30 mg/kgbb
4. *Optical Density* caspase yang sama dengan kontrol positif pada pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* Linn pada dosis 10 mg/kgbb dengan nilai  $0,432 \pm 0,038$
5. Alkaloid *Achyranthes aspera* Linn menyebabkan fraksinasi DNA secara kualitatif.

#### 6.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian aktivitas alkaloid *Achyranthes aspera* linn penyebab apoptosis sel kanker melalui pendekatan imunologi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Andrew W, D. Vicky, D.Hill, J.Keeseey and S.Manzow. 2002. Sell Death.Apoptosis and Necrosis Proliferation. Boehriger Mannheim.
- Ama dan Faisol, 2005. Masalah Kanker Payudara dan pemecahannya. *Majalah Kesehatan Masyarakat Indonesia*. Tahun XIX. Nomor 1 Maret. Jakarta.
- 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
- Chakraborty,A; A.Brantner; T.Mukainaka,T.Konoshima; H.Tokuda and H.Nishino. 2002. Cancer chemopreventive Activity of *Achyranthes aspera* leaves on Epstein barr Virus Activation ang Two-stage Mouse Skin carcinogenesis. *Cancer Lett*. Mar 8;177(1):1-5
- 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 bliomas. *Clin Cancer Res*.Vol.12.p.4523-32
- Fujiwara,M, H.Kamma, H.Wu, M.Hamasaki, S.kaneko, H.Hriguci,Matsui-Horiguci and M.H.Satoh. 2004. Express and Alternative Splincing Pattern of Human Telomerase Reverse Transcriptase in Human Lung cacer Cells. *J. Oncol*.Apr;24(4): 925-930.
- 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
- 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.
- 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*.

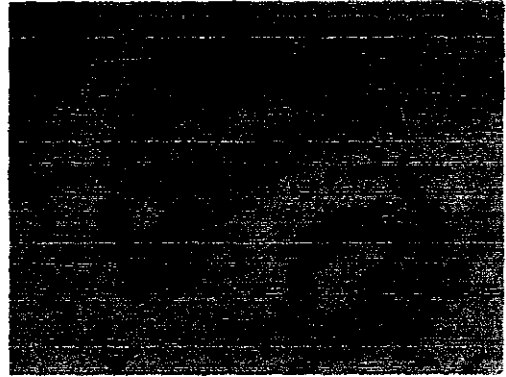
- Meles, D.K, Wurlina dan W. Sastrowardoyo . 2004. Efek Antifertilitas dan Uji reversibilitas Spermatogenik *Achyranthes Aspera* Linn Pada Staging spermatogenesis dalam Upaya Penemuan Obat Kontraspsi. Lemlit Unair.
- Meles,D.K. 2004. Kandungan Bahan Pada Daun *Achyranthes aspera* linn. Lab. Farmakologi.FK. Unair.
- Mitaine A.C; A.Marouf; B.Hanquet; N.Bilirakis;M.A.Lacaille. 2001. Two Triterpenoid and Saponin From *Achyranthes Aspera*.
- 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.
- Reed. J.C.1999. Mechanism of apoptosis avoidance in cancer. *Current opinion oncol.* Vol.11.p.66-75
- Scott.L; R.Alvero; M.Leondires and B. Miller.2000. The Morphology of Human Pronuclear Embryos in Positively Related to Blastocys Development and Implantation. *Hum.Reprod.*5(11)2394-2403.
- Santhanathan,A.H and O.A.Trouson.2000. Mitochondrial Morphology During Preimplantation Human Embryogenesis. *J.Human of Reproduction Suppl.*2 p. 148-159.
- Sutawidja. I.K. 2001. Berbagai Cara Pengobatan Menurut "Lontar Usada" Pengobatan Tradisional Bali. Penerbit Indra Jaya. Singaraja. Bali.
- Tjahjadi dan Gunawan, 2000, *Patologi Tumor Ganas Payudara*, Kursus Singkat Deteksi Dini dan Pencegahan Kanker. 6-8 November. FKUI-POI. Jakarta
- Tjahjadi dan Gunawan, 2006 *Patologi Tumor Ganas Payudara*. Bagian Patologi Anatomi. FKUI. Jakarta.
- Tjindarbumi, 2005. *Diagnosis dan Pencegahan Kanker Payudara*, Kursus Singkat Deteksi Dini dan Pencegahan Kanker. 6-8 November. FKU.II-POI. Jakarta.
- Ward,F; D.Rizos; D.Corrigan; K.Quinn; M. Boland and Leonargan.2001. Paternal Influence on The Time of First Embryonic Cleavage Post Insemination and The Implations for Subsequent Bovine Embryo Development In Vitro and Fertility In Vitro. *Mol.Reprod* 6(1).
- Wurlina dan W. Sastrowardoyo dan D.K. Meles. 2003. Pengaruh Antimitosis *Achyranthes Aspera* Linn Pada Pembelahan Sel Embrio (cleavage) Dalam Upaya Penemuan Obat Antifertilitas Setelah Hubungan Seksual (Post Coital Contaception). Lemlit Unair
- Wurlina dan W. Sastrowardoyo dan D.K. Meles. 2003. Efek Alkaloid *Achyranthes Aspera* Linn Terhadap Pembelahan Sel Embrio (Cleavage) Mencit Secara Invivo. Lemlit. Unair.

- Wurlina dan W. Sastrowardoyo dan D.K. Meles. 2004. Pengaruh Antimitosis Fraksi Kloroform *Achyranthes Aspera* Linn Terhadap Perkembangan sel Embrio Secara Invitro.. Lemlit Unair
- 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. Gambar nodul dan proliferasi sel pada mammae mencit setelah pemberian Benzopirine



Nodul pada mammae mencit



Proliferasi sel mammae



Proliferasi sel mammae



Proliferasi sel mammae

