

TESIS

EKSPRESI PROTEIN p53 DAN *CYCLINE DEPENDENT KINASE* (CDK) PADA KANKER MAMMAE MENCIT SETELAH PEMBERIAN FRAKSI ALKALOID JARONG (*ACHYRANTHES ASPERA LINN*)

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIK



Oleh :

I DEWA PUTU ANOM ADNYANA
NIM : 090810167M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

TESIS

EKSPRESI PROTEIN p53 DAN *CYCLINE DEPENDENT KINASE* (CDK) PADA KANKER MAMMAE MENCIT SETELAH PEMBERIAN FRAKSI ALKALOID JARONG (*ACHYRANTHES ASPERA LINN*)

I DEWA PUTU ANOM ADNYANA

Singaraja - Bali

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

EKSPRESI PROTEIN p53 DAN *CYCLINE DEPENDENT KINASE* (CDK) PADA KANKER MAMMAE MENCIT SETELAH PEMBERIAN FRAKSI ALKALOID JARONG (*ACHYRANTHES ASPERA LINN*)

TESIS

**Untuk Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**I DEWA PUTU ANOM ADNYANA
NIM : 090810167M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
Tanggal 2 September 2010**

Lembar Pengesahan

Tesis yang telah diuji
Pada tanggal 2 September 2010

Oleh :

Pembimbing Ketua



Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, M.Si., drh.
NIP : 131 837 006

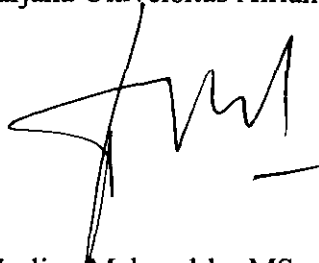
Pembimbing,



Dr. Suherni Susilowati, M.Kes., drh.
NIP : 131 653 764

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Prof. Dr. Wurlina Meles, drh., MS.
NIP. 131257033

Tesis

Tanggal 2 September 2010

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, M.Si., drh.

Anggota : Dr.Suherni Susilowati, M.Kes., drh. ✓

Prof. Dr. Wurlina Meles, MS., drh.

Prof. H. Mas'ud Hariadi, M.Phil. Ph.D., drh.

Dr. Pudji Srianto, M.Kes., drh.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan mengucapkan puji dan syukur kepada Tuhan Yang Maha Kuasa, akhirnya saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini yang merupakan tugas dan kewajiban saya dalam menyelesaikan pendidikan Magister Program Pascasarjana Ilmu Biologi Reproduksi di Universitas Airlangga.

Dalam kesempatan yang berbahagia ini, saya mengucapkan terima kasih yang tidak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

Terima kasih saya sampaikan kepada Yth. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, **Ibu Prof. Hj. Romziah Sidik, drh, Ph.D.**, yang telah memberikan ijin dan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Magister Program Pascasarjana Ilmu Biologi Reproduksi di Universitas Airlangga.

Ibu Dr. Sri Pantja Madyawati, M.Si., drh dan Ibu Dr. Suherni Susilowati, M.Kes., drh. sebagai pembimbing pertama, dan pembimbing kedua kami dengan penuh perhatian dan telah banyak menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk memberikan bimbingan dan saran-saran yang sangat bermanfaat sejak awal saya memasuki Program Pascasarjana sampai saat berakhirnya penyelesaian tesis ini dan mengantarkan saya mencapai sarjana strata 2 (S2) Ilmu Biologi Reproduksi. Terima kasih dan rasa hormat serta penghargaan setinggi - tingginya saya sampaikan kepada Ibu, semoga Tuhan Yang Maha Kuasa senantiasa melimpahkan rahmatnya agar Ibu selalu dalam karuniaNya.

Bapak Prof. Dr. I Dewa Ketut Meles, drh., MS dan Ibu Prof. Dr. Wurlina Meles, drh., MS. yang penuh perhatian, memberikan dorongan, telah banyak menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk membantu dalam penyelesaian

tesis ini, banyak motivasi, nasehat dan bimbingan sejak saya mulai mendaftarkan diri sebagai calon mahasiswa program Magister sampai berakhirnya masa studi ini. Bapak dan Ibu tidak henti-hentinya memberikan dorongan agar secepatnya menyelesaikan tugas sebagai Mahasiswa Program Pascasarjana Ilmu Biologi Reproduksi Universitas Airlangga. Terimakasih dan rasa hormat saya sampaikan, semoga Tuhan Yang Maha Kuasa, senantiasa melimpahkan karuniaNya agar Bapak dan Ibu selalu ada dalam lindunganNya.

Terima kasih saya sampaikan kepada Pemerintah Republik Indonesia melalui Tim Manajemen Program Magister yang telah memberikan bantuan finansial sehingga dapat meringankan beban studi kami untuk segera dapat menyelesaikan tesis ini.

Terima kasih saya sampaikan kepada **seluruh rekan kerja** yang namanya tidak bisa saya sebutkan satu persatu di ***Community Based Avian Influenza Control Project (CBAIC)*** yang didanai oleh ***United States Agency International Development (USAID)*** dan bekerjasama dengan **Palang Merah Indonesia (PMI) Markas Cabang Jawa Timur dan Markas Cabang Jawa Barat** untuk seluruh wilayah kerja di **Jawa Timur dan Jawa Barat** dari tahun **2008, 2009, dan 2010**.

Terima kasih saya sampaikan kepada **Ibu Dewi, Ibu Lia, dan Ibu Neneng** yang telah memberikan bantuan kemudahan dalam peminjaman buku di Perpustakaan Kampus A, Perpustakaan Kampus B, dan Perpustakaan Kampus C Universitas Airlangga.

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada **Drh. Larentius Glen Taufan Kartiko (Dokter Hewan Praktisi), Drh. Lutvin Paramitha Tirnata (Dokter Hewan**

Praktisi), **Drh. Florensia Nailufar** (Dexa Medica Laboratory, Animal Laboratory Division untuk pengembangan obat manusia terbaru), **Patricia Indrayanto, S.Kh.** (Mahasiswa S2 Universiti Sains Malaysia), **Indah Ratna Sari, Apt** (Mahasiswa S2 Farmasi Universitas Airlangga), **Nyoman Lena Mulyati, S.Si** (Mahasiswa S2 Farmasi Universitas Gajah Mada, dan rekan satu penelitian **Sunarni Zakaria, dr., M.Kes.** (Dosen Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Pendidikan Doktor Program Pascasarjana Universitas Airlangga) yang telah memberikan bantuan moril maupun material sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini.

Terima kasih saya sampaikan kepada **Om Ir. Harry Wicaksono dan Tante Rr. Arum Ratna Luckyati, S.E** dorongan moril maupun material sehingga saya dapat menyelesaikan program pendidikan Pascasarjana Universitas Airlangga.

Yang terkasih kedua orang tua saya **Ibunda Drh. Rr. Indah Ratna Wati, dan Ayahanda Drh. I Dewa Nyoman Mantra**, yang telah melahirkan, membesarkan dan mendidik saya, saya sampaikan terima kasih atas semua didikan dan pengorbanan serta doa Ibu dan Ayah berikan kepada saya, untuk saya jadikan teladan dalam menghadapi hidup yang serba sulit ini. Saya hanya bisa berdoa agar Ibu dan Ayah selalu diberi berkah keselamatan, kesehatan, umur yang panjang dan selalu dalam lindungannya. Demikian pula dengan adikku **I Dewa Made Oka Mahendra, S.T.** dan **Cicilia Novarista Sastri, S.T.** terima kasih atas pengertiannya dan dorongan baik moril maupun material sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini.

Terima kasih **Komang Ayu Kosalini Pratiwi, dr.** yang selalu memberikan dorongan moril maupun material sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini serta motivasi yang senantiasa berdoa untuk keberhasilan saya, atas pengertian dan pengorbanannya selama mengikuti pendidikan program Pascasarjana Universitas Airlangga, semangat ya buat ujian PPDS nya, semoga Hyang Widhi memberikan jalan yang terbaik buatmu.

Terima kasih kepada keluarga **Bapak I Wayan Lilir Adinegara, Ibu Anak Agung Anom Puspawati, Putu Ayu Diah Kencana Dewi, Apt., Kadek Ayu Mirah Gayatri, S.E.** atas dorongan moril maupun material sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini serta motivasinya.

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan moril maupun materiil sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan Pascasarjana Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi Universitas Airlangga.

Saya menyadari masih banyak kekurangan dalam tulisan tesis ini, saya berharap agar penelitian ini memberikan manfaat bagi negara dan bangsa serta almamater Universitas Airlangga khususnya dunia pendidikan dan kesehatan.

Surabaya, Agustus 2010

Penulis

RINGKASAN

EKSPRESI PROTEIN p53 DAN *CYCLINE DEPENDENT KINASE* (CDK) PADA KANKER MAMMAE MENCIT SETELAH PEMBERIAN FRAKSI ALKALOID JARONG (*ACHYRANTHES ASPERA LINN*)

I DEWA PUTU ANOM ADNYANA

Tanaman *Achyranthes aspera Linn* yang dikenal dengan nama jarong, jarongan atau remek getih telah digunakan sebagai antikanker terutama kanker payudara dan kanker uterus. Telah dibuktikan secara ilmiah fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera Linn* menyebabkan kematian sel mieloma secara *in vitro* melalui mekanisme apoptosis dan nekrosis. Mekanisme apoptosis yang terjadi, diduga melalui inhibitor gen sel kanker yaitu suppresor gen p53 dan CDK. Sebagai obat antikanker perlu dibuktikan secara *in vivo* bahwa fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera Linn* dapat membunuh sel kanker mammae secara apoptosis melalui ekspresi gen p53 dan CDK dan melindungi sel normal.

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit betina berumur 2 bulan sebanyak 60 ekor yang dibuat menderita kanker mammae dengan menyuntikan benzo(α)pyrene 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 pembedahan 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 1 : kontrol negatif, digunakan mencit sehat, hanya diberi Oilum Olifarum dengan dosis 0,5 cc secara *subkutan* (SC) di 4 daerah posterior sekitar mammae dari 8 daerah mammae mencit, untuk memastikan bahwa bila terjadi efek sitotoksik maka efek ini tidak disebabkan oleh hewan percobaan. Kelompok 2 : digunakan mencit yang menderita kanker mammae mencit yang hanya diberi pelarut bahan uji CMC Na 0,5 % dengan dosis 0,5 cc secara per oral sebagai perlakuan 1 (P1). Kelompok 3: digunakan mencit yang menderita kanker mammae mencit mendapat alkaloid *Achyranthes aspera Linn* dengan dosis 10 mg/kgbb sebesar 0,5 cc secara per oral (P2). Kelompok 4 : digunakan mencit yang menderita kanker mammae mencit diberi alkaloid

Achyranthes aspera Linn dengan dosis 30 mg/kgbb sebesar 0,5 cc secara per oral (P3). Kelompok 5 : digunakan mencit yang menderita kanker mammae mencit diberi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dengan dosis 100 mg/kgbb sebesar 0,5 cc secara per oral (P4). Kelompok 6 : kontrol positif, digunakan mencit yang menderita kanker mammae mencit diberi obat antikanker standar Cyclophosphamide 6 mg/kgbb sebesar 0,5 cc secara per oral. Semua kelompok diberi perlakuan 8 minggu dengan interval 3 hari sambil dilakukan pengamatan terhadap benjolan mammae mencit. Parameter yang diamati melalui pembedahan sel kanker mammae adalah : 1.) Persentase jumlah (viabilitas) sel kanker mammae mencit, 2.) Persentase jumlah sel NK, 3.) Jumlah sel kanker mammae mencit yang mengalami apoptosis dan nekrosis, 4.) Jumlah ekspresi protein p53 pada sel kanker mammae mencit 5.) Jumlah ekspresi *cyclin dependent kinase* (CDK) pada sel kanker mammae mencit.

Hasilnya adalah fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn menyebabkan kematian sel kanker mammae pada mencit sebesar $91,50 \pm 2,27$ %, Jumlah sel NK pada sel kanker mammae setelah pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn sebesar $6,77 \pm 0,42$ %, Kematian sel kanker mammae terjadi melalui mekanisme apoptosis sebesar $37,90 \pm 1,66$ % dan nekrosis sebesar $56,20 \pm 1,03$ %, Jumlah ekspresi protein gen p53 sebesar $63,50 \pm 1,78$, Jumlah ekspresi enzim CDK sebesar $18,70 \pm 2,54$.

Kesimpulan adalah fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn pada dosis 100 mg/kgbb berat badan yang diberikan pada mencit yang menderita kanker mammae dapat meningkatkan sel NK, sel apoptotic bodies, sel yang nekrosis, dan protein gen p53 serta menurunkan viabilitas sel kanker mammae, dan enzim CDK. Pada uji toksisitas fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn merupakan bahan yang sangat aman digunakan dalam pengobatan.

SUMMARY

EXPRESSION OF P53 PROTEIN AND CYCLINE DEPENDENT KINASE (CDK) ON MICE BREAST CANCER GIVEN ALKALOID FRACTION JARONG (ACHYRANTHES ASPERA LINN)

I DEWA PUTU ANOM ADNYANA

Achyranthes aspera Linn plants known as jarong, jarongan or remek getih has been used as anticancer especially breast cancer and uterine cancer. It has been scientifically proven alkaloid fraction of leaves of *Achyranthes aspera* Linn caused the death of myeloma cells in vitro through the mechanisms of apoptosis and necrosis. Mechanisms of apoptosis that occurred, allegedly through the inhibitor of cancer cell gene p53 and CDK genes suppressor As an anti-cancer drugs need to be proven in vivo that the alkaloid fraction of leaves of *Achyranthes aspera* Linn can kill cells by apoptosis of mammary cancer through gene expression of p53 and CDK and protect normal cells.

This research used female mice aged 2 months were 60 tails that were made to suffer by the hypodermic mammary cancer benzo(α)pyrene with a dose of 10 mg / kg subcutaneously around mammary intervals for 8 weeks with injections of 3 days. Occurrence of mammary cancer in mice proved to have a lump on the macroscopic and microscopic mammary via dissection of mammary cells that have experienced proliferation. Mice were divided into six groups so that each group consisted of 10 rats. These groups were as follows: Group 1: negative control, used healthy mice, were given only *Oilum Olifarum* with 0.5 cc dose was sub cutaneous (SC) in four regions around the posterior mammary from eight mice mammary region, to ensure that if there effect the cytotoxic effect was not caused by animal experiments. Group 2 : used mice mammary cancer in mice given only the test material solvent Na 0.5% CMC at a dose of 0.5 cc was given orally as a control treatment 1 (P1). Group 3: mice used mouse mammary cancer alkaloid *Achyranthes aspera* Linn received a dose of 10 mg / kg at 0.5 cc in per oral (P2). Group 4: used mice that were given mouse mammary cancer alkaloid *Achyranthes aspera* Linn with a dose of 30 mg / kg at 0.5 cc in per oral (P3). Group 5: used mice that were given mouse mammary cancer

alkaloid *Achyranthes aspera* linn with a dose of 100 mg / kg at 0.5 cc in per oral (P4). Group 6: positive control, used mice mammary cancer of mice given a standard anticancer drug cyclophosphamide 6 mg / kg at 0.5 cc in per oral. All groups were treated 8 weeks with intervals of three days as he made observations on the mouse mammary lumps. Parameters observed through a dissection mammary cancer cells were: 1.) Percentage of total (viability) mouse mammary cancer cells, 2.) Percentage of NK cells, 3.) Amount mouse mammary cancer cells that undergo apoptosis and necrosis, 4.) Total p53 protein expression in mouse mammary cancer cells 5.) Total expression of cyclin dependent kinase (CDK) in mouse mammary cancer cells.

The result was the alkaloid fraction of leaves of *Achyranthes aspera* Linn cause death in mice mammary cancer cells by $91.50 \pm 2.27\%$, Number of NK cells in mammary cancer cells after administration of the alkaloid fraction of leaves of *Achyranthes aspera* Linn amounted to $6.77 \pm 0.42\%$, deaths mammary cancer cells occurs through the mechanism of apoptosis of $37.90 \pm 1.66\%$ and necrosis amounted to $56.20 \pm 1.03\%$, Number of p53 gene protein expression of 63.50 ± 1.78 , Total expression of enzymes CDK 18.70 ± 2.54 .

The conclusion was the alkaloid fraction of leaves of *Achyranthes aspera* Linn at a dose of 100 mg / kg body weight given to mice suffering from mammary cancer could increase NK cells, apoptotic bodies cell, necrosis cell, p53 gene protein and lower the viability, and CDK enzymes. In the toxicity test of the alkaloid fraction of leaves of *Achyranthes aspera* Linn was a very safe material used in medicine.

ABSTRAK**EKSPRESI PROTEIN p53 DAN *CYCLINE DEPENDENT KINASE* (CDK) PADA KANKER MAMMAE MENCIT SETELAH PEMBERIAN FRAKSI ALKALOID JARONG (*ACHYRANTHES ASPERA LINN*)****I DEWA PUTU ANOM ADNYANA**

Secara empiris dan secara ilmiah daun *Achyranthes aspera linn* digunakan untuk mengobati kanker terutama kanker payudara dan kanker servik. Terbukti secara ilmiah fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera linn* menyebabkan kematian sel mieloma sesuai dengan mekanisme apoptosis dan nekrosis yang berhubungan dengan protein suppresor gen p53 dan enzim cycline dependent kinase.

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit betina usia 2 bulan sebanyak 60 ekor yang dibuat menderita kanker mammae dengan benzo(α)pyrene dengan dosis 10 mg/kgbb daerah sekitar mammae secara subkutan 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 pembedahan mammae yaitu terdapat sel yang mengalami proliferasi. Mencit dibagi menjadi 6 kelompok sehingga masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor. Kelompok: kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif cyclophosphamide 6 mg/kgbb, kelompok perlakuan P1, P2, P3 dan P4 diberikan alkaloid *Achyranthes aspera linn* secara terus menerus dengan dosis CMC Na 0,5% (0 mg/kgbb), 10 mg/kgbb; 30 mg/kgbb dan 100 mg/kgbb. Semua kelompok mendapat perlakuan setiap 3 hari selama 8 minggu. Parameter diamati dengan imunohistokimia untuk melihat jumlah ekspresi protein p53 dan jumlah ekspresi Cycline Dependent Kinase (CDK).

Hasil penelitian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* menyebabkan peningkatan jumlah ekspresi protein p53 dan penurunan jumlah ekspresi enzim CDK yang signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

Kesimpulan adalah fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera Linn* pada dosis 100 mg/kgbb berat badan yang diberikan pada mencit yang menderita kanker mammae dapat meningkatkan sel NK, sel apoptotic bodies, sel yang nekrosis, dan

protein gen p53 serta menurunkan viabilitas sel kanker mammae, dan enzim CDK. Pada uji toksisitas fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn merupakan bahan yang sangat aman digunakan dalam pengobatan.

Kata kunci : *Achyranthes aspera* linn, breast cancer, p53 protein, Cycline Dependent Kinase

ABSTRACT

EXPRESSION OF P53 PROTEIN AND CYCLINE DEPENDENT KINASE (CDK) ON MICE BREAST CANCER GIVEN ALKALOID FRACTION JARONG (*ACHYRANTHES ASPERA LINN*)

I DEWA PUTU ANOM ADNYANA

Empirically and scientifically *Achyranthes aspera linn* leaf is used to treat cancer, particularly breast cancer and cancer cervic. Scientifically proven alkaloid fraction of leaves *Achyranthes aspera linn* cause of death in accordance with the mechanism of myeloma cell apoptosis and necrosis associated with p53 gene and protein suppressor cycline dependent kinase enzymes.

This research used animal experiment female mice aged 2 months were 60 tails that were made to suffer mammary cancer by benzo(α)pyrene with a dose of 10 mg/kgbw subcutaneously mammary area for eight weeks with injections of 3 days interval. Occurrence of mammary cancer in mice proved to have a lump on the macroscopic and microscopic mammary via dissection of mammary cells that have experienced proliferation. Mice were divided into six groups so that each group consisted of 10 rats. Groups: negative control group, positive control group of cyclophosphamide 6 mg/kgbw, the treatment group P1, P2, P3 and P4 are given alkaloid *Achyranthes aspera linn* continuous dose of Na 0.5% CMC (0 mg/kgbw), 10 mg/kgbw; 30 mg/kgbw and 100 mg/kgbw. All groups received treatment every third day for eight weeks. The parameters were observed with immunohistochemistry to see the amount of p53 protein expression and total expression Cycline Dependent Kinases (CDK).

The results of this study *Achyranthes aspera linn* alkaloids caused an increase in the amount of p53 protein expression and a decreased in the number of significant expression of CDK enzymes between control and treatment groups.

The conclusion was the alkaloid fraction of leaves of *Achyranthes aspera Linn* at a dose of 100 mg / kg body weight given to mice suffering from mammary cancer could increase NK cells, apoptotic bodies cell, necrosis cell, p53 gene protein and

lower the viability, and CDK enzymes. In the toxicity test of the alkaloid fraction of leaves of *Achyranthes aspera* Linn was a very safe material used in medicine.

Keyword : *Achyranthes aspera* linn, breast cancer, p53 protein, Cycline Dependent Kinase

DAFTAR ISI

Halaman

SAMPUL DALAM.....	i
PERSETUJUAN.....	ii
PENETAPAN PANITIA PENGUJI.....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
RINGKASAN.....	xii
SUMMARY.....	xiv
ABSTRAK.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
DAFTAR ISI.....	xix
DAFTAR TABEL.....	xxii
DAFTAR GAMBAR.....	xxiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxv
DAFTAR SINGKATAN.....	xxvi
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	8
1.3. Tujuan Penelitian.....	8
1.3.1. Tujuan Khusus Penelitian.....	8
1.3.2. Tujuan Umum Penelitian.....	9
1.4. Manfaat Penelitian.....	9
1.4.1. Manfaat Keilmuan.....	9
1.4.2. Manfaat Praktis.....	10
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	11
2.1. Tanaman <i>Achyranthes aspera</i> Linn.....	11
2.1.1. Tanaman Obat Indonesia.....	11
2.1.2. Penyebaran Tanaman <i>Achyranthes aspera</i> Linn.....	11
2.1.3. Morfologi Tanaman <i>Achyranthes aspera</i> Linn.....	12
2.1.4. Klasifikasi Tanaman <i>Achyranthes aspera</i> Linn.....	13
2.1.5. Nama Lokal <i>Achyranthes aspera</i> Linn.....	13
2.1.6. Khasiat dari Tanaman <i>Achyranthes aspera</i> Linn.....	13
2.1.7. Kandungan Zat Kimia <i>Achyranthes aspera</i> Linn.....	14
2.2. Alkaloid Tanaman.....	14
2.3. Cyclophosphamide.....	16
2.4. Benzo(α)pyrene.....	17
2.5. Penyakit Kanker.....	20
2.6. Obat AntiKanker.....	22
2.7. Tinjauan Induksi Apoptosis Melalui Ekspresi Protein p53 dan ekspresi <i>Cycline Dependent Kinase</i> (CDK).....	24
2.8. Tinjauan Tentang Tumor Gen Suppressor (p53) Dalam pengobatan Kanker.....	27

2.9. Natural Killer	31
2.10. Tinjauan Tentang Mencit	34
2.10.1. Klasifikasi Mencit	34
2.10.2. Kelenjar Mammae Mencit Betina	34
2.11. Tinjauan Viabilitas Sel	34
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	36
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian	36
3.2. Hipotesis Penelitian	39
BAB 4 METODE PENELITIAN	40
4.1. Rancangan Penelitian	40
4.2. Tempat Penelitian dan Waktu Penelitian	40
4.2.1. Tempat Penelitian	40
4.2.2. Waktu Penelitian	40
4.3. Variabel Penelitian	40
4.3.1. Klasifikasi Variabel Penelitian	40
4.3.2. Definisi Operasional Variabel	42
4.3.2.1. Fraksi Alkaloid Daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn ..	42
4.3.2.2. Jumlah Persentase Viabilitas Sel	42
4.3.2.3. Jumlah Sel NK	42
4.3.2.4. Proses Nekrosis dan Apoptosis	43
4.3.2.5. Jumlah Ekspresi Protein p53	43
4.3.2.6. Jumlah Ekspresi CDK	44
4.4. Materi Penelitian	44
4.4.1. Bahan Penelitian	44
4.4.2. Alat Penelitian	45
4.5. Prosedur Penelitian	46
4.5.1. Pembuatan Fraksi Alkaloid	46
4.5.2. Eksplorasi Dosis	46
4.5.3. Persiapan Hewan Coba	47
4.5.4. Pembuatan Mencit Menderita Kanker Mammae ..	47
4.5.5. Perlakuan Hewan Coba	48
4.5.6. Pewarnaan Viabilitas Sel Kanker Mammae	49
4.5.7. Cara Menghitung Sel Dengan Hemositometer	50
4.5.8. Pengambilan Organ dan Pembuatan Sediaan Histologis Mammae	51
4.5.9. Tahapan Pemeriksaan Protein p53 dan CDK Menggunakan Metode Imunohistokimia	52
4.5.10. Menghitung Persentase Sel Apoptosis dan Nekrosis pada sel kanker mammae	53
4.6. Peubah yang Diamati	53
4.7. Analisis Data	54

BAB 5	HASIL PENELITIAN.....	56
5.1.	Viabilitas Sel Kanker Mammae Mencit Setelah Pemberian Fraksi Alkaloid Daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn.....	56
5.2.	Pemberian Fraksi Alkaloid Daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn Terhadap Sel NK Pada Sel Kanker Mammae Mencit	60
5.3.	Pemberian Fraksi Alkaloid Daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn Terhadap Jumlah Sel Apoptosis dan Sel Yang Mengalami Nekrosis Pada Sel Kanker Mammae Mencit	63
5.4.	Pemberian Fraksi Alkaloid Daun <i>Achyranthes Aspera</i> Linn Pada Sel Kanker Mammae Mencit Terhadap Jumlah Protein Gen p53	66
5.5.	Pemberian Fraksi Alkaloid Daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn Pada Sel Kanker Mammae Mencit Terhadap Jumlah Enzim CDK	68
BAB 6	PEMBAHASAN	70
6.1.	Viabilitas Sel Kanker Mammae Mencit Setelah Pemberian Fraksi Alkaloid Daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn.....	70
6.2.	Fraksi Alkaloid Daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn Terhadap Sel NK Pada Sel Kanker Mammae Mencit.....	71
6.3.	Fraksi Alkaloid Daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn Yang Dapat Menyebabkan Apoptosis dan Nekrosis Pada Sel Kanker Mammae Mencit	74
6.4.	Fraksi Alkaloid Daun <i>Achyranthes Aspera</i> Linn Pada Sel Kanker Mammae Mencit Terhadap Protein Gen p53 ..	77
6.5.	Fraksi Alkaloid Daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn Pada Sel Kanker Mammae Mencit Terhadap Jumlah Enzim CDK	79
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN.....	81
	Kesimpulan	81
	Saran.....	81
DAFTAR PUSTAKA	82
LAMPIRAN	100

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1. Senyawa PAH yang bersifat karsinogenik dan faktor potensi relatif karsinogenitasnya.....	19
5.1. Rerata dan Standard Deviasi Viabilitas pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian fraksi alkaloid daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn	56
5.2. Rerata dan Standard Deviasi jumlah Sel NK setelah pemberian fraksi alkaloid daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn.....	60
5.3. Rerata dan Standard Deviasi Sel Hidup, Sel Nekrosis dan Sel Apoptosis setelah pemberian fraksi . alkaloid daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn	63
5.4. Rerata dan Standard Deviasi Protein p53 pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian fraksi alkaloid daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn	66
5.5. Rerata dan Standard Deviasi enzim CDK pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian fraksi alkaloid daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn	68

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Tanaman <i>Achyranthes aspera</i> Linn.umur 1 minggu (kiri) dan umur 2 bulan	11
2.2. Morfologi tanaman <i>Achyranthes aspera</i> Linn	12
(1) Daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn	12
(2) Batang <i>Achyranthes aspera</i> Linn	12
(3) Kuntum bunga yang telah mekar	12
(4) Tanaman <i>Achyranthes aspera</i> Linn	12
2.3. Rumus bangun cyclophosphamide.....	16
2.4. Rumus bangun benzo(α)pyrene	18
3.1. Skema kerangka Konseptual	39
4.1. Skema kerangka operasional penelitian	55
5.1. Histogram rerata viabilitas sel kanker mammae mencit setelah pemberian ekstrak fraksi alkaloid daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn	58
5.2. Viabilitas sel kanker mammae mencit setelah pemberian ekstrak fraksi alkaloid daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn.....	58
5.3. Proliferasi sel kanker mammae mencit (adanya banyak inti sel dalam satu lobus, sedangkan yang normal inti sel hanya terdapat satu pada masing – masing lobus	59
5.4. Histogram rerata Sel NK pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian ekstrak fraksi alkaloid daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn	62
5.5. Sel NK sebagai sel sitotoksik (sel berwarna ungu).....	62
5.6. Histogram rerata hidup, nekrosis, dan apoptosis pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian ekstrak fraksi alkaloid daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn.....	65
5.7. Sel kanker yang mengalami apoptosis dan nekrosis.....	65
5.8. Histogram rerata p53 pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian ekstrak fraksi alkaloid daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn	67
5.9. Ekspresi protein p53 pada kanker mammae mencit.....	67

5.10. Histogram rerata enzim CDK pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian ekstrak fraksi alkaloid daun <i>Achyranthes aspera</i> Linn	69
5.11. Ekspresi enzim CDK pada kanker mammae mencit.....	69

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Susunan nilai gizi pakan tikus dan mencit	91
2. Perhitungan Dosis Benzo(α) pyrene, Chyclophosphamide dan CMC Na 0,5 %.....	92
3. Pembuatan Sediaan Histologis.....	95
4. Foto-foto penelitian.....	96
5. Data-data viabilitas sel kanker mammae mencit.....	101
6. Data-data jumlah protein gen p53 sel kanker mammae mencit....	101
7. Data-data jumlah protein gen CDK sel kanker mammae mencit..	102
8. Data-data presentase apoptosis sel kanker mammae mencit	103
9. Data-data jumlah Sel NK pada sel kanker mammae mencit.....	105
10. Analisis Menggunakan SPSS 14 for Windows.....	108
11. Analisis statistik dengan anava satu arah dan LSD pada viabilitas sel kanker mammae mencit.....	110
12. Analisis Statistik dengan ANAVA Satu Arah dan LSD pada protein Gen p53 sel kanker mammae Mencit.....	113

DAFTAR SINGKATAN

ANOVA	: Analisis Varian
AO	: Acridin Orange
APAF	: Aktivasi Faktor Apoptosis
ATP	: Adenosin Triphosphat
Bax	: Bcl-2 associated protein X
BID	: Protein BID
BP	: Benzo(α)pyrene
CBAIC	: Community Based Avian Influenza Control
CDK	: Cycline Dependent Kinase
CMC Na 0,5%	: Carboxyl Methyl Cellulosa Natrium 0,5%
CTLs	: Cytotoxic T Lymphocytes
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
EB	: Ethidium Bromide
gtBID	: Granzyme Truncated form of BID
HB	: Hemoglobin
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HTS	: High Throught Screening
IARC	: International Agency for Research on Cancer
IL-2	: Interleukin-2
kDa	: Kilodalton
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
LSD	: Least Significant Difference
MHC I	: Mayor Histocompatibility Complex I
Myc	: Protein myc
NCI	: National Cancer Institute
NK cells	: Natural Killer Cells
P<0,05	: Probabilitas<0,05, maka H ₀ ditolak
PAH	: Polisiklik Aromatis Hidrokarbon
PO	: Per Oral
PUSVETMA	: Pusat Veterinaria Farma
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
RB	: Retinoblastoma
RNA	: Ribonucleic Acid
SC	: Sub Cutan
SD	: Standard Deviasi
tBID	: Truncated form of BID
USAID	: United States Agency International Development
USEPA	: United States Enviromental Protection agency
WHO	: World Health Organization

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kanker adalah massa jaringan abnormal, yang tumbuh berlebih, dan tidak terkoordinasi, dan pertumbuhan demikian terus berlanjut walaupun rangsangan hilang (Putra, 1997). Dilaporkan bahwa kanker merupakan penyebab kematian kedua tertinggi di Amerika Serikat, setelah penyakit jantung. Angka mortalitas akibat kanker di Amerika Serikat mencapai lebih dari 500.000 orang tiap tahunnya, dimana 50% diantaranya disebabkan oleh kanker payudara, paru-paru, prostat, kolon, dan rektum (Peterson, 2006).

World Health Organization (WHO) secara resmi menyatakan 8 – 9 % wanita akan mengalami kanker payudara. Kanker payudara merupakan penyebab utama kematian pada wanita akibat kanker. Setiap tahun di Eropa lebih dari 250.000 kasus baru kanker payudara terdiagnosa dengan jumlah kematian sebesar 165.000 sedangkan di Amerika Serikat jumlah kematian sebesar 44.000 dari 175.000 kasus baru kanker payudara yang terdiagnosa dan sekitar 50 % pasien mengalami kanker payudara stadium akhir dan hanya bertahan hidup 18 – 30 bulan. Pada tahun 2000 diperkirakan 1.200.000 wanita didiagnosis kanker payudara dan 700.000 meninggal. Setiap tahunnya di Amerika Serikat 44.000 pasien meninggal karena kanker payudara sedangkan di Eropa lebih dari 165.000. Setelah menjalani perawatan, jumlah penderita menjadikan kanker payudara sebagai jenis kanker yang paling banyak ditemui dan menyebabkan kematian pada

wanita (Sukardiman, 2000). Berdasarkan data dari Departemen Kesehatan, penderita kanker baru di Indonesia mencapai 200.000 orang tiap tahunnya, dan prevalensi penderita penyakit kanker di seluruh dunia diperkirakan akan terus meningkat pada tahun-tahun mendatang (Dalimartha, 2003).

Hingga saat ini, upaya pengobatan penyakit kanker masih menjadi persoalan bagi dunia kedokteran modern, dikarenakan oleh tingkat keberhasilannya yang masih sangat rendah. Berbagai metode pengobatan telah lama dikembangkan, namun demikian belum satupun diantaranya yang dapat direkomendasikan sebagai metode yang paling tepat. Pengobatan dengan cara radiasi atau kemoterapi misalnya, dianggap masih terlalu berbahaya, karena selain membunuh sel-sel kanker, kedua metode tersebut juga rawan mencederai bahkan membunuh sel-sel yang normal. Metode lain seperti dengan cara immuno terapi, pembedahan dan endokrinoterapi juga belum sepenuhnya memberikan hasil yang signifikan (Gao *et al.*, 2000).

Penelitian dan pengembangan obat-obat baru untuk penyakit kanker yang ideal, yaitu yang mampu membunuh sel kanker tanpa membahayakan sel normal terus diupayakan, salah satunya melalui penelitian terhadap manfaat berbagai tanaman obat. Salah satu obat antikanker yang berasal dari tanaman yang banyak dimanfaatkan masyarakat adalah *Achyranthes aspera* Linn. WHO secara resmi menyarankan, bahkan mensponsori penelitian untuk menemukan obat-obat baru asal tanaman (terutama tanaman tropis), untuk penyembuhan penyakit kanker. Beberapa alasan pemanfaatan tanaman obat tersebut antara lain adalah karena ketersediaannya yang berlimpah di alam, biaya produksi yang relatif murah, serta

toksitas yang rendah. Menurut Koosnadi (2000) pada dasarnya pemerintah telah berupaya mengembangkan obat tradisional agar dapat diterima dalam sistem kesehatan formal sejak tahun 1985 melalui pendekatan fitoterapi yang dalam perjalanan selanjutnya berubah menjadi fitofarmaka. Hal ini dipertegas dengan dikeluarkannya Permenkes 760/Per/IX/1992 dan pedoman pelaksanaannya yang tertuang dalam SK Menkes 761/Menkes/SK/IX/1992.

Melalui teknik *High Throught Screening* (HTS), yaitu suatu metode yang digunakan untuk menentukan bahan aktif dari tanaman, terdapat 22 jenis tanaman asli Indonesia yang diketahui memiliki potensi sebagai obat antikanker, dimana salah satunya adalah *Achyranthes aspera* Linn, atau yang umumnya dikenal dengan nama tanaman jarong, jarongan atau remek getih yang biasa digunakan sebagai antikanker pada payudara dan kandungan (Sukardiman, 2000).

Achyranthes aspera Linn diketahui mengandung berbagai macam bahan aktif, diantaranya adalah alkaloid akirantin dan betain, terpenoid, saponin, rannose, glukosa, galaktosa, reilosa, hentriacontan, α spinasterol, β sitosterol, cryopenol, dibuthyl phthalate, asam palmitat, α spinasterol-3- β -D glikosida, daukosterol, ecdysterol, Achyranthoside E dan F (Mardisiswojo dan Kusuma, 1968; Wei *et al.*, 1997; Ida dkk., 1998; Gao *et al.*, 2000; Mitaine *et al.*, 2001; Chakraborty *et al.*, 2002).

Potensi antikanker dari *Achyranthes aspera* Linn, diduga terkait dengan bahan alkaloid yang terkandung didalamnya. Ekstrak metanol dari daun *Achyranthes aspera* Linn, dilaporkan mempunyai aktivitas antimitosis dengan menghambat pembelahan sel dan proliferasi (Gao *et al.*, 2000).

Alkaloid daun *Achyranthes aspera linn* telah berhasil dipisahkan dengan metode kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis melalui pemeriksaan *high performance liquid chromatography* (HPLC) dalam konsentrasi 97,56%. (Meles, 2006, Meles, 2007). Ekstrak daun *Achyranthes aspera linn* mempunyai efek antimitosis yaitu menghambat pembelahan dan perkembangan sel embrio mencit dan tikus (Wurlina dan Sastrowardoyo, 2002, Wurlina dkk., 2003, Wurlina, 2006), menghambat pembelahan dan pertumbuhan sel spermatogenik (Meles dkk., 2004, Meles, 2006). Alkaloid tanaman tersebut sebagai antimitosis sel kanker mammae berhenti pada metafase (Wurlina dkk., 2004, Wurlina, 2005, Anom, 2006) dan sebagai anti telomerase sel kanker mammae (Fujiwara *et al.*, 2004, Wurlina, 2006). Alkaloid sebagai antimitosis dan antitelomerase mempunyai kemampuan mengikat tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus dengan menghambat atau memblokir polimerisasi protein ke dalam mikrotubulus sehingga terjadi penghancuran dari mikrotubulus berakibat sel akan berhenti membelah sehingga akan diikuti dengan terjadinya kematian sel (apoptosis).

Proses apoptosis berbeda dari nekrosis yang merupakan bentuk manifestasi program kematian sel. Nekrosis adalah proses pasif disintegrasi sel, sedangkan apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram dengan mekanisme proses aktif yang membutuhkan energi, sel tersebut aktif dalam proses destruksi, karena apoptosis merupakan proses yang membutuhkan energi, maka ATP intraseluler yang berperan apakah satu sel neuron akan mengalami proses apoptosis atau nekrosis (Kerr *et al.*, 1972)

Penelitian yang dilakukan oleh Silalahi pada tahun 2006 yang hasilnya dikutip oleh Wurlina (2009) menyebutkan bahwa ada tiga kelompok utama gen yang terlibat dalam regulasi pertumbuhan sel yaitu proto-onkogen, gen penekan tumor (tumor suppressor gen = TSG) dan *gatekeeper*. Pro-onkogen menstimulasi dan meregulasi pertumbuhan dan pembelahan sel. Gen penekan tumor biasanya menghambat pertumbuhan sel atau menginduksi apoptosis. Kelompok gen ini dikenal sebagai anti-onkogen karena berfungsi melakukan kontrol negatif (penekanan) pada pertumbuhan sel.

Levine (1979) menemukan p53 pertama kali yang dikenal sebagai protein 53 kilodalton (kDa). Hal ini dihubungkan dengan protein *transforming large T antigen* dari virus simian 40. Menemukan bahwa protein 53-kDa mengalami ekspresi berlebih tidak hanya pada *murine SV40 transformed cells* tapi juga dalam sel karsinoma *uninfected embryonic*. Mapping peptida dari protein 53 menunjukkan hasil identik pada *cell lines* yang berbeda, tapi berbeda dari *map peptida SV40 large-T antigen*. Pada tahun 1980 p53 diketahui sebagai *oncogene*, sebab ketika dikombinasikan dengan ras klon p53 menunjukkan kemampuan transformasi seluler. Akhir tahun 1980 akhirnya menjadi jelas bahwa klon p53 adalah mutan dan p53 *wild type* (wt) (normal) kenyataannya adalah tumor *suppressor gen*. Eksperimen yang menunjukkan kontransfeksi dari plasmid yang mengkode p53 wt menurunkan kemampuan transformasi dari plasmid yang mengkode p53 dan diaktivasi oleh gen Ha-ras, dan pada perkembangan selanjutnya p53 mengatur

siklus sel *checkpoint* yang bertanggung jawab pada kerusakan DNA. (<http://www.lifesciences.napier.ac.uk>).

Penelitian yang dilakukan oleh Silalahi pada tahun 2006 yang hasilnya dikutip oleh Wurlina (2009) gen p53 juga berfungsi mendeteksi kerusakan DNA dan menginduksi reparasi DNA. Gen *gatekeeper* berfungsi mempertahankan integritas genom dengan mendeteksi kesalahan pada genom dan memperbaikinya. Mutasi pada gen-gen ini dapat menyebabkan kelainan siklus sel yang 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.

Pengendalian apoptosis dihubungkan dengan gen yang mengatur siklus sel, termasuk di antaranya gen p53, Rb, myc, Bcl-2 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 (Perkins, 1997).

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 (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 menstimulasi terbentuknya Aktivasi faktor apoptosis 1 (APAF 1). Akibat perubahan ini akan terjadi aktivasi caspase 3 yang merupakan caspase eksekutor yang berasal dari caspase inisiator (Caspase 9) yang bekerjasama dengan caspase 8. Aktivasi caspase 3 akan menyebabkan enzim DNA ase yang berlebihan yang berakibat terjadinya fragmentasi DNA yang menyebabkan kematian sel dalam bentuk apoptosis (Yalon *et al.*, 2004 Meles dkk, 2006).

Sebagai obat antikanker perlu dibuktikan secara *in vivo* bahwa fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn dapat membunuh sel kanker mammae secara apoptosis melalui ekspresi gen p53 dan ekspresi *cyclin dependent kinase* (CDK) dan dapat melindungi sel normal.

Mencit menderita kanker mammae dengan menyuntikkan Benzo(α) pyrene 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 mencit dan secara mikroskopis sel kanker mammae yaitu terdapat sel yang mengalami proliferasi.

Berdasarkan uraian diatas maka penelitian ini membuktikan fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn dapat membunuh sel kanker mammae mencit secara *in vivo* terhadap jumlah ekspresi protein p53 dan jumlah ekspresi CDK.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

- a. Apakah fraksi alkaloid yang terkandung dalam daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) mempunyai efek viabilitas terhadap sel kanker mammae mencit ?
- b. Apakah fraksi alkaloid yang terkandung dalam daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) mempunyai efek terhadap jumlah sel NK ?
- c. Apakah fraksi alkaloid yang terkandung dalam daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) pada sel kanker mammae mencit secara *in vivo* mempunyai efek terhadap proses nekrosis dan apoptosis ?
- d. Apakah fraksi alkaloid yang terkandung dalam daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) pada sel kanker mammae mencit secara *in vivo* mempunyai efek terhadap jumlah ekspresi protein p53 dan jumlah ekspresi CDK ?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini meliputi tujuan khusus dan tujuan umum :

1.3.1. Tujuan Khusus Penelitian

1. Membuktikan fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera linn* mempunyai efek menghambat pertumbuhan sel kanker mammae mencit dengan melihat viabilitas sel
2. Membuktikan fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera linn* mempunyai efek meningkatkan jumlah sel NK yang berfungsi sebagai limfosit T sitotoksik

3. Untuk membuktikan bahwa fraksi alkaloid yang terkandung dalam daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) pada sel kanker mammae mencit secara *in vivo* mempunyai efek terhadap proses nekrosis dan apoptosis
4. Untuk membuktikan bahwa fraksi alkaloid yang terkandung dalam daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) pada sel kanker mammae mencit secara *in vivo* mempunyai efek terhadap apoptosis melalui ekspresi protein p53 dan ekspresi CDK

1.3.2. Tujuan Umum Penelitian

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek fraksi alkaloid dari daun *Achyranthes aspera Linn* dalam menghambat pertumbuhan sel kanker mammae mencit secara apoptosis melalui ekspresi protein p53 dan ekspresi CDK.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini :

1.4.1. Manfaat Keilmuan

Induksi fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera Linn* merupakan inhibitor pertumbuhan sel kanker mammae mencit secara *in vivo* melalui jumlah ekspresi protein p53 dan ekspresi CDK sebagai penyebab terjadinya kematian sel kanker melalui mekanisme apoptosis, yang dimasa mendatang dapat digunakan untuk mengganti gen yang rusak melalui "*suicide gen therapy*" pada penyakit kanker mammae.

1.4.2. Manfaat Praktis

1. Induksi fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn dapat menghambat pertumbuhan sel kanker mammae mencit secara apoptosis melalui ekspresi protein p53 dan CDK dan dapat melindungi sel normal sehingga dapat diketahui bagaimana mekanisme peningkatan jumlah sel kanker dan apoptosis, protein gen p53 dan *natural killer* (NK) sel.
2. Sebagai obat antikanker dengan harga murah mengingat tanaman *Achyranthes aspera* Linn merupakan tanaman asli yang banyak tumbuh di Indonesia.
3. Sebagai swasembada dalam penyediaan bahan baku obat antikanker yang selama ini masih import dari luar negeri.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman *Achyranthes aspera* Linn

2.1.1. Tanaman Obat Indonesia

Indonesia sebagai daerah tropis kaya akan tanaman yang bermanfaat baik sebagai sayuran maupun juga sebagai bahan obat. Pemanfaatan tanaman sebagai bahan obat di Indonesia telah dilakukan sejak dahulu terutama sebagai bahan obat tradisional. Keuntungan jika menggunakan tanaman sebagai bahan baku obat antara lain murah, bahan bakunya mudah diperoleh, dan dapat disiapkan sendiri (Syamsuhidayat, 1994). *Achyranthes aspera* Linn merupakan salah satu jenis tanaman obat Indonesia.



Gambar 2.1. Tanaman *Achyranthes aspera* Linn umur 1 minggu (kiri) dan umur 2 bulan (Wurlina, 2000)

2.1.2. Penyebaran Tanaman *Achyranthes aspera* Linn

Penyebaran *Achyranthes aspera* Linn sangat luas termasuk di daerah tropis dan daerah beriklim sedang. Tanaman ini merupakan tanaman asli Indonesia yang tumbuh secara liar di pekarangan rumah maupun di ladang yang cukup dapat air dan sinar matahari. (Hembing dkk., 1996).

2.1.3. Morfologi Tanaman *Achyranthes aspera* Linn

Tanaman *Achyranthes aspera* Linn juga telah tercatat dalam kitab suci Ayurveda dan ilmu pengobatan Cina dan merupakan salah satu jenis tanaman di Indonesia yang termasuk famili Amaranthaceae. Tergolong mudah tumbuh dan tingginya sampai 1 meter, daunnya oval sampai elips memanjang, tebal, dan duduk berhadapan, bertangkai warna hijau berbentuk bulat telur sungsang sampai lonjong dengan pangkal daun menyempit, tepi daun rata dan agak bergelembung dengan tulang daun menyirip, tenda bunga berwarna hijau, bunga tumbuh diujung tangkai antar percabangan berbentuk tandan seperti tangkai padi, kuntum bunga hijau dengan bulir bulat keras dan tajam, buah berbentuk tong berbiji satu (Mardisiswojo dan Kusuma., 1968, Hembing dkk., 1996).



(1)

(2)

Gambar 2.2. Morfologi tanaman *Achyranthes aspera* Linn

(1) Daun *Achyranthes aspera* Linn

(2) Batang *Achyranthes aspera* Linn

2.1.4. Klasifikasi Tanaman *Achyranthes Aspera Linn*

Menurut inventaris tanaman obat Indonesia Departemen Kesehatan 1997 tanaman *Achyranthes aspera Linn* diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Caryphyllates
Suku	: Amaranthaceae
Marga	: Achyrantes
Jenis	: <i>Achyranthes aspera Linn</i>

2.1.5. Nama Lokal *Achyranthes aspera Linn*

Tanaman ini dikenal dengan berapa nama antara lain : jarong, jarong lalaki, daun sangketan, nyarang, remek getih (Jawa), sui in sui, sangko hidung (Sulawesi), rai rai dodinga (Maluku), pulutan, remak getih (Bali), dao kou cao, niu xi (China) dan tanaman ini memiliki sinonim *Centrostachys aspera, Standl;* *Cyathula geniculata, Lour;* *Desmochaeta repens, Llanos.* (Heming., 1996).

2.1.6. Khasiat Dari Tanaman *Achyranthes Aspera Linn*

Bagian dari tanaman *Achyranthes aspera Linn* yang digunakan untuk pengobatan maupun pencegahan terhadap penyakit adalah seluruh bagian tanaman termasuk daun yang digunakan untuk mengobati demam, panas, malaria, batuk, disentri, enteritis, pharingitis, radang amandel, radang paru-paru (pneumonia), gondongen, radang sendi (reumatik arthritis), infeksi ginjal, batu ginjal, nyeri saat

mentruasi (dysmenorrheal), memperlancar persalinan dan kencing darah (Hembing dkk., 1996).

2.1.7. Kandungan Zat Kimia *Achyranthes Aspera* Linn

Kandungan zat kimia yang terkandung adalah alkaloid akirantin dan betain, terpenoid, saponin, ramnose, glukosa, galaktosa, reilosa, hentriacontan, α spinasterol, β sitosterol, cryopenol, dibutyl phthalate, asam palmiat, α spinasterol-3- β -D glikosida, daukosterol, ecdysterol, achyranthoside E dan F (Mardisiswojo dan Kusuma, 1968; Wei *et al.*, 1997; Ida *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2000; Mitaine *et al.*, 2001; Chakraborty *et al.*, 2002).

2.2. Alkaloid Tanaman

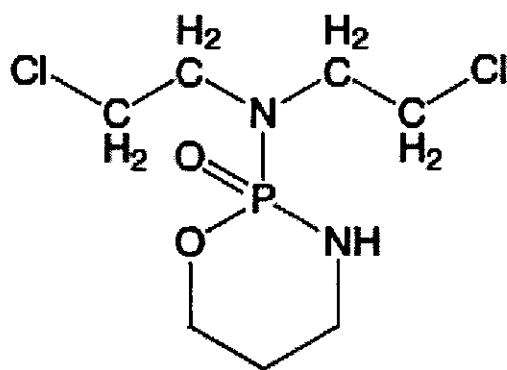
Alkaloid tanaman sebagai antimitosis dapat bekerja berbeda-beda sesuai dengan jenis tanaman. Pada vinca alkaloid tanaman bekerja spesifik pada siklus pembelahan sel dengan menghambat pembelahan mitosis serta mempunyai kemampuan mengikat tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus dengan menghambat atau memblokade polimerisasi protein ke dalam mikrotubulus sehingga terjadi penghancuran (*disolusi*) dari mikrotubulus menjadi kristal-kristal kecil, dimana setiap 1 mol tubulin terikat oleh 1 mol vinca alkaloid. Hal ini menyebabkan gangguan fungsi mikrotubulus yang berperan dalam proses mitosis dan penghentian pembelahan sel pada stadium metafase, dengan tidak terbentuknya benang-benang mitosis (*mitotic spindels*) yang utuh menyebabkan kromosom masuk dalam sitoplasma sehingga kromosom menjadi bergerombol (*clump*) seperti bola atau bintang yang disebut dengan *explode mitotic*.

Mikrotubulus berfungsi membentuk benang-benang mitosis dan berperan untuk pergerakan sel, phagositosis dan transportasi makanan dan hasil metabolisme dalam sel. Pada alkaloid Paklitaxel mempunyai hambatan mitosis pada siklus pembelahan sel yang berbeda dengan vinca alkaloid yaitu menghambat sintesis mikrotubulus dengan mengikat beta tubulin yang spesifik untuk sintesis mikrotubulus. Paklitaxel diketahui mengantagonisir perbaikan protein sitoskeleton yang menyebabkan terbentuknya simpul-simpul atau pembundelan pada mikrotubulus dan gangguan dari struktur mikrotubulus yang diikuti dengan penghentian mitosis. Paklitaxel juga diketahui menghambat sintesis DNA secara progresif (Chabner *et al.*, 2001). Alkaloid lain yang juga menghambat siklus sel adalah epidophylotoxin atau etoposide yang diisolasi dari daun tanaman mandrake (*Podophyllum peltatum*) sejenis pohon pepaya. Alkaloid tanaman ini tidak menghentikan proses mitosis tetapi akan membentuk kompleks dengan enzim topoisomerase II dan DNA. Kompleks ini menyebabkan rusaknya *double helix* pada DNA. Diketahui ekstrak tanaman ini terutama bekerja pada siklus sel pada fase S dan fase G2 sedangkan alkaloid Camptothecin bekerja mengikatkan diri pada enzim topoisomerase I yaitu suatu enzim yang berfungsi pada supercoiled DNA yang berperan pada proses replikasi, rekombinasi, repair dan transkripsi (Chabner *et al.*, 2001; Choudhury, 2004).

Obat yang mempunyai efek antimitosis diduga juga mempunyai efek antitelomerase yang dapat menghambat pembelahan dan perkembangan sel yang sangat cepat seperti sel kanker dan berakibat terjadi kematian sel (apoptosis) (Gao *et al.*, 2000).

2.3. Cyclophosphamide

Cyclophosphamide ($C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$) merupakan suatu alkylator dan turunan dari nitrogen mustard dengan nama generik untuk Endoxan, Cytosan, Neosar, Procytox, Revimmune, juga dikenal sebagai cytophosphane yang tidak berbau berbentuk bubuk kristal putih dengan bobot molekular 261,1 dan titik didih $49,5^{\circ}C - 53^{\circ}C$. Cyclophosphamide mudah larut dalam air dan ethanol dan agak sulit larut dalam benzene, ethylene glycol, carbon (IARC, 1981; HSDB, 2003). Cyclophosphamide adalah golongan kemoterapi untuk mengobati berbagai jenis kanker dan beberapa penyakit autoimun yang memiliki efek samping seperti kerontokan, mual, muntah, dan infertilitas. Sering digunakan pada pengobatan kanker misalnya pulmonal (paru), mammary, kanker rahim, lymphogranulomatosis, lymphosarcoma, sel retikulum, leukimia & multiple myeloma. Dimana kemasan per tablet 80 - 240 mg/m² permukaan badan (2-6 mg/kg berat badan), dalam dosis terbagi secara oral selama 14 hari setiap 28 hari. sebagai dosis tunggal pada interval 10-20 hari.

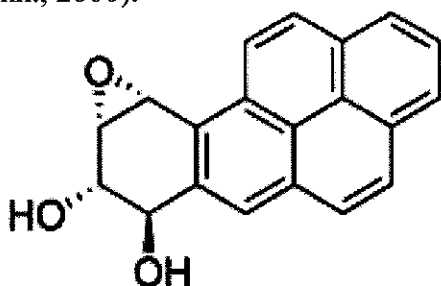


Gambar 2.3. Rumus bangun cyclophosphamide
(Food and Drug Administration, 2003)

2.4. Benzo(α)pyrene

Benzo(α)pyrene (BP) merupakan senyawa Polisiklik Aromatis Hidrokarbon (PAH), yang banyak terdapat dalam asap rokok, gas buangan kendaraan bermotor, asap dari proses pembakaran bahan bakar organik, makanan yang diasap atau dipanggang dan bersifat *prokarsinogenik* kuat. PAH merupakan kelompok senyawa yang memiliki berat molekul besar, berbentuk datar, dan memiliki struktur dengan banyak cincin aromatik. Senyawa ini banyak terdapat di alam sebagai polutan hasil pembakaran bahan-bahan organik, baik dalam bentuk partikel padat ataupun gas. Hingga saat ini terdapat lebih dari 100 jenis PAH yang telah diidentifikasi, baik yang berbentuk jarum, piringan, kristal, lembaran atau prisma, serta dari tidak berwarna, berwarna kuning pucat, hingga kuning keemasan. Sifat kelarutan setiap jenis senyawa PAH juga bervariasi, namun sebagian besar senyawa PAH bersifat kurang larut dalam etanol dan larut atau sedikit larut dalam asam asetat, benzena, dan aseton. Beberapa senyawa PAH bersifat larut dalam minyak mineral dan minyak nabati, namun jenis PAH ini tidak larut dalam dietil eter, petroleum eter, dan air. Sebagai senyawa karsinogen, BP dapat menimbulkan *mutasi gen* yang dapat dimanifestasikan sebagai kerusakan kromosom, yaitu terjadi aberasi atau terbentuk patahan – patahan kromosom. pada tahap telofase, fragmen kromosom dan atau massa kromatin dalam sel akan tertinggal pada sitoplasma membentuk struktur menyerupai inti sel dengan diameter antara 1/20 sampai 1/5 diameter inti yang dinamai mikronukleus (Noor Cholies, 1982).

Banyak senyawa-senyawa aromatik, termasuk PAH, yang bersifat karsinogenik. Hal ini berdasarkan sifatnya yang hidrofobik (tidak suka akan air), dan tidak memiliki gugus metil atau gugus reaktif lainnya untuk dapat diubah menjadi senyawa yang lebih polar. Akibatnya senyawa PAH sangat sulit diekskresi dari dalam tubuh dan biasanya terakumulasi pada jaringan hati, ginjal, maupun adiposa atau lemak tubuh. Dengan struktur molekul yang menyerupai basa nukleat (adenosin, timin, guanin, dan sitosin), molekul PAH dapat dengan mudah menyisipkan diri pada untaian DNA. Akibatnya fungsi DNA akan terganggu dan apabila kerusakan ini tidak dapat diperbaiki dalam sel, maka akan menimbulkan penyakit kanker (Elisabeth, dkk., 2000), didalam tubuh, Benzo(α)pyrene juga dapat berinteraksi dengan hemoglobin (Hb), yang merupakan protein pengangkut oksigen pada sel darah merah. Karena itu keberadaan Benzo(α)pyrene dalam tubuh dapat dideteksi melalui darah atau urin. Namun hasil deteksi ini tidak dapat menggambarkan atau memprediksi sampai seberapa jauh tingkat konsumsi atau kontaminasi Benzo(α)pyrene pada seorang individu (Elisabeth, dkk., 2000).



Gambar 2.4. Rumus bangun benzo(α)pyrene
(Food and Drug Administration, 2003)

Diantara banyak jenis senyawa PAHs, ada 15 jenis yang diketahui bersifat karsinogenik (penyebab kanker). Salah satunya, Benzo(α)pyrene, telah

diidentifikasi sebagai senyawa PAHs yang memiliki sifat karsinogenik tinggi, karena dapat membentuk kompleks dengan DNA secara permanen dan menyebabkan mutasi pada gen. Pada tabel.3.1. berikut ini tertera jenis-jenis senyawa PAH yang bersifat karsinogenik dan masing – masing nilai faktor potensi relatifnya dapat menyebabkan penyakit kanker dengan Benzo(α)pyrene yang digunakan sebagai acuan (Elisabeth, dkk., 2000).

Tabel 3.1. Senyawa PAH yang Bersifat Karsinogenik dan Faktor Potensi Relatif Karsinogenitasnya (Elisabeth, dkk., 2000).

No	Jenis Senyawa	Klasifikasi sifat Karsinogenitasnya		Faktor potensi relatif
		USEPA ¹⁾	IARC ²⁾	
1	Benzo(α)anthracene	B2	2A	0,1
2	Benzo(b)fluoranthene	B2	2B	0,1
3	Benzo(j) fluoranthene	NA	2B	NA
4	Benzo(k) fluoranthene	B2	2B	0,01
5	Benzo(α)pyrene	B2	2A	1
6	Dibenzo(a,h)acridine	D	3	NA
7	Dibenzo(a,j)acridine	D	3	NA
8	Dibenzo(a,h)anthracene	B2	NA	1
9	7H-Dibenzo(c,g)carbazole	D	3	NA
10	Dibenzo(a,e)pyrene	D	3	NA
11	Dibenzo(a,h)pyrene	D	3	NA
12	Dibenzo(a,i)pyrene	D	3	NA
13	Dibenzo(a,l)pyrene	D	3	NA
14	Indeno(1,2,3-cd)pyrene	B2	2B	0,1
15	5-Methylchrysene	B2	3	NA

Keterangan:

¹⁾ US Enviromental Protection agency

²⁾ International Agency for Research on Cancer

B2 dan 2A : Karsinogenik bagi manusia (terbukti secara in vivo)

2B : Dapat bersifat karsinogenik bagi manusia (non genotoxic carcinogen atau mekanismenya belum jelas)

D dan 3 : Belum diklasifikasikan

NA : Data tidak tersedia

2.5. Penyakit Kanker

Kanker adalah massa jaringan abnormal, yang tumbuh berlebih, dan tidak terkoordinasi, dan pertumbuhan demikian terus berlanjut walaupun rangsangan hilang (Putra, 1997). Dilaporkan bahwa kanker merupakan penyebab kematian kedua tertinggi di Amerika Serikat, setelah penyakit jantung. Angka mortalitas akibat kanker di Amerika Serikat mencapai lebih dari 500.000 orang tiap tahunnya, dimana 50% diantaranya disebabkan oleh kanker payudara, paru-paru, prostat, kolon, dan rektum (Peterson, 2006).

Penelitian yang dilakukan oleh Tjindarbumi (2000), dan Tjindarbumi (2002) yang hasilnya dikutip oleh Wurlina (2009) 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.

Penelitian yang dilakukan oleh Tjindarbumi (2005) yang hasilnya dikutip oleh Wurlina (2009) 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%.

Penelitian yang dilakukan oleh Tjahyadi dan Gunawan (2005) yang hasilnya dikutip oleh Wurlina (2009) kanker payudara sering ditemukan di seluruh dunia dengan insidens relatif tinggi, 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. Kejadian 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 2.000.000 dan 460.000 di antaranya meninggal antara 1990-2000. 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.

Penelitian yang dilakukan oleh Tjindarbumi (2005) yang hasilnya dikutip oleh Wurlina (2009) kanker leher rahim dan kanker payudara tetap menduduki tempat teratas, namun kanker payudara merupakan kanker terbanyak sesudah kanker leher rahim, lebih dan 70% penderita kanker payudara ditemukan pada stadium lanjut.

Penelitian yang dilakukan oleh Ama dan Faizol (2005) yang hasilnya dikutip oleh Wurlina (2009) 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 *et al.*, 2000). Tolak ukur keberhasilan pengobatan kanker payudara dilihat dari ketahanan hidup 5 tahun. Faktor yang mempengaruhi prognosis dan ketahanan hidup penderita kanker payudara adalah besar tumor, status kelenjar getah bening regional, pembengkakan kulit, status menopause, perkembangan sel tumor, adanya tumor sisa, jenis patologinya dan metastase, terapi, serta reseptor estrogen, umur dan besar payudara.

2.6. Obat AntiKanker

Obat antikanker diharapkan memiliki toksisitas selektif yaitu obat spesialisik, memiliki batas keamanan yang sempit. Penggunaannya pun bervariasi tergantung kondisi pasien dan jenis kanker. Pengobatan bisa bersifat sangat intensif atau hanya bersifat suportif (Nafrialdi, 1995). Umumnya antikanker menekan proliferasi sel dan menimbulkan toksisitas karena ikut menghambat pertumbuhan sel-sel normal yang proliferasinya cepat seperti sumsum tulang, epitel germinativum, mukosa saluran pencernaan dan jaringan limfosit. Hal ini disebabkan antikanker tersebut membunuh sel kanker melalui jalur nekrosis yang dapat menimbulkan inflamasi dan melibatkan sekelompok sel yang lain (Yalon *et al.*, 2004).

Kemoterapi akhir-akhir ini menjadi salah satu terobosan dalam pengendalian kanker, meskipun penemuan dan pemakaian kemoterapi menunjang hasil yang bagus tetapi toksisitas dan efek sampingnya sangat besar (Siswandono, 1983). Tujuan utama kemoterapi kanker adalah merusak sel kanker secara selektif sel tumor yang berbahaya tanpa mengganggu sel normal. Tujuan ini sering mengalami kegagalan. Obat antikanker hendaknya membunuh sel kanker melalui

antimitosis dan antitelomerase dengan menginduksi apoptosis. Kematian sel karena induksi apoptosis tidak menyebabkan inflamasi dan hanya melibatkan satu atau sekelompok sel (*cluster*) (Zhou *et al.*, 2004).

Mekanisme kerja antikanker pada umumnya merupakan gangguan pada proses dalam sel. Antara lain sebagai berikut (Nafrialdi, 1995)

1. Alkilator

Alkilator bekerja dengan cara membentuk ion karbonium atau kompleks lain yang sangat reaktif. Efek sitotoksik diperoleh dengan terbentuknya alkilasi DNA. Sehingga terjadi kerusakan fungsi DNA. Contoh alkilator : mustar nitrogen.

2. Antimetabolit

Senyawa-senyawa yang termasuk antimetabolit mengambil atau menggantikan senyawa purin, pirimidin ataupun folat dalam proses pembentukan nukleosida. Peristiwa ini secara langsung ataupun tidak langsung dapat menghambat perkembangan sel bahkan menyebabkan kematian sel. Contoh senyawa antimetabolit adalah merkapurin (antipurin), 5-fluorourasil (antipirimidin), dan metotreksat (antagonis folat).

3. Produk Tanaman

Produk tanaman yang telah dimanfaatkan sebagai antikanker adalah golongan alkaloid vinca, yaitu vinblastin dan vincristin yang berasal dari tanaman *Vinca rosea*. Mekanisme kerjanya dengan mengikat tubuli dan menghambat pembentukan komponen mikrotubuli pada kumparan mitosis

sehingga metafase berhenti. Produk tanaman lain adalah podophyllotoxin yang berasal dari tanaman *Podophyllum peltatum*, kolchisin yang berasal dari tanaman *Colchicum autumnale* Linn

4. Antibiotik

Antrasiklin, aktinomisin, dan bleomisin adalah antibiotik yang dapat mengganggu fungsi DNA. Interaksi antibiotik ini dengan enzim P450 dapat membentuk radikal bebas yang dapat membunuh sel kanker.

2.7. Tinjauan Induksi Apoptosis Melalui Ekspresi Protein p53 Dan Ekspresi *Cycline Dependent Kinase* (CDK)

Apoptosis adalah proses alamiah yang dialami oleh semua sel dan alasan sel melakukan apoptosis adalah 1) apoptosis diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan sel, jaringan, atau organ; 2) apoptosis untuk menghancurkan sel-sel yang dianggap membahayakan bagi integritas organisme itu sendiri, seperti sel yang terinfeksi oleh virus atau sel dengan kerusakan DNA maupun sel kanker. (Nagata, 1997; Yalon *et al.*, 2004). Apoptosis adalah mekanisme spesifik kematian sel yang terkontrol, *sinergy dependent*, yang 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 di sekitar sel, seperti terkena bahan toksik (Nagata, 1997).

Kematian sel dapat terjadi melalui nekrosis dan apoptosis. Terjadinya nekrosis sel didahului dengan adanya pembengkakan sel (degenerasi). Pembengkakan sel tampak bila sel tidak mampu mempertahankan homeostasis ion dan cairan. Pembengkakan sel terjadi sebagai akibat pergeseran air ekstraseluler ke dalam sel. Pembengkakan sel mengakibatkan jejas yang bersifat reversible (Andrew *et al.*, 2002; Yalon *et al.*, 2004). Pembengkakan sel yang akut dan bersifat irreversible dipengaruhi hipoksi dan iskemi. Hipoksi yang berlanjut dapat menyebabkan gangguan dalam penyediaan energi ATP. Gangguan dalam pembentukan ATP akan berpengaruh pada enzim ATP-ase terutama pada pembentukan Na-K-ATPase sehingga terjadi gangguan fungsi pompa ion Natrium Kalium (Na-K *Pump*) didalam sel. Hal ini menyebabkan gangguan fungsi pompa natrium dan kalium dalam sel. Akibat penumpukan ion Natrium di dalam sel dan peningkatan ion Kalium di luar sel akan menyebabkan proses pembengkakan sel bertambah. Jika diikuti jejas iskemi menyebabkan organel sel termasuk mitokondria, golgi aparatus, lisosom dan ribosom akan mengalami pembengkakan. Pembengkakan ini dapat menyebabkan kematian sel. Terjadinya proses pembengkakan sel yang berlanjut menyebabkan organel di dalamnya ikut membengkak yang berakibat kerusakan membran. Selanjutnya sel akan mengalami lisis dan diikuti dengan nekrosis sel yang ditandai dengan inti sel alami pinoksis, karioreksis dan kariolisis (Andrew *et al.*, 2002; Yalon *et al.*, 2004).

Proses nekrosis sel dapat pula terjadi karena aktivitas dari lisosim. Lisosom dalam sel akan menghasilkan lisozim yaitu enzim yang berfungsi

mencernakan membran sel. Hal ini akan menyebabkan kerusakan membran sel seperti mitokondria, ribosom, golgi aparatus termasuk cairan didalam sel akan keluar sehingga sel akan mengalami reksis yang diikuti dengan lisis sel. Hal ini akan menyebabkan nekrosis sel (Andrew *et al.*, 2002; Yalon *et al.*, 2004).

Proses kematian sel akibat adanya apoptosis yaitu kematian sel secara terprogram tanpa didahului oleh proses pembengkakan pada sel atau proses peradangan sel. Proses apoptosis dimulai dengan adanya proses pengkerutan sel, selanjutnya sel akan pecah dan diikuti dengan pecahnya ini sel. Proses pemecahan sel yang diikuti dengan pecahnya inti sel dan kromosom yang membentuk suatu badan sel disebut *apoptotic bodies*, selanjutnya *apoptotic bodies* akan mengalami lisis dan terserap oleh sel sekitar melalui proses *fagositosis* (Lantuejoul *et al.*, 2004).

Proses apoptosis pada sel dapat terjadi melalui proses fisiologi maupun proses patologi. Proses apoptosis yang terjadi secara fisiologis melibatkan peran dan fungsi telomer. Telomer adalah suatu protein yang berfungsi melindungi kromosom. Telomer terbentuk dari aktivasi enzim telomerase. Adanya hambatan pada pembentukan enzim telomerase akan menyebabkan hambatan pembentukan telomer sehingga kromosom pecah dan sel akan mati (Andrew *et al.*, 2002; Lantuejoul *et al.*, 2004). Proses kematian sel melalui mekanisme apoptosis yang bersifat patologis dapat terjadi aktivasi dari protein kinase C (PKC). PKC akan mengaktifasi suatu protein (p53) yang ada di dalam inti sel. Selanjutnya protein P53 akan mempengaruhi proses transkripsi p21. Terbentuknya protein p21 akan menyebabkan hambatan pembentukan enzim *cyclin dependent kinase* (CDK)

termasuk CDK1, CDK2, CDK4 dan CDK6. CDK berfungsi mengikat protein cyclin. Adanya hambatan pada pembentukan semua enzim cyclin menyebabkan protein cyclin menjadi inaktif akibatnya proses siklus sel yang melibatkan proses sintesis DNA pada fase S dan proses sintesis RNA dan G2 serta proses mitosis sel yang terjadi pada fase M akan terhenti sehingga, sel tidak akan mengalami pembelahan dan sel akan mati karena kondensasi kromosom yang menyebabkan terjadinya apoptosis (Andrew *et al.*, 2002 ; Yalon *et al.*, 2004). Mekanisme lain terjadinya apoptosis adalah adanya peningkatan aktivitas protein p53 yang akan mengaktivasi protein Bax. Protein Bax akan merangsang mitokondria untuk memproduksi Cytokrom C. Cytokrom C yang berlebihan akan merangsang terbentuknya apoptosis. Aktivasi faktor apoptosis 1 (APAF1) akan menyebabkan aktivasi caspase inisiasi (caspase 9). Caspase 9 ini bekerjasama dengan caspase 8 untuk menstimulir terbentuknya caspase executor (caspase 3) dan caspase 3 akan mengaktivasi enzim DNA-ase yang selanjutnya enzim DNA-ase akan mencernakan DNA sehingga akan mengakibatkan fragmentasi dari DNA. Adanya fragmentasi dari DNA menyebabkan kematian sel dalam bentuk apoptosis (Yalon *et al.*, 2004).

2.8. Tinjauan Tentang Tumor Gen Suppressor (p53) Dalam Pengobatan Kanker

Kanker adalah suatu penyakit yang berhubungan dengan pertumbuhan sel tubuh yang tidak normal, cepat, dan tidak terkendali, dimana sel yang tak terkendali ini juga menyebabkan kerusakan jaringan tubuh yang sehat lainnya. Terdapat lebih dari 200 jenis kanker yang sudah diketahui, dimana kanker dapat muncul di setiap jenis organ tubuh dengan sifat ganas atau jinak (Putra, 1997).

Kanker menempati urutan pertama penyebab kematian di Negara Kanada dan menempati urutan kedua penyebab kematian di Negara Amerika Serikat. Hasil diagnosa setiap tahun Di Amerika Serikat lebih dari 1,2 juta dan di Kanada lebih dari 132 ribu penderita baru kanker, dan lebih dari 1.700 orang meninggal setiap tahun di Amerika Serikat dan Kanada tanpa diketahui penyebabnya (Peterson, 2006).

Persentase penderita kanker berbeda berdasarkan jenis kelamin, suku bangsa dan daerah. Sebagai contoh : Penduduk Amerika Serikat suku Afrika lebih banyak menderita kanker daripada suku lain. Secara global penduduk Amerika Serikat 3 kali lipat lebih mudah terkena kanker daripada penduduk Itali Walaupun kanker menyerang setiap jenjang umur dari anak-anak hingga orang tua, tetapi pada umumnya jenis kanker tertentu hanya menyerang orang yang berumur di atas 50 tahun. Kanker biasanya tumbuh secara perlahan dalam beberapa tahun yang diakibatkan oleh faktor lingkungan yang kompleks, faktor diet makanan, tingkah laku dan faktor keturunan (Sukardiman, 2000).

Menurut Nafrialdi (1995), kanker adalah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multipikasi dan fungsi homeostasis lainnya pada organisme multiseluler. Sifat umum dari kanker adalah sebagai berikut : 1) Pertumbuhan berlebihan umumnya berbentuk tumor, 2) Gangguan diferensiasi dari sel dan jaringan sehingga mirip jaringan mudigah, 3) Bersifat invasif, mampu tumbuh di jaringan sekitarnya (perbedaaan pokok dengan jaringan normal), 4) Bersifat metastatik, menyebarkan pertumbuhan baru, 5) Memiliki hereditas bawaan (*acquired heredity*), yaitu turunan sel kanker

juga dapat menyebabkan kanker, 6) Pergeseran metabolisme ke arah pembentukan makromolekul dari nukleosida dan asam amino serta peningkatan katabolisme karbohidrat untuk energi sel.

Faktor penyebab kanker belum dapat diketahui dengan pasti. Salah satunya berasal dari pemaparan suatu senyawa yang berlangsung secara terus menerus dalam jangka waktu lama, disebut dengan senyawa karsinogen. Senyawa karsinogen dapat menimbulkan pertumbuhan sel normal menjadi sel kanker. Senyawa karsinogen berupa zat kimia dan radiasi dari beberapa senyawa radioaktif misalnya sinar ultraviolet dan sinar X. Senyawa kimia misalnya benzo (a) piren, 2-naftilamin, zat warna azo, aflatoksin, dialkil nitrosamine. Produk kimia alami yang juga menyebabkan kanker antara lain safrol, sikasin, alkaloid piroisidin dan β -asaron (Soekarjo, 1995).

Suatu sel normal dapat berubah menjadi sel kanker adalah karena terjadi akumulasi sejumlah perubahan genetik yang berperan terhadap kejadian tumorigenesis, *tumor progression* dan resistensi terhadap kemoterapi. Sebagian besar perubahan genetik ini berakibat terhadap regulasi siklus sel. Pada sel normal, terdapat keseimbangan antara proliferasi sel dengan kematian sel yang diregulasi melalui siklus sel dengan *cellular checkpoint* (Hartwell dan Kastan, 1994). Sebelum sel dapat memasuki fase berikutnya pada siklus sel, harus melalui sebuah checkpoint yang memutuskan jika proses pada fase sebelumnya telah selesai. Keputusan untuk memasuki siklus sel dibuat selama fase G1 yang dilakukan oleh cyclin dan cyclin-dependent kinase (CDK). Pengendalian oleh CDKs dilakukan dengan fosforilasi pada tempat yang berbeda dari protein dan

oleh aktivitas CDK inhibitor, yang tersusun atas dua famili yaitu: protein INK4 yang terdiri dari p15, p16, p18 dan p19 yang terikat pada CDK4 atau CDK6 (Morgan, 1995). Protein yang lain adalah CIP/KIP yang meliputi p21, p27, dan p57 yang terikat pada cyclin-CDK komplek (Meng dan El-Deiry, 1999). Terjadinya proses progresi siklus sel juga dipengaruhi oleh faktor stimulus dari luar. Pada sel mamalia, *growth factor* dan mitogens meregulasi tingkat ekspresi dari cyclin D1, yang mengendalikan transisi dari G1 ke S. Pada sel mamalia, G1 tergantung *growth factor* bila akan melanjutkan ke fase berikutnya, kontrol *checkpoint* berupa protein retinoblastoma (Rb) (Sherr, 1996).

Pada viral oncoprotein dan mutasi dalam kanker manusia, terdapat dua target yang spesifik yang saling terkait pada kontrol siklus sel yaitu: ATM-p53-p21 pathway dan p16-cyclin D1-CDK4-Rb pathway yang membantu sel progres melalui fase G1. Cyclin D1 terikat pada regulasi positif dengan CDK4, yang membantu fosforilasi Rb. Hipofosforilasi dari Rb merupakan regulator negatif progresi siklus sel, karena Rb terikat pada faktor transkripsi yang menjadikan faktor transkripsi inaktif. Saat hiperfosforilasi oleh E-CDK2, Rb menjadi inaktif dan sel dapat melanjutkan siklus ke fase berikutnya yaitu fase S. p16 adalah regulator negatif dari CDK4, yang mencegah Rb mengalami fosforilasi. Abnormalitas masing-masing komponen pada pathway ini biasanya ditemukan pada kanker manusia. Deteksi DNA yang mengalami kerusakan diatur oleh tumor suppressor p53. Saat terjadi proses kerusakan DNA, p53 menahan sel untuk memasuki fase berikutnya dan memberikan waktu pada DNA untuk melakukan perbaikan, atau bila kerusakan cukup parah, p53 akan menginisiasi apoptosis.

Kehilangan beberapa *molecular checkpoint* dapat ditemukan pada perkembangan beberapa tumor, hal ini dikarenakan progresi siklus sel menjadi berjalan sebagaimana mestinya. Akumulasi perubahan genetik juga berperan pada timbulnya kemoresisten, yang mengakibatkan hilangnya kemampuan DNA merespon kerusakan. Kehilangan tumor gen suppressor yaitu p53 akan menghasilkan perkembangan dan progresi tumor. p53 menjadi perantara respon seluler pada saat DNA rusak yang mengakibatkan ditahannya pertumbuhan atau apoptosis. p21 adalah efektor utama p53 yang menjadi perantara penahanan siklus dan CDK1 dengan p21 dan p27 membantu transisi regulasi G1. Rb membantu menjadi perantara progresi siklus sel dari fase G1 ke fase S. Beberapa perubahan yang telah diidentifikasi, yaitu perubahan pada tumor suppressors seperti p53. Dengan hilangnya *growth inhibitor*, progresi siklus sel tidak terkontrol dan menghasilkan tumorigenesis, sehingga sebagian besar strategi dalam gen terapi untuk kanker difokuskan pada penggantian tumor suppressor dalam sel kanker. (Meng dan El-Deiry, 1999).

2.9. Natural Killer Sel

Sel *Natural Killer* (NK) merupakan bagian dari sel darah putih yang berfungsi membunuh sel tumor dan sel yang terinfeksi virus secara spesifik atau non spesifik termasuk dalam keluarga Mayor Histocompatibility Complex (MHC) I, respon imunologi humoral pada interleukin-2 (IL-2), dan respon imunologi seluler yang berfungsi sebagai sitolisis yang dilepas dari sitotoksik. Salah satu mekanisme pembunuhan sel target dari sel NK adalah melalui pengenalan molekul glikoprotein yang terekspresi pada permukaan sel tumor atau sel yang

terinfeksi virus. Glikoprotein tersebut bertindak sebagai lektin yang dapat mengikat sel NK melalui reseptor yang terdapat pada permukaan sel, T CD8 sel dewasa (T sitotoksik limfosit [CTLs]) dan pembunuh alami (NK) sel adalah efektor respon imun bawaan dan adaptif terhadap patogen intraseluler, kanker sel, atau jaringan transplantasi. CTLs dan sel NK menginduksi apoptosis target melalui dua mekanisme utama. Salah satu mekanisme melibatkan ligasi CD95 pada target sel oleh FasL (Li, JH *et al.*, 1998). Mekanisme kedua melibatkan exocytosis kalsium tergantung dari protein granul CTL-berasal, perforin dan granzymes (Heusel *et al.*, 1994; Shresta *et al.*, 1995.). Perforin memfasilitasi pengiriman B granzyme ke dalam sel target melalui mekanisme yang belum jelas, tidak memerlukan pembentukan pori membran plasma (Shi *et al.*, 1997; Metkar *et al.*, 2002.). Granzyme B, prototypic anggota keluarga ini protease serin, mendorong belahan, dan aktivasi beberapa caspases, termasuk caspase-3, caspase-6, caspase-7, caspase-8, caspase-9, dan caspase-10 (MacDonald *et al.*, 1999). Granzyme B juga memotong BID di lokasi yang berbeda dari yang ditargetkan oleh caspase-8 (Alimonti *et al.*, 2001). Mirip dengan tBID (dihasilkan oleh caspase-8), dipotong BID dihasilkan oleh B granzyme (gtBID) translokasi ke membran mitokondria dan mempromosikan pelepasan faktor kematian mitokondria Bax melalui atau BAK (Heibein *et al.*, 2000; Alimonti *et al.*, 2001; Wang, NS *et al.*, 2001.). Karena B granzyme dan CD95L dapat mengaktifkan kematian BID-BAX/BAK-isyarat jalur, mereka menyediakan mekanisme independen inducing apoptosis sel target. Dengan demikian, kekurangan sel CD95 atau *overexpressing* c-FLIP tetap rentan terhadap CTL-akibat kematian (Kataoka

et al., 1998). Ini akan menjadi penting untuk menentukan apakah gangguan langkah distal jalur kematian-sinyal bersama oleh CD95L dan granzyme B (seperti kehilangan Bax / BAK) mengurangi kematian yang disebabkan CTL target sel tipe II yang membutuhkan penghubung antara jalur ekstrinsik dan intrinsik untuk menjalani apoptosis. Seperti genetik hambatan untuk CTL-induced kematian dapat menjadi penting mekanisme di mana sel-sel tumor menghindari pengawasan kekebalan.

Kematian interaksi reseptor-ligan dapat melayani fungsi fisiologis penting dalam tumor surveilans (Kashii *et al.*, 1999). Sel NK memainkan peran penting dalam kontrol tumor metastasis (Talmadge *et al.*, 1980; Karre *et al.*, 1986.). Takeda (2001) mengisolasi sel NK pada hati murin, tanpa mengisolasi T killer sel atau sel T alam biasa, konstitutif mengungkapkan *cellsurface* Apo2L/TRAIL, yang, bersama-sama dengan perforin dan ligan Fas (FasL). Administrasi menetralkan antibodi monoklonal terhadap baik Apo2L/TRAIL atau FasL signifikan meningkatkan metastasis hati beberapa tumor sel baris. Sedangkan penghambatan membunuh perforin-dimediasi juga menghambat NK mediated sitotoksitas (Smyth *et al.*, 1999), lengkap inhibisi dicapai hanya dengan kombinasi dari anti-TRAIL dan antibodi anti-FasL antagonistik (Takeda *et al.*, 2001). Endogen interferon- γ diproduksi memainkan peran penting dalam mendorong Apo2L / TRAIL ekspresi pada sel NK dan sel T (Kayagaki *et al.*, 1999). Temuan ini menunjukkan bahwa Apo2L/TRAIL dan FasL dapat menyebabkan penindasan alami tumor oleh sel NK. Ekspresi FasL pada sel-sel

selain sel NK juga mungkin berkontribusi untuk penekanan tumor (Owen-Schaub *et al.*, 1998).

2.10. Tinjauan Tentang Mencit

2.10.1. Klasifikasi Mencit

Menurut Jordan dan Verma (1980) mencit dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Sub phylum	: Vertebrata
Kelas	: Mammalia
Subklas	: Theria
Ordo	: Rodentia
Sub ordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Sub famili	: Murinae
Genus	: <i>Mus</i>
Spesies	: <i>Mus musculus</i>

2.10.2. Kelenjar Mammae Mencit Betina

Distribusi jaringan mammae terdapat dalam jaringan lemak yang longgar sepanjang lateral daerah leher dan inguinal. Kelenjar mammae adalah modifikasi dari kelenjar kulit yang dihubungkan saluran laktiferus dan puting. Jaringan mammae ini terbagi menjadi lobules, yang masing – masing terdiri dari banyak alveoli. Mammae tersusun atas sejumlah lemak, pembuluh darah, saraf dan pembuluh limfe. (Sadler, 1995).

2.11. Tinjauan Viabilitas Sel

Pemaparan bahan toksik terhadap sel dapat menyebabkan kerusakan atau kematian sel. Kemampuan sel untuk bertahan terhadap bahan bersifat toksik inilah

yang digunakan sebagai dasar dilakukan uji sitoksitas dan salah satunya dengan menggunakan metode *cell viability test*. Terdapat dua cara untuk menentukan viabilitas sel, cara pertama berdasarkan respon jangka pendek dan yang kedua berdasarkan respon jangka panjang. Respon jangka panjang dapat dilihat setelah beberapa jam atau hari setelah diberi perlakuan. Perhitungan hanya dilakukan pada sel yang mati saja. Pada *short-term assay* atau respon jangka pendek, merupakan metode perhitungan yang dilakukan pada sel yang hidup dan yang mati. Keadaan ini bersifat *reversible* untuk suatu waktu tertentu. Hal ini menyebabkan *long-term assay* atau jangka panjang lebih dipilih karena lebih objektif dibandingkan dengan *short-term assay* (Freshney, 1987).

Kerusakan atau kematian sel akan diikuti dengan perubahan integritas membran. Hal ini dapat diketahui dengan menggunakan pewarnaan. Sel yang mati akan ditunjukkan dengan membedakan warna sel karena masuknya zat warna ke dalam membran sel, sedangkan sel yang dapat bertahan hidup tetap memperlihatkan warna dan bentuk seperti semula. Hal ini disebabkan karena pada sel yang mati bersifat permeabel, sehingga mudah untuk dimasuki oleh cairan yang berada di luar sel. Sel yang hidup masih bersifat impermeabel sehingga tidak bisa dimasuki oleh cairan yang berada di luar sistem tubuhnya (Freshney, 1987).

BAB 3
KERANGKA KONSEPTUAL
DAN HIPOTESIS
PENELITIAN

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

Kajian tentang *Achyranthes aspera* Linn dimana *Achyranthes aspera* Linn diketahui mengandung berbagai macam bahan aktif, diantaranya adalah alkaloid akirantin dan betain, terpenoid, saponin, ramnose, glukosa, galaktosa, reilosa, hentriacontan, α spinasterol, β sitosterol, cryopenol, dibuthyl phthalate, asam palmitat, α spinasterol-3- β -D glikosida, daukosterol, ecdysterol, Achyranthoside E dan F (Mardisiswojo dan Kusuma, 1968; Wei *et al.*, 1997; Ida dkk., 1998; Gao *et al.*, 2000; Mitaine *et al.*, 2001; Chakraborty *et al.*, 2002).

Potensi antikanker dari *Achyranthes aspera* Linn, diduga terkait dengan bahan alkaloid yang terkandung didalamnya. Ekstrak metanol dari daun *Achyranthes aspera* Linn, dilaporkan mempunyai aktivitas antimitosis dengan menghambat pembelahan sel dan proliferasi (Gao *et al.*, 2000).

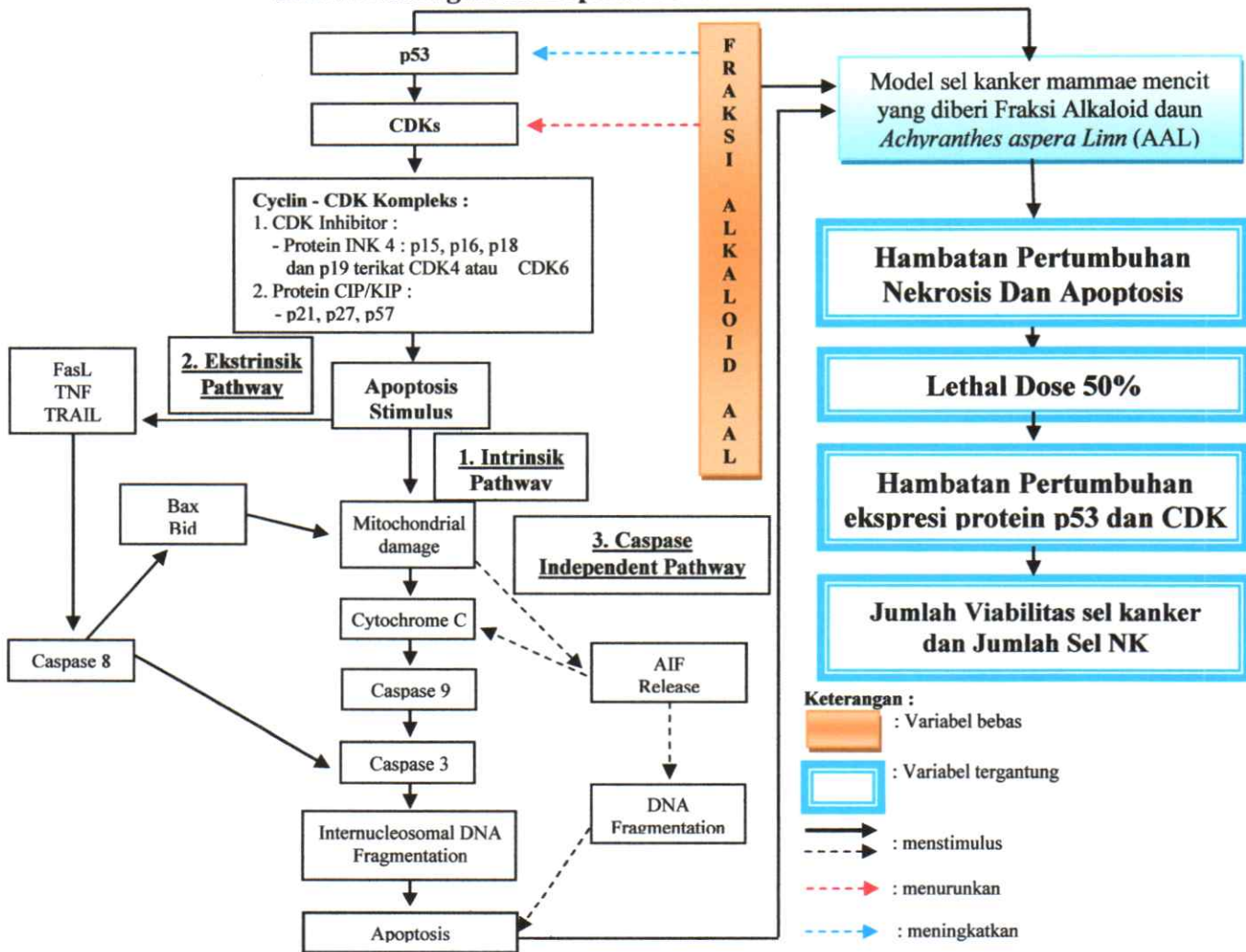
Suatu sel normal dapat berubah menjadi sel kanker karena terjadi akumulasi sejumlah perubahan genetik yang berperan terhadap kejadian *tumor genesis*, *tumor progression* dan resistensi terhadap kemoterapi. Sebagian besar perubahan genetik ini berakibat terhadap regulasi siklus sel. Pada sel normal, terdapat keseimbangan antara proliferasi sel dengan kematian sel yang diregulasi melalui siklus sel dengan *cellular checkpoint* (Hartwell dan Kastan, 1994). Sebelum sel dapat memasuki fase berikutnya pada siklus sel, harus melalui sebuah checkpoint yang memutuskan jika proses pada fase sebelumnya telah selesai.

Keputusan untuk memasuki siklus sel dibuat selama fase G1 yang dilakukan oleh cyclin dan cyclin-dependent kinase (CDK). Pengendalian oleh CDKs dilakukan dengan fosforilasi pada tempat yang berbeda dari protein dan oleh aktivitas CDK inhibitor, yang tersusun atas dua famili yaitu: protein INK4 yang terdiri dari p15, p16, p18 dan p19 yang terikat pada CDK4 atau CDK6 (Morgan, 1995). Protein yang lain adalah CIP/KIP yang meliputi p21, p27, dan p57 yang terikat pada cyclin-CDK kompleks (Meng dan El-Deiry, 1999). Terjadinya proses progresi siklus sel juga dipengaruhi oleh faktor stimulus dari luar. Pada sel mamalia, *growth factor* dan mitogens meregulasi tingkat ekspresi dari cyclin D1, yang mengendalikan transisi dari G1 ke S. Pada sel mamalia, G1 tergantung *growth factor* bila akan melanjutkan ke fase berikutnya, kontrol *checkpoint* berupa protein retinoblastoma (Rb) (Sherr, 1996).

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*mus musculus*) galur *Swiss Webster* yang dikembangkan di Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma). Mencit yang dipilih adalah yang berjenis kelamin betina dengan bobot badan antara 20 - 40 gram, berumur 2 bulan, dengan jumlah 60 ekor. Mencit perlakuan berjumlah 40 ekor dan 10 ekor kontrol positif dibuat menderita kanker mammae dengan menyuntikkan benzopyrene 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 mencit dan secara mikroskopis sel kanker mammae yaitu terdapat sel yang mengalami proliferasi.

Mekanisme nekrosis sel didahului dengan adanya pembengkakan sel (degenerasi). yang ditandai dengan inti sel mengalami pinoksis, karioreksis dan kariolisis (Andrew *et al.*, 2002; Yalon *et al.*, 2004). Mekanisme apoptosis yang terjadi diduga melalui inhibitor gen sel kanker yaitu suppresor gen p53 dan CDK (Meles dkk.,2007, Meles dkk., 2008). Sebagai obat antikanker perlu dibuktikan secara *in vivo* bahwa fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn dapat membunuh sel kanker mammae secara apoptosis melalui ekspresi protein p53 dan CDK dan dapat melindungi sel normal.

Skema Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 3.1. Skema kerangka konseptual

3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis dari penelitian ini adalah :

1. Fraksi alkaloid yang terkandung dalam daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) mempunyai efek menurunkan viabilitas sel kanker mammae mencit
2. Fraksi alkaloid yang terkandung dalam daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) mempunyai efek meningkatkan jumlah sel NK
3. Fraksi alkaloid yang terkandung dalam daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) pada sel kanker mammae mencit secara *in vivo* mempunyai efek terhadap proses nekrosis dan apoptosis
4. Fraksi alkaloid yang terkandung dalam daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) mempunyai efek terhadap apoptosis melalui ekspresi protein p53 dan CDK pada sel kanker mammae mencit secara *in vivo* mempunyai efek terhadap apoptosis melalui ekspresi protein p53 dan ekspresi CDK

BAB 4

METODE PENELITIAN

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan ini menggunakan enam macam perlakuan dengan sepuluh kali ulangan.

4.2. Tempat Penelitian dan Waktu Penelitian

4.2.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dikerjakan di tiga laboratorium yaitu :

1. Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga untuk ekstraksi fraksi alkaloid, dan membuat larutan uji.
2. Laboratorium bersama Farmakologi dan Patologi Klinik, Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk perlakuan pembedahan, pemeriksaan sel kanker mammae mencit dan perhitungan viabilitas
3. Laboratorium Anatomi dan Histologi, Fakultas kedokteran Universitas Airlangga untuk pembuatan preparat histologi, preparat imunohistokimia.

4.2.2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan selama 5 bulan, pada tanggal 1 Agustus 2009 sampai 23 Desember 2009.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Klasifikasi Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas (*independent variable*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn yang diberikan kepada mencit yang menderita kanker mammae mencit.

2. Variabel tergantung (*dependent variable*)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah :

- a. Fraksi alkaloid yang terkandung dalam daun jarong (*Achyranthes aspera* linn) mempunyai efek terhadap jumlah peresentase viabilitas sel kanker mammae mencit secara *in vivo*
- b. Fraksi alkaloid yang terkandung dalam daun jarong (*Achyranthes aspera* linn) mempunyai efek terhadap jumlah Sel NK secara *in vivo*
- c. Fraksi alkaloid yang terkandung dalam daun jarong (*Achyranthes aspera* linn) pada sel kanker mammae mencit secara *in vivo* mempunyai efek terhadap proses nekrosis dan apoptosis
- d. Fraksi alkaloid yang terkandung dalam daun jarong (*Achyranthes aspera* linn) pada sel kanker mammae mencit secara *in vivo* mempunyai efek terhadap jumlah ekspresi protein p53 dan jumlah ekspresi CDK

3. Variabel kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah :

Mencit yang meliputi : galur, berat badan, umur. Pakan, kandang dan perawatan mencit

4.3.2. Definisi Operasional Variabel

4.3.2.1. Fraksi Alkaloid Daun *Achyranthes aspera* Linn

Penentuan ekstraksi dan kadar alkaloid dalam ekstrak fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn melalui proses ekstraksi yang dikerjakan berdasarkan metode Harbone (1973) dan Ikan (1991), yang meliputi proses maserasi dengan n-Heksan, methanol-asam tartrat dan proses pembasaan serta proses fraksinasi dengan kloroform. Penentuan adanya alkaloid dan pengukuran kadar alkaloid pada fraksinasi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn menggunakan metode Hamilton dan Sewell (1979), Dyatmiko (2000).

4.3.2.2. Jumlah Persentase Viabilitas Sel Kanker

Jumlah sel yang hidup dibagi dengan jumlah sel keseluruhan (sel hidup dan sel mati) dikali 100%.

4.3.2.3. Jumlah Sel NK

Sel *Natural Killer* (NK) merupakan bagian dari sel darah putih yang berfungsi membunuh sel tumor dan sel yang terinfeksi virus secara spesifik atau non spesifik termasuk dalam keluarga Mayor Histocompatibility Complex (MHC) I (Heusel *et al.*, 1994; Shresta *et al.*, 1995.).

4.3.2.4. Proses Sel yang Mengalami Nekrosis dan Apoptosis

Kematian sel dapat terjadi melalui nekrosis dan apoptosis. Terjadinya nekrosis sel didahului dengan adanya pembengkaan sel (degenerasi). (Andrew *et al.*, 2002; Yalon *et al.*, 2004). Proses kematian sel akibat adanya apoptosis yaitu kematian sel secara terprogram tanpa didahului oleh proses pembengkakan pada sel atau proses peradangan sel (Lantuejoul *et al.*, 2004).

4.3.2.5. Jumlah Ekspresi Protein p53

Apoptosis dapat terjadi aktivasi dari protein kinase C (PKC). PKC akan mengaktivasi suatu protein (p53) yang ada di dalam inti sel. Selanjutnya protein P53 akan mempengaruhi proses transkripsi p21. Terbentuknya protein p21 akan menyebabkan hambatan pembentukan enzim *cyclin dependent kinase*. (Andrew *et al.*, 2002, Yalon *et al.*, 2004). semakin besar dosis fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera Linn* yang diberikan menyebabkan peningkatan jumlah protein p53 yang diekspresikan oleh sel kanker mammae mencit.

4.3.2.6. Jumlah ekspresi CDK

Proses kematian sel melalui mekanisme apoptosis yang bersifat patologis dapat terjadi aktivasi dari protein kinase C (PKC). Adanya hambatan pada pembentukan semua enzim cyclin menyebabkan protein cyclin menjadi inaktif akibatnya proses siklus sel yang melibatkan proses sintesis DNA pada fase S dan proses sintesis RNA dan G2 serta proses mitosis sel yang terjadi pada fase M akan terhenti sehingga, sel tidak akan mengalami pembelahan dan sel akan mati karena kondensasi kromosom yang menyebabkan terjadinya apoptosis (Andrew *et al.*, 2002 ; Yalon *et al.*, 2004).

4.4. Materi Penelitian

4.4.1. Bahan penelitian

Bahan tanaman yang digunakan adalah daun *Achyranthes aspera Linn* yang dikumpulkan dari Surabaya, yang sudah dalam bentuk fraksi alkaloid, bahan lain mencit (*mus musculus*) galur *Swiss Webster* yang dikembangkan di Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma). Mencit yang dipilih adalah yang berjenis kelamin

betina dengan bobot badan antara 20 - 30 gram, berumur 2 bulan sebanyak 60 ekor, larutan aquadest steril produksi PT. Ikapamidhon - Putra Mas, larutan *Carboxyl Methyl Cellulosa* (CMC) 0,5 % produksi PT. Kimia Farma, larutan *Tripan Blue* 0,4 % dibeli di PT. Brataco, larutan *cyclophosphamide* 6 mg/kgbb produksi PT. Asta Werke, larutan *Benzo(a)pyrene* standart wako Pure Chemical Industries (2004.03) 10 mg/kgbb, *ethidium bromida* dibeli di PT. Brataco, acridin orange dibeli di PT. Brataco, eter dibeli di PT. Brataco.

4.4.2. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut : timbangan elektrik merk hettich, pipet merk pirex, gelas ukur merk pirex, hemositometer, sentrifuse merk hettich, 60 buah tempat obat volume 5 - 10 cc dan tutupnya, 8 botol 7 cc, 60 buah *disposable spuit* 3 cc merk terumo syringe, sonde menciit, mikroskop inverted merk nikon, mikroskop cahaya merk nikon, mikroskop flourescence merk Nikon, 6 tabung reaksi dan tempatnya merk pirex, waskom plastik produksi PT. Maspion, nampan plastik produksi PT.Maspion, 1 kotak masker merk diapro, 1 kotak sarung tangan karet merk maxter, 6 pinset anatomis merk swann morton - england, 6 gunting anatomis merk swann morton - england, Alkohol 70%, 80%, 90, 95%, dan 100%, Xylol , paraffin, ethanol, untuk pembuatan preparat histologi, mikrotom, incubator, PBS pH 7,4 , aquades, Hidrogen Peroksidase 3%, BSA, antibody primer anti CDK, anti p53 IgG Biotin labeled, SA-HRP (Strep Avidin Hoesa Radish Peroxidase), kromogen DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride).

4.5. Prosedur Penelitian

4.5.1. Pembuatan Fraksi Alkaloid

Pembuatan fraksi alkaloid berdasarkan metode Pharmacope Indonesia, dan kadar alkaloid *Achyranthes aspera linn* diukur menggunakan HPLC (*high performnace liquid chrometagraphy*), yang didahului dengan pemeriksaan alkaloid menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dan proses fraksinasi menggunakan metode kromatografi kolom dengan fase diam silika gel dan fase gerak campuran etil asetat, metanol dan air dengan perbandingan 7 : 4 : 1. (Harbone (1973), Ikan (1991), Hamilton dan Sewell (1979))

4.5.2. Eksplorasi Dosis

Penentuan dosis fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera Linn* sebagai obat antikanker berdasarkan hasil penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Wurlina (2000), Wurlina dkk. (2002), Wurlina dkk. (2003), Meles (2004) yaitu 100 mg/kgbb secara *in vivo*, dan dosis pada penelitian pendahuluan Adnyana, (2006) secara *in vitro* 100 ppm sehingga pada penelitian secara *invitro* yang dihubungkan dengan cairan tubuh mencit yang mencapai kurang lebih 60 persen dari berat badan tikus yang dihubungkan dengan log dosis obat maka dosis yang digunakan untuk kelompok perlakuan yaitu 10 mg/kgbb, 30 mg/kgbb, 100 mg/kgbb.

Pemilihan konsentrasi larutan uji ini telah berdasarkan syarat yang ditetapkan oleh *National Cancer Institute* (NCI).

4.5.3. Persiapan Hewan Coba

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*mus musculus*) galur *Swiss Webster* yang dikembangkan di Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma). Mencit yang dipilih adalah yang berjenis kelamin betina dengan bobot badan antara 20 - 40 gram, berumur 2 bulan sebanyak 60 ekor dibagi dalam 6 kelompok perlakuan masing – masing terdiri dari 40 ekor perlakuan, 10 ekor kontrol negatif dan 10 ekor kontrol positif. Mencit dipelihara dalam ruangan dengan suhu berkisar antara 22 – 25 °C dan kelembaban 70 - 80%. Pakan tikus terdiri atas pelet dan air minum yang diberikan secara *ad libitum*. Sebelum digunakan, hewan uji diaklimasi selama 14 hari untuk memastikan bahwa hewan uji sudah teradaptasi dengan baik dan siap untuk digunakan dalam penelitian. Untuk meminimalisasi sumber keragaman yang dapat mempengaruhi validitas data, selama aklimasi hewan uji diberi obat cacing (combantrin) yang diberikan secara *per oral* (PO) untuk membersihkan saluran pencernaan dari cacing dan amoksisilin untuk membersihkan saluran pernafasan dari mikrobial patogen dengan dosis sesuai yang dianjurkan. Obat cacing diberikan pada hari ke 2, 3 dan 7, sedangkan amoksisilin diberikan pada hari ke 5 yang diberikan secara PO. Selama aklimasi hewan uji juga diberi pakan komersial BR-1 pabrik Comfeed (susunan nilai gizi pakan tikus dan mencit dapat dilihat di lampiran 1) dan minum secara *adlibitum*.

4.5.4. Pembuatan Mencit Menderita Kanker Mammae

Mencit perlakuan berjumlah 40 ekor dan 10 ekor kontrol positif dibuat menderita kanker mammae dengan menyuntikkan Benzo(α)pyrene dengan dosis

10 mg/kgbb sebesar 0,5 cc secara *sub kutan* (SC) di 4 daerah sekitar mammae dari 8 daerah mammae mencit selama 8 minggu dengan interval penyuntikan 3 hari dengan total penyuntikan 20 kali penyuntikan. Terjadinya kanker mammae pada mencit dibuktikan secara makroskopis dengan terdapat benjolan pada mammae dan secara mikroskopis melalui biopsi sel kanker mammae mencit yaitu terdapat sel yang mengalami proliferasi. Biopsi dilakukan setelah minggu ke - 8. secara bertahap dengan melakukan palpasi payudara mencit dengan *glove* setiap hari mulai minggu pertama setelah perlakuan benzo(a)pyrene sampai pembedahan, Pengukuran diameter nodul yang teraba dengan penggaris. membunuh mencit yang telah dimasukkan ke ruang yang di beri eter dengan metode *cervical dislocation* (dislokasi leher).

4.5.5. Perlakuan Hewan Coba

Alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn yang diberikan secara per oral dengan dosis 10 mg/kgbb, 30 mg/kgbb, 100 mg/kgbb yang masing – masing diberi dosis sebesar 0,5 cc 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 sehat, hanya diberi Oilum Olifarum dengan dosis 0,5 cc secara *sub kutan* (SC) di 4 daerah posterior sekitar mammae dari 8 daerah mammae mencit, untuk memastikan bahwa bila terjadi efek sitotoksik maka efek ini tidak disebabkan oleh hewan percobaan.

Kelompok 2 : digunakan mencit yang menderita kanker mammae mencit yang hanya diberi pelarut bahan uji CMC Na 0,5 % dengan dosis 0,5 cc secara per oral sebagai kontrol perlakuan 1 (P1).

Kelompok 3 : digunakan mencit yang menderita kanker mammae mencit mendapat alkaloid *Achyranthes aspera* Linn dengan dosis 10 mg/kgbb sebesar 0,5 cc secara per oral (P2).

Kelompok 4 : digunakan mencit yang menderita kanker mammae mencit diberi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn dengan dosis 30 mg/kgbb sebesar 0,5 cc secara per oral (P3).

Kelompok 5 : digunakan mencit yang menderita kanker mammae mencit diberi alkaloid *Achyranthes aspera* linn dengan dosis 100 mg/kgbb sebesar 0,5 cc secara per oral (P4).

Kelompok 6 : kontrol positif, digunakan mencit yang menderita kanker mammae mencit diberi obat antikanker standar Cyclophosphamide 6 mg/kgbb sebesar 0,5 cc secara per oral.

Semua kelompok diberi perlakuan 8 minggu dengan interval 3 hari sambil dilakukan pengamatan terhadap benjolan mammae mencit (kanker mammae mencit). Setelah perlakuan selesai semua mencit dinekropsi, diambil mammae, selanjutnya mengamati sel kanker mammae mencit, kemudian dibuat preparat imunohistokimia.

4.5.6. Pewarnaan Viabilitas Sel Kanker Mammae

Biopsi sel kanker mammae dilakukan setelah minggu ke - 8. Setiap perlakuan dimasukkan ke dalam tempat obat dan digerus menggunakan mortar

dan cairan fisiologis, ditambahkan dengan pewarna *tripan blue* 0,4% sebanyak 1ml. Dengan menggunakan teknik penghitungan cara Thoma dibawah mikroskop dihitung persentase viabilitas selnya yaitu jumlah sel yang hidup dibagi dengan jumlah sel keseluruhan (sel hidup dan sel mati) dikali 100% (Meyer and Harvey, 2003). Jarak antara pewarnaan dengan penghitungan sel dilakukan tidak kurang dari 3 menit dan maximum selama 10 menit hal ini untuk menghindari hasil positif palsu (Freshney, 1987).

4.5.7. Cara Menghitung Sel kanker dengan Hemositometer

Dihitung jumlah sel hidup (tidak terwarnai) dan jumlah sel yang mati dengan menyerap warna (terwarnai biru) yang terlihat di daerah hitung hemositometer. Hemositometer memiliki 9 (Sembilan) kotak hitung untuk setiap sisinya. Ada dua aturan untuk menghitung sel tersebut, jika sel yang menyentuh garis kiri dan atas dari setiap daerah hitung tersebut dimasukkan daerah hitung maka sel yang menyingung garis kanan dan bawah daerah hitung tidak dimasukkan dalam hitungan. (Meyer and Harvey, 2003).

Hasil Biopsi sel kanker mammae terlebih dahulu diencerkan dengan pewarnaan *tripan blue* 0,4%. Sebelum memasukkan sel yang akan dihitung, hemositometer ditutup dengan *cover glass* terlebih dahulu dan pengisian sel harus memenuhi tempat yang disediakan.

$$\% V_s = \frac{N_{sh}}{N_{sh} + N_{sm}} \times 100\%$$

$\%V_s$ = % viabilitas sel

P = Pengenceran

N_{sh} = Jumlah sel hidup

N_{sm} = Jumlah sel mati

Penghitungan dilakukan dengan perbesaran 400 \times .

4.5.8. Pengambilan Organ dan Pembuatan Sediaan Histologis Mammae

Organ mammae mencit galur *Swiss Webster* berjumlah 60 buah yang telah diisolasi dimasukkan ke dalam 60 buah tempat obat yang berisi larutan formalin 10 %. Organ yang sudah bersih kemudian dimasukkan ke dalam larutan fiksatif Bouin selama 24 jam. Setelah fiksasi selesai dilanjutkan dengan pengirisan organ berbentuk kubus sampai diperoleh ukuran sampel organ kurang lebih 0,5 cm dengan luas permukaan 1 x 1cm sehingga diperoleh sampel organ yang sesuai. Sampel organ kemudian didehidrasi menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat yaitu 70%, 80%, 90%, 95% I, II, III masing-masing selama 1 jam sampai organ tampak jernih, kecuali untuk alkohol 95% tahap ketiga didehidrasi selama 2 jam. Sampel organ selanjutnya direndam ke dalam xylol I, II, III masing-masing 1 jam, kecuali pada xylol III selama 2 jam. Sampel organ selanjutnya diinfiltrasi parafin (parafin I, II, III) dengan suhu 56⁰C - 58⁰C masing-masing selama 2 jam di dalam inkubator. Sampel organ yang telah diinfiltrasi parafin selanjutnya dicetak dengan menggunakan blok parafin dengan proses yang disebut *embedding*. Blok parafin yang sudah terisi jaringan kemudian di *triming* (penipisan sampel organ untuk mendapatkan jaringan atau bagian organ yang benar dan bagus) untuk mempermudah pemotongan dengan menggunakan mikrotom. *Triming* kemudian dilanjutkan dengan pembuatan irisan terhadap sampel organ dengan menggunakan *rotary microtome* dengan ketebalan sayatan 4-5 μ m. Setelah pembuatan irisan sampel organ selesai dilanjutkan dengan

penempelan irisan pada gelas obyek (*affixing*) didalam gelas kaca berisi air bersuhu 40⁰C dengan tujuan agar jaringan menjadi meregang (tidak mengkerut) dan mempermudah penempelan. Sambil menunggu pewarnaan imunohistokimia, sediaan jaringan dapat disimpan dalam inkubator suhu 39⁰C - 40⁰C proses tersebut dapat dilihat pada lampiran 4. Tahapan pembuatan preparat dimulai dari dehidrasi, clearing, impregnasi, dan embedding. (Putra, 1993).

4.5.9. Tahapan Pemeriksaan Protein p53 dan CDK Menggunakan Metode Imunohistokimia

Preparat kanker mammae mencit yang telah dibuat pada obyek glass dicelup dalam xylol sebanyak 2 kali, alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%, dan 30%) dan aquades secara berurutan. Selanjutnya dicuci dalam PBS pH 7,4 sebanyak tiga kali masing masing selama 5 menit. Selanjutnya direndam dalam hidrogen peroksidase 3% selama 5 - 10 menit. Kemudian dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Direndam dalam BSA dalam PBS selama 10 - 30 menit. Ditambahkan antibodi primer anti CDK dan anti p53 IgG Biotin labelled selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3X5 menit. Ditambahkan SA-HRP (Strep Avidin Hoseradish Peroxidase) selama 30-60 menit. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Ditambahkan kromogen DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) selama 10 - 20 menit . Dicuci dalam aquades selama 3x5 menit. Dilakukan mounting dengan entellan. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop pada pembesaran 40, 100 dan 400 kali. Penentuan jumlah ekspresi protein p53 dapat diketahui dari jumlah perubahan warna kecoklatan pada sel kanker mammae dibandingkan dengan kontrol,

sedangkan pemeriksaan terhadap jumlah ekspresi CDK dapat dilihat pada preparat setelah berikatan dengan anti CDK sel kanker juga berwarna coklat sedangkan sel normal akan berwarna biru (Putra, 1993).

4.5.10. Menghitung Persentase Sel Apoptotic Bodies dan Sel yang Mengalami

Nekrosis pada sel kanker mammae

Kanker mammae mencit yang telah dilakukan biopsi dengan cara pembedahan dibuat preparat imunohistokimia dengan pewarnaan campuran *ethidium bromide* (EB) dan *acridin orange* (AO) dengan cara sebagai berikut :

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

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

4.6. Peubah yang Diamati

Parameter penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan untuk membuktikan fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn dapat membunuh sel kanker mammae mencit secara *in vivo* terhadap jumlah ekspresi protein p53 dan jumlah ekspresi CDK. Parameter yang diamati adalah :

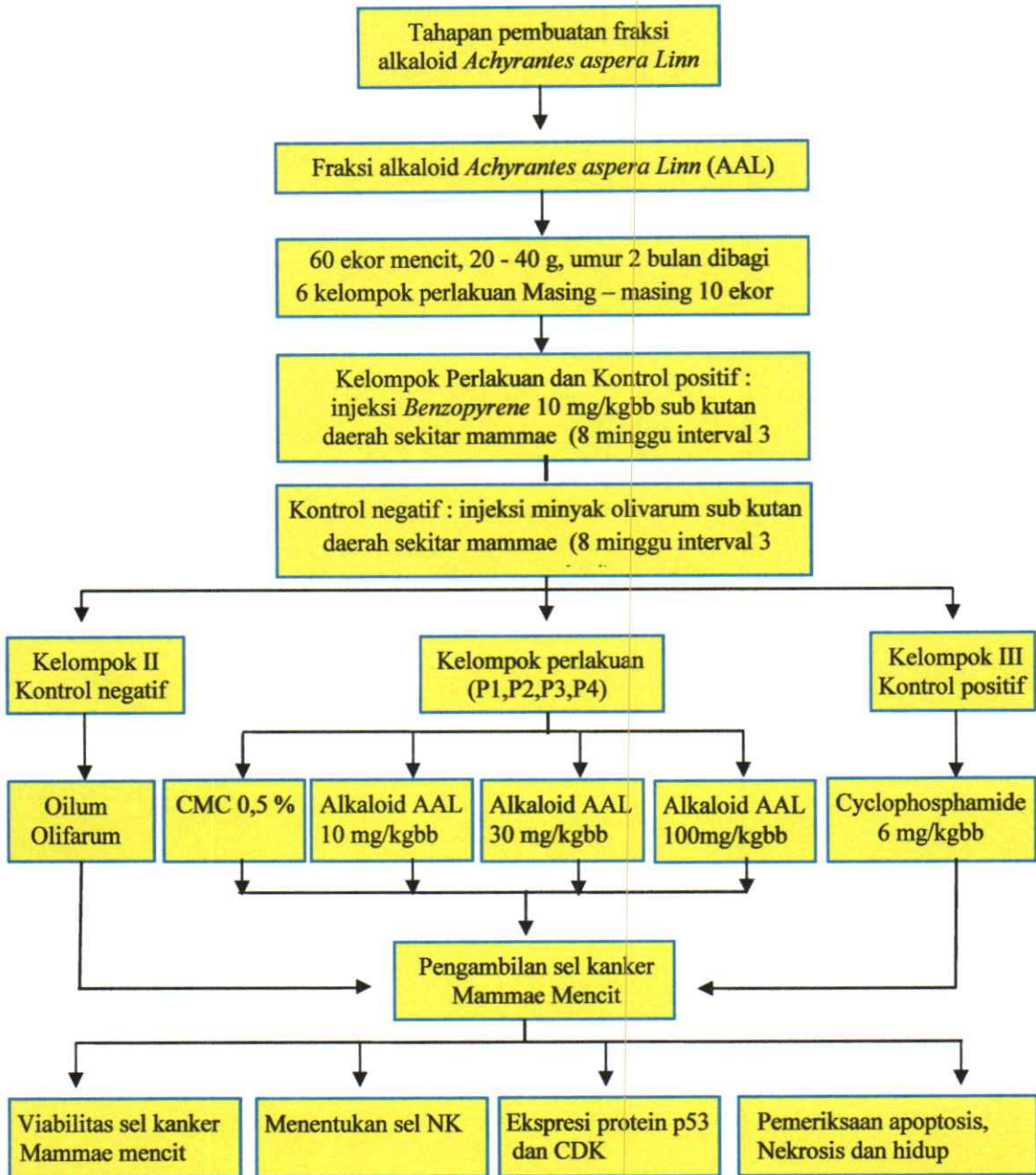
1. Persentase jumlah (viabilitas) sel kanker mammae mencit
2. Persentase jumlah Sel NK
3. Jumlah sel kanker mammae mencit yang mengalami apoptosis dan nekrosis
4. Jumlah ekspresi protein p53 pada sel kanker mammae mencit
5. Jumlah ekspresi *cyclin dependent kinase* (CDK) pada sel kanker mammae mencit

4.7. Analisis Data

Data yang didapat dianalisis dengan menggunakan analisis varian (ANOVA) satu arah untuk mengetahui ekspresi protein p53 dan *cycline dependent kinase* (CDK) pada kanker mammae mencit setelah pemberian fraksi alkaloid jarong (*achyranthes aspera linn*)

Menilai hipotesis statistik dengan menggunakan program SPSS 14 *for Windows*. Selanjutnya ditentukan harga F hitung yang akan dibandingkan dengan harga F tabel dengan tingkat kepercayaan 95 %. Bila harga F hitung > F tabel maka H_0 ditolak atau H_a diterima yang berarti ada perbedaan ekspresi protein p53 dan *cycline dependent kinase* (CDK) pada kanker mammae mencit antar larutan percobaan. Apabila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji *Least Significant Differance* (LSD). (Kusriningrum, 1989).

Kerangka operasional penelitian



Gambar 4.1. Skema kerangka operasional penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN

BAB 5

HASIL PENELITIAN

Pada bab ini menjelaskan tentang data hasil penelitian yang berhubungan dengan tujuan dan hipotesis penelitian. Penyajian data hasil penelitian ditampilkan dalam bentuk tabel, diagram, grafik, foto atau gambar yang disusun dan disesuaikan dengan rancangan penelitian.

5.1. Viabilitas Sel Kanker Mammae Mencit Setelah Pemberian Fraksi Alkaloid Daun *Achyranthes aspera* Linn.

Hasil penelitian ekspresi protein p53 dan *cycline dependent kinase* (CDK) pada kanker mammae mencit setelah pemberian alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn pada pemberian 0,5 cc masing-masing larutan uji kontrol negatif, CMC Na 0,5%, 10 mg/kgbb, 30 mg/kgbb, 100 mg/kgbb, dan kontrol positif terhadap viabilitas fraksi alkaloid daun *achyranthes aspera linn* secara *in vivo* dapat dilihat pada Tabel 5.1. serta Gambar 5.1.

Tabel 5.1. Rerata dan Standard Deviasi Viabilitas pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn

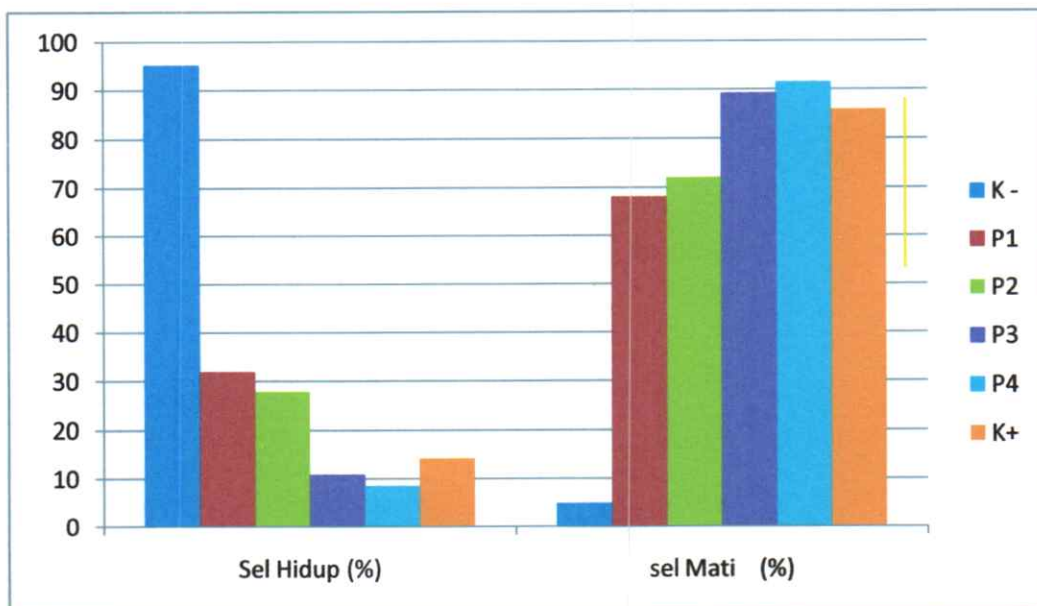
PERLAKUAN	$\bar{X} \pm SD$	
	Sel Hidup (%)	Sel Mati (%)
K -	95,20 ^a ±1,99	4,80 ^c ±1,99
P1 (CMC 0,5%)	31,90 ^b ±4,01	68,10 ^b ±4,01
P2 (10 mg/kgbb)	27,90 ^b ±3,51	72,10 ^b ±3,51
P3 (30 mg/kgbb)	10,80 ^c ±2,66	89,20 ^a ±2,66
P4 (100 mg/kgbb)	8,50 ^c ±2,66	91,50 ^a ±2,27
K + (Cyclophosphamide 6 mg/kgbb)	14,10 ^c ±6,40	85,90 ^a ±6,40

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

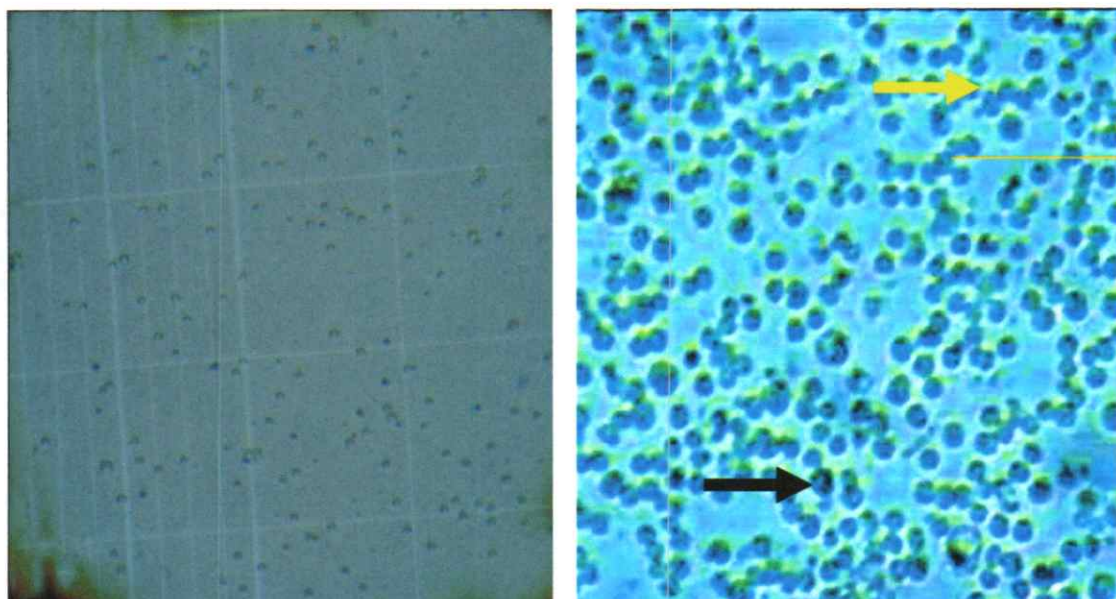
Hasil pemeriksaan uji analisis statistik menggunakan metode deskriptif terhadap sel kanker mammae mencit setelah pemberian alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn dapat dilihat pada Tabel 5.1. dan Lampiran 5, 10, 11. Pada kolom persentase sel hidup diperoleh rata-rata hasil pada sel kanker mammae mencit kelompok kontrol negatif sebanyak $95,20 \pm 1,99$, P1 sebanyak $31,90 \pm 4,01$, P2 sebanyak $27,90 \pm 3,51$, P3 sebanyak $10,80 \pm 2,66$, P4 sebanyak $8,50 \pm 2,66$ dan kontrol positif sebanyak $14,10 \pm 6,40$.

Pada kolom persentase sel mati diperoleh rata-rata hasil pada sel kanker mammae mencit kelompok kontrol negatif sebanyak $4,80 \pm 1,99$, P1 sebanyak $68,90 \pm 4,01$, P2 sebanyak $72,10 \pm 3,51$, P3 sebanyak $89,20 \pm 2,66$, P4 sebanyak $91,50 \pm 2,66$ dan kontrol positif sebanyak $85,90 \pm 6,40$.

Setelah dilakukan uji statistik menggunakan Anava satu arah yang dilanjutkan dengan uji LSD terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$). Pada kontrol negatif terdapat perbedaan yang bermakna terhadap semua perlakuan termasuk kontrol positif, sedangkan kontrol positif tidak terdapat perbedaan dengan perlakuan pemberian fraksi alkaloid 30 mg/kgbb (P3) dan 100 mg/kgbb (P4) namun terdapat perbedaan dengan kontrol negatif P1 (fraksi alkaloid 0 mg/kgbb) dan P2 (fraksi alkaloid 10 mg/kgbb). Viabilitas sel kanker mammae antara pemberian fraksi alkaloid 0 mg/kgbb (P1) dengan 10 mg/kgbb (P2) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$) dan viabilitas sel kanker antara pemberian fraksi alkaloid 30 mg/kgbb (P3) dan 100 mg/kgbb (P4) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$).



Gambar 5.1. Histogram rerata viabilitas sel kanker mammae mencit setelah pemberian ekstrak fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn



(1) Hemositometer

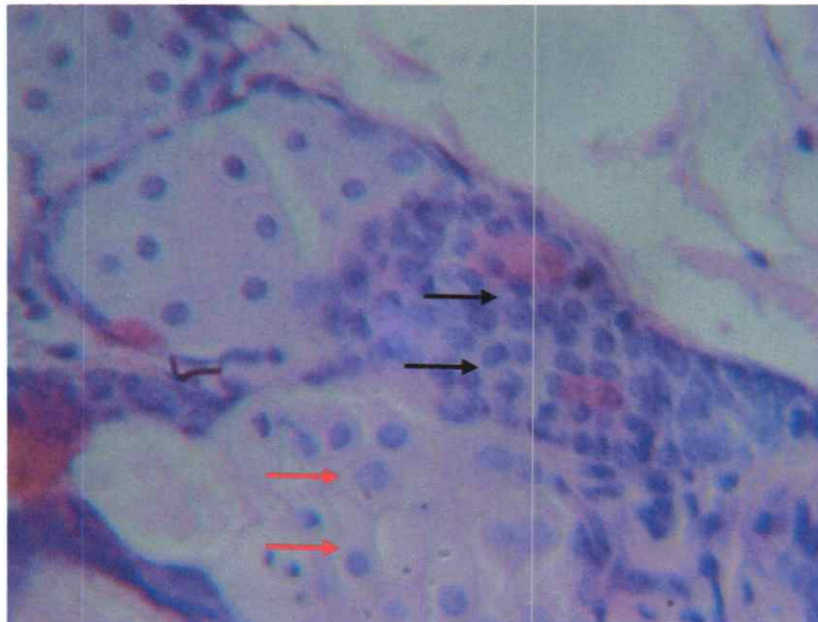
(2) Pembesaran 100 X

Gambar 5.2. Viabilitas sel kanker mammae mencit setelah pemberian ekstrak fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn

Keterangan :

- : sel hidup tidak berwarna biru
- : sel mati berwarna biru

Pada kontrol negatif tidak memiliki hambatan pertumbuhan terhadap sel kanker mammae seperti pada kelompok perlakuan, hal ini dapat ditunjukkan dengan tingginya persentase viabilitas sel kanker kelompok kontrol negatif ($95,20 \pm 1,99$). 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 daun *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 ($89,20 \pm 2,66$) melebihi efek cyclophosphamide (kontrol positif $85,90 \pm 6,40$) pada konsentrasi 10 mg/kgbb. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi alkaloid sangat efektif dalam membunuh sel kanker secara *in vivo*.



Gambar 5.3. Proliferasi sel kanker mammae mencit (adanya banyak inti sel dalam satu lobus, sedangkan yang normal inti sel hanya terdapat satu pada masing – masing lobus) (Pembesaran 400X)

Keterangan :

- : Proliferasi sel kanker mammae mencit
- : Sel Mammae normal

5.2. Pemberian Fraksi Alkaloid Daun *Achyranthes aspera* Linn Terhadap Sel NK Pada Sel Kanker Mammae Mencit

Hasil penelitian ekspresi protein p53 dan *cycline dependent kinase* (CDK) pada kanker mammae mencit setelah pemberian alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn pada pemberian 0,5 cc masing-masing larutan uji kontrol negatif, CMC Na 0,5%, 10 mg/kgbb, 30 mg/kgbb, 100 mg/kgbb, dan kontrol positif terhadap Sel NK fraksi alkaloid daun *achyranthes aspera linn* secara in vivo dapat dilihat pada Tabel 5.2. serta Gambar 5.2.

Tabel 5.2. Rerata dan Standard Deviasi jumlah Sel NK setelah pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn

SEL NK PADA SEL KANKER MAMMAE MENCIT	
PERLAKUAN	$\bar{X} \pm SD$
	Jumlah Sel NK
K -	7,53 ^a ± 0,23
P1 (CMC 0,5%)	3,90 ^e ± 0,22
P2 (10 mg/kgbb)	5,80 ^d ± 0,28
P3 (30 mg/kgbb)	6,47 ^{bc} ± 0,42
P4 (100 mg/kgbb)	6,77 ^b ± 0,42
K + (Cyclophosphamide 6 mg/kgbb)	6,37 ^c ± 6,40

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

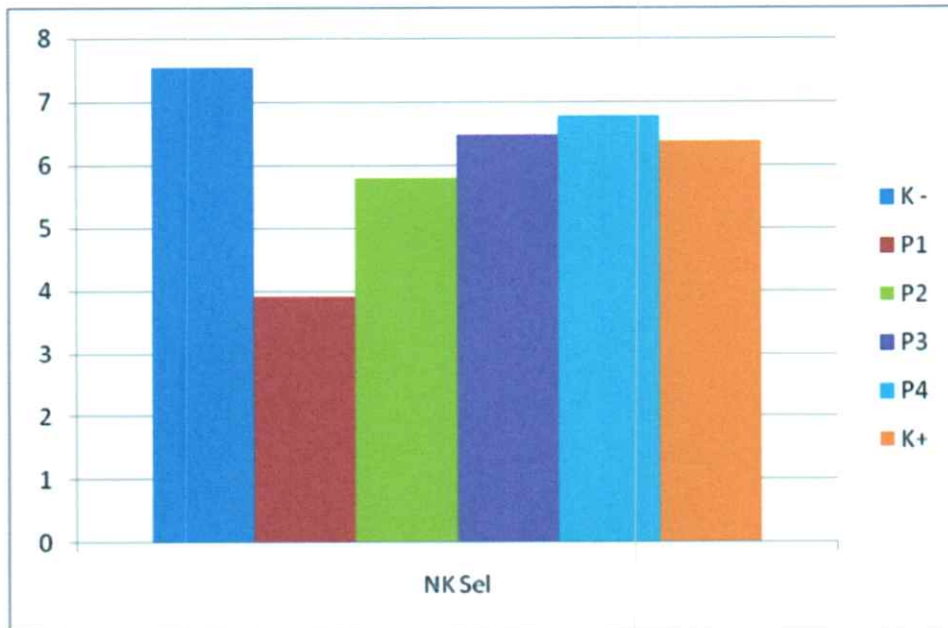
Hasil pemeriksaan uji analisis statistik menggunakan metode deskriptif terhadap Sel NK pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn dapat dilihat pada Tabel 5.2. dan Lampiran 9. Pada kolom persentase sel hidup diperoleh rata-rata hasil pada sel kanker mammae mencit kelompok kontrol negatif sebanyak $7,53 \pm 0,23$, P1 sebanyak $3,90 \pm 0,22$, P2 sebanyak $5,80 \pm 0,28$, P3 sebanyak $6,47 \pm 0,42$, P4 sebanyak $6,77 \pm 0,42$ dan kontrol positif sebanyak $6,37 \pm 6,40$.

Pada tabel 5.2. dapat dilihat bahwa semakin besar dosis fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn yang diberikan menyebabkan peningkatan jumlah Sel NK yang berfungsi sebagai sel sitotoksik terhadap sel kanker mammae mencit.

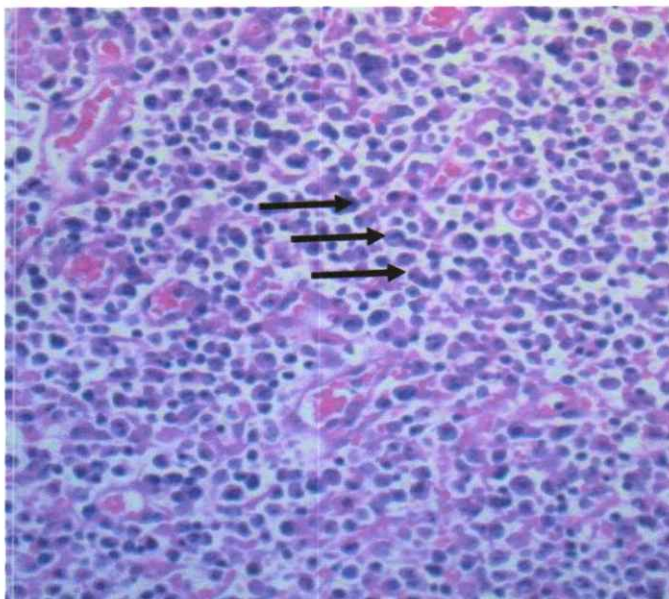
Setelah dilakukan uji statistik menggunakan Anava satu arah yang dilanjutkan dengan uji LSD terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap jumlah Sel NK yang berperan dalam membunuh sel kanker mammae mencit ternyata antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif, P1, P2, P3, dan P4 terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn

Pada kontrol positif terdapat perbedaan dengan perlakuan pemberian fraksi alkaloid 30 mg/kgbb (P3), sedangkan kontrol positif tidak terdapat perbedaan dengan perlakuan pemberian fraksi alkaloid 10 mg/kgbb (P2) untuk P2 dan P3 tidak terdapat perbedaan ($P > 0,055$). Terlihat bahwa semakin besar dosis fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn yang diberikan menyebabkan peningkatan jumlah Sel NK yang berfungsi membunuh sel kanker mammae sehingga sel NK berfungsi sebagai sel sitotoksik terhadap sel kanker.

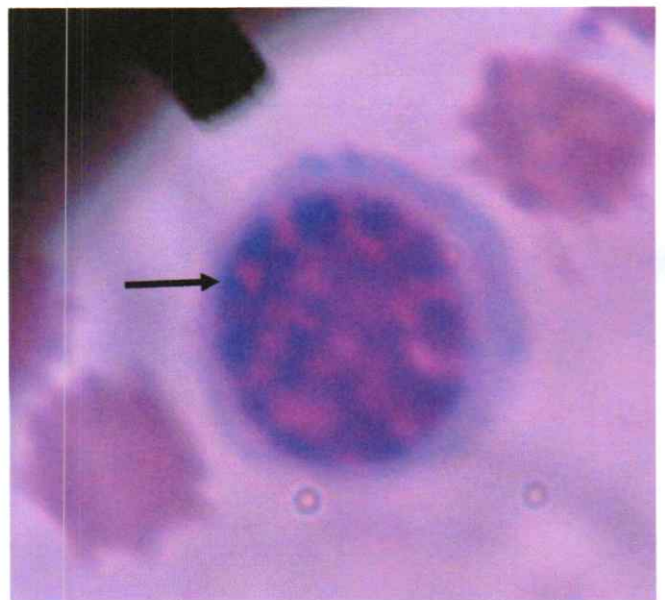
Dari tabel dapat dilihat bahwa pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn pada konsentrasi 30 mg/kgbb memberikan efek yang sama dengan penggunaan cyclophosphamide 6 mg/kgbb secara in vivo, pada pemberian konsentrasi 100 mg/kgb memberikan efek lebih baik ($6,77 \pm 0,42$) daripada kontrol positif ($6,37 \pm 6,40$).



Gambar 5.4. Histogram rerata Sel NK pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian ekstrak fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn



1. Pembesaran 100X



2. Pembesaran 400X

Gambar 5.5. Sel NK sebagai sel sitotoksik (sel berwarna ungu)

Keterangan

→ : Sel NK

5.3. Pemberian Fraksi Alkaloid Daun *Achyranthes aspera* Linn Yang Mengalami Apoptosis dan Nekrosis Pada Sel Kanker Mammae Mencit

Hasil penelitian ekspresi protein p53 dan *cycline dependent kinase* (CDK) pada kanker mammae mencit setelah pemberian alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn pada pemberian 0,5 cc masing-masing larutan uji kontrol negatif, CMC Na 0,5%, 10 mg/kgbb, 30 mg/kgbb, 100 mg/kgbb, dan kontrol positif terhadap apoptosis fraksi alkaloid daun *achyranthes aspera linn* secara in vivo dapat dilihat pada Tabel 5.3. serta Gambar 5.4.

Hasil pemeriksaan uji analisis statistik menggunakan metode deskriptif terhadap Apoptosis, Nekrosis dan Sel Hidup pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn dapat dilihat pada Tabel 5.3. dan Lampiran 8.

Tabel 5.3. Rerata dan Standard Deviasi Hidup, Nekrosis dan Apoptosis setelah pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn

APOPTOSIS PADA SEL KANKER MAMMAE MENCIT			
PERLAKUAN	$\bar{X} \pm SD$		
	Hidup (%)	Nekrosis (%)	Apoptosis (%)
K -	92,50 ^a ±1,43	6,30 ^b ±1,25	1,10 ^d ±0,74
P1 (CMC 0,5%)	30,30 ^b ±1,83	54,20 ^a ±2,44	15,40 ^c ±1,65
P2 (10 mg/kgbb)	26,80 ^b ±1,81	56,10 ^a ±3,96	17,0 ^c ±0,28
P3 (30 mg/kgbb)	7,60 ^{cd} ±1,65	55,70 ^a ±1,47	36,70 ^a ±1,83
P4 (100 mg/kgbb)	5,70 ^d ±0,42	56,20 ^a ±1,03	37,90 ^b ±1,66
K + (Cyclophosphamide 6 mg/kgbb)	12,40 ^c ±6,40	56,30 ^a ±2,58	31,30 ^b ±1,64

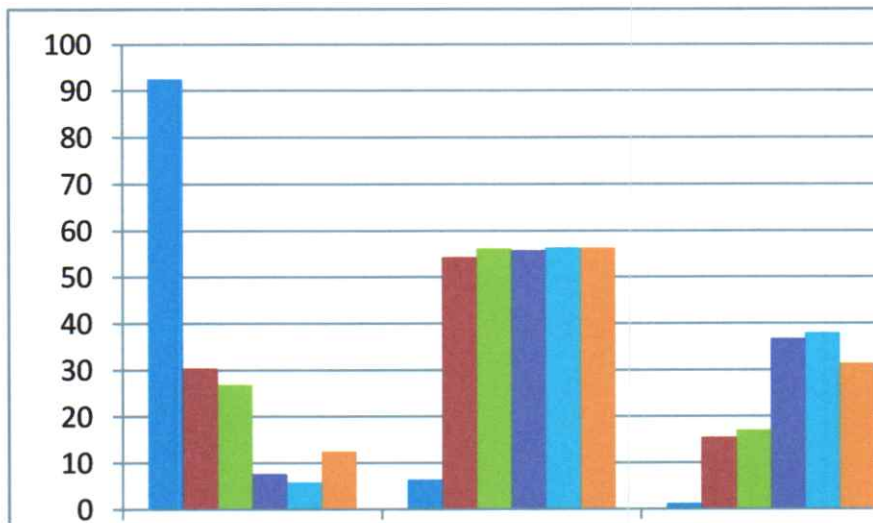
Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Pada tabel 5.3. dapat dilihat bahwa semakin besar dosis fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn yang diberikan menyebabkan peningkatan presentase sel kanker yang mengalami nekrosis dan apoptosis.

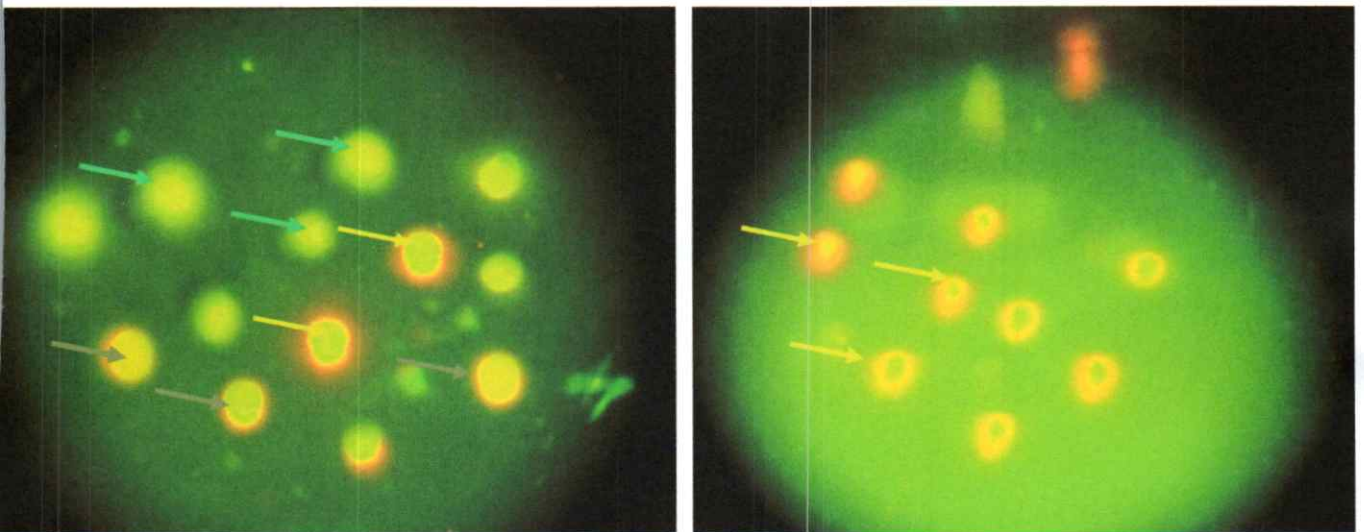
Setelah dilakukan uji statistik menggunakan Anava satu arah yang dilanjutkan dengan uji LSD terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap kejadian nekrosis sel, ternyata antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif, P1, P2, P3, dan P4 terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat kematian sel kanker pada pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn dan Cyclophosphamide, antara kontrol positif dengan semua perlakuan tidak ada perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$). Hal ini berarti bahwa pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn mulai dari konsentrasi 10 mg/kgbb sampai 100 mg/kgbb memberikan efek yang sama dengan penggunaan Cyclophosphamide 6mg/kgbb secara *in vivo*.

Terhadap kejadian apoptosis sel, ternyata antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif, P1, P2, P3, dan P4 terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan ada pengaruh terjadinya apoptosis sel kanker pada pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn dan Cyclophosphamide, antara kontrol positif dengan P3 dan P4 terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Namun antara kejadian apoptosis sel kanker pada konsentrasi fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn 30 mg/kgbb dan 100 mg/kgbb tidak terdapat perbedaan ($P > 0,05$).

Pada kontrol negatif terjadi kematian sel melalui mekanisme nekrosis sebesar $6,30 \pm 1,25\%$ dan apoptosis sebesar $1,10 \pm 0,74\%$. Hal ini dapat terjadi pada sel yang normal yang tumbuh dan berkembang akan selalu terjadi kematian baik secara fisiologis maupun secara patologis.



Gambar 5.6. Histogram rerata hidup, nekrosis, dan apoptosis pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian ekstrak fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn



Gambar 5.7. Sel kanker yang mengalami apoptosis dan nekrosis (Pembesaran 400X)

Keterangan :

- (1)Hidup berwarna hijau (→)
- (2)Nekrosis berwarna coklat (→)
- (3)Apoptosis berwarna kuning ditengahnya (→)

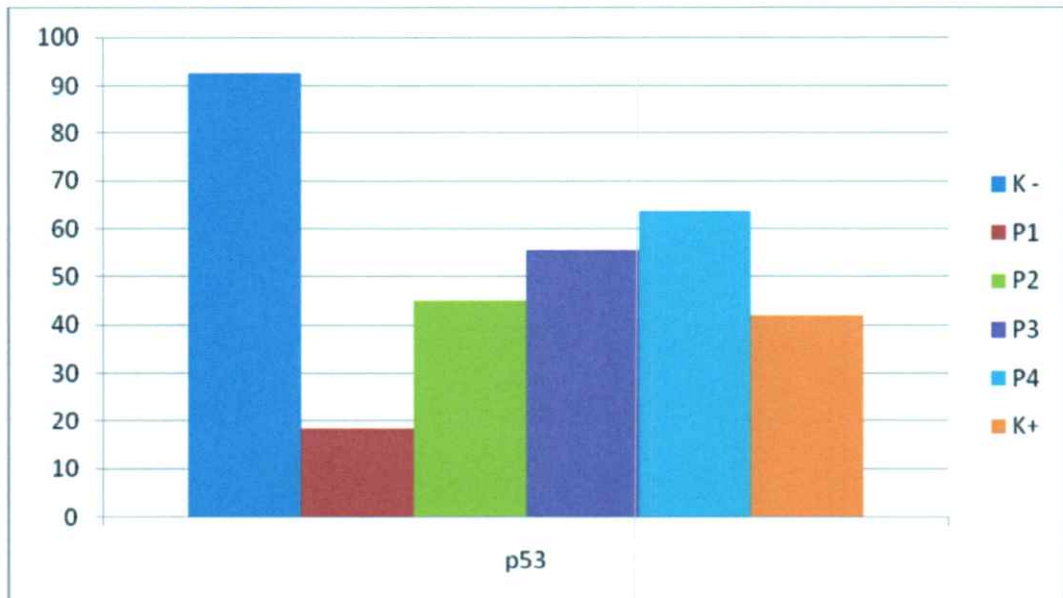
5.4. Pemberian Fraksi Alkaloid Daun *Achyranthes Aspera Linn* Pada Sel Kanker Mammae Mencit Terhadap Protein Gen p53

Dari hasil pemeriksaan terhadap protein gen p53 *wild type* pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian berbagai dosis fraksi alkaloid *Achyranthes aspera Linn*, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.4, lampiran 6, 10, 12. Setelah dilakukan uji statistik menggunakan anava terhadap ekspresi protein p53 antara kelompok kontrol perlakuan (P1) dan semua kelompok perlakuan (P2, P3 dan P4) dan kelompok kontrol positif terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat ekspresi protein gen p53 pada pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera Linn* dan Cyclophosphamide. Antara kontrol positif dengan perlakuan P2 dan P3 tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) namun berbeda dengan P4 ($p < 0,05$), sedangkan p3 tidak berbeda dengan P4 ($p > 0,05$) Hal ini berarti bahwa pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera Linn* pada konsentrasi 10 mg/kgbb dan 30 mg/kgbb memberikan efek yang sama dengan penggunaan cyclophosphamide 6 mg/kgbb secara *in vivo*.

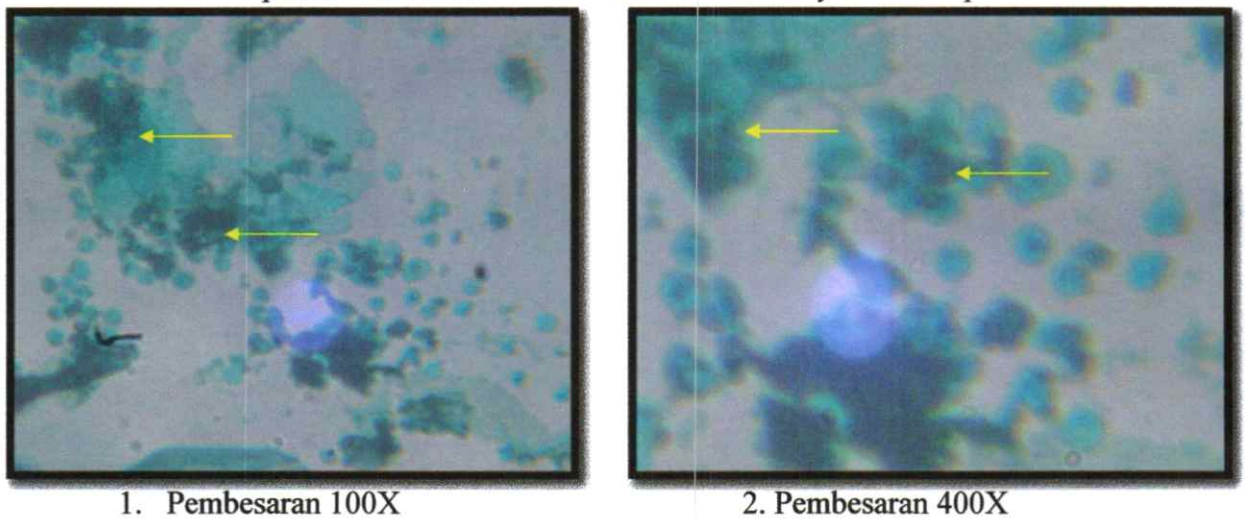
Tabel 5.4. Rerata dan Standard Deviasi Protein p53 pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera Linn*

JUMLAH PROTEIN GEN p53	
PERLAKUAN	$\bar{X} \pm SD$
K -	92,50 ^a ±2,57
P1 (CMC 0,5%)	18,40 ^b ±1,84
P2 (10 mg/kgbb)	45,20 ^c ±4,29
P3 (30 mg/kgbb)	55,60 ^e ±2,91
P4 (100 mg/kgbb)	63,50 ^f ±1,78
K +(Cyclophosphamide 6 mg/kgbb)	41,90 ^d ±2,51

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)



Gambar 5.8. Histogram rerata p53 pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian ekstrak fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn



Gambar 5.9. Ekspresi protein p53 pada kanker mammae mencit
Keterangan :

→ : Protein p53

5.5. Pemberian Fraksi Alkaloid Daun *Achyranthes aspera* Linn Pada Sel Kanker Mammae Mencit Terhadap Jumlah Enzim CDK

Dari hasil pemeriksaan terhadap pemeriksaan terhadap enzim CDK pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian berbagai dosis fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.5.

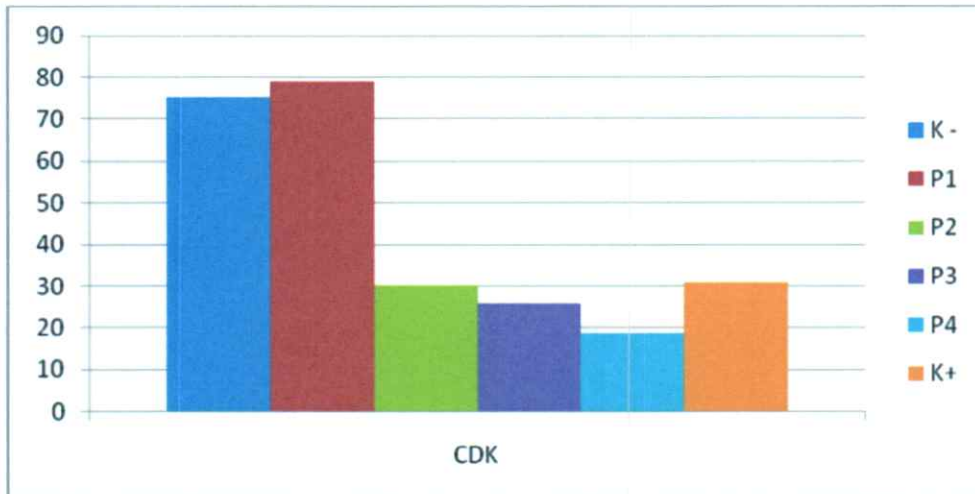
Tabel 5.5. Rerata dan Standard Deviasi enzim CDK pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn

JUMLAH ENZIM CDK	
PERLAKUAN	$\bar{X} \pm SD$
K -	75,30 ^a ±1,89
P1 (CMC 0,5%)	79,00 ^a ±1,70
P2 (10 mg/kgbb)	30,10 ^b ±3,11
P3 (30 mg/kgbb)	25,90 ^{bc} ±2,17
P4 (100 mg/kgbb)	18,70 ^c ±2,54
K +(Cyclophosphamide 6 mg/kgbb)	30,60 ^b ±2,95

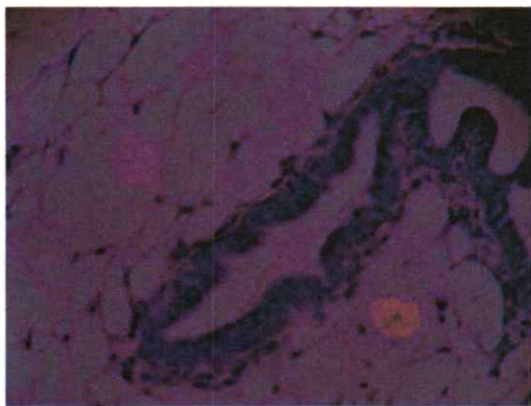
Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

Setelah dilakukan uji statistik lihat lampiran 7, 10, 13 menggunakan Anava satu arah yang dilanjutkan dengan uji LSD terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap enzim CDK, ternyata antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif, P1, P2, P3, dan P4 terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat ekspresi enzim CDK pada pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn dan Cyclophosphamide, antara kontrol positif dengan perlakuan P2 dan P3 tidak ada perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$), tetapi berbeda dengan P4 ($P < 0,005$), sedangkan perlakuan P3 dan P4 tidak ada perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$). Hal ini berarti bahwa pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn mulai dari konsentrasi 10 mg/kgbb sampai 30 mg/kgbb memberikan efek yang sama dengan penggunaan Cyclophosphamide 6mg/kgbb secara *in vivo*, dan terlihat bahwa semakin besar

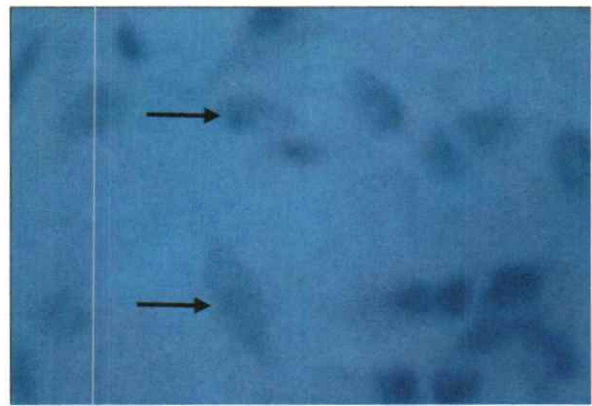
dosis fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn yang diberikan menyebabkan penurunan jumlah enzim CDK yang diekspresikan oleh sel kanker mammae.



Gambar 5.10. Histogram rerata enzim CDK pada sel kanker mammae mencit setelah pemberian ekstrak fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn



1) Pembesaran 100X



2. Pembesaran 400X

Gambar 5.11. Ekspresi enzim CDK pada kanker mammae mencit
 → : Enzim CDK

BAB 6

PEMBAHASAN

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1. Viabilitas Sel Kanker Mammae Mencit Setelah Pemberian Fraksi Alkaloid Daun *Achyranthes aspera* Linn.

Metode viabilitas sel yang didasarkan pada kemampuan senyawa uji untuk membunuh sel. Kemampuan senyawa uji membunuh sel akan tergambar melalui penurunan jumlah sel yang hidup. Viabilitas sel kanker mammae mencit adalah kemampuan hidup sel kanker mammae mencit terhadap lingkungan yang diberikan fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* linn. Viabilitas sel dihitung terhadap jumlah sel kanker mammae yang hidup, yang diamati dibawah mikroskop dengan pewarnaan *tripan blue*, sel-sel yang hidup tidak terwarnai oleh *tripan blue* karena integritas membran selnya yang baik. Sel-sel yang mati akan menyerap zat warna *triptan blue* oleh karena integritas membran selnya rusak sehingga *tripan blue* akan masuk melalui lubang-lubang membran sel ke dalam sel (sitoplasma). Sel yang mati ukurannya cenderung lebih kecil karena sebagian isi sel (sitoplasma) keluar sehingga volume sel menyusut dan diikuti dengan penurunan persentase viabilitas sel kanker mammae. Hal ini sesuai dengan pendapat Freshney(1987) yang menyatakan bahwa kerusakan atau kematian sel akan diikuti dengan perubahan integritas membran.

Pada tabel 5.1. menunjukkan semakin besar dosis fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn yang diberikan menyebabkan peningkatan presentase sel kanker mammae yang mati dan penurunan viabilitas sel kanker. Setelah dilakukan

uji statistik menggunakan Anava satu arah yang dilanjutkan dengan uji LSD terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$). Pada kontrol negatif terdapat perbedaan yang bermakna terhadap semua perlakuan termasuk kontrol positif, sedangkan kontrol positif tidak terdapat perbedaan dengan perlakuan pemberian fraksi alkaloid 30 mg/kgbb (P3) dan 100 mg/kgbb (P4) namun terdapat perbedaan dengan kontrol negatif P1 (fraksi alkaloid 0 mg/kgbb) dan P2 (fraksi alkaloid 10 mg/kgbb). Viabilitas sel kanker mammae antara pemberian fraksi alkaloid 0 mg/kgbb (P1) dengan 10 mg/kgbb (P2) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$) dan viabilitas sel kanker antara pemberian fraksi alkaloid 30 mg/kgbb (P3) dan 100 mg/kgbb (P4) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$).

6.2. Fraksi Alkaloid Daun *Achyranthes aspera* Linn Terhadap Sel NK Pada Sel Kanker Mammae Mencit

Pada tabel 5.2. dapat dilihat bahwa semakin besar dosis fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn yang diberikan menyebabkan peningkatan jumlah Sel NK yang berfungsi sebagai sel sitotoksik terhadap sel kanker mammae mencit.

Pada kontrol positif terdapat perbedaan dengan perlakuan pemberian fraksi alkaloid 30 mg/kgbb (P3), sedangkan kontrol positif tidak terdapat perbedaan dengan perlakuan pemberian fraksi alkaloid 10 mg/kgbb (P2) untuk P2 dan P3 tidak terdapat perbedaan ($P > 0,05$). Terlihat bahwa semakin besar dosis fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn yang diberikan menyebabkan peningkatan jumlah Sel NK yang berfungsi membunuh sel kanker mammae sehingga sel NK berfungsi sebagai sel sitotoksik terhadap sel kanker.

Dari tabel dapat dilihat bahwa pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn pada konsentrasi 30 mg/kgbb memberikan efek yang sama dengan penggunaan cyclophosphamide 6 mg/kgbb secara in vivo, pada pemberian konsentrasi 100 mg/kgb memberikan efek lebih baik ($6,77 \pm 0,42$) daripada kontrol positif ($6,37 \pm 6,40$).

Proses kematian sel melalui mekanisme apoptosis pada Sel NK adalah melalui perforin dan granzyme B yang mengaktifkan caspase. Perforin memfasilitasi pengiriman granzyme B ke dalam sel target melalui mekanisme yang belum jelas, tidak memerlukan pembentukan pori membran plasma (Shi *et al.*, 1997; Metkar *et al.*, 2002.). Granzyme B, prototypic anggota keluarga ini protease serin, mendorong belahan, dan aktivasi beberapa caspases, termasuk caspase-3, caspase-6, caspase-7, caspase-8, caspase-9, dan caspase-10 (MacDonald *et al.*, 1999). Granzyme B juga memotong BID di lokasi yang berbeda dari yang ditargetkan oleh caspase-8 (Alimonti *et al.*, 2001). Mirip dengan tBID (dihasilkan oleh caspase-8), dipotong BID dihasilkan oleh B granzyme (gtBID) translokasi ke membran mitokondria dan mempromosikan pelepasan faktor kematian mitokondria Bax melalui atau BAK (Heibein *et al.*, 2000; Alimonti *et al.*, 2001; Wang, NS *et al.*, 2001.). Karena B granzyme dan CD95L dapat mengaktifkan kematian BID-BAX/BAK-isyarat jalur, mereka menyediakan mekanisme *independen inducing* apoptosis sel target. Dengan demikian, kekurangan sel CD95 atau overexpressing c-FLIP tetap rentan terhadap CTL-akibat kematian (Kataoka *et al.*, 1998). Ini akan menjadi penting untuk menentukan apakah gangguan langkah distal jalur kematian-sinyal bersama oleh

CD95L dan granzyme B (seperti kehilangan Bax / BAK) mengurangi kematian yang disebabkan CTL target sel tipe II yang membutuhkan penghubung antara jalur ekstrinsik dan intrinsik untuk menjalani apoptosis. Seperti genetik hambatan untuk CTL-induced kematian dapat menjadi penting mekanisme di mana sel-sel tumor menghindari pengawasan kekebalan.

Kematian interaksi reseptor-ligan dapat melayani fungsi fisiologis penting dalam tumor surveilans (Kashii *et al.*, 1999). sel NK memainkan peran penting dalam kontrol tumor metastasis (Talmadge *et al.*, 1980; Karre *et al.*, 1986.). Takeda (2001) mengisolasi Sel NK pada hati murin, tanpa mengisolasi T killer sel atau sel T alam biasa, konstitutif mengungkapkan permukaan sel Apo2L/TRAIL, yang, bersama-sama dengan perforin dan ligan Fas (FasL). Administrasi menetralkan antibodi monoklonal terhadap baik Apo2L/TRAIL atau FasL signifikan meningkatkan metastasis hati beberapa tumor sel baris. Sedangkan penghambatan membunuh perforin-dimediasi juga menghambat NK mediated sitotoksitas (Smyth *et al.*, 1999), lengkap inhibisi dicapai hanya dengan kombinasi dari anti-TRAIL dan antibodi anti-FasL antagonistik (Takeda *et al.*, 2001). Endogen interferon- γ diproduksi memainkan peran penting dalam mendorong Apo2L / TRAIL ekspresi pada sel NK dan sel T (Kayagaki *et al.*, 1999). Temuan ini menunjukkan bahwa Apo2L/TRAIL dan FasL dapat menyebabkan penindasan alami tumor oleh sel NK. Ekspresi FasL pada sel-sel selain sel NK juga mungkin berkontribusi untuk penekanan tumor (Owen-Schaub *et al.*, 1998).

6.3. Fraksi Alkaloid Daun *Achyranthes aspera* Linn Yang Dapat Menyebabkan Apoptosis dan Nekrosis Pada Sel Kanker Mammae Mencit

Berdasarkan hasil penelitian seperti pada tabel 5.3. dapat dilihat bahwa semakin besar dosis fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn yang diberikan menyebabkan peningkatan presentase sel kanker yang mengalami nekrosis dan apoptosis.

Setelah dilakukan uji statistik menggunakan Anava satu arah yang dilanjutkan dengan uji LSD terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap kejadian nekrosis sel, ternyata antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif, P1, P2, P3, dan P4 terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat kematian sel kanker pada pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn dan Cyclophosphamide, antara kontrol positif dengan semua perlakuan tidak ada perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$). Hal ini berarti bahwa pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn mulai dari konsentrasi 10 mg/kgbb sampai 100 mg/kgbb memberikan efek yang sama dengan penggunaan Cyclophosphamide 6mg/kgbb secara *in vivo*.

Terhadap kejadian apoptosis sel, ternyata antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif, P1, P2, P3, dan P4 terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan ada pengaruh terjadinya apoptosis sel kanker pada pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn dan Cyclophosphamide, antara kontrol positif dengan P3 dan P4 terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Namun antara kejadian apoptosis sel kanker pada konsentrasi fraksi alkaloid daun

Achyranthes aspera Linn 30 mg/kgbb dan 100 mg/kgbb tidak terdapat perbedaan ($P>0,05$).

Pada kontrol negatif terjadi kematian sel melalui mekanisme nekrosis sebesar $6,30 \pm 1,25\%$ dan apoptosis sebesar $1,10 \pm 0,74\%$. Hal ini dapat terjadi pada sel yang normal yang tumbuh dan berkembang akan selalu terjadi kematian baik secara fisiologis maupun secara patologis.

Kematian sel dapat terjadi melalui nekrosis dan apoptosis. Terjadinya nekrosis sel didahului dengan adanya pembengkakan sel (degenerasi). Pembengkakan sel tampak bila sel tidak mampu mempertahankan homeostasis ion dan cairan. Pembengkakan sel terjadi sebagai akibat pergeseran air ekstraseluler ke dalam sel. Pembengkakan sel mengakibatkan jejas yang bersifat reversible (Andrew *et al.*, 2002; Yalon *et al.*, 2004). Pembengkakan sel yang akut dan bersifat irreversible dipengaruhi hipoksi dan iskemi. Hipoksi yang berlanjut dapat menyebabkan gangguan dalam penyediaan energi ATP. Gangguan dalam pembentukan ATP akan berpengaruh pada enzim ATP-ase terutama pada pembentukan Na-K-ATPase sehingga terjadi gangguan fungsi pompa ion Natrium Kalium (NA-K *Pump*) didalam sel. Hal ini menyebabkan gangguan fungsi pompa natrium dan kalium dalam sel. Akibat penumpukan ion Natrium di dalam sel dan peningkatan ion Kalium di luar sel akan menyebabkan proses pembengkakan sel bertambah. Pada keadaan ini sel masih dapat mengalami perbaikan secara reversible 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 termasuk

mitokondria, golgi apparatus, lisosom dan ribosom akan mengalami pembengkakan. Pembengkakan ini dapat menyebabkan kematian sel. Terjadinya proses pembengkakan sel yang berlanjut menyebabkan organel di dalamnya ikut membengkak yang berakibat kerusakan membran. Selanjutnya sel akan mengalami lisis dan diikuti dengan nekrosis sel yang ditandai dengan inti sel alami pinoksis, karioreksis dan kariolisis (Andrew *et al.*, 2002; Yalon *et al.*, 2004).

Proses nekrosis sel setelah pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn dapat terjadi karena aktivitas dari lisosim. Lisosom dalam sel akan menghasilkan lisozim yaitu enzim yang berfungsi mencernakan membran sel. Hal ini akan menyebabkan kerusakan membran sel seperti mitokondria, ribosom, golgi apparatus termasuk cairan didalam sel akan keluar sehingga sel akan mengalami reksis yang diikuti dengan lisis sel. Hal ini akan menyebabkan nekrosis sel (Andrew *et al.*, 2002; Yalon *et al.*, 2004).

Proses kematian sel akibat adanya apoptosis yaitu kematian sel secara terprogram tanpa didahului oleh proses pembengkakan pada sel atau proses peradangan sel. Proses apoptosis dimulai dengan adanya proses pengkerutan sel, selanjutnya sel akan pecah dan diikuti dengan pecahnya inti sel. Proses pemecahan sel yang diikuti dengan pecahnya inti sel dan kromosom yang membentuk suatu badan sel disebut *apoptotic bodies*, selanjutnya *apoptotic bodies* akan mengalami lisis dan terserap oleh sel sekitar melalui proses *fagositosis* (Lantuejoul *et al.*, 2004).

Proses apoptosis pada sel dapat terjadi melalui proses fisiologi maupun proses patologi. Proses apoptosis yang terjadi secara fisiologis melibatkan peran dan fungsi telomer. Telomer adalah suatu protein yang berfungsi melindungi kromosom. Telomer terbentuk dari aktivasi enzim telomerase. Adanya hambatan pada pembentukan enzim telomerase akan menyebabkan hambatan pembentukan telomer sehingga kromosom pecah dan sel akan mati (Andrew et al., 2002; Lantuejoul et al., 2004).

6.4. Fraksi Alkaloid Daun *Achyranthes Aspera Linn* Pada Sel Kanker Mammae Mencit Terhadap Protein Gen p53

Berdasarkan hasil penelitian seperti pada tabel 5.4. dapat dilihat bahwa semakin besar dosis fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera Linn* yang diberikan menyebabkan peningkatan jumlah protein p53 yang diekspresikan oleh sel kanker mammae mencit dimana antara kelompok kontrol perlakuan (P1) dan semua kelompok perlakuan (P2, P3 dan P4) dan kelompok kontrol positif terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat ekspresi protein gen p53 pada pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera Linn* dan Cyclophosphamide. Antara kontrol positif dengan perlakuan P2 dan P3 tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) namun berbeda dengan P4 ($p < 0,05$), sedangkan P3 tidak berbeda dengan P4 ($p > 0,05$) Hal ini berarti bahwa pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera Linn* pada konsentrasi 10 mg/kgbb dan 30 mg/kgbb memberikan efek yang sama dengan penggunaan cyclophosphamide 6 mg/kgbb secara *in vivo*. Sedangkan pada pemberian konsentrasi 100 mg/kgbb memberikan efek lebih baik daripada kontrol positif.

Apoptosis yang bersifat patologis dapat terjadi aktivasi dari protein kinase C (PKC). PKC akan mengaktivasi suatu protein (p53) yang ada di dalam inti sel. Selanjutnya protein P53 akan mempengaruhi proses transkripsi p21. Terbentuknya protein p21 akan menyebabkan hambatan pembentukan enzim *cyclin dependent kinase* (CDK) termasuk CDK1, CDK2, CDK4 dan CDK6. CDK berfungsi mengikat protein cyclin. Adanya hambatan pada pembentukan semua enzim cyclin menyebabkan protein cyclin menjadi inaktif akibatnya proses siklus sel yang melibatkan proses sintesis DNA pada fase S dan proses sintesis RNA dan G2 serta proses mitosis sel yang terjadi pada fase M akan terhenti sehingga, sel tidak akan mengalami pembelahan dan sel akan mati karena kondensasi kromosom yang menyebabkan terjadinya apoptosis (Andrew *et al.*, 2002 ; Yalon *et al.*, 2004). Mekanisme lain terjadinya apoptosis adalah adanya peningkatan aktivitas protein p53 yang akan mengaktivasi protein Bax. Protein Bax akan merangsang mitokondria untuk memproduksi Cytokrom C. Cytokrom C yang berlebihan akan merangsang terbentuknya apoptosis. Aktivasi faktor apoptosis 1 (APAF1) akan menyebabkan aktivasi caspase inisiasi (caspase 9). Caspase 9 ini bekerjasama dengan caspase 8 untuk menstimulir terbentuknya caspase executor (caspase 3) dan caspase 3 akan mengaktivasi enzim DNA-ase yang selanjutnya enzim DNA-ase akan mencernakan DNA sehingga akan mengakibatkan fragmentasi dari DNA. Adanya fragmentasi dari DNA menyebabkan kematian sel dalam bentuk apoptosis (Yalon *et al.*, 2004).

6.5. Fraksi Alkaloid Daun *Achyranthes aspera* Linn Pada Sel Kanker Mammae Mencit Terhadap Enzim CDK

Berdasarkan hasil penelitian dan setelah diadakan pengujian secara statistik dengan menggunakan analisis varian satu arah yang dilanjutkan dengan uji LSD, hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa semakin besar pemberian dosis fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn yang diberikan menyebabkan penurunan jumlah enzim CDK seperti terlihat pada tabel 5.5. antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif, P1, P2, P3, dan P4 terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat ekspresi enzim CDK pada pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn dan Cyclophosphamide, antara kontrol positif dengan perlakuan P2 dan P3 tidak ada perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$), tetapi berbeda dengan P4 ($P < 0,005$), sedangkan perlakuan P3 dan P4 tidak ada perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$). Hal ini berarti bahwa pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn mulai dari konsentrasi 10 mg/kgbb sampai 30 mg/kgbb memberikan efek yang sama dengan penggunaan Cyclophosphamide 6mg/kgbb secara *in vivo*.

Proses kematian sel melalui mekanisme apoptosis yang bersifat patologis dapat terjadi aktivasi dari protein kinase C (PKC). PKC akan mengaktifasi suatu protein (p53) yang ada di dalam inti sel. Selanjutnya protein P53 akan mempengaruhi proses transkripsi p21. Terbentuknya protein p21 akan menyebabkan hambatan pembentukan enzim *cyclin dependent kinase* (CDK) termasuk CDK1, CDK2, CDK4 dan CDK6. CDK berfungsi mengikat protein cyclin. Adanya hambatan pada pembentukan semua enzim cyclin menyebabkan

protein cyclin menjadi inaktif akibatnya proses siklus sel yang melibatkan proses sintesis DNA pada fase S dan proses sintesis RNA dan G2 serta proses mitosis sel yang terjadi pada fase M akan terhenti sehingga, sel tidak akan mengalami pembelahan dan sel akan mati karena kondensasi kromosom yang menyebabkan terjadinya apoptosis (Andrew *et al.*, 2002 ; Yalon *et al.*, 2004).

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat dibuat kesimpulan sebagai berikut :

1. Terjadi penurunan viabilitas sel kanker mammae dengan tingkat kematian sel kanker mammae mencit sebesar $91,50 \pm 2,27$ % dengan konsentrasi 100 mg/kgbb
2. Jumlah Sel NK meningkat pada sel kanker mammae setelah pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn 100 mg/kgbb sebesar $6,77 \pm 0,42$ %
3. Kematian sel kanker mammae terjadi peningkatan sel apoptotic bodies sebesar $37,90 \pm 1,66$ % dan sel yang mengalami nekrosis sebesar $56,20 \pm 1,03$ % dengan konsentrasi fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn sebesar 100 mg/kgbb
4. Jumlah peningkatan ekspresi protein gen p53 sebesar $63,50 \pm 1,78$ pada sel kanker mammae setelah pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn 100 mg/kgbb
5. Jumlah penurunan ekspresi enzim CDK sebesar $18,70 \pm 2,54$ pada sel kanker mammae setelah pemberian fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn 100 mg/kgbb

SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian aktivitas fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn penyebab apoptosis sel kanker mammae melalui ekspresi caspase 3, fragmentasi DNA dan interaksi obat

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Andrew W, D. Vicky, D.Hill, J.Keesey and S.Manzow. 2002. Cell Death Apoptosis and Necrosis Proliferation. Boehringer Mannheim.
- Alimonti, J.B., Shi, L., Baijal, P.K. and Greenberg, A.H. (2001) Granzyme B induces BIDmediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition. *J.Biol.Chem.*276:6974–6982.
- Adnyana, I.D.P. 2006. Efek Fraksi Alkaloid Daun Jarong (*Achyranthes Aspera* Linn) Terhadap Pembelahan Sel Mieloma Mencit Sebagai Obat AntiKanker.Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Ama dan Faisol, 2005. Masalah Kanker Payudara dan pemecahannya . *Majalah Kesehatan Masyarakat Indonesia*. Tahun XIX(Nomor 1 Maret. Jakarta.
- Chabner, B.A., D.P. Rian., L. Paz-Ares., R.G. Carbonero and P. Calabresi. 2001. Antineoplastic Agents. In Goodman & Gilman's The Pharmacological basis of Therapeutics. 10 th. Edition. McGraw-Hill. Medical Publishing Division. p.1417-1421.
- Choudhury, S.C., A.K. Palo and A. Padhy. 2004.Cytogenetic Consequences of Vinblastine Treatment in Mouse Bone-marrow. *Chemoterapy*. 50 (4). p. 171-177.
- Chakraborty A., A. Branther., T. Mukainaka., T. Konoshima., H. Tokuda and H. Nishino. 2002. Cancer chemopreventive activity of *Achyranthes aspera* leaves on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Institute of Pharmacognosy. Cancer Lett.* Mar 8:177(1). p. 1-5.
- Cody,V, E. Middleton, J.B. Harborne and M. Borets. 1997. Progress in Clinical and Biological Research. Plant Flavonoid in Biology and Medicine II. Vol 200. Alan R Liss, Inc. New York.
- Dalimartha, S., 2003. Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Kanker, Penebar Swadaya, Jakarta, hal. 1-52.
- Departemen Kesehatan. 1997. Inventaris Tanaman Obat Indonesia (IV). Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Hal. 1-2.
- Dyatmiko, W., A. Fuad dan M.H. Santosa. 2000. Konsep Standarisasi Pada Bahan dan Produk Obat dari Tanaman. Kongres Nasional Obat Tradisional Indonesia. Nop. 20-22. p. 12-29.
- Elisabeth., S. Cokro, M. Joko, dan Parto, 2000, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon: Kaitannya dengan minyak sawit dan kesehatan, warta Pusat Penelitian Kelapa Sawit, Medan.hal : 36-37

- Freshney, I.R., 1987. *Culture of Animal Cell : A manual Basic of Technique*, 2nd ed, Alan R. Liss Inc., New York, p 227-292.
- Fujiwara, M., H. Kamma., H. Wu., M. Hamasaki., S. Kaneko., H. Horiguci., Matsui-Horiguci and M.H. Satoh. 2004. Express and Alternative Splincing Pattern of Human Telomerase Reverse Transcriptase in Human Lung Cancer Cells. *J. Oncol Apr.*, 24: 925-930.
- Gao, X.Y., D.W. Wang and F.M. Li. 2000. Determination of Achysterane in *Achyranthes Bidentata* and its Activity Promoting Proliferation of Osteoblast-Like Cell. *Yao Xue Xue Bao*. Nov:35: 868-870.
- Gavrieli Y., Y. Sherman, and SA. J. Ben-Sasson. 1992 *Cell Biol*. Nov.,119: 493-501.am sury
- Hamilton, R.J. and P.A. Sewel. 1979. *Introduction to High Performance Liquid Chromatography*. Chapman and Hall. London.
- Harbone, J.B. 1973. *Phytochemical Methode*. Chapman and Hall. London. p. 109-116.
- Heibein, J.A., Goping, I.S., Barry, M., Pinkoski, M.J., Shore, G.C., Green, D.R. and Bleackley, R.C. (2000) Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J.Exp. Med.* 192:1391–1402.
- Hembing, W.H.M., A. Wirian, T. Yaputra, S. Dalimartha dan B. Wibowo, 1996. *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*. Cet.4. P.T. Karya Wreda, hal. 46-47.
- Heusel, J.W., R.L. Wesselschmidt, S. Shresta, J.H. Russell, and T.J. Ley. 1994 Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76:977–987.
- HSDB. 2003. Hazardous Substances Database. Cyclophosphamide. National Library of Medicine. Last Updated 8/29/03. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/html> diakses tanggal 28 agustus 2009.
- Huang, D.M., J.H. Guh, Y.T. Huang, S.C. Chueh, P.C. Chiang, and C.M. Teng. 2005. Induction of Mitotic Arrest and Apoptosis in Human Prostate cancer PC-3 Cells by Evodiamine. 173 (1). p. 256-261.
- IARC. 1981. *Some Antineoplastic and Immunosuppressive Agents*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to

- Humans, vol. 26. Lyon, France :International Agency for Research on Cancer. 411 pp.
- Ida, Y., M. Katsumata., Minagasao., Y. Hirai., T. Kajimoto., N. Katada., M. Yasuda and Yamamoto. 1998. Two Novel Oleanolic acid Saponin Having a Sialyl Lewis X Mimetic Structure Achyrantes fauriei Root. *Bioorg Med Chem.Lett.* Sep.22.8(18): 2555-2558.
- Ikan, R. 1991. *Natural Product A Laboratory Guide*. 2nd.Ed. Academic Press, Toronto, p. 227-253.
- Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G. and Kiessling, R. 1986 Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319:675-678.
- Karjala, G, Q. Chan, E. Manzo, R.J. Andersen, and M. Roberge. 2005. Ceratamides, Structurally Simple Microtubule-Stabilizing Antimitotic Agents with Unusual Cellular Effects. *Cancer Res.* 65 (8). p. 3040-3043.
- Kashii, Y., R. Giorda, R.B. Herberman, T.L. Whiteside, and N.L. Vujanovic. 1999 Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J.Immunol.* 163:5358-5366.
- Kataoka, T., M. Schroter, M. Hahne, P. Schneider, M. Irmeler, M. Thome, C.J.Froelich, and J. Tschopp. 1998 FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J.Immunol.* 161:3936-3942.
- Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, H. Eto, K. Okumura, and Yagita, H. 1999 Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J.Exp.Med.* 189:1451-1460.
- Koosnadi, S., M. Suprpto, dan S. Roemwerdianidi. 2000. *Terapi Biologi Untuk Kanker*. Cet 1. Airlangga University Press, Surabaya, hal 50 -51.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat Dengan Hewan Coba*. Cet. 1. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Kusriningrum. 1989. *Dasar Rancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Universitas Airlangga.
- Lanteujoul., S.J.C. Soria., D. Moro-Sibilot., L. Morat., S. Vegrenc., P. Lorilier., P. Y. Brichon., L Sabatier., L. Brabilia, and E. Brambilla. 2004. Differential Expression of Telomerase Reverse Transcriptase (h TERT) in Lung Tumors *J. Cancer.* Mar 22 ; 90(6) 1222-1229.

- Levine. 1979. Discovery of p53 Historical Perspective. <http://www.lifesciences.napier.ac.uk/courses/projectsoo/p53/history.htm>. (I). Diakses tanggal 28 agustus 2009
- Li, J.H., Rosen, D., Ronen, D., Behrens, C.K., Krammer, P.H., Clark, W.R. and Berke, G. 1998 The regulation of CD95 ligand expression and function in CTL. *J.Immunol.* 161: 3943–3949.
- Mac Donald, G., L. Shi, V.C. Vande, J. Lieberman, and A.H. Greenberg. 1999 Mitochondria-dependent and -independent regulation of granzyme B-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 189:131-144.
- Mardiswojo, S dan H.R. Kusuma. 1968. Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang. Cet. III. PT. Karya Wreda.
- Meles D.K., 2004, Efek Antifertilitas dan Uji Reversibilitas Spermatogenik *Achyranthes Aspera* Linn Pada Staging Spermatogenesis Dalam Upaya Penemuan Obat Kontrasepsi. Laporan Penelitian, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya, hal 31-34.
- Meles D.K., 2005, Efek Antimitosis Fraksi Alkaloid *Achyranthes Aspera* Linn Pada Pembelahan Sel Embrio. Laporan Disertasi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya, hal 14-25.
- Meng, R.D. and E.S. El-Deiry. 1999. Tumor Suppressor Genes as Targets for Cancer Gene Therapy. In: *Gene Therapy of Cancer*. Academic Press. San Diego. hal 3–15.
- Metkar, S.S., B. Wang, M. Aguilar-Santelises, S.M. Raja, L. Uhlin-Hansen, E. Podack, J.A. Trapani, and C.J. Froelich, 2002 Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* 16:417–428.
- Meyer, D.J. and J.W. Harvey. 2003. *Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and Diagnosis*. W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- Mitaine, A.C., A. Marouf., B. Haquei., N. Bilirakis., and M.A. Lacaille. 2001. Two Tripenoid and Saponin From *Achyranthes Bidentata*. *Chem. Pharm Bull.(Tokyo)*. Nov. 49 (11) p. 1492-1494.
- Nafrialdi, G., 1995. *Farmakologi dan Terapi edisi IV*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, hal 686-701.
- Nagata S., 1997. “Apoptosis by death factor” dlm. *Cell* 88: 355–65 www.pubmed.gov , diakses tanggal 24 september 2009.
- Noor Cholies, 1982. *Komponen Herba Veronica cinneria yang Berkhasiat Anti Kanker*. Disertasi, FMIPA-ITB.

- Oloff A, J.B. Gibbs, F. Mc Cormick, 1996. New molecular targets for cancer therapy. *Scienti Am.*, 275: 110-5.
- Owen-Schaub, L.B., K.L. Van Golen, L.L Hill, and J.E. Price. 1998. Fas and Fas ligand interactions suppress melanoma lung metastasis. *J.Exp. Med.* 188: 1717-1723.
- Putra, S.T., 1997. Patofisiologi Kedokteran. Graha Masyarakat Ilmiah Kedokteran Universitas Airlangga. hal 16-18.
- Putra, S.T., 1993. Pewarnaan Imunohistologik dan Imunohistopatologik Untuk Penelitian Kedokteran. Graha Masyarakat Ilmiah Kedokteran Universitas Airlangga.
- Putra, S.T., 1993. Peran Pemeriksaan Imunohistokimia dibidang Kedokteran. Graha Masyarakat Ilmiah Kedokteran Universitas Airlangga.
- Perkins AS, and Stern DF. 1997. Molecular Biology Of Cancer : Oncogenes. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA(eds) *Cancer: Principles of oncology*, Philadelphia, Lippincott-Raven Publ. p.79-102
- Peterson K.R., 2006. Cancer (Medicine) [http://www.cancer.org.com/Microsoft Encarta/cancer \(medicine\)](http://www.cancer.org.com/MicrosoftEncarta/cancer(medicine)), diakses tanggal 28 agustus 2009.
- Rang, HP., M.M. Dale, and J.M. Ritter. 1998. *Pharmacology 3rd Edition* . Churchill Livingstone Inc. New York. Halaman 71-79.
- Rochestry, S, 2000. Terapi Kanker pada Tingkat Molekuler. Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknik Nuklir - Batan, Jakarta, Cermin Dunia Kedokteran No. 127.
- Roiit I.M., 1991. *Essential Immunology*. Blackwell Sci Publ.London
- Sadler, T.W. 1995. *Langman's Medical Embryology*. 7th. Ed. Williams and Wilkins Baltimore-Philadelphia-Hongkong
- Sherr, D.H., S.T. Ju, D.J. Panka, H. Cui, R. Ettinger, M. el Khatib, B.Z. Stanger, and A. Marshak-Rothstein. 1995 Fas (CD95) / FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 373:444-448.
- Shi, L., S. Mai, S. Israels, K. Browne, J.A. Trapani, and A.H. Greenberg. 1997 Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *J.Exp. Med.* 185:855-866.

- Shresta, S., D.M. MacIvor, J.W. Heusel, J.H. Russell, and T.J. Ley. 1995 Natural killer and lymphokine-activated killer cells require granzyme B for the rapid induction of apoptosis in susceptible target cells. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 92:5679–5683.
- Siswandono, 1983. Mekanisme Kerja Obat-obat Antikanker, Buletin ISFI Jatim, Tahun X, No. 1-2, hal. 3.
- Siswandono dan Soekarjo, B., 1995, Kimia Medisinal II, Airlangga University Press, Surabaya, hal 307- 309.
- Soekarjo, B., 1995. Kimia Medicinal. Airlangga University Press. hal. 407-408.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Cretney, E., Kelly, J.M., Snook, M.B., Forbes, C.A. and Scalzo, A.A., 1999. Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *J. Immunol.* 162:6658–6662.
- Sukardiman, H.P., dan A. Widyawaruyanti, 2000. Penapisan Senyawa Antikanker dan Tanaman Obat Indonesia dengan Molekul Target DNA Topoisomerase, Faklutas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya, Hal.1-16.
- Suryo, H., 1995. Sitogenetika. Cet.1. Gajah Mada University Press, Bulak sumur, Yogyakarta. 814.60.10.95. Hal.219-226.
- Sui, M and W. Fan. 2005. Combination of Gamma-radiation Antagonizes the Cytotoxic Effects of Vincristine and Vinblastine on Both Mitotic Arrest and apoptosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 61. 1511-1158.
- Syamsuhidayat, 1994. Tumbuhan Bermanfaat Disekitar Kita. Pustaka Raya. Jakarta, hal. 3-4.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H. and Okumura, K. (2001) Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat. Med.* 7:94–100.
- Talmadge, J.E., Meyers, K.M., Prieur, D.J. and Starkey, J.R. (1980) Role of NK cells in tumour growth and metastasis in beige mice. *Nature* 284:622–624.
- Tjahjadi dan Gunawan, 2000, Patologi Tumor Ganas Payudara, Kursus Singkat *Deteksi Dini dan Pencegahan Kanker*. 6-8 November. FKUI-pol. Jakarta
- Tjahjadi dan Gunawan, 2006 Patologi Tumor Ganas Payudara. Bagian patologi Anatomi. FKIII. Jakarta.

- Tjindarbumi, 2000. Deteksi Dini Kanker Payudara dan Penanggulangannya Dalam: Deteksi Dini Kanker. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Tjindarbumi, 2002. Penemuan Dini Kanker Payudara dan Penanggulangannya dalam: Diagnosis Dini Keganasan serta Penanggulangannya. FKUI. Jakarta.
- Tjindarbumi, 2002. Penanganan kanker Dini dan Lanjut. Bagian Patologi Anatomi. FKUI. Jakarta.
- Tjindarbumi, 2005. Diagnosis dan Pencegahan Kanker Payudara, Kursus Singkat Deteksi Dini dan Pencegahan Kanker. 6-8 November. FKCI-POI. Jakarta.
- Trevor R., 1991. The Organic Constituents of Higher Plants, 6th ed. Department of Biochemistry. University of Massachusetts Amherst, Ma 01003.
- Toni S., 2005. Kanker. <http://www.detok.com/kaker.org>. diakses tanggal 24 agustus 2009.
- Ward, F, D. Rizos, D. Corridan, K. Gluinn, M. Boland and P. Leonargan. 2001. Paternal Influence on The Time of First Embryonic Cleavage Post Insemination and The Implications for Subsequent Bovine Embryo Development In Vitro and Fertility In Vivo. *Mol Reprod Dev.* 60 : 47-55.
- Wang, N.S., M.T. Unkila, E.Z. Reineks, and C.W. Distelhorst. 2001 Transient expression of wild-type or mitochondrially targeted Bcl-2 induces apoptosis, whereas transient expression of endoplasmic reticulum-targeted Bcl-2 is protective against Bax-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 276:44117-44128.
- Wei. S., H. Liang., Y. Zhao and R. Jhang. 1997. Separation and Identification of The Compounds from *Achyranthes Bidentata*. *Zhongguo Zhong yao Za Zhi.* May 22(5) : 293-295, 319-320.
- Wurlina. 2000. Efek Antifertilitas Infusa Daun *Achyranthes Aspera* Linn Terhadap Siklus Birahi Pada Mencit. Lab. Ilmu kemajiran. FKH Universitas Airlangga.
- Wurlina, W. Sastrowardoyo, dan D. K. Meles, 2002. Pengaruh ekstrak Etanol *Achyranthes Aspera* linn Terhadap Perkembangan Embrio (Cleavage) Mencit (*Mus musculus*). Lemlit. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Wurlina, W. Sastrowardoyo dan D.K. Meles. 2003. Pengaruh Antimitosis Ekstrak Etanol *Achyranthes Aspera* Linn Terhadap Jumlah Kebuntingan, Korpus

- Luteum, Tahap Implantasi dan Anak Dalam Upaya penemuan Obat Antifertilitas Setelah Hubungan Seksual (Post Coital Contaception). Lemlit Unair. Laporan Kegiatan Penelitian Traditional Medicine , Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya, hal. 9-13.
- Wurlina, W. Sastrowardoyo dan Sunarni. Z. 2009. Ekspresi Protein P21 Pada Kanker Mammae Mencit Setelah Pemberian Fraksi Alkaloid Jarong (*Achyranthes Aspera Linn*) Laporan Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Batch 1 (cluster Gizi dan Kesehatan). Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya, hal. 4-5.
- Yalon, T.J., R. Kocki, and B.h. Choi. 2004. In Press: Cancer Chemotherapy and Pharmacology. <http://www.pubmed.com/full text/paper cancer.org>.
- Zhou, J., M. Liu, R. Aneju, R. Chandra and H.C. Joshi. 2004. Enhancement of Paclitaxel-induced Microtubule Stabilization, Mitotic Arrest, Fnd Apoptosis by The Microtubule-targeting Agent EM012. *Biochern. Pharmacol.* 68. 2435-2441.

LAMPIRAN

LAMPIRAN

Lampiran 1. Susunan nilai gizi pakan tikus dan mencit

Berdasarkan Farris and Griffith (1971) kebutuhan kadar nilai Gizi pakan tikus sebagai berikut :

Protein	: optimum untuk pertumbuhan dan laktasi = 22-23%
Lemak	: 5-8% atau 25 mg/hari. Karbohidrat :4-6%
Kalsium	: 0,5-0,6%
Fosfor	: 0,7-0,9%
Natrium	: 0,5%
Chlor	: 5 mg/ hari
Copper	: 0,05 mg/hari
Mangan	: 0,5-0,8 mg/hari
Magnesium	: < 4 mg/kg. Bb/ hari.
Zink	: 40 microgram/hari
Vitamin A	: 4 microgram/ hari, dalam bentuk Caroten 15-20 microgram.
Thiamin	: 10-12 ug/hari
Riboflavin	: 40-120 ug/hari
Pyridoxin	: 10 ug/hari
Vitamin D	: tidak dibutuhkan tergantung keseimbangan Ca dan P.
Vitamin E	: 1 mg/ hari alfa tocopherol 3 mg/ hari pada saat bunting.
Vitamin K	: tidak dibutuhkan
Nicotinic acid	: tidak dibutuhkan

Untuk memperoleh kadar zat makanan yang sesuai dengan kebutuhan zat makanan untuk tikus (*Rattus-rattus*) dipakai pakan ternak untuk ayam pedaging periode starter dengan merek Broiler I produksi PT. Jaffa Comfeed Indonesia tbk. ditambah dengan kecambah kacang hijau secukupnya.

Susunan Nilai Gizi pakan Broiler I sebagai berikut :

Protein = 21-23%, Lemak = 5-8%, Serat = 3-5%, Kalsium = 0,9-1,1 %, Fosfor = 0,7-0,9%, Abu = 5-7%, Energi = 2.800-3.000 kcal/ kg.

Lampiran 2. Perhitungan Dosis Benzo(α) pyrene, Chyclophosphamide dan CMC NA 0,5 %

A. Perhitungan dosis chyclophosphamide

Konversi perhitungan dosis untuk berbagai jens hewan dan manusia (kusumawati, 2004).

	Mencit 20 g	Tikus 200 g	Marmut 400 g	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 g	1,0	70	1225	2780	2970	6410	12420	38790
Tikus 200 g	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	1,78	5,6
Marmut 400 g	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	1,02	3,15
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	1,42
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	1,3
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,08	0,06	0,1	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,6

Sediaan obat Cyclophosphamide dengan penggunaan dosis harian dalam tablet bersalut 6 mg/kgbb untuk manusia dewasa di indonesia yang memiliki berat dengan standart rata-rata 50 kg sedangkan standart konversi obat di dunia menggunakan berat badan 70 kg

Jadi pemberian dosis dengan konversi dari dosis manusia ke dosis mencit adalah sebagai berikut :

Dosis untuk orang Indonesia :

$$6 \text{ mg/kgbb} \propto 70 \text{ kg}$$

$$50 \text{ kg} \propto 70 \text{ kg} \longrightarrow \frac{70 \text{ kg} \times 6 \text{ mg/kg}}{50 \text{ kg}} = 8,4 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis untuk orang Indonesia} = 8,4 \text{ mg}$$

Dosis untuk mencit, dengan konversi dari standart manusia ke mencit :

$$8,4 \text{ mg} \propto 20 \text{ g}$$

$$20 = 0,0026 \text{ (table konversi) } \times 8,4$$

$$= 0,02184 \text{ mg}$$

Kemudian diencerkan sampai 0,5 cc dengan aquadest steril dan diberikan secara peroral dengan sonde.

B. Perhitungan CMC NA 0,5 %

Sediaan CMC NA yang ada adalah CMC NA 2%, dan karena bentuk dari CMC NA 2% dan tidak sesuai dengan sistem pencernaan dari mencit dan tidak bisa diambil dengan spuit jadi membutuhkan CMC NA 0,5% yang sesuai dg kondisi saluran pencernaan sehingga Perhitungan CMC NA 2% adalah :

$$\text{CMC NA 2\%} \longrightarrow \text{CMC NA 0,5\%}$$

$$2\% \longrightarrow 0,5\%$$

$$\frac{2}{100} \times X = \frac{0,5}{100}$$

$$\frac{2X}{100} = \frac{0,5}{100}$$

$$200 X = 50$$

$$X = \frac{50}{200}$$

$$= \frac{1}{4}$$

Jadi jika 1 cc lar CMC NA 2% + 3 cc aquadest steril = 4 cc CMC NA 0,5%

Misal jika CMC NA 2% 5 gram berapa pelarut yang di butuhkan untuk menjadi CMC NA 0,5% = $\frac{0,5}{2} \times 1000 = 250 \text{ ml pelarut}$

C. Perhitungan Benzo(α)pyrene

Dosis dari benzo(α)pyrene adalah 10 mg/kgbb dimana berat badan mencit adalah 20 gram, sehingga Perhitungan benzo(α)pyrene adalah :

Benzo(α)pyrene 10 mgg/kgbb ∞ mencit 20 gram

$$\frac{20}{1000} \times 10 \text{ mg} = 0,2 \text{ mg}$$

0,2 mg diencerkan add 0,5 cc dengan oilum olifarum

Oilum olifarum yang dibutuhkan untuk mengencerka sebesar :

$$\text{Benzo}(\alpha)\text{pyrene } 0,2 \text{ mg} = 0,5 \text{ cc}$$

$$10 \text{ mg} = X \text{ (oilum olifarum)}$$

$$\frac{10}{0,2} \times 0,5 = X$$

$$\frac{50}{2} = X$$

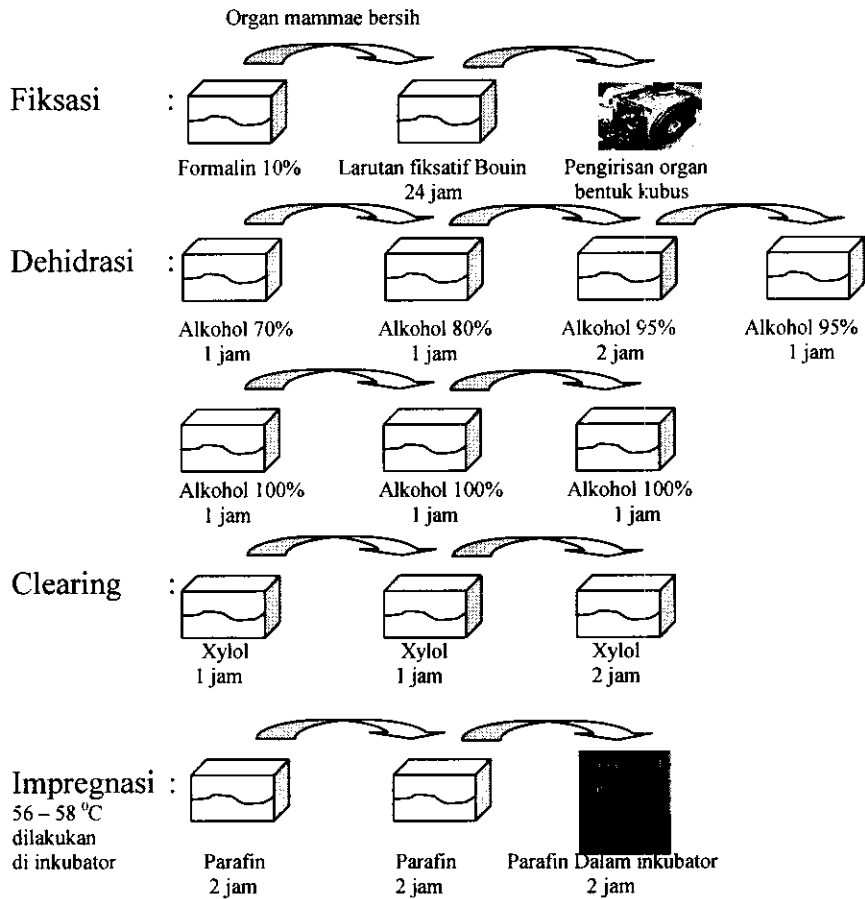
$$25$$

25 cc oilum olifarum

Jadi pengencer yang dibutuhkan untuk melarutkan 10 mg/kgbb

Benzo(α)pyrene adalah 25 cc oilum olifarum

Lampiran 3. Pembuatan Sediaan Histologis



Pembuatan Sediaan Histologis Biopsi Sel Kanker Mammae dimulai dari dehidrasi, clearing, impregnasi, dan embedding (Putra, 1993).

Lampiran 4. Foto-foto penelitianGambar 4.1. Fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn

Gambar 4.2. Penimbangan bahan

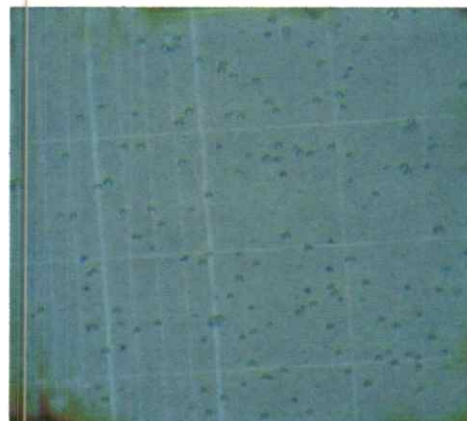
Gambar 4.3. Ekstrak fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn



Gambar 4.4. Larutan kontrol negatif, CMC NA 0,5%, AAL 10mg/kgbb, AAL 30mg/kgbb, AAL 60 mg/kgbb, AAL 100mg/kgbb, kontrol positif.



1



2

Gambar 4.5. Viabilitas dengan hemositometer
(1) Zat warna *Tripian Blue*
(2) Lapangan pandang hemositometer



Gambar 4.6. Pemberian Benzo(α)pyrene secara subkutan pada mammae mencit



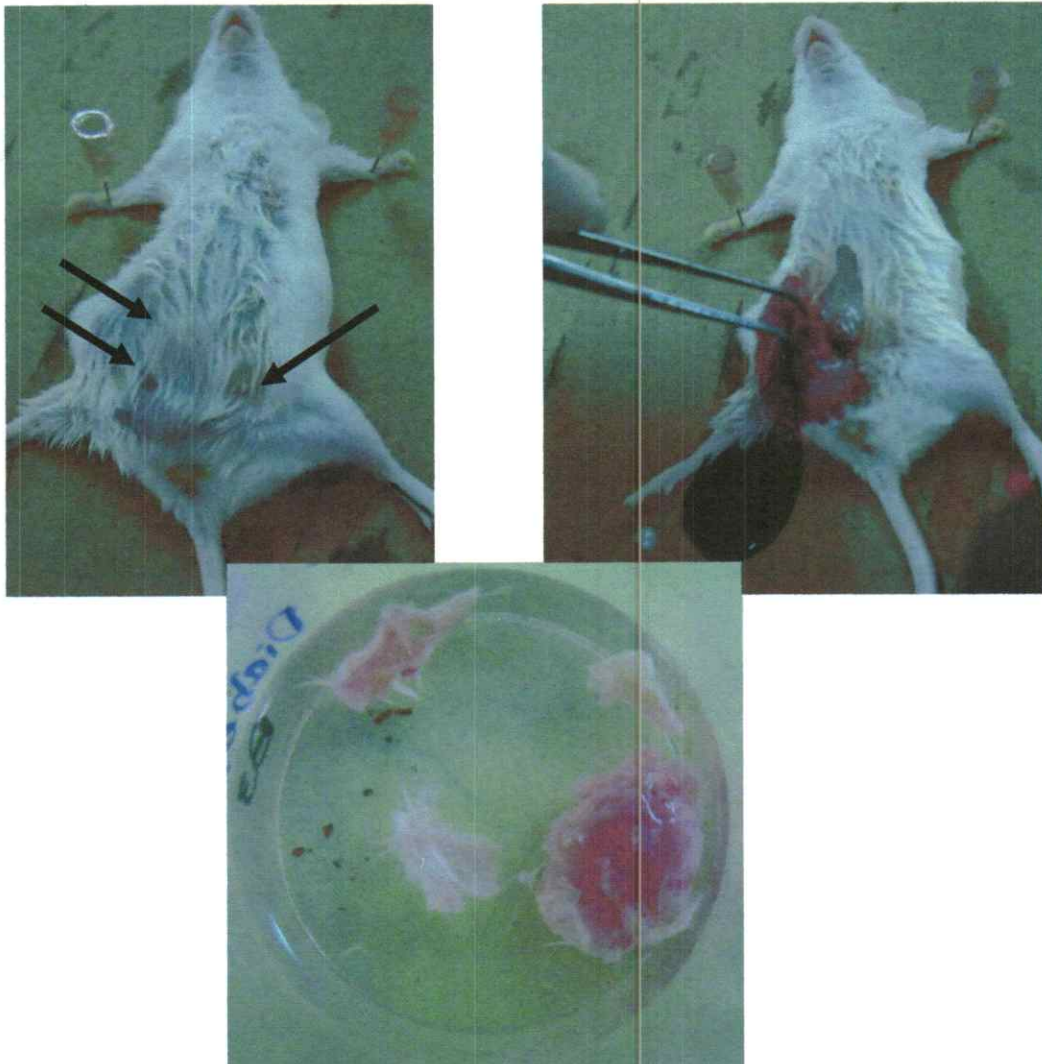
Gambar 4.7. Pemberian dosis fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera* Linn menggunakan sonde



Gambar 4.8. Pengerusan Cyclophosphamide dengan alu dan mortar yang diberi pelarut CMC Na 0,5%



Gambar 4.9. Ether dan sebagian alat-alat yang digunakan saat penelitian



Gambar 4.10. pengambilan sel kanker mammae, makroskopis adanya benjolan pada mammae



Gambar 4.11. Pengambilan darah kanker mammae mencit untuk parameter Sunarni Zakaria dr., M.Kes. (Dosen Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Pendidikan Doktor Program Pascasarjana Universitas Airlangga)



Gambar 4.1.2. Mikroskop fluroucence merk nikon untuk pemeriksaan preparat imunohistokimia

Lampiran 5. Data-data viabilitas sel kanker mammae mencit

Ulangan	Perlakuan					
	No.	K -	P1	P2	P3	P4
1.	95	31	27	10	8	14
2.	94	28	24	12	7	20
3.	98	27	30	8	12	21
4.	97	35	22	12	7	13
5.	95	36	30	11	7	8
6.	91	34	32	12	11	8
7.	95	37	24	12	6	7
8.	94	26	31	7	12	21
9.	97	35	28	8	7	22
10	96	30	31	16	8	7
Σ	952	319	279	108	85	141
\bar{X}	95,2	31,9	27,9	10,8	8,5	14,1
SD	1,99	6,40	4,01	3,51	2,66	2,27

Lampiran 6. Data-data jumlah protein gen p53 sel kanker mammae mencit

Ulangan	Perlakuan					
	No	K -	P1	P2	P3	P4
1.	93	19	45	55	63	42
2.	90	18	40	54	65	45
3.	95	20	43	54	60	43
4.	93	20	43	50	65	43
5.	93	21	42	60	65	40
6.	90	20	40	55	62	43
7.	96	17	50	54	62	42
8.	90	17	49	58	65	38
9.	91	16	48	58	65	38
10	97	16	52	58	63	45
Σ	928	184	452	556	635	419
\bar{X}	92,5	18,4	45,2	55,6	63,5	41,9
SD	2,57	1,84	4,29	2,91	1,78	2,51

Lampiran 7. Data-data jumlah protein gen CDK sel kanker mammae mencit

Ulangan	Perlakuan					
	K -	P1	P2	P3	P4	K +
1.	13	79	30	25	18	32
2.	10	80	31	27	16	30
3.	12	75	30	25	15	35
4.	10	80	30	25	18	29
5.	15	81	32	28	18	26
6.	12	78	30	30	20	35
7.	13	80	28	23	21	30
8.	13	80	28	25	14	32
9.	10	78	37	25	22	32
10	15	79	25	23	18	35
Σ	123	790	301	256	180	316
X	12,3	79,0	30,1	25,6	18,0	31,6
SD	1,89	1,70	3,11	2,17	2,54	2,95

Lampiran 8. Data-data presentase apoptosis sel kanker mammae mencit

Kontrol -	Jumlah sel kanker		
	Sel Hidup (%)	Sel Nekrosis (%)	Sel Apoptosis (%)
1	93	6	1
2	94	4	2
3	90	8	2
4	93	6	1
5	90	8	1
6	93	7	0
7	94	6	0
8	92	7	1
9	93	6	1
10	93	5	2
Σ	925	63	11
X	92,5	6,3	1,1
SD	1,43	1,25	0,74
Kontrol +	Sel Hidup (%)	Sel Nekrosis (%)	Sel Apoptosis (%)
1.	12	56	32
2.	14	54	32
3.	16	51	33
4.	14	56	30
5.	10	59	31
6.	12	57	31
7.	10	57	33
8.	12	55	33
9.	14	58	28
10	10	60	30
Σ	124	563	313
X	12,4	56,3	31,3
SD	2,07	2,58	1,64
Perlakuan 1	Sel Hidup (%)	Sel Nekrosis (%)	Sel Apoptosis (%)
1.	29	55	15
2	30	57	13
3.	28	55	17
4.	32	54	14
5.	33	50	17
6.	28	55	17
7.	29	58	13
8.	30	54	16
9.	32	53	15
10	32	51	17
Σ	303	542	154
X	30,3	54,2	15,4
SD	1,83	2,44	1,65

Perlakuan 2	Jumlah Sel Kanker		
	Sel Hidup (%)	Sel Nekrosis (%)	Sel Apoptosis (%)
1.	27	55	17
2.	25	57	18
3.	25	60	15
4.	29	55	16
5.	28	50	22
6.	30	55	15
7.	27	50	23
8.	27	59	14
9.	25	58	17
10	25	62	13
Σ	268	561	170
X	26,8	56,1	17,0
SD	1,81	3,96	3,27
Perlakuan 3	Sel Hidup (%)	Sel Nekrosis (%)	Sel Apoptosis (%)
1.	8	55	37
2.	7	55	38
3.	9	56	35
4.	5	56	39
5.	10	55	35
6.	7	53	40
7.	10	55	35
8.	7	58	35
9.	6	58	36
10	7	56	37
Σ	76	557	367
X	7,6	55,7	36,7
SD	1,65	1,49	1,83
Perlakuan 4	Sel Hidup (%)	Sel Nekrosis (%)	Sel Apoptosis (%)
1.	6	56	36
2.	4	58	38
3.	5	55	40
4.	8	57	35
5.	6	57	37
6.	6	55	39
7.	7	55	38
8.	5	56	39
9	6	57	37
10	4	56	40
Σ	57	562	379
X	5,7	56,2	37,9
SD	1,25	1,03	1,66

Lampiran 9. Data-data jumlah NK sel pada sel kanker mammae mencit

Perlakuan	Ulangan			Rata-rata
	1	2	3	
Kontrol -				
1	7	6	9	7.33333
2	8	7	8	7.66667
3	7	7	8	7.33333
4	7	7	9	7.66667
5	6	8	9	7.66667
6	7	7	8	7.33333
7	7	8	7	7.33333
8	6	8	8	7.33333
9	8	8	8	8
10	7	8	8	7.66667
Σ				75.3333
X				7.53333
SD				0.23307
Kontrol +				
1	6	8	6	6.66667
2	6	7	6	6.33333
3	6	7	6	6.33333
4	5	7	6	6
5	7	6	5	6
6	5	7	7	6.33333
7	6	6	8	6.66667
8	6	6	6	6
9	7	6	6	6.33333
10	7	7	7	7
Σ				63.6667
X				6.36667
SD				0.33148

Perlakuan	Ulangan			Rata-rata
	1	2	3	
P1				
1	3	4	5	4
2	3	4	5	4
3	3	3	5	3.66667
4	4	5	3	4
5	3	3	5	3.66667
6	3	4	4	3.66667
7	4	3	5	4
8	3	5	4	4
9	3	4	4	3.66667
10	5	3	5	4.33333
Σ				39
X				3.9
SD				0.22498
P2	5	5	6	5.33333
1	5	6	5	5.33333
2	6	6	6	6
3	5	5	7	5.66667
4	5	6	7	6
5	6	5	6	5.66667
6	6	5	6	5.66667
7	7	6	6	6.33333
8	5	6	6	5.66667
9	5	6	6	5.66667
10	5	6	7	6
Σ				58
X				5.8
SD				0.28109

Perlakuan	Ulangan			Rata-rata
	1	2	3	
P3				
1	6	7	6	6.33333
2	6	7	6	6.33333
3	6	7	5	6
4	7	8	7	7.33333
5	8	5	6	6.33333
6	7	6	7	6.66667
7	7	6	6	6.33333
8	7	6	8	7
9	7	6	6	6.33333
10	7	5	6	6
Σ				64.6667
X				6.46667
SD				0.42164
P4				
1	7	6	5	6
2	7	7	7	7
3	7	5	8	6.66667
4	7	7	6	6.66667
5	6	6	8	6.66667
6	5	8	7	6.66667
7	8	7	6	7
8	7	7	8	7.33333
9	7	8	7	7.33333
10	7	6	6	6.33333
Σ				67.6667
X				6.76667
SD				0.41722

Lampiran 10 : Analisis Menggunakan SPSS 14 for Windows Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Viabilitas Sel Kanker * Perlakuan	60	100,0%	0	,0%	60	100,0%
Protein Gen p53 * Perlakuan	60	100,0%	0	,0%	60	100,0%
Protein Gen CDK * Perlakuan	60	100,0%	0	,0%	60	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

			Viabilitas Sel Kanker	Protein Gen p53	Protein Gen CDK
Perlakuan	KN	1	95,00	93,00	13,00
		2	94,00	90,00	10,00
		3	98,00	95,00	12,00
		4	97,00	93,00	10,00
		5	95,00	93,00	15,00
		6	91,00	90,00	12,00
		7	95,00	96,00	13,00
		8	94,00	90,00	13,00
		9	97,00	91,00	10,00
		10	96,00	97,00	15,00
			Total	Mean	95,2000
		Median	95,0000	93,0000	12,5000
		Std. Deviation	1,98886	2,57337	1,88856
	KP	1	14,00	42,00	32,00
		2	20,00	45,00	30,00
		3	21,00	43,00	35,00
		4	13,00	43,00	29,00
		5	8,00	40,00	26,00
		6	8,00	43,00	35,00
		7	7,00	42,00	30,00
		8	21,00	38,00	32,00
		9	22,00	38,00	32,00
		10	7,00	45,00	35,00
			Total	Mean	14,1000
		Median	13,5000	42,5000	32,0000
		Std. Deviation	6,40226	2,51440	2,95146
	P1	1	28,00	19,00	79,00
		2	31,00	18,00	80,00
		3	27,00	20,00	75,00
		4	35,00	20,00	80,00
		5	36,00	21,00	81,00
		6	34,00	20,00	78,00
		7	37,00	17,00	80,00
		8	26,00	17,00	80,00
		9	35,00	16,00	78,00
		10	30,00	16,00	79,00
			Total	Mean	31,9000
		Median	32,5000	18,5000	79,5000
		Std. Deviation	4,01248	1,83787	1,89967
	P2	1	27,00	45,00	30,00
		2	24,00	40,00	31,00
		3	30,00	43,00	30,00
		4	22,00	43,00	30,00
		5	30,00	42,00	32,00
		6	32,00	40,00	30,00
		7	24,00	50,00	28,00
		8	31,00	49,00	28,00
		9	28,00	48,00	37,00
		10	31,00	52,00	25,00
			Total	Mean	27,9000
		Median	29,0000	44,0000	30,0000
		Std. Deviation	3,51030	4,28952	3,10734

P3	1		10,00	55,00	25,00
	2		12,00	54,00	27,00
	3		8,00	54,00	25,00
	4		12,00	50,00	25,00
	5		11,00	60,00	28,00
	6		12,00	55,00	30,00
	7		12,00	54,00	23,00
	8		7,00	58,00	25,00
	9		8,00	58,00	25,00
	10		16,00	58,00	23,00
	Total		10,8000	55,6000	25,6000
		Mean	11,5000	55,0000	25,0000
		Median	2,65832	2,91357	2,17051
		Std. Deviation			
P4	1		8,00	63,00	18,00
	2		7,00	65,00	16,00
	3		12,00	60,00	15,00
	4		7,00	65,00	18,00
	5		7,00	65,00	18,00
	6		11,00	62,00	20,00
	7		6,00	62,00	21,00
	8		12,00	65,00	14,00
	9		7,00	65,00	22,00
	10		8,00	63,00	18,00
	Total		8,5000	63,5000	18,0000
		Mean	7,5000	64,0000	18,0000
		Median	2,27303	1,77951	2,53859
		Std. Deviation			
Total		Mean	31,4000	52,9000	32,7667
		Median	22,0000	51,0000	27,5000
		Std. Deviation	30,27568	23,01046	22,04261

a. Limited to first 100 cases.

**Lampiran 11. Analisis Statistik dengan ANAVA Satu Arah dan LSD
pada viabilitas sel kanker mammae mencit**

Oneway

Descriptives

Viabilitas Sel Kanker

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
KN	10	95,2000	1,98886	,62893	93,7773	96,6227	91,00	98,00
KP	10	14,1000	6,40226	2,02457	9,5201	18,6799	7,00	22,00
P1	10	31,9000	4,01248	1,26886	29,0296	34,7704	26,00	37,00
P2	10	27,9000	3,51030	1,11006	25,3889	30,4111	22,00	32,00
P3	10	10,8000	2,65832	,84063	8,8984	12,7016	7,00	16,00
P4	10	8,5000	2,27303	,71880	6,8740	10,1260	6,00	12,00
Total	60	31,4000	30,27568	3,90857	23,5790	39,2210	6,00	98,00

ANOVA

Viabilitas Sel Kanker

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	53310,000	5	10662,000	747,336	,000
Within Groups	770,400	54	14,267		
Total	54080,400	59			

Test of Homogeneity of Variances

Viabilitas Sel Kanker

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7,513	5	54	,000

Post Hoc Tests (LSD dan Bonferroni Viabilitas sel kanker mammae mencit)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Viabilitas Sel Kanker

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	KN	KP	81,10000*	1,68918	,000	77,7134	84,4866
		P1	63,30000*	1,68918	,000	59,9134	66,6866
		P2	67,30000*	1,68918	,000	63,9134	70,6866
		P3	84,40000*	1,68918	,000	81,0134	87,7866
		P4,	86,70000*	1,68918	,000	83,3134	90,0866
	KP	KN	-81,10000*	1,68918	,000	-84,4866	-77,7134
		P1	-17,80000*	1,68918	,000	-21,1866	-14,4134
		P2	-13,80000*	1,68918	,000	-17,1866	-10,4134
		P3	3,30000	1,68918	,056	-,0866	6,6866
		P4,	5,60000*	1,68918	,002	2,2134	8,9866
	P1	KN	-63,30000*	1,68918	,000	-66,6866	-59,9134
		KP	17,80000*	1,68918	,000	14,4134	21,1866
		P2	4,00000*	1,68918	,021	,6134	7,3866
		P3	21,10000*	1,68918	,000	17,7134	24,4866
		P4,	23,40000*	1,68918	,000	20,0134	26,7866
	P2	KN	-67,30000*	1,68918	,000	-70,6866	-63,9134
		KP	13,80000*	1,68918	,000	10,4134	17,1866
		P1	-4,00000*	1,68918	,021	-7,3866	-,6134
		P3	17,10000*	1,68918	,000	13,7134	20,4866
		P4,	19,40000*	1,68918	,000	16,0134	22,7866
P3	KN	-84,40000*	1,68918	,000	-87,7866	-81,0134	
	KP	-3,30000	1,68918	,056	-6,6866	,0866	
	P1	-21,10000*	1,68918	,000	-24,4866	-17,7134	
	P2	-17,10000*	1,68918	,000	-20,4866	-13,7134	
	P4,	2,30000	1,68918	,179	-1,0866	5,6866	
P4,	KN	-86,70000*	1,68918	,000	-90,0866	-83,3134	
	KP	-5,60000*	1,68918	,002	-8,9866	-2,2134	
	P1	-23,40000*	1,68918	,000	-26,7866	-20,0134	
	P2	-19,40000*	1,68918	,000	-22,7866	-16,0134	
	P3	-2,30000	1,68918	,179	-5,6866	1,0866	

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Viabilitas Sel Kanker

Bonferroni	KN	KN	81,10000*	1,68918	,000	75,9118	86,2882
		P1	63,30000*	1,68918	,000	58,1118	68,4882
		P2	67,30000*	1,68918	,000	62,1118	72,4882
		P3	84,40000*	1,68918	,000	79,2118	89,5882
		P4,	86,70000*	1,68918	,000	81,5118	91,8882
KN	KN	KN	-81,10000*	1,68918	,000	-86,2882	-75,9118
		P1	-17,80000*	1,68918	,000	-22,9882	-12,6118
		P2	-13,80000*	1,68918	,000	-18,9882	-8,6118
		P3	3,30000	1,68918	,839	-1,8882	8,4882
		P4,	5,60000*	1,68918	,025	,4118	10,7882
P1	KN	KN	-63,30000*	1,68918	,000	-68,4882	-58,1118
		KP	17,80000*	1,68918	,000	12,6118	22,9882
		P2	4,00000	1,68918	,322	-1,1882	9,1882
		P3	21,10000*	1,68918	,000	15,9118	26,2882
		P4,	23,40000*	1,68918	,000	18,2118	28,5882
P2	KN	KN	-67,30000*	1,68918	,000	-72,4882	-62,1118
		KP	13,80000*	1,68918	,000	8,6118	18,9882
		P1	-4,00000	1,68918	,322	-9,1882	1,1882
		P3	17,10000*	1,68918	,000	11,9118	22,2882
		P4,	19,40000*	1,68918	,000	14,2118	24,5882
P3	KN	KN	-84,40000*	1,68918	,000	-89,5882	-79,2118
		KP	-3,30000	1,68918	,839	-8,4882	1,8882
		P1	-21,10000*	1,68918	,000	-26,2882	-15,9118
		P2	-17,10000*	1,68918	,000	-22,2882	-11,9118
		P4,	2,30000	1,68918	1,000	-2,8882	7,4882
P4,	KN	KN	-86,70000*	1,68918	,000	-91,8882	-81,5118
		KP	-5,60000*	1,68918	,025	-10,7882	-,4118
		P1	-23,40000*	1,68918	,000	-28,5882	-18,2118
		P2	-19,40000*	1,68918	,000	-24,5882	-14,2118
		P3	-2,30000	1,68918	1,000	-7,4882	2,8882

*. The mean difference is significant at the .05 level.

**Lampiran 12. Analisis Statistik dengan ANAVA Satu Arah dan LSD
pada protein Gen p53 sel kanker mammae mencit**

Oneway

Descriptives

Protein Gen p53

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
KN	10	92,8000	2,57337	,81377	90,9591	94,6409	90,00	97,00
KP	10	41,9000	2,51440	,79512	40,1013	43,6987	38,00	45,00
P1	10	18,4000	1,83787	,58119	17,0853	19,7147	16,00	21,00
P2	10	45,2000	4,28952	1,35647	42,1315	48,2685	40,00	52,00
P3	10	55,6000	2,91357	,92135	53,5158	57,6842	50,00	60,00
P4	10	63,5000	1,77951	,56273	62,2270	64,7730	60,00	65,00
Total	60	52,9000	23,01046	2,97064	46,9558	58,8442	16,00	97,00

ANOVA

Protein Gen p53

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	30822,000	5	6164,400	797,503	,000
Within Groups	417,400	54	7,730		
Total	31239,400	59			

Test of Homogeneity of Variances

Protein Gen p53

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,152	5	54	,014

Post Hoc Tests (LSD dan Bonferroni Protein gen p53 sel kanker mammae mencit)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Protein Gen p53

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	KN	KP	50,90000*	1,24335	,000	48,4072	53,3928
		P1	74,40000*	1,24335	,000	71,9072	76,8928
		P2	47,60000*	1,24335	,000	45,1072	50,0928
		P3	37,20000*	1,24335	,000	34,7072	39,6928
		P4,	29,30000*	1,24335	,000	26,8072	31,7928
	KP	KN	-50,90000*	1,24335	,000	-53,3928	-48,4072
		P1	23,50000*	1,24335	,000	21,0072	25,9928
		P2	-3,30000*	1,24335	,010	-5,7928	-,8072
		P3	-13,70000*	1,24335	,000	-16,1928	-11,2072
		P4,	-21,60000*	1,24335	,000	-24,0928	-19,1072
	P1	KN	-74,40000*	1,24335	,000	-76,8928	-71,9072
		KP	-23,50000*	1,24335	,000	-25,9928	-21,0072
		P2	-26,80000*	1,24335	,000	-29,2928	-24,3072
		P3	-37,20000*	1,24335	,000	-39,6928	-34,7072
		P4,	-45,10000*	1,24335	,000	-47,5928	-42,6072
	P2	KN	-47,60000*	1,24335	,000	-50,0928	-45,1072
		KP	3,30000*	1,24335	,010	,8072	5,7928
		P1	26,80000*	1,24335	,000	24,3072	29,2928
		P3	-10,40000*	1,24335	,000	-12,8928	-7,9072
		P4,	-18,30000*	1,24335	,000	-20,7928	-15,8072
P3	KN	-37,20000*	1,24335	,000	-39,6928	-34,7072	
	KP	13,70000*	1,24335	,000	11,2072	16,1928	
	P1	37,20000*	1,24335	,000	34,7072	39,6928	
	P2	10,40000*	1,24335	,000	7,9072	12,8928	
	P4,	-7,90000*	1,24335	,000	-10,3928	-5,4072	
P4,	KN	-29,30000*	1,24335	,000	-31,7928	-26,8072	
	KP	21,60000*	1,24335	,000	19,1072	24,0928	
	P1	45,10000*	1,24335	,000	42,6072	47,5928	
	P2	18,30000*	1,24335	,000	15,8072	20,7928	
	P3	7,90000*	1,24335	,000	5,4072	10,3928	

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Protein Gen p53

Bonferroni	KN	KP	50,90000*	1,24335	,000	47,0812	54,7188
		P1	74,40000*	1,24335	,000	70,5812	78,2188
		P2	47,60000*	1,24335	,000	43,7812	51,4188
		P3	37,20000*	1,24335	,000	33,3812	41,0188
		P4,	29,30000*	1,24335	,000	25,4812	33,1188
KP	KN	KP	-50,90000*	1,24335	,000	-54,7188	-47,0812
		P1	23,50000*	1,24335	,000	19,6812	27,3188
		P2	-3,30000	1,24335	,156	-7,1188	,5188
		P3	-13,70000*	1,24335	,000	-17,5188	-9,8812
		P4,	-21,60000*	1,24335	,000	-25,4188	-17,7812
P1	KN	KP	-74,40000*	1,24335	,000	-78,2188	-70,5812
		KP	-23,50000*	1,24335	,000	-27,3188	-19,6812
		P2	-26,80000*	1,24335	,000	-30,6188	-22,9812
		P3	-37,20000*	1,24335	,000	-41,0188	-33,3812
		P4,	-45,10000*	1,24335	,000	-48,9188	-41,2812
P2	KN	KP	-47,60000*	1,24335	,000	-51,4188	-43,7812
		KP	3,30000	1,24335	,156	-,5188	7,1188
		P1	26,80000*	1,24335	,000	22,9812	30,6188
		P3	-10,40000*	1,24335	,000	-14,2188	-6,5812
		P4,	-18,30000*	1,24335	,000	-22,1188	-14,4812
P3	KN	KP	-37,20000*	1,24335	,000	-41,0188	-33,3812
		KP	13,70000*	1,24335	,000	9,8812	17,5188
		P1	37,20000*	1,24335	,000	33,3812	41,0188
		P2	10,40000*	1,24335	,000	6,5812	14,2188
		P4,	-7,90000*	1,24335	,000	-11,7188	-4,0812
P4,	KN	KP	-29,30000*	1,24335	,000	-33,1188	-25,4812
		KP	21,60000*	1,24335	,000	17,7812	25,4188
		P1	45,10000*	1,24335	,000	41,2812	48,9188
		P2	18,30000*	1,24335	,000	14,4812	22,1188
		P3	7,90000*	1,24335	,000	4,0812	11,7188

*. The mean difference is significant at the .05 level.

**Lampiran 13. Analisis Statistik dengan ANAVA Satu Arah dan LSD
pada protein gen CDK sel kanker mammae mencit**

Oneway

Descriptives

Protein Gen CDK

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
KN	10	12,3000	1,88856	,59722	10,9490	13,6510	10,00	15,00
KP	10	31,6000	2,95146	,93333	29,4887	33,7113	26,00	35,00
P1	10	79,0000	1,69967	,53748	77,7841	80,2159	75,00	81,00
P2	10	30,1000	3,10734	,98263	27,8771	32,3229	25,00	37,00
P3	10	25,6000	2,17051	,68638	24,0473	27,1527	23,00	30,00
P4	10	18,0000	2,53859	,80277	16,1840	19,8160	14,00	22,00
Total	60	32,7667	22,04261	2,84569	27,0725	38,4609	10,00	81,00

ANOVA

Protein Gen CDK

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28342,933	5	5668,587	945,348	,000
Within Groups	323,800	54	5,996		
Total	28666,733	59			

Test of Homogeneity of Variances

Protein Gen CDK

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,543	5	54	,743

Post Hoc Tests (LSD dan Bonferroni protein gen CDK sel kanker mammae mencit)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Protein Gen CDK

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	KN	KP	-19,30000*	1,09511	,000	-21,4956	-17,1044
		P1	-66,70000*	1,09511	,000	-68,8956	-64,5044
		P2	-17,80000*	1,09511	,000	-19,9956	-15,6044
		P3	-13,30000*	1,09511	,000	-15,4956	-11,1044
		P4,	-5,70000*	1,09511	,000	-7,8956	-3,5044
	KP	KN	19,30000*	1,09511	,000	17,1044	21,4956
		P1	-47,40000*	1,09511	,000	-49,5956	-45,2044
		P2	1,50000	1,09511	,176	-,6956	3,6956
		P3	6,00000*	1,09511	,000	3,8044	8,1956
		P4,	13,60000*	1,09511	,000	11,4044	15,7956
	P1	KN	66,70000*	1,09511	,000	64,5044	68,8956
		KP	47,40000*	1,09511	,000	45,2044	49,5956
		P2	48,90000*	1,09511	,000	46,7044	51,0956
		P3	53,40000*	1,09511	,000	51,2044	55,5956
		P4,	61,00000*	1,09511	,000	58,8044	63,1956
	P2	KN	17,80000*	1,09511	,000	15,6044	19,9956
		KP	-1,50000	1,09511	,176	-3,6956	,6956
		P1	-48,90000*	1,09511	,000	-51,0956	-46,7044
		P3	4,50000*	1,09511	,000	2,3044	6,6956
		P4,	12,10000*	1,09511	,000	9,9044	14,2956
P3	KN	13,30000*	1,09511	,000	11,1044	15,4956	
	KP	-6,00000*	1,09511	,000	-8,1956	-3,8044	
	P1	-53,40000*	1,09511	,000	-55,5956	-51,2044	
	P2	-4,50000*	1,09511	,000	-6,6956	-2,3044	
	P4,	7,60000*	1,09511	,000	5,4044	9,7956	
P4,	KN	5,70000*	1,09511	,000	3,5044	7,8956	
	KP	-13,60000*	1,09511	,000	-15,7956	-11,4044	
	P1	-61,00000*	1,09511	,000	-63,1956	-58,8044	
	P2	-12,10000*	1,09511	,000	-14,2956	-9,9044	
	P3	-7,60000*	1,09511	,000	-9,7956	-5,4044	

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Protein Gen CDK

Bonferroni	KN	KP	-19,30000*	1,09511	,000	-22,6635	-15,9365
		P1	-66,70000*	1,09511	,000	-70,0635	-63,3365
		P2	-17,80000*	1,09511	,000	-21,1635	-14,4365
		P3	-13,30000*	1,09511	,000	-16,6635	-9,9365
		P4,	-5,70000*	1,09511	,000	-9,0635	-2,3365
KP	KN	KP	19,30000*	1,09511	,000	15,9365	22,6635
		P1	-47,40000*	1,09511	,000	-50,7635	-44,0365
		P2	1,50000	1,09511	1,000	-1,8635	4,8635
		P3	6,00000*	1,09511	,000	2,6365	9,3635
		P4,	13,60000*	1,09511	,000	10,2365	16,9635
P1	KN	KP	66,70000*	1,09511	,000	63,3365	70,0635
		KP	47,40000*	1,09511	,000	44,0365	50,7635
		P2	48,90000*	1,09511	,000	45,5365	52,2635
		P3	53,40000*	1,09511	,000	50,0365	56,7635
		P4,	61,00000*	1,09511	,000	57,6365	64,3635
P2	KN	KP	17,80000*	1,09511	,000	14,4365	21,1635
		KP	-1,50000	1,09511	1,000	-4,8635	1,8635
		P1	-48,90000*	1,09511	,000	-52,2635	-45,5365
		P3	4,50000*	1,09511	,002	1,1365	7,8635
		P4,	12,10000*	1,09511	,000	8,7365	15,4635
P3	KN	KP	13,30000*	1,09511	,000	9,9365	16,6635
		KP	-6,00000*	1,09511	,000	-9,3635	-2,6365
		P1	-53,40000*	1,09511	,000	-56,7635	-50,0365
		P2	-4,50000*	1,09511	,002	-7,8635	-1,1365
		P4,	7,60000*	1,09511	,000	4,2365	10,9635
P4,	KN	KP	5,70000*	1,09511	,000	2,3365	9,0635
		KP	-13,60000*	1,09511	,000	-16,9635	-10,2365
		P1	-61,00000*	1,09511	,000	-64,3635	-57,6365
		P2	-12,10000*	1,09511	,000	-15,4635	-8,7365
		P3	-7,60000*	1,09511	,000	-10,9635	-4,2365

*. The mean difference is significant at the .05 level.