

SKRIPSI

POTENSI FRAKSI ALKALOID DAUN JARONG
(*Achyranthes aspera linn*) PADA INDUKSI
APOPTOSIS KULTUR SEL MIELOMA
MENCIT SECARA *IN VITRO*



Oleh

LULY KURNIAWATI
NIM 060213005

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2008

FC. KRISNA

**POTENSI FRAKSI ALKALOID DAUN JARONG (*Achyranthes aspera* linn)
PADA INDUKSI APOPTOSIS KULTUR SEL MIELOMA SECARA IN
VITRO**

Skripsi
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga


oleh

LULY KURNIAWATI
NIM 060213005

Menyetujui

Komisi Pembimbing,


(Hana Eliyani, Mkes., Drh)
Pembimbing Pertama


(Roesno Darsono, Drh)
Pembimbing Kedua

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**Potensi Fraksi Alkaloid Daun Jarong (*Achyranthes aspera linn*) terhadap
Induksi Apoptosis Kultur Sel Mieloma**

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, Juni 2007

Luly Kurniawati
NIM.060213005

Telah diuji pada

Tanggal : 31 Juli 2007

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Dr. Dewa Ketut Meles, MS., Drh.

Anggota : Arimbi, Mkes., Drh.

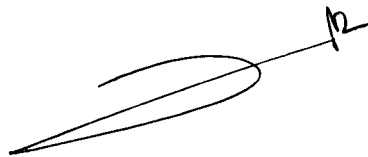
Chairul Anwar, MS., Drh.

Hana Eliyani, Mkes., Drh

Roesno Darsono, Drh.

Surabaya, 10 Juni 2008

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh
NIP. 130 687 305

THE POTENCIAL OF *ACHYRANTHES ASPERA LINN* ALKALOID TO INDUCED APOPTOSIS OF MYELOMA CELL

Luly Kurniawati

ABSTRACT

This study was aimed to determine the potency of *Achyranthes aspera linn* alkaloid in the induction apoptosis of myeloma cells of mice.

Myeloma cell cultures were added into 24 microwell plate contained 6 groups of test material i.e negative control, positive control (contained 100ppm colchicin) and *Achyranthes aspera linn* in 4 different concentration (1, 10, 100 and 1000 ppm).

Myeloma cells underwent apoptosis were counted using *etidium bromid* and *acridin orange* staining under fluorescence microscope with 400x magnification.

This study showed that apoptosis on mice induced by 10, 100, and 1000 ppm *Achyranthes aspera linn* fraction were equivalent to that of by 100ppm colchichin.

Key word : *Achyranthes aspera linn*, apoptosis, myeloma cell.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah berkenan memberikan segala taufik dan hidayahNya, karena hanya limpahan rahmat, berkah dan karuniaNya penulis dapat menyelesaikan tulisan ini yang merupakan salah satu syarat memperoleh gelar sarjana Kedokteran Hewan pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Dalam penulisan yang berjudul “POTENSI FRAKSI ALKALOID DAUN JARONG (*Achyranthes aspera linn*) PADA INDUKSI APOPTOSIS KULTUR SEL MIELOMA MENCIT SECARA IN VITRO” penulis mencoba membuktikan potensi fraksi alkaloid daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) sebagai obat kanker secara in vitro pada kultur sel mieloma mencit dapat menginduksi apoptosis.

Dalam penulisan ini penulis banyak menerima bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat: Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh selaku dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga beserta staf pimpinan atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menempuh pendidikan, Hana Eliyani, Mkes.,Drh selaku pembimbing pertama dan Roesno Darsono,Drh selaku pembimbing kedua yang selalu memberikan saran dan bimbingannya, Dr. Dewa Ketut Meles, MS., Drh dan Dr. Wurlina,MS., Drh selaku dosen pembimbing penelitian atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti penelitian dan bimbingannya, Dharmawan, Drh, Nurul Qmariah Drh, Panca Drh dan seluruh staff Labolatorium Zoonosis PUSVETMA

Surabaya atas kesempatan, bantuan dan bimbingan selama pelaksanaan penelitian, ayah tercinta Soeprapto, SE, Ibu tercinta (Alm) Erna DW, Mamak Susi saudara-saudaraku Diah Ayu R, Ragil R, Pirman atas doa, perhatian, kasih sayang, kesabaran, pengorbanan yang tak ternilai oleh apapun, kelompok penelitian Anom, Devi, Yuli, teman-teman Winda, Denia, Rendy, Sony, Septi, Dewi, Ardiana, sahabat-sahabatku serta teman FKH'02 atas dukungan, saran dan kritiknya serta semua pihak yang secara tidak langsung turut membantu dalam kegiatan penelitian ini dari awal hingga selesainya tulisan ini.

Akhirnya penulis hanya mampu memohon kepada Allah SWT semoga kebaikan yang tak ternilai tersebut, mendapat balasan dari Allah SWT. Semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Surabaya, Juli 2007

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PERNYATAAN	ii
HALAMAN IDENTITAS.....	iii
ABSTRACT	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
SINGKATAN DAN LAMBANG.....	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latarbelakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Landasan Teori	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Hasil Penelitian	5
1.6 Hipotesis.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Tanaman <i>Achyranthes aspera</i> linn.....	6
2.1.1 Klasifikas.....	6
2.1.2 Sinonim Nama Tanaman.....	6
2.1.3 Morfologi	8
2.1.4 Kegunaan	8
2.1.5 Kandungan Zat	9
2.2 Kanker	9
2.3 Antikanker	11
2.4 Sel Mieloma	12
2.5 Kultur Sel	13
2.6 Apoptosis	14
2.7 Tanaman Berkhasiat Antimitosis	15
2.8 Colchisin Sebagai Antimitosis	17
2.9 Pembuatan Fraksi Alkaloid	18
BAB III MATERI DAN METODE	20
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	20
3.2 Materi Penelitian	20
3.2.1 Bahan Penelitian.....	20
3.2.1 Alat Penelitian.....	21
3.3 Prosedur Penelitian.....	21
3.3.1 Ekplorasi Dosis.....	21
3.3.2 Pembuatan Fraksi Alkaloid dan Pengencerannya	22

3.3.3 Persiapan Media untuk Kontrol Negative dan Positif....	24
3.4 Peubah yang Diamati.....	24
3.4.1 Preparasi Kultur.....	25
3.5 Pemeriksaan Sel Mieloma Yang Megalami Apoptosis.....	26
3.6 Analisis Data	26
BAB IV HASIL.....	27
BAB V PEMBAHASAN	29
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	33
6.1 Kesimpulan.....	33
6.2 Saran.....	33
RINGKASAN	34
DAFTAR PUSTAKA.....	36
DARTAR LAMPIRAN.....	41

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rata-rata dan Simpangan Baku Jumlah Sel dan Persentase sel Mieloma Mencit yang Mengalami Apoptosis	27

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tanaman <i>Achyranthes asperaa linn</i>	7
2.2 Batang <i>Achyranthes asperaa linn</i>	7
2.3 Daun <i>Achyranthes asperaa linn</i>	7
2.4 Bentuk Sel Yang Mengalami Nekrosis dan Apotosis (Kerr <i>et al.</i> , 1972)	15
2.5 Rumus Bangun Colchisin.....	18
2.6 Metode Ekstraksi Hamilton <i>and</i> Sewell (1979); Santoso(2000)	19
3.1 Skematis Prosedur Penelitian	22
3.2 Skematis Pembuatan Larutan Uji	23
4.1 Sel Mieloma Yang Mengalami Apoptosis	28
4.2 Sel Mieloma Yang Hidup.....	28
4.3 Sel Mieloma Yang Mengalami Apoptosis dan Hidup	28

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

Alkaloid	= alkalin basale
Caspase	= <i>Cystein Aspartyl Specific Protease</i>
Dep Kes	= Departemen Kesehatan
DMSO	= <i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	= <i>Deoxyil Ribonucleat Acid</i>
FBS	= <i>Foetal Bovine Serum</i>
HPLC	= <i>High Performance Liquid Chromatografi</i>
HEPES	= <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid /</i> $C_8H_{18}N_2O_4S$
KLT	= Kromatografi Lapis Tipis
LSD	= <i>Least Significant Difference</i>
MOPC-21	= <i>Mineral Oil Plasmacytoma-21</i>
PKC	= Protein Kinase C
PUSVETMA	= Pusat Veterinaria Farma
ppm	= Part Per Million
RPMI	= <i>Rosewell Park Memorial Institut</i>
TDC	= <i>Tropical Diseases Center</i>

**BAB I
PENDAHULUAN**

FC. KRISNA

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latarbelakang Masalah

Di Indonesia *Achyranthes aspera linn* yang merupakan salah satu tanaman tropis yang digunakan sebagai obat tradisional karena ketersediaan hayati, biaya produksi dan toksisitas yang rendah serta efek samping yang terbatas sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan antikanker (Roya and Zoo, 2000).

Achyranthes aspera linn dikenal dengan nama jarong, jarongan atau remek getih. Selama ini *Achyranthes aspera linn* dimanfaatkan masyarakat umum untuk pengobatan antikanker pada payudara dan kandungan (Sutawidja, 2001; Nala, 2002). Tahiliani and Kai, 2000; Chakraborty *et al.*, 2002 menyatakan bahwa ekstrak daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) merupakan bahan baku obat antikanker dan hepatitis.

Achyranthes aspera linn berpotensi sebagai antikanker oleh karena kandungan alkaloid yang bersifat antimitosis yakni dapat menghambat pembelahan dan proliferasi sel yang mengawali apoptosis (Gao *et al.*, 2000).

Apoptosis merupakan program kematian sel melalui mekanisme genetik yang dapat terjadi secara fisiologis maupun patologis, dimana DNA sel dipecah ke dalam 200 fragmen pasangan dasar (Janeway *et al.*, 1999). Apoptosis fisiologis dipengaruhi oleh aktivitas enzim telomerase sedangkan apoptosis patologis terjadi karena terdapat gangguan keseimbangan genetik yang terpicu oleh faktor lingkungan (Thompson, 1995).

Alkaloid sebagai antimitosis mempunyai kemampuan mengikat tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus dengan menghambat atau memblokir polimerisasi protein ke dalam mikrotubulus berakibat pada gangguan enzim telomerase sehingga mitosis terhenti pada metafase, akibat dari gangguan telomerase menyebabkan ukuran telomer pada ujung kromosom tidak dapat dipertahankan sehingga terjadi kematian sel secara apoptosis (Chabner *et al.*, 2001).

Pada penelitian ini digunakan metode kultur sel mieloma karena metode ini memiliki beberapa kelebihan. Selain mendapatkan sel yang sifatnya sama, juga memudahkan untuk mengatur kondisi lingkungan dan kondisi biologis yang relatif konstan. Dengan menggunakan kultur sel, dapat diamati peningkatan atau pertumbuhan sel dengan jelas. Manfaat lain lebih mengarah pada etika terhadap sesama makhluk hidup. Dengan menggunakan kultur sel berarti akan mengurangi jumlah hewan coba yang digunakan, mengurangi rasa sakit dan penyiksaan terhadap hewan coba. Secara ekonomis, penggunaan kultur sel dapat menghemat kebutuhan pereaksi dan bahan uji karena larutan uji yang digunakan konsentrasi dan jumlahnya lebih kecil dibandingkan jika menggunakan hewan coba sebagai subjek penelitian (Freshney, 1987).

Berdasarkan penelitian Dhevie (2006) menyatakan bahwa Ekstrak fraksi alkaloid daun jarong (*Achyranthes aspera* Linn) mempunyai aktivitas hambat pertumbuhan terhadap kultur sel mieloma dengan metode viabilitas sel secara *invitro*. Maka pada penelitian ini, ingin mengetahui seberapa besar potensi fraksi

alkaloid *Achyranthes aspera linn* mampu menginduksi apoptosis pada biakkan sel mieloma mencit secara *invitro*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian, maka diajukan pokok permasalahan, apakah fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dapat menginduksi apoptosis pada kultur sel mieloma mencit secara *in vitro*?

1.3 Landasan Teori

Penelitian pendahuluan pada ekstrak methanol dari daun *Achyranthes aspera linn* mempunyai efek antimitosis yaitu menghambat pembelahan dan perkembangan sel embrio pada mencit dan tikus (Wurlina, 2000; Wurlina dan Sastrowardoyo, 2002; Wurlina dkk., 2003).

Ekstrak metanol *Achyranthes aspera linn* juga telah diteliti dapat menghambat pembelahan dan pertumbuhan sel spermatogenik (Meles dkk., 2004). Menurut Wurlina dkk (2004) efek antimitosis dari daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) disebabkan oleh kandungan alkaloid tanaman, dapat menghambat sintesis protein dengan cara mencegah polimerasi DNA dan menghambat transkripsi DNA.

Berdasarkan penelitian Meles (2004) melakukan pemisahan kadar total alkaloid daun *Achyranthes aspera linn* adalah 50% dari 100 gram bahan mengandung alkaloid seperti yang terlihat pada lampiran 5.

Scott *et al.*, 2000, Ward *et al.*, 2001 proses pembelahan sel dibagi menjadi 2 fase interfase dan pembelahan mitosis. Pada stadium interfase disebut pula fase persiapan pembelahan sel yang meliputi: 1) periode G1 2) periode Sintesis 3) periode G2. Menurut Sthananthan *and* Trouson (2000) pada pembelahan sel secara mitosis terdiri dari 4 fase, yaitu: 1) Profase 2) Metafase 3) Anafase 4) Telofase sehingga terbentuk 2 sel yang masing-masing memiliki inti dan sentrosom yang mengandung sepasang sentriol.

Alkaloid sebagai antimetosis mempunyai kemampuan mengikat tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus dengan menghambat atau memblokir polimerisasi protein ke dalam mikrotubulus sehingga mitosis terhenti pada metafase. Alkaloid *Achyranthes aspera* Linn juga menghambat enzim telomerase yang dapat menyebabkan ukuran telomer pada ujung kromosom tidak dapat dipertahankan, sehingga terjadi kematian sel (apoptosis). Tidak terbentuknya benang mitosis yang utuh menyebabkan kromosom seperti bola atau bintang disebut dengan mikrotubulus berfungsi membantu benang-benang mitosis dan berperan untuk pergerakan pagositosis, transportasi makanan dan hasil metabolisme dalam sel (Chabner *et al.*, 2001). Obat yang mempunyai efek antimetosis diduga juga memiliki efek antitelomerase yang dapat menghambat pembelahan dan perkembangan sel yang sangat cepat seperti sel kanker dan berakibat terjadi kematian sel (apoptosis) (Fujiwara *et al.*, 2004).

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sejauh mana kemampuan fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* yang menginduksi apoptosis pada kultur sel mieloma mencit.

1.5 Manfaat Hasil Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjajaki potensi ekstraksi *Achyranthes aspera linn* sehingga dapat dijadikan landasan empiris untuk mengembangkan obat antikanker asal tanaman, mengingat *Achyranthes aspera linn* mudah diperoleh di Indonesia.

1.6 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah: fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dapat menginduksi apoptosis pada kultur sel mieloma mencit secara *in vitro*.



BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

FC. KRISNA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman *Achyranthes aspera* linn

2.1.1 Klasifikasi

Menurut Investasi Tanaman Obat Indonesia. DepKes Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (1997) Tanaman *Achyranthes aspera* linn diklasifikasikan sebagai berikut :

- Divisi : *Spermatophyta*
Sub divisi : *Angiospermae*
Kelas : *Dicotyledoneae*
Bangsa : *Caryophyllales*
Suku : *Amaranthaceae*
Marga : *Achyranthes*
Jenis : *Achyranthes aspera* linn

2.1.2 Sinonim Nama Tanaman

Tanaman ini secara umum dikenal sebagai sangketan atau remek getih. Beberapa daerah menggunakan istilah yang berbeda seperti ara sangsang (Sumatra Utara); Jarong Lalaki (Sunda); Sangketan (Jawa); Nyarang (Madura); Pulet atau Sangket (Bali); Rai-rai (Maluku); Sangkohidung (Ternate); Sui-in Sui (Minahasa). (Hembing dkk., 1996)



Gambar 2.1 Tanaman *Achyranthes aspera* linn (Meles,2005)



Gambar 2.2 Batang *Achyranthes aspera* linn (Adyana,2006)



Gambar 2.3 Daun *Achyranthes aspera* linn (Adyana,2006)

2.1.3. Morfologi

Tanaman *Achyranthes aspera linn* merupakan tanaman asli Indonesia, tumbuh liar di pekarangan rumah maupun di ladang yang cukup mendapat air dan sinar matahari. Tanaman ini mudah tumbuh, tingginya sampai 100 cm atau lebih, daunnya tunggal, duduk berhadapan, bertangkai, warna hijau berbentuk bulat telur sungsang sampai lonjong memanjang. Panjang daun 1,5-10 cm dengan kedua permukaan daun berbulu halus. Ujung daun tumpul membulat dengan pangkal daun menyempit, tepi daun rata dan agak bergelombang dengan tulang daun menyirip. Bunga tumbuh di ujung tangkai antara percabangan berbentuk tandan seperti tangkai padi, kuntum bunga hijau, dengan bulir bulat keras dan tajam (Mardisiswojo dan Kusuma, 1968).

2.1.4 Kegunaan

Tanaman *Achyranthes aspera linn* yang digunakan untuk pengobatan maupun pencegahan penyakit adalah akar dan seluruh tanaman termasuk daun digunakan untuk mengobati demam, panas, malaria, enteritis, pharyngitis, radang paru-paru (*pneumonia*), gondongan, radang sendi (*Rheumatic arthritis*) infeksi ginjal, nyeri saat menstruasi (*dysmenorrhea*), memperlancar persalinan dan kencing darah. Perasan daun *Achyranthes aspera linn* digunakan sebagai peluruh haid, mencegah kehamilan sehingga wanita hamil dilarang minum perasan daun tersebut karena menyebabkan keguguran (Mardisiswoyo dan Kusuma, 1968)

Tahiliani *and* Kai (2000) dan Chakraborty *et al.*,(2002) menyatakan bahwa ekstrak daun *Achyranthes aspera linn* merupakan bahan baku obat antikanker dan hepatitis.

2.1.5. Kandungan Zat

Tanaman *Achyranthes aspera linn* secara organoleptis berasa sedikit pahit dan sejuk. Mardisiswoyo dan Kusuma (1968) menyatakan tanaman ini mengandung *saponin, alkaloid, betain, akirantin, ramnose, glukose, galaktose*. DepKes (1997) menyebutkan daun *Achyranthes aspera linn* mengandung senyawa *saponin, flavonoid* dalam bentuk *polifenol* dan *alkaloid*.

Wei *et al.*,(1997) menemukan senyawa *flavonoid* yang terdapat dalam *Achyranthes aspera linn* adalah α *spinasterol*, β *sitosterol*, *crysophanol*, *dibutylphthalate*, *asam palmitat*, α -*spinasterol-3- β -D glikosida*, *daukosterol* dan *ecdysteron*. Ida *et al.*,(1998) menemukan senyawa alkaloid pada akar *Achyranthes aspera linn* dalam bentuk *glikosida triterpenoid* dan *achyranthoside E dan F*. Gao *et al.*,(2000) menemukan senyawa alkaloid, non alkaloid dan saponin pada ekstrak metanol.

2.2 Kanker

Kanker adalah suatu penyakit dimana terjadi pertumbuhan sel-sel di jaringan tubuh yang tidak normal, cepat dan tidak terkendali (Dalimartha, 2003). Menurut Nafrialdi (2000), kanker adalah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan

atau kegagalan mekanisme pengaturan multifikasi dan fungsi homeostasis lainnya pada organisme multiseluler.

Sifat umum kanker adalah pertumbuhan berlebihan umumnya berbentuk tumor, gangguan diferensiasi dari sel dan jaringan sehingga mirip jaringan mudigah, bersifat invasif yaitu mampu tumbuh di jaringan sekitar (perbedaan pokok dengan jaringan normal), bersifat metastatik yaitu menyebarkan pertumbuhan baru, memiliki hereditas bawaan, pergeseran metabolisme ke arah pembentukan makromolekul dari nukleosida dan asam amino serta peningkatan katabolisme karbohidrat untuk energi sel (Nafrialdi, 2000).

Sel kanker dapat mengganggu penderita karena menyebabkan : desakan akibat pertumbuhan tumor, penghancuran jaringan tempat tumor berkembang atau bermetastasis, gangguan sistemik lainnya sebagai akibat sekunder dari pertumbuhan sel kanker (Nafrialdi, 2000).

Tumor adalah istilah umum untuk menunjukkan adanya pertumbuhan tidak normal dari massa atau jaringan yang tidak membahayakan kehidupan. Kanker merupakan *Malignant tumor* atau tumor yang membahayakan (Soekardjo, 2000). Suatu sel normal berubah menjadi sel kanker karena terjadi perubahan pada DNANYA (Rang, 1998).

Tumor terbentuk karena adanya mutasi pada biosintesis sel yaitu kekeliruan urutan DNA karena terpotong, tersubstitusi atau ada pengaturan kembali, adanya adisi dan integrasi bahan genetik virus baru ke dalam gen sel dan adanya ekspresi gen. Gen supresor tumor, yaitu p53 akan memacu terjadinya kematian sel jika terjadi kegagalan perbaikan pada DNA yang mengalami

kerusakan. Inaktivasi gen p53 dapat terjadi karena mutasi gen p53 tersebut atau gen p53 terikat dengan virus. Akibat terjadi replikasi DNA yang abnormal dan berkembang menjadi sel kanker (Rang, 1998).

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 perubahan atau mutasi sel normal menjadi sel kanker (Soekardjo,2000).

2.3 Antikanker

Obat antikanker sebaiknya memiliki toksisitas yang selektif, namun obat antikanker yang ada biasanya menekan sel dan menimbulkan toksisitas karena ikut menghambat pertumbuhan sel normal yang proliferasinya cepat seperti sumsum tulang, epitel germinativum, mukosa saluran pencernaan dan jaringan limfosit. Obat antikanker biasanya membunuh sel kanker melalui jalur nekrosis yang dapat menimbulkan inflamasi yang juga melibatkan sekelompok sel disekitar (Chaoi *et al.*,2004).

Tujuan utama antikanker adalah merusak sel kanker secara selektif sel tumor yang berbahaya tanpa mengganggu sel normal. Tujuan itu sering mengalami kegagalan (Soekardjo, 2000). Pada umumnya obat kanker menghambat metastase dan pertumbuhan sel kanker dengan menghancurkan sel tersebut (nekrosis sel). Kematian sel melalui jalur nekrosis melibatkan sekelompok besar sel sekitarnya dan menimbulkan inflamasi. Diharapkan antikanker dapat menghambat

pertumbuhan dan metastase sel kanker dengan merusak DNA (apoptosis sel). Keuntungan dari apoptosis sel adalah tidak menimbulkan inflamasi dan hanya melibatkan sekelompok kecil sel (Katzung, 1995).

Obat antikanker diharapkan membunuh sel kanker melalui aktivitas antimitosis dan antitelomerase yang dapat mengawali proses apoptosis. Kematian sel karena induksi apoptosis tidak menyebabkan inflamasi lagipula hanya melibatkan satu atau sekelompok sel (Fujiwara *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2004)

2.4 Sel Mieloma

Sel mieloma adalah sel tumor yang mengalami transformasi menjadi sel malignant atau sel ganas. Pada hewan coba sel tumor dapat diinduksi melalui pemberian senyawa karsinogen golongan hidrokarbon secara terus menerus dalam waktu tertentu. Setahun kemudian sel kanker atau sel mieloma dapat dideteksi pertumbuhannya pada organ target hewan coba. Sel mieloma dapat berasal dari jaringan limpa manusia, tikus dan mencit. Persyaratan sel mieloma untuk bahan penelitian adalah sel yang tidak memproduksi sel imunoglobulin. Imunoglobulin dapat menyebabkan reaksi yang tidak dikehendaki pada percobaan. Sel mieloma yang sering digunakan adalah galur *Mineral Oil Plasmacytoma-21* (MOPC-21) (Indrawati, 1990). Saat ini sel mieloma yang berasal dari mencit yang diketahui tidak mengandung imunoglobulin (Bagun, 1990).

2.5 Kultur Sel

Kultur sel diperoleh dari pemisahan sel suatu makhluk hidup baik secara fisik atau mekanisme maupun kimiawi. Sel tersebut kemudian dikembangkan pada media yang sesuai dan optimal bagi pertumbuhannya. Kultur yang berasal dari pembiakan jaringan suatu organ disebut kultur sel primer. Hasil pembiakan kultur sel primer disebut *cell line*. Pemisahan *cell line* berdasarkan karakteristik tertentu menghasilkan kelompok-kelompok tertentu yang disebut dengan *strain cell* (Freshney, 1987).

Prinsip dasar pembiakan kultur sel secara *in vitro* yaitu dengan memindahkan atau mengambil sel yang akan diteliti dari jaringan asal. Kemudian sel tersebut ditempatkan dalam wadah kultur sel yang memiliki permukaan pertumbuhan dan nutrisi yang cukup sebagai media kultur (Spector, 1998).

Dewasa ini, banyak penelitian yang menggunakan metode kultur sel mieloma karena metode ini memiliki beberapa kelebihan. Selain mendapatkan sel yang sifatnya sama, juga memudahkan untuk mengatur kondisi lingkungan dan kondisi biologis yang relatif konstan. Dengan menggunakan kultur sel, dapat diamati peningkatan atau pertumbuhan sel dengan jelas. Manfaat lain lebih mengarah pada etika terhadap sesama makhluk hidup. Dengan menggunakan kultur sel berarti akan mengurangi jumlah hewan coba yang digunakan, mengurangi rasa sakit dan penyiksaan terhadap hewan coba. Secara ekonomis, penggunaan kultur sel dapat menghemat kebutuhan pereaksi dan bahan uji karena larutan uji yang digunakan konsentrasi dan jumlahnya lebih kecil dibandingkan jika menggunakan hewan coba sebagai subjek penelitian (Freshney, 1987).

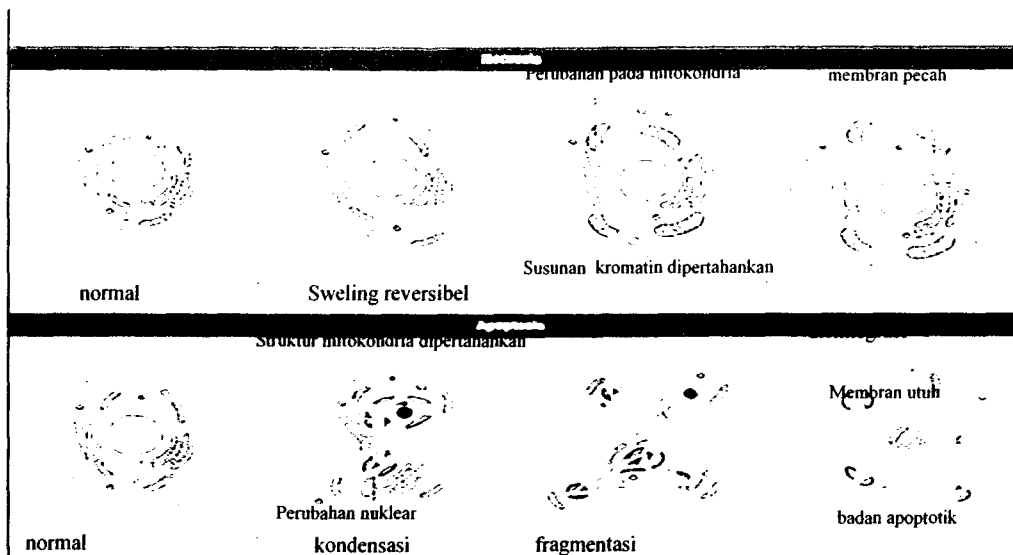
2.6 Apoptosis

Proses kematian sel dapat terjadi melalui 2 cara yaitu nekrosis dan apoptosis. Agen fisik atau agen kimia dapat mengakibatkan kematian sel berupa nekrosis atau disintegrasi sel. Jaringan yang mati dimakan dan didegradasi oleh sel fagosit. Sedangkan apoptosis adalah kematian sel secara terprogram, yang terjadi secara fisiologis maupun patologis melalui mekanisme genetik, DNA dipecah ke dalam 200 fragmen pasangan dasar (Janeway *et al.*, 1999).

Kematian sel secara nekrosis dan apoptosis dapat dibedakan melalui gambaran struktur sel yang mengalami perubahan. (Kerr *et al.*, 1972). Proses apoptosis awalnya, akan ditandai dengan menyusut atau mengerut sel sehingga terjadi konvulsi. Perubahan kondensasi, segmentasi, dan fragmentasi DNA terjadi pada inti sel. Sedangkan peningkatan distribusi *phosphatidylserine* terjadi akibat adanya penonjolan keluar pada membran sel. Mitokondria tidak mengalami perubahan pada proses apoptosis. Sedangkan menurut Thompson (2000) kematian sel akibat apoptosis dapat dibedakan dari kematian sel akibat nekrosis. Nekrosis merupakan bentuk patologis kematian sel akibat adanya peradangan akut seluler dan ditandai dengan pembengkakan sel secara cepat dan terjadinya lisis. Sebaliknya pada apoptosis dikontrol oleh autodigesti sel. Gambar 2.5 akan memperjelas uraian diatas.

Apoptosis adalah proses alamiah yang dialami oleh semua sel dan alasan sel melakukan apoptosis adalah pertama apoptosis diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan sel, jaringan atau organ. Kedua 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 (Fujiwara *et al.*, 2004; Yalon *et al.*, 2004).



Gambar 2.4. Bentuk sel yang mengalami nekrosis dan apoptosis (Sumber Kerr *et al.*, 1972)

Proses apoptosis secara fisiologis terjadi oleh aktivitas enzim telomerase sedangkan apoptosis patologis terjadi akibat adanya gangguan keseimbangan sistem genetik yang dipicu oleh faktor luar, misalnya infeksi virus (Thompson, 2000).

2.7 Tanaman Berkhasiat *Antimitosis*

Telah diketahui tanaman *Periwenkel* (*Periwenkle plant*) atau disebut dengan *Cantharathus rosea* atau *Vinca rosea* atau tapak dara mengandung *alkaloid vinblastin* dan *vinkristin* yang digunakan untuk pengobatan *leukemia* dan *diabetes mellitus*. Penelitian yang dilakukan oleh Noble dan Couworker (1958); Johnson *et al.*, (1958) yang dikutip oleh Chabner *et al.*, (2001) menyebutkan bahwa tanaman ini digunakan untuk pengobatan *granulositopenia* dan *supresi*

sumsum tulang, limfositis neoplasma akut. Dimana *Vinca alkaloid* bekerja spesifik pada siklus sel dengan menghambat proses mitosis. Vinca alkaloid dapat mengikat mikrotubulus dengan menghambat atau memblokir polimerisasi protein ke dalam mikrotubulus sehingga terjadi penghancuran dari mikrotubulus menjadi kristal, yang mana setiap 1 mol tubulin terikat pada 1 mol Vinca alkaloid. Keadaan ini menyebabkan gangguan fungsi mikrotubulus yang berperan dalam proses mitosis. Pembelahan sel terhenti pada metafase. Sehingga dengan tidak terbentuknya benang-benang mitosis (*mitotic spindels*) menyebabkan kromosom masuk dalam sel sehingga kromosom menjadi bergerombol seperti bola atau bintang yang disebut dengan *explode mitotic*. Mikrotubulus berfungsi membentuk benang-benang mitosis dan berperan untuk pergerakan sel, fagositosis dan transportasi makanan dan hasil metabolisme dalam sel. (Chabner *et al.*, 2001)

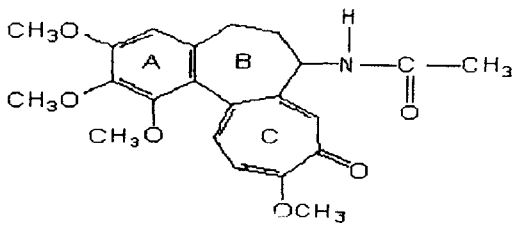
Bahan alkaloid lain yang diketahui menghambat siklus sel adalah *epidophylotoxin* atau *etoposide* yang diisolasi dari tanaman *mandrake* (*Podophyllum peltatum*) sejenis pohon pepaya. Ekstrak tanaman ini tidak menghentikan proses mitosis tetapi akan membentuk kompleks dengan enzim topoisomerase II dan DNA. Kompleks ini menyebabkan pecahnya double helik pada DNA. Diketahui ekstrak tanaman ini terutama bekerja pada siklus sel pada fase S dan fase G2 (Chabner *et al.*, 2001).

Bahan lain yang berpengaruh pada siklus sel adalah *camptothecin* yang berasal dari tanaman *Camptotheca acumilata* yang terdapat didarat Cina. *Camptothecin* 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).

2.7 Colchisin Sebagai Antimitosis

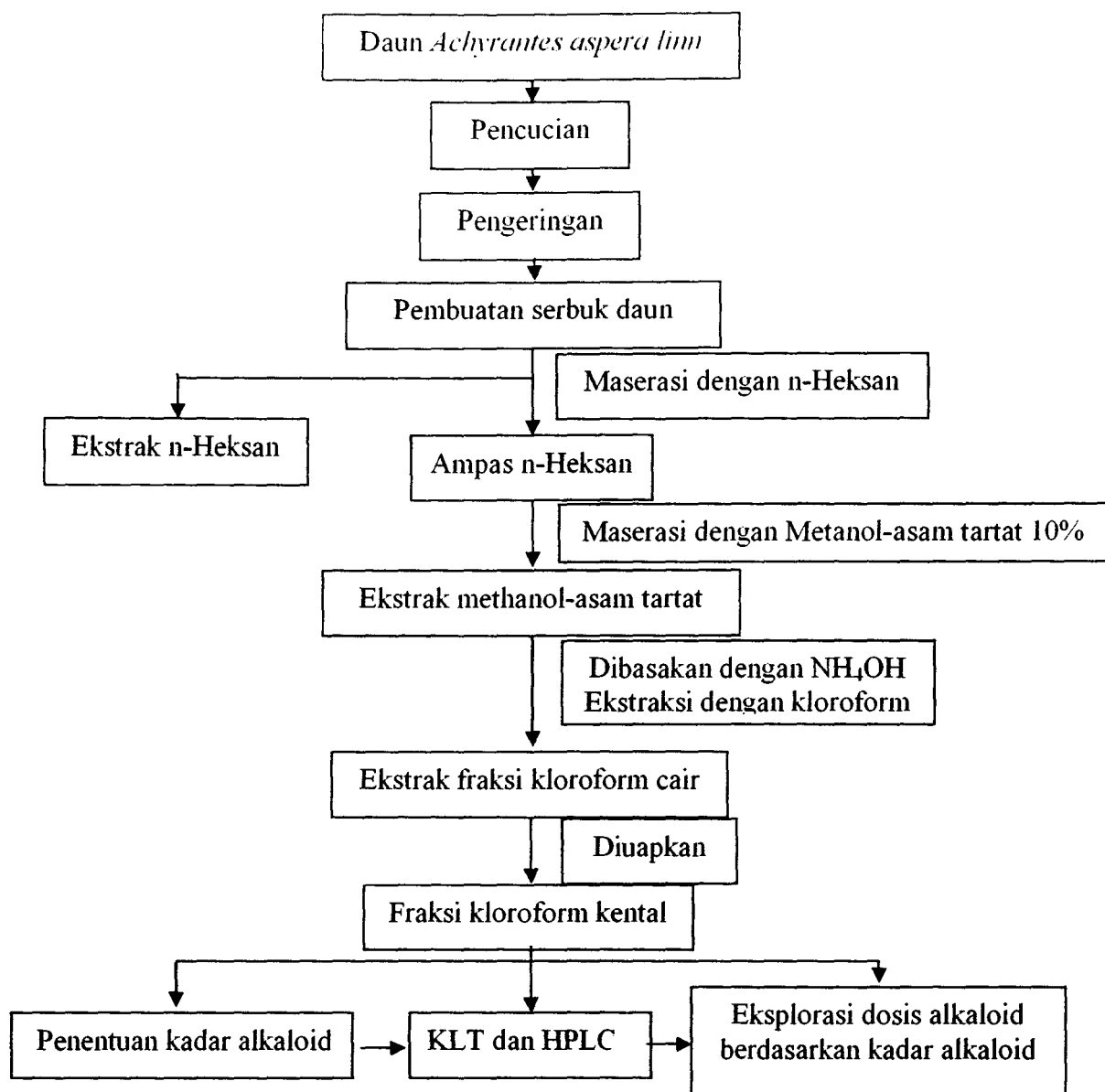
Colchisin merupakan salah satu alkaloid yang berasal dari umbi dan biji tanaman *Autum crocus* (*Colchicum autumnale* Linn) yang termasuk dalam famili *liliaceae*. *Colchisin* bersifat sebagai racun terutama pada tumbuhan, dengan memperlihatkan pengaruhnya pada nukleus yang membelah. Larutan *colchisin* dengan konsentrasi kritis dapat mencegah terbentuknya benang-benang plasma dari gelondong inti (*spindel*) sehingga pemisahan kromosom pada anafase tidak berlangsung dan menyebabkan penggandaan kromosom tanpa pembentukan dinding sel. Akibat dari tidak terbentuknya spindel, maka kromosom-kromosom tetap tinggal berserakan dalam sitoplasma (stadium C-metafase). Pada stadium ini kromosom-kromosom memperlihatkan gambaran khas yaitu seperti tanda silang, akan tetapi jika kromosom-kromosom dapat memisahkan diri pada sentromernya (C-anafase) akan terbentuklah dinding nukleus yaitu nukleus resustansi (nukleus perbaikan) yang mengandung jumlah kromosom lipat dua. Apabila pengaruh *colchisin* telah menghambur maka sel poliploid yang baru tersebut dapat membentuk spindel pada kedua kutubnya dan membentuk nukleus anakan poliploid seperti pada telofase dari mitosis normal (Suryo, 1995).



Gambar 2.5 Rumus Bangun *Colchisin* (Suryo,1995)

2.8 Pembuatan Fraksi Alkaloid

Serbuk daun *Achyranthes aspera linn* ditimbang sebanyak yang diperlukan, kemudian direndam dengan n-heksan dalam bejana pada suhu kamar selama 2x24 jam. Rendaman lalu ditapis dengan penyaring *buchner* dengan bantuan pompa vakum. Ampas yang tersaring dimaserasi dengan pelarut n-heksan, secara berulang-ulang hingga diperoleh larutan bening. Proses maserasi dimaksudkan untuk melarutkan lemak dan klorofil yang terdapat dalam daun. Larutan bening dimaserasi lagi dengan metanol asam tartrat 10%, disaring dan endapan dimaserasi lagi. Filtrat yang didapat dipekatkan, kemudian dibasakan dengan NH_4OH , sehingga alkaloid terdapat dalam bentuk garam polar, selanjutnya ditarik dengan kloroform dan diuapkan sehingga diperoleh masa kental. Kadar alkaloid *Achyranthes aspera linn* ditentukan dengan HPLC yang sebelumnya telah diuji alkaloidnya menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) (Harbone,1973)



Gambar 2.6 Metode ekstraksi (Hamilton *and* Sewell (1979), Santosa (2000))



BAB III
MATERI DAN METODE

FC. KRISNA

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dikerjakan di tiga laboratorium yaitu: Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga untuk membuat larutan uji, di Laboratorium Zoonosis Rabies, Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) Surabaya untuk mensterilkan larutan uji menggunakan membran filter 0,45 μm , preparasi kultur sel mieloma mencit, serta uji bahan antikanker dan di Laboratorium Malaria, *Tropical Diseases Center* (TDC), Universitas Airlangga untuk pemeriksaan dan penghitungan sel apoptosis menggunakan mikroskop flouresen.

Waktu penelitian dilaksanakan selama 2 bulan pada tanggal 28 April 2006 sampai 12 Mei 2006

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* sebagai bahan uji. Bahan dan media-media kultur sel digunakan sel mieloma mencit tipe P3UI. Media "*Rosewell Park Memorial Institut*" (RPMI) untuk pertumbuhan sel mieloma dan larutan "*Foetal Bovine Serum*" (FBS 10%) ketiganya diperoleh dari PUSVETMA Surabaya. Beberapa larutan yang lain diperlukan antara lain larutan *dimetil sulphoxide* (DMSO 10%) sebagai

pengencer, larutan *colchicin* 100% sebagai kontrol positif dalam bentuk colsemit, aquadest steril, *acridin orange* dan *etidium bromida* yang merupakan pewarnaan sensitif dan cepat untuk pewarnaan DNA dan RNA (Kawamoto, 1991).

3.2.2 Alat Penelitian

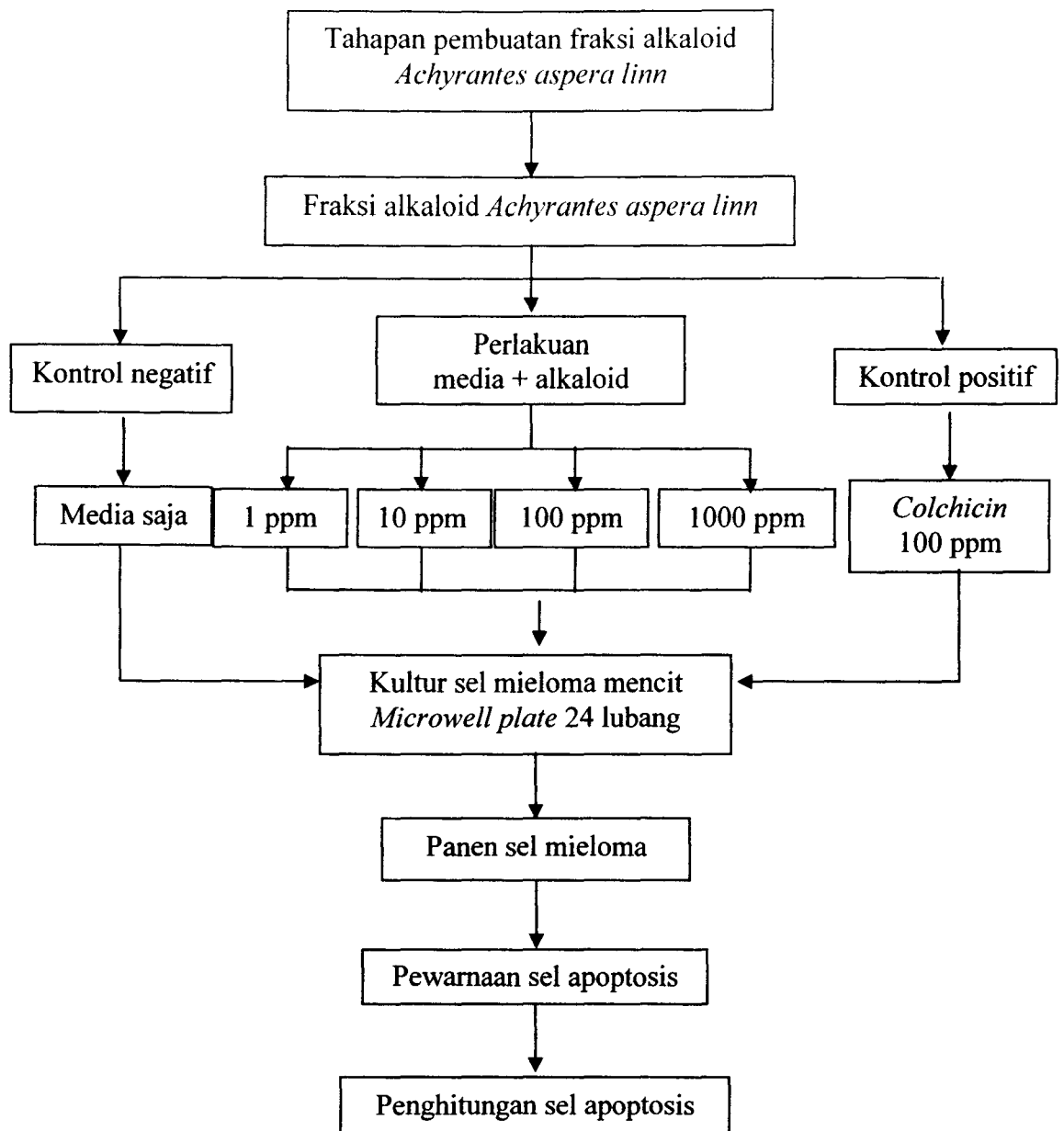
Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut : timbangan elektrik, pipet steril 1ml dan 5ml, filter 0,45 μ , hemositometer, *microwell plate* datar 24 lubang, 24 buah *disposable spuit* 0,1 cc, 7 buah *spuit disposibel* 3 cc, mikroskop, mikroskop flouresen, inkubator O₂ 95% dan CO₂ 5% pada suhu 37°C, 24 vial steril volume 10 ml, tisu, tabung roux dan autoclaf objek gelas dan cover gelas.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Ekplorasi Dosis

Penentuan dosis alkaloid daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) sebagai obat antimitosis terhadap sel embrio dan spermatozoa ditetapkan sebesar 100 mg/kg berat badan (Wurlina., 2000; Wurlina dan Sastrowardoyo., 2002; Wurlina dkk .,2003 dan Meles.,2004).

Penelitian secara *in vitro* didapati dalam ekstrak total *Achyranthes aspera linn* mengandung fraksi alkaloid sebesar 10%, kandungan tersebut dikonversikan berdasarkan cairan tubuh mencit sehingga ditetapkan dosis untuk penelitian ini konsentrasi 1, 10, 100 dan 1000 ppm



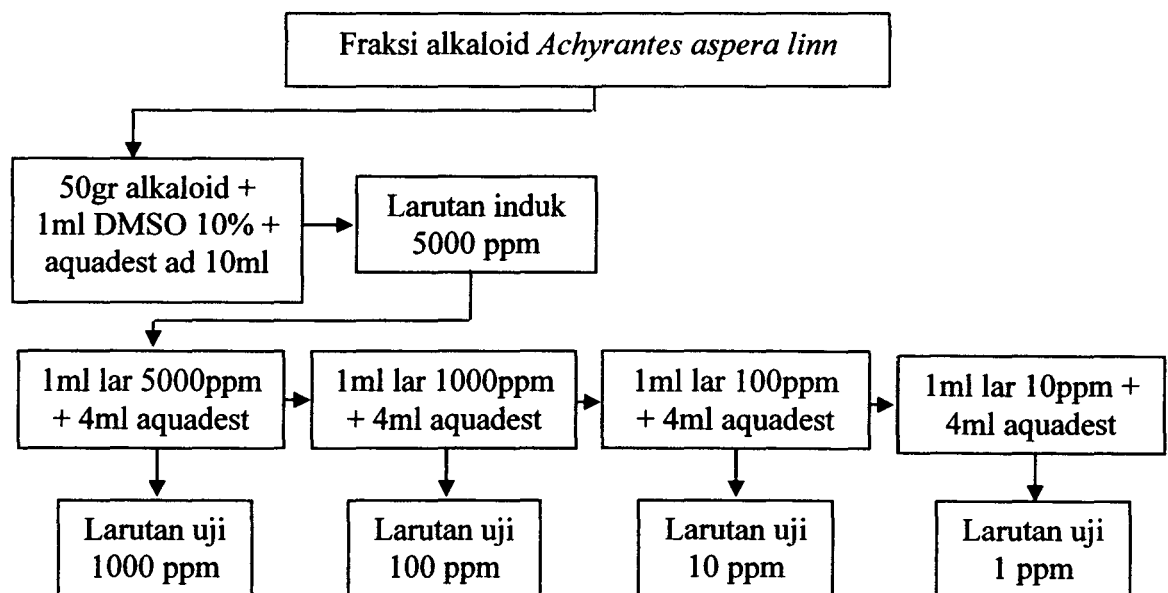
Gambar 3.1 Skematis Prosedur Penelitian

3.3.2 Pembuatan Fraksi Alkaloid dan Pengencerannya

Fraksi alkaloid ditimbang 50 mg, dimasukkan ke dalam gelas ukur, dilarutkan dengan 1 ml larutan *dimetil sulphoxide* (DMSO 10%) steril kemudian ditambahkan aquades hingga 10 ml dicampur hingga homogen.

Larutan baku ini selanjutnya disimpan dalam tabung bertutup steril dengan konsentrasi 5000 ppm

Disiapkan untuk pengenceran Fraksi alkaloid secara bertahap dari bahan baku 5000 ppm, menjadi larutan dengan konsentrasi 1,10,100,1000 ppm. Larutan 1000 ppm diperoleh dengan menambahkan 4 ml aquades kedalam 1 ml larutan fraksi alkaloid 5000 ppm. Secara bertahap dibuat larutan konsentrasi 100 ppm dengan menambahkan 1ml larutan 1000 ppm kedalam 9 ml aquades, satu ml larutan 100 ppm diencerkan dengan 9 ml aquades untuk memperoleh 10 ppm, dan yang terakhir dengan mengencerkan 1 ml larutan 10 ppm dalam 9 ml aquades diperoleh larutan 1 ppm.



Gambar 3.2 Skematis pembuatan larutan uji

3.3.3 Persiapan Media Untuk Kontrol Negatif dan Positif Serta Fraksi

Alkaloid

Media kontrol negatif mengandung 0,1 ml larutan *dimetil sulphoxide* (DMSO 10%) ditambah 9 ml aquadest, diaduk hingga homogen kemudian diambil 0,1 ml dan ditambahkan 9 ml aquadest diaduk hingga homogen.

Media kontrol positif diperoleh dengan melarutkan 50 mg *colchicin* dalam 1 ml larutan *dimetil sulphoxide* (DMSO 10%), kemudian ditambahkan aquades sampai 10 ml sehingga konsentrasinya 5000 ppm. Satu ml bahan ini dilarutkan sampai homogen dengan aquades sampai 50 ml sehingga konsentrasi akhir tercapai 100 ppm.

Media yang mengandung alkaloid *Achyranthes aspera linn* dengan konsentrasi 1 ppm sebagai perlakuan P1, konsentrasi 10 ppm sebagai perlakuan P2, konsentrasi 100 ppm sebagai P3, konsentrasi 1000 ppm sebagai perlakuan P4.

3.4 Peubah yang diamati

Peubah yang diamati untuk menguji potensi fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* adalah jumlah sel mieloma yang mengalami apoptosis dan persentase sel mieloma yang mengalami apoptosis didapat dari pembagian antara sel mieloma yang mengalami apoptosis dibagi sel mieloma yang hidup, nekrosis dan apoptosis dikali 100%

3.4.1 Preparasi Kultur

Sel mieloma dalam media *Rosewell Park Memorial Institut* (RPMI) disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipisahkan dari endapan kemudian sel ditanam pada botol kultur berisi media FBS 10% dan antibiotik kanamisin, streptomisin atau penicillin untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme. Selain FBS juga ditambahkan HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid / $C_8H_{18}N_2O_4S$) dan $NaHCO_3$ mempertahankan pH media tetap pada rentan 7,4 – 7,7. Saat Kultur disimpan dalam inkubator O_2 95% dan CO_2 5% pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur sel diperiksa dengan hemositometer untuk menentukan jumlah sel sebanyak 9×10^5 sel/ml. Bila jumlah tersebut telah mencukupi kultur sel dimasukkan ke dalam *microwell plate* yang sebelumnya telah diisi 0,2 ml bahan uji alkaloid *Achyranthes aspera linn* 1, 10, 100, 1000 ppm, kontrol positif dan kontrol negatif.

Microwell plate adalah lempengan yang terdiri dari 24 sumuran, dengan demikian untuk keperluan penelitian ini setiap perlakuan P1, P2, P3, P4, kontrol positif dan kontrol negatife menempati 4 sumuran yang diasumsikan sebagai ulangan.

Setiap perlakuan maupun kontrol dilakukan pada satu *microwell plate* sehingga seluruh percobaan adalah 24. setiap perlakuan ataupun kontrol mempunyai 4 kali replikasi.

Setiap perlakuan dimasukan kedalam vial sebanyak 1 ml dan diwarnai dengan *acridin orange* dan *etidium bromida* sebanyak 0,01 ml. Pemeriksaan dengan menggunakan mikroskop flourensen hijau.

3.5 Pemeriksaan Sel Mieloma Yang Mengalami Apoptosis

Pewarnaan sel mieloma dimaksudkan untuk membedakan apakah kematian sel kanker oleh pengaruh *Achyranthes aspera linn* terjadi melalui jalur apoptosis atau nekrosis.

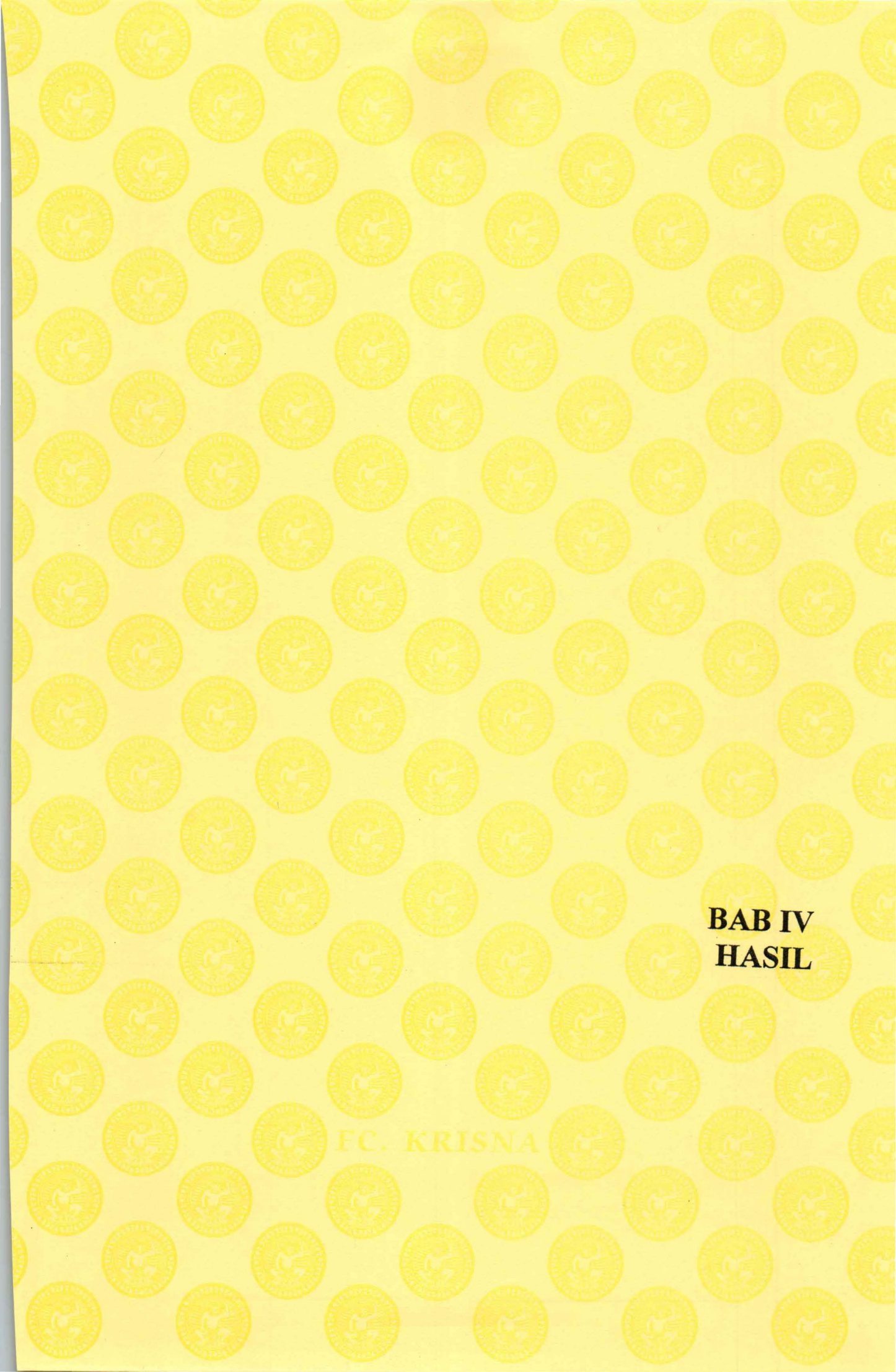
Pengamatan menggunakan mikroskop Flouresen dengan pembesaran 400 kali. Sel yang mengalami apoptosis akan tampak terwarnai oranye terang yang menandai kondensasi dan fragmentasi inti sel. Sel yang mengalami nekrosis akan terwarnai kecoklatan merata karena tidak terjadi kondensasi kromatin dan fragmentasi inti sel. Sel yang mengalami apoptosis dihitung jumlahnya dan ditetapkan persentasenya berdasarkan rumus:

$$\frac{\text{Jumlah sel yang mengalami apoptosis}}{\text{total seluruh sel (normal, nekrosis, apoptosis)}} \times 100\%$$

3.6 Analisis Data

Data jumlah dan persentase sel yang mengalami apoptosis, dianalisis melalui uji ANAVA, sehingga dapat diuji potensi alkaloid daun jarong jika dibandingkan dengan kontrol positif dan negatif.

Jika uji ANAVA memberi hasil bermakna maka untuk mengetahui perbedaan pengaruh perlakuan dilanjutkan dengan uji LSD pada tingkat signifikansi 95% ($\alpha = 0,05$)



**BAB IV
HASIL**

FC. KRISNA

BAB IV

HASIL

Hasil pengamatan terhadap kultur sel mieloma mencit yang mengalami apoptosis setelah pemberian berbagai dosis fraksi alkaloid daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) secara *in vitro*. Menunjukkan bahwa persentase sel yang mengalami apoptosis oleh pengaruh fraksi alkaloid daun jarong pada dosis 10ppm atau lebih, berbeda nyata dengan persentase apoptosis pada kontrol negative ($p < 0,05$), dan tidak berbeda nyata dengan dosis 1ppm.

Tabel 4.1 Rata-rata dan Simpangan Baku jumlah sel dan persentase sel mieloma mencit yang mengalami apoptosis.

PERLAKUAN	Jumlah sel	Persentase
KONTROL NEGATIF	$2,50 \pm 1,73$ a	$1,97 \pm 1,37$ a
KONTROL POSITIF	$14,00 \pm 9,83$ b	$9,62 \pm 5,96$ b
P1	$11,25 \pm 6,45$ ab	$7,65 \pm 4,17$ ab
P2	$13,25 \pm 6,65$ b	$8,86 \pm 3,59$ b
P3	$16,00 \pm 2,45$ b	$12,66 \pm 3,67$ b
P4	$15,75 \pm 4,1$ b	$12,93 \pm 3,81$ b

Superskrip huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan terdapat perbedaan ($p < 0,05$). Pada kolom jumlah didapatkan dari jumlah sel mieloma yang mengalami apoptosis dan kolom persentase didapat dari sel mieloma yang mengalami apoptosis dibagi jumlah sel mieloma yang hidup, nekrosis, apoptosis dikali 100%.

Pengaruh fraksi alkaloid daun jarong pada berbagai dosis tidak berbeda nyata dengan kontrol positif ($p > 0,05$).

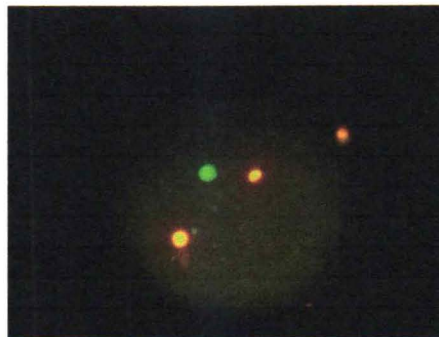
Persentase apoptosis pada kontrol negatife adalah $1,97 \pm 1,37$; kontrol positif adalah $9,62 \pm 5,96$; sedangkan pada dosis 1, 10, 100, 1000 ppm persentasenya masing-masing adalah $7,65 \pm 4,17$; $8,86 \pm 3,59$; $12,66 \pm 3,67$; $12,93 \pm 3,81$. Hasil selengkapnya disajikan pada tabel. 4.1



Gambar 4.1 Sel mieloma yang mengalami apoptosis. Dilihat dari mikroskop flouresen pembesaran 400x pewarnaan *acridin orange* dan *etidium bromide*.



Gambar 4.2 Sel mieloma yang hidup. Dilihat dari mikroskop flouresen pembesaran 400x pewarnaan *acridin orange* dan *etidium bromide*.



Gambar 4.3 Sel mieloma yang mengalami apoptosis dan hidup. Dilihat dari mikroskop flouresen pembesaran 400x pewarnaan *acridin orange* dan *etidium bromide*.

BAB V
PEMBAHASAN

FC. KRISNA

BAB V

PEMBAHASAN

Berdasarkan pada analisis hasil penelitian sebagai upaya pengujian terhadap potensi fraksi alkaloid daun jarong menunjukkan bahwa senyawa ini dapat mematikan sel mieloma mencit melalui jalur apoptosis.

Diduga kuat bahwa larutan uji memiliki aktivitas hambat pertumbuhan terhadap sel kanker (sitostatika) yang merupakan salah satu mekanisme antikanker.

Fraksi alkaloid daun jarong pada dosis 1 ppm , tampaknya kurang mampu mematikan sel, serupa dengan apa yang diperlihatkan kontrol negatif. Bilamana dosis alkaloid ditingkatkan mulai 10, 100 hingga 1000 ppm maka persentase kematian sel tampak meningkat. Tingkat persentase tersebut terlihat setara dengan kemampuan senyawa *colchicin* dalam membunuh sel mieloma mencit secara *in vitro*.

Tampaknya pemberian dosis fraksi alkaloid daun jarong diatas 10ppm dapat mempengaruhi proses apoptosis sel kanker, merupakan tolak ukur untuk pengujian terhadap senyawa yang mampu membunuh sel mieloma.

Chabner *et al.*,(2001) menyatakan bahwa alkaloid yang berasal dari tanaman vinka bekerja spesifik pada siklus sel dengan menghambat proses mitosis. Alkaloid dari tanaman juga sebagai antimitosis yang mengakibatkan gangguan pada enzim telomerase sehingga mitosis terhenti pada metaphase, sehingga terjadi kematian sel secara apoptosis.

Proses kematian sel secara apoptosis terjadi pada suatu sel secara terprogram tanpa didahului oleh proses pembengkakan atau proses peradangan sel. Proses apoptosis diawali oleh terjadinya pengkerutan sel, selanjutnya sel akan pecah yang diikuti dengan pecahnya inti sel dan kromosom kemudian membentuk suatu badan sel yang disebut dengan *apoptotic bodies*. Selanjutnya *apoptotic bodies* akan mengalami lisis dan terserap oleh sel makrofak melalui proses fagositosis (Fujiwara *et al.*, 2004; Lantuejoul *et al.*, 2004)

Proses apoptosis pada sel dapat terjadi melalui proses fisiologis maupun proses patologis. Proses apoptosis yang terjadi secara fisiologis melibatkan peran dan fungsi dari telomere. Telomere adalah suatu protein yang berfungsi melindungi kromosom. Telomere terbentuk dari proses aktivasi enzim telomerase. Adanya hambatan pada pembentukan enzim telomerase maka akan menyebabkan hambatan pembentukan telomere sehingga kromosom tidak ada yang melindungi sehingga terjadi proses fragmentasi kromosom (pecahnya kromosom) sehingga sel akan mati dan disebut apoptosis (Andrew *et al.*, 2002; Fujiwara *et al.*, 2004; Lantuejoul *et al.*, 2004)

Proses kematian sel melalui mekanisme apoptosis yang bersifat patologis dapat terjadi melalui hambatan aktivasi dari Protein Kinase C (PKC). PKC akan mengaktivasi protein p53 yang ada di dalam inti sel, yang berperan utama untuk transkripsi semua enzim yang diperlukan untuk kelangsungan siklus sel. Akibatnya proses siklus sel yang melibatkan proses sintesis DNA pada fase S dan proses sintesis RNA pada fase G1 dan G2 serta proses mitosis sel yang terjadi pada fase M akan terhenti sehingga sel tidak akan mengalami pembelahan dan sel

akan mati karena terjadi kondensasi kromosom yang menyebabkan terjadinya apoptosis (Andrew *et al.*, 2002; Yalon *et al.*, 2004)

Peningkatan aktivitas protein *p53* ternyata juga mengaktivasi protein Bax. Protein Bax akan merangsang mitokondria untuk memproduksi Cytokrom-C. yang mengaktifkan *Apoptotic Protease Activating Factor 1* (APAF1). Selanjutnya APAF1 akan berpengaruh akhir pada fragmentasi DNA yang menyebabkan kematian sel dalam bentuk apoptosis (Yalon *et al.*, 2004)

Mekanisme apoptosis yang bersifat patologis terjadi melalui proses sitotoksik sel oleh suatu bahan yang bersifat toksik. Bahan toksik menyebabkan terlepasnya berbagai macam protein dari sel diantaranya *perforin* dan *granzim*, yang mengakibatkan fragmentasi DNA. Adanya fragmentasi dari DNA menyebabkan kematian sel dalam bentuk apoptosis (Yalon *et al.*, 2004)

Apoptosis secara patologis dipengaruhi oleh peran dari *caspase 8*. Kondisi lingkungan di luar sel sangat menentukan terjadinya kematian sel yang termasuk jalur intrinsik. Jalur intrinsik dimulai dengan penggabungan dari reseptor-reseptor. Inisiasi jalur tersebut disebabkan oleh ikatan antara FAS ligand dan FAS reseptor. Penggabungan dari FAS akan menarik FADD dan *procaspase 8* menjadi suatu rangkaian kompleks. Aktivasi *caspase 8* dan *autocatalysis* dipengaruhi oleh konsentrasi *pro-caspase 8*. *Caspase 8* yang teraktivasi akan membelah *pro-caspase 3*, kemudian terjadi *autocatalysis* dari bentuk *caspase 3* yang aktif sebagai efektor utama dari apoptosis (Kulozik *et al.*, 2000).

Peran *caspase* pada apoptosis belum sepenuhnya diketahui karena varian substrat *caspase* cukup banyak ditemukan. Beberapa substrat mengalami

pemrosesan selama apoptosis. Sebagian besar *caspase* diperkirakan terlibat secara langsung dalam kematian sel, tetapi tidak semuanya terlibat dalam apoptosis (Adams *et al.*, 1998).

Sel mengalami apoptosis karena proses ini diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan sel, jaringan atau organ. Apoptosis juga berguna untuk menghancurkan sel-sel yang dianggap membahayakan integritas organisme itu sendiri, seperti sel yang terinfeksi oleh virus atau sel dengan kerusakan DNA maupun sel kanker (Fujiwara *et al.*, 2004, Yalon *et al.*, 2004)

Colchisin yang digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini. *Colchisin* merupakan salah satu alkaloid yang berasal dari tanaman *Autum crocus* (*Colchicum autumnale linn*) berpengaruh pada nukleus yang membelah. Larutan *colchisin* dengan konsentrasi kritis dapat mencegah terbentuknya benang-benang plasma dari gelondong inti (*spindel*) sehingga pemisahan kromosom pada anafase tidak berlangsung dan menyebabkan penggandaan kromosom tanpa pembentukan dinding sel. Akibat dari tidak terbentuknya spindel, maka kromosom-kromosom tetap tinggal berserakan dalam sitoplasma (stadium C-metafase). Pada stadium ini kromosom-kromosom memperlihatkan gambaran khas yaitu seperti tanda silang, akan tetapi jika kromosom-kromosom dapat memisahkan diri pada sentromernya (C-anafase) akan terbentuklah dinding nukleus yaitu nukleus resustansi (nukleus perbaikan) yang mengandung jumlah kromosom lipat dua. Apabila pengaruh *colchisin* telah menghambur maka sel poliploid yang baru tersebut dapat membentuk spindel pada kedua kutubnya dan membentuk nukleus anakan poliploid seperti pada telofase dari mitosis normal. (Suryo, 1995).

BAB VI
KESIMPULAN DAN SARAN

FC. KRISNA

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

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

- Pada pemberian fraksi alkaloid daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) dosis 10 ppm sudah dapat mempengaruhi proses kematian sel kanker secara apoptosis.

6.2 Saran

- Dilakukan penelitian lanjutan mengenai dosis efektif alkaloid daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) sebagai antikanker
- Dilakukan uji aktivitas antikanker dari fraksi alkaloid daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) secara *invivo*.

RINGKASAN

FC. KRISNA

RINGKASAN

Luly Kurniawati. Potensi Fraksi Alkaloid Daun Jarong (*Achyranthes Aspera linn*) Pada Induksi Apoptosis Kultur Sel Mieloma Mencit. Penelitian ini dibawah bimbingan Hana Eliyani, Mkes., Drh selaku pembimbing pertama dan Roesno Darsono Drh selaku pembimbing kedua.

Di Indonesia daun Jarong (*Achyranthes aspera linn*) sudah dimanfaatkan masyarakat untuk pengobatan kanker payudara dan kandungan. *Achyranthes aspera linn* berpotensi sebagai antikanker. Kandungan alkaloid *Achyranthes aspera linn* yang bersifat antimitosis yakni dapat menghambat pembelahan dan proliferasi sel yang mendahului proses apoptosis.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari potensi fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* sebagai penginduksi apoptosis pada kultur sel mieloma mencit.

Penelitian ini menggunakan bahan uji yaitu larutan *Achyranthes aspera linn* (dosis 1,10,100 dan 1000 ppm), kontrol negative dan kontrol positif 100 ppm *colchicin*. Sel mieloma dalam media RPMI disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C kemudian supernatan dipisahkan dari endapan. Selanjutnya sel ditanam pada botol kultur berisi media FBS 10% dan antibiotik kanamisin, streptomisin dan penicillin untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme dan ditambahkan HEPES dan NaHCO₃ untuk mempertahankan pH 7,4 – 7,7, kemudian kultur disimpan dalam inkubator O₂ 95% dan CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur sel diperiksa dengan hemositometer untuk

menentukan jumlah sel sebanyak 9×10^5 sel/ml. Bila jumlah tersebut telah mencukupi kultur sel dimasukkan ke dalam *microwell plate* yang sebelumnya telah diisi 0,2 ml bahan uji alkaloid *Achyranthes aspera linn* 1, 10, 100, 1000 ppm, kontrol positif dan kontrol negatif. kemudian di inkubasi kembali selama 24 jam setelah itu dilakukan penghitungan sel menggunakan pewarnaan *acridin orange* dan *etidium bromida* dibawah mikroskop flouresen pembesaran 400x. Penghitungan persentase sel apoptosis yaitu jumlah sel apoptosis dibagi jumlah keseluruhan sel (sel hidup, nekrosis dan apoptosis) dikali 100%

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada larutan uji *Achyranthes aspera linn* dosis 1 ppm setara dengan kontrol negatif ($p > 0,05$), sedangkan pada dosis 10, 100 dan 1000 ppm berpotensi setara dengan kemampuan kontrol positif 100 ppm *colchisin* ($p > 0,05$). Persentase apoptosis pada kontrol negatife adalah $1,97 \pm 1,37$; kontrol positiffe adalah $9,62 \pm 5,96$; sedangkan pada dosis 1, 10, 100, 1000 ppm persentasenya masing-masing adalah $7,65 \pm 4,17$; $8,86 \pm 3,59$; $12,66 \pm 3,67$; $12,93 \pm 3,81$.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan, bahwa fraksi alkaloid daun jarong (*Achyranthes aspera linn*) mulai dosis 10 ppm dapat menginduksi terjadinya apoptosis pada kultur sel mieloma mencit.



DAFTAR PUSTAKA

FC. KRISNA

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, J.M., and Cory, S.1998. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cells Survival Science. 281: 1322-1326.
- Adyana. I.D.P. 2006. Efek Antitelomerase Fraksi Alkaloid Terhadap Pembelahan dan Mitosis Sel Mieloma Mencit. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Andrew W, D.Vicky, D.Hill, J.Keeseey and S.Manzow.2002. Cell Death. Apoptosis and Necrosis Proliferation. Boehringer Mannheim.
- Bangun,A. 1990. Antibodi Monoklonal, Karya Aksara. Jakarta. Hal.16-68.
- Chabne, 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 Terapeutics 10TH. Edition. McGraw-Hill. Medical Publishing Division. P.1417-1421.
- Chakraborty,A; A.Brantner; T.Mukainaka, T.Konoshima; H.Tokuda and H.Nishino. 2002. Cancer Chemopresentative Activity of Achyranthes aspera Leaves on Epstein Barr Virus Activation and Two – Stage Mouse Skin Carcinogenesis. Cancer Lett. Mar 8;177(1):1-5.
- Chaoi S.H, S.Y.Lyu and W.B.Park.2004. Mistietoe Lectin Induce Apoptosis and Telomerase Inhibition in Human A253 Cancer Cell Through Dephosphorylation of Akt.Arc.Pharm Res. Jan 27(1)68-76.
- Choudhury, SC, A.K. Palo and A Padhy. 2004. Cytogenesis Consequences of vimblastine Tratmen in Mouse Bone marrow. Chemoterapy, 50(4) p. 171-177.
- Coundry, E.D. 1995. Cancer Cell. W.B. Sounder Company Philadelphia and London. P.136-144.
- Dalimartha, S. 2003. Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Kanker. Penerbit Swadaya. Jakarta. Hal. 1-52.
- Depkes. 1997. Inventaris Tanaman Obat Indonesia (IV) Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, hal 1-5.
- Dhevie, K.A. 2006. efek Fraksi Alkaloid Daun Jarong (*Achyranthes aspera* linn) pada viabilitas kultur sel Mieloma mencit. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

- Fujiwara, M., H. Kamma, H. Wu, M. Hamasaki, S. Kaneko, H. Horiguci, Matsui-Horiguci and M. Hatoh. 2004. Express and Alternative Splicing Pattern of Human Telomerase Reverse Transcriptase in Human Lung Cancer Cells, *J. Oncol. Apr*;24(4):925-930.
- Freshney, L.R. 1987. *Culture of Animal Cell: A Manual Basic of Technique*. 2nd Edition. Alan R. Liss Inc. New York. P. 227-292.
- Gao, X.Y.; D.W. Wang and F.M. Lin. 2000. Determination of Ecdystreone in *Achyranthes Bidentata* and Activity Promotion Proliferation of Osteoblast-Like Cell. *Yao Xue Xue Bao*. Nov;35(11):868-70.
- Hamilton, R.J. and P.A. Sewel. 1979. *Introduction to High Performance Liquid Chromatography*. Chapman and Hall. London.
- Harbone, J.B. 1973. *Phytochemical Metode*. Chapman and Hall. London, P. 109-116.
- Hembing, H.W., M.A.S. Wirian., T. Yaputro., S. Dalimartha, dan B. Wibowo. 1996. *Tanamam Berkhasiat Obat di Indonesia*. Cet 4 PT Karya Wreda. Hal. 46-47.
- Huang, D.M, JH. Gub, Y.T. Huang, SC Chuch, PC. 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.
- Ida, Y; Y. Satoh; M. Katsumata; M. Nagasao; Y. Hirai; T. Kajimoto; N. Katada; M. Yusuda and T. Yamamoto. 1998. Two Novel Oleanolic Acid Saponin Having a Sialyl lewis X Mimetic Structure *Achyranthes Fauriei* Root. *Bioorg Med Chem. Lett*. Sep.22:6(18):2555-2558.
- Indrawati, R., Lazuardi, dan Ratna, S.M. 1999. *Pengkajian Hambatan Pertumbuhan Sel Kanker Mieloma Secara *Invitro* Antara Maserasi Benalu Duku dan Maserasi Benalu Teh Dibandingkan dengan Benalu Metroteksat*, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya. Halama 8-9.
- Janeway, Charles A. Jr., Paul Travers, Mark Walport, and J. Donald Capra. 1999. *Immunobiology : The immune system in health and disease*, 4th . London : Elsevier Science
- Katzung, B.G. 1995. *Basic and Clinical Pharmacology* 7th Edition. Prentice Hall International. PP. 881.

- Kawamoto F. 1991. Rapid detection of *Plasmodium* By A New 'Thick Smear' Method Using Transmission Fluorescence Microscopy: Direct Staining With Acridine Orange. *Journal Of Protozoology Research*. 1 : 27-34.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., and Currie, A.R., 1972. Apoptosis : A Basic Biological Phenomenon With Wide Ranging Implication in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*. 26. 239.
- Kocki, J., J. Kolano. M., Cloch. A. Dmszynsk, and J.Wojclerowski. 2004. The Activity of Human Telomerase in The Cells Of Acut Leukemia *Folia Morphol. Feb.* 83(1):127-129.
- Kulozik A. E., Hentze M. W., Hegemeiere C., Bartram C. R., 2000. *Moleculare Medizine : Grundlagen-Pathomechanismen-Klinik*, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- 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. Diffrential Expression of Telomerase Reserve Transciptase (h TERT) in Lung Tumors *J. Cancer. Mars* 22;90(6)1222-1229.
- Liu J, G. Yang, J.A. Tho,pson, A.Glassman, K.Hayes, A Patterson and R.T.Marquez. 2004. A Genetically Defined Model for Human Ovarian Cancer. *Cancer Res. Mar* 1;64(5):1655-1663.
- Mardiswoyo, S dan H.R.Kusuma. 1968. *Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang. Cet.III.*
- Meles, D.K, Wurlina dan W. Sastrowardoyo. 2004. Efek Antifertilitas Dan Uji Reversibilitas Spermatogetik *Achyranthes Aspera Linn* Pada Staging Spermatogenesis Dalam Upaya Penemuan Obat Kontraspsi. Lemit Unair.
- Meles,D.K. 2004 *Kandungan Bahan Pada Daun Achyranthes aspera linn. Lab. Farmakologi. FK. Unair.*
- Meles,D.K. 2005 *Efek Antimitosis Fraksi Alkaloid Achyranthes aspera linn pada Pembelahan Sel Embrio. Disertasi, Pasca Sarjana Universitas Airlangga.*
- Mitaine A.C; A.Marouf; B.Hanquet; N. Bilirakis; M.A. Lacaille. 2001. Two Triterpenoid and Saponin From *Achyranthes aspera*.
- Nafrialdi, G. 2000. *Farmakologi dan Terapi Edisi IV, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta, Hal. 71-79.*

- Soekardjo, 2000. Kimia Medicinal. Airlangga university Press. Hal. 407-408.
- Nala, N. 2002. Obat Tradisional Bali Usada Penyakit Kanker. Upada, Denpasar.
- Rang, HP., M.M.Dale, J.M. Ritter. 1998. Pharmacology 3rd Edition. Churchill Livingstone Inc. New York. Halaman 71-79.
- Roya G.and P.S Rao Zoo. 2000. Anticancer Compounds From Tissue Culture of Medical Plants of Herbal. Medicinal Plants. Vol 7(2):71-79
- Scott.L., R.Alvero, M.Leondires, and B.Miller. 2000. Mitochondrial Morphology During Preimplantation Human Embryogenesis. J. Human of Reproduction Supl.2.p.148-159.
- Siswandono. 1983. Mekanisme Kerja Obat-obat Anti Kanker. Penerbit Dian Rakyat. Hal.VIII/95.
- Soekardjo. 2000. Kimia Medicinal. Airlangga Univesity press. Hal. 407-408.
- Spector, Davd L., G.D. Robet., Leinwand, and A. Leslie. 1998. Cell: A Laboratory Manual Vol.1 Culture and Biochemical Analysis of Cell. Cold Spring Harbor Labolatory Press. Harbor. P. 15.1-15.7.
- Suryo.1995. Sitogenetika. Cet I. Gajah Mada University Press. Bulak Sumur Yogyakarta. Hal.40-45.
- Sutawidja. I.K. 2001. Berbagai Cara Pengobatan Menurut "Lontar Usaha" Pengobatan Tradisional Bali. Penerbit Indra Jaya. Singaraja Bali.
- Tahiliani,P and A. Kai.2000.Achyranthes aspera Elevates Thyroid Hormone Levels and Decrease Hepatic Lipid Feroxidation in Female Rats. J. Ethnopharmacol 7(3).
- Thompson, C.B. 2000. Apoptosis In The Patogenesis And Treatment of Disease Science. 267: 1445-1448.
- Ward, F., D. Rizos., D. Corridan., K.Quina., M. Boland, and P. Leonargan. 2001. Paternal Influence on The Time of First Embriogenic Cleavage Post Inseminatin and The Implications for Subsequent Bovine Embryo Development In Vitro and Fertility In Vivo. Mol Repro dev. Vol 60 (1): 47-55.
- Wei,S; H.Liang; Y.Zhao and R.Zhang. 1997. Separation and Indentification of The Compounds From *Achyranthes Bidentata*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. May. 22(5) 293 -5, 391-20.

- Wurlina, 2000. Efek Antifertilitas Infusa *Achyranthes aspera linn* Terhadap Reproduksi Mencit. Lab. I. Kemajiran. FKH Unair
- Wurlina dan W. Sastrowardoyo dan D.K. Meles. 2002. Efek Alkaloid *Achyranthes aspera linn* Terhadap Pembelahan dan Perkembangan Embrio (*cleavage*) Mencit. Lemlit Unair.
- Wurlina dan W. Sastrowardoyo dan D.K Meles.2003. Pengaruh Antimitosis *Achyranthes aspera linn* Pada Pembelahan Sel Embrio (*cleavage*) Dalam Upaya Penemuan Obat Antifertilitas Setelah Hubungan Seksual (Post Coital Contraception). Lemlit Unair.
- Yalon M, S.Gal, Y. Segev and K.L Skorecki. 2004. Sister Chromatid Separation at Human Telomeric Region. J. Cell Sci. Mar.23.

LAMPIRAN

FC. KRISNA

Lampiran 1 : Tabel data jumlah sel hidup, nekrosis dan apoptosis pada sel mieloma mencit oleh pengaruh pemberian berbagai dosis ekstrak fraksi alkaloid daun jarong (*Achyranthes aspera linn*)

PERLAKUAN	ULANGAN	JUMLAH SEL			% APOPTOSIS
		NORMAL	NEKROSIS	APOPTOSIS	
KONTROL NEGATIF	1	124	39	0	0
	2	106	16	4	3,17
	3	96	21	3	2,5
	4	106	27	3	2,21
KONTROL POSITIF	1	98	22	3	2,44
	2	103	37	26	15,66
	3	92	20	17	13,18
	4	112	17	10	7,19
1 PPM	1	110	26	13	8,72
	2	82	28	2	1,79
	3	90	51	13	8,44
	4	80	49	17	11,64
10 PPM	1	83	27	5	4,35
	2	94	24	12	9,23
	3	104	35	21	13,13
	4	100	57	15	8,72
100 PPM	1	99	24	15	10,87
	2	81	26	18	14,4
	3	73	16	18	16,82
	4	111	28	13	8,55
1000 PPM	1	94	28	12	8,96
	2	70	25	21	18,10
	3	93	33	17	11,89
	4	69	20	13	12,75

Lampiran 2. Hasil analisis SPSS dari sel mieloma yang mengalami apoptosis (dalam persentase) oleh pengaruh fraksi alkaloid daun jarong (*Achyranthes aspera linn*)

Summarize

Case Processing Summary

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
sel non apoptosis * Perlakuan	24	100,0%	0	.0%	24	100,0%
sel apoptosis * Perlakuan	24	100,0%	0	.0%	24	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries

Perlakuan	k-		sel non apoptosis		sel apoptosis		
			N	Mean	N	Mean	
		1	100,00			,00	
		2	96,83			3,17	
		3	97,50			2,50	
		4	97,79			2,21	
		Total	N	4		4	
			Sum	392,12		7,88	
			Mean	98,0300		1,9700	
			Std. Deviation	1,37349		1,37349	
		k+	1	97,56			2,44
			2	84,34			15,66
			3	86,82			13,18
			4	92,81			7,19
		Total	N	4		4	
			Sum	361,53		38,47	
			Mean	90,3825		9,6175	
			Std. Deviation	5,96133		5,96133	
	1 ppm	1	91,28			8,72	
		2	98,21			1,78	
		3	91,56			8,44	
		4	88,36			11,64	
	Total	N	4		4		
		Sum	369,41		30,58		
		Mean	92,3525		7,6450		
		Std. Deviation	4,16448		4,16917		
	10 ppm	1	95,65			4,35	
		2	90,77			9,23	
		3	86,87			13,13	
		4	91,28			8,72	
	Total	N	4		4		
		Sum	364,57		35,43		
		Mean	91,1425		8,8575		
		Std. Deviation	3,59302		3,59302		
	100 ppm	1	89,13			10,87	
		2	85,60			14,40	
		3	83,18			16,82	
		4	91,45			8,55	
	Total	N	4		4		
		Sum	349,36		50,64		
		Mean	87,3400		12,6600		
		Std. Deviation	3,67103		3,67103		
	1000 ppm	1	91,04			8,96	
		2	81,90			18,10	
		3	88,11			11,89	
		4	87,25			12,75	
	Total	N	4		4		
		Sum	348,30		51,70		
		Mean	87,0750		12,9250		
		Std. Deviation	3,81242		3,81242		
	Total	N	24		24		
		Sum	2185,29		214,70		
		Mean	91,0538		8,9458		
		Std. Deviation	5,14488		5,14549		

a. Limited to first 100 cases.

Lanjutan Lampiran 2

Descriptives

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
sel non apoptosis	24	81,90	100,00	91,0538	5,14488
sel apoptosis	24	,00	18,10	8,9458	5,14549
Valid N (listwise)	24				

Oneway

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
sel non apoptosis	Between Groups	321,743	5	64,349	4,035	,012
	Within Groups	287,063	18	15,948		
	Total	608,806	23			
sel apoptosis	Between Groups	321,769	5	64,354	4,034	,012
	Within Groups	287,180	18	15,954		
	Total	608,949	23			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

sel non apoptosis

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Duncan ^a 1000 ppm	4	87,0750	
100 ppm	4	87,3400	
k+	4	90,3825	
10 ppm	4	91,1425	
1 ppm	4	92,3525	92,3525
k-	4		98,0300
Sig.		,108	,060

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

sel apoptosis

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Duncan ^a k-	4	1,9700	
1 ppm	4	7,6450	7,6450
10 ppm	4		8,8575
k+	4		9,6175
100 ppm	4		12,6600
1000 ppm	4		12,9250
Sig.		,060	,108

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

Lanjutan Lampiran 2

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
sel non apoptosis	LSD	k-	k+	7,6475*	2,82382	,014	1,7149	13,5801
			1 ppm	5,6775	2,82382	,060	-,2551	11,6101
			10 ppm	6,8875*	2,82382	,025	,9549	12,8201
			100 ppm	10,6900*	2,82382	,001	4,7574	16,6226
			1000 ppm	10,9550*	2,82382	,001	5,0224	16,8876
		k+	k-	-7,6475*	2,82382	,014	-13,5801	-1,7149
			1 ppm	-1,9700	2,82382	,494	-7,9026	3,9626
			10 ppm	-,7600	2,82382	,791	-6,6926	5,1726
			100 ppm	3,0425	2,82382	,296	-2,8901	8,9751
			1000 ppm	3,3075	2,82382	,257	-2,6251	9,2401
		1 ppm	k-	-5,6775	2,82382	,060	-11,6101	,2551
			k+	1,9700	2,82382	,494	-3,9626	7,9026
			10 ppm	1,2100	2,82382	,673	-4,7226	7,1426
			100 ppm	5,0125	2,82382	,093	-,9201	10,9451
			1000 ppm	5,2775	2,82382	,078	-,6551	11,2101
		10 ppm	k-	-6,8875*	2,82382	,025	-12,8201	-,9549
			k+	,7600	2,82382	,791	-5,1726	6,6926
			1 ppm	-1,2100	2,82382	,673	-7,1426	4,7226
			100 ppm	3,8025	2,82382	,195	-2,1301	9,7351
			1000 ppm	4,0675	2,82382	,167	-1,8651	10,0001
		100 ppm	k-	-10,6900*	2,82382	,001	-16,8226	-4,7574
			k+	-3,0425	2,82382	,296	-8,9751	2,8901
			1 ppm	-5,0125	2,82382	,093	-10,9451	,9201
			10 ppm	-3,8025	2,82382	,195	-9,7351	2,1301
			1000 ppm	-,2650	2,82382	,926	-5,6676	6,1976
		1000 ppm	k-	-10,9550*	2,82382	,001	-16,8876	-5,0224
			k+	-3,3075	2,82382	,257	-9,2401	2,6251
			1 ppm	-5,2775	2,82382	,078	-11,2101	,6551
			10 ppm	-4,0675	2,82382	,167	-10,0001	1,8651
			100 ppm	-,2650	2,82382	,926	-6,1976	5,6676
sel apoptosis	LSD	k-	k+	-7,6475*	2,82440	,014	-13,5813	-1,7137
			1 ppm	-5,6750	2,82440	,060	-11,6088	,2588
			10 ppm	-6,8875*	2,82440	,025	-12,8213	-,9537
			100 ppm	-10,6900*	2,82440	,001	-16,6238	-4,7562
			1000 ppm	-10,9550*	2,82440	,001	-16,8888	-5,0212
		k+	k-	7,6475*	2,82440	,014	1,7137	13,5813
			1 ppm	1,9725	2,82440	,494	-3,9613	7,9063
			10 ppm	,7600	2,82440	,791	-5,1738	6,6938
			100 ppm	-3,0425	2,82440	,296	-8,9763	2,8913
			1000 ppm	-3,3075	2,82440	,257	-9,2413	2,6263
		1 ppm	k-	5,6750	2,82440	,060	-,2588	11,6088
			k+	-1,9725	2,82440	,494	-7,9063	3,9613
			10 ppm	-1,2125	2,82440	,673	-7,1463	4,7213
			100 ppm	-5,0150	2,82440	,093	-10,9488	,9188
			1000 ppm	-5,2800	2,82440	,078	-11,2138	,6538
		10 ppm	k-	6,8875*	2,82440	,025	,9537	12,8213
			k+	-,7600	2,82440	,791	-6,6938	5,1738
			1 ppm	1,2125	2,82440	,673	-4,7213	7,1463
			100 ppm	-3,8025	2,82440	,195	-9,7363	2,1313
			1000 ppm	-4,0675	2,82440	,167	-10,0013	1,8663
		100 ppm	k-	10,6900*	2,82440	,001	4,7562	16,6238
			k+	3,0425	2,82440	,296	-2,8913	8,9763
			1 ppm	5,0150	2,82440	,093	-,9188	10,9488
			10 ppm	3,8025	2,82440	,195	-2,1313	9,7363
			1000 ppm	-,2650	2,82440	,926	-6,1988	5,6688
		1000 ppm	k-	10,9550*	2,82440	,001	5,0212	16,8888
			k+	3,3075	2,82440	,257	-2,6263	9,2413
			1 ppm	5,2800	2,82440	,078	-,6538	11,2138
			10 ppm	4,0675	2,82440	,167	-1,8663	10,0013
			100 ppm	-,2650	2,82440	,926	-5,6688	6,1988

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

Lampiran 3. Hasil analisis SPSS dari sel mieloma yang mengalami apoptosis (jumlah) oleh pengaruh fraksi alkaloid daun jarong (*Achyranthes aspera linn*)

Summarize

Case Processing Summary ^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
sel non apoptosis * Perlakuan	24	100,0%	0	,0%	24	100,0%
sel apoptosis * Perlakuan	24	100,0%	0	,0%	24	100,0%

a. Limited to first 100 cases.

Summarize

Case Summaries ^a

			sel non apoptosis	sel apoptosis	
Perlakuan	k-	1	163,00	,00	
		2	122,00	4,00	
		3	117,00	3,00	
		4	133,00	3,00	
		Total	N	4	4
			Sum	535,00	10,00
			Mean	133,7500	2,5000
			Std. Deviation	20,61351	1,73205
	k+	1	120,00	3,00	
		2	140,00	26,00	
		3	112,00	17,00	
		4	129,00	10,00	
		Total	N	4	4
			Sum	501,00	56,00
			Mean	125,2500	14,0000
			Std. Deviation	12,03813	9,83192
1 ppm	1	136,00	13,00		
	2	110,00	2,00		
	3	141,00	13,00		
	4	129,00	17,00		
	Total	N	4	4	
		Sum	516,00	45,00	
		Mean	129,0000	11,2500	
		Std. Deviation	13,58921	6,44851	
10 ppm	1	110,00	5,00		
	2	118,00	12,00		
	3	139,00	21,00		
	4	157,00	15,00		
	Total	N	4	4	
		Sum	524,00	53,00	
		Mean	131,0000	13,2500	
		Std. Deviation	21,21320	6,65207	
100 ppm	1	123,00	15,00		
	2	107,00	18,00		
	3	89,00	18,00		
	4	139,00	13,00		
	Total	N	4	4	
		Sum	458,00	64,00	
		Mean	114,5000	16,0000	
		Std. Deviation	21,43984	2,44949	
1000 ppm	1	122,00	12,00		
	2	95,00	21,00		
	3	126,00	17,00		
	4	89,00	13,00		
	Total	N	4	4	
		Sum	432,00	63,00	
		Mean	108,0000	15,7500	
		Std. Deviation	18,70829	4,11299	
Total		N	24	24	
		Sum	2966,00	291,00	
		Mean	123,5833	12,1250	
		Std. Deviation	18,77305	7,91125	

a. Limited to first 100 cases.

Lanjutan Lampiran 3

Descriptives

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
sel non apoptosis	24	89,00	163,00	123,5833	18,77305
sel apoptosis	24	,00	26,00	12,1250	7,01125
Valid N (listwise)	24				

Oneway

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
sel non apoptosis	Between Groups	2063,333	5	412,667	1,229	,336
	Within Groups	6042,500	18	335,694		
	Total	8105,833	23			
sel apoptosis	Between Groups	505,375	5	101,075	2,910	,043
	Within Groups	625,250	18	34,736		
	Total	1130,625	23			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

sel non apoptosis

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	
Duncan ^a 1000 ppm	4	108,0000	
100 ppm	4	114,5000	
k+	4	125,2500	
1 ppm	4	129,0000	
10 ppm	4	131,0000	
k-	4	133,7500	
Sig.			,093

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

sel apoptosis

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Duncan ^a k-	4	2,5000	
1 ppm	4	11,2500	11,2500
10 ppm	4		13,2500
k+	4		14,0000
1000 ppm	4		15,7500
100 ppm	4		16,0000
Sig.		,050	,318

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.

Lanjutan Lampiran 3

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
sel non apoptosis	k-	k+	8,5000	12,95559	,520	-18,7187	35,7187
		1 ppm	4,7500	12,95559	,718	-22,4687	31,9687
		10 ppm	2,7500	12,95559	,834	-24,4687	29,9687
		100 ppm	19,2500	12,95559	,155	-7,9687	46,4687
		1000 ppm	25,7500	12,95559	,062	-1,4687	52,9687
	k+	k-	-8,5000	12,95559	,520	-35,7187	18,7187
		1 ppm	-3,7500	12,95559	,776	-30,9687	23,4687
		10 ppm	-5,7500	12,95559	,662	-32,9687	21,4687
		100 ppm	10,7500	12,95559	,418	-16,4687	37,9687
		1000 ppm	17,2500	12,95559	,200	-9,9687	44,4687
	1 ppm	k-	-4,7500	12,95559	,718	-31,9687	22,4687
		k+	3,7500	12,95559	,776	-23,4687	30,9687
		10 ppm	-2,0000	12,95559	,879	-29,2187	25,2187
		100 ppm	14,5000	12,95559	,278	-12,7187	41,7187
		1000 ppm	21,0000	12,95559	,122	-6,2187	48,2187
	10 ppm	k-	-2,7500	12,95559	,834	-29,9687	24,4687
		k+	5,7500	12,95559	,662	-21,4687	32,9687
		1 ppm	2,0000	12,95559	,879	-25,2187	29,2187
		100 ppm	16,5000	12,95559	,219	-10,7187	43,7187
		1000 ppm	23,0000	12,95559	,093	-4,2187	50,2187
	100 ppm	k-	-19,2500	12,95559	,155	-46,4687	7,9687
		k+	-10,7500	12,95559	,418	-37,9687	16,4687
		1 ppm	-14,5000	12,95559	,278	-41,7187	12,7187
		10 ppm	-16,5000	12,95559	,219	-43,7187	10,7187
1000 ppm		6,5000	12,95559	,622	-20,7187	33,7187	
1000 ppm	k-	-25,7500	12,95559	,062	-52,9687	1,4687	
	k+	-17,2500	12,95559	,200	-44,4687	9,9687	
	1 ppm	-21,0000	12,95559	,122	-48,2187	6,2187	
	10 ppm	-23,0000	12,95559	,093	-50,2187	4,2187	
	100 ppm	-6,5000	12,95559	,622	-33,7187	20,7187	
sel apoptosis	k-	k+	-11,5000*	4,16750	,013	-20,2556	-2,7444
		1 ppm	-8,7500	4,16750	,050	-17,5056	,0056
		10 ppm	-10,7500*	4,16750	,019	-19,5056	-1,9944
		100 ppm	-13,5000*	4,16750	,005	-22,2556	-4,7444
		1000 ppm	-13,2500*	4,16750	,005	-22,0056	-4,4944
	k+	k-	11,5000*	4,16750	,013	2,7444	20,2556
		1 ppm	2,7500	4,16750	,518	-6,0056	11,5056
		10 ppm	,7500	4,16750	,859	-8,0056	9,5056
		100 ppm	-2,0000	4,16750	,637	-10,7556	6,7556
		1000 ppm	-1,7500	4,16750	,680	-10,5056	7,0056
	1 ppm	k-	8,7500	4,16750	,050	-,0056	17,5056
		k+	-2,7500	4,16750	,518	-11,5056	6,0056
		10 ppm	-2,0000	4,16750	,637	-10,7556	6,7556
		100 ppm	-4,7500	4,16750	,269	-13,5056	4,0056
		1000 ppm	-4,5000	4,16750	,294	-13,2556	4,2556
	10 ppm	k-	10,7500*	4,16750	,019	1,9944	19,5056
		k+	-,7500	4,16750	,859	-9,5056	8,0056
		1 ppm	2,0000	4,16750	,637	-6,7556	10,7556
		100 ppm	-2,7500	4,16750	,518	-11,5056	6,0056
		1000 ppm	-2,5000	4,16750	,556	-11,2556	6,2556
	100 ppm	k-	13,5000*	4,16750	,005	4,7444	22,2556
		k+	2,0000	4,16750	,637	-6,7556	10,7556
		1 ppm	4,7500	4,16750	,269	-4,0056	13,5056
		10 ppm	2,7500	4,16750	,518	-6,0056	11,5056
1000 ppm		,2500	4,16750	,953	-8,5056	9,0056	
1000 ppm	k-	13,2500*	4,16750	,005	4,4944	22,0056	
	k+	1,7500	4,16750	,680	-7,0056	10,5056	
	1 ppm	4,5000	4,16750	,294	-4,2556	13,2556	
	10 ppm	2,5000	4,16750	,556	-6,2556	11,2556	
	100 ppm	-,2500	4,16750	,953	-9,0056	8,5056	

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

Lampiran 4. Komposisi Larutan Media RPM11640

Komponen	Mg/L
L-Arginine	200
L-Asparagine	50
L-Aspartic Acid	20
L-Cystine [free base]	50
L-Glutamic Acid	20
L-Glutamine	300
Glycine	10
L-Histidine	15
L-Hidroxy-Proline	20
L-Serine	30
L-Threonine	20
L-Tryptophan	20
L-Tyrosine	20
L-Valine	20
Biotin	0,20
D-Ca pantothenate	0,25
Choline Chloride	3,00
Folic Acid	1,00
I-Inositol	35
Nicotinamide	1,00
Riboflavine	0,20
Thiamin HCL	1,00
Vitamin B-12	0,01
Pyridoxine HCL	1,00
Para-Aminobenzoic Acid	1,00
KCL	400
MgSO ₄ .7H ₂ O	100
NaCl	6000
NaHCO ₃	2200
Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	1512
CaNO ₃ . 4H ₂ O	100
D-Glukosa	2000
Phenol Red	5,00
Glutatione [reduced]	1,00
CO ₂ [gas phase]	5%

Dikutip dari : Freshney, I.R., 1987. Culture of Animal Cell: A manual Basic of Technique, 2nd edition, Alan R. Liss Inc., New York, p 227-292

Lampiran 5. Hasil Pengukuran Kadar Alkaloid daun Jarong (*Achyranthes aspera linn*).

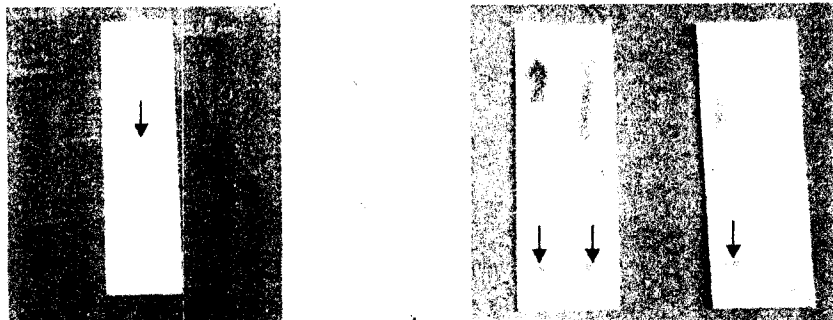
Hasil tahapan ekstraksi dapat di lihat pada tabel dibawah:

Tabel .1. Hasil Tahapan Ekstraksi Daun *Achyranthes aspera linn* (Meles, 2005).

Daun <i>Achyranthes aspera Linn</i>	Berat (gram)	%
Daun basah	5000,00	100
Daun kering	4080,00	81,6
Serbuk halus	4015,00	80,3
Ekstrak Methanol	400,01	8,00
Ekstrak fraksi kloroform kering	100,01	2,00

Hasilnya analisis luas puncak dari masing-masing komponen dapat dilihat pada

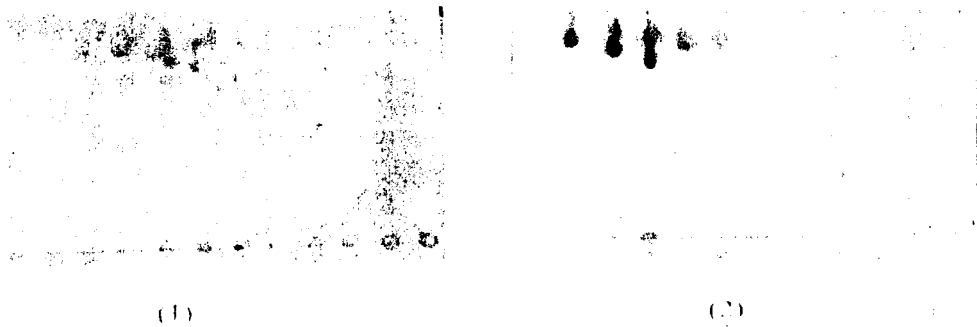
Gambar



Gambar . Hasil pengukuran kualitatif alkaloid dengan metode kromatografi lapis tipis. Wama jingga (tanda panah) menunjukkan adanya alkaloid dalam ekstrak daun *Achyranthes aspera Linn*

1. Eluen kloroform : methanol =5:1
2. Eluen etilasetat: methanol: air = 7 :4:2 (Meles, 2005)

Lanjutan lampiran 5



Gambar. Uji KLT hasil fraksinasi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn dalam 12 gradien konsentrasi pelarut kloroform dan methanol.

1. Fase gerak Kloroform : Methanol = 5 : 1
2. Fase gerak Etilasetat : Methanol : Air = 7 : 4 : 2 (Meles, 2005)