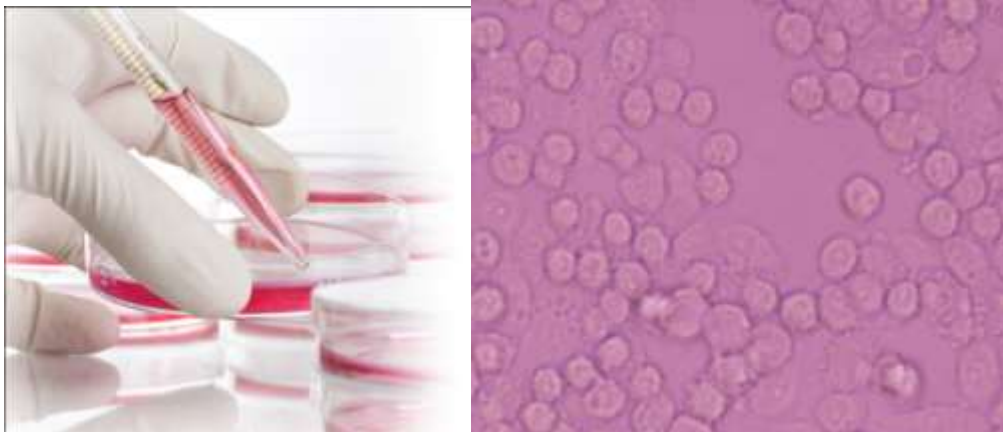


ANTI-KANKER EKSTRAK ETANOLIK TANAMAN WIDURI



Oleh:

Roihatul Muti'ah, S.F., M.Kes., Apt

Prakata

Pengembangan obat tradisional menjadi fitofarmaka saat ini sangat perlu di galakan. Obat tradisional yang telah digunakan untuk pengobatan selama ratusan tahun dan telah di wariskan secara turun temurun secara empirik jelas terbukti kemanjurannya. Namun demikian, hal ini tidak mudah begitu saja diterima dalam pengobatan formal. Untuk dapat diterima dalam pengobatan formal maka diperlukan bukti ilmiah melalui uji pre klinik sampai uji klinik, sehingga *grade* obat tradisional meningkat menjadi bentuk sediaan obat herbal terstandar maupun sediaan fitofarmaka.

Pada buku ini akan dipaparkan bagaimana metode pengembangan sediaan obat tradisional menjadi Obat Herbal terstandar dan sediaan fitofarmaka, skrining obat anti kanker dari bahan alam, teknik-teknik pengembangan obat antikanker secara pre-klinik melalui uji *in vitro*, contoh pengembangan obat tradisional dari tanaman *Calotropis gigantea* untuk antikanker.

Puji syukur Alhamdulillah kami panjatkan kehadiran Allah SWT atas selesainya buku ini. Dan terimakasih saya ucapkan kepada semua pihak yang telah membantu menyelesaikan buku ini dengan mencurahkan segala pikiran, tenaga baik moril maupun materiil. Pepatah mengatakan tiada gading yang ta retak. Begitu juga dalam buku ini masih banyak kekurangan dalam penulisan buku ini. Kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi esempurnaan buku ini.

Malang, November 2014

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR

DAFTAR ISI

DAFTAR GAMBAR

DAFTAR TABEL

BAB 1	Pendahuluan	1
BAB 2	Pengembangan Obat Tradisional Menjadi Fitofarmaka	3
	A Jamu (<i>Empirical based herbal medicine</i>)	3
	B Obat Herbal Terstandar (<i>Scientific based herbal medicine</i>)	4
	C Fitofarmaka (<i>Clinical based herbal medicine</i>)	6
BAB 3	Skrining Obat Antikanker Dari Bahan alam	20
	A <i>Potatato Disc Bioassay</i>	20
	B <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>	20
	C Uji sitotoksik secara <i>in vitro</i>	21
BAB 4	Teknik-Teknik Kultur Sel	27
	A persiapan Kerja <i>In vitro</i>	30
	B Media pertumbuhan kultur sel	32
	C Menumbuhkan sel dari tangki nitrogen cair	33
	D Penggantian Media	34
	E Panen Sel	35
	F Penghitungan Sel	36
	G Sub Kultur Sel	38

	H	Menyimpan Sel di tangki Nitrogen Cair (<i>Cryopreservation</i>)	39
	I	Preparasi Sampel	40
	J	Double Staining (uji Apoptosis Sel Kanker)	41
	K	Imunositokimia	44
	L	Uji kombinasi	47
	M	Double Time (uji antiproliferasi sel Kanker)	51
		Uji Antikanker Dari Tanaman <i>Calotropis gigantea</i> Pada Sel	
BAB 5		Kanker Kolon WiDr	53
	A	Tinjauan tentang Tanaman	54
	B	Tinjauan tentang Penyakit Kanker	59
	C	Tinjauan Tentang Daur Sel	64
	D	Tinjauan tentang Apoptosis Sel	69
	E	Tinjauan Tentang Matrix Metalloproteinase (MMPs)	75
	F	Tinjauan tentang kromatografi	78
	G	Kromatografi Lapis Tipis	79
	H	Tinjauan tentang Spektroskopi	81
	I	Tinjauan Tentang Spektroskopi Infra Merah	82
	J	Tinjauan tentang Spektroskopi Resonansi Magnet inti	83
		Hasil dan Pembahasan penelitian uji aktifitas antikanker dari ekstrak tanaman <i>Calotropis gigantea</i> pada sel kanker kolon serta profil kromatogram kandungan senyawanya	
BAB 6			84
		Hasil ekstraksi bagian daun dan bunga tanaman <i>Calotropis</i>	
	A	<i>gigantea</i>	84

	Hasil uji sitotoksisitas bagian daun dan bunga tanaman <i>Calotropis</i>	
B	<i>gigantea</i>	84
	Toksisitas ekstrak etanol daun <i>Calotropis gigantea</i> pada sel	
C	normal, fibroblast NIH3T3	88
D	Hasil Fraksinasi ekstrak daun <i>Calotropis gigantea</i>	89
E	Hasil uji sitotoksik fraksi ekstrak etanol daun <i>Calotropis gigantea</i>	92
	DAFTAR PUSTAKA	95

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Logo Jamu	4
Gambar 2	Logo Obat herbal Terstandar	5
Gambar 3	Logo Fitofarmaka	11
Gambar 4	Morfologi sel T47D akibat perlakuan EP 60 µg/mL (a) dibandingka dengan sel tanpa perlakuan/kontrol sel (b). Dilakukan dengan menginkubasi 3×10 ³ sel T47D dengan EP (30-210 µg/mL) selama 48 jam	23
Gambar 5	Morfologi sel MCF-7 pada perlakuan EP dan FKP. Uji dilakukan dengan menginkubasi 5×10 ³ sel MCF-7 dengan EP (25-100 µg/mL) dan FKP (10-500 µg/mL) selama 48 jam. A adalah kontrol sel, B adalah sel dengan perlakuan EP 75 µg/mL, C adalah sel dengan perlakuan FKP 70 µg/mL	24
Gambar 6	Morfologi sel HeLa tanpa perlakuan (CCRC UGM, 2013)	25
Gambar 7	Tanaman <i>C.gigantea</i>	
Gambar 8	struktur kimia beberapa kandungan senyawa dalam <i>C.gigantea</i>	
Gambar 9	Patogenesis kanker kolorektal	65
Gambar 10	Regulasi Cyclin/CDK	
Gambar 11	Jalur regulasi apoptosis	70

	Penyakit yang berhubungan dengan malfungsi apoptosis termasuk kanker kolorektal, dimana salah satu penyebabnya juga karena kegagalan apoptosis sel kanker	73
Gambar 12		
Gambar 13	ilustrasi morfologi sel selama proses apoptosis dan necrosis	74
Gambar 14	Peran MMPs dalam perkembangan penyakit kanker	78
	Perbandingan efek penghambatan pertumbuhan sel karena perlakuan ekstrak etanol <i>Calotropis gigantea</i> dari bagian daun dan bunga pada sel kanker kolon WiDr	87
Gambar 15		
Gambar 16	Pengaruh perlakuan ekstrak etanol terhadap pertumbuhan sel NiH3T3	89
	Metode fraksinasi cai-cair dari ekstrak daun <i>Calotropis gigantea</i>	90
Gambar 17		
Gambar 18	Profil KLT ekstrak etanol daun	91
Gambar 19	Profil KLT ekstrak etanol Bunga	91
	Perbandingan efek penghambatan pertumbuhan sel karena perlakuan fraksi DCM,EA, BuOh dan air pada sel kanker kolon WiDr dengan metode reduksi MTT	94
Gambar 20		

Bab 1

Pendahuluan

Sumber daya alam bahan obat dan obat tradisional merupakan aset nasional yang perlu terus digali, diteliti, dikembangkan dan dioptimalkan pemanfatannya. Sebagai suatu Negara dengan wilayah yang mempunyai tingkat keanekaragaman hayati yang tinggi, potensi sumber daya tumbuhan yang ada merupakan suatu aset dengan nilai keunggulan komparatif dan sebagai suatu modal dasar utama dalam upaya pemanfaatan dan pengembangannya untuk menjadi komoditi yang kompetitif.

Indonesia memiliki sekitar 400 suku bangsa (etnis dan sub etnis). Masing-masing etnis dan sub etnis memiliki berbagai pengetahuan yang diwariskan dari generasi ke generasi, diantaranya pengetahuan tradisional dibidang pengobatan dan obat-obatan. Bukti penggunaan obat tradisional sejak berabad-abad yang lalu di Indonesia antara lain terlihat dari relief yang terdapat pada candi prambanan dan candi borobudur, tertulis dalam daun lontar, serta peninggalan dan budaya di keraton-keraton hingga saat ini.

Bagi masyarakat Jawa dan Madura, obat tradisional lebih dikenal dengan sebutan Jamu, baik dalam bentuk rajangan maupun bentuk serbuk siap seduh. Informasi tertulis tentang jamu yang hingga saat ini terpelihara dengan baik di Perpustakaan Kraton Surakarta adalah Serat kawruh dan serat centini. Serat kawruh memberikan informasi yang sistemik tentang jamu, memuat 1.734 ramuan yang dibuat dari bahan alam dan cara penggunaannya serta dilengkapi dengan jampi-jampi (KOTRANAS, 2007).

Kearifan lokal pada daerah yang lain yaitu masyarakat sunda mempunyai 188 jenis tumbuhan obat propinsi Riau dan Jambi diketahui memiliki 45 ramuan dengan 195 spesies tumbuhan obat telah digunakan oleh masyarakat suku Melayu Tradisional, 58 ramuan dengan 115 spesies digunakan oleh suku Talang Mamak dan 72 jenis ramuan dengan 116 spesies oleh masyarakat suku Dalam.

Masyarakat Bali sangat mengenal “lengis Arak Nyuh” yaitu multikhasiat hasil penyulingan dari berbagai jenis tumbuhan rempah yang terdiri dari sisa-sisa bumbu dan potongan kelapa yang diasapkan di atas tungku dapur selama 4-5 bulan.

Pemanfaatan dan pengembangan obat tradisional di berbagai daerah tersebut merupakan warisan turun temurun berdasarkan pengalaman/empirik selanjutnya berkembang melalui

pembuktian ilmiah melalui uji praklinik dan uji klinik. Obat tradisional yang didasarkan pada pendekatan “warisan turun temurun” dan pendekatan empirik disebut jamu, sedangkan yang didasarkan pendekatan ilmiah melalui uji pra-klinik disebut obat herbal terstandar (OHT) dan yang telah melalui uji klinik disebut fitofarmaka.

Di Indonesia produk obat yang telah mendapat status fitofarmaka sampai saat ini hanya mencapai enam produk yaitu Nodiar (PT Kimia Farma), Stimuno (PT Dexa Medica), Rheumaneer PT. Nyonya Meneer), Tensigard, X-Gra (PT Phapros), ardiun (Darya Varia). Sedangkan OHT mencapai 17 produk dan jamu mencapai ribuan produk. Lambatnya perkembangan fitofarmaka ini disebabkan oleh beberapa hal antara lain untuk mendapatkan status fitofarmaka suatu produk harus dibuktikan khasiat dan keamanannya melalui uji klinik pada manusia. Hal ini membutuhkan biaya besar dan waktu yang cukup lama. Ironisnya masyarakat sampai saat ini belum memahami apa makna *grade-grade* Obat bahan alam tersebut. Sehingga hal tersebut menambah keengganan produsen untuk menaikkan *grade* produknya menjadi fitofarmaka karena produsen berdalih bahwa kenaikan grade produknya menjadi fitofarmaka tidak menambah *revenue* dari modal yang dikeluarkan.

Bab 2

Pengembangan obat tradisional menjadi Fitofarmaka

Obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang secara turun temurun telah digunakan untuk pengobatan, dan dapat diterapkan sesuai norma yang berlaku dimasyarakat (Kemenkes, 2012). Berdasarkan cara pembuatan serta jenis klaim penggunaan dan tingkat pembuktian khasiat Obat bahan alam di Indonesia saat ini digolongkan menjadi 3 yaitu : Jamu, obat herbal terstandar dan Fitofarmaka (BPOM, 2004).

A. Jamu (*Empirical based herbal medicine*)

Jamu adalah obat tradisional yang disiapkan dan disediakan secara tradisional. Berisi seluruh bahan tanaman yang menjadi penyusun jamu tersebut, higienis (bebas cemaran) serta digunakan secara tradisional berdasarkan pengalaman.

Jamu telah digunakan secara turun-temurun selama berpuluh-puluh tahun bahkan mungkin ratusan tahun. Pada umumnya, jenis ini dibuat dengan mengacu pada resep peninggalan leluhur atau pengalaman leluhur. Sifat jamu umumnya belum terbukti secara ilmiah (empirik) namun telah banyak dipakai oleh masyarakat luas. Belum ada pembuktian ilmiah sampai dengan klinis, tetapi digunakan dengan bukti empiris berdasarkan pengalaman turun temurun.

Berdasarkan keputusan BPOM obat tradisional yang didaftarkan sebagai jamu harus memenuhi kriteria sebagai berikut:

- a. Aman sesuai dengan persyaratan yang ditetapkan;
- b. Klaim khasiat dibuktikan berdasarkan data empiris;
- c. Memenuhi persyaratan mutu yang berlaku.
- d. Jenis klaim penggunaan sesuai dengan jenis pembuktian tradisional dan tingkat pembuktiannya yaitu tingkat pembuktian umum dan medium;
- e. Jenis klaim penggunaan harus diawali dengan kata – kata : “ Secara tradisional digunakan untuk ...”, atau sesuai dengan yang disetujui pada pendaftaran.



Gambar 1. Logo Jamu (BPOM, 2004)

B. Herbal Terstandar (*Scientific based herbal medicine*)

Jamu dapat dinaikkan kelasnya menjadi herbal terstandar dengan syarat bentuk sediaannya berupa ekstrak dengan bahan dan proses pembuatan yang terstandarisasi. Disamping itu herbal terstandar harus melewati uji praklinis seperti uji toksisitas (keamanan), kisaran dosis, farmakodinamik (kemanfaatan) dan teratogenik (keamanan terhadap janin).

Uji praklinis meliputi *in vivo* dan *in vitro*. Riset *in vivo* dilakukan terhadap hewan uji seperti mencit, tikus ratus-ratus galur, kelinci atau hewan uji lain.

Sedangkan *in vitro* dilakukan pada sebagian organ yang terisolasi, kultur sel atau mikroba. Riset *in vitro* bersifat parsial, artinya baru diuji pada sebagian organ atau pada cawan petri. Tujuannya untuk membuktikan klaim sebuah obat. Setelah terbukti aman dan berkhasiat, bahan herbal tersebut berstatus herbal terstandar.

Berdasarkan keputusan BPOM obat tradisional yang didaftarkan sebagai Obat Herbal Terstandar harus memenuhi kriteria sebagai berikut:

1. Aman sesuai dengan persyaratan yang ditetapkan;
2. Klaim khasiat dibuktikan secara ilmiah/praklinik;
3. Telah dilakukan standarisasi terhadap bahan baku yang digunakan dalam produk jadi;
4. Memenuhi persyaratan mutu yang berlaku



Gambar 2. Logo Obat herbal Terstandar (BPOM,2004)

Tujuh belas (17) jenis obat tanaman yang masuk kategori obat terstandar, yaitu diabmeneer, diabet, kiranti (obat datang bulan), fitogaster, fitolac, lelap dan lain sebagainya. Sedangkan sembilan jenis tanaman obat yang siap menjadi fitofarmaka, yaitu cabe jawa sebagai androgenik, temulawak untuk antihiperfipidemia, Daun Jambu Biji, sebagai obat anti demam berdarah, buah mengkudu dan daun salam sebagai anti diabet, jati belanda untuk anti hiperfidemia, jahe merah sebagai anti neoplasma, serta rimpang kunyit untuk anti hiperfidemia. Sementara 18 belas jenis tanaman obat unggulan lainnya yang siap menjadi fitofarmaka dan OHT yaitu brotowali (antimalaria antidiabetik), kuwalot (antimalaria), akar kucing (anti asam urat), sambiloto (antimalaria), johar (perlindungan hati), biji papaya (kesuburan), daging biji bagore (antimalaria), daun paliasa (perlindungan hati), makuto dewo (perlindungan hati), daun kepel (asam urat), akar senggugu (sesak napas), seledri (batu ginjal), Gandarusa (KB lelaki), daun johar (anti malaria), mengkudu (dermatitis), mengkudu rimpang jahe (anti TBC), umbi lapis kucai (anti hipertensi), jati belanda & jambu biji (pelangsing) (Sarmoko, 2009).

C. Fitofarmaka (*Clinical based herbal medicine*)

1. Pengertian Fitofarmaka

Menurut peraturan menteri kesehatan Indonesia Nomor 760/MENKES/PER/IX/1992 tentang fitofarmaka menyebutkan bahwa Fitofarmaka adalah sediaan obat dan obat tradisional yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya bahan bakunya terdiri dari simplisia atau sediaan galenik yang telah memenuhi persyaratan yang berlaku.

Fitofarmaka oleh pemerintah disetarakan dengan obat modern karena :

- a. Proses pembuatannya yang telah terstandar,

- b. Ditunjang bukti ilmiah s/d uji klinik pada manusia dengan criteria- memenuhi syarat ilmiah,
- c. Protokol uji yang telah disetujui,
- d. Dilakukan oleh pelaksana yang kompeten,
- e. Memenuhi prinsip etika,
- f. Tempat pelaksanaan uji memenuhi syarat.

2. Standar Bahan Baku Dan Bentuk Sediaan Fitofarmaka

Bahan baku Fitofarmaka dapat berupa simplisia atau sediaan galenik yang harus memenuhi persyaratan yang tertera dalam Farmakope Indonesia, Ekstra Farmakope Indonesia atau Materia Medika Indonesia. Bila pada ketiga buku persyaratan tersebut tidak tertera paparannya, boleh menggunakan ketentuan dalam buku persyaratan mutu negara lain atau pedoman lain. Penggunaan ketentuan atau persyaratan lain di luar Farmakope Indonesia, Ekstra Farmakope Indonesia dan Materia Medika Indonesia harus mendapat persetujuan pada waktu pendaftaran Fitofarmaka.

Bentuk sediaan harus dipilih sesuai dengan sifat bahan baku dan tujuan penggunaannya, sehingga bentuk sediaan tersebut dapat memberikan keamanan, khasiat, dan mutu yang paling tinggi. Komposisi Fitofarmaka tidak boleh lebih dari 5 (lima) bahan baku, tetapi akan dilakukan penilaian secara khusus pada saat pendaftaran bila ada penyimpangan terhadap hal tersebut. Penilaian khusus tersebut meliputi kemampuan Industri Obat Tradisional dalam melakukan pengujian secara kualitatif dan kuantitatif terhadap Fitofarmaka. Masing-masing bahan baku tersebut harus diketahui keamanan dan khasiatnya, serta keamanan dan kebenaran khasiat ramuan tersebut harus dibuktikan dengan uji klinik.

3. Pedoman Pelaksanaan Uji Klinik

Dalam rangka pengembangan obat tradisional (Red: Obat Bahan Alam Indonesia) ke arah Fitofarmaka tersebut perlu adanya suatu pedoman. Hal ini diatur dalam Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia nomor 761/ MENKES/SK/IX/1992 tentang Pedoman Fitofarmaka dan Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia nomor 56/MHNKES/SK/I/2000 tentang Pedoman Pelaksanaan Uji Klinik Obat Tradisional. Dasar pemikirannya adalah bahwa obat tradisional baik dalam bentuk simplisia tunggal maupun ramuan sebagian besar penggunaan dan kegunaannya masih berdasarkan pengalaman. Data yang meliputi kegunaan, dosis dan efek samping sebagian besar belum didasarkan

pada landasan ilmiah, karena penggunaan obat tradisional baru didasari kepada kepercayaan terhadap informasi berdasarkan pengalaman.

Pedoman Pelaksanaan Uji Klinik Obat Tradisional disusun sebagai panduan pengembangan yang mencakup penyiapan dan pembuatan obat tradisional yang memenuhi kaidah dan persyaratan ilmiah dan teknologi untuk siap produksi dan uji agar dapat dimanfaatkan dalam upaya pelayanan kesehatan. Salah satu persyaratan agar obat tradisional dapat digunakan pada upaya pelayanan kesehatan adalah tingkat keamanan dan kemanfaatannya telah dapat dibuktikan secara ilmiah serta bersifat terulangkan (*reproducible*) baik dalam bentuk sediaan maupun keamanan dan manfaat penggunaan. Untuk mendapatkan kepastian keterulangan tentang bentuk, keamanan, serta manfaat maka pembakuan obat tradisional perlu dilakukan agar tersedia acuan dalam bentuk data baku. Dengan demikian setiap obat tradisional yang akan digunakan dalam upaya pelayanan kesehatan perlu dibakukan untuk mendapatkan obat tradisional yang jelas identitasnya. Tata-laksana pengembangan obat tradisional ke arah penggunaan dalam upaya pelayanan kesehatan berlangsung dalam suatu mekanisme pengujian yang melibatkan pihak-pihak terkait.

Apabila obat tradisional yang tidak terkena ketentuan wajib daftar berdasarkan UU No. 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan seperti Jamu Racik dan Jamu Gendong ingin dikembangkan penggunaannya ke jalur pelayanan kesehatan, maka obat tradisional tersebut terlebih dahulu harus mengalami pengungkapan untuk memperoleh informasi tentang kemanfaatannya secara empiris, luas jangkauan masyarakat pengguna, dan informasi menyangkut teknologi kefarmasian (cara pembuatan dan bentuk sediaan, cara pemakaian, bahan yang digunakan, identitas serta cara perolehan, ketersediaan bahan sumber simplisia). Hal ini dimaksudkan agar obat tradisional tersebut dapat terulangkan pada saat pemanfaatan nantinya. Berdasarkan informasi tersebut selanjutnya dilakukan persiapan dan pengujian praklinik dan klinik obat tradisional dimaksud.

Dari hasil-hasil uji yang diperoleh ditetapkan langkah lanjut oleh Tim yang berwenang untuk itu.

Pada lampiran Peraturan Menteri Kesehatan RI No. 243 /Menkes/Per/V/1990 Daftar Bahan Obat Tradisional Yang Dibebaskan Dari Ketentuan Wajib Daftar adalah:

NO	Bahan Indonesia	Nama Latin	Bagian yang digunakan
1	Adas	<i>Foeniculum vulgare</i>	Buaha
2	Adas Manis	<i>Pimpinella anisus</i>	Buah
3	Akar Wangi	<i>Vetiveria zizanioides (Andropogon zizanioides)</i>	Akar
4	Asam	<i>Tamarindus Indica</i>	Buahh
5	Bangle	<i>Zingiber purpureum</i>	Rimpang
6	Bawang Merah	<i>Allium cepa</i>	Umbi
7	Bayam duri	<i>Amarantus spinosus</i>	Daun
8	Baligo	<i>Benincasa hispida</i>	Buah
9	Belimbing Manis	<i>Averhoa carambola</i>	Bunga
10	Beluntas	<i>Pluchea indica</i>	Daun
11	Belustru	<i>Liffa cylindrica</i>	Daun
12	Cabe Jawa	<i>Piper retrofractum</i>	Buah
13	Cendana	<i>Santalum album</i>	Kayu
14	Cengkeh	<i>Syzygium aromaticum</i>	Bunga
15	Cincao	<i>Cyclea barbata</i>	Daun
16	Daun Jintan	<i>Plectranthus amboinicus</i>	Daun
17	Gambir	<i>Uncaria gambir</i>	Sari daun
18	Ganyong	<i>Canna edulis</i>	Pati
19	Garut/ Irut	<i>Marantha arundinaceae</i>	Pati
20	Jahe	<i>Zingiber officinale</i>	Rimpang
21	Jambu biji	<i>Psidium guajava</i>	Daun
22	Jeruk manis	<i>Citrus aurantium</i>	Kulit buah
23	Jeruk nipis	<i>Citrus aurantifoli</i>	Buah

24	Kepulaga	<i>Amomum compactum</i>	Buah
25	Katuk	<i>Sauropus androgynus</i>	Daun
26	Kayu manis	<i>Cinnamomum gurma</i>	Kulit batang
27	Kecombrang	<i>Nicolaia speciea</i>	Bunga
28	Kedawung	<i>Parkia roxburghii</i>	Biji
29	Kelapa	<i>Cocos nucifera</i>	Air
30	Kemenyan	<i>Styrox benzoin</i>	Damar
31	Kemiri	<i>Aleurites moluccana</i>	Biji
32	Kencur	<i>Kaemferia galanga</i>	Rimpang
33	Ketumbar	<i>Coriandrum sativum</i>	Biji/ buah
34	Kunyit	<i>Curcuma domestika</i>	Rimpang
35	Labu	<i>Legenaria Leucantha</i>	Buah
36	Labu merah	<i>Cucurbitamoschata</i>	Biji
37	Lada	<i>Piper nigrum</i>	Buah
38	Lampas	<i>Ocimum sanctum</i>	Daun
39	Lengkuas	<i>Languas galanga</i>	Rimpang Roi
40	(lempuyang emprit	<i>Zingiber americana</i>	Rimpang
41	Lampuyang gajah	<i>Zingiber zerumber</i>	Rimpang
42	Lempuyang wangi	<i>Zingiber aromaticus</i>	Rimpang
43	Pepaya	<i>Carica papaya</i>	Daun
44	Pulosari	<i>Alyxia reinwardtii</i>	Kulit batang
45	Saga	<i>Abrus precatorius</i>	Daun
46	Secang	<i>Caesalpinnia sappen</i>	Kayu
47	Selasih	<i>Ocium basilicum</i>	Herba
48	Sereh	<i>Cymbopogon nardus</i>	Daun
49	Sirih	<i>Piper bettle</i>	Daun

50	Temu giring	<i>Curcuma heyneana</i>	Rimpang
51	Temu hitam	<i>Curcuma aeroginosa</i>	Rimpang
52	Temu kunci	<i>Bosaenbergia pandurata</i>	Rimpang
53	Temu lawak	<i>Curcuma xanthorrhiza</i>	Rimpang

Bagi obat tradisional yang terkena ketentuan wajib daftar ingin dikembangkan penggunaannya pada jalur pelayanan kesehatan, maka industri dan produk yang dihasilkannya pertama-tama harus memenuhi persyaratan seperti tertera pada Peraturan Menkes nomor 007 tahun 2012 tentang Registrasi Obat Tradisional serta Keputusan Menteri Kesehatan nomor 661/Menkes/SK/VII/1994 tentang Persyaratan Obat Tradisional. Dengan melampirkan dokumen seperti dipersyaratkan pada peraturan tersebut, maka industri obat tradisional dapat mengajukan permintaan untuk uji klinik terhadap produk, di mana protokolnya terlebih dahulu diajukan ke Badan POM untuk memperoleh persetujuan. Hasil uji klinik obat tradisional merupakan syarat pelengkap pendaftaran obat tradisional yang akan digunakan pada upaya pelayanan kesehatan.

Tata laksana pengembangan pemanfaatan obat tradisional dilakukan melalui beberapa langkah. Setelah dilakukan observasi dan penilaian pemakaian obat tradisional di masyarakat dan ternyata obat tradisional tersebut berkhasiat secara empirik dan tidak memperlihatkan efek samping maka dilakukan:

Langkah I : Uji praklinik yang menentukan keamanan melalui uji toksisitas dan menentukan khasiat melalui uji farmakodinamik.

Tahap uji Pra klinik, *in vivo* dan *in vitro* diperlukan jika ingin diketahui mekanisme kerja yang lebih rinci dari calon fitofarmaka.

Tahap uji toksisitas meliputi toksisitas subkronis, toksisitas akut, toksisitas khas/ khusus

Langkah II : Standardisasi bahan baku dan mutu; yaitu standarisasi simplisia, standarisasi ekstrak dan standarisasi sediaan

Langkah III : Teknologi farmasi yang menentukan identitas secara seksama sampai dapat dibuat produk yang terstandarisasi;

Langkah IV : Uji klinik pada orang sakit dan atau orang sehat.

Tahapan uji klinik ini melalui 4 fase yaitu

Fase 1 : dilakukan pada sukarelawan sehat

Fase 2 : dilakukan pada kelompok pasien terbatas

Fase 3 : dilakukan pada pasien dengan jmlh yang lebih besar dari fase 2

Fase 4: *post marketing survailence*, untuk melihat kemungkinan efek samping yang tidak terkendali saat uji pra klinik maupun saat uji klinik fase 1-3

Setelah langkah IV ini, dan terbukti manfaat dan ke-amanannya, maka obat tradisional dapat dipakai di dalam pelayanan kesehatan sebagai Fitofarmaka.

Kemasan produk fitofarmaka berupa jari-jari daun yang membentuk bintang dalam lingkaran dan ditempatkan pada bagian atas sebelah kiri dari wadah/pembungkus atau brosur. Logo produk fitofarmaka disajikan pada gambar di bawah ini:



Gambar 3. Logo Fitofarmaka (BPOM,2004)

4. Produk obat yang telah mendapat status fitofarmaka

Sampai saat ini masih terdapat 6 produk Fitofarmaka yang terdapat di Indonesia yaitu:

a. Nodiar (POM FF 031 500 361)

Komposisi:

- Attapulgate, 300 mg
- *Psidium folium* ekstrak (daun jambu biji), 50 mg
- *Curcuma domesticae rhizoma* ekstrak (kunyit), 7.5 mg

Khasiat: untuk pengobatan diare non spesifik

Produksi: PT. Kimia Farma

b. Rheumaneer (POM FF 032 300 351)

Komposisi:

- *Curcuma domesticae rhizoma*, 95 mg
- *Zingiberis rhizoma* ekstrak, 85 mg
- *Curcuma rhizoma* ekstrak, 120 mg

- *Panduratae rhizoma* ekstrak, 75 mg
- *Retrofracti fructus* ekstrak, 125 mg

Khasiat: pengobatan nyeri sendi ringan

Produksi : PT. Nyonya Meneer

- c. Stimuno (POM FF 041 300 411, POM FF 041 600 421)

Komposisi: *Phyllanthi herba* ekstrak (meniran), 50 mg

Khasiat: Membantu memperbaiki dan meningkatkan daya tahan tubuh (sebagai imunomodulator)

Produksi: PT. Dexa Medica

- d. Tensigard Agromed (POM FF 031 300 031, POM FF 031 300 041)

Komposisi:

- *Apii Herba* ekstrak (seledri), 95 mg
- *Orthosiphon folium* ekstrak (daun kumis kucing), 28mg

Khasiat: Membantu menurunkan tekanan darah sistolik dan diastolik pada penderita hipertensi ringan hingga sedang

Produksi: PT. Phapros

- e. X-Gra (POM FF 031 300 011, POM FF 031 300 021)

Komposisi:

- *Ganoderma lucidum* (jamur ganoderma), 150 mg
- *Eurycomae radix* (akar pasak bumi), 50 mg
- *Panacis ginseng radix* (akar ginseng), 30 mg
- *Retrofracti fructus* (buah cabe jawa), 2.5 mg
- Royal jelly 5 mg

Khasiat: Meningkatkan stamina dan kesegaran tubuh, membantu meningkatkan stamina pria, membantu mengatasi disfungsi ereksi dan ejakulasi dini.

Produksi: PT. Phapros

- f. Ardium

Komposisi:

Tiap tablet ardiium® mengandung micronized flavonoid fraction 500 mg yang setara dengan: Diosmin 450 mg dan Hesperidin 50 mg.

Khasiat : Nyeri tungkai, bengkak/edema terutama pada malam hari dan pada gejala-gejala fungsional yang diakibatkan oleh wasir

Produksi : Darya Varia

Keenam produk fitofarmaka ini merupakan produk Indonesia yang membanggakan. Melalui berbagai penelitian, prosedur, dan biaya yang tidak sedikit akhirnya produk ini dapat secara aman dikonsumsi masyarakat sesuai dengan indikasinya. Dengan berkembangnya fitofarmaka maka akan meningkatkan kepercayaan konsumen dalam menggunakannya, jelas karena fitofarmaka adalah *grade* tertinggi dari produk herbal di Indonesia. Fitofarmaka juga dalam proses produksinya sudah terstandarisasi dimulai sejak budi daya melalui adanya GAP (Good Agricultural Practice).

5. Daftar Obat Tradisional yang harus dikembangkan Menjadi Fitofarmaka

Pada Lampiran Peraturan Menteri Kesehatan R.I. Nomor 760/Menkes/Pery/Xi/992 Tanggal : 4 September 1992 dicantumkan daftar Obat Tradisional yang harus dikembangkan Menjadi Fitofarmaka yaitu

- | | | |
|------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| 1. Antelmintik | 8. Anti Hiperlipidemia | 14. Anti Malaria |
| 2. Anti Ansietas (Anti Cemas) | 9. Anti Hipertensi | 15. Anti TBC |
| | | 16. Antitusif/
Ekspektoransia |
| 3. Anti Asma | 10. Anti Hipertiroidisma | |
| 4. Anti Diabetes
(Hipoglikemik) | 11. Anti Histamin | 17. Disentri |
| | 12. Anti Inflamasi (Anti
Rematik) | 18. Dispepsia (Gastritis) |
| 5. Anti Diare | | |
| 6. Anti Hepatitis Kronik | 13. Anti Kanker | 19. Diuretik |
| 7. Anti Herpes Genitalis | | |

D. Good Agriculture Practise (GAP)

GAP merupakan upaya untuk standardisasi dimulai sejak budi daya. Hal ini dimaksudkan agar diperoleh keterulangan yang sama antarproduk yang dibuat. Hal ini dianalogikan dengan proses pembuatan obat sintetis yaitu dari proses bahan baku, proses produksi, uji kestabilan, uji kualitas semua ada SOP-nya (prosedur tetap/protap).

E. CPOTB (Cara Pembuatan Obat tradisional yang Baik)

Berdasarkan Keputusan BPOM Nomor HK.03.1.23.06.11.5629 tahun 2011 tentang persyaratan teknis Cara Pembuatan Obat tradisional yang Baik (CPOTB) menyebutkan bahwa Industri obat tradisional harus membuat obat tradisional sedemikian rupa agar sesuai dengan tujuan penggunaannya, memenuhi persyaratan yang tercantum dalam dokumen izin edar (registrasi) dan tidak menimbulkan risiko yang membahayakan penggunaannya karena tidak aman, mutu rendah atau tidak efektif. Manajemen puncak bertanggung jawab untuk pencapaian tujuan ini melalui suatu “Kebijakan Mutu”, yang memerlukan partisipasi dan komitmen dari semua jajaran di semua departemen di dalam perusahaan, para pemasok dan para distributor. Untuk mencapai tujuan mutu secara konsisten dan dapat diandalkan, diperlukan sistem Pemastian Mutu yang didesain secara menyeluruh dan diterapkan secara benar serta menginkorporasi Cara Pembuatan Obat Tradisional yang Baik (CPOTB) termasuk Pengawasan Mutu dan Manajemen Risiko Mutu.

CPOTB merupakan bagian dari Pemastian Mutu yang memastikan bahwa obat tradisional dibuat dan dikendalikan secara konsisten untuk mencapai standar mutu yang sesuai dengan tujuan penggunaan dan dipersyaratkan dalam izin edar dan Spesifikasi produk. CPOTB mencakup produksi dan pengawasan mutu. Persyaratan dasar dari CPOTB adalah :

1. semua proses pembuatan obat tradisional dijabarkan dengan jelas, dikaji secara sistematis berdasarkan pengalaman dan terbukti mampu secara konsisten menghasilkan obat tradisional yang memenuhi persyaratan mutu dan spesifikasi yang telah ditetapkan;
2. tahap proses yang kritis dalam proses pembuatan, pengawasan dan sarana penunjang serta perubahannya yang signifikan divalidasi;
3. tersedia semua sarana yang diperlukan untuk CPOTB termasuk:
 - a. personil yang terqualifikasi dan terlatih;
 - b. bangunan dan sarana dengan luas yang memadai;
 - c. peralatan dan sarana penunjang yang sesuai;
 - d. bahan, wadah dan label yang benar;
 - e. prosedur dan instruksi yang disetujui; dan
 - f. tempat penyimpanan dan transportasi yang memadai.
4. prosedur dan instruksi ditulis dalam bentuk instruksi dengan bahasa yang jelas, tidak bermakna ganda, dapat diterapkan secara spesifik pada sarana yang tersedia;

5. operator memperoleh pelatihan untuk menjalankan prosedur secara benar;
6. pencatatan dilakukan secara manual atau dengan alat pencatat selama pembuatan yang menunjukkan bahwa semua langkah yang dipersyaratkan dalam prosedur dan instruksi yang ditetapkan benar-benar dilaksanakan dan jumlah serta mutu produk yang dihasilkan sesuai dengan yang diharapkan. Tiap penyimpangan dicatat secara lengkap dan diinvestigasi;
7. catatan pembuatan termasuk distribusi yang memungkinkan penelusuran riwayat bets secaram lengkap, disimpan secara komprehensif dan dalam bentuk yang mudah diakses;
8. penyimpanan dan distribusi obat tradisional yang dapat memperkecil risiko terhadap mutu obat tradisional;
9. tersedia sistem penarikan kembali bets obat tradisional mana pun dari peredaran; dan
10. keluhan terhadap produk yang beredar dikaji, penyebab cacat mutu diinvestigasi sertadilakukan tindakan perbaikan yang tepat dan pencegahan pengulangan kembali keluhan.

F. REGISTRASI OBAT TRADISIONAL

Dalam rangka melindungi masyarakat dari peredaran obat tradisional yang tidak memenuhi persyaratan keamanan , khasiat/manfaat, dan mutu maka pemerintah mewajibkan setiap produsen untuk melakukan registrasi obat tradisional sebelum diedarkan. Hal tersebut diatur dalam Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 007 tahun 2012 tentang registrasi Obat tradisional.

1. Izin edar

Obat tradisional yang diedarkan diIndonesia diwajibkan memiliki izin edar. Namun ada beberapa obat tradsional yang tidak diperlukan izin edar yaitu

- a. obat tradisional yang dibuat oleh usaha jamu racikan dan usaha jamu gendong;
- b. simplisia dan sediaan galenik untuk keperluan industri dan keperluan layanan pengobatan tradisional;
- c. obat tradisional yang digunakan untuk penelitian, sampel untuk registrasi dan pameran dalam jumlah terbatas dan tidak diperjualbelikan.

kriteria Obat tradisional yang dapat diberikan izin edar adalah sebagai berikut:

- a. menggunakan bahan yang memenuhi persyaratan keamanan dan mutu;
- b. dibuat dengan menerapkan CPOTB;
- c. memenuhi persyaratan Farmakope Herbal Indonesia atau persyaratan lain yang diakui;

- d. berkhasiat yang dibuktikan secara empiris, turun temurun, dan/atau secara ilmiah; dan
- e. penandaan berisi informasi yang objektif, lengkap, dan tidak menyesatkan.

2. Larangan obat tradisional

Dalam Permenkes No 007 tahun 2012 pasal 7 dan 8 juga dijelaskan bahwa Obat tradisional dilarang mengandung:

- a. etil alkohol lebih dari 1%, kecuali dalam bentuk sediaan tingtur yang pemakaiannya dengan pengenceran;
- b. bahan kimia obat yang merupakan hasil isolasi atau sintetis berkhasiat obat;
- c. narkotika atau psikotropika; dan/atau
- d. bahan lain yang berdasarkan pertimbangan kesehatan dan/atau berdasarkan penelitian membahayakan kesehatan.

Obat tradisional dilarang dibuat dan/atau diedarkan dalam bentuk sediaan: intravaginal; tetes mata; parenteral; dan supositoria, kecuali digunakan untuk wasir.

3. Tata cara registrasi obat tradisional

- a. Permohonan registrasi diajukan kepada Kepala Badan
- b. Ketentuan mengenai tata laksana registrasi ditetapkan dengan Peraturan Kepala Badan
- c. Kepala Badan memberikan persetujuan berupa izin edar atau penolakan registrasi berdasarkan rekomendasi yang diberikan oleh Tim Penilai Keamanan, Khasiat/Manfaat, dan Mutu, dan/atau Komite Nasional Penilai Obat Tradisional.
- d. Dalam hal registrasi ditolak, pendaftar dapat mengajukan keberatan melalui tata cara peninjauan kembali.
- e. Pemegang nomor izin edar wajib memproduksi atau mengimpor dan mengedarkan obat tradisional selambat-lambatnya 1 (satu) tahun setelah tanggal persetujuan dikeluarkan dan dilaporkan kepada Kepala Badan.
- f. Pemegang nomor izin edar wajib melakukan pemantauan terhadap keamanan, khasiat/manfaat, dan mutu produk yang beredar.
- g. Dalam hal terjadi ketidaksesuaian terhadap keamanan, khasiat/manfaat, dan mutu produk, pemegang nomor izin edar wajib melakukan penarikan produk dari peredaran dan melaporkan kepada Kepala Badan.

4. Sanksi

Kepala Badan dapat memberikan sanksi administratif berupa pembatalan izin edar apabila:

- a. obat tradisional tidak memenuhi kriteria sebagaimana dimaksud
- b. obat tradisional mengandung bahan yang dilarang
- c. obat tradisional dibuat dan/atau diedarkan dalam bentuk sediaan g yang dilarang
- d. penandaan dan informasi obat tradisional menyimpang dari persetujuan izin edar;
- e. pemegang nomor Izin edar tidak melaksanakan kewajiban yang ditentukan
- f. izin IOT, UKOT, UMOT, dan importir OT yang mendaftarkan, memproduksi atau mengedarkan dicabut;
- g. pemegang nomor izin edar melakukan pelanggaran di bidang produksi dan/atau peredaran obat tradisional;
- h. pemegang nomor izin edar memberikan dokumen registrasi palsu atau yang dipalsukan; atau
- i. terjadi sengketa dan telah mempunyai kekuatan hukum tetap

G. Permasalahan Perkembangan Oht Menjadi Fitofarmaka

Seperti yang telah disebutkan di atas Hingga tahun 2012 Obat Herbal terstandar yang telah berkembang menjadi produk Fitofarmaka hanya mencapai enam produk. Sedangkan OHT mencapai 17 dan golongan jamu mencapai ribuan. Jumlah fitofarmaka yang masih sedikit tersebut sangat tidak seimbang dengan kekayaan hayati Indonesia yang begitu besar. Hal ini disebabkan adanya beberapa kendala yaitu:

1. Permasalahan waktu dan Biaya

Untuk menuju grade Fitofarmaka maka harus melalui uji klinik yang diawali dari uji pre-klinik, uji klinik fase I (20-50 orang), fase II (200-300 orang) *some trials combine Phase I and Phase II, and test both efficacy and toxicity*. Kemudian fase III (300–3.000 orang), fase 4 disebut juga post marketing surveillance. Pada pengujian tersebut diperlukan dana milyaran hingga triliunan rupiah selain itu juga diperlukan waktu yang cukup lama yaitu lima sampai belasan tahun sehingga tidak semua Industri Obat Tradisional mampu untuk menanggung biaya tersebut. Hal inilah yang membuat produsen enggan untuk mendaftarkan produknya menjadi fitofarmaka.

2. Belum populernya fitofarmaka di masyarakat

Sampai saat ini masyarakat belum banyak yang mengenal apa fitofarmaka dan belum paham makna penggolongan *grade-grade* tersebut. Sebagai contoh produk Tolak angin, pada awalnya produk tolak angin adalah jamu namun sekarang sudah OHT. Bagi konsumen jelas dengan kenaikan *grade* ini semakin meningkatkan kepercayaan, obat ini

telah melalui proses standardisasi sehingga lebih terjamin produknya. Masyarakat kita baru sampai tahap ini saja, bisa membedakan Jamu dan OHT, namun belum sampai ke fitofarmaka. Masyarakat juga masih belum tahu apa makna label fitofarmaka disetiap produk. Sebagai contoh Jika kita ke apotek disuguhkan oleh apoteker 2 produk, 1 stimuno dan 1 lagi obat yang mengandung sama-sama meniran dan ada tambahan *Echinacea* dan Zn, Vitamin C, dengan harga lebih murah, juga kemasan yang lebih menarik. Tentu kita sebagai masyarakat awam akan cenderung memilih produk X. Di sini yang menjadi titik kritis, walau bisa dikatakan produk X lebih lengkap tapi ini belum diuji formulasinya ke klinik (manusia/pasien), jadi kita belum tahu bagaimana satu-kesatuan tersebut (formulasi) efeknya pada manusia. Walaupun masing-masing bahan oleh jurnal-jurnal ilmiah telah dibuktikan khasiatnya.

3. Keengganan produsen untuk menaikkan grade produknya menjadi fitofarmaka
Keengganan para produsen menaikkan grade produknya menjadi Fitofarmaka dikarenakan sampai saat ini tingkat pemahaman para konsumen dalam hal ini masyarakat masih sampai OHT (obat herbal terstandart) yang memiliki tingkatan lebih tinggi dari jamu. Peningkatan status menjadi OHT bagi produsen sudah cukup meningkatkan pamor dan *revenue* selain itu untuk menaikkan grade OHT menjadi fitofarmaka diperlukan biaya yang cukup besar dan waktu yang sangat lama namun tidak menambah *revenue* dari modal tersebut.

Bab 3

Skrining Obat Antikanker Dari Bahan Alam

A. Metode Potato Disk (menghambat tumor crown gall)

Crown gall merupakan penyakit tumor pada tumbuhan yang ditimbulkan oleh strain yang spesifik dari bakteri gram negatif, *Agrobacterium tumefaciens* (Lippincott & Lippincott, 1975; Kahl & Shell, 1982). Terdapat kesamaan antara mekanisme terjadinya tumor pada tumbuhan dan pada hewan, senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan tumor pada tumbuhan juga dapat berfungsi sebagai antitumor pada hewan. Uji ini merupakan uji pendahuluan yang sederhana untuk menemukan senyawa antikanker dari bahan alam. Penghambatan pertumbuhan *crown gall* tumor pada potato disk oleh ekstrak alami, menunjukkan bahwa ekstrak bahan alami tersebut aktif (Hostettmann, 1991)

B. Brine Shrimp Lethality Bioassay (BSLT)

Brine Shrimp Lethality test (BST) merupakan salah satu metode untuk menguji bahan-bahan yang bersifat sitotoksik. Metode ini menggunakan larva *Artemia salina* Leach sebagai hewan coba. Uji toksisitas dengan metode BST ini merupakan uji toksisitas akut dimana efek toksik dari suatu senyawa ditentukan dalam waktu singkat setelah pemberian dosis uji. Prosedurnya dengan menentukan nilai LC₅₀ dari aktivitas komponen aktif tanaman terhadap larva *Artemia salina* Leach. Suatu ekstrak dikatakan aktif sebagai antikanker berdasarkan metode BST jika harga LC < 1000 µg/ml. Penelitian Carballo dkk menunjukkan adanya hubungan yang konsisten antara sitotoksitas dan letalitas *Brine shrimp* pada ekstrak tanaman. Metode BST dapat dipercaya untuk menguji aktivitas toksikologi dari bahan-bahan alami.

C. Uji Sitotoksik secara *In vitro*

Sel kultur (*cell line*) adalah sel yang digunakan dalam penelitian yang dikembangkan dan ditumbuhkan/berproliferasi pada media kultur secara *in vitro*. Sel kultur dapat diambil dari jaringan asal ataupun memperbanyak sel yang sudah ada. Dalam kultur sel selalu terkontrol dan terjaga aseptiknya. Dalam penelitian tingkat *in vitro* banyak digunakan sel-

sel kultur, seperti penelitian dalam uji senyawa atau ekstrak obat baru, dilakukan penelitian tingkat kultur.

Sel kultur juga disebut *continous cell line*. *Continous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penangannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (Burdall *et al.*, 2003).

Dalam Penelitian tingkat kultur sel banyak sekali sel sel kultur yang digunakan antara lain: Untuk sel kanker payudara yaitu sel MCF7 dan T47D, Sel kanker leher rahim (serviks) yaitu sel HeLa dan Raji, Sel Kanker kolon yaitu sel WiDr dan HCT-116, Sel Normal yaitu sel Vero (sel normal dari Kera), sel fibroblast NIH-3T3 dan sel-sel kultur lainnya

1. Sel kanker kolon WiDr

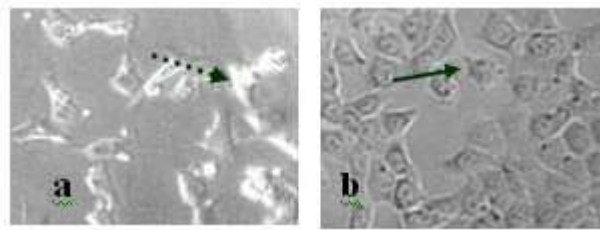
Sel WiDr adalah sel kanker kolon manusia yang diisolasi dari kolon seorang wanita berusia 78 tahun. Sel WiDr merupakan turunan sel kanker kolon yang lain yakni sel HT-29 (Chen *et al.*, 1987). Sel WiDr memproduksi antigen karsinoembrionik dan memerlukan rentang waktu sekitar 15 jam untuk dapat menyelesaikan 1 daur sel. Salah satu karakteristik dari sel WiDr ini adalah ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2) yang tinggi yang memacu proliferasi sel WiDr (Palozza *et al.*, 2005). Pada sel WiDr, terjadi mutasi p53 G pada posisi 273 sehingga terjadi perubahan residu arginin menjadi histidin (Noguchi *et al.*, 1979). Namun, p21 pada sel WiDr yang masih normal memungkinkan untuk terjadinya penghentian daur sel (Liu *et al.*, 2006). Apoptosis pada sel WiDr dapat terjadi melalui jalur independent p53, di antaranya melalui aktivasi p73 (Levrero *et al.*, 2000).

WiDr merupakan salah satu sel yang memiliki sensitivitas yang rendah terhadap perlakuan dengan 5-fluorouracil (5-FU), agen kemoterapi golongan antimetabolit. Transfeksi WiDr dengan p53 normal pun tidak menyebabkan peningkatan sensitivitasnya terhadap 5-FU (Giovannetti *et al.*, 2007). Resistensi sel WiDr terhadap 5-FU salah satunya diperantarai dengan terjadinya peningkatan ekspresi enzim timidilat sintetase yang merupakan target penghambatan utama dari 5-FU (Sigmond *et al.*, 2003). P-glikoprotein (Pgp) pada sel WiDr tidak diekspresikan tinggi sehingga kemungkinan terdapat mekanisme lain yang memperantarai resistensi WiDr terhadap 5-FU (Jansen, 1997). Secara keseluruhan, sel WiDr merupakan sel yang sesuai untuk digunakan sebagai model dalam skrining suatu senyawa baru sebagai agen kokemoterapi dengan 5-FU

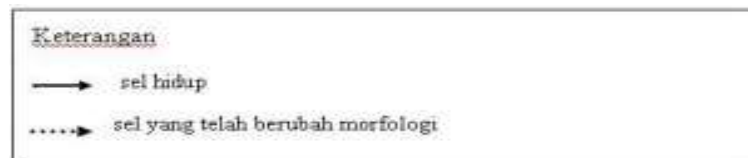
2. Sel kanker payudara

a.sel T47D

Sel T47D merupakan continuous cell line yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. Continuous cell line sering dipakai dalam penelitian kanker secara in vitro karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan frozen stock jika terjadi kontaminasi (Burdall et al., 2003). Sel T47D memiliki morfologi seperti sel epitel. Sel ini dikulturkan dalam media DMEM + 10% FBS + 2 mM L-Glutamin, diinkubasi dalam CO2 inkubator 5% dan suhu 37°C (Abcam, 2007)



Gambar 4. Morfologi sel T47D akibat perlakuan EP 60 µg/mL (a) dibandingkan dengan sel tanpa perlakuan/kontrol sel (b). Dilakukan dengan menginkubasi 3×10^3 sel T47D dengan EP (30-210 µg/mL) selama 48 jam (CCRC UGM, 2013)

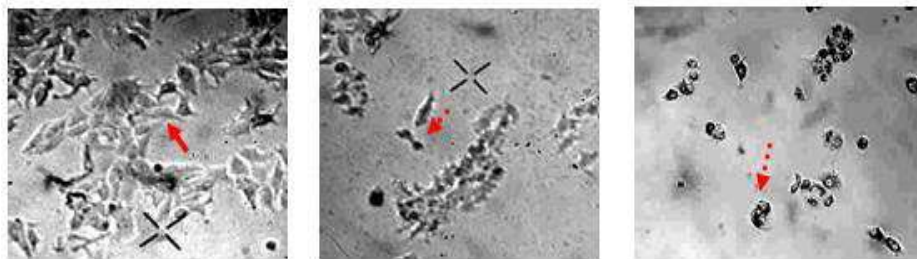


Sel kanker payudara T47D mengekspresikan protein p53 yang termutasi. Missence mutation terjadi pada residu 194 (dalam zinc-binding domain, L2), sehingga p53 tidak dapat berikatan dengan response element pada DNA. Hal ini mengakibatkan berkurang bahkan hilangnya kemampuan p53 untuk regulasi cell cycle. Sel T47D merupakan sel kanker payudara ER/PR-positif (Schafer et al., 2000). Induksi estrogen eksogen mengakibatkan peningkatan proliferasinya (Verma et al., 1998). Sel T47D merupakan sel yang sensitif terhadap doksorubisin (Zampieri et al., 2002).

b. Sel MCF-7

Sel MCF-7 merupakan salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel tersebut diambil dari jaringan payudara seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif, berupa sel adherent (melekat) yang dapat ditumbuhkan dalam media penumbuh DMEM atau RPMI yang mengandung

foetal bovine serum (FBS) 10% dan antibiotik Penicilin-Streptomycin 1% (Anonim, 2007). Sel MCF-7 memiliki karakteristik antara lain resisten agen kemoterapi (Mechetner et al., 1998; Aouali et al., 2003), mengekspresikan reseptor estrogen (ER +), overekspresi Bcl-2 (Butt et al., 2000; Amundson et al., 2000) dan tidak mengekspresikan caspase-3 (Onuki et al., 2003; Prunet et al., 2005). Sel MCF-7 tergolong cell line adherent (ATCC, 2008) yang mengekspresikan reseptor estrogen alfa (ER- α), resisten terhadap doxorubicin (Zampieri dkk., 2002), dan tidak mengekspresikan caspase-3 (Onuki dkk., 2003; Prunet dkk., 2005).



Gambar 5. Morfologi sel MCF-7 pada perlakuan EP dan FKP. Uji dilakukan dengan menginkubasi 5×10^3 sel MCF-7 dengan EP (25-100 $\mu\text{g/mL}$) dan FKP (10-500 $\mu\text{g/mL}$) selama 48 jam. A adalah kontrol sel, B adalah sel dengan perlakuan EP 75 $\mu\text{g/mL}$, C adalah sel dengan perlakuan FKP 70 $\mu\text{g/mL}$ (CCRC UGM, 2013)

3. Sel kanker leher rahim (sel HeLa)

Kultur sel HeLa atau HeLa cell line merupakan *continuous cell line* yang diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (cervix) seorang wanita penderita kanker leher rahim bernama Henrietta Lacks yang meninggal akibat kanker pada tahun 1951 (Anonim, 2006a). Kultur sel ini memiliki sifat semi melekat (Anonim, 2000) dan digunakan sebagai model sel kanker dan untuk mempelajari sinyal transduksi seluler (Anonim, 2006b). Sel HeLa ini cukup aman dan merupakan sel manusia yang umum digunakan untuk kepentingan kultur sel (LabWork, 2000). Sel ini oleh George Gey. Sel ini diperlakukan sebagai sel kanker yang dipercaya berasal dari sel kanker leher rahim Ms.Lacks, namun klasifikasi dari sel ini masih diperdebatkan. HeLa bersifat imortal yang tidak dapat mati karena tua dan dapat membelah secara tidak terbatas selama memenuhi kondisi dasar bagi sel untuk tetap hidup masih ada. Strain-strain baru dari sel HeLa telah dikembangkan dalam berbagai macam kultur sel, tapi semua sel HeLa berasal dari keturunan yang sama. Sel HeLa telah mengalami transformasi akibat

infeksi human papillomavirus 18 (HPV 18) dan berbeda dengan sel leher rahim yang normal (Anonim, 2006c).

Sel HeLa dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan adalah media RPMI 1640-serum. Di dalamnya terkandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan, yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon-hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel. Albumin berfungsi sebagai protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral berfungsi sebagai kofaktor enzim (Freshney, 1986). Sel HeLa adalah sel kanker leher rahim akibat infeksi Human Papillomavirus (HPV 18) sehingga mempunyai sifat yang berbeda dengan sel leher rahim normal. Sel kanker leher rahim yang diinfeksi HPV diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Protein E6 dan E7 terbukti dapat menyebabkan sifat imortal pada kultur primer keratinosit manusia, namun sel yang imortal ini tidak bersifat tumorigenik hingga suatu proses genetik terjadi. Jadi, viral onkogen tersebut tidak secara langsung menginduksi pembentukan tumor, tetapi menginduksi serangkaian proses yang pada akhirnya dapat menyebabkan sifat kanker (Goodwin dan DiMaio, 2000).



Gambar 6. Morfologi sel 1 diinkubasi pada μ HeLa (a) Sel HeLa dengan kepadatan $2 \times 10^4/100$ suhu 37°C 1 sampel dengan seri konsentrasi selama 24 jam, μC dengan 100 direaksikan dengan MTT selama lebih kurang 6 jam, MTT akan dipecah oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium membentuk formazan (b) Morfologi sel HeLa tanpa perlakuan (CCRC UGM, 2013).

Protein E6 dan E7 dari HPV memodulasi protein seluler yang mengatur daur sel. Protein E6 berikatan dengan tumor suppressor protein p53 dan mempercepat degradasi p53 yang diperantarai ubiquitin. Protein E6 juga menstimulasi aktivitas enzim telomerase. Sedangkan protein E7 dapat mengikat bentuk aktif terhipofosforilasi dari p105Rb dan

anggota lain dari famili Rb. Ikatan ini menyebabkan destabilisasi Rb dan pecahnya kompleks Rb/E2F yang berperan menekan transkripsi gen yang diperlukan untuk cell cycle progression (DeFilippis,*et,al* 2003). Sebagian besar sel kanker leher rahim, termasuk sel HeLa, mempunyai gen p53 dan p105Rb dalam bentuk wild type. Jadi, gen pengatur pertumbuhan yang aktif dalam sel normal ini juga terdapat dalam sel kanker leher rahim. Namun, aktivitasnya dihambat oleh ekspresi protein E6 dan E7 dari HPV (Goodwin dan DiMaio, 2000)

Bab 4

Teknik-teknik kultur sel

Kultur sel, khususnya kultur sel banyak digunakan sebagai model penelitian *in vitro* guna penulusuran senyawa aktif dari bahan alam untuk mencari obat baru khususnya senyawa kemopreventif. Sel kultur (*cell line*) adalah sel yang digunakan dalam penelitian yang dikembangkan dan ditumbuhkan/berploriferasi pada media kultur secara *in vitro*. Sel kultur dapat diambil dari jaringan asal ataupun memperbanyak sel yang sudah ada. Dalam kultur sel selalu terkontrol dan terjaga aseptiknya. Dalam penelitian tingkat *in vitro* banyak digunakan sel-sel kultur, seperti penelitian dalam uji senyawa atau ekstrak obat baru, dilakukan penelitian tingkat kultur. Adapun teknik-teknik kerja kultur sel di rinci pada prosedur kerja di bawah ini:

A. Persiapan kerja *in vitro*

Persiapan kerja yang baik diperlukan agar diperoleh kultur sel yang bagus yang dapat digunakan dalam penelitian sehingga memberikan ketepatan dalam analisis data.

Percobaan 1. Persiapan kerja *in vitro* di laboratorium (CCRC UGM, 2009)

1. Memasuki laboraatorium
 - a. Siapkan kamera dan log book penelitian
 - b. Letakkan tas dan jaket dalam loker penyimpanannya
 - c. Cucilah tangan sebelum mulai bekerja
 - d. Kenakan jas lab, masker dan sarung tangan
 - e. Bacalah buku komunikasi kerja lab *in vitro* sebelum melakukan kerja lab
 - f. Lepaskan sepatu saat akan memasuki ruangan kerja
2. Pemeriksaan kondisi kultur sel
 - a. Semprotkan alcohol 70% ke tangan anda
 - b. Keluarkan sel dari incubator, lalu amati kondisi sel serta kemungkinan kontaminasi bakteri atau jamur
 - c. Jika kondisi sel sudah 70-80% konfluen, sel siap diperlakukan dengan dengan senyawa uji, segera masukkan kembali sel ke dalam incubator
 - d. Incubator digunakan untuk inkubasi sel (menyimpan sel), suhu 37°C, 5% CO₂
3. Sterilisasi LAF
 - a. Nyalakan UV untuk sterilisasi LAF selama tidak kurang dari 20 menit
 - b. Matikan lampu UV, buka penutup LAF, dan nyalakan lampu biasa
 - c. Tunggu 3 menit setelah lampu UV dimatikan
 - d. Semprot permukaan meja LAF dengan alcohol 70% dan keringkan dengan tisu
 - e. Nyalakan lampu spiritus. Jika isi spiritus habis, isi kembali terlebih dahulu
 - f. Masukkan alat dan bahan yang akan digunakan ke dalam LAF
 - g. LAF maksimal dipakai 2 orang secara bersamaan
4. Persiapan perlengkapan kerja
 - a. Siapkan lampu spiritus, semprokan alcohol 70%, mikropipet, tissue gulung, korek, spidol marker, tempat buangan basah dan tempat buangan kering sebelum memasuki ruangan kerja
 - b. Peralatan steril (botol duran, conical, tip, tabung reaksi kecil, dll yang telah di autoklaf disimpan di dalam oven atau di box di ruangan preparasi
 - c. Beri penandaan pada plate, disck, flask sebelum atau sesudah perlakuan

5. persiapan bahan (media, PBS, tripsin-EDTA, dll)

- a. Bahan-bahan yang disimpan dalam lemari es seperti media dan PBS 1x, dikeluarkan terlebih dahulu agar saat akan dipakai tidak dalam keadaan dingin
- b. Kembalikan bahan ke dalam lemari es setelah selesai digunakan
- c. Jika bahan akan habis lakukan pencatatan pada buku komunikasi lab in vitro dan segera laporkan pada kepala supervisor

6. Sanitasi

Sanitasi dilakukan sesuai kondisi masing-masing alat dan ruangan

- a. Setelah selesai bekerja semprot kembali LAF dengan alcohol, matikan dan tutup kembali LAF
- b. Kembalikan mikropipet, tisu, lampu spiritus, alcohol 70% di tempat semula setelah selesai bekerja
- c. Alat yang selesai dipakai, dicuci dengan air kran biasa, disabun dan dicelupkan pada ember aquadest di bawah bak cuci
- d. Ruangan disanitasi dengan sapu dan dipel setiap hari oleh cleaning service

7. sebelum meninggalkan lab

- a. Pastikan semua peralatan dan bahan sudah dikembalikan ke tempatnya
- b. Pastikan LAF, sentrifugator, mikroskop, sudah dalam keadaan off
- c. Tulislah kegiatan yang sudah dilaksanakan pada hari tersebut serta rencana kegiatan selanjutnya pada buku komunikasi lab

B. Media pertumbuhan kultur sel

Untuk dapat tumbuh dan berkembang, sel memerlukan media yang sesuai. Kebanyakan media yang digunakan merupakan media kimiawi tetapi ditambahkan dengan serum 5-20% yang mengandung factor pertumbuhan (stimulan) yang penting untuk pembelahan sel. Media mengandung larutan garam isotonis, asam amino, vitamin, glukosa, contohnya Eagle's Minimal Essential Medium (MEM), selain mengandung serum, media juga diperkaya dengan antibiotic (biasanya penicillin dan streptomisin) untuk membantu mencegah kontaminasi bakteri. Umumnya pertumbuhan sel yang baik terjadi pada PH 7-7,4. Media juga ditambah fenol red sebagai indikator PH yang akan berwarna merah 7,4 orange PH 7,0 dan kuning pada PH 6,5 kebiru-biruan PH 7,6 dan ungu PH 7,8.

Media tumbuh juga membutuhkan penyangga karena terjadinya dua kondisi yaitu penggunaan flask terbuka menyebabkan masuknya O₂ dan meningkatkan PH dan konsentrasi sel yang tinggi menyebabkan diproduksi CO₂ dan asam laktat, hal ini menyebabkan turunnya PH. Kedua kondisi ini dihadapi dengan memberikan buffer ke dalam media dan kedalam incubator dialirkan CO₂ dari luar. Buffer yang biasanya digunakan adalah system bikarbonat CO₂, sehingga ke dalam media ditambahkan larutan bikarbonat. Reagen yang digunakan di dalam media dan kultur sel harus disterilisasi dengan autoklaf (uap panas), hot-air oven (panas kering), membrane filtration, atau di iradiasi untuk peralatan plastik

Media kultur lengkap merupakan media yang mengandung factor pertumbuhan seperti Fetal Bovine Serum (FBS) dan juga penisilin-streptomisin sebagai antibiotic. Pembuatan media kultur lengkap dilakukan di LAF pada kondisi aseptis, sehingga sesudah dan sebelum mengambil bahan yang sudah steril, harus selalu dilakukan pemanasan peralatan di dekat nyala api spiritus.

Percobaan 2. Pembuatan media cair (CCRC UGM, 2009)

1. Alat

Beker glass volume 1000 ml
Magnetic stirer
pH-meter
filter 0,2 mikron
botol duran 1000 ml

2. Bahan

Media padat
Aquabidest 1000 ml
NaHCO₃
HCL/NaOH

3. Prosedur kerja

- 1) Siapkan media padat yang akan digunakan
- 2) Siapkan 950 ml aquabidest steril ke dalam gelas beker, aduk hingga rata
- 3) Ilas bagian dalam pembungkus media bubuk dengan aquadest, tuang cairannya ke dalam gelas beker glass
- 4) Tambahkan 2,2 g NaHCO₃ untuk setiap liter media yang dibuat aduk rata
- 5) Tambahkan aquabidest steril hingga volume 1000 ml
- 6) Aduk dengan magnetic stirrer hingga semua media padat dan NaHCO₃ dapat larut
- 7) Lakukan adjust pH (seharga 0,2-0,3 di bawah pH yang diinginkan) dengan menambahkan NaOH 1N atau HCl 1N
- 8) Lakukan filtrasi media dengan filter 0,2 mikron, tamping ke dalam botol duran 1000 ml
- 9) Beri penandaan dan simpan media di kulkas dengan suhu 4°C

Percobaan 3. Pembuatan media kultur lengkap (CCRC UGM, 2009)

1. Alat

Mikropipet 1000 µl
Botol duran 100 ml

2. Bahan

Pinisilin streptomisin 1% (1ml)
FBS (fetal bovine serum) qualified 10% (10 ml)
Media (RPMI/DMEM)

3. Prosedur kerja

- 1) Cairkan FBS dan pinisilin-streptomisin pada suhu kamar terlebih dahulu sebelum digunakan
- 2) Siapkan botol duran 100 ml
- 3) Ambil 10 ml FBS, tuang ke dalam botol duran
- 4) Ambil 1 ml pinisilin-streptomisin, tuang ke dalam botol duran
- 5) Tambahkan media cair sampai 100 ml (sekitar leher botol)
- 6) Beri penandaan pada botol berupa nama media, tanggal pembuatan media kultur lengkap.

C. Menumbuhkan sel dari tangki nitrogen cair

Sel apabila tidak digunakan dalam penelitian dalam jangka waktu lama dapat disimpan dalam tangki nitrogen cair, atau bisa juga disimpan pada suhu -80°C untuk penyimpanan selama 2-3 bulan. Sel ditumbuhkan kembali dalam medium saat akan digunakan dalam uji in vitro. Dalam proses penumbuhan sel perlu diperhatikan beberapa factor agar sel dapat tumbuh dengan baik pada mediumnya, sehingga hasil analisis yang di peroleh menjadi valid.

Percobaan 4. Penumbuhan sel (CCRC UGM, 2009)

1. Prosedur kerja

- 1) Ikuti prosedur kerja persiapan kerja in vitro (percobaan 1)
- 2) Siapkan aliquot MK (media komplit) yang sesuai untuk sel, yaitu 3 ml MK dalam conical tube baru
- 3) Masukkan dish untuk sub kultur dan beri penandaan terlebih dahulu meliputi nama sel dan tanggal
- 4) Ambil ampul (cryo tube) yang berisi sel dari tangki nitrogen cair (atau dari freezer -80°C)
- 5) Cairkan suspensi sel dalam cryo tube pada suhu kamar hingga tepat mencair
- 6) Ambil suspensi sel dengan mikropipet 1000 µl, masukkan tetes demi tetes ke dalam MK yang telah disiapkan (langkah b)
- 7) Tutup conical tube dengan rapat, sentrifugasi dengan sentrifus untuk conical tube pada 600 g selama 5 menit
- 8) Kembali ke dalam LAF, semprot conical tube dan tangan dengan alcohol 70%
- 9) Buka conical tube, tuang supernatant MK ke dalam pembuangan
- 10) Tambahkan 4 ml MK baru, resuspensi sel hingga homogeny
- 11) Transfer masing-masing 2 ml suspensi sel ke dalam 2 dish
- 12) Tambahkan masing-masing 5 ml MK ke dalam dish homogenkan
- 13) Amati kondisi sel dengan mikroskop
- 14) Simpan ke dalam incubator CO₂
- 15) Setiap selesai melakukan pekerjaan lakukan sanitasi.

Dalam pertumbuhan konsentrasi sel yang tinggi menyebabkan produksi asam laktat dan berkurangnya nutrisi untuk pertumbuhan sel. guna mencapai kondisi sel yang pertumbuhannya optimum diperlukan penggantian media pertumbuhan.

Percobaan 5. Penggantian Media (CCRC UGM, 2009)

1. Alat
 - Mikropipet 1000 μ l atau pipet Pasteur
 - Conical steril
2. Bahan
 - MK (DMEM/RPMI)
 - PBS
3. Prosedur kerja
 - a. Ikuti protocol kerja in vitro dilab
 - b. Aliquot PBS dan MK di dalam conical tube
 - c. Hisap dan buang media lama secara perlahan dengan mikropipet atau pipet pasteur
 - d. Uang 5-7 ml MK ke dalam dish yang berisi sel. Homogenkan dan amati kondisi dan jumlah sel secara kualitatatif pada mikroskop inverted
 - e. Inkubasi semalam dang anti MK jika sudah berwarna merah pucat
 - f. Lakukan sanitasi sesuai dengan persiapan kerja in vitro di lab

E. Panen sel

Kultur sel yang telah membentuk monolayer konfluen 80% mulai dapat digunakan untuk pengujian atau disubkultur. Proses pengambilan sel yang telah konfluen disebut panen sel. Poin utama dari panen sel adalah melepaskan ikatan antar sel dan ikatan sel dengan matrik tanpa merusak sel itu sendiri.

Percobaan 6. Panen sel (CCRC UGM, 2009)

1. Alat
Mikropipet 1000 µl atau pipet Pasteur
Conical steril
Stiker label/pulpen marker
2. Bahan
MK (DMEM/RPMI)
PBS
Trypsin-EDTA
3. Prosedur kerja
 - 1) Ikuti protocol kerja in vitro dilab
 - 2) Ambil sel dari incubator CO₂, amati kondisi sel. Panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen.
 - 3) Buang media dengan menggunakan mikropipet atau pipet Pasteur steril
 - 4) Cuci sel diulang 2 kali dengan PBS (volume PBS \pm ½ volume media awal)
 - 5) Tambahkan trypsin-EDTA (trypsin 0,25%) secara merata dan inkubasi di dalam incubator selama 3 menit
 - 6) Tambahkan pada media \pm 5 ml untuk menginaktifkan trypsin
 - 7) Amati keadaan sel di mikroskop. Resuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol
 - 8) Transfer sel sel yang telah lepas ke dalam conical steril baru
 - 9) Setip slesai melakukan pekerjaan lakukan sanitasi seperti pada persiapan kerja in vitro di laboratorium.

F. Penghitungan sel

Sel yang akan digunakan untuk uji dengan output data melibatkan jumlah sel (misalnya uji sitotoksik, flowcytometri dan doubling time) harus memiliki jumlah tertentu dan antar kelompok perlakuan harus homogenya penghitungan sel tersebut dapat dilakukan dengan homositometer di bawah mikroskop. Syarat penghitungan sel dengan metode homositometri adalah selus berdiri sendiri-sendiri/ tidak menggerombol

Percobaan 7. Penghitungan sel (CCRC UGM, 2009)

1. Alat

Mikropipet 20 μ l
Conical tube
Mikroskop inverted/cahaya
Homositometer
counter

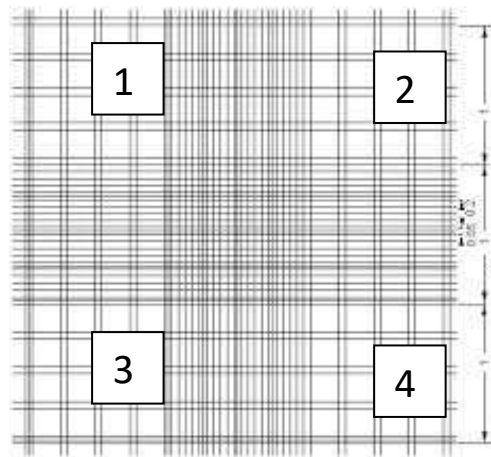
2. Bahan

MK (DMEM/RPMI)

3. Prosedur kerja

- 1) Lakukan panen sel seperti prosedur kerja panen sel
- 2) Resuspensi seldi coical tube
- 3) Ambil 10 μ l panen sel dan pipetkan ke homositometer
- 4) Hitung sel di bawah mikroskop (cara perhitungan disajikan di nomer 4)
- 5) Untuk sel yang akan ditanam , lakukan transfer sejumlah sel yang diperlukan ke dalam conical yang lain dan tambahkan MK sesuai dengan konsentrasi yang dikehendaki
- 6) Sisa suspense sel pada conical tube (a) dilakukan cryopreservation atau subkultur
- 7) Setiap selesai melakukan pekerjaan, lakukan sanitasi seperti pada persiapan kerja in vitro di lab.

Cara perhitungan



Homositometer terdiri dari 4 kamar hitung, setiap kamar hitung terdiri dari 14 kotak.

1. Hitung sel pada 4 kamar homositometer. Sel yang gelap (mati) dan sel yang berada di batas luar di sebelah atas dan disebelah kanan tidak ikut dihitung. Sel di batas kiri dan batas bawah ikut dihitung
2. Hitung jumlah sel per mL dengan rumus

$$\text{Jumlah sel terhitung/mL} : \frac{\sum \text{sel (kamar 1 (K1) +K2 +K3+K4) } \times 10^4}{4}$$

3. Hitung jumlah total sel yang diperlukan.

Missal untuk menanam sel pada tiap sumuran 96 well plate maka jumlah total sel yang diperlukan adalah $5 \times 10^3 / \text{sumuran} \times 100 \text{ sumuran (dibuat lebih)} = 5 \times 10^5$

4. Hitung volume panen sel yang diperlukan (dalam mL) dengan rumus di bawah ini

Volume panen sel yang ditransfer = jumlah total sel yang diperlukan

Jumlah sel terhitung/mL

5. Ambil panen sel , transfer ke *conical tube* baru kemudian tambahkan MK sampai total volume yang diperlukan.

Perhitungan setiap volume yang diperlukan adalah setiap sumuran akan diisi 100µl MK berisi sel, maka total volume yang diperlukan untuk menanam sel= $100 \mu\text{l} \times 100 \text{ sumuran} = 10 \text{ mL}$

G. Sub kultur sel

Sel yang telah konfluen memerlukan tempat kosong untuk dapat tumbuh kembali. Proses pemindahan sel dari kondisi konfluen ke tempat tumbuh yang masih kosong disebut

sebagai subkultur sel. Prosedur sub kultur ini penting agar sel yang akan digunakan untuk pengujian dapat tumbuh dengan maksimal pada medianya.

Percobaan 8. Sub kultur sel (CCRC UGM, 2009)

1. Alat

Mikropipet 1000 µl
Conical tube
Culture dish
Stiker/label/ pulpen marker

2. Bahan

MK (DMEM/RPMI)

3. Prosedur kerja

- 1) Lakukan panen sel seperti prosedur kerja panen sel
- 2) Resuspensi sel di dalam conical tube
- 3) Ambil 300 µl panen sel dan masukkan ke dalam conical yang lain. Tambahkan 5-7 ml MK dan resuspensi kembali.
- 4) Tuang sel ke dalam dish baru yang telah disiapkan. Penanaman secara homogen dan amati kondisi sel
- 5) Inkubasi semalam dan ganti MK jika medium sudah berwarna merah pucat
- 6) Setiap selesai melakukan pekerjaan, lakukan sanitasi seperti pada persiapan kerja in vitro di lab.

H. Menyimpan sel di tangki nitrogen cair (*cryopreservation*)

Sel jika tidak digunakan dalam penelitian dalam jangka waktu yang lama perlu dilakukan penyimpanan. Penyimpanan sel bisa dilakukan dalam tangki nitrogen cair (> 3 bulan) atau pada freezer suhu -80 (2-3 bulan). Dalam penyimpanan sel perlu diperhatikan beberapa faktor agar sel bisa terjaga dalam kondisi baik selama penyimpanannya.

Percobaan 9. Cryopreservation (CCRC UGM, 2009)

1. Alat

Mikropipet 1000 μ l
Conical tube
Cryo tube
pulpen marker

2. Bahan

DMSO
MK (DMEM/RPMI)

3. Prosedur kerja

- 1) Siapkan kultur sel yang 80% konfluen untuk di-cryo. Amati kondisi sel dengan mikroskop
- 2) Siapkan cryo tube. Masukkan 100 μ l + 900 μ l MK ke dalam cryotube
- 3) Lakukan panen selsesuai prosedur kerja panen sel
- 4) Resuspensi sel dalam conical tube
- 5) Tutup conical tube dengan rapat. Sentrifugasi pada 600 rpm selama 5 menit
- 6) Kembali ke LAF, semprot conical tube dan tangan dengan alcohol 70%
- 7) Buka conical tube, buang supernatant (lapisan atas) ke dalam pembuangan
- 8) Tambahkan 1000 μ l campuran MK-DMSO (9:1), resuspensi kembali sehingga homogeny
- 9) Transfer suspense sel dari conical tube ke cryo tube
- 10) Beri labe berupa nama sel dan tanggal penyimpanan
- 11) Simpan dalam freezer -80
- 12) Pindah ke dalam tangki nitrogen cair sebelum 1 minggu
- 13) Setiap selesai melakukan pekerjaan, lakukan sanitasi seperti pada persiapan kerja in vitro di lab.

I. Preparasi sampel

Sampel yang akan diujikan ke dalam kultur sel harus memenuhi persyaratan utama yaitu larut dalam media kultur dan kelarutannya dibantu oleh cosolvent seperti DMSO. Dalam membuat sei konsentrasi sampel untuk pengujian perlu diperhatikan kelipatan konsentrasi agar hasil regresi yang diperoleh baik, sesuai dengan standar.

Percobaan 10. Preparasi sampel (CCRC UGM, 2009)

1. Alat

Mikropipet 20 µl, 200 µl, 1000 µl
Conical tube
Tabung reaksi kecil atau eppendorf
Rak tabung kecil
Vortex
Timbangan analitik
pulpen marker

2. Bahan

DMSO
MK (DMEM/RPMI)

3. Prosedur kerja

- 1) Ikuti prosedur kerja persiapan kerja in vitro di laboratorium
- 2) Timbang sampel kurang lebih 5 mg dengan seksama di dalam eppendorf
- 3) Uji kelarutan sampel dalam DMSO
- 4) Tambahkan 50 µl DMSO dan coba larutkan dengan bantuan vortex
- 5) Jika belum larut, tambahkan 50 µl DMSO dan coba larutan dengan bantuan vortex
- 6) Buat stok baru sampel dalam DMSO setiap kali akan digunakan untuk perlakuan
- 7) Buat seri kadar sampel dengan pengenceran stok dalam DMSO menggunakan MK. Jika terjadi endapan pada pengenceran pertama, jangan dilanjutkan dan pikirkan dahulu solusinya agar sampel dapat larut, kemudian ulangi lagi pemberian seri kadar dari stok DMSO
- 8) Setiap selesai melakukan pekerjaan, lakukan sanitasi seperti pada prosedur kerja persiapan kerja in vitro di lab.

Cara Pembuatan seri konsentrasi

1. Buat 7-8 seri konsentrasi sampel antara 1-1000 µg/ml dengan kelipatan antar konsentrasi.

Contoh salah satu cara membuat konsentrasi larutan dengan menghitung angka kelipatan (f)

$$f: \sqrt[n-1]{D_t/D_r}$$

n: banyaknya dosis

D_t: dosis tertinggi

D_r: Dosis terendah

Misal akan dibuat 6 seri dosis, dengan rentang 1-1024 µg/ml, maka

$$F = \sqrt[6-1]{1024/1} = 4$$

2. Volume akhir tiap seri konsentrasi untuk perlakuan dibuat minimal 400 µl (100 µl/sumuran, triplo)

J. Double Staining (Uji apoptosis sel kanker)

Apoptosis adalah kematian sel yang terprogram. Apoptosis merupakan proses normal yang mempunyai dua fungsi yaitu: perbaikan jaringan dan pelepasan sel yang rusak yang bisa membahayakan tubuh (King, 2000). Apoptosis dipengaruhi oleh proses fisiologis yang berfungsi untuk mengeliminasi sel yang tidak diinginkan atau tidak berguna selama proses pertumbuhan sel dan proses biologis normal lainnya (Wyllie *et al.*, 2000).

Apoptosis dapat diamati pada penampakan fisiologis yaitu berupa pengkerutan sel, kerusakan membran plasma dan kondensasi kromatin. Sel yang mati dengan proses ini tidak kehilangan kandungan internal sel dan tidak menimbulkan respon inflamasi. Jika program apoptosis sudah selesai, sel akan menjadi kepingan-kepingan sel mati yang disebut badan apoptosis (*apoptotic body*). Badan apoptosis ini akan segera dikenali oleh sel makrofag, untuk selanjutnya dimakan (*engulfed*) (Wyllie *et al.*, 2000).

Apoptosis dapat di deteksi dengan pengecatan akridine oranye-etidium bromide. Metode ini berdasarkan perbedaan fluoresensi DNA pada sel yang hidup dan mati karena pengikatan warna akridine-oranye-etidium bromide. Akridine orange akan menembus seluruh bagian sel dan nucleus akan tampak berwarna hijau. Sedangkan etidium bromide hanya dapat berinterkalasi dengan sel yang membrannya sudah rusak dan nucleus akan berwarna merah. Warna yang ditimbulkan oleh etidium bromide pada sel mati lebih

dominan jika dibandingkan dengan akridine orange sehingga nucleus ad sel mati akan berwarna orange. Sel hidup dengan membrane yang masih utuh memiliki nucleus dengan warna hijau yang seragam . selam sel mengalami proses apoptosis dan membrane blebbing mulai terjadi, etidium bromide dapat masuk ke dalam sel dan memberikan warna oranye.

Percobaan 12. Perlakuan Double Staining (CCRC UGM, 2009)

1. Prosedur kerja

- a. Ambil 24 well plate yang telah berisi sel dari incubator
- b. Buang semua MK dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.
- c. Cuci sel dalam sumuran dengan PBS masing-masing 500 μ l
- d. Buang PBS dari sumuran dengan pipet pasteur secara perlahan lahan
- e. Masukkan sampel dengan konsentrasi tertentu sebanyak 1000 μ l ke dalam sumuran
- f. Masukan media ke dalam sumuran untuk control sel dan pelarut DMSO.
- g. Inkubasi plate dalam incubator
- h. Amati kondisi sel setelah inubasi selama 10 jam, dokumentasikan
- i. Setelah inkubasi selesai eluaran sel dari incubator
- j. Buang media sel dari sumuran, pipet pateur secara perlahan
- k. Cuci sel dalam sumuran dengan PBS masing-masing 500 μ l
- l. Buang PBS dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan
- m. Ambil coverslip menggunakan pinset dengan bantuan ujung jarum dengan hati-hati
- n. Letakan coverslip di ats object glass
- o. Tetesan 10 μ l reagen campuran etidium bromide akridine oranye diatas cover slip ratakan dengan cara menggoyang secara perlahan
- p. Amati dibawah mikroskop flouresen
- q. Jika pewarnaan belum optimal, tunggu beberapa menit dan amati kembali
- r. Dokumentasian
- s. Setelah selesai buang coverslip dan cuci kembali object glass

2. Interpretasi data

Sel yang berflouresen hijau menunjukkan sel yang hidup, sedangkan sel yang berflouresen merah menunjukkan sel yang mati. Sel utuh berflouresen merah menunjukkan sel nekrosis sedangkan sel yang terfragmentasi menunjuan sel yang apoptosis

K. Imunositokimia

Imunositokimia merupakan suatu metode yang digunakan untuk mendeteksi adanya ekspresi suatu protein spesifik atau antigen dalam sel dengan menggunakan antibody spesifik yang akan berikatan dengan protein atau antigen.

Ada dua jenis metode imunositokimia, yaitu metode langsung dan metode tidak langsung. Antibody yang mengikat fluoresen atau zat warna langsung berikatan dengan antigen pada sel. Sedangkan pada metode tidak langsung, antigen dikaitkan pada antibody primer secara langsung. Kemudian ditambahkan antibody sekunder yang mengikat enzim seperti peroxidase, alkaline fosfatase, atau glukosa oksidase. Antibody sekunder akan berikatan dengan antibody primer. Selanjutnya ditambahkan substrat kromogen yang akan diubah oleh enzim sehingga terjadi pembentukan warna (pigmen) yang akan mewarnai sel.

Untuk menjamin antibody agar dapat mengikat antigen sel harus difiksasi dengan ditempelkan dengan bahan pendukung padat sehingga antigen akan imobile. Hal ini dapat dilakukan dengan menumbuhkan sel pada slide mikroskop, coverslip, atau bahan pendukung plastik yang sesuai. Ada dua macam metode fiksasi yaitu pelarut organik dan reagen cross linking. Pelarut organik seperti alkohol, aseton, akan memindahkan lipid, mendehidrasi sel dan mengendapkan protein. Reagen cross linking seperti paraformaldehid membentuk jembatan intermolecular melalui gugus amino bebas.

Imunositokimia melibatkan inkubasi sel dengan antibody. Antibody akan berikatan dengan antigen atau protein spesifik di dalam sel. Antibody yang tidak berikatan dipisahkan dengan pencucian, sedangkan antibody yang berikatan dideteksi secara langsung dengan antibody primer berlabel, maupun secara tidak langsung dengan antibody sekunder berlabel enzim atau fluoresen.

Percobaan 13. Imunositoimia (CCRC UGM, 2009)

Prosedur kerja

- 1) ambil sel dari incubator CO₂, amati kondisi sel
- 2) lakukan panen sel sesuai prosedur erja panen sel
- 3) lakuan perhitungan sel sesuai prosedur kerja peritungan sel
- 4) siapan 24 well plate dan coverslip
- 5) masukkan coverslip ke dalam sumuran menggunakan pinset dengan hati-hati
- 6) Transfer 200µl suspense sel tepat di atas coverslip secara merata dan perlahan , kemudian diamkan selama 3-30 menit dalam incubator agar sel menemel pada coverslip
- 7) Tambahan 800µl MK ke dalam sumuran secara perlahan
- 8) Amati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel
- 9) Inubasi sel dalam incubator selama semalam
- 10) Jika dalam waktu semalam kondisi sel belu pulih ganti media sel MK dan inkubasi kembali
- 11) Setelah sel normal kembali, segera buat satu konsentrasi sampel, yaitu IC₅₀ untu perlakuan dan satu control sel, masing-masing sebanyak 1000 µl
- 12) Ambil 24 well plate yang telah berisi sel dari incubator
- 13) Buang semua MK dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.
- 14) Cuci sel dalam sumuran dengan PBS masing-masing 500 µl
- 15) Buang PBS dari sumuran dengan pipet pasteur secara perlahan lahan
- 16) Masukkan sampel dengan konsentrasi tertentu sebanya 1000 µl ke dalam sumuran
- 17) Masukkan MK ke dalam sumuran untuk control sel
- 18) Inkubasi plate dalam incubator CO₂
- 19) Amati kondisi sel sebelum fiksasi
- 20) Siapan methanol dingin dan PBS
- 21) Inkubasi dihentikan
- 22) Buang semua media sel dari sumuran dengan pipet pateur secara perlahan
- 23) Cuci sel dalam sumuran dengan PBS masing-masing 500 µl
- 24) Buang PBS dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan
- 25) Ambil coverslip menggunakan pinset dengan bantuan ujung jarum dengan hati-hati
- 26) Letakan di dalam sumuran 6-well plate bekas atau dish bekas yang bersih
- 27) Beri label pada masing-masing sumuran perlakuan
- 28) Teteskan 300 µl methanol dingin, inkubasi 10 menit di dalam freezer
- 29) Buang methanol secara perlahan, jangan sampai cover slip terbalik
- 30) Tambahkan 500 µl PBS pada cover slip, diamkan selama 5 menit, buang aquadest
- 31) Teteskan larutan hydrogen peroksida (blocking solution). Inkubasi selama 10 menit. Buang larutan dengan mikropipet

Lanjutan Percobaan 13. Imunositoimia (CCRC UGM, 2009)

Prosedur kerja

- 1) Teteskan predeluted blocking serum. Inkubasi selama 10 menit. Buang larutan
- 2) Teteskan antibody monoclonal primer untuk antigen yang ingin diamati
- 3) Tambahkan 500 µl PBS. Inkubasi selama 5 menit, buang PBS
- 4) Tetesan larutan subtract kromogen DAB, inkubasi selama 10 menit
- 5) Tambahkan aquadest 500 µl, kemudian buang kembali
- 6) Teteskan larutan Mayehaematoxilin, inkubasi selama 3 menit
- 7) Tambahkan aquadest 500 µl, kemudian buang kembali
- 8) Angkat coverslip dengan pinset secara hati-hati, kemudian celupkan dalam xylol
- 9) Celupkan coverslip dalam alcohol. Keringkan coverslip
- 10) Letakkan cover slip di atas object glass, tetesi dengan lem (mounting media) tutup cover slip dengan cover slip kotak
- 11) Ambil ekspresi protein dengan mikroskop cahaya
- 12) Setiap selesai melakukan pekerjaan, lakukan sanitasi seperti pada prosedur kerja persiapan kerja in vitro

Interprestasi data

Ekspresi protein tertentu (misal COX-2) akan ditunjukkan dengan warna coklat pada sitoplasma (bukan intisel). Warna biru pada sitoplasma menunjukkan tidak adanya ekspresi pada sel atau level ekspresi yang rendah sehingga tidak terdeteksi.

L. Uji Kombinasi

Saat ini perkembangan terapi kanker modern memberi peluang pemberian kombinasi kemoterapi. Kombinasi kemoterapi (ko-kemoterapi) merupakan strategi terapi dengan mengkombinasikan suatu senyawa dengan agen kemoterapi. Kombinasi agen kemoterapi bertujuan untuk meningkatkan efektifitas pengobatan dan menurunkan efek samping agen kemoterapi. Idealnya obat yang dikombinasikan mempunyai efek sinergis melawan sel kanker namun tosisitasnya dapat ditoleransi sehingga secara klinik akan lebih efisien dibandingkan dengan agen tunggal. Oleh karenanya desain kombinasi yang tepat diperlukan untuk memperoleh manfaat yang lebih optimal.

Metode yang digunakan untuk mengevaluasi kombinasi obat adalah isobologram dan combination index (CI). Analisis CI menghasilkan suatu nilai parameter kuantitatif yang menggambarkan efikasi kombinasi, menggunakan persamaan:

$$CI : (D)_1/(D_x)_1 + (D)_2/(D_x)_2$$

Dengan D_x adalah konsentrasi suatu senyawa tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek sebesar efek kombinasi, yaitu IC_{50} terhadap pertumbuhan sel kanker payudara, dan $(D)_1$, $(D)_2$ adalah besarnya konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama. CI digunakan untuk menentukan efek aditif yang diberikan dua kombinasi senyawa, apakah berupa efek sinergis, aditif atau antagonis (CCRC UGM, 2009)

Percobaan 14. Uji kombinasi (CCRC UGM, 2009)

1. Alat

- a. Mikropipet 20,200,1000 μ l
- b. Tabung reaksi kecil
- c. Rak tabung reaksi kecil
- d. Vortex
- e. Conical tube 15 ml
- f. White tip
- g. Yellow tip
- h. Blue tip
- i. 96 well plate
- j. Tisu makan (kotak)
- k. Tempat buangan untuk media bekas dan PBS

Lanjutan Percobaan 14. Uji kombinasi (CCRC UGM, 2009)

2. Bahan

- a. Stok sampel (10 mg) dalam eppendorf
- b. Pelarut DMSO
- c. Media kultur (MK)
- d. Phosphat buffer saline (PBS)
- e. Reagen MTT 0.5 mg/ml
- f. SDS 10% dalam HCL 0,1 N

3. Prosedur kerja

- 1) Ikuti prosedur kerja persiapan in vitro di lab
- 2) Ambil dish berisi sel dari incubator CO₂, amati kondisi sel di bawah mikroskop
- 3) Jika sel sudah siap dipanen alat dan bahan yang akan digunakan
- 4) Panen sel sesuai dengan prosedur kerja panen sel
- 5) Hitung jumlah sel sesuai dengan prosedur kerja penghitungan sel
- 6) Buat pengenceran suspensi sel sehingga konsentrasi sel akhir 5×10^3 sel/100 μ l MK
- 7) Transfer sel ke dalam sumuran, masing-masing 100 μ l
- 8) Siasakan 3 sumuran kosong (jangan diisi sel) untuk control media
- 9) Amati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel. Dokumentasikan dengan menggunakan kamera
- 10) Inkubasi sel di dalam incubator, setelah 2 jam dokumentasikan dan laporkan ke staff atau pimpinan apakah sel sudah siap untuk ditreatmen
- 11) Setelah sel normal kembali segera buat seri konsentrasi sampel dan agen kemoterapi (misal: doxorubisin) untuk perlakuan
- 12) Ambil plate yang telah berisi sel dari incubator
- 13) Buang media sel dengan cara balikkan plate 180° di atas tempat buangan, kemudian tekan plate secara perlahan di atas tussue makan untuk meniriskan sisa cairan
- 14) Cuci sel dalam sumuran dengan masing-masing 100 μ l PBS
- 15) Buang PBS, tiriskan sisa cairan dengan tisu
- 16) Untuk perlakuan kombinasi:
Masukkan seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran @50 μ l dengan replikasi 3x (triplo) kemudian tambahkan seri konsentrasi doxorubisin untuk kombinasi @50 μ l
- 17) Untuk kelompok perlakuan tunggal:
Masukkan seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran @50 μ l dengan replikasi 3x (triplo) kemudian tambahkan seri konsentrasi MK untuk kombinasi @50 μ l
- 18) Untuk control sel: tambahkan MK ke dalam sumuran yang berisi sel @100 μ l dengan replikasi 3x (triplo)

Lanjutan Percobaan 14. Uji kombinasi (CCRC UGM, 2009)

19) Untuk control media :

Tambahkan MK ke dalam sumuran yang kosong (tanpa sel) @100 μ l dengan replikasi 3 kali (triplo)

20) Inkubasi sel di incubator CO₂

21) Menjelang akhir waktu inkubasi, dokumentasikan dengan kamera untuk melihat kondisi sel pada setiap perlakuan

22) Buat stok MTT 5 mg/ml dengan cara timbang 50 mg serbuk MTT, larutkan dalam 10 ml PBS (dengan bantuan vortex). Buat reagen MTT untuk perlakuan (0,5 mg/ml) dengan cara ambil 1 ml stok MTT 5mg/ml, encerkan dengan MK ad 10 ml

23) Buang media sel cuci masing-masing dengan 100 μ l PBS 1x

24) Tambahkan 100 μ l reagen MTT 0,5 mg/ml 100 μ l ke setiap sumuran, termasuk control media (tanpa sel)

25) Inkubasi sel selama 2-4 jam di dalam incubator sampai terbentuk Kristal formazan yang ungu

26) Setelah 2-4 jam periksa kondisi sel dengan mikroskop inverted. Jika formazan telah jelas terbentuk, tambahkan stopper SDS 10% dalam HCL 0,1N

27) Bungkus plate dengan kertas atau aluminium foil dan inkubasikan di tempat gelap dan suhu kamar selama semalam

28) Keesokan harinya, plate di shaker selama 10 menit untuk melarutkan formazan

29) Hidupkan ellysa reader, tunggu proses progressing hingga selesai

30) Buka pembungkus plate dan tutup plat. Masukkan ke dalam ellysa reader

31) Baca absorbansi masing-masing sumuran dengan ellysa reader dengan 550-600 nm (595 nm) dengan cara tekan tombol start

32) Setelah semua sumuran di baca tekan tombol stop, dan matikan ellysa reader

33) Simpan dan tempel kertas hasil ELISA pada logbook. Segera transfer hasil ellysa ke program excel

34) Hitung prosentase sel hidup akibat perlakuan kombinasi senyawa.

35) Hitung harga CI (combination Index)

36) Setiap selesai melakukan pekerjaan lakukan sanitasi sesuai SOP in vitro di laboratorium.

Analisis dan interpretasi data

a. Perhitungan prosentase sel hidup

$$\text{Prosentase sel hidup} = \frac{(\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi control media}) \times 100\%}{(\text{absorbansi control negative} - \text{absorbansi control media})}$$

b. Perhitungan harga CI (combination Index)

Metode yang umum digunakan untuk mengevaluasi kombinasi obat adalah combination Index (CI) menggunakan persamaan:

$$CI : (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2$$

D_x : konsentrasi suatu senyawa tunggal yang dibutuhkan untuk memberikan efek sebesar efek kombinasi

(D)1, (D)2 adalah besarnya konsentrasi kedua senyawa untuk memberikan efek yang sama

Interpretasi nilai CI

Nilai CI	Interpretasi
<0,1	
0,1-0,3	Efek sinergis sangat kuat
0,3-0,7	Efek sinergis kuat
0,7-0,9	Efek sinergis
0,9-1,1	Efek sinergis ringan-sedang
1,1-1,45	mendekati aditif
1,45-3,3	Efek antagonis ringan –sedang
3,3	Efek antagonis
>3,3	Efek antagonis kuat-sangat kuat

M. *Doubling time* (uji anti proliferasi)

Doubling time merupakan waktu yang dibutuhkan sel kanker untuk tumbuh menjadi dua kali lipatnya. Uji ini dilakukan untuk mengetahui efek suatu senyawa uji terhadap kinetika proliferasi sel secara *in vitro*. Sel yang digunakan untuk uji sebaiknya pada saat sel berada pada kondisi log phase yaitu fase dimana sel sedang aktif membelah. Sel dipanen pada jam ke 0, 24, 48, dan 72 setelah penambahan suatu senyawa uji dan ditentukan jumlah sel hidup. Setelah inkubasi dilakukan penghitungan terhadap jumlah sel yang hidup dengan metode tertentu, misalnya metode MTT, direct counting dengan tripan blue dan sebagainya

Percobaan 15. Uji antiproliferasi (CCRC UGM, 2009)

1. Alat
 - a. Mikropipet 20,200,1000 μ l
 - b. Tabung reaksi kecil
 - c. Rak tabung reaksi kecil
 - d. Vortex
 - e. Conical tube 15 ml
 - f. 96 well plate
 - g. ELISA-reader
 - h. Tempat buangan untuk media bekas dan PBS
 - i. Tissue makan
 - j. Aluminium foil
2. Bahan
 - a. Stok sampel 10 mg dalam eppendorf
 - b. Pelarut DMSO
 - c. Media kultur (MK)
 - d. Phosphat buffer saline (PBS) 1x
 - e. MTT 0,5 mg/ml
 - f. Stopper SDS 10% dalam 0,1 HCL
3. Prosedur kerja
 - 1) Ikuti SOP persiapan kerja *in vitro* di laboratorium
 - 2) Ambil sel dari incubator CO₂, amati kondisi sel
 - 3) Panen sel sesuai dengan SOP panen sel
 - 4) Hitung jumlah sel dan buat pengenceran dengan MK sesuai ebutuhan mengikuti SOP penghitungan sel
 - 5) Transfer sel ke dalam sumuran, masing-masing 100 μ l

Lanjutan Percobaan 15. Uji antiproliferasi (CCRC UGM, 2009)

- 6) Siasakan 3 sumuran kosong (jangan diisi sel) untuk control media
- 7) Amati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel.
Dokumentasikan dengan menggunakan kamera
- 8) Inkubasi sel di dalam incubator selama 24 jam
- 9) Jika dalam 24 jam kondisi sel belum pulih, inkubasikan kembali
- 10) Setelah sel normal kembali, buat seri konsentrasi sampel untuk perlakuan (termasuk ontrol sel dan control DMSO) sesuai dengan protocol preparasi sampel
- 11) Ambil plate yang telah berisi sel dari incubator
- 12) Buang media sel dengan cara balikkan plate 180 ° di atas tempat buangan, kemudian tekan plate secara perlahan di atas tussue makan untuk meniriskan sisa cairan
- 13) Cuci sel dalam sumuran dengan masing-masing 100 µl PBS
- 14) Buang PBS, tiriskan sisa cairan dengan tisu
- 15) Masukkan 100 µl seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran dengan replikasi 3x (triplo)
- 16) Inubasi dalam incubator CO2
- 17) Menjelang akhir inkubasi, dokumentasikan dengan kamera untuk melihat kondisi sel pada setiap perlakuan
- 18) Buat stok MTT 5 mg/ml dengan cara timbang 50 mg serbuk MTT, larutkan dalam 10 ml PBS (dengan bantuan vortex). Buat reagen MTT untuk perlakuan (0,5 mg/ml) dengan cara ambil 1 ml stok MTT 5mg/ml, encerkan dengan MK ad 10 ml
- 19) Buang media sel cuci masing-masing dengan 100 µl PBS 1x
- 20) Tambahan 100 µl reagen MTT 0,5 mg/ml 100 µl ke setiap sumuran, termasuk control media (tanpa sel)
- 21) Inkubasi sel selama 2-4 jam di dalam incubator sampai terbentuk Kristal formazan yang ungu
- 22) Setelah 2-4 jam periksa kondisi sel dengan mikroskop inverted. Jika formazan telah jelas terbentuk, tambahkan stopper SDS 10% dalam HCL 0,1N
- 23) Bungus plate dengan kertas atau aluminium foil dan inkubasikan di tempat gelap dan suhu kamar selama semalam
- 24) Keesokan harinya, plate di shaker selama 10 menit untuk melarutkan formazan
- 25) Hidupkan ellysa reader, tunggu proses progressing hingga selesai
- 26) Buka pembungkus plate dan tutup plat. Masukkan ke dalam ellysa reader
- 27) Baca absorbansi masing-masing sumuran dengan ellysa reader dengan 550-600 nm (595 nm) dengan cara tekan tombol start
- 28) Setelah semua sumuran di baca tekan tombol stop, dan matikan ellysa reader
- 29) Simpan dan temple kertas hasil ELISA pada logbook. Segera transfer

Bab 5

Uji antikanker dari tanaman *Calotropis gigantea* pada sel kanker kolon WiDr

Calotrophis gigantea merupakan tanaman obat tradisional yang tumbuh di Bangladesh, Burma, China, India, Indonesia, Malaysia, Pakistan, Philippina, Thailand dan Srilanka. Di Indonesia secara turun temurun tanaman ini telah dimanfaatkan untuk obat gatal-gatal, kudis, bisul, batuk, trakhoma, konstipasi (daunnya), asma, mual, nyeri lambung (bunganya), rajasinga, digigit ular berbisa (akarnya), sakit gigi, bengkak-bengkak, radang telinga, cacingan dan disentri (Mardisiswojo dan Radjakmanugunsudarso, 1968).

Secara ilmiah tanaman tersebut telah terbukti mempunyai beberapa efek farmakologi. Pada bunga terbukti aktif sebagai analgesik (Pathak & Argal, 2007), antimikroba dan sitotoksik terhadap *Artemia salina* (Habib & Karim, 2009). Daunnya telah terbukti aktif sebagai antidiare (Chitme *et al*, 2004), anti Candida (Kumar *et al*, 2010), antibakteri (Kumar *et al*, 2010),. Pada akar terbukti aktif sebagai antipiretik (Chitme *et al*, 2005), antimikroba (Alam *et al*, 2008), insektisida (Alam *et al*, 2009), berpengaruh pada CNS (Argal & Pathak, 2006), kontrasepsi (Srivastava, 2007). Getah tanaman tersebut terbukti berefek purgatif, prokoagulan (Rajesh *et al*, 2005), *wound healing* (Nalwaya, 2009), antimikroba (Kumar *et al*, 2010). Batang dilaporkan mempunyai efek hepatoprotektor (Lodhi *et al*, 2009). Beberapa penelitian terbaru terkait kemampuan tanaman *Calotropis gigantea* sebagai antikanker yaitu potensi sitotoksik senyawa cardenolid dari daun terhadap sel kanker payudara MCF-7, sel kanker kulit KB, sel kanker paru NCL-H18 (Seeka & Sutthivaiyakit, 2010), potensi sitotoksik ekstrak diklorometan dari daun terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan MDA-MB-231, sel Hela, sel kanker kolon HT-29, sel kanker ovarium SKOV-3, sel kanker hepar Hep-G2 (Wong *et al*, 2011). Senyawa calotropin dari bagian akar mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap Leukemia K562 dan *gastric cancer* 7901 (Wang *et al*, 2008). Ekstrak methanol dan fraksi kloroform dari bagian bunga mempunyai aktivitas antitumor pada mencit *ascites carcinoma* (Habib *et al*, 2010). Selebihnya data mengenai aktivitas antikanker dari bagian daun, bunga, akar dan batang *C.gigantea* terhadap sel kanker kolon WiDr dan selektifitasnya pada sel normal serta senyawa bioaktif apakah yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut masih belum diketahui. sehingga sangat penting untuk dilakukan penelitian lanjutan sebagai

langkah awal uji preklinik dalam mengembangkan obat antikanker baru yang mempunyai efektifitas dan selektifitas tinggi.

A. Tinjauan tentang Tanaman

1. kasifikasi Tanaman

Kerajaan : Plantae
Ordo : Gentianales
Famili : Apocynaceae
Genus : Calotropis
Spesies : *C. gigantea*
Nama binomial : *Calotropis gigantea* (L.) W.T.Aiton



(A)



(B)



(C)

Gambar 7. Gambar tanaman *C.gigantea* ;pohon (A), bunga (B), buah (C)

2. Nama daerah

Biduri atau *Calotropis gigantea* adalah tumbuhan yang umum dijumpai di Indonesia, Malaysia, Philippines, Thailand, Sri Lanka, India dan China. Di Indonesia bunga ini dikenal dengan nama antara lain *babakoan*, *badori*, *biduri*, *widuri*, *saduri*, *sidoguri*, *bidhuri*, *burigha* (Jawa); *rubik*, *biduri*, *lembega*, *rembega*, *rumbigo* (Sumatera); *Manori*,

maduri (Bali); *muduri*, *rembiga*, *kore*, *krokoh*, *kolonsusu*, *modo kapauk*, *modo kampauk* (Nusa Tenggara); *rambega* (Sulawesi). Sementara dalam bahasa Inggris, bunga ini dikenal dengan nama *Crown Flower*, *Giant milk weed*, *mudar plant*; dan dalam bahasa tagalog disebut sebagai *kapal-kapal*.

3. Kandungan senyawa dan bioaktivitas

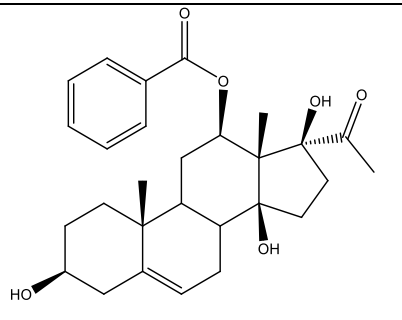
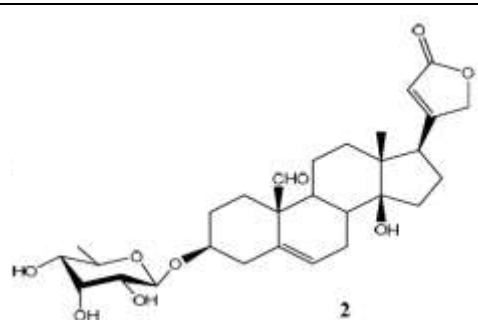
Calotropis gigantea (*C.gigantea*) telah dilaporkan mengandung alkaloid, glikosida sianogenik, senyawa fenolik dan tannin (Mahajan dan Badgujar, 2008), kardenolid (Lhinhatrakool dan Sutthivaiyakit, 2006; Seeka & Sutthivaiyakit, 2010), flavonoid (Sen *et al*, 1992), terpen (Anjaneyulu dan Row, 1968), sterol (Habib *et al*, 2007), proteinase (Abraham dan Joshi, 1979), asam amino nonprotein (Pari *et al*, 1998). Beberapa penelitian kandungan aktif pada tiap bagian tanaman *C. gigantea* disajikan pada tabel di bawah ini:

Tabel 1 Kandungan kimia tanaman *C.gigantea*

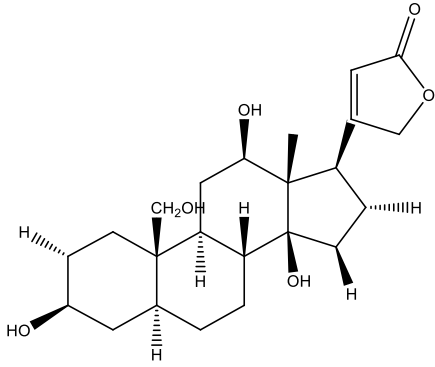
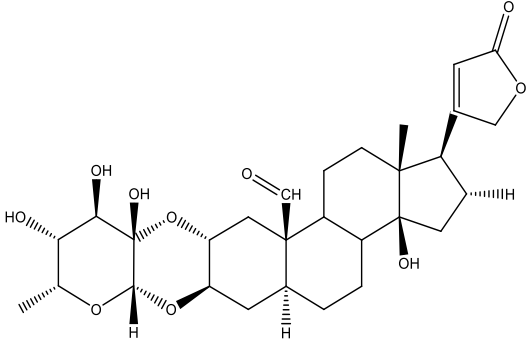
Kandungan Kimia	Bagian	Gol. senyawa	Pustaka
19-Nor- and 18,20-Epoxy-cardenolides	Daun	Cardenolid	Lhinhatrakool dan Sutthivaiyakit, 2006
15beta-hydroxycardenolides	Daun	Cardenolid	Seeka & Sutthivaiyakit, 2010
16alpha-hydroxycalactinic acid methyl ester	Daun	Cardenolid	Seeka & Sutthivaiyakit, 2010
Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside	Daun	Flavonoid	Sen <i>et al</i>
Isorhamnetin-3- <i>O</i> -Glucopyranoside	Daun	Flavonoid	Sen <i>et al</i>
Taraxasteryl acetate	Daun	Flavonoid	Sen <i>et al</i>
Calotropain-F1 dan	Getah	enzim	Abraham dan Joshi, 1976
Calotropain-FII	Getah	enzim	Abraham dan Joshi, 1976
3'-methylbutanoates of α -amyrin	Getah	Triterpen ester	Thakur <i>et al</i> , 1984
ψ -taraxasterol	Getah	Triterpen ester	Thakur <i>et al</i> , 1984
Calotropins DI	Getah	enzim	Pal dan Sinha, 1980

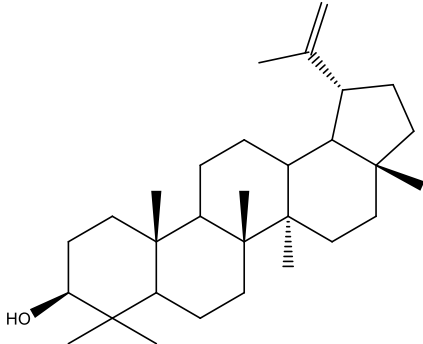
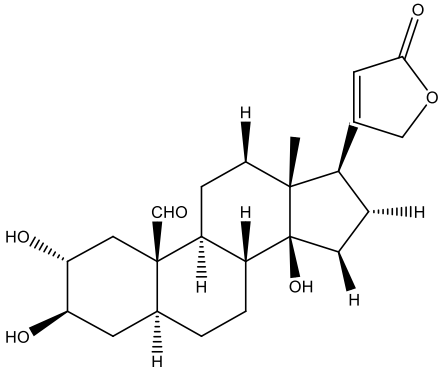
Calotropins DII	Getah	enzim	Pal dan Sinha, 1980
Di-(2-ethylhexyl) Phthalate	Bunga	Triterpenoid	Habib dan Karim, 2009
Anhydrosophoradiol-3-acetate	Bunga	Triterpenoid	Habib dan Karim, 2009
Calotropone	Akar	Glikosida jantung	Wang <i>et al</i> , 2008
Calotropises juiterpenol	Akar	Terpen	Gupta dan Ali, 2000
Calotropisesterterpenol	Akar	Terpen	Gupta dan Ali, 2000
Calotropbenzofuranone	Akar	Aromatik	Gupta dan Ali, 2000
Coroglaucigenin	Akar	Cardenolid	Maoyuan <i>et al</i> , 2008
Gofrusid	Akar	Cardenolid	Maoyuan <i>et al</i> , 2008
Stigmasterol	Akar Batan g	Sterol	Habib <i>et al</i> , 2007
β -sitosterol	Akar Batan g	Sterol	Habib <i>et al</i> , 2007
Giganticine	Akar Batan g	Asam amino nonprotein	Pari <i>et al</i> , 1998

Berikut adalah struktur kimia beberapa kandungan senyawa dari tanaman *C.gigantea* :

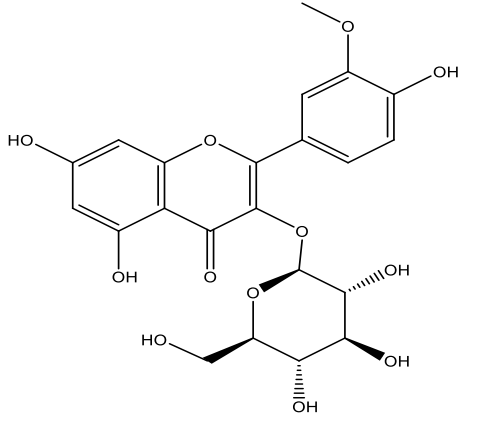
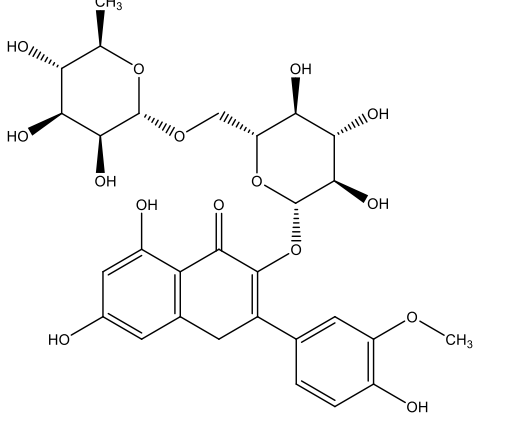
	
<p>Calotropone (Wang <i>et al</i>, 2008)</p> <p>(suatu glikosida jantung yang diisolasi dari ekstrak EtOH kar <i>C.gigantea</i> mempunyai</p>	<p>Gofruside(Wang <i>et al</i>, 2008)</p> <p>(suatu glikosida jantung yang diisolasi dari ekstrak EtOH akar <i>C.gigantea</i></p>

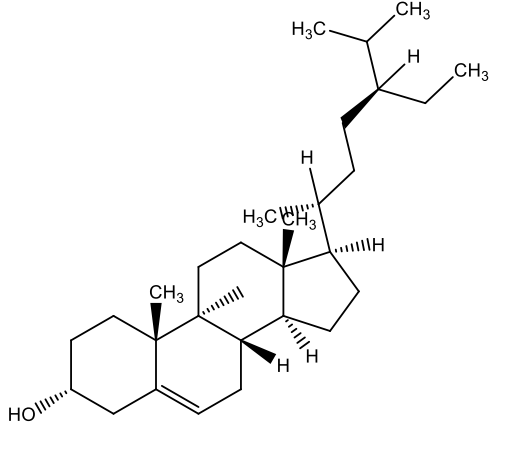
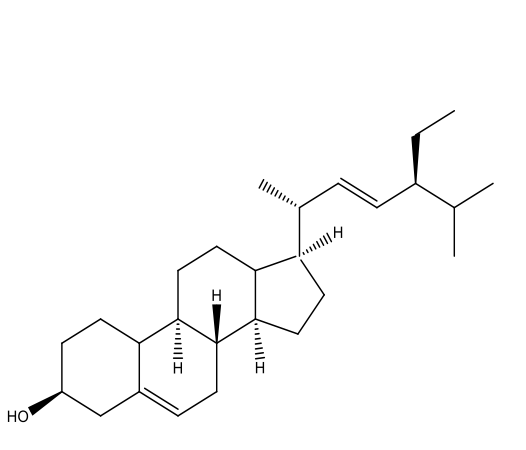
<p>aktivitas sitotoksik pada sel leukemia (K562) IC_{50} 9.2 $\mu\text{g/mL}$ dan sel kanker lambung (SGC-7901); IC_{50} 91.3 $\mu\text{g/mL}$</p>	<p>mempunyai aktivitas sitotoksi pada sel leukemia (K562) IC_{50} 4.7 $\mu\text{g/mL}$ dan sel kanker lambung (SGC-790) IC_{50} 14.3 $\mu\text{g/mL}$</p>
--	---

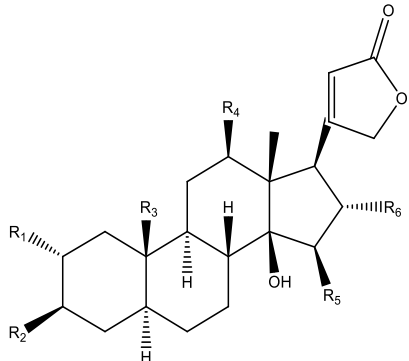
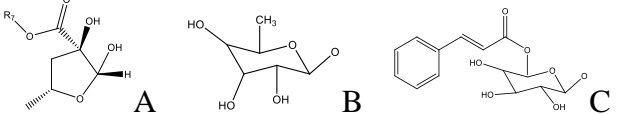
	
<p>12β –hydroxycoroglaucigenin ((Seeka & Sutthivaiyakit, 2010)</p> <p>Diisolasi dari ekstrak daun <i>C.gigantea</i> mempunyai aktivitas sitotoksik pada <i>cell line</i> KB (IC_{50}: 0.68), MCF7 (IC_{50}: 34.35), NCI-H187 (IC_{50}: 6.24)</p>	<p>Calotoxin/calotropin(Seeka & Sutthivaiyakit, 2010)</p> <p>Diisolasi dari ekstrak daun <i>C.gigantea</i> mempunyai aktivitas sitotoksik pada <i>cell line</i> KB (IC_{50}: 0.02), MCF7 (IC_{50}: 1.96), NCI-H187 (IC_{50}: 0.002)</p>

	
<p>Lupeol</p> <p>Diisolasi dari getah <i>C.gigantea</i> Mempunyai efek antiploriferatif pada sel CaP (kanker</p>	<p>Calotropagenin (Cheung and Nelson, 1989 in Seeka & Sutthivaiyakit, 2010)</p> <p>Diisolasi dari ekstrak daun <i>C.gigantea</i></p>

prostat) secara in vivo (Saleem <i>et al</i> , 2009)	mempunyai aktivitas sitotoksik pada <i>cell line</i> KB (IC ₅₀ : 2.56), MCF 7 (IC ₅₀ : 2.56), NCI-H187 (IC ₅₀ : 19.42) (Seeka & Sutthivaiyakit, 2010)
--	--

	
Isorhamnetin-3-o-glukopyranosida (Sen <i>et al</i> , 1992)	Isorhamnetin-3-o-rutinosida (Sen <i>et al</i> , 1992)

	
β-sitosterol	stigmasterol

	No	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
	1	OH	A	CHO	H	H	OH	CH ₃
	2	OH	A	CHO	H	H	H	H
	3	H	B	CH ₂ OH	H	H	H	
	4	H	C	CH ₃	H	H	H	
								
<p>1. 16α –hydroxycalotropagenin. Diisolasi dari ekstrak daun <i>C.gigantea</i> mempunyai aktivitas sitotoksik pada <i>cell line</i> KB (IC₅₀: 0.94), MCF7 (IC₅₀: 46.61), NCI-H187 (IC₅₀: 5.74)</p> <p>2. 12β –hydroxycoroglaucigenin (Abe <i>et al.</i>, 1963 in Seeka & Sutthivaiyakit, 2010)</p> <p>Diisolasi dari ekstrak daun <i>C.gigantea</i> mempunyai aktivitas sitotoksik pada <i>cell line</i> KB (IC₅₀: 17.15) (Seeka & Sutthivaiyakit, 2010) frugoside (Elgamal <i>et al.</i>, 1999; Maoyuan <i>et al.</i>, 2008)</p> <p>3. Diisolasi dari ekstrak daun <i>C.gigantea</i> mempunyai aktivitas sitotoksik pada <i>cell line</i> KB (IC₅₀: 0.02), MCF7 (IC₅₀: 1.96), NCI-H187 (IC₅₀: 0.11)</p> <p>4. 6-<i>O</i>-(<i>E</i>-4-hydroxycinnamoyl) desglucouzarin Diisolasi dari ekstrak daun <i>C.gigantea</i> mempunyai aktivitas sitotoksik pada <i>cell line</i> KB (IC₅₀: 0.02), NCI-H187 (IC₅₀: 39.56)</p>								

Gambar 8. struktur kimia beberapa kandungan senyawa dalam *C.gigantea*

B. Tinjauan tentang penyakit kanker

Kanker pada dasarnya merupakan sel dengan proliferasi yang tidak terkendali akibat kerusakan gen, utamanya pada regulator daur sel, sehingga menyebabkan ketidakseimbangan antara proliferasi sel dan kematian sel (Ruddon, 2007). Perkembangan penyakit kanker merupakan proses mikroevolusioner yang dapat berlangsung dalam

beberapa bulan atau beberapa tahun (Albert *et al*, 1994). Proses pertumbuhan ini dinamakan karsinogenesis, dimulai dari satu sel yang memperbanyak diri dan membentuk koloni kecil dalam jaringan yang sama.

Kanker terjadi karena adanya perubahan mendasar dalam fisiologis sel yang akhirnya tumbuh menjadi malignan. Perubahan tersebut disebabkan adanya perubahan ekspresi gen yang menyebabkan disregulasi terutama siklus sel dan apoptosis (Ruddon, 2007). Secara umum ciri-ciri sel kanker adalah (Hanahan dan Winberg, 2000):

- Memiliki kemampuan mencukupi sinyal pertumbuhan sendiri yang dapat memacu daur sel.
- Insentifitas terhadap antifaktor pertumbuhan yang menyebabkan daur sel tidak terhenti.
- Kehilangan kemampuan apoptosis (kemampuan melakukan program bunuh diri), sehingga sel tersebut terus bertambah.
- Invasi ke jaringan lain dan masuk ke peredaran pembuluh darah, sehingga dapat mengalami metastasis
- Potensi replikasi yang tidak terbatas (immortal)
- Kemampuan membentuk saluran darah ke sel kanker (angiogenesis)

Terdapat empat tahapan karsinogenesis yaitu tahap inisiasi, promosi, progresi, dan metastasis (Pusztai *et al.*, 1996). Pada tahap inisiasi, zat-zat kimia karsinogen dan zat inisiator diaktivasi oleh enzim tertentu sehingga menghasilkan metabolit elektrofil dan reaktif. Metabolit yang pada dasarnya bersifat mutagen ini akan memasuki sel sehat berikatan dengan DNA secara irreversible. Ikatan tersebut menyebabkan terjadinya mutasi dan kelainan kromosomal berupa gen *rearrangement*, atau amplifikasi gen, sehingga DNA berubah dan sel akan mulai memperbanyak diri secara tidak terkontrol (Ruddon, 2007).

Tahap promosi terjadi karena kesalahan acak selama proses pembelahan sel atau terpapar oleh karsinogen spesifik, misalnya hormon (Scheneider, 1997). Oleh sistem kekebalan tubuh, senyawa ini akan mendapat respon penolakan dan akibat lebih lanjut dapat terjadi perubahan fungsi sel serta pertumbuhan neoplasma. Fase promosi tersebut sebagai tahap proliferasi sel dan ekspansi klonal yang dipicu oleh mitogen (Ruddon, 2007). Tahap ketiga merupakan tahap progresif yang meliputi manifestasi pertumbuhan dan perkembangan kanker menjadi ganas. Perubahan genetik terjadi sebagai akibat pembelahan sel yang berlangsung secara cepat, hal ini merupakan tanda tahap progresif. Pada tahap ini, jumlah sel kanker bertambah banyak. Fase metastase meliputi beberapa tahap pemisahan,

termasuk pemisahan sel kanker dari tumor induk, masuk dalam sirkulasi sistemik atau kelenjar limfa, sehingga dapat menginvasi jaringan baru (Schneider, 1997).

Proses karsinogenesis pada prinsipnya sangat terkait dengan perubahan ekspresi dan regulasi gen-gen yang berperan dalam proses daur sel. Pemahaman lebih mendalam mengenai daur sel dan mekanisme molekuler yang memperantarainya dapat digunakan untuk menjelaskan proses karsinogenesis sekaligus pemanfaatannya dalam pengendalian sel tumor.

1. Kanker Kolon

Kanker kolon termasuk dalam kelompok lima kanker penyebab kematian terbanyak di dunia selain kanker payudara, paru-paru, lambung dan hati. Kanker kolon menyebabkan 608.000 kematian per tahun (WHO, 2013). Di Amerika pada tahun 2013, terdapat 102.480 kasus baru untuk kanker kolon dan 40.430 kasus baru untuk kanker rectum dan keduanya menimbulkan kematian sebesar 50.830 (NCI, 2013).

Secara genetika kanker kolorektal dikategorikan menjadi dua kelompok yaitu *familial adenomatous polyposis* yang disebabkan oleh mutasi gen APC (*Adenomatous polyposis coli*) dan *hereditary non-polyposis colon cancer* (HNPCC) yang diketahui berhubungan dengan adanya mutasi DNA repair pada gen *hMSH2* and *hMLH1*. *Gene tersebut menyebabkan sel kanker bertambah ganas.* (Ganong dan Mcphee, 2005).

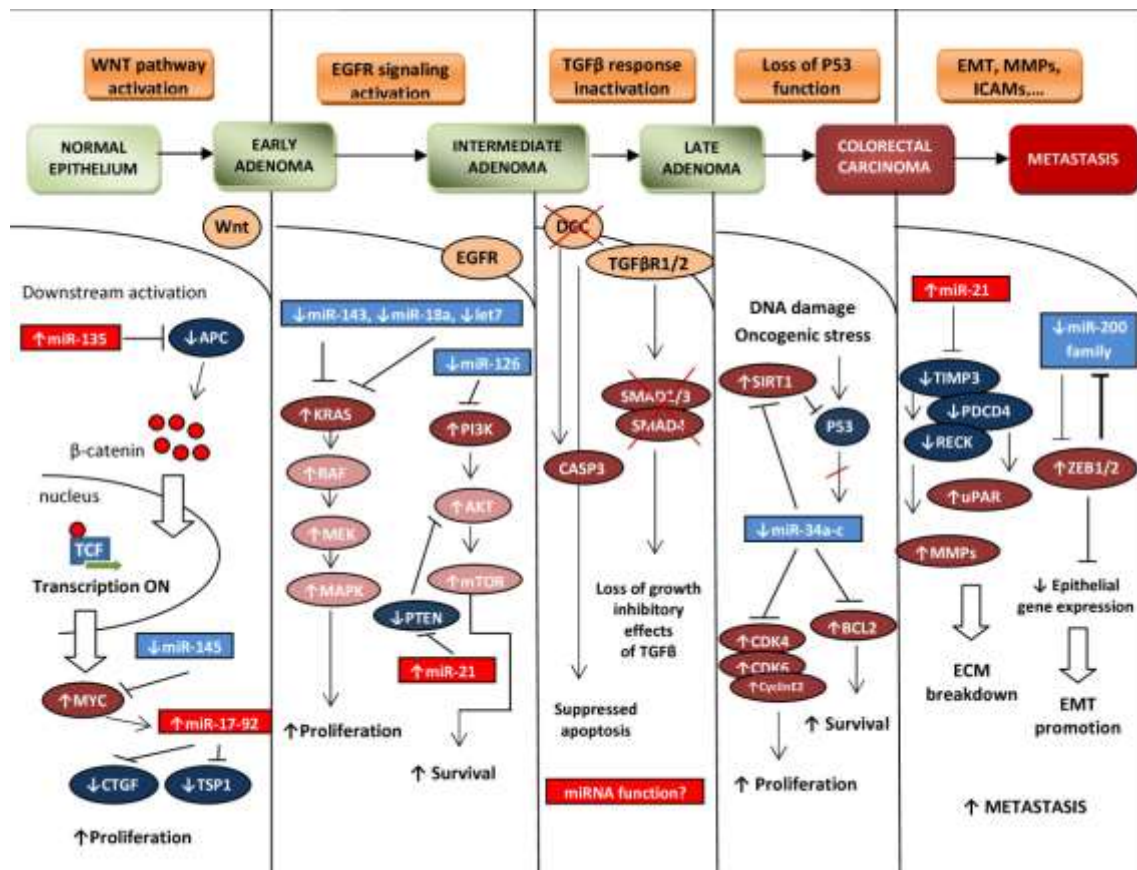
Beberapa protein yang terlibat pada signal pathogenesis *colorectal cancer* (CRC) adalah Wnt/ β -catenin, phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3-K) pathway, KRAS, P53, regulator matrix ekstraseluler, EMT (epithelial mesenchyme transition) regulator, matrix Metalloproteinase (MMPs) (Slaby *et al.*, 2009).

Proses patogenesis kanker kolon diawali dengan adanya mutasi gen APC pada jalur Wnt/ β -catenin di daerah mukosa kolon yang normal sehingga menyebabkan regulasi β -catenin yang tidak normal, hal ini menimbulkan proliferasi sel yang tidak normal dan menginisiasi tumor pada mukosa untuk membentuk adenoma kecil. Lebih dari 60% kejadian kanker kolon disebabkan karena mutasi gen APC ini (Slaby *et al.*, 2009).

Proses patogenesis kanker kolorektal selanjutnya adalah melalui aktivasi signal reseptor EGF. Overekspresi reseptor EGF ini terbukti menyebabkan promosi berbagai tanda-tanda kanker seperti penghambatan apoptosis, migrasi sel metastase dan resistensi terhadap sitostatik standar. Secara eksperimental terbukti bahwa penghambatan reseptor EGF dapat menekan semua tanda ini (Ikawati, 2008). Pada tahap ini adenoma akan berkembang menjadi *intermediate adenoma* sampai *late adenoma*.

Sekitar 50-70% kejadian kanker kolorektal disebabkan karena mutasi gen p53. Gen ini berperan dalam merespon adanya kerusakan DNA, *check point* siklus sel, apoptosis dan *cellular senescence* (Slaby *et al.*, 2009). Kehilangan fungsi dari gen p53 ini menyebabkan proliferasi sel kanker yang tidak terkendali. Pada tahap ini *late adenoma* berkembang menjadi *colorectal carcinoma*.

Tahapan selanjutnya adalah tahapan metastase sel kanker kolon. Tahapan ini ditandai dengan terbentuknya pembuluh darah baru (angiogenesis), meningkatnya potongan-potongan matriks ekstraselular, tingginya enzim MMPs dan penurunan E-caderin, hilangnya adhesi sel dan peningkatan motilitas sel kanker (Slaby *et al.*, 2009). Proses pathogenesis kanker kolon disajikan pada gambar dibawah ini.



Gambar 9. Patogenesis kanker kolorektal :(APC - *adenomatous polyposis coli*, CTGF - *connective tissue growth factor*, TSP1 -*thrombospondin 1*, EGFR - *epidermal growth factor receptor*, mTOR - *mechanistic target of rapamycin*, PTEN - *phosphatase and tensin homolog*, DCC - *deleted in colorectal carcinoma*, TGFβ R1/2 - *transforming growth factor, beta receptor 1/2*, CASP3 - *caspase 3*, SIRT1 - *sirtuin 1*, CDK4,6 - *cyclin-dependent kinase 4,6*, ECM - *extracellular matrix*, EMT - *epithelial--mesenchymal*

transition, ICAMs - *intercellular adhesive molecules*, TIMP3 - *tissue inhibitor of metalloproteinase 3*, PDCD4 - *programmed cell death 4*, RECK - *reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs*, uPAR - *plasminogen activator, urokinase receptor*, MMPs - *matrix metalloproteinases*, ZEB1/2 - *zinc-finger E-box binding homeobox 1*) (Slaby *et al.*, 2009).

C. Tinjauan tentang Daur sel

Daur sel suatu sel kanker pada dasarnya sama dengan sel normal, yaitu terdapat tiga keadaan: sedang membelah (fase proliferasi), dalam keadaan istirahat (tidak membelah, G₀) dan secara permanen tidak membelah. Daurl sel meliputi duplikasi genom pada fase S dan pembagian kromosom pada sel anak secara tepat pada fase M. Di antara kedua fase tersebut terdapat 'gap' yang disebut fase G₁ dan G₂. Fase G₁ menghubungkan akhir dari rangkaian fase M dengan inisiasi fase S, sedangkan fase G₂ memisahkan fase S dengan fase M. Daurl sel normal tergantung pada *signal* pertumbuhan dari lingkungan. Jika *signal* pertumbuhan tidak mencukupi, sel yang berada pada fase G₁ dapat keluar dari sel memasuki fase G₀ (Van dan Heuvel, 2005). Fase G₁ merupakan fase yang paling menentukan terhadap keseluruhan daurl sel, karena merupakan tahap penting dari sistem regulasi *signal* pertumbuhan. Fase ini berfungsi untuk kelangsungan sel dan akurasi transmisi informasi genetik (King, 2000).

Fase S (sintesis DNA) ditandai dengan adanya proses sintesis DNA dan replikasi genomnya (Wyllie *et al.*, 2000). Sel mereplikasi DNA menjadi dua set DNA yang identik, dan dengan demikian sel siap memasuki fase G₂. Fase ini berlangsung secepat mungkin dengan tujuan meminimalkan pengaruh agen luar (King, 2000).

Pada fase G₂, sel melakukan persiapan untuk proses pembagian genom ke sel anak dan juga memastikan ketepatan replikasi DNA dengan enzim preparasi DNA. Selain itu, sel juga melakukan pertumbuhan dan sintesis protein sehingga cukup untuk kelangsungan dua sel yang akan terbentuk (Wyllie *et al.*, 2000).

Pada fase M, sel melakukan pembagian genom kepada sel anak dengan sama (Wyllie *et al.*, 2000) dengan bantuan sistem mikrotubulus yang membawa kromatid ke kutub yang berlawanan dalam sel (King, 2000). Setelah proses ini selesai, sel akan melakukan pembelahan (*cytokinesis*) sehingga menghasilkan dua sel anak yang identik. Kedua sel akan masuk ke fase G₁ atau masuk fase istirahat (G₀) (Wyllie *et al.*, 2000).

Regulasi daur sel biasanya diatur oleh tiga jenis gen, yaitu *oncogen*, *suppressor genes*, dan gen yang mengatur replikasi dan repair DNA (sofyan, 2000). Kedua jenis gen tersebut (*oncogen* dan *suppressor genes*) bekerja secara harmonis untuk mengatur perkembangan sel dalam rangka menjaga integritas tubuh secara keseluruhan. Kerusakan pada gen-gen tersebut berisiko terjadinya kanker atau proliferasi berlebihan.

Setiap tahap dalam siklus sel dikontrol secara ketat oleh regulator siklus sel, yaitu:

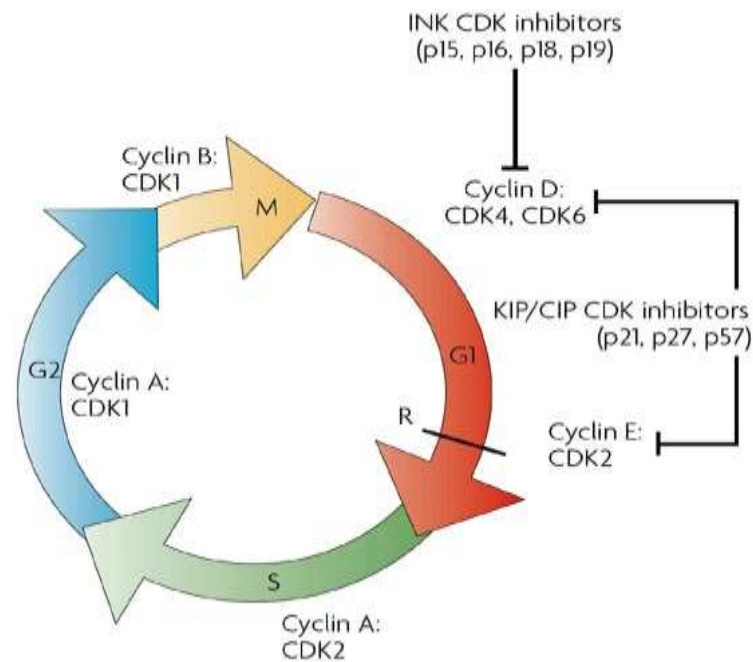
a. *Cyclin*

Jenis *cyclin* utama dalam siklus sel adalah *cyclin* D,E,A dan B. *cyclin* diekspresikan secara periodik sehingga konsentrasi *cyclin* berubah-ubah pada setiap fase siklus sel. Berbeda dengan *cyclin* yang lain, *cyclin* D tidak diekspresikan secara periodik akan tetapi selalu disintesis selama ada stimulasi *growth factor*.

b. *Cyclin-dependent kinase* (Cdk)

Cdk utama dalam siklus sel adalah Cdk 4, 6, 2, dan 1. Cdks merupakan treonin atau serin protein kinase yang harus berikatan dengan *cyclin* untuk aktivitasnya. Konsentrasi Cdks relatif konstan selama siklus sel berlangsung. Cdks dalam keadaan bebas (tidak berikatan) adalah inaktif karena *catalytic site*, tempat ATP dan substrat berikatan diblok oleh ujung C-terminal dari CKIs. *Cyclin* akan menghilangkan pengeblokan tersebut. Ketika diaktifkan, Cdk akan memacu proses *downstream* dengan cara menfosforilasi protein spesifik.

c. *Cyclin dependent kinase inhibitor* (CKI), merupakan protein yang dapat menghambat aktifitas Cdk dengan cara mengikat Cdk atau kompleks *cyclin*-cdk. *Cyclin dependent kinase inhibitor* terdiri dari dua kelompok protein yaitu INK4 (p15, p16, p18, dan p19) dan CIP/KIP (p21, p27, p57). Keluarga INK4 membentuk kompleks yang stabil dengan Cdk sehingga mencegah Cdk mengikat *cyclin* D. INK4 bertugas mencegah progresi fase G1. Keluarga CIP/KIP meregulasi fase G1 dan S dengan menghambat kompleks G1 *cyclin*-Cdk dan *cyclin* B-Cdk1. Protein p21 juga menghambat sintesis DNA dengan menonaktifkan *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA). Ekspresi p21 diregulasi oleh p53 karena p53 merupakan faktor transkripsi untuk p21 (Vermeulen *et al.*, 2003)



Gambar 10. Regulasi Cyclin/CDK dalam setiap fase daur sel. Komplek cyclin D/CDK4/6 berperan dalam awal transisi sampai pertengahan fase G1. Awal fase S ditandai dengan pembentukan komplek cyclin E/CDK2. Kontrol daur sel dilakukan oleh CKI, yang berperan sebagai regulator aktivasi komplek cyclin/CDK selama fase G1 dan S (Dehay and Kennedy, 2007)

Regulasi daur sel melalui *gen suppressor* biasanya melalui *gen Retinoblastoma* (Rb) dan *gen p53*. Protein Rb berperan dalam regulasi daur sel secara umum, sedangkan protein *p53* berperan dalam perbaikan DNA dan pemacuan apoptosis (King, 2000). Protein *p53* mencegah replikasi dari DNA yang rusak pada sel normal dan mendorong program penghancuran sendiri sel yang mengandung DNA yang tidak normal (Sofyan, 2000).

Protein Rb bekerja dengan cara menghambat aktivitas faktor transkripsi dari sel, yakni E2F (King, 2000). E2F merupakan faktor transkripsi penting yang bekerja dengan cara menginduksi gen-gen transkripsi agar mengekspresikan protein-protein yang diperlukan untuk kelangsungan proses transisi sel dari fase G1 ke fase S (Pan *et al.*, 2002).

Protein Rb yang aktif berada dalam bentuk hipofosforilasi, sehingga akan mengikat E2F (King, 2000). Protein Rb sendiri merupakan target utama mekanisme fosforilasi oleh komplek Cdk-Cyc (Weinberg, 1996). Jika Rb berada dalam bentuk hiperfosforilasi maka menjadi tidak aktif, akibatnya E2F akan terlepas (King, 2000). Protein E2F bebas, menjadi aktif dan menginduksi gen-gen transkripsi yang penting untuk kelangsungan daur sel (Pan *et al.*, 2002).

Protein *p53* berhubungan langsung dengan proses induksi CIPI khususnya yang mengekspresikan *p21* (Shapiro and harper, 1999). Inhibitor Cdk ini memegang peran penting dalam memacu *cell cycle arrest* pada fase G1 (Pan *et al.*, 2002). Hal ini menunjukkan bahwa *p53* menyebabkan G1 *arrest* secara tidak langsung.

Ekspresi *p53* akan meningkat jika selama fase S terjadi kerusakan DNA. Protein *p53* ini akan memberikan tiga efek, yaitu perbaikan DNA, penghentian sintesis DNA, dan atau pemacuan apoptosis. Stimulasi apoptosis bisa lewat mekanisme penurunan ekspresi protein Bcl-2 dan peningkatan protein Bax (King, 2000). Mekanisme kerja Bcl-2 menghambat apoptosis dengan aksi berlawanan terhadap faktor induksi apoptosis Fasl yang biasanya diekspresikan jika sel dalam keadaan stress (Kampa *et al.*, 2003). Protein Bax merupakan pemacu terjadinya apoptosis (King, 2000).

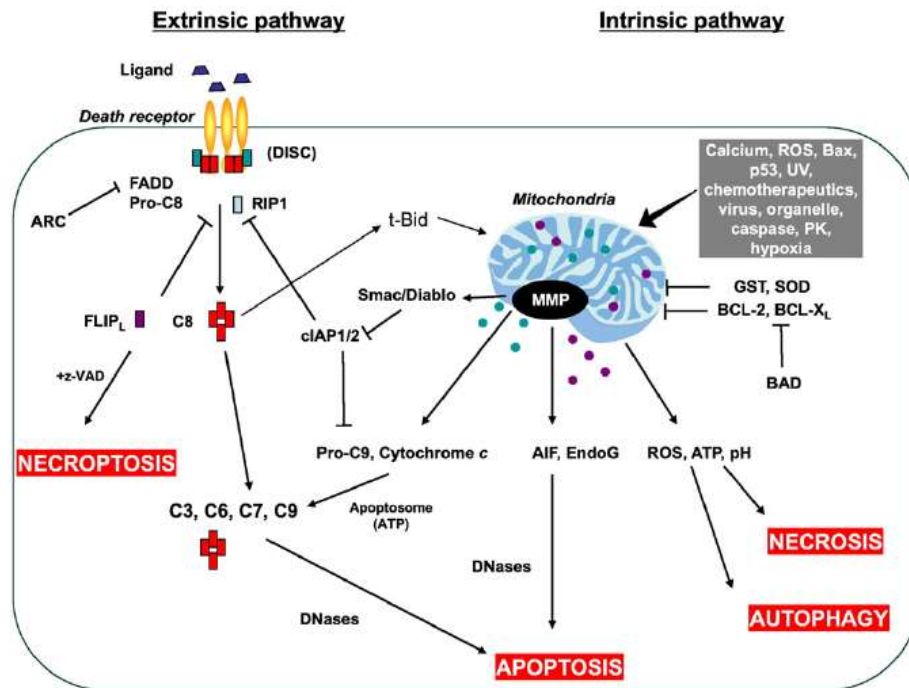
Fase-fase yang terjadi dalam siklus sel dan kemungkinan terjadinya hambatan dalam setiap fase tersebut dapat diamati dengan *flowcytometry*. Analisis dengan metode ini didasarkan pada jumlah set DNA setiap sel dalam populasi yang diamati. Jumlah set DNA tersebut yang menjadi penanda penting setiap fase dalam daur sel.

D. Tinjauan tentang apoptosis sel

Apoptosis adalah kematian sel yang terprogram. Apoptosis merupakan proses normal yang mempunyai dua fungsi yaitu: perbaikan jaringan dan pelepasan sel yang rusak yang bisa membahayakan tubuh (King, 2000). Apoptosis dipengaruhi oleh proses fisiologis yang berfungsi untuk mengeliminasi sel yang tidak diinginkan atau tidak berguna selama proses pertumbuhan sel dan proses biologis normal lainnya (Wyllie *et al.*, 2000).

Apoptosis dapat diamati pada penampakan fisiologis yaitu berupa pengkerutan sel, kerusakan membran plasma dan kondensasi kromatin. Sel yang mati dengan proses ini tidak kehilangan kandungan internal sel dan tidak menimbulkan respon inflamasi. Jika program apoptosis sudah selesai, sel akan menjadi kepingan-kepingan sel mati yang disebut badan apoptosis (*apoptotic body*). Badan apoptosis ini akan segera dikenali oleh sel makrofag, untuk selanjutnya dimakan (*engulfed*) (Wyllie *et al.*, 2000).

Pada prinsipnya ada dua jalur inisiasi apoptosis, yaitu melalui *death receptor* pada permukaan sel (jalur ekstrinsik) dan melalui mitokondria (jalur intrinsik) (gambar 2.5). Pada kedua jalur ini terjadi aktivasi *cystein aspartyl-specific proteases (caspase)*, yang berperan memecah substrat seluler sehingga akan menyebabkan perubahan morfologi dan biokimia sel sebagai karakteristik apoptosis (Igney and Krammer, 2002).



Gambar 11. Jalur regulasi apoptosis. Apoptosis diregulasi melalui dua jalur yaitu jalur ekstrinsik (kiri) dan jalur intrinsik (kanan). Jalur ekstrinsik dimediasi oleh faktor luar melalui Fas, apo2/3, *tumour-necrosis factor* (TNF) dan reseptor faktor pertumbuhan. Jalur intrinsik diaktivasi oleh beberapa stimulus seperti *oncogene*, kerusakan DNA dan penarikan kembali faktor pertumbuhan yang dapat merubah potensial membran mitokondria (MMP) (Indran *et al*, 2011).

Jalur apoptosis yang disebabkan karena faktor ekstrinsik adalah melalui *death receptor* yang terdapat pada permukaan membran sel diantaranya TNF, CD95(Fas), *TNF related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) reseptor. Reseptor ini merupakan suatu protein trans membran yang memiliki tempat ikatan (domain) ligan pada sisi luar membrane plasma. Domain ini bertanggung jawab dalam transmisi *death signal* dari permukaan sel ke dalam sel. Aktivasi CD95 dan TNF reseptor menyebabkan aktivasi *caspase* 8, yang selanjutnya memicu aktivasi *caspase* 3. Aktivasi *caspase* tersebut akan memicu kerusakan mitokondria (Hengartner, 2000)

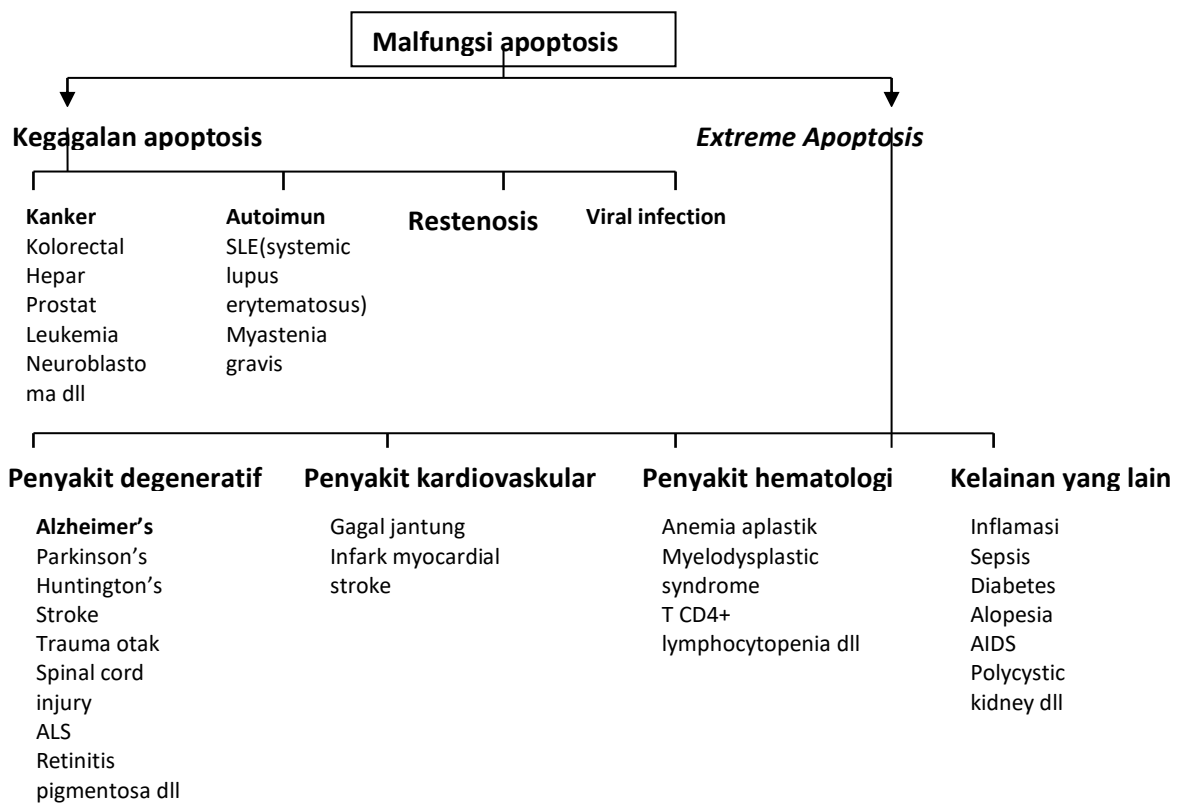
Apoptosis melalui jalur intrinsik (mitokondria) di aktivasi oleh berbagai stimuli diantaranya radiasi, radikal bebas, infeksi virus, kemoterapi dan faktor pertumbuhan. Awalnya stimuli tersebut akan memicu perubahan permeabilitas membran mitokondria yang menyebabkan terbukanya MPT (*mitochondrial permeability transition*). Sebagai

konsekuensi utama dari perubahan tersebut adalah hilangnya potensial mitokondria trans membran, pengeluaran protein proapoptosis dan hilangnya fungsi organel . secara garis besar protein tersebut dibagi menjadi dua kategori . kategori pertama adalah protein yang mengaktifkan jalur caspase. Protein yang termasuk dalam kelompok ini adalah sitokrom (cyt c) dan Smac/DIABLO (*second mitochondria derived of caspase*). Cyt c membentuk kompleks dengan Apaf-1 untuk mengaktifkan caspase-9. Kompleks cyt c, Apaf-1, caspase-9 ini adalah bentuk aktif (apoptosom) yang selanjutnya mengaktifasi caspase 3 dan 7 sehingga menghasilkan pembongkaran sel melalui fragmentasi inti . Smac/DIABLO berikatan dengan IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) untuk deaktivasi dan mencegah IAPs menahan proses apoptosis. Over ekspresi Bcl-2 dan familinya seperti Bcl-Xl mengeblok terjadinya apoptosis pada sel kanker (Indran *et al.*, 2011).

Kelompok protein pro-apoptosis yang kedua adalah protein *Apoptotic Inducing factor* (AIF) dan *endonuclease G* (Endo G). pada beberapa model, pengeluaran protein ini adalah terlambat pada proses apoptosis, dimana protein ini muncul ketika sel akan mati. AIF diekresikan dan masuk ke inti sel untuk selanjutnya memicu fragmentasi DNA. Aktivitas kedua protein ini (AIF dan Endo G) dalam proses *Cell death* tidak tergantung pada *caspase* .

Apoptosis melalui jalur mitokondria yang lain dimediasi Bcl-2 famili. Regulasi apoptosis ini dijalankan oleh protein yang bersifat antiapoptosis (Bcl-1 dan Bcl-xl) dan pro-apoptotic (Bax dan Bak). Protein-protein tersebut berperan dalam regulasi apoptosis melalui pengaturan pelepasan *cyt-c*. Ekspresi Bcl-2 atau Bcl-xl mencegah pelepasan *cyt-c* dari mitokondria. Penambahan langsung Bax pada isolat mitokondria dapat menginduksi pelepasan *Cyt-c* (Igney dan krammer, 2002). Di dalam sitosol *Cyt c* akan membentuk kompleks dengan apaf-1 (*Apoptotic Protease Factor-1*), ATP dan *procaspase-9*. Kompleks ini disebut *apoptosome*.

Rasio antara pro-survival dan pro-apoptosis lebih penting dibanding level masing-masing di dalam sel. Pengaturan kesetimbangannya melibatkan regulasi transkripsional oleh p53. Protein p53 merupakan protein yang mengatur ekspresi gen dalam *cell cycle arrest* dan apoptosis. Ekspresi berlebihan p53 yang dipicu oleh kerusakan DNA, stress dan stimulasi onkogen. Menyebabkan overekspresi Bax yang merupakan pro-apoptosis. Rasio kesetimbangan prosurvival dan pro apoptosis bergeser mengarah pada bentuk homodimer Bax-Bax. Menyebabkan pelepasan sitokrom c dan aktivasi Apaf-1.



Gambar 12. Penyakit yang berhubungan dengan malfungsi apoptosis termasuk kanker kolorektal, dimana salah satu penyebabnya juga karena kegagalan apoptosis sel kanker (diadaptasi dari (Rastogi et al, 2009))

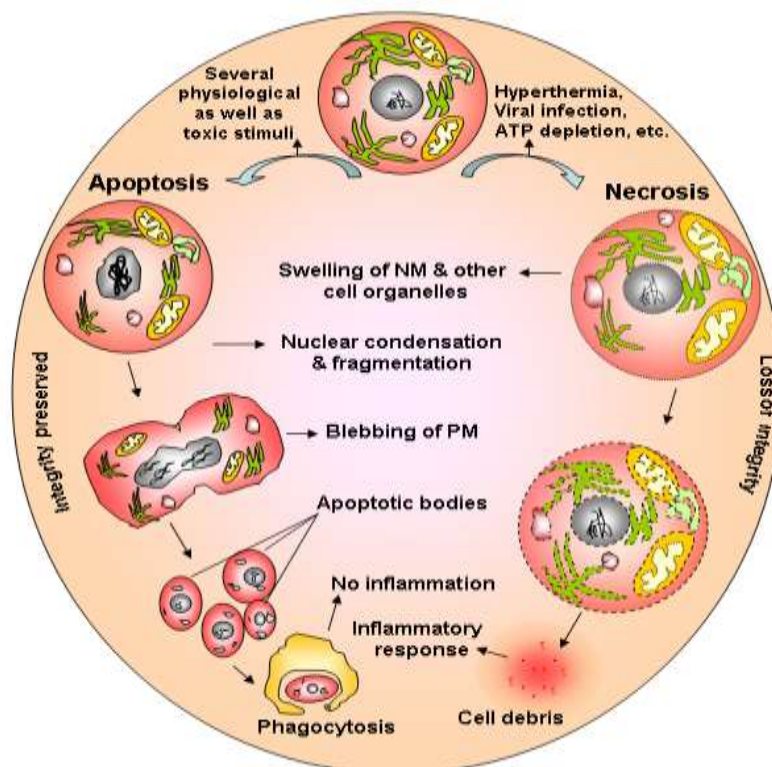
Protein p53 dapat memacu apoptosis melalui jalur ekstrinsik dan intrinsik (Sledge & Miller, 2003). Protein p53 terdiri dari 3 (tiga) domain fungsional, yaitu *transaktivating domain*, *sequens- specific zinc-binding domain*, dan *tetradimerization domain*. Terdapat 2 daerah pada *zinc-binding domain*, yaitu Loop L2 dan L3 (residu 163-195 dan 236-251) yang berperan penting pada pengikatan DNA dan stabilisasi protein (Schafer *et al.*, 2000). Protein p53 merupakan faktor transkripsi banyak gen yang mengatur proses apoptosis, daur sel dan angiogenesis.

Nekrosis merupakan kerusakan sel yang ditandai oleh adanya peningkatan volume sel dan kehilangan tekanan membran. Nekrosis diakibatkan oleh adanya pelepasan enzim lisis lisosomal seperti protease dan nuclease, sehingga sel mengalami lisis yang kemudian diikuti oleh respon inflamasi . necrosis merupakan proses patologis karena adanya paparan tekanan fisik atau kimia yang sangat berpengaruh pada sel (Wyllie *et al.*, 2000). Kematian

sel melalui mekanisme nekrosis menyebabkan gangguan bagi sel-sel disekitarnya, sehingga pada proses terapi kanker kematian sel dengan mekanisme ini sangat merugikan bagi pasien. Respon inflamasi sistemik yang sangat mungkin ditimbulkan akan menyebabkan efek samping yang serius bahkan bisa sampai pada kematian.

Mekanisme kematian sel yang sering dijumpai juga setelah paparan agen kemoterapi kanker adalah *mitotic catastrophe*. Pada awalnya kematian sel ini dikira termasuk kematian sel melalui nekrosis karena memang tanda-tanda awalnya hampir sama. Tetapi ternyata kematian sel dengan jalur ini juga membutuhkan regulasi protein-protein di dalam sel, dan kemudian diikuti dengan proses apoptosis. Sehingga membutuhkan waktu yang lebih lama.

Fenomena *mitotic catastrophe* pertama kali ditemukan pada *Scizosaccharomyces* yang sangat sensitif terhadap peningkatan temperatur. Kematian sel yang terjadi terkait dengan segregasi kromosom yang abnormal (Ayscough *et al.*, 1992). Sel mamalia yang gagal menyelesaikan fase mitosis dengan sempurna setelah paparan dengan genotoksik yang menyebabkan kerusakan DNA, menyebabkan sel menjadi *tetraploidy* setelah satu siklus. Kemudian dijumpai juga sel yang *aneuploidy* setelah siklus berikutnya (Margottin-Goguet *et al.*, 2003).



Gambar 13. Gambar ilustrasi morfologi sel selama proses apoptosis dan necrosis. Kematian sel melalui apoptosis merupakan kematian alami yang disebabkan oleh stimulus

endogen dan exogen. Selama apoptosis, terjadi penurunan volume sel , perubahan inti dengan kondensasi kromatin dan fragmentasi inti yang diikuti dengan blebbing namun integritas membrane masih terjaga. Proses selanjutnya adalah terbentuk fragmen sel (*apoptotic body*) dan dicerna oleh makrofag. Kematian sel melalui jalur nekrosis di tandai dengan peningkatan volume sel yang diikuti dengan pembesaran organel sel termasuk nucleus, kehilangan integritas membran , degradasi DNA acak dan pengeluaran isi sel yang mengandung enzim hydrolase sehingga memicu reaksi inflamasi dalam inisiasi pertumbuhan sel dan perbaikan jaringan (Rastogi et al, 2009).

E. Tinjauan tentang Matrix metalloproteinase (MMPs)

Matrix metalloproteinase (MMPs) adalah keluarga besar dari enzim endopeptidase yang mengandung Zinc tergantung kalsium. MMPs bertanggung jawab terhadap remodeling jaringan, degradasi matrix ekstraseluler termasuk kolagen,elastin, gelatin, matriks glikoprotein dan proteoglikan. MMPs biasanya terekspresi dalam jumlah yang kecil pada kondisi fisiologis normal akan tetapi pada kondisi kelainan patologis MMps terekspresi lebih besar. MMPs dikontrol secara ketat oleh *endogenous MMP inhibitor* (MMPI) dan *Tissue Inhibitor* MMPs (TIMPs). Ketidakseimbangan antara TIMPs dan MMPs menyebabkan overekspresi MMPs yang memicu berbagai kelainan patologi seperti rematoid arthritis, atherosclerosis, pertumbuhan tumor dan kanker (Tochowicz *et al.*, 2007). Di bawah ini (tabel 1) disajikan beberapa kondisi fiologis dan patologis yang menunjukkan overekspresi dari MMPs:

Tabel 2.2 Kondisi fiologis dan patologis yang menunjukkan overekspresi dari MMPs

Proses fisiologi			Proses patologi	
angiogenesis	siklus rambut	folikel	metastase	neurological disease
apoptosis	respon imun		alzeimer's	osteoarthritis (OA)
blastosis	inflamasi		atherosclerosis	periodontal disease
implantasi	pertumbuhan saraf	sel	kerusakan otak	sawar Rheumatik
remodeling tulang	morfogenesis organ		kanker	skin ulceration

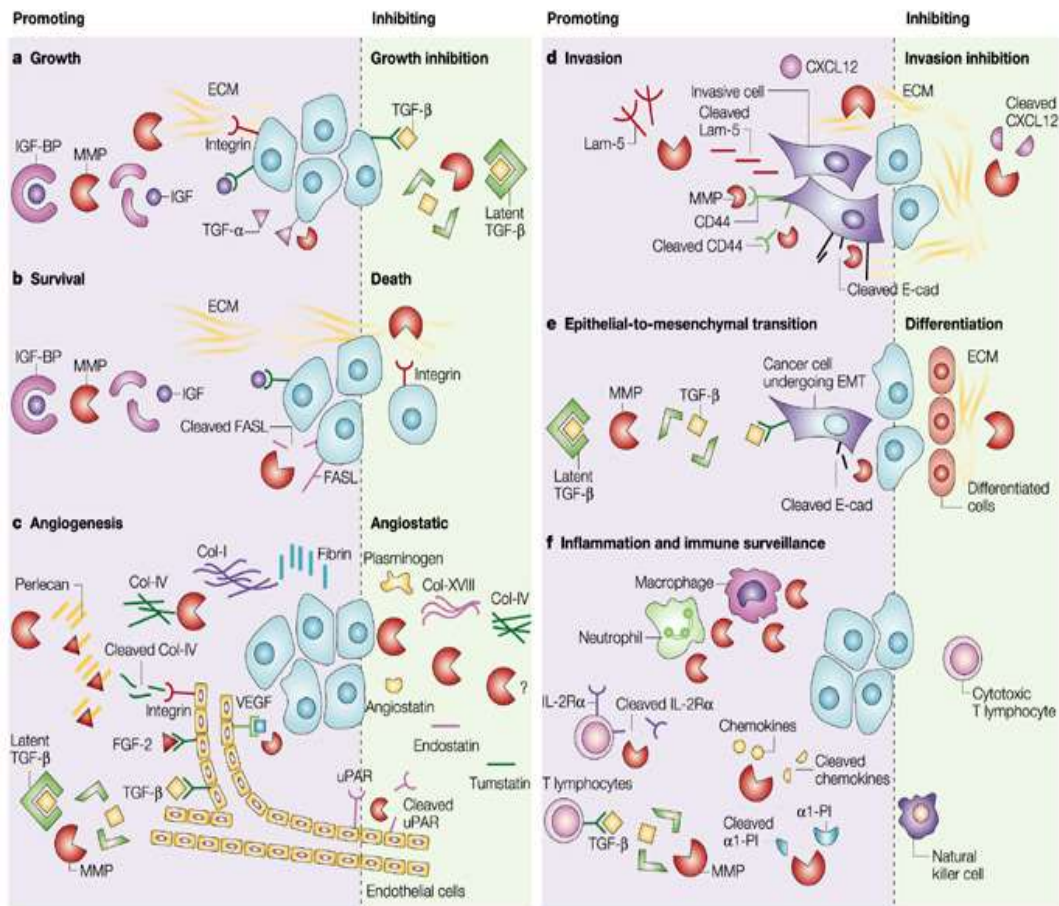
dilatasi cervic	ovulasi	kardiovaskular	sorby's disease	fundus
perkembangan embrio	postpartum uterin	kerusakan CNS	vascular disease	
siklus endometrium	penyembuhan luka	corneal ulceration	sirosis hati	
		emfisema	fibrotic disease	lung
		tukak lambung	nefritis	
		fibrosis hati	arthritis	
		multiple sclerosis		

MMPs di ekresikan oleh berbagai jaringan ikat dan sel proinflamasi seperti , fibroblast, osteoblas, sel endotel, makrofag, neutrofil dan limfosit. Enzim tersebut diekspresikan sebagai zymogen (proMMPs). Dalam bentuk aktif MMPs tersubsequen dengan enzim proteolitik yang lain seperti serinprotease, furin, plasmin. Pada kondisi fisiologis normal aktivitas proteolitik MMPs dikontrol pada tiga tahapan yaitu aktivasi zymogen, transkripsi, dan inhibisi bentuk aktif oleh TIMPs. Pada kondisi patologi keseimbangan tersebut bergeser pada peningkatan aktivitas MMPs pada degradasi jaringan (Verma & Hansch, 2007).

MMP-2 (Matrix Metalloproteinase-2) adalah keluarga MMPs Kolagenase tipe IV, dikenal juga dengan gelatinase A dengan Berat molekul 72 KDa dan dikode oleh gen MMP-2 (Devarajan *et al*, 1992). Enzim MMP-2 memegang peranan penting dalam invasi dan metastases sel kanker. Peningkatan ekspresi MMP-2 berkorelasi dengan memburuknya prognosis pada kanker kolon (Papadopoulou *et al*, 2001; Roomi *et al*, 2009). Inhibisi MMP-2 merupakan kunci penting dalam terapi kanker kolon. Beberapa senyawa bahan alam dari golongan flavonoid seperti myricetin dan quercetin telah diketahui dapat menghambat MMP-2 pada sel kanker kolon COLO 320HSR, COLO320DM, HT29 dan COLO 205-X (Ko *et al*, 2005).

MMP-2 telah diketahui berperan dalam degradasi tenascin-c pada sel kanker paru yang telah bermetastase (Cai *et al.*, 2002). Tenascin C merupakan matrix ekstraselular yang terekpresi selama proses embriogenesis, penyembuhan luka, dan pada penyakit kanker. tingginya ekspresi tenascin-C ini mengindikasikan kondisi patologi yang rendah (Tsunoda *et al*, 2003). Telah diketahui pula bahwa tingginya ekspresi MMPs pada kanker kolon yang

telah bermetastase berkorelasi dengan ekspresi tenascin C pada Berat molekul rendah. Dimana Tenascin C ditemukan pada tumor yang belum bermetastase dengan BM tinggi dengan ekspresi MMPs rendah, sedangkan pada kanker kolon yang progresif dan telah bermetastase ditemukan overekspresi MMPs dan overekspresi tenascin C pada BM rendah (Alembeyi *et al.*, 2003).



Gambar 14 Peran MMPs dalam perkembangan penyakit kanker. MMPs berperan dalam promosi dan inhibisi kanker pada jalur yang berlawanan pada perkembangan kanker.

a) MMPs berperan dalam promosi perkembangan kanker dengan memotong *insulin-growth-factor* (IGF-BP), sehingga IGF dibebaskan selain itu juga dapat berikatan dengan reseptor untuk promosi pertumbuhan sel. Pada tahap ini MMPs berperan dalam promosi secara tidak langsung terhadap interaksi antara extracellular matrix (ECM) dan integrin. Di sisi lain MMPs dapat menghambat pertumbuhan sel kanker melalui pembebasan Transforming growth factor-β (TGF-β). b) pada tahap promosi survival MMPs berperan dalam pembebasan IGF dan pemotongan FAS Ligan (FASL), dimana FAS ligan ini berperan dalam meneruskan signal *cell death*. Disisi lain MMPs berperan dalam promosi

apoptosis melalui pengaturan komposisi ECM yang berpengaruh pada sinyal integrin. c) MMPs mempromosikan angiogenesis melalui peningkatan bioavailabilitas pro-angiogenik faktor pertumbuhan Endotelial Growth Factor (VEGF), fibroblast growth factor 2 (FGF-2) dan TGF- β . Faktor-faktor tersebut berperan dalam stimulasi dan migrasi sel endotel. FGF-2 dibebaskan dengan memotong ECM perlecan, dimana mekanisme yang bertanggung jawab dalam peningkatan bioavailabilitas VEGF masih belum diketahui. Pada tahap ini MMPs juga mempromosikan invasi sel endotel dengan memotong struktur komponen ECM seperti kolagen tipe 1 (Col I), IV (Col-IV) dan fibrin. Potongan Col-IV berperan sebagai pro-angiogenik melalui pembentukan ikatan dengan $\alpha v \beta 3$ integrin. MMPs beraksi sebagai antiangiogenik melalui pemotongan plasminogen dan col-XVIII, sehingga menghasilkan faktor antiangiogenik yaitu angiostatin dan endostatin. Pemotongan reseptor *urokinase-type plasminogen activator* (uPAR) pada permukaan sel endotel kemungkinan menghambat angiogenesis. uPAR telah diketahui berperan dalam invasi sel endotel secara in vitro. d) MMPs berperan penting dalam pengaturan invasi sel kanker melalui degradasi komponen ECM, yang spesifik lagi MMPs mempromosikan invasi dan migrasi sel kanker melalui pemotongan laminin 5 (Lam-5). MMPs juga mempromosikan invasi sel kanker melalui pemotongan molekul adhesi CD44 dan e-caderin. Dimana ikatan antara CD44 dengan MMP9 diperlukan pada invasi sel kanker. MMPs dapat menghambat metastase melalui pemotongan CXCL12, yaitu sebuah chemokine dari family CXC yang berperan dalam promosi metastase kanker payudara. e) MMPs mempromosikan epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) melalui pemotongan E-caderin dan melalui pembebasan TGF- β , yang mana transisi ini (EMT) berhubungan dengan sifat sel ganas (maligna). MMPs juga berperan dalam promosi diferensiasi sel. f) reaksi inflamasi juga juga sebagai kunci peran MMPs dalam perkembangan kanker. MMPs memotong interleukin-2 reseptor- α (IL-2R α) pada sel T, sehingga menghambat proliferasi sel T, MMPs juga membebaskan TGF- β , yang merupakan suppressor sel T dalam melawan sel kanker. pemotongan $\alpha 1$ -proteinase inhibitor ($\alpha 1$ -PI) menyebabkan penurunan sensitivitas sel kanker terhadap sel natural killer. (Egeblad & Werb, 2002).

F. Tinjauan tentang kromatografi

Teknik-teknik yang terkait dengan kromatografi telah digunakan untuk memisahkan bahan-bahan seperti zat warna dari tanaman. Kromatografi pertama kali dikembangkan

oleh Michael Tswett pada tahun 1903 untuk memisahkan pigmen tanaman dengan cara perkolasi ekstrak petroleum eter dalam kolom gas yang berisi CaCO_3 .

Saat ini kromatografi merupakan teknik pemisahan yang paling umum dan paling sering digunakan dalam bidang analisis farmasetik, karena kromatografi dapat menawarkan tiga fungsi sekaligus, yaitu analisis kualitatif, kuantitatif dan preparatif. Kromatografi merupakan suatu proses yang mana komponen-komponen dalam suatu campuran dapat dipisahkan. Kromatografi telah menjadi salah satu metode yang utama untuk identifikasi dan kuantifikasi senyawa obat. Prinsip dasarnya adalah didasarkan pada kesetimbangan konsentrasi komponen-komponen yang dituju, antara dua fase yang tidak saling campur. Yang satunya disebut fase diam karena tidak bergerak di dalam suatu kolom atau diikatkan dalam suatu pendukung, sedangkan yang kedua disebut fase gerak, karena fase gerak didorong oleh fase diam. Fase-fase ini dipilih sedemikian rupa, sehingga komponen-komponen sampel mempunyai afinitas/kelarutan yang berbeda pada tiap fase. Perbedaan migrasi senyawa berperan pada pemisahannya. Diantara analisis instrumental, prosedur kromatografi merupakan salah satu yang penggunaannya paling luas. Kromatografi menempati posisi yang dominan sehingga semua laboratorium yang terlibat dalam analisis sediaan farmasetik dapat melakukannya (Gandjar dan Rohman, 2012)

G. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. KLT merupakan metode pemisahan campuran analit dengan mengelusi analit melalui suatu lempeng kromatografi lalu komponen/analit yang terpisah dapat dilihat dengan penyemprotan atau pengecatan. Dalam bentuknya yang paling sederhana, lempeng-lempeng KLT dapat disiapkan di laboratorium, lalu lempeng diletakkan dalam wadah dengan ukuran yang sesuai, selanjutnya hasil kromatogram dapat discanning secara visual.

Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*). KLT dalam pelaksanaannya lebih mudah dan lebih murah dibanding kromatografi kolom. Demikian juga peralatan yang digunakan. Dalam KLT, peralatan yang digunakan lebih sederhana dan dapat dikatakan bahwa hampir semua laboratorium dapat melaksanakannya setiap saat secara cepat. Beberapa keuntungan KLT adalah; KLT banyak digunakan untuk tujuan analisis; identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna,

fluoresensi, atau dengan radiasi menggunakan sinar ultra violet; dapat dilakukan elusi secara menaik (*ascending*), menurun (*descending*), atau dengan cara elusi dua dimensi; ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang akan ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak.

Gambaran utama yang mengatur kemampuan daya pisah lempeng KLT adalah ukuran bercak (*spot*) dan dimensi fisik lempeng, dengan diameter sebesar 0,5 cm dan panjang lempeng pada umumnya 10 cm. dengan ukuran seperti ini lempeng hanya mampu memisahkan 20 analit secara optimal supaya terpisah secara sempurna (Gandjar dan Rohman, 2012). Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering dengan mencoba-coba karena waktu yang diperlukan hanya sebentar. Berikut adalah beberapa petunjuk dalam memilih dan mengoptimasi fase gerak:

- a. Fase gerak harus memiliki kemurnian yang tinggi karena KLT merupakan teknik yang sensitive.
- b. Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga R_f terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan.
- c. Untuk pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silica gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi solute yang berarti juga menentukan nilai R_f . Penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar seperti dietil eter ke dalam pelarut nonpolar seperti metil benzene akan meningkatkan harga R_f secara signifikan.
- d. Solute-solut ionik dan solute-solut polar lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase geraknya seperti campuran air dan methanol dengan perbandingan tertentu. Penambahan sedikit asam etanoat atau ammonia masing-masing akan meningkatkan solute-solut yang bersifat basa atau asam.

H. Tinjauan tentang Spektroskopi

Teknik spektroskopi adalah salah satu teknik analisis fisiko-kimia yang mengamati tentang interaksi atom atau molekul dengan radiasi elektromagnetik (REM). Pada prinsipnya interaksi REM dengan molekul akan menghasilkan satu atau dua dari tiga kejadian yang mungkin terjadi yaitu hamburan (*scattering*), absorbs (*absorption*) dan emisi (*emission*).

I. Tinjauan tentang Spektroskopi infra merah

Spektrofotometri *Infra Red* atau Infra Merah merupakan suatu metode yang mengamati interaksi molekul dengan radiasi elektromagnetik yang berada pada daerah panjang

gelombang 0,75–1.000 μm atau pada bilangan gelombang 13.000–10 cm^{-1} dengan menggunakan suatu alat yaitu *Spektrofotometer Inframerah*. Metode ini banyak digunakan pada laboratorium analisis industri dan laboratorium riset karena dapat memberikan informasi yang berguna untuk analisis kualitatif dan kuantitatif, serta membantu penerapan rumus bangun suatu senyawa.

Kelebihan spektroskopi *infra red* ini adalah;

1. Spesifik terhadap suatu molekul dan akan memberikan informasi menyatu (*inheren*) tentang gugus-gugus fungsional yang ada dalam suatu molekul, termasuk macamnya, interaksinya, dan orientasi-orientasinya.
2. Selektif terhadap isomer yang disebabkan kisaran daerah sidik jari (*finger print*)
3. Bersifat kuantitatif dan nondestruktif (tidak merusak)
4. Bersifat universal dalam persyaratan pengambilan sampelnya, baik sampel padat, cair, gas, sampel antara padat dan cair atau gas, sampel permukaan maupun sampel ruahan (bulk)

J. spektroskopi resonansi magnetik inti

Spektroskopi resonansi magnet inti (RMI) merupakan salah satu teknik analisis kualitatif yang sangat penting khususnya dalam penentuan struktur molekul zat organik. Spektrum RMI akan mampu menjawab beberapa pertanyaan yang berkaitan dengan inti atom yang spesifik seperti: gugus apa yang dihadapi, dimana lokasi gugus tersebut dalam molekul, berapa jumlah gugus tersebut dalam molekul, siapa dan dimana gugus tetangganya, bagaimana hubungan gugus tersebut dengan tetangganya.

Bab 6

Hasil dan Pembahasan penelitian uji aktifitas antikanker dari ekstrak tanaman *Calotropis gigantea* pada sel kanker kolon serta profil kromatogram kandungan senyawanya

A. Hasil ekstraksi bagian daun dan bunga tanaman *Calotropis gigantea*

Serbuk daun dan bunga tanaman *Calotropis gigantea* masing-masing sebanyak 350 g, diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% v/v. Proses ekstraksi menghasilkan ekstrak kental berwarna coklat kekuningan menghasilkan rendemen berturut-turut 21,4% dan 22,6%.

Tabel 2. hasil ekstraksi metode maserasi tanaman *Calotropis gigantea*

No	Bagian	Berat serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen % b/b
1	Daun	350	43.1	21.4
2	Bunga	350	79.1	22.6

B. Hasil uji sitotoksitas bagian daun dan bunga tanaman *Calotropis gigantea*

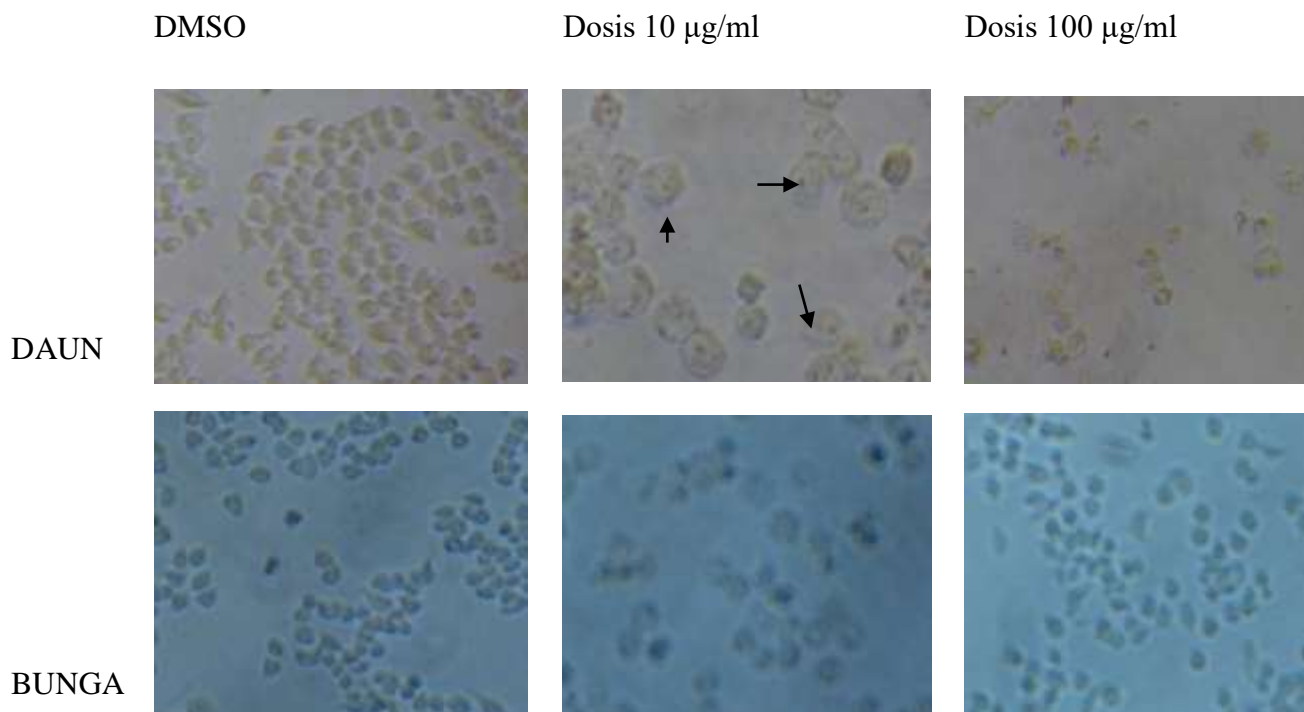
Tujuan uji sitotoksitas pada tahap ini adalah untuk mengetahui perbandingan potensi antikanker dari bagian daun dan bagian bunga tanaman *Calotropis gigantea*. Selanjutnya akan dipilih ekstrak yang mempunyai potensi paling tinggi untuk penelitian lebih lanjut. Sel kanker yang dipakai pada uji ini adalah sel kanker kolon WiDr. Sel WiDr adalah sel kanker kolon manusia yang diisolasi dari kolon seorang wanita berusia 78 tahun. Sel WiDr merupakan turunan sel kanker kolon yang lain yakni sel HT-29 (Chen *et al.*, 1987). Sel WiDr memproduksi antigen karsinoembrionik dan memerlukan rentang waktu sekitar 15 jam untuk dapat menyelesaikan 1 daur sel. Salah satu karakteristik dari sel WiDr ini adalah ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2) yang tinggi yang memacu proliferasi sel WiDr (Palozza *et al.*, 2005). Pada sel WiDr, terjadi mutasi p53 G pada posisi 273 sehingga terjadi perubahan residu arginin menjadi histidin (Noguchi *et al.*, 1979). Namun, p21 pada sel WiDr yang masih normal memungkinkan untuk terjadinya

penghentian daur sel (Liu *et al.*, 2006). Apoptosis pada sel WiDr dapat terjadi melalui jalur independent p53, di antaranya melalui aktivasi p73 (Levrero *et al.*, 2000).

Untuk keperluan uji selanjutnya ekstrak yang diperoleh dilarutkan dalam pelarut Dimetil sulfoksida (DMSO) sebagai stok, untuk selanjutnya diencerkan sesuai dengan konsentrasi yang diperlukan dengan menggunakan pelarut lain yang sesuai. Dimetil sulfoksida merupakan pelarut yang baik untuk ion anorganik maupun senyawa organik (Fessenden dan Fessenden, 1997). Pada kadar rendah DMSO relative tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan sel. tetapi pada kadar tertentu senyawa ini mempunyai sifat sitotoksik yang signifikan. penggunaan DMSO sebagai pelarut sampai 1.25% pada sel HeLa dan sel raji relative tidak berpengaruh terhadap proliferasi sel (Da'I, 2003). Penelitian uji sitotoksitas DMSO sampai konsentrasi 2% pada beberapa sel line tidak memberikan pengaruh pada pertumbuhan sel tersebut (Ishida *et al.*, 2002). Penggunaan DMSO sampai 0.1% v/v dilaporkan tidak berkorelasi terhadap kematian sel T47D (Susanto, 2004), bahkan sampai konsentrasi 4% v/v tidak mengganggu proliferasi sel myeloma (Nurrocmad, 2001). Konsentrasi DMSO akhir tertinggi yang digunakan pada penelitian ini adalah 0.1% v/v.

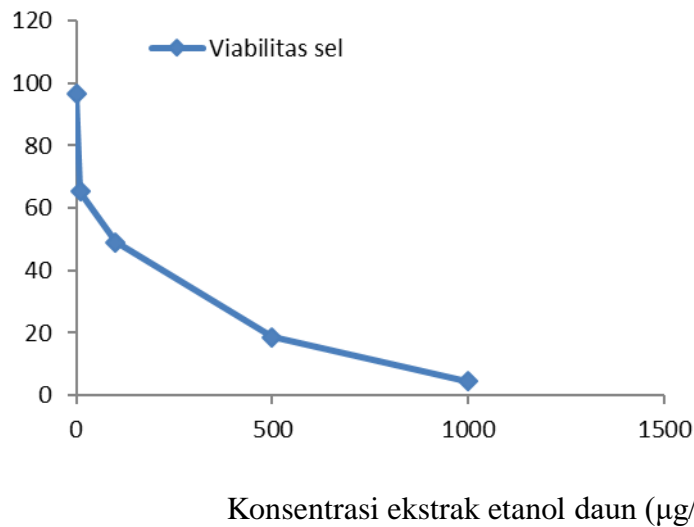
Data hasil uji antikanker pada tahap penelitian ini disajikan pada gambar 15

A

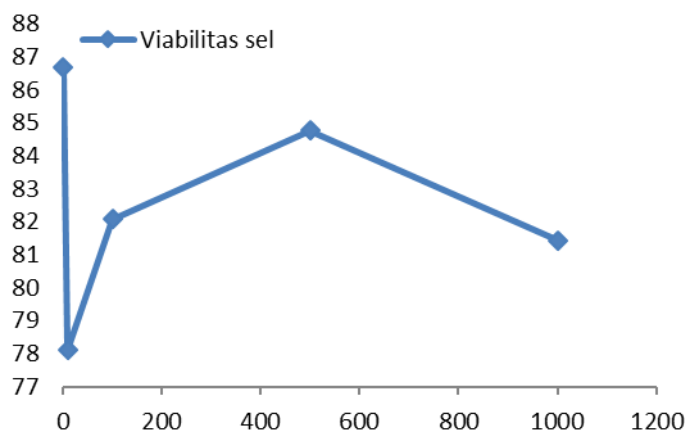


B

DAUN (1)



Bunga (2)



Konsentrasi ekstrak etanol bunga (µg/ml)

Gambar 15. Perbandingan efek penghambatan pertumbuhan sel karena perlakuan ekstrak etanol *Calotropis gigantea* dari bagian daun dan bunga pada sel kanker kolon WiDr dengan metode reduksi MTT. Sel sebanyak 10^4 sel/sumuran ditanam dalam 96 well plate, diinkubasi selama 24 jam dalam media RPMI komplet. A. Morfologi sel diamati di bawah mikroskop fase kontras. Perubahan yang terjadi adalah *blebbing* (→), membesar (→) dan berserabut (→) dengan perbesaran 200x. B. efek perlakuan ekstrak etanol bagian daun dan bunga terhadap viabilitas sel. terlihat pada perlakuan daun (1) viabilitas sel semakin menurun dengan peningkatan dosis sedangkan pada perlakuan bunga (2) peningkatan dosis tidak berpengaruh terhadap viabilitas sel. data merupakan representasi dari 3 (tiga)

eksperimen yang berbeda dengan hasil yang konsisten dan masing-masing eksperimen dilakukan dengan 3(tiga) replikasi.

Pada gambar 15 (A) di atas dapat diketahui bahwa pemberian perlakuan ekstrak daun *Calotropis gigantea* menyebabkan perubahan morfologi sel kanker kolon WiDr. Perubahan morfologi ini sejalan dengan peningkatan konsentrasi uji. Sedangkan pada perlakuan ekstrak bunga perubahan morfologi tampak terlihat pada dosis 10 µg/ml, namun ketika dosis ditingkatkan pertumbuhan sel semakin baik dan tampak tidak ada perubahan pada morfologi sel. hal tersebut juga di dukung oleh data viabilitas sel kanker pada perlakuan ekstrak etanol bagian daun dan bunga (B). Viabilitas sel kanker pada perlakuan ekstrak etanol daun semakin menurun dengan peningkatan dosis sedangkan pada perlakuan ekstrak etanol bunga tidak berpengaruh terhadap penurunan viabilitas sel.

Berdasarkan perhitungan IC₅₀ dapat diketahui bahwa ekstrak etanol bagian daun memiliki IC₅₀ yang jauh lebih rendah 48,5 µg/mL sedangkan ekstrak etanol bunga memiliki IC₅₀ >1000 µg/mL

Berdasarkan data-data tersebut di atas maka ekstrak daun pada penelitian ini akan dilakukan uji lebih lanjut. Perbandingan data IC₅₀ disajikan pada tabel 3

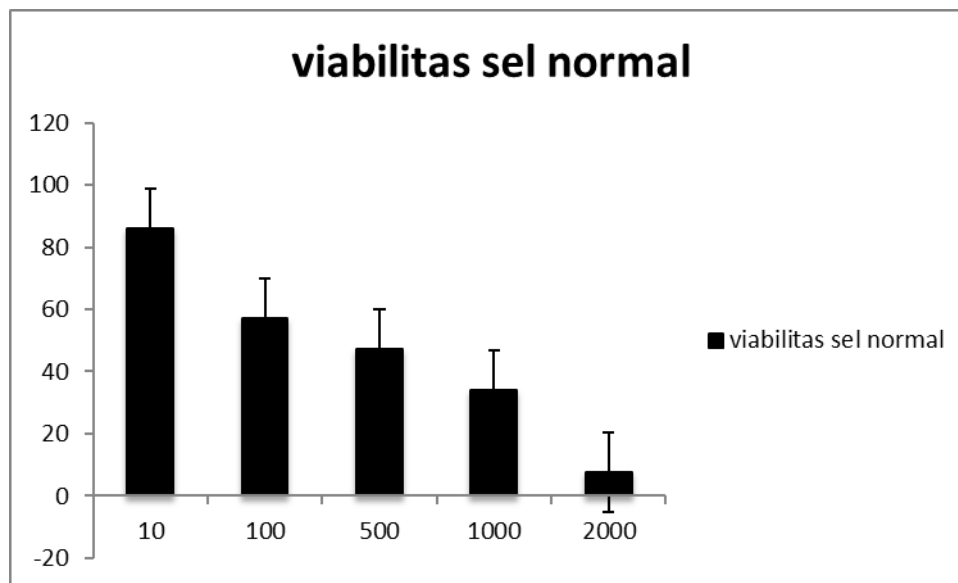
Tabel 3 Rata-rata persen viabilitas sel dan nilai IC₅₀ ekstrak terhadap pertumbuhan sel kanker kolon WiDr ekstrak etanol daun dan bunga tanaman *Calotropis gigantea*

			Rata-rata % viabilitas sel T47D					
No	Ekstrak		pada konsentrasi uji (µg/mL)					IC ₅₀ (µg/mL)
			1	10	100	500	1000	
1	Ekstrak daun	Etanol	96.75	65.21	49.08	18.56	4.40	48,5 µg/mL
2	Ekstrak bunga	Etanol	86.70	78.10	82.09	84.76	81.43	2423 µg/mL

C. Toksisitas ekstrak etanol daun *Calotropis gigantea* pada sel normal, fibroblast NIH3T3

Hasil uji sitotoksisitas ekstrak daun *calotropis gigantea* pada sel kanker kolon menunjukkan potensi sitotoksisitas yang cukup tinggi. Sebelum dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensinya sebagai antikanker perlu dipastikan terlebih dahulu efek

sitotoksiknya terhadap sel normal. Efek toksik pada sel normal menjadi permasalahan besar pada terapi kanker, berupa efek samping yang dapat menurunkan kualitas hidup pasien

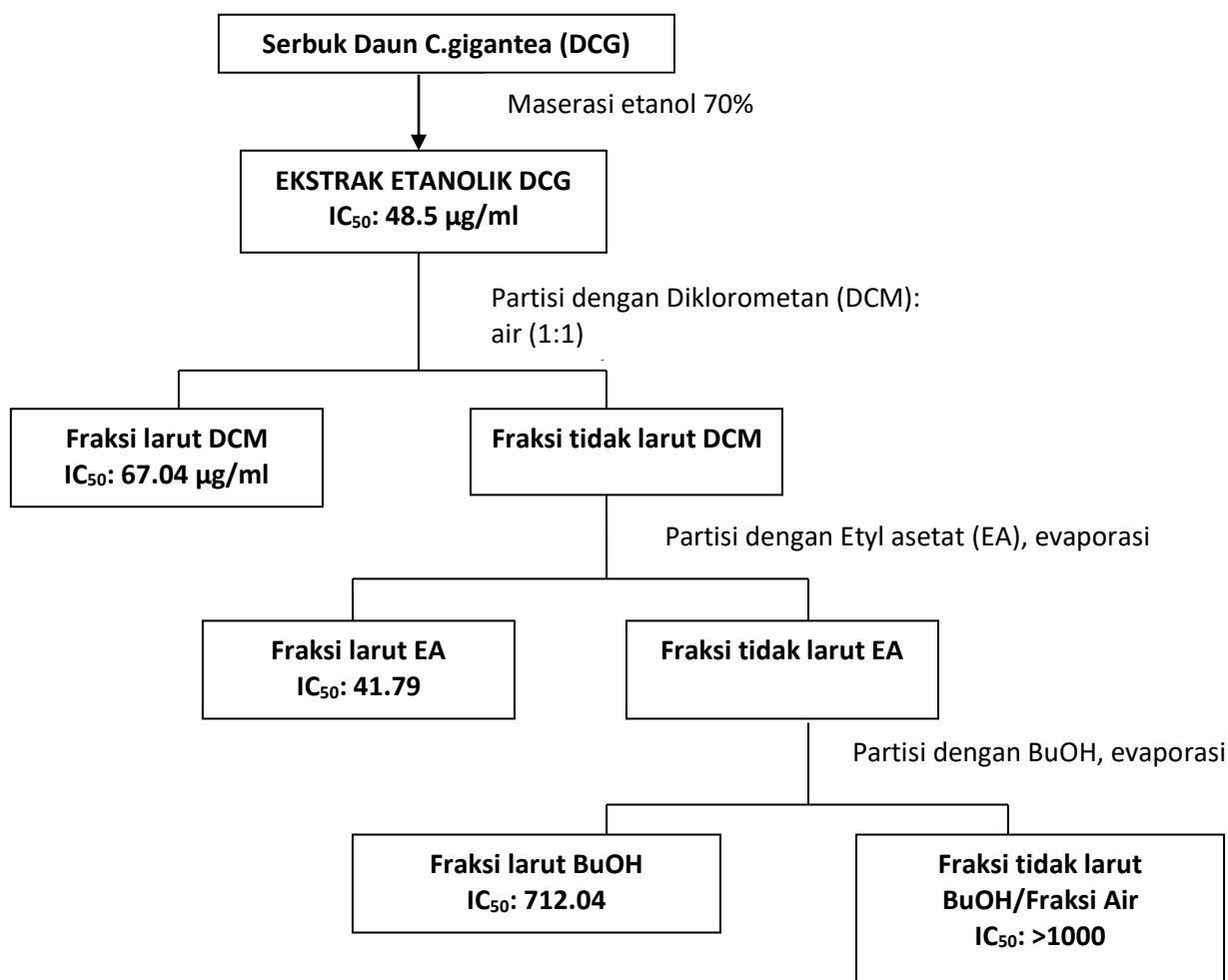


Gambar 16. Pengaruh perlakuan ekstrak etanol terhadap pertumbuhan sel NiH3T3.

Sel sebanyak 10^4 sel/sumuran ditanam dalam 96 well plate, diinkubasi selama 24 jam, untuk mengembalikan sel dalam bentuk morfologi semula. Sel diberi perlakuan ekstrak etanol (10-2000 µg/mL) dengan waktu inkubasi 24 jam. viabilitas sel dengan metode MTT. Analisis t test dengan taraf kepercayaan 95% menunjukkan konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini tidak menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel yang signifikan.

D. Hasil Fraksinasi ekstrak daun *Calotropis gigantea*

Pada penelitian tahap ini ekstrak etanol daun difraksinasi dengan metode partisi cai-cair menggunakan pelarut diklorometana : air (1: 1) sehingga didapatkan fraksi diklorometana dan farksi air (residu), selanjutnya residu dipartisi dengan pelarut etil asetat (1:1) sehingga didapatkan fraksi etil asetat dan residu. Selanjutnya residu di partisi dengan butanol (1:1) sehingga didapatkan fraksi butanol dan residu. Residu terahir ini pada penelitian ini disebut dengan fraksi air. sehingga dari fraksinasi ekstrak etanol bagian daun ini didapatkan empat fraksi yaitu fraksi diklorometana (DCM), fraksi etil asetat (EA), Fraksi Butanol (BuOH) dan fraksi air. rendemen hasil fraksinasi disajikan pada tabel 4

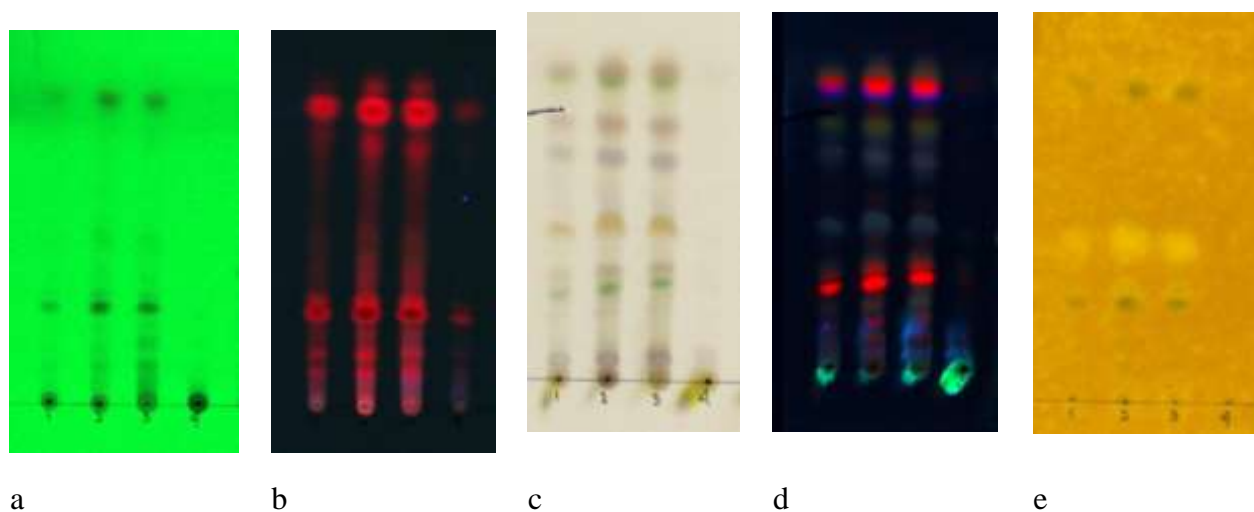


Gambar 17 Metode fraksinasi cai-cair dari ekstrak daun *Calotropis gigantea*

Tabel 4 Hasil rendemen fraksinasi dari daun *Calotropis gigantea*

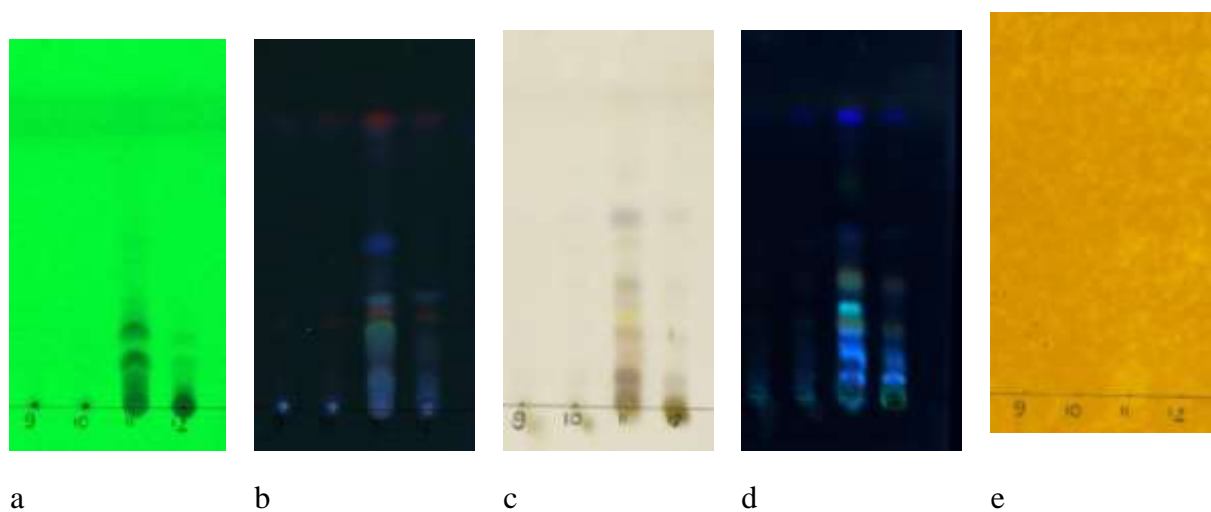
Berat daun	ekstrak	Rendemen fraksi %	
	Fraksi	Berat fraksi	b/b
40 g	Diklorometana	14.74 g	34.27
	Etil Asetat	0.55 g	1.27
	Butanol	3.73 g	8.67
	Air	23.98 g	55.77

Terhadap keempat fraksi tersebut selanjutnya dilakukan identifikasi dengan pendekatan KLT (Kromatografi Lapis Tipis)



Gambar 18 A. Skrining alkaloid. Profil KLT ekstrak etanol daun (1) fraksi Diklorometana (2), fraksi etil asetat (3), fraksi butanol (4). Fase diam: silika gel F₂₅₄; fase gerak= methanol: chloroform=95:5; (a: UV254;b: UV366; c:penampak noda H₂SO₄ 10%; d: UV 366 dengan penampak noda H₂SO₄ 10% ; e:penampak noda reagen dragendroft)

B

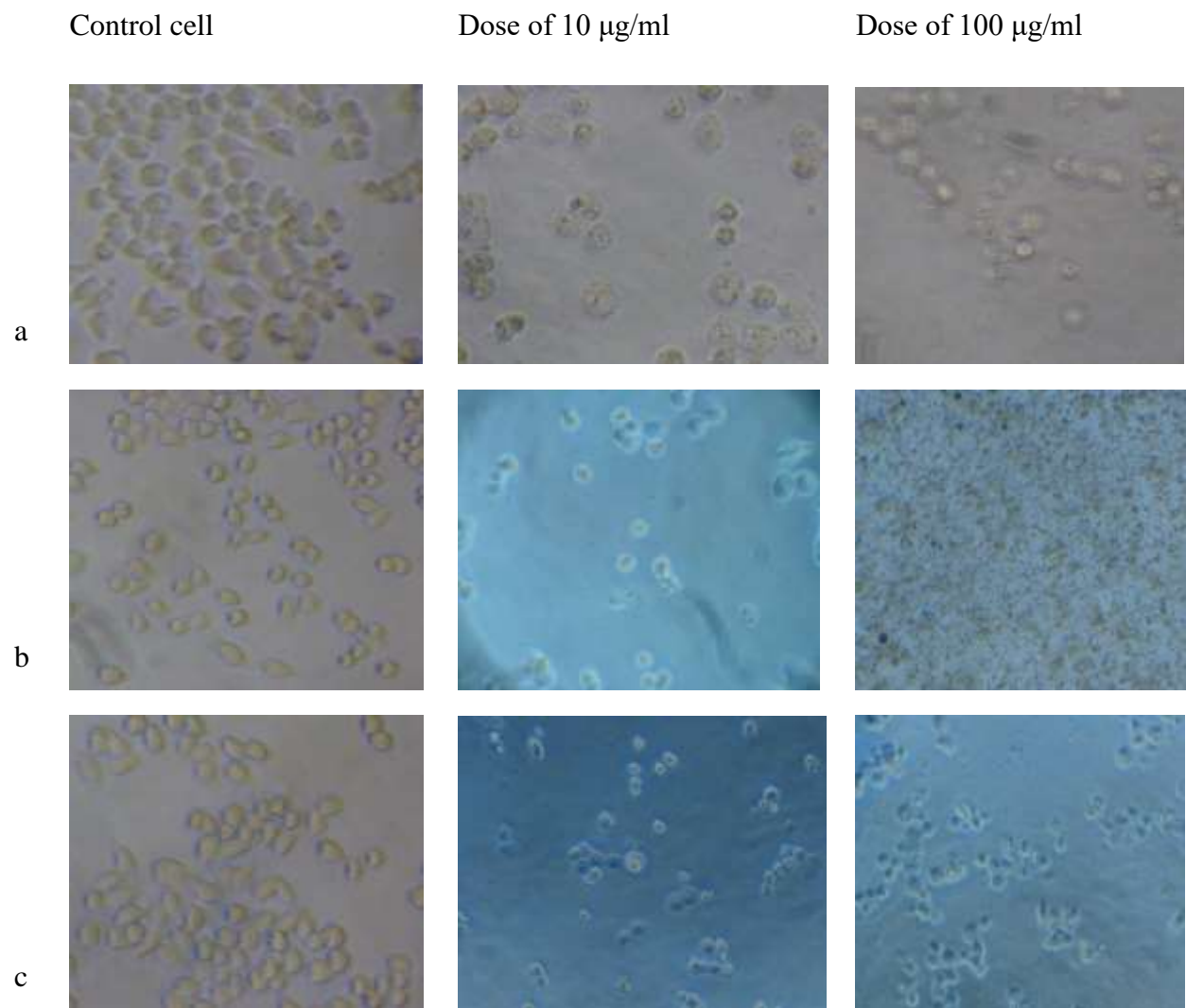


Gambar 19 A. Skrining alkaloid. Profil KLT ekstrak etanol Bunga (1) fraksi Diklorometana (2), fraksi etil asetat (3), fraksi butanol (4). Fase diam: silika gel F₂₅₄; fase

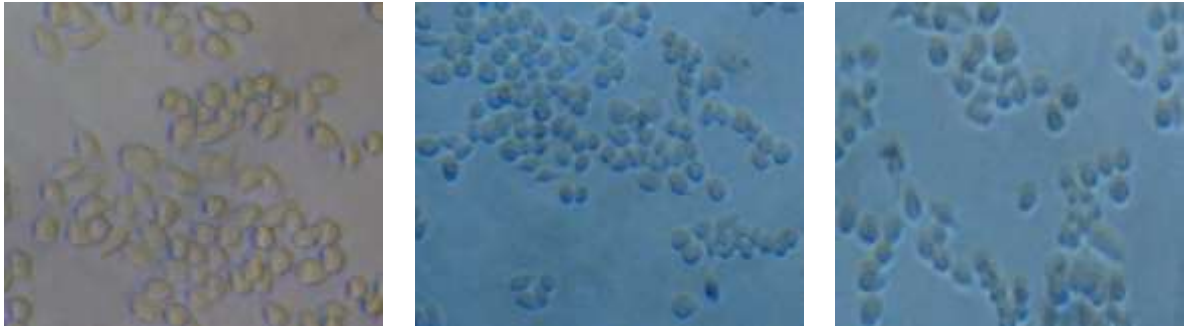
gerak= methanol: chloroform=95:5; (a: UV254;b: UV366; c:penampak noda H2SO4 10%;
d: UV 366 dengan penampak noda H2SO4 10% ; e:penampak noda reagen dragendroft)

E. Hasil uji sitotoksik fraksi ekstrak etanol daun *Calotropis gigantea*
Keempat fraksi yaitu fraksi diklorometana (DCM), fraksi etil asetat (EA), fraksi butanol (BuOH) dan fraksi air diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker kolon WiDr.

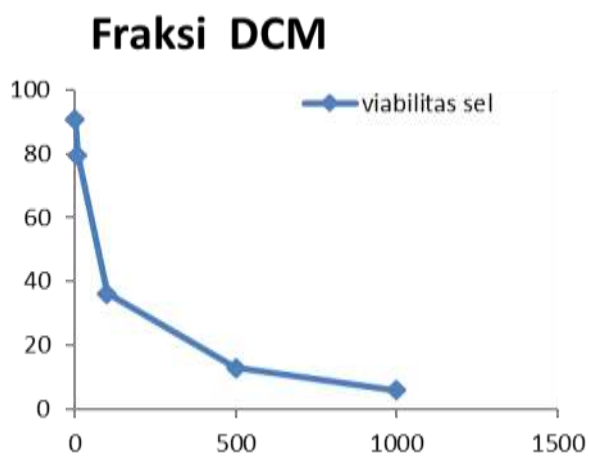
A



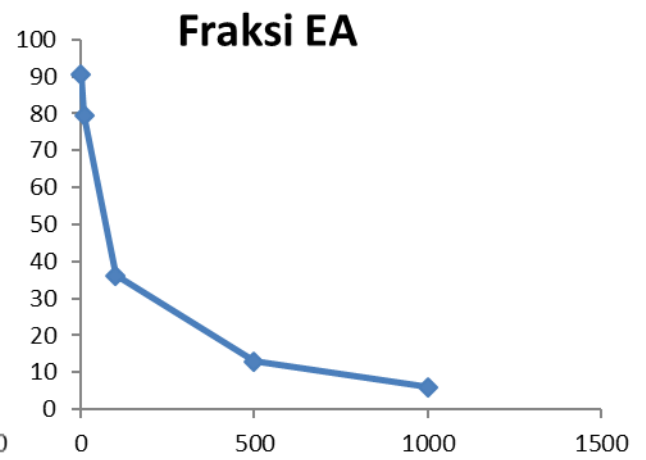
d



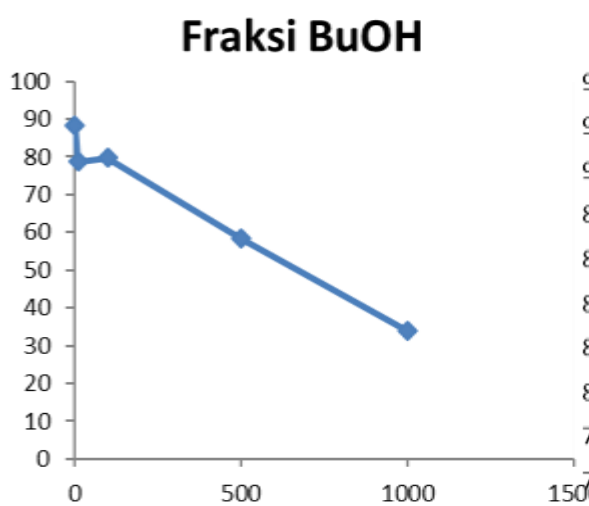
B



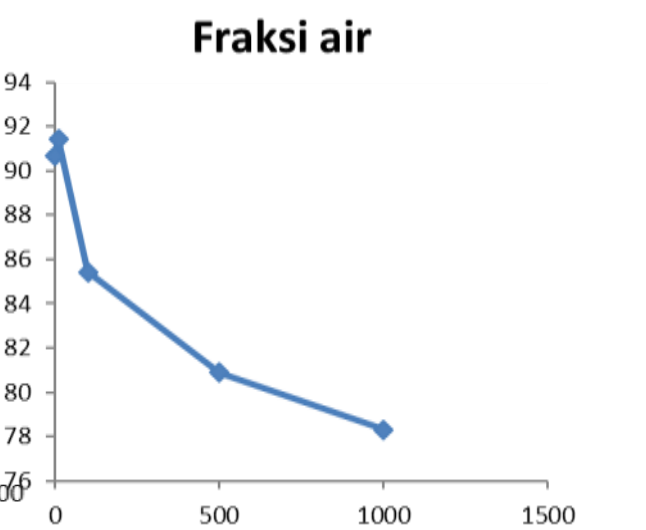
Konsentrasi uji $\mu\text{g/mL}$



Konsentrasi uji $\mu\text{g/mL}$



Konsentrasi uji $\mu\text{g/mL}$



Konsentrasi uji $\mu\text{g/mL}$

Gambar 20. Perbandingan efek penghambatan pertumbuhan sel karena perlakuan fraksi DCM,EA, BuOH dan air pada sel kanker kolon WiDr dengan metode reduksi MTT. Sel sebanyak 10^4 sel/sumuran ditanam dalam 96 *well plate*, diinkubasi selama 24 jam dalam media RPMI komplet. A. Morfologi sel diamati di bawah mikroskop fase kontras (a) fraksi diklorometana; (b) fraksi etil asetat; (c) fraksi BuOH; (d) fraksi air. Perubahan yang terjadi tampak pada perlakuan fraksi diklorometana (a) dan fraksi etil asetat (b) yaitu terjadi *blebbing* (→), membesar (→) dan berserabut (→) dengan perbesaran 200x. B. efek perlakuan fraksi terhadap viabilitas sel. terlihat pada perlakuan fraksi diklorometan dan fraksi etil asetat viabilitas sel semakin menurun dengan peningkatan dosis. data merupakan representasi dari 3 (tiga) eksperimen yang berbeda dengan hasil yang konsisten dan masing-masing eksperimen dilakukan dengan 3(tiga) replikasi.

Berdasarkan hasil perhitungan IC_{50} masing- masing fraksi di dapatkan hasil bahwa fraksi etylasetat (IC_{50} : 41.79 $\mu\text{g/mL}$) dan fraksi diklorometana (IC_{50} : 67.04 $\mu\text{g/mL}$) mempunyai potensi sitotoksik terhadap sel kanker kolon widr lebih tinggi dari pada fraksi butanol (IC_{50} :712 $\mu\text{g/mL}$) dan fraksi air (IC_{50} :712 $\mu\text{g/mL}$). dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat dan fraksi diklorometana mempunyai potensi yang tinggi untuk dikembangkan menjadi obat antikanker terutama untuk terapi kanker kolon. Data IC_{50} disajikan pada tabel berikut.

Tabel 5.Rata-rata persen viabilitas sel dan nilai IC_{50} ekstrak terhadap pertumbuhan sel kanker kolon WiDr dari fraksi diklorometan, etil asetat, butanol dan air daun *Calotropis gigantea*

No	Ekstrak	Rata-rata % viabilitas sel T47D					IC ₅₀ (µg/mL)
		pada konsentrasi uji (µg/mL)					
		1	10	100	500	1000	
1	Fraksi diklorometana	90.76	82.4	48.36	11.65	5.02	67.04 µg/mL
2	Fraksi etyl asetat	80.97	76.05	57.09	4.86	11.18	41.79 µg/mL
3	Fraksi butanol	88.17	78.69	79.82	58.28	33.82	712 µg/mL
4	Fraksi air	91.49	94.29	87.99	85.95	80.18	>1000 µg/mL

Bab 7

Kesimpulan

Berdasarkan hasil data riset tanaman widuri (*C.gigantea*) telah ditemukan bahwa tanaman widuri mempunyai potensi tinggi untuk dikembangkan sebagai kandidat fitofarmaka. Hal ini dapat dibuktikan dengan nilai IC₅₀ ekstrak etanol dan fraksinya kurang dari 100µg/ml dalam menghambatn pertumbuhan sel kanker payudara T47D.

Analisis t test dengan taraf kepercayaan 95% menunjukkan konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 10 µg-2000 µg tidak menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel normal NiH3T3 secara signifikan.

Hasil analisis senyawa kimia menggunakan Thin Layer Chromatography dan reagen warna menunjukkan adanya kandungan senyawa terpenoid dan falvonoid

DAFTAR PUSTAKA

- Abcam, 2007, T47D (Human ductal breast epithelial tumor cell line) Whole Cell Lysate (ab14899) data sheet.
<http://www.abcam.com/index.html?datasheet=14899>, diakses Februari 2007
- Amundson, S.A., Myers, T.G., Scudiero, D., Kitada, S., Reed, J.C., and Fornace, A.J., 2000, An Informatics Approach Identifying Markers of Chemosensitivity in Human Cancer Cell Lines, *Cancer Res*, 60:6101-6110.
- Anonim, 2007, ATCC Cell Biology, available from <http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=HTB-22>, cited in 25 June 2007.
- Aouali, N., Morjani, H., Trussardi, A., Soma, E., Giroux, B., and Manfait, M., 2003, Enhanced Cytotoxicity and Nuclear Accumulation of Doxorubicin-loaded Nanospheres in Human Breast Cancer MCF-7 Cells Expressing MRP1, *International Journal of Oncology*, 23:1195-1201.
- ATCC, 2008, Cell Biology, ATCC® Number: HTB-22TM, Designations: MCF-7, <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-22&Template=cellBiology>, 19 Juli 2008.
- Burdall, E.S., Hanby M.A., Landsdown, R.J.M., dan Speirs, V., 2003, Breast Cancer Cell Line, *Breast Cancer Res.*, 5(2): 89-95.
- Butt, A.J., Firth, S.M., King, M.A., and Baxter, R.C., 2000, Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 Modulates Expression of Bax and Bcl-2 and Potentiates P53-Independent Radiation-Induced Apoptosis In Human Breast Cancer Cells, *J. Biol Chem*, 275(50):39174-39181.
- Menchetner, E., Kyshtoobayeva, A., Zonis, S., Kim, H., Stroup, R., Garcia, R., Parker, R.J., and Fruehauf, J.P., 1998, Levels of Multidrug Resistance (MDR1) P-Glycoprotein Expression by Human Breast Cancer Correlate with in Vitro Resistance to Taxol and Doxorubicin, *Clinical Cancer Research*, 4:389-398.
- Onuki, R., Kawasaki, H., Baba, T., dan Taira, K., 2003, Analysis of A Mitochondrial Apoptotic Pathway Using Bid-Targeted Ribozymes in Human MCF7 Cells in the Absence

of A Caspase-3-Dependent Pathway, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 13 (2): 75-82.

Anonim, 2006a, Apoptosis Extrinsic and Intrinsic Pathways, http://www.upstate.com/features/apop_pathway.asp

Anonim, 2006b, HeLa Cell, www.answers.com/topic/hela

Anonim, 2006c, HeLa is also The German Name for Hel, Poland and The Cruiser SMS HeLa, Wikipedia the Free Encyclopedia, Wikimedia Foundation, <http://en.wikipedia.org/wiki/HeLa>, diakses tanggal 20 Januari 2006.

Aagaard E.M., Barsh G., Bauer C.D., Bloch C.K., *et al.* 2007. *Pathophysiology*. Chapter 5. McGraw-Hill Companies

Albert B., 1994. *Molecular Biology of The Cell*, 3th ed. Garland Publisher. Inc. New York and London

Alam M.A., Habib M.R., Nikkon R., Rahman M., Karim M.R., 2008. Antimicrobial activity of akanda (*Calotropis gigantea* L.) on some pathogenic bacteria. *Bangladesh J Sci Ind Res*, 3 (43), hal.397-404.

Alam M.A., Habib M.R., Nikkon F., Khalequzzaman M., Karim M.R., 2009. Insecticidal activity of root bark of *Calotropis gigantea* L. against *Tribolium castaneum* (Herbst). *World Journal of Zoology*, 2 (4), hal.90-95.

Argal A., Pathak A.K., 2006. CNS activity of *Calotropis gigantea* roots. *J Ethnopharmacol.* 1 (106), hal.142-145.

Abraham K.I, Joshi P.N., 1979. Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrate. *Biochim Biophys Acta*, 1 (568), hal.111-119.

Anjaneyulu V., Row L.R., 1968. The triterpenes of *Calotropis gigantea* Linn. *Curr Sci*, 6 (156) hal.157.

Ayscough K., Hayles J., Macnaill S.A., & Nurse P., 1992. Cold sensitive mutants of p34cdc2 that suppress a mitotic catastrophe phenotype in fission yeast. *Mol. Gen. Genet.*, 232, hal.344-350.

Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2010. *Acuan Sediaan Herbal*. Badan Pengawas Obat dan makanan Republik Indonesia hal.7-8

Chitme H.R., Chandra R., Kaushik S., 2004. Studies on anti-diarrhoeal activity of *Calotropis gigantea* in experimental animals. *J Pharm Pharmaceut Sci*,1 (7) hal.70-75.

Chitme H.R., Chandra R., Kaushik S., 2005. Evaluation of antipyretic activity of *Calotropis gigantea* (Asclepiadaceae) in experimental animals. *Phototherapy Research*, 5 (19) hal.454-456.

Chen, T.R., Drabkowski, D., Hay, R.J., Macy, M. & Peterson, W. Jr., 1987. WiDr is a Derivative of Another Colon Adenocarcinoma Cell Line, HT-29. *Cancer Genet Cytogenet.*, 27(1), hal.125-34.

Conze, D., Weiss,L., Regen, P.S., Bushan, A., Weaver, D., Johnson, P., & Rincond, M., 2001. Autocrine Production of Interleucin-6 causes multidrug resistance in breast cancer cell, *Cancer Res*, 61, hal.8851-8858.

Cotran R.S., Kumar, V., Collin, T., 1999. *Neoplasia in Robbins Pathologic Basic of Disease*, Sixth Edition, Philadelphia : W.B. Saunders Company, hal.260-325.

Christopher Mark Overall, M.C., & Otín, L.C.,2002. Strategies For MMP Inhibition In Cancer: Innovations For The Post-Trial Era. *Nature review. Cancer*, 2, hal.657-672

Cancer Cemoprevention Riset Center (CCRC) Farmasi UGM, 2009, Prosedur Tetap Kerja In vitro, Fakultas Farmasi UGM

Cancer Cemoprevention Riset Center (CCRC) Farmasi UGM, 2013, Sel Kanker, Fakultas Farmasi UGM

DeFillippis, R.A., Goodwin, E.C., Wu, L., DiMaio, D., 2003, Endogenous Human Papillomavirus E6 and E7 Proteins Differentially Regulate Proliferation, Senescence, and Apoptosis in Hela Cervical Carcinoma Cells, *Journal of Virology*, Vol.77, no.2, 1551-

1563.

Freshney, R.I., 1986, Animal Cell Culture, A Practical Approach, 1st Ed, IRL Press, Washington D.C.

Goodwin, E.C., DiMaio, D., 2000, Repression of human papillomavirus oncogenes in Hela cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways, Biochemistry, Vol.97, no.23. Labwork Study Guide and Lecture Notes, 2000, Henrietta Lacks, www.micro.msb.le.ac.uk/Labwork/Lack1.htm.

Egeblad, M., & Werb, Z., 2002. New Function for The Matrix Metalloproteinase in Cancer Progression. Nature Review, Cancer, 2, hal. 161-174

Giovannetti, E., Backus, H.H.J., Wouters, D., Ferreira, C.G., van Houten, V.M.M. and Brakenhoff, R.H., 2007, Changes in the Status of p53 Affect Drug Sensitivity to Thymidylate Synthase (TS) Inhibitors by Altering TS Levels, *British J. Can.*, 96:769-775.

Gandjar, G.I., dan Rohman, A., 2012. *Analisis Obat Secara Spektrofometri dan Kromatografi*. Pustaka Pelajar.

Gupta J., Ali M., 2000. Rare chemical constituents from *Calotropis gigantea* roots. *Indian J. Pharm. Sci.*, 1 (62) hal.29-32.

Habib M.R., Karim M.R., 2009. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate and Anhydrosophoradiol-3-acetate Isolated from *Calotropis gigantea* (Linn.) Flower. *Mycrobiology*, 1 (37) hal.31-36.

Habib M.R., Nikkon F., Rahman M., Haque M.E., Karim M.R., 2007. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from methanolic extract of root bark of *Calotropis gigantea* (Linn). *Pak. J. Biol. Sci.*, 22 (10) hal. 4174-4176.

Habib & Karim. 2011. Evaluation of antitumor activity of *Calotropis gigantea* L. Root Bark Against Ehrlich Ascites Carcinoma in Swiss Albino Mice. Elsevier. *Asian Pasific journal of tropical medicine*, hal.786-790.

Hanahan D., & Weinberg R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 100, hal.57-70

Hsiang, Y.H., Lihou, M.G., Liu L.F. 1989. Arrest of replication fork by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin, *Cancer Research*, 49, hal.5077-5082

Indran, R.I., Tufo, G., Pervaiz, S., Brenner, C., 2011. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta. Elsevier*, 1807, hal. 735-745

Igney F.H., & Krammer P.H., 2002. Review : death and antideath: tumor resistance to apoptosis, *Nature Review: Cancer*, 2, hal.277-286

Jansen, W.J.M., Zwart, B., Hulscher, S.T.M., Giaccone, Pinedo, H.M. and Boven, E., 1997, CPT-11 in Human Colon-Cancer Cell Lines and Xenografts: Characterization of Cellular Sensitivity Determinants, *Int. J. Cancer*, 70:335-340.

Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D., 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2 (61), hal.69-90.

Kampa M., Alexaki V.I., Notas G., Nifli A.P., Nistikaki A., Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Kouimtoglou E., Blekas G., Boskou D., Gravanis A., & Castanas E., 2003. Antiproliferatif and apoptotic effect of selective phenolic acid on T47D human breast cancer cell: potential mechanism of action, *Breast Cancer Res*, 6, hal. 63-74

King R.J.B., 2000. *Cancer Biology*. 2nd edition. School of Biological Science. University of Surrey. Pearson Education. Harlow-England-London-New York. hal.228-231,263-264

Ko, C.H., Shen, C.S., Lee, F.J.T., *et al.* 2005. Myricetin inhibits matrix metalloproteinase 2 protein expression and enzyme activity in colorectal carcinoma cells. *Mol Cancer Ther*, 4, hal.281-290.

Kumar G., Karthik L., Bhaskara Rao K.V., 2011. A Review on Pharmacological and Phytochemical Profile of *Calotropis Gigantea* Linn, *Pharmacologyonline*, 1 (1), hal.1-8.

Kumar G., Karthik L., Bhaskara Rao K.V., 2010a. *In vitro* anti-Candida activity of *Calotropis gigantea* against clinical isolates of *Candida*. *Journal of Pharmacy Research*, 1 (3) hal. 539-542.

Kumar G., Karthik L., Bhaskara Rao K.V., 2010b. Antibacterial activity of aqueous extract of *Calotropis gigantea* leaves – an *in vitro* study. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2 (4) hal.141-144.

Levrero, M., Laurenzi, V. De, Constanzo, A., Sabatini, S., Gong, J., Wang, J.Y.J. and Melino, G., 2000, The p53/p63/p73 Family of Transcription Factors: Overlapping and Distinct Functions, *Journal of Cell Science*, 113:1661-1670.

Liu, H.C., Chen, G.G., Vlantis, A.C., Leung, B.C.S., Tong, M.C.E. and van Hasselt, C.A., 2006, 5-Fluorouracil Mediates Apoptosis and G1/S Arrest in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma via a p53-Independent Pathway, *The Cancer Journal*, 12(6):482-493.

Liabakk,N.B., Talbot,I., Smith,A.R., Wilkinson,K., & Balkwill, F., 1996. Matrix Metalloprotease 2 (MMP-2) And Matrix Metalloprotease 9 (MMP-9) Type IV Collagenases In Colorectal Cancer.Cancer res,AAC Journal, hal.190-196

Lhinhatrakool T., Sutthivaiyakit S., 2006. 19-Norand 18, 20-Epoxy-cardenolides from the leaves of *Calotropis gigantea*. *J. Nat. Prod.*, 8 (69), hal.1249-1251.

Maoyuan W., Wenli M., Yuanyuan D., Shenglan L., Zhunian W., Haofu D., 2008. Cytotoxic Cardenolides from the Roots of *Calotropis gigantea*. *Modern Pharmaceutical Research*, 2 (1), hal.4-9

Mardisiswojo & Radjakmanugunsudarso. 1968. *Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang*. Jilid II, hal. 4-5.

Margottin-Goguet F., Hsu J.Y., Loktev A., Hsieh H.M., Reimann J.D.R., & Jackson P.K., 2003. *Dev.Cell*, 4, hal.813-826

Mahajan R.T., Badgujar S.B., 2008. Phytochemical Investigations of some laticiferous plants belonging to Khandesh Region of Maharashtra. *Ethnobotanical Leaflets*, 12, hal.1145- 1152.

Michael O. Hengartner, 2000, The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-776

Nalwaya N., Pokharna G., Deb L., Jain N.K., 2009. Wound healing activity of latex of *Calotropis gigantea*. *IJPPS*. 1 (1), hal.176-181

National Cancer Institute (NCI). 2013. Database Colon and Rectal Cancer. The National institutes of Health.

Neto, C.C., 2011. Ursolic Acid and other Pentacyclic Triterpenoid: anticancer activities and occurrence in Berries. *Berries and Cancer Prevention*, 2, hal. 41-51

Noguchi, P., Wallace, R., Johnson, J., Early, E.M., O'Brien, S. and Ferrone, S., 1979, Characterization of the WiDr: a Human Colon Carcinoma Cell Line, *In Vitro*, 15(6):401-408.

Pan M.H., Serini S., Manggiano N., Giuseppe T., Navarra P., & Ranelletti F.O., 2005. Downregulates The Steady-State and Heregulin-a-induced COX-2 Pathway in Colon Cancer Cells. *J. Nutr.*, 135, hal.129-136

Pal G., Sinha N.K., 1980. Isolation, crystallization, and properties of calotropins DI and DII from *Calotropis gigantea*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2 (202), hal.321-329.

Palozza, P., Serini, S., Maggiano, N., Giuseppe, T., Navarra, P. and Ranelletti, F.O., 2005, β -Carotene Downregulates the Steady-State and Heregulin-a-Induced COX-2 Pathways in Colon Cancer Cells, *J.Nutr.*, 135:129-136.

Pari K., Rao P.J., Devakumar C., Rastogi J.N., 1998. A Novel Insect antifeedant nonprotein amino acid from *Calotropis gigantea*. *J. Nat. Prod.*, 1 (61), hal.102-104.

Park, Y.S., KIM, H., Younghee Kim, Y., & Lee, J., S. 2012. Frondoside A has an anti-invasive effect by inhibiting TPA-induced MMP-9 activation via NF- κ B and AP-1

signaling in human breast cancer cells. *International Journal Of Oncology*, 41, hal. 933-940

Pathak & Argal. 2007. Analgesic activity of *Calotropis gigantea* flower. *Fitoterapia*, 1 (78) hal. 40-42.

Prunet, C., Lemaire-Ewing, S., Ménétrier, F., Néel, D., dan Lizard, G., 2005, Activation of Caspase-3-Dependent and -Independent Pathways During 7-Ketocholesterol- and 7 β -Hydroxycholesterol-Induced Cell Death: A Morphological and Biochemical Study, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19 (5): 311-326.

Pusztai L., Lewis C.E., & Yap E., 1996. *Cell Proliferation in Cancer, Regulatory Mechanism of Neoplastic Cell Growth*. Oxford University Press.

Rajesh R., Raghavendra Gowda C.D., Nataraju A., Dhananjaya B.L., Kemparaju K., Vishwanath B.S., 2005. Procoagulant activity of *Calotropis gigantea* latex associated with fibrinogenolytic activity. *Toxicon*, 1 (46) hal.84-92.

Rastogi, P.R., Richa & Sinha, P.R., 2009. Apoptosis: Molecular Mechanisms And Pathogenicity. *EXCLI Journal*, 8, hal.155-181.

Rieger, M.A., Nelson, L.K., Konowalchuk, D.J., Barreda, D.R., 2011. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *Journal of Visualized Experiments*.

Roomi1, M. W., Roomi1, N. W., Bhanap, B. , Niedzwiecki, A., & Rath, M., 2012. The Anti-Cancer Effect of a Novel Nutrient Mixture by Inhibiting MMPs Expression, Invasion and Inducing Apoptosis in Chondrosarcoma Cell Line SW-1353. *Cancer and Clinical Oncology*, 1 (2), hal.99-108.

Ruddon, R.W., 2007. *Cancer Biology*. Fourth Eddition, Oxford University Press.

Schafer, J.M., Lee, E.S., O'Regan, R.M., Yao, K., dan Jordan, V.C., 2000, Rapid Development of Tamoxifen-stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice, *Clinical Cancer Research*, 6, 4373-4380

Saleem, M., Murtaza, I., Tarapore, R., Suh, Y., Adhami, V.M., Johnson, J.J., Siddiqui, I., Khan, N., Asim, M., Hafeez, B., Shekhani, T.M., Li, B., & Mukhtar, H., 2009. Lupeol inhibits proliferation of human prostate cancer cells by targeting β -catenin signaling. *Carcinogenesis*, 30 (5), 808-817

Saratha, V., Pillai S.I., Subramanian, S., 2011. Isolation And Characterization Of Lupeol, A Triterpenoid From *Calotropis gigantea* Latex. *International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research*. 10 (2), hal. 54-57

Shapiro G.I., & Harper J.W., 1999. Anticancer Drug Target : cell cycle and checkpoint control. *J. Clin. Invest*, 104 (12), hal. 1645-1653.

Schneider A.K., 1997. *Cancer Genetic. Encyclopedia of Human Biology*. 2nd Ed., Academic Press.

Schafer J.M., Lee E.S., O'Regan R.M., Yao K., & Jordan V.C., 2000. Rapid Development of Tamoxifen-stimulated Mutant p53 breast tumors (T47D) in athymic mice, *Clin Cancer Res*, 6, hal. 4373-4380.

Slaby, O., Svoboda, M., Michalek, J., & Vyzula, R., 2009. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Molecular Cancer*, 8 (102), hal. 1-13

Srivastava S.R., Keshri G., Bhargavan B., Singh C., Singh M.M., 2007. Pregnancy interceptive activity of the roots of *Calotropis gigantea* Linn. in rats. *Contraception*, 43 (75) hal. 4318-322.

Siegel R., Naishadham D., Jemal A., 2012. Cancer Statistic. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62 (1), hal. 10-29.

Sofyan R., 2000. Terapi Kanker Pada Tingkat Molekuler. *Cermin Dunia Kedokteran*, 127, hal. 5-10

Sigmond, J., Backus, H.H., Wouters, D., Temmink, O.H., Jansen, G. and Peters, G.J., 2003, Induction of Resistance to the Multitargeted Antifolate Pemetrexed (ALIMTA) in WiDr Human Colon Cancer Cells is Associated with Thymidilate Synthase Overexpression, *Biochem. Pharmacol.*

Tsunoda T, Inada H, Kalembeyi I, Imanaka-Y. K, Sakakibara M, Okada R, Katsuta K, Sakakura T, Majima Y, Yoshida T. 2003. Involvement of large tenascin-C splice variants in breast cancer progression. *Am J Pathol*, 162 (6), hal.1857-1867

Biodata Penulis



Roihatul Muti'ah, S.F, M.Kes, Apt lahir di Malang pada tanggal 3 Februari 1980. Penulis menempuh jenjang pendidikan S1 di Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Jogjakarta pada tahun 1998-2002, kemudian melanjutkan profesi Apoteker di fakultas yang sama pada tahun 2002-2003. Jenjang S2 juga telah ditempuh penulis di program studi Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada tahun 2008-2010. Sekarang penulis sedang menyelesaikan pendidikan S3 di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya. Penulis adalah pengajar di Program Studi Farmasi Fakultas Saintek Universitas Islam Negeri Malang. Pada program studi ini penulis spesifik menjadi pengajar dibidang bahan alam. Mata pelajaran yang beliau ajarkan meliputi Botani Farmasi I dan II, Farmakognosi, Fitokimia, Fitofarmasi dan farmakologi. Berbagai penelitian telah dilakukan oleh peneliti dengan spesifikasi di bidang obat herbal terutama pada pengembangan obat tradisonal menjadi bentuk sediaan fitofarmaka.

PENGEMBANGAN FITOFARMAKA

ANTIANKER

(Panduan dan Teknik)

Pengembangan obat tradisional menjadi fitofarmaka saat ini sangat perlu di galakan. Obat tradisional yang telah digunakan untuk pengobatan selama ratusan tahun dan telah di wariskan secara turun temurun secara empirik jelas terbukti kemanjurannya. Namun demikian, hal ini tidak mudah begitu saja diterima dalam pengobatan formal. Untuk dapat diterima dalam pengobatan formal maka diperlukan bukti ilmiah melalui uji pre klinik sampai uji klinik, sehingga *grade* obat tradisional meningkat menjadi bentuk sediaan obat herbal terstandar maupun sediaan fitofarmaka.

Pada buku ini dipaparkan bagaimana metode pengembangan sediaan obat tradisional menjadi Obat Herbal terstandar dan sediaan fitofarmaka, metode skrining obat anti kanker dari bahan alam, teknik-teknik pengembangan obat antikanker secara pre-klinik melalui uji *in vitro*, contoh pengembangan obat tradisional dari tanaman *Calotropis gigantea* untuk antikanker.

Buku ini sangat bermanfaat bagi para peneliti tanaman obat, akademisi di bidang Farmasi, Kedokteran, Kimia dan Biologi, teknisi, praktisi industri obat. Serta bermanfaat bagi para mahasiswa yang ingin menekuni penelitian di bidang pengembangan fitofarmaka terutama dalam pengembangan obat Kanker

Verma, P.R., & Hansch, C.,2007. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry, ScienceDirect*, 15 ,hal. 2223–2268

Verma, S.P., Goldin, B.R., and Lin, P.S., 1998, The Inhibition of the Estrogenic Effects of Pesticides dan Enviromental Chemicals by Curcumin and Isoflavonoids, *Envir. Health Presp*, 106 (12), 807-812.

Wang, C.S., Lu, C.M., Chen, L.H., Tseng, I.H., Ke, Y.Y.,Wu, C.Y., Yang, Y.P., 2009. Cytotoxicity of calotropin is through caspase activation and downregulation of anti-apoptotic proteins in K562 cells. *Cell Biology International. Elsevier*. 33, 1230-1236

Wyllie A., Donahue V., Fischer B., Hill D., Keesey J. & Manzow S., 2000. *Cell Death Apop. Nec.* Roche Diagnostic Corporation.

Weinberg R.A., 1996. How Cancer Arises. *Sci.Am*, 275 (3), hal.62-75

Zampieri, L., Bianchi, P., Ruff, P., dan Arbuthnot, P., 2002, Differential modulation by estradiol of P-glycoprotein drug resistance protein expression in cultured MCF7 and T47D breast cancer cells, *Anticancer Res.*, 22(4):2253-9



UIN-MALIKI PRESS
Jalan Gajayana 50 Malang 65144
Telepon/Faksimile 0341-573225
e-mail: admin@uinmalikipress.com
<http://uinmalikipress.com>

