



POTENSI EKSTRAK  
*Daun Widuri*  
(CALOTROPIS GIGANTEA)  
sebagai Obat Antikanker Fibrosarkoma



UIN-VA - IKT - P3788  
Jalan Geger 57, Malang 65144  
Telp: 0341-373225  
E-MAIL: uinva@uic.ac.id  
WWW: www.uic.ac.id



dr. Ana Rahmawati  
Roihatul Muti'ah, M.Kes, Apt.

**POTENSI EKSTRAK DAUN WIDURI (*Calotropis Gigantea*)  
SEBAGAI OBAT ANTIKANKER FIBROSARKOMA**

© UIN-Maliki Press, 2014

Penulis :  
dr. Ana Rahmawati  
Roihatul Muti'ah, M.Kes,Apt.

ISBN: 978-602-1190-27-2

Cetakan Pertama, 2014

*All rights reserved*

Hak cipta dilindungi oleh undang-undang

Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi  
buku ini dengan cara apapun, tanpa izin tertulis dari Penerbit

Diterbitkan pertama kali oleh

LP2M dan UIN-MALIKI PRESS (Anggota IKAPI),

Jalan Gajayana 50 Malang 65144

Telepon/Faksimile (0341) 573225,

E-mail: uinmallkipress@gmail.com

Website://press.uin-malang.ac.id

## DAFTAR ISI

DAFTAR ISI .....	iii
Bab I	
PENDAHULUAN .....	5
Bab II	
TANAMAN WIDURI ( <i>Calotropis gigantea</i> ) .....	5
2.1 Deskripsi Widuri ( <i>Calotropis gigantea</i> ) .....	5
2.2 Kandungan dan efek farmakologi Daun Widuri ( <i>Calotropis gigantea</i> ) .....	7
Bab III	
KANKER .....	9
3.1 Definisi Kanker .....	9
3.2 Sklus Sel .....	10
3.3 Proliferasi Sel .....	17
3.4 Mekanisme Kematian Sel .....	23
3.5 Apoptosis .....	24
3.6 Pengobatan Kanker .....	26
3.7 Mekanisme kerja obat antikanker/kemoterapi .....	27

## Bab IV

### Hasil Penelitian Tahap Pertama Pengembangan

#### Obat Herbal Terstandar dari Ekstrak Etanol

##### Daun Widuri (*Calotropis Gigantea*)

sebagai Obat Antikanker (Kemoterapi) Fibrosarkoma ----- 31

4.1 Road Map Penelitian ----- 31

4.2 Alat dan Bahan Penelitian ----- 33

4.3 Rancangan Penelitian ----- 34

4.4 Preparasi Sampel ----- 34

4.5 Ekstraksi Senyawa Aktif ----- 35

4.6 Uji aktivitas antikanker pada model hewan  
coba fibrosarkoma ----- 35

4.7 Hasil Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder ----- 36

4.8 Induksi Sel Kanker Fibrosarkoma  
pada Hewan Coba ----- 38

DAFTAR PUSTAKA ----- 45

## Bab I

# PENDAHULUAN

Kanker adalah penyakit yang berhubungan dengan tidak terkontrolnya kecepatan pertumbuhan sel abnormal dalam tubuh. Kanker sampai saat ini masih menjadi salah satu penyakit yang menjadi problem dunia. Kanker menyebabkan kematian yang cukup besar, ditahun 2008 tercatat 12,7 juta kasus kanker dan menyebabkan 7,6 juta kematian atau sekitar 13% dari semua kematian penduduk dunia disebabkan karena penyakit kanker (Jemal *et al*, 2011). Di Amerika kanker menjadi penyebab kematian ke-2 setelah penyakit kardiovaskuler tercatat 1.638.910 kasus kanker dan menyebabkan 577.190 jiwa kematian di tahun 2012 (Siegel *et al*, 2012). Di Indonesia kanker merupakan penyebab kematian ke-6 setelah penyakit infeksi, kardiovaskuler, kecelakaan lalu lintas, kekurangan gizi dan penyakit bawaan (Tjindarhumi dan Mangunkusumo, 2002).

Beberapa usaha pengobatan telah dilakukan secara intensif yaitu dengan pembedahan, kemoterapi dan radinterapi. Namun pengobatan tersebut masih belum mampu secara efektif menanggulangi kanker. Kegagalan yang sering terjadi dalam pengobatan kanker, utamanya melalui kemoterapi adalah disebabkan karena rendahnya

selektifitas obat-obat antikanker terhadap sel normal sehingga menimbulkan efek samping yang serius pada pasien. Selain itu kegagalan kemoterapi tersebut juga disebabkan karena resistensi sel kanker terhadap agen-agen kemoterapi. Fenomena resistensi tersebut membawa konsekuensi pada semakin meningkatnya dosis terapi (Conze, 2001). Sehingga sampai saat ini masih perlu dikembangkan obat kemoterapi baru yang efektif dan selektif guna mengatasi permasalahan tersebut di atas. Salah satu alternatif bahan obat yang bisa digunakan adalah dari bahan alam. Salah satu bahan alam yang menarik untuk diteliti adalah Widuri (*Calotropis gigantea*).

*Calotropis gigantea* (*Calotropis gigantea*) termasuk dalam famili Apocynaceae yang dilaporkan memiliki beberapa khasiat untuk menyembuhkan penyakit. Dalam Ayurveda dan Siddha daun widuri telah digunakan sebagai obat tradisional untuk pengobatan paralisis, pembengkakan, demam, gigitan ular beracun, penyakit vata, cacangan dan bisul (Kumar, Karthik and Rao, 2011). 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, cacangan dan disentri (Mardiswojo dan Radjakmanugunsudarso, 1968)

Beberapa penelitian terbaru terkait kemampuan tanaman *Calotropis gigantea* sebagai antikanker yaitu potensi sitotoksik senyawa cardenolid dari daun terhadap sel kanker fibrosarkoma MCF-7, sel kanker kulit KB, sel kanker paru NCL-H18 (Seeka dan Sutthivaiyakit, 2010), potensi sitotoksik ekstrak etanol dari daun terhadap sel MCF-7, MDA-MB-231, sel Hela, HT-29, SKOV-3, 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).

Dari data penelitian tersebut di atas dapat diketahui bahwa tanaman widuri terutama bagian daun mempunyai potensi antikanker yang tinggi. Sehingga sangat penting untuk dilakukan penelitian lanjutan sebagai langkah awal uji preklinik dalam mengembangkan obat antikanker baru yang mempunyai efektifitas dan selektifitas tinggi. Tahap uji lanjutan yang diperlukan adalah uji efektifitas antikanker pada model hewan coba yang telah diinduksi kanker.

Pada bagian akhir buku ini akan dibahas hasil penelitian tahap pertama penulis tentang pengembangan obat herbal terstandar dari ekstrak daun widuri (*Calotropis Gigantea*) sebagai obat antikanker fibrosarkoma. Penelitian ini menggunakan model hewan coba fibrosarkoma, yaitu hewan coba yang menderita keganasan sel (kanker) pada sel fibroblas. Induksi kanker dilakukan dengan pemberian benzo(a)pirena sebanyak 0,3 mg/0,2 ml dalam oleum olivarium secara injeksi subkutan pada daerah scapular. Selanjutnya dilakukan terapi ekstrak etanolik daun *Calotropis gigantea* selama 14 hari. Parameter yang ditentukan adalah berat jaringan kanker dan gambaran histopatologinya. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi antikanker ekstrak etanol daun widuri (*Calotropis gigantea*) pada model hewan coba fibrosarkoma dan perbedaan gambaran histopatologi jaringan kanker antara perlakuan kontrol dengan perlakuan terapi ekstrak etanol daun widuri.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan data aktivitas antikanker dari tanaman *Calotropis gigantea* sebagai dasar bagi pengembangannya menjadi produk antikanker berbasis tanaman obat/fitofarmaka.

## TANAMAN WIDURI (*Calotropis gigantea*)

### 2.1 Deskripsi Widuri (*Calotropis gigantea*)

Tanaman widuri banyak ditemukan di daerah bermusim kemarau panjang, seperti padang rumput yang kering, lereng-lereng gunung yang rendah dan pantai berpasir (Dalimarta, 2003).

Widuri (*Calotropis gigantea*) merupakan tanaman perdu, berumur menahun (perennial) dengan tinggi  $\pm 2$  m. Akar tanaman widuri adalah tunggang. Batang aertal, berkayu, silindris, warna putih kotor, permukaan halus, percabangan simpodial (batang utama tidak tampak jelas). Tanaman ini memiliki daun tunggal, tidak bertangkai (*sessilis*), tersusun berhadapan (*folia opposita*), warna hijau keputih-putihan, panjang 8-20 cm, lebar 4-15 cm, belahan daun agak tehal - tegar, bentuk bulat telur, ujung tumpul (*obtusus*), pangkal herlekuk (*emarginatus*), tepi rata, pertulangan menyirip (*pinnate*) dan permukaan kasar (*scaber*). Bunga majemuk, bentuk payung (*umbrello*), muncul dari ketiak daun (*axillaris*), bertangkai panjang, kelopak berwarna hijau, mahkota berwarna putih sedikit keunguan, panjang mahkota  $\pm 4$  mm. Buah bumbung (*folliculus*), bulat telur, warna hijau, bentuk dengan hiji lonjong, kecil - berwarna coklat. Bijinya kecil, lonjong.

pipih, berwarna cokelat, berambut pendek dan tebal, umbar rambut serpa sutera panjang. Perbanyakannya secara generatif (biji) (Ditjenbun, 2010).



Gambar 2.1 Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea*) (Ditjenbun, 2010)

Klasifikasi tanaman widuri adalah sebagai berikut (Ditjenbun, 2010):

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua/dikotil)
Sub Kelas	: Asteridae
Ordo	: Gentianales
Famili	: Asclepiadaceae
Genus	: <i>Calotropis</i>
Spesies	: <i>Calotropis gigantea</i>

Khasiat tanaman widuri antara lain: kulit akar widuri berkhasiat sebagai kolagoga, peluruh keringat (diaforetik), perangsang muntah (emetik), memacu kerja enzim pencernaan (alternatif), dan peluruh kencing (diuretik). Kulit kayu widuri berkhasiat sebagai obat muntah (emetik), bunga sebagai tonik dan penambah nafsu makan (stomatik). Daun berkhasiat rubifasien dan mengkilangkan gatal. Getahnya beracun dan dapat menyebabkan muntah. Namun berkhasiat sebagai obat pencabar (Dalimartha, 2003).

## 2.2 Kandungan dan efek farmakologi Daun Widuri (*Calotropis gigantea*)

Daun widuri mengandung saponin, flavonoid, polifenol, tanin, dan kalsium oksalat. Getah mengandung racun jantung yang menyerupai digitalis (Dalimartha, 2003).

Hasil uji fitokimia ekstrak hidroalkohol daun widuri menunjukkan adanya karbohidrat, alkaloid, flavonoid, steroid, protein, asam amino dan tanin. Ekstrak ini menunjukkan aktivitas antioksidan (Singh; Jain; Kannoja; Garud; Pathak and Mehta, 2010). Sedangkan kandungan fitokimia ekstrak etanol 80% daun widuri menunjukkan adanya alkaloid, *cardiac glycosides*, flavonoid, tanin, triterpenoid, karbohidrat dan saponin (Yaligar; lampa tahun). Senyawa kelompok *cardenolite glycoside* dalam daun widuri meliputi *coroglaucigenin*, *frugoside* dan *4- $\alpha$ -beta-D-glucopyranosylfrugoside* (Ahmed, Kumar and Robbins, 2005)

Hasil uji secara *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak daun widuri (*Calotropis gigantea*) memiliki aktivitas antiproliferatif dalam menghambat 6 sel kanker manusia yaitu, MCF-7, MDA-MB-231, Hela, HT-29, SKOV-3 dan HepG2 (Wong; Lim; Abdullah and Nordin, 2011).

Flavonoid, polifenol dan tanin merupakan senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan karena ketiga senyawa tersebut adalah senyawa-senyawa fenol, yaitu senyawa dengan gugus -OH yang terikat pada

karbon cincin aromatik. Flavonoid berfungsi sebagai antioksidan yang efektif dengan memberikan atom hidrogen pada radikal bebas sehingga terbentuk produk radikal bebas sendiri pada senyawa ini. Produk radikal bebas senyawa-senyawa ini terstabilkan secara resonansi akibat adanya ikatan rangkap terkonjugasi dan oleh karena itu tidak reaktif dibandingkan dengan kebanyakan radikal bebas lain (Fessenden dan Fessenden, 1982).



## KANKER

### 3.1 Definisi Kanker

Kanker merupakan penyakit yang ditandai dengan perubahan mekanisme kontrol yang mengatur proliferasi dan diferensiasi sel sehingga sel mengalami pertumbuhan yang tidak normal, cepat dan tidak terkontrol dan berkembang ke dalam populasi dari sel dan membentuk tumor lokal yang dapat menekan atau menyerang struktur jaringan sehat di sekitarnya yang akhirnya menginvasi jaringan serta menyebar ke tempat lain dari tubuh. Perubahan mekanisme ini menyebabkan gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostasis lainnya pada organisme multiseluler (Salmon & Sartorelli, 2004; Dipiro *et al.*, 2005; Raddon, 2007).

Sedangkan tumor ialah penyakit yang berbentuk benjolan atau pembengkakan yang abnormal dalam tubuh. Tumor adalah istilah umum untuk suatu benjolan yang dapat disebabkan oleh bermacam-macam penyakit, seperti neoplasma, infeksi, kelainan bawaan, dan sebagainya, tetapi dalam arti khusus tumor ialah benjolan yang disebabkan oleh neoplasma. Tumor (neoplasma) merupakan suatu lesi sebagai hasil pertumbuhan abnormal dari sel yang autonom atau relatif autonom, yang menetap walaupun

rangsangan penyebabnya telah dihilangkan. Tumor merupakan hasil transformasi neoplastik dari semua sel berinti tunggal dalam tubuh. Transformasi ini terjadi karena terjadi mutasi pada gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel, yaitu protoonkogen dan gen supresor tumor (Price & Wilson, 2005). Sedangkan neoplasma ialah penyakit pertumbuhan sel yang terjadi karena dalam tubuh timbul dan berkembang blak sel-sel baru yang bentuk, sifat, dan kinetiknya berbeda dari sel normal asalnya. Sel neoplasma itu terjadi karena ada mutasi atau transformasi sel normal akibat adanya kerusakan gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel (Sukardja, 2000).

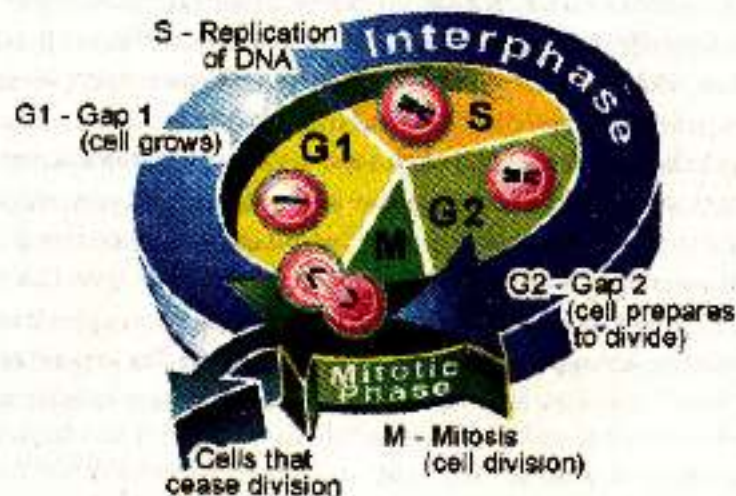
### 3.2 Siklus Sel

Siklus sel dapat dibedakan secara morfologi dan biokimawi. Jika dilihat secara biokimawi maka siklus sel menggambarkan jangka waktu antara dua waktu yang berurutan pada pembelahan sel yang terdiri dari empat fase regulasi yaitu gap 1 (G1) untuk pertumbuhan sel, sintesis DNA (S) untuk duplikasi bahan baku pada proses genetik, gap 2 (G2) untuk perbaikan pada saat pembelahan sel dimana fase G1, S dan G2 secara bersamaan disebut interfase sedangkan fase mitosis (M) untuk pelaksanaan pembelahan sel, yaitu pembelahan inti dan sitoplasma (Sukardja, 2000; Weber, 2007). Sedangkan pada fase gap 0 (G0) disebut fase istirahat dimana sel yang tidak bergerak dan tidak mengalami pertumbuhan.

Selama masa interfase, sel menghasilkan nutrisi dan adanya duplikasi dari kromatid dimana kromatid ini berhubungan langsung dengan sentromer dan mempunyai lengan panjang dan pendek (Andreeff, *et al.*, 2000). Waktu yang diperlukan untuk satu siklus masing-masing sel amat bervariasi tergantung spesies serta jenis jaringannya, berkisar antara 16-24 jam. Fase gap 1 (G1) merupakan tahap pertama fase interfase yang berlangsung diantara fase mitosis dan sebelum fase sintesis. Pada fase ini sel dipersiapkan untuk sintesis

DNA terjadi biosintesis RNA dan protein serta menghasilkan enzim-enzim yang dibutuhkan pada fase S, terutama yang dibutuhkan pada replikasi DNA. Lama fase G1 sangat bervariasi bahkan untuk spesies yang sama. Fase akhir G1 siklus sel merupakan fase sel-sel membuat kesepakatan untuk sel yaitu akan terus mengadakan pembelahan sehingga menuju fase berikutnya atau siklus sel berhenti sementara (*Growth arrest*) yang akan keluar siklus sel dan masuk ke fase G0 untuk memperbaiki DNA yang mengalami kerusakan DNA (*DNA damage*). Sedangkan kemungkinan lainnya terjadi proses penuaan sel atau *senescense* (Grander, 1998) dan selanjutnya jika kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki lagi akibat stimulasi mutagen yang terus menerus tersebut maka sel akan keluar dari siklus sel dan terjadi apoptosis atau program kematian sel (King & Cidlowsky, 1998). Selanjutnya apabila sel yang mengalami kerusakan DNA tersebut tetap tinggal di dalam siklus sel dan dapat merusak pengendali sinyal ekstrasel atau bahkan dapat melakukan program otonom yaitu sel akan menghasilkan faktor pertumbuhannya sendiri sehingga menyebabkan proliferasi sel makin tidak terkendali yang diketahui sebagai penyebab kanker (Sherr, 2000). Fase selanjutnya adalah fase S. Selama fase S dimulai kecepatan dari proses transkripsi RNA dan proses sintesis protein sangat rendah tetapi sintesis histon sangat besar pada fase ini. Selain itu juga pada fase S terjadi replikasi DNA, sehingga pada akhir fase ini isi DNA sudah kembar dan kromosom siap mengalami pemisahan. Fase gap 2 (G2) terjadi setelah fase S dan sebelum fase M. Pada fase G2 sel siap untuk membelah, proses replikasi DNA dan berbagai protein serta biosintesis disempurnakan. Tahap selanjutnya nukleus dan sitoplasma terpisah sebagai 2 anak sel pada fase M (Asikin, 2003; Weber, 2007).

Fase selanjutnya adalah fase mitosis (M) dimana pertumbuhan dan sintesis protein berhenti selama fase M dan terjadi pembelahan sel genom menjadi dua kromosom yang sama. Lama waktu pada fase M lebih pendek dibanding pada fase interfase, kemungkinan lamanya 1-2 jam (Weber, 2007).



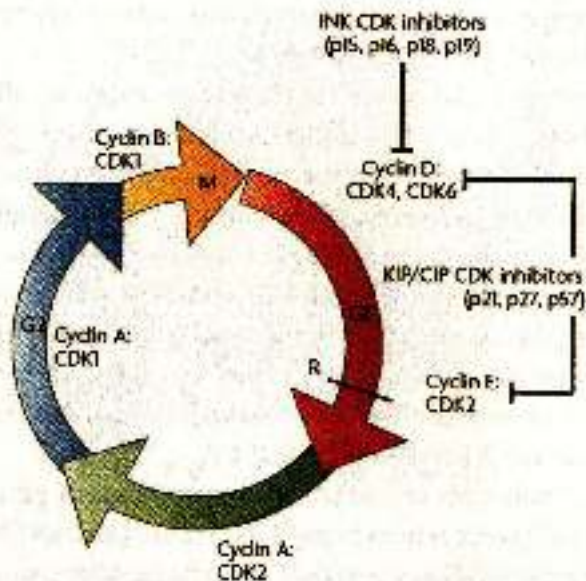
Gambar 3.1 Siklus pertumbuhan sel (Anonim, 2009)

Selain faktor diatas keluarga *cyclin* juga merupakan faktor penting dalam mengatur siklus sel. Ikatan *cyclin* dan aktivasi dari *cyclin dependent kinase* (cdk) serta *cyclin dependent kinase inhibitor* (cdki) mempunyai efek terhadap progresifitas siklus sel sehingga aktivasi dan penghambatan keluarga *cyclin* dapat dilakukan melalui progresi dari siklus sel (Weber, 2007; Amazone, 2008). Ekspresi tiap anggota *cyclin* berbeda pada masing-masing fase siklus sel (Beresford et al., 2008). Tidak kurang dari 13 jenis *cyclin* yang saat ini telah teridentifikasi, masing-masing diperlukan dan akan menghilang pada fase siklus yang berbeda. Masing-masing *cyclin* mempunyai karakteristik serta struktur yang berbeda, tergantung pada fase mana *cyclin* tersebut dibutuhkan atau tidak diperlukan. *Cyclin D1* diekspresikan selama fase G1, *cyclin E* selama fase G1 dan awal fase S, *cyclin A* selama fase S dan G2, *cyclin B* selama fase akhir dari G2. Keberadaan *cyclin* juga diperlukan oleh protein patnernya, yaitu

*cyclin dependent kinase* yang berperan penting dalam pengendalian siklus sel (Asikin, 2003; Weber, 2007)

Mekanisme umum terkait *cyclin*, cdk dan cdki dalam siklus sel, yaitu setelah menerima sinyal ekstraselular pro-mitosis, kompleks *cyclin*-cdk pada G1 menjadi aktif dan menyiapkan sel untuk ke tahap S, mempromosikan ekspresi dari faktor transkripsi yang pada gilirannya akan meningkatkan *cyclin* pada fase S dan meningkatkan enzim-enzim yang dibutuhkan untuk replikasi DNA. Protein fosforilasi dari aktif *cyclin* cdk pada fase S yang membentuk kompleks pre-replikasi yang dikumpulkan selama tahap G1 pada replikasi DNA. Fosforilasi disini bertujuan mengaktifkan kompleks pre-replikasi dan mencegah kompleks terbentuk kembali (Kumar, 2004)

Pada semua jenis keganasan, gangguan siklus sel yang terdiri dari 4 fase yang berurutan yaitu gap 1 (G1), fase S (sintesis DNA), gap 2 (G2) dan mitosis (M) merupakan faktor penting dalam patogenesis molekuler kanker terutama pada gen-gen pengatur siklus sel pada fase transisi G1/S. Mekanisme pengaturan molekuler siklus pembelahan sel melibatkan banyak gen-gen pengatur positif dan negatif yang terjadi pada fase transisi G1/S sebelumnya disebut sebagai pusat pengendali restriksi atau *restriction point control* siklus sel yang pertama kali ditemukan oleh Arthur Pardee (Sherr, 2000) seperti dapat dilihat pada gambar 3.2.



Gambar 3.2 Pengaturan molekular siklus sel kanker fase G1/S (Sherr, 2000)

Sedangkan jika dilihat dari segi morfologis, siklus sel dibagi menjadi tiga tahap, yaitu :

- (i) **Amitosis** dimana satu sel membelah secara langsung, ditengah-tengah sel menjadi dua sel anak yang sama besar dengan komponen yang sama seperti sel induk.
- (ii) **Mitosis** dimana sel yang membiak secara mitosis mempunyai dua fase, yaitu :

**Fase mitosis**, yaitu fase pada saat sel membelah menjadi dua sel anak, lamanya 2,5-3 jam. Fase mitosis dibagi lagi menjadi empat fase, yaitu: **Profase**, yang lamanya ± 1 jam. Pada awal profase, sentrosom dengan sentriolnya mengalami replikasi dan dihasilkan dua sentrosom. Masing-masing sentrosom hasil pembelahan bermigrasi ke sisi berlawanan dari inti. Pada saat bersamaan, mikrotubul muncul diantara dua sentrosom dan

membentuk benang-benang *spindle*, yang membentuk seperti bola. Pada saat bersamaan, kromosom teramati dengan jelas di dalam inti yang berupa benang-benang halus. yaitu terdiri dua kromatid identik yang terbentuk pada interfase. Dua kromatid identik tersebut bergabung pada sentromernya. Benang-benang *spindel* terlihat memanjang dari sentromer dan sentriol menggandakan diri dan masing-masing menuju kutub (Campbell *et al.*, 1999).

**Metafase**, yang lamanya < 1 jam. Pada metafase selaput inti dan nukleolus menghilang. Dari sentriol di kutub nampak adanya benang-benang halus menuju ekuator. Kromosom mengatur diri menuju ekuator dan membelah menjadi 2 bagian yang sama, sehingga terbentuklah 2 sel anak yang sama besar. Kromatid bersaudara bergerak ke bagian tengah inti membentuk lemping metafase (*metaphasic plate*) (Campbell *et al.* 1999).

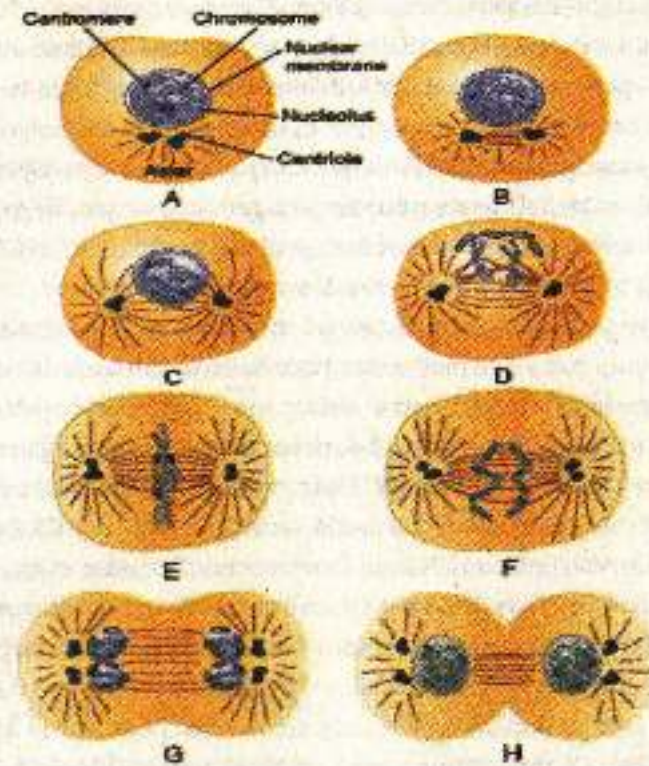
**Anafase**, yang lamanya ± 0,5 jam. Pada anafase kromosom memisahkan diri di ekuator, separuh menuju sentriol di kutub utara dan separuhnya lagi menuju sentriol di kutub selatan dengan tuntunan henang sentriol.

**Telofase**, yang lamanya beberapa menit. Pada telofase sitoplasma membelah dan memisah menjadi 2 bagian, selaput inti nampak lagi dan sel terbelah menjadi 2 sel anak yang sama. Kromosom saudara tampak tidak beraturan dan jika diwarnai, akan nampak jelas dengan pewarna histologi (Campbell *et al.* 1999).

**Interfase**, Saat interfase tidak terjadi pembiakan sel, lamanya sangat bervariasi dari beberapa hari sampai tahunan. Pada interfase sel anak yang masih muda yang baru terbentuk berkembang menjadi dewasa, yang masing-masing hanya mengandung kromosom yang terdiri dari satu untai rantai tunggal DNA [haploid]. Mendekati akhir interfase sebelum masuk ke fase mitosis, terjadi sintesis DNA, enzim dan protein dan terjadi replikasi rantai tunggal menjadi rantai ganda DNA.

Tahap berikutnya terlihat henang-benang *spindle* hilang dan kromosom tidak terlihat (membentuk kromatin; difus). Keadaan seperti ini merupakan karakteristik dari interfase. Pada akhirnya membran inti tidak terlihat diantara dua anak inti. Sitokinesis, selama fase akhir pembelahan mitosis muncul lekukan membran sel dan lekukan makin dalam yang akhirnya membagi sel tua menjadi dua sel anak. Sitokinesis terjadi karena dibantu oleh protein aktin dan miosin (Campbell *et al.* 1999).

- (iii) **Meiosis**, yaitu pembelahan reduksi yang hanya terjadi pada sel kelamin, yaitu sel sperma pada pria dan sel ovarium pada wanita. Meiosis terjadi dalam 2 fase, yaitu fase I dan fase II.
- (a) Pada fase I terjadi duplikasi kromosom. Profase pada fase I dibagi menjadi 6 fase yaitu proleptonema, leptonema, zygonema, pachynema, diplonema, dan diakinesis. Pembelahan fase I pada pria menghasilkan sel spermatosit dan pada wanita sel oosit.
  - (b) Pada fase II terjadi dua kali pembelahan. Pada laki-laki menghasilkan sel sperma dan pada perempuan sel ovum yang merupakan sel haploid.



Gambar 3.3 Siklus morfologis pertumbuhan sel A, B, C: Profase; D: Prometafase; E: Metafase; F: Anafase dan H: Telofase (Anonim, 2002)

### 3.3 Proliferasi Sel

Aktivitas proliferasi dari populasi sel atau meningkatnya populasi sel, akan menyebabkan pertumbuhan jaringan maupun organ. Keseimbangan dalam pertumbuhan ini harus terkontrol. Setelah manusia dewasa, maka jumlah sel relatif tetap dan tidak

terjadi pembelahan sel (mitosis). Pembelahan sel pada orang dewasa bertujuan untuk menggantikan sel yang mati, yang diakibatkan oleh proses apoptosis atau nekrosis. Bila jumlah sel yang lebih banyak, maka akan terjadi penyusutan jaringan atau organ dan sebaliknya bila sel yang diproduksi lebih banyak dari yang seharusnya digantikan maka akan terjadi pertumbuhan jaringan atau organ. Kegagalan kontrol mekanisme ini dapat mengakibatkan aktivitas proliferasi sel tidak terkendali (Rosai, 2004; Kumar *et al.*, 2005).

Kecepatan dari proliferasi sel itu sendiri pada populasi sel bergantung pada tiga parameter yaitu kecepatan pembelahan sel, fraksi pada sel dari populasi dalam menjalani pembelahan sel serta kecepatan hilangnya sel dari populasi terkait dengan akhir diferensiasi dan kematian sel. Pada pembelahan sel dapat dibagi menjadi dua kelas yaitu fase S dan M, serta fase persiapan G1 dan G2. Fase S terjadi replikasi DNA. Di bawah kondisi normal waktu yang dibutuhkan manusia dalam menghasilkan fase S yang lengkap adalah 8 jam dan itu bervariasi antar individu. Replikasi kromosom yang lengkap dipisahkan pada tiap dua inti yang sama dari fase mitosis selama fase M. Dimana waktu yang dibutuhkan pada fase M adalah 1 jam. Fase G1 mendahului fase S, sedangkan fase G2 mendahului fase M. Fase G1 dan G2 dibutuhkan untuk sebagai bahan pokok pada sintesis sel dan mendukung pembelahan sel.

Kesuksesan dari pembelahan sel membutuhkan transisi searah dan keterlibatan dalam prosesnya dari satu fase siklus sel ke fase berikutnya (Andreoff *et al.*, 2000). Aktifitas proliferasi dapat dipengaruhi oleh faktor ekstraseluler maupun intraseluler. Faktor eksternal yang berpengaruh terhadap proliferasi sel diantaranya, yaitu faktor pertumbuhan (*Growth Factors=GF*), *cyclin* dan *cyclin dependent kinase* (cdks), *Rb family*. Molekul faktor pertumbuhan akan dapat berfungsi kalau dikenali oleh reseptor yang terdapat pada permukaan sel, yang disebut reseptor faktor pertumbuhan (*Growth Factor receptor=GFR*). Berbagai penelitian membuktikan bahwa

GFR merupakan protein yang terdiri dari berbagai komponen, yaitu komponen di luar sel yang akan berikatan dengan GF, komponen transmembran dan protein kinase di bagian dalam membran sel (Krisno, 2003). Aktivasi GFR sebagai akibat terjadi ikatan dengan GF, merupakan suatu jaringan aktivitas sampai pengikatan protein tertentu pada DNA dalam inti sel yang mengakibatkan beberapa gen spesifik pengontrol proses proliferasi sel menjadi aktif. Dengan demikian mudah dimengerti bahwa mutasi proto-onkogen yang berperan aktif dalam proses sinyal transduksi dapat mengganggu keseimbangan siklus sel dalam berproliferasi.

Ada tiga tipe jalur transduksi sinyal yang aktif pada sel untuk merespon faktor pertumbuhan (GF) atau merangsang mitogenik. Respon dari rangsangan ini pada sel bervariasi dari tipe sel dan berlanjut pada jalur untuk sel tumbuh lebih besar dan lengkap. Ketiga tipe jalur ini terus menjadi penelitian dan dipertimbangkan sebagai hal yang penting dalam regulasi siklus sel secara biologik (Wyllie, 2005).

#### 1. Jalur pertama adalah MAP Kinase (MAPK)

Pada tipe ini bekerja melalui fosforilasi *cascade*, dimulai dengan faktor pertumbuhan (GF) berikatan dengan *tyrosine kinase receptor* pada permukaan sel. Hal ini menyebabkan dimerisasi reseptor sehingga terjadi fosforilasi dari dua molekul reseptor, menyebabkan aktivitas protein Ras (p21). Aktivitas Ras terjadi melalui protein Grb2 dan SOS. Selanjutnya Ras atau p21 yang aktif mengikat ujung amino Raf, Raf memfosforilasi MEK, mengaktifkan MAP kinase kinase (MAPKK), mengaktifkan ERK (*extracellular regulated kinase*). ERK yang aktif ditranslokasikan ke inti sel untuk mempengaruhi faktor transkripsi seperti *jun*, *c-myc*, *c-fos*. Hasil fosforilasi dari MAPK juga digunakan untuk mengontrol proses transkripsi, siklus sel dan menata ulang dari sitoskeleton (Kandel *et al.*, 2000; Wyllie, 2007).

## 2. Jalur Protein kinase C (PKC)

Terdiri dari keluarga fosfolipid *dependent protein kinase*. PKC diregulasi dengan variasi yang luas dari jalur metabolisme yang melibatkan fosfolipid dan jumlah kalsium pada sel. Regulator utama dari jalur ini adalah *diacylglycerol* (DAG) dimana nampak mengambil PKC pada membran plasma dan menjadi penyebab terjadinya aktivasi. Ketika telah aktif, PKC dapat memfosforilasi sejumlah substrat selular dalam jumlah besar untuk meregulasi proliferasi dan diferensiasi sel. Beberapa kejadian juga terlihat PKC berinteraksi dengan jalur MAPK.

## 3. Jalur Lintas JAK/STAT (*Janus Kinase/Signal transducer and activator of transcription*)

Jalur ini diaktivasi oleh interaksi *cytokine* dengan keluarga reseptor yang dikenal dengan keluarga reseptor *cytokine*. Reseptor ini tidak mengandung domain protein kinase sendiri, tetapi mereka berhubungan dengan bentuk aktif dari keluarga protein kinase yang dikenal dengan sebutan JAK (*Just Another Kinase* atau Janus kinase). Pengikatan ligan menyebabkan dimerisasi rantai spesifik dari reseptor sehingga menyebabkan autofosforilasi reseptor melalui kerja JAK kinase. Selanjutnya reseptor yang sudah terfosforilasi menarik molekul STAT sehingga terikat melalui domain SH<sub>2</sub>, selanjutnya mengalami fosforilasi pada residu tirosin dan melalui autodimerisasi terlepas dari reseptor dan translokasi ke inti sel untuk mempengaruhi transkripsi gen.

Menilai aktivitas proliferasi sel merupakan satu langkah penting didalam menentukan status *cellular population* dan potensi keganasan kanker. Didalam kegunaan praktis penilaian aktivitas proliferasi sel merupakan salah satu cerminan tingkat keganasan suatu neoplasma. Sampai saat ini belum ditemukan metode yang memuaskan untuk melakukan penilaian aktivitas proliferasi sel.

Hal ini disebabkan oleh karena berbagai metode yang digunakan sampai saat ini bersifat penilaian sesaat dengan menghitung hasil dari aktivitas proliferasi tanpa menlal proses proliferasi secara utuh termasuk memperhitungan waktu yang dibutuhkan. Sehingga hasil yang didapat berupa cerminan *proliferation rate* yang mencerminkan jumlah perbanyakkan sel dalam kurun waktu tertentu.

Beberapa metode yang dipakai untuk menilai aktivitas proliferasi sel :

- Indeks mitosis adalah pemeriksaan morfologi sederhana secara konvensional memakai mikroskop cahaya terhadap fase mitosis. Penilaian dengan menghitung jumlah mitosis berdasar standar gambaran morfologi yang ditemukan. Banyaknya mitosis merupakan informasi yang bermanfaat untuk menentukan derajat keganasan neoplasma, terutama jenis-jenis limfoma, melanoma, sarkoma jaringan lunak dan karsinoma payudara (Cotran, 1999)
- Pendekatan lain untuk menilai aktivitas proliferasi adalah dengan memanfaatkan proses sintesis DNA, dimana selama fase S terjadi *doubling*, sehingga *diploid genome* menjadi tetraploid menjelang fase mitosis. Proses ini dapat diukur dengan berbagai cara *thymidinlabelling*, *bramodeoxyuridine incorporation* dan *flowcytometry*. Howard dan Pele (1953) dengan menggunakan *H3 labelling thymidine* berhasil mengidentifikasi terdapatnya fase S. *H3 thymidine* ini secara spesifik terikat ke dalam DNA yang disintesis setelah dilakukan injeksi. Teknik analisis proliferasi sel dengan menggunakan *H3-thymidine* ini secara etis tidak dapat digunakan pada manusia oleh karena bersifat radioaktif (Besertford, 2009)
- Metode imunohistokimia, dimana prinsip ini dipakai pada Ki67, PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) termasuk untuk menganalisa pola ekspresi berbagai gen yang berperan dalam pengendalian siklus sel. Pembelahan secara aktif akan memproduksi

sejumlah protein yang khas. Hal ini dapat dimanfaatkan sebagai petanda antigen untuk studi proliferasi sel. Pada tahun 1983 Gerdes melaporkan suatu antibodi monoklonal tikus yang dapat mengenal antigen inti sel yang terekspresi pada semua fase siklus sel kecuali fase G0. Antibodi monoklonal ini disebut Ki67. Protein lain yang diekspresikan oleh sel dalam proses proliferasi adalah PCNA. Menurut Bravo (1987) PCNA merupakan suatu protein inti sel non-histon yang tingkat sintesisnya mempunyai korelasi langsung dengan proliferasi pada sintesis DNA. Kadar PCNA meningkat dalam inti sepanjang fase G1 akhir menjelang terjadinya sintesis DNA menjadi maksimal pada fase S kemudian menurun pada fase G2 dan M

- d. *Nucleolar Organizer Regions*, yaitu suatu segmen kromosom dimana rDNA gen dijumpai. Segmen ini dapat ditunjukkan dan diidentifikasi secara morfologis melalui pengecatan "one step silver staining metode". Cara ini pada prinsipnya mengidentifikasi non histon protein yang bersifat *argophylic* (AgNOR protein). Penggunaan pengecatan ini memberikan gambaran Ag positif pada *nucleolus*, sesuai dengan adanya *fibrillar center* serta *fibrillar komponen* yang lain pada pemeriksaan ultrastruktur. Jumlah, ukuran serta pola distribusi dari Ag positif dapat dipakai sebagai petunjuk untuk menilai aktivitas proliferasi sel tumor (Putzai, 1996). Antigen antibodi kompleks yang dapat dideteksi apabila antibodi yang mengikatnya telah diberi label. Pada imunohistokimia labelisasi menggunakan aktifitas enzim, yang akan menghasilkan warna setelah diberi tambahan kromogen. Warna akan tampak pada daerah kompleks-enzim-antibodi didalam jaringan yang terlihat dengan pemeriksaan mikroskop cahaya. Sebagai sarana diagnosis, ada beberapa keuntungan yang didapat dengan menggunakan pemeriksaan imunohistokimia, misalnya dengan teknik monoklonal antibodi dan teknik hibridoma dapat ditingkatkan sensitifitas dan spesifisitasnya (Wasito, 1991; Beserford, 2009)

### 3.4 Mekanisme Kematian Sel

#### a. Nekrosis

Kematian sel dapat didefinisikan sebagai kehilangan integritas dari sel membran permeabel secara irreversibel. Ada tiga tipe kematian sel yang dapat dibedakan dari bentuk morfologinya. Tipe pertama yaitu apoptosis kematian sel yang menyebabkan perubahan karakteristik dari morfologi dari inti, termasuk kondensasi kromatin dan fragmentasi, perubahan kecil dari organel sitoplasma, pembentukan *blebs* dari membran plasma dan badan apoptosis (*apoptotic bodies*) yang terdiri dari inti dan sitoplasma. Kesemua perubahan pada apoptosis terjadi sebelum membran plasma kehilangan integritasnya. Tipe kedua yaitu kematian sel yang dikarakteristik oleh akumulasi secara besar-besaran oleh dua membran *autophagic vacuoles* pada sitoplasma. Tipe ketiga dikenal dengan sebutan nekrosis. Nekrosis adalah istilah yang sangat umum untuk menamakan suatu kematian sel atau sekelompok sel. Pada mulanya kematian sel dikenal dengan nekrosis atau lisis. Nekrosis terutama disebabkan oleh peningkatan lisosom akibatnya adanya suatu rangsangan (misal iskemi) yang menyebabkan organel intraseluler rusak, metabolisme sel berhenti. Disamping itu iskemia dapat mengakibatkan gangguan ATP, terjadi gangguan transport ion pada membran sel, kegagalan pada pompa sodium, peningkatan sodium intrasel, sel menjadi bengkak dan akhirnya terjadi lisis dari sel (Kroemer, 2006)

Nekrosis juga terjadi ketika sel mengarah pada variasi yang sangat besar dari kondisi fisiologik (contoh hipotermia dan hipoksia) dimana mungkin berbahaya bagi membran plasma. Dibawah kondisi histologik, hubungan kerusakan pada membran plasma juga dikaitkan dengan komponen lain seperti lisisnya virus (Wyllie, 2005).

Awal nekrosis ditandai dengan hilangnya kemampuan sel untuk mempertahankan homeostasis, mendorong kearah influk dari air dan ion ekstraselular. Organel intraselular khususnya mitokondria dan

hampir seluruh bagian sel mengalami pembengkakan dan pemecahan (sel lisis). Hal ini juga terkait pada batas perpecahan membran plasma, isi sitoplasma termasuk enzim lisosom akan keluar melalui celan ekstraselular. Oleh karena itu kematian sel secara nekrosis pada *in vivo* seringkali dikaitkan dengan kerusakan jaringan secara luas yang menghasilkan respon inflamasi (Wyllie, 2005).

### 3.5 Apoptosis

#### a. Definisi Apoptosis

Pada makhluk hidup multiseluler, homeostasis dipertahankan melalui keseimbangan antara proliferasi atau perkembangbiakan sel dan kematian sel. Dengan ketiadaan perubahan dalam laju proliferasi sel, perubahan dalam laju kematian sel dapat mengakibatkan terjadinya akumulasi atau kehilangan sel. Akumulasi sel terjadi bila laju kematian sel lebih rendah dibanding proliferasi sel, sebaliknya bila laju kematian sel lebih besar maka kehilangan sel akan terjadi. Walaupun telah banyak diketahui tentang kontrol dari proliferasi sel, kontrol dari kematian sel masih sangat sedikit diketahui dan masih terus dipelajari. Kematian sel secara fisiologik terjadi terutama melalui bentuk kematian sel yang disebut dengan apoptosis. Keputusan dari suatu sel mengalami apoptosis dapat dipengaruhi oleh sejumlah rangsangan dari luar sel (Naim, 2006)

Apoptosis atau dikenal sebagai *programmed cell death* merupakan kematian sel terprogram yang secara fisiologis berupa kemampuan sel untuk menghancurkan diri bila mengalami perubahan atau kerusakan dan merupakan keadaan yang tidak dapat dihindari bagi sel untuk mati (Ashkenazi, 1998; Hardin *et al.*, 2003). Proses ini bertanggung jawab dalam keseimbangan jumlah sel dan dengan apoptosis, organisme dapat mengontrol jumlah sel dalam jaringan dan membuat sel itu sendiri yang menjadi ancaman bagi kelangsungan hidup organisme (Ashkenazi, 1998; Cooper & Hausmann, 2004). Apoptosis pertama diidentifikasi sebagai bentuk kematian sel

berdasarkan morfologinya. Penelitian mengenai insiden biokimiawi dan genetik merupakan prediksi dari peranannya dalam mengontrol sel ditentukan secara genetik dan alamiah sehingga kontrol genetik dan mekanisme biokimia dari apoptosis menjadi lebih dimengerti dalam perkembangan dan strategi terapi yang mengatur kejadian dalam proses penyakit (Carson & Roberto, 1993; Cotran *et al.*, 1999)

Apoptosis memainkan peranan penting dalam perkembangan sel normal vertebrata. Sebagai contoh, hal yang bertanggungjawab untuk regresi dari ekor *tadpole* (berudu) yang mengambil tempat selama metamorfosis menjadi seekor kodok dan untuk memindahkan *interdigital webs* selama pertumbuhan anggota gerak pada embrio mamalia.

Pada mamalia dewasa, apoptosis terjadi secara berkesinambungan dalam populasi sel yang berproliferasi lambat seperti epitel hati, prostat dan korteks adrenal dan dalam populasi yang berproliferasi cepat seperti epitel intestinal yang membentuk kriptas dan diferensiasi spermatogonia. Walaupun banyak sel yang hilang dalam populasi pada tipe yang lebih lambat secara jelas adalah hasil dari kumpulan sel-sel jaringan, dalam kenyataannya, mitosis dan apoptosis seimbang satu sama lain dibawah kondisi yang siap.

Apoptosis juga merupakan proses penting dalam pengaturan homeostasis normal, proses ini menghasilkan keseimbangan dalam jumlah sel jaringan tertentu melalui eliminasi sel yang rusak dan proliferasi fisiologis dan dengan demikian memelihara agar fungsi jaringan normal

Proses apoptosis ini memiliki kegunaan yang luas dalam proses biologis, seperti pada proses perkembangan, diferensiasi, proliferasi atau homeostatis, regulasi, fungsi imun, perbaikan kecacatan karena pengaruh sel yang berbahaya. Deregulasi apoptosis mengakibatkan keadaan patologis, termasuk proliferasi sel secara tidak terkontrol seperti dijumpai pada kanker. Ada berbagai bukti yang menyatakan kontrol apoptosis dikaitkan dengan gen yang mengatur berlangsungnya siklus

sel, diantaranya gen p53, Rb, Myc, E1A dan keluarga Bcl-2. Gangguan regulasi dan proliferasi sel haik akibat aktivitas onkogen dominan maupun inaktivasi tumor suppressor genes ada hubungannya dengan kontrol apoptosis. Beberapa jenis virus onkologik melaksanakan proses transformasi sel dengan cara mengganggu fungsi apoptosis dalam sel misalnya SV40, herpes dan adenovirus, poliooma maupun virus *Epstein Barr* (EBV) (Goepel, 1996).

### 3.6 Pengobatan Kanker

Ada beberapa cara pengobatan kanker yang berbeda dan masing-masing dapat diterapkan secara serentak atau secara serial, yakni :

#### a. Operasi pengangkatan jaringan

Tindakan ini sangat efektif jika eksisi tumor primer disertai dengan eksisi tepi jaringan normal dan mungkin disertai pula eksisi kelenjar getah bening regional. Hal ini akan menghilangkan sel kanker dari tubuh atau mengurangi sel kanker sampai ke titik saat daya tahan tubuh mampu menghilangkan sel kanker yang masih tersisa. Tetapi banyak tumor yang tidak dapat dioperasi karena tumor primer tidak dapat dieksisi seluruhnya tanpa mengorbankan struktur lokal yang penting atau karena telah terjadi metastasis (Sylvia dan Lorraine,2005).

#### b. Radioterapi

Yaitu memberikan radiasi ionisasi pada neoplasma. Pengaruh radiasi yang mematikan lebih besar pada sel-sel kanker yang sedang proliferasi dan berdiferensiasi buruk dibandingkan terhadap sel-sel normal yang berada didekatnya, sehingga jaringan normal mungkin mengalami cedera dalam derajat yang dapat ditoleransi dan diperbaiki, sedangkan sel kanker dapat dimatikan. Cara pengobatan ini memiliki keterbatasan, beberapa tumor dapat radioresisten. Tumo

yang telah tersebar luas juga tidak dapat diobati dengan radioterapi, karena iradiasi pada daerah tubuh yang luas akan memberikan resiko morbiditas yang tidak dapat ditoleransi atau bahkan mematikan (Sylvia dan Lorraine,2005).

#### c. Kemoterapi

Yaitu memaparkan sel-sel kanker yang berproliferasi dan sel-sel normal yang dengan agen sitotoksik. Sel-sel kanker yang tersebar luas hingga tidak mungkin untuk dioperasi atau ditangani dengan radioterapi dapat dihilangkan dengan pemberian obat secara sistemik yang toksisitasnya terhadap sel-sel normal cukup rendah untuk dapat ditoleransi. Setiap sel kanker memiliki kepekaan yang berbeda terhadap satu obat atau kombinasi obat-obat tertentu dan tidak ada satu obat yang dapat dipakai untuk semua macam tumor. Keterbatasan kemoterapi yaitu toksisitasnya terhadap sel-sel normal yang berproliferasi cepat, seperti sel-sel hematopoietik atau sel-sel epitel pada lapisan sumsum tulang atau saluran pencernaan (Sylvia dan Lorraine,2005).

#### d. Immunoterapi

Sel-sel kanker sering memiliki perbedaan antigen dengan sel normal, perbedaan ini dapat membangkitkan reaksi imunologik. Tindakan pengobatan dengan stimulasi imunologik penderita kanker telah menunjukkan hasil yang menjanjikan pada beberapa keadaan (Sylvia dan Lorraine,2005).

### 3.7 Mekanisme kerja obat antikanker/kemoterapi.

Ditinjau dari siklus sel, obat dapat digolongkan dalam 2 golongan, yakni :

1. Obat yang toksisitas selektif terhadap fase-fase tertentu dari siklus sel, yang disebut zat cell cycle-specific (CSS), misalnya vincristin, vinblastin, merkaptopurin, hidroksijurva, metotreksat

dan asparaginase. Obat golongan ini terbukti efektif terhadap kanker yang berproliferasi tinggi misalnya kanker sel darah.

2. Obat yang termasuk cell cycle-nonspecific (CCNS) misalnya zat alkilator, antibiotik antikanker (daktinomisin, daunorubisin, doksorubisin, mitomisin)

Perbedaan kerja tersebut bersifat relatif, karena beberapa obat pada golongan CCNS dapat lebih efektif terhadap sel yang sedang berproliferasi dan terhadap sel-sel yang sedang dalam fase tertentu siklusnya (Nafrialdi; Sulistia, 2000)

Kerja antikanker pada proses dalam sel :

1. Alkilator : pembentukan ion karbonium atau kompleks lain yang sangat reaktif. Ikatan kovalen (alkilasi) akan terjadi dengan berbagai nukleofilik penting dalam tubuh misalnya sulfat, amino, hidroksil. Efek sitotoksik maupun efek sampingnya berhubungan langsung dengan terjadinya alkilasi DNA.
2. Antimetabolit : Antipurin dan antipirimidin mengambil tempat purin dan pirimidin dalam pembentukan nukleosida, sehingga mengganggu berbagai reaksi penting dalam tubuh.
3. Alkaloid vinka : Berikatan secara spesifik dengan protein tubulin, sehingga menghambat polimerisasi mikrotubulus.
4. Antibiotik :
  - Antrasiklin : Berinteraksi dengan DNA, sehingga fungsi DNA sebagai template dan pertukaran sister chromatid terganggu. Bereaksi dengan sitokrom P450 reduktase yang membentuk zat perantara, dan bereaksi dengan oksigen menghasilkan radikal bebas yang menghancurkan sel.
  - Aktinomisin : Menyebabkan putusannya rantai tunggal DNA yang mungkin akibat terbentuknya radikal bebas selain itu juga mengblokir polimerase RNA.
  - Bleomisin : Menyebabkan fragmentasi dan translokasi kromatid.

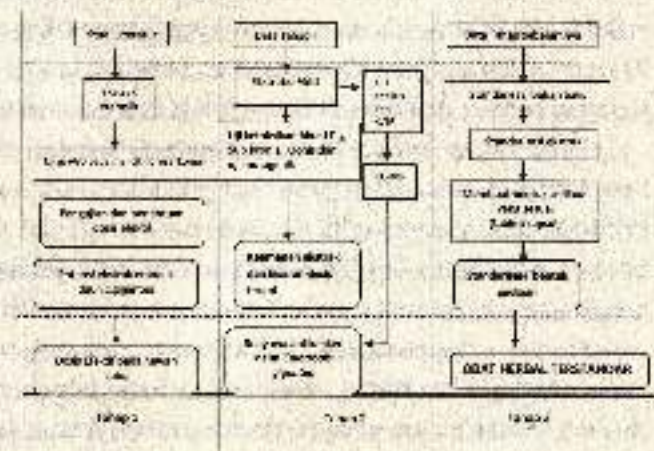
Asparaginase : Hidrolisis asparagin menjadi asam aspartat, sehingga sel kanker kekurangan asparagin dan terjadi kematian sel (Nafrialdi; Sulistia, 2000)

**Hasil Penelitian Tahap Pertama Pengembangan Obat Herbal Terstandar dari Ekstrak Etanol Daun Widuri (*Calotropis Gigantea*) sebagai Obat Antikanker (Kemoterapi) Fibrosarkoma**

**4.1 Road Map Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian yang berkelanjutan dengan *road map* penelitian :

**Road Map Penelitian**



Gambar 4.1 Road map penelitian daun *Calotropis gigantea* sebagai obat antikanker

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi antikanker yaitu sebagai obat kemoterapi dari ekstrak etanol daun widuri (*Calotropis gigantea*) pada model hewan coba fibrosarkoma. Penelitian ini merupakan langkah awal uji preklinik yang dapat bermanfaat sebagai dasar untuk uji preklinik lanjutan seperti penentuan dosis efektif, keamanan, standarisasi sediaan ekstrak. Beberapa langkah yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu yang pertama preparasi sampel, yang kedua ekstraksi serbuk daun widuri (*Calotropis gigantea*) dengan pelarut etanol, ketiga induksi sel kanker dengan DMBA (dimethyl benzene antrasena) dan yang keempat uji efektivitas ekstrak daun widuri terhadap sel kanker fibrosarkoma.

Pada penelitian tahap pertama dilakukan ekstraksi daun *Calotropis gigantea* dengan pelarut etanol 70%. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antikanker secara *in vivo* pada hewan coba mencit galur balb/c yang telah diinduksi dengan benzo(a)pirena. Setelah diketahui potensi antimalaria pada tanaman ini maka dilakukan penentuan dosis efektif ekstrak etanolik daun *Calotropis gigantea* sebagai antikanker. Parameter potensi yang didapatkan pada pengujian ini adalah berat jaringan kanker, gambaran histopatologi dan dosis efektif.

Pada tahap kedua dilakukan penelitian lanjutan dengan berdasar pada data-data yang diperoleh dari tahap sebelumnya. Pada penelitian lanjutan ini ada beberapa pengujian yang penting untuk dilakukan yaitu uji ketoksikan akut, ketoksikan sub kronis, kronis dan uji antimutagenik. Tujuan pengujian ini adalah untuk mengetahui keamanan ekstrak tanaman pada organ atau tubuh manusia jika dikonsumsi sebagai obat baik dalam jangka waktu singkat, sedang maupun dalam jangka panjang. Pengujian dilakukan dengan menggunakan model hewan coba mencit. Dari pengujian ini akan diperoleh parameter keamanan ekstrak berupa kisaran dosis letal LD<sub>50</sub> (Lethal Dose 50%), SGOT-SGPT (fungsi faal hati), gambaran histologi organ ginjal, jantung, lambung dan hati. Selain itu pada

penelitian tahap kedua ini juga dilakukan identifikasi ekstrak aktif dengan kromatografi lapis tipis, isolat yang diduga dari tanaman terkait akan dilakukan identifikasi lebih lanjut dengan LC-MS untuk mengetahui jenis senyawa aktifnya.

Pada tahap ketiga dilakukan standarisasi bahan baku, ekstrak dan bentuk sediaan obat. Tujuan standarisasi bahan baku dan ekstrak adalah agar sediaan herbal yang akan dibuat mempunyai kualitas/mutu yang konstan dan sesuai dengan standar yang telah ditetapkan dalam Farmakope herbal Indonesia dan atau materia Medika. Pemilihan bentuk sediaan penting untuk dilakukan dengan tujuan untuk mencari bentuk sediaan yang sesuai dengan sifat bahan baku dan tujuan penggunaannya, sehingga bentuk sediaan tersebut memberikan keamanan, khasiat dan mutu yang paling tinggi. Setelah dilakukan beberapa tahapan di atas maka produk obat antikanker siap untuk didaftarkan menjadi Obat herbal Terstandar.

#### 4.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian pemisahan dan uji fitokimia adalah mortar, neraca analitik, gelas ukur 100 ml, gelas beker 100 ml, pengaduk kaca, *aluminium foil*, penyaring *Buchner*, kertas saring, *rotary evaporator*, *shaker*, desikator, corong gelas, tabung reaksi, pipet ukur 5 ml, lampu UV, *vortex*, jangka sorong, *erlemeyer* 500 ml, lampu UV, plat KLT F<sub>254</sub>, kertas saring *whatman*, bejana pengembang. Alat yang digunakan dalam uji antikanker adalah kandang hewan coba, botol minum, tempat makan mencit, kawat, gunting, jarum trokar, sonde lambung, jangka sorong, pinset, sarung tangan.

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun widuri (*Calotropis gigantea*). Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan galur balb/c dengan umur 10-12 minggu yang diperoleh dari Laboratorium Universitas Airlangga. Induksi tumor dengan bahan benzo(a)pirena.

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: CMCNa, pelarut etanol 70%, aquades, reagen Dragendorf, reagen Liebermann-Burchard, kloroform, metanol, butanol, asam asetat, n-heksana, etil asetat, serbuk kayu, air minum aqua. Adapun determinasi tanaman dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Jawa Timur.

#### 4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental di laboratorium. Sampel daun widuri dikeringkan kemudian diserbukkan. Serbuk sampel diekstraksi secara bertahap menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak yang diperoleh dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian diuji aktivitas antikanker secara *in vivo* yaitu pada model hewan coba fibrosarkoma. Selanjutnya akan diamati berat jaringan kanker, dan gambaran histopatologi organ serta ditentukan dosis efektif antikanker.

#### 4.4 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun dari tanaman widuri (*Calotropis gigantea*) yang telah dikeringkan. Tahap pertama diambil bagian daun tanaman dan dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam. Pengeringan tersebut diharapkan tidak merusak kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman tersebut. Pengeringan dimaksudkan untuk mengurangi kadar air, menghentikan reaksi enzimatis, dan mencegah tumbuhnya jamur sehingga dapat disimpan lebih lama dan tidak mudah rusak serta komposisi kimianya tidak mengalami perubahan.

Tahap kedua, sampel yang telah kering berwarna hijau kecoklatan ini dihaluskan dengan menggunakan blender untuk memperoleh serbuk sampel yang berukuran halus dengan permukaan yang cukup

banyak sehingga dapat mempermudah proses ekstraksinya. Voight (1995) menyatakan semakin kecil bentuknya semakin besar luas permukaannya maka interaksi zat cairan ekstraksi akan semakin besar, sehingga proses ekstraksi akan semakin efektif. Serbuk dengan penghalusan yang tinggi kemungkinan sel-sel yang rusak juga semakin besar, sehingga memudahkan pengambilan bahan kandungan langsung oleh bahan pelarut. Selanjutnya serbuk yang digunakan untuk proses ekstraksi maserasi.

#### 4.5 Ekstraksi Senyawa Aktif

Di masukkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus ke dalam sebuah bejana, dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup, biarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, diserkai, diperas, ampas dicuci dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian. Dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan ditempat sejuk, terlindung dari cahaya selama 2 hari. Di enapkan tuangkan dan di saring. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan lalu diuapkan dalam *rotary evaporator* pada suhu 50°C. ekstrak kental yang diperoleh kemudian di keringkan di desikator vakum dan selanjutnya dialiri gas N<sub>2</sub> untuk menghilangkan semua sisa pelarut pada ekstrak (BPOM, 2010)

#### 4.6 Uji aktivitas antikanker pada model hewan coba fibrosarkoma

Mencit jantan sebanyak 30 ekor mengalami proses adaptasi penelitian, kemudian semua mencit mendapat induksi benzo(a)pirenase sebanyak 0,3 mg/0,2 ml dalam oleum olivarum secara injeksi subkutan pada daerah scapular sebanyak lima kali tiap dua hari sekali. Selanjutnya seluruh mencit dipelihara dalam suasana dan diet yang sama selama dua bulan atau terbentuk kanker pada daerah tengkuk. Setelah volume kanker mencapai + 100mm<sup>3</sup>, mencit yang telah menderita kanker dikelompokkan secara acak menjadi enam

kelompok. Kelompok satu adalah control negative hanya diberikan CMC Na; kelompok II diberikan ekstrak etanolik daun widuri dosis 100 mg/kgBB, kelompok III ekstrak etanolik daun widuri dosis 200 mg/kg BB, kelompok IV diberikan ekstrak etanolik daun widuri dosis 300 mg/kg BB;kelompok V diberikan ekstrak etanolik daun widuri dosis 400 mg/kg BB dan kelompok VI diberikan etoposida dosis 13,33kg/BB; dan semua bahan uji diherikan secara intraperitoneal dan diberikan setiap hari selama 14 hari. Setelah itu mencit dikorbhankan dan dilakukan pengambilan jaringan kanker dan kemudian dilakukan penimbangan berat kanker.

Perhitungan aktivitas efek kemoterapi antikanker dilakukan dengan menentukan presentasi hambatan pertumbuhan kanker dengan menggunakan rumus sbh:

$(1 - \text{berat kelompok kontrol} / \text{berat kanker kelompok perlakuan}) \times 100\%$  (Sukardiman, 2007).

#### 4.7 Hasil Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa campuran dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Penelitian ini menggunakan ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol. Pada prinsipnya metode maserasi adalah distribusi pelarut organik yang secara terus menerus ke dalam sel tumbuhan yang mengakibatkan pemecahan dinding dan membran sel sehingga senyawa metabolit sekunder yang berada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik (Djarwis, 2004).

Serbuk sampel ditimbang sebanyak 60 gram dan perlakuan dibagi menjadi dua yaitu masing-masing 30 g untuk proses ekstraksi. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk sampel selama 24 jam ke dalam pelarutnya. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung senyawa metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan senyawa-senyawa metabolit sekunder di dalam dan di luar sel. Pengadukan diperlukan untuk

meratakan konsentrasi larutan di luar serbuk sampel sehingga tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam dan di luar sel (Baraja, 2008). Proses pengadukannya dibantu dengan *shaker* selama 3 jam dengan kecepatan 150 rpm untuk mempercepat proses ekstraksinya karena kecepatan pengadukannya dapat dilakukan secara konstan.

Tahap selanjutnya dilakukan penggantian pelarut yang sama yaitu 150 mL pada setiap harinya sampai diperoleh filtrat yang warnanya pucat yaitu sampai 4 kali proses ekstraksi. Ekstraksi dihentikan sampai filtrat berwarna pucat, diharapkan senyawa-senyawa yang memiliki kepolaran yang sesuai dengan pelarutnya dapat terekstrak secara maksimal pada pelarutnya. Perubahan filtrat yang diperoleh dari warna hijau tua pekat hingga berwarna hijau pucat.

Filtrat yang diperoleh selanjutnya diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator vacuum* untuk mendapatkan ekstrak pekatnya. Suhu penguapan diatur berdasarkan suhu titik didih pelarut yaitu 70-75 °C. Dalam hal ini pelarut dapat menguap lebih dahulu di bawah titik didihnya karena adanya pompa vakum. Hal ini disebabkan karena tekanan yang diberikan lebih besar sehingga pelarut di bawah titik didihnya dapat teruapkan dan uap yang dihasilkan akan mudah tertarik ke dalam kondensor yang selanjutnya didinginkan sehingga dihasilkan pelarutnya kembali dalam wujud cair (Vogel, 1978).

Penguapan pelarut dengan *rotary evaporator vacuum* dihentikan sampai diperoleh ekstrak yang cukup pekat yang ditandai dengan berhentinya penetesan pelarut pada labu penampung. Selanjutnya pelarut yang masih ada dalam ekstrak diuapkan dalam desikator. Hasil ekstraksi ditunjukkan pada Tabel IV.1

Tabel IV.1 Hasil maserasi serbuk tanaman Widuri [*Calotropis gigantea*]

Pelarut	Berat serbuk	Perubahan warna filtrat	Warna ekstrak pekat	Berat ekstrak pekat (g)
Etanol	1000 g	Hijau tua pekat menjadi hijau pucat	Hijau tua	200 g

Berat ekstrak pekat etanol menunjukkan kandungan senyawa polar yang terdapat pada tanaman Widuri (*Calotropis gigantea*). Hasil ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk uji selanjutnya yaitu uji antikanker fibrosarkoma pada mencit balb/c yang telah diinduksi DMBA.

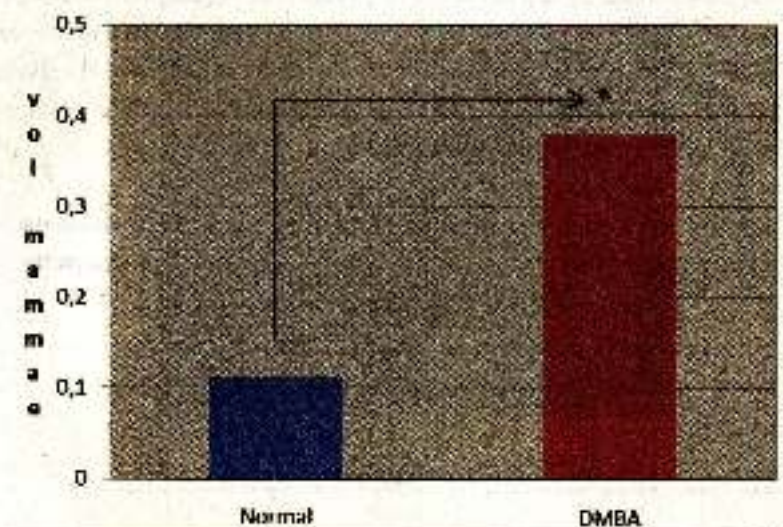
#### 4.8 Induksi Sel Kanker Fibrosarkoma Pada Hewan Coba

Penelitian mengenai pengaruh pemberian DMBA terhadap kanker fibrosarkoma mencit telah dilakukan. Mencit jantan galur Balb/C diinduksi 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) dosis 25 µg/ekor mencit secara sub kutan sebanyak 12 kali induksi dalam waktu enam minggu. Setelah diikuti dengan masa pematangan selama tujuh minggu, hewan coba dikorbankan dan dilakukan pengamatan makroskopik meliputi volume kelenjar fibrosarkoma serta pengamatan histopatologi. Palpasi dilakukan setiap minggu selama induksi DMBA, namun nodul tumor harus ditemukan ketika palpasi dilakukan setelah empat minggu masa pematangan. Prevalensi kanker dapat dilihat dari munculnya nodul pada masing-masing kelenjar fibrosarkoma dan terutama setelah dilakukan pengorbanan terhadap hewan yaitu dengan mengukur volume kelenjar fibrosarkoma model kanker yang berbeda dengan kelompok normal. Rata-rata volume kelenjar

fibrosarkoma serta prevalensi kanker fibrosarkoma pada mencit akibat induksi DMBA dapat dilihat pada tabel IV.2 dan gambar 4.2

Tabel IV.2 Volume kelenjar fibrosarkoma mencit BALB/C pada kelompok normal dan model kanker fibrosarkoma dengan induksi DMBA

Kelompok	Volume kelenjar fibrosarkoma (ml)( $\bar{X} \pm$ BALB/C)
Normal	0.1108±0.014697
Sakit (DMBA)	0.379583±0.08893

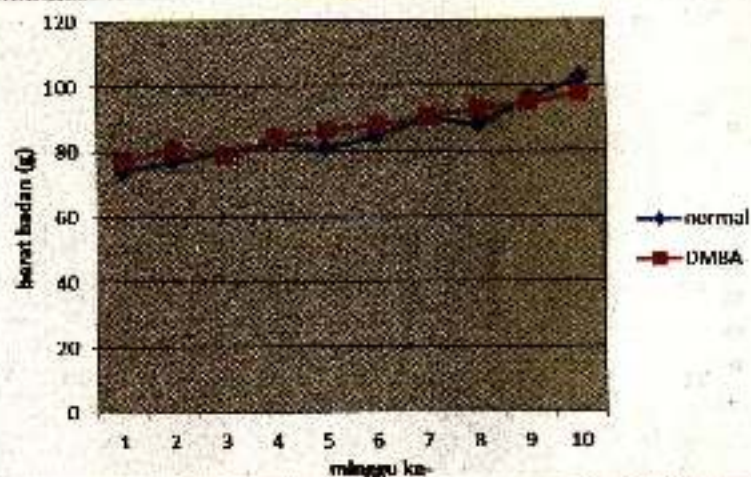


Ket : \* )berbeda secara signifikan kelompok kontrol normal vs DMBA

dengan  $F_{(1,2)} = 731.711$  dan  $p < 0,001$  melalui uji ANOVA satu arah

Gambar 4.2 Volume kelenjar fibrosarkoma mencit BALB/C pada kelompok normal dan yang di induksi DMBA

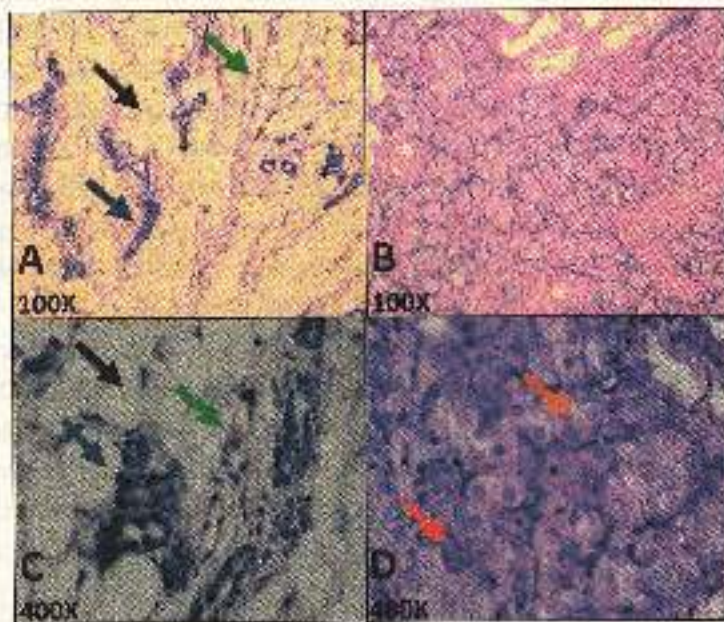
Dari tabel IV.2 dan gambar 4.2 dapat dijelaskan bahwa terdapat perbedaan volume kelenjar fibrosarkoma dan prevalensi kanker fibrosarkoma antara kelompok normal dan yang di induksi DMBA. Dimana berdasarkan hasil palpasi dan pengukuran volume kelenjar fibrosarkoma, didapatkan prevalensi kanker fibrosarkoma 75 %. Berdasarkan analisa statistik melalui uji ANOVA satu arah pada kelompok normal dan model kanker (DMBA) menunjukkan perbedaan volume secara bermakna dengan  $p < 0,001$ . Induksi DMBA yang dilakukan tidak mempengaruhi pertumbuhan normal mencit, hal ini dapat diamati dari gambar 4.3 yang menunjukkan pertumbuhan normal berat badan kelompok yang diinduksi DMBA dibandingkan dengan kelompok normal.



Gambar 4.3 Pertumbuhan berat badan mencit RALB/C pada kelompok normal dan yang diinduksi DMBA.

Dengan analisis anova satu arah, didapatkan nilai  $p > 0,05$  ( $p = 0,691$ ) dan  $F_{(0,18)} = 0,163$  yang berarti tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok normal dan model kanker (DMBA) dalam hal pertumbuhan berat badan. Hal ini berarti pemberian DMBA tidak mempengaruhi pertumbuhan normal mencit. Penurunan berat badan pada masing masing kelompok suatu saat terjadi kemungkinan dikarenakan jumlah makanan dan minuman yang dikonsumsi sebelum dilakukan penimbangan, kondisi lingkungan dan stress akibat perlakuan.

Untuk mengetahui perubahan morfologi, apoptosis dan proliferasi pada sel-sel epitel kelenjar fibrosarkoma mencit, maka dilakukan pembedahan mencit dan diambil kelenjar fibrosarkoma dari masing-masing kelompok untuk dipreparasi secara histokimia dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin*. Perbedaan gambaran histopatologi kelenjar fibrosarkoma antara normal dengan hewan yang mendapatkan induksi DMBA disajikan pada gambar di bawah ini



Gambar 4.4 Irisan melintang kelenjar fibrosarkoma mencit halh/c dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin* yang diberi oleum maydis (A) dan DMBA (B)

Struktur dan homeostatis parenkim fibrosarkoma normal dipertahankan oleh interaksi dinamik antara sel epitel fibrosarkoma dan stroma yang terkait. Elemen stroma ini meliputi vaskularisasi, adiposit, sel imun dan fibroblast dengan produk produk selulernya meliputi beberapa matriks pertumbuhan dan matriks ekstraseluler. Pada irisan kelenjar fibrosarkoma normal atau yang hanya diberi oleum maydis yang terlihat dari gambar 4.4 (A) tampak bentukan fibrosarkoma berupa duktus-duktus yang merupakan unit struktural fibrosarkoma yang disebut TDLU (*Terminal Ductal Lobular Unit*) (→) sehingga tampak bentukan seperti kelenjar dan sel-selnya homogen serta tidak pleomorfik. Pada irisan normal ini juga tampak adanya

kelenjar lemak (→) dan jaringan ikat fibroblast (→) yang lebih banyak dibandingkan dengan hewan yang mendapat induksi DMBA. Pada sel sel kanker (→) yang terlihat pada gambar 4.4 (B), secara seluler ditandai perubahan 3 S (*Size, Shape dan Stain*), yaitu ukurannya lebih besar dibandingkan normal dan bentuknya bermacam-macam (pleomorfik) meliputi bulat, oval maupun poligonal dengan tepi inti irregular atau tidak rata. Ketika dilakukan pengecatan, akan tampak warna yang lebih gelap (hiperkromatin) dengan sel-sel kecil dengan inti yang oval atau bulat dan anak inti yang kecil serta tidak berdekatan satu sama lain, jumlah sel tumor yang tampak masih banyak namun banyak bentukan yang mengalami fibrosis, yaitu sel tumor mati dan diisi jaringan ikat. Pada gambar tersebut juga tampak nekrosis (→) yang ditandai dengan warna kemerahan dan tidak ada sel. Secara jaringan, terlihat tanda bahwa sel meloncat keluar dari basal membran dan menginfiltrasi ke jaringan sekitar, membentuk sel yang berlapis-lapis dan bertumpuk-tumpuk sehingga jaringan adiposit menghilang (berkurang) serta sel fibrosarkoma tidak tersusun dalam bentukan kelenjar.

## DAFTAR PUSTAKA

---

- Ahmed, M. K. K; Rana A. C. and Dixit V. K. 2005. *Calotropis* Species (Asclepiadaceae)-A Comprehensive Review. *Pharmacognosy magazine* Vol 1, Issue 2.
- Darwis, D. 2000. Teknik Dasar Laboratorium dalam Penelitian Senyawa Bahan Alam Hayati. *Workshop Pengembangan Sumber Daya Manusia dalam Bidang Kimia Organik Bahan Alam Hayati*. FMIPA Universitas Andalas Padang.
- Ganiswara, G Sultia et al. 2000. *Farmakologi dan Terapi*. Bagian Farmakologi FKUI.
- Habib, M Roswahul and M Rezaul Karim. 2011. Evaluation of Antitumor Activity of *Calotropis gigantea* L. Root Bark Against Ascites Carcinoma In Swiss Albino Mice. *Asian Pasific Journal of Tropical Medicine*: 786-790
- Haque, Megbahul. 2012. Evaluation of Antihyperglycemic and Antinordicetive Properties of Leaves of *Calotropis gigantea* R. BR. (Asclepiadaceae)-A Medical Plant of Bangladesh. *Original Article Advances in Natural and Applied Sciences*, 6 (8):

- Hatim, Nina Bin. 2012. Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol Daun Surian (*Toona sinensis*) pada Mencit Jantan *Balb/C* yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz(a)antrasena. *Skripsi*. Bogor: Jurusan Biokimia FMIPA IPB.
- Jagtap; Md Rageeb; Md Usman; Salunkhe P S and Gagrani M B. 2010. Anti-inflammatory Activity of *Calotropis gigantea* Linn. Leaves Extract on In-vitro Models. *International Journal of Pharmaceutical Review and Research*. Vol 1, Issue 2.
- Jayakumar, D; S. Jhancy Mary and R. Jaya Santhi. 2010. Evaluation of Antioxidant and Antihacterial Activity of *Calotropis gigantea* and *Vinca rosea* Using *In vitro* Models. *Indian Journal of Science and Technology*, Vol.3 No. 7.
- Kumar; Gaurav; Karthik, Loganathan and Rao, Kokati Venkat Bhaskara. 2010. Antihacterial Activity of Aqueous Extract of *Calotropis Gigantea* Leaves- An *In Vitro* Study. *Article 024 Vol.4 Issue 2*.
- Kumar; Gaurav; Karthik, Loganathan and Rao, Kokati Venkat Bhaskara. 2011. A Review on Pharmacological and Phytochemical Profile of *Calotropis gigantea* Linn. *Pharmacologyonline* 1: 1-8.
- Price, Sylvia; Wilson, Lorraine. 2005. Patofisiologi. Terjemahan oleh Brahm U. Pendit dkk. 2005. Jakarta: EGC.
- Ravy, Ravi Gavy; Dubey Harikesh; Tenpe R. Chandrasekhar; Yeole G, Pramod and Patule M. Angad. 2011. Cytotoxic Activity of Ethanolic Root Extract of *Calotropis gigantea* Linn. *International Journal of Drug Development and Research*. Vol. 4 No. 4.
- Shahabudin dan Flora Pasaru. 2009. Pengujian Efek Penghambatan Ekstrak Daun Widuri Terhadap Pertumbuhan Larva *Spodoptera exigua* Hubn. (Lepidoptera: Noctuidae) dengan Menggunakan Indeks Pertumbuhan Relatif. *Jurnal Agroland* 16 (2): 148-154.
- Sukardiman, 2007, Mekanisme Induksi Apoptosis Pinostrobin Dari *Kaemferia Pandurata Roxb* Dan *Andrographolida* Dari *Andrographis paniculata* Nees Terhadap Sel Kanker Manusia Secara *In vitro* Dan Implikasi Penggunaan Secara *In vivo*, Disertasi Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Singh, Namrata; Neetesh K Jain; Pushpendra Kannoja; Navneet Garud; Pathak, Anupam K and Swaroop C. Mehta. 2010. *In Vitro* antioxidant of *Calotropis gigantea* Hydroalcoholic Leaves Extract. *Der Pharmacia Lettre*. 2(3): 95-100.
- Swapna, P; Stella Robertson; Elumalai A; M. Chinna Eswaraiiah and Nirnala K. 2011. Evaluation of Antiulcer Activity of *Calotropis gigantea* R. Br Leaves. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. Vol 2 No. 11.
- Veena, K., Shanthi P, Achdanam P. 2006. Anticancer Effect of Kalpaamruthaa on Mammary Carcinoma in Rats with Reference to Glycoprotein Components, Lysosomal and marker Enzymes. *Biol Pharm Bull* 29:565-569.
- WHO (World Health Organization). 2013. *World Health Statistics 2013*. Switzerland: WHO Press
- Wong, Siu Kuhn; Yau Yan Lin; Noor Razi Abdullah and Fariza Juliana Nordin. 2011. Assesment of Antiproliferatif and Antiplasmodial Activities of Five Selected Apocynaceae Species. *Research Article BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*, 11:3
- Yaligar, Kotresh. \_\_\_\_ Premierly Phytochemical Investigation and Screening of Anticonvulsant Activity of Leaves of *Calotropis gigantea* Linn. *Disertation*. Karnataka: Departmen of Pharmacognosy Rajiv Gandhi University of Health Science