

LAPORAN PENELITIAN FUNDAMENTAL

**PERANAN CASPASE 3 (CASPASE EXECUTOR) PENYEBAB
APOPTOSIS SEL KANKER UTERUS YANG TERINDUKSI
ALKALOID *ACHYRANTHES ASPERA* LINN SECARA *IN VITRO***



Penanggung Jawab Program :

**Dr. Wurlina, MS.,Drh.
Dr. Widayzt Sastrowardoyo,SpFK.
Dr. Sunarni Zakaria,MKes.
Dr. Dewa Ketut Meles,MS.**

**LEMBAGA PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOPEMBER, 2008**

2 - 066

LAPORAN PENELITIAN FUNDAMENTAL

**PERANAN CASPASE 3 (CASPASE EXECUTOR) PENYEBAB
APOPTOSIS SEL KANKER UTERUS YANG TERINDUKSI
ALKALOID *ACHYRANTHES ASPERA* LINN SECARA *IN VITRO***

klc
kkB
lp. 61/10
Per



Penanggung Jawab Program :

**Dr. Wurlina, MS.,Drh.
Dr. Widayat Sastrowardoyo,SpFK.
Dr. Sunarni Zakaria,MKes.
Dr. Dewa Ketut Meles,MS.**



**LEMBAGA PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOPEMBER, 2008**

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN PENELITIAN FUNDAMENTAL**

A. Judul : PERANAN CASPASE 3 (*CASPASE EXECUTOR*) PENYEBAB APOPTOSIS SEL KANKER UTERUS YANG TERINDUKSI ALKALOID *ACHYRANTHES ASPERA LINN* SECARA *IN VITRO*

B. Peneleti Utama

- a. Nama Lengkap : Dr. Wurlina,MS.,Drh.
- b. Jenis Kelamin : Perempuan
- c. Pangkat/Gol./NIP. : Lektor Kepala/ IV-a/ 131257033
- d. Bidang Keahlian : Reproduksi dan TCM
- e. Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS AIRLANGGA

C. Tim peneliti

Nama	Bidang Keahlian	Fakultas	Lembaga
Dr. Wurlina,MS,Drh	Reproduksi,TCM	FKH	Unair
W.Sastrowardoyo, SpFK., dr.	Farmakologi, Tradisional China Medicin (TCM)	Poli Obat Tradisional	SP3T Jawa Timur
S. Zakaria, MKes., dr.	Farmakologi Molekuler, TCM	FK	Unair
Dr. D.K. Meles,MS,Drh	Farmakologi & Toksikologi	FKH	Unair

D. Pendanaan dan Jangka waktu Penelitian

- Jangka Waktu Penelitian : 1 Tahun (2007/2008)
- Biaya Total yang diusulkan : Rp. 25.000.000
- Biaya Tahun 2007/2008 : Rp. 25.000.000

e. Dibiayai : Direktorat Pembinaan Penelitian dan pengabdian Kepada Masyarakat. Dirjen Pendidikan Tinggi dengan nomor kontrak 319/SP2H/PP/DP2M/III/2008 Tanggal 5 Maret 2008

Surabaya, 28 Nopember 2008

Mengetahui,
Lembaga Penelitian dan
Pengabdian Kepada masyarakat
Universitas Airlangga



Ketua
[Signature]
Prof. Dr. Bambang Sektiari L,DEA,Drh.
NIP. 131 837 044

Peneliti Utama,

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

RINGKASAN

PERANAN CASPASE 3 (CASPASE EXECUTOR) PENYEBAB APOPTOSIS SEL KANKER UTERUS YANG TERINDUKSI ALKALOID *ACHYRANTHES ASPERA LINN* SECARA *IN VITRO***Wurlina, S.Sastrowardoyo, S. Zakaria dan DK. Meles**

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* berpengaruh terhadap viabilitas sel mieloma, induksi apoptosis dan jumlah sel mieloma yang mengalami nekrosis, menentukan konsentrasi fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* yang menyebabkan kematian 50% sel mieloma (LC50) dan mengukur *Optical Density* Caspase menggunakan Elisa

Penelitian ini menggunakan fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera linn* yang dibuat dengan metode fraksinasi alkaloid berdasarkan farmakope Indonesia yang mengacu pada pembuatan sediaan obat berasal dari tanaman (Harbone, 1987). Proses pemisahan bahan dilakukan di laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Hasil dari proses fraksinasi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dilakukan ujicoba secara *in vitro* pada pertumbuhan sel mieloma yang bertindak sebagai sel kanker dengan design penelitian acak lengkap, sebagai berikut : pada penelitian ini menggunakan 3 kelompok sel mieloma yakni kelompok 1 sebagai kelompok uji, kelompok 2 sebagai kontrol negatif dan kelompok 3 sebagai kontrol positif. Pada kelompok 1 masing-masing mendapatkan larutan uji dengan konsentrasi fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* berbeda-beda yakni 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 1000 ppm. Pada kelompok 2 sebagai kelompok kontrol negatif hanya diberi media RPMI saja untuk mengetahui bahwa media tidak bersifat sitotoksik. Sedangkan kelompok 3 sebagai kelompok kontrol positif menggunakan obat standar yang dipakai untuk pengobatan kanker yakni colchicin dengan konsentrasi 100 ppm. Masing-masing kelompok diwakili oleh 8 lubang *microwell plate* sehingga pada percobaan ini dipakai 48 lubang *microwell plate*. Ketiga kelompok perlakuan dilakukan 8 kali replikasi.

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah : 1) viabilitas sel mieloma, 2) jumlah sel mieloma yang mengalami apoptosis, 3) jumlah sel mieloma yang mengalami nekrosis, 4) konsentrasi fraksi alkaloid yang dapat membunuh 50% sel mieloma (LC50) dan mengukur *Optical Density* Caspase menggunakan Elisa

Hasil penelitian adalah sebagai berikut viabilitas sel mieloma pada kelompok perlakuan 1 = $30,42 \pm 3,58\%$; kelompok perlakuan 2 = $26,19 \pm 3,99\%$; perlakuan 3 = $9,45 \pm 4,82\%$ dan perlakuan 4 = $7,26 \pm 7,26\%$. Kontrol positif = $13,18 \pm 7,75\%$ dan kontrol negatif = $94,38 \pm 2,59\%$. Prosentase sel mieloma yang mengalami nekrosis pada kelompok P1= $54,33 \pm 7,65\%$; kelompok P2= $54,05 \pm 6,29\%$; kelompok P3= $53,03 \pm 2,42\%$; kelompok P4= $57,81 \pm 1,47\%$; kelompok

kontrol positif= $55,40 \pm 4,23\%$; dan kelompok kontrol negatif $5,08 \pm 0,68\%$. Prosentase sel mieloma yang mengalami apoptosis pada kelompok P1= $15,23 \pm 4,16\%$; kelompok P2= $19,75 \pm 3,59\%$; kelompok P3= $37,52 \pm 3,67\%$; kelompok P4= $34,93 \pm 3,41\%$; kelompok kontrol positif= $31,41 \pm 5,96\%$; dan kelompok kontrol negatif $0,54 \pm 0,07\%$. Konsentrasi fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* linn yang dapat membunuh 50% sel mieloma (LC50) secara in vitro sebesar 0,719 ppm. Berdasarkan uji ELISA, *optical density* Caspase mulai terlihat pada pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* linn dosis 10 ppm (besar caspase $> 2x$ COV).

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa alkaloid *Achyranthes aspera* linn menyebabkan kematian sel mieloma. Mekanisme kematian sel mieloma terjadi melalui proses nekrosis dan apoptosis dan semakin besar dosis fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* linn semakin besar pula *optical density* caspase

ABSTRACT**THE EFFECT OF CASPASE 3 (CASPASE EXECUTOR)
TO CAUSE APOPTOTIC IN BREAST CANCER BY INDUCTION
OF ALKALOID *ACHYRANTHES ASPERA LINN* IN VITRO**

Wurlina, S.Sastrowardoyo, S. Zakaria and DK.Meles

The purpose these research to prove the alkaloid *Achyranthes aspera linn* to influence on viability, apoptotic inductio, necrotin induction, lethal concentration 50% (LC50) and optical density of caspase by Elisa on myeloma cell. In this research was found 97,73% alkaloid fraction of *Achyranthes aspera linn* by high performance liquid chromatography.

Alkaloid fraction of *Achyranthes aspera linn* was prepare by Pharmacope Indonesian methode. The effect of alkaloid was proved on myeloma cell, devided into 3 groups: the first group was treatment groups, was given alkaloid fraction in concentration 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm and 1000 ppm. The second group was negative control was given RPMI and DMSO media only. The third groups was positive control was given colchicin in concentration 100 ppm. Each groups was represented with 4 hole in 24 microwell plate hole. The result showed that the alkaloid fraction of *Achyranthes aspera linn* in dose 100 ppm in vitro cause viability of myeloma cell $9,45 \pm 5,96\%$ lower than positive control $13,18 \pm 3,67\%$, caused apoptotic $37,52 \pm 3,67\%$ and higher than positive control $31,41 \pm 5,96\%$, caused necrotic myeloma cell $53,03 \pm 2,42\%$ lower than positive control $55,40 \pm 4,23\%$ and the lethal concentration 50% on myeloma cell was 0,719 ppm. The optical density of caspase by Elisa test to begin at dose 10 ppm concentration of alkaloid *Achyranthes aspera linn* (value of caspase > 2x COV).

The conclusion of these research the valkaloid *Achyranthes aspera linn* to cause of cell death of myeloma. Mechanism of action by necrosis and apoptotic, and increase of dose of alkaloid to cause of increase the optical density of caspase.

Keyword : *Achyranthes aspera linn*, caspase, myeloma breast cancer cell

PRAKATA

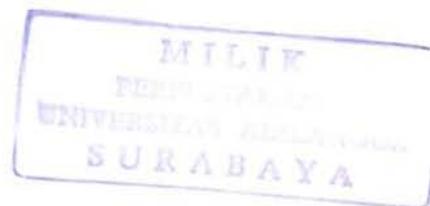
Puji syukur panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa atas karuniaNya yang telah melimpahkan rachmatNya kepada penulis, sehingga dapat menyelesaikan laporan hasil penelitian Fundamental dengan judul : " PERANAN CASPASE 3 (*CASPASE EXECUTOR*) PENYEBAB APOPTOSIS SEL KANKER UTERUS YANG TERINDUKSI ALKALOID *ACHYRANTHES ASPERA LINN* SECARA *IN VITRO*"

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* berpengaruh terhadap viabilitas sel mieloma, induksi apoptosis dan jumlah sel mieloma yang mengalami nekrosis, menentukan konsentrasi fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* yang menyebabkan kematian 50% sel mieloma (LC50) dan mengukur *Optical Density Caspase* menggunakan Elisa

Pada kesempatan ini kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada DP2M. Dirjen Pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian ini, dr. Wijayat Sastrowardoyo, SpFK. selaku Kepala SP3T Jawa Timur, Prof. Dr. H. Sarmanu, selaku mantan ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga dan Prof.Dr. Bambang Sektiari L,DEA,Drh selaku ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga, Prof. Dr.H. Fasich selaku Rektor Universitas Airlangga, serta rekan-rekan yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian ini. Semoga hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai bahan informasi ilmiah dalam pengembangan ilmu pengetahuan pada umumnya dan khususnya dibidang pengembangan obat tradisional yang berkaitan dengan efek fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dan mekanisme kematian sel mieloma untuk dapat dikembangkan sebagai bahan obat antikanker pada masa mendatang yang aman dan murah yang bersumber dari tanaman asli Indonesia.

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
ABSTRACT	iv
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TUJUAN DAN MANFAAT	5
BAB 3. TINJAUAN PUSTAKA	6
BAB 4. METODE PENELITIAN	21
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	39



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1. Rerata prosentase viabilitas sel meloma setelah pemberian fraksi alkaloid <i>Achyranthes aspera linn</i>	27
Tabel 5.2. Rerata persentase apoptosis sel mieloma setelah pemberian fraksi alkaloid <i>Achyranthes aspera linn</i>	28
Tabel 5.3. Rerata Optical density caspase pada berbagai dosis Alkaloid <i>Achyranthes aspera linn</i>	33

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Tanaman <i>Achyranthes aspera</i> linn	7
Gambar 2.2. Struktur kimia dari berbagai kelompok alkaloid	14]
Gambar 5.1. Sel mieloma berwarna hijau, sel mieloma apoptosis berwarna kuning dan sel mieloma nekrosis berwarna coklat	30

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Gambar kegiatan	39
Lampiran 2. Print out ELISA <i>reader</i>	43
Lampiran 3 Optical density caspase pada berbagai dosis alkaloid Achyranthes aspera linn	44
Lampiran 4. Skema silsilah sel mieloma	45

BAB 1

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit jantung koroner di Amerika Serikat. Tercatat lebih dari 500.000 kasus kematian pertahun akibat penyakit kanker, dan lebih dari 50% kasus kematian karena kanker disebabkan oleh kanker payudara, paru, prostat, kolon dan rektum. Menurut laporan Departemen Kesehatan diperkirakan setiap tahun terdapat 100 penderita penyakit kanker baru dari 100.000 penduduk Indonesia. Dengan jumlah penduduk lebih dari 200 juta diperkirakan terdapat lebih dari 200.000 penderita kanker baru setiap tahunnya (*National Cancer Institute, 2001*). Salah satu obat antikanker yang berasal dari tanaman dan telah digunakan secara empiris di masyarakat untuk mengobati penyakit kanker payudara dan kandungan adalah tanaman *Achyranthes aspera Linn* yang dikenal dengan nama jarong, jarongan atau remek getih.

Tanaman *Achyranthes aspera Linn* mengandung berbagai macam zat kimia di antaranya adalah akirantin, betain, terpenoid, saponin, ramnose, glukosa, galaktosa, reilosa, hentriacontan, α spinasterol, β sitosterol, cryopenol, dibutyl phtalate, asam palmitat, α spinasterol-3 β -D glikosida, daukosterol, ecdysterol, achyranthoside E dan F. Potensi *Achyranthes aspera Linn* untuk pengobatan kanker berhubungan dengan alkaloid yang diduga mempunyai aktivitas sebagai antimitosis dengan menghambat pembelahan sel yang cepat pembelahannya (Gao dkk., 2000; Mitaine dkk., 2001; Chakraborty dkk., 2002).

Menurut Andrew dkk. (2004) potensi *Achyranthes aspera Linn* sebagai antikanker, berhubungan dengan kandungan alkaloid yang terdapat pada tanaman tersebut. Aktivitas efek antikanker dari tanaman *Achyranthes aspera linn* diduga melalui mekanisme antimitosis yakni menghambat pembelahan sel. Selain berkhasiat sebagai antimitosis alkaloid yang terdapat pada tanaman *Achyranthes aspera Linn* juga diduga berkhasiat antitelomerase yang berperan dalam proses pembentukan telomer yaitu suatu protein yang berfungsi melindungi kromosom dalam proses pembelahan sel untuk mengikat tubulin yaitu menghambat

polimerisasi protein yang berakibat mikrotubulus akan hancur dan pembelahan sel akan berhenti pada stadium metafase. Tidak terbentuknya benang mitosis secara utuh menyebabkan kromosom seperti bola atau bintang disebut dengan *explode mitotic*. Gangguan pada telomerase menyebabkan ukuran telomer pada ujung kromosom tidak dapat dipertahankan, sehingga terjadi kematian sel melalui mekanisme apoptosis. Obat yang mempunyai efek antimitosis diduga juga mempunyai efek antitelomerase yang dapat menghambat pembelahan dan perkembangan sel yang cepat pembelahannya seperti sel kanker dan berakibat terjadi kematian sel melalui mekanisme apoptosis.

Obat antikanker dapat membunuh sel kanker melalui hambatan mitosis dan telomerase menyebabkan terjadinya induksi apoptosis. Kematian sel karena induksi apoptosis tidak disertai timbulnya inflamasi pada sel yang mengalami kematian dan biasanya sel yang mati akibat proses apoptosis hanya melibatkan satu atau sekelompok sel (Fujiwara dkk.,2004).

Penelitian pendahuluan terhadap ekstrak metanol dari daun *Achyranthes aspera* mempunyai efek antimitosis yaitu menghambat pembelahan dan perkembangan sel embrio (*cleavage*) pada mencit dan tikus (Wurlina,dkk.,2001; Wurlina dan Sastrowardoyo, 2002, Wurlina, 2003) serta menghambat pembelahan sel spermatogenik (Meles dkk., 2004). Menurut Wurlina dkk.,2004 efek antimitosis pada daun *Achyranthes aspera linn* diduga disebabkan adanya kandungan alkaloid akirantin dan pembelahan sel berhenti pada stadium metafase. Alkaloid yang berasal dari beberapa tanaman dapat menghambat sintesis protein dengan cara mencegah polimerisasi DNA dan menghambat transkripsi DNA (Mitaine dkk.,2001)

Suatu sel normal dapat berubah menjadi sel kanker atau sel ganas karena adanya perubahan pada DNA sel tersebut. Ada 2 penyebab perubahan genetika yang dapat menyebabkan terjadinya kanker, yaitu inaktivasi gen supresor tumor dan aktivasi protoonkogen menjadi onkogen (Lantuejoul dkk, 2004) Perubahan sel normal menjadi sel ganas dapat disebabkan adanya distorsi atau gangguan dari gen pengatur pertumbuhan sel. Protoonkogen merupakan gen yang terlihat dalam pertumbuhan dan diferensiasi normal sel. Bila diaktivasi oleh adanya virus tertentu maupun sebagai hasil dari mutasi, protoonkogen dapat berkembang

menjadi onkogen aktif dan memacu tumbuhnya keganasan sel (Kocki dkk.,2004, Yalon dkk.,2004,)

Apoptosis merupakan proses alamiah yang dialami oleh semua sel dan alasan sel melakukan apoptosis adalah pertama apoptosis diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan sel, jaringan atau organ, kedua apoptosis untuk menghancurkan sel-sel yang dianggap membahayakan bagi integritas organisme itu sendiri, seperti sel yang terinfeksi oleh virus atau sel dengan kerusakan DNA, maupun sel kanker (Fujiwara dkk.,2004, Yalon dkk.,2004).

Salah satu proses apoptosis dapat terjadi melalui ribonukleoprotein atau telomerase. Telomerase terdiri dari beberapa nukleotida yang tersusun secara berulang, terdiri dari C4-A2 dan G4-T2. Telomerase berfungsi untuk mempertahankan ukuran telomer dari kromosom dan telomer akan mengalami pemendekan pada waktu sel melakukan pembelahan diri. Apabila telomer tersebut mencapai ukuran tertentu (level kritis) sebagai akibat terjadi pembelahan sel secara berulang, maka sel tersebut tidak akan dapat melanjutkan pembelahannya yang pada akhirnya sel akan mengalami kematian yang disebut apoptosis. Adanya aktivitas enzim telomerase menyebabkan ukuran telomer pada ujung kromosom akan dapat dipertahankan secara terus menerus, sehingga kromosom sel selalu terlindungi. Telomerase akan tetap aktif pada sel benih dan tidak aktif pada sel somatik, namun telomerase akan terinduksi kembali bila sel normal mengalami transformasi menjadi sel kanker (Lantuejoul dkk., 2004)

Obat-obat antikanker yang akan digunakan untuk pengobatan kanker diharapkan mampu membunuh sel kanker melalui mekanisme induksi apoptosis. Kematian sel karena induksi apoptosis tidak menyebabkan inflamasi dan hanya melibatkan satu atau sekelompok sel (cluster) sel sehingga mencegah efek samping yang disebabkan oleh kemoterapi non selektif (Fujiwara dkk.,2004, Liu dkk.,2004, Anonimus,WWWpotofolio,mvm.ed.ac.uk.2003). Pada penelitian ini diharapkan fraksi alkaloid daun *Achyranthes aspera linn* menunjukkan aktivitas antikanker pada kultur sel mieloma mencit dengan mengetahui viabilitas sel mieloma yang merupakan prototif sel kanker. Dari pengamatan viabilitas sel mieloma akan dilakukan pengamatan terhadap jalur mekanisme kematian sel mieloma berdasarkan induksi apoptosis dan nekrosis dengan pewarnaan akridin orange atau etidium bromida. Dengan pewarnaan tersebut akan dapat dibedakan

kedua jalur kematian sel, nekrosis atau apoptosis. Sel yang mengalami apoptosis akan tampak terwarnai orange dengan bintik orange terang yang menunjukkan kondensasi kromatin dan fragmentasi Deoxyribonucleic acid (DNA), sedangkan sel yang mengalami nekrosis akan terwarnai orange merata tanpa bintik orange terang karena tidak terjadi kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA.

Rumusan Masalah

1. Apakah fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* berpengaruh terhadap viabilitas, apoptosis dan nekrosis sel mieloma secara *in vitro* ?
2. Pada dosis berapa fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* menyebabkan kematian 50% (LC50) ?
3. Berapakah *Optical Density Caspase* fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* yang dapat menyebabkan apoptosis ?

BAB 2

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan Penelitian

Fraksi alkaloid dari tanaman *Achyranthes aspera linn* yang diduga sebagai antimitosis dan antitelomerase, maka tujuan penelitian adalah sebagai berikut :

1. Membuktikan fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* berpengaruh terhadap viabilitas sel mieloma
2. Membuktikan fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* berpengaruh terhadap induksi apoptosis dan jumlah sel mieloma yang mengalami nekrosis
3. Menentukan konsentrasi fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* yang menyebabkan kematian 50% sel mieloma (LC50)
4. Mengukur *Optical Density Caspase* menggunakan Elisa

Manfaat Penelitian

1. Untuk mengungkap mekanisme kerja fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dalam menyebabkan kematian sel mieloma.
2. Untuk menentukan konsentrasi fraksi alkaloid yang dapat menyebabkan 50% kematian sel mieloma (LC50).
3. Untuk menemukan obat anti kanker yang berasal dari tanaman tanpa efek samping

BAB 3

TINJAUAN PUSTAKA

3.1. Pemanfaatan Tumbuhan Sebagai Bahan Obat

Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan obat di Indonesia telah dilakukan sejak dahulu, terutama sebagai bahan obat tradisional. Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan baku obat tradisional menunjukkan kecenderungan terus meningkat.

Menurut laporan Farnsworth (1985) data National Prescription Audit (NPA) di Amerika Serikat menyatakan bahwa 25% obat yang digunakan oleh masyarakat Amerika Serikat masih mengandung obat yang bahannya berasal dari tumbuhan, sedangkan menurut Berg (1987) sekitar 100 bahan obat pada saat ini masih diekstraksi dari tumbuhan.

Di alam terdapat ± 250.000 jenis tumbuhan dimana sekitar 70% dari tumbuhan tersebut tumbuh di beberapa negara daerah tropis. Dari tumbuhan ini baru sekitar 1% saja yang diteliti potensi ekonominya. Dalam mencari bahan yang berkhasiat di dalam tumbuhan sering dilakukan kesalahan yaitu membuang bahan-bahan yang berkhasiat tanpa dilakukan penelitian lebih lanjut. Penelitian secara kimia dari tumbuhan yang mengandung bahan berkhasiat mempunyai nilai yang besar bagi bidang ilmu lainnya seperti kemotaksonomi, ekologi dan sintesis (Birch, 1994).

3.2. Tinjauan Umum Tentang Tanaman *Achyranthes Aspera* L.

Tanaman *Achyranthes aspera* L. merupakan tanaman asli Indonesia, tumbuh secara liar di pekarangan rumah maupun di ladang yang cukup mendapat air dan sinar matahari. Tanaman ini tergolong mudah tumbuhnya. Tingginya sampai 100 cm atau lebih. Daunnya tunggal, duduk berhadapan, bertangkai, warna hijau berbentuk bulat telur sungsang sampai lonjong memanjang. Panjang daun 1,5 - 10 cm dengan kedua permukaan daun berbulu halus. Ujung daun tumpul memudar dengan pangkal daun menyempit, tepi daun rata dan agak bergelombang dengan tulang daun menyirip. Bunga tumbuh di ujung tangkai antara percabangan berbentuk

tandan seperti tangkai padi, kuntum bunga hijau, dengan bulir bulat keras dan tajam (Mardiswojo dan Kusuma, 1968).



(1)



(2)

Gambar 2.1. Tanaman *Achyranthes aspera* L. (1) Umur 1 bulan dan (2) Umur 2 bulan

3.2.1. Klasifikasi Tanaman *Achyranthes Aspera* L.

Menurut Inventaris Tanaman Obat Indonesia Departemen Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (1997) Tanaman *Achyranthes aspera* L diklasifikasikan sebagai berikut :

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

3.2.2. Nama Daerah *Achyranthes Aspera* L.

- Nama umum : Sangketan
- Sumatra : Ara sang-sang (Sumatra Utara)
- Jawa : Sangketan
- Sunda : Jarong Lalaki (Sunda)
- Madura : Nyarang
- Bali : Pulet atau Sangket

- Maluku : Rai-rai, Sangkohidung (Ternate)
Sulawesi : Sui-in Sui (Minahasa)

3.2.3. Kandungan Zat Pada Tanaman *Achyranthes Aspera L.*

Menurut beberapa peneliti kandungan zat yang terdapat pada tanaman *Achyranthes aspera linn.* yang dibuktikan secara organoleptis adalah sedikit pahit dan sejuk. Mardisiswoyo dan Kusuma (1968) menyatakan tanaman *Achyranthes aspera linn.* mengandung akirantin, betain, terpenoid, saponin, ramnose, glukose, galaktose. DepKes. (1997) menyebutkan daun *Achyranthes aspera linn.* mengandung senyawa saponin, senyawa polifenol dan alkaloid.

Wei dkk.(1997) menemukan senyawa flavonoid yang terdapat dalam *Achyranthes aspera linn.* adalah alfa spinasterol, beta sitosterol, crysophanol, dibutylphthalate, asam palmitat, alfa-spinasterol-3-beta-D glikosida, daukosterol dan ecdysteron. Ida dkk. (1998) menemukan senyawa alkaloid pada akar *Achiranthos aspera linn.* dalam bentuk glikosida terpenoid dan achyranthoside E & F. Gao dkk. (2000) menemukan flavonoid ecdysteron dan alkaloid betain. Chakraborty dkk. (2002) menemukn senyawa alkaloid, non alkaloid dan saponin pada ekstrak metanol.

Menurut Burrow, dkk. (2001), di Cina dan Thailand tanaman yang mengandung saponin digunakan sebagai bahan baku obat antifertilitas. Dikatakan pula bahwa saponin merupakan senyawa yang dapat menekan susunan saraf pusat pada tikus dan menyebabkan gangguan pada poros hipotatamus-hipofisa-ovarium sehingga berakibat gangguan sintesis dan pelepasan hormon gonadotropin.

Wurlina (2000) melakukan penelitian perasan daun *Achyranthes aspera linn* pada mencit yang diberikan secara per oral ternyata menyebabkan perubahan pada siklus birahi yaitu perpanjangan pada fase proestrus dan diestrus. Wurlina dkk. (2003) melakukan penelitian ekstrak etanol daun *Achyranthes aspera linn.* yang diberikan pada tikus, menyebabkan terjadinya penurunan jumlah anak dalam satu periode kebuntingan, tapak implantasi, dan jumlah korpus luteum.

Terpenoid dan saponin berpengaruh terhadap permeabilitas membran sel. Peningkatan permeabilitas membran sel dapat menyebabkan cairan elektrolit di luar sel akan mudah masuk ke dalam sel, akibatnya sel akan jadi membengkak dan mudah pecah, di samping permeabilitas membran, berperan juga dalam transportasi nutrisi yang diperlukan untuk metabolisme sel dalam menghasilkan energi. Permeabilitas membran sel telur, embrio dan spermatozoa berhubungan dengan proses pertumbuhan dan pembelahan sel embrio. (Tahiliani dan Kai, 2000). Pengaruh terpenoid dan saponin pada membran sel telur maupun embrio menyebabkan pengkerutan membran sehingga integritas membran akan menurun dan menghambat perkembangan sel telur dan embrio (*cleavage*) sehingga embrio akan mati (Geisert dkk., 1997; Sathananthan dan Trouson, 2000; Mitaine dkk., 2001).

Gill dkk. (2001) dan Juneja dkk. (2001) menyatakan bahwa golongan flavonoid maupun alkaloid tanaman dapat menyebabkan gangguan pada membran sel sehingga berakibat komponen penyusunan membran akan berubah dan proses fisiologi membran akan terganggu dengan terjadi kerusakan dan pengkerutan pada membran sel tersebut. Yanagimachi (1988) menyatakan perubahan karakteristik akibat alkaloid tanaman yang ditambahkan pada media fertilisasi sel telur akan diikuti perubahan membran lipid yang dapat membantu pemasukan ion kalsium ke dalam sel. Peningkatan ion kalsium yang masuk ke dalam membran akan merangsang ikatan membran dengan cAMP interseluler.

Nigg dan Seigler (1992) menyatakan bahwa alkaloid maupun flavonoid yang berasal dari tanaman, dapat berfungsi sebagai antispasmodik pada otot polos dan antiinflamasi. Flavonoid dapat menghambat sintesa uterine peroksidase pada tikus yaitu enzim yang dapat meningkatkan respons terhadap estrogen. Di Amerika golongan alkaloid maupun flavonoid tanaman sering dikaitkan dengan kejadian abortus pada golongan ruminansia dan syndrome infertilitas serta menyebabkan reduksi pada uterus domba yang diberi makan tanaman tersebut.

Menurut laporan Chang dan But (1987) yang dikutip oleh Meles dan Sastrowardoyo (2001) pada tikus jantan dan betina yang diberi perlakuan flavonoid tanaman selama 10 hari berturut-turut dengan dosis 3 gram/kg berat

badan secara per oral, pada hari ke 5 dikawinkan dan hari ke 25 dilaparotomi, ternyata mempunyai efek kontrasepsi hampir 100%. Efek ini diduga adanya penekanan pada proses ovulasi, atropi uterus dan pengecilan ovarium.

Menurut Cody dkk. (1997) dan Gomez dkk. (2001) melaporkan bahwa flavonoid dengan kandungan hidroksil dan phenol dapat menghambat sekresi hormon gonadotropin sehingga pertumbuhan folikel maupun ovulasi akan terganggu.

Beberapa alkaloid yang berasal dari tanaman seperti daun tapak dara, daun cemara kipas, daun pepaya telah diketahui mengandung bahan yang mempunyai efek antimitosis dan sekarang banyak digunakan untuk pengobatan penyakit kanker baik dalam sediaan oral maupun dalam sediaan parenteral.

3.2.4. Kegunaan Tanaman *Achyranthes Aspera L.*

Bagian dari tanaman *Achyranthes aspera linn.* yang digunakan untuk pengobatan maupun pencegahan terhadap penyakit adalah akar dan seluruh tanaman termasuk daun digunakan untuk mengobati demam, panas, malaria, enteritis, pharyngitis, radang paru-paru (*pneumonia*), gondongan, radang sendi (*rheumatoid arthritis*) infeksi ginjal, nyeri saat menstruasi (*dysmenorrhea*), memperlancar persalinan (*induction of labor*), kencing darah. Perasan daun *Achyranthes aspera linn.* digunakan sebagai peluruh haid, mencegah kehamilan. Disarankan wanita hamil tidak minum perasan daun tersebut karena menyebabkan keguguran (Mardisiswoyo dan Kusuma, 1968; Anonymous, 1978). Menurut beberapa peneliti, ekstrak daun *Achyranthes aspera L.* merupakan bahan baku obat antikanker dan hepatitis (Tahiliani dan Kai, 2000 ; Chakraborty dkk.,2002)

3.3. Ekstraksi Bahan Tanaman

Metode ekstraksi bahan tanaman dikerjakan berdasarkan metode ekstraksi dari Harborn (1973) dan Ikan (1991), yang membagi dua tipe ekstraksi yaitu ekstraksi padat-cair (*solid-liquid extraction*) dan ekstraksi cair-cair (*liquid-liquid*). Ekstraksi padat-cair adalah ekstraksi bahan padat oleh cairan pelarut, sedangkan ekstraksi cair-cair adalah ekstraksi dari bahan

berupa cairan dengan cairan pelarut yang tidak saling tercampur. Bahan-bahan tanaman yang akan diekstraksi dapat berupa bahan segar atau bahan yang sudah dikeringkan, kemudian dipotong-potong atau ditumbuk untuk proses penyarian. Beberapa metode ekstraksi yang sering dikerjakan yaitu maserasi, perkolasi, refluks dan alat sokslet. Maserasi adalah metode ekstraksi dengan cara merendam bahan yang akan disari dengan pelarut organik yang diinginkan, sambil dilakukan pengadukan atau pengocokan yang dilakukan pada temperatur kamar. Metode ekstraksi dengan cara maserasi paling sering digunakan terutama untuk penelitian bahan-bahan untuk keperluan laboratorium karena di samping sederhana dan butuh waktu cepat, juga tidak memerlukan proses pemanasan sehingga perubahan kimia terhadap bahan-bahan yang diekstraksi relatif terhindar dari proses kimiawi. Perkolasi dan reperkolasi adalah suatu metode ekstraksi bahan-bahan berupa serbuk tanaman dengan pelarut menggunakan alat perkolator, yaitu suatu alat dari bahan gelas atau bahan logam yang tidak mudah berkarat yang dibagian bawahnya dilengkapi dengan kran untuk mengalirkan larutan yang terbentuk dari hasil penyarian bahan. Pada metode perkolasi yakni proses penambahan pelarut secara terus-menerus sampai cairan yang keluar dari kran menjadi bening seperti pelarut awal (tidak berwarna). Reperkolasi yaitu metode perkolasi berulang dari hasil penyarian dimasukan lagi ke dalam alat perkolator untuk mendapatkan hasil penyarian bahan yang lebih sempurna. Metode perkolasi dan reperkolasi membutuhkan jumlah pelarut yang banyak dan waktu yang dibutuhkan lebih lama serta bahan-bahan yang akan diperkolasi harus dimaserasi lebih dahulu.

Metode ekstraksi dengan refluks dan alat sokslet adalah suatu metode ekstraksi bahan dengan menggunakan beberapa macam pelarut secara bergantian yaitu mulai dari ether, petroleum ether dan kloroform, hal ini dimaksudkan untuk memisahkan lipid dan terpenoid. Kemudian penambahan pelarut alkohol dan etilasetat untuk memisahkan kandungan zat yang lebih polar. Cara ekstraksi diatas memerlukan pemanasan. Ekstrak yang diperoleh kemudian dilakukan pemekatan dengan penguapan pada temperatur 56° C. Ekstrak bahan yang diperoleh bisa dalam bentuk ekstrak total, ekstrak parsial atau ekstrak fraksi. Apabila ekstrak yang diperoleh terdapat dalam bentuk zat

tunggal maka segera zat tersebut dapat dimurnikan dengan metode kristalisasi. Namun kebanyakan ekstrak yang diperoleh dengan metode ekstraksi di atas masih dalam bentuk ekstrak kasar sehingga perlu dilakukan fraksinasi untuk memisahkan kandungan utama dengan golongan yang lain yang menyertainya. Metode fraksinasi dapat dilakukan berdasarkan derajat kepolaran dari masing-masing bahan yang akan dipisahkan.

3.4. Pemisahan Ekstrak Bahan Tanaman

Pemisahan dan pemurnian zat kandungan alkaloid tanaman berdasarkan Harborn (1973) dan Ikan (1991), dilakukan dengan pengasaman, pembasaan dan kromatografi. Pengasaman dan pembasaan dilakukan untuk memisahkan bahan-bahan yang bersifat asam atau basa untuk mendapatkan bentuk garam. Selanjutnya dengan penambahan bahan pelarut yang spesifik untuk bahan ekstraksi yang akan dipisahkan dikerjakan dalam labu pisah. Dalam labu pisah akan terdapat dua lapisan cairan secara terpisah yaitu bahan-bahan yang larut air dan bahan-bahan yang larut dalam pelarut organik, Selanjutnya lapisan air dipisahkan dengan jalan mengalirkan dari keran labu pisah, sedangkan lapisan pelarut organik ditampung. Bahan yang diperoleh dalam pelarut organik dilakukan pemekatan dengan penguapan pada temperatur tertentu.

Kromatografi adalah suatu cara pemisahan zat kimia menjadi komponen-komponen tertentu yang ditahan secara selektif. Berdasarkan teknik pemisahan, kromatografi dibagi menjadi kromatografi lapis tipis (KLT) termasuk kromatografi preparatif, dan kromatografi kolom.

Kromatografi lapis tipis (KLT) dikerjakan menggunakan lempeng aluminium atau kaca yang dilapisi silika gel sebagai fase diam. Fase gerak yang dipakai adalah pelarut yang spesifik untuk bahan tertentu yang akan dipisahkan, pada umumnya terdiri dari campuran berbagai macam pelarut dalam konsentrasi tertentu yang ditempatkan dalam bejana kaca. Zat yang akan diperiksa ditotolkan pada lempeng fase diam, dibiarkan sampai kering. Setelah kering dimasukkan ke dalam bejana gelas yang berisi fase gerak kemudian ditutup rapat. Setelah proses pemisahan selesai, kemudian lempeng diambil, dikeringkan dari fase gerak dengan cara diangin-anginkan.

Selanjutnya bercak hasil pemisahan fase gerak dideteksi dengan pereaksi penampak noda. Pemilihan pereaksi penampak noda tergantung pada golongan kandungan yang terdapat dalam ekstrak. Letak noda yang tampak dihitung nilai R_f (*Retardation factor*) dengan membagi jarak tempuh senyawa dari titik awal dengan jarak tempuh fase gerak dari titik awal sampai batas yang telah ditentukan.

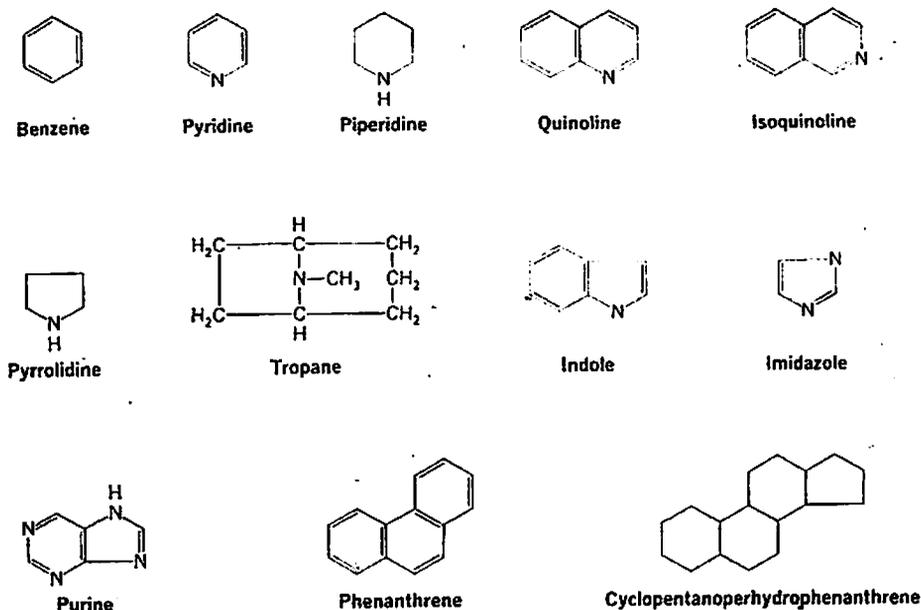
Cara kerja kromatografi preparatif adalah sama dengan KLT biasa, bedanya pada lempeng yang dipakai umumnya berbentuk lempeng kaca dan zat yang ditotolkan berupa garis pada salah satu sisi lempeng fase diam. Proses pemisahan dilakukan secara tegak lurus pada garis toloan sehingga akan terpisah seperti pita-pita. Selanjutnya pita dikerok dari fase diam dan hasil kerokan dilarutkan dalam eluen yang sesuai, kemudian disentrifuse, selanjutnya dilakukan penyaringan. Filtrat yang diperoleh diuapkan dan kristal yang diperoleh dimurnikan.

Kromatografi kolom adalah kromatografi serapan yang digunakan untuk memisahkan suatu campuran senyawa. Kolom yang dipakai terbuat dari kaca yang di dalamnya diisi dengan penyerap sebagai fase diam, kemudian dialiri eluen sebagai fase gerak. Sejumlah ekstrak yang dikeringkan terlebih dahulu dengan penambahan penyerap dengan perbandingan 1:300 sampai 1:500 dimasukkan melalui bagian atas lubang kolom, yang selanjutnya dialiri dengan fase gerak yang dibuat berdasarkan eluen untuk kromatografi lapis tipis. Eluen yang dipakai dapat digunakan berbagai gradien konsentrasi untuk mendapatkan sejumlah gradien konsentrasi dari bahan yang akan dipisahkan. Untuk menentukan komposisi zat kimia yang terdapat pada masing masing gradien konsentrasi dari zat dalam eluen dilakukan pemeriksaan dengan kromatografi lapis tipis. Biasanya zat kimia yang dikerjakan dengan pemisahan kromatografi kolom telah mendekati zat tunggal.

3.5. Tinjauan Alkaloid tanaman

Alkaloid tanaman yaitu senyawa kimia yang berasal dari tanaman, mengandung satu gugus atau lebih atom nitrogen, bersifat alkali dan pada umumnya berasa pahit. Gugus nitrogen yang terdapat dalam alkaloid tanaman dapat berbentuk amina primer (RNH_2) yaitu derivat piridin dan piperidin seperti

nikotin dan arekolin, dan dalam bentuk amina sekunder (R_2NH) yaitu derivat imidazol seperti pilokarpin, maupun dalam bentuk amina tersier (R_3N) yaitu derivat purin seperti cafein, teofilin dan teobromin bahkan amina kuartener [$(R_4N)^+X^-$] seperti tubokurarin dan papaverin. Kebanyakan alkaloid tidak larut atau sangat sedikit larut dalam air tetapi larut di dalam ether, kloroform atau dalam pelarut yang bersifat nonpolar kecuali dalam bentuk garam asam. Kebanyakan alkaloid berbentuk kristal solid, walaupun ada beberapa yang berbentuk amorf seperti nikotin dan sparteine. Apabila mengalami oksidasi maka akan segera bersifat higroskopis dan menjadi cair. Klasifikasi alkaloid biasanya didasarkan atas struktur dasar kimia dari derivat alkaloid, seperti alkaloid dari derivat piridin dan piperidin struktur intinya hampir sama yaitu berbentuk cincin benzena dengan satu gugus atom nitrogen (N) pada C6, hanya berbeda pada rantai rangkap pada cincin benzena. Alkaloid dari derivat quinolin dan isoquinolin dengan struktur inti kimia keduanya hampir sama yakni dua gugus cincin benzena rantai rangkap sama, hanya berbeda pada letak satu gugus atom nitrogen pada cincin benzena yakni gugus atom N derivat quinolin terletak pada gugus atom C10 pada cincin benzena, sedangkan derivat isoquinolin pada C9.



Gambar 2.2. Struktur kimia dari berbagai kelompok alkaloid (Claus,dkk. 1991)

Demikian pula struktur inti dari derivat alkaloid indol, tropan, imidazol, purin dan pirolidin berbeda satu sama lainnya. Aktivitas farmakologi dari tiap derivat alkaloid sangat berbeda dengan lainnya tergantung dari sumber isolasi bahan alkaloid tersebut, bahkan dalam satu derivat alkaloid yang mempunyai struktur kimia sama, aktivitas farmakologinya sangat berbeda. Sebagai contoh alkaloid yang termasuk dalam derivat isoquinolin seperti papaverin, opium, emetin, tubocurarin yang masing-masing mempunyai efek farmakologi yang sangat berbeda. Demikian pula derivat alkaloid indol termasuk didalamnya adalah fisostigmin, vinblastin, strichnin, ergotamin, reserpin yang masing-masing alkaloid tersebut mempunyai efek farmakologi yang sangat berbeda (Thomas, 1949, Robinson, 1991).

Menurut Robinson (1991) pemberian nama alkaloid dari masing-masing zat kimia yang terdapat di dalam tanaman didasarkan atas (1) nama generik yang spesifik dari tanaman yang menghasilkan alkaloid tersebut seperti atropin, papaverin. (2) nama spesifik dari tanaman yang menghasilkan alkaloid, seperti cocain, beladonin. (3) nama umum bahan obat yang dihasilkan, seperti ergotamin, (4) dari aktivitas fisiologik yang dihasilkannya seperti emetin, morfin, (5) dari nama penemunya seperti pelletierin.

Berdasarkan penelitian tidak semua tanaman mengandung alkaloid. Telah diketahui tanaman dari orde Angiospermae seperti Leguminosae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Solanaceae, dan Berberidaceae mengandung alkaloid. Tanaman dari Amaryllidaceae dan Liliaceae diketahui paling banyak mengandung alkaloid (Claus dkk., 1991)

3.6. Alkaloid Tanaman Sebagai Antimitosis.

Telah diketahui tanaman Periwinkle (*Periwinkle plant*) atau disebut dengan *Cantharathus rosea* atau *Vinca rosea* atau tapak dara, mengandung alkaloid vinblastin dan vinkristin yang digunakan untuk pengobatan leukemia dan diabetes militus. Penelitian yang dilakukan oleh Noble dan Couworker (1958) yang hasilnya dikutip oleh Chabner dkk. (2001) menyebutkan bahwa tanaman ini digunakan untuk pengobatan granulositopenia dan supresi sumsum tulang. Pada saat yang bersamaan Johnson dkk. (1958) yang dikutip oleh Chabner dkk. (2001) menyebutkan bahwa tanaman ini digunakan untuk

pengobatan limpositis neoplasma akut. Diketahui vinca alkaloid bekerja spesifik pada siklus pembelahan sel dengan menghambat pembelahan mitosis. Vinca alkaloid mempunyai kemampuan mengikat tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus dengan menghambat atau memblokir polimerisasi protein ke dalam mikrotubulus sehingga terjadi penghancuran (*disolusi*) dari mikrotubulus menjadi kristal-kristal kecil, dimana setiap 1 mol tubulin terikat oleh 1 mol vinca alkaloid. Hal ini menyebabkan gangguan fungsi mikrotubulus yang berperan dalam proses mitosis dan penghentian pembelahan sel pada stadium metafase. Dengan tidak terbentuknya benang-benang mitosis (*mitotic spindels*) yang utuh menyebabkan kromosom masuk dalam sitoplasma sehingga kromosom menjadi bergerobol (*clump*) seperti bola atau bintang yang disebut dengan *explode mitotic*. Mikrotubulus berfungsi membentuk benang-benang mitosis dan berperan untuk pergerakan sel, fagositosis dan transportasi makanan dan hasil metabolisme dalam sel.

Alkaloid lain yang berasal dari tanaman dan telah diketahui mempunyai efek antimitosis adalah paklitaxel atau dikenal dengan nama taxol. Taxol diisolasi dari kulit tanaman Yew (*Yeu bark*) sejenis pohon cemara kipas. Tanaman ini tumbuh di benua Eropa dan sekarang telah dibuat semisintetik yaitu 10-des acetyl baccatin yang berasal dari daun tanaman yew. Hambatan mitosis pada siklus pembelahan sel yang terjadi pada pemakaian paklitaxel berbeda dengan vinca alkaloid. Paklitaxel menghambat sintesis mikrotubulus dengan mengikat beta tubulin yang spesifik untuk sintesis mikrotubulus. Paklitaxel diketahui mengantagonisir perbaikan protein sitoskeleton yang menyebabkan terbentuknya simpul-simpul atau pembundelan pada mikrotubulus dan gangguan dari struktur mikrotubulus yang diikuti dengan penghentian mitosis. Paklitaxel juga diketahui menghambat sintesis DNA secara progresif (Chabner dkk., 2001).

Bahan alkaloid lain yang berasal dari tanaman dan diketahui menghambat siklus sel adalah epidophylotoxin atau etoposide yang diisolasi dari daun tanaman Mandrake yaitu *Podophyllum peltatum* atau sejenis pohon pepaya. Ekstrak tanaman ini tidak menghentikan proses mitosis tetapi akan membentuk kompleks dengan enzim topoisomerase II dan DNA. Kompleks ini menyebabkan rusaknya double helik pada DNA. Diketahui ekstrak tanaman ini

terutama bekerja pada siklus sel pada fase S dan fase G2 (Chabner dkk., 2001).

Alkaloid lain yang berasal dari tanaman yang berpengaruh pada siklus sel adalah camptothecin yang berasal dari tanaman *Camptotheca acuminata* yang terdapat didaratan Cina. Camptothecin mengikatkan diri pada enzim topoisomerase I yaitu suatu enzim yang berfungsi pada supercoiled DNA yang berperan pada proses replikasi, rekombinasi, repair dan transkripsi (Chabner dkk.,2001).

4. Apoptosis

Apoptosis merupakan proses alamiah yang dialami oleh semua sel, mekanisme apoptosis yang terkontrol, sinergi yang dapat terjadi pada masa pertumbuhan, inflamasi jaringan, penuaan atau pada mekanisme imun dan hanya mempengaruhi sekelompok kecil atau satu sel saja. Keadaan ini yang membedakan apoptosis dengan nekrosis. Nekrosis merupakan proses kematian sel yang bersifat pasif, tidak terkontrol yang disebabkan adanya perubahan secara mendadak yang terjadi pada sekitar sel tersebut seperti terkena bahan toksik (Anonimus, 2003)

Alasan sel melakukan apoptosis adalah pertama apoptosis diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan sel, jaringan atau organ, kedua apoptosis untuk menghancurkan sel-sel yang dianggap membahayakan bagi integritas organisme itu sendiri, seperti sel yang terinfeksi oleh virus atau sel dengan kerusakan DNA, maupun sel kanker (Fujiwara dkk.,2004, Yalon dkk.,2004).

Salah satu proses apoptosis dapat terjadi melalui ribonukleoprotein atau telomerase. Telomerase terdiri dari beberapa nukleotida yang tersusun secara berulang, terdiri dari C4-A2 dan G4-72. Telomerase berfungsi untuk mempertahankan ukuran telomer dari kromosom dan telomer akan mengalami pemendekan pada waktu sel melakukan pembelahan diri. Apabila telomer tersebut mencapai ukuran tertentu (level kritis) sebagai akibat terjadi pembelahan sel secara berulang, maka sel tersebut tidak akan dapat melanjutkan pembelahannya yang pada akhirnya sel akan mengalami kematian yang disebut apoptosis. Adanya aktivitas enzim telomerase menyebabkan ukuran telomerase pada ujung kromosom akan dapat dipertahankan secara terus menerus, sehingga

kromosom sel selalu terlindungi. Telomerase akan tetap aktif pada sel benih dan tidak aktif pada sel somatik, namun telomerase akan terinduksi kembali bila sel normal mengalami transformasi menjadi sel kanker (Lantuejoul dkk., 2004)

Pengamatan adanya induksi apoptosis dengan pewarnaan akridin orange atau etidium bromida. Pewarnaan tersebut dapat digunakan untuk mengamati perbedaan kedua jalur kematian sel, nekrosis atau apoptosis. Pengamatan menggunakan mikroskop fuorosens pembesaran 100 X akan terlihat : sel yang hidup berwarna hijau, sel yang mengalami apoptosis akan tampak terwarnai orange dengan bintik orange terang yang menunjukkan kondensasi dan frakmentasi inti sel dan sel yang mengalami nekrosis akan terwarnai orange kecoklatan merata tanpa bintik orange terang karena tidak terjadi kondensasi kromatin dan frakmentasi inti sel.

5. Kanker dan Antikanker

Suatu sel normal dapat berubah menjadi sel kanker atau sel ganas karena adanya perubahan pada DNA sel tersebut. Ada 2 penyebab perubahan epigenetik yang dapat menyebabkan terjadinya kanker, yaitu inaktivasi gen supresor tumor dan aktivasi protoonkogen menjadi onkogen (Lantuejoul dkk., 2004) Perubahan sel normal menjadi sel ganas dapat disebabkan adanya distorsi atau gangguan dari gen pengatur pertumbuhan sel. Protoonkogen merupakan gen yang terlihat dalam pertumbuhan dan deferensiasi normal sel. Bila diaktivasi oleh adanya virus tertentu maupun sebagai hasil dari mutasi, proto-onkogen dapat berkembang menjadi onkogen aktif dan memacu tumbuhnya keganasan sel (Kocki dkk.,2004, Yalon dkk.,2004,)

Obat antikanker sebaiknya memiliki toksisitas yang selektif, namun obat antikanker yang ada biasanya menekan sel dan menimbulkan toksisitas karena ikut menghambat pertumbuhan sel normal yang proliferasinya cepat seperti sumsum tulang, epitel germinativum, mukosa saluran pencernaan dan jaringan limposit. Hal ini disebabkan obat antikanker tersebut membunuh sel kanker melalui jalur nekrosis yang dapat menimbulkan inflamasi dan melibatkan sekelompok sel yang lain (Chaoi dkk.,2004). Obat kemoterapi atau antikanker yang ideal adalah yang mampu membunuh sel kanker tanpa membahayakan sel normal dan hingga saat ini belum ada obat yang memenuhi kriteria tersebut,

belum lagi terjadi resisten terhadap obat tersebut. Oleh karena itu pengembangan obat antikanker dilakukan melalui skrining empirik, desain rasional senyawa obat baru maupun terapi genetik.

Mekanis kerja obat sebagai antikanker menurut Nafrialdi (2000) adalah sebagai berikut : 1) Alkilator. Mekanisme kerjanya adalah membentuk ion karboniumau kompleks lain yang sangat reaktif. Efek sitotaksik disebabkan terbentuknya alkilasi DNA sehingga terjadi kerusakan DNA. Contoh mustar nitrogen. 2) Antimetabolik. Senyawa yang mengandung metabolik seperti merkapurin (antipurin), 5-fluorourasil (antipirimidin) dan metotreksat (antagonis folat) mekanisme kerjanya adalah mengambil aatau menggantikan senyawa purin, pirimidin atau folat atau secara tidak langsung menghambat perkembangan sel bahkan menyebabkan kematian sel. 3) Antibiotik. Antibiotil yang dapat mengganggu fungsi dari DNA seperti antrasiklin, aktinomisin dan bleomisin. Antibiotik tersebut dengan enzim P450 dapat membentuk radikal bebas yang dapat membunuh sel kanker dan 4) Tanaman. Alkaloid tanaman yang dapat digunakan sebagai antikanker adalah vinkristin dan vinblastin yang bersal dari tanaman *Vinca rosea*, kolkhisin yang berasal dari tanaman *Colchicum autumnale*. Mekanisme kerja alkaloid tersebut adalah mengikat tubili dan menghambat pembentukan komponen mikrotubuli pada benang nitosis sehingga akan berhenti pada metafase.

Obat antikanker hendaknya membunuh sel kanker melalui antimitosis dan antitelomerase dengan menginduksi apoptosis. Kematian sel karena induksi apoptosis tidak menyebabkan inflamasi dan hanya melibatkan satu atau sekelompok sel (*cluster*) (Anonimus, WWWpotofolio, mvm.ed.ac.uk.3003, Fujiwara dkk.,2004, Liu dkk.,2004).

6. Sel Mieloma

Sel mieloma adalah sel tumor yang mengalami trnsformasi menjadi sel malignant atau sel ganas. Pada hewan percobaan dapat disebabkan dengan pemberian senyawa karsinogen golongan hidrokarbon secara terus menerus dengan waktu tertentu dan terjadinya sel kanker atai sel mieloma dapat dideteksi setelah setahun setelah terhitung diberi perlakuan senyawa karsinogenik. Sel mieloma dapat berasal dari jaringan limpa manusia, tikus dan mencit.

Persyaratan sel mieloma dapat digunakan sebagai bahan penelitian adalah sel mieloma yang tidak memproduksi sel imunoglobulin. Adanya imunoglobulin dapat menyebabkan terjadinya reaksi yang tidak dikehendaki pada percobaan. Sel mieloma yang sering digunakan adalah galur *Mineral Oil Plasmacytoma-21* (MOPC-21) (Indrawati, 1999). Saat ini sel mieloma yang berasal dari mencit yang diketahui tidak mengandung imunoglobulin (Bagun, 1990).

BAB 4

METODE PENELITIAN

Rancangan penelitian yang dipakai pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap kelompok yang terdiri dari 6 kelompok perlakuan dengan 6 parameter. Kelompok perlakuan terdiri dari 4 kelompok dosis fraksi alkaloid dalam berbagai konsentrasi yakni 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, dan 1000 ppm. Kelompok kontrol positif menggunakan alkaloid tanaman yang merupakan standar obat kanker yang ada di pasaran yakni colchicin 100 ppm, sedangkan kontrol negatif hanya menggunakan media RPMI saja.

Pembuatan Faksi Alkaloid

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

Eksplorasi Dosis

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan penelitian ekstrak total daun *Achyranthes aspera linn* yang telah dilakukan sebelumnya oleh Wurlina dkk. (2003), Wurlina dkk. (2004), Meles dkk..(2004) dan Meles (2005) yaitu 100 mg/kgbb sebagai antimitosis pada perkembangan sel embrio dan spermatozoa secara *invivo*. Dari ekstrak total *Achyranthes aspera linn* setelah dilakukan fraksinasi diperoleh fraksi alkaloid sebesar 10%, sehingga dosis fraksi alkaloid yang digunakan dalam penelitian ini yang dipakai secara invitro adalah konsentrasi 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 1000 ppm.

Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan larutan induk alkaloid *Achyranthesaspera linn* 5.000 ppm, dengan menimbang sebanyak 50 mg alkaloid, selanjutnya dilarutkan dengan dimetilsulfoxida (DMSO) sebanyak 1 ml, diaduk sampai larut, selanjutnya ditambahkan aquadest steril sampai 10 ml. Kemudian disimpan dalam botol steril sebagai larutan induk. Melalui beberapa tahapan pengenceran yang diambil dari larutan induk, dibuat larutan uji dengan konsentrasi 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 1.000 ppm.

Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Kontrol positif digunakan Colchicin 100 ppm. Dibuat dengan menimbang sebanyak 50 mg colchicin dimasukkan kedalam gelas ukur, selanjutnya ditambahkan 1 ml DMSO hingga larut. Ditambahkan aquades steril sampai 10 ml larutan ini konsentrasi 5.000 ppm. Selanjutnya diambil 0,1 ml larutan 5.000 ppm ditambahkan 4,9 ml aquades steril sehingga diperoleh larutan colchicin 100 ppm.

Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Kontrol negatif dibuat hanya diberi DMSO sebanyak 1 ml, kemudian ditambahkan aquades steril 9 ml yang diencerkan tiga kali.

Preparasi Kultur

Sel mieloma dalam media *Rosewell Park Memorial Institut* (RPMI) disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 5^o C, kemudian supernatan dipisahkan dari endapan sel. Selanjutnya sel mieloma diresuspensi pada media dengan menggunakan campuran FBS 10%, kemudian kultur diinkubasikan dalam inkubator 95% O₂ dan 5% CO₂ pada suhu 37^o C. Kultur sel yang diinkubasikan dilakukan pemeriksaan dengan hemositometer untuk menentukan kultur sel mieloma tumbuh dan berkembang. Setelah diperkirakan jumlah sel mieloma yang tumbuh dan berkembang mencapai 2X 10⁶ sel/ml, selanjutnya kultur sel dimasukkan kedalam *microwell plate* sampai volume 0,5 ml yang sebelumnya telah diisi bahan uji fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* sebanyak 0,1 ml dalam konsentrasi masing-masing 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 1000 ppm. Kelompok tersebut adalah sebagai berikut : Kelompok 1 :

sebagai bahan uji sel mielom mendapatkan larutan bahan uji fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn.* masing-masing dengan konsentrasi 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 1000 ppm. Kelompok 2 : sebagai kontrol negatif, digunakan hanya DMSO dan media RPMI dan aquades steril dan untuk memastikan bahwa bila terjadi efek sitotoksik maka efek ini tidak disebabkan oleh medianya. Kelompok 3 : sebagai kontrol positif, sel mieloma mendapatkan larutan colchicin 100 ppm

Masing-masing konsentrasi pada kelompok 1, 2 dan 3 diwakili oleh 8 *microwell plate* sehingga lubang yang digunakan dalam tiap percobaan adalah 48 lubang. Keenam perlakuan tersebut dilakukan 6 replikasi. Parameter yang diamati adalah sebagai berikut : 1) Persentase sel mieloma hidup dan mati, 2) Persentase sel mieloma yang mengalami apoptosis, 3) Persentase sel mieloma yang mengalami nekrosis, dan 4) Konsentrasi fraksi alkaloid yang dapat membunuh 50% (LC50%) sel myeloma secara *in vitro*, 5) Kadar caspase menggunakan Elisa

Menghitung Persentase Viabilitas sel Mieloma

Untuk menghitung viabilitas sel mieloma setelah pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* menggunakan pewarnaan Tripian blue, dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 X. Pada pemeriksaan mikroskop cahaya akan terlihat sel yang hidup tidak menyerap warna akan terlihat tidak berwarna, sedangkan sel yang mati akan terlihat berwarna biru.

Prosedur kerja penentuan viabilitas sel mieloma

1. Sel Mieloma mencit dalam media RPMI dipersiapkan
2. Sel mieloma dalam media dimasukkan kedalam tabung sentrifugasi.
3. Dilakukan sentrifuge kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C.
4. Supernatan dipisahkan dari endapan (dalam Laminar air flow = LAF))
5. Sel ditanam dalam media ditambah FBS 10% dalam botol kultur sampai volume 10 ml. Tahap ini dikerjakan pada LAF.
6. Kultur disimpan dalam inkubator 95% O₂ dan 5% CO₂ pada suhu 37°C.
7. Kultur dikeluarkan dari inkubator, dihomogenkan, kemudian dihitung jumlah sel (hemositometer) sampai mendekati 2 x 10⁶ sel / ml.
8. Bila jumlah sel telah mencukupi, pindahkan kultur sel ke dalam lubang *microwell plate* sampai volume 0,5 ml. Masing-masing *microwell plate* telah

diisi sebelumnya sejumlah 0,1 ml larutan uji, lar kontrol positif dan lar. kontrol negatif.

9. Inkubasikan dalam inkubator selama 24 jam.
10. Diambil 50 uL suspensi masing-masing uji ke vial, sisanya dipindahkan kedalam disposable tube untuk pengamatan induksi apoptosis.
11. Tambahkan 50uL larutan zat warna (nigrosin atau tripan blue 0,4%) kedalam masing-masing vial .
12. Dihitung dengan Hemositometer, dihitung Viabilitas sel mieloma.

$$\% \text{ Viabilitas sel} = \frac{\Sigma \text{ sel hidup}}{\Sigma \text{ sel hidup} + \Sigma \text{ sel mati}} \times 100\%$$

Menghitung Persentase apoptosis dan nekrosis sel Mieloma

Sel mieloma yang mengalami apoptosis setelah pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn dihitung menggunakan pewarnaan campuran etidium bromid dan acridin orange, dengan menggunakan mikroskop fluoresens pembesaran 400 kali. Sel mieloma yang hidup akan terlihat berwarna hijau, sel yang mengalami apoptosis terlihat berwarna orange dengan tengahnya kekuningan dan sel yang mengalami nekrosis terlihat berwarna kecoklatan

Prosedur kerja penentuan induksi apoptosis dan nekrosis sel mieloma:

1. Dibuat larutan acrydin orange konsentrasi 100 ppm dan larutan ethidium bromid konsentrasi 100 ppm dalam lar. PBS.
2. Campurkan kedua zat warna sama banyak dalam vial
3. Campurkan sebanyak 25 uL suspensi sel dengan 1 uL campuran zat warna (2) dalam vial segera diamati.
4. Pipet sebanyak 10 uL, tempatkan objek glass, tutup dengan cover glass, amati minimal 300 sel dengan mikroskop flourecein.
5. Sel apoptosis : berwarna oranye dengan bintik2 terang karena kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA, dan sel nekrosis berwarna oranye tanpa bintik terang, sedangkan sel hidup berwarna hijau.

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

Menghitung konsentrasi fraksi alkaloid yang menyebabkan kematian 50% sel mieloma (LC50).

Untuk menentukan konsentrasi fraksi alkaloid yang dapat membunuh 50% (LD50) sel mieloma secara in vitro, dapat dihitung dari dosis yang menyebabkan kematian sel mieloma yang paling mendekati 50% sel mieloma mengalami kematian dengan perbandingan secara matematik yakni 50% sel mieloma yang mati : X ppm (LC50) = persentase sel mieloma yang paling mendekati kematian 50% : dosis alkaloid dalam ppm. Dari perbandingan ini dapat dihitung LC50 alkaloid *Achyranthes aspera linn* yang mampu menyebabkan kematian 50% sel mieloma (LC50).

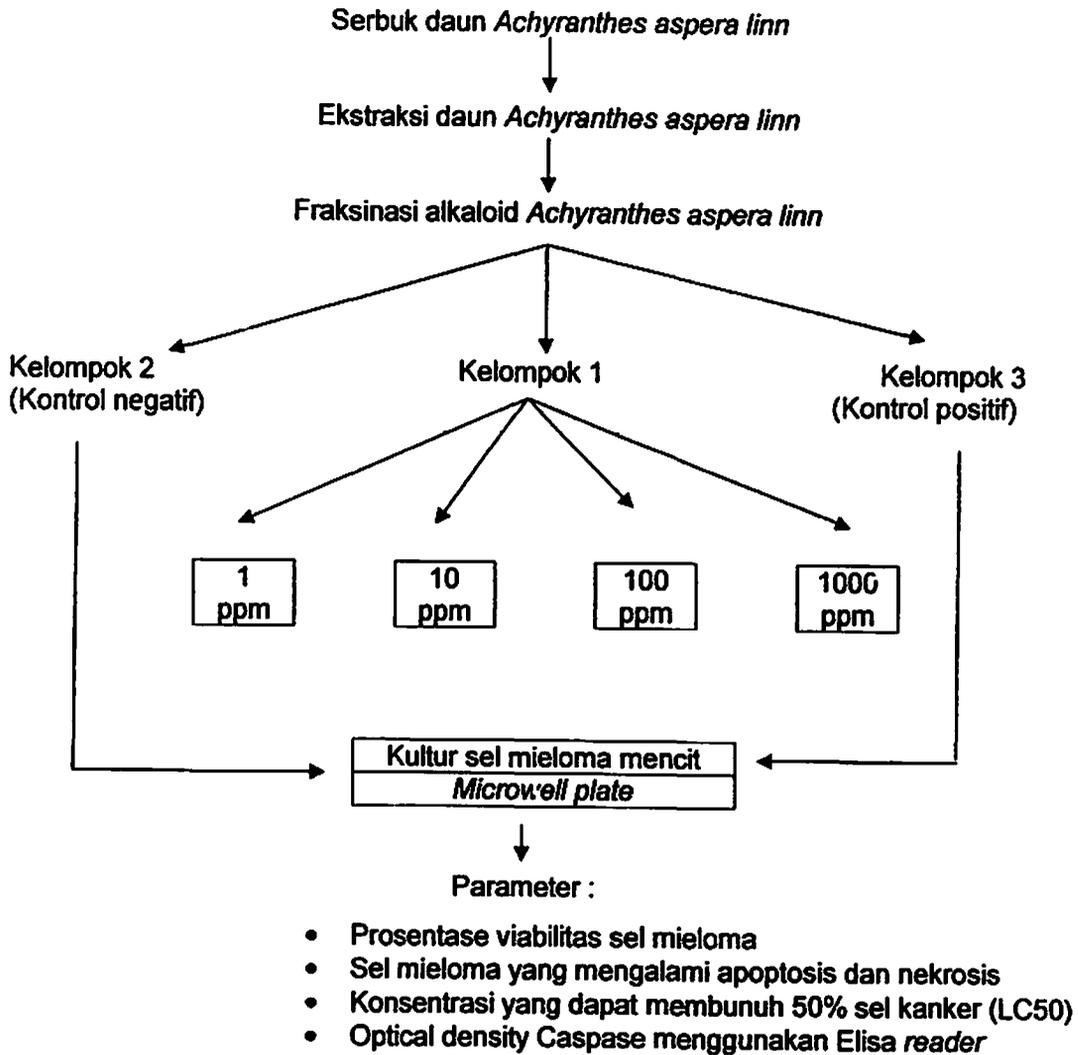
Pengukuran *Optical Density* Caspase

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

1. Sel Mieloma mencit dalam media RPMI dipersiapkan
2. Sel mieloma dalam media dimasukkan kedalam tabung sentrifugasi.
3. Dilakukan sentrifuge kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4° C.
4. Supernatan dipisahkan dari endapan (dalam Laminar air flow = LAF))
5. Sel ditanam dalam media ditambah FBS 10% dalam botol kultur sampai volume 10 ml. Tahap ini dikerjakan pada LAF.
6. Kultur disimpan dalam inkubator 95% O₂ dan 5% CO₂ pada suhu 37°C.
7. Kultur dikeluarkan dari inkubator, dihomogenkan, kemudian dihitung jumlah sel (hemositometer) sampai mendekati 2 x 10⁶ sel / ml.
8. Bila jumlah sel telah mencukupi, pindahkan kultur sel ke dalam lubang *microwell plate* sampai volume 0,5 ml. Masing-masing *microwell plate* telah diisi sebelumnya sejumlah 0,1 ml larutan uji, lar kontrol positif dan lar. kontrol negatif.
9. Inkubasikan dalam inkubator selama CO2 95% selama 4 jam
10. Diberi pereaksi anticaspase 25 ul
11. Inkubasikan dalam inkubator selama 1 jam
12. Diberi pelarut DMSO 50ul
13. Selanjutnya disentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit

14. pembacaan nilai absorban dengan menggunakan *Elisa reader* pada panjang gelombang 630 nm

Kerangka Penelitian :



BAB 5

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Fraksi Alkaloid *Achyranthes aspera* linn Terhadap Viabilitas Sel Pada Kultur Sel Meloma

Pemeriksaan viabilitas sel mieloma setelah pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* pada berbagai dosis, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.1. Pada Tabel 5.1, menunjukkan semakin besar dosis fraksi alkaloid *Achyranthes aspera Linn* yang diberikan menyebabkan peningkatan persentase sel mieloma yang mati dan penurunan persentase viabilitas sel mieloma.

Setelah dilakukan uji statistik menggunakan Anava, pada kontrol negatif terdapat perbedaan yang bermakna terhadap semua perlakuan termasuk kontrol positif ($p < 0,05$), sedangkan kontrol positif tidak terdapat perbedaan dengan perlakuan pemberian fraksi alkaloid 100 ppm (P3) dan 1000 ppm (P4) namun terdapat perbedaan dengan kontrol negatif, P1 (fraksi alkaloid 1 ppm) dan P2 (fraksi alkaloid 10 ppm). Viabilitas sel mieloma antara pemberian fraksi alkaloid 1 ppm (P1) dengan 10 ppm (P2) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) dan viabilitas sel mieloma antara pemberian fraksi alkaloid 100 ppm (P3) dan 1000 ppm (P4) tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$).

Tabel 5.1. Rerata Persentase Viabilitas Sel Meloma setelah Pemberian Fraksi Alkaloid *Achyranthes aspera linn*

Perlakuan	Sel hidup (%)	Sel mati (%)
Kontrol negatif	94,38 ^a ± 2,59	5,62 ^c ± 2,59
Kontrol positif (colchicin 100 ppm)	13,18 ^c ± 7,75	86,81 ^b ± 7,75
P1 (alkaloid 1 ppm)	30,42 ^b ± 3,58	69,57 ^b ± 3,58
P2 (alkaloid 10 ppm)	26,19 ^b ± 3,99	73,80 ^b ± 3,99
P3 (alkaloid 100 ppm)	9,45 ^c ± 4,82	90,55 ^a ± 4,81
P4 (alkaloid 1000 ppm)	7,26 ^c ± 6,42	92,74 ^a ± 6,42

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

Pada kontrol negatif tidak memiliki hambatan pertumbuhan terhadap kultur sel mieloma seperti pada kelompok perlakuan, hal ini dapat ditunjukkan dengan tingginya persentase viabilitas sel mieloma kelompok kontrol negatif (94,38%). Perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan terhadap viabilitas sel

mieloma adalah semakin besar konsentrasi fraksi alkaloid, maka semakin kecil persentase viabilitas sel mieloma tersebut. Berdasarkan hasil ini dapat dikatakan bahwa fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn memiliki aktivitas yang dapat menyebabkan kematian sel mieloma secara *in vitro*. Efek kematian pada sel mieloma pada pemberian fraksi alkaloid dengan konsentrasi 100 ppm melebihi efek colchicin (kontrol positif) pada konsentrasi yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi alkaloid sangat efektif dalam membunuh sel mieloma secara *in vitro*.

Untuk menentukan besarnya konsentrasi fraksi alkaloid yang dapat membunuh 50% (LC50) sel mieloma secara *in vitro* dapat dihitung dari data yang diperoleh di atas yakni dari persentase kematian sel mieloma yang mendekati kematian 50% yaitu dengan dosis 1 ppm sebesar $69,57 \pm 3,58\%$, sehingga dapat diketahui bahwa konsentrasi fraksi alkaloid yang dapat membunuh 50% sel mieloma berada pada konsentrasi fraksi alkaloid dibawah 1 ppm. Dengan perbandingan secara matematik dapat dihitung yakni $69,57\% : 1 \text{ ppm} = 50\% : x \text{ ppm}$. Sehingga $X \text{ ppm} = \frac{50\% \times 1 \text{ ppm}}{69,57\%} = 0,718 \text{ ppm}$.

Pengaruh Fraksi Alkaloid *Achyranthes aspera* Linn Terhadap Sel Mieloma Yang Mengalami Apoptosis

Pemeriksaan terhadap sel mieloma yang mengalami apoptosis pada pemberian berbagai dosis fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Rerata persentase apoptosis sel mieloma setelah pemberian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* linn

Perlakuan	Sel hidup (%)	Sel nekrosis (%)	Sel apoptosis (%)
Kontrol negatif	$94,38^a \pm 2,59$	$5,08^b \pm 0,68$	$0,54^c \pm 0,07$
Kontrol positif	$13,18^c \pm 7,75$	$55,40^a \pm 4,23$	$31,41^a \pm 5,96$
P1 (alkaloid 1 ppm)	$30,42^b \pm 3,58$	$54,33^a \pm 7,65$	$15,23^b \pm 4,16$
P2 (alkaloid 10 ppm)	$26,19^b \pm 3,99$	$54,05^a \pm 6,29$	$19,75^b \pm 3,59$
P3 (alkaloid 100 ppm)	$9,45^c \pm 4,82$	$53,03^a \pm 2,42$	$37,52^a \pm 3,67$
P4 (alkaloid 1000 ppm)	$7,26^{cd} \pm 6,42$	$57,81^a \pm 1,47$	$34,93^a \pm 3,41$

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

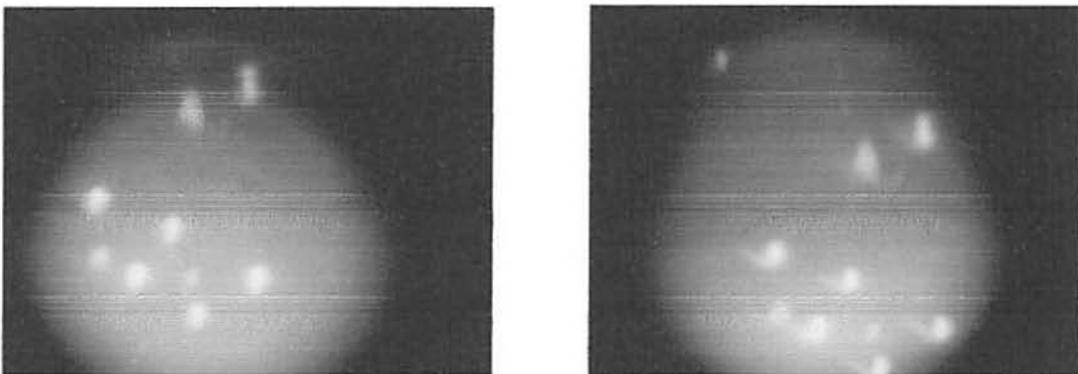
Pada Tabel 5.2, terlihat semakin besar dosis alkaloid *Achyranthes aspera* Linn yang diberikan menyebabkan peningkatan persentase sel mieloma yang mengalami nekrosis dan apoptosis

Setelah dilakukan uji statistik menggunakan anava terhadap kejadian nekrosis sel mieloma antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan semua kelompok perlakuan (P1, P2, P3 dan P4) terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat kematian sel mieloma pada pemakaian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* dan colchicin. Antara kontrol positif dengan semua perlakuan tidak ada perbedaan yang bermakna ($P > 0,05$). Hal ini berarti bahwa penggunaan fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* mulai dari konsentrasi 1 ppm sampai 1000 ppm memberikan efek yang sama dengan penggunaan colchicin dalam konsentrasi 100 ppm secara *in vitro*.

Terhadap kejadian apoptosis sel mieloma setelah dilakukan uji statistik menggunakan Anava, antara kontrol negatif dengan kontrol positif dan semua perlakuan (P1, P2, P3 dan P4) terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan ada pengaruh terjadinya apoptosis sel mieloma pada penggunaan fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn* maupun pada penggunaan colchicin. Antara kelompok kontrol positif dengan P3 dan P4 tidak terdapat perbedaan bermakna ($p > 0,05\%$). Hal ini menunjukkan tidak ada perbedaan kejadian apoptosis sel mieloma antara konsentrasi fraksi alkaloid 100 ppm dan 1000 ppm dengan colchicin 100 ppm, walaupun data dalam tabel diatas efek apoptosis pada sel mieloma lebih besar terjadi pada pemakaian fraksi alkaloid *Achyranthes aspera linn*.

Pada kontrol negatif terjadi kematian sel melalui mekanisme nekrosis sebesar $5,08 \pm 0,68 \%$ dan apoptosis sebesar $0,54 \pm 0,07 \%$. Hal ini dapat terjadi pada sel yang normal yang tumbuh dan berkembang akan selalu terjadi kematian baik secara fisiologis maupun secara patologis. Berdasarkan penelitian hampir jutaan sel didalam tubuh yang sedang tumbuh dan berkembang baik sel muda maupun sel yang tua akan mengalami kematian dengan mekanisme apoptosis yang bersifat fisiologis maupun nekrosis yang bersifat patologis akibat terpapar oleh bahan-bahan kimia, sinar ultraviolet maupun proses mekanisme tubuh yang bersifat respon imun dan kegagalan proses pembelahan sel secara mitosis dan miosis.

Kematian sel dapat terjadi melalui proses nekrosis dan apoptosis. Terjadinya kematian sel melalui mekanisme nekrosis dimulai dari adanya pembengkakan sel (degenerasi sel) yang berakibat terganggunya aliran darah kedalam sel atau terganggunya keseimbangan cairan intrasel dan cairan ekstraseluler yang menyebabkan terjadi pembengkakan dan terjadi gangguan dalam penyediaan energi (ATP) yang berasal dari proses metabolisme sehingga berpengaruh pada pembentukan enzim ATPase terutama pada pembentukan Na-K-ATPase sehingga terjadi gangguan fungsi pompa ion Natrium Kalium (Na-K Pump) didalam sel. Akibatnya terjadi penumpukan ion Natrium didalam sel dan peningkatan ion K diluar sel, hal ini yang menyebabkan terjadi pembengkakan sel. Pada keadaan ini sel masih dapat mengalami perbaikan secara reversibel didalam sel dengan mekanisme fisiologis, sel akan berusaha untuk mencapai keseimbangan. Apabila proses gangguan pada pembentukan ATPase berlanjut terus maka akan menyebabkan seluruh organel sel seperti mitokondria, golgi aparatus, lisosom, ribosom, nukleus dan komponen-komponen didalam nukleus akan mengalami pembengkakan yang mengarah pada kematian sel. Sel akan membengkak dimana seluruh organel sel akan bengkak mencapai optimal. Proses kebengkakan sel yang telah mencapai optimal akan menyebabkan terjadi kebocoran sel, yang diawali adanya kerusakan pada membran sel, selanjutnya sel mengalami lisis dan diikuti dengan nekrosis sel yang ditandai dengan inti sel mengalami piknosis, karioreksis dan kariolisis (Meles, dkk..2004; Yalon dkk, 2004).



Gambar 5.1. Sel mieloma hidup berwarna hijau, sel mieloma apoptosis berwarna kuning orange dan sel mieloma nekrosis berwarna coklat

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

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

Apoptosis yang terjadi *secara* fisiologis melibatkan peran dan fungsi dari telomer. Telomer adalah suatu protein yang berfungsi melindungi kromosom. Telomer terbentuk dari proses aktivasi enzim telomerase. Adanya hambatan pada pembentukan enzim telomerase akan menyebabkan hambatan pembentukan telomer. Akibatnya kromosom tidak ada yang melindungi sehingga terjadi proses fragmentasi kromosom (pecahnya kromosom), hal ini akan menyebabkan sel mati yang dikenal sel mengalami apoptosis (Andrew dkk., 2002, Fujiwara dkk., 2004, Lantuejoul dkk., 2004)

Proses kematian sel melalui mekanisme apoptosis yang bersifat patologis dapat terjadi melalui aktivasi dari protein kinase C (PKC) dan Cystein Protein Kinase-2 (CPK2). PKC maupun CPK2 akan mengaktivasi suatu protein yaitu protein P53 yang ada didalam inti sel, selanjutnya akan mempengaruhi proses transkripsi protein P21 yang menyebabkan hambatan pembentukan semua enzim cyclin dependent kinase (CDK) termasuk CDK1, CDK2, CDK4 dan CDK6. CDK berfungsi mengikat protein cyclin untuk memulai proses pembelahan sel. Hambatan pembentukan CDK menyebabkan protein cyclin menjadi inaktif. Hal ini berakibat siklus sel yang melibatkan sintesis DNA pada fase S dan proses sintesis RNA pada fase G1 dan G2 serta proses mitosis sel yang terjadi pada fase M akan terhenti sehingga sel tidak akan mengalami pembelahan dan sel akan

mati karena terjadi kondensasi kromosom yang menyebabkan sel mati yang disebut sel mengalami apoptosis (Andrew dkk., 2002, Yalon dkk., 2004, Huang dkk., 2005).

Apoptosis yang bersifat patologis yang terjadi akibat peningkatan aktivitas protein P53 dapat terjadi melalui aktivasi protein Bax. Protein Bax akan merangsang mitokondria memproduksi Cytokrom-C secara berlebihan sehingga terjadi apoptosis. Cytokrom-C akan mengaktifasi apoptotic protease activating factor 1 (APAF1) yang menyebabkan aktivasi caspase inisiasi (caspase 9) bekerjasama dengan caspase 8 untuk menstimulir terbentuknya caspase executor (caspase 3). Selanjutnya caspase 3 akan mengaktifasi enzim deoxyribo nucleotidase (DNA ase) untuk mencernakan DNA sehingga terjadi fragmentasi DNA yang menyebabkan kematian sel (apoptosis) (Choi dkk., 2004, Yalon dkk., 2004, Zou dkk., 2004).

Mekanisme apoptosis yang bersifat patologi dapat pula terjadi melalui proses sitotoksik sel. Keracunan sel tubuh oleh suatu bahan-bahan yang bersifat toksik akan menyebabkan terlepasnya berbagai macam protein dari sel tersebut seperti perforin dan granzim. Kedua enzim ini akan menyebabkan aktivasi darai caspase inisiator (Caspase 9) selanjutnya Caspase 9 akan bekerjasama dengan Caspase 8 unutm membentuk Caspase executor (caspase 3) dan Caspase 3 mengaktifasi enzim DNAase yang selanjutnya anzim DNAase akan mencernakan DNA yang mengakibatkan fragmentasi dari DNA, dan berakibat kematian sel (apoptosis) (Sui dan Fan, 2005, Yalon dkk., 2004).

Optical Density Caspase fraksi Alkaloid Achyranthes aspera linn

Pembacaan hasil *optical density* dengan ELISA reader pada panjang gelombang 630 nm. Pembacaan *Optical Density* caspase bisa dipakai sebagai patokan apabila optrical density pada kelompok kontrol <0,2 (Suwarno,2000). *Optical density* caspase yang dibaca melalui reader dari ELISA dinyatakan positif bila sampel memberikan nilai absorban diatas nilai rata-rata kontrol negatif (COV/Cut Of Value). COV ditentukan dengan rata kontrol negatif ditambah 2-3 simpangan baku ($X + 2-3 SD$) (Suryani, 2005).

Terdapatnya caspase pada pemberian berbagai dosis alkaloid Achyranthes aspera linn dapat dilihat pada tabel 5.3.

Tabel 5.3. Rerata *Optical density* caspase pada berbagai dosis alkaloid *Achyranthes aspera* linn

Perlakuan	N	Rentangan	Retara Optical Density
Kontrol -	8	0,172 - 0,191	0,180 ^a + 0,006
Kontrol +	8	0,398 - 0,473	0,435 ^c + 0,026
Alkaloid 1 ppm	8	0,279 - 0,387	0,352 ^b + 0,035
Alkaloid 10 ppm	8	0,397 - 0,482	0,434 ^c + 0,033
Alkaloid 100 ppm	8	0,423 - 0,574	0,489 ^{cd} + 0,049
Alkaloid 1000 ppm	8	0,540 - 0,675	0,618 ^d + 0,066

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

Berdasarkan hasil pemeriksaan *Optical Density* caspase dengan uji Elisa *indirect* maka diperoleh data bahwa pada perlakuan alkaloid *Achyranthes aspera* linn dosis 10 ppm sudah menunjukkan *Optical Density* positif adanya caspase yaitu diatas nilai dua kali COV (0,384).

Salah satu proses kematian sel dapat terjadi melalui mekanisme apoptosis dengan melibatkan peran dan fungsi mitokondria. Adanya kerusakan pada mitokondria menyebabkan kematian sel melalui mekanisme apoptosis. Seperti diketahui mitokondria sangat berperan dalam proses reaksi oksidasi dan reduksi sel dalam menghasilkan energi (Adenosin triphosphat =ATP), disamping berperan dalam proses metabolisme sel juga sebagai tempat sintesis lemak dan protein yang diperlukan oleh sel. Pendekatan molekular menunjukkan bahwa adanya kerusakan pada mitokondria akan memicu terjadinya peningkatan sintesis Sitokrom C. Adanya peningkatan sitokrom C akan menyebabkan terjadinya peningkatan enzim caspase terutama caspase-9 yang disebut dengan caspase inisiator. Peningkatan caspase-9 akan merangsang terbentuknya caspase-3 sebagai caspase executor yang menyebabkan pelepasan beberapa enzim endonuclease seperti deoksi ribonuclease (DNase). Peningkatan enzim ini akan menyebabkan terjadinya fragmentasi DNA sehingga terjadi induksi apoptosis pada sel kanker (Lantuejoul dkk., 2004).

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn menyebabkan kematian sel mieloma lebih dari 90% dengan konsentrasi 100 ppm.
2. Kematian sel mieloma terjadi melalui mekanisme apoptosis sebesar $37,52 \pm 3,67\%$ dengan konsentrasi 100 ppm..
3. Kematian sel mieloma terjadi melalui mekanisme nekrosis sebesar $53,03 \pm 2,42\%$ dengan konsentrasi 100 ppm.
4. Konsentrasi fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* linn yang menyebabkan kematian 50% (LC50) sel mieloma sebesar 0,719 ppm.
5. *Optical Density* caspase yang sama dengan kontrol positif pada pemberian alkaloid *Achyranthes aspera* Linn pada dosis 10 ppm

Saran

1. Dilakukan isolasi dan identifikasi alkaloid yang terkandung dalam daun *Achyranthes aspera* Linn untuk menentukan struktur kimia, berat molekul dan batas keamanan serta farmakokinetik untuk pengembangan kearah obat modern.
2. Dilakukan penelitian terhadap selektivitas efek anti mitosis dan antitelomerase fraksi alkaloid *Achyranthes aspera* Linn pada pembelahan sel normal maupun sel kanker dibandingkan dengan alkaloid dari tanaman lain yang telah dipakai di klinik.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus, Apoptosis Overview. <http://www.portofolio.mvm.ed.ac.uk/studentwebs/session2/group/cancer.html>, 11 Desember 2003.
- Andrew W, D.Vicky, D.Hill, J.Keeseey and S. Manzow.2002. Cell Death. Apoptosis and Necrosis Proliferation. Boehriger Mannheim.
- Berg,A.J.J. 1987. Production of Anthraquinones Anthrones and Dianthrones by Plant Cell Culture of Rhamnus Purshina and Rhamus Frangulata Proefschrift Utrecht Drukerti Elinkwijk B.V.
- Birch, A.J. 1994. Some Scientific and Social Implication of Research on Natural Products ImpSact of Science on Society. Vol.126.
- Borrow.M.E; S.M. Bone; B.M.Coelin; L.I.Meinik;B.N.Duona; S.W.Canter; T.E.Wiese; T.E.Cleveland and J.A.Mc.Lachlan.2001. Phytochemical Gliceolins Isolated from Soy Mediate Antihormonal Effect Through Estrogen Receptor Alpha and Beta. J.Clin. Endocrinol Metab. Apr. 86(4) 1750-1758
- Chabner,B.A.; D.P.Rian., L.Paz-Ares., R.G. Carbonero and P. Calabresi. 2001. Antineoplastic Agents. In Goodman & Gilman's The Pharmacological basis of Therapeutics. 10 th. Edition. McGraw-Hill. Medical Publishing Division. p.1417-1421.
- Choudhury, S.C., A.K. Palo and A. Padhy. 2004. Cytogenetic Consequences of Vinblastine Treatment in Mouse Bone-marrow. Chemoterapy. 50 (4). p. 171-177.
- Chakraborty,A; A.Branther; T.Mukainaka; T.Konoshima; H.Tokuda and H.Nishino.2002.Cancer hemopreventive Activity of Achyrantes aspera Leaves on Epstein Barr Virus Activation and Two-stage Mouse Skin Carcinogenesis. Carcer Lett. Mar 8:177(1). p. 1-5.
- Cody,V, E.Middleton, J.B.Harborne and M.Borets. 1997. Progress in Clinical and Biological Research. Plant Flavonoid in Biology and Medicine II. Vol 200. Alan R Liss, Inc. New York.
- Chaoi S.H.,S.Y.Lyu and W.B. Park. 2004. Mistietoe lectin Induce Apaoptosis and Telomerase Inhibition In Human A253 cancer Cells Through Dephosphorylation of Akt. Arc. Pharm Res. Jan 27(1) 68-76.
- DepKes. 1997. Inventaris Tanaman Obat Indonesia (IV). Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Hal. 1-2.
- De Robertis, E.D.P. and E.M.F. De Robertis JR. 1988. Cell and Molecular Biology. 8th.ed. Info-Med. Hongkong. p. 418-436.

- Farnworth, R.Norman,A.S.Bingel, G.Acordell, F.A.Crane and H.H.S.Fong. 1985. Potential Value of Plant as Sources of New Antifertility Agents II. *J Pharm.Sci.* Vol. 64.
- Gao,X.Y; D.W.Wang and F.M. Li.2000. Determination of Acysterone in *Achyranthes Bidentata* and its Activity Promoting Proliferation of Osteoblast-Like Cell. *Yao Xue Xue Bao.*Nov:35(11) : 868-870
- Gomez,Y, P.N. Velazquez, I.D. Pelalta, M.C.Mendez , F.Vilchia, M.A.O. Juarez and E.Pedernera. 2001. Follicle Stimulating Hormone Regulates Steroigenic Enzymes in Culture Cells of The Chick Embryo Ovary. *Gen Comp Endocrinol.* Vol.121 (3): 305-315.
- Harbone, J.B. 1973. *Phytochemical Methode.* Chapman and Hall. London. p. 109-116.
- Huang, D.M, J.H.Guh, Y.T.Huang; S.C.Chueh, P.C.Chiang, and C.M. Teng. 2005. Induction of Mitotic Arrest and Apoptosis in Human Prostate Cancer PC-3 Cells by Evodiamine. 173 (1). p. 256 -261.
- Ida,Y; M.Katsumata; Mnagasao;Y.Hirai; T.Kajimoto; N.katada; M.Yasuda and Yamamoto. 1998. Two Novel Oleanolic acid Saponin Having a Sialyl Lewis X Mimotic Structure *Achyranthes fauriei* Root. *Bioong Med Chem.Lett.* Sep.22.8(18): 2555-2558.
- Ikan, R. 1991. *Natural Product A Laboratory Guide.* 2nd. Ed. Academic Press. Toronto. p. 227-253.
- Juneja, P; S.M.K.Gill; S.Dsouza; V.Padwai; N.Balasimor; M.Aleem and P Parte. 2001. Antifertility Efect of Estradiol in Adult Female Rat. *J.Endocrinol. Invest.* Sept.2498): 598-607.
- Liu J, G.Yang, J.A. Tho,pson, A.Glassman, K.hayes, A Patterson and R.T.Marquez. 2004. A Genetically Defined Model for Human Ovarian Cancer. *Cancer Res.* Mar 1;64(5) :1655-1663.
- Logarinho, E., H. Bousbaa, J.M. Dias, C. Lopes, I. Amorim, A: Martins and C.E. Sunkel. 2004. Different Spindel Checkpoint Proteins Monitor Microtubule Attachmænt ang Tension at Kinetochores in *Drosophila* Cells. *J. Cell Sci.* 117 (9). p. 1757-1771.
- Lundberg, A.S. and R.A. Weinberg. 1999. Control of the Cell Cycle and Apoptosis. *European Journal of Cancer.* Vol. 35. No.14. p. 1886-1894.
- Mardisiswojo,S dan H.R. Kusuma. 1968. *Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang.* Cet. III. PT. Karya Wreda.

- Marques, N., S.C. Chappel, O.J. Sansom, A.R. Clarke, P.Teesdale-Spittle, R.J. Errington and Smith, P.J. 2004. Microtubule Stress Modifies Intra-nuclear Location of Msh2 in Mouse Embrionic Fibroblast. *Cell Cycle*. 3 (5) p. 662-671.
- Meles D.K. W.Sastrowardoyo dan Wurlina. 2004. Efek Antimitosis Ekstrak *Achyranthes Aspera* Linn Terhadap staging spermatogenik. Lemlit Unair.
- Mitaine, A.C; A.Marouf; B.Haquei; N.Bilirakis; and M.A.Lacaille. 2001. Two Triterpenoid and Saponin From *Achyranthes Bidentata*. *Chem.Pharm Bull. (Tokyo)*. Nov. 49(11) p. 1492-1494.
- Robinson, T. 1991. *The organic Constituents of Highter Plant*. Published by Cordus Press. North Anherst. p. 281 -292.
- Santhanathan, A.H. and O.A. Trouson. 2000. Mitochondrial Morphology During Preimplantation Human Embryogenesis. *J.Human of Reproduction. Suppl.2*. p.148-159.
- Suwarno, 2000. Prinsip Dasar , Optimalisasi dan Interpretasi Hasil Uji ELISA. Laboratorium Virologi dan Imunologi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Hal 10-11.
- Suryani. 2005. Produksi Antibodi Poliklonal Antiprolaktin dan pengukuran Optical Density antiprolaktin dengan Elisa Indirect. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Tahiliani, P. and A.Kai. 2000. *Achyranthes Aspera* Elevates Thyroid Hormone Levels and Decrease Hepatic Lipid Feroxidation in Female Rats. *J. Ethnopharmacol.* Aug. 7(3): p. 527-532.
- Wei, S; H.Liang; Y.Zhao and R.Zhang. 1997. Separation and Identification of The Compounds from *Achyranthes Bidentata*. *Zhogguo Zhong yao Za Zhi*. May 22(5) : 293-295, 319-320.
- Wurlina. 2000. Efek Antifertilitas infusa daun *Achyranthes Aspera* Linn Terhadap Siklus Birahi Pada mencit. Lab. Ilmu kemajiran. FKH Unair.
- Wurlina. 2001. Pengaruh Perasan daun *Achyranthes Aspera* Linn Terhadap Siklus Birahi Pada Mencit. Lemlit. Unair
- Wurlina dan W. Sastrowardoyo 2002. Efek alkaloid daun *Achyranthes Aspera* Linn Terhadap pembelahan dan perkembangan sel (Cleavage) Lemlit Unair.
- Wurlina, W. Sastrowardoyo dan D.K. Meles, 2003. Pengaruh Antimitosis Ekstrak *Achyranthes aspera* linn Terhadap Pembelahan Sel (Cleavage). Lemlit Unair.

- Wurlina, W.sastrowardoyo dan D.K. Meles. 2004. Pengaruh antimitosis fraksi daun *Achyranthes Aspera* linn Terhadap Perkembangan Sel Embrio Secara In Vitro. lemlit Unair.
- Yalon M, S.Gal, Y.Segev and K.L.Skorecki.2004. Sister Chromatid Separation at Human Telomeric Region. *J.Cell Sci.* Mar 23;Pt
- Zhou, J., M. Liu, R. Aneja, R. Chandra and H.C. Joshi. 2004. Enhancement of Paclitaxel-induced Microtubule Stabilization, Mitotic Arrest, and Apoptosis by The Microtubule-targeting Agent EM012. *Biochem. Pharmacol.* 68 (12). p. 2435-2441.

Lampiran 1. Gambar kegiatan



Achyranthes aspera linn



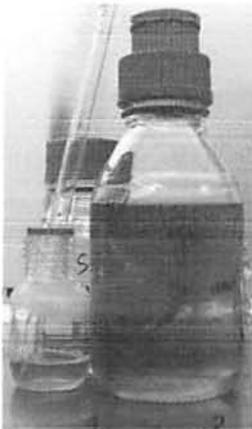
Fraksi alkaloid



Larutan fraksi Alkaloid



kontrol - ; 1, 10, 100, 1000ppm; kontrol +



- (1) Media RPMI 1640, FBS 10% (1cc FBS + 9cc media RPMI 1640)
- (2) larutan HEPES dalam LAFC
- (3) Pembuatan larutan FBS 10 % disaring membran filter 0,45 μ m



Sentrifuse



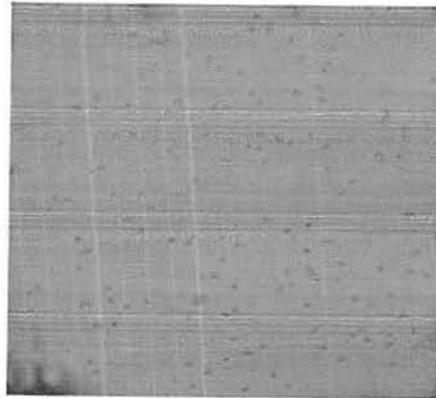
Inkubator O₂ 95% dan CO₂ 5 %



Microwell plate 24 lubang



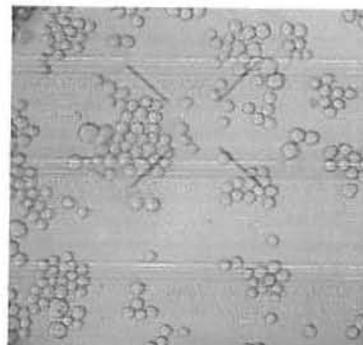
Zat warna *Tripan Blue*



Lapangan pandang hemositometer



Sel mieloma pembesaran 100 X

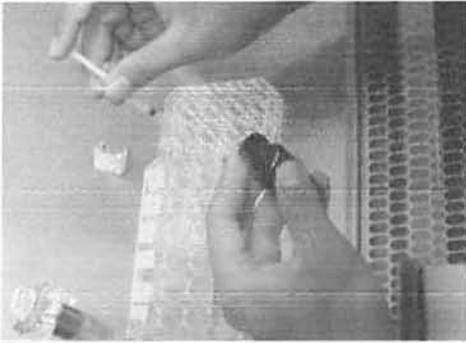


Sel mieloma pembesaran 400 X

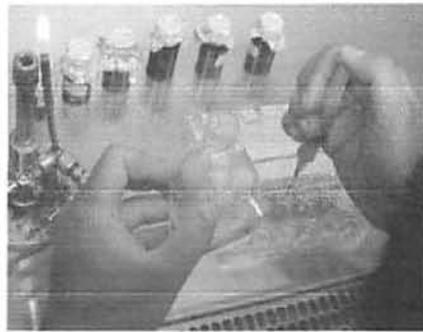


Proses thawing





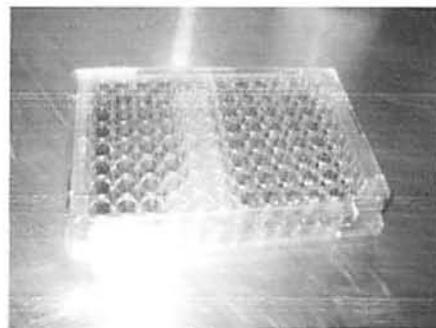
Percobaan antikanker



Pemanenan sel mieloma, kemudian ditaruh divial 2-5 cc



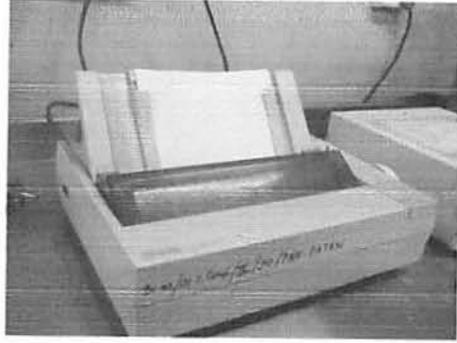
Pemeriksaan viabilitas sel mieloma



Elisawell palte



Pembacaan optical density



Lampiran 2. Print out ELISA reader

PUSVETMA

Printed at 14:57 on 09.07.2008

Page 1

DYNEX OPSYS MR

CT NO : W/L MODE : DUAL DATE : 09.07.2008
 CT NAME : TEST FILTER : 630 nm TIME : 14:56
 TE : 0000 REF. FILTER : 630 nm OPERATOR ::

	1	2	3	4	5	6	
	0,186	0,398	0,340	0,406	0,574	0,675	1
	0,191	0,473	0,377	0,397	0,487	0,593	2
	0,181	0,452	0,386	0,426	0,465	0,743	3
	0,172	0,423	0,279	0,417	0,423	0,586	4
	0,177	0,413	0,387	0,409	0,490	0,571	5
	0,176	0,462	0,345	0,464	0,544	0,540	6
	0,174	0,415	0,352	0,471	0,455	0,646	7
	0,185	0,442	0,350	0,482	0,472	0,593	8

Lampiran 3 : Optical density caspase pada berbagai dosis alkaloid *Achyranthes aspera* linn

No.	Perlakuan alkaloid <i>Achyranthes aspera</i> linn					
	Kontrol -	Kontrol +	1 ppm	10 ppm	100 ppm	1000 ppm
1.	0,186	0,398*	0,340	0,406*	0,574*	0,675*
2.	0,191	0,473*	0,377	0,397*	0,487*	0,593*
3.	0,181	0,452*	0,386	0,426*	0,465*	0,743*
4.	0,172	0,423*	0,279	0,417*	0,423*	0,586*
5.	0,177	0,413*	0,387	0,409*	0,490*	0,571*
6.	0,176	0,462*	0,345	0,464*	0,544*	0,540*
7.	0,174	0,415*	0,352	0,471*	0,455*	0,646*
8.	0,185	0,442*	0,350	0,482*	0,472*	0,593*
Σ	1,442	0,348	2,816	3,472	3,910	4,947
X	0,180	0,435	0,352	0,434	0,489	0,618
SD	0,006	0,026	0,035	0,033	0,049	0,066

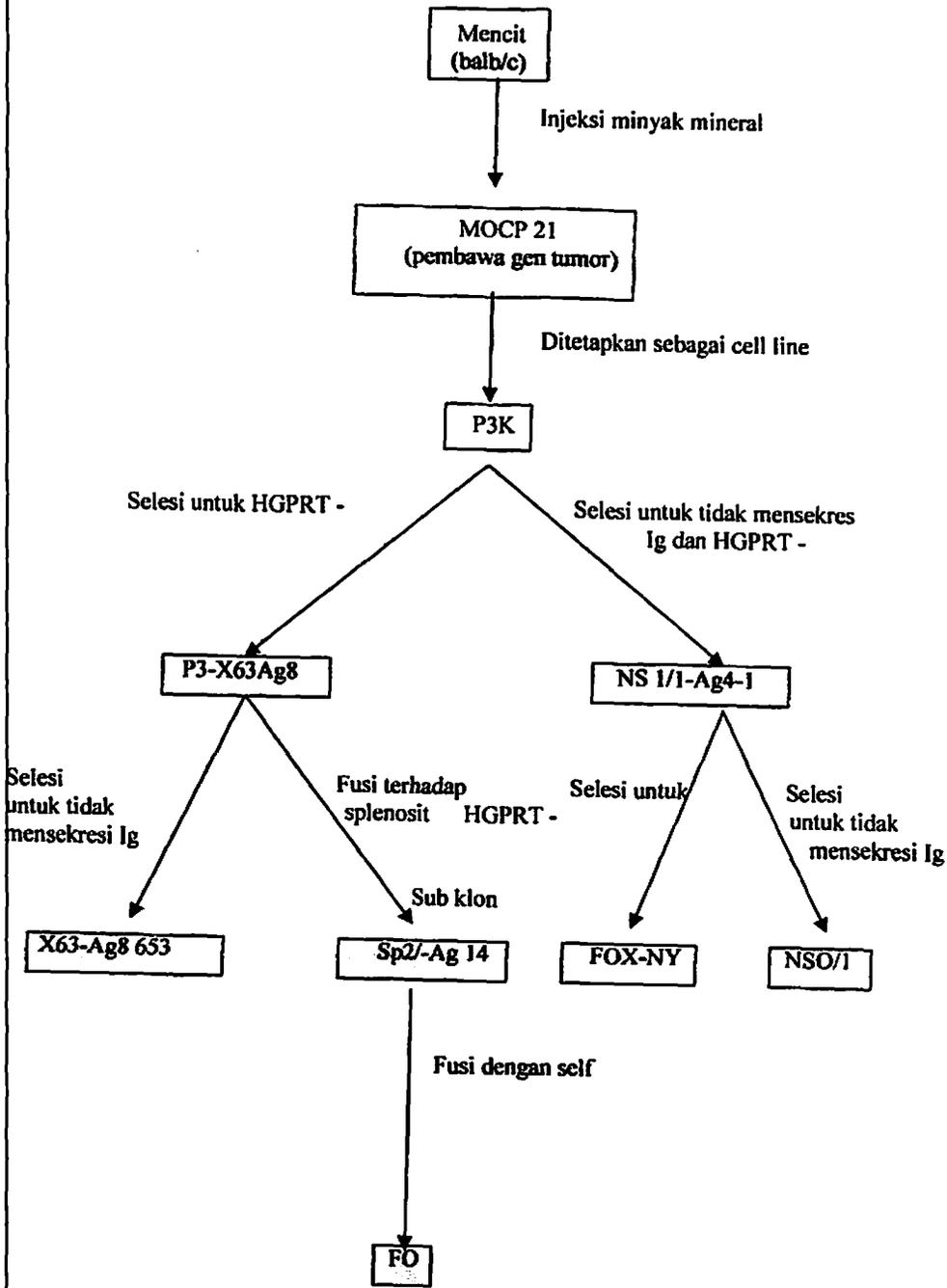
COV : Cut Of Value

$$\text{COV} = X + 2SD = 0,180 + 0,012 = 0,192$$

$$2 \text{ COV} = 2 \times 0,192 = 0,384$$

Elisa Reader dinyatakan positif (+) bila sampel > COV
Terdapat caspase berdasarkan nilai > 2 X COV

Lampiran 4. Skema silsilah sel mieloma (sumber : Lane and Harlow, 1988)



HGPRT - = *Hypoxanthine Guanin Phosphoribosil Transferase Gene Negatif*

