



Pengaruh Polifenol Mahkota Dewa Terhadap Proliferasi Sel dan Apoptosis pada Mencit Strain Balb/C yang Diinduksi Benzo(a) Pyrene (BaP)

Theopilus W. Watuguly *, Indranila KS **, Pamela Mercy Papilaya *, Edi Dharmana ***

ABSTRACT

The effect of mahkota dewa polyphenol in the cell proliferation and apoptosis in BaP induced Balb/c rats

Background: The polyphenol of mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* [Scheff.] Boerl) has the potency as antioxidant and anticancer which can handle free radicals, but there has not been extensive research on this. This research is aimed to prove the role of mahkota dewa polyphenol in the cell proliferation inhibition and induct lung carcinogenesis apoptosis in strain Balb/c mice which induced with benzo(a)pyrene (BaP).

Methods: Posttest control group design was carried out among 40 strain Balb/c mice sample, aged 1-2 weeks, weighed 20-30 grams, healthy mice condition. All mice were induced with BaP and then randomized into 2 groups, as control group and the treatment group. The development of the lung tumor was observed by tissue surgery in the 8th, 17th and 26th week. The data collected were AgNORs, and IHC-TUNEL-apoptosis index dying. The data analysis was conducted using Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, One-way ANOVA, and Post hoc test LSD with significance degree of $p < \alpha$ (0.05).

Results: The oral administration of mahkota dewa polyphenol showed significantly decreasing cell proliferation, increasing apoptosis index in treatment group in week 8, 17 and 26 ($p=0.000$). Carcinogenesis incidence for the treatment group week 8 and 26 were 2.32 ± 0.26 and 3.93 ± 0.46 , while for the treatment group were 1.88 ± 0.38 and 0.88 ± 0.22 ($p=0.000$). The cell proliferations for control group week 8 and 26 were 1.57 ± 0.12 and 2.29 ± 0.15 , while for the treatment group were 1.53 ± 0.11 and 1.60 ± 0.04 ($p=0.000$). Apoptosis index for the control group for week 8 was 0.00 ± 0.00 and 0.92 ± 0.22 in week 26, while the treatment group was 1.12 ± 0.71 and 2.02 ± 1.05 ($p=0.000$).

Conclusion: The administration of mahkota dewa polyphenol effectively inhibited the cell proliferation activity and increased apoptosis measured by apoptosis index. Therefore polyphenol has anticancer and antioxidant activities which can inhibit lung carcinogenesis in Balb/c mice.

Keywords: Polyphenol, mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* [Scheff.] Boerl), apoptosis index, strain Balb/c mice, benzo(a)pyrene (BaP).

ABSTRAK

Latar belakang: Polifenol mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* [Scheff.] Boerl) berpotensi sebagai antioksidan dan antikanker yang mampu menangkap radikal bebas, namun belum banyak diteliti. Penelitian ini bertujuan membuktikan peran polifenol mahkota dewa dalam menghambat proliferasi sel dan menginduksi apoptosis pada mencit strain Balb/c hasil induksi Benzo(a)pyrene (BaP).

Metode: Posttest control group design dengan sampel 40 mencit strain Balb/c, umur 1-2 minggu, berat 20-30 g, kondisi mencit sehat. Semua mencit diinduksi BaP kemudian hewan dirandomisasi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan polifenol 50 mg. Perkembangan tumor paru diamati dengan pembedahan jaringan pada minggu ke-8, 17 dan 26. Data dikumpulkan meliputi AgNORs, pengamatan IHC-TUNEL-indeks apoptosis. Analisis data dengan Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, One-way ANOVA, post hoc test LSD dengan derajat kemaknaan $p < \alpha$ (0,05).

Hasil: Pemberian oral polifenol mahkota dewa sebesar 50 mg secara bermakna memperlihatkan penurunan insidens karsinogenesis paru, proliferasi sel, protein Bax dan peningkatan indeks apoptosis, protein p53, Bcl-2, ekspresi caspase 3, 8, 9 pada kelompok

* Program Pendidikan Biologi dan Program Pendidikan Dokter Universitas Pattimura Ambon, Jl. Ir. Putuhena Kampus Poka Ambon - 97233

** Bagian Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi, Jl. Dr. Sutomo 16-18 Semarang

*** Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, Jl. Prof. H. Soedarto, SH, Tembalang Semarang

perlakuan pada minggu ke-8, 17 dan 26 ($p=0,000$). Insidens karsinogenesis untuk kelompok kontrol minggu ke-8, dan 26 sebesar $2,32\pm 0,26$ dan $3,93\pm 0,46$, sedangkan kelompok perlakuan sebesar $1,88\pm 0,38$ dan $0,88\pm 0,22$ ($p=0,000$). Proliferasi sel untuk kelompok kontrol minggu ke-8 dan 26 sebesar $1,57\pm 0,12$ dan $2,29\pm 0,15$, sedangkan kelompok perlakuan sebesar $1,53\pm 0,11$ dan $1,60\pm 0,04$ ($p=0,000$). Indeks apoptosis pada kelompok kontrol minggu ke-8 sebesar

$0,00\pm 0,00$ dan $0,92\pm 0,22$ minggu ke-26, sedangkan kelompok perlakuan sebesar $1,12\pm 0,71$ dan $2,02\pm 1,05$ ($p=0,000$).

Simpulan: Pemberian polifenol mahkota dewa efektif meng-inhibisi proliferasi sel dan menginduksi apoptosis melalui peningkatan indeks apoptosis. Jadi polifenol mahkota dewa memiliki aktivitas antikanker dan antioksidan mampu menghambat karsinogenesis paru mencit Balb/c.

PENDAHULUAN

Pengujian bahan alam sebagai agen kemopreventif dimaksudkan untuk meningkatkan sensitivitas sel, mengurangi efek samping, menghambat pertumbuhan tumor, menghambat ekspresi protein dan pemacuan apoptosis. Kegagalan dalam kemoterapi biasanya berkaitan dengan kegagalan agen antikanker menginduksi kematian sel secara terprogram (apoptosis).¹ Dengan mempelajari berbagai jalur apoptosis, diharapkan agen kemopreventif dapat meningkatkan proses apoptosis pada sel kanker.^{2,3} Kematian sel yang terprogram yang disebut apoptosis adalah suatu proses yang diregulasi secara genetik yang berperan penting dalam perkembangan dan keseimbangan.⁴ Abnormalitas pada apoptosis dihubungkan dengan berbagai macam penyakit pada manusia seperti kanker dan gangguan lainnya.⁵ Sementara itu, proses proliferasi sel merupakan satu dari banyaknya proses biologis dasar karena berperan dalam proses pertumbuhan dan pemeliharaan homeostatis jaringan.^{6,7} Penilaian aktivitas proliferasi sel dapat diukur dengan bercak nucleolar organizer region. AgNOR merupakan 2 protein yang berperan dalam biogenesis ribosome (nucleolin dan B23). Nucleolin dan B23 ini berperan dalam reaksi pada fase interfase siklus sel. Kecepatan biosintesis ribosome secara langsung berhubungan dengan aktivitas RNA polimerase 1 yang juga merupakan salah satu komponen protein AgNOR.⁸ Proliferasi yang meningkat atau tidak terkontrol dan gangguan apoptosis berperan dalam menentukan akumulasi sel-sel ganas dan menyebabkan pembentukan karsinogenesis *multistage*. Proliferasi sel dapat dipelajari baik dengan cara menghancurkan jaringan seperti metode 'flowsitometri' maupun dengan cara tetap mempertahankan struktur jaringan seperti pelabelan dengan radioisotop, Ki-67, PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) dan teknik pewarnaan AgNOR.⁹ Dengan pewarnaan silver, protein AgNORs akan tampak sebagai titik hitam (*black dot*) yang dapat dihitung. Aktivitas proliferasi sel diukur dengan nilai mAgNOR, yaitu perbandingan antara jumlah titik hitam dalam sel (*black dot*) dengan jumlah sel. Semakin tinggi tingkat proliferasi, maka semakin banyak titik hitam yang dapat diamati.¹⁰

Inhibisi proliferasi sel dan induksi apoptosis cukup penting untuk menunjukkan bahwa aktivitas *in vivo*

dapat digunakan sebagai alat *screening* fitokimia fenolik antikanker yang potensial.¹¹ Sejumlah polifenol pro-oksidan mungkin bersifat sitotoksik¹² dan dapat memblokir serangan inisiasi pada DNA serta meregulasi jalur sinyal sel.¹³ Proliferasi sel dan apoptosis merupakan suatu peristiwa penting dalam regulasi karsinogenesis, dan ketidakseimbangan kematian sel (apoptosis) menentukan timbulnya neoplasma ganas, maka keduanya merupakan target untuk intervensi kemopreventif.¹⁴ Peningkatan proliferasi dan penurunan apoptosis memainkan peran yang menentukan dalam genesis karsinogenesis berbagai stadium.^{15,16} Mahkota dewa telah terbukti memiliki aktivitas antikanker dan antioksidan secara *in-vivo* yang jelas, namun pada sistem biologis yang kompleks, belum ada pemahaman mekanisme seluler dan molekuler yang bertanggung jawab dalam modulasi apoptosis. Untuk itu, penelitian tambahan dan lebih mendalam diperlukan untuk menguraikan mekanisme aksi dan keefektifan *in-vivo* polifenol sesungguhnya untuk mengajukan polifenol mahkota dewa sebagai kemoterapi pencegahan (*chemoprevention*) yang menjanjikan di masa mendatang.

Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* [Scheff.] Boerl) merupakan salah satu tanaman obat tradisional Indonesia yang banyak digunakan dan dijual di pasar bebas sebagai anti kanker. Mahkota dewa telah diketahui memiliki efek antikanker dan penghambatan ini diduga berkaitan dengan peran polifenol. Berdasarkan analisis fitokimia, polifenol merupakan salah satu senyawa yang ditemukan pada mahkota dewa.^{17,18} Sampai saat ini, polifenol mahkota dewa belum pernah dilaporkan dalam memodulasi apoptosis sel kanker paru secara *in-vivo*.

Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), yang merupakan salah satu faktor etiologi penting untuk kanker pada manusia, terbentuk dalam proses pembakaran yang tidak sempurna dari bahan organik dan ditemukan secara luas di lingkungan, misalnya pada kendaraan bermotor, asap rokok, tanah, air dan makanan.¹⁴ Oleh karena itu, terpaparnya manusia terhadap PAH tidak dapat dihindari. Salah satu PAH yang paling penting yaitu *Benzo(a)Pyrene* (BP), yang merupakan suatu karsinogen poten yang ditemukan dalam rokok. BaP salah satu karsinogen penting yang terkait dengan tembakau, signifikan dalam pembentukan

kelainan DNA dan menyebabkan kanker. Selain itu, BaP salah satu dari hidrokarbon aromatik polisiklik pada asap tembakau, yang berhubungan dengan kanker paru pada manusia dan diketahui sebagai bahan karsinogen dalam sistem eksperimental dan suatu karsinogen poten yang ditemukan dalam rokok dengan jumlah BaP per rokok adalah 18-50ng.^{15,16} Asap rokok mengandung 20-40 ng dari B(a)P tiap rokok. Jumlah keseluruhan B(a)P yang dibutuhkan untuk menimbulkan kanker paru pada mencit sama dengan jumlah keseluruhan senyawa tersebut dimana seorang perokok akan terpapar seumur hidup merokok.¹⁹

METODE

Model karsinogenesis, setiap mencit strain Balb/c yang baru lahir (24-48 jam) mendapatkan injeksi subkutan pada daerah sub-skapula dengan suspensi 0,02 ml yang mengandung konsentrasi BP 0,2 mg dalam larutan DMBA 1% (dosis tunggal). Karsinogen digunakan dalam waktu 1 jam setelah emulsifikasi. Kemudian mencit tersebut dibiarkan tumbuh dengan induk mereka, yang dilengkapi dengan air dan pelet makanan secara *ad libitum*. Setelah penyapihan (setelah 4 minggu) jantan dan betina dipisahkan dan hewan tersebut dibagi menjadi dua kelompok.

Kelompok I adalah kelompok kontrol karsinogen yang tidak mendapatkan polifenol mahkota dewa secara oral setiap hari dari minggu ke-5 pemberian BP dan dilanjutkan sampai minggu ke-26.

Kelompok II adalah kelompok perlakuan yang mendapatkan polifenol mahkota dewa secara oral pada dosis 50mg/tikus/hari dari minggu ke-5 pemberian BP dan dilanjutkan sampai minggu ke-26.

Hewan dari kedua kelompok diterminasi pada minggu ke-8, 17 dan 26 untuk penilaian dengan parameter yang berbeda. Jumlah hewan adalah sebanyak 30 untuk masing-masing kelompok ($N=30$; $n=15$ untuk setiap titik waktu). Mencit yang diterminasi digunakan untuk analisis histopatologi dan imunohistokimia.^{14,15,20}

Rancangan eksperimental, perlakuan polifenol mahkota dewa mulai dilakukan dari minggu ke-5 setelah pemberian BaP dengan dosis 50 mg tiap mencit per hari dan diteruskan sampai minggu ke-26. Hewan diterminasi dengan mengikuti pedoman dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan Rumah Sakit Pusat Dr. Kariadi Semarang (No. Reg: 38/EC/FK/RSDK/2010).

Evaluasi histopatologi bagian paru mencit, setelah terminasi mencit dari ke-2 kelompok pada interval waktu yang berbeda semua 5 lobus paru dari masing-masing tikus dikumpulkan, dicuci dalam *phosphate buffered saline* (PBS) dan direndam dalam kertas

blotting untuk menghilangkan darah. Jaringan kemudian difiksasi dalam buffered formalin netral 10% selama 24 jam. Sampel jaringan telah didehidrasi dalam konsentrasi etanol yang semakin meningkat, dibersihkan dalam *xylene*, dan ditanam dalam parafin untuk menyiapkan blok. Kelima lobus paru dibelah, dipasang pada slide dan diwarnai. Bagian serial 4 μ m digunakan sedemikian rupa sehingga bagian yang sesuai digunakan untuk pewarnaan dengan *hematoxylin-eosin* (HE) untuk mikroskopi cahaya dan evaluasi histopatologi serta ekspresi AgNORs dan indeks apoptosis (*apoptotic index* = AI).¹⁴⁻¹⁶

Pewarnaan jaringan dengan H&E. Secara berurutan jaringan pada kaca obyek dimasukkan dalam 1. Xylol selama 5 menit, 2. Xylol II selama 5 menit, 3. Alkohol bertingkat selama 3X2 menit, 4. Aquades 2 menit, 5. HE Lillie-Mayer selama 5 menit, 6. Air mengalir selama 2 menit, 7. Alkohol asam 0,4% sebanyak 3 celup, 8. Air mengalir selama 2 menit, 9. Lithium carbonat jenuh sebanyak 3 celup, 10. Air mengalir selama 2 menit, 11. Alkohol 50% selama 3X2 menit, 12. Alkohol 70%, 13. Eosin, 14. Alkohol 70% sebanyak 3 kali, 15. Carbol Xylol, 16. Xylol sebanyak 3 kali, 17. Xylol selama 20 menit, 18. Canada balsam dan 19. Tutup dengan kaca penutup.¹⁴⁻¹⁶

Deteksi proliferasi sel, untuk pemeriksaan aktivitas proliferasi sel dihitung dengan melihat jumlah bercak NORs yang ditandai dengan anak inti sel yang berwarna hitam. Tiap slide dinilai 5 lapang pandang dengan menggunakan mikroskop cahaya, pembesaran 400X. Aktivitas proliferasi sel ditunjukkan dengan bertambah banyaknya sel kanker yang dapat dideteksi melalui jumlah nukleolus pada inti sel kanker dengan pewarnaan perak nitrat.

Aktivitas proliferasi adalah proses pembelahan sel menjadi pembelahan selanjutnya, melalui tahapan yang disebut siklus sel. Siklus sel terdiri dari 4 tahapan yaitu G1, S, G2 dan M. aktivitas proliferasi dapat dinilai menggunakan AgNORs yang akan mengekspresikan seluruh tahapan siklus sel kecuali fase istirahat (G0).²¹

Deteksi kematian sel, indeks apoptosis dihitung dengan melihat jumlah sel apoptosis. Apoptosis adalah proses regulasi kematian sel untuk mengontrol jumlah sel dan menghilangkan sel yang rusak. Sel apoptosis mempunyai tanda-tanda kondensasi dan fragmentasi inti yang dilabel dengan TUNEL yang akan mengekspresikan warna coklat pada inti sel. Jumlah sel apoptosis yang terekspresi positif dilakukan perhitungan dengan cara tiap slide dihitung persentase sel apoptosis dari sel tumor dalam epitel bronkiolus dari 5 lapang pandang dan menghitung sel TUNEL-positif diantara sel-sel tersebut dengan mikroskop cahaya menggunakan pembesaran 400x.¹⁴⁻¹⁶

Analisis statistik, data aktivitas proliferasi sel dan indeks apoptosis, merupakan skala rasio. Data dilakukan analisis deskriptif ditampilkan dalam bentuk mean, median, modus dan simpangan baku, selanjutnya dinilai memiliki sebaran normal atau tidak dengan menilai histogram dan box plot. Analisis data meliputi uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk melihat proliferasi AgNORs sedangkan uji parametrik *One-way ANOVA (analysis of variance)*, dilanjutkan uji beda antar kelompok dengan *post hoc test LSD (least square difference)* untuk melihat indeks apoptosis. Data yang diperoleh secara statistik menggunakan SPSS versi 19.

HASIL

Inhibisi proliferasi sel pada lesi bronkiolus paru hasil induksi B(a)P oleh polifenol mahkota dewa, peran polifenol terhadap aktivitas proliferasi sel dinilai dengan AgNORs dimana dilakukan dengan cara menghitung bercak AgNORs yang diekspresikan oleh inti sel pada epitel bronkiolus mencit. Nilai dihitung 100 sel pada 5 lapang pandang pada epitel bronkiolus dan dihitung rerata (mean).

Pada Gambar 1 menunjukkan ekspresi AgNORs dengan jumlah sel-sel yang berproliferasi positif di epitel bronkiolus lebih rendah pada kelompok yang diberi perlakuan (B1 dan B2) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (A1 dan A2).

Proliferasi sel bercak AgNORs pada minggu ke-8 paparan BaP sebesar $1,57 \pm 0,12$, mengalami kenaikan sebesar $1,92 \pm 0,49$ pada minggu ke-17 dan $2,29 \pm 0,15$ pada minggu ke-26 pada kelompok kontrol karsinogen. Perlakuan dengan polifenol *made* mengurangi proliferasi sel bercak NORs pada minggu ke-8 sebesar $1,53 \pm 0,11$; $1,45 \pm 0,11$ pada minggu ke-17 dan $1,60 \pm 0,04$ pada minggu ke-26 (Gambar 2).

Hasil uji statistik menggunakan *Kruskal-Wallis Test* memperlihatkan peningkatan secara signifikan ($p=0,000$). Selanjutnya perbedaan lebih lanjut antar kelompok percobaan dianalisis menggunakan uji *Mann-Whitney Test*. Uji *Mann-Whitney Test*, memperlihatkan terjadi penghambatan aktivitas proliferasi sel pada kelompok perlakuan baik minggu ke-8, 17 dan 26 dibandingkan dengan kelompok kontrol. Data statistik dapat dilihat pada Tabel 1.

Uji statistik tingkat signifikansi pada proliferasi sel menunjukkan kelompok perlakuan lebih rendah secara bermakna dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok kontrol minggu ke-8, menunjukkan bermakna ($p=0,008$) dengan kelompok kontrol minggu ke-17 dan 26; sedangkan kelompok perlakuan minggu ke-8, 17 dan 26 menunjukkan tidak bermakna masing-masing

($p=0,310$; $p=0,222$; $p=0,841$). Pada kelompok kontrol minggu ke-17, menunjukkan bermakna ($p=0,008$) pada kelompok kontrol minggu ke-26 dan bermakna ($p=0,008$) pada minggu ke-8, 17 dan 26 pada kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol minggu ke-26, menunjukkan bermakna ($p=0,008$) pada kelompok perlakuan minggu ke-8, 17 dan 26.

Hasil uji kelompok perlakuan minggu ke-8, menunjukkan tidak bermakna ($p=0,222$; $p=0,841$) masing-masing dengan minggu ke-17 dan 26. Sedangkan pada minggu ke-17, hasil uji menunjukkan bermakna ($p=0,016$) dengan kelompok perlakuan minggu ke-26.

Induksi apoptosis oleh polifenol mahkota dewa pada karsinogenesis paru mencit strain Balb/c. Pada penelitian ini, indeks apoptosis dihitung berdasarkan jumlah sel positif yang mengekspresikan bercak TUNEL dihitung 100 sel pada 5 lapang pandang pada epitel bronkiolus dan dihitung rata-rata. Penggunaan metode TUNEL memperlihatkan derajat spesifitas tinggi untuk mendeteksi sel yang mengalami apoptosis. Perhitungan perkembangan hiperplasia dan displasia pada epitel bronkiolus, dimana nilai yang dihitung 10 epitel bronkiolus, diulang 5x pada daerah yang tidak sama dan dihitung rata-rata.

Pada penelitian ini, terlihat bahwa pemberian polifenol *made* dapat menginduksi indeks apoptosis (Gambar 3). Indeks apoptosis pada minggu ke-8 sebesar $0,00 \pm 0,00$ pada kelompok kontrol, sedangkan pada kelompok perlakuan sebesar $1,12 \pm 0,71$. Selama progresi karsinogenesis, indeks apoptosis pada kelompok kontrol sebesar $0,00 \pm 0,00$ pada minggu ke-17 dan $0,24 \pm 0,26$ pada minggu ke-26. Induksi apoptosis setelah perlakuan polifenol *made* minggu ke-8 sebesar $1,12 \pm 1,71$; $2,28 \pm 0,83$ pada minggu ke-17 dan $3,80 \pm 0,83$ pada minggu ke-26.

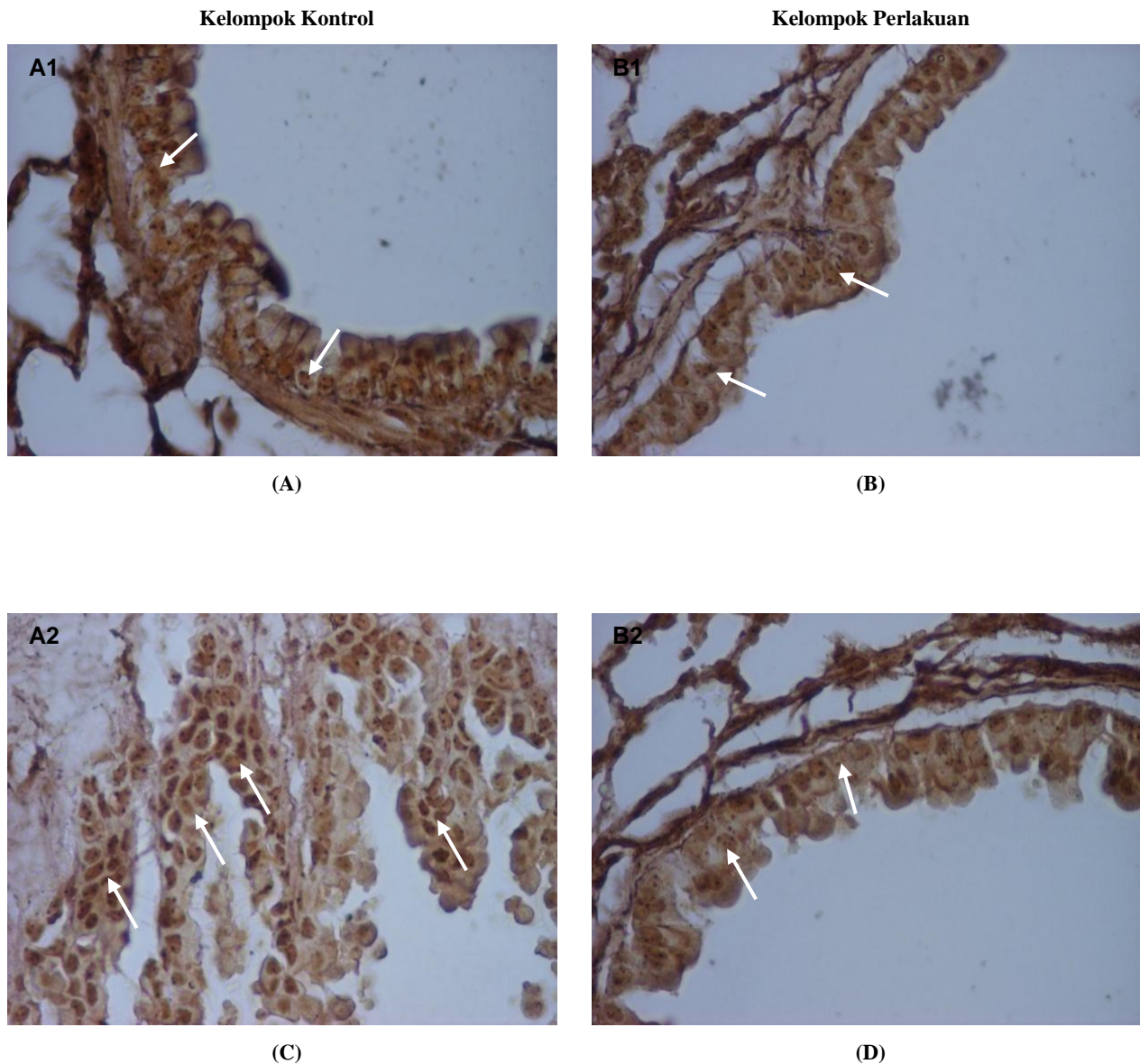
Hasil uji statistik pada indeks apoptosis memperlihatkan uji normalitas dan uji homogenitas menunjukkan data berdistribusi normal dan varian sama, sehingga dilanjutkan dengan *One-way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji LSD, dimana indeks apoptosis ($p=0,000$) pada kelompok perlakuan terlihat lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol baik minggu ke-8, 17 dan 26. *Post hoc test LSD*, memperlihatkan terjadi peningkatan indeks apoptosis pada kelompok perlakuan pada minggu ke-8, 17 dan 26 dibandingkan dengan kelompok kontrol. Data statistik dapat dilihat pada Tabel 2.

Uji statistik tingkat signifikansi pada indeks apoptosis menunjukkan kelompok perlakuan lebih tinggi secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok kontrol minggu ke-8, memiliki nilai ($p=1,000$) dengan minggu ke-17 dan tidak bermakna ($p=0,514$) dengan minggu ke-26. Kelompok perlakuan

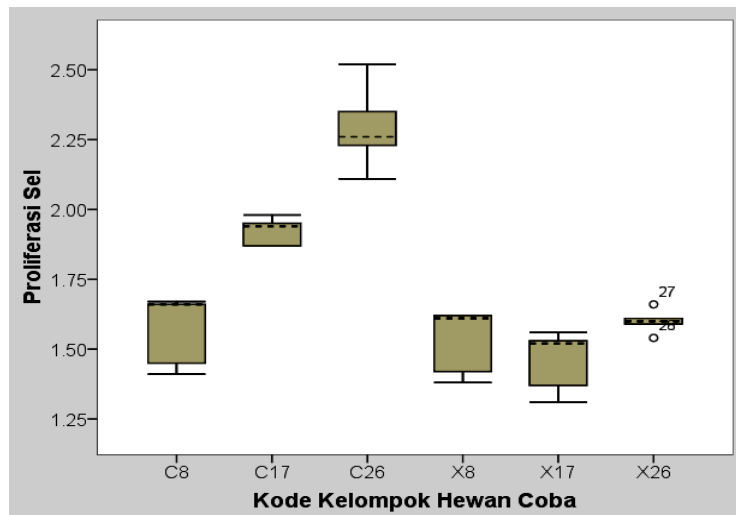
minggu ke-8, ($p=0,004$) dan menunjukkan bermakna ($p=0,000$) dengan kelompok perlakuan minggu ke-17 dan 26. Pada kelompok kontrol minggu ke-17, memiliki nilai ($p=1,000$) dengan minggu ke-26 dan bermakna ($p=0,004$) dengan minggu ke-8 dan bermakna ($p=0,000$) dengan minggu ke-17 dan 26 kelompok perlakuan. Pada kelompok kontrol minggu ke-26, menunjukkan

bermakna ($p=0,004$) dengan minggu ke-8 dan bermakna ($p=0,000$) dengan minggu ke-17 dan 26 kelompok perlakuan.

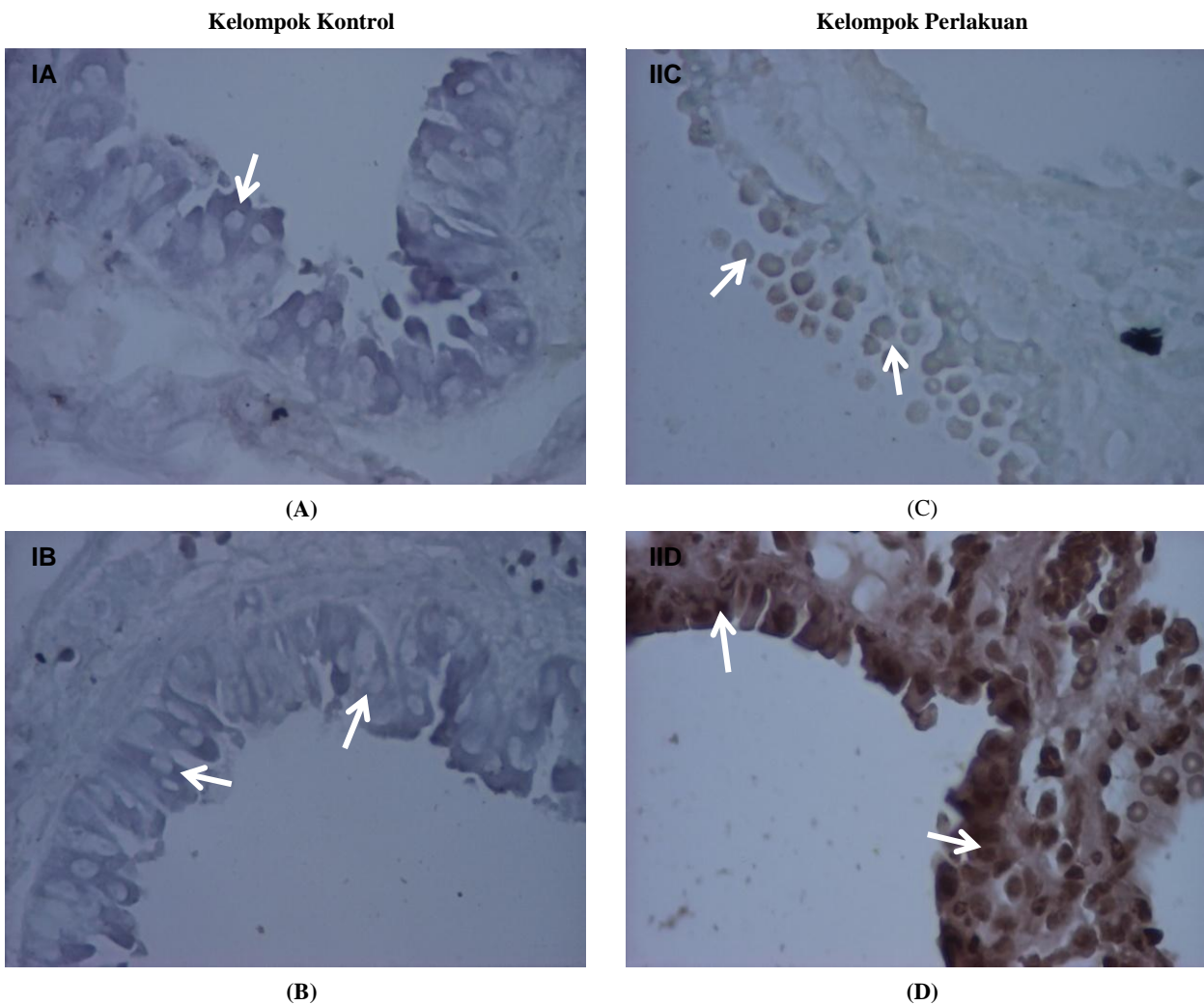
Hasil uji kelompok perlakuan pada minggu ke-8 menunjukkan bermakna ($p=0,003$) dengan minggu ke-17 dan menunjukkan bermakna ($p=0,000$) pada minggu ke-26 serta minggu ke-17 dengan minggu ke-26



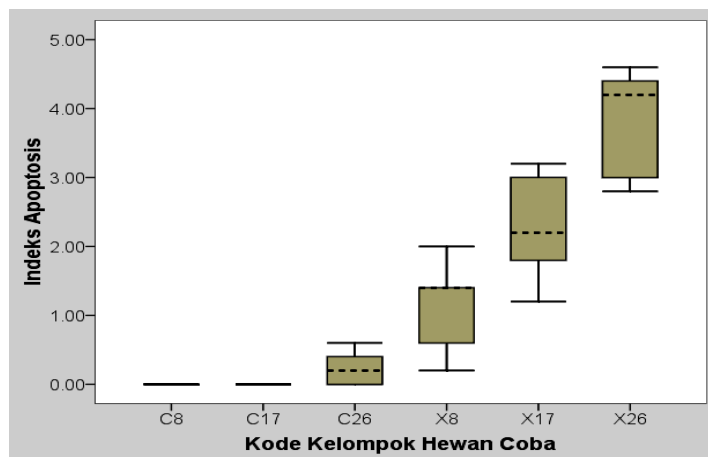
Gambar 1. Ekspresi AgNORS yang menunjukkan sel-sel yang berproliferasi pada epitel bronkiolus mencit pada minggu ke-8 (A1) dan ke-26 (A2). Peningkatan jumlah sel yang berproliferasi tampak setelah minggu ke-26. Sel yang berproliferasi dalam jumlah sedikit terdapat pada epitel bronkiolus setelah pemberian perlakuan polifenol made (B1 dan B2). Tanda panah menunjukkan bercak NORs pada kelompok control dan perlakuan.



Gambar 2. Grafik boxplot efek polifenol *made* pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada mencit strain Balb/c. Pemberian polifenol *made* dapat menghambat aktivitas proliferasi sel kanker paru pada daerah bronkiolus selama karsinogenesis paru mencit yang diinduksi *Benzo(a)Pyrene* (BaP).



Gambar 3. Lokalisasi *in situ* sel apoptosis pada jaringan paru selama karsinogenesis hasil induksi B(a)P pada kelompok kontrol karsinogen (IA, IB) dan kelompok perlakuan (IIC, IID). Perlakuan dengan polifenol mahkota dewa menyebabkan peningkatan sel-sel apoptosis pada epitel bronkiolus, pengamatan dengan pembesaran 400X. Tanda panah menunjukkan sel yang mengalami apoptosis pada kelompok perlakuan (IIC dan IID).



Gambar 4. Grafik boxplot efek polifenol *made* pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada mencit strain Balb/c. Pemberian polifenol *made* dapat meningkatkan indeks apoptosis pada daerah bronkiolus selama karsinogenesis paru mencit yang diinduksi *Benzo(a)Pyrene* (BaP).

Tabel 1. Hasil uji tingkat signifikansi aktivitas proliferasi sel pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

| Kelompok | Minggu | Kelompok/minggu | | | | | |
|-----------|--------|-----------------|-------|-------|-----------|-------|-------|
| | | Kontrol | | | Perlakuan | | |
| | | 8 | 17 | 26 | 8 | 17 | 26 |
| Kontrol | 8 | - | 0,008 | 0,008 | 0,310 | 0,222 | 0,841 |
| | 17 | | - | 0,008 | 0,008 | 0,008 | 0,008 |
| | 26 | | | - | 0,008 | 0,008 | 0,008 |
| Perlakuan | 8 | | | | - | 0,222 | 0,841 |
| | 17 | | | | | - | 0,016 |
| | 26 | | | | | | - |

Keterangan: bermakna ($p < 0,05$)
 Sumber: Data Penelitian Primer, 2011

Tabel 2. Hasil uji tingkat signifikansi indeks apoptosis pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

| Kelompok | Minggu | Kelompok/minggu | | | | | |
|-----------|--------|-----------------|-------|-------|-----------|-------|-------|
| | | Kontrol | | | Perlakuan | | |
| | | 8 | 17 | 26 | 8 | 17 | 26 |
| Kontrol | 8 | - | 1,000 | 0,514 | 0,004 | 0,000 | 0,000 |
| | 17 | | - | 0,005 | 0,004 | 0,000 | 0,000 |
| | 26 | | | - | 0,004 | 0,000 | 0,000 |
| Perlakuan | 8 | | | | - | 0,003 | 0,000 |
| | 17 | | | | | - | 0,000 |
| | 26 | | | | | | - |

Keterangan: bermakna ($p < 0,05$)
 Sumber: Data Penelitian Primer, 2011

PEMBAHASAN

Seperti pada jenis kanker lainnya, pertumbuhan kanker paru juga melalui 3 fase yaitu fase inisiasi, fase promotif dan fase progresif. Proses karsinogenesis perlu dikendalikan melalui proses fisiologik maupun farmakologik pada tahap preneoplastik sehingga pada fase promotif dapat ditahan dan dicegah proses pengembangan lebih lanjut. Untuk pengendalian ini

dapat dilakukan melalui langkah pencegahan yang termasuk penghindaran dari berbagai agent yang dikenal dapat menimbulkan kanker, meningkatkan daya tahan terhadap kanker, mengubah pola hidup dan penggunaan bahan kemopreventif (*chemoprevention*). *Chemoprevention* adalah bahan yang dapat memperlambat atau menghentikan proses karsinogenesis sehingga menurunkan risiko proses invasi kanker. Dengan mempelajari

berbagai jalur terbangkitnya apoptosis, diharapkan dapat digunakan *chemo-prevention* untuk meningkatkan proses apoptosis dan menghambat proliferasi sel.²²

Proliferasi yang meningkat atau tidak terkontrol dan gangguan apoptosis berperan dalam menentukan akumulasi sel-sel ganas dan menyebabkan pembentukan karsinogenesis *multistage*. Pemberian polifenol mahkota dewa dalam penelitian ini mampu menghambat proliferasi sel pada mencit strain Balb/c hasil induksi B(a)P. Hasil penelitian ini, jumlah sel yang positif melalui ekspresi AgNORs secara signifikan berkurang setelah perlakuan secara oral polifenol mahkota dewa pada mencit dibanding dengan kelompok kontrol karsinogen. Hasil ini ditunjukkan melalui uji statistik dengan ($p=0,000$). Oleh karena nilai $p<0,05$ ($0,000$) maka polifenol mahkota dewa dapat menurunkan aktivitas proliferasi melalui penghambatan ekspresi AgNORs dimana jumlah NORs lebih sedikit dibandingkan sel normal pada mencit strain Balb/c. Hal ini disebabkan karena fungsi AgNOR sebagai marker proliferasi sel. Semakin tinggi nilai AgNOR semakin tinggi aktivitas proliferasi sel. Makin tinggi aktivitas proliferasi sel, maka makin lebih besar dijumpai fase S (sintesis DNA) yang merupakan fase yang paling sensitif terhadap perlakuan polifenol mahkota dewa. Menurut Sirri V, *et al*, ekspresi AgNOR yang tinggi dijumpai pada fase S dari siklus sel dan kemudian menurun pada saat sel memasuki mitosis melalui fase G₂.²³

Pengendalian proliferasi sel sangat penting untuk pencegahan karsinogenesis karena proliferasi sel memiliki peran penting dalam karsinogenesis paru melalui proses inisiasi dan promosi. Progresi yang tertunda pada perubahan histopatologi dari hiperplasia menjadi *carcinoma in situ* pada kelompok perlakuan dapat dihubungkan dengan sifat anti-proliferasi. Kontrol proliferasi sel diatur secara ketat oleh protein pengontrol siklus sel. Model siklus sel, terdiri dari suatu fase sintesis (S) DNA, fase mitosis (M), dan dua fase *gap* (G₁ dan G₂), kini telah dijelaskan dengan rinci secara molekuler.^{24,25} Komponen penting dari siklus tersebut termasuk *cyclin*, *cyclin-dependent kinase* (Cdk), dan retinoblastoma (Rb) dan protein E2F. Setiap Cdk diregulasi dengan suatu subunit *cyclin*, yang diperlukan untuk aktivitas katalitik dan spesifitas substrat. Langkah penting pertama dalam siklus sel terjadi pada akhir fase G₁ pada titik pembatasan (*restriction point*), ketika suatu sel berkomitmen untuk menyelesaikan siklus tersebut. Faktor-faktor kompetensi seperti *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan faktor progresi seperti *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) dapat berinteraksi pada titik tersebut untuk menstimulasi proliferasi sel. Kedua *growth factor* tersebut dapat

dibuat mengalami peningkatan pertumbuhan tumor oleh sel tumor paru dengan cara autokrin, biasanya pada tahap akhir tumorigenesis. Pertemuan (*engagement*) *growth factor* dengan reseptor masing-masing menyebabkan dimerisasi reseptor, fosforilasi, dan transmisi *growth signal* ke nukleus. Sinyal yang meningkatkan pertumbuhan (*growth-promoting*) yang ditransduksi dari permukaan sel ke nukleus menyebabkan elevasi cepat dan transien pada *cyclin* tipe D (awal G₁). *Cyclin D1* menjadi suatu kompleks dengan Cdk4/6 dan memfosforilasi protein Rb.²⁶ Ekspresi berlebihan *Cyclin D1* merupakan suatu kelainan molekuler yang umum terjadi pada kanker paru.¹⁹ Hiperfosforilasi dari Rb pada G₁ melepaskan faktor transkripsi E2F, yang mengaktivasi gen fase-S, termasuk *thymidine kinase*, *c-myc*, *dihydrofolate reductase*, Cdc6, dan DNA *polymerase- α* .²⁷

Dua famili inhibitor Cdk sangat penting dalam perkembangan G₁. Famili INK4 pada kromosom 9p21 mengkode empat gen (INK4a, b, c, dan d) dimana produknya mengikat dimer *cyclin* D-Cdk4/6 untuk menginaktivasi fungsi kinase. Anggota dari famili Kip1 (p21, p27, p57) mengikat kompleks *cyclin* D-Cdk4/6, *cyclin* E-Cdk2, dan *cyclin* A-Cdk2. Kompleks *cyclin* E-Cdk2 memperantarai perkembangan keluar dari G₁, dan ekspresi *cyclin* A meningkat secara dramatis dengan permulaan fase S. Fungsi *cyclin* A-Cdk2 tampaknya diperlukan untuk replikasi DNA dan dalam transisi G₂/M. Hilangnya fungsi p53 menyebabkan penurunan jumlah p21 dan hiperaktivitas baik pada kompleks *cyclin* D-Cdk maupun *cyclin* E-Cdk, hiperfosforilasi dari gen Rb, dan peningkatan jumlah E2F. Inaktivasi gen tumor supresor Rb menghasilkan pengaruh yang sama yang mengakibatkan peningkatan kadar E2F bebas dalam sel. Kerjasama antara jalur Rb dan p53 mungkin menentukan apakah p53 menginduksi penghentian G₁ (*G₁ arrest*) atau apoptosis sebagai respon terhadap kerusakan DNA, dengan hilangnya Rb yang memiringkan keseimbangan ke arah apoptosis.²⁵

Proliferasi yang meningkat atau tidak terkontrol dan gangguan apoptosis berperan dalam menentukan akumulasi sel-sel ganas dan menyebabkan pembentukan karsinogenesis *multistage*. Proliferasi sel dapat dipelajari baik dengan cara menghancurkan jaringan seperti metode '*flowsitometri*' maupun dengan cara tetap mempertahankan struktur jaringan seperti pelabelan dengan radioisotop, Ki-67, PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) dan teknik pewarnaan AgNOR.²⁸ AgNOR merupakan salah satu cara penilaian proliferasi sel dengan cara menghitung '*nucleolar organizer region*' (NOR) yang merupakan lengkung DNA ribosom yang ditranskripsikan menjadi RNA ribosomal dengan bantuan RNA polymerase. NOR terletak pada lengan pendek kromosom akrosentris (nomor 13, 14, 15,

21 dan 22) pada manusia dan terlihat secara ultrastruktur berasosiasi dengan komponen fibril pada fase interfase. NOR mengandung gen yang membentuk ribosomal 18s dan 28s RNA, yang sangat vital untuk sintesis protein.²⁹

Untuk menilai parameter proliferasi sel, dalam penelitian ini menggunakan teknik pulasan AgNORs. AgNOR merupakan penanda biokimia rDNA dan transkripsi.^{30,31} Dengan pewarnaan silver, protein AgNORs akan tampak sebagai titik hitam (*black dot*) yang dapat dihitung. Aktivitas proliferasi sel diukur dengan nilai mAgNOR, yaitu perbandingan antara jumlah titik hitam dalam sel (*black dot*) dengan jumlah sel. Semakin tinggi tingkat proliferasi, maka semakin banyak titik hitam yang dapat diamati.^{32,33} Beberapa metode telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi proliferasi sel dengan tujuan sebagai penanda keganasan ke depan seperti metode pelabelan antibodi monoklonal Ki-67, *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), *triated thymidine labeling*, *bromodeoxy-uridine* (BrdU), indeks mitosis dan reaksi Ag dengan NORs. Menurut Sushma M, *et al.*, penggunaan metode reaksi Ag dengan NOR merupakan salah satu metode pewarnaan sederhana yang dapat digunakan untuk menggantikan metode-metode lain seperti kebutuhan peralatan canggih, teknik keahlian, biaya dan waktu pengerjaannya. Selain itu, metode AgNORs mempunyai kelebihan dibanding metode lain yaitu dapat dilakukan pada jaringan yang telah difiksasi secara konvensional.³⁴

Nucleolar organizer region yang diamati dengan AgNOR merupakan 2 protein yang berperan dalam biogenesis ribosome (nucleolin dan B23). Nucleolin dan B23 ini berperan dalam reaksi pada fase interfase siklus sel. Kecepatan biosintesis ribosom secara langsung berhubungan dengan aktivitas RNA polimerase 1 yang juga merupakan salah satu komponen protein AgNOR.⁸

Hasil penelitian ini sama dengan penelitian lain yang telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa polifenol dapat menurunkan indeks proliferasi. Polifenol teh hijau theaflavin dan EGCG, yang terdapat dalam teh hijau maupun teh hitam, dapat menurunkan indeks proliferasi di berbagai stadium eksperimen karsinogenesis paru pada tikus hewan percobaan.¹⁴ Telah dikemukakan bahwa komponen teh dapat memodulasi aktivitas beberapa enzim, yaitu protein kinase C, DNA polimerase, siklooksigenase²⁹ yang terkait erat dengan proliferasi selular. Aktivitas inhibisi theaflavin terhadap proliferasi sel pada karsinogenesis paru yang ditimbulkan NNK.³⁷ Inhibisi pertumbuhan sel *Ha-ras transformed 21 BES* oleh theaflavin polifenol teh hitam juga dilaporkan.³⁷ Pengamatan tersebut konsisten dengan penemuan peneliti mengenai peranan anti-

proliferatif theaflavin dan EGCG. Pemberian oral teh hijau meningkatkan efek inhibisi tumor dari *doxorubicin* pada karsinoma ascites Ehrlich yang ditanamkan pada tikus CDF1 dan BDF1.³² Penelitian lain menemukan kombinasi bovine laktoferin (bLF) dan polifenol teh hitam (polyphenon-B: PB) pada karsinogenesis kantong buccae hamster hasil induksi DMBA, dapat menghambat proliferasi sel.³² Penelitian lain polifenol teh hitam (polyphenon-B: PB dan BTF-35) dapat menghambat proliferasi sel pada karsinogenesis kantong buccae hamster hasil induksi DMBA.²¹

Proses proliferasi sel dan regulasi siklus sel juga berkaitan erat dengan proses apoptosis, sehingga disregulasi siklus sel secara langsung dapat mempengaruhi kepekaan terhadap rangsangan apoptosis. Kesimbangan antara produksi sel melalui proliferasi dan hilangnya sel melalui apoptosis menentukan seberapa cepatnya tumor bertumbuh dan menjadi penentu penting dalam perilaku tumor. Berbagai studi pada hewan percobaan memperlihatkan sel tumor memiliki waktu siklus sel sekitar setengah dari epitel normal, menunjukkan tingkat pertumbuhan yang tinggi. Peningkatan kematian sel merupakan usaha untuk membatasi ekspansi populasi sel tumor, oleh karena itu dapat dikatakan bahwa tingkat proliferasi sel berkaitan dengan apoptosis. Peningkatan proliferasi dan penurunan apoptosis memainkan peran yang menentukan dalam genesis karsinogenesis berbagai stadium.¹⁴

Apoptosis dicirikan oleh perubahan-perubahan morfologis meliputi pepadatan (kondensasi) kromatin, fragmentasi inti, *blebbing* membran dan penyusutan sel (*cell shrinkage*).⁴² Pada tingkat molekuler, apoptosis menggambarkan kumpulan dari jalur-jalur rumit dengan >100 protein yang berbeda yang secara aktif berpartisipasi dalam aktivitas dari transduksi sinyal, kaskade tipe-zymogen sampai eksekusi bedah yang tepat dari struktur-struktur sitoskeletal penting serta DNA pusat komando di dalam sel yang ditandai (diberi *marker*). Kegagalan sel-sel tumor untuk menjalani apoptosis berarti potensi malignan dan resistensi kemoterapetik.^{43,44}

Apoptosis dapat terjadi melalui 2 jalur yang dipicu oleh bermacam-macam faktor baik internal maupun eksternal.⁴⁵ Pada penelitian ini perlu dieksplorasi apoptosis baik melalui jalur reseptor kematian (*death receptor pathway*) yang melibatkan caspase-8 dan melalui jalur mitokondria (*mitochondrial pathway*) yang melibatkan p53, anggota famili Bcl-2. Melalui serangkaian interaksi molekuler yang kompleks, jalur ekstrinsik diaktivasi oleh Fas melibatkan transmisi sinyal bergantung reseptor DD (*death domain*) yang mengaktivasi caspase kematian yang mengandung DED

dengan respons penjamu lainnya, yang memicu aktivitas gen supresi.^{46,47} Aktivasi reseptor kematian Fas, reseptor kematian 4 dan 5 (DR4 dan DR5) oleh ligannya (FasL, TRAIL) menyebabkan rekrutmen molekul adaptor FADD (*fas associated death domain*) dan pembentukan kompleks protein yang disebut DISC (*death-inducing signaling complex*) yang pada gilirannya akan mengaktifasi caspase-8 dan selanjutnya akan mengaktifasi caspase eksekutor yaitu caspase-3 sehingga terjadi kematian sel kanker secara apoptosis.⁴⁸

Proses apoptosis adalah suatu proses yang terintegrasi antara faktor eksternal dan internal yang melibatkan sejumlah protein reseptor-ligan (FasL/C95L) dengan Fas/CD95), protein regulator sitosolik (Bcl-2, Bcl-xl, Bax, Apaf-1, PUMA, Noxa, Smac-Diablo) dan sejumlah enzim-enzim (enzim hidrolase dan proteolitik) yang berperan sebagai pemain utama dalam proses apoptosis.⁴⁸ Proses apoptosis di dalam sel dibedakan menjadi 3 fase yaitu inisiator, efektor dan eksekusi yang masing-masing fase merupakan rangkaian proses reaksi biokimia yang diperankan sejumlah protein. Fase inisiasi terjadi perikatan sinyal kematian dari luar sel oleh reseptornya yang berada pada membran sel (ikatan antara ligan dan reseptor seperti halnya ikatan yang terjadi antara *death ligan* dan *death receptor* yaitu antara FasL dan Fas).⁴⁹ Ikatan antara ligan dan reseptor ini diikuti dengan terbentuknya kompleks *protein death domain*, recruitment protein adaptor seperti FADD (*fas associated death domain*) dan procaspase-8 (*inactive*). Kompleks protein ini merupakan *cell death signals*. Pada fase efektor procaspase-8 akan aktif selama mengalami *digest*. Caspase-8 (aktif) akan mengaktifkan protein Bid (*death promoting protein*). Protein Bid ini akan memacu pelepasan sitokrom-c dari mitokondria.¹ Mitokondria akan melepaskan sitokrom-c, setelah menerima sinyal dari luar sel (sinyal berupa stres, kerusakan DNA, kemoterapi atau sinar ultra violet). Lepasnya sitokrom-c akan ditangkap oleh procaspase-9 (*inactive*) dan membentuk protein kompleks bersama dengan protein apaf-1. Ikatan protein ini akan mengaktifkan caspase-9. Aktifnya caspase-9 akan mengaktifkan procaspase-3 menjadi caspase-3 (*active*). Eksekusi sel dilaksanakan oleh caspase-3 dengan ditandai adanya *cleavage* atau pemotongan PARP (*poly-ADP ribosa polymerase*) yang merupakan substrat spesifik caspase-3, atau secara tampak terbentuknya *apoptotic bodies* yaitu fragmen-fragmen DNA (inti sel) dan komponen sitosol yang terbentuk dengan selubung membran sel dengan ukuran yang lebih kecil dari inti sel.⁴⁸

Sel apoptosis mempunyai bentuk kondensasi kromatin menjadi kasar, *shrinkage*/penyusutan sel dan nukleus. Fragmentasi nukleus dan protuberan (pembengkakan) pada permukaan sel yang menghasilkan badan

apoptosis, yang dikelilingi oleh halo yang jernih, yang dapat dilihat secara mikroskopis, dengan prosesing jaringan rutin, pengecatan rutin H&E maupun pengecatan imunohistokimia TUNEL (*terminal deoxy-nucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick and labeling*) essay. Prinsip metode ini adalah perpaduan antara reaksi molekuler dengan imunohistokimia, dimana reaksi molekuler ditandai dengan ligasi antar fragmentasi DNA dengan degoxigenin dengan bantuan enzim TdT (*terminal deoxynucleotide transferase*) dan reaksi imunohistokimia yang ditandai adanya reaksi imunologi yaitu antara antigen dan antibodi dan reaksi kimiawi yaitu adanya reaksi enzim dengan substrat. Pemeriksaan TUNEL menggunakan TdT-FragEl *detection kit*, pada pemeriksaan ini, ikatan TdT untuk menampakkan akhir 3-OH dari fragmentasi DNA, penambahan katalisa dari *biotin-labeled* dan *unlabeled deoxy-nucleotides* pada bagian ini. *Biotinylated nucleotides* akan dideteksi menggunakan ikatan streptavidin-horseradis peroxidase. Reaksi diamino-benzidine dengan sampel yang dilabel akan menyebabkan warna pada *DNA fragmentation*.

Kemopreventif polifenol *made* diperkirakan dapat menyebabkan apoptosis dengan ciri morfologi, membran sel menggelembung (*blebbing*), penyusutan volume sitoplasma (*shrinkage*), terjadi peningkatan permeabilitas dan penurunan potensial membran mitokondria. Sel yang apoptosis terjadi pemecahan rantai DNA yang dapat dideteksi dengan pengecatan TUNEL. Penggunaan metode TUNEL memperlihatkan derajat spesifisitas tinggi untuk mendeteksi sel yang mengalami apoptosis.⁵⁰

Hasil penelitian ini, berhasil membuktikan bahwa pemberian secara oral polifenol mahkota dewa dapat meningkatkan indeks apoptosis pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol (tidak diberi perlakuan) pada mencit. Hasil ini ditunjukkan melalui uji statistik dengan ($p=0,000$). Oleh karena nilai $p<0,05$ ($0,000$), maka hasil ini memperlihatkan polifenol mahkota dewa dapat meningkatkan indeks apoptosis pada mencit strain Balb/c.

Telah dilaporkan bahwa EGCG meningkatkan indeks apoptosis pada sel karsinoma epidermoid manusia A431. Selain itu, penelitian menunjukkan menunjukkan induksi apoptosis pada barisan sel adenokarsinoma kolon manusia HT-29 oleh EGCG.⁵¹ Hasil tersebut juga menunjukkan tindakan yang menimbulkan apoptosis dari *theaflavin* dan EGCG secara *in vivo*. Sangat menarik untuk dicatat bahwa baik *theaflavin* maupun EGCG dapat melakukan penghambatan proses proliferasi dan melakukan peningkatan apoptosis, sehingga pembatasan yang signifikan dari proses

karsinogenesis yang diinduksi oleh BaP pada paru tikus.¹⁵⁻¹⁷

SIMPULAN

Polifenol mahkota dewa menghambat proliferasi sel yang ditandai oleh berkurangnya bercak NORs dan dapat menginduksi apoptosis melalui peningkatan indeks apoptosis pada mencit Balb/c hasil induksi *benzo(a)pyrene* (BaP).

DAFTAR PUSTAKA

1. Fisher DE. Apoptosis in the cancer therapy: Crossing the threshold. *Cell*. 2004;78:539-42.
2. Shi-Yong Sun, Numsen Hail Jr, Reuben Lotan. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *Journal of the National Cancer Institute* 2004;96(9):662-72.
3. Kitagawa S. Inhibitory effect of polyphenols on p-glycoprotein-mediated transport. *Biol. Pharm. Bull* 2006;29:1-6.
4. Vucic D & Fairbrother WJ. The inhibitor of apoptosis protein as therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res* 2007;12(20):5995-6000.
5. Reed JC. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancel Cell*. 2003;3:17-22.
6. Nurseta T. Konsep dasar genetika sel kanker. *Ethical Digest*. 2006;31:70-3.
7. Elias JM. Cell Proliferation Indexes: a Biomarker in solid tumors. *Biotech and Histoche*. 1997;72(2):78-85.
8. Derenzini M. The AgNORs. *Micron* 2000;31:117-120.
9. Kurnia I, Budiningsih S, Adrijono, Ramli I, Cholid B. AgNOR as sensitivity early response radiation proliferation marker in cervical cancer chemoradiotherapy. *Prosiding Seminar Nasional Keselamatan, Kesehatan dan Lingkungan IV dan International Seminar on Occupational Health and Safety I*. Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi (PTKMR)-Badan Tenaga Nuklir Nasional & FKM-UI Jakarta. 2008.
10. Rizali E dan Auerkari EI. Teknik pewarnaan silver (AgNOR) sebagai salah satu cara menentukan aktivitas proliferasi sel tumor dan apoptosis. *Jurnal Kedokteran Gigi Indonesia*. 2003;10(3):41-5.
11. Hsu S, Lewis J, Singh B, Schoenlein P, Osaki T, Athar M, Porter AG, Schuter G. Green tea polyphenol targets the mitochondria in tumor cell inducing caspase 3-dependent apoptosis. *Anticancer Research*. 2003;23:1533-9.
12. Hadi SM, Asad SF, Sing S, Ahmad A. Putative mechanism for anticancer and apoptosis-inducing properties of plant-derived polyphenolic compounds. *IUBMB Life*. 2000;167-71.
13. Yeh CW, Chen WJ, Chiang CT, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of fatty acid synthase in MCF-7 breast cancer cells by tea and tea polyphenols: a possible mechanism for their hypolipidemic effects. *Pharmacogenomics Journal*. 2003;3:267-76.
14. Banerjee S, Manna S, Saha P, Panda CKr, Das S. Black tea polyphenols suppress cell proliferation and induce apoptosis during benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis. *European Journal of Cancer Prevention*. 2005;14:215-21.
15. Banerjee S, Manna S, Mukherjee S, Pal Debalina, Panda CKr, Das S. Black tea polyphenols restrict benzo(a)pyrene-induced mouse lung cancer progression through inhibition of Cox-2 and induction of caspase-3 expression. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2006;7:661-6.
16. Banerjee S, Panda CKr, Das S Clove. A potential chemopreventive agent for lung cancer. *Carcinogenesis*. 2006;27(8):1645-54.
17. Lisdawati E. Buah mahkota dewa (*Phaleria macrocrapa* (Scheff.) Boerl.), toksisitas, efek antioksidan dan efek antikanker berdasarkan uji penapisan farmakologi. *J. Med. Indo*. 2002;9(3):34-9.
18. Watuguly T, Yotoprano S, Subekti S. Uji toksisitas bioinsektisida ekstrak biji mahkota dewa (*Phaleria papuana* Warb.) terhadap mortalitas stadium larva *Aedes aegypti* Linn. di laboratorium. *Maj. Ked. Trop. Indo*. 2005;17(1):33-46.
19. Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Wong KM. Molecular and genetic aspects of lung cancer (review). *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(4Pt1):1355-67.
20. Taik-Koo Y, Sung-Ho K, Yun-Sil L. Trial of a new medium-term model using benzo(a)pyrene induced lung tumor in newborn mice. *Anticancer Res*. 1995;15:839-46.
21. Letchoumy PV, Mohan KVPC, Prathiba D, Hara Y, Siddavaram N. Comparative evaluation of anti-proliferative, antiangiogenic and apoptosis inducing potential of black tea polyphenols in the hamster buccal pouch carcinogenesis model. *Journal of carcinogenesis*. 2007;6(19):1-13.
22. Shi-Yong Sun, Numsen Hail Jr, Reuben Lotan. Apoptosis as a Novel target for cancer chemoprevention. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(9):662-72.
23. Sirri V, Pascal R, Marie CG, Hernandez VD. Amount of the two mayor AgNOR proteins, nucleolin and protein B23 is cell-cycle dependent. *Cytometry*. 2007;28:147-56.
24. Wuerin J, Nurse P. Regulating S phase: CDKs, licensing and proteolysis. *Cell*. 1996;85:785-7.
25. Sherr C. Cancer cell cycles. *Science*. 1996;274:1672-7.
26. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*. 1994;79:573-82.
27. Weintraub SJ. Inactivation of tumor suppressor proteins in lung cancer. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 1996;15:150-5.
28. Kurnia I, Budiningsih S, Adrijono, Ramli I, Cholid B. AgNOR as sensitivity early response radiation proliferation marker in cervical cancer chemoradiotherapy. *Prosiding Seminar Nasional Keselamatan,*

- Kesehatan dan Lingkungan IV dan *International Seminar on Occupational Health and Safety* I. Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi (PTKMR)-Badan Tenaga Nuklir Nasional & FKM-UI Jakarta. 2008.
29. Chen M, Lee JG, Lo S, Shen J. Argyrophilic Nuclear Organizer Regions (AgNOR) in neopharyngeal carcinoma and paraneoplastic epithelial. *Head and Neck* 2003;25(5):395-9.
 30. Wei HB, Han XW, Fan E, Chen GH, Wang JF. Effect of retinoic acid on cell proliferation kinetics and retinoic acid receptor expression of colorectal mukosa. *World J Gastroenterol* 2003;9(8):1725-8.
 31. Oliveira MG, Lauxen IS, Neto MM, Rados PV, Jaeger F, Kaizer MR, et al. Tongue squamous cell carcinoma: relationship between argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) and histopathologic grading. *Appl Cancer Res* 2005;25(1):20-4.
 32. Rizali E dan Auerkari EI. Teknik pewarnaan silver (AgNOR) sebagai salah satu cara menentukan aktivitas proliferasi sel tumor dan apoptosis. *Jurnal Kedokteran Gigi Indonesia* 2003;10(3):41-5.
 33. Wasito H, Murwanti R, Meiyanto E. Efek antiproliferasi ekstrak etanol daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. pada sel paru tikus jantan yang diinduksi 7,12-dimetilbenz[*a*]antrasen. *Statistika* 2007;7(1):13-9.
 34. Sushma M, Asha RI, Nagesh KS, Bharati MB. Analysis of cell proliferation rate in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *J Clin Exp Dent* 2010;2(4):e173-7.
 35. Yoshida T, Tanaka S, Mogi A, Shitara Y, Kuwano H. The clinical significance of cyclin B1 and Wee1 expression in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004;15:252-6.
 36. Singhal S, Vachani A, Ozerkis DA, Kaiser LR, Albelda SM. Prognosis implications of cell cycle, apoptosis and angiogenesis biomarker in non-small cell lung cancer: a review. *Clin. Cancer Res.* 2005;11(11):3974-86.
 37. Yang CS, Chung JY, Yang G, Chhabra SK, Lee MJ. Tea and tea polyphenols in cancer prevention. *J Nutr* 2000;130:4725-85.
 38. Yang GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis* 1998;19:611-6.
 39. Sadzuka Y, Sugiyama T, Hirota S. Modulation of cancer chemotherapy by green tea. *Clin Cancer Res* 1998;4:153-6.
 40. Mohan KPVC, Devaraj H, Prathiba D, Hara Y, Nagini S. Antiproliferative and apoptosis inducing effect of lactoferrin and black tea polyphenol combination on hamster buccal pouch carcinogenesis. *Bioch. et Biophys. Acta* 2006;1760(10):1536-44.
 41. Pich A, Chiusa L, Margaria E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron.* 2000;31:133-41.
 42. Viktorsson K, Lewensohn R. Apoptotic signaling pathways in lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology.* 2007;2(3):175-9.
 43. Vermeulen K, Bockstaele Van DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanism and relevance in cancer. *Ann. Hematol.* 2005;84:627-39.
 44. Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth. *Carcinogenesis* 2007;28(2):233-9.
 45. Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insight from geneically alterek mice. *Vet. Pathol.* 2003;40:481-95.
 46. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* 2001;92: 57-70.
 47. Giovannini C, Scazzocchio B, Vari R, Santangelo C, Archivio D' M and Masella R. Apoptosis in cancer and arteriosclerosis: poliphenol activities. *Ann Ist Suoer Sabita* 2007;43(4):406-16.
 48. Sareen D, Ginkel van PR, Takach JC, Mohiuddin A, Darjatmoko SR, Albert DM, et al. Mitochondria as the primary target of resveratrol-induced apoptosis in human retinoblastoma cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2006;47(9):3708-16.
 49. Hanahan D and Weinberg RA. The hallmark of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
 50. Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW, Molitoris BA, Dagher PC. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 2003;284: C1309-C1318.
 51. Chen C, Shen G, Hebbar V, Hu R, Owuor ED, Kong AN. Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2003;24:1369-78.