



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *SPIRULINA*
TERHADAP INDEKS APOPTOSIS SEL T47D**

*THE EFFECTS OF SPIRULINA EXTRACT
ON APOPTOTIC INDEX OF T47D CELL*

ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

**Disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan
guna mencapai derajat sarjana strata-1 kedokteran umum**

**AMELIA SUKO
G2A 007 022**

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
TAHUN 2011**

LEMBAR PENGESAHAN

Telah disetujui oleh Dosen Pembimbing Artikel Karya Tulis Ilmiah dari:

Nama : Amelia Suko
NIM : G2A 007 022
Tingkat : Program Pendidikan Sarjana
Fakultas : Kedokteran
Perguruan Tinggi : Universitas Diponegoro Semarang
Bagian : Histologi
Judul : PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *SPIRULINA*
TERHADAP INDEKS APOPTOSIS SEL T47D
Pembimbing : dr. Ratna Damma Purnawati, M.kes

Semarang, 1 Agustus 2011

Dosen Pembimbing

dr. Ratna Damma Purnawati, M,Kes
NIP 196311141990032001

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *SPIRULINA* TERHADAP INDEKS APOPTOSIS SEL T47D

Amelia Suko¹, Ratna Damma Purnawati²

ABSTRAK

Latar belakang : Kanker payudara merupakan kanker yang banyak ditemukan pada wanita, bahkan merupakan kanker nomor satu di Indonesia yang disusul kanker *cervix*. *Spirulina* merupakan *cyanobacterium* mikroskopik berfilamen yang kaya akan c-fikosianin yang mampu menginduksi apoptosis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *Spirulina* terhadap indeks apoptosis sel T47D (*cell line* tumor duktal payudara).

Metode : Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan *Post Test Only Control Group Design*. Sebanyak 5×10^4 sel T47D/1000 μ l MK dimasukkan dalam 10 kelompok, yang masing-masing terdiri dari dua sumuran. Kelompok perlakuan (P1, P2, P3, P4, dan P5) diberikan ekstrak *Spirulina* yang terlarut dalam DMSO dengan dosis 125 μ g/1000 μ l MK, 250 μ g/1000 μ l MK, 500 μ g/1000 μ l MK, 1000 μ g/1000 μ l MK, dan 2000 μ g/1000 μ l MK. Kelompok kontrol (K1, K2, K3, K4, dan K5) diberikan DMSO dengan dosis yang setara dengan kelompok perlakuan. Indeks apoptosis dinilai dengan metode *double staining*.

Hasil: Uji Kruskal-Wallis menunjukkan perbedaan bermakna indeks apoptosis antar kelompok dengan nilai $p < 0,001$. Uji Mann-Whitney menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok K1 dan P1 ($p = 0,002$), K2 dan P2 ($p < 0,001$), K3 dan P3 ($p < 0,001$), K4 dan P4 ($p < 0,001$), K5 dan P5 ($p < 0,001$), P1 dan P2 ($p = 0,003$), P1 dan P3 ($p < 0,001$), P1 dan P4 ($p < 0,001$), P1 dan P5 ($p < 0,001$), P2 dan P3 ($p = 0,007$), P2 dan P4 ($p < 0,001$), P2 dan P5 ($p < 0,001$), P3 dan P4 ($p < 0,001$), P3 dan P5 ($p < 0,001$), P4 dan P5 ($p = 0,002$).

Kesimpulan : Ekstrak *Spirulina* terbukti secara bermakna dapat meningkatkan indeks apoptosis sel T47D.

Kata kunci: *Spirulina*, indeks apoptosis, sel T47D

¹ Mahasiswa Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang

² Dosen Pengajar Bagian Histologi, Universitas Diponegoro, Semarang

THE EFFECTS OF SPIRULINA EXTRACT ON APOPTOTIC INDEX OF T47D CELL

Amelia Suko¹, Ratna Damma Purnawati²

ABSTRACT

Background: Breast cancer is a common malignancy in women. Evenmore, breast cancer's incidence in Indonesia is ranked number one, followed by cervix cancer. Spirulina is a microscopic cyanobacterium rich of c-phycoyanin which are able to induce apoptosis. This study aim to find out the effect of Spirulina extract on apoptotic index of T47D cell (ductal breast cancer cell line).

Method: This research is an experimental study with Post Test Only Control Group Design. As much as 5×10^4 of T47D cells/1000 μ l MK are being divided into ten groups, each consists of two wells. The treatment groups (P1, P2, P3, P4, and P5) were given Spirulina extract dissolved in DMSO with ascending dose, starting from 125 μ g/1000 μ l MK, 250 μ g/1000 μ l MK, 500 μ g/1000 μ l MK, 1000 μ g/1000 μ l MK, to 2000 μ g/1000 μ l MK. The control group (K1, K2, K3, K4, and K5) were given DMSO in equal dose to those of the treatment group. Apoptotic index was measured using double staining method.

Result: Kruskal-Wallis test showed significans apoptotic index's differences among groups with $p < 0,001$ ($p < 0,05$). Mann-Whitney test showed significant differences between K1 and P1 groups ($p = 0,002$), K2 and P2 ($p < 0,001$), K3 and P3 ($p < 0,001$), K4 and P4 ($P < 0,001$), K5 and P5 ($p < 0,001$), P1 and P2 ($p = 0,003$), P1 and P3 ($p < 0,001$), P1 and P4 ($p < 0,001$), P1 and p5 ($p < 0,001$), P2 and P3 ($p = 0,007$), P2 and P4 ($p < 0,001$), P2 and P5 ($p < 0,001$), P3 and P4 ($p = < 0,001$), P3 and P5 ($p < 0,001$), P4 and P5 ($p = 0,002$).

Conclusion: Spirulina extract was proven to increase apoptotic index in T47D cell significantly.

¹ Student of Faculty of Medicine, Diponegoro University, Semarang

² Lecturer of Histology Department, Diponegoro University, Semarang

PENDAHULUAN

Kanker adalah suatu penyakit yang terjadi melalui proses transformasi. Proses ini akan berlangsung apabila sel mengalami perubahan genetik dan mendapat kemampuan untuk melepaskan diri dari mekanisme regulator. Kanker dapat mengenai seluruh jaringan tubuh manusia termasuk payudara.¹⁻⁴

Kanker payudara bisa dikatakan sebagai momok yang menakutkan bagi wanita. Hal ini tidak lain karena kanker payudara merupakan kanker yang banyak ditemukan pada wanita. Walaupun pada kenyataannya kanker payudara juga dapat mengenai pria (1:1000). Kanker payudara sejak tahun 2004 sampai 2008 merupakan kanker nomor satu di Indonesia yang disusul oleh kanker cervix. Sedangkan menurut *American Cancer Society* pada tahun 2009 di seluruh dunia diperkirakan terdiagnosis 192.370 kasus baru kanker payudara dan 40.170 wanita meninggal karenanya.⁵⁻⁷

Modalitas terapi kanker payudara secara umum meliputi: operasi, kemoterapi, radioterapi, terapi hormonal, dan terapi target. Kemoterapi merupakan pengobatan kanker dengan menggunakan bahan kimia yang mempunyai efek menghambat atau mematikan sel kanker. Namun karena biaya yang tinggi, hasil yang tidak memuaskan, dan *multi drugs resistance* maka penelitian baru tentang antikanker sangat diperlukan.^{8,9}

Sel T47D merupakan *cell line* yang pertama kali diisolasi dari pasien wanita dengan tumor duktal payudara. Sel ini sering dipakai dalam kanker in vitro oleh karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak

terbatas, homogenitas yang tinggi, serta mudah diganti dengan stok beku jika terjadi kontaminasi.^{10, 11}

Spirulina adalah cyanobacterium mikroskopik berfilamen, mengandung bahan yang bermanfaat bagi manusia antara lain c-fikosianin. C-fikosianin merupakan zat dengan aktivitas kemopreventif kanker yang poten. Zat ini mampu menginduksi apoptosis dengan menimbulkan fragmentasi DNA dan kondensasi nukleus. C-fikosianin juga memiliki kemampuan untuk menurunkan regulasi protein anti apoptosis dan meningkatkan regulasi protein proapoptosis.^{12, 13}

Ketika suatu sel mengalami kerusakan yang tidak dapat diperbaiki lagi, sel tersebut akan menginduksi respon apoptosis yang sangat sel spesifik dan merupakan bentuk yang paling umum dari kematian sel secara fisiologis. Apoptosis adalah suatu mekanisme kematian sel di mana sel merupakan pihak aktif dalam kematiannya sendiri. Apoptosis memegang peranan penting dalam keberlangsungan hidup organisme dan merupakan komponen penting dari berbagai proses seperti pergantian sel normal, perkembangan dan berfungsinya sistem imun, atrofi hormon-dependent, perkembangan embrionik, eliminasi sel sakit, dan menjaga homeostasis sel. Gangguan pada proses apoptosis dapat menyebabkan penyakit seperti kanker, neurodegeneratif, dan juga gangguan autoimun.^{12, 14-17}

Indeks apoptosis adalah salah satu cara untuk mengukur persentase apoptosis yang dihitung dengan membandingkan jumlah sel apoptosis dengan jumlah total sel yang dihitung.¹⁸ Apoptosis yang tidak adekuat merupakan salah satu faktor yang dapat menyebabkan timbulnya kanker, maka dari itu

meningkatnya indeks apoptosis pada sel yang mengalami keganasan merupakan faktor yang baik terhadap kesembuhan dan prognosis dari penyakit tersebut.¹⁷

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dalam penelitian ini dirumuskan masalah : Apakah pemberian ekstrak *Spirulina* berpengaruh terhadap indeks apoptosis sel T47D?

Penelitian eksperimental ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *Spirulina* terhadap indeks apoptosis sel T47D dengan membandingkan indeks apoptosis sel T47D antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat dosis yang setara dan antara masing-masing kelompok perlakuan.

Diharapkan hasil penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai pengaruh ekstrak *Spirulina* terhadap *adenocarcinoma mammae*, sebagai dasar pertimbangan dalam mengembangkan pengobatan *adenocarcinoma mammae* berdasarkan konsep imunoterapi, dan menjadi bahan pertimbangan untuk penelitian lebih lanjut.

METODE

Penelitian ini mencakup bidang patobiologi dan farmakologi. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada selama 3 hari. Penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian eksperimental, *Randomized Post-test Control Group*, dengan menggunakan sel T47D.

Sampel yang digunakan adalah sel T47D yang menempel pada dasar sumuran dan dengan distribusi yang merata. Sampel diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada. Penelitian ini menggunakan 5×10^4 sel/1000 μ l media kultur yang dimasukkan dalam 20 sumuran.

Berdasarkan metode pengecatan *double staining*, sel apoptosis mempunyai gambaran sel dengan nukleus hijau/oranye dengan kondensasi atau fragmentasi kromatin, membran *blebbing*, dan sel melisut.¹⁸⁻²³

Kultur sel T47D yang sudah dalam kondisi 80% konfluens dilakukan pemanenan. Sel yang telah dipanen dihitung dan dibuat pengenceran sehingga konsentrasi sel akhir adalah 5×10^4 sel per 1000 μ l MK. Siapkan 24 well plate dan masukkan *cover slip* ke dalamnya dengan hati-hati. Masukkan 1000 μ l suspensi sel tepat di atas *cover slip* secara perlahan, kemudian diinkubasi selama semalam.

Buat konsentrasi sampel untuk perlakuan dan kontrol masing-masing sebanyak 1000 μ l. Buang semua MK pada 24 well plate yang diambil dari inkubator dengan menggunakan pipet pasteur secara perlahan-lahan. Cuci sel dalam sumuran dengan PBS masing-masing 500 μ l. Buang PBS dari sumuran dengan pipet pasteur secara perlahan-lahan. Masukkan sampel dengan konsentrasi 125 μ g/ml, 250 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml, dan 2000 μ g/ml yang sudah diencerkan dalam DMSO dan ditambahkan dengan MK sampai mencapai volume 1000 μ l ke dalam sumuran. Masukkan DMSO sesuai dengan konsentrasi sampel, kemudian tambahkan dengan MK sampai mencapai volume 1000 μ l ke dalam sumuran sebagai kontrol. Inkubasi plate dalam inkubator selama semalam.

Dengan begitu, terdapat 10 kelompok perlakuan yaitu:

- Kelompok 1 (K1) : 6,25 µl DMSO + 993,75 µl MK
- Kelompok 2 (K2) : 12,5 µl DMSO + 987,5 µl MK
- Kelompok 3 (K3) : 25 µl DMSO + 975 µl MK
- Kelompok 4 (K4) : 50 µl DMSO + 950 µl MK
- Kelompok 5 (K5) : 100 µl DMSO + 900 µl MK
- Kelompok 6 (P1) : 6,25 µl ekstrak *Spirulina* yang terlarut dalam DMSO + 993,75 µl MK
- Kelompok 7 (P2) : 12,5 µl ekstrak *Spirulina* yang terlarut dalam DMSO + 987,5 µl MK
- Kelompok 8 (P3) : 25 µl ekstrak *Spirulina* yang terlarut dalam DMSO + 975 µl MK
- Kelompok 9 (P4) : 50 µl ekstrak *Spirulina* yang terlarut dalam DMSO + 950 µl MK
- Kelompok 10 (P5) : 100 µl ekstrak *Spirulina* yang terlarut dalam DMSO + 900 µl MK

Setelah dikeluarkan dari inkubator, buang semua media dalam sumuran dengan pipet pasteur secara perlahan dan lakukan pencucian sel dengan PBS sebanyak 500 µl. Buang PBS dari sumuran dengan pipet pasteur secara perlahan. Ambil *cover slip* menggunakan pinset dan letakkan di atas *object glass*. Teteskan 10 µl reagen campuran ethidium bromida – akridin oranye di atas *cover slip*. Amati di bawah mikroskop fluoresens dengan pembesaran 400 kali pada lima lapangan pandang yang mencakup empat area sudut dan satu area tengah.

Oleh karena jumlah sampel dalam tiap kelompok hanya dua, maka langsung digunakan uji non parametrik Kruskal-Wallis. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda, maka dilakukan uji *Mann-Whitney*.

HASIL PENELITIAN

Dari hasil observasi yang dilakukan dengan pembutaan, didapatkan reliabilitas antar pengamat *intraclass correlation coefficient* (ICC) sebesar 0,99 yang berarti didapatkan kesesuaian yang sangat baik.²⁴

Untuk menganalisis indeks apoptosis secara deskriptif, digunakan median, mean, dan standar deviasi.

Tabel 1. Nilai deskriptif masing-masing kelompok

Kelompok	Median	Mean	Standar Deviasi
Kontrol 1	3,375	3,600	1,248
Kontrol 2	2,875	3,000	0,993
Kontrol 3	3,500	3,250	0,782
Kontrol 4	2,625	3,025	1,283
Kontrol 5	4,250	4,275	1,024
Perlakuan 1	5,625	5,650	1,243
Perlakuan 2	10,000	10,125	3,495
Perlakuan 3	15,875	15,950	4,916
Perlakuan 4	85,500	85,550	3,350
Perlakuan 5	76,500	77,425	4,947

Oleh karena jumlah sampel dalam tiap kelompok hanya dua, maka langsung digunakan uji non parametrik Kruskal-Wallis. Analisis data menggunakan uji Kruskal-Wallis menghasilkan nilai $p < 0,001$, sehingga dapat disimpulkan paling tidak terdapat perbedaan bermakna indeks apoptosis antara dua kelompok.

Tabel 2. Hasil Uji Mann-Whitney Antar Kelompok

	K1	K2	K3	K4	K5	P1	P2	P3	P4	P5
K1	-	-	-	-	-	0,002	-	-	-	-
K2	-	-	-	-	-	-	<0,001	-	-	-
K3	-	-	-	-	-	-	-	<0,001	-	-
K4	-	-	-	-	-	-	-	-	<0,001	-
K5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<0,001
P1	0,002	-	-	-	-	-	0,003	<0,001	<0,001	<0,001
P2	-	<0,001	-	-	-	0,003	-	0,007	<0,001	<0,001
P3	-	-	<0,001	-	-	<0,001	0,007	-	<0,001	<0,001
P4	-	-	-	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001	-	0,002
P5	-	-	-	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	-

Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda, maka dilakukan analisis Mann-Whitney (tabel 3). Hasilnya menunjukkan perbedaan yang signifikan antara semua kelompok yang diuji ($p < 0,05$).

PEMBAHASAN

Apoptosis adalah suatu mekanisme kematian sel yang terjadi dalam keadaan fisiologis dan sel merupakan pihak aktif dalam proses kematiannya sendiri. Mekanisme apoptosis terjadi dalam dua jalur, yaitu jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik. Jalur ekstrinsik dimulai dengan ligasi antara reseptor transmembran dengan ligan yang sesuai. Ligasi ini akan mengaktifkan *caspase* aktivator, yang nantinya akan menembus dan mengaktifkan efektor *caspase* sehingga memacu terjadinya apoptosis. Jalur intrinsik akan terjadi jika terdapat disrupsi pada membran mitokondria sehingga akan melepaskan aktivator protease spesifik apoptosis, sitokrom c, dan AIF (*Apoptotic Inducing Factor*) yang akan menginduksi terjadinya apoptosis^{12, 14}

Indeks apoptosis adalah suatu ukuran dari jumlah sel apoptosis yang diekspresikan dalam bentuk ratio atau persentase dari seluruh sel yang dihitung.

Indeks apoptosis dapat digunakan sebagai indikator untuk mengetahui prognosis dari suatu neoplasma. Semakin besar nilai indeks apoptosis maka semakin baik prognosis dari neoplasma tersebut. Hal ini dikarenakan kecepatan pertumbuhan kanker akan menurun.¹⁸

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna nilai indeks apoptosis antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang mendapat dosis yang setara. Ini menandakan bahwa ekstrak *Spirulina* terbukti meningkatkan indeks apoptosis sel T47D. Hal tersebut dikarenakan *Spirulina* mampu menginduksi apoptosis dengan mengaktivasi gen pro-apoptosis, menurunkan ekspresi gen anti apoptosis, memfasilitasi transduksi signal apoptosis tumor, dan mengaktivasi *caspase* 2, 3, 4, 6, 8, 9, dan 10.²⁵ Pada penelitian terdahulu *Spirulina platensis* terbukti menghambat pertumbuhan sel kanker dengan menginduksi penghentian siklus pada fase G1 dan apoptosis yang diperantarai oleh mitokondria.²⁶ Fragmentasi DNA dan kondensasi nukleus yang terlihat pada sel yang apoptosis disebabkan oleh aktivasi *caspase* 8 dan *caspase* 9. Kandungan c-fikosianin pada *Spirulina* mampu menurunkan regulasi protein antiapoptosis Bcl-2 dan meningkatkan regulasi proapoptosis protein Bax.^{12, 13, 19, 27-}

29

Pemberian ekstrak *Spirulina* pada penelitian ini sesuai dengan teori dan penelitian terdahulu, yaitu mampu meningkatkan indeks apoptosis secara bermakna.

Pada penelitian ini juga didapatkan hasil perbedaan bermakna antar tingkat dosis perlakuan dimana nilai indeks apoptosis berbanding lurus dengan dosis pada kelompok perlakuan satu sampai empat. Namun, indeks apoptosis mengalami

penurunan pada kelompok perlakuan lima dengan dosis 2000 μ g/1000 μ l media kultur.

Dari penelitian ini didapatkan hasil bahwa indeks apoptosis dari *Spirulina* berbanding lurus dengan dosis yang diberikan. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa efek dari c-fikosianin yang terkandung dalam *Spirulina* berbanding lurus dengan dosisnya. Selain itu ada penelitian lain yang menyatakan bahwa *Spirulina* mampu menurunkan ukuran tumor kulit dan gaster yang berbanding lurus dengan dosis yang diberikan.^{12, 13, 19, 27}

Hal tersebut juga sesuai dengan prinsip farmakologis yaitu berdasarkan kurva log dosis, dimana efek dari suatu senyawa kimia atau obat akan mempunyai hubungan dosis-efek terapeutik yang berbentuk sigmoid. Semakin besar konsentrasi dosis senyawa kimia atau obat maka akan diikuti dengan peningkatan efeknya sampai mencapai titik maksimal dan tidak akan bertambah lagi meski dosis terus bertambah.^{30, 31}

Pada kelompok perlakuan lima didapatkan indeks apoptosis sudah di bawah dari kelompok perlakuan empat dan berbeda secara bermakna. Hal ini dikarenakan banyaknya sel T47D yang mengalami nekrosis. Pada penelitian terdahulu dijelaskan jika β -carotene dalam dosis yang berlebihan akan menjadi toksik dan bahkan meningkatkan resiko terjadinya kanker paru. Seperti yang telah dipaparkan sebelumnya kandungan β -carotene dalam *Spirulina* sangat besar yaitu sepuluh kali lebih besar dibandingkan kandungan β -carotene dalam wortel. Penurunan indeks apoptosis pada kelompok perlakuan lima diperkirakan oleh karena dosis β -carotene yang terkandung dalam *Spirulina* sudah mencapai dosis toksik sehingga menyebabkan nekrosis sel T47D.^{13, 27, 32, 33}

Penurunan indeks apoptosis secara bermakna pada kelompok perlakuan lima dibanding kelompok empat juga disebabkan oleh karena faktor farmakodinamik dari *Spirulina*. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya mengenai hubungan dosis efek dalam bentuk kurva log dosis, dimana efek dari obat akan berbanding lurus dengan dosisnya sampai suatu titik maksimal dan tidak akan bertambah lagi meski dosis terus ditambah. Namun, pada suatu titik dosis akan timbul juga suatu kurva baru, yaitu kurva hubungan dosis-efek toksik, dengan bentuk sigmoid dan karakteristik yang umumnya serupa. hal tersebut yang menyebabkan penambahan dosis *Spirulina* terus menerus pada suatu titik akan menimbulkan efek toksik, yang dalam penelitian ini berupa nekrosis sel, di samping tetap berlangsungnya apoptosis sel. Dengan bertambahnya sel yang mengalami nekrosis, indeks apoptosis tentunya akan mengalami penurunan karena persentase sel yang apoptosis dibanding total sel yang dihitung akan mengalami penurunan.^{30,31}

SIMPULAN DAN SARAN

Pemberian ekstrak *Spirulina* berpengaruh meningkatkan indeks apoptosis pada sel T47D secara bermakna pada kelompok perlakuan dibanding kelompok kontrol yang mendapatkan dosis yang setara.

Pemberian ekstrak *Spirulina* meningkatkan indeks apoptosis sel T47D secara bermakna pada kelompok 125 µg/ 1000 µl MK, 250 µg/ 1000 µl MK, 500 µg/ 1000 µl MK, dan 1000 µg/ 1000 µl MK yang berbanding lurus dengan peningkatan dosis. Namun didapatkan penurunan indeks apoptosis pada dosis 2000 µg/ 1000 µl MK yang berbeda bermakna dibandingkan kelompok dosis 1000 µg/ 1000 µl MK.

Disarankan pula dilakukannya penelitian lebih lanjut dengan menggunakan beberapa kriteria penilaian sehingga didapatkan hasil yang lebih objektif. untuk menilai indeks apoptosis ekstrak *Spirulina*. Selain itu perlu dilakukan penelitian secara in vivo untuk mengetahui efek apoptosis yang ditimbulkan oleh reaksi imun.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis tujukan kepada yang terhormat dr.Ratna Damma Purnawati, M Kes selaku dosen pembimbing yang telah memberikan perhatian, masukan, saran serta menyediakan waktu selama proses persiapan proposal, pelaksanaan penelitian, hingga akhir penelitian ini. Para dosen penguji dan narasumber dr. Ika Pawitra Miranti, Mkes, dr. Neni Susilaningsih, M.Si, dr. Noor Wijayahadi, Mkes, dan dr. Hardian atas masukan dan saran perbaikan untuk kesempurnaan penelitian ini. Serta seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Baratawidjaja KG, Rengganis I. Imunologi Dasar. 9 ed. Jakarta: FK UI; 2010.
2. Suryohudoyo P. Kapita selekta ilmu kedokteran molekuler. VI ed. Jakarta: KDT; 2000.

3. Atwater SK. Neoplasms of the Immune System. In: Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB, editors. *Medical Immunology*. X ed. Singapore: Mc Graw Hill; 2003.
4. Paul WE. *Fundamental Immunology*. VI ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
5. American Cancer Society. *Breast Cancer Facts & Figures 2009-2010*. Atlanta: American Cancer Society, Inc.; 2009.
6. Departemen Kesehatan. *Profil Kesehatan Indonesia 2008*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI; 2009.
7. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2010*. Atlanta: American Cancer Society; 2010.
8. Suyatno, Pasaribu ET. *Bedah Onkologi Diagnosis dan Terapi*. I ed. Jakarta: CV Sagung Seto; 2010.
9. Pegram MD, Casciato DA. Breast Cancer. In: Casciato DA, editor. *Manual of Clinical Oncology*. VI ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
10. Rahmi F, Hermawan A. Sel T47D. CCRC. 2009.
11. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique 5ed*. Singapore: John Wiley & Sons; 2005.
12. Ravi M, De SL, Azharuddin S, Paul SFD. The beneficial effects of spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. *Nutrition and Dietary Supplements*. 2010;2:73-83.
13. Belay A. The Potential Application of Spirulina (Arthrospira) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. *JANA*. 2002;5.
14. Rode HJ, Etsel D, Frost I. *Apoptosis, Cell Death, and Cell Necrosis*. 3 ed. Mannheim: Roche Applied Sciences; 2006.
15. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:897-907.
16. Cruchten SV, Van den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis, and necrosis. *Anat Histol Embryol*. 2002;31:214-23.
17. Rastogi RP, Sinha RP. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI Journal*. 2009;8:155-81.

18. Liu S, Edgerton SM, Moore H. measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2001.
19. Mohammed M. Immunohistochemical Study Effects of Spirulina Algae on the Induced Mammary Tumor in Rats. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 2008;15.
20. Ismail MF, Ali DA, Fernando A, Abdraboh M, Gaur RL, Ibrahim WM, et al. Chemoprevention of rat liver toxicity and carcinogenesis by spirulina. *Int J Biol Sci.* 2009;5:377-87.
21. Lowitz BB, Casciato DA. Principles , Definitions, and Statistics. In: Casciato DA, editor. *Manual of Clinical Oncology.* VI ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
22. Sotiriou C, Pusztai L. Molecular Origins of Cancer Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2009.
23. Karkos PD, Leong SC, Karkos CD, Sivaji N, Assimakopoulos DA. Spirulina in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008;11:4.
24. Gail MH, Benichou J. *Encyclopedia of Epidemiologic Methods.* A P, Colton T, editors. West Sussex: John Wiley & Sons; 2000.
25. Lee AN, Werth VP. Activation of autoimmunity following use of immunostimulatory herbal supplements. *Arch Dermatol.* 2004;140(6):723-7.
26. Chen T, Wong YS, Zheng W. Induction of G1 cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells by selenium-enriched Spirulina extract. *Biomed Pharmacother.* 2009;27.
27. Dore JE. *GRAS Notification: Spirulina.* California: Earthrise Nutritionals, Inc; 2003.
28. Li B, Gao MH, Zhang XC, Chu XM. Molecular immune mechanism of c-phycoyanin from spirulina platensis induces apoptosis in HeLa cells in vitro. *Biotechnol and Appl Biochem.* 2006.
29. Subhashini J, Mahipal SV, Reddy MC, Mallikarjuna Reddy M, Rachamalla A, Reddanna P. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(3):453-62.

30. Setiawati A, Suyatna F, Gan S. Pengantar Farmakologi. In: Gunawan SG, editor. Farmakologi dan Terapi. 5 ed. Jakarta: Balai Penerbit FKUI; 2008.
31. Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology. 10 ed. San Francisco: Mc Graw Hill; 2006.
32. Sanchez M, Bernal-Castillo J, Rozo C, Rodrigues I. Spirulina (Arthrospira) : an Edible Microorganism [homepage on the internet]. No date [cited 2011 jul 9]. Available From: http://www.javeriana.edu.co/universitas_docs/vol_8n1/J_bernal.htm.
33. Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Meyskens FL, Omenn GS, et al. The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-year follow-up after stopping beta-carotene and retinol supplements. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(23):1743-50.