



**PENGARUH EKSTRAK *Phyllanthus niruri* Linn  
TERHADAP KANKER KOLON TIKUS  
SPRAGUE-DAWLEY YANG DIINDUKSI  
1,2 DIMETHYLHYDRAZINE**

**ENDANG SAWITRI**

**UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
2012**

**PENGARUH EKSTRAK *Phyllanthus niruri* Linn  
TERHADAP KANKER KOLON TIKUS  
*SPRAGUE-DAWLEY* YANG DIINDUKSI  
*1,2 DIMETHYLHYDRAZINE***

Disertasi  
Untuk memperoleh gelar Doktor  
dalam Ilmu Kedokteran / Kesehatan

Untuk dipertahankan di hadapan  
Rapat Senat Terbuka Terbatas Universitas Diponegoro  
pada tanggal 23 Mei 2012 pukul 10.00 WIB.

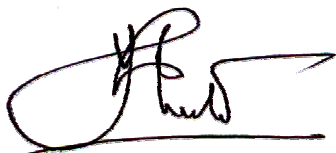
Oleh  
Endang Sawitri  
Lahir di Manado

**PENGARUH EKSTRAK *Phyllanthus niruri* Linn  
TERHADAP KANKER KOLON TIKUS  
*SPRAGUE-DAWLEY* YANG DIINDUKSI  
1,2 *DIMETHYLHYDRAZINE***

**ENDANG SAWITRI  
NIM: G5A006003**

Telah disetujui oleh:

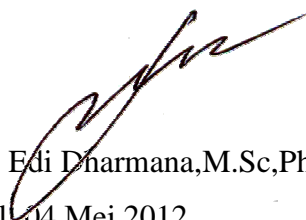
Promotor



Prof. Dr. dr. Ign. Riwanto, Sp. B-KBD

Tanggal: 04 Mei 2012

Ko-Promotor



Prof. dr. Edi Dharma, M. Sc, PhD, Sp. ParK

Tanggal: 04 Mei 2012

Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan  
Pascasarjana Universitas Diponegoro Semarang

Ketua, 11 Mei 2012



Prof. Dr. dr. Hardhono Susanto, PAK(K)  
NIP. 19550511 198103 1004

Wahai manusia! Makanlah dari (makanan) yang halal lagi baik yang terdapat di bumi, dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah setan. Sungguh, setan itu adalah musuh yang nyata bagimu (QS. Al Baqarah: 168).

Dan Dialah yang menjadikan tanaman-tanaman yang merambat dan yang tidak merambat, pohon korma, tanaman yang beraneka ragam rasanya, zaitun dan delima yang serupa (bentuk dan warnanya) dan tidak sama (rasanya). Makanlah buahnya apabila ia berbuah dan berikanlah haknya (zakatnya) pada waktu memetik hasilnya, tapi janganlah berlebih-lebihan. Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang yang berlebih-lebihan (QS. Al An'aam: 141).

Dan janganlah engkau berjalan di bumi ini dengan sombong, karena sesungguhnya engkau tidak akan dapat menembus bumi dan tidak akan mampu menjulang setinggi gunung (QS. Al-Isra': 37).

*Let food be thy medicine and medicine be thy food* (Hippocrates).

Dipersembahkan kepada  
Suami dan anakku tercinta, Orang tua,  
Kakak-kakak dan adikku,  
para Guru dan Guru Besarku.



## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, atas segala karunia dan anugerah yang telah diberikan berkaitan dengan pendidikan yang dijalani. Shalawat dan salam semoga selalu tercurah kepada junjungan dan tauladan kita Rasulullah Muhammad SAW, keluarga dan para sahabatnya. Sesungguhnya tiada kekuatan selain atas izin Allah SWT serta hanya atas berkat rahmat, pertolongan dan ridhoNya saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi dengan judul “Pengaruh Ekstrak *Phyllanthus niruri* Linn terhadap Kanker Kolon Tikus *Sprague-Dawley* yang Diinduksi 1,2 *Dimethylhydrazine*” ini.

Penelitian dan penulisan disertasi ini tidak mungkin dapat diselesaikan tanpa pengarahan, bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak, terutama Promotor dan Ko-promotor. Untuk itu pada kesempatan yang baik ini, dengan tulus ikhlas dan rasa hormat perkenankanlah saya menghaturkan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

Prof. Sudharto P. Hadi, MES, PhD, selaku Rektor Universitas Diponegoro Semarang, Prof. Dr. dr. Susilo Wibowo, MS.Med, Sp.And, selaku mantan Rektor Universitas Diponegoro Semarang, Prof. Dr. dr. Anies, M.Kes, PKK, selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Diponegoro, Prof. Drs. J. Warella, MPA, PhD, selaku mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Diponegoro, Prof. Dr. dr. Hardhono Soesanto, PAK, selaku Ketua Program Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan dan Prof. Dr. dr. Soeharyo Hadisaputro, Sp.PD (KPTI), selaku mantan Ketua juga Dr.dr. Ari Suwondo, MPH selaku Sekretaris Program Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan yang telah mengizinkan dan memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan pada Program Pascasarjana Universitas Diponegoro Semarang.

Prof. Dr. dr. Ign. Riwanto, Sp.B-KBD, Guru Besar pada bidang Bedah Digestif Fakultas Kedokteran Undip atas kesediaan beliau sebagai Promotor. Di

sela-sela waktu beliau yang sangat sibuk, senantiasa membimbing saya dengan penuh ketekunan dan kesabaran mulai dari penyusunan proposal, pelaksanaan penelitian sampai penulisan disertasi. Beliau tak pernah bosan mengingatkan dan mendorong saya untuk segera menyelesaikan penulisan disertasi dengan dasar ilmiah dan metode penelitian yang benar dan analisis yang kuat. Beliau selalu memberi semangat untuk tetap bertahan, mengatasi segala hambatan baik dari diri sendiri maupun dari luar.

Prof. Dr. dr. Tjahjono, Sp.PA(K), FIAC (alm), Guru Besar pada bidang Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Undip dan Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan FK UNDIP/RSUP dr. Kariadi Semarang atas kesediaan beliau untuk menjadi Ko-promotor dan Pembimbing Akademik. Beliau senantiasa meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam memberikan wawasan, pengarahan, bimbingan dan petunjuk dengan penuh ketulusan dan kesabaran sejak mengambil gelar magister. Beliau senantiasa memberikan motivasi di saat-saat sulit, baik dalam pendidikan, penelitian sampai selesainya penulisan disertasi dengan penuh pengertian dan kearifan. Ya Allah ampunilah dosa-dosa Almarhum, terimalah amal ibadahnya dan tempatkanlah beliau sebagai penghuni surga-Mu. Amin..

Prof. dr. Edi Dharmana, M.Sc, PhD, Sp.ParK, Guru Besar pada bidang Parasitologi Kedokteran dan Imunologi Fakultas Kedokteran Undip atas kesediaan beliau untuk menjadi Ko-promotor. Beliau telah banyak memberikan wawasan keilmuan di bidang imunologi kanker, sehingga saya mendapatkan gambaran lebih jelas untuk menuangkan ide dalam penelitian ini. Beliau adalah orang yang dengan penuh semangat selalu mengingatkan dan memberi dorongan, bimbingan dan saran sejak mengambil gelar magister yang sangat bermanfaat dalam penyelesaian disertasi ini.

Dewan Penguji Prof. Sudharto P. Hadi, MES, Prof. Dr. Ir. Sunarso, MS, Prof. Dr. dr. Sjamsuhidajat Ronokusumo, Sp.BD, Prof. Dr. dr. Sarjadi, Sp.PA(K), Prof. Dr. dr. Soeharyo Hadisaputro, Sp.PD (KPTI), Prof. Dr. dr. Hendro Wahjono, M.Sc., TropMed, DMM, Sp.MK, Prof. Dr. dr. Anies, M.Kes, PKK, Dr. Henna Rya Sunoko, Apt, MES, Prof. dr. Edi Dharmana, M.Sc, PhD, Sp.ParK dan Prof. Dr. dr. Ign. Riwanto, Sp.B-KBD atas semua sumbangan pemikiran, pengarahan dan

pendalaman materi, masukan sekaligus kritikan dan saran yang konstruktif demi kebenaran isi disertasi ini.

Dewan Guru Besar, Prof. Dr. dr. Ariawan Soejoenoes, Sp.OG (K), Prof. Dr. dr. Sarjadi, Sp.PA(K), Prof. Dr. dr. Soeharyo Hadisaputro, Sp.PD (KPTI), Prof. dr. Sultana MH. Faradz, PhD, Prof. Dr. dr. Hendro Wahjono, M.Sc., TropMed, DMM, Sp.MK, Prof. Dr. dr. Lisyani Suromo, Sp.PK (K), Prof. Dr. dr. Hertanto W Subagio, MS., Sp.GK, Prof. Dr. dr. Endang Purwaningsih, MPH, Sp.GK (almh), Prof. Dr. dr. Hardhono Soesanto, PAK, Prof. Dr. dr. Sudiro, MPH, Dr. Nico L. Kana dan seluruh staf pengajar Program Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan Program Pascasarjana Undip yang telah banyak membantu dalam pengajaran dan memperdalam wawasan keilmuan yang sangat berharga untuk pendidikan dan penyelesaian disertasi ini.

Prof. Dr. Zamrudin, SE., M.Si. selaku Rektor dan Prof. Dr. Ir. H. Ach. Ariffien Bratawinata, M.Agr selaku mantan Rektor Universitas Mulawarman dan dr. Emil Moerad, Sp.P selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman Samarinda yang telah berkenan memberi izin, kesempatan, dukungan moril dan finansial yang sangat berharga kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan pada Program Pascasarjana Universitas Diponegoro Semarang.

Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Kementrian Pendidikan Nasional Republik Indonesia atas bantuan dana berupa Beasiswa Pendidikan Pascasarjana (BPPS), Sandwich-like Programe dan Hibah Doktor, juga kepada Gubernur Provinsi Kalimantan Timur dan Tim Pengelola Beasiswa Kaltim Cemerlang yang telah memberi dukungan dana pendidikan dan penelitian sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan lancar sesuai dengan yang diharapkan.

Ir. Ferry A. Soetikno, MSc., MBA selaku President Director PT. Dexa Medica, DR. Raymond R. Tjandrawinata, MSc., MBA, PhD selaku Director of Scientific Affairs and Bussiness Development PT. Dexa Medica, Dwi Nofiarny, Pharm, MSc. selaku Medical Information and Clinical Research Senior Manager yang telah memberikan kepercayaan dan bantuan dana yang sangat berarti sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan lancar, juga kepada Liana W.



Susanto, MBIomed selaku Clinical Data Manager, Dr. Prihatini Hendri selaku Clinical Project Manager dan Fenny, Pharm selaku Medical Writer and Data Analyst yang telah meluangkan waktunya dalam memberikan informasi yang saya butuhkan, serta menjalin komunikasi dan korespondensi yang lancar.

Dr. drh. Pudji Astuti, MP selaku Ketua Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Bidang Layanan Penelitian Pra-klinik dan Pengembangan Hewan Percobaan (LPPT Bidang LP3HP) UGM Yogyakarta yang telah memberi izin dan kesempatan kepada saya untuk melakukan penelitian dan menggunakan fasilitas laboratorium yang tersedia, beserta seluruh staf laboratorium khususnya bapak Samidi, Sugito dan Sutari yang telah banyak membantu saya dengan tulus dan sabar dalam pelaksanaan penelitian pada hewan coba. Juga kepada dr. Awal Prasetyo, M.Kes, Sp.THT-KL dan ibu Didit Iriantiningasih atas kesediaan membantu dalam pengadaan karsinogen 1,2 DMH.

Dr. Harijadi, Sp.PA dan dr. Totok Sp.PA, Ahli Patologi Anatomi FK UGM/RSUP dr. Sardjito Yogyakarta dan dr. Noor Yazid, Sp.PA serta dr. Ika P. Miranti, SpPA., M.Kes, Ahli Patologi Anatomi FK Undip/RSUP dr. Kariadi Semarang yang telah mengizinkan sekaligus membantu saya melakukan pemeriksaan dan pemotretan preparat histopatologi dan imunohistokimia, juga seluruh staf Instalasi PA FK UGM/RSUP dr. Sardjito Yogyakarta, khususnya kepada Ketua tim analis dan teknisi laboratorium ibu Agustina Supriyanti, Amd., bapak Yunadir dan bapak Soemantri yang telah banyak membantu dalam penyiapan dan pembuatan preparat histopatologi dan imunohistokimia.

Prof. Dr. Johnson Stanslas sebagai Host Advisor dari Department of Biomedical Sciences Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Putra Malaysia yang telah memberikan izin dan kesempatan kepada peneliti untuk melaksanakan preliminary study seiring dengan pelaksanaan Sandwich-like Programe di Universiti Putra Malaysia. Beliau senantiasa membimbing, mengarahkan dan memberikan saran sekaligus kritik yang membangun demi keberhasilan penelitian yang dikerjakan. Terima kasih yang sebesar-besarnya juga disampaikan kepada staf laboratorium dari Department of Biomedical Sciences.

Teman sejawat dr. Arya Hasanudin, Sp.J (alm), dr. Budi Laksono, MHSc., dr. Indranilla KS, Sp.PK(K), Dr. Judiono, MPS, Dra. Meiny Suzery, MS dan Theophilus Watugully, M.Kes atas segala pengertian, dorongan semangat, masukan, saling membantu serta kerjasama yang telah diberikan selama mengikuti pendidikan program doktor.

Pegawai administrasi di Program Doktor Ilmu Kedokteran/Kesehatan Ibu Fera Dwi Susanti, SE, bapak Untung Supriyanto dan bapak Ahmad Saryono, serta para pegawai administrasi di Program Pascasarjana Undip yang tidak sempat disebut namanya satu persatu, juga bapak Rusli Haidar, S.Pi yang telah ikut berperan besar selama proses pendidikan dan penelitian sampai penulisan disertasi ini dapat berjalan dengan lancar.

Almarhum kedua orangtua bapak Drs. Sudharkam Danupoyo dan ibu Trees Naningsih Gusti yang tercinta, yang telah membesarkan dan mendidik saya dengan penuh kasih sayang yang tak terhingga, memberikan doa restu, semangat dan dukungan moril sejak kecil, keprihatinan dan kesabaran menjadikan saya dapat meraih cita-cita yang diharapkan. Ya Allah, ampunilah segala dosa ibu bapakku, terimalah segala amal ibadahnya dan tempatkanlah mereka sebagai penghuni surga-Mu, Amiin. Juga kepada bapak dan ibu mertua Hamlet Mayulu dan Eba Gonibala (almh) yang selalu mendoakan agar kami sekeluarga senantiasa rukun dan saling mencintai serta maju terus dalam menimba ilmu.

Suami tercinta Ir. Hamdi Mayulu, M.Si, dan anak saya terkasih Najwan Mahendra Pratama yang merupakan sumber motivasi, inspirasi dan kebahagiaan. Dari pengorbanan, pengertian, kesabaran dan do'a mereka yang tiada henti sehingga penelitian dan penulisan disertasi ini dapat selesai dan kepada merekalah disertasi ini saya persembahkan.

Saudara kandung Ir. Sarwo Dharmono, M.Sc (alm), Bambang Darmasto dan Rini Andajani, SE, juga bapak Zoelhard Gusti dan ibu Happy Gunawan, bapak Goen Soenaryo dan ibu Nurfien Gusti serta ibu Nuryati Gusti yang senantiasa memberi semangat dan dorongan spiritual untuk tetap maju dalam menempuh pendidikan. Bapak Drs. Rudy Mantik, Prof. Dr. dr. Max FJ. Mantik,

Sp.A(K) dan Dr. dr. Nelly Mayulu, M.Si yang telah mendukung secara moril dan spiritual serta selalu memberi motivasi untuk maju dalam keilmuan.

Saya yakin masih banyak pihak yang telah membantu dan mendukung tetapi tidak dapat disebutkan satu-persatu, saya haturkan terima kasih yang tak terhingga. Akhir kata, dari lubuk hati yang paling dalam saya menyampaikan permohonan maaf kepada semua pihak bila terdapat kesalahan dan kekurangan dalam proses penelitian dan penulisan disertasi ini. Semoga hasil penelitian dan tulisan ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan untuk mereka yang membutuhkannya.

Semarang, April 2012

Penulis

## ABSTRAK

**Latar belakang:** Perkembangan kemoterapi untuk kanker kolon sangat maju, tetapi *survival* penderitanya belum memuaskan, sehingga penanganannya juga melibatkan imunoterapi. *Phyllanthus niruri* Linn (*P.niruri* L) terbukti sebagai imunomodulator tetapi potensinya dalam melawan kanker kolon belum banyak diungkap. Tujuan penelitian untuk menganalisis pengaruh pemberian ekstrak *P. niruri* L terhadap status imunologik dan perkembangan kanker kolon.

**Metode:** Penelitian ini menggunakan *The Randomized Posttest-Only Control Group Design*. Sampel tikus *Sprague-Dawley* jantan, berat 170-220 gram, dibagi 2: kelompok tanpa induksi 1,2 DMH dan tanpa *P. niruri* L (K-: kelompok kontrol negatif) 9 ekor dan kelompok induksi 1,2 DMH 30 mg/kgBB subkutan setiap minggu sebanyak 30 ekor. Pada minggu ke-9, 11 dan 13 masing-masing empat ekor tikus dikorbankan untuk melihat perkembangan tumor. Pada minggu ke-13 keempat tikus telah berkembang menjadi kanker kolon, induksi dihentikan dan sisa 18 tikus dirandom alokasi menjadi 2 kelompok. Kelompok kontrol positif (K+) tanpa pemberian *P. niruri* L (9 tikus) dan kelompok diberi *P. niruri* L. 13.5 mg/kg BB per hari melalui sonde (9 tikus). Minggu ke-19 semua tikus diterminasi, diperiksa lesi tumor makroskopik pada kolon. Jaringan dipulas H&E, perak nitrat dan imunohistokimia. Uji hipotesis dengan *oneway Anova* dan *Post Hoc Test LSD* untuk pertumbuhan tumor kolon dan uji t tidak berpasangan untuk infiltrasi limfosit, ekspresi perforin, indeks apoptosis dan proliferasi sel AgNORs, juga dilakukan analisis diskriminan. Derajat signifikansi yang dipilih adalah  $p < 0,05$ .

**Hasil:** Rerata infiltrasi limfosit K+  $191,89 \pm 50,68$  meningkat sangat signifikan ( $p=0,000$ ) pada X ( $401,89 \pm 70,19$ ). Rerata ekspresi perforin K+  $23,00 \pm 3,00$  % meningkat sangat signifikan ( $p=0,000$ ) pada X ( $39,00 \pm 1,80$  %). Rerata indeks apoptosis K+  $1,45 \pm 0,41$  meningkat sangat signifikan ( $p=0,000$ ) pada X ( $2,37 \pm 0,48$ ). Rerata bercak AgNORs K+  $4,60 \pm 0,55$ , menurun sangat signifikan ( $p=0,000$ ) pada X ( $2,25 \pm 0,39$ ). Pertumbuhan tumor kelompok K- tidak ada, rerata K+  $83,33 \pm 14,34$ % menurun sangat signifikan ( $p=0,000$ ) pada X ( $40,44 \pm 13,23$  %). Hasil analisis diskriminan infiltrasi limfosit, ekspresi perforin dan bercak AgNORs mempunyai kontribusi signifikan sebagai pembeda dua kelompok.

**Simpulan:** Pemberian ekstrak *P. niruri* L mampu meningkatkan status imunologis melalui peningkatan infiltrasi limfosit dan ekspresi perforin, serta menghambat perkembangan kanker kolon melalui peningkatan indeks apoptosis, penekanan proliferasi sel dan pertumbuhan tumor kolon pada tikus *Sprague-Dawley*.

**Kata kunci:** *Phyllanthus niruri* Linn, kanker kolon, proliferasi, apoptosis, respons imun.

## ABSTRACT

**Background:** Despite the very advanced development of colon cancer chemotherapy, the survival of patients has not been satisfactory, therefore, the current therapy also involve immunotherapy. *Phyllanthus niruri* Linn (*P.niruri* L) may act as an immunomodulator, but its potency has not been revealed. Study was conducted to confirm the effects of *P.niruri* L extract in the treatment of colon cancer.

**Methods:** The study was Randomized Posttest-Only Control Group Design. Samples were *Sprague-Dawley* male rats, bodyweight 170-220 gr, were divided into two groups: non induced or negative control (K-) consisted of 9 normal rats, and induced by 1.2 DMH 30 mg/kg bw subcutaneously group consisted 30 rats. On the weeks 9,11 and 13, four induced rats each week were sacrificed to detect the development of colon cancer. On the weeks of 13<sup>th</sup> all of 4 rats were developed colon cancer, so the induction were stopped. The rest of 18 induced rats were randomly into two groups: without *P. niruri* L or positive control (K+) = 9 rats and given *P. niruri* L extract 13.5 mg/kg orally or X group = 9 rats. After 19<sup>th</sup> week all of rats were then terminated and tumor lesion of colon were examined macroscopically. The tumor tissues were stained by H&E, nitric silver and immunohistochemistry. Oneway Anova and Post Hoc LSD test for the growth of colon tumor and non pairs t-test for infiltration of lymphocytes, perforin expression, apoptotic index and AgNORs cell proliferation and also discriminant analysis were used. Considered significant if p was <0.05.

**Results:** The mean of lymphocytes infiltration on K+ was  $191.89 \pm 50.68$ , while on X was  $401.89 \pm 70.19$  ( $p=0.000$ ). The mean of perforin expression of K+ was  $23.00 \pm 3.00\%$  and on X  $39.00 \pm 1.80\%$  ( $p=0.000$ ). The mean of apoptotic index of K+ was  $1.45 \pm 0.41$  and on X was  $2.37 \pm 0.48$  ( $p=0.000$ ). The mean of AgNORs on K+ was  $4.60 \pm 0.55$ , while on X was  $2.25 \pm 0.39$  ( $p=0.000$ ). There was no tumor growth on K- group, while mean on K+ was  $83.33 \pm 14.34\%$ , and on X was  $40.44 \pm 13.23\%$  ( $p=0.000$ ). The discriminant analysis showed that lymphocytes infiltration, perforin expression and cell proliferation of AgNORs had major contributions as a discriminator of the both groups.

**Conclusion:** The administration of *P.niruri* L extract increases the immunologic status through increasing lymphocytes infiltration and perforin expression and also inhibits the colon cancer development by increasing the apoptotic index, suppress the AgNORs cell proliferation and colon tumor growth in *Sprague-Dawley* rats.

**Key words:** *Phyllanthus niruri* Linn, colon cancer, proliferation, apoptosis, immune response.

## RINGKASAN

### A. Pendahuluan

Kanker kolon merupakan kanker ketiga terbanyak di seluruh dunia, diperkirakan terjadi satu juta kasus baru setiap tahun dan 50% penderita meninggal karenanya. Di Amerika Serikat, kanker kolon merupakan penyebab kedua kematian karena kanker setelah kanker paru pada pria sedangkan pada wanita menempati peringkat ketiga setelah kanker serviks dan payudara. Di negara-negara Eropa khususnya Inggris, kanker kolon juga merupakan penyebab utama morbiditas kanker. Di negara berkembang seperti Afrika dan Asia, insidensinya lebih rendah dibanding dengan di negara-negara maju. Di Indonesia, belum jelas berapa insidens kanker kolon karena angka secara nasional belum diketahui dengan pasti.

Perkembangan kemoterapi untuk kanker kolon sangat maju, tetapi *survival* penderitanya belum memuaskan terutama bila ditemukan dalam stadium lanjut. Angka *survival* 5 tahun di USA hanya sekitar 57%, sementara di negara-negara Eropa < 60%. Di Indonesia angka harapan hidup kasar untuk *grade* III-IV sebesar 21,7%, untuk *grade* I-II adalah 58,9%. Stadium penyakit merupakan faktor prognostik paling utama untuk menentukan penanganan serta meramalkan hasil akhir. Faktor-faktor lain adalah derajat keganasan histopatologik, komplikasi pasca pembedahan, transfusi darah, marker biomolekuler terutama proliferasi sel, apoptosis dan angiogenesis serta terapi adjuvan. Oleh karenanya, penanganan multimodalitas saat ini juga melibatkan terapi gen dan imunoterapi yang bertujuan untuk meningkatkan kualitas hidup penderita.

Berbagai senyawa yang dapat berfungsi sebagai imunomodulator untuk imunoterapi banyak terkandung dalam tanaman obat dan memiliki berbagai efek farmakologis yang akan bekerja serentak untuk melawan sel-sel kanker. Salah satu yang banyak digunakan adalah *Phyllanthus niruri* Linn (*P. niruri* L). Potensi *P. niruri* L dalam menghambat pertumbuhan kanker belum banyak diungkap. Ekstrak *P. niruri* L yang diberikan pada kultur sel karsinoma *mamma* bersama sel

mononuklear mencit C3H terbukti dapat menurunkan viabilitas sel kanker tersebut. Ekstrak *P. niruri L* juga dapat menghambat pertumbuhan HCT116 dan HT29 *human colon cancer cell line*.

## **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan uraian di atas, maka ditetapkan rumusan masalah sebagai berikut: Apakah pemberian ekstrak *P. niruri L* dapat mempengaruhi status imunologis dan perkembangan kanker kolon pada tikus *Sprague-Dawley* yang diinduksi 1,2 *Dimethylhydrazine* (DMH) ?

## **C. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh pemberian ekstrak *P. niruri L* terhadap infiltrasi limfosit, ekspresi perforin, indeks apoptosis, proliferasi sel kanker dan pertumbuhan tumor kolon pada tikus *Sprague-Dawley* yang diinduksi 1,2 DMH.

## **D. Manfaat Penelitian**

Manfaat hasil penelitian terhadap ilmu pengetahuan adalah sumbangan temuan tentang pengaruh *P. niruri L* dalam menghambat perkembangan kanker kolon. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah khasanah ilmu pengetahuan di bidang onkologi, patologi anatomi, imunologi serta ilmu tentang pemanfaatan tanaman obat terutama *P. niruri L*. Manfaat terhadap pelayanan kesehatan adalah memberikan bahan masukan dan wawasan bagi institusi pelayanan kesehatan masyarakat tentang potensi *P. niruri L* secara ilmiah sebagai dasar pengembangan kemoimunoterapi adjuvan terhadap kanker kolon. Bagi masyarakat pengguna, hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi ilmiah tentang manfaat *P. niruri L* dalam mengobati penyakit keganasan kolon sebagai obat komplementer kemoterapi. Manfaat untuk riset adalah hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi landasan bagi penelitian pemanfaatan *P. niruri L* untuk pengobatan kanker kolon tahap selanjutnya.

## E. Tinjauan Pustaka

Pengenalan kemampuan sistem imun untuk mempertahankan tubuh melawan penyakit sebagai pendekatan baru dalam terapi kanker dikenal dengan imunoterapi yang bertujuan untuk memodulasi/menyokong sistem imun agar lebih mampu memusnahkan sel kanker. Peran *P. niruri L* dalam memodulasi sistem imun telah terbukti baik pada hewan coba maupun pada manusia. Uji imunologis pada mencit membuktikan bahwa ekstrak *P. niruri L* bekerja sebagai imunostimulator. Tidak ditemukan laporan adanya gejala toksisitas atau efek samping *P. niruri L* baik pada studi dengan hewan coba maupun pada manusia untuk pemakaian jangka pendek dan panjang.

Fungsi sistem imun dalam kaitannya dengan imunitas terhadap tumor adalah fungsi protektif dengan cara mengenal dan menghancurkan sel-sel abnormal sebelum berkembang menjadi tumor atau dibunuhnya jika tumor sudah tumbuh. Peran sistem imun itu disebut *immune surveillance* yang secara teoritik memastikan terjadinya apoptosis pada sel kanker. Sel-sel imunokompeten yang sangat berperan dalam imunitas terhadap tumor adalah *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL), sel *Natural Killer* (NK), makrofag dan limfosit B. Sel NK dan CTL mengekspresikan aktivitas antitumornya melalui sekresi perforin dan granzym yang memecah molekul sitoplasmik pengontrol apoptosis dan produksi sitokin. Adanya infiltrasi limfosit intraepitelial yang sangat banyak berhubungan nyata dengan perbaikan prognosis penderita kanker kolorektal.

Memahami perilaku kanker sangat penting dalam penentuan terapi maupun peramalan prognosis. Oleh karenanya, diperlukan pemahaman proses terjadinya kanker, kelainan siklus sel dan pengukuran marker biomolekuler seperti aktivitas proliferasi sel dan apoptosis yang terkait dengan respons terapi dan *survival* penderita. Perubahan pada keseimbangan antara proliferasi dan apoptosis menjadi dasar perkembangan neoplastik.

Pengukuran aktivitas proliferasi sel didasarkan pada kelainan dalam siklus sel, salah satunya dapat dilakukan dengan metode reaksi Ag dengan NORs. Protein AgNORs (*argyrophilic nucleolar organizer regions*) adalah protein yang



terakumulasi pada sel yang hiperproliferasi, sebaliknya pada sel yang tidak berproliferasi ekspresinya sangat sedikit. Pemeriksaan AgNORs merupakan cara yang dianggap tepat untuk menggambarkan aktivitas transkripsi DNA ribosomal yang berkaitan erat dengan siklus sel dan proliferasi sel ganas.

Apoptosis berperan penting dalam regulasi sistem imun dan eliminasi sel yang mengalami kerusakan DNA yang tidak dapat diperbaiki. Adanya disregulasi apoptosis mengakibatkan sel bertahan dengan kerusakan DNA yang pada gilirannya meningkatkan risiko terjadi mutasi. Deteksi badan apoptotik yang diekspresikan oleh sel kanker antara lain dapat dilakukan dengan metode *Terminal Deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling* (TUNEL) pada potongan jaringan histologik kanker kolon.

## **F. Metode Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan rancangan *The Randomized Posttest-Only Control Group Design*. Sampel dipilih secara random dari populasi terjangkau berupa tikus galur *Sprague-Dawley* jantan berumur 6-7 minggu yang dikembangkan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Unit IV (Pre Klinik) UGM sesuai kriteria inklusi yaitu berat badan 170-220 gram dan sehat. Kriteria eksklusi adalah tikus coba mengalami perdarahan sebelum perlakuan.

Sampel dibagi 2 kelompok: kontrol negatif (K-) = 9 ekor tikus tidak diinduksi atau diberi ekstrak *P. niruri L*, kelompok induksi 1,2 DMH 30mg/Kg BB subkutan pada hari pertama tiap minggu, sebanyak 30 tikus. Pada minggu ke-9,11 dan 13 tikus yang diinduksi dikorbankan masing-masing empat tikus per minggu untuk deteksi pertumbuhan kanker kolon. Pada minggu ke-13 keempat tikus sudah tumbuh kanker kolon, selanjutnya induksi dihentikan dan sisa 18 tikus dirandom alokasi menjadi 2 kelompok yaitu kontrol positif (K+) = 9 ekor tikus tanpa pemberian *P. niruri L* dan dan kelompok X = 9 ekor tikus yang diinduksi kemudian diberi ekstrak *P. niruri L* 13,5 mg/kg BB perhari per oral selama 30 hari. Minggu ke-19 seluruh tikus coba diterminasi, kolon dieksisi dan diperiksa

lesi tumor makroskopik. Pertumbuhan tumor ditandai dengan terjadinya penebalan dan atau pengerasan dinding kolon yang cenderung berbentuk anuler dan infiltratif ke seluruh dinding kolon sehingga sulit menilai ukuran tumor secara individu. Oleh karenanya, ukuran pertumbuhan tumor berdasarkan pada persentase panjang usus yang tumbuh tumor yang dibuktikan secara patologi anatomi. Jaringan histopatologik diproses dalam blok parafin, dipotong setebal 4 mikron dan diberi pulasan H&E untuk pemeriksaan infiltrasi limfosit, MoAb anti perforin untuk menghitung ekspresi perforin, identifikasi sel apoptotik sesuai metode TUNEL dan perak nitrat AgNORs untuk pemeriksaan proliferasi sel.

Analisis univariat dilakukan pada seluruh variabel terikat yang diukur, untuk menghitung nilai rerata (*mean*) dan simpangan baku (*standar deviation*), hasil analisis disajikan dalam diagram *Boxplot*. Selanjutnya dilakukan analisis bivariat untuk menguji hipotesis, yang didahului uji normalitas data dan homogenitas. Uji *Saphiro Wilk* menunjukkan distribusi data normal dan seluruhnya homogen, sehingga pembuktian hipotesis minor dianalisis dengan uji *oneway Anova (Analysis of Variance)* yang dilanjutkan dengan *Post Hoc Test LSD (Least Square Difference)* untuk variabel pertumbuhan tumor kolon dan uji t tidak berpasangan untuk variabel infiltrasi limfosit, ekspresi perforin, indeks apoptosis dan proliferasi sel AgNORs. Analisis multivariat dilakukan untuk mengetahui variabel mana yang memiliki kontribusi terbesar terhadap fungsi pembeda antara dua kelompok perlakuan, menggunakan *discriminant function analysis*. Pengambilan keputusan dilakukan pada derajat signifikansi  $p < 0,05$  dan interval kepercayaan 95%.

Penelitian telah dilaksanakan di LPPT UGM, Laboratorium Patologi Anatomi FK UGM / RSUP dr. Sardjito Yogyakarta dan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UNDIP / RSUP dr. Kariadi Semarang.

## **G. Hasil Penelitian**

Selama periode penelitian, seluruh hewan coba dapat mengikuti penelitian (tidak ada tikus yang mati). Empat ekor tikus dikorbankan pada minggu kesembilan pasca induksi dengan 1,2 DMH, secara makroskopik belum terlihat

adanya benjolan tetapi mulai teraba penebalan pada kolon, secara mikroskopik terlihat gambaran displasia pada semua sampel. Empat ekor tikus dikorbankan pada minggu ke-11, secara makroskopik teraba penebalan dinding kolon yang keras dan semakin nyata. Secara mikroskopik terlihat gambaran displasia sampai adenokarsinoma pada semua sampel. Empat sampel yang dikorbankan pada minggu ke-13 menunjukkan penebalan yang semakin keras, cenderung berbentuk anuler dan infiltratif ke seluruh dinding kolon. Gambaran mikroskopik memperlihatkan adenokarsinoma kolon.

Rerata jumlah infiltrasi limfosit kelompok tikus yang diberi ekstrak *P. niruri L* (X) adalah  $401,89 \pm 70,19$  lebih tinggi dibanding kelompok tanpa pemberian ekstrak tersebut (K+) yaitu  $191,89 \pm 50,68$ . Analisis bivariat menunjukkan bahwa perbedaan antara kelompok K+ dan X sangat signifikan ( $p=0,000$ ).

Persentase rerata ekspresi perforin kelompok X sebesar  $39,00 \pm 1,80$  %, lebih tinggi bila dibandingkan dengan K+ ( $23,00 \pm 3,00$  %). Uji hipotesis membuktikan bahwa terdapat perbedaan yang sangat signifikan antara K+ dan X ( $p=0,000$ ).

Rerata indeks apoptosis kelompok K+ adalah  $1,45 \pm 0,41$  lebih rendah dibanding X dengan rerata  $2,37 \pm 0,48$ . Terdapat perbedaan yang sangat signifikan pada jumlah inti sel yang mengekspresikan TUNEL positif antara kelompok K+ dan X ( $p = 0,000$ ).

Rerata bercak AgNORs per inti sel kelompok K+ adalah  $4,60 \pm 0,55$ , sedangkan X jauh menurun ( $2,25 \pm 0,39$ ). Uji hipotesis membuktikan bahwa *P. niruri L* memberikan efek penekanan ekspresi bercak AgNORs yang sangat signifikan ( $p=0,000$ ).

Kelompok kontrol negatif (K-) tidak terlihat pertumbuhan tumor. Persentase rerata pertumbuhan tumor pada kelompok X  $40,44 \pm 13,23$  % lebih sedikit dibanding kelompok K+ ( $83,33 \pm 14,34$  %). Hasil uji hipotesis menunjukkan bahwa antara kelompok K-, K+ dan X didapatkan perbedaan yang sangat signifikan ( $p=0,000$ ).

Kontribusi variabel terikat terhadap fungsi pembeda pada dua kelompok dianalisis dengan menggunakan *discriminant function analysis* untuk mengetahui apakah tiap variabel yang berbeda tersebut dominan terhadap perbedaan kelompok. Analisis dilakukan dengan metode *stepwise*, hasilnya infiltrasi limfosit, ekspresi perforin dan proliferasi sel AgNORs yang masih mempunyai kontribusi pembeda pada dua kelompok. Fungsi klasifikasi dari tiga variabel terikat tersebut dianalisis dengan menggunakan *Fisher's linear discriminant function*. Hasilnya menunjukkan bahwa peningkatan ekspresi perforin, infiltrasi limfosit dan penekanan proliferasi sel sama-sama mempunyai kontribusi dan interaksi pada kedua kelompok. Kekuatan terbesar ditunjukkan oleh ekspresi perforin, diikuti oleh infiltrasi limfosit dan proliferasi sel AgNORs, sedangkan pertumbuhan tumor dan indeks apoptosis mempunyai interaksi yang kecil dengan kelompok.

## **H. Pembahasan**

Hasil penelitian kami mendukung teori sebelumnya, bahwa infiltrasi limfosit dapat digunakan sebagai prediktor respons terapi. Pemberian ekstrak *P. niruri L* terbukti mampu meningkatkan infiltrasi limfosit pada tikus coba lebih tinggi secara sangat signifikan dibanding tanpa pemberian ekstrak tersebut. *P. niruri L* juga memiliki efek meningkatkan ekspresi perforin yang disekresikan oleh CTL dan sel NK. Perforin ini sangat dibutuhkan oleh sel-sel dalam kaitan dengan respons imun antitumor. Hal ini mengindikasikan bahwa *P. niruri L* bekerja sebagai imunomodulator dengan memodulasi respons imun antitumor dan pada gilirannya dapat menghambat perkembangan kanker kolon sehingga diharapkan respons terapi pada hewan coba akan lebih baik.

Limfosit pembunuh CTL dan sel NK menggunakan mekanisme dasar yang sama untuk menghancurkan sel target, meskipun mereka dipicu oleh reseptor yang berbeda. Sitotoksitas sel tersebut juga mengatur dan mengakhiri respons imun. Mekanisme penghancuran sel target oleh sel NK dan CTL adalah dengan dua cara. Cara pertama, sel-sel efektor mengekspresikan ligan seperti Fas/ CD95 pada permukaan selnya untuk membunuh sel target atau memusnahkan sel yang

mengalami transformasi yang mengekspresikan reseptor yang sesuai. Fas-ligan (FasL) penting dalam proses pembunuhan tumor yang dimediasi CTL, sementara TRAIL (*Tumour Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand*) atau Apo2-ligan penting bagi eliminasi tumor yang dimediasi sel NK. Cara kedua melibatkan lalulintas granzym yang dimediasi perforin dengan cara melepaskan isi granula sitotoksik (sitotoksitas eksositosis) yang bersifat merusak ke dalam sel target, kemudian mempromosi kematian sel secara apoptosis dengan cara memecahkan / hidrolisis substrat protein spesifik termasuk caspase.

Proliferasi sel dan regulasi siklus sel berkaitan erat dengan apoptosis, keseimbangan antara produksi sel melalui proliferasi dan hilangnya sel melalui apoptosis menentukan seberapa cepat tumor bertumbuh dan menjadi penentu penting perilaku tumor. Perkembangan tumor pada kolon berhubungan dengan disregulasi pertumbuhan sel dan penghambatan apoptosis yang bertahap. Fenomena ini menunjukkan bahwa apoptosis merupakan respons adaptif terhadap kerusakan yang dipicu karsinogen 1,2 DMH dan apabila sel kehilangan kemampuan apoptotiknya maka keganasan akan berkembang secara cepat. Penggunaan ekstrak *P. niruri L* dalam penelitian ini membuktikan bahwa herbal tersebut mampu mengatasi gangguan pada mekanisme apoptosis saat progresi tumor mengindikasikan bahwa indeks apoptosis dapat digunakan sebagai indikator respons terapi terhadap kanker kolon.

Penggunaan ekstrak *P. niruri L* terbukti mampu menekan proliferasi sel yang dicerminkan dengan ekspresi AgNORs yang secara nyata lebih sedikit dibanding tanpa pemberian ekstrak tersebut. Bercak AgNORs menggambarkan peningkatan aktivitas transkripsi rDNA dan maturasi RNA ribosom (rRNA) sehingga dapat digunakan sebagai indikator peningkatan aktivitas proliferasi sel KKR pada fase S.

Sel kanker memiliki potensi replikatif yang tidak terbatas. Replikasi DNA berlangsung pada fase S siklus sel. Dasar proses replikasi adalah duplikasi materi genetik dengan bantuan dari mesin replikasi yaitu *DNA polymerases*, *DNA ligases* dan *DNA topoisomerases*. Ekstrak *P.niruri L* diduga memiliki aktivitas anti-proliferaatif dengan mempengaruhi pembentukan enzim yang berperan dalam

proses replikasi dan transkripsi. Hal ini mengakibatkan terhambatnya aktivitas transkripsi pada fase S yang mengarah pada perbaikan siklus sel dan pada akhirnya proliferasi yang berlebihan dapat dikendalikan. Aktivitas antikarsinogenik *P. niruri L* ditunjukkan melalui penghambatan aktivitas *aniline hydroxylase*, suatu enzim P-450. Ekstrak juga menghambat DNA *topoisomerase II* dan *cdc 25 tirosin fosfatase*, enzim yang mengatur siklus sel, menghambat DNA *polymerase* sehingga menurunkan aktivitas transkripsi dan translasi mRNA. Pada akhirnya terjadi peningkatan *survival* dan berkurangnya tumor solid. Jadi aktivitas antikanker *P. niruri L* berhubungan dengan penghambatan aktivasi metabolik karsinogen dan penghambatan regulator siklus sel serta DNA *repair*.

Berkurangnya pertumbuhan tumor kolon pada kelompok hewan coba yang diberi ekstrak *P. niruri L* dalam penelitian ini merupakan akibat yang muncul karena adanya aktivitas yang diduga diinisiasi oleh komponen bioaktif yang terkandung dalam ekstrak, misalnya lignan yang bersifat sebagai anti neoplastik karena dapat menghambat aktivitas telomerase dan aktivasi *c-myc* sehingga proliferasi sel kanker dapat ditekan dan flavonoid yang bekerja sebagai imunostimulator dan antineoplastik. Ekstrak *P. niruri L* juga dapat menghambat perkembangan tumor solid dan menginduksi apoptosis secara signifikan pada mencit yang diinduksi dengan sel *Dalton's lymphoma ascites (DLA)*.

Hasil analisis diskriminan menunjukkan bahwa kontribusi variabel terbesar yang mempunyai interaksi pada kedua kelompok adalah ekspresi perforin yang diikuti infiltrasi limfosit dan proliferasi sel AgNORs. Secara statistik variabel yang dikeluarkan dari analisis, yaitu pertumbuhan tumor dan indeks apoptosis mempunyai interaksi yang kecil terhadap kelompok meskipun pada analisis bivariat didapatkan perbedaan yang sangat signifikan pada kedua kelompok. Hal ini menunjukkan bahwa peran *P. niruri L* terhadap pengendalian perkembangan kanker kolon utamanya melalui ekspresi perforin yang diikuti infiltrasi limfosit dan proliferasi sel AgNORs

## **I. Simpulan dan Saran**

Pemberian ekstrak *P. niruri L* mampu meningkatkan status imunologis melalui peningkatan infiltrasi limfosit dan ekspresi perforin, serta menghambat perkembangan kanker kolon melalui peningkatan indeks apoptosis, penekanan proliferasi sel dan pertumbuhan tumor kolon pada tikus *Sprague-Dawley*.

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui lebih jauh aktivitas antikanker *P. niruri L* dengan mengevaluasi indikator apoptosis (aktivitas Fas dan reseptor Fas, ekspresi granzym, ekspresi sitokrom c, aktivitas p53 dan bcl-2, aktivitas caspase inisiator dan eksekutor), indikator respons imun antitumor yang lain (aktivitas *killing* makrofag dan ekspresi sitokin terkait), indikator antioksidan, indikator angiogenesis (ekspresi COX-2 dan VEGF) dan uji klinis manfaat *P. niruri L* sebagai suplemen pada kemoterapi kanker kolon.

## EXECUTIVE SUMMARY

### A. Background

Colon cancer is the third rank of cancer worldwide, estimated one million of new cases occur each year and 50% of patients die because of it. In the United States, the colon cancer is the second leading cause of cancer death after lung cancer in men and in women, ranked third after cervical and breast cancer. In European countries, especially Britain, the colon cancer is also the leading cause of cancer morbidity. In developing countries such as Africa and Asia, the incidence is lower than in developed countries. In Indonesia, the incidence of the colon cancer is not known due to lack of cancer registry, but according several report the incidence tend to increase.

The development of chemotherapy for colon cancer is very advanced, but the survival of patients has not been satisfactory, especially when found in an advanced stage. Five-year survival rate in the USA was only about 57%, while in European countries was <60%. In Indonesia, the 5 years survival rate for *grade* I-II and *grade* III-IV was 21.7% and 58.9% respectively. Stage of disease is the most important factor for determining treatment and predicting outcomes (prognosis). Other prognostic factors are the degree of malignancy, post-surgical complications, blood transfusion, biomolecular markers especially of cell proliferation, apoptosis and angiogenesis and adjuvant therapy. Therefore, the current multimodality handling also involve gene therapy and immunotherapy that aims to improve patient quality of life.

Compounds that can serve as an immunomodulator contain in many medicinal plants and have various pharmacological effects that will work to fight the cancer cells. One of the widely used is *P. niruri* L. Potential role of this herb in inhibiting cancer growth has not been revealed. Administration the extract of *P. niruri* L in breast cancer cell cultures of mice C3H proved to reduce the viability of cancer cells. The extract of *P. niruri* L can also inhibit the growth of HCT116 and HT29 human colon cancer cell line.



## **B. Problem Statement**

Based on the above, description the formulation of the problem defined as follows: Did the administration of *P. niruri* L extract affect the immunologic status and development of colon cancer in 1.2 DMH-induced *Sprague-Dawley* rats?

## **C. Research Objectives**

This study was conducted to analyze the effects of *P. niruri* L extract on the infiltration of lymphocytes, expression of perforin, apoptotic index, cancer cell proliferation and tumor growth of colon in 1.2 DMH-induced *Sprague-Dawley* rats.

## **D. Benefits of Research**

The benefit of this research results from the science perspective is a scientific explanation about the effects of *P. niruri* L against the development of colon cancer. The results of this study is expected to add the repertoire of knowledge in the field of oncology, pathology anatomy, immunology and the scientific foundation of the use of medicinal plants, especially *P. niruri* L. The benefit to health services is to provide input and insight for public health care institutions about the potency of *P. niruri* L scientifically as the basis for the development of adjuvant chemoimmunotherapy against colon cancer. For the community of user, the results of this study is expected to be scientific information about the benefit of *P. niruri* L in treatment of colon malignant as an herbal complementary medicine to chemotherapy. The result of this research is expected to be reference for the next research to treatment of colon cancer.

## **E. Review of References**

The ability of the immune system to protect the body from disease is a new approach in cancer therapy known as immunotherapy is aimed to modulate /

support the immune system so that it is better able to combat cancer cells. In addition locoregionally therapy, also simultaneously generate a systemic immune system. Efficacy *P. niruri* L in modulating the immune system has been proved in both animals experimental and in humans. Immunological tests in mice show that extract of *P. niruri* L act as immunostimulator. There was no reports regarding symptoms of toxicity or side effects of *P. niruri* L in both animals and in humans experimental, for short and long-term use.

The function of immune system in relation to immunity against the tumor is called the protective function of immune surveillance through recognizing and then eliminating the abnormal cells before tumor was formed or combat the tumor cells. This concept should theoretically ensures apoptosis of cancer cells. Immunocompetence cells that plays an important role in immunity against tumors are Cytotoxic T lymphocyte (CTL), Natural Killer cells (NK), macrophages and B lymphocytes. NK cells and CTL express their anti-tumor activity through secretion of perforin and cytoplasm molecules that break down granzym controlling apoptosis and cytokine production. Intraepithelial lymphocyte infiltration is strongly associated with improved prognosis of colorectal cancer patients.

Understanding the behavior of cancer is very important in determining therapy and it's prognosis prediction. Therefore, better understanding of cancer processes, cell cycle abnormalities and measurement of biomoleccular markers such as cell proliferation and apoptotic activity associated with therapeutic response and patient survival are needed. Inbalance between proliferation and apoptosis become the basis of neoplasm progression.

Measurement of cell proliferation activity was based on abnormalities in the cell cycle, one of them can be done by the method of reaction of Ag with NORs. Protein AgNORs (argyrophilic nucleolar organizer regions) is a protein that accumulates in the cell during hyper-proliferation, in contrast to cells that do not proliferate, they are very little expression. AgNORs examination, is deemed appropriate methode to describe the activity of ribosomal DNA transcription, are strongly associated with cell cycle and proliferation of malignant cells.

Apoptosis plays an important role in the regulation of the immune system and elimination of cells undergoing DNA damage is irreparable. Dysregulating of apoptosis resulted in cells with DNA damage survive, which in turn increases the risk of mutation. Detection of apoptotic bodies that are expressed by cancer cells, among others, can be done by the method of Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) in colon cancer histological tissue sections.

## **F. Methods**

The design of study was Randomized Posttest-Only Control Group Design. Samples were *Sprague-Dawley* male rats aged 6-7 weeks, from LPPT UGM, bodyweight 170-220 gr and healthy, were divided into two groups: non induced or negative control (K-) consisted of 9 normal rats, and induced by 1.2 DMH 30 mg/kg bw subcutaneously group consisted 30 rats. On the weeks 9,11 and 13, four induced rats each week were sacrificed to detect the development of colon cancer. On the weeks of 13<sup>th</sup> all of 4 rats were developed colon cancer, so the induction were stopped. The rest of 18 induced rats were randomly into two groups: without *P. niruri* L or positive control (K+) = 9 rats and given *P. niruri* L extract 13.5 mg/kg bw orally for 30 days or X group = 9 rats. After 19<sup>th</sup> week all of rats were then terminated and tumor lesion of colon were examined macroscopically. Furthermore, tumor tissues were processed histopathologically, stained H&E to check infiltration of lymphocytes, anti-perforin MoAb, TUNEL method for apoptotic cells and AgNORs stained.

Univariate analysis were performed on all of dependent variables to calculate the average (mean) and standard deviation, the results were presented in Boxplot graphics. Bivariate analysis were performed to test the hypothesis, which preceded the test of normality and homogeneity of data. Saphiro Wilk test showed a normal data distribution and entirely homogeneous, thus the minor hypothesis were analyzed by Oneway ANOVA test and Post Hoc LSD for colon tumor growth and unpaired t test for lymphocytes infiltration, expression of perforin,

apoptotic index and AgNORs cell proliferation,. Multivariate discriminant function analysis was used to explain the role and contribution of dependent variables on discriminator function between two groups. Significance level was preferred if  $p < 0.05$  with 95% confidence interval.

## G. Results

During the period of study, all of animals no rate died. Four rats that were sacrificed at the ninth week post-induction with 1.2 DMH, there were no mass macroscopically, but palpable thickening in the wall of colon. Dysplasia seen microscopically in all samples. Four rats that were sacrificed at week 11 showed much more thickening of the colonic wall and some irregular mass were seen that grew along the wall of colon. Dysplasia to adenocarcinoma seen microscopically in all samples. Four rats that were sacrificed at week 13 showed advance colonic adenocarcinoma in all samples microscopically.

The mean of lymphocyte infiltration of the group X was  $401.89 \pm 70.19$ , it was higher compared to K+ ( $191.89 \pm 50.68$ ). The difference between the groups K+ and X were very significant ( $p = 0.000$ ). The mean percentage of perforin expression of group X was  $39.00 \pm 1.80\%$ , it was higher compared to K+  $23.00 \pm 3.00\%$  ( $p=0.000$ ). The mean of apoptotic index K+ was  $1.45 \pm 0.4$ , it was lower than the X group with mean apoptotic index  $2.37 \pm 0.48$  ( $p=0.000$ ). The mean of AgNORs per cell nucleus group K+ was  $4.60 \pm 0.55$ , while the X was much decreased  $2.25 \pm 0.39$  ( $p=0.000$ ). There was no tumor growth on K- group, while on X was  $40.44 \pm 13.23\%$  and on K+ was  $83.33 \pm 14.34\%$ . Hypothesis test results indicate that between K-, K+ and X were very significant different ( $p = 0.000$ ).

The result of discriminant function analysis showed that infiltration of lymphocytes, perforin expression and AgNORs cell proliferation were still included in the analysis and have a distinctive contribution to the two groups. Classification function of three dependent variables were analyzed using Fisher's linear discriminant function. The results showed that increased expression of perforin, infiltration of lymphocytes and decreased of cell proliferation both

have the contributions and interactions in both groups. The greatest strength is shown by the expression of perforin, followed by infiltration of lymphocytes and cells proliferation of AgNORs, whereas tumor growth and apoptosis index has little interaction with the groups statistically.

## **H. Discussion**

Our results support the previous theory, that the infiltration of lymphocytes can be used as predictors of therapeutic response. *P. niruri* L extract proved to increase the infiltration of lymphocytes in colon cancer rats model significantly higher compared to without extract. *P. niruri* L also increased the expression of perforin that secreted by CTL and NK cells. Perforin is highly needed by the cells in terms of anti-tumor immune responses. This indicates that the *P. niruri* L act as an immunomodulator through modulate the anti-tumor immune response, eventually inhibit the development of colon cancer.

Killer lymphocytes, CTL and NK cells use the same basic mechanism to destroy the target cells, although they are triggered by different receptors. Cell cytotoxicity was also regulated and terminated the immune response. Two mechanisms of destruction of target cells by NK cells and CTL is by two way: First, effector cells expressing deaths ligand such as Fas / CD95 on the cell surface to kill or destroy the target cells. They are transformed cells that express the appropriate receptors. Fas-ligand (FasL), that are important in the process of CTL-mediated killing of tumors, while TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) or Apo2-ligand are important for NK cell-mediated tumor elimination. The second pathway involves the perforin-mediated granzym traffic by releasing cytotoxic granule contents (exocytosis cytotoxicity) that are destructive to the target cells and promote cell death by apoptosis in a way to solve / hydrolysis of specific proteins, including caspase substrates.

Cell proliferation and cell cycle regulation is also closely related to apoptosis, the balance between cell production through proliferation and cell loss through apoptosis determines how fast the tumor grows and becomes an important

determinant of tumor behavior. Development of colon cancer is associated with dysregulation of cell growth and inhibition of apoptosis gradually. This phenomenon indicates that apoptosis is a adaptive response to damage induced carcinogen 1.2 DMH and when the cells lose their apoptotic ability, the malignancy will develop rapidly. The use of *P. niruri* L extracts in this study has shown that the herb is able to overcome the interference to the mechanism of apoptosis during tumor progression, indicates that the apoptotic index could be used as an indicator of colon cancer therapeutic response.

*Phyllanthus niruri* Linn extract was proven to be able to suppress cell proliferation, reflected by the expression of AgNORs. Spotting AgNORs reflects increased activity of rDNA transcription and maturation of ribosomal RNA (rRNA) that can be used as an indicator of increased activity on colon cancer cell proliferation in S phase. Cancer cells have an unlimited replicative potential. DNA replication in S phase of cell cycle. Basic process of replication is a duplication of genetic material with the help of the replication machinery, such as DNA polymerases, DNA ligases and DNA topoisomerases. *P. niruri* L extract is assumed to have anti-proliferating activity by affecting the formation of enzymes that play an important role in the process of replication transcription that resulted in inhibition of rDNA transcription activity in S phase. Furthermore, the cell cycle improvement and ultimately excessive proliferation can also be inhibited. Extract of *P. niruri* L was found to inhibit aniline hydroxylase, a P-450 enzymes. The extract also inhibits DNA topoisomerase II and cdc-25 tyrosine phosphatase, an enzyme that regulates the cell cycle, inhibits DNA polymerase, thus decreasing the activity of transcription and translation of mRNA. So that eventually an increase in survival and reduction of tumors lesion. Thus, anticancer activity of *P. niruri* L associated with the inhibition of carcinogen metabolic activation and inhibition of cell cycle regulators and DNA repair.

Growth reduction of colon cancer in experimental animals fed with extract of *P. niruri* L in this study, was the result of bioactive components in the extract, such as lignan that has anti-neoplasm. It can inhibit telomerase activity and activate of *c-myc* that ultimately inhibited cancer cell proliferation. Flavonoids in

the *P. niruri* L also act as immunostimulator. Extract of *P. niruri* L inhibited development of solid tumor and induced apoptosis significantly in Dalton's lymphoma ascites (DLA) cell-induce mice.

The result of discriminant analysis showed that the greatest contribution of variables that have interaction in both groups were perforin expression followed by lymphocytes infiltration and AgNORs cell proliferation. Variables excluded from the analysis statistically were the tumor growth and apoptosis index, although in the bivariate analysis found a highly significant difference in both groups. These result indicate that modifying effect of *P. niruri* L to the development of colon cancer are mainly through perforin expression, lymphocytes infiltration and AgNORs cell proliferation

## **I. Conclusion and Suggestions**

The administration of *P. niruri* L extract increases the immunologic status through increasing lymphocytes infiltration and perforin expression and inhibits the colon cancer development by increasing the apoptotic index, suppress the AgNORs cell proliferation and colon tumor growth in *Sprague-Dawley* rats.

It is necessary for further research to explore more anticancer activity of *P. niruri* L by evaluating some indicators of apoptosis (Fas and Fas receptor activity, granzym expression, the expression of cytochrome c, the activity of p53 and bcl-2, activity of initiator and executor caspases), indicator of other antitumor immune responses (macrophage killing activity and cytokine expression), indicator of antioxidant and some indicator of angiogenesis (the expression of COX-2 and VEGF) and of course clinical benefit of *P. niruri* L as a supplement to chemotherapy of colon cancer.