

Mekanisme Peningkatan *Heat Shock Protein-70* pada Kanker Payudara Tikus yang Diradiasi, Pascapemberian Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*)

(MECHANISM OF INCREASING OF HSP-70
ON IRRADIATED RAT BREAST CANCER,
DUE TO APPLICATION OF EXTRACT OF PHYLLANTHUS NIRURI)

Bambang Soeprijanto¹, Juliati Hood Assegaf²

¹Departemen Radiologi, ²Departemen Patologi Anatomi
Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga-Rumah Sakit Dr Sutomo, Surabaya.
Telepon (031)5939887/0811312134,
Email : bambangsoeprijanto@yahoo.com

ABSTRAK

Pemanfaatan radiasi dalam pengobatan kanker, ternyata juga memberi efek samping, berupa kerusakan pada jaringan normal. Ekstrak tanaman meniran (*Phyllanthus (P.) niruri L.*) telah diketahui dapat memodulasi sistem imun. *Heat shock protein-70* (HSP70) adalah protein yang mempunyai peran melindungi protein lainnya dari kerusakan. Faktor transkripsi, seperti *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (Nf-kB), diperlukan untuk sintesis protein. Penelitian ini bertujuan menganalisis, mekanisme peningkatan sel pengeksresi HSP70, melalui peningkatan sel pengeksresi Nf-kB, pada kanker payudara tikus yang diradiasi, setelah/pascapemberian ekstrak *aqueous* tanaman meniran (*P. niruri*). Percobaan dilakukan dengan rancangan *randomized separate pre-test post test control group*. Hewan model yang dipergunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur *Sprague Dawley*, yang menderita kanker payudara karena diinduksi dengan bahan karsinogen, *-7,12-dimethyl benz(a)antrasen* (DMBA) dengan dosis 20 mg/kg bobot badan, dan kemudian diradiasi eksterna dengan dosis 6Gy. Kelompok perlakuan diberi ekstrak *aqueous* tanaman *P. niruri*, secara per oral, dengan dosis 250 mg/kg bb. Dengan teknik imunohistokimia dan *t-test*, didapatkan adanya perbedaan yang bermakna pada jumlah sel yang mengekspresikan Nf-kB ($p < 0,05$) dan jumlah sel yang mengekspresikan HSP70 ($p < 0,05$) pada kelompok perlakuan. Pada uji regresi didapatkan adanya pengaruh NF-kB pada HSP70 yang lebih kuat pada kelompok perlakuan. Disimpulkan bahwa mekanisme peningkatan sel pengeksresi HSP70, pada jaringan kanker payudara tikus yang diradiasi, karena pemberian ekstrak *aqueous* tanaman *P. niruri*. per oral, adalah melalui peningkatan sel pengeksresi Nf-kB.

Kata-kata kunci : HSP70, Nf-kB, *Phyllanthus niruri L.*, kanker payudara tikus, terapi radiasi

ABSTRACT

The used of radiation as a cancer treatment is also proven giving the side effect of damaging the normal tissue. The extract of *Phyllanthus niruri L* plant has already been known have an ability to modulate the immune system. Heat Shock Protein 70 (HSP70) is a protein which can protect other proteins from any damages. The transcription factor, such as Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (Nf-kB), is required for protein synthesis. This research was intended to analyze the mechanism, of the immune competent cells in expressing the HSP70, through the increase of Nf-kB, at the rat breast cancer tissue under radiation, due to the application of the extract of *P. niruri L* plant. An experimental study was performed by using the randomized separate pre-test post test controlled group design. The female white rat (*Rattus norvegicus*) strain *Sprague Dawley* strain, undergoing breast cancer due to the application of carcinogen materials *7,12-dimethylbenz(a)antrasen* (DMBA) at 20 mg/kg.b.wt, and then the external radiation at 6Gy given. The treatment group was given the aqueous extract of *P. niruri L* plant per oral at 250 mg/kg b.wt. By immunohistochemistry and *t-test* study we observe a significant increases in the number of cells expressing Nf-kB ($p < 0.05$) and a significant increases in the number of cells expressing HSP70 ($p < 0.05$) at the treatment group. At the *regression test*, there found to be a stronger influence of Nf-kB to HSP70 at the treatment group. It is concluded that the mechanism of cell increase expressing the HSP70 at the rat breast cancer tissue under radiation due to the application of the aqueous extract of *P. niruri L* plant per oral, is through the increase of cells expressing the Nf-kB.

Keywords : HSP70, Nf-kB, *Phyllanthus niruri L.*, rat breast cancer, and radiation therapy.

PENDAHULUAN

Terapi radiasi adalah pengobatan yang menggunakan gelombang elektromagnetik dan partikel yang berenergi tinggi (Woodward, 2008). Sampai saat ini terapi radiasi masih dipergunakan sebagai salah satu modalitas untuk pengobatan penyakit kanker payudara (Polgar, 2009).

Salah satu mekanisme terapi radiasi pada kanker adalah merusak sel secara tidak langsung sehingga terjadi apoptosis, melalui pembentukan radikal bebas. Radikal bebas di samping merusak sel kanker, juga merusak sel normal yang dikenal sebagai efek samping terapi radiasi (Eriksson, 2010). Adanya efek samping radiasi yang berat dapat mengakibatkan tertunda atau gagalnya terapi radiasi (Kentjono, 2001). Oleh karena itu, perlu dipikirkan upaya untuk mengurangi efek samping terapi radiasi tersebut.

Radikal bebas juga merusak makro molekul seperti protein. Kerusakan dapat terjadi pada protein ekstraseluler maupun intraseluler, dan mengganggu fungsinya (Dean, 1986).

Sintesis protein dalam sel melalui dua tahap, yaitu transkripsi dan translasi. Pada fase transkripsi perlu bantuan faktor transkripsi, seperti *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (Nf- κ B), yang juga merupakan protein (Meffert, 2003).

Bila terjadi kerusakan protein, maka ada protein lain yang disebut sebagai *Heat shock protein* (HSP) dan mempunyai peran melindungi protein. Salah satu HSP adalah HSP70, yang mempunyai bobot molekul 70 kDa (Wegele, 2004).

Ekstrak suatu tanaman yang di Pulau Jawa dikenal sebagai *meniran* (*P.niruri*), telah diketahui dapat memberikan efek imunomodulator, seperti : peningkatan aktivitas makrofag, netrofil, serta sel *natural killer*/NK (Maat, 1997).

Telah dilaporkan oleh Harikumar (2004) bahwa pemberian ekstrak tanaman *Phyllanthus* pada mencit yang di radiasi, didapatkan adanya peningkatan antioksidan, serta adanya efek radio protektif dengan meningkatnya jumlah sel darah putih dan selularitas sumsum tulang. Laporan lain yang menggunakan mencit yang diradiasi dan kemudian diberi ekstrak tanaman *Phyllanthus*, didapatkan adanya efek protektif dengan penurunan aberasi kromosom dan penurunan jumlah pembentukan *micronuclei* (Harikumar, 2007).

Penelitian tentang efek pemberian *P.niruri* juga telah dilaporkan pada mencit yang mengalami *papillomagenesis*, dan didapatkan efek kemopreventif dengan adanya kenaikan *glutathione*, *catalase*, dan protein (Sharma, 2010).

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis mekanisme peningkatan jumlah sel imunokompeten pengeksresi HSP70, melalui peningkatan Nf- κ B, pada jaringan kanker payudara tikus yang diradiasi, pasca pemberian ekstrak tanaman meniran (*P.niruri*).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan rancangan *randomized separate pretest-post test control group*. Hal tersebut karena keterbatasan metodologi, karena tidak memungkinkan melakukan observasi pada tikus yang dieksisi payudaranya, pada saat sebelum perlakuan, kemudian diberi perlakuan, serta dipelihara selama beberapa waktu, dan selanjutnya payudaranya dieksisi kembali. Pengelompokan subjek penelitian dilakukan dengan teknik alokasi random, sehingga pada penelitian ini ada kelompok *pre-test*, kelompok perlakuan (*post-test*), dan kelompok kontrol (Kuntoro, 2009).

Kegiatan penelitian dilakukan setelah mendapatkan Surat Keterangan Kelaikan Etik dari Komisi Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya. Tempat penelitian dilakukan di kandang hewan percobaan Departemen Biokimia, Departemen Patologi Anatomi, Departemen Radiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga-RS Sutomo, dan Pusat Penyakit Tropis Universitas Airlangga, di Surabaya.

Jumlah tikus yang digunakan ditentukan berdasar rumus Frederer. Dengan pembulatan angka dan ditambah subjek cadangan, didapatkan besar sampel adalah 10 pada tiap kelompok. Karena ada tiga kelompok, maka totalnya diperlukan 30 ekor tikus (Kuntoro, 2009). Variabel bebas adalah pemberian ekstrak tanaman meniran (*P. niruri*) secara per oral. Variabel kendali adalah jenis hewan dan jenis kelamin, umur, bobot badan hewan percobaan, tatalaksana pemeliharaan, prosedur pembuatan hewan model, serta dosis dan cara pemberian perlakuan. Variabel tergantung

adalah sel pengeksresi HSP70 dan sel pengeksresi Nf-kB pada jaringan kanker payudara tikus.

Sampel penelitian menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur *Sprague Dawley*. Kondisi tikus percobaan dalam keadaan sehat, dewasa (umur 3-4 bulan), bobot badan antara 250-300 gram. Untuk tujuan homogenitas subjek, maka hewan coba diperoleh hanya dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan, di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

Pembuatan model kanker payudara adalah dengan pemberian senyawa *7,12-dimethyl benz(a) antrasen* (DMBA) yang merupakan bahan karsinogen golongan *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAH). Senyawa DMBA dicampur dengan minyak jagung, dan dosis pemberiannya adalah 20 mg/kg bobot badan. Cara pemberian adalah dua kali per minggu, selama lima minggu, secara intragastrik, dengan menggunakan selang oro-gastrik. Dugaan adanya kanker payudara adalah setelah terlihat dan terabanya *nodule* pada payudara tikus, dalam waktu observasi selama 25 minggu setelah induksi dengan pemberian DMBA (Kubatka, 2002; Hamid, 2010).

Pembuktian adanya sel kanker dilakukan dengan mengorbankan nyawa tikus setelah dibius sebelumnya pada kelompok *pretest*, dan dieksisi jaringan payudara yang ada *nodule*-nya. Terhadap contoh jaringan kemudian dilakukan pemeriksaan secara histopatologi dengan pengecatan Hematoksilin Eosin, dan ditunjukkan adanya sel kanker (Hamid, 2010; Seagrove, 2011).

Sel kanker secara mikroskopik mempunyai beberapa sifat morfologi yang spesifik, antara lain inti sel yang besar dan berbeda-beda bentuk, ukuran maupun distribusi kromatinnya, serta intinya nampak kasar. Ratio ukuran inti dengan sel mengalami peningkatan. Pola kromosomnya seringkali tetraploid, dan hal tersebut karena adanya penambahan kromosom yang tidak teratur. Ukuran sel bervariasi serta banyak ditemukan adanya gambaran mitosis (Weinberg, 2008).

Setelah 20-25 minggu, semua tikus yang mengalami *nodule* di payudaranya karena induksi DMBA, diberikan radiasi ionisasi eksternal. Radiasi dilakukan dengan menggunakan mesin *Teletherapy Cobalt 60* (*Shinva*, tipe FCC8000F, *People Republic of*

China). Masing-masing tikus diberi *whole body radiation* dengan dosis tunggal sebanyak 6Gy (600 rads). Sebelumnya, tikus difiksasi pada papan khusus, tanpa pemberian anestesia. Paparan yang diberikan dengan luas lapangan radiasi 10x15 cm² pada jarak 80 cm dari sumber radiasi (Harikumar, 2004; 2007).

Ekstrak *P.niruri* adalah hasil ekstraksi seluruh bagian tanaman tersebut dalam bentuk serbuk dan telah terstandar. (produksi *Xi'an Biof Bio-Technology Co. Ltd, People Republic of China* yang dilengkapi dengan *Certificate of analysis*).

Larutan *aqueous* ekstrak tanaman *P.niruri* 10% dibuat dengan mencampurnya dengan cairan air suling. Dosisnya adalah 250 mg/kg bobot badan tikus coba. Pemberiannya dimulai pada hari keenam setelah radiasi, dan diberikan satu kali per hari, secara intragastrik (lewat selang oro-gastrik) sampai hari ke-12 (Harikumar, 2004; 2007).

Unit analisis penelitian adalah spesimen hasil eksisi payudara semua tikus coba yang ada *nodule*-nya, yang dikorbankan nyawanya dengan dibius sebelumnya, serta diproses menjadi preparat histologis. Penghitungan kuantitatif secara visual dengan menggunakan mikroskop cahaya memakai pembesaran 400 kali. Penilaian terhadap sel imunoreaktif, ditunjukkan dengan adanya ekspresi positif, yang nampak tercatat coklat kemerahan pada sitoplasmanya. Jumlah sel pengeksresi Nf-kB dan sel pengeksresi HSP70, dihitung secara terpisah pada 10 lapang pandang, kemudian diambil nilai rataannya. Pemeriksaan dilakukan secara *blind* oleh dua orang (Plumeriastuti, 2010).

Untuk mengetahui apakah pemberian ekstrak *aqueous* meniran (*P.niruri*) mengakibatkan perbedaan yang bermakna pada jumlah sel pengeksresi HSP70 dan jumlah sel pengeksresi Nf-kB, dilakukan analisis statistika dengan uji beda. Sebelumnya dilakukan uji normalitas pada ketiga kelompok tikus coba. Analisis korelasi dilakukan untuk mengetahui keeratan hubungan antara Nf-kB dan HSP70 dari ketiga kelompok. Dilakukan pula analisis regresi untuk menilai kekuatan pengaruh dari kedua variabel tersebut. Uji linearitas dilakukan terlebih dahulu sebagai prasyarat sebelum melakukan analisis regresi linear.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada jaringan kanker payudara tikus terdapat sel yang mengekspresikan HSP70 (Gambar 1), sel yang mengekspresikan Nf-kB (Gambar 2), dan sejumlah sel kanker (Gambar 1 dan gambar 2).

Dari ketiga kelompok tikus coba distribusi datanya adalah normal. Uji *t-test* pada jumlah sel pengeksresi HSP70 didapatkan adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok *pretest* (1 ± 1) dengan kelompok perlakuan (6 ± 1). Juga didapatkan adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan (6 ± 1) dengan kelompok kontrol (3 ± 1), serta didapatkan pula adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok *pretest* (1 ± 1) dengan kelompok kontrol (3 ± 1) (Tabel 1).

Uji beda *t-test* pada jumlah sel pengeksresi Nf-kB didapatkan adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok *pre-test* ($0,5 \pm 0,4$) dengan kelompok perlakuan ($3 \pm 2,6$). Juga didapatkan adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan ($3 \pm 2,6$) dengan kelompok kontrol ($0,1 \pm 0,01$), serta didapatkan pula adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok *pretest* ($0,5 \pm 0,4$) dengan kelompok kontrol ($0,1 \pm 0,01$) (Tabel 1).

Hasil penelitian, dengan memberi perlakuan ekstrak *aqueous* tanaman meniran pada tikus yang menderita kanker payudara dan diradiasi, diperoleh peningkatan jumlah sel-sel yang mengekspresi HSP70 dan Nf-kB. Hasil penelitian ini menunjang penelitian sebelumnya, yang menyatakan bahwa ekstrak tanaman meniran bersifat imunomodulator (Maat, 1997; Harikumar, 2004; Karuma, 2009).

Protein mempunyai banyak peran antara lain, sebagai komponen struktural tubuh, sebagai *water balancing*, sistem transportasi, sebagai enzim, hormon, dan juga sebagai sumber energi. Protein juga berperan dalam sistem respons imun dan sistem darah. Secara intraseluler, protein berperan sebagai enzim dan dalam sistem transduksi sinyal (Genton, 2010).

Kerusakan protein intraseluler bisa terjadi karena radikal bebas yang timbul pada pemberian radiasi, sehingga menimbulkan *unfolding protein*, dan hal ini akan menyebabkan protein lebih peka terhadap proteinase dan lebih mudah masuk ke lisosom. Radikal bebas juga menyebabkan fragmentasi protein ekstraseluler, sehingga menjadikannya lebih mudah larut dan

lebih mudah dicerna pada proses endositosis serta didegradasi oleh sel makrofag (Dean, 1986).

Heat shock protein berfungsi sebagai *chaperon* terhadap protein yang lain. Senyawa HSP berperan dalam *protein folding*, *trafficking* protein intraseluler, dan *coping* pada protein yang mengalami denaturasi. Peran HSP penting dalam *maintenance* protein. Senyawa HSP mengangkut protein tua/*old protein* ke *recycling bean (proteasome)*, di samping itu HSP juga membantu sintesis protein (Mayer, 2005).

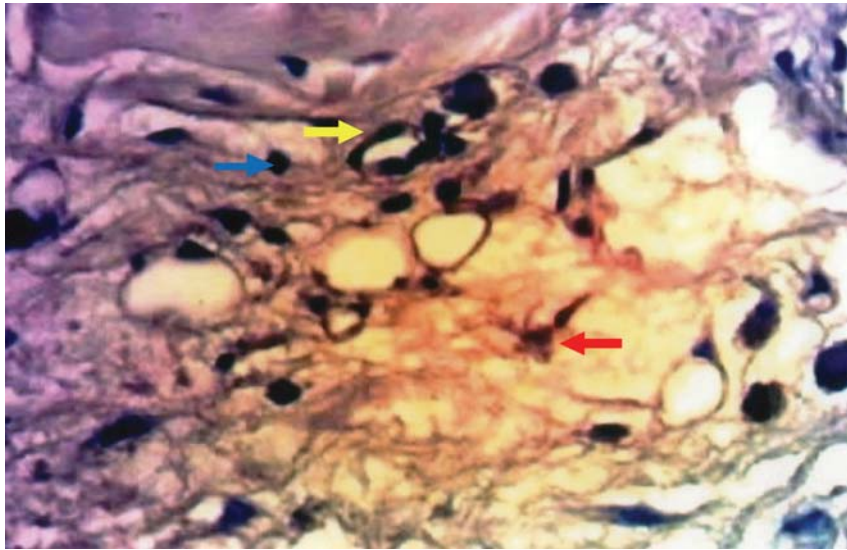
Karena kemampuan dan aktivitasnya dalam sistem reparasi sel, maka HSP70 disebut juga sebagai *cellular stress response* (Clark, 2009). Stres pada sel yang merusak protein, akan menyebabkan *unfolding* dan kemungkinan terjadi agregasi protein. Proses pencegahan oleh HSP70 ini adalah dengan mengikatkan diri pada protein yang terganggu tersebut (Nollen, 2002; Tomanek, 2003).

Peningkatan HSP70 oleh sel akan melindungi protein, mencakup juga perlindungan pada sel pengeksresi itu sendiri. Hal tersebut akan lebih meningkatkan fungsi sel termasuk sel-sel sistem imun. Kenaikan sel pengeksresi HSP70 pada jaringan kanker payudara tikus yang diradiasi, menunjukkan adanya efek radioprotektif, yaitu proteksi protein dari kerusakan akibat radiasi. Hal tersebut adalah berbeda dengan mekanisme proteksi dari laporan hasil penelitian sebelumnya, tetapi dapat melengkapi mekanisme perlindungan dari ekstrak tanaman meniran (*P.niruri*) terhadap radiasi.

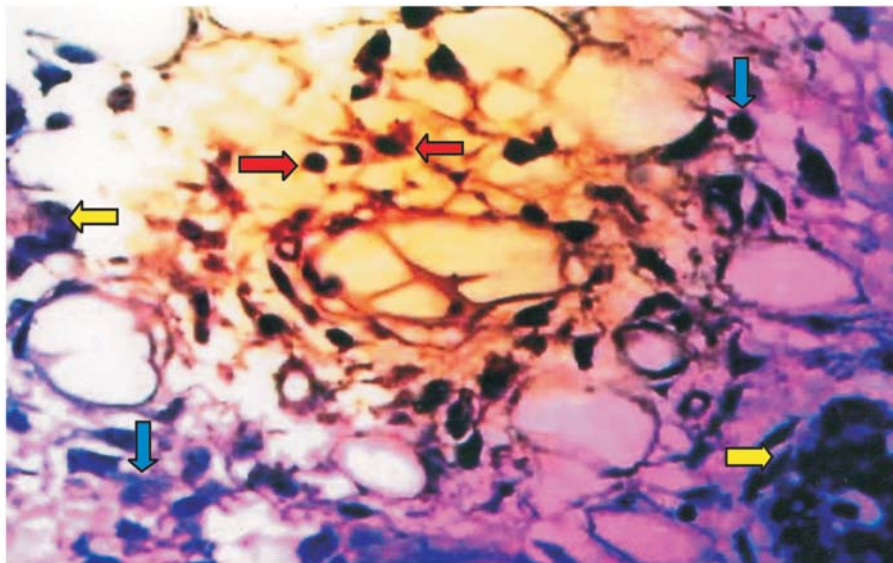
Sintesis protein oleh sel adalah melalui proses transkripsi, yaitu penyalinan informasi genetik dari *deoxyribonucleic acid* (DNA), yang dilanjutkan dengan translasi oleh *messenger*

Tabel 1. Nilai rata-rata dan simpangan baku dari jumlah pemeriksaan sel pengeksresi protein HSP70 dan Nf-kB dari jaringan payudara tikus yang mengalami kanker dan di radiasi, dari kelompok *pre-test*, kelompok perlakuan, dan kelompok control.

	Rataan \pm simpangan baku jumlah sel pengeksresi	
Kelompok	HSP70	Nf-kB
<i>Pre-test</i>	$1^a \pm 1$	$3^a \pm 1$
Kontrol	$3^b \pm 1$	$0.1^b \pm 0.01$
Perlakuan	$6^c \pm 1$	$3^c \pm 2.6$



Gambar 1. Gambar sediaan histologis jaringan payudara tikus yang menderita kanker dan diradiasi, dengan pengecatan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal anti HSP70. Sel sel yang meng ekspresi HSP70 ditunjukkan anak panah merah (→) dan sel yang tidak mengekspresi HSP70 ditunjukkan anak panah biru (→). Anak panah kuning (→) menunjukkan adanya sel kanker. Pembesaran 400x.



Gambar 2. Gambar sediaan histologis jaringan payudara tikus yang menderita kanker dan diradiasi, dengan pengecatan imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal anti Nf-kB. Sel sel yang meng ekspresi Nf-kB ditunjukkan anak panah merah (→) dan sel yang tidak mengekspresi Nf-kB ditunjukkan anak panah biru (→). Anak panah kuning (→) menunjukkan adanya sel kanker. Pembesaran 400x.

ribonucleic acid (m-RNA) dan proses tersebut dikenal sebagai ekspresi gen. Salah satu yang berperan dalam sistem kontrol ekspresi gen tersebut adalah faktor transkripsi (Chen, 2001). Senyawa Nf-kB adalah protein yang juga merupakan faktor transkripsi, dan juga berperan sebagai respons sel terhadap stimulus.

Senyawa Nf-kB tergolong dalam *rapid acting primary transcription factor*. Hal ini menjadikan Nf-kB sebagai *first responder* terhadap rangsangan berbahaya pada sel (Meffert, 2003). Adanya peningkatan jumlah sel pengekspreasi Nf-kB pada jaringan kanker payudara tikus yang diradiasi, setelah pemberian

ekstrak meniran (*P.niruri*), dapat diartikan sebagai adanya peningkatan respons terhadap stimulus yang berupa radiasi. Selanjutnya, peningkatan senyawa tersebut juga mengakibatkan peningkatan sintesis protein, termasuk sintesis HSP70.

Pada analisis korelasi Nf-kB dengan HSP70 didapatkan bahwa koefisien korelasi pada kelompok perlakuan adalah yang paling besar ($r=0,938$).

Uji linearitas pada ketiga kelompok tikus coba didapatkan ada hubungan linear antara Nf-kB dengan HSP70. Pada uji regresi linear didapatkan pengaruh Nf-kB pada HSP70 pada kelompok perlakuan (0,938) adalah lebih besar.

Didapatkan pula adanya peningkatan yang bermakna pada jumlah sel pengeksresi Nf-kB dan HSP70.

SIMPULAN

Dari penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa, mekanisme peningkatan jumlah sel pengeksresi HSP70 pada jaringan kanker payudara tikus yang diradiasi, dan kemudian diberi ekstrak *aqueous* tanaman meniran (*P.niruri*), adalah melalui peningkatan jumlah sel pengeksresi Nf-kB.

SARAN.

Perlu penelitian lebih lanjut tentang jenis sel yang paling berperan dalam ekspresi Nf-kB dan HSP70 pada jaringan kanker payudara tikus yang diradiasi, setelah pemberian ekstrak meniran (*P.niruri*). Di samping itu juga diperlukan penelitian tentang pemanfaatan ekstrak tanaman meniran ke arah uji klinik, sehingga lebih meningkatkan perannya bagi masyarakat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Dr drh Hani Plumeriastuti, MKes (Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya), dan Bapak Herry (Unit Pemeliharaan Hewan Percobaan, Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran, Unair), yang telah banyak membantu selama penelitian.

DAFTAR PUSTAKA.

- Chen F, Castranova V, Shi X. 2001. New Insights into the Role of Nuclear Factor-kB in Cell Growth regulation. *The American Journal of Pathology* 159 : 387-397.
- Clark MS, Peck LS. 2009. Triggers of the HSP70 stress response: environmental Responses and laboratory manipulation in an Antarctic marine invertebrate (*Nacella concinna*). *PMC* 14(6) : 649–660.
- Dean RT, Wolf SP. 1986. Free Radicals and Protein Damage: Consequence for Protein Function and Catabolism, and in Cytolysis. Sydney, NSW. Australia Heart Research Institute.
- Dunn GP, Dunn IF, Curry WT. 2007. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma. *Cancer Immunity* 7: 12-13.
- Eriksson D, Stigbrand T. 2010. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol* 31(4) : 363-72.
- Genton L, Melzer K, Pichard C. 2010. Energy and macronutrient requirements for physical fitness in exercising subjects. *Clinical Nutrition* 29 (4) : 413–423.
- Hamid IS. 2010. Efek Ekstrak *Gynura Procumbens* pada karsinogenesis kelenjar mammae tikus yang di induksi 7,12-dimethylbenz(a)antrasen : kajian enzimatik dan genetik. Disertasi. Yogyakarta. Universitas Gajah Mada.
- Harikumar KH, Kuttan R. 2004. Protective effect of an extract of *Phyllanthus amarus* against radiation induced damaged in mice. *J Radiat Res* 45 : 133-139.
- Harikumar KH, Kuttan R. 2007. An extract of *Phyllanthus amarus*, protect mouse chromosomes and intestine from radiation induced damages. *J Radiat Res* 48 : 469-476.
- Karuma R, Reedy S, Baskar R, Saralakumari D. 2009. Antioxidant potential of aqueous extract of *Phyllanthus amarus* in rats. *Indian J Pharmacol* 41 : 66-67.

- Kentjono AW. 2001. Pengaruh vaksinasi BCG dalam meningkatkan respon Th1 dan respon terhadap radiasi pada karsinoma nasofaring. Disertasi. Surabaya. Universitas Airlangga.
- Kubatka P, Ahlersova E, Ahler I, Bojkova B, Kalicka K, Adamekova E, Markova M, Chamilova M, Chermakova M. 2002. Variability of Mammary Carcinogenesis Induction in female Sprague-Dawley and Wista: Han Rats: the Effect of Season and Age. *Physiol Res* 51 : 633-640
- Kuntoro H. 2009. *Dasar Filosofis Metodologi Penelitian*. Surabaya. Pustaka Melati. Hal 113-146; 165-188.
- Ma'at S. 1997. *Phyllanthus niruri* L sebagai imunostimulator pada mencit. Disertasi. Surabaya. Universitas Airlangga.
- Mayer MP, Bukau B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62(6) : 670-684.
- Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D . 2003. NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci* 6 (10) : 1072-1078.
- Nollen EAA, Morimoto RI. 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *Journal of Cell Science* 115 : 2809-2816
- Plumeriastuti H, Suwanti LT. 2010. *Immunohistokimia dan Tunel Assay*. Unit Pelayanan Pemeriksaan Laboratorium, Konsultasi Kesehatan dan Pelatihan. Surabaya. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Polgár C, Major T. 2009. Current status and perspectives of brachytherapy for breast cancer *International Journal of Clinical Oncology* 14 (1) : 7-10.
- Seagroves T. 2011. The Mouse as a Model for Breast Development and Breast Cancer Research. Viewed 9 Dec 2011, <<http://www.tseagro.v@biomail.ucsd.edu>>
- Sharma P, Parmar I, Verma P, Goyal PK. 2010. Chemopreventive effect of *Phyllanthus niruri* on DMBA induced skin papillomagenesis in swiss albino mice. *J Biol Med Res* 1(4) : 158-164.
- Tomanek L, Sanford E. 2003. Heat Shock protein 70 (Hsp70) as a biochemical stress indicator : An Experimental Field Test in two Congeneric Intertidal Gastropod (Genus : Tegula). *Biol Bull* 205: 276-284.
- Wegele H, Müller L, Buchner J. 2004. "Hsp70 and Hsp90—a relay team for protein folding". *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151: 1-44.
- Woodward WA, Cox JD. 2008. Molecular Basis of Radiation Therapy. In : Mendelsohn J (Ed). *The Molecular Basis of cancer*. Philadelphia. Saunders Elsevier. Pp 593-604.