

Aktivitas Fraksi Protein *Jatropha curcas* Sebagai Antikanker Terhadap Ekspresi p53 pada Kulit Mencit Pasca Pemaparan DMBA dan UVB

(Activity of Protein Fraction from *Jatropha curcas* As Anticancer on p53 Expression in Mice Skin Exposed to DMBA and UVB)

HANIF NASIATUL BAROROH*, WARSINAH, AND HARWOKO

Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Jenderal Soedirman, Jl. Dr. Soeparno, Kampus Karangwangkal, Purwokerto.

Diterima 21 Februari 2012, Disetujui 20 Agustus 2012

Abstrak: Radiasi ultraviolet (UV) dan 7,12-dimethylbenz[α]anthracene (DMBA) dapat menyebabkan kerusakan sel kulit yang bisa menyebabkan kanker. Radiasi UV dapat menginduksi kanker kulit melalui mekanisme kematian sel secara apoptosis. Terjadinya apoptosis ditandai dengan peningkatan ekspresi protein apoptosis p53. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antiproliferatif fraksi protein dari daun *Jatropha curcas* pada kanker kulit melalui ekspresi protein p53 pada mencit yang diinduksi DMBA dan UVB. Penelitian ini menggunakan 4 kelompok masing-masing terdiri dari 10 mencit. Kelompok 1 adalah kelompok kontrol tanpa perlakuan. Kelompok 2 diinduksi 0.2% DMBA (200 μ L/mencit) dan UVB (5 kali/minggu). Kelompok 3 dan 4 diinduksi 0.2% DMBA (200 μ L/mencit) dan UVB (5 kali/minggu) dilanjutkan dengan DMSO dan fraksi protein dosis 2 mg/mL. Pemeriksaan imunohistokimia dari jaringan kulit kanker dilakukan dengan antibodi monoklonal p53. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan pada jumlah sel yang mengekspresikan p53 antara kelompok 2 dan kelompok 4 ($p < 0,05$). Perlakuan dengan fraksi protein daun *J. curcas* menunjukkan peningkatan ekspresi protein p53. Peningkatan ekspresi p53 merupakan tanda terjadinya apoptosis, sehingga fraksi protein *J. curcas* memiliki potensi sebagai antikanker melalui induksi apoptosis.

Kata kunci: *Jatropha curcas*, kanker kulit, p53, apoptosis.

Abstract: Ultraviolet (UV) radiation and 7,12-dimethylbenz[α]anthracene (DMBA) damaging effect to skin cells can lead to the development of cancer. UV radiation induces skin cancer can be seen from the increased cell death through apoptosis mechanism. Apoptosis can be observed through the expression of p53 protein as a protein proapoptosis. This study aims to determine the antiproliferative activity of protein fractions from *Jatropha curcas* leaves against skin cancer cells through the expression of p53 protein in mice induced with DMBA and UVB. The study was carried out using 4 groups of 10 mice in each group. Group 1 was the control group without treatment. Group 2 was induced with 0.2% of DMBA (200 μ L/mice) and UVB (5 times/week). Group 3 and 4 were induced with 0.2% of DMBA (200 μ L/mice) and UVB (5 times/week), followed by treatment with DMSO and the protein fraction dose of 2 mg/0,1 mL. Immunohistochemistry examination on skin tissues of all mice were performed by using p53 monoclonal antibody. The results showed that p53 expression was significantly different between group 2 and group 4 ($p < 0,05$). The highest expression of p53 was found in group treated with the protein fraction. The lowest expression of p53 was found in group induced with DMBA and UVB. An increased in expression of p53 is a sign of apoptosis, therefore the protein fraction from *Jatropha curcas* has anticancer activity through the induction of apoptosis.

Keywords: *Jatropha curcas*, skin cancer, p53, apoptosis.

* Penulis korespondensi, Hp. 08157940671
e-mail: h_baroroh@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

KANKER merupakan penyakit yang memerlukan perhatian yang serius sebab kanker merupakan masalah utama kesehatan masyarakat di Amerika Serikat dan negara berkembang. Insidensi kanker kulit di Amerika Serikat dapat menyebabkan kematian satu dari setiap 4 orang penderita⁽¹⁾. Setiap 100.000 penduduk di Belanda diketahui ada 100 penderita kanker. Di Indonesia kanker kulit semakin meningkat sesuai dengan bertambahnya usia⁽²⁾. Dijk *et al.* mengatakan bahwa kenaikan dosis paparan dari sinar ultraviolet (UV) B dapat meningkatkan resiko menderita kanker kulit⁽³⁾. Menurut Manoharan *et al.* pemberian berulang senyawa 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA) dapat mengakibatkan kanker pada mencit⁽⁴⁾. Komponen UVB dari radiasi matahari dan DMBA bertanggung jawab atas terbentuknya senyawa mutagenik yang menyebabkan mutasi p53 pada kasus kanker kulit⁽⁵⁾.

Kanker umumnya diatasi berdasarkan pada upaya pengangkatan jaringan atau dengan mematikan sel kanker tersebut serta meminimalkan efek samping yang tidak diinginkan terhadap sel normal. Pengatasan ini harus diimbangi dengan kemoterapi atau penyinaran dengan sinar-X dengan harapan menghambat proliferasi sel kanker dan mengatasi kemungkinan sel yang telah mengalami metastasis⁽⁶⁾.

Usaha penyembuhan kanker dengan obat (farmakoterapi) atau dengan senyawa kimia (kemoterapi) pada umumnya belum mampu memberikan hasil yang memuaskan, sehingga dijumpai cara-cara pengobatan alternatif antara lain dengan obat tradisional⁽⁷⁾. Cara pengobatan dengan menggunakan obat tradisional tersebut umumnya belum mempunyai dasar rasional baik secara laboratorium maupun klinis.

Jarak pagar (*Jatropha curcas* Linn) adalah salah satu tanaman yang berpotensi sebagai anti kanker, anti bakteri dan anti inflamasi⁽⁸⁾. Tanaman jarak pagar mengandung senyawa saponin, polifenol, dan flavanoid yang berkasiat sebagai obat borok, obat kumur, obat udem, anti bengkak, reumatik dan rasa nyeri⁽⁹⁾. Baroroh dan Warsinah melaporkan bahwa ekstrak etanol daun jarak pagar dengan dosis 300 mg/kg berat badan tikus yang diberikan secara oral dapat menghambat peradangan sebesar 23,25%, dan dosis 500 mg/kg berat badan yang diberikan pada tikus dapat mengurangi rekrutmen neutrofil pada kaki tikus⁽¹⁰⁾. Akar, batang dan daun *J. curcas* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap *human colon adenocarcinoma* dan *human hepatocytes*⁽¹¹⁾.

Telah dilaporkan bahwa protein yang diisolasi dari daun jarak pagar memiliki aktivitas pemotongan DNA plasmid superkoil yang membuktikan keberadaan

ribosome-inactivating proteins (RIPs)⁽¹²⁾. Aktivitas nuklease dari RIPs menyebabkan kerusakan DNA dan akan meningkatkan ekspresi p53 yang akan memacu terjadinya apoptosis⁽¹³⁾. RIP telah diketahui sebagai *therapeutic agent* yang dapat menyebabkan kematian sel kanker dengan cara memacu apoptosis^(13,14).

Berdasarkan latar belakang tersebut perlu dilakukan penelitian tentang potensi protein yang diisolasi dari daun *J. curcas* dalam menghambat proliferasi kanker kulit pada mencit yang diinduksi DMBA dan pemaparan sinar UVB melalui ekspresi p53.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) diambil dari Kecamatan Kedungbanteng Banyumas, bahan untuk ekstraksi protein daun *J. curcas* L., dapar natrium fosfat 5 mM yang mengandung 0,14 M NaCl pH 7,2, dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5 tanpa NaCl, aseton (E.Merck), mencit betina galur Balb/c berumur satu setengah bulan dengan bobot badan seragam (20-30 gram), larutan 9,10-(DMBA) (Sigma) 0,2% b/v dalam aseton dan enhancer dimetil sulfoksida (DMSO) (E.Merck).

Alat. Alat yang digunakan adalah *centrifuge*, ultrasentrifugator, pH-meter, alat elektroforesis gel agarosa, *microwave*, lampu UVB (Philips®40W/12RS Ultraviolet B, 6 buah lampu), alat pencukur elektrik, mikroskop cahaya Olympus CH-12.

METODE. Fraksinasi protein dari daun *Jatropha curcas* L.⁽¹⁵⁾ Sebanyak 64,46 gram daun *Jatropha curcas* L. segar ditambah 80 mL dapar pH 7,2 kemudian diblender hingga halus dan disaring. Cairan hasil penyaringan kemudian diultrasentrifus pada 15.000 g selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan kemudian dibagi dalam 15 konikel masing-masing 5 mL dan didinginkan dalam es. Setelah itu, ditambah aseton dengan perbandingan 1:1 selanjutnya disentrifus dengan skala 8 pada 1288 g selama 20 menit. Hasil sentrifus diambil endapannya sedangkan supernatan dibuang. Endapan dikumpulkan untuk uji antiproliferatif pada mencit.

Induksi karsinogenesis terhadap hewan Uji⁽¹⁶⁾. Mencit sebanyak 40 ekor dibagi dalam 4 kelompok, masing-masing kelompok berjumlah 10 ekor mencit untuk perlakuan yang berbeda. Masing-masing kelompok mencit ditempatkan pada kandang dengan kelembaban nisbi 98%, suhu kamar 28-32°C, diberi makan pellet standar dan diberikan air minum. Adapun pembagian kelompok sebagai berikut: kelompok 1 tanpa perlakuan sebagai kontrol, kelompok 2 diinduksi DMBA dan pemaparan UVB tanpa terapi, kelompok 3 diinduksi DMBA dan pemaparan UVB selanjutnya

diterapi dengan DMSO+dapar, Kelompok 4 diinduksi DMBA dan paparan UVB selanjutnya diterapi protein daun *J. curcas* (dosis 2 mg/0,1 mL fraksi protein).

Induksi karsinogenesis dilakukan dengan pengolesan DMBA 0,2% dalam aseton dosis tunggal pada punggung mencit kelompok B, C, D, E dan F yang telah dicukur (200 µL/mencit), kemudian diistirahatkan selama 2 hari dan selanjutnya diinduksi dengan paparan UVB kronik (UVB dosis 0,4 J/cm² sekali sehari, 5 kali per minggu) selama 6 menit. Paparan sinar UVB dihentikan saat semua kelompok perlakuan dengan UVB insidensi sebesar 60 %, yaitu setelah paparan UVB ke-40 (akhir minggu ke-8). Pada akhir minggu ke 8, tiga ekor mencit dari masing-masing kelompok dienkropsi untuk uji tahap satu (terminasi pasca UV).

Perlakuan fraksi protein pada mencit terinduksi kanker. Perlakuan (terapi) dengan fraksi protein dilakukan setelah selesai paparan UVB pada minggu ke 8, setiap hari dengan cara dioleskan pada punggung mencit, dengan dosis sesuai dosis kelompoknya sampai minggu ke 12. Sesaat sebelum pemberian protein, mencit diolesi dengan DMSO. Pada akhir minggu ke 12, tiga ekor mencit dari masing-masing kelompok dienkropsi untuk uji tahap dua.

Pengamatan ekspresi protein p53 dengan metode imunohistokimia. Jaringan kulit yang diambil dari bagian punggung mencit dipotong dengan panjang 1 cm dan lebar 0,5 cm dan diawetkan dalam formalin 10%. Tahap selanjutnya adalah pembuatan preparat dari jaringan kulit tersebut sebagai *pre-treatment* imunohistokimia.

Tahapan berikutnya merupakan proses imunohistokimia dengan metode tidak langsung. Langkah pertama dilakukan inkubasi dengan antibodi primer yang mengenali protein p53, dan dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak 3 kali selama 5 menit. Setelah itu, dilakukan pemberian streptavidin peroksidase sebagai langkah ketiga dengan cara diteteskan pada gelas objek selama 5 menit, dan dilakukan pencucian dengan PBS 3 kali selama 10-15 menit. Kemudian diinkubasi dalam DAB selama 5-15 menit diikuti pencucian dengan air kran. Selanjutnya direndam dalam hematoksilin selama 3-4 menit kemudian dicuci dengan air kran selama 10-15 menit. Tahap yang terakhir yaitu preparat ditetesi dengan *mounting fluid* dan ditutup *deckglass*. Pengamatan ekspresi p53 pada kanker kulit mencit diamati dengan mikroskop cahaya Olympus CH-12 dengan perbesaran 400 kali.

Analisis Data. Analisis ekspresi protein p53 dilakukan dengan mengamati ada atau tidaknya peningkatan ekspresi protein tersebut setelah

pemberian fraksi protein daun *J. curcas* pada kulit mencit yang menderita kanker. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus CH-12 dengan perbesaran 100-400 kali terhadap daerah epidermis kulit. Ekspresi protein p53 diamati pada bagian epidermis karena kanker kulit yang terbentuk akibat paparan kronik UVB terjadi di bagian epidermis. Sel yang mengekspresikan p53 akan berwarna coklat pada inti selnya. Sedangkan, sel yang tidak mengekspresikan p53 akan berwarna biru pada semua bagian selnya. Perhitungan jumlah sel yang mengekspresikan p53 dilakukan dengan menghitung sel pada daerah yang berbeda-beda dengan luas yang sama (37909 µm²) dan hasilnya kemudian dirata-rata pada kulit normal, kontrol, dan sampel kemudian dibandingkan hasil perhitungan sel tersebut dan dianalisis dengan Anova dengan taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah paparan UVB dan DMBA, respon yang teramati adalah mencit menjadi lebih agresif dibandingkan kelompok mencit yang tidak mendapatkan paparan UVB (mencit kontrol) serta mengalami kemerahan (eritema) pada kulitnya. Hasil penginduksian kanker kulit menunjukkan bahwa dari keseluruhan mencit yang diinduksi kanker kulit, nodul tumor pertama kali muncul setelah 14 kali paparan UVB kemudian disusul mencit-mencit lain pada paparan UVB selanjutnya. Setelah paparan UVB ke-40 (akhir minggu ke-8) terlihat penampakan nodul tumor seperti pada Gambar 1. Sedangkan, kelompok kontrol sehat tidak satu pun menunjukkan nodul tumor.

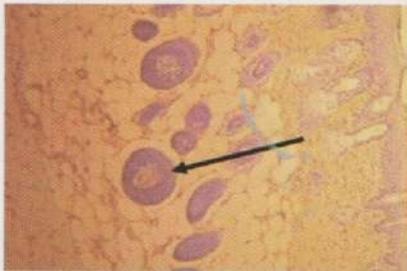
Pengamatan nodul tumor dilakukan secara makroskopik. Ciri makroskopik dari jenis papiloma yang teramati pada penelitian ini adalah: bentuk bulat atau oval, berbentuk papul kecil saat awal pertumbuhan, berwarna kehitaman saat membesar. Tumor jenis fibroma memiliki ciri: tumbuhnya lebih lambat dibanding jenis lain, terlihat kokoh karena tumbuh dari lapisan yang lebih dalam (Gambar 1C). Jenis kanker kulit yang banyak ditemukan di dunia ialah karsinoma sel basal (basalioma), karsinoma sel skuamosa (*squamous cell carcinoma*) dan melanoma maligna⁽²⁾.

Hasil pengamatan jumlah sel yang mengekspresikan protein p53 ditunjukkan oleh Gambar 3. Ekspresi protein p53 diamati pada bagian epidermis karena kanker kulit yang terbentuk akibat paparan kronik UVB terjadi di bagian epidermis⁽¹⁷⁾. Sel yang mengekspresikan p53 akan berwarna coklat pada intinya sedangkan membran sitoplasmanya berwarna biru (Gambar 2). Sedangkan, sel yang tidak



Gambar 1. Nodul tumor pada kulit mencit yang diinduksi UVB dan DMBA Kulit normal (A); nodul jenis fibroma (B dan C) dan nodul jenis papiloma (D).

mengekspresikan p53 akan berwarna biru pada semua bagian selnya. Hasil pengamatan tahap 2 atau setelah terapi selama 4 minggu menunjukkan jumlah sel yang mengekspresikan p53 dari kelompok kontrol UVB dan kelompok kontrol dapar adalah lebih kecil daripada kelompok perlakuan protein. Bahkan pada kelompok UVB tidak ada sel yang mengekspresikan protein p53.



Gambar 2. Ekspresi p53 pada jaringan kulit yang diinduksi UVB dan DMBA (ditunjukkan tanda panah hitam).

Penentuan dosis protein daun jarak pagar didasarkan pada konsentrasi protein daun jarak pagar yang memiliki aktivitas pemotongan DNA *supercoil*⁽¹²⁾. Hasil analisis statistik data menunjukkan bahwa saat terminasi akhir kelompok tanpa perlakuan (normal) tidak berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan protein ($p > 0,05$). Kelompok perlakuan protein jarak pagar dosis 2 mg/0,1 mL berbeda signifikan terhadap kelompok kontrol dapar dan kontrol UVB ($p < 0,05$). Ekspresi protein p53 pada perlakuan jarak pagar lebih besar dibanding kontrol DMBA-UVB yaitu sebesar 7 tiap luas $37909 \mu\text{m}^2$ (Tabel 1).

Kelompok dosis 2 mg/0,1 mL mengalami peningkatan jumlah sel yang mengekspresikan protein p53 sebesar 2,62 x dibanding kontrol UVB dan DMBA sedangkan kelompok kontrol dapar mengalami penurunan (Gambar 3).

Apoptosis sering dikenal dengan sebagai kematian sel terprogram. Salah satu mekanisme terjadinya apoptosis adalah adanya kerusakan DNA yang akan memacu protein p53 untuk upregulasi ekspresi dari

protein proapoptosis (Bax, Bad) sehingga mitokondria mengeluarkan sitokrom-C yang menyebabkan terjadinya apoptosis⁽¹⁸⁾. Apabila protein p53 hilang atau mengalami mutasi maka secara nyata akan berperan dalam perkembangan karsinogenesis. Kehilangan p53 akan menyebabkan penurunan apoptosis⁽¹⁹⁾. Hal ini terlihat pada kelompok kontrol UVB dengan tidak adanya sel yang mengekspresikan protein p53 (Gambar 3). Pada kelompok dapar jumlah sel yang mengekspresikan protein p53 juga sedikit dengan rata-rata 1.

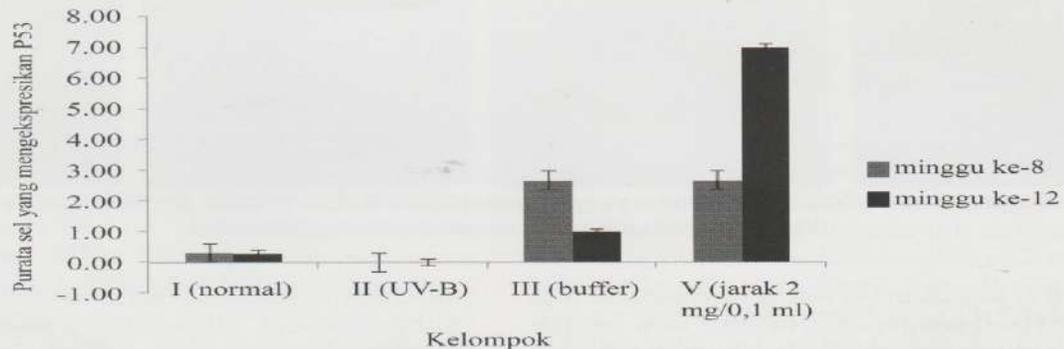
Radiasi UV memiliki peran yang penting dalam kanker kulit karena dapat merusak sel keratinosit untuk transformasi neoplastik⁽²⁰⁾. Radiasi UV yang terus menerus dapat menyebabkan kerusakan DNA permanen.

Tabel 1. Ekspresi protein p53 pada perlakuan fraksi protein *J. curcas* dibandingkan dengan perlakuan DMBA dan UVB.

Kelompok	Purata ekspresi protein p53*
Kontrol Normal	1,67
DMBA+UV-B	0,00
DMBA-UVB+ DMSO	1,00
DMBA-UVB+Fraksi protein <i>J. curcas</i>	7,00

*purata ekspresi p53 tiap $37909 \mu\text{m}^2$

Setelah pemaparan UV adalah kerusakan DNA pada keratinosit yang menginduksi p53, kemudian p53 akan meregulasi protein, sehingga siklus sel terhenti dan terjadi perbaikan DNA. Bila kerusakan tidak dapat diperbaiki, maka akan terjadi apoptosis. Radiasi UV menyebabkan mutasi pada p53. Mutasi pada gen p53 menyebabkan proliferasi yang tidak normal sehingga memacu terjadinya kanker⁽¹⁷⁾. Jalur lain adalah penekanan respon imun oleh UV juga dapat mengakibatkan terjadinya kanker kulit^(16, 20). Protein p53 merupakan tumor supresor protein yang bertanggung jawab pada mekanisme apoptosis sel kanker. Mekanisme tersebut merupakan regulasi repair



Gambar 3. Jumlah sel yang mengekspresikan protein p53 pada kelompok perlakuan.

suatu sel yang terinduksi kanker. Ekspresi protein p53 spesifik terjadi pada sel-sel yang membutuhkan regulasi kematian terprogram yang disebut apoptosis⁽⁵⁾.

Peningkatan ekspresi p53 merupakan salah satu tanda terjadinya apoptosis, sehingga protein *Jatropha curcas* memiliki potensi sebagai antikanker karena salah satu penyebab terjadinya kanker adalah kemampuan dalam menghambat mekanisme apoptosis⁽¹⁹⁾. Hasil penelitian menunjukkan protein yang diisolasi dari daun jarak pagar berpotensi memacu apoptosis melalui peningkatan ekspresi p53.

SIMPULAN

Fraksi protein daun *Jatropha curcas* dosis 2 mg/0,1 mL memiliki aktivitas antiproliferasi pada mencit yang diinduksi DMBA dan UVB ditandai dengan peningkatan ekspresi protein p53. Protein *Jatropha curcas* memiliki potensi sebagai antikanker dengan menginduksi apoptosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada DP2M Dikti yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- World Health Organisation. Health information for world. 2005. diambil dari <http://diahome.org/content/abstract/2005/dij991>. diakses 28 April, 2009.
- Azamris. Kanker kulit di bangsal bedah RS Dr. M. Djamil Padang Januari 2002-Maret 2007. Cermin Dunia Kedokteran. 2011.38 (2): 109-10.
- Dijk M, Robbins C. Diseases of skin cancer. Health Information. 2007. diambil dari <http://bulogniOrg/content/abstract/2003/dij893>. diakses 10 Februari, 2009.
- Manoharan S, Muneeswaran M, Baskaran N. Chemopreventive efficacy of Berberine in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in swiss albino mice. Int J Res Pharm Sci. 2010.1(4):521-9
- Wu Y, Xing D, Liu L, Gao B. Regulation of Bax activation and apoptotic response to UV irradiation by p53 transcription-dependent and independent pathways. Cancer Lett. 2008.271:231-9.
- King RJB. Cancer biology. 2nd ed. London: Pearson Education Limited; 2000. 149-68.
- Ma'at S. Obat tradisional untuk pelayanan kesehatan formal. Prosiding Seminar Nasional, Surabaya 5 September, 2004:45-9.
- Hutapea JR. Inventaris tanaman obat Indonesia. Jilid III. Jakarta: Departemen Kesehatan RI, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2004. 29-30.
- Amijoyo S. Tanaman obat asli Indonesia. Jakarta: Penerbit Pustaka. 1998. 29-30.
- Baroroh HN, Warsinah. Antiinflammatory activity of ethanolic extract of leaves of Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) and neutrophils profile in rat's foot induced Carrageenan. Proceedings of International Conference On Medicinal Plants, Surabaya 20-21 Juli, 2009:490-4.
- Oskueian E, Abdullah N, Saad WZ, Omar AR, Ahmad S, Kuan WB, Zolkifli NA, Hendra R, Wan Ho Y. Antioxidant, antiinflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Jatropha curcas* Linn. J Med Plants Res. 2011.5(1):49-57.
- Baroroh HN, Warsinah, Harwoko. The cleaving activity assay on supercoiled DNA by protein fraction from *Jatropha curcas* leaves. Proceedings of The First International Conference In Medicine and Health Sciences; Interprofessional Education: Walking Through Collaborative Learning to Collaborative Practice, Purwokerto 29 November-1 Desember, 2011:264-70.
- Narayanan S, Surendranath K, Bora N, Surolia A and Karande A. Ribosome inactivating proteins and apoptosis. FEBS Lett. 2005.579:1324-31.
- Kumari BDR, Kumar SP. Ribosome inactivating proteins: An overview. Journal of Pharmacy Research. 2011. 4(3):769-72
- Sudjadi, Witasati DL, Sadarum TL, Nastity N,

- Sismindari. Efek sitotoksik suatu protein seperti *Ribosome Inactivating Protein* yang bersifat asam dari daun *Mirabilis jalapa* L. *Majalah Farmasi Indonesia*. 2007.18(1):20-7
16. Widyarini S, Sismindari, Sudjadi. Efek paparan UVB pada mencit yang diinduksi DMBA dengan variasi dosis. *Majalah Farmasi Indonesia*. 2005.11(1): 25-30.
 17. Ouhit, Ananthaswamy. Efek paparan UVB terhadap pembentukan keratinosit. *Majalah Farmasi Indonesia*. 2002.14(2):24-8
 18. Fridman SJ, Lowe SW. Control of apoptosis. *Oncogene*. 2003.22:9030-40.
 19. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000.100:57-70.
 20. Ueda M, Sismindari, Sujadi, Yulies. Respon imun akibat paparan UVB dilihat harga IgG dan IgA pada mencit. *J Nature*. 2000.11(1): 36-9.