

**AKTIVITAS ANTIKANKER
EKSTRAK DAUN KESAMBI (*Scheichera oleosa*)
TERHADAP SEL HEPAR TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
(7,12-Dimethylbenz(a)antrasena) (DMBA) SECARA *IN VITRO***

Tesis

**Oleh:
LIL HANIFAH
NIM. 19820005**



**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**AKTIVITAS ANTIKANKER
EKSTRAK DAUN KESAMBI (*Scheichera oleosa*)
TERHADAP SEL HEPAR TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
(7,12-Dimethylbenz(a)antrasena) (DMBA) SECARA *IN VITRO***

Tesis

**Oleh:
LIL HANIFAH
NIM. 19820005**

**Diajukan kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana
Malik Ibrahim Malang untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam
memperoleh gelar Magister Sains (M.Si)**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**AKTIVITAS ANTIKANKER
EKSTRAK DAUN KESAMBI (*Scheichera oleosa*)
TERHADAP SEL HEPAR TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
(7,12-Dimethylbenz(a)antrasena) (DMBA) SECARA *IN VITRO***

Tesis

Oleh:
LIL HANIFAH
NIM. 19820005

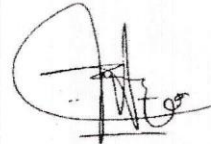
Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji
Tanggal 25 Juni 2021

Pembimbing I



Prof. Dr. drh. Bayyinatul M, M. Si
NIP. 19741018 200312 2 002

Pembimbing II



Dr. Kiptiyah, M. Si
NIP. 19731005 200212 2 003







Mengetahui,
Ketua Program Magister Biologi
Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M. Si
NIP. 19741018 200312 2 002

**AKTIVITAS ANTIKANKER
EKSTRAK DAUN KESAMBI (*Scheichera oleosa*)
TERHADAP SEL HEPAR TIKUS (*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
(7,12-Dimethylbenz(α)antrasena) (DMBA) SECARA *IN VITRO***

Tesis

Oleh:
LIL HANIFAH
NIM. 19820005

telah dipertahankan
di depan Dewan Penguji Tesis dan dinyatakan diterima
sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar
Magister Sains (M.Si) Tanggal: 25 Juni 2021

Ketua Penguji	: Prof. Dr. Retno Susilowati, M.Si	()
	NIP. 19671113 199402 2 001	
Anggota Penguji I	: Prof. Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes	()
	NIP. 198002032009122003	
Anggota Penguji II	: Prof. Dr. drh. Bayyinatul M, M. Si	()
	NIP. 19741018 200312 2 002	
Anggota Penguji III	: Dr. Kiptiyah, M. Si	()
	NIP. 197310052002122003	



Mengesahkan,
Ketua Program Magister Biologi

Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si
NIP. 19741018 200312 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Lil Hanifah
NIM : 19820005
Program Studi : Magister Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Aktivitas Antikanker Ekstrak Daun Kesambi
(*Scheichera Oleosa*) Terhadap Sel Hepar
Tikus (*Rattus Norvegicus*) yang Diinduksi
(7,12-Dimethylbenz(A)Antrasena) (DMBA)
Secara *In Vitro*

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tesis yang saya tulis ini benar-banar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan Tesis ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi akademik maupun hukum atas perbuatan tersebut.

Malang,

Yang membuat pernyataan,



Lil Hanifah
NIM. 19820005

PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

Tesis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

Aktivitas Antikanker Ekstrak Daun Kesambi (*Scheichera Oleosa*) Terhadap Sel Hepar Tikus (*Rattus Norvegicus*) yang Diinduksi (7,12-Dimethylbenz(A)Antrasena) (DMBA) Secara *In Vitro*

Lil Hanifah, Bayyinatul Muchtaromah, Kiptiyah

Program Studi Magister Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAK

Kesambi (*Schleichera oleosa*) merupakan tanaman yang mempunyai peran sangat penting sebagai antioksidan, antimikroba dan antikanker. telah diketahui mengandung senyawa turunan terpenoid yaitu sterols scheicherastins 1-7 serta scheicherol 1 dan scheicherol 2. Scheicherastins yang diisolasi ini mampu menjadi penghalang bagi pertumbuhan sel kanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap aktivitas antikanker ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) terhadap sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi (7,12-Dimethylbenz(A)Antrasena) (DMBA) secara *in vitro*. Ekstrak daun kesambi diperoleh dengan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol 96%. Pengujian aktivitas antikanker terhadap pengaruh konfluenitas menggunakan *ImageJ*, pengujian terhadap viabilitas menggunakan metode *MTT Assay* yang sekaligus untuk mengetahui nilai IC_{50} berdasarkan absorbansinya. Analisa siklus sel menggunakan *flowcytometri* dan dilakukan pembacaan dengan program *cell quest*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pengaruh ekstrak daun kesambi terhadap konfluenitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) ditunjukkan pada perlakuan P2 (400 $\mu\text{g/mL}$) yang mampu menurunkan persentase konfluenitas menjadi 6,22%. Pengaruh ekstrak daun kesambi terhadap viabilitas ditunjukkan pada perlakuan P2 (400 $\mu\text{g/mL}$) dengan nilai 49,7% dengan nilai IC_{50} sebesar 15,77 $\mu\text{g/mL}$ < 1000 $\mu\text{l/mL}$ sehingga berpotensi sebagai antikanker. Sedangkan pengaruh terhadap siklus sel ditunjukkan pada perlakuan P4 (800 $\mu\text{g/mL}$) terjadi penurunan persentase sel dari jumlah sel awal 52,5% menjadi 7,9% pada fase sub G-G1. Pemberian ekstrak daun kesambi mempengaruhi penurunan tingkat konfluenitas, viabilitas yang ditunjukkan pada nilai sitotoksitasnya serta mempengaruhi regulasi siklus sel hepar yang diinduksi 7,12-DMBA.

Kata kunci: Antikanker, Ekstrak Daun Kesambi, 7,12-DMBA, *In Vitro*

**Anticancer Activity of Kesambi (*Scheichera Oleosa*) Leaf Extract Against
Rat Liver Cells (*Rattus Norvegicus*) In Vitro Induced (7,12
Dimethylbenz(A)Anthracena) (DMBA)**

Lil Hanifah, Bayyinatul Muchtaromah, Kiptiyah

Magister Biology Study Program, Sains and Technology Faculty, Islamic State
University Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRAC

Kesambi (*Schleichera oleosa*) is a plant that has a very important role as an antioxidant, antimicrobial and anticancer. Kesambi has been known to contain terpenoid derivative compounds, namely sterols scheicherastins 1-7 and scheicherol 1 and scheicherol 2. These isolated scheicherastins can be a barrier to the growth of cancer cells. This study aimed to reveal the anticancer activity of kesambi leaf extract (*Scheichera oleosa*) against rat liver cells (*Rattus norvegicus*) induced (7,12-*Dimethylbenz(A)Anthracena*) (DMBA) in vitro. Kesambi leaf extract was obtained by maceration extraction method with 96% methanol as solvent. Testing of anticancer activity on the effect of confluency using *ImageJ*, testing of viability using the MTT Assay method which is also to determine the IC50 value based on absorbance. Cell cycle analysis using *flowcytometry* and readings carried out with the cell quest program. The results of this study showed that the effect of kesambi leaf extract on rat liver cell confluency *Rattus norvegicus* was shown in P2 treatment (400 µg/mL) which was able to reduce the percentage of confluency to 6.22%. The effect of kesambi leaf extract on viability was shown in treatment P2 (400 µg/mL) with a value of 49.7% with an IC50 value of 15.77 g/mL < 1000 l/mL so that it has potential as an anticancer. While the effect on the cell cycle was shown in treatment P4 (800 µg/mL) there was a decrease in the percentage of cells from the initial cell number of 52.5% to 7.9% in the sub G-G1 phase. Kesambi leaf extract affected the decrease in confluency level, viability indicated by its cytotoxicity value and affected the regulation of liver cell cycle induced by 7,12-DMBA.

Keyword: Anticancer, Kesambi Leaf Extrac, 7,12-DMBA, *In Vitro*

نشاط مضاد للسرطان من مستخلص أوراق كيسامبي (*Scheichera Oleosa*) ضد خلايا كبد الجرذان (*Rattus Norvegicus*) في المختبر (DMBA-7,12) (*Dimethylbenz (α) Anthracena*)

Lil Hanifah, Bayyinatul Muchtaromah, Kiptiyah

برنامج دراسة ماجستير الأحياء ، كلية العلوم والتكنولوجيا ، جامعة مولانا مالك إبراهيم الحكومية الإسلامية (UIN) مالانج

نبذة مختصرة

نبا Kesambi (*Schleichera oleosa*) هو نبات له دور مهم جدًا كمضاد للأكسدة ومضاد للميكروبات ومضاد للسرطان. من المعروف أنها تحتوي على مركبات مشتقة من التربينويد ، وهي ستيرول و scheicherastins 1-7 و scheicherol 1 و scheicherol 2. هذه الشيكيراستين المعزولة قادرة على أن تصبح حاجزًا أمام نمو الخلايا السرطانية. هدفت هذه الدراسة إلى الكشف عن النشاط المضاد للسرطان لمستخلص أوراق كيسامبي (*Scheichera oleosa*) ضد خلايا كبد الفئران (*Rattus norvegicus*) التي يسببها (DMBA-7,12) (*Dimethylbenz (A) Anthracena*) في المختبر. تم الحصول على مستخلص أوراق كيسامبي بطريقة الاستخلاص النقع مع 96٪ ميثانول كمذيب. اختبار النشاط المضاد للسرطان على تأثير الالتحام باستخدام *ImageJ* ، واختبار الجدوى باستخدام طريقة MTT Assay التي تهدف أيضًا إلى تحديد قيمة IC50 بناءً على الامتصاصية. تحليل دورة الخلية باستخدام قياس التدفق الخلوي والقراءات التي يتم إجراؤها باستخدام برنامج البحث عن الخلايا. أظهرت نتائج هذه الدراسة أن تأثير مستخلص أوراق الكيسامبي على التقاء خلايا كبد الفئران ظهر في معاملة P2 (400 ميكروغرام / مل) والتي كانت قادرة على تقليل نسبة الالتحام إلى 6.22٪. تم عرض تأثير مستخلص أوراق الكيسامبي على الجدوى في المعالجة P2 (400 جم / مل) بقيمة 49.7٪ بقيمة IC50 15.77 جم / مل > 1000 لتر / مل بحيث يكون لها إمكانية كمضاد للسرطان. بينما ظهر التأثير على دورة الخلية في المعاملة P4 (800 جم / مل) كان هناك انخفاض في النسبة المئوية للخلايا من رقم الخلية الأولي من 52.5٪ إلى 7.9٪ في المرحلة الفرعية G-G1. أثرت إدارة مستخلص أوراق kesambi على انخفاض مستوى التقاء ، والجدوى التي أشارت إليها قيمة السمية الخلوية وأثرت على تنظيم دورة خلايا الكبد الناتجة عن DMBA-7,12

الكلمات الرئيسية: مضاد للسرطان ، مستخلص أوراق كيسامبي ، DMBA-7,12 ، في المختبر

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Bismillahirrohmaanirrohiim, segala puji bagi Allah Tuhan semesta alam karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini yang berjudul “Aktivitas Antikanker Ekstrak Daun Kesambi (*Scheichera Oleosa*) Terhadap Sel Hepar Tikus (*Rattus Norvegicus*) yang Diinduksi (7,12-Dimethylbenz(A)Antrasena) (DMBA) Secara *In Vitro*”. Tidak lupa pula shalawat dan salam disampaikan kepada junjungan Nabi besar Muhammad SAW. yang telah menegakkan Addiinul Islam yang terpatri hingga akhirul zaman. Aamiin.

Berkat bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak maka penulis mengucapkan terima kasih yang tak terkira khususnya kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si selaku Ketua Program Magister Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Prof. Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si dan Dr. Kiptiyah, M.Si selaku pembimbing yang telah membimbing penulis dengan penuh kesabaran dan keikhlasan dalam meluangkan waktu untuk membimbing penulis sehingga tugas akhir ini dapat terselesaikan.
5. Seluruh dosen dan tenaga kependidikan di Program Magister Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
6. Kedua orangtua dan keluarga tercinta yang telah memberikan doa, dukungan serta motivasi kepada penulis.
7. Teman-teman Magister Biologi angkatan 2019/ 2020.

Semoga amal baik yang telah diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Allah SWT. Tesis ini sudah ditulis secara cermat dan sebaik-baiknya, namun apabila ada kekurangan, saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, 20 Juni 2021

Penulis

DAFTAR ISI

COVER	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERSETUJUAN	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS	vi
ABSTRAK BAHASA INDONESIA.....	vii
ABSTRAK BAHASA INGGRIS	viii
ABSTRAK BAHASA ARAB	ix
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	8
1.3 Tujuan Penelitian	9
1.4 Manfaat Penelitian	9
1.5 Hipotesis.....	9
1.6 Batasan Masalah.....	9
BAB II KAJIAN PUSTAKA	10
2.1 Tinjauan tentang Kesambi (<i>Scheichera oleosa</i>).....	10
2.2 Kandungan Senyawa Kimia dan Manfaat Kesambi (<i>Scheichera oleosa</i>) Sebagai Antikanker	14
2.3 Kanker	18
2.3.1 Tinjauan Umum Kanker	18
2.3.2 Karakteristik Sel Kanker	19
2.3.3 Karsinogenesis.....	21
2.4 Siklus Sel	24
2.5 Apoptosis	28
2.6 Hepar	34
2.6.1 Anatomi Hepar	34
2.6.2 Perkembangan Kultur Sel Hepar	38
2.6.3 Karakteristik Sel Hepar dalam Kultur <i>In Vitro</i>	39
2.6.4 Kanker Hepar.....	40
2.7 Senyawa Penginduksi <i>7,12-dimetil(α)antrasen</i> (DMBA) pada Sel Hepar	43
2.8 Kerangka Konseptual.....	46
2.9 2.8.1 Uraian Kerangka Konseptual.....	47
BAB III METODE PENELITIAN.....	49
3.1 Rancangan Penelitian	49
3.2 Variabel Penelitian	49
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	49

3.4 Alat dan Bahan.....	50
3.4.1 Alat	50
3.4.2 Bahan.....	50
3.5 Prosedur Penelitian	50
3.5.1 Ekstraksi Daun Kesambi.....	50
3.5.2 Pembuatan Media <i>Stock</i> DMEM	51
3.5.3 Isolasi dan Kultur Sel Hepar Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	51
3.5.4 Pembagian Kelompok Perlakuan	52
3.5.5 Induksi Perlakuan DMBA pada Sel Hepar Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	53
3.5.6 Pengamatan Konfluenitas Sel Hepar Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>).....	53
3.5.7 Pengamatan Viabilitas Sel Hepar Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	54
3.5.8 Uji Sitotoksitas Ekstrak Daun Kesambi Terhadap Sel Hepar Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi DMBA.....	54
3.5.9 Pengamatan Siklus Sel Menggunakan <i>Flowcytometry</i>	56
3.6 Analisis Data	57
3.7 Alur Kerja Penelitian.....	59
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	60
4.1 Pengaruh Ekstrak Daun Kesambi (<i>Scheichera oleosa</i>) Terhadap Konfluenitas Sel Hepar Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi 7,12-DMBA Secara <i>In Vitro</i>	60
4.2 Pengaruh Ekstrak Daun Kesambi (<i>Scheichera oleosa</i>) Terhadap Viabilitas Sel Hepar Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi 7,12-DMBA Secara <i>In Vitro</i>	70
4.3 Aktivitas Antikanker Ekstrak Daun Kesambi (<i>Scheichera oleosa</i>) Terhadap Siklus Sel Hepar Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi 7,12-DMBA Secara <i>In Vitro</i>	77
BAB V PENUTUP	85
5.1 Kesimpulan	85
5.2 Saran.....	85
DAFTAR PUSTAKA	86
LAMPIRAN	95

DAFTAR TABEL

No	Judul	Halaman
1.	Ringkasan ANOVA Pengaruh Ekstrak Daun Kesambi (<i>Scheichera oleosa</i>) Terhadap Konfluenitas Sel Hepar Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi 7,12-DMBA Secara <i>In Vitro</i>	66
2.	Ringkasan UJD 5% Pengaruh Ekstrak Daun Kesambi (<i>Scheichera oleosa</i>) Terhadap Konfluenitas Sel Hepar Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi 7,12-DMBA Secara <i>In Vitro</i>	66
3.	Ringkasan ANOVA Pengaruh Ekstrak Daun Kesambi (<i>Scheichera oleosa</i>) Terhadap Viabilitas Sel Hepar Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi 7,12-DMBA Secara <i>In Vitro</i>	72
4.	Ringkasan UJD 5% Pengaruh Ekstrak Daun Kesambi (<i>Scheichera oleosa</i>) Terhadap Viabilitas Sel Hepar Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi 7,12-DMBA Secara <i>In Vitro</i>	72
5.	% Viabilitas Sel Pada Setiap Konsentrasi Ekstrak Daun Kesambi (<i>Scheichera oleosa</i>) Melalui Pembacaan Absorbansi	73
6.	Persentase Siklus Sel Hepar <i>Rattus norvegicus</i> Yang Diinduksi 7,12-DMBA Dengan Pemberian Ekstrak Daun Kesambi (<i>Scheichera Oleosa</i>)	80

DAFTAR GAMBAR

No	Gambar	Halaman
1.	Morfologi Daun Kesambi (<i>Schleichera oleasa</i>).....	12
2.	Struktur Senyawa Scheicherastins pada Kesambi (<i>Scheichera oleosa</i>)....	16
3.	Siklus Sel.....	28
4.	Hepar Tampak Anterior dan Permukaan Posterior	38
5.	Kultur primer sel hepar <i>Tupai javanica</i>	40
6.	Metabolisme DMBA dan Pembentukan Genotoksik.....	44
7.	Kultur Primer Sel Hepar Hamster	45
8.	Konfluenitas Sel Hepar Tikus (<i>Rattus nirvegicus</i>).....	61
9.	Hasil <i>Flowcytometry</i> Apoptosis Pada Setiap Perlakuan	77
10.	hasil <i>Flowcytometry</i> Siklus Sel Hepar <i>Rattus Norvegicus</i> Yang Diinduksi 7,12-DMBA Pada Setiap Perlakuan.....	79

DAFTAR SINGKATAN

Simbol/Singkat	Keterangan
DNA	Deoxyribonucleic acid
PAH	<i>Polycyclic Aromatic Hidrocarbons</i>
DMBA	7,12 dimetilbenz(α)antrasen
CYP	<i>Cytochrome</i>
kDA	Kilodalton
Fase S	Fase Sintesis
Fase M	Fase Mitosis
Fase G	Fase Gap
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i>
CYP	<i>Cytochrome</i>
LAF	<i>Laminar Air Flow</i>
TCD	<i>Tissue Culture Disk</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
MTT	3-(4,5dimetiltiazol-2-yi)0-2,5-difeniltetra-zolium bromide
DI	<i>deionized water</i>
PBS	Phospat Buffer Saline
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
PI	<i>Promide Iodide</i>
MK	Media Kultur
IC50	<i>Inhibitor Concentration 50</i>
μ l	Mikroliter
$^{\circ}$ C	Derajat Celcius
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan rusaknya mekanisme pengaturan dasar perilaku sel, khususnya mekanisme pertumbuhan dan diferensiasi sel (Achmad dkk., 2014). Menurut Muti'ah (2015) kanker atau dikenal sebagai neoplasma ganas adalah penyakit yang ditandai dengan kelainan siklus sel yang menyebabkan kemampuan sel untuk tumbuh tidak terkendali, menyerang jaringan biologis di dekatnya dan bermigrasi ke jaringan tubuh yang lain (metastase).

Kanker terjadi karena adanya kesalahan atau kegagalan sel-sel dalam melakukan proses apoptosis (proses kematian sel) sehingga mengakibatkan tidak terkendalinya faktor pertumbuhan. Proses terjadinya kanker disebut karsinogenesis, yang diawali peningkatan proliferasi sel yang mengalami mutasi genetik sehingga terjadi proliferasi sel secara berlebihan. Sel kanker diawali dengan proses mutasi DNA, proliferasi sel secara berlebihan dan tidak terkontrol, sehingga menyebabkan apoptosis menurun secara signifikan (Achmad dkk., 2014).

Angka kejadian penyakit kanker di Indonesia (136,2 per 100.000 penduduk) berada pada urutan 8 di Asia Tenggara, sedangkan di Asia urutan ke 23. Angka kejadian tertinggi di Indonesia untuk laki laki adalah kanker paru yaitu sebesar 19,4 per 100.000 penduduk dengan rata-rata kematian 10,9 per 100.000 penduduk, yang diikuti dengan kanker hati sebesar 12,4 per 100.000 penduduk

dengan rata-rata kematian 7,6 per 100.000 penduduk. Angka kejadian untuk perempuan yang tertinggi adalah kanker payudara yaitu sebesar 42,1 per 100.000 penduduk dengan rata-rata kematian 17 per 100.000 penduduk yang diikuti kanker leher rahim sebesar 23,4 per 100.000 penduduk dengan rata-rata kematian 13,9 per 100.000 penduduk (Kemenkes RI, 2020).

Beberapa faktor yang menyebabkan meningkatnya kejadian kanker hepar diidentifikasi berasal dari faktor keturunan dan lingkungan. Kedua faktor tersebut menunjukkan hubungan yang signifikan pada kanker hepar (McMaster, 2011). Salah satu faktor lingkungan yang menyebabkan kanker hepar adalah bahan kimia yang bersifat karsinogen. Menurut Kurlila (2018), bahan kimia yang bersifat karsinogen tersebut disebut senyawa *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* (PAH).

PAH merupakan kontaminan lingkungan yang dapat terdistribusi secara luas dan mempunyai efek biologis yang merugikan, bersifat toksik, mutagenitas serta karsinogenitas (Haritash dan Kaushik, 2009). PAH mempunyai sifat hidrofobik sehingga sulit untuk diekskresikan oleh tubuh dan biasanya terakumulasi pada jaringan hepar, ginjal maupun adiposa atau lemak tubuh. PAH mempunyai struktur molekul yang menyerupai basa nukleat (adenosin, timin, guanin, sitosin) sehingga dapat dengan mudah menyisip pada untaian DNA. Akibatnya fungsi DNA akan terganggu dan apabila terjadi kerusakan yang fatal yang tidak dapat diperbaiki maka akan menyebabkan penyakit, salah satunya kanker (Elisabeth, dkk., 2000).

Hepar merupakan organ tubuh yang mempunyai peran penting dalam proses metabolisme, konjugasi dan detoksifikasi. Sehingga hepar rentan mengalami kerusakan. Kerusakan hepar dapat disebabkan oleh peradangan yang

sebagian besar merupakan akibat infeksi virus, paparan alkohol, keracunan obat-obatan atau bahan kimia (Maulina, 2018).

Hepar mengandung lebih banyak enzim untuk proses metabolisme. Akan tetapi hasil metabolisme beberapa obat bersifat lebih toksik, sehingga mampu membentuk ikatan kovalen dengan asam nukleat dan dapat menyebabkan karsinogenesis. Kepekaan terhadap senyawa karsinogen tersebut dikarenakan adanya reaksi oksidasi enzim sitokrom P450 (CYP) yang terikat dengan retikulum endoplasma sel hepar, sehingga rentan terhadap kanker (Kurlila, 2013).

Rowlands *et. al* (2001) menyatakan bahwa pada ekspresi CYP1 yang diinduksi oleh senyawa PAH terdapat pada zat karsinogen 7,12-dimetilbenz(α)antrasen (DMBA). DMBA adalah prokarsinogen yang bekerja secara tidak langsung dan membutuhkan metabolik untuk menjadi produk yang aktif yaitu *ultimate carcinogen* (bekerja secara langsung) berupa DMBA-3,4-dihydrodiol-1,2-epoxide.

Metabolik DMBA menjadi produk aktif *ultimate carcinogen* melibatkan proses dua oksidasi terpisah oleh enzim CYP (*cytochrome* P450). Oksidasi pertama menghasilkan 3,4-dihydrodiol dan dikatalis oleh CYP1A1 atau CYP1B1. Sedangkan oksidasi kedua menghasilkan metabolit mutagenik yaitu 3,4-dihydrodiol-1,2-epoxide yang dikatalis oleh CYP1B1. CYP1A1 dan CYP1B1 termasuk enzim bioaktivasi karsinogen yang menyebabkan DNA *adduct* yang menentukan mutasi dalam gen dan mampu mengendalikan siklus sel, sehingga mendorong pembelahan sel kanker (Rowland *et al.*, 2001).

Sel kanker yang terbentuk dari aktivitas karsinogen akan menyebabkan mutasi DNA, hal ini dikarenakan DNA sebagai komponen dasar gen. Sel-sel yang

mengalami kerusakan genetik tidak peka terhadap mekanisme regulasi siklus sel normal sehingga akan terjadi proliferasi tanpa terkontrol. Mutasi yang terjadi pada DNA di dalam gen yang meregulasi siklus sel (pertumbuhan, kematian dan pemeliharaan sel) akan mengakibatkan penyimpangan siklus sel (Parwata, 2014).

Pada saat terjadi kerusakan DNA, protein supresor tumor TP53 (p53; yaitu suatu protein fosforilasi dengan berat molekul 53 kDa) akan distabilkan dan menginduksi transkripsi CDKN1A (p21), suatu inhibitor CDK. Inhibitor ini menahan sel dalam fase G1 atau G2 sampai DNA dapat diperbaiki; pada tahapan tersebut, kadar TP53 menurun, CDKN1A berkurang, dan sel dapat melanjutkan tahapan. Jika kerusakan DNA terlalu luas, TP53 akan memulai suatu kaskade peristiwa untuk meyakinkan sel agar melakukan bunuh diri (apoptosis) (Kumar *et al.*, 2012).

Pada siklus sel peka terhadap bahan yang bersifat prokarsinogen seperti 7, 12-dimetilbenz(α)antrasen (DMBA). Pada pembelahan sel hepar terdapat fase yang peka adanya senyawa toksik yang reaktif. Fase sintesis DNA (fase S) adalah paling peka bagi senyawa toksik karsinogen dan rentan terhadap efek mutagenik (Kurlila, 2018). Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Freshney (2010), bahwa pada fase S inilah ditentukan integritas dari DNA untuk menghentikan siklus sel dalam melakukan perbaikan atau masuk ke jalur apoptosis jika tidak memungkinkan untuk dilakukan perbaikan.

Allah menciptakan segala apa yang ada di alam ini dalam keadaan seimbang. Tubuh manusia pun diciptakan Allah dalam keadaan seimbang. Sebagaimana yang difirmankan-Nya dalam surat al-Infithar ayat 7 berikut ini:

الَّذِي خَلَقَكَ فَسَوَّنَكَ فَعَدَلَكَ ﴿٧﴾

Artinya: Yang telah menciptakan kamu lalu menyempurnakan kejadianmu dan menjadikan (susunan tubuh)mu seimbang, (Q.S al-Infithar:7)

Keseimbangan dalam tubuh manusia yang dimaksud dalam ayat tersebut tidak hanya secara bentuk saja, melainkan juga proses-proses metabolisme yang terjadi di dalamnya. Jika terdapat salah satu proses metabolisme yang tidak seimbang, maka akan terjadi suatu kelainan atau yang kita kenal sebagai penyakit.

Beberapa usaha pengobatan kanker hati telah dilakukan secara intensif yaitu dengan kemoterapi dan radioterapi. Namun pengobatan tersebut masih belum mampu secara efektif menanggulangi kanker. Kegagalan yang sering terjadi dalam pengobatan kanker, utamanya melalui kemoterapi adalah disebabkan karena rendahnya selektifitas obat-obat antikanker terhadap sel normal sehingga menimbulkan efek samping yang serius pada pasien. Selain itu kegagalan kemoterapi tersebut juga disebabkan karena resistensi sel kanker terhadap agen-agen kemoterapi. Fenomena resistensi tersebut membawa konsekuensi pada semakin meningkatnya dosis terapi. Strategi terapi yang tepat sangat diperlukan untuk mengatasi permasalahan tersebut (Muti'ah dkk., 2015).

Pemanfaatan tanaman sebagai obat menjadi salah satu solusi dalam mengatasi permasalahan-permasalahan yang timbul akibat resistensi tertentu pada proses terapi, dikarenakan tanaman obat sudah sejak zaman dahulu digunakan sebagai alternatif pengobatan karena dianggap mempunyai nilai kebermanfaatan yang lebih tinggi dibanding efek samping.

Hal ini sesuai dengan pernyataan Bathia *et.al.*, (2012) penggunaan tanaman sebagai obat saat ini sudah menjadi hal yang penting bagi masyarakat dan sudah diwariskan secara turun temurun. Salah satu tanaman yang mempunyai

manfaat yang sangat penting untuk pengobatan atau penyembuhan secara tradisional bagi masyarakat adalah kesambi (*Schleichera oleosa*) (Anuraghi dan Mishra, 2017).

Kita sebagai manusia yang diberikan kelebihan akal oleh Allah SWT dibanding dengan makhluk lain seharusnya selalu memperhatikan, memikirkan serta merenungkan segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah di alam ini, termasuk tumbuhan yang ada di sekitar kita. Sebagaimana firman-Nya dalam surat Asy-syu'araa' ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya: Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik? (Q.S Asy-Syu'araa':7).

Pada ayat ini Allah mengajak manusia untuk belajar dari alam, agar mengetahui bahwa hanya Allah saja yang berhak untuk disembah. “*Dan apakah mereka yaitu orang musyrik itu tidak memperhatikan apa yang mereka lihat di hamparan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan tumbuh-tumbuhan yang baik dan membawa banyak sekali kemanfaatan bagi manusia. Bukankah itu pertanda atas kekuasaan Allah, dan anugerah-Nya yang tak terhingga kepada manusia?*” (Kemenag, 2020). Dari ayat ayat tersebut kita sebagai manusia diharapkan dapat selalu memperhatikan dan mempelajari bahwa segala sesuatu yang datang dari Allah SWT selalu mendatangkan kebaikan dan manfaat serta tidak ada yang sia-sia, termasuk tanaman Kesambi (*Schleichera oleosa*).

Kesambi (*Schleichera oleosa*) tergolong dalam famili Sapindaceae yang mengandung unsur fitokimia yang sangat penting sehingga mempunyai manfaat sangat besar dalam proses antimikroba, antioksidan, antikanker dan dapat digunakan untuk produksi biodiesel (Sakagami *et.al*, 2000). Isolasi kesambi menghasilkan tujuh sterols scheicherastins (1-7) serta scheicherol 1 dan scheicherol 2. Scheicherastins yang diisolasi ini mampu menjadi penghalang bagi pertumbuhan sel kanker (Pettit *et.al*,2000).

Pada hasil ekstraksi menggunakan metanol dinilai mampu melawan sel P-388 yang merupakan cell line *lympocitic* leukimia. Isolat scheicherastins juga dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan CNS SF-295, colon KM 20L2, lung NCI-H460, ovary OVCAR-3, pancreas BXPC-3, dan *cell line* kanker prostat (Pettit *et.al*, 2000). Scheicherastins ini merupakan turunan dari terpenoid. Berdasarkan hasil *molecular docking* pada penelitian yang dilakukan oleh (Pratiwi, 2020) bahwa terdapat interaksi senyawa aktif tersebut dengan protein 3ERT dalam menghambat pertumbuhan sel kanker.

Mekanisme kerja golongan terpenoid dalam menghambat sel kanker adalah dengan cara memblok siklus sel pada fase M (mitosis atau pembelahan sel) dengan menstabilkan benang-benang *spindle*. Benang-bennag *spinlde* berfungsi untuk mempertahankan bentuk sel dan mengatur pergerakan kromosom dalam pembelahan sel, sehingga ketika sel kanker berinteraksi dengan senyawa terpenoid akan menyebabkan tahapan mitosis terhambat yang selanjutnya akan terjadi penghambatan proliferasi sel dan memicu terjadinya apoptosis (Setiawati *et.at*, 2010).

Ekstrak kesambi juga mempunyai potensi sitotoksik. Hal ini dikemukakan oleh Thind *et.al*, (2010), bahwa ekstrak kesambi juga mempunyai potensi sitotoksik yang berbeda pada *cell line* seperti pada 502713 (colon), SW-520 (colon), A-549 (lungs), HEP-2 9 liver), SK-NS-H (central nervous system) dan IMR-32 (neuroblastoma). Etil asetat, metanol, dan ekstrak air menunjukkan sitotoksisitas yang signifikan terhadap semua *cell line*, kecuali IMR-32. Potensi sitotoksik berkorelasi dengan hidroksilnya sebagai penyeimbang radikal. Ekstrak heksana dan kloroform ditemukan memiliki kemampuan pembersihan radikal hidroksil paling sedikit, karenanya paling sedikit sitotoksisitas terhadap *cell line* yang berbeda (Bathia *et.al.*, 2012).

Berdasarkan hal tersebut diatas, potensi senyawa aktif kesambi (*Scheichera oleosa*) sebagai antikanker secara in vitro dilaporkan sudah dilakukan pada beberapa *cell line*, akan tetapi untuk aktivitas antikanker pada sel primer belum pernah dilakukan (diteliti) sebelumnya. Sehingga perlu dilakukan penelitian untuk pengembangan metode baru. Maka penelitian ini akan mengkaji aktivitas antikanker ekstrak daun Kesambi (*Schleichera oleosa*) terhadap sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12-dimetilbenz(α)antrasen (DMBA) secara in vitro.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana pengaruh ekstrak metanol daun kesambi (*Scheichera oleosa*) terhadap konfluenitas, viabilitas, dan siklus sel hepar dari tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah tersebut maka tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak metanol daun kesambi (*Scheichera oleosa*) terhadap konfluenitas, viabilitas dan siklus sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Ekstrak daun Kesambi (*Schleichera oleosa*) dapat digunakan sebagai salah satu alternatif pengembangan pencegahan dan pengobatan penyakit, salah satunya penyakit kanker.
2. Menambah pengetahuan tentang manfaat tanaman kesambi (*Schleichera oleosa*) sebagai tanaman yang berkhasiat obat.
3. Dapat digunakan sebagai dasar pengembangan penelitian selanjutnya.

1.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah ekstrak metanol daun kesambi (*Scheichera oleosa*) mempunyai pengaruh terhadap konfluenitas, viabilitas dan siklus sel hepar dari tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA secara *in vitro*.

1.6 Batasan Masalah

1. Sel hepar yang digunakan adalah sel hepar yang berasal dari bayi tikus (*Rattus norvegicus*) yang berumur 2-3 hari.

2. Media kultur yang digunakan adalah DMEM dengan penambahan *Fetal Bovine Serum* (FBS) sebagai suplemen tambahan.
3. Parameter penelitian ini meliputi konfluenitas sel hepar, viabilitas sel hepar, uji sitotoksitas ekstrak daun kesambi terhadap sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA serta pengamatan siklus sel dengan *flowcytometry*.
4. Sel hepar yang mengalami kerusakan akibat induksi DMBA dicirikan dengan adanya pertumbuhan sel yang abnormal dan proliferasi yang berlebihan.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Kesambi (*Scheichera oleosa*)

Pohon kesambi (*Schleichera oleosa*) tumbuh alami di lembah Himalaya, Srilanka dan Indonesia. Di Indonesia, kesambi banyak tumbuh di Jawa, Bali, Nusa Tenggara, Sulawesi, Maluku, pulau Seram dan pulau Kai. Di Jawa Timur banyak ditemukan di Panarukan, Probolinggo, Pasuruan dan Besuki. Pemanfaatan kesambi (*Schleichera oleosa*) masih banyak dilakukan pada biji dikarenakan biji kesambi dapat digunakan sebagai biofuel (Heyne, 1987). Selain itu, kesambi (*Schleichera oleosa*) mempunyai unsur fitokimia yang sangat penting diantaranya adalah terpenoid, fenolic acid, betulin, betulin acid dan lain-lain, sehingga mempunyai manfaat sangat besar dalam proses antimikroba, antioksidan, antikanker dan dapat digunakan untuk produksi biodiesel (Anuraghi & Mishra, 2017). Berikut ini adalah klasifikasi dari kesambi (*Schleichera oleosa*):

Divisi : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Bangsa : Sapindales
Suku : Sapindaceae
Marga : Schleichera
Jenis : Schleichera oleosa (Lour) Oken (Heyne, 1987).



Gambar 2.1. Morfologi **Daun Kesambi** (*Schleichera oleosa*) (Suita, 2012)

Kesambi ditemukan tumbuh di daratan rendah yang beriklim kering sampai ketinggian 600 m dpl, biasanya ditanam pada daerah pantai sampai ketinggian 250 m dpl. Di Jawa sendiri kesambi ditemukan pada ketinggian rendah, namun dapat juga ditemukan pada ketinggian hingga (900–1200) m. Kesambi membutuhkan curah hujan tahunan 750 – 2500 mm. Tumbuhan ini mampu hidup pada suhu maksimum 35– 47.5°C dan suhu minimum 2,5°C. Kesambi tumbuh pada tanah kering, hingga terkadang pada tanah yang berawa. Kondisi tanah kadang berbatu, kerikil, dan liat, memiliki drainase yang baik dan lebih disukai tanah yang sedikit masam. Kawasan 3 hutan produksi yang tidak produktif dan lahan kritis di luar kawasan hutan dapat ditanami kesambi (Suita, 2012).

Pohon kesambi dapat mencapai tinggi hingga 40 m, dengan diameter hingga 2 m. Biasanya batang pohon kesambi selalu bengkok dan bermata kayu serta berbanir. Kulitnya halus, berwarna abu-abu. Batangnya silindris, berkerut, dan tipis, berbulu pendek berwarna kuning kemerahan ketika muda dengan kelenjar tertentu, hitam, kemudian coklat kekuningan seperti abu. Daunnya bersirip genap, anak daun terakhir seringkali seperti ujung anak daun. Bentuk

daunnya lanset, berseling, panjang 11-25 cm, lebar 2-6 cm, tepi rata, ujung lancip, pertulangan menyirip, tangkai bulat, panjang + 1 cm dan berwarna hijau. Bunga terletak pada bagian cabang yang tidak berdaun, kadang-kadang terletak diketiak daun, warna kuning pucat hingga hijau pucat. Bunga kesambi adalah bunga majemuk, berbentuk tandan, di ketiak daun atau ujung batangan, kelopak 4-6 lembar, bersatu di pangkal, berduri, hijau dan warna mahkotanya putih. Buah dan biji berbentuk bulat dengan diameter biji 6-10 cm, buah terdiri atas 1 - 2 biji, biji dikelilingi oleh kulit berwarna coklat kehitaman. Termasuk akar tunggang dan berwarna coklat muda (Suita, 2012).

Kesambi (*Schleichera oleosa*) mempunyai manfaat yang sangat besar sekali dari mulai kulit pohon, biji, kayu serta daunnya. Adapun salah satu manfaat daun kesambi (*Schleichera oleosa*) adalah sebagai obat eksem, obat kudis, obat koreng dan obat radang telinga. Untuk obat eksem dipakai \pm 15 gram daun segar kemudian dicuci dan direbus dengan 3 gelas air selama 25 menit selanjutnya disaring. Hasil saringan didinginkan sampai airnya hangat untuk mencuci eksim sampai bersih. Daun kesambi yang masih muda dapat dimakan sebagai sayur asam. Bahkan dapat dimakan mentah sebagai lalapan, walaupun rasanya agak sepat. Di Sulawesi Selatan, daun kering dari pohon kesambi dapat dibakar dan asapnya digunakan untuk pengobatan (pengasapan) penyakit kudis dan gatal-gatal (Bachli, 2007). Selain itu, daun kesambi dalam bentuk pasta dapat digunakan untuk mengobati berbagai penyakit yang disebabkan oleh bakteri (Tiwari dan Pandey, 2016).

Kayu kesambi (*Scheichera oleosa*) mmepunyai struktur yang rapat, padat, sangat keras dan lebih berat dari kayu besi. Kayu yang berusia tua warna kayu

mengalami perubahan warna dari merah ke kelabu. Kayu kesambi salah satunya dimanfaatkan sebagai bahan membuat jangkar perahu kecil (Bachli, 2007). Selain itu, dapat juga dimanfaatkan sebagai roda gerobak, bantalan rel kereta api dan peralatan pertanian (Kundu dan Schmidt, 2011).

Kulit kayu biasanya dipakai sebagai bahan untuk penyamak kulit. Menurut penelitian, di dalam kulit kayunya terdapat 6,1-14,3% zat penyamak. Pada jaman dahulu masyarakat Madura dan Bali menggunakan kulit kayu kesambi untuk mengobati penyakit, terutama penyakit kudis (Bachli, 2007).

Biji kesambi mengandung sekitar 70% minyak yang dapat digunakan untuk bahan baku membuat minyak gosok. Hasil minyak yang diekstrak dari biji kesambi disebut “minyak kusum” yang dapat digunakan dalam tata rambut, kuliner, keperluan penerangan dan pengobatan tradisional (Kundu dan Schmidt, 2011). Pada pengembangan biodiesel, biji kesambi dapat digunakan sebagai bahan pelumas, industri batik, bahan pembuat lilin dan sebagai bahan pembuat sabun (Bachli, 2007).

2.2 Kandungan Senyawa Kimia dan Manfaat Kesambi (*Scheichera oleosa*) Sebagai Antikanker

Penggunaan tanaman sebagai obat sudah dilakukan secara turun temurun oleh masyarakat kita. Pemanfaatan tanaman sebagai etnomedis ini dikarenakan salah satunya mempunyai manfaat yang cukup besar dari pada efek sampingnya. Akan tetapi, masih banyak yang belum diketahui tentang kandungan dan manfaat dari tumbuhan yang kita gunakan. Sehingga sudah menjadi tugas kita sebagai Kholifah di muka bumi ini untuk terus belajar dengan cara merenungkan dan mempelajari apa yang telah Allah SWT di alam ini untuk kita ambil manfaatnya

dan dipergunakan secara bijak, tidak terkecuali tumbuhan. Dalam Q.S surat Asy-syu'araa' ayat 7 Allah SWT berfirman:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمَا أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya: Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik? (Q.S Asy-Syu'araa':7).

Pada ayat tersebut Allah SWT berkuasa untuk menciptakan segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik yang dapat diambil manfaatnya termasuk sebagai pengobatan. Masing-masing tumbuhan yang tumbuh dengan subur dan memiliki banyak manfaat (Shihab, 2002), yaitu termasuk tumbuh-tumbuhan yang digunakan untuk pengobatan baik pada bagian daun, batang, akar maupun bunga. Akan tetapi setiap tumbuhan memiliki potensi yang berbeda. Dalam bidang pengobatan untuk mengetahui potensi masing-masing tumbuhan dengan cara mengetahui senyawa yang terkandung dalam tumbuhan tersebut.

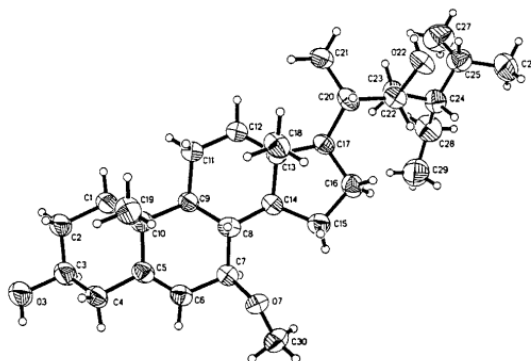
Metabolit sekunder atau yang dikenal sebagai fitokimia merupakan produk alami atau konstituen tanaman yang mempunyai sifat obat dari tanaman tempat mereka berasal (Kabera *et al.*, 2014). Metabolit sekunder memainkan peran penting dalam bagaimana organisme berurusan dengan lingkungannya dan penting untuk kelangsungan hidup mereka (Bhat *et al.*, 2009). Metabolit sekunder sering diproduksi melalui jalur sintesis yang dimodifikasi dari metabolit primer, atau berbagai substrat asal metabolit primer (Long dan Works, 2013).

Metabolit sekunder dapat ditemukan pada daun, batang, akar, atau kulit tanaman tergantung dari jenis metabolit sekunder yang dihasilkan (Anulika *et al.*,

2016). Manfaat metabolit sekunder dalam kehidupan manusia antara lain dapat digunakan sebagai obat perasa, obat penenang, terutama minyak atsiri (Savithrama *et al.*, 2011).

Kesambi (*Scheuchera oleosa*) tergolong dalam famili Sapindaceae yang mempunyai kandungan tanin rendah sehingga baik digunakan untuk makanan ternak. Akan tetapi mempunyai unsur fitokimia yang sangat penting diantaranya adalah terpenoid, fenolic acid, betulin, betulin acid dan lain-lain, sehingga mempunyai manfaat sangat besar dalam proses antimikroba, antioksidan, antikanker dan dapat digunakan untuk produksi biodiesel (Sakagami *et al.*, 2000).

Isolasi kesambi menghasilkan tujuh sterols scheicherastins (1-7) serta scheicherol 1 dan scheicherol 2. Scheicherastins yang diisolasi ini mampu menjadi penghalang bagi pertumbuhan sel kanker. Isolat scheicherastins juga dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan CNS SF-295, colon KM 20L2, lung NCI-H460, ovary OVCAR-3, pancreas BXPC-3, dan *cell line* kanker prostat. (Pettit *et al.*, 2000). Sterols scheicherastins ini diketahui merupakan salah satu turunan dari senyawa terpenoid (triterpenoid).



Gambar 2.2. Struktur Senyawa Scheicherastins pada Kesambi (*Scheuchera oleosa*) (Pettit *et.al*, 2000)

Terpenoid telah terbukti bermanfaat dalam pencegahan dan berbagai terapi penyakit, termasuk kanker. Sejumlah penelitian *in vitro* juga menunjukkan efek

sitotoksik dari berbagai terpenoid yang mampu menghambat proliferasi sel dan mampu menginvasi pertumbuhan berbagai *cell line* kanker (Thoppil dan Bishayee, 2011).

Menurut Lee *et al.*, (2000) bahwa triterpenoid yang merupakan turunan dari golongan terpenoid dapat menginduksi apoptosis pada sel HepG2 dengan cara menurunkan viabilitas sel HepG2 dengan meningkatkan pelepasan kalsium (Ca^{2+}) intraseluler yang mendorong peningkatan ekspresi gen tumor supresor p53. Kumar *et.al.*, (2012) menyatakan bahwa peningkatan kalsium sitosol mengaktifasi bermacam fosfolipase (mencetuskan kerusakan membran, protease (mengkatabolisasi protein membran dan struktural), ATPase (mempercepat deplesi membran).

Kebanyakan sel kanker meregulasi overekspresi protein antiapoptosis Bcl-2 dan Bcl-x. Protein antiapoptosis juga mencegah aktivasi sinyal protease apoptotik, seperti caspase-3. Senyawa sterol dilaporkan juga dapat menginduksi apoptosis pada sel HT-29 melalui aktivasi caspase-3, menurunkan protein Bcl-2 dan Bcl-x (Bunpo *et al.*, 2005).

Selain itu, menurut Hsu *et al.*, (2005) senyawa steroid mampu menghambat pertumbuhan sel dengan menginduksi apoptosis melalui mediator *extracellular signal-regulated kinase* dan jalur *p38 mitogen-activated protein kinase*, keduanya merupakan protein sinyal transduksi yang diaktivasi dengan fosforilasi oleh protein kinase. Dilaporkan juga bahwa senyawa tersebut dapat menghambat pertumbuhan sel kanker dengan menahan fase S-G atau M pada kanker sel payudara manusia.

2.3 Kanker

2.3.1 Tinjauan Umum Kanker

Kanker adalah suatu keadaan patologis yang ditandai dengan pembelahan sel yang tidak terkendali dan kemampuan sel-sel tersebut menyerang jaringan biologis yang masih normal lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan yang bersebelahan (invasif) atau dengan migrasi sel ke tempat yang lebih jauh dari jaringan awal yang tumbuh (metastasis). Pertumbuhan yang tidak terkendali tersebut dikarenakan terdapat kerusakan DNA, menyebabkan terjadinya mutasi di gen vital yang mengontrol pembelahan sel. Sel kanker merupakan sel yang kehilangan fungsi kontrolnya terhadap regulasi daur sel maupun fungsi homeostasis sel pada organisme multiseluler. Dikarenakan terjadinya kegagalan tersebut, sel tidak dapat berproliferasi secara normal. Akibatnya sel akan mengalami proliferasi secara terus-menerus sehingga menimbulkan pertumbuhan jaringan yang abnormal (Diananda, 2009).

Sel kanker timbul dari sel normal tubuh yang mengalami transformasi atau perubahan menjadi ganas oleh karsinogen atau karena mutasi spontan. Neoplasma adalah jaringan abnormal yang terbentuk dikarenakan aktivitas proliferasi yang tidak terkontrol (neoplasia). Pada tahap awal, neoplasma akan berkembang menjadi karsinoma in situ di mana sel-sel pada jaringan tersebut masih pada satu lokasi dan mungkin memiliki fungsional yang sama dengan sel normal. Sel neoplasma akan mengalami perubahan morfologi, fungsi, dan siklus pertumbuhan, yang pada akhirnya menimbulkan disintegrasi serta hilangnya kemampuan komunikasi antar sel. Terdapat klasifikasi dari tumor yaitu benigna dan maligna. Dikatakan benigna apabila kejadian neoplasma tersebut bersifat

jinak dan tidak menyebar ke jaringan di sekitarnya. Sebaliknya, disebut maligna apabila tumor tersebut melakukan metastasis atau pertumbuhan sel tumor yang menyebar dan menyerang jaringan lain. Sehingga maligna sering dikatakan sebagai kanker (Diananda, 2009).

2.3.2 Karakteristik Sel Kanker

Ada beberapa perbedaan yang sangat signifikan antara sel kanker dengan sel normal dalam tubuh. Ciri-ciri khusus sel kanker yang membedakannya dengan sel normal antara lain:

- a. Pada sel kanker tidak mengenal program kematian sel yang diebut dengan apoptosis. Terdapat peran dari protein p53 yang mampu mencegah replikasi dari DNA yang rusak pada sel normal dan mendorong terjadinya penghancuran sendiri dari sel yang mengandung DNA tidak normal. Peristiwa ini disebut apoptosis. Apoptosis sangat dibutuhkan untuk mengatur berapa jumlah sel yang dibutuhkan dalam tubuh, yang mana semuanya fungsional dan menempati tempat yang tepat dengan umur tertentu. Sehingga bila melewati masa hidupnya, sel-sel normal (non kanker) akan mati dengan sendirinya tanpa ada efek peradangan (inflamasi). Namun lain halnya dengan sel kanker dimana sel kanker akan terus hidup meski seharusnya mati (immortal). Terdapatnya mutasi dari gen p53 akan menyebabkan proliferasi dan transformasi sel tersebut menjadi kehilangan kendali sehingga tidak terprogram kematian sel (apoptosis) (Pecorino, 2012).
- b. Sel kanker tidak mengenal komunikasi ekstra seluler. Pada kondisi sel normal seharusnya terjadi komunikasi ekstraseluler yang diperlukan untuk menjalin

koordinasi antar sel sehingga hubungan antar sel dapat saling menunjang fungsi masing-masing. Dengan sifatnya yang tidak melakukan komunikasi ekstra seluler seperti sel kanker, sel tersebut akan bertindak semauanya sendiri tanpa peduli apa yang dibutuhkan oleh lingkungannya. Sel kanker dapat memproduksi *growth factor* sendiri, sehingga sel kanker tidak akan bergantung pada rangsangan sinyal pertumbuhan dari luar untuk melakukan proliferasi. Dengan demikian sel kanker akan dapat tumbuh menjadi tidak terkendali. Sel kanker juga tidak merespon terhadap sinyal yang dapat menghentikan pertumbuhan dan pembelahan sel. Sel kanker mampu menghindar dari sinyal anti pertumbuhan yang berhubungan dengan siklus sel, salah satu mekanismenya adalah dengan rusaknya gen Rb (Kumar *et al.*, 2014).

- c. Sel kanker mampu menyerang jaringan lain (invasif), merusak jaringan tersebut dan tumbuh subur di atas jaringan lain membentuk sel yang menyebar (metastasis). Semakin besar jangkauan metastasis tumor, kanker semakin sulit disembuhkan. Kanker pada stadium metastasis yang merupakan penyebab 90% kematian penderita kanker (Pecorino, 2012).
- d. Sel kanker akan membentuk pembuluh darah baru yang disebut dengan neoangiogenesis untuk mencukupi kebutuhan nutrisi. Neoangiogenesis dapat mengganggu kestabilan jaringan tempat di mana ia tumbuh. Sinyal inisiasi pada proses angiogenesis adalah *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan *Fibroblast Growth Factor* (FGF). Selain itu regulator yang lain adalah angiopoietin-1, angiotropin, angiogenin, *epidermal growth factor*, *granulocytecolony-stimulating factor*, interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, PDGF. TNF- α , kolagen, *cathepsin* (Kumar *et al.*, 2014).

e. Sel kanker memiliki kemampuan yang tidak terbatas dalam memperbanyak dirinya sendiri (proliferasi) meski seharusnya ia sudah tidak dibutuhkan dan jumlahnya sudah melebihi kebutuhan yang seharusnya. Dengan kemampuan untuk memenuhi kebutuhan sinyal pertumbuhan dan kemampuan menghindar dari mekanisme apoptosis, sel kanker memiliki kemampuan tak terbatas untuk bereplikasi (Kumar *et al.*, 2014). Kanker dapat timbul karena pola hidup yang tidak sehat. Hampir separuh dari kanker yang terdiagnosis setiap tahun disebabkan oleh gaya hidup yang tidak sehat. Pencetus kanker dapat berasal dari makanan yang kaya akan gula buatan, karbohidrat olahan, pengawet, produk sampingan dari hasil penggorengan (minyak jelantah), mengandung banyak lemak, asupan antioksidan yang kurang, dan minuman yang mengandung bahan kimia (minuman beralkohol) (Mueller *et al.*, 2010).

2.3.3 Karsinogenesis

Serangkaian proses berkembangnya kanker disebut karsinogenesis. Karsinogenesis adalah suatu proses terjadinya kanker melalui mekanisme multi tahap yang menunjukkan perubahan genetik dan menyebabkan transformasi progresif sel normal menjadi sel malignan (ganas). Perubahan ini diawali dari mutasi somatik satu sel tunggal yang mengakibatkan perubahan dari normal menjadi hiperplastik, displastik, dan pada akhirnya menjadi suatu keganasan atau malignansi (memiliki kemampuan metastasis atau menginvasi jaringan di sekitarnya). Perubahan genetik ini termasuk perubahan seluler mendasar pada sel kanker yang dipengaruhi oleh beberapa gen seperti *tumor suppressor genes* (pRb,

p53, PTEN, *E-cadherin*) dan *proto-oncogenes* (ras, c-myc, Bcl-2). Karsinogenesis dapat dibagi menjadi empat tahap utama, yaitu tahap inisiasi, promosi, progresi, dan metastasis (Tsao, *et al.*, 2004).

Tahap inisiasi adalah tahap pertama pada karsinogenesis dan merupakan hasil perubahan genetik yang menuntun pada proliferasi tidak terkontrol (abnormal) sebuah sel. Tahap inisiasi dapat terjadi melalui jalur germinal dan somatik. Pada kebanyakan kasus diperoleh secara somatik akibat terjadinya kesalahan acak saat pembelahan sel atau karena paparan dari karsinogen spesifik seperti tembakau dan radiasi. Pada tahap ini, senyawa yang berpotensi sebagai senyawa karsinogen diaktivasi terlebih dahulu di dalam tubuh terutama di hepar menjadi senyawa metabolitnya. Senyawa metabolit ini ada yang bersifat reaktif, mutagenik, dan mampu berikatan dengan makromolekul di dalam tubuh seperti DNA dengan ikatan irreversible. Sel yang mengalami inisiasi atau prakanker dapat kembali ke tingkat normal secara spontan, tetapi pada tingkat lebih lanjut dapat menjadi ganas (malignan) (Diananda, 2009).

Tahap promosi yang merupakan tingkat lanjutan dari tahap inisiasi. Pada tahap ini, sel mulai mengalami hiperplastik pada inti sel. Berbeda dengan tahap inisiasi yang dapat melewati jalur germinal dan somatik, tahap promosi hanya diketahui terjadi melalui jalur somatik. Pada tahap promosi, sel akan memperoleh beberapa keuntungan selektif untuk tumbuh sehingga pertumbuhannya menjadi cepat dan berubah menjadi tumor jinak. Tahap promosi tidak melibatkan perubahan struktural dari genom secara langsung, tetapi biasanya terjadi perubahan ekspresi gen yang terinisiasi (Tsao, *et al.*, 2004).

Pada tahap progresi, kemampuan pembelahan yang tinggi menuntun terbentuknya koloni sel yang lebih besar melalui perubahan genetik lebih lanjut dan munculnya keistimewaan lain seperti peningkatan mobilitas dan angiogenesis (Kumar *et al*, 2014). Pada tahap ini, sel tumor dikatakan sebagai sel malignan. Pada fase ini juga akan terjadi karsinoma dan metastasis melalui aktivasi onkogen dan malfungsi dari enzim topoisomerase (Pecorino, 2012).

Tahap metastasis merupakan tahap akhir dalam karsinogenesis. Pada tahap ini, sel kanker melakukan invasi ke jaringan lain di dalam tubuh melalui pembuluh darah, pembuluh limpa, atau rongga tubuh. Tahap metastasis dapat berlangsung karena melemahnya ikatan antarsel yang disebabkan oleh terdegradasinya CAMs (*Cell-cell Adhesion Molecules*) dan *E-cadherin* sebagai molekul yang menjaga pertautan antarsel. Molekul tersebut diketahui sudah sangat sedikit bahkan tidak ditemukan lagi pada sel kanker, sehingga proses metastasis dapat terus terjadi (Kumar *et al.*, 2014). Jika terjadi mutasi pada satu sel tunggal normal yang diakibatkan terpapar oleh karsinogen (inisiasi) akan menyebabkan progresi sel menjadi hiperplasia (promosi), displasi (progresi) dan pada akhirnya memiliki kemampuan invasi ke jaringan sekitarnya (metastasis) (Tsao *et al.* 2004).

2.4 Siklus Sel

Pembelahan sel melalui serangkaian tempat dan fase yang telah ditentukan disebut siklus sel. Siklus sel tersebut terdiri atas (secara berurutan) fase : pertumbuhan prasintesis 1, atau G1; fase sintesis DNA, atau S; fase pertumbuhan

pramitosis 2, atau. G2, dan fase mitosis, atau M. Sel istirahat berada dalam keadaan fisiologis yang disebut G0 (Kumar *et al.*, 2012).

Allah berfirman dalam Al-Qur'an surat AN-Nuh:

وَقَدْ خَلَقْنَاكُمْ أَطْوَارًا

Artinya: Padahal Dia Sesungguhnya telah menciptakan kamu dalam beberapa tingkatan kejadian (Q.S An-Nuh:14).

Kata أَطْوَارًا (tingkatan) bisa diartikan juga sebagai fase. Kata fase digunakan dalam arti kondisi yang dialami sesuatu (Shihab, 2002). Dalam ilmu sains, fase bisa memiliki arti atau makna tingkatan, tahapan dalam suatu kejadian ataupun proses yang berlaku. Sebagaimana dalam tahapan siklus sel tersebut, yang terdapat beberapa fase dalam prosesnya. Fase dalam siklus sel ini bertahap dan prosesnya bersifat irreversibel, sampai sel menghasilkan anakan (sel baru).

Kemampuan sel dalam tiap fase siklus sel dikarenakan terdapat suatu mekanisme metabolisme didalamnya, walaupun sel merupakan unit terkecil dari makhluk hidup akan tetapi mempunyai struktur dan fungsi yang harus dilakukan untuk keberlangsungan perkembangan sel. Menurut Freshney, (2010) lamanya siklus sel pada berbagai macam organisme berbeda-beda, pada sel normal manusia lamanya proses siklus sel terjadi sekitar 20 – 24 jam. Fase G₁ membutuhkan waktu 8 – 10 jam, fase S 6 – 8 jam, fase G₂ 5 jam dan fase M 1 jam.

a. Fase G₁

Pada fase G₁ (Gap), sel melakukan persiapan untuk sintesis DNA. Fase ini merupakan fase awal *cell cycle progression* yang diatur oleh faktor ekstraselular

seperti mitogen dan molekul adhesi. Penanda fase ini adalah adanya ekspresi dan sintesis protein sebagai persiapan memasuki fase S (Ruddon, 2007).

b. Fase S

Pada fase S (Sintesis) terjadi proses replikasi sehingga membentuk untai DNA yang baru. Proses replikasi DNA ini terjadi dengan bantuan enzim yang disebut dengan enzim DNA-polimerase. Dengan terbentuknya DNA baru, maka DNA yang sebelumnya rantai tunggal menjadi rantai ganda (Sudiana, 2008). Pada fase S dengan pembentukan asam deoksiribonukleat baru, jumlah kromosom akan berlipat dua kemudian pembelahan sel akan dipersiapkan, dan pada akhir fase ini akan terbentuk 2 kromatid (Ruddon, 2007).

c. Fase G₂

RNA, protein, dan enzim terbentuk pada fase ini, yang akan digunakan untuk persiapan fase berikutnya yaitu fase M. Fase ini disebut fase pramitosis dengan ciri sel berbentuk tetraploid, DNA dua kali lebih banyak daripada fase lain dan masih berlangsung proses sintesis DNA dan protein. Pada fase ini juga kromosom telah ada dalam bentuk kromatid. Jika terjadi kerusakan pada DNA, DNA tidak akan bereplikasi sempurna, sehingga proliferasi sel ke fase M akan diblok dan berhenti pada fase G₂. Protein kinase yang bertindak sebagai pengontrol siklus sel memicu terjadinya fosforilasi oleh protein fosfatase Cdc25 sehingga menjadi tidak aktif. Terjadinya fosforilasi menyebabkan fase M diblok karena tidak terbentuknya cdk1/siklin B yang bertindak sebagai regulator ke fase M. Fase G₂ dihentikan bertujuan untuk dilakukan perbaikan DNA, tetapi jika perbaikan DNA tidak dapat dilakukan maka akan menyebabkan terjadinya apoptosis (Freshney, 2010).

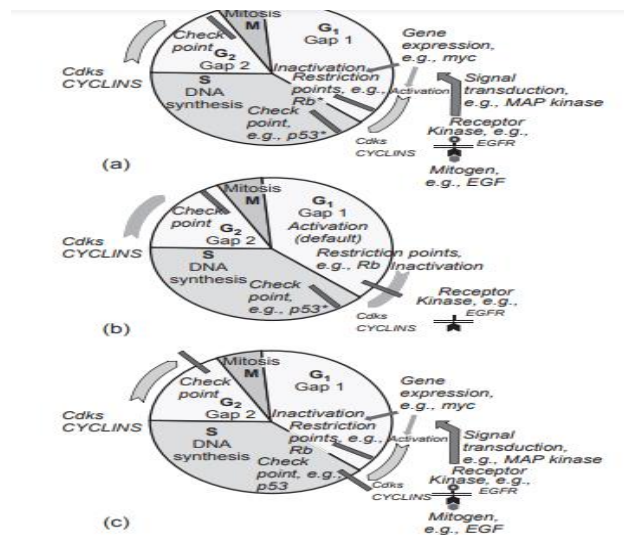
d. Fase M

Pada fase ini secara tiba-tiba sintesis protein dan RNA berkurang dilanjutkan dengan pembelahan menjadi dua sel, Pada pembelahan dua sel ini terdiri dari empat tahapan yang disebut dengan tahap profase, metaphase, anaphase dan telofase. Awal fase mitosis ditandai dengan terbentuknya benang gelendong (*spindle*) dan akhirnya terjadi pemisahan kromosom (Fitri dan Rosidah, 2014).

Protein berperan penting pada proses siklus sel yang merupakan pengontrol dan bertindak sebagai regulator positif dan negatif. Protein yang berperan adalah kelompok *cyclin*, khususnya *cyclin D*, *E*, *A*, dan *B*. Regulator positif yang memacu terjadinya siklus sel dipicu oleh *cyclin* bersama dengan kelompok *cyclin dependent kinase* (CDK), khususnya CDK 4, 6, dan 2. Pada mamalia ekspresi *cyclin dependent kinase* yaitu (CDK4, CDK2, dan CDC2/CDK1) terjadi bersamaan dengan ekspresi *cyclin* (*D*, *E*, *A*, dan *B*) secara berurutan seiring dengan jalannya fase siklus sel (Nurse, 2000). Aktivasi dari CDK dihambat oleh CDK inhibitor (meliputi p21, p27, p57) dan keluarga INK4 (meliputi p16, p18, p19), yang merupakan regulator negatif siklus sel. Selain itu terdapat juga *tumor suppressor protein* yaitu p53 dan pRb yang bertindak sebagai protein regulator negatif (Foster *et al.*, 2001).

Fase G2 merupakan checkpoint untuk mendeteksi dan memperbaiki kerusakan DNA melalui aktivasi beberapa kinase termasuk *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) kinase. Hal tersebut menginisiasi dua kaskade untuk menginaktivasi Cdc2-CycB baik dengan jalan memutuskan kompleks Cdc2-CycB maupun mengeluarkan kompleks Cdc-CycB dari nukleus atau aktivasi p21.

Checkpoint pada fase G1 akan dapat dilalui jika ukuran sel memadai, ketersediaan nutrisi mencukupi, dan adanya faktor pertumbuhan (sinyal dari sel yang lain) sementara *checkpoint* pada fase G2 dapat dilewati jika ukuran sel memadai, dan replikasi kromosom terselesaikan dengan sempurna. *Checkpoint* pada metafase (M) terpenuhi bila semua kromosom dapat menempel pada *spindle* mitosis. Kontrol *checkpoint* sangat penting untuk menjaga stabilitas genomik. Kesalahan pada *checkpoint* akan meloloskan sel untuk berkembang biak meskipun terdapat kerusakan DNA atau replikasi yang tidak lengkap atau kromosom tidak terpisah sempurna sehingga akan menghasilkan kerusakan genetik. Hal ini kritis bagi timbulnya kanker. Oleh karena itu, proses regulasi siklus sel mampu berperan dalam pencegahan kanker (Ruddon, 2007). Siklus sel dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 2.4 Siklus Sel (a). Siklus sel ditahan pada *restriction point* di G1 oleh aktivasi Rb, (b). Ketika *restriction point* tidak aktif, biasanya dengan fosforilasi (Rb) sel melanjutkan putaran siklus (a). Siklus sel juga ditahan pada *check point* oleh inhibitor siklus sel seperti p53 jika kerusakan DNA terdeteksi, (c). Fosforilasi p53 memungkinkan untuk melanjutkan siklus berikutnya (a) (Freshney, 2010)

2.5 Apoptosis

Proses kematian sel yang terprogram merupakan komponen penting dari suatu mekanisme pergantian sel yang normal disebut juga dengan proses apoptosis (Elmore, 2007). Suatu jaringan dikatakan memiliki homeostatis apabila terdapat kestabilan dari proses apoptosis yang normal dengan perkembangan dan penuaan sel pada populasi dalam jaringan tersebut. Pada keadaan reaksi imun atau pada saat sel-sel mengalami kerusakan oleh agen berbahaya maka apoptosis juga bertindak sebagai mekanisme pertahanan pada tubuh (Norbury dan Hickson 2001). Maka, dalam hal ini sel mempertahankan kestabilan dan keseimbangannya sebagai tindakan adanya perubahan dalam lingkungannya. Allah SWT berfirman dalam Surat al-Infithaar ayat 7:

الَّذِي خَلَقَكَ فَسَوَّاكَ فَعَدَلَكَ ﴿٧﴾

Artinya: Yang telah menciptakan kamu lalu menyempurnakan kejadianmu dan menjadikan (susunan tubuh)mu seimbang, (Q.S al-Infithar:7)

Makna kata “*menjadikan (susunan tubuh) mu seimbang*” (فَعَدَلَكَ) yaitu ciptaan yang lurus, sepadan dan seimbang (Al-Qurthubi, 2009). Keseimbangan dalam tubuh manusia yang dimaksud dalam ayat tersebut tidak hanya secara bentuk saja, melainkan juga proses – proses metabolisme yang terjadi di dalamnya walaupun dalam tingkatan seluler. Setiap sel normal memiliki potensi dalam proses proliferasi dan apoptosis (program kematian sel) karena sel memiliki molekul protein yang bekerja secara terorganisir yaitu yang dikenal dengan protein proapoptosis (protein yang diaktivasi untuk melakukan eksekusi kematian

sel) dan protein antiapoptosis (protein untuk mempertahankan kelangsungan hidup sel).

Apoptosis dibagi menjadi 3 fase yaitu fase inisiasi, fase eksekusi dan fase terminasi (Krammer, 2000). Pada fase inisiasi proses apoptosis distimulasi oleh berbagai macam faktor seperti radiasi sinar gamma, obat-obatan kemoterapi, sinyal dari *death receptor* dan menurunnya konsentrasi faktor pertumbuhan. Pada fase eksekusi terjadi pengelembungan membran sel (*blebbing*), fragmentasi inti, kondensasi kromatin dan degradasi DNA. Kemudian pada fase terminasi akan terjadi apoptotik yang merupakan proses fagositosis oleh sel-sel fagosit (Krueger *et al.*, 2001).

Proses apoptosis terjadi melalui 2 jalur yang dipicu oleh berbagai macam faktor baik internal (jalur intrinsik) dan eksternal (jalur ekstrinsik) (Igney dan Krammer 2002).

1. Jalur Ekstrinsik

Pada jalur ini terjadi proses pelepasan molekul signal yang disebut ligan oleh sel lain tetapi bukan berasal dari sel yang akan mengalami apoptosis, molekul tersebut adalah TNF- α , *TNF-related apoptosis including ligand* (TRAIL), *FasLigand* (Fas-L) dan *Apo-3 ligand* (Apo-3L). Apoptosis diinduksi oleh ligan yang berikatan dengan *death receptor* yang terletak pada transmembran sel target. Beberapa reseptor seperti reseptor TNF (*Tumor Necrosis Factor*), yang meliputi CD 95, TNF- α receptor 1 (TNF-R1), TNF- α receptor 2 (TNF-R2), Fas, *death receptor 3* (DR-3) merupakan family *death receptor* yang terletak di permukaan sel (Hadi, 2011).

Setelah berikatan dengan ligand yang sama, death receptor membentuk kompleks homotrimerik yang menyebabkan protein adaptor intraseluler tertarik ke membran sel seperti TNF-R1 dan DR-3 yang disebut *TNFR-associated death domain protein* (TRADD). Sedangkan Fas dan DR-4 berinteraksi dengan *Fas-associated death domain protein* (FADD). FADD dan TRADD tidak berinteraksi dengan DR-5 sehingga diduga ada protein lain yang terlibat. Sinyal yang diaktivasi oleh TNF-R1 atau DR-3 terpecah pada tingkat TRADD. Translokasi inti faktor transkripsi *nuclear factor- κ B* (NF- κ B), dan aktivasi *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) dimulai. Sinyal TNF- α akan berikatan dengan sinyal jalur Fas menyebabkan interaksi antara TRADD dengan FADD (Chen dan Goeddel, 2002). Aktivasi dari *caspase-8* akan mengakibatkan terjadinya kaskade *caspase* untuk apoptosis yang dikarenakan ikatan-ikatan tersebut mengirimkan sinyal ke sitoplasma (Thorburn, 2004).

2. Jalur Intrinsik

Pada jalur intrinsik adanya kerusakan karena oksidasi radikal bebas, radiasi ionisasi, senyawa kimia, kehilangan faktor pertumbuhan dan gangguan pada siklus sel menyebabkan stress mitokondria dan terjadi pelepasan dua kelompok protein proapoptosis dari intermembran mitokondria ke sitosol akan menginduksi apoptosis. Kelompok pertama yaitu sitokrom c, Samc/Diablo, *Apoptosis Inducing Factors* (AIF), dan *omi/Htr2*. Protein ini mengaktifkan *caspase* yang bergantung jalur mitokondria. Sitokrom c mengikat dan mengaktifkan Apaf-1 serta *procaspase-9*, membentuk *apoptosome* yang akan mengaktifkan kaskade *caspase*. Apoptosis diinduksi dengan menghambat aktivitas

IAP (*inhibitors of apoptosis proteins*) oleh Smac/DIABLO dan HtrA2/Omi (Elmore, 2007).

Anggota dari family protein Bcl-2 memegang peranan pada kontrol dan regulasi peristiwa mitokondria apoptosis (Cory dan Adam 2002). Famili protein Bcl-2 berfungsi mengatur permeabilitas membran mitokondria dan dapat menjadi protein proapoptosis atau antiapoptosis. Protein penekan tumor p53 memiliki peran penting dalam regulasi famili protein Bcl-2, dengan cara berikatan langsung dengan famili protein Bcl-2 antiapoptosis dan mengaktifkan famili protein Bcl-2 proapoptosis lalu kemudian mengatur permeabilitas membran mitokondria (Chipuk dan Green 2006). Sampai saat ini, total 25 gen telah diidentifikasi dalam famili protein Bcl-2. Beberapa protein antiapoptosis termasuk Bcl-2, Bcl-x, BclXL, Bcl-XS, Bcl-w, TAS, dan beberapa protein proapoptosis termasuk Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, dan Blk. Protein ini memiliki peran penting karena dapat menentukan apakah sel melakukan apoptosis atau tidak. (Elmore, 2007). Diperkirakan bahwa mekanisme utama tindakan dari famili protein Bcl-2 adalah regulasi pelepasan sitokrom c dari mitokondria melalui perubahan permeabilitas membran mitokondria (Scorrano dan Korsmeyer 2003).

Jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik akan berakhir pada titik fase eksekusi yang dianggap jalur akhir apoptosis. Dimulai dengan aktivasi *caspase* yang mengaktifkan endonuklease sitoplasma, lalu mendegradasi badan inti, dan mengaktifkan protease yang mendegradasi protein inti dan sitoskeletal. *Caspase* adalah kelompok dari *cysteine-aspartic acid protease*. Kaskade *caspase* berperan penting pada fase apoptosis sel. *Caspase* disintesis sebagai rantai tunggal *zymogen* tidak aktif yang terdiri dari *N-terminal prodomain* diikuti oleh subunit besar

berukuran 20 kDa dan subunit kecil berukuran 10 kDa. Aktivasi dari *zymogen* didapatkan lewat pemecahan proteolitik pada tempat yang identik dengan motif *caspase* yang dikenal. Mekanisme ini memungkinkan *caspase* dan memproses dirinya sendiri atau *caspase zymogen* lain (Kumar, 2014).

Caspase dapat dibagi menjadi kelompok inisiator dan kelompok eksekutor. *Caspase-3* merupakan salah satu contoh dari *caspase* kelompok eksekutor. Aktivasi *caspase-3* merupakan salah satu poin kunci dalam transmisi dari sinyal apoptosis karena aktifitas pemecahan *caspase-3* menghasilkan berbagai morfologi dan jenis biokimia dari apoptosis. *Caspase-3* diaktifkan dalam proses apoptosis baik oleh jalur ekstrinsik (death ligan) dan intrinsik (jalur mitokondria). Aktivasi dari *caspase-3* diperlukan karena bila tidak maka aktivitas *caspase* akan membunuh sel-sel tanpa pandang bulu. Sebagai eksekutor, *caspase-3* diaktifkan melalui proses pemotongan (*cleaving*) oleh *caspase* inisiator menjadi *cleaved caspase-3* setelah peristiwa sinyal apoptosis telah terjadi (Chowdhury *et al.*, 2008).

Procaspase-3 merupakan bentuk tidak aktif dari *caspase-3* yang memiliki berat molekul 32 kDa yang bila diaktifkan akan menjadi sub unit berukuran 20 kDa dan 12 kDa, seiring dengan perubahan menjadi bentuk aktif maka sub unit 20 kDa secara otomatis berubah menjadi sub unit 17 kDa (Chen *et al.*, 2003). Aktivasi dari *procaspase-3* merupakan peran dari *caspase-3*, *caspase-8*, *caspase-9*, *caspase-10*, CPP32 *activating protease*, serta *granzyme B*. Ketika *caspase-3* aktif maka akan menyebabkan pembelahan atau degradasi dari berbagai substrat yang bertinteraksi dengan *caspase-3* seperti *procaspase-3*, *procaspase-6*, *procaspase-9*, DNA-PK, PKC γ , PARP, D4-GDI (*D4 GDP-dissociation inhibitor*),

steroid response element-binding protein (SREBPs), U1-70kD, serta *inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease* (ICAD). Ketika semua jenis substrat telah diaktifkan, sel akan mengalami serangkaian perubahan, termasuk aktivasi gen terkait apoptosis, penurunan kemampuan perbaikan DNA, aktivasi zymogen atau inaktivasi enzim, pembongkaran sitoskeleton, dan fragmentasi kromatin yang pasti menyebabkan apoptosis (Fan *et al.*, 2005).

Caspase-3 bersama dengan *caspase-6*, dan *caspase-7* berfungsi sebagai efektor atau pengeksekusi, membelah berbagai substrat termasuk sitokeratin, PARP, protein membran plasma, protein inti dan lain-lain, yang pada akhirnya menyebabkan morfologi dan perubahan biokimia terlihat pada sel apoptosis (Slee *et al.*, 2001).

Fagositosis sel apoptosis adalah komponen terakhir dari apoptosis. Fagositosis sel-sel mati oleh sel fagosit disebut *efferocytosis*. Sel-sel sekarat yang menjalani tahap akhir apoptosis mengekspresikan molekul fagositik seperti *phosphatidylserine* di permukaan selnya (Li, *et al.* 2003). *Phosphatidylserine* biasanya ditemukan pada bagian dalam permukaan membran plasma, tetapi didistribusikan di permukaan ekstraseluler selama apoptosis oleh protein yang dikenal sebagai *scramblase*. (Wang, *et al.* 2003). Molekul-molekul ini menandai sel untuk difagositosis oleh sel-sel yang memiliki reseptor yang sesuai, seperti makrofag. Setelah pengenalan, sel fagosit akan membentuk kembali sitoskeleton untuk melingkupi sel. Fagositosis sel yang sekarat oleh sel fagosit terjadi secara tertib tanpa memunculkan respons peradangan. (Savill, *et al.* 2003). Setelah pengenalan, sel fagosit akan membentuk kembali sitoskeleton untuk melingkupi

sel. Fagositosis sel yang sekarat oleh sel fagosit terjadi secara tertib tanpa memunculkan respons peradangan (Napirei and Mannherz, 2009).

2.6 Hepar

2.6.1 Anatomi Hepar

Hepar atau hati merupakan organ atau kelenjar terbesar di dalam tubuh (Wibowo dan Paryana, 2009), memiliki berat sekitar 1-2,3 kg (Waugh dan Grant, 2011) atau sekitar 2,5% dari berat badan (Moore dan Dalley, 2006). Hepar memiliki struktur yang halus, lunak dan lentur, serta terletak di bagian atas rongga abdomen yang menempati bagian terbesar regio hipokondrium (Waugh dan Grant, 2011; Snell, 2012). Sebagian besar hepar terletak di bawah arcus costalis kanan dan diaphragma setengah bagian kanan, memisahkan hepar dari pleura, paru-paru, perikardium dan jantung (Moore dan Dalley, 2006). Hepar merupakan organ yang mudah diraba dengan melakukan palpasi dinding abdomen di bawah arcus costalis kanan, yaitu dengan memeriksa pada waktu inspirasi dalam sehingga tepi bawah hepar dapat teraba (Wibowo dan Paryana, 2009).

Hepar dibungkus oleh jaringan fibrosa tipis yang tidak elastis yang disebut capsula fibrosa perivascularis (Glisson) dan sebagian tertutupi oleh lapisan peritoneum (Wibowo dan Paryana, 2009). Lipatan peritoneum membentuk ligamen penunjang yang melekatkan hepar pada permukaan inferior diaphragma (Waugh dan Grant, 2011). Dalam keadaan segar, hepar berwarna merah tua atau kecoklatan yang disebabkan oleh adanya darah yang sangat banyak dalam organ ini (Leeson et al., 1996).

Hepar memiliki 4 lobus. Dua lobus yang berukuran paling besar dan jelas terlihat adalah lobus kanan yang berukuran lebih besar, sedangkan lobus kiri berukuran lebih kecil dan berbentuk baji (Waugh dan Grant, 2011). Diantara kedua lobus tersebut terdapat vena portae hepatis, jalur masuk dan keluarnya pembuluh darah, saraf, dan ductus. Lobus kanan terbagi menjadi lobus quadratus dan lobus caudatus karena adanya vesical biliaris, fisura untuk ligamentum teres hepatis, vena cava inferior, dan fisura untuk ligamentum venosum. Hilus hepatis atau porta hepatis terdapat pada permukaan posteroinferior dan terletak di antara lobus caudatus dan lobus quadratus. Bagian atas ujung bebas omentum minus melekat pada pinggir porta hepatis dan terdapat ductus hepaticus dexter dan sinister, cabang dextra dan sinistra arteria hepatica, vena porta, serabut-serabut saraf simpatik dan para simpatik, serta beberapa kelenjar limfe hepar.

Lobulus-lobulus hepatis adalah penyusun hepar. Vena sentralis pada masing-masing lobus bermuara ke venae hepatica dan di antara lobulus-lobulus terdapat canalis hepatis, yang berisi cabang-cabang arteria hepatica, vena porta, dan sebuah cabang dari ductus choledochus (trias hepatis). Darah arteri dan vena berjalan di antara sel-hepatosit melalui sinusoid dan dialirkan ke vena sentralis (Snell, 2012).

Ligamentum falciforme memisahkan lobus dexter dan lobus sinister dan diantara kedua lobus ini terdapat porta hepatis, yang merupakan jalur masuk dan keluar antar pembuluh darah, saraf, dan ductus (Sloane, 2004). Ligamentum ini memiliki pinggir bebas dan berbentuk bulan sabit dan terdapat ligamentum teres hepatis yang merupakan sisi vena umbilicalis. Ligamentum falciforme berjalan ke permukaan anterior dan kemudian ke permukaan superior hepar serta akhirnya

membelah menjadi dua lapis. Lapisan kanan akan membentuk lapisan atas ligamentum coronarium dan lapisan kiri membentuk lapisan atas ligamentum triangulare. Bagian kanan ligamentum coronarium dikenal sebagai ligamentum triangulare dextrum (Snell, 2012). Ligamentum falciforme berjalan dari hepar ke diaphragma dan dinding anterior abdomen. Permukaan hepar diliputi oleh peritoneum visceralis, kecuali daerah kecil pada permukaan hepar diliputi oleh peritoneum visceralis, kecuali daerah kecil pada permukaan posterior yang melekat langsung pada diaphragma (Price dan Wilson, 2012).

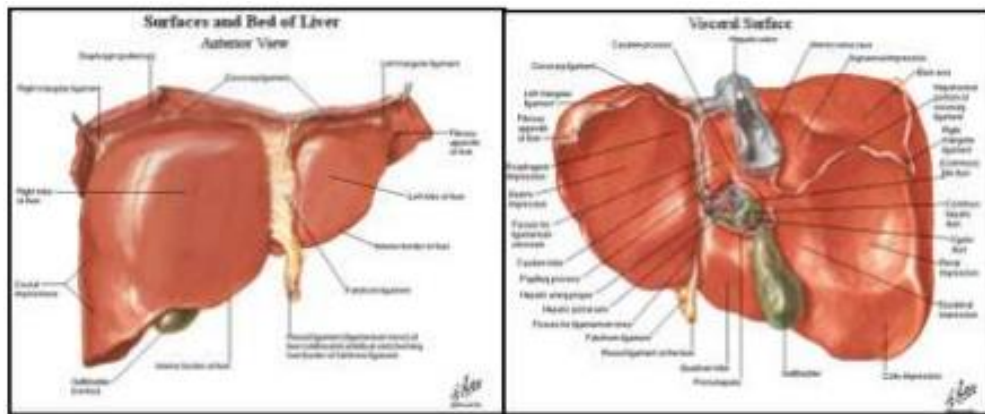
Ligamentum teres hepatis berjalan ke dalam fissura yang terdapat pada facies visceralis hepatis dan bergabung dengan cabang sinistra vena porta hepatis. Ligamentum venosum (ligamentum of Arantius) merupakan pita fibrosa yang merupakan sisa ductus venosus, melekat pada cabang sinistra vena porta dan berjalan ke atas di dalam fissura pada permukaan visceral hepatis, dan di atas melekat pada vena cava inferior. Pada jaringan darah yang kaya oksigen dibawa ke hepar melalui vena umbilicalis (ligamentum teres hepatis). Sebagian besar darah yang tidak melewati hepar masuk ke dalam ductus venosus (ligamentum venosum) dan bersatu dengan vena cava inferior. Pada waktu lahir vena umbilicalis dan ductus venosus menutup dan menjadi pita fibrosa (Snell, 2012).

Vaskularisasi hepar didapatkan dari arteri hepatica propria, cabang arteria coeliac (truncus coeliacus), vena porta, vena hepaticae (tiga buah atau lebih) muncul dari permukaan posterior hepatis dan bermuara ke dalam vena cava inferior. Pembuluh-pembuluh darah yang mengalirkan darah ke hepar adalah arteria hepatica propria (30%) dan vena porta (70%). Arteria hepatica propria membawa darah yang kaya oksigen ke hepar, dan vena porta membawa darah

yang kaya akan hasil metabolisme pencernaan yang telah diabsorpsi dari traktus gastrointestinalis. Darah arteri dan vena dialirkan ke vena centralis masing-masing lobules hepatis melalui sinusoid hepar. Vena centralis mengalirkan darah ke vena hepatica dextra dan sinistra, dan vena-vena ini meninggalkan permukaan posterior hepar dan bermuara langsung ke dalam vena cava inferior (Snell, 2012).

Sistem porta membawa darah dari pancreas, limpa, dan usus. Nutrien terakumulasi dan diubah dalam hepar, dan zat toksik dinetralkan dan dihilangkan di tempat tersebut. Vena porta bercabang-cabang menjadi vena pendistribusi kecil yang berjalan di tepi setiap lobulus dan berujung ke dalam sinusoid. Vena sentralis dari setiap lobulus menyatu menjadi vena, yang akhirnya membentuk dua atau lebih vena hepatica besar yang bermuara ke dalam vena cava inferior. Arteria hepatica bercabang berulang kali dan membentuk arteriol di area portal dan beberapa diantaranya berakhir langsung ke dalam sinusoid pada jarak tertentu dari celah portal sehingga darah arteri yang kaya oksigen ditambahkan ke darah vena porta di sinusoid (Junqueira dan Carneiro, 2012).

Hepar banyak menghasilkan cairan limfe, sekitar sepertiga sampai setengah dari jumlah seluruh cairan limfe tubuh. Pembuluh limfe meninggalkan hepar dan masuk ke dalam sejumlah kelenjar limfe yang ada di dalam porta hepatis. Pembuluh eferen berjalan ke nodi coeliaci. Beberapa pembuluh limfe berjalan dari area nuda hepatis melalui diaphragma ke nodi lymphoid mediastinalis posterior. Sistem persarafan hepar terdiri atas saraf simpatik dan para simpatik membentuk plexus coeliacus. Truncus vagalis anterior mencabangkan banyak ramus hepaticus yang berjalan langsung ke hepar (Snell, 2012).



Gambar 2.5.1. Hepar Tampak Anterior dan Permukaan Posterior (Maulina, 2018).

2.6.2 Perkembangan Kultur Sel Hepar

Freshney (2010) membagi fase pertumbuhan dalam kultur menjadi:

Lag phase. Fase ini adalah waktu setelah sub kultur atau penanaman, selama fase ini sedikit sekali kenaikan jumlah sel. *Lag phase* merupakan periode adaptasi yang lambat, sel perlu penggantian unsur-unsur yang hilang seperti misalnya unsur glikolaliks yang hilang sewaktu tripsinasi. Disamping itu, sel harus melakukan perlekatan terlebih dahulu pada substrat dan melakukan penyebaran diri. Pada saat menyebar tersebut, sitoskeleton baru terlihat lagi. Setelah sel menyebar terjadi kenaikan enzim, seperti DNA polimerase diikuti dengan sintesis DNA baru dan protein struktural lainnya.

Log phase. Fase ini terjadi peningkatan eksponensial jumlah sel setelah *lag phase* dan berakhir dengan satu atau dua kali penggandaan populasi sel setelah sel mencapai konfluen. Panjang fase logaritmik tergantung pada kepadatan penanaman, kecepatan tumbuh sel dan kepadatan sel yang menghambat proliferasi sel. Dalam fase logaritmik ini bagian populasi sel yang tumbuh cepat biasanya

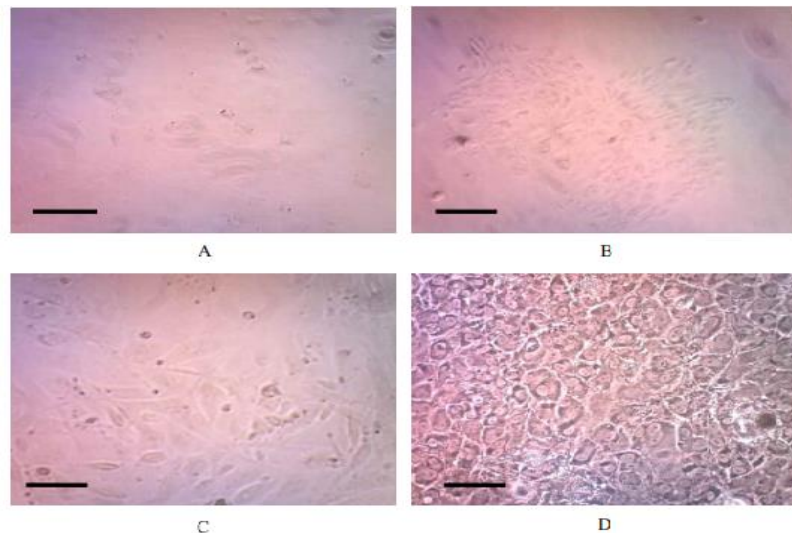
mencapai 90-100%. Fase ini merupakan waktu yang optimal untuk sampling diakarenakan populasi sel seragam dan viabilitas akan naik.

Plateau phase. Menjelang fase logaritmik, kultur menjadi konfluen, seluruh permukaan sudah ditempati oleh sel dan semua berkontak satu sama lainnya. Setelah konfluen kecepatan tumbuh menurun kemudian proliferasi sel hampir berhenti sama sekali setelah populasinya berlipat ganda. Fase plateau ini populasi sel yang tumbuh turun menjadi 0-10%.

2.6.3 Karakteristik Sel Hepar dalam Kultur *In Vitro*

Secara umum karakteristik sel primer mamalia berbentuk poligonal dengan dimensi lebih teratur dan berbentuk bipolar ataupun multipolar yang melekat pada substrat (Khumairoh dan Puspitasari, 2016).

Gambar berikut menunjukkan ciri dari sel hepar dalam kultur secara *in vitro*:



Gambar 2.5.3 Kultur primer sel hepar *Tupai javanica*. A Ciri sel hepar yang umur hari 1, terdiri dari *singel cell* yang berbentuk memanjang (*elongasi*); B. Sel hepar umur 4 hari, berbentuk poligonal dan berkoloni dengan tingkat konfluenitas 30%; C. Sel hepar umur 7 hari, sel berbentuk poligonal dan berkoloni dengan tingkat konfluenitas 50%; D. Sel hepar umur 14 hari, l berbentuk poligonal dan berkoloni dengan tingkat konfluenitas 80% (Surya *et al.*, 2016).

Kondisi pada saat kultur bervariasi tergantung setiap jenis sel, tetapi lingkungan buatan dimana sel-sel tersebut dikultur selalu terdiri dari vessel yang sesuai dan mengandung substrat atau media yang memasok nutrisi penting bagi sel (seperti asam amino, karbohidrat, vitamin, dan mineral). Selain nutrisi tersebut, ada pula *Growth Factor*, hormon, gas (O₂ dan CO₂), dan dilakukan pengaturan terhadap lingkungan fisikokimianya (seperti pH, tekanan osmotik, dan suhu). Kebanyakan sel hanya dapat tumbuh dan membelah di media yang cocok untuk sel tersebut (Khumairoh dan Puspitasari, 2016).

2.6.4 Kanker Hepar

Kanker hepar atau *hepatocellular carcinoma* (HCC) merupakan penyakit kanker yang paling banyak menyebabkan kematian dari pada penyakit kanker lainnya, karena membunuh hampir semua pasien-pasien yang menderitanya dalam waktu satu tahun. Kanker hati dibagi dua yaitu, yang pertama kanker hati primer dan kanker hati sekunder. Kanker hati primer atau Hepatoma disebabkan oleh virus hepatitis B yang menyerang sel-sel hati (hepatocytes) yang mengakibatkan sel-sel hati bermutasi dan mengganggu fungsi kerja jaringan-jaringan lain di dalam hati (hepar). Sedangkan kanker hati sekunder (kanker hati metastatik) disebabkan oleh sel-sel kanker dari organ lain (seperti kanker payudara, kanker paru-paru, dsb.) yang terbawa oleh darah yang akan disaring di hati dan menyebabkan sel kanker menempel di dalam hati yang menjadi pemicu kanker hati (Ardiansyah, 2014).

Kanker hepar adalah penyakit kronis pada hepar dengan inflamasi dan fibrosis hepar yang mengakibatkan distorsi struktur hepar dan hilangnya sebagian

besar fungsi hepar. Kanker hati adalah penyakit gangguan pada hati yang disebabkan karena hepatitis kronik dalam jangka panjang yang menyebabkan gangguan pada fungsi hati (Khanifah, 2019).

Sel-sel pada hati akan memperbanyak diri untuk menggantikan sel-sel yang rusak karena luka atau karena sudah tua. Seperti proses pembentukan sel lain di dalam tubuh, proses ini juga dikontrol oleh gen-gen tertentu dalam sel. Kanker hati berasal dari satu sel yang mengalami perubahan mekanisme kontrol dalam sel yang mengakibatkan pembelahan sel yang tidak terkontrol. Sel abnormal tersebut akan membentuk jutaan kopi, yang disebut klon. Mereka tidak dapat melakukan fungsi normal sel hati dan terus menerus memperbanyak diri. Sel-sel tidak normal ini akan membentuk tumor (Khanifah, 2019).

Kanker hepar dapat bermula dari organ bagian hepar (hepatocellular cancer) atau dapat juga berasal dari organ lain, misalnya dari kolon, yang menyebar ke hati (*metastatic liver cancer*). Kanker yang berasal dari organ hepar sering disebut sebagai kanker hepar dan merupakan jenis kanker kelima yang memiliki insidensi terbesar di dunia. Penyakit yang sering berhubungan dengan kanker hepar antara lain virus hepatitis dan sirosis hati (Khanifah, 2019).

Hepatitis dapat disebabkan oleh beberapa faktor, seperti penyakit autoimun primer (hepatitis lupoid), infeksi virus, obat (seperti parasetamol, oksifenisatin, metildopa, nitrofurantoin, isoniazid, dan lain-lain), alkoholisme, dan defisiensi alfa-1-antitripsin (Hamidy *et al.*, 2009). Selain hal tersebut, hepatitis dapat disebabkan oleh zat toksik (hepatitis toksik), yaitu kerusakan hepar yang terjadi akibat zat-zat yang bersifat toksik (Maulina, 2018).

Mekanisme terjadinya kanker hati atau HCC terjadi berhubungan dengan peningkatan atau penurunan ekspresi protein. Protein yang mengalami upregulasi seperti COX, protein siklus sel, faktor pertumbuhan, dan protein antiapoptosis (King, 2000). Peningkatan ekspresi dan atau mutasi pada N-ras juga ditemukan pada kanker hepar. Selain itu juga terjadi aneuploidi dan perubahan genetik seperti mutasi p53 pada kanker hepar (Kim *et.al*, 2003).

Pada HCC telah diketahui adanya ras yang termutasi, tetapi relatif berbeda dengan kanker lain seperti kanker colorectal (Macdonald dan Ford, 1997). Ekspresi Ras yang berlebihan ini dapat menaikkan jumlah Myc dalam semua kasus pada HCC dan memberikan kesan bahwa 2 onkogen ini dapat bekerja sama satu dengan yang lain (Macdonald dan Ford, 1997). Gen tersebut dapat dipengaruhi oleh adanya infeksi virus Hepatitis B dan Hepatitis C. Hal ini memberi kesan bahwa gen tersebut dapat diaktivasi oleh virus tersebut secara spesifik.

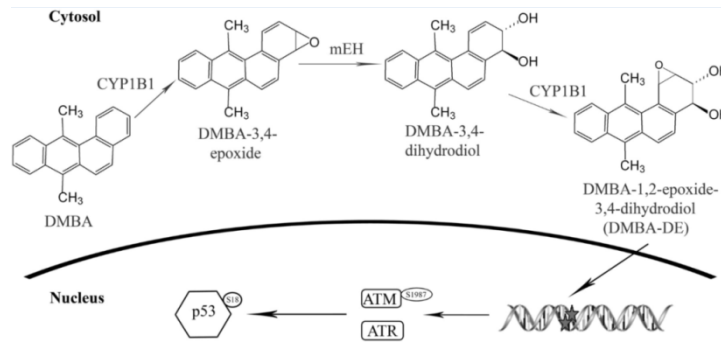
Studi kinetik kanker menemukan adanya berbagai jenis onkogen yang berperan dalam karsinogenesis di hepar. Overekspresi N-ras dan c-myc oleh senyawa karsinogen merupakan abnormalitas genetik yang sering terjadi pada kanker (Peters dan Vousden, 1997). CYP1A2 di hepar telah diketahui dapat mengaktivasi senyawa prokarsinogen (benzo(a)pyrene) menjadi intermediet reaktif yang berinteraksi dengan nukleofil selular dan akhirnya memicu karsinogenesis dengan ditandai terjadinya overekspresi N-Ras dan c-myc (Kawajiri *et al.*, 1993). Selain itu ditemukan insiden yang tinggi pada titik mutasi kodon spesifik di p53 suatu tumor supresor gene, pada hepatoseluler yang secara epidemiologis berkaitan dengan aflatoksin (Underwood, 1996). Mutasi

pada p53 merupakan penyebab utama kasus kanker hepar di Asia Selatan dan Asia Tenggara (King, 2000).

2.7 Senyawa Penginduksi 7,12-dimetil(a)antrasen (DMBA) pada Sel Hepar

Senyawa DMBA merupakan suatu karsinogen dengan rumus empiris $C_{20}H_{16}$, berat molekul 256.34 g/mol, dan titik leleh 122-123 °C. Warna bubuk hidrokarbon poliaromatik (*polyaromatic hydrocarbon* disingkat PAH) ini adalah kuning hingga kuning agak kecokelatan dengan sedikit kandungan warna hijau. Senyawa ini dalam metabolisme hewan pengerat akan bereaksi dengan sitokrom p-450 untuk membentuk ikatan kovalen dengan DNA pada sel yang aktif membelah sehingga menyebabkan *DNA adduct* (Ranasasmita, 2008).

Mekanisme masuknya DMBA ke dalam sel sebagai ligan yang mengaktifkan reseptor *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) atau faktor transkripsi sitosol yang biasanya tidak aktif dengan beberapa faktor protein. Setelah berikatan dengan ligan faktor protein akan memisah akibat perpindahan Ahr ke dalam inti, kemudian membentuk heterodimer dengan protein *aryl hydrocarbon nuclear translocator* (ARNT) dan berinteraksi dengan *xenobiotic response element* (XRE) di bagian promoter gen enzim fase I dan fase II inti sel, dalam biotransformasi DMBA menjadi bentukan *elektrofilik diolepoxide* yang tidak stabil. Aktivasi dikatalis oleh enzim sitokrom (CYP) yaitu epoxide hidrase menjadi metabolik yang elektrofilik (Nagini, 2009). Seperti yang dapat terlihat pada gambar dibawah ini:



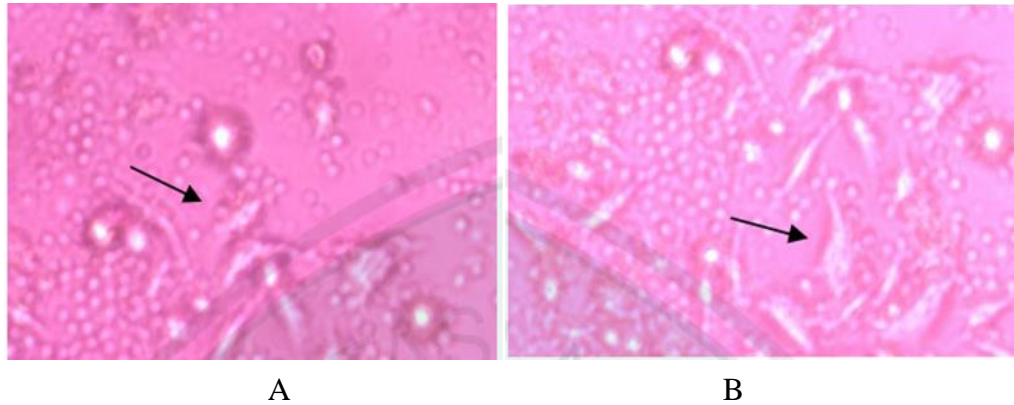
Gambar 2.6.1. Metabolisme DMBA dan pembentukan genotoksik

Metabolit reaktif DMBA dapat berkonjugasi dengan GSh oleh GST. Enzim detoksifikasi fase II mengkatalis pengeluaran reaksi produk CYP fase I. Walaupun enzim fase I dan fase II mendetoksifikasi DMBA, namun beberapa *diol-epoxide* lolos dari detoksifikasi yang mampu berikatan dengan residu adenin DNA sehingga menyebabkan mutasi onkogen pada sel normal menjadi transformasi sel abnormal (Nagini, 2009).

Cytochrome P-450 dan *microsomal epoxide hydrolase* (mEH) memetabolisme DMBA menjadi dua metabolit yaitu metabolit elektrofilik dan metabolit yang mampu membentuk DNA *adduct*. *Cytochrome* P-450 CYP1B1 mengoksidasi DMBA menjadi 3,4-*epoxides* yang diikuti dengan hidrolis *epoxides* oleh mEH membentuk metabolit DMBA-3,4-diol. Metabolit ini nantinya dioksidasi oleh CYP1A1 atau CYP1B1 menjadi metabolit karsinogen aktif (*ultimate carcinogen*) yaitu 7,12-DMBA-3,4-diol-1,2 *epoxide* (Nagini, 2009).

Metabolit aktif DMBA-3,4- *diol*-1,2 *epoxide* mampu berikatan kovalen dengan DNA membentuk *bulky DNA adduct* dan kerusakan oksidatif pada sisi 8-hidroksi-2'-Deoksiguanosin (8-OH-dG). Interaksi DNA *adduct* mampu menginduksi produk mutasi gen supresor p53 (Weimer et al., 2000) dan mutasi adenin menjadi timin pada codon 61 gen ras (Ewing, 2007).

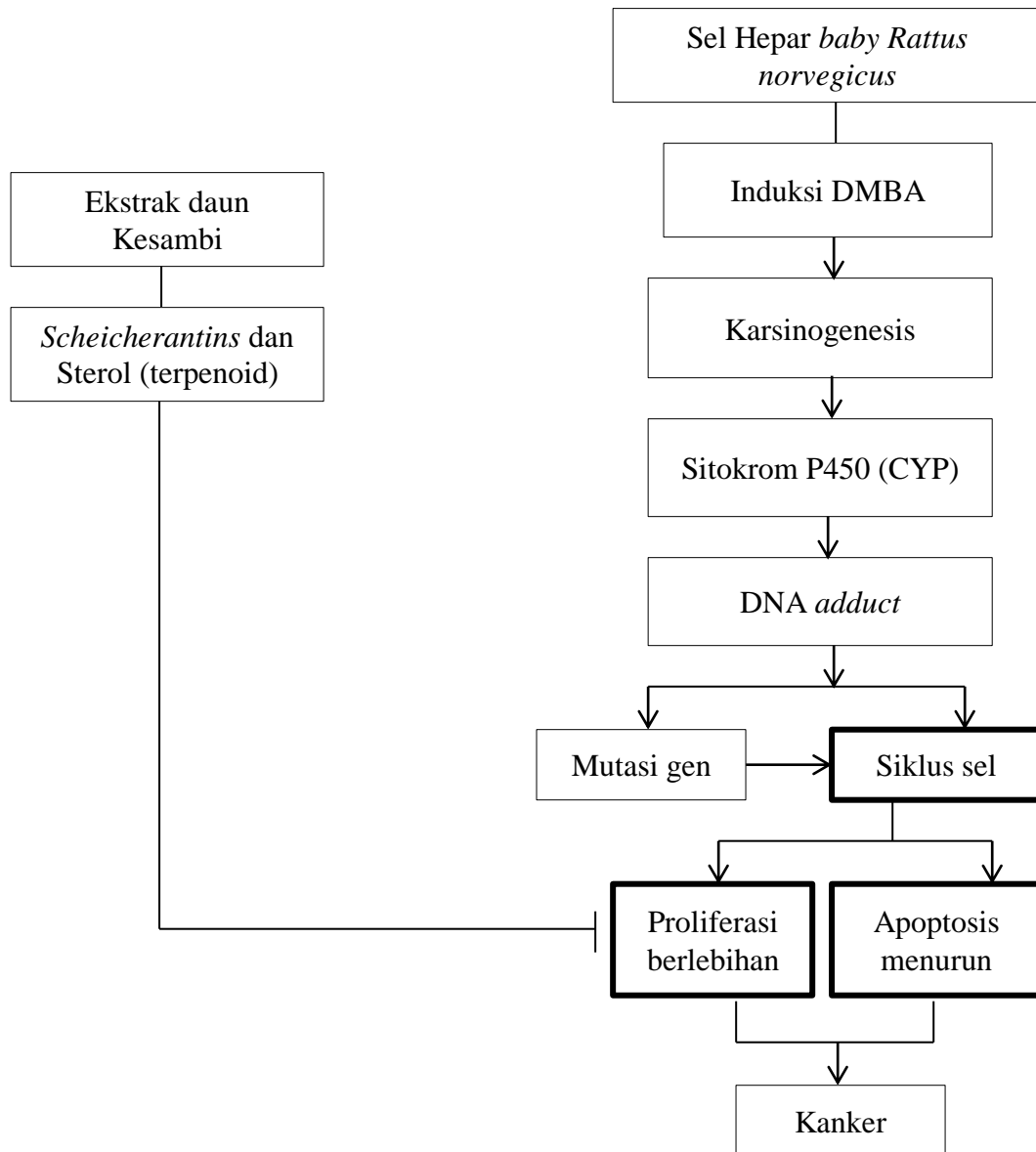
Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kurlila (2013), bahwa pemberian induksi DMBA pada kultur sel primer hepar terkadang secara morfologi tidak dapat dibedakan dengan sel yang tidak diinduksi, akan tetapi pada sel yang diinduksi DMBA pada dosis 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ selama 48 jam akan mengalami pertumbuhan yang abnormal. Hal ini dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 2.6.2 Kultur Primer Sel Hepar Hamster. A. Kultur primer sel hepar yang tidak diinduksi DMBA, B. Kultur primer sel hepar yang diinduksi DMBA

2.8 Kerangka Konseptual

Adapun bagan kerangka konseptual pada penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 3.1 Skema Kerangka Konsep

- Keterangan:
- : Diteliti
 - : Tidak diteliti
 - : Memicu
 - | : Menghambat

2.8.1 Uraian Kerangka Konseptual

Faktor lingkungan merupakan salah satu penyebab timbulnya penyakit kanker, tidak terkecuali kanker hepar. Faktor lingkungan yang berasal dari bahan kimia yang bersifat karsinogen menunjukkan hubungan yang signifikan pada kanker hepar. Hal ini dikarenakan hepar merupakan organ tubuh yang mempunyai peranan penting dalam proses metabolisme dan detoksifikasi, sehingga hepar cenderung rentan mengalami kerusakan. Paparan bahan kimia yang bersifat toksik, karsinogen dan mutagenik terdapat pada bahan kimia yang bersifat *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* (PAH). Senyawa PAH tersebut terdapat pada 7,12 dimetilbenz(α)antrasen (DMBA).

Metabolisme DMBA melibatkan enzim CYP (*cytochrome* P450), sehingga menghasilkan metabolit mutagenik. Hal ini akan menyebabkan adanya DNA adduct yang menentukan mutasi dalam gen serta mengendalikan siklus sel, sehingga mendorong terbentuknya sel kanker (Rowland *et al.*, 2001). Sel kanker tersebut diakibatkan oleh rusaknya gen (mutasi gen) sehingga sel mengalami proliferasi yang tidak terkontrol dan kemampuan apoptosis menurun. Hal ini akan mengakibatkan terganggunya siklus sel, yang berperan dalam proses pertumbuhan, kematian dan pemeliharaan sel.

Kesambi (*Schleichera oleosa*) merupakan salah satu tumbuhan yang mempunyai manfaat yang besar, salah satunya sebagai antikanker. Hasil isolasi kesambi menunjukkan adanya tujuh sterols scheincherastins (1-7) serta scheincherol 1 dan scheincherol 2. Scheicherastins yang diisolasi ini mampu menjadi penghalang bagi pertumbuhan sel kanker (Pettit *et.al*,2000). Scheicherastins ini merupakan turunan dari terpenoid.

Mekanisme kerja golongan terpenoid dalam menghambat sel kanker adalah dengan cara memblok siklus sel pada fase M (mitosis atau pembelahan sel) dengan menstabilkan benang-benang *spindle*. Benang-benang *spindle* berfungsi untuk mempertahankan bentuk sel dan mengatur pergerakan kromosom dalam pembelahan sel, sehingga ketika sel kanker berinteraksi dengan senyawa terpenoid akan menyebabkan tahapan mitosis terhambat yang selanjutnya akan terjadi penghambatan proliferasi sel dan memicu terjadinya apoptosis (Setiawati *et.al*, 2010). Selain itu, kesambi juga mempunyai potensi efek sitotoksik yang berbeda pada beberapa jenis *cell line* kanker (Thind *et.al*, 2010).

Pada penelitian ini untuk mengetahui efek sitotoksitas ekstrak daun kesambi terhadap sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA menggunakan MTT assay. Sedangkan untuk pengujian apoptosis dan penghambatan siklus sel menggunakan flowcytometri. Pengujian apoptosis secara *in vitro* juga dilakukan dengan melihat tingkat konfluenitas dan viabilitas sel.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 6 perlakuan dan 4 ulangan.

3.2 Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : Ekstrak metanol daun kesambi (*Schleichera oleosa*) dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 200µg/mL, 400µg/mL, 600µg/mL dan 800µg/mL.
- b. Variabel terikat : Konfluenitas sel hepar, viabilitas sel hepar, sitotoksisitas ekstrak daun kesambi terhadap sel hepar dan siklus sel hepar.
- c. Variabel terkendali : Tikus (*Rattus norvegicus*) yang digunakan merupakan jenis tikus wistar yang berumur 2-3 hari yang diinduksi DMBA dengan konsentrasi 0,1 µg/mL selama 48 jam.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Labortaorium Kultur Sel Hewan dan Laboratorium Genetika Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Februari – Mei 2021.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: *Laminar Air Flow* (LAF) (LABTECH), Mikroskop *Inverted* (Nikon TI-u), Sentrifus (Thermo Scientific), *Automatic Cell Counter* (Invitrogen Thermo Fisher), Inkubator CO² (Thermo Scientific), *Elisa Reader*, *Flowcytometri*, timbangan analitik, micropipet, *Tissue Culture Disk* (TCD), *plate well* 98, tabung sentrifus 15 ml, tabung endorf 2 ml, filter 0,2 µm, spuit 20 cc, tabung duran 100 ml, beaker glass 100 ml dan enlemeyer 100 ml.

3.4.2 Bahan

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: simplisia daun kesambi (*Scheichera oleosa*) (Materia Medica), media *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco), Trypsin (Sigma), *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Biowest), *Phospat Buffer Saline* (PBS) (Gibco), *Dimethyl Sufoxide* (DMSO), *7,12-Dimethylbenz(α)antrasena* (DMBA), MTT assay, NaHCO₃, penicilin, streptomycin, hepes dan air steril.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Ekstraksi Daun Kesambi

Tahap ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi yaitu dengan cara merendam simplisia kesambi (*Schleichera oleosa*) sebanyak 100 gr dengan metanol 96% 500 ml (1:5) selama 2 x 24 Jam. Setelah 2 x 24 jam rendaman disaring dengan menggunakan kertas saring kemudian dilakukan

penguapan dengan menggunakan *Rorary Evaporator*. Jika sudah dihasilkan hasil ekstrak berbentuk pasta, maka ekstrak siap untuk digunakan.

3.5.2 Pembuatan Media Stock DMEM

Ditimbang 1,35 gr DMEM, 0,37 gr NaHCO₃, 0,006 gr penisilin, 0,01gr streptomycin dan 0,23 gr hepes. Semua bahan tersebut dilarutkan dengan 100 ml *deionized water* (DI) steril, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer* dan difilter dengan membran millipore 0,22µm. Selanjutnya dimasukkan dalam botol tutup ulir dan disimpan pada suhu 4⁰C. Media stock siap untuk digunakan.

3.5.3 Isolasi dan Kultur Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*)

Tikus (*Rattus norvegicus*) yang digunakan berumur 2-3 hari, tikus didislokasi, dibedah dan diambil organ heparnya, kemudian dicuci dengan 2 ml PBS, 3 ml fungizone dan 1 ml penisilin streptomycin. Organ dipindah dan dicacah pada 500 µl tripsin sampai halus, dihomogenasi dengan spuit. Selanjutnya dimasukkan dalam tabung sentrifus. Sisa homogenasi ditambah 500 µl PBS (1:1) kemudian diinkubasi selama 20 menit.

Tabung sentrifus diambil dari inkubator dan di sentrifus 2500 rpm selama 5 menit kemudian dibuang supernatan dan pelet ditambahkan dengan 3 ml media DMEM, 3 ml fungizone dan 1 ml penisilin streptomycin kemudian disentrifus kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Dibuang supernatan dan pelet ditambahkan 3 ml DMEM 10% FBS dan 3 ml fungizone kemudian disentrifus kembali. Setelah itu supernatan dibuang dan pelet disisakan 1 ml

kemudian dipipeting. Hasil pelet diambil 50 µl kemudian dimasukkan ke dalam multiwell 24 yang telah berisi DMEM 10% FBS dan fungizone. Kemudian sel dikultur pada suhu 37⁰C, 5% CO². Untuk perlakuan induksi DMBA 0,1 µg/ ml dilakukan setelah kultur sel mengalami konfluen.

Jumlah sel yang ditanam adalah sebanyak 7000 sel pada masing-masing well. Menurut Freshney (2000) jumlah sel yang ditanam dalam *multiwell* 24 adalah berkisar antara 2x10² sel/ ml sampai dengan 2 x 10⁵ sel/ml. Jumlah sel tersebut setara dengan 2000 sampai dengan 200000 sel/ml.

3.5.4 Pembagian Kelompok Perlakuan

Pembagian kelompok pada rancangan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Kelompok K (-) : Sel hepar dalam media DMEM 10% FBS
2. Kelompok K (+) : Sel hepar dalam media DMEM 10% FBS yang diinduksi DMBA 0,1 µg/mL
3. Kelompok P1 : Sel hepar dalam media DMEM 10% FBS yang diinduksi DMBA 0,1 µg/mL selama 48 jam dan pemberian ekstrak daun kesambi 200µg/mL
4. Kelompok P2 : Sel hepar dalam media DMEM 10% FBS yang diinduksi DMBA 0,1 µg/mL selama 48 jam dan pemberian ekstrak daun kesambi 400µg/mL
5. Kelompok P3 : Sel hepar dalam media DMEM 10% FBS yang diinduksi DMBA 0,1 µg/mL selama 48 jam dan pemberian ekstrak daun kesambi 600µg/mL

6. Kelompok P4 : Sel hepar dalam media DMEM 10% FBS yang diinduksi DMBA 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ selama 48 jam dan pemberian ekstrak daun kesambi 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$

3.5.5 Induksi Perlakuan DMBA pada Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*)

Induksi perlakuan DMBA ini mengacu pada metode yang dilakukan oleh Kurlila (2013). Induksi DMBA terhadap sel hepar yang dikultur dengan konsentrasi 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sebanyak 100 μl selama 48 jam. Setelah masing-masing hasil kultur sel konfluen kemudian dicuci dengan 1 ml media DMEM, fungizone dan penisilin streptomycin, setelah itu media diganti dengan media DMEM 10% FBS dan diberi perlakuan ekstrak daun kesambi dengan konsentrasi yang berbeda kemudian diamati pada hari ke-1, ke-3 dan ke-5.

3.5.6 Pengamatan Konfluenitas Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*)

Pengamatan konfluenitas sel dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan sel hepar pada perlakuan yang berbeda. Konfluenitas sel hepar diamati berdasarkan tingkat perlekatan sel dengan substrat dan ekspansi sel dengan menggunakan *Mikroskop Inverted* dan dianalisis menggunakan *ImageJ*.

Apabila sel telah konfluen maka dapat dilakukan pasase dengan cara media dibuang, kemudian dicuci dengan 1 ml PBS, fungizone dan penisilin streptomycin. Sel dicuci dengan media DMEM, fungizone, penisilin streptomycin kemudian diberi tripsin EDTA 200 μl . Setelah itu dikocok pelan dan dibagi tripsinasi menjadi 2 dan dimasukkan dalam multiwell 24 baru yang telah berisi media DMEM dengan 10% FBS, fungizone, kemudian diinduksi DMBA dengan

konsentrasi 0,1 µg/ ml untuk perlakuan. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37⁰C dengan 5% CO₂. Setelah 2x24 jam media diganti dengan DMEM 10% FBS dan diberi perlakuan ekstrak daun kesambi sesuai dengan perlakuan. Metode ini dilakukan berdasarkan prosedur pada pelatihan kultur sel kanker dan aplikasinya oleh Fakultas Farmasi Unair (2013).

3.5.7 Pengamatan Viabilitas Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*)

Perhitungan viabilitas sel hepar dilakukan untuk mengetahui persentase perbandingan antara sel hidup dan sel yang mati. Perhitungan viabilitas sel dilakukan dengan menggunakan *Countess Cell*. Adapun prosedur pengamatan viabilitas sel disesuaikan dengan *Countess™ II FL automated cell counter User Guide* (2019). Sebanyak 10 µl *tripan blue* 0,4% ditambahkan pada 10 µl suspensi sel, kemudian dicampurkan dengan baik. Diambil 10 µl campuran sampel dan dimasukkan ke dalam ruang pada slide, campuran didiamkan selama 30 detik. Campuran sampel kemudian dimasukkan pada *port* slide di instrumen. Instrumen akan membaca secara otomatis, mengatur fokus dan intensitas cahaya, kemudian akan menunjukkan jumlah konsentrasi sel, persentase sel yang hidup dan yang mati.

3.5.8 Uji Sitotoksisitas Ekstrak Daun Kesambi Terhadap Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi DMBA

Uji sitotoksisitas ini mengacu pada metode pada *Cancer Chemoprevention Research Center* Fakultas Farmasi UGM (2009). Sel diambil dari inkubator CO₂, kemudian diamati kondisi sel (tingkat konfluen 80%) untuk dipanen. Setelah itu

sel dipanen. Jumlah sel dihitung dan dibuat pengenceran sel dengan Media kultur (MK) sesuai kebutuhan. Sel ditransfer dalam sumuran, masing-masing berisi 100 μ l. Kemudian sel diamati di bawah mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel. Sel diinkubasi di dalam inkubator selama semalam (agar sel pulih kembali setelah panen).

Reagen MTT disiapkan untuk pelakuan (0,5 mg/mL) dengan cara diambil 1 mL stok MTT dalam PBS (5 mg/mL), lalu diencerkan dengan Media Kultur (MK) sampai 10 mL (untuk 1 buah 96 *well plate*). Stok MTT dibuat dengan cara menimbang 50 mg serbuk MTT dan dilarutkan dalam PBS sampai 10 mL. Pemberian reagen MTT dilakukan dengan cara media sel dibuang dan dicuci dengan PBS, lalu ditambahkan reagen MTT 100 μ L ke dalam setiap sumuran termasuk kontrol media (tanpa sel). Langkah selanjutnya sel diinkubasi selama 2-4 jam di dalam inkubator CO². Inkubasi dilakukan sampai terbentuk formazan. Kondisi sel diamati dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan sudah terlihat jelas, maka ditambahkan *stopper* 100 μ L SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10% dalam 0,01 N HCl. Selanjutnya *plate* dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi kembali di tempat yang gelap pada temperatur kamar selama semalam.

Langkah selanjutnya adalah dilakukan pembacaan nilai absorbansi menggunakan ELISA *reader*. ELISA *reader* dihidupkan dan ditunggu sampai proses *prossesing* selesai. Selanjutnya dibuka pembungkus *plate* lalu dimasukkan ke dalam ELISA *reader*. Dibaca absorbansi dari masing-masing sumuran dengan ELISA *reader* dengan $\lambda = 550-600$ nm. Kemudian dihitung prosentase sel hidup dan nilai IC₅₀.

3.5.9 Pengamatan Siklus Sel Menggunakan *Flowcytometry*

Pengamatan siklus sel ini menggunakan pewarna Promide Iodide (PI). Pewarna tersebut dapat digunakan untuk analisis sejumlah set DNA pada setiap sel. Sel sebanyak 5×10^5 sel/ sumuran ditanam dalam 6 *well plate* (untuk perlakuan dan untuk kontrol sel). Keadaan sel diamati di bawah mikroskop untuk melihat distribusi sel, kemudian sel diinkubasikan sampai normal kembali. Setelah sel normal kembali, dibuat seri konsentrasi sampel untuk perlakuan. Plate yang berisi sel diambil dari inkubator. Media sel dibuang dengan menggunakan pipet pasteur secara perlahan-lahan. Semua sumuran yang berisi sel dicuci dengan 500 μ l PBS. PBS dibuang dengan pipet pasteur secara perlahan-lahan. Untuk perlakuan, dimasukkan 1000 μ l seri konsentrasi sampel kedalam sumuran. Sedangkan untuk kontrol sel ditambahkan 1000 μ l MK kedalam sumuran, lalu diinkubasi dalam inkubator CO₂. Pada waktu akhir inkubasi, kondisi sel didokumentasikan untuk setiap perlakuan.

Langkah selanjutnya disiapkan 1 konikel untuk 1 jenis perlakuan. Media diambil dari sumuran dengan mikropipet 1 ml, dan ditrasfer ke konikel, lalu ditambahkan 500 μ l PBS kedalam sumuran. PBS diambil dengan mikropipet dan ditransfer ke dalam konikel. Sebanyak 299 μ l tripsin-EDTA 0,25% ditambahkan kemudian diinkubasi di inkubator selama 3 menit.

Sebanyak 1 ml MK ditambahkan dan dilakukan resuspensi sampel sel agar lepas satu persatu dan diamati dibawah mikroskop. Setelah sel lepas satu per satu, sel ditransfer ke konikel dan ditambahkan kembali 500 μ l PBS kedalam sumuran untuk mengambil sisa sel, lalu ditransfer kedalam konikel. Sel yang berada pada konikel disentrifus dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit. PBS dibuang

dengan cara dituang, lalu plate sel dicuci dengan 500 µl PBS dingin, disentrifus kembali dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit. PBS dibuang dengan cara dituang, lalu diteteskan 500 µl alkohol 70% kedalam konikel sambil digoyang perlahan. Konikel disimpan pada suhu ruang (37⁰C) selama 30 menit, kemudian disentrifus kembali dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit. Alkohol dibuang dan ditambahkan 500 µl PBS, kemudian disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 3 menit. Dilakukan 2 kali pencucian dengan PBS. Konikel dibungkus dengan aluminium foil dan diberi tanda. Ditambahkan reagen *flowcytometry* dan didiamkan selama 30 menit. Kemudian suspensi sel ditransfer kedalam *flowcytotope*, lalu dibaca dengan *flowcytometer* FACS *Calibur* untuk mengetahui profil *cell cycle*.

Data *flowcytometry* dianalisis dengan program *cell quest* untuk melihat distribusi sel pada fase-fase siklus sel sub G1 (apoptosis), S dan G2/M. Penghambatan siklus sel yang terjadi dapat diketahui dengan membandingkan antara efek perlakuan dengan kontrol. Metode pengamatan siklus sel ini mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Amrullah (2018).

3.6 Analisis Data

Analisis tingkat konfluenitas sel menggunakan program *ImageJ*, sedangkan tingkat viabilitas sel dihitung dengan *Automatic Cell Counter*. Data konfluenitas dan viabilitas sel kemudian dianalisis menggunakan statistik *One Way ANOVA*.

Analisis uji sitotoksik dilakukan dengan menentukan nilai *IC50* dari ekstrak daun kesambi. Perhitungan *IC50* dibuat dengan cara membuat grafik log

konsentrasi vs prosentase sel hidup dengan *chart type scatter* dan *chart subtype compare pairs of values*. Konversi prosentase presentase sel hidup/ viabilitas sel dihitung dengan menggunakan rumus :

$$= \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontro media})}{(\text{Absorbansi kontrol sel}) - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Keterangan :

Abs. Perlakuan : Absorbansi perlakuan (media sel + sel + senyawa uji)

Abs. Kontrol Media : Absorbansi media (media sel)

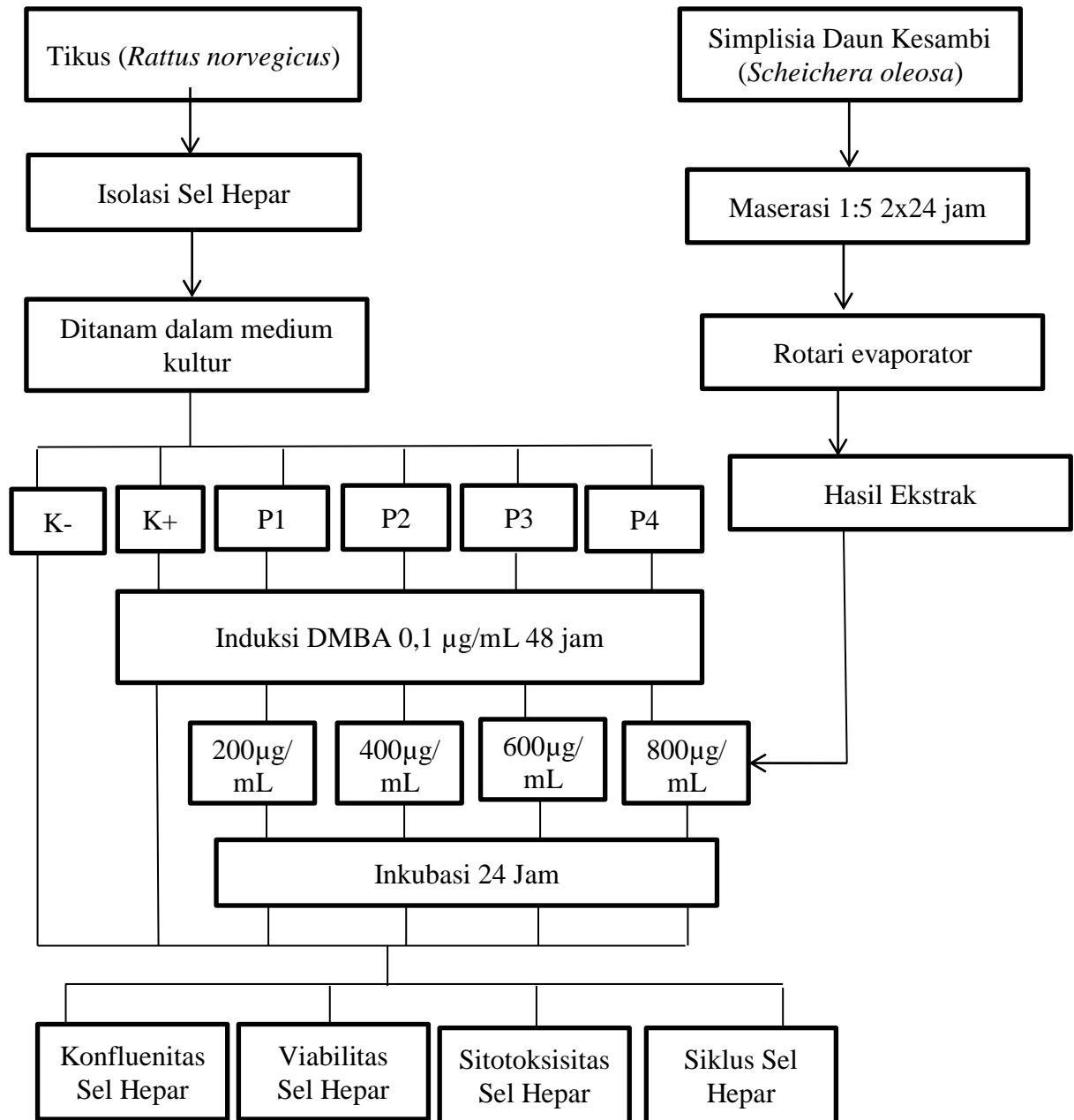
Abs. Kontrol Sel : Absorbansi kontrol sel (media sel + sel)

Selanjutnya dibuat kurva jumlah sel hidup dan waktu inkubasi untuk menentukan persamaan garis dan menentukan nilai *IC50*. Nilai *IC50* yang kecil menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki efek sitotoksik yang tinggi, begitu pula sebaliknya, nilai *IC50* yang besar menunjukkan bahwa efek sitotoksiknya rendah. *IC50* merupakan kadar yang menyebabkan kematian 50% populasi sel. *IC50* dihitung dengan persamaan $Y = B.X + A$, dengan Y adalah probit persen kematian sel dan X adalah log kadar. Semakin kecil nilai *IC50* makin poten senyawa uji tersebut.

Menurut (Meyer , *et al.*, 1982) suatu ekstrak dikatakan bersifat toksik jika nilai *IC50* < 1000 ppm, sedangkan untuk senyawa murni jika *IC50* < 200 ppm berpotensi sebagai antikanker.

Adapun data untuk siklus sel berbentuk gambar dan grafik hasil dari pengamatan pada *flowcytometry* dianalisis secara deskriptif.

3.7 Alur Kerja Penelitian



BAB IV

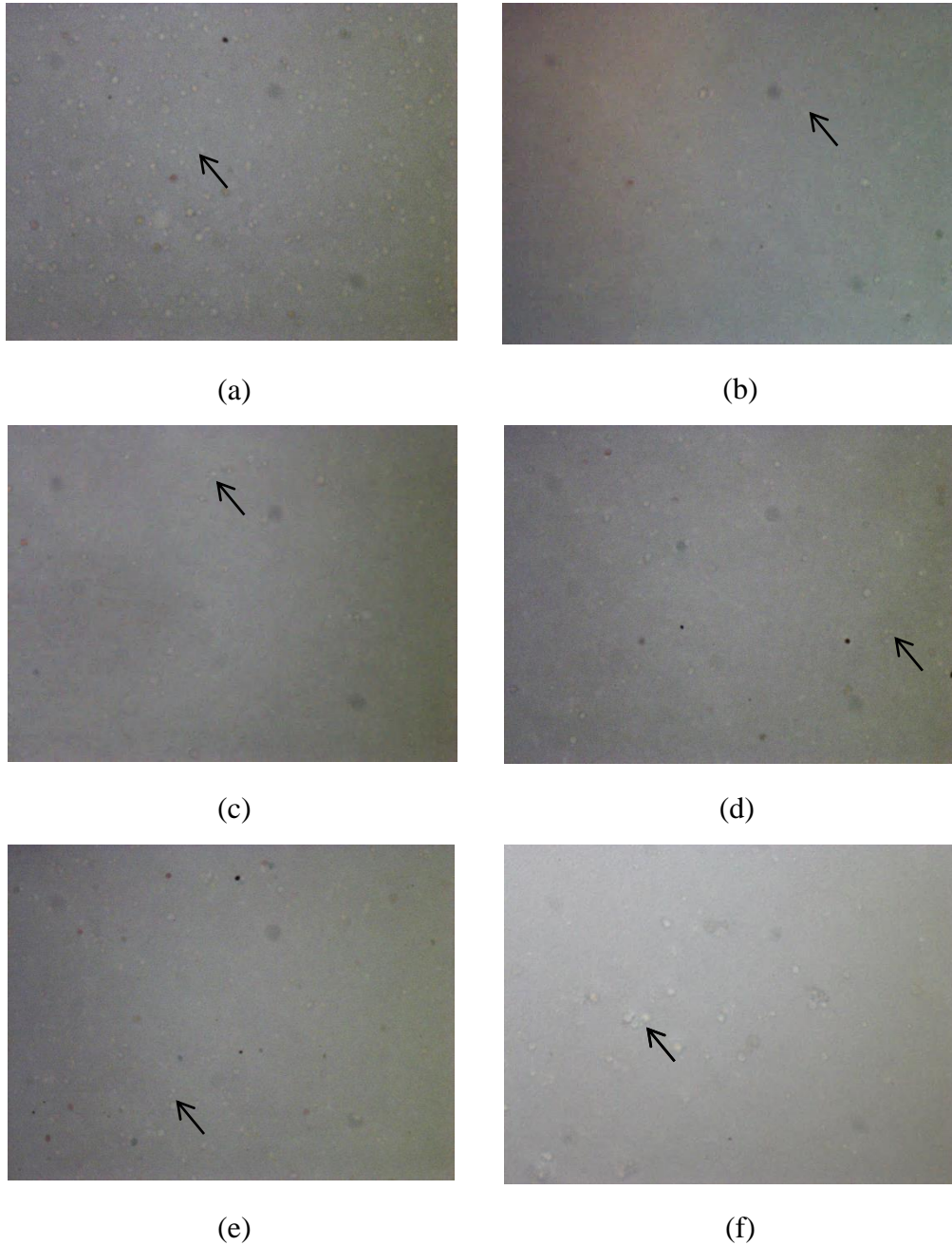
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh Ekstrak Daun Kesambi (*Scheichera oleosa*) Terhadap Konfluenitas Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-DMBA Secara *In Vitro*

Pengaruh ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) terhadap konfluenitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA ditandai dengan adanya perlekatan sel dengan substrat dan perlekatan sel dengan sel lain yang membentuk agregat (membentuk elongasi atau perpanjangan/ penjuluran). Pengamatan konfluenitas ini bertujuan untuk mengetahui tingkat proliferasi sel hepar yang diinduksi DMBA berdasarkan tingkat konfluenitasnya.

Pengamatan konfluenitas dilakukan pada hari ke 3 setelah penanaman dengan perlakuan yang berbeda yaitu: kelompok K (-): sel hepar dalam media DMEM 10% FBS, kelompok K (+): sel hepar dalam media DMEM 10% FBS yang diinduksi DMBA 0,1 µg/mL selama 48 jam, kelompok P1: sel hepar dalam media DMEM 10% FBS yang diinduksi DMBA 0,1 µg/mL selama 48 jam dan ekstrak daun kesambi 200µg/mL, kelompok P2: sel hepar dalam media DMEM 10% FBS yang diinduksi DMBA 0,1 µg/mL selama 48 jam dan ekstrak daun kesambi 400µg/mL, kelompok P3: sel hepar dalam media DMEM 10% FBS yang diinduksi DMBA 0,1 µg/mL selama 48 jam dan ekstrak daun kesambi 600µg/mL dan kelompok P4: sel hepar dalam media DMEM 10% FBS yang diinduksi DMBA 0,1 µg/mL selama 48 jam dan ekstrak daun kesambi 800µg/mL.

Adapun pengaruh ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) terhadap konfluenitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA dapat dilihat pada gambar 5.1 berikut:



Gambar 4.1 Konfluenitas sel hepar tikus (*Rattus nirvegicus*) yang diinduksi DMBA selama 48 jam dan pemberian ekstak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) yang ditunjukkan tanda panah. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop *inverted* perbesaran 200 x. (a): K-, (b): K+, (c): P1, (d): P2, (e): P3 dan (f): P4

Berdasarkan gambar tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan konfluenitas pada kontrol (a dan b) dan perlakuan (c, d, e dan f). pada gambar a mengalami konfluenitas tinggi dari pada gambar b yang merupakan kontrol dengan pemberian 7,12-DMBA. Gambar c, d, e dan f juga menunjukkan tingkat konfluenitas yang berbeda. Pada gambar d menunjukkan tingkat konfluenitas paling sedikit sedangkan gambar f menunjukkan konfluenitas paling banyak dari setiap perlakuan. Pada keseluruhan kelompok perlakuan baik kontrol maupun perlakuan ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) pada sel hepar belum mengalami ekspansi yang berarti.

Kultur sel primer merupakan kultur yang berasal dari disgregasi jaringan, sel yang tumbuh dan melekat pada substrat merupakan hasil seleksi dari sel-sel yang ada, sifat dari kultur sel primer yaitu dapat bertahan hidup setelah dilakukan disagregasi dan memiliki sifat *adhesive*, yaitu mampu melekat pada substrat (Trenggono, 2009).

Beberapa aspek fungsi khusus ditunjukkan oleh kultur sel primer diantaranya ketika mengalami konfluenitas kultur sel primer cenderung menunjukkan kemiripan morfologi dengan jaringan induk dan mampu mempertahankan beberapa keragaman. Setelah proses penanaman, sel-sel yang mampu berproliferasi akan mengalami penambahan jumlah, akan tetapi beberapa jenis sel hanya mampu bertahan, tetapi tidak mengalami proliferasi, bahkan ada yang tidak dapat bertahan dalam kondisi tertentu. Oleh karena itu, proporsi kebutuhan setiap sel relatif diperlukan sampai sel tersebut dalam kondisi *monolayer* (Freshney, 2010).

Pada hari ke-3 setelah penanaman, sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) telah mengalami konfluen sekitar 40%, hasil tersebut menunjukkan bahwa sel telah mengalami pertumbuhan pada tahap *log phase* (fase eksponensial) yaitu fase sel yang mengalami peningkatan jumlah sel secara eksponensial dan saat pertumbuhan mencapai konfluen.

Konfluenitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang ditandai dengan tanda panah menunjukkan bahwa sel hepar telah mengalami perlekatan sel pada substrat dan berproliferasi. Menurut Hansen *et al*, (1994) perlekatan sel dengan permukaan substrat membentuk *attachmen site* yang dipengaruhi oleh adanya interaksi molekuler dan adhesi sel. Interaksi molekuler dan adhesi sel melibatkan bentuk interaksi sel dengan sel, sel dengan *extracellular matrix* (ECM), sel dengan faktor pertumbuhan, *extracellular matrix* (ECM) dengan *extracellular matrix* (ECM) dan *extracellular matrix* (ECM) dengan faktor pertumbuhan.

Pertumbuhan sel bergantung pada dua jenis sinyal ekstrasel yang berasal dari mediator terlarut dan matriks ECM. Sinyal pertama berasal dari molekul terlarut, seperti faktor pertumbuhan dan penghambat (inhibitor) pertumbuhan polipeptida. Sedangkan sinyal yang kedua melibatkan unsur tidak terlarut pada ECM yang berinteraksi dengan integrin sel. Integrin merupakan kelompok glikoprotein heterodimer transmembran sel yang berikatan dengan ECM melalui tripeptida arginin-glisin-asam aspartat yang terdapat pada fibronektin (Hansen *et al*, 1994).

Interaksi ini memberikan sinyal perlekatan sel dan dapat mempengaruhi pergerakan dan proliferasi sel. Dengan demikian interaksi integrin dengan ECM digunakan faktor pertumbuhan untuk berikatan dengan reseptornya dan

mengaktifkan kaskade atau sinyal transduksi. Kaskade kinase yang dihasilkan menyebabkan aktivasi faktor transkripsi inti, menginisiasi sintesis DNA hingga pembelahan sel (Kumar *et al*, 2007).

Induksi 7,12-DMBA dengan konsentrasi 0,1 µg/mL selama 48 jam terhadap sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) secara morfologi tidak dapat dibedakan dengan sel hepar yang tidak diinduksi 7,12-DMBA, akan tetapi sel hepar yang diinduksi 7,12-DMBA diduga menunjukkan pertumbuhan yang abnormal. Menurut Suidiana (2008) adanya perubahan perilaku sel yang abnormal, yaitu mempunyai kemampuan proliferasi yang tinggi, disebabkan sel mengekspresikan berbagai protein yang abnormal sehingga sel mengalami transformasi (pembentukan sel kanker). Terkespresinya berbagai protein abnormal dikarenakan sel mengalami mutasi (kecatatan gen) akibat induksi oleh suatu mutagen.

7,12-DMBA yang dipapar atau diinduksi pada sel kultur primer sebagian metabolit terlarut air (hidrofilik). Metabolisme DMBA yang terlarut dengan penanda bentukan *DNA adduct* telah diidentifikasi, sehingga pada pemberian 0,1 µg/mL selama 48 jam 7,12-DMBA menghasilkan metabolisme reaktif DMBA-3,,4-diol sebesar 24% dari metabolit yang terlarut dalam hasil ekstraksi sel, maka hal tersebut telah mampu menginduksi mutasi (Digiovanni *et al*, 1984).

Data perhitungan pengaruh ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) terhadap konfluenitas dianalisis dengan menggunakan *software ImageJ* (Lampiran 3), kemudian dianalisis menggunakan SPSS *One Way Anova*. Berikut merupakan ringkasan tabel *One Way Anova* dengan hasil konfluenitas pada tabel diperoleh $F_{hitung} > F_{tabel}$ ($\alpha=0.05$), hal ini menunjukkan terdapat pengaruh nyata ekstrak

daun kesambi (*Scheichera oleosa*) terhadap konfluenitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12-DMBA secara *in vitro*.

Tabel 4.1 Ringkasan ANOVA Pengaruh Ekstrak Daun Kesambi (*Scheichera oleosa*) Terhadap Konfluenitas Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-DMBA Secara *In Vitro*

ANOVA					
Konfluenitas					
SK	JK	db	KT	Fhitung	Ftabel
Perlakuan	2076.140	5	415.228	5.070	2.62
Galat	1965.662	24	81.903		
Total	4041.802	29			

Hasil notasi UJD 5% aktivitas antikanker ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) terhadap konfluenitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12-DMBA secara *In Vitro* dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 4.1.2 Ringkasan UJD 5% Pengaruh Ekstrak Daun Kesambi (*Scheichera oleosa*) Terhadap Konfluenitas Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-DMBA Secara *In Vitro*

Perlakuan	Rata-rata Konfluenitas	Notasi UJD 5%
K-	12,93	a
K+	10,55	b
P1	9,52	b
P2	6,22	c
P3	31,54	d
P4	10,02	b

Angka yang didampingi oleh adanya huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 5% ($\alpha=0.05$)

Berdasarkan tabel ringkasan UJD 5% tersebut menunjukkan bahwa konfluenitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) terhadap pemberian ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) yang diinduksi 7,12-DMBA pada perlakuan P2 berbeda nyata dengan perlakuan P1, P4 dan K(+). Pada perlakuan K(+) berbeda nyata dengan K(-), sedangkan pada perlakuan P3 berbeda sangat nyata dengan K

(-), K(+), P1, P2 dan P4. Perlakuan K(-) memiliki tingkat konfluenitas dengan rata-rata tertinggi dibandingkan dengan seluruh perlakuan kecuali P3.

Perlakuan pemberian ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) diharapkan mampu memberikan pengaruh terhadap tingkat konfluenitas sel hepar yang diinduksi 7,12-DMBA pada tiap konsentrasi. Akan tetapi pada penelitian ini, pemberian ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) di setiap perlakuan belum menunjukkan penurunan konfluenitas secara berurutan dari setiap konsentrasi. Pada perlakuan (K-) dan (K+) terdapat perbedaan nyata rata-rata konfleunitasnya. Perlakuan (K-) menunjukkan tingkat konfluenitas lebih tinggi dari pada (K+), yang seharusnya diharapkan (K+) mempunyai tingkat konfluenitas lebih tinggi dikarenakan (K+) merupakan perlakuan dengan pemberian 7,12-DMBA. Hal ini dimungkinkan terkait dengan metabolit DMBA.

Metabolit reaktif DMBA dapat berkonjugasi dengan GSh oleh GST. Enzim detoksifikasi fase II mengkatalis pengeluaran reaksi produk CYP fase I. Walaupun enzim fase I dan fase II mendetoksifikasi DMBA, namun beberapa *dioloxide* lolos dari detoksifikasi yang mampu berikatan dengan residu adenin DNA sehingga menyebabkan mutasi onkogen pada sel normal menjadi transformasi sel abnormal (Nagini, 2009). Sehingga diduga metabolit reaktif DMBA pada perlakuan tersebut terjadi proses detoksifikasi oleh enzim dan tidak adanya *dioloxide* yang lolos dari detoksifikasi, maka produk metabolit reaktif DMBA tidak berikatan dengan adenin DNA. Hal ini menyebabkan induksi DMBA tersebut tidak menyebabkan proliferasi yang berlebihan akibat dari kerusakan DNA, yang dapat dilihat dari indikator tingkat konfluenitas yang rendah.

Menurut Freshney (2010), setelah proses penanaman, sel-sel yang mampu berproliferasi akan mengalami pertambahan jumlah, akan tetapi beberapa jenis sel hanya mampu bertahan, tetapi tidak mengalami proliferasi, bahkan ada yang tidak dapat bertahan dalam kondisi tertentu. Oleh karena itu, proporsi kebutuhan setiap sel relatif diperlukan sampai sel tersebut dalam kondisi *monolayer*.

Selain itu, perbedaan tingkat konfluenitas sel hepar dimungkinkan karena adanya interaksi senyawa-senyawa yang terdapat pada ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) yang pada konsentrasi tertentu mampu membantu sel untuk meningkatkan kemampuan bertahan hidup dan berproliferasi sehingga mempengaruhi tingkat konfluenitas sel hepar. Senyawa-senyawa tersebut dimungkinkan bertindak sebagai antioksidan sehingga mampu melindungi sel hepar dari kerusakan.

Walaupun demikian, pada perlakuan P2 dengan pemberian ekstrak daun kesambi sebesar 400µg/mL ini mampu menurunkan tingkat konfluenitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA, sehingga pertumbuhan dan proliferasi sel juga akan menurun. Penurunan tingkat konfluen yang dialami oleh sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12 DMBA dengan pemberian ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) terjadi karena banyaknya sel hepar yang telah mengalami kematian. Kematian sel hepar tersebut dipicu oleh adanya senyawa kimia yang mampu bersifat sebagai sitotoksik pada ekstrak daun kesambi, sehingga menyebabkan penurunan permeabilitas pada membran sel sehingga sel mengalami kematian.

Penurunan tingkat konfluen terhadap sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12 DMBA dengan pemberian ekstrak daun kesambi (*Scheichera*

oleosa) diduga karena aktivitas terpenoid sebagai salah satu senyawa turunan steroid yang terkandung dalam ekstrak daun kesambi yang mampu berikatan dengan sebagian molekul yang bersifat non polar pada membran sel yaitu kolesterol dan fosfolipid, menghentikan siklus sel dan menginduksi kematian sel (apoptosis).

Menurut Wahed (2009) terpenoid mampu mengurangi *reactive oxygen species* seperti H_2O_2 dengan meningkatkan kerusakan *peroxiredoxins*, *katalase*, dan *glutathione peroksidase* serta menekan produksi dengan menghambat jalur signaling *phosphatidylinositol-3-kinase* yang mencegah kerusakan kromosom. Kerusakan tersebut disebabkan oleh afinitas aglikon pada membran sterol, terutama kolesterol. Sel kanker memiliki struktur membran dengan lebih banyak senyawa kolesterol.

Terpenoid juga mengakibatkan sitotoksik terhadap sel kanker melalui *epidermal growth factor receptor* (EGFR) dan aktivasi apoptosis melalui jalur caspase oleh aktivasi caspase-3 dengan menekan induksi protein antiapoptosis bcl-2 dan bcl-x (Weng *et al.*, 2012).

Berdasarkan hal tersebut, semakin tinggi pemberian konsentrasi suatu ekstrak belum tentu mampu menjadikan sel tersebut mengalami kerusakan /kematian ataupun sebaliknya. Hal ini dikarenakan setiap senyawa dalam bahan alam tertentu mempunyai fungsi dan peran masing-masing berdasarkan tingkat konsentrasi dan sel target.

4.2 Pengaruh Ekstrak Daun Kesambi (*Scheichera oleosa*) Terhadap Viabilitas Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-DMBA Secara *In Vitro*

Viabilitas merupakan salah satu parameter penting yang menunjukkan kemampuan sel untuk bertahan hidup dan menjelaskan proses metabolisme sel dalam media selama proses kultur *in vitro* berlangsung (Bolt, 2001). Menurut Browne dan Al-Rubei (2011) dalam kultur sel, viabilitas yang optimal sangat penting dalam menjaga kualitas sel dan dapat mempengaruhi keberhasilan kultur. Sedangkan sel yang *non-viable* (mati) dalam kultur dapat menghambat produktivitas sel dalam perkembangannya. Pengujian viabilitas juga dapat bertujuan untuk mengetahui sitotoksitas sel terhadap ekstrak berdasarkan penurunan viabilitas sel tersebut. Pada penelitian ini pengujian ekstrak metanol 96% daun kesambi (*Scheichera oleosa*) dilakukan terhadap sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12-DMBA menggunakan metode MTT *assay*.

Pengujian menggunakan MTT *assay* mempunyai prinsip kerja pada terjadinya reaksi reduksi garam tetrazolium MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetra-zolium bromide) oleh *sistym reductase*. Suksinat tetrazolium dengan mitokondria sel-sel hidup akan membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Selanjutnya diberikan larutan *stopper Sodium Dodesil Sulfat* (SDS) untuk menghentikan reaksi MTT. SDS bekerja dengan tujuan untuk melisiskan membran sel dan mendenaturasi protein sehingga reaksi antara MTT dengan mitokondria dapat dihentikan (Bhuyan, 2009).

Larutan stok ekstrak dibuat sebagai perlakuan sel. Sebanyak 5 mg ekstrak daun kesambi dilarutkan dengan 10 mL *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO). DMSO digunakan sebagai buffer untuk melarutkan ekstrak dengan baik. Konsentrasi

ekstrak yang digunakan sebagai perlakuan adalah 200 µg/ mL, 400 µg/ mL, 600 µg/ mL dan 800 µg/ mL. Setiap konsentrasi disiapkan sebanyak 5 kali pengulangan yang bertujuan untuk mengetahui signifikansi peningkatan dosis dengan efek peningkatan proliferasi sel yang dihasilkan.

Sel hepar dibiakkan dalam media kultur (MK) dengan penambahan *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% untuk suplemen peningkat pertumbuhan bagi sel. FBS mengandung berbagai nutrisi untuk pertumbuhan dan perlindungan sel seperti asam amino, vitamin, garam-garam anorganik serta glukosa. Sel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dan CO₂ 5% selama 24 jam. Setelah sel diinkubasi selama 24 jam dilakukan penghitungan menggunakan *Automatic cell counter*, kemudian ditanam kedalam *96-well plate* dengan menambahkan media sebanyak 10 mL. Setiap sumuran diisi sebanyak 100 µL suspensi sel, kemudian diinkubasi selama 2-4 jam samapi terbentuk formazan. Jika sudah terbentuk formazan ditambahkan stopper 100 µL SDS 10% dalam 0,1 N HCl. Setelah itu, sel dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi pada suhu kamar di tempat gelap selama semalam. Kemudian dilakukan pembacaan absorbansi dengan menggunakan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 500-600 nm.

Data perhitungan pengaruh ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) terhadap sitotoksitas yang dilakukan melalui pembacaan absorbansi (Lampiran 4), kemudian dianalisis menggunakan SPSS *One Way Anova*. Berikut merupakan ringkasan tabel *One Way Anova* dengan hasil viabilitas pada tabel diperoleh F hitung > F tabel ($\alpha=0.05$), hal ini menunjukkan terdapat pengaruh ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) terhadap viabilitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12-DMBA secara *in vitro*.

Tabel 4.2 Ringkasan ANOVA Pengaruh Ekstrak Daun Kesambi (*Scheichera oleosa*) Terhadap Viabilitas Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-DMBA Secara *In Vitro*

ANOVA					
Viabilitas					
SK	JK	db	KT	Fhitung	Ftabel
Perlakuan	0.105	5	0.021	4.83	2.62
Galat	0.105	24	0.004		
Total	0.210	29			

Hasil notasi UJD 5% pengaruh ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) terhadap viabilitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12-DMBA secara *In Vitro* dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 4.2.1 Ringkasan UJD 5% Pengaruh Ekstrak Daun Kesambi (*Scheichera oleosa*) Terhadap Viabilitas Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-DMBA Secara *In Vitro*

Perlakuan	Rata-rata Viabilitas	Notasi UJD 5%
K-	0.627	a
K+	0.662	a
P1	0.605	a
P2	0.497	b
P3	0.519	b
P4	0.612	a

Angka yang didampingi oleh adanya huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 5% ($\alpha=0.05$)

Berdasarkan tabel ringkasan UJD 5% tersebut menunjukkan bahwa viabilitas sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) terhadap pemberian ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) yang diinduksi 7,12-DMBA pada perlakuan P2 dan P3 berbeda nyata dengan perlakuan (K-), (K+), P1, dan P4. Pada perlakuan P2 (terutama) mampu menurunkan tingkat viabilitas sel hepar dari pada perlakuan

yang lain, walaupun pada perlakuan P4 menunjukkan kenaikan tingkat viabilitas akan tetapi nilai rata-rata masih dibawah perlakuan kontrol.

Dari hasil pengujian viabilitas tersebut dapat diketahui pengaruh sitotoksisitas ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) terhadap sel hepar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12-DMBA berdasarkan nilai pembacaan absorbansi pada tabel berikut:

Tabel 4.2.2 Persentase Viabilitas Sel Pada Tiap Konsentrasi Ekstrak Daun Kesambi (*Scheichera Oleosa*) Melalui Pembacaan Absorbansi

Konsentrasi	% Viabilitas \pm SD
K- (0 μ l)	62,8 \pm 0,040
K+ (0 μ l)	66,3 \pm 0,089
P1 (200 μ l)	60,5 \pm 0,042
P2 (400 μ l)	49,7 \pm 0,052
P3 (600 μ l)	51,9 \pm 0,061
P4 (800 μ l)	61,2 \pm 0,093

Berdasarkan tabel tersebut dapat diperoleh tingkat viabilitas sel dengan persentase paling tinggi yaitu pada konsentrasi 0 μ g/mL (K+) sebesar 66.3 \pm 0,089, sedangkan tingkat viabilitas sel terendah adalah pada konsentrasi 400 μ g/mL (P2) sebesar 49,7 \pm 0,052 %. Nilai sitotoksisitas ekstrak daun kesambi diperoleh melalui persamaan regresi linear (Lampiran 5) dengan IC50 sebesar 15,77 ppm dapat dikatakan memiliki nilai IC50 < 1000 ppm. Ekstrak dikatakan bersifat toksik jika nilai IC50 < 1000 ppm, sedangkan untuk senyawa murni jika IC50 < 200 ppm berpotensi sebagai antikanker (Meyer , *et al.*, 1982). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun kesambi bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker.

Penurunan jumlah rata-rata viabilitas sel hepar antara perlakuan kontrol dengan perlakuan pemberian ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) menunjukkan adanya aktivitas senyawa terpenoid yang diduga mampu menurunkan viabilitas sel hepar yang diinduksi 7,12-DMBA. Haridas et al., (2006) menyatakan bahwa terpenoid tidak hanya membuat kerusakan membran plasma tetapi juga membran permeabel intraseluler terhadap protein. Hal ini disebabkan interaksi terpenoid mampu berikatan dengan kolesterol pada membran sel, sehingga mengganggu permeabilitas membran sel. Selain itu juga mampu menekan protein antiapoptosis bcl-2 dan bcl-x serta aktivasi caspase.

Sel yang mati menunjukkan pengaruh sitotoksik ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) terhadap sel hepar yang diinduksi 7,12-DMBA, dikarenakan ekstrak daun kesambi diduga mengandung terpenoid yang target utamanya yaitu kematian sel (apoptosis) dan kerusakan membran.

Terpenoid yang terkandung dalam ekstrak daun kesambi diduga mampu berikatan dengan sebagian besar molekul yang bersifat nonpolar pada membran plasma maupun membran permeabel intraseluler, dan hanya sebagian kecil berikatan dengan molekul yang bersifat polar sehingga menyebabkan apoptosis pada sel hepar. Hal ini dikarenakan senyawa terpenoid bersifat amfifilik. Seperti yang dikemukakan oleh Yadav, *et al.*, (2010) dan Tang, *et al.*, (2009) bahwa terpenoid memiliki satu target yang umum yaitu antiapoptotik protein bcl-2 yang dapat menimbulkan apoptosis dalam sel-sel kanker dan peningkatan permeabilitas membran.

Permeabilitas membran seringkali berhubungan dengan sifat kelarutan dengan aktivitas biologis dari suatu senyawa. Sifat kelarutan juga berhubungan

erat dengan proses absorpsi obat. Konsep bahwa kelarutan senyawa organik dalam lemak berhubungan dengan mudah tidaknya penembusan membran sel. Senyawa nonpolar bersifat mudah larut dalam lemak (Siswandono dan Soekarjdo, 2008).

Mekanisme turunan terpenoid yang terkandung dalam ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) melibatkan aktivasi sinyal transduksi *extracellular signal-regulated kinase* (ERK 1/2) dan jalur p38 *mitogen-activated protein kinase* (p38 MAPK), kedua jalur tersebut responsif terhadap rangsangan stress, misalnya *shock osmotic*. Kemudian jalur instrinsik apoptosis transisi permeabilitas membran mitokondria (Hsu *et al.*, 2005). Transisi permeabilitas mitokondria menyebabkan peningkatan kalsium sitosol, stres oksidatif intrasel (Kumar *et al.*, 2007).

Secara fisiologis, sistem pertumbuhan sel dalam individu diatur oleh suatu sistem keseimbangan yaitu apoptosis dan proliferasi. Apabila pada individu terjadi apoptosis yang berlebihan, maka individu tersebut akan mengalami kemunduran fungsi dari suatu sistem organ yang dapat menimbulkan suatu penyakit. Demikian juga halnya bila terjadi proliferasi sel secara berlebihan, maka akan terjadi massa tumor (*malignancy*) (Sudiana, 2008).

Proses pertumbuhan sel membutuhkan keseimbangan, baik proliferasi maupun apoptosis. Apabila sel mengalami abnormalitas maka sel tersebut secara alami akan melakukan “bunuh diri” melalui jalur apoptosis. Jika keduanya berjakan tidak seimbang maka akan berdampak bagi pertumbuhan sel tersebut. Allah berfirman dalam surat Al-Mulk ayat 3:

الَّذِي خَلَقَ سَبْعَ سَمَوَاتٍ طِبَاقًا ۗ مَا تَرَىٰ فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِن تَفَوتٍ ۗ فَأَرِجْ

الْبَصَرَ هَلْ تَرَىٰ مِن فُطُورٍ ﴿٣﴾

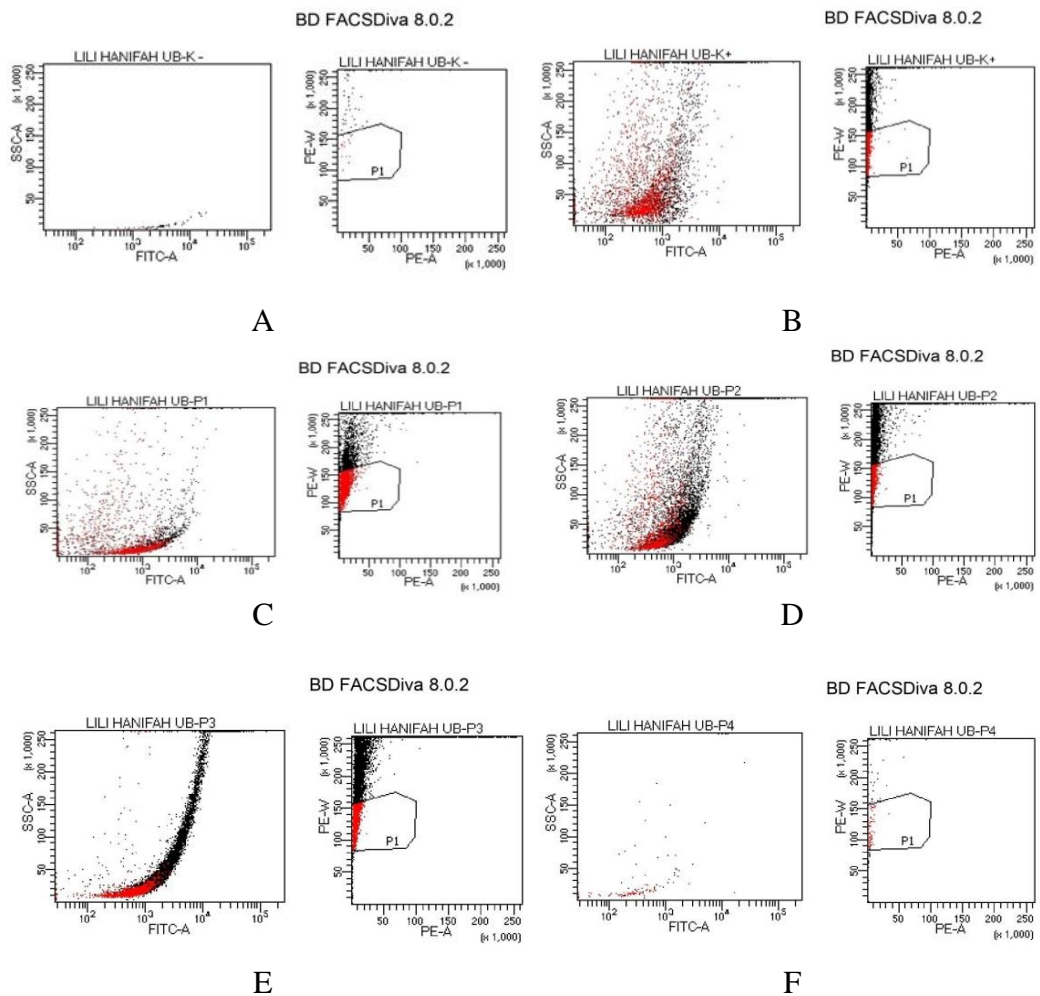
Artinya: *Yang telah menciptakan tujuh langit berlapis-lapis. kamu sekali-kali tidak melihat pada ciptaan Tuhan yang Maha Pemurah sesuatu yang tidak seimbang. Maka lihatlah berulang-ulang, Adakah kamu lihat sesuatu yang tidak seimbang? (Q.S Al-Mulk:3).*

Maksud dari kalimat مَا تَرَىٰ فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِن تَفَوتٍ adalah semua ciptaan Allah bersesuaian dan seimbang. Tidak ada pertentangan, benturan, ketidakcocokan, kekurangan dan kerusakan (Abdullah, 2006). Shihab (2003) menjelaskan bahwa Allah menciptakan seluruh makhluk dalam keadaan seimbang sebagai rahmat, karena seandainya ciptaan-Nya tidak seimbang, maka tentulah akan terjadi kekacauan.

Kata seimbang pada firman Allah tersebut dapat diartikan sebagai keadaan yang homeostatis. Seperti halnya proses keseimbangan dalam proses pertumbuhan sel. Apabila antara proses proliferasi dan apoptosis tidak berjalan dengan seimbang maka akan berdampak buruk bagi kelangsungan hidup sistem pada suatu organisme.

4.3 Pengaruh Ekstrak Daun Kesambi (*Scheichera oleosa*) Terhadap Siklus Sel Hepar Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi 7,12-DMBA Secara *In Vitro*

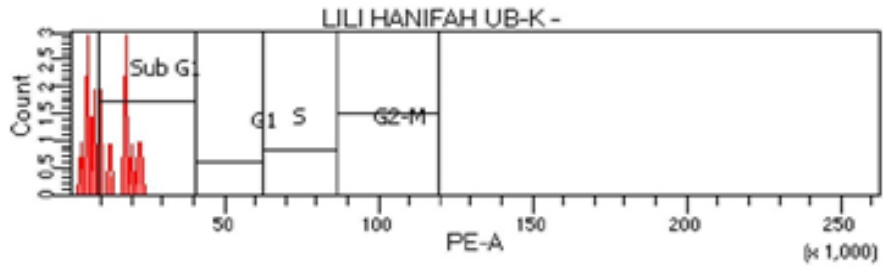
Pengaruh ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) terhadap siklus sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi 7,12-DMBA dapat dilihat pada gambar berikut.



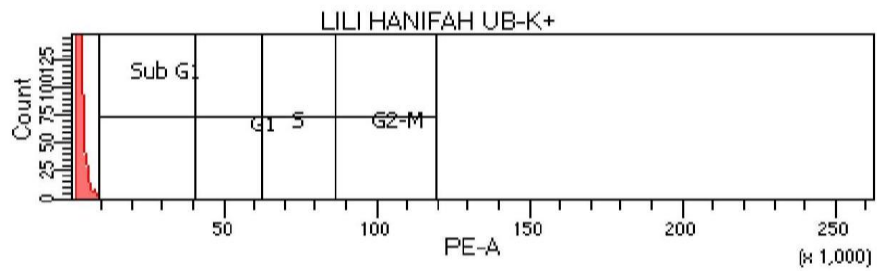
Gambar 4.3 Hasil *flowcytometry* persebaran sel pada setiap perlakuan K- (A), K+ (B), P1 (C), P2 (D), P3 (E) dan P4 (F).

Gambar tersebut menunjukkan bahwa pada sebaran sel dengan warna hitam merupakan sel yang masih heterogen, sedangkan warna merah

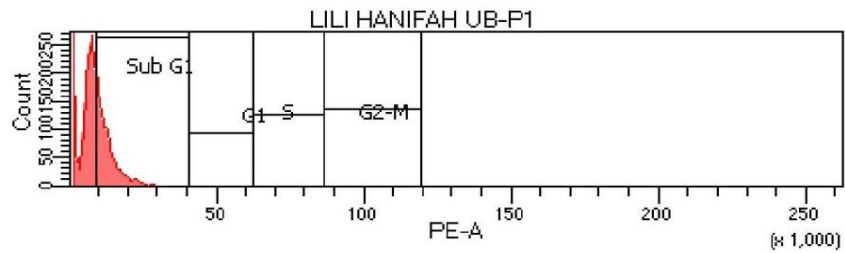
menunjukkan sel target yang akan dianalisis siklus selnya. Adapun untuk siklus sel disajikan pada gambar berikut.



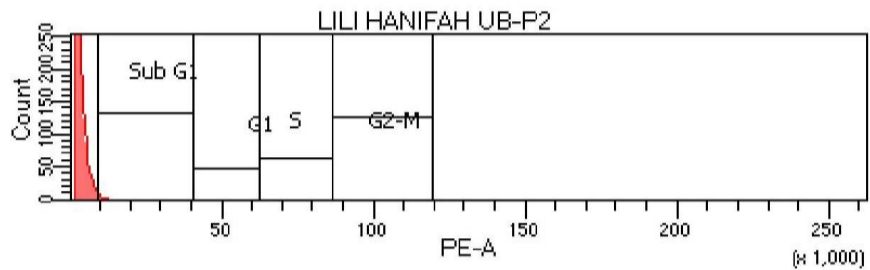
A



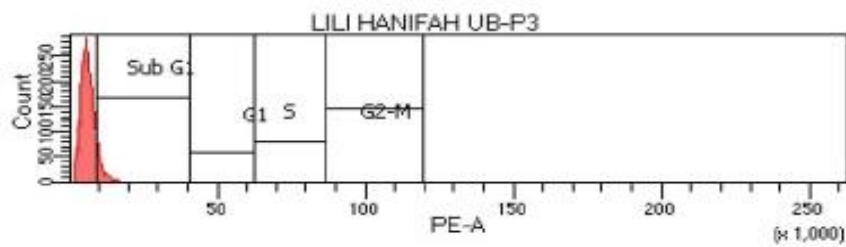
B



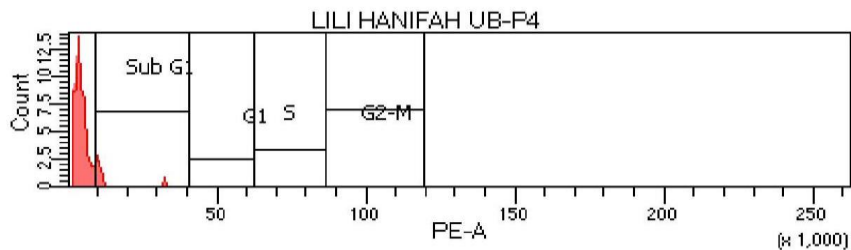
C



D



E



F

Gambar 4.3.1 Hasil *flowcytometry* siklus sel hepar *Rattus norvegicus* yang diinduksi 7,12-DMBA pada setiap perlakuan K- (A), K+ (B), P1 (C), P2 (D), P3 (E) dan P4 (F)

Pada siklus sel dengan menggunakan *flowcytometry* dapat mendeteksi setiap fase dalam siklus sel berdasarkan jumlah kromosom pada tiap-tiap fasenya. Dalam pengujian ini menggunakan pewarna *Propidium Iodide* (PI). Hasil analisa siklus sel berupa histogram yang menunjukkan persebaran sel pada tiap fase. *Flowcytometry* bekerja dengan mendeteksi jumlah kromosom pada tiap fasenya. Fase G1 memiliki jumlah kromosom $2n$ yang selanjutnya masuk kedalam fase S. Pada fase S, sel mengalami replikasi untuk persiapan memasuki fase G2 sehingga memiliki jumlah kromosom antara $2n$ dan $4n$. Sedangkan fase G2 dan M telah terjadi replikasi secara sempurna sehingga jumlah kromosom menjadi $4n$ (Putri, 2014).

Untuk mengetahui persentase persebaran siklus sel hepar *Rattus norvegicus* yang diinduksi 7,12-DMBA dengan pemberian ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 4.3 Persentase siklus sel hepar *Rattus norvegicus* yang diinduksi 7,12-DMBA dengan pemberian ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*)

Fase	% Sel				
	Kontrol	P1	P2	P3	P4
PI (Sel awal)	25	56,7	13,8	15	52,5
Sub G1	46,7	34,1	2,1	9,5	7,9
G1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
S	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G2-M	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Berdasarkan tabel tersebut menunjukkan bahwa pada perlakuan kontrol persentase jumlah sel bertambah pada fase Sub G1 dari jumlah awal sel 25% menjadi 46,7%, akan tetapi pada perlakuan P1, P2, P3 dan P4 terjadi penurunan persentase jumlah sel dari sel awal ke fase sub G1. Penurunan yang signifikan terjadi pada perlakuan P4 (800 µg/mL) dari jumlah sel awal 52,5% menjadi 7,9%. Hal ini menunjukkan bahwa pada pemberian ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) dengan konsentrasi 800 µg/mL diduga mampu menghambat pertumbuhan sel dan menghambat siklus sel pada fase sub G1. Akan tetapi pada fase-fase yang lain yaitu fase G, S dan G2-M tidak dapat diamati pada siklus sel ini. Hal ini dimungkinkan kondisi sel yang mengalami stagnasi atau bahkan tidak tumbuh sama sekali sehingga mengakibatkan jumlah persentase sel menjadi 0%.

Pada fase sub G-G1 (Gap), sel seharusnya melakukan persiapan untuk sintesis DNA. Fase ini merupakan fase awal *cell cycle progression* yang diatur oleh faktor ekstraselular seperti mitogen dan molekul adhesi. Penanda fase ini adalah adanya ekspresi dan sintesis protein sebagai persiapan memasuki fase S

(Ruddon, 2007). Sedangkan pada fase S (Sintesis) terjadi proses replikasi sehingga membentuk untai DNA yang baru. Proses replikasi DNA ini terjadi dengan bantuan enzim yang disebut dengan enzim DNA-polimerase. Dengan terbentuknya DNA baru, maka DNA yang sebelumnya rantai tunggal menjadi rantai ganda (Sudiana, 2008). Akan tetapi pada penelitian ini hanya dapat diamati pada fase sub G1-G1 saja, sedangkan pada fase S tidak dapat diamati yang seharusnya pada fase S inilah dimungkinkan terjadi akumulasi jumlah sel sebagai akibat dari proses pembelahan sel yang terjadi. Senyawa terpenoid yang terkandung dalam ekstrak daun kesambi (*Scheichera oleosa*) inilah yang diharapkan mampu menghambat biosintesis makromolekul dan menghambat peran enzim topoisomerase II selama proses transkripsi dan replikasi DNA sehingga proses pembelahan sel terhenti (Park *et al.*, 2012).

Begitupun pada fase G2-M, pada penelitian ini tidak bisa diamati. Akumulasi pada fase G2 berfungsi untuk mencegah sel memasuki fase mitosis dikarenakan adanya respon stres intrasel dan ekstrasel yang akan mengakibatkan kerusakan DNA. Fase G2 bertujuan untuk memperbaiki DNA yang mengalami kerusakan atau menghentikan proliferasi sel yang rusak untuk mempertahankan stabilitas genomik (Stark and Taylor, 2006), apabila perbaikan DNA tidak dapat dilakukan maka jalur apoptosis akan diaktifkan untuk mengeliminasi sel yang mengalami kerusakan DNA (Wang *et al.*, 2009).

Senyawa golongan terpenoid diduga memiliki aktivitas menghambat regulasi daur sel pada fase G2- M dengan cara menurunkan ekspresi protein cyclin CDK1-cyclin B dan akan mencegah sel memasuki fase mitosis (Nagappan *et al.*, 2016). Penghambatan regulasi daur sel pada fase G2-M juga dapat

dipengaruhi oleh ekspresi p53. Peningkatan ekspresi p53 akan menginduksi protein p21 dan 14-3-3 σ menginaktivasi CDK1-cyclin B1 dan akan mencegah sel memasuki fase mitosis (Taylor and Stark, 2001). Inhibitor ini menahan sel dalam fase G1 atau G2 sampai DNA dapat diperbaiki; pada tahapan tersebut, kadar TP53 menurun, CDKN1A berkurang, dan sel dapat melanjutkan tahapan. Jika kerusakan DNA terlalu luas, TP53 akan memulai suatu kaskade peristiwa untuk meyakinkan sel agar melakukan bunuh diri (apoptosis) (Kumar *et al.*, 2012).

Sunnatullah untuk makhluk ialah mengatasi suatu takdir dengan menggunakan takdir. Mengatasi takdir lapar dengan makan, mengatasi takdir haus dengan minum dan mengatasi takdir sakit dengan berobat (Al-Qardhawy, 1999). Pernyataan tersebut menjelaskan bahwa manusia (khususnya) ketika sakit tidak boleh hanya pasrah dan menerima cobaan serta rela dengan ketentuan Allah tanpa berusaha mencari kesembuhan atau obat. Menurut Shihab (1996), dalam Al-Qur'an ditegaskan bahwa "*Barang siapa yang menghidupkan seseorang, maka dia bagaikan menghidupkan manusia semuanya*" (Q.S. Al-Maidah:32). "Menghidupkan" disini dalam arti luas dapat diartikan "memelihara kehidupan", atau upaya "memperpanjang harapan hidup".

Dengan demikian, kesambi (*Scheichera oleosa*) merupakan salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai salah satu alternatif pengobatan ataupun pencegahan penyakit kanker. Pernyataan ini menunjukkan bahwa Allah SWT menciptakan tumbuh-tumbuhan yang menjadi salah satu tanda kebesaran dan kekuasaan-Nya bagi manusia agar dapat diambil manfaatnya, salah satunya kesambi (*Scheichera oleosa*) yang mungkin selama ini hanya dimanfaatkan

sebagai obat kulit. Padahal pada tumbuhan kesambi (*Scheichera oleosa*) juga dapat berpotensi sebagai antikanker.

Manusia adalah makhluk yang paling sempurna yang diciptakan oleh Allah. Kelebihan manusia diantara makhluk yang lain adalah diberikannya akal untuk selalu dapat merenung, berfikir dan menyibak segala sesuatu yang telah diciptakan oleh Allah. Karena kelebihan akal yang dimilikinya, manusia diharapkan mampu menjaga, melestarikan serta memanfaatkan segala apa yang ada di bumi ini yang telah diciptakan oleh Allah sebagai bentuk kekuasaan-Nya dan rahmat bagi hamba-Nya.

Tentang kelebihan Allah berikan kepada manusia merupakan sebuah konsekuensi agar manusia sellau berfikir, merenung, bertadabbur atas segala ciptaan-Nya, maka merekalah termasuk golongan *Ulul Albab*. Sebagaimana firman Allah dalam al-Qur'an surat Ali-Imron ayat 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَأَخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ

السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya: “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal, (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia,*

Maha suci Engkau, Maka peliharalah Kami dari siksa neraka”. (Q.S. Ali-Imron 190-191).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa yang dimaksud dengan *Ulul Albab* adalah orang-orang yang selalu mengingat Allah dalam keadaan apapun, baik dalam keadaan berdiri, duduk bahkan berbaring. Mereka tidak henti-hentinya memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi beserta isinya, karena pada penciptaan Allah tidak ada sesuatu yang sia-sia. Sehingga, sudah seharusnya manusia sebagai satu-satunya makhluk yang berakal bisa merenungkan, memikirkan, mempelajari sebagai suatu pelajaran yang mulia.

Kegiatan penelitian ini merupakan salah satu bentuk merenung, berfikir dan mempelajari suatu fenomena yang melibatkan akal dan hati. Dengan akal manusia bisa berfikir dan memahami segala bentuk fenomena di alam ini sebagai sumber ilmu pengetahuan. Dengan hati manusia bisa merenungkan dan meyakini bahwa segala yang ada di alam ini tidak luput dari pencipta-Nya.

Menurut Muhyidin (2006), fungsi akal adalah untuk mengetahui, memahami dan menyadari setiap fakta dan fenomena, sedang fungsi hati adalah untuk menyelami dan meyakini serta mensucikan setiap fakta dan fenomena tersebut. Dengan akal dan hati inilah manusia tampil sebagai makhluk Allah yang paling indah dan paling baik diantara makhluk lain.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa pengaruh ekstrak metanol daun kesambi (*Scheichera oleosa*) terhadap sel hepar tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi DMBA secara *in vitro* ditunjukkan terhadap konfluenitas pada perlakuan P2 dengan konsentrasi 400 µg/mL yang mampu menurunkan rata-rata konfluenitas menjadi 6,22%. Pengaruh terhadap viabilitas juga ditunjukkan pada perlakuan P2 dengan konsentrasi 400 µg/mL mampu menurunkan rata-rata viabilitas menjadi 49,7% dengan nilai sitotoksisitas pada IC₅₀ sebesar 15,77 ppm < 1000 ppm sehingga berpotensi sebagai antikanker. Sedangkan pengaruh terhadap siklus sel ditunjukkan pada perlakuan P4 dengan konsentrasi 800 µg/mL terjadi penurunan persentase sel dari jumlah sel awal 52,5% menjadi 7,9% pada fase sub G-G1.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dikemukakan saran sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian menggunakan *cell line*, misalnya HEP-2 9 liver untuk membandingkan efektivitas ekstrak daun kesambi sebagai antikanker pada sel primer hepar *Rattus norvegicus* secara *in vitro* dengan *cell line*.
2. Parameter pengujian perlu ditambahkan, misalnya analisa ekspresi p53 dengan imunositokimia.

3. Perlu pengembangan lebih lanjut terhadap penelitian tentang kesambi (*Scheichera oleosa*) sebagai alternatif pengobatan yang berasal dari bahan alam.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, Bin Muhammad, 2006. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 8*. Jakarta: Pustaka Imam Asy-Syafi'i
- Achmad Harun, Supriatno, Marhama, Rasmidar. 2014. Aktivitas antikanker dan Antiproliferasi Fraksi Etanol Sarang Semut (*Myrmecodya pendans*) pada Sel Kanker Lidah Manusia SP-C1 (anti-cancer and anti-proliferation activity of ethanol fraction of ant nest plants (*myrmecodya pendans*) on human tongue cancer cell sp-c1). *Dentofasial*, vol.13, no.1, februari 2014:1-6
- Al Qardhawi, Yusuf. 1999. *As-Sunnah sebagai Sumber IPTEK dan Peradaban*. Jakarta: Pustaka Al-Kautsar
- Al Qurthubi, Syaikh Imam. 2009. *Tafsir Al Qurthubi*. Penerjemah: Muhyiddin Mas Rida, Muhammad Rana Mengala. Jakarta: Pustaka Azzam
- Amrullah, M. Firman, 2018. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L.) Terhadap Apoptosis, Siklus Sel dan Ekspresi P53 Pada Sel Kanker Serviks *HeLa*. Skripsi. Jurusan Farmasi. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Anulika P. Nwokeji, Ignatious O. Enodiana, Raymond S. Ezenweani, Osasere, Hilda Akatah. 2016. The Chemistry of Natural Product: Plat Secondary Metabolites. *International Journal of Technology Enhancements and Emerging Engineering Research*. 1:1-2
- Anuraghi, Jay., Mishra, RP. 2017. Ethnomedicinal study of *Schleichera oleosa* among the tribals of Satna (M.P.). *International Journal of Applied Research*, 3(3): 672-67.
- Ardiansyah, Achmad, 2014. Tinjauan Oncology terhadap Terapi Radiasi (Radiation Therapy) untuk Kanker Hati. <https://www.researchgate.net/publication/269347321>. Diakses 03 Mei 2020
- Bachli, Y. 2007. Tanaman Kesambi dan Beternak Kutu Untuk Kesejahteraan. Buletin BPTP. Vol 1 (3). Sulawesi Selatan.
- Bathia, Harsh., Kaur, Jaspreet., Nandi, Shreya., Gurnani, Virnita., Chowdury, Anushua., Hemalatha, P., Vashistha, Amit., Rathi, Brijesh. 2012. A Review on *Schleichera oleosa*: Pharmacological and Environmental Aspects. *Elsevier Journal of Pharmacy Research* 6: 224-229
- Bhat, S. V., Nagasampagi, B. A., dan Meenakshi, S. 2009. Natural Products Chemistry and Application. *Alpha Science International Limited*. 1: 242

- Bhuyan, A. K., 2009. On The Mechanism of SDS-induced Protein Denaturation. *Biopolymer*. 93(2): 186-199
- Bunpo, Piyawan, Keiko Kataoka, Hideki Arimochi, Haruyuki Nakayama, Tomomi Kuwahara, Yoshinari Ohnishi, Usanee Vinitketkumnuen. 2005. Centella Asiatica Extract Induces Cell Cycle Arrest In Caco-2 Human Colon Cancer Cells. *Chiang Mai Med Bull*. Vol.44(1):21-28.
- Bolt, M. W. 2001. Effect of Vitamin E on Cytotoxicity of Amiodarone and N-desethylamiodarone in Isolated Hamster Lung Cells. *Toxicology*. 166
- Browne, Susan M. dan Mohammed Al-Rubeai. 2011. Defining Viability in Mammalian Cell Culture. *Biotechnology Letters*. 33 (9): 1745-1749.
- Cancer Chemoprevention Research Center, 2009. Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT. Fakultas Farmasi UGM. Yogyakarta
- Chen, L., Smith, L., Wang, Z. and Smith, J. B. 2003. Preservation of *caspase-3* subunits from degradation contributes to apoptosis evoked by lactacystin: any single lysine or lysine pair of the small subunit is sufficient for ubiquitination', *Molecular pharmacology*, 64(2), pp. 334-345.
- Chowdhury, I., Tharakan, B. and Bhat, G. K. 2008. *Caspases—an update*', *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 151(1), pp. 10-27.
- Diananda, R. 2009. *Mengenal Seluk Beluk Kanker*. 3 edn. Yogyakarta: Kata Hati.
- Digiovanni, J., JM. Singer, L. Diamond. 1984. Comparison of the Metabolic Activation of 7, 12-Dimethylbenz(a)anthracene by a Human Hepatoma Cell Line (HepG2) and Low Passage Hamster Embryo Cells. *Cancer Research*. Vol.44: 2878-2884
- Elisabeth, dkk.. 2000. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) : Kaitannya dengan minyak sawit dan kesehatan, dalam warta PPKS (Pusat Penelitian Kelapa Sawit). Medan.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), pp. 495-516.
- Ewing, Sarah Jane. 2007. C/EBP β Represses p53 to Promote Cell Survival Downstream of DNA Damage Independent of Oncogenic RAS and p19Arf. *A dissertation submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University*.
- Fakultas Farmasi, 2013. Modul Pelatihan Kultur Sel Kanker dan Aplikasinya. Universitas Airlangga. Surabaya

- Fan, T.-J., Han, L.-H., Cong, R.-S. and Liang, J. 2005. *Caspase family proteases and apoptosis*, *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 37(11), pp. 719-727.
- Fitri, Y. and Rosidah, E. S. 2014. Effects of Inhibition Cell Cycle and Apoptosis of Sabrang Onion extract (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.) on Breast Cancer Cells.
- Foster, J. S., Henley, D. C., Ahamed, S. and Wimalasena, J. 2001. Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 12(7), pp. 320-327.
- Freshney Ian, R. 2010. *Cultur of animal Cell: A Manual of Basic Technique and Spesialized Aplication*. Division of Cancer Sciences and Molecular Pharmacology University of Glasgow. UK
- Hadi, R. S. 2011. Mekanisme Apoptosis Pada Regresi Sel Luteal', *Majalah Kesehatan Pharmamedika*, 3(1).
- Hamidy, M., Yulis, Malik, Zulkifli, Mutiara Machyar, Ryan., 2009. Gambaran histopatologi kerusakan hati mencit yang diproteksi dengan air rebusan daun sirih (*Piper betle Lin*). Diakses 05 Februari 2021 Available from: URL: <http://www.portalgaruda.org/pdf>.
- Hansen, LK., DJ. Mooney, JP. Vacanti, DE. Ingber. 1994. Integrin Binding and Cell Spreading on Extracellular Matrix Act at Different Points in the Cell Cycle to Promote Hepatocyte Growth. *Molecular Biologi of the Cell*. Vol5: 967-975
- Haridas, V., M Higuchi, GS Jayatilake, D Bailey, K Mujoo, M Blake, CJArntzen JU Gutterman. 2001. Avicins : Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Bentham) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *Medical Sciences*. Vol. 98. no. 10 5821–5826
- Haritash, A.K, Kaushik, C.P. 2009. Biodegradation Aspect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 169: 1-15
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jilid I dan II. Terj. Badan Libang Kehutanan. Cetakan I. Koperasi Karyawan Departemen Kehutanan Jakarta Pusat
- Hsu, Ya-Ling, Po-Lin Kuo, Liang-Tzung Lin, and Chun-Ching Lin. 2005. Asiatic Acid, a Triterpene, Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest through Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 MitogenActivated Protein Kinase Pathways in Human Breast Cancer Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol.313(1): 333–344

- Igney, F. H. and Krammer, P. H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis'. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), pp. 277-288.
- Ika Khumairoh., Irma M. Puspitasari. 2016. Review Article Kultur Sel. *Farmaka Suplemen*. Vol. 4:2
- Junquiera, LC., Carneiro, J 2012. Histologi dasar, Edisi 10. trans. A Dharma, EGC, Jakarta
- Kabera Justi N., Semana Edmond, Mussa Ally R., He Xin, 2014. Plant Scondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties (Abstract). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2:377-392
- Kawajiri, K., Nakachi, K., Imai, K., Watanabe, J and Hayashi, S (1993) The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit Rev Oncol Hematol* 14:77-87
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020. Hari Kanker Sedunai 2019.Artikel. www.depkes.go.id Diakses 13 Juli 2020
- Kementerian Agama Republik Indonesia, 2020. Qur'an Kemenag. <https://quran.kemenag.go.id/sura/26>
- Khanifah, 2019. Makalah CA. Hepar. Poltekkes Kemenkes Pontianak
- Kim, J.W. dan Wang, X.W., 2003, Gene Expression Profilling of Preneoplastic Liver Disease and Liver Cancer: a new era for imptoved early detection and treatment of these deadly diseases?, *Carcin*, 24(3), 363-369
- King, R.J.B.. 2000. *Cancer Biology*. 2nd ed. London: Pearson Education Limited
- Krammer, P. H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system'. *Nature*, 407(6805), pp. 789-795.
- Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P. H. and Kirchhoff, S. 2001. FLICEinhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 21(24), pp. 8247-8254.
- Kumar, V., Abbas, A. K. and Aster, J. C. 2012. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. Ninth edn. Philadelphia: Elsevier Health Sciences.
- Kumar, Vinay, Ramzi S.Contran, Stanley L.Robbins. 2007. *Buku Ajar Patologi Robbins*. Jakarta: EGC
- Kundu, M., dan Schmidt, L.H.2011. Scheichera oleosa (Lou.) Oken. *Seed Leaflet*. Hal. 153
- Kurlila, Anis. 2018. Pengaruh Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica* Linn.) Terhadap Pertumbuhan Kultur Primer Sel Hepar Baby Hamster Yang

Dipapar 7.12-Dimetilbenz(α)Antrasen. Skripsi. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

- Lee YS, Jin DQ, Kwon EJ, Park SH, Lee ES, Jeong TC, Nam DH, Huh K, and Kim JA .2002. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular Ca²⁺ release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells. *Cancer Lett.* Vol.186:83–91
- Leeson, CR., Leeson, TS., Paparo, AA. 1996. Buku ajar histologi, 5th Ed, trans. J Tambayong, EGC, Jakarta, Hal. 383-396
- Li, M. O., Sarkisian, M. R., Mehal, W. Z., Rakic, P. and Flavell, R. A. 2003. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science*, 302(5650), pp. 1560-1563.
- Long, G., and Works, J. 2013. Innovation in the Biopharmaceutical Pipeline: A Multidimensional View. *An Analysis Group Report*
- Maulina, Meutia, 2018. *Zat-zat yang Mempengaruhi Histopatologi Hepar*. Unimal Press: Lhokseumawe
- Macdonald, F., Ford C.H.J., 1997. *Molecular Biology of Cancer*. Bio Scientific Publisher, Oxford, United Kingdom
- McMasters, Kelly M. and Jean-Nicolas Vauthey. 2011. *Hepatocellular Carcinoma Targeted Therapy and Multidisciplinary Care*. London: Springer New York Dordrecht Heidelberg
- Meyer BN, Ferrigni NR, Purnam JE, Jacobsen LB, Nicchols DE, McLaughiil JL.1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent. *Planta Medica*
- Mueller, N. T., Odegaard, A., Anderson, K., Yuan, J.-M., Gross, M., Koh, W.-P. and Pereira, M. A. 2010. 'Soft drink and juice consumption and risk of pancreatic cancer: the Singapore Chinese Health Study', *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 19(2), pp. 447-455.
- Muhyidin, Muhammad. 2006. *Qu anfusakum Wa Ahlikum Nara*. Yogyakarta: Diva Press
- Muti'ah, Roihatul dkk, 2015. Ekstrak Etanol Akar Dan Daun Dari Tanaman Calotropis Gigantea Aktif Menghambat Pertumbuhan Sel Kanker Kolon Widr Secara In Vitro. *Jurnal Farma Sains* Vol. 1 (1)
- Moore, KL and Dalley, AF 2006, Clinically oriented anatomy, 5th Ed, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pp. 289.

- Nagappan, A., Lee, H. J., Saralamma, V. V. G., Park, H. S., Hong, G. E., Yumnam, S., Raha, S., Charles, S. N., Shin, S. C. and Kim, E. H. (2016) 'Flavonoids isolated from Citrus platymamma induced G2/M cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung cancer cells', *Oncology Letters*, 12(2), pp. 1394-1402.
- Nagini, S. 2009. Of Humans and Hamsters: The Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis Model as a Paradigm for Oral Oncogenesis and Chemoprevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. Vol.9: 843-852
- Napirei, M. and Mannherz, H. G. 2009. Molecules Involved in Recognition and Clearance of Apoptotic/Necrotic Cells and Cell Debris', in Krysko, D.V. & Vandenabeele, P. (eds.) *Phagocytosis of Dying Cells: From Molecular Mechanisms to Human Diseases*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 103-145.
- Norbury, C. J. and Hickson, I. D. 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41(1), pp. 367-401.
- Park, E.-J., Kwon, H.-K., Choi, Y.-M., Shin, H.-J. and Choi, S. (2012) 'Doxorubicin induces cytotoxicity through upregulation of perK-dependent ATF3', *PloS one*, 7(9), pp. e44990.
- Parwata, I Made, O.A. 2014. *Kanker dan Antikanker*. Bahan Ajar. Fakultas MIPA. Universitas Udayana. Bali
- Pecorino, L. 2012. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. Third edn. Oxford: Oxford University Press.
- Peters, Gordon., dan Vousden, K.H., 1997, *Oncogenes dan Tumor Supressors*, Oxford University Press, New York.
- Pettit GR, Numata A, Cragg GM, et al, 2000. Isolation and structures of Scheicherastins (1e7) and Schleicheols 1 and 2 from the teak forest medicinal tree *Schleichera oleosa*. *J Nat Prod.*;63:72e78.
- Pratiwi, Radita. I.A. 2020. Analisis Histokimia dan Molecular Docking Senyawa Aktif Daun Kesambi (*Scheichera oleosa*) Terhadap Reseptor Estrogen Alpha. Skripsi. Fakultas MIPA. UISMA. Malang
- Price, SA., Wilson, LM. 2012. Patofisiologi Konsep Klinis Proses Penyakit. Edisi 6 Vol.1. trans. H. Pendit, M. Wulansari. EGC. Jakarta.

- Putri, H., 2004. *Preparasi Sampel untuk Siklus Sel dengan Metode Flowcytometry*. Yogyakarta: CCRC Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada
- Ranasasmita, Raafqi, 2008. Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol Daun *Aglaia Elliptica* Blume Pada Tikus Betina Yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenz(α)Antrasena. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Rahmawati, Muti'ah. 2014. Potensi Ekstrak Daun Widuri (*Calotropis gigantea*) Sebagai Obat Antikanker Fibrosarkoma. UIN-Maliki Press. Malang
- Rowlands, J. Craig, Ling He, Reza Hakkak, Martin J.J. Ronis and Thomas M. Badger. 2001. Soy and Whey Proteins Downregulate DMBA-Induced Liver and Mammary Gland CYP1 Expression in Female Rats. *Journal of Nutrition*: 3281-3287
- Ruddon, R. W. 2007. *Cancer Biology*. Fourth edn. New York: Oxford University Press.
- Sakagami H, Jiang Y, Kusama K *et al*. 2000. Cytotoxic Activity of Hydrolysable Tannins Against Human Oral Tumor Cell lines Possible Mechanism. *Phytomedicine*. 1:39e47.
- Savill, J., Gregory, C. and Haslett, C. 2003. Eat me or die', *Science*, 302(5650), pp. 1516-1517.
- Savithrama, N., Linga Rao, M., and Suhrulata, D. 2011. Screening of Medicinal Plants for Scondary Metabolites. *Middle-East Journal od Science Research*. 8: 579-584.
- Scorrano, L. and Korsmeyer, S. J. 2003. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(3), pp. 437-444.
- Setiawati A, Septisetyani EP, Wijayanti TR, dan Rokhman MR. 2010. Sambung Nyawa (*Gynura Procumbens* (Lour.) Merr.) sebagai Agen Kemopreventif, [serial on line] viewed 22 Februari 2021, <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/naskah-gynura-procumbens.pdf> [12].
- Slee, E. A., Adrain, C. and Martin, S. J. 2001. Executioner *caspase*-3,-6, and-7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis', *Journal of biological Chemistry*, 276(10), pp. 7320-7326.
- Stark, G. R. and Taylor, W. R. 2006. 'Control of the G2/M transition', *Molecular biotechnology*, 32(3), pp. 227-248.
- Shihab, M. Quraish. 2002. 1996. *Wawasan Al-Qur'an*. Bandung: Mizan

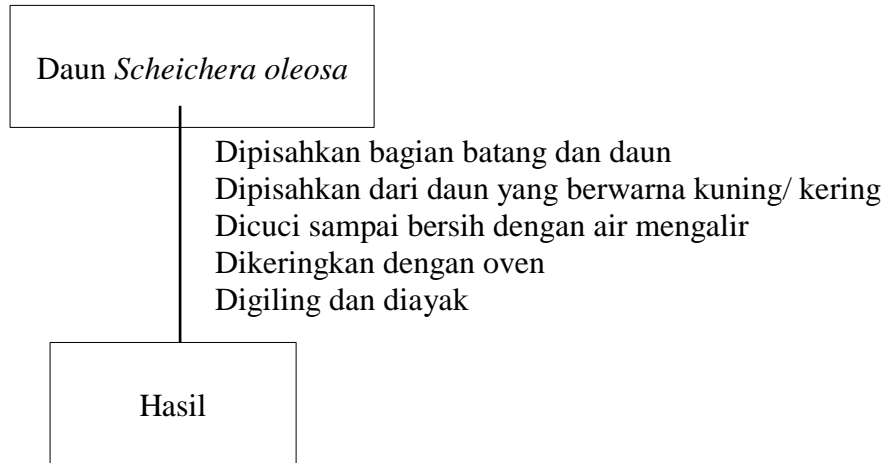
- Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir Al Mishbah: Pesan, Kesan Keserasian alQur'an*. Jakarta: Lentera Hati
- Siswandono dan Bambang Soekardjo. 2008. *Kimia Medisinal Edisi 2*. Surabaya: Erlangga
- Sloane, E., 2014. *Anatomi dan Fisiologi untuk Pemula*. diterjemahkan oleh: Veldman. EGC, Jakarta
- Snell, RS 2012, Anatomi klinis berdasarkan sistem, trans. L Sugiharto, EGC, Jakarta, Hal. 122-127.
- Sudiana, I Ketutu. 2008. *Patobiologi Molekuler Kanker*. Jakarta: Salemba Medika
- Suita, Eliya. 2016. *Seri Teknologi Perbenihan Tanaman Hutan Kesambi (Schleichera oleosa MERR.)*. Balai Penelitian Teknologi Perbenihan Tanaman Hutan Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan Kementerian Hutan. Bogor
- Surya Maryati., Iskandriati Diah., Mariya Silmi., Saepuloh Uus., Permanawati., Sajuthi Dondin., Pamungkas Joko. 2016. Primary tupaia javanica Hepatocytes Culture ac In Vitro Replication System for Ape Hapatitis B Viruses. *Microbiology Indonesia*. ISSN 1978, eISSN 2087-8575. Vol.10:2
- Tang, Xue-Lian, Xin-Ying Yang,aHyun-Ju Jung, Sung-Yeon Kim, Suk-Yul Jung,Du-Young CHOI,Won-Cheol Park,and Hyun Park. 2009. Influence of -Naphthoflavone on 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene. Asiatic Acid Induces Colon Cancer Cell Growth Inhibition and Apoptosis through Mitochondrial Death Cascade. *Biol. Pharm. Bull.* 32(8): 1399-1405
- Thermo Fisher Scientific Invitrogen, 2019. Countess™ II FL Automated Cell Counter User Guide. <https://www.thermofisher.com/>. Diakses 09 September 2020
- Thind TS, Rampal G, Agarwal SK, Saxena AK, Arora S. 2010. Diminution of free radical induced DNA damage by extracts/ fractions from bark of Schleichera oleosa (Lour.) Oken. *Drug Chem Toxicol.*33:329e336.
- Thorburn, A. 2004. Death receptor-induced cell killing. *Cellular Signalling*, 16(2), pp. 139-144.
- Thoppil. R.J, Bishayee, A. 2011. Terpenoids as Potential Chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. *World Journal of Hepatology.* 27;3(9): 228-249
- Tiwari Neha, Padney N.V. 2016. Ethnobotanical and Phytochemical Analysis of Scheichera oleosa (Lour). India: DAMA International

- Tsao, A. S., Kim, E. S. and Hong, W. K. 2004. Chemoprevention of cancer, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 54(3), pp. 150-180.
- Underwood, J.C.E., 1999, *Patologi Umum dan Sistemik (General and Systematic Pathology)*, Edisi 2, Vol.1, Editor Sarjadi, Penerbit Buku Kedokteran (EGC), Jakarta
- Waugh, A., Grant, A. 2011. *Dasar-dasar anatomi dan fisiologi*, trans. E Nurrachmah and R Angriani, Salemba Medika, Jakarta, Hal. 192-196.
- Wahed, Rafid Abdul. 2009. Effect Of Crude Saponin Extracted From Alfalfa (*Medicago Sativa L*) On Neoplastic And Normal Cell Lines. *Journal of Al-Nahrain University*. Vol.12: 107-112
- Wang, Y., Ji, P., Liu, J., Broaddus, R. R., Xue, F. and Zhang, W. (2009) 'Centrosome-associated regulators of the G 2/M checkpoint as targets for cancer therapy', *Molecular cancer*, 8(1), pp. 8.
- Wang, X., Wu, Y.-C., Fadok, V. A., Lee, M.-C., Gengyo-Ando, K., Cheng, L.-C., Ledwich, D., Hsu, P.-K., Chen, J.-Y. and Chou, B.-K. 2003. Cell corpse engulfment mediated by *C. elegans* phosphatidylserine receptor through CED-5 and CED-12. *Science*, 302(5650), pp. 1563-1566.
- Weimer, TL., AP. Reddy, U. Harttig, D. Alexander, SC. Stamm, MR. Miller, W. Baird, J. Hendricks, G. Bailey. 2000. Influence of beta-naphthoflavone on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene metabolism, DNA adduction, and tumorigenicity in rainbow trout. *Toxicological Sciences* 57: 217–228
- Weng, A., MTK. Mergel, MF. Melzigc, FB. Brauna , H. Fuchsa. 2012. *Biomedical Papers: Anti-tumor toxins and their efficacy in combination with triterpenoid saponins*. Olomouc: Palaky University Press
- Wibowo, DS., Paryana, W. 2009, *Anatomi tubuh manusia*, Graha Ilmu, Bandung, Hal. 345-352.
- Yadav, Vivek R., Sahdeo Prasad, Bokyung Sung, Ramaswamy Kannappan and Bharat B. Aggarwal. 2010. Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer. *Toxins*. Vol. 2, 2428-2466

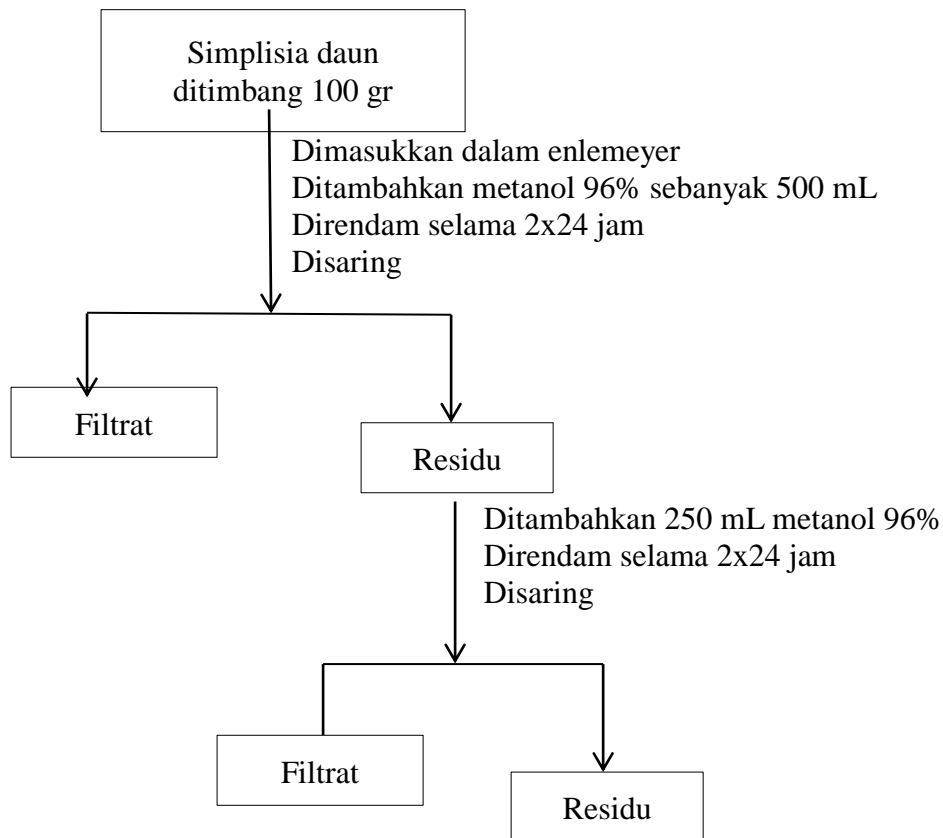
DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja

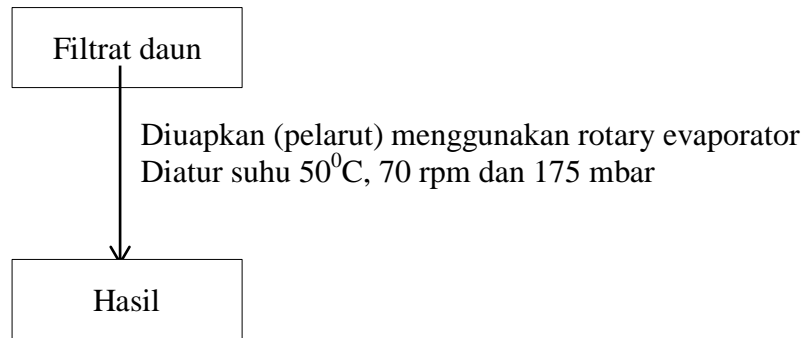
1. Preparasi Sampel



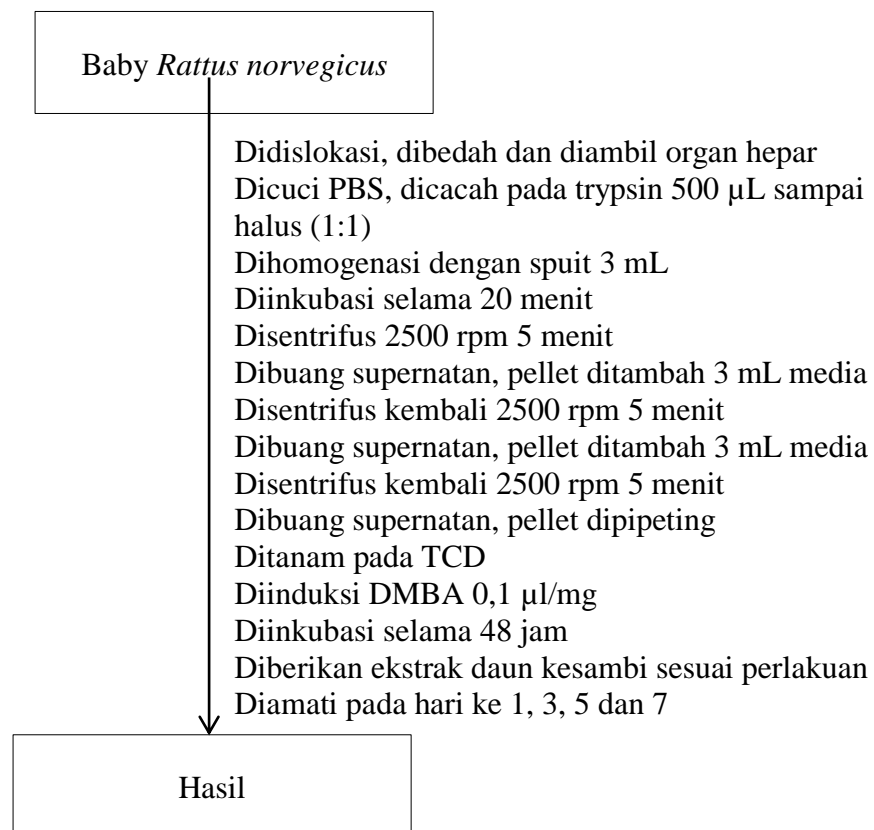
2. Ekstraksi



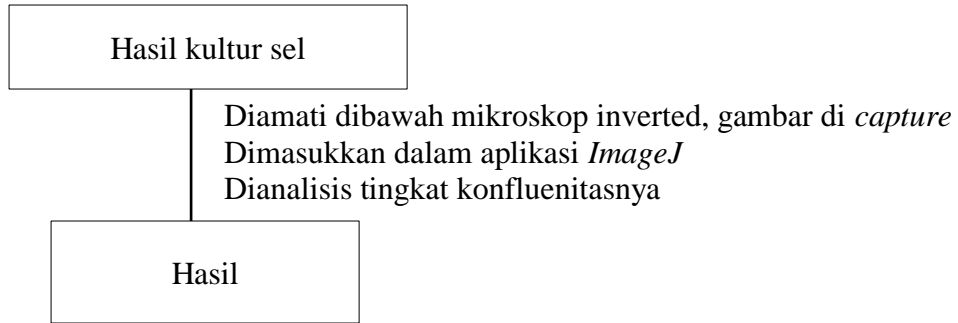
3. Evaporasi



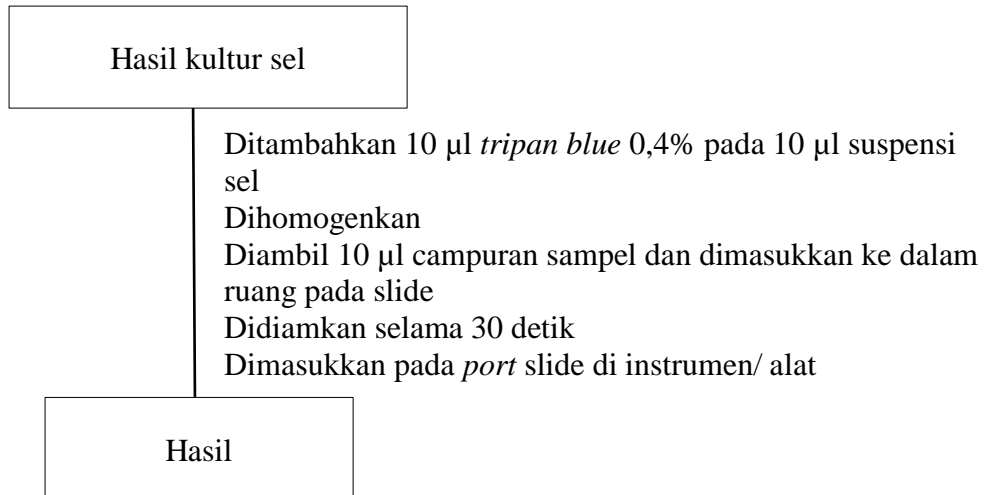
4. Isolasi dan Kultur Sel Hepar *Rattus norvegicus*



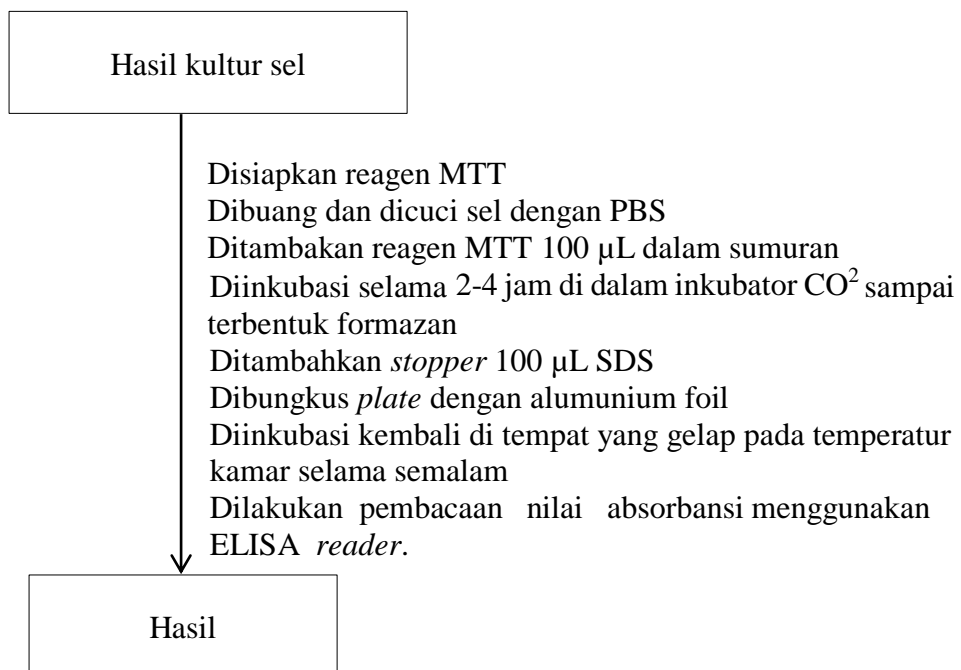
5. Pengamatan Tingkat Konfluenitas



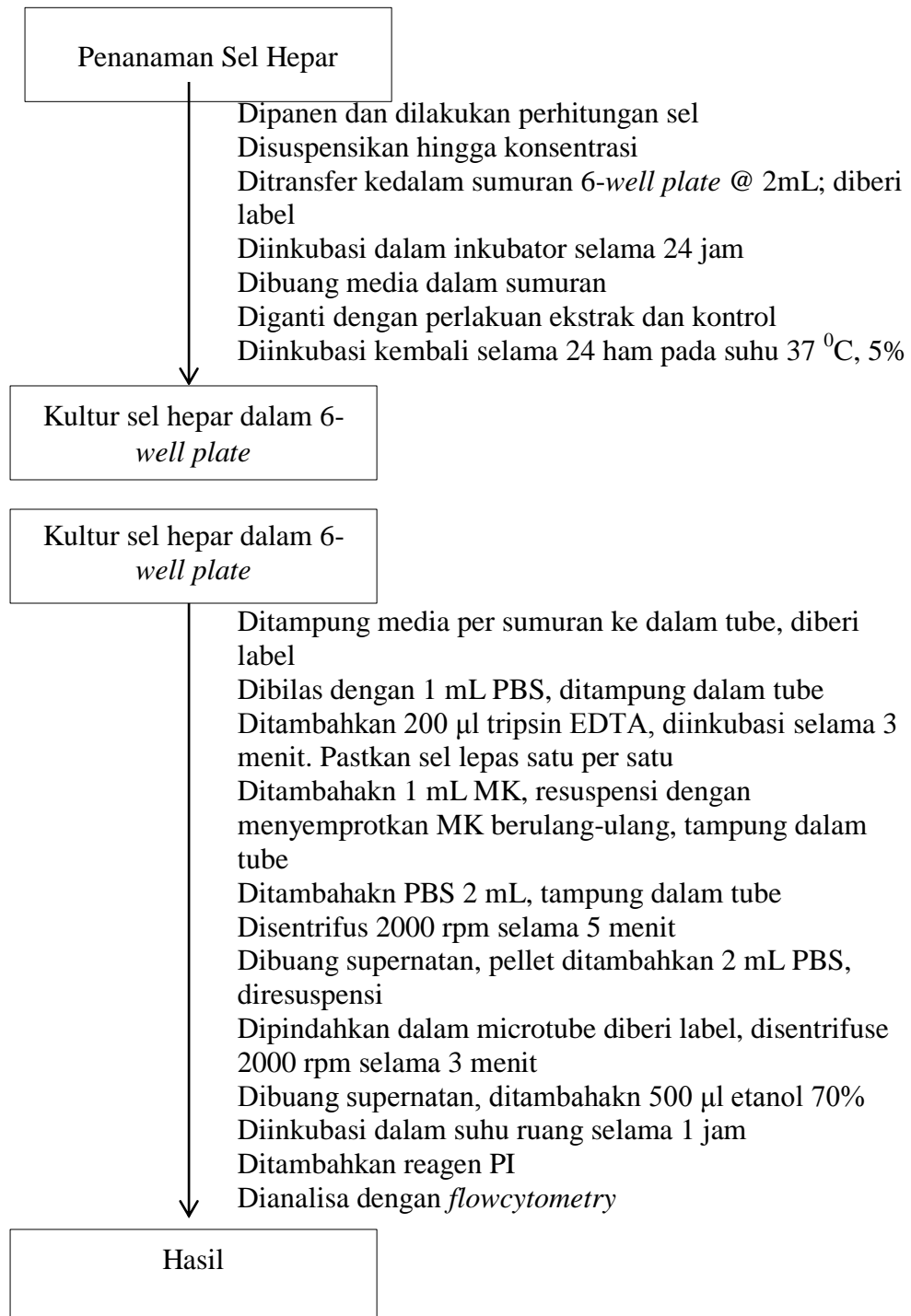
6. Pengamatan Viabilitas menggunakan *Countess Cell*



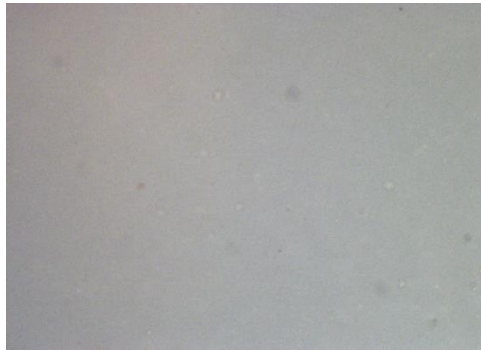
7. Uji Sitotoksisitas



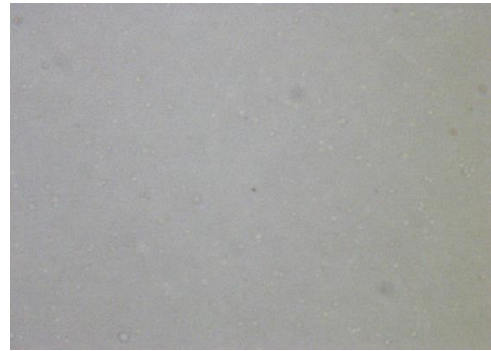
8. Pengamatan Siklus Sel



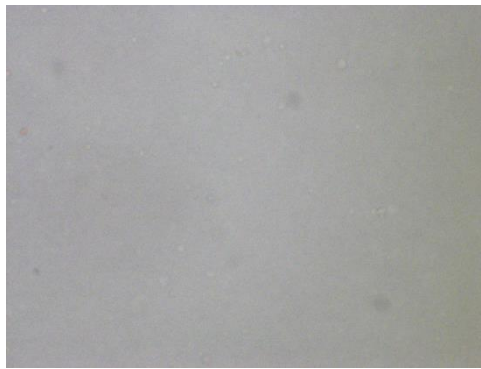
Lampiran 2. Gambar Konfluenitas



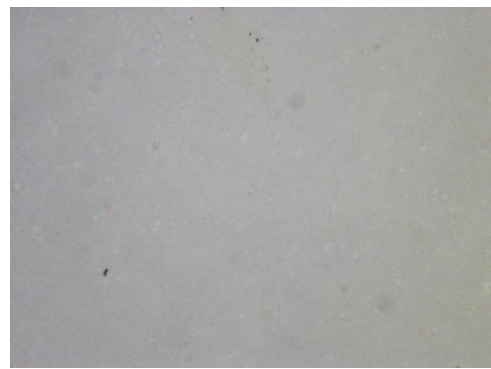
K+



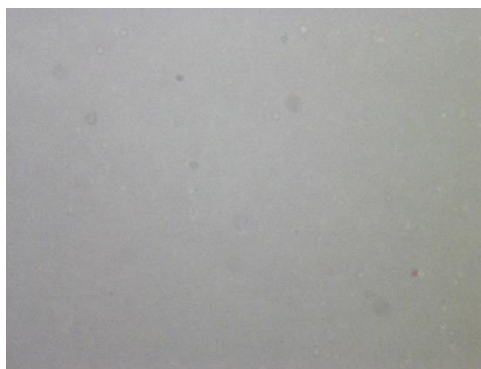
K-



P1



P2

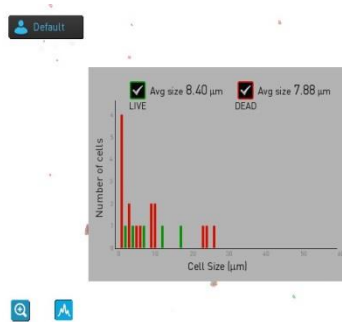


P3

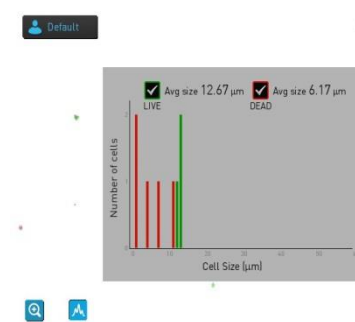


P4

Lampiran 3. Gambar Viabilitas

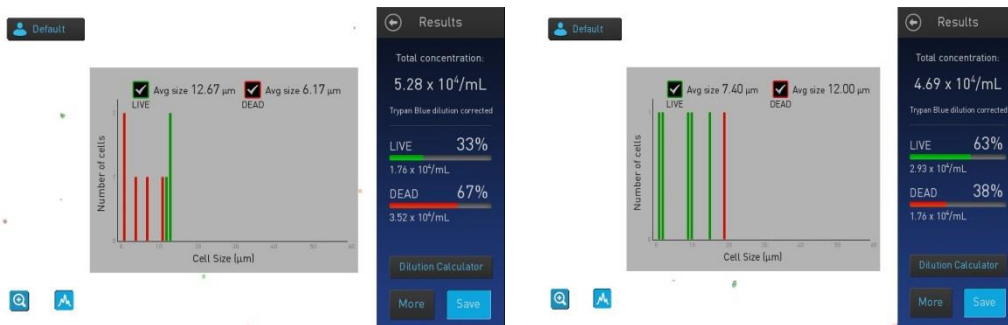


K+



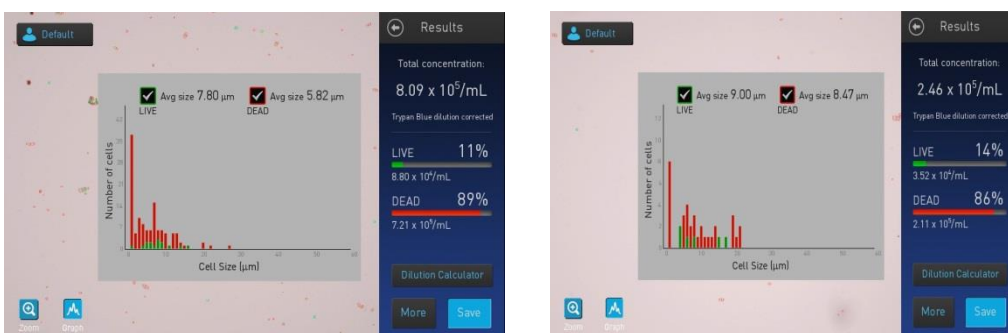
K-





P1

P2



P3

P4

Lampiran 4. Hasil Perhitungan dan Analisis SPSS

DATA KONFLUENTITAS SEL HEPAR TIKUS (<i>Rattus norvegicus</i>) YANG DIINDUKSI DMBA SECARA IN VITRO						
Perlakuan	Ulangan	A	B	%	Transformasi	
K+	1	81	307200	3%	16.43	
	2	62	307200	2%	8.17	
	3	83	307200	3%	9.46	
	4	98	307200	3%	10.29	
	5	66	307200	2%	8.43	
K-	1	74	307200	2%	8.93	
	2	531	307200	17%	24.57	
	3	103	307200	3%	10.55	
	4	81	307200	3%	9.35	
	5	117	307200	4%	11.25	
P1	1	94	307200	3%	10.07	
	2	67	307200	2%	8.49	
	3	85	307200	3%	9.58	
	4	107	307200	3%	10.76	
	5	71	307200	2%	8.74	
P2	1	51	307200	2%	7.40	
	2	43	307200	1%	6.79	
	3	43	307200	1%	6.79	
	4	26	307200	1%	5.28	
	5	22	307200	1%	4.85	
P3	1	229	307200	7%	15.84	
	2	194	307200	6%	14.55	
	3	415	307200	14%	21.56	
	4	1508	307200	49%	44.48	
	5	2362	307200	77%	61.27	
P4	1	62	307200	2%	8.17	
	2	43	307200	1%	6.79	
	3	238	307200	8%	16.16	
	4	92	307200	3%	9.97	
	5	76	307200	2%	9.05	

Descriptives

Konfluenitas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K-	5	12.9300	6.57253	2.93933	4.7691	21.0909	8.93	24.57
K+	5	10.5560	3.39075	1.51639	6.3458	14.7662	8.17	16.43
P1	5	9.5280	.93711	.41909	8.3644	10.6916	8.49	10.76
P2	5	6.2220	1.09575	.49003	4.8614	7.5826	4.85	7.40
P3	5	31.5400	20.53087	9.18169	6.0476	57.0324	14.55	61.27
P4	5	10.0280	3.62278	1.62016	5.5297	14.5263	6.79	16.16
Total	30	13.4673	11.80561	2.15540	9.0590	17.8756	4.85	61.27

Test of Homogeneity of Variances

Konfluenitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
13.823	5	24	.000

ANOVA

Konfluenitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2076.140	5	415.228	5.070	.003
Within Groups	1965.662	24	81.903		
Total	4041.802	29			

Konfluenitas

Perla kuan	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Duncan ^a P2	5	6.2220	31.5400
P1	5	9.5280	
P4	5	10.0280	
K+	5	10.5560	
K-	5	12.9300	
P3	5		
Sig.		.305	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

DATA VIABILITAS SEL HEPAR TIKUS (<i>Rattus norvegicus</i>) YANG DIINDUKSI DMBA SECARA IN VITRO			
Perlakuan	Ulangan	Viabilitas Sel (%)	Transformasi
K-	1	25%	30.00
	2	37%	37.46
	3	38%	38.06
	4	10%	18.43
	5	25%	30.00
K+	1	7%	15.34
	2	17%	24.35
	3	33%	35.06
	4	67%	54.94
	5	11%	19.37
P1	1	8%	16.43
	2	83%	65.65
	3	64%	53.13
	4	20%	26.57
	5	33%	35.06
P2	1	91%	72.54
	2	76%	60.67
	3	91%	72.54
	4	29%	32.58
	5	90%	71.57
P3	1	60%	50.77
	2	87%	68.87
	3	69%	56.17
	4	36%	36.87
	5	63%	52.54
P4	1	92%	73.57
	2	86%	68.03
	3	71%	57.42
	4	25%	30.00
	5	25%	30.00

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K-	5	34.0000	20.72438	9.26823	8.2673	59.7327	8.00	66.00
K+	5	44.4000	26.66083	11.92309	11.2962	77.5038	23.00	76.00
P1	5	22.8000	20.69299	9.25419	-2.8937	48.4937	10.00	59.00
P2	5	33.8000	32.42992	14.50310	-6.4671	74.0671	9.00	75.00
P3	5	10.6000	2.96648	1.32665	6.9166	14.2834	7.00	15.00
P4	5	19.0000	10.17349	4.54973	6.3679	31.6321	13.00	37.00
Total	30	27.4333	22.48936	4.10598	19.0357	35.8310	7.00	76.00

ANOVA

ANOVA					
Viabilitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3737.367	5	747.473	1.641	.187
Within Groups	10930.000	24	455.417		
Total	14667.367	29			

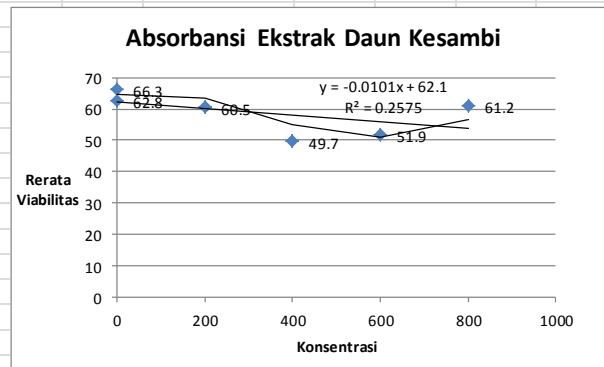
Lampiran 5. Absorbansi Ekstrak Daun Kesambi

Hasil Pembacaan Elisa reader uji sitotoksitas						
Perlakuan	Absorbansi					% rerata viabilitas
	1	2	3	4	5	
Blanko	0.521	0.517	0.462	0.453	0.481	48.7%
K-	0.604	0.653	0.668	0.642	0.571	62.8%
K+	0.582	0.632	0.654	0.631	0.814	66.3%
P1	0.608	0.652	0.559	0.567	0.641	60.5%
P2	0.588	0.46	0.478	0.475	0.484	49.7%
P3	0.595	0.526	0.559	0.461	0.455	51.9%
P4	0.717	0.68	0.613	0.568	0.483	61.2%

Konsentrasi	Absorbansi					% rerata viabilitas	SD
	1	2	3	4	5		
Kontrol med	0.521	0.517	0.462	0.453	0.481	48.7%	0.031
0	0.604	0.653	0.668	0.642	0.571	62.8%	0.040
0	0.582	0.632	0.654	0.631	0.814	66.3%	0.089
200 ug/ ml	0.608	0.652	0.559	0.567	0.641	60.5%	0.042
400 ug/ ml	0.588	0.46	0.478	0.475	0.484	49.7%	0.052
600 ug/ ml	0.595	0.526	0.559	0.461	0.455	51.9%	0.061
800 ug/ ml	0.717	0.68	0.613	0.568	0.483	61.2%	0.093

Kurva Standar

Konsentrasi	Absorbansi (y)
0	62.8
0	66.3
200	60.5
400	49.7
600	51.9
800	61.2
kontrol	48.7



$$y = -0.0101x + 62.1$$

$$48.7 = -0.0101x + 62.1$$

$$-13.4$$

$$x = -13.4 / -0.0101$$

$$1,327$$

$$IC_{50} = \frac{50 - B}{A}$$

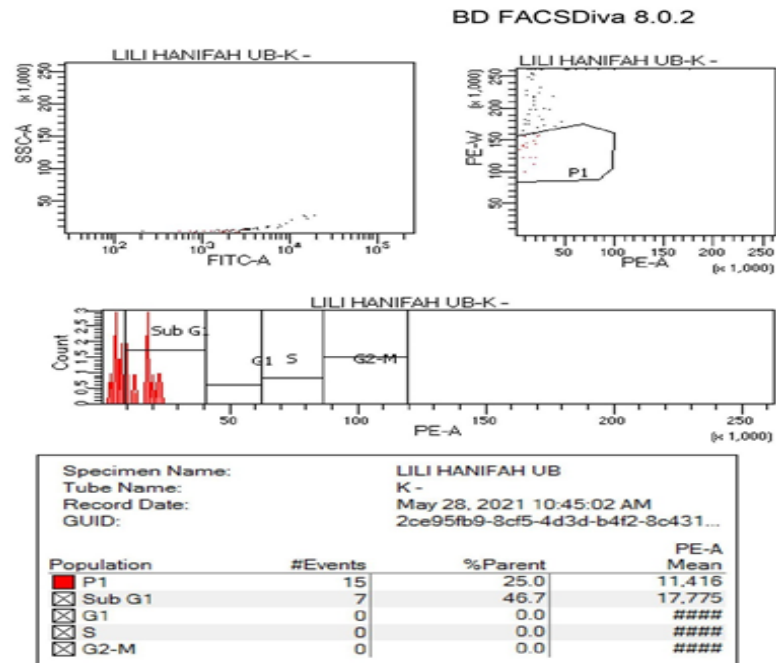
$$IC_{50} = \frac{50 - 62.1}{-0.0101}$$

$$= \frac{-12.1}{-0.0101}$$

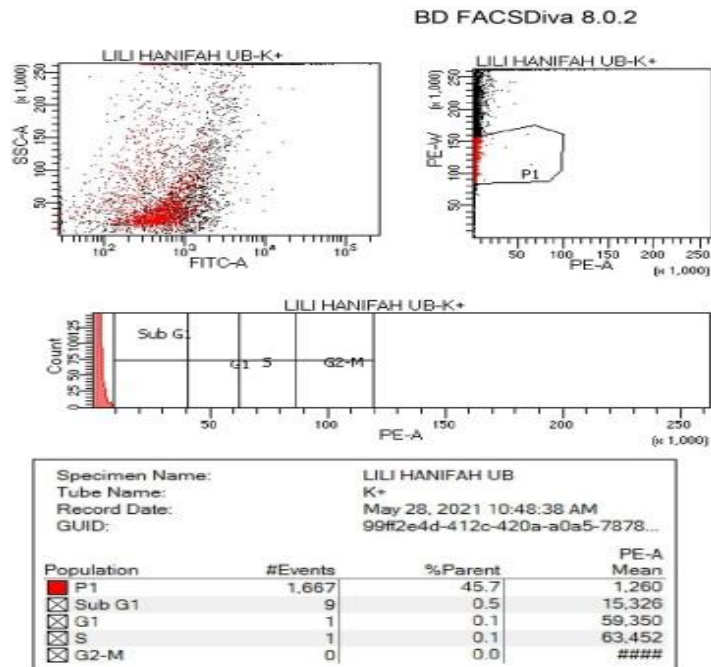
$$= 1.198 \mu g/mL \quad 1.198$$

$$\text{anti log} = 15.77611$$

Lampiran 6. Hasil Pengujian Siklus Sel dengan *Flowcytometry*

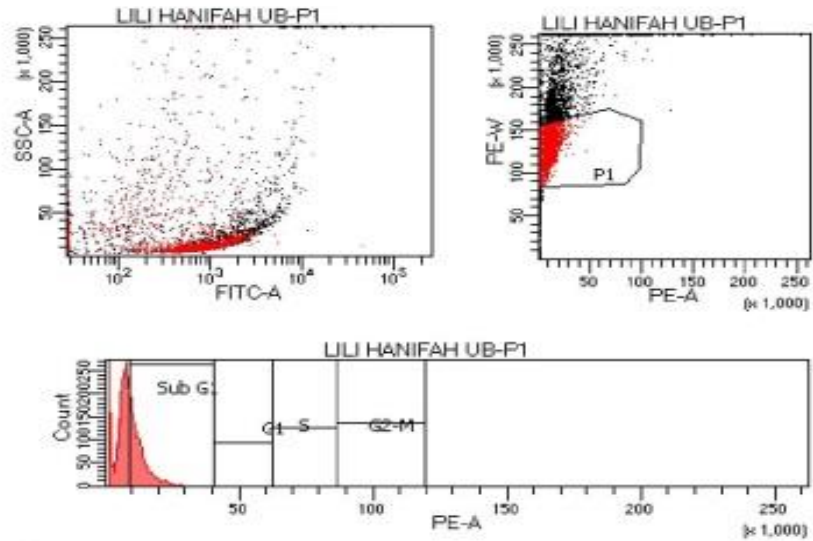


K-



K+

BD FACSDiva 8.0.2

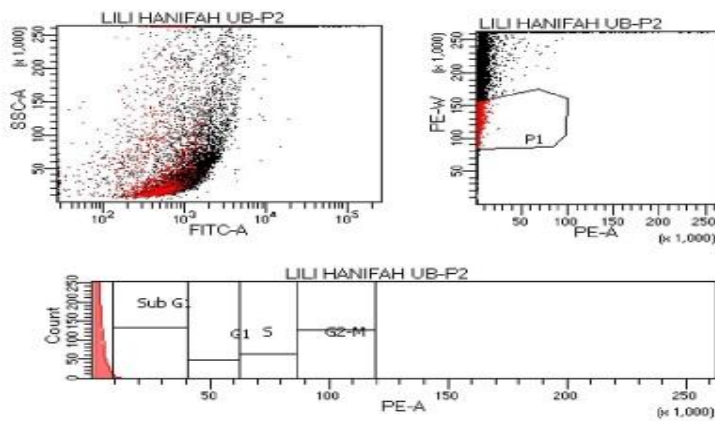


Specimen Name: LILI HANIFAH UB
 Tube Name: P1
 Record Date: May 28, 2021 10:52:31 AM
 GUID: 1bf0c47-4839-412c-9b42-c516...

Population	#Events	%Parent	PE-A Mean
■ P1	2,280	56.7	8,070
 Sub G1	778	34.1	13,868
 G1	5	0.2	45,626
 S	0	0.0	####
 G2-M	0	0.0	####

P1

BD FACSDiva 8.0.2

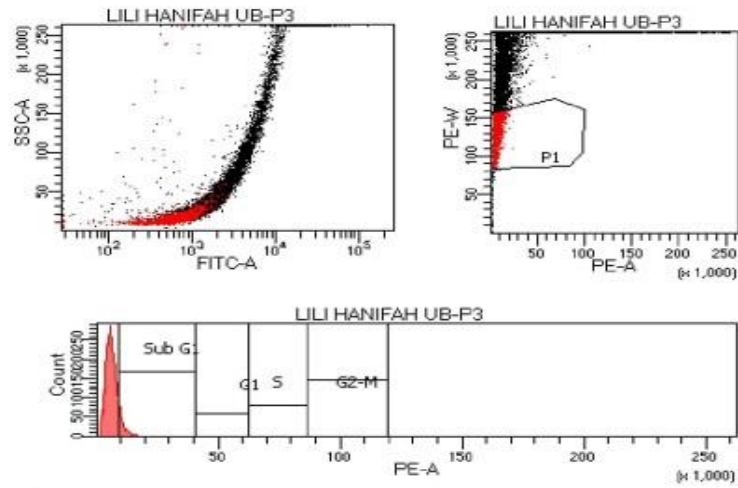


Specimen Name: LILI HANIFAH UB
 Tube Name: P2
 Record Date: May 28, 2021 10:54:34 AM
 GUID: 057148b0-f260-491e-b4e2-d11...

Population	#Events	%Parent	PE-A Mean
■ P1	1,384	13.8	2,270
 Sub G1	29	2.1	13,044
 G1	0	0.0	####
 S	0	0.0	####
 G2-M	0	0.0	####

P2

BD FACSDiva 8.0.2

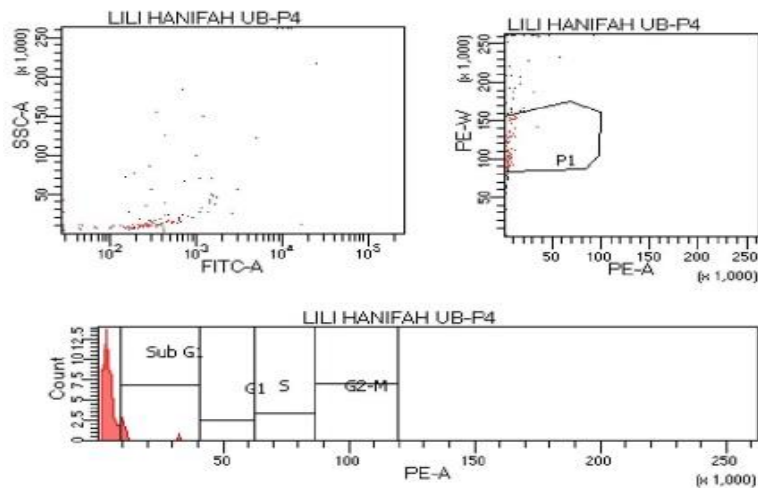


Specimen Name: LILI HANIFAH UB
 Tube Name: P3
 Record Date: May 28, 2021 10:56:06 AM
 GUID: 761b9583-b2c9-433a-b850-acd...

Population	#Events	%Parent	PE-A Mean
<input checked="" type="checkbox"/> P1	1,502	15.0	5,428
<input checked="" type="checkbox"/> Sub G1	142	9.5	11,534
<input checked="" type="checkbox"/> G1	0	0.0	####
<input checked="" type="checkbox"/> S	0	0.0	####
<input checked="" type="checkbox"/> G2-M	0	0.0	####

P3

BD FACSDiva 8.0.2



Specimen Name: LILI HANIFAH UB
 Tube Name: P4
 Record Date: May 28, 2021 10:59:30 AM
 GUID: 5f4bfb08-4b59-4194-8c21-8762...

Population	#Events	%Parent	PE-A Mean
<input checked="" type="checkbox"/> P1	63	52.5	4,057
<input checked="" type="checkbox"/> Sub G1	5	7.9	14,088
<input checked="" type="checkbox"/> G1	0	0.0	####
<input checked="" type="checkbox"/> S	0	0.0	####
<input checked="" type="checkbox"/> G2-M	0	0.0	####

P4

Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian

