

**LAPORAN PENELITIAN KOMPETITIF DOSEN  
TAHUN ANGGARAN 2016**

**AKTIVITAS ANTIKANKER DAN MEKANISME FARMAKOLOGI  
EKSTRAK DAN FRAKSI BENALU NANGKA (*Macrosolen cochinchinensis*)  
PADA SEL KANKER PAYUDARA T47D**

Nomor DIPA	:	DIPA BLU: DIPA-025.04.2.423812/2016
Tanggal	:	7 Desember 2015
Satker	:	(423812) UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
Kode Kegiatan	:	(2132) Peningkatan Akses, Mutu, Kesejahteraan dan Subsidi Pendidikan Tinggi Islam
Kode Sub Kegiatan	:	(008) Penelitian Yang Bermutu
Kegiatan	:	(004) Dukungan Operasional penyelenggaraan Pendidikan

**Oleh:**

dr. Christyaji Indradmojo  
NIP.197706112009121004



**KEMENTERIAN AGAMA  
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
(LP2M)  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2016**

## **HALAMAN PENGESAHAN**

Laporan penelitian ini disahkan oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada  
Masyarakat Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
Pada tanggal 13 September 2016

Peneliti

dr. Christyaji Indradmojo (.....)  
NIP.197706112009121004

**KETUA LP2M**  
UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

Dr. Hj.Mufidah Ch., M.Ag  
NIP. 196009101989032001

## **PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN**

Kami yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : dr. Christyaji Indradmojo  
NIP : 197706112009121004  
Pangkat/Gol.Ruang : Asisten Ahli/IIIb  
Fakultas/Jurusan : SAINTEK/Biologi

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa dalam penelitian ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis disebutkan dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila dikemudian hari ternyata dalam penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur penjiplakan dan pelanggaran etika akademik, maka kami bersedia mengembalikan dana penelitian yang telah kami terima dan diproses sesuai aturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang 13 September 2016

**Peneliti**

Materai 6000

dr. Christyaji Indradmojo  
NIP.197706112009121004

## **PERNYATAAN TIDAK SEDANG TUGAS BELAJAR**

**Saya yang bertanda tangan di bawah ini, Saya:**

**Nama** : dr. Christyaji Indradmojo

**NIP** : 197706112009121004

Pangkat/Gol.Ruang : Asisten Ahli/IIIb

Jabatan Dalam Penelitian : Peneliti utama

Dengan ini menyataan bahwa:

1. Kami TIDAK SEDANG TUGAS BELAJAR
2. Apabila diemudian hari terbukti bahwa saya sedang tugas belajar, maka secara langsung saya akan mengembalikan dana yang telah saya terima dari Program Penelitian Dosen tahun 2016  
Demikian surat pernyataan ini saya buat sebagaimana mestinya

Malang, 5 September 2016

Peneliti

Materai 6000

dr. Christyaji Indradmojo  
NIP. 197706112009121004

## **PERNYATAAN KESANGGUPAN MENYELESAIKAN PENELITIAN**

**Saya yang bertanda tangan di bawah ini :**

Nama : dr. Christyaji Indradmojo

NIP : 197706112009121004

Pangkat/Gol.Ruang : Asisten Ahli/IIIb

Jabatan Dalam Penelitian : Peneliti utama

Dengan ini menyataan bahwa:

1. Kami sanggup menyelesaikan dan menyerahkan laporan hasil penelitian sesuai dengan batas waktu yang telah ditetapkan (20 Desember 2016)
2. Apabila sampai dengan batas waktu yang telah ditetapkan kami belum menyerahkan laporan hasil, maka kami sanggup mengembalikan dana penelitian yang telah kami terima

Malang, 5 September 2016

Peneliti

Materai 6000

dr. Christyaji Indradmojo  
NIP. 197706112009121004

## **BAB 1**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Kanker adalah segolongan penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel yang tidak terkendali dan kemampuan sel-sel tersebut untuk menyerang jaringan biologis lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan yang bersebelahan (invasi) atau dengan migrasi sel ke tempat yang jauh (metastasis) (Krishna dan Hayashi, 2000). Kanker payudara dapat didefinisikan sebagai tumor ganas atau kumpulan sel kanker yang berkembang dari sel-sel payudara yang pada umumnya terjadi pada saluran atau lobus ASI. Organisasi kesehatan dunia, WHO mencatat bahwa pasien kanker payudara meningkat sebanyak 13 juta orang dalam kurun waktu 4 tahun (2008 – 2012), nomor 2 terbanyak setelah kanker leher rahim, dimana 70 persennya berada di negara-negara berkembang seperti di Indonesia (KemenKes, 2012).

Meningkatnya masalah kanker payudara pada saat ini yang belum ditemukan obat yang dianggap tepat untuk mengobati kanker tersebut, memicu para peneliti untuk mengeksplorasi bahan-bahan alam yang dianggap potensial sebagai alternatif agen antikanker. Sebagaimana pada ayat-ayat Allah dalam QS. An-Nahl [16]: 11 yang berbunyi:

يُنْبِتُ لَكُمْ بِهِ الْزَّرْعَ وَالرَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَبَ وَمِنْ كُلِّ الْثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَذَّةً  
لِقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ

*Artinya: “Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air hujan itu tanam-tanaman; zaitun, korma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memikirkan.” (QS. An-Nahl : 11)*

Menurut tafsir Nurun Quran karangan Imani (2005) dijelaskan bahwa Allah telah menciptakan segala macam tanaman sebagai tanda-tanda kekuasaan Allah dan sebagai bahan untuk berfikir agar tercipta kemaslahatan umat.

*Macrosolen cochinchinensis* masuk dalam famili Loranthaceae biasanya hidup pada inang Nangka maupun Belimbing Wuluh. *Macrosolen*

*cochinchinensis* mempunyai banyak manfaat untuk menyembuhkan penyakit dan biasanya digunakan dalam menyembuhkan diare, maag dan sakit kepala. Hasil penelitian Artanti (2006), uji antikanker *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak benalu Nangka memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara T47D dengan  $IC_{50} = 57 \mu\text{g/ml}$ . Hasil ko-kemoterapi ekstrak benalu Nangka dan agen antikanker Doxorubicin tidak terhadap sel kanker T47D menunjukkan efek sinergistik karena memiliki IK (Indeks kombinasi)  $> 1$ . Ekstrak air daun benalu nangka yang diberikan pada mencit yang diinduksi dengan benzo[ $\alpha$ ]pirena dengan dosis 750 mg/Kg BB mampu menghambat secara bermakna ( $p=0,05$ ) pertumbuhan tumor paru dengan persentase penghambatan sebesar 75,27 % pada mencit jantan dan 84,57 % pada mencit betina (Artanti, 2006).

Hasil penelitian Puspa (2011), bahwa dengan dosis 37,5 mg/gr BB ekstrak etanol daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) dapat menurunkan jumlah total limfosit tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi virus dengue. Pada penelitian ini, peneliti akan melakukan ekstraksi dan fraksinasi untuk mendapatkan fraksi yang mempunyai potensi aktivitas antikanker dan menguji mekanisme farmakologi pada benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) yang diasumsikan benalu Nangka dapat menghambat siklus sel kanker pada fase  $G_0$  (fase istirahat) serta mengidentifikasi proses terjadinya apoptosis sel kanker menggunakan metode *flowcytometry* dan pewarnaan *double staining* menggunakan *acridine orange*.

## 1.2 RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Bagaimana potensi antikanker ekstrak etanol, fraksi n-heksana, kloroform, etil asetat, dan air benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) terhadap *cell line* kanker payudara T47D?
2. Bagaimana mekanisme kerja terjadinya apoptosis ekstrak etanol dan fraksi benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) yang aktif yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D menggunakan metode pewarnaan *double staining* menggunakan *acridine orange*?

3. Bagaimana mekanisme kerja terjadinya apoptosis ekstrak etanol dan fraksi benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) yang aktif yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D menggunakan metode *flowcytometry*?
4. Bagaimana mekanisme kerja hambatan siklus sel yang diinduksi ekstrak etanol dan fraksi benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) yang aktif yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D menggunakan metode *flowcytometry*?

### **1.3 TUJUAN**

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui potensi antikanker ekstrak etanol, fraksi n-heksana, kloroform, etil asetat, dan air benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) terhadap *cell line* kanker payudara T47D.
2. Untuk mengetahui mekanisme kerja terjadinya apoptosis ekstrak etanol dan fraksi benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) yang aktif yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D menggunakan metode pewarnaan *double staining* menggunakan *acridine orange*.
3. Untuk mengetahui mekanisme kerja terjadinya apoptosis ekstrak etanol dan fraksi benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) yang aktif yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D menggunakan metode *flowcytometry*.
4. Untuk mengetahui mekanisme kerja hambatan siklus sel yang diinduksi ekstrak etanol dan fraksi benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) yang aktif yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D menggunakan metode *flowcytometry*.

### **1.4 MANFAAT PENELITIAN**

#### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi antikanker dari ekstrak dan fraksi benalu (*Macrosolen cochinchinensis*) terhadap sel kanker payudara T47D, informasi ilmiah mengenai mekanisme kerja apoptosis

ekstrak dan fraksi yang aktif menggunakan metode pewarnaan *double staining* menggunakan *acridine* orange dan *flowcytometry* serta mekanisme kerja hambatan siklus sel yang diinduksi ekstrak dan fraksi yang aktif *flowcytometry*.

#### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Memberikan kontribusi pada pengembangan daun benalu (*Macrosolen cochinchinensis*) dijadikan agen antikanker dari bahan alam yang relatif lebih efektif dan efek sampingnya yang kecil.

#### **1.4 Urgensi Penelitian**

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. Resistensi terhadap obat kemoterapi banyak ditemukan pada kanker kolon, payudara prostat dan leukemia.

Resistensi agen kemoterapi tersebut dapat terjadi melalui beberapa mekanisme antara lain kegagalan inisiasi apoptosis, inaktivasi obat, pengeluaran obat oleh pompa pada membran sel dan mutasi pada target obat (Davis et al, 2003; Notarbartolo et al, 2005). Strategi terapi yang tepat sangat diperlukan untuk mengatasi permasalahan tersebut. Penggunaan agen kemoterapi yang memiliki target molecular yang spesifik menjadi pilihan terapi utama pada pengobatan kanker saat ini terutama melalui jalur apoptosis. Apoptosis sel merupakan kematian sel yang terprogram. Implementasi aktivitas klinik apoptosis tersebut selain menunjukkan efek kemoterapi juga memiliki efek kemopreventif (Hsiang, et al. , 1989 ; Cotran , 1999).

Oleh karena itu penting untuk dikembangkan obat baru terutama dari bahan alam yang memiliki potensi tinggi dan target molecular spesifik sehingga diharapkan dapat menurunkan efek samping dan mencegah resistensi obat kemoterapi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak etanolik tanaman benalu Nangka *Macrosolen cochinchinensis* sebagai agen kemoterapi kanker dan mengungkap mekanisme molekuler yang menjadi target terapi spesifik pada kanker payudara. Dengan data ilmiah yang nantinya akan diperoleh

diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan tanaman ini menjadi produk fitofarmaka pilihan.

## BAB II

### TINJAUAN KEPUSTAKAAN DAN *ROAD MAP* PENELITIAN

#### 2.1 Deskripsi Benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*)

Benalu merupakan tumbuhan pengganggu tumbuhan lain. Benalu memiliki akar isap yang mampu mengisap sari makanan dari tumbuhan yang ditumpanginya. Akar benalu mampu menancap pada batang tumbuhan yang hidup, kemudian mengisap sari-sari makan pada tumbuhan itu.

*M. cochinchinensis* merupakan perdu yang bercabang banyak. Ranting dengan ruas yang membesar. Daun bertangkai pendek, eliptis sampai bentuk lanset, kadang-kadang bulat telur, gundul 3,5-17 kali 1,5-7 dengan ujung yang agak meruncing, serupa kulit, mengkilat. Karangan bunga berbunga 5-7 di ketiak, kadang-kadang dalam berkas pada ruas yang tua. Tangkai bunga pendek. Tabung kelopak elipsoid, panjang lingkaran 3 mm, pinggiran mahkota sangat pendek. Mahkota sebagai tunas dewasa 1-1,5 cm panjangnya separo bagian bawah melebar, di tengah dengan 6 sayap, di atas menyempit menjadi buluh sempit, berakhir ke dalam gada tumpul, kuning atau hijau kekuningan, coklat tua di atas sayap, kuning sampai merah pada ujung. Taju mahkota pada akhirnya melengkung jauh kembali dan terpuntir. Bagian yang bebas dari benang sari panjangnya 3-5 mm. Kepala putik bentuk gada. Buah bulat peluru, panjang 6 mm, akhirnya coklat violet tua (Van Steenis, 1975).



Gambar 2.1 Benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) (Van Steenis, 1975)

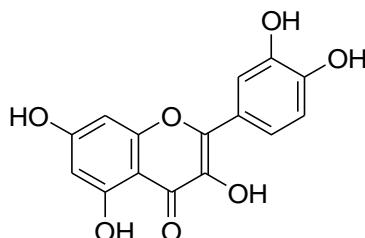
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Santalales

Suku : Loranthaceae  
Marga : Macrosolen  
Jenis : Macrosolen cochinchinensis (Lour.) van Tiegh (Backer and Van Den Brink, 1965).

## 2.2 Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder pada Benalu (*Macrosolen cochinchinensis*)

Menurut Hutapea (1999), bahwa daun dan batang benalu mengandung alkaloida, saponin, flavonoid dan tanin. Senyawa utama murni yang diisolasi dari benalu (*M. cochinchinensis*) adalah *quercetin* glikosida lainnya dan *quercitrin* bukan merupakan senyawa utama karena bercak dan puncak *quecitrin* tidak terdeteksi pada TLC dan HPLC dari semua ekstrak *M. cochinchinensis* (Artanti, 2006).

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa *quarcelin* merupakan salah satu golongan flavonoid yang memiliki efek antiproliferatif dan mampu menginduksi kematian sel melalui mekanisme apoptosis pada leukimia, kanker payudara, kanker paru-paru, hepatoma, kanker oral, dan kanker kolon.



Gambar 2.2 Senyawa *quercetin* (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)

Hasil penelitian Artanti (2006), uji antikanker *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak benalu Nangka memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara T47D dengan  $IC_{50} = 57 \mu\text{g/ml}$ . Hasil ko-kemoterapi ekstrak benalu Nangka dan agen antikanker Doxorubicin tidak terhadap sel kanker T47D menunjukkan efek sinergistik karena memiliki IK (Indeks kombinasi)  $> 1$ . Ekstrak air daun benalu nangka yang diberikan pada mencit yang diinduksi dengan benzo[ $\alpha$ ]pirena dengan dosis 750 mg/Kg BB mampu menghambat secara bermakna ( $p=0,05$ ) pertumbuhan tumor paru dengan persentase penghambatan sebesar 75,27 % pada mencit jantan dan 84,57 % pada mencit betina.

### 2.3 Kanker

Kanker adalah suatu penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel tidak terkendali dan kemampuan sel-sel tersebut untuk menyerang jaringan lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan sebelumnya (*invasi*) atau dengan migrasi sel lainnya (*metastasis*) (Amalina, 2008).

Kanker pada dasarnya merupakan sel dengan proliferasi yang tidak terkendali akibat kerisakan gen, utamanya pada regulator daur sel, sehingga menyebabkan ketidakseimbangan antara proliferasi sel dan kematian sel (Ruddon, 2007). Perkembangan penyakit kanker merupakan proses mikroevolusioner yang dapat berlangsung dalam beberapa bulan atau beberapa tahun (Albert *et al.*, 1994). Proses pertumbuhan ini dinamakan karsinogenesis, dimulai dari satu sel yang memperbanyak diri dan membentuk koloni kecil dalam jaringan yang sama (Muti'ah, 2014).

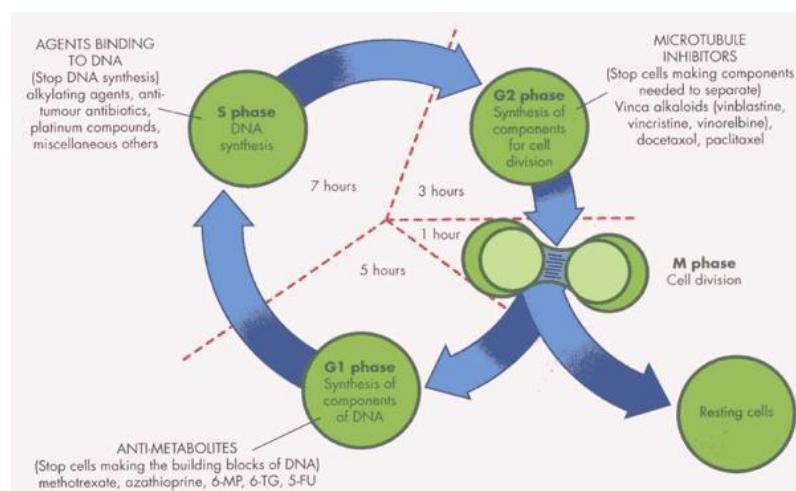
Terdapat empat tahapan karsinogenensis yaitu tahap inisiasi, promosi, progesi, dan metastasis (Pusztai *et al.*, 1996). Proses karsinogenesis pada prinsipnya sangat terkait dengan perubahan ekspresi dan regulasi gen-gen yang berperan dalam proses daur sel. Pemahaman lebih mendalam mengenai daur sel dan mekanisme molekuler yang memperantarnya dapat digunakan untuk menjelaskan proses karsinogenesis sekaligus pemanfaatannya dalam pengendalian sel tumor (Muti'ah, 2014).

Kanker payudara adalah pertumbuhan sel yang abnormal pada jaringan payudara seseorang. Payudara wanita terdiri dari lobulus (kelenjar susu), duktus (saluran susu), lemak dan jaringan ikat, pembuluh darah dan *limfe*. Sebagian besar kanker payudara bermula pada sel-sel yang melapisi duktus (kanker duktal), beberapa bermula di lobulus (kanker lobular), serta sebagian kecil bermula di jaringan lain (Ellis, E.O., dkk, 2003).

### 2.4 Siklus Sel

Siklus sel merupakan proses vital dalam kehidupan setiap organisme. Secara normal, siklus sel menghasilkan pembelahan sel. Pembelahan sel terdiri dari 2 proses utama, yaitu replikasi DNA dan pembelahan kromosom yang telah digandakan ke 2 sel anak (Muti'ah, 2014)..

Siklus sel tumor pada umumnya sama dengan siklus sel normal. Sel tumor dapat berada dalam tiga keadaan : (1) yang sedang membelah (siklus proliferative); (2) yang dalam keadaan istirahat (tidak membelah,  $G_0$ ); dan (3) yang secara permanen tidak membelah (Ganiswara, 1995). Sel yang sedang membelah terdapat dalam beberapa fase yaitu fase mitosis (M); pascamitosis ( $G_1$ ), merupakan fase persiapan sel untuk melakukan replikasi DNA; sintesis DNA (S); pramitosis ( $G_2$ ) merupakan fase istirahat dari fase sintesis ke mitosis. Fase M merupakan fase tersingkat yang di dalamnya terjadi pemecahan DNA yang telah berduplikasi secara komplit dan akan menghasilkan dua sel anak. Di akhir fase  $G_1$  terjadi peningkatan RNA disusul dengan fase S yang merupakan saat terjadinya replikasi DNA kromosom (Gambar 2.3). pada fase  $G_1$  sel mempersiapkan diri untuk membelah dan mempersiapkan dua set kromosom (Gondhowiardjo, 2004).



Gambar 2.3 Siklus sel hidup

Regulasi daur sel biasanya diatur oleh tiga jenis gen, yaitu *oncogen*, *suppressor genes*, dan gen yang mengatur replikasi dan repair DNA (Sofyan, 2000). Kedua jenis gen tersebut (*oncogen* dan *suppressor genes*) bekerja secara harmonis untuk mengatur perkembangan sel dalam rangka menjaga integritas tubuh secara keseluruhan. Kerusakan pada gen-gen tersebut berisiko terjadinya kanker atau proliferasi berlebihan (Muti'ah, 2014).

Setiap tahap dalam siklus sel dikontrol secara ketat oleh regulator siklus sel, yaitu :

a. *Cyclin*

Jenis *cyclin* utama dalam siklus sel adalah *cyclin* D, E, A, dan B. *Cyclin* diekspresikan secara periodik sehingga konsentrasi *cyclin* berubah-ubah pada setiap fase siklus sel. Berbeda dengan *cyclin* yang lain, *cyclin* D tidak diekspresikan secara periodik akan tetapi selalu disintesis selama ada stimulasi *growth factor*.

b. *Cyclin-dependent kinase* (Cdk)

Cdk utama dalam siklus sel adalah Cdk 4, 6, 2, dan 1. Cdks merupakan treonin atau serin protein kinase yang harus berikatan dengan *cyclin* untuk aktivasinya. Konsentrasi Cdks relatif konstan selama siklus sel berlangsung. Cdks dalam keadaan bebas (tak berikatan) adalah inaktif karena *catalytic site*, tempat ATP dan substrat berikatan diblok oleh ujung C-terminal dari CKIs. Cyclin akan menghilangkan pengebloka tersebut. Ketika diaktifkan, Cdk akan memacu proses *downstream* dengan cara memfosforilasi protein spesifik.

c. *Cyclin dependent kinase inhibitor* (CKI)

CKI merupakan protein yang dapat menghambat aktifitas Cdk dengan cara mengikat Cdk atau kompleks *cyclin*-Cdk. CKI terdiri dari dua kelompok protein yaitu INK\$ (p15, p16, p18, dan p19) dan CIP/KIP (p21, p27, dan p57). Keluarga INK4 membentuk kompleks yang stabil dengan Cdk sehingga mencegah Cdk mengikat cyclin D. INK4 bertugas mencegah progresi fase G1. Keluarga CIP/KIP meregulasi fase G1 dan S dengan menghambat kompleks G1 *cyclin*-Cdk dan cyclin B-Cdk1. Protein p21 juga menghambat sintesis DNA dengan menonaktifkan *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA). Ekspresi p21 diregulasi oleh p53 karena p53 merupakan faktor transkripsi untuk ekspresi p21 (Vermeulen *et al.*, 2003).

Regulasi daur sel melalui *gen suppressor* biasanya melalui gen *Retinoblastoma* (Rb) dan gen *p53*. Protein Rb berperan dalam regulasi daur sel secara umum, sedangkan protein p53 berperan dalam perbaikan DNA dan pemacuan apoptosis (King, 2000). Protein p53 mencegah replikasi dari DNA yang rusak pada sel normal dan mendorong program penghancuran sendiri sel yang mengandung DNA yang tidak normal (Sofyan, 2000).

Protein Rb bekerja dengan cara menghambat aktivitas faktor transkripsi dari sel, yakni E2F (King, 2000). E2F merupakan faktor transkripsi penting yang

bekerja dengan cara menginduksi gen-gen transkripsi agar mengekspresikan protein-protein yang diperlukan untuk kelangsungan protein transisi sel dari fase G1 ke fase S (Pan *et al.*, 2002).

Protein p53 berhubungan langsung dengan proses induksi CIPI khususnya yang mengekspresikan p21 (Shapiro and Harper, 1999). Inhibitor Cdk ini memegang peran penting dalam memacu *cell cycle arrest* pada fase G1 (Pan *et al.*, 2002). Hal ini menunjukkan bahwa p53 menyebabkan g1 *arrest* secara tidak langsung.

Ekspresi p53 akan meningkat jika selama fase S terjadi kerusakan DNA. Protein p53 ini akan memberikan tiga efek, yaitu perbaikan DNA, penghentian sintesis DNA, dan atau pemicuan apoptosis. Stimulasi apoptosis bisa lewat mekanisme penurunan ekspresi protein Bcl-2 dan peningkatan protein Bax (King, 2000). Mekanisme kerja Bcl-2 menghambat apoptosis dengan aksi berlawanan terhadap faktor induksi apoptosis Fasl yang biasanya diekspresikan jika sel dalam keadaan stress (Kampa *et al.*, 2003). Protein Bax merupakan pemicu terjadinya apoptosis (King, 2000).

Fase-fase yang terjadi dalam siklus sel kemungkinan terjadinya hambatan dalam setiap fase tersebut dapat diamati dengan *flowcytometry*. Analisis dengan metode ini didasarkan pada jumlah set DNA setiap sel dalam populasi yang diamati. Jumlah set DNA tersebut yang menjadi penanda penting setiap fase dalam daur sel (Muti'ah, 2014).

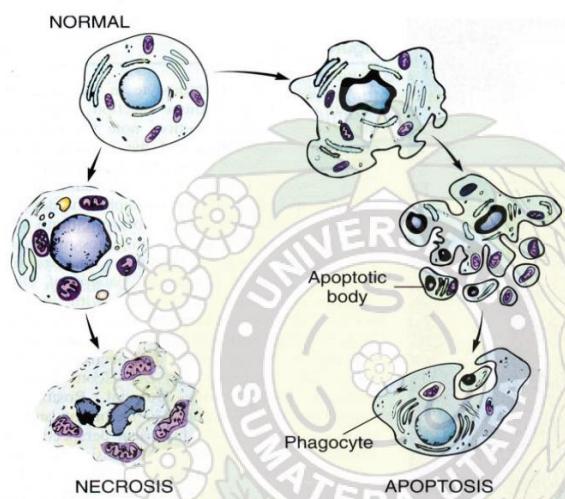
## 2.5 Apoptosis

Apoptosis adalah kematian sel yang terprogram. Apoptosis merupakan proses normal yang mempunyai dua fungsi yaitu : perbaikan jaringan dan pelepasan sel yang rusak yang bisa membahayakan tubuh (King, 2000). Apoptosis dipengaruhi oleh proses fisiologis yang berfungsi untuk mengeleminasi sel yang tidak diinginkan atau tidak berguna selama proses pertumbuhan sel dan proses biologis normal lainnya (Wyllie *et al.*, 2000).

Apoptosis dapat diamati pada penampakan fisiologis yaitu berupa pengkerutan sel, kerusakan membran plasma dan kondensasi kromatin. Sel yang mati dengan proses ini tidak kehilangan Kandungan internal sel dan tidak

menimbulkan respon inflamasi. Jika program apoptosis sudah selesai, sel akan menjadi kepingan-kepingan sel mati yang disebut bahan apoptosis (*apoptotic body*) badan apoptosis ini akan segera dikenali oleh sel makrofag, untuk selanjutnya dimakan (*engulfed*) (Wyllie *et al.*, 2000).

Nekrosis merupakan kerusakan sel yang ditandai oleh adanya peningkatan volume sel dan kehilangan tekanan membran. Nekrosis diakibatkan oleh adanya pelepasan enzim lisis lisosomal seperti protease dan nuclease, sehingga sel mengalami lisis yang kemudian diikuti oleh respon inflamasi. Nekrosis merupakan proses patologis karena adanya paparan tekanan fisik atau kimia yang sangat berpengaruh pada sel (Wyllie *et al.*, 2000). Kematian sel melalui mekanisme nekrosis menyebabkan gangguan bagi sel-sel disekitarnya, sehingga pada proses terapi kanker kematian sel dengan mekanisme ini sangat sangat merugikan bagi pasien. Respon inflamasi sistemik yang sangat mungkin ditimbulkan akan menyebabkan efek samping yang serius bahkan bisa sampai pada kematian (Muti'ah, 2014).



Gambar 2.4 Apoptosis dan nekrosis (Lumongga, 2008).

Sejak awal kemunculannya, metode uji *flowcytometric* propidium iodide (PI) telah digunakan secara luas sebagai uji apoptosis pada banyak model eksperimental. Metode ini didasarkan pada karakteristik sel yang mengalami apoptosis yaitu adanya fragmentasi DNA dan hilangnya DNA pada inti sel. Metode ini menggunakan agen *fluorochrome*, contohnya PI, yang dapat berikatan dan melabeli DNA. Metode ini mampu mendapatkan hasil uji DNA sel yang cepat

(selesai dalam 2 jam). Sejak publikasinya uji PI telah digunakan secara luas pada banyak laboratorium (Riccardi and Niccoletti, 2006).

Agen *fluorochrome* yang lain adalah *Acridine orange* (AO), yang dapat berikatan dengan semua asam nukleat dan dapat menembus membrane, bersama dengan *propidium iodide* (PI) yang merupakan pewarna yang tidak dapat menembus membrane yang juga mengikat semua asam nukleat merupakan kombinasi pewarna untuk mengetahui integritas sel. PI berflouresensi merah apabila berkaitan dengan asam nukleat dan AO berflouresensi hijau apabila berikatan dengan BNA untai ganda dan berflouresensi merah apabila berikatan dengan RNA atau DNA untai tunggal (Helberstdt and Emerich, 2007).

Uji viabilitas sel *double-staining* dengan komponen yang dapat menyisip DNA yaitu *acridine orange* dan *ethidium bromide* (AO/EB) atau *propidium iodide* (PI) didasarkan pada prinsip bahwa *acridine orange* (AO) dapat masuk ke dalam sel hidup ataupun sel mati, sedangkan EB dan PI hanya dapat menembus membrane sel yang mengalami disintegrasi. Sel hidup berwarna hijau jika dibaca dibawah mikroskop fluorensense dan sel mati berwarna merah (Kavanagh, 2007).

## 2.6 Uji Aktivitas Antikanker

Uji sitotoksik merupakan uji *in vitro* dengan menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendekati tingkat ketoksikan suatu senyawa. Sistem tersebut merupakan uji kualitatif dengan menetapkan kematian sel. Dasar dari percobaan tersebut antara lain bahwa sistem penetapan aktivitas biologis seharusnya memberikan kurva dosis respon yang menunjukkan hubungan lurus dengan jumlah sel (Anggraini, 2008).

Sel T47D merupakan *continuous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. *Continuous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penangannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan frozen stock jika terjadi kontaminasi (Burdall et al., 2003). Sel T47D memiliki morfologi seperti sel epitel. Sel ini dikulturkan dalam media DMEM + 10 % FBS + 2 mM L-Glutamin, diinkubasi dalam CO<sub>2</sub> inkubator 5 % dan suhu 37 °C (Abcam, 2007).

Sel kanker payudara T47D mengekspresikan protein p53 yang termutasi. *Mis sense mutation* terjadi pada residu 194 (dalam zinc-binding domain, L2), sehingga p53 tidak dapat berikatan dengan response element pada DNA. Hal ini mengakibatkan kurang bahkan hilangnya kemampuan p53 untuk regulasi *cell cycle*. Sel T47D merupakan sel payudara ER/PE-positif (Schafer *et al.*, 2000). Induksi estrogen eksogen mengakibatkan peningkatan proliferasinya (Verma *et al.*, 1998). Sel T47D merupakan sel yang sensitive terhadap doksorubisin (Zampieri *et al.*, 2002).

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter  $IC_{50}$  (*Inhibitory Concentration*). Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar harga  $IC_{50}$  maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Senyawa sitotoksik adalah senyawa yang bersifat toksik pada sel. Uji sitotoksik dapat memberikan informasi konsentrasi obat yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Akhir dari uji sitotoksik adalah memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Amalina, 2008).

## 2.7 Flowcytometry

*Flowcytometry* merupakan suatu teknik yang digunakan untuk menganalisis jenis-jenis sel yang terdapat pada suatu populasi sel. Sel dilabel fluoresen, dilewatkan celah sempit, dan ditembak sinar. Pada suatu populasi sel yang sejenis, misal pada sel kanker yang diberi perlakuan suatu senyawa sitotoksik, dapat dilakukan analisis terhadap fase-fase daur sel, sel apoptosis, serta sel yang mengalami poliploid. Masing-masing jenis sel tersebut memiliki perbedaan pada jumlah set kromosom di mana pada fase  $G_0/G_1$ , fase S, fase  $G_2/M$  berturut-turut memiliki 2, 3, dan 4 set kromosom. Semakin banyak jumlah set kromosom, maka intensitas sinyal optik yang diberikan semakin kuat karena kemampuan fluoresen untuk berinterkalasi pada DNA semakin besar. Pada sel yang mengalami apoptosis (sub  $G_0$ ), intensitas fluoresen sangat lemah karena kromosom telah mengalami fragmentasi. Sedangkan pada sel poliploidi, intensitas

yang diberikan sangat kuat karena jumlah set kromosom yang lebih dari 4 set (CCRC, 2014).

*Flow cytometry* merupakan teknologi yang secara simultan mampu menghitung dan mengkarakterisasi berbagai macam sifat fisika dari partikel tunggal (biasanya sel). *Flow cytometry* dapat menganalisis suspensi partikel atau sel dengan dari ukuran 0,2-150  $\mu\text{m}$ . Prinsip kerja *flow cytometry* adalah setiap sel akan dialirkkan dalam sistem fluida, lalu ditembak dengan sinar laser, kemudian disebarluaskan oleh setiap sel. Selain itu, sinar laser tersebut juga dapat mengaktifkan senyawa fluoresen yang terdapat dalam sel. Setiap sinyal sinar yang disebarluaskan maupun yang difluoresensikan akan diubah menjadi impuls elektrik sehingga dapat terdeteksi dan tersimpan sebagai data di dalam komputer. *Flow cytometry* dapat digunakan untuk deteksi adanya perubahan morfologi sel yang mengalami apoptosis menggunakan *nuclear staining* dan mampu menghitung jumlah sel yang mengalami apoptosis menggunakan *flow cytometry* Annexin V (Koolman *et al.*, 1994).

## 2.8 Skema *Road Map*

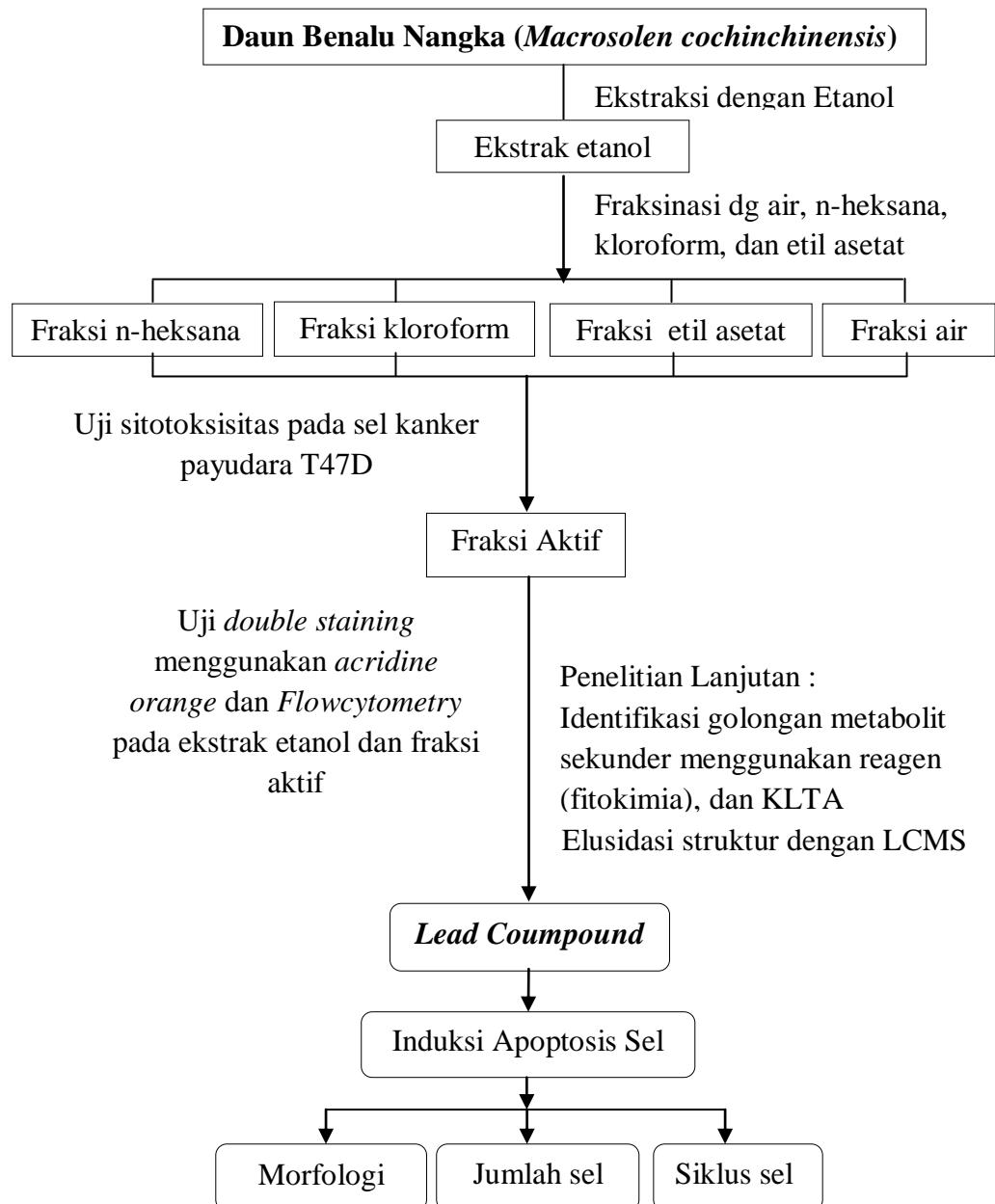
Penelitian ini merupakan penelitian pengembangan daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*). Penelitian ini akan dikerjakan kurang lebih 6 bulan berturut-turut dengan tujuan akhir mendapatkan informasi mengenai mekanisme farmakologi ekstrak dan fraksi benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*). Pada penelitian ini akan dilakukan beberapa tahapan penelitian dengan tujuan akhir mendapatkan senyawa *lead compound* antikanker terutama terhadap kanker payudara dan mendapatkan mekanisme farmakologi senyawa tersebut. Penemuan senyawa antikanker pada tanaman ini dilakukan dengan pendekatan *Bioassay-guided by activity* yaitu suatu metode penemuan senyawa aktif antikanker yang dipandu aktivitasnya mulai dari aktivitas ekstrak kasar tanaman sampai fraksi aktifnya, selanjutnya untuk penelitian berkelanjutan fraksi aktif yang diperoleh diidentifikasi strukturnya menggunakan LC-MS.

Tahapan penelitian ini adalah :

1. Determinasi tanaman yang bertujuan untuk memastikan kebenaran tanaman yang digunakan.

2. Ekstraksi dengan pelarut etanol benalu Nangka (*macrosolen cochinchinensis*) sehingga di dapatkan ekstrak etanol daun benalu Nangka (*macrosolen cochinchinensis*).
3. Ekstrak etanol aktif di fraksinasi dengan pelarut n-heksan, kloroform, dan etil asetat sehingga akan didapatkan ekstrak fraksi n-heksan, fraksi kloroform, fraksi etil asetat, dan fraksi air. Pada masing-masing fraksi tersebut dilakukan pengujian aktivitas antikanker pada sel kanker payudara T47D. Pada tahapan ini akan diperoleh data aktivitas antikanker masing-masing fraksi benalu Nangka (*macrosolen cochinchinensis*).
4. Tahapan selanjutnya adalah mengetahui mekanisme kerja senyawa antikanker tersebut dengan pendekatan metode *Selective Apoptosis Antineoplastic Drug* (SAAND) yaitu suatu metode skrining aktivitas hasil isolasi bahan alam yang diharapkan memiliki aktifitas antikanker yang selektif hanya membunuh sel kanker tanpa membunuh sel normal melalui mekanisme apoptosis sel. Fenomena apoptosis sel di lihat dari morfologi sel dan jumlah apoptosis sel dengan metode pengecatan acridine orange dan flowcytometry. Sedangkan regulasi siklus sel dilakukan dengan metode flowcytometry. Ekstrak etanol dan fraksi aktif yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D di uji menggunakan metode *flowcytometry*.

## SKEMA RANCANGAN PENELITIAN



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Bahan dan Alat**

##### **3.1.1 Bahan**

###### **3.1.1.1 Bahan Uji**

Bahan tanaman yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) diambil dari beberapa tempat di kabupaten Blitar. Bahan yang digunakan diambil dari seluruh bagian daun kemudian dicuci. Dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan dengan pemanasan menggunakan oven pada suhu 30 – 37 °C selama ± 5 jam. Selanjutnya daun diblender hingga terbentuk serbuk lalu diayak dengan ayakan ukuran 60 mesh agar diperoleh serbuk yang kecil-kecil dan seragam. Serbuk halus yang diperoleh dimasukkan ke dalam wadah untuk disimpan.

###### **3.1.1.2 Bahan untuk Ekstraksi dan Fraksinasi**

Pelarut yang akan digunakan untuk tahap ekstraksi maserasi adalah etanol, sedangkan yang digunakan untuk tahap fraksinasi adalah aquadest, n-heksana, kloroform, dan etil asetat. Semua bahan yang digunakan untuk ekstraksi dan fraksinasi berderajat teknis.

###### **3.1.1.3 Bahan untuk Kultur Sel**

Sel kanker yang akan digunakan pada penelitian ini adalah *cell line* kanker payudara. Sel kanker payudara yang digunakan adalah T47D, sel tersebut akan diperoleh dari Prof. Tatsuo Takeya (*laboratorium of Gene Function in Animal, Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology*, Jepang) melalui Dr. Edy Meiyanto, M.Si, Apt.

Sel kanker payudara T47D ditumbuhkan pada media penumbuh Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) ditambah dengan 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (PAA Labortories), 1% v/v penicillin-streptomycin (Nacalay Tesque), dan 1,0mM L-glutamin (Nacalay Tesque). Semua sel dikultur dalam incubator pada 5% CO<sub>2</sub>, 37°C.

### **3.1.1.4 Bahan untuk Uji Antikanker**

Bahan yang digunakan dalam uji aktivitas antikanker dengan metode MTT adalah *phospat buffer saline* (PBS) digunakan sebagai larutan penyangga pencuci, media kultur (DMEM/RPMI/MEM), DMSO akan digunakan untuk melarutkan ekstrak daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian ini maksimal 1% dalam medium kultur, *3-(4,5-dimetiltiazole-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide* (MTT) digunakan sebagai reagen yang bereaksi dengan enzim suksinat dehidrogenase pada sel, 0,025% tripsin dalam medium kultur digunakan untuk memanen sel, SDS 10 % dalam 0,1 N HCl digunakan untuk *stopper*, tissue makan, dan aluminium foil.

### **3.1.1.5 Bahan untuk Uji *Double Staining* dan *Flowcytometry***

Bahan yang digunakan dalam uji *double staining* menggunakan *acridine orange* adalah sel T47D, *phospat buffer saline* (PBS), media kultur RPMI, DMSO, pereaksi warna *acridine orange*. Pembuatan pereaksi *ethidium bromide-acridine orange* (EtBr-AO) yaitu larutan induk dibuat dari 50 mg etidium bromida (Sigma, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) dan 15 akridin oranye (Sigma, Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) dilarutkan dalam 1 mL etanol 95%, ditambah akuabides hingga 50 mL. Sebelum pemakaian, 1 mL larutan induk diencerkan dengan PBS sampai volume 100 mL (setiawati, 2011).

Bahan yang digunakan dalam uji *flowcytometry* adalah sel T47D, *phospat buffer saline* (PBS), media kultur RPMI, DMSO, etanol dingin, tripsin, *annexin V*, *propidium iodide* (PI), dan reagen *flowcytometry*.

## **3.1.2 Alat**

Alat utama yang diperlukan dalam penelitian ini adalah maserator, evaporator, sentrifus, spektrofotometer, tangki nitrogen cair, CO<sub>2</sub>-Jacketed Incubator, *plate 96 well*, *plate 6 well*, *plate 24 well* yang telah dilapis *coverslip*, FACS *Calibur*, *Laminar Air Flow cabinet* (Nuaire), vortex, sentrifuse, mikroskop *inverted*, Elisa reader, mikroskop *fluorescence*, dan seperangkat alat *flowcytometry*.

### **3.2 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.2.1 Determinasi Tanaman**

Determinasi tanaman akan dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Jawa Timur

#### **3.2.2 Ekstraksi, Fraksinasi dan Isolasi**

Secara singkat masing-masing serbuk daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensi*) di ekstraksi dengan cara maserasi (perendaman) menggunakan pelarut etanol 96 % rasio 1:5 selama selama 24 jam dan pengadukannya dibantu dengan shaker selama 3 jam, kemudian disaring. Diulangi perlakuan pada ampas yang diperoleh sampai diperoleh filtrat yang bening. Filtrat ekstrak kemudian digabungkan lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat tersebut diberi gas N<sub>2</sub> untuk menghilangkan residu pelarut. Selanjutnya ekstrak pekat ditimbang sampai diperoleh berat konstan untuk meyakinkan bahwa pelarut telah menguap dan didiamkan selama ± 2 hari dengan ditutup *aluminium foil* yang dilubangi. Ekstrak yang diperoleh ditambah 100 ml aquadest dan kemudian dicampur untuk mendapatkan bentuk cair ekstrak etanol. Kemudian difraksinasi dengan n-heksana dalam corong pisah dengan perbandingan 1:1, dikocok secukupnya. Dibiarkan sampai terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan n-heksana dan lapisan air. Perlakuan ini dilakukan beberapa kali pengulangan sampai lapisan n-heksana terlihat jernih sehingga diperoleh fraksi n-heksana. Perlakuan untuk lapisan air ini dilakukan seperti perlakuan diatas dengan beberapa kali pengulangan fraksinasi menggunakan pelarut kloroform, dan etil asetat perbandingan 1:1. Hasil fraksi n-heksana, kloroform, etil asetat, dan air diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan fraksi kental. Masing-masing fraksi pekat tersebut diberi gas N<sub>2</sub> untuk menghilangkan residu pelarut. Selanjutnya masing-masing fraksi pekat ditimbang sampai diperoleh berat konstan untuk meyakinkan bahwa pelarut telah menguap dan didiamkan selama ± 2 hari dengan ditutup *aluminium foil* yang dilubangi.

### **3.2.3 Uji sitotoksik dengan metode MTT**

Ekstrak dan fraksi daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) dibuat dengan konsentrasi larutan uji. Sebagai kontrol positif digunakan doksorubisin. Masing-masing seri konsentrasi dibuat replikasi 3 kali. Suspensi sel kanker T47D dalam media RPMI dimasukkan ke dalam plate berisi 96 sumuran dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam media dibuang dan dicuci dengan PBS, dimasukkan seri konsentrasi ekstrak dan fraksi (*Macrosolen cochinchinensis*) ke dalam sumuran seri konsentrasi yang digunakan adalah 1000;500; 250; 125; 62,5; 31,25 ppm dan diulang sebanyak 3 x (triplo), kemudian diinkubasi selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, larutan dalam plate dibuang dan dicuci dengan PBS 1x kemudian ditambahkan reagen MTT 100  $\mu$ L dalam setiap sumuran. Sel yang telah diberi MTT diinkubasi selama 2-4 jam dalam inkubator (sampai terbentuk garam formazan). Setelah garam formazan terbentuk, ditambahkan *stopper* SDS 10% dalam 0,1 N HCl kemudian diinkubasi di tempat gelap selama semalam. Setelah itu dilakukan pembacaan dengan menggunakan *Elisa reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu (Rahmawati, 2013).

### **3.2.4 Uji Double Staining menggunakan Acridine Orange**

Kultur sel T47D yang telah konfluen diperpanjang dan distribusikan dengan konsentrasi  $5 \times 10^4$  sel/sumuran dalam 1000  $\mu$ L media RPMI ke dalam *plate 24 well* (Nune) yang telah diberi *cover slip* (Nune). Setelah itu sel diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> agar sel teradaptasi dan normal kembali. Selanjutnya *treatment* sampel terhadap sel T47D dengan perlakuan kontrol sel T47D dan sampel ekstrak dan fraksi benalu Nangka yang aktif yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D dengan menggunakan konsentrasi IC<sub>50</sub> -nya selanjutnya diinkubasi kembali 24 jam ke dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Pada akhir inkubasi media kultur RPMI dibuang dengan hati-hati dan dicuci menggunakan PBS, kemudian *cover slip* yang memuat sel dipindahkan ke atas obyek gelas lalu ditetesi dengan pereaksi *acridine orange* sebanyak 10  $\mu$ L. pengamatan morfologi sel dilakukan dengan mikroskop fluoresense (CCRC, 2009).

### 3.2.4 Uji *Flowcytometry*

Tahapan selanjutnya yaitu pengujian mekanisme kerja sampel menggunakan *flowcytometry*, pada tahap ini yang diuji menggunakan *flowcytometry* adalah ekstrak etanol dan fraksi yang paling aktif yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D.

Kultur sel T47D yang telah konfluen diperpanjang dan distribusikan dengan konsentrasi  $5 \times 10^5$  sel/sumuran dalam 2000  $\mu\text{L}$  media RPMI ke dalam *plate 6 well*. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator  $\text{CO}_2$ . Setelah itu dibuang media RPMI dengan cara disedot dengan hati-hati dan dicuci sel dengan PBS. Selanjutnya *treatment* sampel terhadap sel T47D dengan perlakuan kontrol sel T47D dan sampel ekstrak dan fraksi benalu Nangka yang aktif yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D dengan menggunakan konsentrasi  $\text{IC}_{50}$  -nya selanjutnya diinkubasi kembali 24 jam ke dalam inkubator  $\text{CO}_2$ .

Selanjutnya dilakukan preparasi sampel untuk *flowcytometry*. Pertama-tama disiapkan alat-alat yang akan digunakan. Disiapkan conical (per well 1 conical), diambil media dalam well ditampung dalam conical masing-masing. Dibilas dengan 1 mL PBS lalu ditampung dalam conical masing-masing. Ditambahkan 250  $\mu\text{L}$  Tripsin, diinkubasi selama 3 menit, pastikan sel sudah lepas satu-satu. Tambah 1 mL MK dan diresuspensi. Ambil sel ditampung dalam conical ditambah 2 mL PBS. Selanjutnya disentrifuge dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Dibuang supernatan, untuk perlakuan apoptosis ditambah 1 mL PBS kemudian diresuspensi dan dipindah ke dalam eppendorf dan untuk perlakuan siklus sel ditambah 1 mL etanol dingin kemudian diresuspensi dan dipindah ke dalam eppendorf. Masing-masing eppendorf di inkubasi selama 30 menit dalam lemari es. Untuk perlakuan apoptosis masing-masing eppendorf disentrifuge pada 2000 rpm selama 3 menit dan sel siap untuk diuji dengan *flowcytometer*. Media pada tabung eppendorf dibuang, lalu dimasukkan 100  $\mu\text{L}$  reagen Annexin V-PI ke dalam tabung eppendorf dan buffer sebanyak 350  $\mu\text{L}$ . Agar bercampur maka divortex, kemudian diinkubasi pada suhu ruang dan tempat gelap selama 10 menit. Suspensi sel tersebut dipindahkan ke *flowcyto-tube*. Suspensi sel siap untuk diinjek pada alat *flowcytometry*. Untuk perlakuan siklus sel yaitu reagen

*flow cytometry* sebanyak 400  $\mu$ L pada tiap eppendorf, diresuspen dengan homogen. Tiap eppendorf dibungkus dengan alumunium foil dan diberi penandaan pada bagian atas eppendorf. Semua eppendorf diinkubasi di waterbath 37°C, 10 menit untuk mengaktivasi RNase. Diresuspen lagi sebelum ditransfer ke *flowcyto-tube*. Suspensi sel ditransfer ke dalam *flowcyto-tube* melalui filter (kain nylon/kain kaca) menggunakan mikropipet 1 ml. Tutup *flowcyto-tube* dilubangi terlebih dahulu. Selanjutnya dibaca dengan *flow cytometer* FACS Calibur untuk mengetahui profil *cell cycle*. Data *flow cytometry* dianalisis dengan program *cell quest* untuk melihat distribusi sel pada fase-fase daur sel sub G1, S, G2/M dan sel yang mengalami poliploidi (CCRC, 2009). *Flow cytometry* dilakukan dengan pancaran cahaya 488 nm dan dengan kecepatan medium (500 sel/detik).

### 3.3 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup.

$$\text{Prosentase (\%)} \text{ sel hidup} = \frac{(\text{Abs. perlakuan} - \text{Abs. kontrol media})}{(\text{Abs. kontrol sel} - \text{Abs. kontrol media})} \times 100\%$$

Keterangan: Abs : absorbansi

Prosentase sel hidup dihitung untuk memperoleh nilai IC50 yaitu konsentrasi yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan sebanyak 50% dari populasi sel sehingga dapat diketahui potensi sitotoksiknya. Nilai IC50 ditentukan dengan analisis probit (*Statistic Product and Service Solution* (SPSS) 16.0 for windows). Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan analisis statistic menggunakan paired-samples T-test (SPSS 16.0 for windows) dengan taraf kepercayaan 95%. Perbedaan dengan rerata pada  $p < 0,05$  dianggap signifikan, sedangkan  $p > 0,05$  tidak signifikan secara statistic.

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji potensi antikanker dari ekstrak dan fraksi daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*). Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yang nantinya berkelanjutan yaitu preparasi sampel, ekstraksi maserasi dan fraksinasi daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*), uji antikanker dengan metode MTT (CCRC, 2009), uji mekanisme kerja terjadinya apoptosis dengan pewarnaan *double staining* menggunakan *Acridine orange* dan *flowcytometry*, serta uji mekanisme kerja siklus sel yang diinduksi ekstrak etanol dan fraksi benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) yang aktif yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D (CCRC, 2009).

#### **4.1 Preparasi Sampel**

Preparasi sampel merupakan tahapan penyebukan sampel yang bertujuan untuk mempercepat tahapan ekstraksi maserasi, karena dengan ukuran sampel bentuk serbuk, yang terjadi semakin banyak kontak antara sampel dengan pelarut sehingga maserasi berjalan dengan cepat dan maksimal. Preparasi sampel yang dilakukan ini meliputi pencucian, pengeringan dan penyebukan. Daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) yang segar dicuci dengan air bersih. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan kotoran berupa debu yang menempel pada daun benalu Nangka. Daun yang sudah bersih kemudian dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan dengan diangin-anginkan terlebih dahulu di teras rumah selama 1 hari kemudian pemanasan menggunakan oven pada suhu 30 – 37 °C selama ± 5 hari. Pengeringan ini dilakukan bertujuan menghilangkan kadar air dalam sampel agar terhindar dari perkembangbiakan mikroba, selain itu dianginkan pada suhu dibawah 40 °C agar senyawa aktif pada sampel tidak rusak. Selanjutnya dihaluskan dengan menggunakan blender hingga terbentuk serbuk. Perlakuan ini bertujuan untuk memperluas permukaan sehingga mudah dalam pengekstraksian. Kemudian diayak dengan ayakan ukuran 60 mesh agar diperoleh serbuk yang kecil-kecil dan seragam. Penyebukan dilakukan untuk menyeragamkan ukuran

sampel yakni 60 mesh. Ukuran 60 mesh merupakan ukuran yang sesuai untuk jenis sampel akar atau rimpang dalam proses ekstraksi (Sembiring, 2005). Hasil yang diperoleh disebut sebagai sampel daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) berupa serbuk daun benalu nangka berwarna hijau pudar.

#### **4.2 Ekstraksi Maserasi dan Fraksinasi Daun Benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*)**

Pada tahap ini dilakukan ekstraksi daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) dengan tujuan mendapatkan ekstrak dari daun benalu Nangka. Ekstraksi merupakan metode pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutan terhadap dua cairan yang tidak saling larut (Khopkar, 2008).

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi. Penekanan utama dalam metode ini adalah tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dengan jaringan yang diekstraksi (Guenther, 1987). Prinsip utama dalam maserasi adalah mengekstrak senyawa aktif yang terdapat dalam pelarut berdasarkan tingkat kepolaran masing-masing pelarut (*like dissolves like*) (Khopkar, 2008). Metode ini didasarkan pada perendaman sampel dengan pelarutnya pada suhu ruang, selanjutnya sampel akan mengalami pemecahan dinding sel dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut pada pelarut (Voight, 1994).

Daun benalu Nangka di maserasi dengan pelarut etanol 96 %. Pemilihan pelarut etanol 96 % karena lebih mudah dalam melarutkan semua zat yang bersifat polar, semipolar, dan non polar. Menurut Robinson (1995), senyawa fenolik dapat larut dalam air maupun pelarut organik yang polar dan flavonoid dalam tumbuhan dapat diekstraksi dengan air maupun etanol. Dilakukan pengadukan pada saat maserasi menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 3 jam. Hal ini bertujuan agar kejenuhan pelarut terjadi cepat dan ekstrak yang diperoleh lebih homogen (Vogel, 1978). Pada saat proses maserasi dilakukan pegantian pelarut setiap harinya hingga diperoleh filtrat bening yang mengindikasikan senyawa telah terekstrak secara maksimal (Voight, 1995).

Filtrat didapat dari proses penyaringan. Penyaringan merupakan proses pemisahan partikel yang terdapat didalam suatu bahan cair sehingga diperoleh filtrat yang diinginkan (Schmitt, 1996 dalam Diniyah). Penyaringan bertujuan untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Proses penyaringan pada penelitian ini menggunakan penyaring *vacuum* untuk mempercepat proses penyaringan. Filtrat dan residunya dipisahkan dengan cara disaring menggunakan corong *Buchner* dan kertas saring. Prinsip penyaringan dengan corong *Buchner* adalah penyaringan secara mekanis berdasarkan ukuran molekul, sehingga molekul yang berukuran lebih besar akan tertahan pada kertas saring (Vogel, 1978).

Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator*. Pemekatan atau penguapan ini dilakukan untuk menghilangkan atau menguapkan pelarut etanol 96 % sehingga yang didapatkan merupakan ekstrak pekat dari daun benalu Nangka. Pemekatan dilakukan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 60 °C. Proses ini dihentikan ketika pelarut sudah tidak menetes lagi pada labu alas bulat. Prinsip kerja *rotary evaporator vaccum* ini adalah penurunan tekanan sehingga pelarut akan menguap dan terpisah pada suhu sebelum titik didihnya. Pelarut yang menguap lebih dahulu di bawah titik didihnya dikarenakan adanya pompa vakum yang berfungsi untuk menurunkan tekanan. Penurunan tekanan menyebabkan titik didih pelarut menjadi turun sehingga pelarut akan lebih mudah menguap. Pelarut yang terkena panas dari waterbath dibawah suhu titik didihnya akan menguap, uap dari pelarut akan terkondensasi menjadi wujud cair yang tertampung dalam labu destilat sedangkan ekstrak tertampung dalam labu alas bulat (Abraham, 2013)..

Pemekatan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* menghasilkan ekstrak pekat yang berupa padatan berwarna hijau tua pekat dan pelarut yang dapat digunakan lagi. Ekstrak pekat yang didapat di aliri gas N<sub>2</sub> untuk menghilangkan sisa-sisa pelarut yang mungkin masih ada dalam ekstrak sehingga ekstrak tersebut yang dihasilkan benar-benar murni dan bebas dari pelarutnya.

Ekstraksi kedua menggunakan fraksinasi bertingkat menggunakan variasi pelarut berdasarkan sifat kepolarannya yaitu n-heksana, kloroform, dan etil asetat. Ekstrak pekat etanol yang didapat terlebih dahulu disisihkan sebanyak 1 gram yang nantinya juga akan diuji aktivitas antikankernya. Sisa ekstrak pekat etanol

daun benalu Nangka yang didapat dilarutkan dalam air : etanol (8:2) sampai larut dengan volume sebanyak 100 mL, hal ini bertujuan untuk proses hidrolisis menggunakan bantuan air. Hidrolisis adalah suatu reaksi peruraian antara suatu senyawa dengan air agar senyawa tersebut pecah atau terurai (Yuniwati, dkk, 2011). Larutan ekstrak selanjutnya diekstraksi cair-cair (partisi) menggunakan corong pisah dengan fraksinasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, kloroform, dan etil asetat. Hal ini bertujuan untuk memisahkan senyawa polar dan nonpolar yang terdapat pada filtrat air ekstrak etanol. Prinsip dari ekstraksi cair-cair adalah adanya distribusi komponen target pada dua pelarut yang tidak saling larut. Sebagian komponen larut pada fase pertama dan sebagian larut pada fase kedua (Khopkar, 2008).

Pada fraksinasi pertama antara filtrat air ekstrak etanol dengan pelarut n-heksana perbandingan 1:1 terbentuk dua lapisan organik yaitu lapisan atas fraksi n-heksana (hijau muda) dan lapisan bawah fraksi air (hijau pekat). Perbedaan massa jenis pelarut mengakibatkan fraksi n-heksana berada di atas karena massa jenis n-heksana (0,655 g/mL) lebih kecil daripada massa jenis air (1 g/mL). Pada fraksinasi kedua antara fraksi air dengan pelarut kloroform perbandingan (1:1) terbentuk dua lapisan organik yaitu lapisan atas fraksi air (hijau pekat) dan lapisan bawah fraksi kloroform (hijau bening). Fraksi kloroform berada dibawah karena kloroform mempunyai massa jenis 1,498 g/mL. Pada fraksinasi ketiga antara fraksi air dengan pelarut etil asetat perbandingan (1:1) terbentuk dua lapisan organik yaitu lapisan atas fraksi etil asetat (hijau kekuningan) dan lapisan bawah fraksi air (hijau pekat). Fraksi etil asetat berada diatas karena etil asetat mempunyai massa jenis 0,894 g/mL. Terbentuknya dua lapisan disebabkan adanya perbedaan konstanta dielektrikum dari etanol dengan air dan air dengan n-heksana, kloroform, dan etil asetat. Adapun konstanta dielektrikum etanol, air, n-heksana, kloroform, dan etil asetat secara berturut-turut adalah 30; 80; 2.0; 4.8; dan 6.0. Konstanta dielektrikum semakin besar maka sifat kepolaran dari suatu zat akan semakin tinggi. Perbedaan konstanta dielektrikum yang cukup jauh antara air dengan n-heksana, kloroform, dan etil asetat mengakibatkan kedua zat tersebut tidak saling bercampur. Senyawa non polar akan tertarik ke pelarut non polar

yaitu n-heksana dan kloroform. Untuk senyawa polar akan tertarik ke pelarut polar yaitu etil asetat dan n-butanol.

Fraksi n-heksana, kloroform, etil asetat, n-butanol, dan air yang diperoleh selanjutnya dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat. Fraksi pekat yang didapat di aliri gas N<sub>2</sub> untuk menghilangkan sisa-sisa pelarut yang mungkin masih ada dalam ekstrak sehingga ekstrak tersebut yang dihasilkan benar-benar murni dan bebas dari pelarutnya. Selanjutnya ekstrak dan masing-masing fraksi yang diperoleh dilakukan uji aktivitas antikanker dengan metode MTT (*Microtetrazolium*) (CCRC, 2009; Ilhamy, dkk, 2013).

#### **4.3 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT (*Microtetrazolium*) (CCRC, 2009; Ilhamy, dkk, 2013)**

Ekstrak dan masing-masing fraksi diuji aktivitas antikanker secara *in vitro* menggunakan kultur terhadap *cell line* T47D menggunakan metode MTT. Uji MTT merupakan uji yang sensitif, kuantitatif dan terpercaya. Metode MTT merupakan pengujian aktivitas sel berdasarkan perubahan warna atau reaksi kolorimetri pada *bioreduction* garam tetrazolium ke formazan (Goodwin, dkk., 1995). Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas penghambatan sel secara *in vitro* dengan menentukan nilai IC<sub>50</sub> dengan menghitung pembentukan kristal formazan yang berwarna ungu (Doyle dan Griffiths, 2000).

Uji dilakukan terhadap sel kanker payudara T47D. Sel T47D merupakan *continuous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. *Continuous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penangananya, memiliki kemampuan dalam replikasi yang tidak terbatas, homogenitasnya yang tinggi serta mudah diganti *frozen stock* jika terjadi kontaminasi. Sel T47D dapat mengekspresikan *calcitonin*, reseptor androgen, reseptor progesterone, *glucocorticoid*, *prolactin*, dan reseptor esterogen (AATC, 2015). Sel T47D adalah model sel kanker payudara yang belum resisten terhadap agen kemoterapi doxorubicin akan tetapi diketahui memiliki p53 yang telah termutasi (Junedi, *et al.*, 2010).

Sel T47D tersebut dikultur dalam media RPMI dan diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37 °C dengan aliran CO<sub>2</sub> 5 mL/menit (Nursid, dkk.

2010). Kultur sel adalah teknik yang biasa digunakan untuk mengembangkan sel diluar tubuh (*in vitro*) (Zarisman, 2006). Menurut Malole (1990), faktor yang mendukung pertumbuhan sel didalam kultur adalah media pertumbuhan dan kondisi lingkungan. Pertumbuhan sel memerlukan pH 7,4. Keseimbangan pH dapat diatur dengan penambahan NaHCO<sub>3</sub> sebagai *buffer*. Suhu dipertahankan 37 °C dengan konsentrasi CO<sub>2</sub> 5 % dan O<sub>2</sub> 95 %. Suhu harus dijaga karena suhu dapat dipengaruhi pH lingkungan.

Media RPMI adalah media yang baik untuk menumbuhkan sel kanker T47D untuk jangka pendek. Medium tersebut mengandung serum FBS 10 % (Gusmita, 2010). FBS merupakan suplemen peningkat pertumbuhan yang efektif untuk sel kanker karena kompleksitas dan banyaknya faktor pertumbuhan, perlindungan sel dan faktor nutrisi yang dikandungnya. Kandungan tersebut dapat dibagi dalam beberapa polipeptida spesifik yang menstimulasi pertumbuhan sel (*growth factor*), protein pengangkut, agen pelindung, faktor pelekat dan nutrisi. Medium RPMI juga mengandung streptomisin adalah antibiotik yang tidak bersifat toksik, memiliki spektrum antimikroba luas dan ekonomis (Zarisman, 2006). Komposisi media kultur lengkap RPMI yaitu *penisilin-streptomisin* 2 %, FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10 %, *Fungizone* 0,5 % dan media RPMI add 100 %.

Dalam tahap preparasi sel kultur kanker, prosedur awal yang dilakukan yaitu penumbuhan sel (*thawing*) dengan cara mengambil ampul (*cryo tube*) yang bersisi sel, kemudian dicairkan pada suhu kamar hingga tepat mencair. Suspense sel diambil dengan mikropipet, dimasukkan ke dalam *conical tube*, disentrifuse selama 5 menit, kemudian supernatan dibuang dan ditambah media kultur baru, sel diresuspensi kembali hingga homogen dan ditransfer ke dalam *cell culture dish*. Kondisi sel diamati dengan mikroskop diberi penandaan dan sel disimpan ke dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37 °C dengan komposisi udara 5 % CO<sub>2</sub>. Kondisi sel diamati keesokan harinya.

Setelah 24 jam, kondisi sel diamati kembali dengan mikroskop, bila media kultur telah berwarna agak kuning atau media kultur menjadi keruh maka segera dilakukan pergantian media dengan cara menghisap media lama dengan mikropipet kemudian PBS dituang untuk mencuci sel, PBS dibuang dengan mikropipet. Media kultur dituang ke dalam *flask*, lalu dihomogenkan. Kondisi dan

jumlah sel diamati secara kualitatif pada mikroskop *inverted*, diinkubasi semalam dan keadaan sel diamati keesokan harinya.

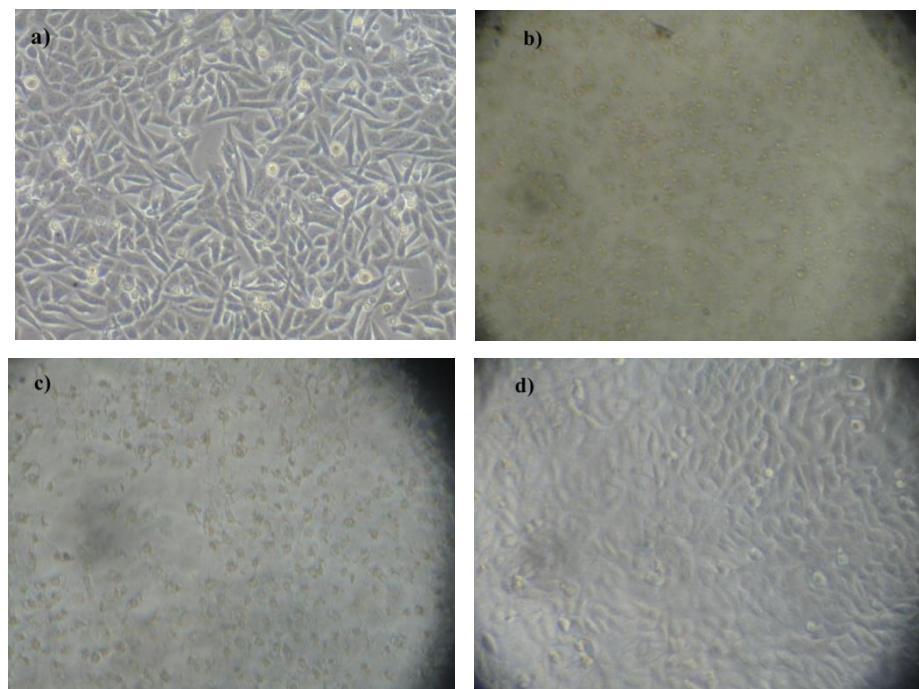
Sel diambil dari inkubator CO<sub>2</sub>, kondisi sel diamati. Panen sel dilakukan setelah sel 80 % konfluen. Media dibuang dengan menggunakan mikropipet. Sel dicuci sebanyak dua kali dengan PBS. Tripsin-EDTA ditambahkan ke dalam *flask* secara merata dan diinkubasi di dalam inkubator selama 3 menit. Proses penambahan tripsin-EDTA ini dilakukan agar sel lepas dari *flask*. Setelah sel lepas, tambahkan media untuk menginaktifkan tripsin. Sel diresuspensi dengan mikropipet sampai sel terlepas satu-satu (tidak menggerombol). Keadaan sel diamati di mikroskop, diresuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol. Sel yang telah lepas satu-satu ditransfer ke dalam *conical* steril baru kemudian ditambahkan media kultur, diresuspensi. Panenan sel diambil 10  $\mu$ L dan dipipetkan ke *hemacytometer*. Sel dihitung dibawah mikroskop (*inverted* atau mikroskop cahaya) dengan *counter*. Dihitung sel pada 4 kamar *hemacytometer*, sebelum diletakkan pada *hemacytometer* diberi tripan biru agar terlihat sel yang mati dan hidup. Sel yang berwarna biru merupakan sel yang mati dan sel yang berada di batas luar di sebelah atas dan di sebelah kanan tidak dihitung. Sel dibatas kiri dan batas bawah ikut dihitung.

Pada penelitian ini jumlah sel kanker hidup dalam suspensi yang digunakan dalam kultur adalah  $104,5 \times 10^4$  sel/mL. Jumlah sel tersebut merupakan hasil perhitungan menggunakan *hemacytometer*. Jumlah sel tersebut diharapkan sel kanker dapat bertahan hidup melewati siklus hidupnya dengan baik dalam waktu inkubasi 24 – 48 jam. Penentuan waktu inkubasi 24 – 48 jam adalah untuk mencegah berkurangnya ketersediaan nutrisi yang dikonsumsi oleh sel. Medium RPMI akan berfungsi maksimal dalam mengkultur sel kanker T47D selama dua hari (Zarisman, 2006).

Pada uji sitotoksik tunggal, sel sejumlah  $10^4$  sel/sumuran ditanam *96-well plate*. Untuk preparasi sampel yaitu sebanyak 1 mg ekstrak dan masing-masing fraksi dilarutkan dalam 100  $\mu$ L *Dimetil Sulfoksida* (DMSO) dan divortex. Selanjutnya ditambahkan medium RPMI sampai volume 1000  $\mu$ L. DMSO berfungsi sebagai *buffer* agar ekstrak dapat larut dengan baik. DMSO dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar dan tidak memiliki efek samping

terhadap sel normal (Muir, 2007 dalam Nala, 2013). Larutan tersebut digunakan sebagai larutan stok. Selanjutnya ekstrak dan masing-masing fraksi dibuat seri konsentrasi yaitu dengan konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; dan 31,25  $\mu\text{g/mL}$  dan diulang sebanyak 3 x (triplo). Hal ini bertujuan untuk mengetahui signifikan peningkatan dosis konsumsi dengan efek peningkatan proliferasi sel yang dihasilkan. Ditambahkan juga kontrol sel dan kontrol media.

Setelah 24 jam, diamati sel untuk mengetahui sel sudah siap untuk di *treatment* menggunakan larutan uji yaitu ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi kloroform, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air, kemudian di inkubasi selama 24 jam. Setelah pemberian larutan uji, sel diamati menggunakan mikroskop *inverted*.

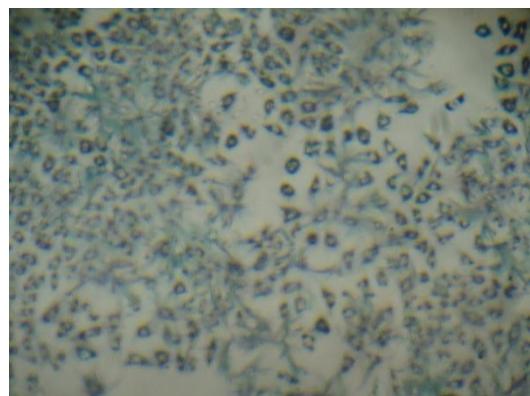


Gambar 4.1 Sel T47D ; a) kontrol sel T47D, b) perlakuan sampel fraksi etil asetat daun benalu konsentrasi  $1000 \mu\text{g/mL}$ , c) perlakuan sampel fraksi etil asetat daun benalu konsentrasi  $125 \mu\text{g/mL}$ , d) perlakuan sampel fraksi etil asetat daun benalu konsentrasi  $31,25 \mu\text{g/mL}$

Dari gambar diatas ditunjukkan ada perbedaan dari kontrol sel dengan kontrol sampel dari konsentrasi  $1000 \mu\text{g/mL}$ ,  $125 \mu\text{g/mL}$  dan  $31,25 \mu\text{g/mL}$ . Sel

hidup berbentuk memanjang seperti daun sedangkan yang mati berbentuk bulat (Nala, 2013). Pada kontrol sel, sel kanker banyak yang hidup dapat dilihat dari banyaknya sel yang bentuknya memanjang seperti daun. Sedangkan pada kontrol sel konsentrasi 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  banyak yang mati dari bentuk sel yang bulat. Untuk kontrol sel 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dan 31,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sel kanker ada yang mati ada yang hidup dapat dilihat dari bentuk sel dan jumlah sel yang mati dan hidup.

Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang, dicuci dengan PBS. Kemudian MTT ditambahkan ke dalam masing-masing sumuran *96-well plate*. Inkubasi kembali selama 4 jam. Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Pada sel yang hidup di dalam mitokondria sel, MTT akan bereaksi dengan hidrogen yang berasal dari enzim dehidrogenase yang dapat mengakibatkan pecahnya cincin suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air.



Gambar 4.2 Kontrol sel T47D setelah ditambahkan MTT

Setelah 4 jam reaksi MTT dengan enzim *mitokondria reduktase* yang terdapat pada sel dihentikan dengan penambahan *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS). Larutan SDS sebagai *reagen stopper* akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader* (CCRC, 2009). SDS berfungsi sebagai detergen yang dapat melisiskan membran sel dan mendenaturasi protein (Maulana, dkk, 2010). Intensitas warna ungu tersebut ditetapkan nilai absorbansinya menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Penggunaan panjang gelombang 595 nm karena warna yang tampak pada larutan adalah ungu kebiruan yang akan menyerap warna kuning dari spektrum sinar tampak (Effendy, 2007). Intensitas warna ungu yang terbentuk sebanding dengan jumlah sel hidup. Semakin banyak *cell line* yang mati maka semakin kecil absorbansi dan semakin berkurang warna ungu yang terbentuk. Maka semakin rendah absorbansi maka semakin toksik zat tersebut terhadap *cell line* kanker payudara T47D.

Nilai absorbansi yang diperoleh untuk perlakuan dengan konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 62,5, dan 31,25  $\mu\text{g/mL}$  pada ekstrak etanol 96 % direntang 0,137 – 0,907, fraksi n-heksana 0,146 – 0,897, fraksi kloroform 0,262 – 0,823, fraksi etil asetat 0,152 – 1,041, fraksi air 0,704 – 0,980 sedangkan untuk kontrol sel diketahui sebesar 0,945 dan kontrol media 0,094. Perhitungan prosentase sel hidup tiap sampel ditunjukkan pada Lampiran dan dianalisis menggunakan SPSS probit untuk mengetahui nilai  $IC_{50}$  masing-masing sampel. Adapun hasil  $IC_{50}$  tiap sampel ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Data nilai  $IC_{50}$  uji aktivitas antikanker ekstrak dan fraksi benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*)

Sampel	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Ekstrak etanol 96 %	362,8
Fraksi n-Heksana	926
Fraksi kloroform	356,8
Fraksi Etil Asetat	314,8
Fraksi Air	2243

Harga  $IC_{50}$  yang diperoleh mencerminkan sitotoksitas bahan terhadap sel uji. Hasil penelitian menunjukkan bahwa larutan uji mempunyai aktivitas sitotoksik dengan metode MTT karena hasil  $IC_{50}$  nya masuk dalam rentang konsentrasi yang digunakan. Namun, jika hasil  $IC_{50}$  yang didapat didasarkan pada kriteria yang ditetapkan oleh NCI (*National Cancer Institut*) (NCI, 2001 dalam Rahmawati, 2013) bahwa suatu ekstrak dinyatakan aktif memiliki aktivitas antikanker apabila memiliki nilai  $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ , moderate aktif apabila memiliki nilai  $IC_{50} \geq 30 \mu\text{g/mL}$  dan  $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ , dan dikatakan tidak aktif apabila nilai  $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ . Berdasarkan hasil di atas menunjukkan bahwa fraksi etil asetat daun benalu nangka mempunyai nilai  $IC_{50}$  lebih kecil

dibandingkan larutan uji lainnya. Nilai IC<sub>50</sub> dari ekstrak etanol dan masing-masing fraksi daun benalu nangka yang didapat pada penelitian ini jauh lebih besar dibandingkan pada penelitian Artanti, dkk (2003). Fraksi heksana daun benalu duku (*Macrosolen cochinchinensis* (Lour.) van Tiegh) memiliki IC<sub>50</sub> sebesar 12 µg/mL. Pada penelitian Hidayati (2011), hasil uji sitotoksitas fraksi etil asetat ekstrak etanol Herba Alfalfa (*Medicago sativa* L.) terhadap sel T47D dengan konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5 µg/mL diperoleh data probit dari presentase kehidupan hasil IC<sub>50</sub> sebesar 1893,4 µg/mL. Pada penelitian Ilhamy (2013), dari hasil uji MTT diketahui bahwa fraksi etil asetat akar asam kandis memiliki nilai IC<sub>50</sub> 0,52 µg/mL sedangkan fraksi air akar asam kandis juga memiliki nilai IC<sub>50</sub> 81,14 µg/mL. Hasil yang didapat berbeda-beda dikarenakan perbedaan pada jenis tumbuhan dan pelarut yang berbeda sehingga menghasilkan nilai IC<sub>50</sub> yang berbeda-beda.

Dari hasil uji aktivitas antikanker yang mempunyai potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D dilihat dari nilai IC<sub>50</sub> yang paling kecil sehingga diambil fraksi etil asetat daun benalu nangka dengan nilai IC<sub>50</sub> 314,8 µg/mL. Selanjutnya fraksi etil asetat daun benalu nangka dilakukan uji *double staining* menggunakan *acridine orange* dan uji *flowcytometry*.

#### **4.4 Uji Double Staining menggunakan Acridine Orange**

Apoptosis adalah kematian sel terprogram yang menghasilkan perubahan karakteristik morfologi dan biokimia sel. Apoptosis dirangsang oleh kerusakan DNA, adanya TNF (*Tumor Necrosis Factor*) atau tidak adanya faktor pertumbuhan. Peristiwa apoptosis ditandai dengan adanya membrane *blebbing* tanpa hilangnya integritas membrane, kondensasi dan fragmentasi kromatin, pemanjangan organela sitoplasma, dilatasi dari reticulum endoplasma, penurunan volume sel dan pembentukan badan apoptosis (Subowo, 2011).

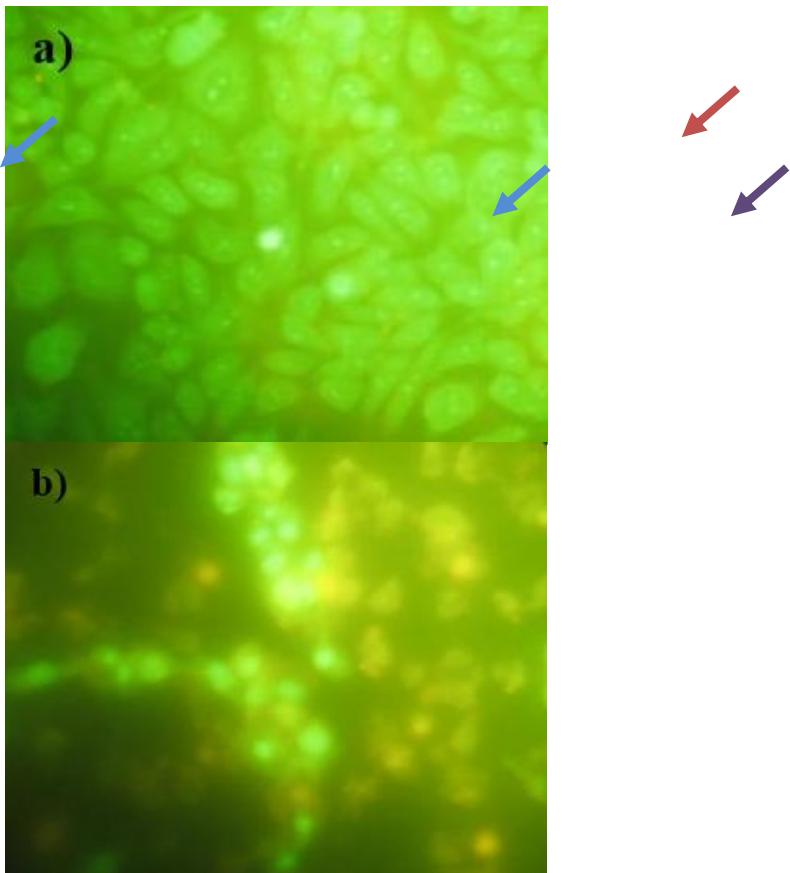
Peristiwa apoptosis dapat dideteksi dengan pengecatan *acridine orange-ethidium bromide*. Metode ini didasarkan pada perbedaan profil fluoresensi DNA pada sel mati dan sel hidup yang berikatan dengan *acridine orange* atau *ethidium bromide*. *Acridine orange* dapat menembus masuk dalam sel yang hidup atau yang mati. *Acridine orange* bila berikatan dengan DNA untai ganda menghasilkan

fluoresensi hijau, dan menghasilkan warna merah bila berikatan dengan DNA untai tunggal. Sel yang masih hidup berwarna hijau merata, sedangkan sel yang mengalami apoptosis memiliki warna oranye terfragmentasi yang menandakan bahwa sel mengalami fase *late apoptosis* atau berwarna hijau seperti sel hidup namun terdapat warna kekuningan di bagian tengah sel yang berarti terdapat kondensasi kromatin yang menandakan sel mengalami fase *early apoptosis*. Sel yang berwarna merah merata adalah sel yang mengalami nekrosis (Immanuel, 2015).

Terjadinya kematian sel akibat perlakuan fraksi etil asetat daun benalu Mangga (*Macrosolen cochinchinensis*) melalui induksi apoptosis sel T47D didukung oleh penelitian menggunakan sel T47D dengan *Acridine Orange-Ethidium Bromide* (AO/EB). Antiproliferasi fraksi etil asetat daun benalu Mangga (*Macrosolen cochinchinensis*) terhadap sel T47D diduga dengan cara menginduksi apoptosis. Hal ini sesuai dengan evaluasi pewarnaan sel T47D menggunakan AO-EB. *Acridine orange-ethidium bromide* digunakan untuk menggambarkan sel dengan perubahan organisasi kromatin. *Acridine orange* digunakan untuk menunjukkan jumlah sel yang akan mengalami apoptosis tetapi AO tidak bisa membedakan sel hidup dan tidak hidup. Untuk mendapatkan gambaran yang jelas bahwa sel akan mengalami apoptosis tetapi masih hidup dan sel mengalami kematian karena telah terjadi apoptosis, maka digunakan ethidium bromida yang dapat berinterkalasi dengan DNA maupun RNA dan memberikan warna merah (Nafisi *et al.*, 2002; Olmsted and Kearns, 1997).

Kombinasi AO-EB dapat digunakan baik sel hidup maupun sel mati yang mengalami apoptosis. Fluoresensi akan berwarna hijau ketika berikatan dengan DNA *double stranded* pada sel hidup dan fluoresensi akan berwarna merah ketika berikatan dengan *single stranded* DNA yang didominasi pada sel mati. Sel yang mengalami apoptosis awal akan mengalami fragmentasi DNA yang memberikan warna hijau pada *nucleus*. Sedangkan pada proses apoptosis akhir, DNA mengalami fragmentasi dan akan berwarna merah (Ho *et al.*, 2009).

Hasil uji *double staining* dari fraksi etil asetat daun benalu Mangga dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Hasil uji *double staining* fraksi etil asetat daun benalu Nangka menggunakan *acridine orange*. a) Kontrol sel, b) perlakuan dengan fraksi etil asetat 314,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

■ hidup      ■ Early apoptosis      ■ late apoptosis

Berdasarkan hasil fluoresensi warna diatas, secara kualitatif dapat dilihat bahwa terjadi perbedaan warna antara variabel kontrol dan perlakuan yang menandakan telah terjadinya apoptosis. Perlakuan fraksi etil asetat daun benalu Mangga (*Macrosolen cochinchinensis*) dapat menginduksi apoptosis, ditandai dengan perubahan bentuk, kondensasi kromatin dan degradasi DNA yang dengan pengecutan *acridine orange/ethidium bromide* menunjukkan warna hijau terang pada sel kanker T47D yang mengalami apoptosis awal dan warna orange pada sel yang mengalami apoptosis akhir. *Acridine orange* adalah pewarna sel yang berperan dalam pewarnaan sel yang masih hidup. Pada perlakuan fraksi etil asetat daun benalu Nangka mengalami *early apoptosis*, *late apoptosis*, dan apoptosis. Kondisi *early apoptosis* terdeteksi warna *orange* dengan morfologi sel berwarna *orange* masih utuh. Kondisi apoptosis terdeteksi warna *orange* dengan morfologi selnya berwarna *orange* pudar. Perubahan morfologi pada sel yang mengalami

apoptosis ditandai dengan terjadinya kondensasi dan fragmentasi kromatin, fragmentasi DNA, menyusutnya volume sel, karioreksis, dan pembentukan badan-badan apoptosis (Kerr *et al.*, 1970).

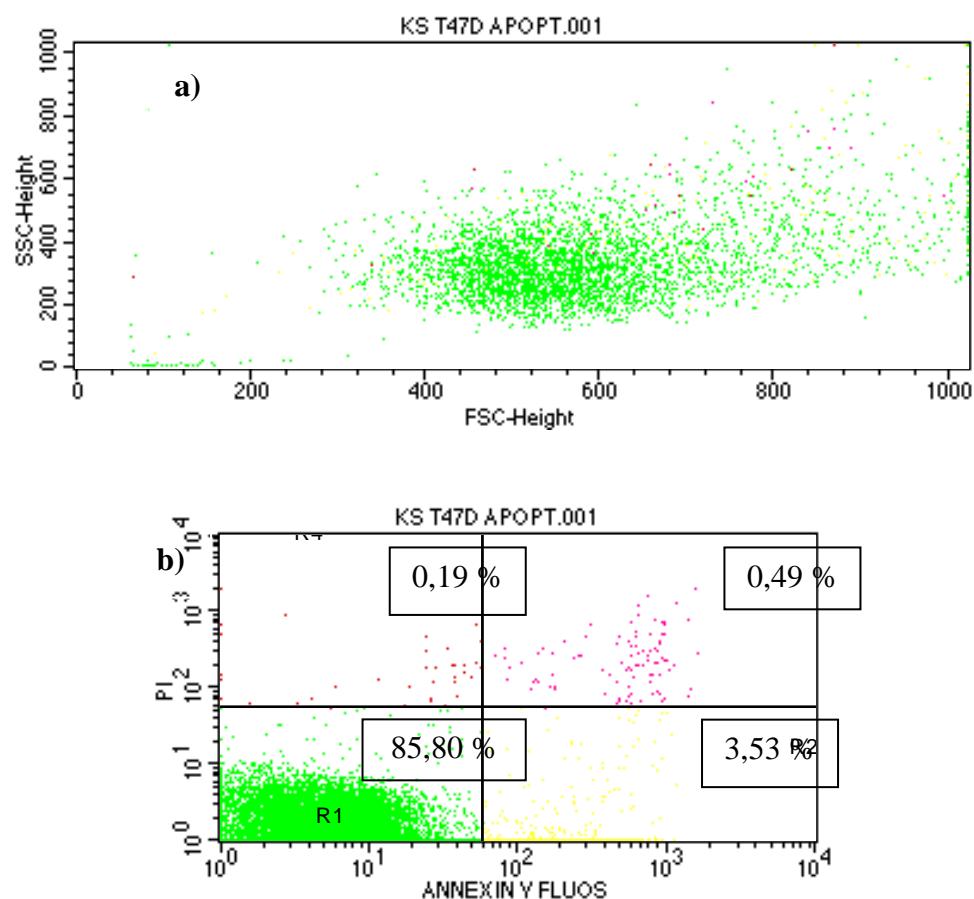
Sel yang mengalami apoptosis menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel

(Wang *et al.*, 2005; Hirsch *et al.*, 1997). Perubahan permeabilitas sel menyebabkan AO EB dapat masuk dan berinterkalasi dengan DNA yang ditandai dengan adanya warna *orange* pada sel (Attari *et al.*, 2009). Sedangkan sel yang berwarna hijau terang menunjukkan sel mengalami apoptosis awal, yaitu terjadi kondensasi kromatin yang menyebabkan kromatin menyerap lebih banyak warna dibandingkan kontrol, sehingga sel berwarna hijau terang, namun demikian sel masih hidup, sehingga hanya AO yang dapat mewarnai sel hidup (Zhang *et al.*, 1998; Jeune *et al.*, 2005). Konsentrasi yang digunakan dalam uji ini adalah sesuai dengan nilai IC<sub>50</sub> yang didapat pada uji antikanker menggunakan metode MTT yaitu sebesar 314,8 µg/mL untuk fraksi etil asetat daun benalu Nangka.

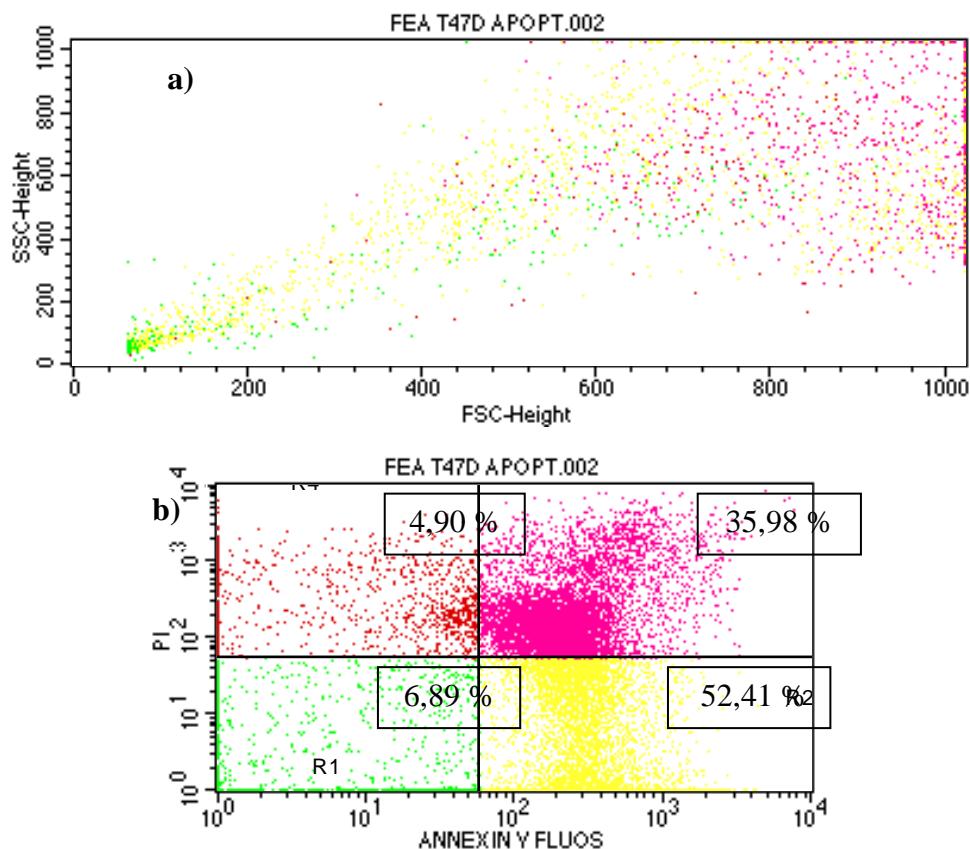
## 4.5 Uji *Flowcytometry*

### 4.5.1 Apoptosis

MTT *assay* dilakukan untuk mengetahui kemampuan fraksi etil asetat daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) dalam menghambat pertumbuhan sel T47D. Fraksi etil asetat daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) memiliki kemampuan sitotoksik terhadap sel T47D sebesar 314,8 µg/mL. Nilai IC<sub>50</sub> dari MTT *assay* menunjukkan bahwa fraksi etil asetat daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) mampu menghambat pertumbuhan sel sebanyak 50 % pada konsentrasi 314,8 µg/mL. Pengamatan induksi apoptosis dilakukan untuk mengetahui penyebab kematian sel baik apoptosis maupun nekrosis. Metode *flowcytometry* mampu membedakan sel hidup, apoptosis awal, apoptosis akhir dan nekrosis, karena reagen Annexin V dan PI bekerja secara selektif mengikat sel yang utuh maupun tidak utuh (fragmentasi). Hasil uji induksi apoptosis dengan *flow cytometry* diperoleh hasil pada Gambar 4.4 dan 4.5.



Gambar 4.4. Hasil *flowcytometry* kontrol sel T47D, a) Hasil persebaran kontrol sel T47D, b) Hasil analisis dengan *cell quest* kontrol sel T47D. Keterangan : (R1) sel hidup, (R2) apoptosis awal, (R3) apoptosis akhir, dan (R4) nekrosis.



Gambar 4.4. Hasil *flowcytometry* perlakuan fraksi etil asetat daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) terhadap sel T47D, a) Hasil persebaran perlakuan fraksi etil asetat daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) terhadap sel T47D, b) Hasil analisis dengan *cell quest* perlakuan fraksi etil asetat daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) terhadap sel T47D. Keterangan : (R1) sel hidup, (R2) apoptosis awal, (R3) apoptosis akhir, dan (R4) nekrosis.

Data persebaran sel (Gambar 4.4 a) dan Gambar 4.5 a)) menghubungkan diameter sel pada sumbu X atau bagian FSC (*forward-angle light scatter*) dan konformasi struktur sel pada sumbu Y atau bagian SSC (*side-single light scatter*). Persebaran sel apoptosis pada FSC akan menurun dan pada SSC akan menaik, sedangkan persebaran sel nekrosis pada FSC akan menaik dan SSC akan menurun (Azizah, 2015).

Dari data persebaran sel tersebut agar memudahkan analisis, maka warna-warna yang terbentuk dipisahkan dengan metode *cell quest* (Gambar 4.4 b) dan Gambar 4.5 b)). Data diperoleh 4 macam warna, yakni hijau menunjukkan sel hidup, kuning menunjukkan *early apoptosis*, merah muda menunjukkan *late apoptosis*, dan merah menunjukkan nekrosis. Warna tersebut bisa terbentuk

disebabkan oleh sel yang memancarkan epi-fluoresensi oleh ikatan Annexin V atau PI lalu ditangkap oleh sinar UV (Azizah, 2015). Panjang gelombang warna hijau pada 488 nm – 525 nm, absorbansi maksimal berada pada 490 nm. Pada apoptosis awal akan berfluoresensi kuning dengan intensitas yang lemah pada panjang gelombang 536 nm – 617 nm. Sel yang mengalami nekrosis atau apoptosis akhir akan berfluoresensi merah pada panjang gelombang 650 nm – 700 nm (Rahman, 2014).

Tabel 4.2 Hasil presentase induksi apoptosis perlakuan fraksi etil asetat daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) terhadap sel T47D

Perlakuan	Presentase Populasi Sel T47D (%)			
	Sel Hidup	Early Apoptosis	Late Apoptosis	Nekrosis
Kontrol sel T47D	95,80	3,53	0,49	0,19
Fraksi etil asetat daun benalu Nangka IC <sub>50</sub>	6,89	52,41	35,98	4,90

Hasil pengamatan apoptosis menggunakan *flowcytometry* menunjukkan bahwa perlakuan fraksi etil asetat daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) pada konsentrasi IC<sub>50</sub> sebesar 314,8 µg/mL dengan inkubasi 24 jam menyebabkan 52,41 % sel T47D mengalami *early apoptosis*, 35,98 % sel T47D mengalami *late apoptosis*, dan 4,90 % sel T47D mengalami nekrosis. Jumlah ini dibandingkan dengan kontrol sel T47D tanpa perlakuan sampel mengalami 3,53 % *early apoptosis*, 0,49 % sel T47D mengalami *late apoptosis*, 0,19 % sel T47D mengalami nekrosis, dan sisanya sebanyak 95,80 % sel T47D masih hidup.

Pada apoptosis awal, sel T47D mengalami ekspresi fosfatidilserin dalam membran sel yang menyebabkan fosfatidilserin keluar dari membran sel sehingga menyebabkan reagen Annexin V mampu mengidentifikasi adanya peristiwa tersebut. Apoptosis akhir ditandai dengan fragmentasi DNA yang menyebabkan Annexin V dan PI mampu mengidentifikasi peristiwa tersebut (Azizah, 2015).

Apoptosis menginduksi berbagai perubahan dalam membran plasma termasuk perubahan permeabilitas dan lipid membran. Selama apoptosis terjadi perubahan utama pada lipid membran di mana *phospatidilserine* (PS) berpindah

posisi dari membrane internal ke eksternal. *Phosphatidylserine* (PS) berikatan dengan Annexin V dan perubahan ini dapat diamati dengan inkubasi sel dengan Annexin V. Annexin V adalah protein yang memiliki afinitas tinggi terhadap fosfolipid yang bermuatan negatif dengan adanya ion  $Ca^{2+}$ . Sel dinkubasi dengan Annexin V yang telah dikonjugasi dengan fluorokrom yang sesuai, biasanya dengan penambahan *Propidium Iodide* (PI) untuk membedakan sel-sel yang telah kehilangan integritasnya pada membran plasma (Ormerod, 2000).

Pada sel hidup yang normal, *phosphatidylserine* (PS) terletak pada permukaan sitoplasmik pada sel membran. Selama induksi apoptosis, perubahan yang cepat terjadi pada fosfolipid dalam sel yang menyebabkan pembongkaran PS pada permukaan sel. Deteksi *in vitro* dari PS eksternal dapat diperoleh dari interaksi dengan antikoagulan Annexin V. Dengan kehadiran kalsium, kemampuan ikatan antara annexin V dengan PS terjadi sangat cepat. Translokasi PS pada permukaan sel mendahului pembongkaran nuklear, fragmentasi DNA dan kemunculan apoptosis menjadikan ikatan Annexin V sebagai penanda apoptosis tahap awal (Wikanta, 2012).

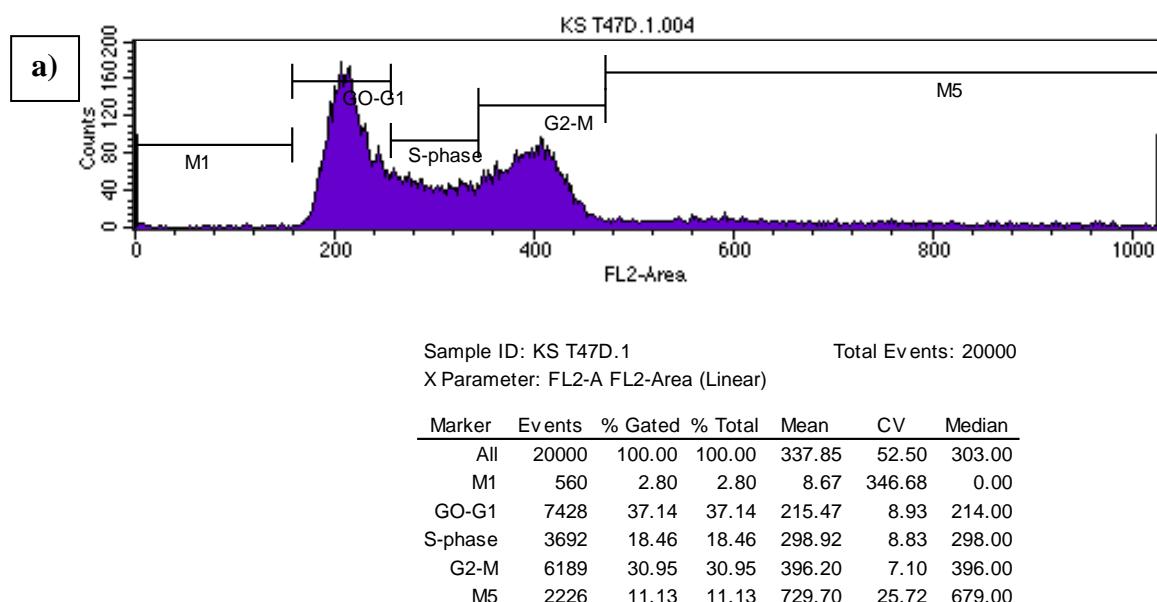
Efek sitotoksik selain disebabkan oleh pemacuan apoptosis juga disebabkan oleh pemacuan penghambatan daur sel (*cell cycle arrest*). Oleh karena itu untuk penelitian selanjutnya, uji mekanisme kerja hambatan siklus sel yang diinduksi fraksi etil asetat daun benalu Nangka terhadap sel T47D sebagai wujud nyata dari perubahan fisiologis atau morfologis.

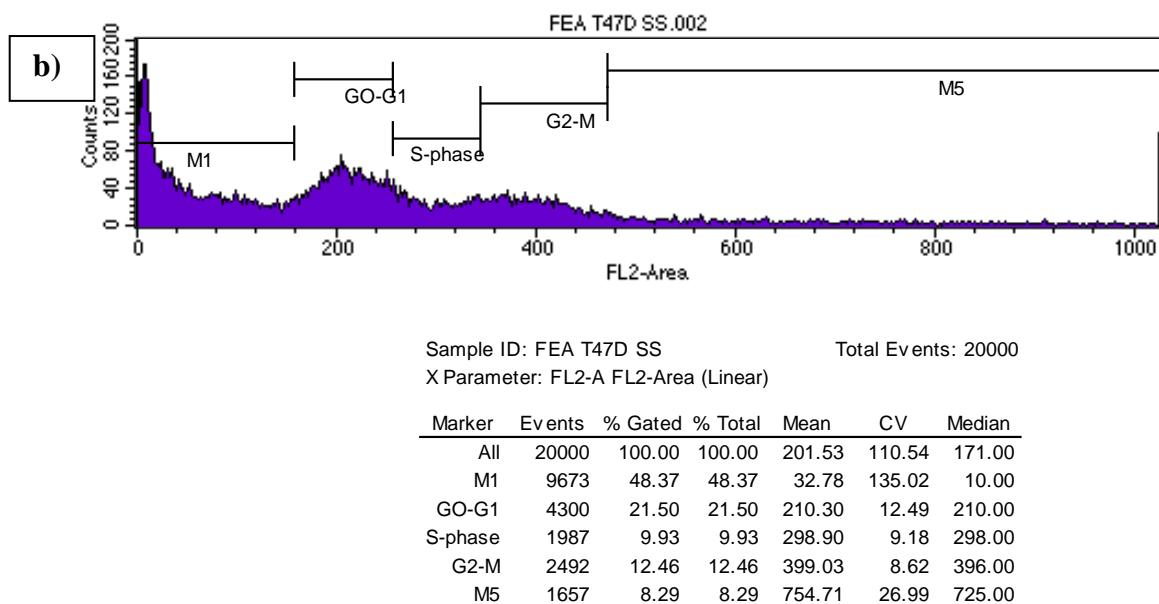
#### 4.5.2 Siklus Sel

Akumulasi sel pada siklus sel merupakan salah satu target utama agen antikanker. Pada penelitian ini pengamatan siklus sel dilakukan dengan metode *flowcytometry*. Dengan metode ini, dapat dilihat distribusi sel pada masing-masing fase dalam siklus sel setelah perlakuan (Ningrum, 2011), sehingga dapat diperkirakan jalur penghambatan fraksi etil asetat daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) dalam menghambat siklus sel. Fase-fase dalam siklus sel normal memiliki perbedaan pada jumlah set kromosom yaitu fase G1 jumlah set kromosomnya adalah 2n. Berlanjut pada fase S, jumlah set kromosomnya antara 2n dan 4n karena terjadi proses replikasi, sedangkan pada

fase G2 dan M, replikasi telah sempurna membentuk set kromosom 4n. Begitu juga yang terjadi pada sel T47D, dimana pada fase G1 memiliki 2 set kromosom (2n), pada fase G2 antara 2n-4n, dan pada fase G2/M adalah 4n (Collins *et al.*, 1997).

Hasil penelitian menggunakan *flowcytometry* hambatan siklus sel T47D yang diinduksi oleh fraksi etil asetat daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) menggunakan konsentrasi IC<sub>50</sub> dari hasil uji MTT sebelumnya didapat sebesar 314,8 µg/mL ditunjukkan pada Gambar 4.6 b) menunjukkan bahwa hambatan siklus sel T47D mulai terjadi pada sel yang diinduksi fraksi etil asetat daun benalu Nangka 314,8 µg/mL pada siklus G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> dan fase S, selain itu juga mengalami apoptosis pada fase M<sub>1</sub>. Hal ini dibandingkan dengan kontrol sel T47D yang ditunjukkan pada gambar 4.6 a) menunjukkan siklus sel T47D mulai terjadi pada siklus fase S dan fase G<sub>2</sub>-M, dan juga mengalami apoptosis pada fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>.





Gambar 4.6 Hasil analisis *flowcytometry* mekanisme siklus sel, a) mekanisme hambatan siklus sel T47D, b) mekanisme hambatan siklus sel T47D yang diinduksi oleh fraksi etil asetat daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*)  $IC_{50}$  314,8  $\mu$ g/mL.

Tabel 4.3 Hasil presentase mekanisme siklus sel T47D diinduksi fraksi etil asetat daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) terhadap sel T47D

Perlakuan	Presentase Fase Sel (%)				
	M <sub>1</sub>	G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> -M	M <sub>5</sub>
Kontrol sel T47D	2,80	37,14	18,46	30,95	11,13
Fraksi etil asetat daun benalu Nangka $IC_{50}$ 314,8 $\mu$ g/mL	48,37	21,50	9,93	12,46	8,29

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa analisis molekuler dilakukan terhadap protein-protein yang terlibat pada fase G2-M yaitu Cdc-2 dan p21 dan protein penanda aktivasi Capase-3 (cleavage Caspase-3) dan penanda apoptosis (cleavage PARP). Cdc-2 merupakan kinase yang meregulasi siklus sel pada fase G2-M. Kinase Wee1 dan Myt1 dapat menginaktivkan Cdc-2 melalui proses fosforilasi, keduanya merupakan substrat Caspase. Aktivasi Caspase dapat memacu terjadinya aktivasi Cdc-2 dan memacu sel memasuki fase mitosis (Nugraheni, 2013). Hal ini berarti fraksi etil asetat daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) diduga dapat memacu aktivasi caspase sehingga dapat memacu aktivasi Cdc-2 yang menyebabkan sel tidak dapat memasuki fase mitosis dan diikuti dengan hiperploidi pada sel T47D.

Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan aktivasi Cdc-2 dapat memacu terjadinya apoptosis. Penelitian lain menunjukkan bahwa aktivasi Cdc-2 merupakan terminal efektor proses apoptosis. Hal ini menunjukkan bahwa aktivasi Cdc-2 dapat berperan sebagai penyebab maupun sebagai konsekuensi proses apoptosis. Namun adanya populasi yang lebih tinggi dibandingkan control pada fase sub G1 (M1) dapat pula disebabkan oleh mekanisme kematian lain tanpa melalui aktivasi Caspase melalui pelepasan sitokrom C. Beberapa peneliti menunjukkan terjadinya kematian sel ditandai dengan hiperploid dan aktivasi Cdc-2 dikenal sebagai mekanisme kematian mitotic catastrophe, sebagai akibat kelainan mitosis. (Nugraheni, 2013).

#### **4.6 Pemanfaatan Daun Benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) dalam Perspektif Agama Islam**

Penelitian ini mengkaji mengenai pemanfaatan daun benalu Nangka sebagai agen antikanker. Allah SWT menumbuhkan tumbuh-tumbuhan yang indah, hijau dan banyak memberi manfaat serta kenikmatan kepada manusia. Di dalam Al-Qur'an terdapat banyak ayat yang menjelaskan tentang tanaman, dimana pada intinya tanaman memiliki manfaat yang bermacam-macam dan tidak ada yang sia-sia. Sebagaimana firman Allah SWT dalam al An'aam ayat 141 yang berbunyi :

\* وَهُوَ الَّذِي أَنْشَأَ جَنَّتٍ مَّعْرُوشَتٍ وَغَيْرَ مَعْرُوشَتٍ وَالنَّخْلَ وَالرَّزْعَ مُخْتَلِفًا  
أُكُلُهُ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُتَشَبِّهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِّهٍ كُلُّوْ مِنْ ثَمَرَهِ إِذَا أَتَمَرَ  
وَأَتُوا حَقَّهُ رِيَوْمَ حَصَادِهِ وَلَا تُسْرِفُوا إِنَّهُ لَا تُحِبُّ الْمُسْرِفِينَ ﴿١٤١﴾

Artinya : "dan Dialah yang menjadikan kebun-kebun yang berjunjung dan yang tidak berjunjung, pohon korma, tanam-tanaman yang bermacam-macam buahnya, zaitun dan delima yang serupa (bentuk dan warnanya) dan tidak sama (rasanya). makanlah dari buahnya (yang bermacam-macam itu) bila Dia berbuah, dan tunaikanlah haknya di hari memetik hasilnya (dengan disedekahkan kepada fakir miskin); dan janganlah kamu berlebih-lebihan. Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang yang berlebih-lebihan."

Menurut tafsir Imam Syafi'i bahwa firman Allah dalam surat al An'aam ayat 141 menjelaskan bahwa Allah menumbuhkan berbagai macam tanaman yang memiliki bentuk, warna, dan rasa yang sama/berbeda meskipun tumbuh di tanah yang sama. Melalui tanaman tersebut Allah menunjukkan kekuasaan, kekuatan dan kasih sayang yang tidak terbatas kepada manusia dengan memperbolehkan hamba (manusia) untuk menikmati hasilnya dengan tidak melupakan saudaranya (kaum kafir miskin) (al-Faran, 2007). Hal ini yang dimaksud adalah keanekaragaman tumbuhan terdapat manfaat dari masing-masing tumbuhan tersebut.

Pemanfaatan daun benalu Nangka sebagai obat merupakan ikhtiar untuk memperoleh kesembuhan dari Allah yang Maha Penyembuh, karena merupakan kewajiban kita untuk berikhtiar mengobati penyakit. Sungguh tidak ada yang dapat memberikan kesembuhan kecuali Allah SWT semata. Allah berfirman dalam surat asy Syu'araa' ayat 80 :

وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِيْنِ

*Artinya : "dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan Aku,"*

Menurut al Maraghi (1992), firman Allah dalam surat asy Syu'araa' ayat 80 tersebut menunjukkan bahwa sesungguhnya sakit yang diberikan oleh Allah SWT merupakan nikmat yang wajib disyukuri. Segala penyakit yang diberikan oleh Allah, tentunya sudah tersedia obat yang juga diberikan oleh-Nya. Melalui ayat ini Allah menganjurkan umat-Nya untuk tetap berusaha jika terkena suatu penyakit. Salah satu usaha yaitu mencari obat. Salah satunya obat dari alam. Tanaman merupakan salah satu makhluk Allah yang dapat dimanfaatkan oleh manusia jika manusia itu berfikir.

Allah sering kali menyeru kepada manusia untuk mempelajari alam dan menyaksikan "ayat-ayat" yang ada padanya. Semua makhluk hidup dan tak hidup di jagad raya ini dipenuhi "ayat" yang menunjukkan bahwa alam semesta beserta isinya telah diciptakan. Disamping itu, alam ini adalah pencerminan dari Kemahakuasaan, Ilmu dan Kreasi pencipta-Nya. Wajib bagi manusia untuk memahami ayat-ayat ini melalui akalnya, sehingga ia pun pada akhirnya menjadi

hamba Allah yang tunduk dan patuh dihadapan Allah SWT. Sebagaimana Allah berfirman dalam surat Ali 'Imran ayat 190 – 191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَآخْتِلَافِ الْلَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولَئِكَ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيمًا وَقُعُودًا وَعَلَى جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطِلاً 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 keadaan 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."

Al-Maraghi (1992) memberikan penjelasan bagian Q.S Ali Imran ayat 191 bahwa tidak ada segala sesuatu yang Allah ciptakan yang tidak berarti dan sia-sia, bahkan semua ciptaanNya adalah hak, yang mengandung hikmah-himah yang agung dan maslahat-maslahat yang besar. Seorang mukmin yang mau menggunakan akal pikirannya selalu mengharapkan kepada Allah dengan puji, doa dan *ibтиhal*, sesudah ia melihat bukti-bukti yang menunjukkan kepada keindahan hikmah. Ia pun luas pengetahuannya tentang detail-detail alam semesta yang menghubungkan antara manusia dengan Tuhannya. Konsekuensi logis dari penggunaan akal untuk tujuan mencari hikmah-hikmah tersebut adalah dengan menuntut ilmu. Ulul Albab adalah orang-orang yang memiliki akal untuk merenungkan fenomena alam raya hingga pada bukti yang nyata tentang keesaan Allah. Semua yang ada di alam tidaklah terjadi dengan sendirinya, melainkan ada yang menciptakan yakni Allah SWT. Melalui kegiatan berfikir, merenungkan dan menganalisis ciptaan-ciptaan Allah maka akan timbul rasa tawakkal, berserah diri dan mengakui kelemahan diri dihadapan kebesaran Allah SWT.

## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

1. Potensi antikanker daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) terhadap *cell line* kanker payudara T47D ditunjukkan melalui nilai IC<sub>50</sub>. Adapun nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etanol, fraksi n-heksana, kloroform, etil asetat, dan air daun benalu Nangka secara berturut-turut adalah 362,8; 926; 356,8; 314,8; dan 2243  $\mu$ g/mL. Dari hasil uji aktivitas antikanker yang mempunyai potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D dilihat dari nilai IC<sub>50</sub> yang paling kecil sehingga diambil fraksi etil asetat daun benalu Nangka.
2. Mekanisme kerja terjadinya apoptosis fraksi etil asetat benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) terhadap sel T47D dengan metode pewarnaan *double staining* menggunakan pereaksi *acridine orange* yaitu mengalami *early apoptosis* sampai apoptosis ditandai dengan warna *orange* yang tampak pada mikroskop fluoresense.
3. Mekanisme kerja terjadinya apoptosis fraksi etil asetat benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) terhadap sel T47D menggunakan metode *flowcytometry* yaitu mengalami 52,41 % *early apoptosis*, 35,98 % *late apoptosis* dan 4,90 % nekrosis.
4. Mekanisme kerja hambatan siklus sel yang diinduksi fraksi etil asetat benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) terhadap sel T47D menggunakan metode *flowcytometry* yaitu mengalami hambatan siklus sel pada siklus G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> dan fase S, dan juga mengalami apoptosis pada fase M<sub>1</sub>.

#### **5.2 Saran**

1. Identifikasi golongan senyawa yang terdapat pada fraksi etil asetat daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) dengan menggunakan uji fitokimia dan KLT.
2. Isolasi lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom *vacuum* dan kromatografi kolom terbuka serta elusidasi struktur senyawa dari fraksi etil asetat daun benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) menggunakan

instrumen LCMS dan HNMR/CNMR untuk mengetahui spesifikasi golongan senyawa.

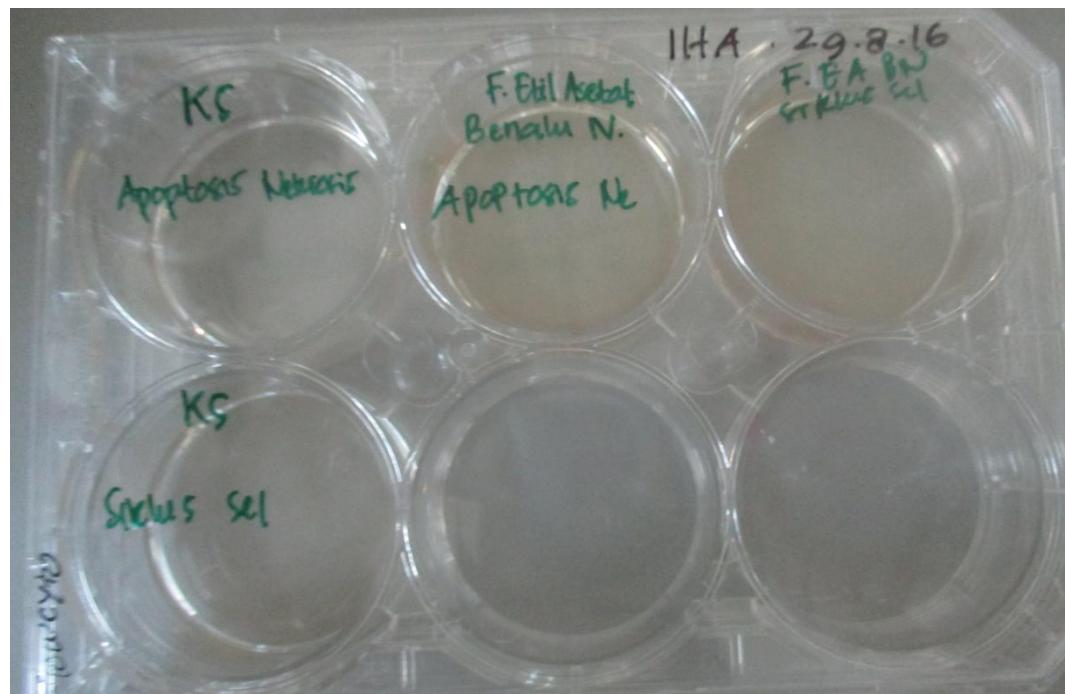
## DAFTAR PUSTAKA

- Amalina, N. 2008. *Uji Sitotoksik Ekstrak 70% Buah Kemukus (Piper cubeba L.) Terhadap Sel Hela*. Universitas Muhamadiyah Surakarta.
- Anggraini, P. 2008. *Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Kemukus (Piper cubeba L.) Terhadap Sel Hela*. Universitas Muhamadiyah Surakarta.
- Artanti, Nina. 2006. *Pengembangan Senyawa Potensial Antikanker dari Benalu*. Serpong : Pusat Penelitian Kimia-LIPI.
- Backer, A dan Van De Brink B. 1965. *Flora of Java (Spermatophytes Only) Volume I, N.V.P.* The Nederlands : Noordhoff-Groningen.
- Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R. J., & Speirs, V. 2003. Breast cancer cell lines : friend or foe ? *Breast Cancer Research*, 5, 89–95. doi:10.1186/bcr577.
- CCRC. 2009. *Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi, UGM.
- Cotran R.S., Kumar, V., Collin, T. 1999. *Neoplasia in Robbins Pathologic Basic of Disease*. Sixth Edition, Philadelphia : W.B. Saunders Company.
- Davis, J.M., Navolanic, P.M., Weinstein-Oppenheimer, C.R., Steelman, L.S., Wei H., Konopleva, M., Blagosklonny, M.V., and McCubrey, J.A.. 2003. Raf-1 and Bcl-2 Induce Distinct and Common Pathways That Contribute to Breast Cancer Drug Resistance. *Clinical Cancer Research*, Vol. 9.
- Ellis, E.O., Schnitt, S.J., S.-Garau, X., Bussolati, G., Tavassoli, F.A., Eusebi, V. 2003. *Pathology and Genetic of Tumours of The Breast and Female Genital Organs / WHO Classification of Tumours*. Washington: IARC Press.
- Ganiswara, S., Setiabudy, R., Suyatna, F, D., dan Purwanyastuti. 1995. *Farmakologi dan Terapi*, Edisi II. Jakarta : Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Gondhowiardjo, G. G. dan Skett, P. F. 1991. *Pengantar Metabolisme Obat*, diterjemahkan oleh Aisyah, I. B. Jakarta : Universitas Indonesia Press.
- Harbone, J. B. 1996. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan Kokasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: ITB.
- Hsiang, Y.H., Lihou, M.G., Liu L.F. 1989. Arrest of replication fork by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Research*, Vol. 49.
- Hutapea, J.R. 1999. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Jilid V. Jakarta : Departemen Kesehatan RI dan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.

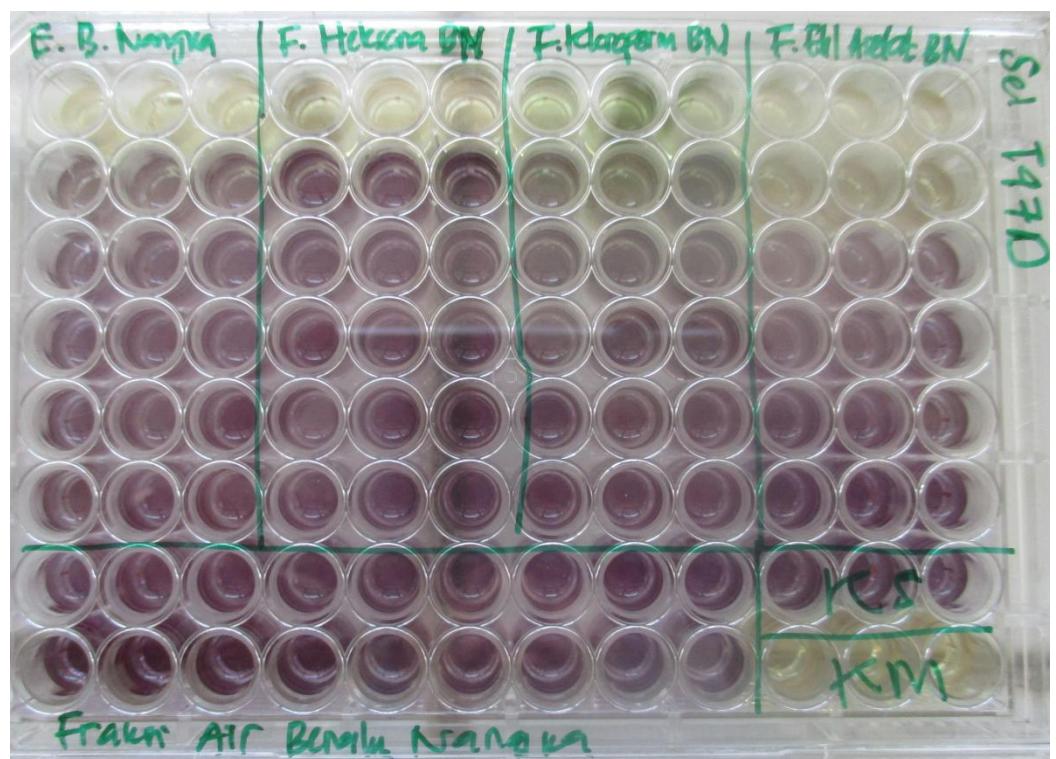
- Imani, A.K.Q. 2005. *Tafsir Nurul Quran Sebuah Tafsir Sederhana Menuju Cahaya al-Quran*, penerjemah Salman Nano. Jakarta : , Penerbit Al-Huda.
- Indrayani, L., Hartati S. dan Lydia S. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Jurnal Fakultas Sains dan Matematika*. Salatiga: Universitas Kristen Satya Wacana.
- Kementerian Kesehatan. 2012. <http://depkes.go.id/index.php/berita/press-release/1060-jika-tidak-dikendalikan-26-juta-or> diakses tanggal 29 November 2012.
- Koolman, Jan. 1994. *Atlas Berwarna dan Teks Biokimia* diterjemahkan oleh Septelia Inawati Wanadi Jan Koolman, Klaus-Heinrich Rohm. Jakarta : Hipokrates.
- Krishna, G., dan Makoto H. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Journal of Elsevier Science*. Vol. 455..
- Lindsay, S. 1992. *High Performance Liquid Chromatography* second edition. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore : John Wiley & Sons.
- Ningrum, Puspa. 2010. *Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Benalu (Macrosolen cochinchinensis) terhadap Penurunan Jumlah Total Limfosit Tikus Putih (Rattus norvegicus) yang Diinveksi Virus Dengue*. Jember : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Notarbartolo, M., Poma, P., Perri, D., Dusonchet, L., Cervello, M., and Alessandro, N. 2005. Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF- $\kappa$ B activation levels and in IAP gene expression. *Cancer Letter*, Vol. 224.
- Rahmawati, Emma, dkk. 2013. Aktivitas Antikanker Ekstrak n-Heksana dan Ekstrak Metanol Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn) terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Media Farmasi* Vol. 10 No.2.
- Sriwahyuni. 2010. Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* L.) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas dengan Menggunakan Brine Shrimp. *Tugas akhir/Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki Malang.
- Van Steenis, C.G, 1975. *Flora Voor de Scholen in Indonesia*, diterjemahkan oleh Sorjowinoto, M, edisi VI. Jakarta : PT. Pradnya Paramitha.

## LAMPIRAN-LAMPIRAN

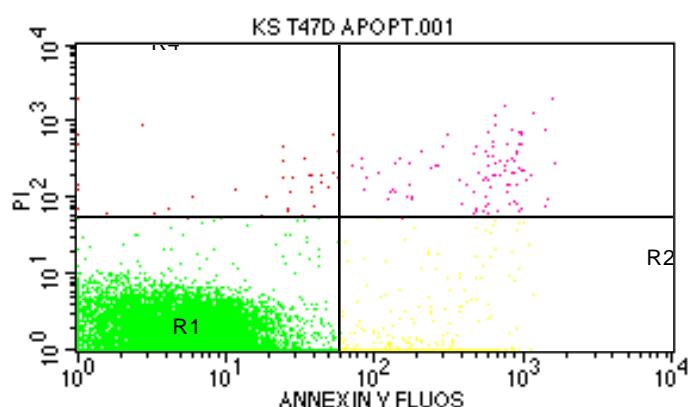
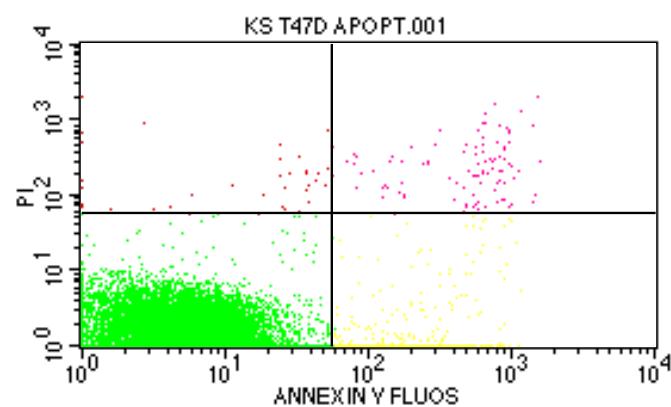
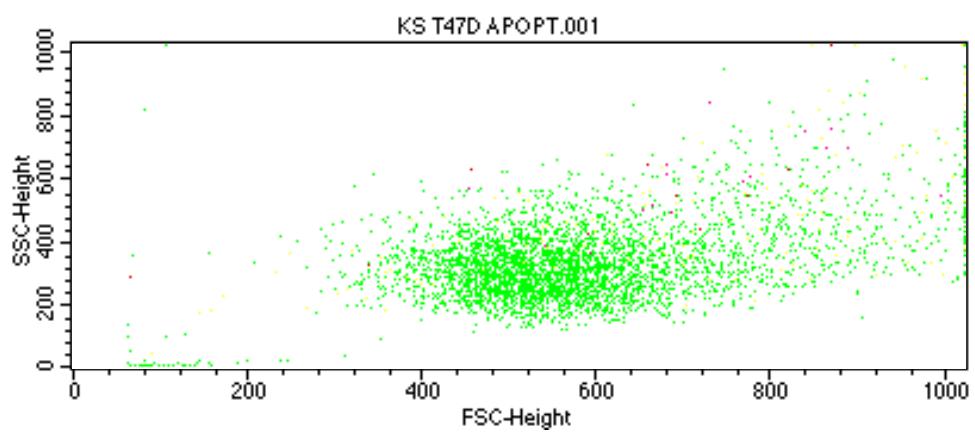
### 1. PLATE UJI FLOWCYTO



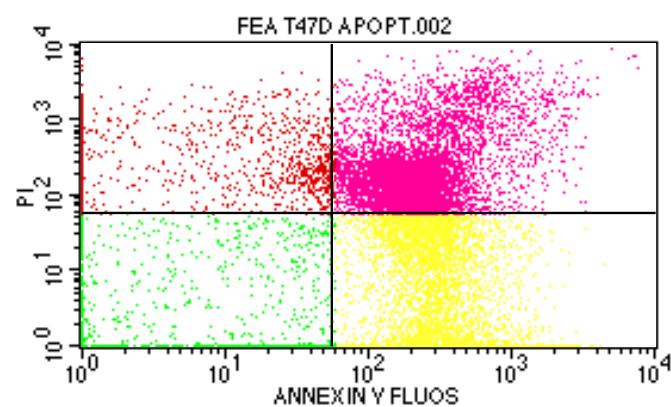
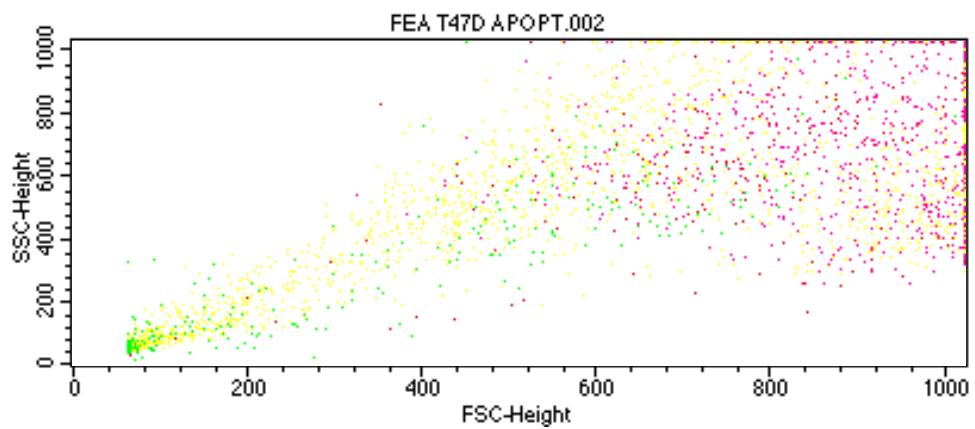
### 2. WELL PLATE UJI MTT



### **3. HASIL Flowcytomtri**

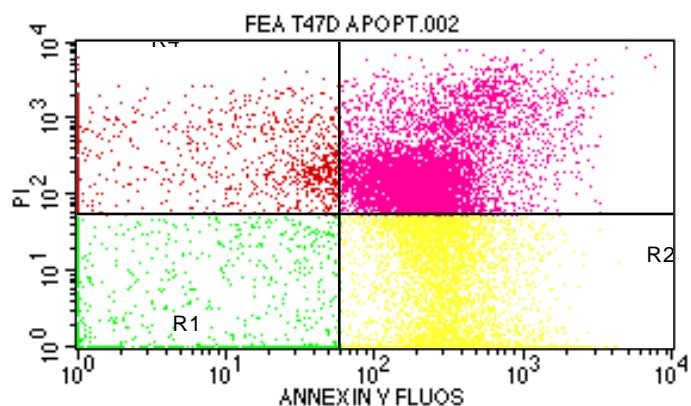


4.



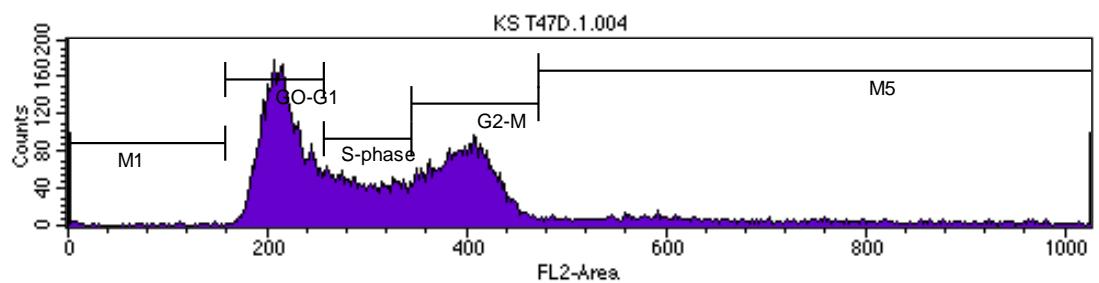
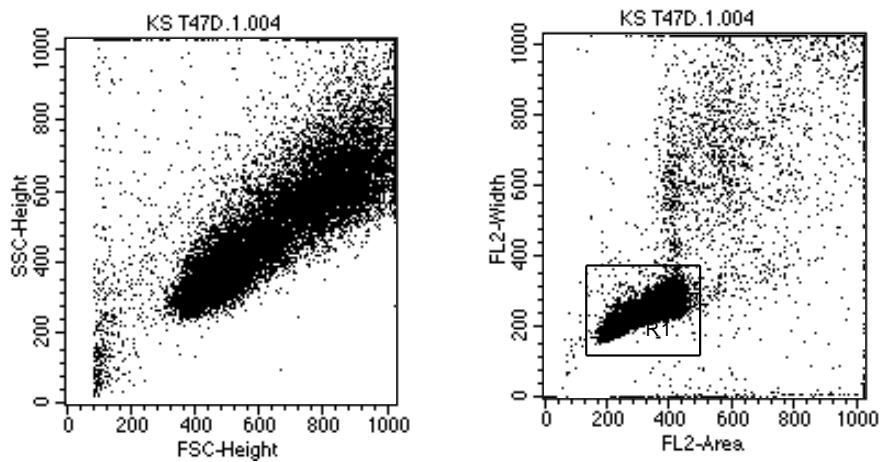
File: FEA T47D APOPT.00  
Gate: No Gate  
Total Events: 20000

Quad	% Gated	% Total
UL	4.71	4.71
UR	35.57	35.57
LL	6.69	6.69
LR	53.04	53.04



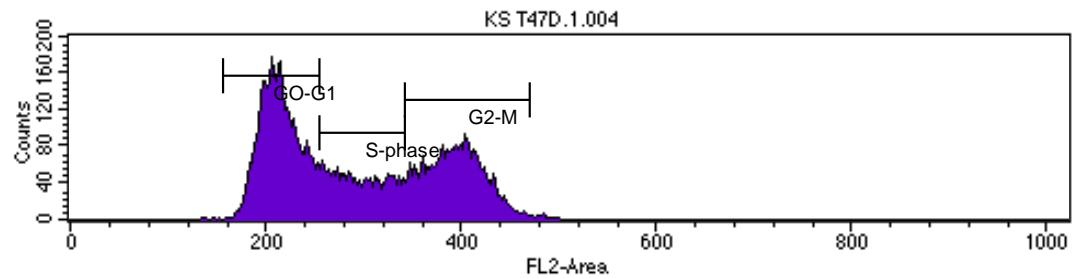
File: FEA T47D APOPT.00  
Gate: No Gate  
Total Events: 20000

Region	% Gated	% Total
R1	6.89	6.89
R2	52.41	52.41
R3	35.98	35.98
R4	4.90	4.90



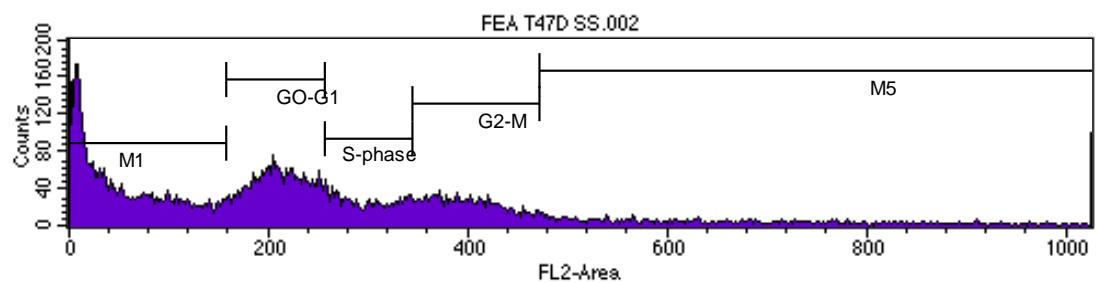
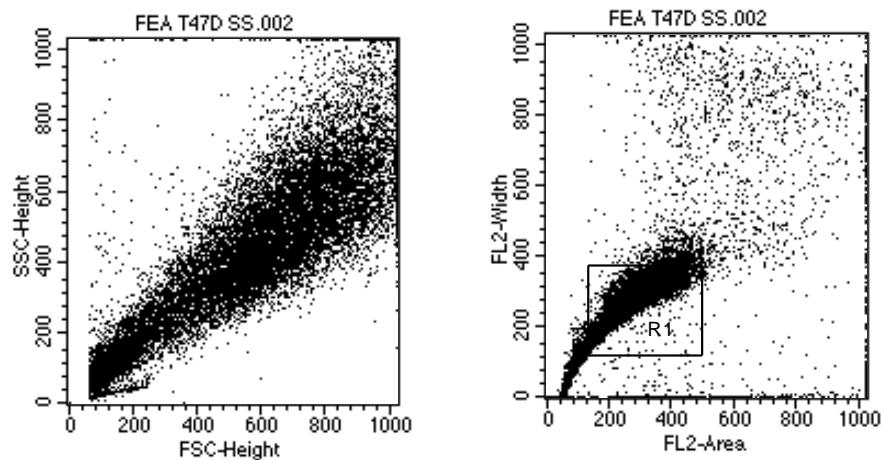
Sample ID: KS T47D.1 Total Events: 20000  
 X Parameter: FL2-A FL2-Area (Linear)

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Median
All	20000	100.00	100.00	337.85	52.50	303.00
M1	560	2.80	2.80	8.67	346.68	0.00
GO-G1	7428	37.14	37.14	215.47	8.93	214.00
S-phase	3692	18.46	18.46	298.92	8.83	298.00
G2-M	6189	30.95	30.95	396.20	7.10	396.00
M5	2226	11.13	11.13	729.70	25.72	679.00



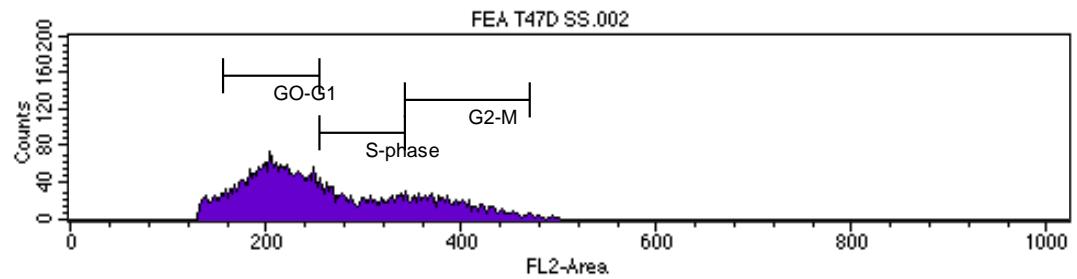
Sample ID: KS T47D.1 Total Events: 20000  
 X Parameter: FL2-A FL2-Area (Linear)

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Median
All	16666	100.00	83.33	294.74	28.07	277.00
GO-G1	7403	44.42	37.02	215.47	8.92	214.00
S-phase	3640	21.84	18.20	298.84	8.82	298.00
G2-M	5666	34.00	28.33	394.57	6.96	395.00



Sample ID: FEA T47D SS Total Events: 20000  
X Parameter: FL2-A FL2-Area (Linear)

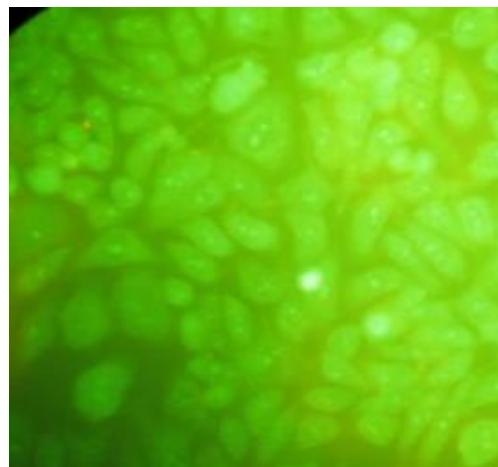
Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Median
All	20000	100.00	100.00	201.53	110.54	171.00
M1	9673	48.37	48.37	32.78	135.02	10.00
GO-G1	4300	21.50	21.50	210.30	12.49	210.00
S-phase	1987	9.93	9.93	298.90	9.18	298.00
G2-M	2492	12.46	12.46	399.03	8.62	396.00
M5	1657	8.29	8.29	754.71	26.99	725.00



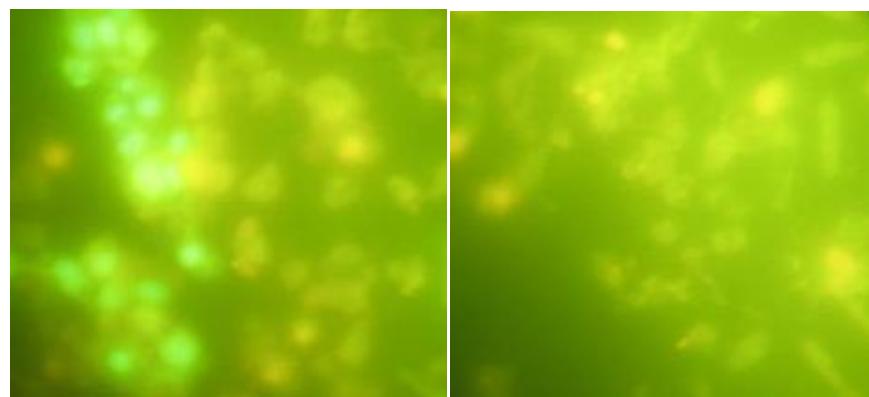
Sample ID: FEA T47D SS Total Events: 20000  
X Parameter: FL2-A FL2-Area (Linear)

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Median
All	8059	100.00	40.29	263.14	31.30	241.00
GO-G1	4225	52.43	21.12	210.12	12.48	210.00
S-phase	1794	22.26	8.97	297.88	9.23	297.00
G2-M	1607	19.94	8.04	391.39	8.14	386.00

**KONTROL SEL**



**PERLAKUAN FRAKSI ETIL ASETAT**



## Hasil perhitungan SPSS

### a. Crude ekstrak

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for dosis			95% Confidence Limits for log(dosis) <sup>b</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup>						
0.01	1.081E4	1501.872	4.269E18	4.034	3.177	18.630
0.02	7.259E3	1199.129	9.491E16	3.861	3.079	16.977
0.03	5.639E3	1037.546	8.499E15	3.751	3.016	15.929
0.04	4.664E3	929.359	1.386E15	3.669	2.968	15.142
0.05	3.996E3	848.933	3.171E14	3.602	2.929	14.501
0.06	3.504E3	785.374	9.047E13	3.545	2.895	13.956
0.07	3.122E3	733.078	3.014E13	3.494	2.865	13.479
0.08	2.816E3	688.797	1.127E13	3.450	2.838	13.052
0.09	2.564E3	650.490	4.611E12	3.409	2.813	12.664
0.1	2.351E3	616.790	2.026E12	3.371	2.790	12.307
0.15	1.644E3	491.550	6.777E10	3.216	2.692	10.831
0.2	1.237E3	406.021	4.601E9	3.092	2.609	9.663
0.25	969.224	340.563	4.633E8	2.986	2.532	8.666
0.3	778.512	286.719	5.979E7	2.891	2.457	7.777
0.35	635.458	239.969	9135388.675	2.803	2.380	6.961
0.4	524.100	197.489	1576715.325	2.719	2.296	6.198
0.45	434.970	157.292	299600.378	2.638	2.197	5.477
0.5	362.067	117.988	62282.287	2.559	2.072	4.794
0.55	301.382	79.258	14458.152	2.479	1.899	4.160
0.6	250.129	43.544	3982.741	2.398	1.639	3.600
0.65	206.296	17.281	1425.442	2.314	1.238	3.154
0.7	168.388	4.580	687.677	2.226	.661	2.837
0.75	135.255	.821	417.055	2.131	-.086	2.620
0.8	105.972	.100	288.015	2.025	-.998	2.459
0.85	79.740	.008	210.729	1.902	-2.114	2.324

0.9	55.753	.000	154.840	1.746	-3.554	2.190
0.91	51.137	.000	144.890	1.709	-3.906	2.161
0.92	46.554	.000	135.134	1.668	-4.288	2.131
0.93	41.987	.000	125.473	1.623	-4.710	2.099
0.94	37.415	.000	115.794	1.573	-5.183	2.064
0.95	32.804	.000	105.952	1.516	-5.723	2.025
0.96	28.108	.000	95.743	1.449	-6.358	1.981
0.97	23.246	.000	84.835	1.366	-7.142	1.929
0.98	18.059	.000	72.577	1.257	-8.185	1.861
0.99	12.130	.000	57.202	1.084	-9.832	1.757

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

### b. Fraksi n-heksan

c.

#### Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for dosis			95% Confidence Limits for log(dosis) <sup>b</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup>						
0.01	4.080E4	.	.	4.611	.	.
0.02	2.618E4	.	.	4.418	.	.
0.03	1.976E4	.	.	4.296	.	.
0.04	1.599E4	.	.	4.204	.	.
0.05	1.346E4	.	.	4.129	.	.
0.06	1.163E4	.	.	4.065	.	.
0.07	1.022E4	.	.	4.010	.	.
0.08	9.113E3	.	.	3.960	.	.
0.09	8.207E3	.	.	3.914	.	.
0.1	7.454E3	.	.	3.872	.	.
0.15	5.002E3	.	.	3.699	.	.
0.2	3.643E3	.	.	3.561	.	.
0.25	2.776E3	.	.	3.443	.	.

Probability	2.174E3	.	.	3.337	.
0.35	1.734E3	.	.	3.239	.
0.4	1.399E3	.	.	3.146	.
0.45	1.136E3	.	.	3.056	.
0.5	926.319	.	.	2.967	.
0.55	755.026	.	.	2.878	.
0.6	613.384	.	.	2.788	.
0.65	494.849	.	.	2.694	.
0.7	394.631	.	.	2.596	.
0.75	309.122	.	.	2.490	.
0.8	235.519	.	.	2.372	.
0.85	171.539	.	.	2.234	.
0.9	115.119	.	.	2.061	.
0.91	104.547	.	.	2.019	.
0.92	94.159	.	.	1.974	.
0.93	83.924	.	.	1.924	.
0.94	73.803	.	.	1.868	.
0.95	63.741	.	.	1.804	.
0.96	53.658	.	.	1.730	.
0.97	43.420	.	.	1.638	.
0.98	32.770	.	.	1.515	.
0.99	21.030	.	.	1.323	.

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

d. Fraksi DCM

#### Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for dosis			95% Confidence Limits for log(dosis) <sup>b</sup>			
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
PROBIT <sup>a</sup>	0.01	5.188E4	4244.040	4.380E12	4.715	3.628	12.641

0.02	2.895E4	3018.270	3.682E11	4.462	3.480	11.566
0.03	1.999E4	2428.101	7.664E10	4.301	3.385	10.884
0.04	1.513E4	2059.718	2.355E10	4.180	3.314	10.372
0.05	1.206E4	1800.503	9.026E9	4.081	3.255	9.955
0.06	9.948E3	1604.854	3.992E9	3.998	3.205	9.601
0.07	8.401E3	1450.188	1.953E9	3.924	3.161	9.291
0.08	7.221E3	1323.823	1.030E9	3.859	3.122	9.013
0.09	6.292E3	1217.999	5.762E8	3.799	3.086	8.761
0.1	5.543E3	1127.658	3.375E8	3.744	3.052	8.528
0.15	3.280E3	815.635	3.707E7	3.516	2.911	7.569
0.2	2.162E3	625.547	6456301.818	3.335	2.796	6.810
0.25	1.512E3	493.831	1454235.624	3.179	2.694	6.163
0.3	1.096E3	395.075	385462.503	3.040	2.597	5.586
0.35	814.020	316.715	114247.985	2.911	2.501	5.058
0.4	613.696	251.580	36777.935	2.788	2.401	4.566
0.45	466.935	195.115	12675.377	2.669	2.290	4.103
0.5	356.814	144.303	4677.898	2.552	2.159	3.670
0.55	272.664	97.750	1884.868	2.436	1.990	3.275
0.6	207.459	57.046	863.305	2.317	1.756	2.936
0.65	156.405	27.035	465.807	2.194	1.432	2.668
0.7	116.134	10.247	292.016	2.065	1.011	2.465
0.75	84.224	3.148	201.571	1.925	.498	2.304
0.8	58.894	.776	145.404	1.770	-.110	2.163
0.85	38.813	.143	105.223	1.589	-.844	2.022
0.9	22.968	.016	73.128	1.361	-1.786	1.864
0.91	20.234	.010	67.259	1.306	-2.015	1.828
0.92	17.632	.005	61.497	1.246	-2.265	1.789
0.93	15.155	.003	55.805	1.181	-2.540	1.747
0.94	12.798	.001	50.138	1.107	-2.848	1.700
0.95	10.553	.001	44.442	1.023	-3.200	1.648
0.96	8.414	.000	38.636	.925	-3.614	1.587

0.97	6.369	.000	32.594	.804	-4.124	1.513
0.98	4.398	.000	26.069	.643	-4.803	1.416
0.99	2.454	.000	18.417	.390	-5.876	1.265

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

### e. Fraksi Etyl Asetat

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for dosis			95% Confidence Limits for log(dosis) <sup>b</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup>						
0.01	1.220E3	.	.	3.086	.	.
0.02	1.041E3	.	.	3.017	.	.
0.03	941.193	.	.	2.974	.	.
0.04	872.522	.	.	2.941	.	.
0.05	820.375	.	.	2.914	.	.
0.06	778.453	.	.	2.891	.	.
0.07	743.462	.	.	2.871	.	.
0.08	713.468	.	.	2.853	.	.
0.09	687.242	.	.	2.837	.	.
0.1	663.954	.	.	2.822	.	.
0.15	575.639	.	.	2.760	.	.
0.2	513.907	.	.	2.711	.	.
0.25	466.250	.	.	2.669	.	.
0.3	427.232	.	.	2.631	.	.
0.35	393.996	.	.	2.595	.	.
0.4	364.852	.	.	2.562	.	.
0.45	338.709	.	.	2.530	.	.
0.5	314.810	.	.	2.498	.	.
0.55	292.597	.	.	2.466	.	.
0.6	271.632	.	.	2.434	.	.

0.65	251.539	.	.	.	2.401	.
0.7	231.971	.	.	.	2.365	.
0.75	212.558	.	.	.	2.327	.
0.8	192.847	.	.	.	2.285	.
0.85	172.166	.	.	.	2.236	.
0.9	149.266	.	.	.	2.174	.
0.91	144.208	.	.	.	2.159	.
0.92	138.907	.	.	.	2.143	.
0.93	133.303	.	.	.	2.125	.
0.94	127.311	.	.	.	2.105	.
0.95	120.805	.	.	.	2.082	.
0.96	113.585	.	.	.	2.055	.
0.97	105.298	.	.	.	2.022	.
0.98	95.210	.	.	.	1.979	.
0.99	81.235	.	.	.	1.910	.

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

## f. Fraksi air

g.

### Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for dosis			95% Confidence Limits for log(dosis) <sup>a</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	3.327E7	931818.027	3.092E11	7.522	5.969	11.490
	1.414E7	513246.354	6.738E10	7.150	5.710	10.829
	8.216E6	351501.120	2.563E10	6.915	5.546	10.409
	5.461E6	264371.184	1.239E10	6.737	5.422	10.093
	3.918E6	209678.382	6.858E9	6.593	5.322	9.836
	2.953E6	172128.355	4.146E9	6.470	5.236	9.618
	2.304E6	144773.751	2.667E9	6.363	5.161	9.426

0.08	1.846E6	123986.395	1.797E9	6.266	5.093	9.254
0.09	1.508E6	107680.802	1.254E9	6.178	5.032	9.098
0.1	1.253E6	94570.868	9.013E8	6.098	4.976	8.955
0.15	5.803E5	55229.285	2.294E8	5.764	4.742	8.361
0.2	3.148E5	35999.995	7.733E7	5.498	4.556	7.888
0.25	1.863E5	24925.632	3.044E7	5.270	4.397	7.483
0.3	1.163E5	17909.039	1.319E7	5.066	4.253	7.120
0.35	7.517E4	13177.131	6075748.354	4.876	4.120	6.784
0.4	4.968E4	9843.426	2914140.410	4.696	3.993	6.465
0.45	3.327E4	7418.523	1432377.846	4.522	3.870	6.156
0.5	2.243E4	5611.876	712562.686	4.351	3.749	5.853
0.55	1.512E4	4241.119	354818.946	4.180	3.627	5.550
0.6	1.013E4	3186.621	174934.369	4.005	3.503	5.243
0.65	6.692E3	2367.025	84379.860	3.826	3.374	4.926
0.7	4.325E3	1725.285	39247.568	3.636	3.237	4.594
0.75	2.700E3	1220.254	17269.105	3.431	3.086	4.237
0.8	1.598E3	821.235	6994.165	3.204	2.914	3.845
0.85	866.946	503.729	2506.070	2.938	2.702	3.399
0.9	401.658	245.043	765.626	2.604	2.389	2.884
0.91	333.543	198.971	594.974	2.523	2.299	2.774
0.92	272.570	155.436	461.844	2.435	2.192	2.664
0.93	218.311	115.538	358.473	2.339	2.063	2.554
0.94	170.377	80.695	277.687	2.231	1.907	2.444
0.95	128.415	52.139	213.294	2.109	1.717	2.329
0.96	92.119	30.432	160.449	1.964	1.483	2.205
0.97	61.234	15.346	115.667	1.787	1.186	2.063
0.98	35.582	6.045	76.488	1.551	.781	1.884
0.99	15.123	1.359	40.833	1.180	.133	1.611

a. Logarithm base = 10.

h.