

**POTENSI EKSTRAK KULIT PISANG KEPOK (*Musa balbisiana*)
SEBAGAI KANDIDAT TERAPEUTIK KANKER PAYUDARA SECARA
IN VITRO DENGAN MENGGUNAKAN SEL T-47D**

SKRIPSI

Oleh:

FAUCHIL WARDATI

NIM. 13620083



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)
MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG**

2017

**POTENSI EKSTRAK KULIT PISANG KEPOK (*Musa balbisiana*)
SEBAGAI KANDIDAT TERAPEUTIK KANKER PAYUDARA SECARA
IN VITRO DENGAN MENGGUNAKAN SEL T-47D**

SKRIPSI

Diajukan Kepada:

Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam

Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Oleh:

FAUCHIL WARDATI

NIM. 13620083

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)

MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2017

HALAMAN PERSETUJUAN
POTENSI EKSTRAK KULIT PISANG KEPOK (*Musa balbisiana*)
SEBAGAI KANDIDAT TERAPEUTIK KANKER PAYUDARA SECARA
***IN VITRO* DENGAN MENGGUNAKAN SEL T-47D**

SKRIPSI

Oleh:
FAUCHIL WARDATI
NIM. 13620083

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 4 Desember 2017

Pembimbing I,



Kholifah Holil, M.Si
NIP. 19751106 200912 2 002

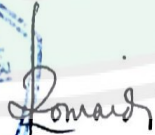
Pembimbing II,



Umaiyatus Syarifah, M.A
NIP. 19820925 200901 2 005

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi




Romadi, M.Si., D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

HALAMAN PENGESAHAN
POTENSI EKSTRAK KULIT PISANG KEPOK (*Musa balbisiana*)
SEBAGAI KANDIDAT TERAPEUTIK KANKER PAYUDARA SECARA
***IN VITRO* DENGAN MENGGUNAKAN SEL T-47D**

SKRIPSI

Oleh:
FAUCHIL WARDATI
NIM. 13620083

Telah Dipertahankan di Depan Penguji Skripsi
dan dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal: 20 Desember 2017

Penguji Utama	Dr. drh. Hj. Bayyinatul M., M.Si NIP. 19710919 200003 2 001	
Ketua Penguji	Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si NIP. 19671113 199402 2 001	
Sekretaris Penguji	Kholifah Holil, M.Si NIP. 19751106 200912 2 002	
Anggota Penguji	Umayyatus Syarifah, M.A NIP. 19820925 200901 2 005	

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi



Romaidi, M.Si., D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fauchil Wardati

NIM : 13620083

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Skripsi : Potensi Ekstrak Kulit Pisang Kepok (*Musa balbisiana*) sebagai Kandidat Terapeutik Kanker Payudara secara *In Vitro* dengan Menggunakan Sel T-47D

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan, atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar rujukan. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 4 Desember 2017
Yang membuat pernyataan,



Fauchil Wardati
NIM. 13620083

MOTTO

فَإِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا ۖ إِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا ۚ

Artinya:

Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.

(QS. Al-Insyiroh 5-6)

Dear Allah,

Sometimes it's hard for me to understand what You really want to happen,

But I trust You, I know You will give me the what's best

"لا يصيبنا إلا ما كتب الله لنا"

HALAMAN PERSEMBAHAN

الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي أَنْعَمَنَا بِنِعْمَةِ الْإِيمَانِ وَالْإِسْلَامِ
وَنُصَلِّي وَنُصَلِّمْ عَلَى خَيْرِ الْأَتَامِ سَيِّدِنَا مُحَمَّدٍ وَعَلَى آلِهِ وَصَحْبِهِ أَجْمَعِينَ أَمَا بَعْدُ

Alhamdulillah, puja dan puji syukur kupersembahkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan nikmat sehingga dapat mencari ilmu dan mengungkap kebesaran-Nya melalui proses pembelajaran dan penelitian di UIN Malang.

Skripsi ini kupersembahkan untuk:

Ibuku, *rectum cancer survivor*

dan semua pejuang kanker di dunia, khususnya kanker payudara

Terima kasih sebanyak-banyaknya kuucapkan kepada orang tuaku, Abah H. Sariyun Naja Anwar, B.Sc., M.MSI., dan Ibu Dra. Hj. Jauharotul Farida, M.Ag serta Kakak Niela Amalina dan Dedek Fayyad Yaqfi Ahmada yang tidak pernah lelah memberikan cinta, semangat dan doa di setiap sujudnya. Tak lupa pula, pengasuh Asrama PPAP.Nurul Ummah, Bapak Drs. H. Sabilul Rosyad dan Ibu Hj. Aminatuz Zahroh, terima kasih karena telah diberi kesempatan untuk menimbah ilmu di asrama.

Terima kasih juga untuk sahabat-sahabatku di Biologi 2013, PPAP.Nurul Ummah Malang, PPST. Ar-Risalah Lirboyo, PMII Rayon Pencerahan Galileo, dan Turun Tangan Malang yang telah menjadi keluarga kecilku. Terima kasih selalu memberi nasihat, motivasi dan semangat dalam menyelesaikan skripsi ini.

Tak tertinggal pula, semua pihak yang tidak bisa kusebutkan satu persatu yang telah mendukung, membantu, dan mendoakan agar terselesaikannya skripsi ini. Semoga Allah membalas kebaikan kalian dan selalu melimpahkan rahmat hidayah-Nya kepada kita semua, serta mengumpulkan kita di surga-Nya kelak. Aamiin.

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullah Wabarakatuh

Puji syukur Alhamdulillah, penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan rangkaian penyusunan skripsi dengan judul **“Potensi Ekstrak Kulit Pisang Kepok (*Musa balbisiana*) sebagai Kandidat Terapeutik Kanker Payudara secara *In Vitro* dengan Menggunakan Sel T-47D”**. Sholawat beserta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Rasulullah Muhammad SAW, sang revolusioner pembawa cahaya terang bagi peradaban, salah satunya adalah melalui pendidikan yang senantiasa berlandaskan keagungan moral dan spiritual.

Penulis juga haturkan ucapan terimakasih seiring doa dan harapan *Jazakumullah ahsanaljaza'* kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terimakasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. H. Abdul Haris, M.Ag, selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Romaidi, M.Si.,D.Sc, selaku ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Kholifah Holil, M.Si., dan Umaiatus Syarifah, M.A., selaku dosen pembimbing utama dan dosen pembimbing agama, yang senantiasa memberikan pengarahan, nasehat, dan motivasi dalam penyelesaian skripsi.
5. dr. Tyas Pramesti Griana dan Shinta, M.Si., selaku dosen wali yang senantiasa memberikan pengarahan dan nasehat.
6. Segenap Dosen dan Sivitas Akademika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
7. Kedua orang tua penulis H. Sariyun Naja Anwar, B.Sc., M.MSI., dan Ibu Dra. Hj. Jauharotul Farida, M.Ag., serta Kakak Niela Amalina dan Dedek Fayyad Yaqfi Ahmada tercinta yang senantiasa memberikan kasih sayang, doa, serta dorongan semangat menuntut ilmu kepada penulis selama ini.

8. Laboran dan staff administrasi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
9. Seluruh teman-teman Biologi angkatan 2013 terimakasih atas kerjasama, motivasi, serta bantuannya selama menempuh studi di Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
10. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah memberikan sumbangan pemikiran, doa dan semangat hingga terselesaikannya skripsi ini.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas bantuan dan pemikirannya. Sebagai akhir kata, penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis khususnya dan bagi para pembaca. *Amin yaa robbal 'alamiin.*

Wassalamu'alaikum Warahmatullah Wabarakatuh

Malang, 4 Desember 2017

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
MOTTO	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
المخلص	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	9
1.3 Tujuan Penelitian	9
1.4 Manfaat Penelitian	9
1.5 Batasan Masalah	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1 Kanker	11
2.1.1 Tinjauan Umum	11
2.1.2 Kanker Payudara	12
2.1.3 Faktor Penyebab	14
2.1.4 Mekanisme Pembentukan Kanker	15
2.1.5 Terapi Kanker	20
2.1.6 Apoptosis	23
2.1.7 Sel Kanker T-47D	28
2.2 Pisang Kepok	32
2.2.1 Tinjauan Umum	32
2.2.2 Kandungan Bahan Aktif	37
a. Flavonoid	38
b. Saponin	40
c. Tanin	41
d. Alkaloid	41
2.3 Mekanisme Induksi Apoptosis Sel T-47D	42
2.4 Ekstraksi	46

2.5 Kultur Sel	48
2.6 MTT Assay	50
2.7 Flow cytometry	52
BAB III METODE PENELITIAN	54
3.1 Rancangan Penelitian	54
3.2 Variabel Penelitian	55
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian	55
3.4 Alat dan Bahan Penelitian	56
3.4.1 Alat-alat Penelitian	56
3.4.2 Bahan-bahan Penelitian	57
3.5 Prosedur Penelitian.....	57
3.6 Prosedur Kerja	59
3.6.1 Preparasi Sampel.....	59
3.6.2 Ekstraksi Maserasi	59
3.6.3 Pembuatan Reagen.....	60
a. Pembuatan Medium Biakan Sel	60
b. Pembuatan Medium Penumbuh Sel	60
c. Pembuatan Larutan SDS	60
d. Pembuatan Larutan MTT	61
e. Pembuatan Larutan Doxorubicin.....	61
3.6.4 Uji Sitotoksik	61
a. Persiapan sel.....	61
b. Penghitungan Sel.....	61
c. Peletakan Sel pada Plate.....	62
d. Pembuatan Larutan Sampel dan Perlakuan Sampel pada Sel	62
e. Pemberian Larutan MTT	63
3.6.5 Analisis Data Uji Sitotoksik	65
3.6.6 Uji Induksi Apoptosis	66
a. Persiapan Sel	66
b. Perlakuan Sampel pada Sel	66
3.6.7 Analisis Data Uji Induksi Apoptosis	67
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	69
4.1 Uji Sitotoksik	69
4.2 Uji Induksi Apoptosis	87
BAB V PENUTUP.....	96
5.1 Kesimpulan	96
5.2 Saran	96
DAFTAR PUSTAKA	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Jaringan kanker payudara	13
Gambar 2.2 Anatomi payudara	14
Gambar 2.3 Tahapan karsinogenesis	16
Gambar 2.4 Stres ROS pada perkembangan sel kanker	18
Gambar 2.5 Terapi apoptosis	23
Gambar 2.6 Perbedaan apoptosis dan nekrosis	25
Gambar 2.7 Transduksi sinyal apoptosis	26
Gambar 2.8 Dua jalur utama apoptosis	28
Gambar 2.9 Sel kanker payudara T-47D.....	29
Gambar 2.10 Sel T-47D	31
Gambar 2.11 Buah pisang kepok	35
Gambar 2.12 Struktur senyawa flavonoid	39
Gambar 2.13 Struktur senyawa saponin.....	40
Gambar 2.14 Struktur senyawa tanin	41
Gambar 2.15 Struktur senyawa alkaloid	42
Gambar 2.16 Mekanisme flavonoid menginduksi apoptosis sel kanker	45
Gambar 2.17 Reaksi reduksi MTT menjadi formazan	51
Gambar 3.1 Kerangka prosedur penelitian	58
Gambar 3.2 <i>Haemocytometer</i>	62
Gambar 3.3 Perlakuan sampel ke sel (<i>MTT assay</i>)	63
Gambar 3.4 Perlakuan sampel ke sel (<i>Flow cytometry</i>)	67
Gambar 4.1 Sel T-47D sebelum <i>treatment</i> (perbesaran 100x)	70
Gambar 4.2 Sel T-47D setelah diberi 1x24 jam diberi perlakuan ekstrak kulit pisang kepok dengan konsentrasi a) 1000 µg/mL; b) 500 µg/mL; c) 250 µg/mL; d) 125 µg/mL; e) 62.5 µg/mL; f) 31.25 µg/mL (perbesaran 100x).....	71
Gambar 4.3 Kristal formazan yang terbentuk setelah pemberian reagen MTT a) kontrol sel T-47D b) kontrol media c) doxorubicin (kontrol positif) d) perlakuan ekstrak kulit pisang kepok (perbesaran 100x)	72
Gambar 4.4 Perubahan warna setelah pemberian <i>SDS stopper</i>	74
Gambar 4.5 Persentase hidup sel T-47D setelah pemberian a) ekstrak kulit pisang kepok dan b) Doxorubicin	77
Gambar 4.6 Strategi pencegahan agen kemoprevensi pada tahapan karsinogenesis	82
Gambar 4.7 Peran senyawa fenolik dalam menghambat proliferasi sel kanker	84
Gambar 4.8 Efek kemopreventif flavonoid terhadap tahapan karsinogenesis	85
Gambar 4.9 Persentase sel setiap quadran a) kontrol sel T-47D b) perlakuan ekstrak kulit pisang kepok IC_{50} terhadap sel-T-47D.....	87
Gambar 4.10 Mekanisme program kematian nekrosis pada sel kanker	91
Gambar 4.11 Regulasi jalur kematian yang menyebabkan nekrosis	93

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Rancangan waktu penelitian.....	56
Tabel 3.2 Tabel data hasil uji sitotoksik setiap sampel.....	65
Tabel 3.3 Tabel data hasil uji induksi apoptosis.....	68
Tabel 4.1 Persentase sel T-47D yang hidup (%) setelah diberi perlakuan ekstrak kulit pisang kepok dan doxorubicin (kontrol positif) menggunakan MTT assay.....	76
Tabel 4.2 Nilai IC_{50} dari setiap perlakuan dengan analisis SPSS Probit.....	78
Tabel 4.3 Kategori sitotoksitas berdasarkan nilai IC_{50}	79
Tabel 4.4 Populasi sel T-47D (%) setelah diberi perlakuan ekstrak kulit pisang kepok terhadap sel T47D dengan <i>flow cytometry</i>	88



DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 Kerangka Penelitian
- Lampiran 2 Determinasi Tanaman
- Lampiran 3 Sertifikat Kursus Kultur
- Lampiran 4 Ethical Approval
- Lampiran 5 Perhitungan
 - L.5.1 Perhitungan Data dan Hasil Uji Sitotoksik
 - L.5.2 Perhitungan Data dan Hasil Uji Induksi Apoptosis
- Lampiran 6 SPSS Probit
- Lampiran 7 Dokumentasi
 - L.7.1 Persiapan Sampel
 - L.7.2 Ekstraksi Maserasi
 - L.7.3 Uji Sitotoksik dengan metode MTT assay
 - L.7.4 Uji Induksi Apoptosis dengan Flow cytometry
- Bukti Konsultasi Skripsi



ABSTRAK

Wardati, Fauchil. 2017. **Potensi Ekstrak Kulit Pisang Kepok (*Musa balbisiana*) sebagai Kandidat Terapeutik Kanker Payudara secara *In Vitro* dengan Menggunakan Sel T-47D**. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing Biologi: Kholifah Holil, M.Si. Pembimbing Agama: Umaiatus Syarifah, M.A

Kata kunci: kanker payudara, kulit pisang kepok, sel T-47D, MTT assay, flowcytometry

Pemanfaatan bahan alam seperti buah sebagai agen terapi kanker payudara mulai banyak diteliti oleh para ilmuwan. Salah satu bahan alam yang berpotensi sebagai antikanker adalah kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*). Pisang ini mengandung berbagai senyawa fitokimia yang dapat menginduksi apoptosis sel kanker. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui nilai IC_{50} ekstrak kulit pisang kepok dan persentase sel yang mengalami apoptosis sehingga dapat diketahui potensinya sebagai kandidat terapeutik kanker payudara.

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan tahapan penelitian: ekstraksi, uji sitotoksik (*MTT assay*) dan uji induksi apoptosis. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi dengan etanol 95%. Uji sitotoksik dilakukan dengan pemberian ekstrak kulit pisang kepok pada sel T-47D, kemudian dibaca absorbansi dengan *ELISA reader* (λ 595 nm) dan dianalisis dengan SPSS Probit. Untuk konfirmasi efektifitas ekstrak dalam menginduksi apoptosis sel T-47D, digunakan *flowcytometry* dengan reagen Annexin V/PI.

Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa persentase sel hidup setelah diberi ekstrak kulit pisang kepok dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$, dan 31,25 $\mu\text{g/mL}$ berturut-turut adalah 3,74%, 3,94%, 63, 90%, 81,23%, 91,45%, dan 91,97% serta memiliki nilai IC_{50} sebesar 220,375 $\mu\text{g/mL}$. Untuk hasil uji induksi apoptosis pada konsentrasi IC_{50} menunjukkan bahwa jumlah sel yang mengalami apoptosis awal adalah 2,50%, apoptosis akhir 3,10%, nekrosis 5,40%, dan sel yang hidup 89,0%. Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit pisang kepok memiliki toksisitas sedang terhadap sel T-47D yang menunjukkan potensinya sebagai kandidat agen kemoprevensi kanker payudara, terutama pada konsentrasi tinggi ($>250 \mu\text{g/mL}$).

ABSTRACT

Wardati, Fauchil. 2017. **The Potency of Pisang Kepok Peel Extract (*Musa balbisiana*) as Therapeutic Candidate of Breast Cancer by *In Vitro* Using T-47D Cells.** Thesis. Biology Department. Science and Technology Faculty. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Biology Advisor: Kholifah Holil, M.Si. Religious Advisor: Umayyatus Syarifah, MA.

Keywords: breast cancer, pisang kepok peel, T-47D cells, MTT assay, flowcytometry

Utilization of natural ingredients such fruit as a breast cancer treatment agent is beginning to be widely studied by scientists. One of the potential natural ingredients as anticancer is pisang kepok peel (*Musa balbisiana*). This kind of banana contains various phytochemical compounds that can induce cancer cell apoptosis. The purpose of this research is to know the IC₅₀ value of pisang kepok peel extract and percentage of cancer cells that undergo apoptosis so that can be known its potential as therapeutic candidate of breast cancer.

This research is experimentally done by using CRD (Completely Randomized Design). The stages of this research are extraction, cytotoxic test (*MTT assay*) and apoptosis induction test. The extraction method used was maceration (ethanol 95%). The cytotoxic test was performed by giving pisang kepok peel extract on T-47D cell, then read the absorbance with ELISA reader at λ 595 nm and analyzed by SPSS Probit. To confirm the effectiveness of extract in inducing T-47D cell apoptosis, flow cytometry was used with Annexin V/PI reagents.

The result of cytotoxic test showed that the percentage of viable cell after given pisang kepok peel extract with concentration of 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$, and 31,25 $\mu\text{g/mL}$ were 3.74%, 3.94%, 63.90%, 81.23%, 91.45%, and 91.97% respectively; and also has an IC₅₀ value of 220.375 $\mu\text{g/mL}$. Meanwhile the test result for apoptotic induction test at IC₅₀ concentrations showed that the number of cells undergoing initial apoptosis: 2.50%, late apoptosis: 3.10%, necrosis: 5.40%, and viable cells: 89.0%. Based on this results, it can be concluded that pisang kepok peel extract has moderate cytotoxic to T-47D cells, therefore indicate its potential as a candidate for breast cancer chemoprevention agents, especially at high concentrations (>250 $\mu\text{g/mL}$).

الملخص

الوردة, فوح. 2017. احتمال مقتطف جلود الموز الكيبوك (*Musa balbisiana*) كترشيع علاج سرطان الثدي في المختبر باستخدام الخلية T-47D. البحث الجامعي. قسم الحياة كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة للحياة: خليفة خليل الماجستير، المشرفة للدين: أمية الشريفة الماجستير.

الكلمات المفتاحية: سرطان الثدي، جلود الموز الكيبوك، الخلية T-47D، MTT assay، flowcytometry.

والجدير بالذكر، كثير من العلماء يقوم بالدراسة عن استفادة المواد الطبيعية وهي الفواكه كوكيل علاجية سرطان الثدي. ومنها جلود الموز الكيبوك (*Musa balbisiana*)، لها عدّة مركبات الكيمائي النباتي لاستقراء أفكارك خلية السرطان. تهدف هذه الدراسة لمعرفة قيمة IC_{50} مقتطف جلود الموز الكيبوك ونسبة الخلية التي تصيب الأفكارك حسبما يستطيع أن يعرف احتمال وكيل علاجية سرطان الثدي.

تستخدم الباحثة الدراسة التجريبية RAL (خطة العشوائية الشاملة) على المراحل الاستخلاص واختبار السامة للخلايا (*MTT assay*) واختبار حث الأفكارك. أما طريقة الاستخلاص المستخدمة فهي النقاة باستخدام مذبة الإيثانول 95%. يقوم اختبار الأفكارك باعطاء مقتطف جلود الموز الكيبوك على خلية T-47D، وبالتالي يقرأ على امتصاصية *ELISA reader* وتحلل باستخدام SPSS Probit. لتأكيد فعالية في حث أفكارك الخلية T-47D باستخدام *flowcytometry* مع الكاشف AnnexinV/PI.

تظهر نتائج الدراسة أن نسبة الخلية الحية بعد اعطاء مقتطف جلود الموز الكيبوك على تركيز 1000، 500، 250، 125، 62،5 و 31،25 $\mu\text{g/mL}$ على الترتيب 3،74%، 3،94%، 63،90%، 81،23%، 91،97% ولديها قيمة IC_{50} على المبلغ 220،375 $\mu\text{g/mL}$. ونتائج اختبار حث الأفكارك على تركيز IC_{50} تدلّ إلى أن عدد الخلية بالأفكارك الأول عدده 2،50%، والأفكارك الأخير 3،10%، و nekrosis 5،40%، والخلية الحية 89،0%. تأسيسا في نتائج الدراسة السابقة أن احتمال مقتطف جلود الموز الكيبوك وهو معتدل السامة على خلية T-47D تدلّ إلى الاحتمال كترشيع وكيل شامل سرطان الثدي خاصة على التركيز الأعلى ($>250 \mu\text{g/mL}$).

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kanker termasuk salah satu penyakit penyebab kematian utama di dunia (Erejuwa dkk., 2014; Siegel dkk., 2016). Angka kematian yang diakibatkan kanker akan terus meningkat setiap tahunnya. Othman (2012) mengemukakan bahwa pada tahun 2020, kematian akibat kanker diperkirakan meningkat mencapai 104%. Salah satu kanker yang menyebabkan kematian tersebut adalah kanker payudara (Indrati, 2005; Othman, 2012). Berdasarkan hasil Riset Kesehatan Dasar Tahun 2013 menunjukkan bahwa kanker payudara menduduki prevalensi tertinggi yaitu 28,7% (12.014 orang), disusul kanker serviks 10,4% (4342 orang) (Noorhidayah, 2016).

Salah satu langkah dalam penyembuhan kanker adalah melalui kemoterapi. Namun, cara ini memiliki efek samping, penyembuhannya yang tidak tuntas, dan bahkan bisa terjadi resistensi obat. Para ilmuwan mulai banyak meneliti pemanfaatan bahan alam seperti buah sebagai agen terapi kanker atau agen kemoprevensi. Pemanfaatan senyawa-senyawa yang terkandung di dalam bahan-bahan alam tersebut dapat menjadi salah satu alternatif pengobatan kanker. Tujuannya adalah untuk meningkatkan sensitifitas sel kanker dan mengurangi efek samping dari agen kemoterapi (Meiyanto, Susidarti and Handayani, 2008; Handoko dkk., 2011). Hal ini kemudian mendasari perlunya dikembangkan agen kemoprevensi dari bahan alam untuk terapi kanker, seperti buah-buahan.

Pemberian buah-buahan yang mengandung antioksidan dapat menangkal atau meredam radikal bebas sehingga penyakit kanker dapat dicegah atau dihambat perkembangannya (Halliwell, 2007). Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif yang memiliki elektron tidak berpasangan (Winarsi, 2007). Senyawa radikal bebas terbentuk di dalam tubuh dan dapat dipicu oleh berbagai faktor. Radikal bebas dapat dengan cepat menyerang komponen seluler di sekelilingnya dan berakibat pada kerusakan sel sehingga berujung kanker (Winarsi, 2007). Tubuh manusia secara alamiah sudah memiliki mekanisme pertahanan antioksidan yang efektif untuk menangkal radikal bebas. Namun, mekanisme tersebut terkadang tidak bisa mengatasi radikal bebas yang berlebihan di dalam tubuh, sehingga dibutuhkan antioksidan tambahan dari makanan seperti buah-buahan maupun sayur-sayuran (Erguder, dkk., 2007).

Pengobatan kanker dengan antioksidan menguatkan kebenaran secara ilmiah hadits Nabi Muhammad yang berbunyi sebagai berikut:

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

Artinya: “Setiap penyakit ada obatnya. Maka bila obat itu mengenai penyakit akan sembuh dengan izin Allah Azza wa Jala” (HR. Muslim no.575)

Hadits tersebut menjelaskan bahwa Allah pasti menurunkan obat untuk semua penyakit dengan kata kunci داء yang berarti penyakit dan دواء yang berarti obat.

Penyakit yang dimaksudkan disini adalah segala macam penyakit, baik secara lahir maupun batin, begitu pula dengan obatnya. Seperti halnya dengan penyakit kanker, atas izin Allah dapat dicegah dan diobati dengan menangkal radikal bebas yang berlebihan di dalam tubuh melalui antioksidan. Winarsi (2007) menjelaskan

bahwa antioksidan terkandung dalam bahan pangan dan bekerja sebagai *free radical scavenger* yang mampu mencegah atau menghambat kerusakan oksidatif dalam tubuh. Di Indonesia, Allah telah melimpahkan berbagai bahan pangan yang kaya akan antioksidan seperti buah-buahan, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai agen terapi kanker (Winarsi, 2007).

Salah satu buah yang mengandung antioksidan adalah pisang. Secara khusus, Allah menyebutkan pisang dalam QS. Al-Waqiah (56): 29;

وَطَلْحٍ مَّنْضُودٍ ﴿٢٩﴾

Artinya: “.... dan pohon pisang yang bersusun-susun (buahnya)”.

Kata *طلح منضود*, diartikan oleh sebagian besar ulama sebagai pohon pisang (al-Qurthubi, 2008; Abdullah, 1994; Quthb, 2008; al-Jazari, 2009; al-Qarni, 2010). Kata *الطلح* ada yang memahaminya pohon pisang atau pohon kurma. Banyak juga yang melukiskan sebagai pohon yang batangnya sangat kuat, dahannya panjang dan tinggi, memiliki duri yang banyak dan aroma yang harum (Shihab, 2006). Az-Zajjaj *dalam* al-Qurthuby (2008) mengatakan bahwa pohon itu ada di dalam surga namun duri-durinya telah dibuang. As-Suddi *dalam* al-Qurthuby (2008) menambahkan bahwa pohon *الطلح* surga adalah pohon *الطلح* dunia, akan tetapi pohon *الطلح* surga memiliki buah yang lebih manis dari madu (al-Qurthubi, 2008).

Penyebutan ‘pisang’ dalam QS. Al-Waqiah ayat 29 ini menunjukkan keistimewaan buah pisang sebagai buah surga. Salah satu keistimewaan dari buah pisang adalah tingginya kandungan antioksidan dan serat, khususnya pada kulit

buahnya. Wachirasiri (2009) menyatakan bahwa kandungan serat pada buah memiliki kualitas yang lebih baik daripada makanan lainnya dan dapat mencegah penyakit kanker terutama pada kulit pisang yang memiliki kandungan serat 50 g/ 100 g berat kering (Wachirasiri, Julakarangka dan Wanlapa, 2009) Kelebihan pada kulit buah pisang juga didukung oleh penelitian Someya (2002) yang melaporkan bahwa gallokatekin pada bagian kulit buah pisang (*Musa Cavendish*) 158 mg/ 100 g berat kering sedangkan pada daging buahnya 29.6 mg/ 100 g berat kering. Tingginya gallokatekin (kelompok flavonoid) dari ekstrak kulit buah pisang menunjukkan potensi kulit buah pisang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (Someya dkk., 2002). Ali (2008) berpendapat bahwa antioksidan alami yang utama berasal dari kelompok senyawa fenolik seperti flavonoid, dan salah satu turunannya, senyawa katekin, dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker, bukan sel normal (Ali dkk., 2008; Cos dkk., 2003).

Kulit pisang di satu sisi memiliki kandungan antioksidan yang tinggi, namun disisi lain, antioksidan kulit pisang belum banyak dimanfaatkan oleh masyarakat. Winarsi (2007) menyampaikan bahwa produk alam Indonesia yang bersifat antioksidan sangatlah berlimpah dan belum dimanfaatkan secara optimal (Winarsi, 2007). Melihat hal tersebut, diperlukan kajian dan pemanfaatan lebih lanjut terkait potensi kulit pisang dengan kandungan antioksidannya yang tinggi sebagai alternatif agen terapi kanker lain yang memiliki efek samping pada sel normal. Hal ini juga didukung keamanan dalam mengkonsumsi kulit pisang sebab konsentrasi dari hidrogen sianida, zat yang sangat beracun (1,33 mg/g) dan

kandungan oksalat (0,51 mg/g) dalam kulit pisang berada dalam batas aman (Wachirasiri, Julakarangka dan Wanlapa, 2009).

Aktifitas antioksidan pada kulit buah pisang kepok termasuk tinggi dibandingkan dengan pisang yang lain. Atun, dkk (2007) mengemukakan bahwa ekstrak kulit pisang kepok memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dengan kemampuan menghambat 50% oksidasi pada konsentrasi 693,15 mg/ml dibandingkan dengan ekstrak kulit pisang ambon yang menghambat 50% oksidasi pada konsentrasi 5000 mg/ml (Rosdiana, 2014). Ekstrak kulit pisang kepok juga mengandung antioksidan cukup tinggi dengan aktivitas 95,14% (Supriyanti dkk., 2015) dibandingkan dengan ekstrak etanol kulit pisang goroho sebesar 75,71% (Alhabsyi dkk., 2014).

Tingginya aktifitas antioksidan pada kulit pisang kepok dimungkinkan karena terdapat senyawa-senyawa hasil metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antioksidan, seperti flavonoid (katekin, gallokatekin dan epikatekin), tannin, terpenoid, alkaloid, saponin, dan kuinon (Fitrianingsih dan Purwanti, 2012; Saraswati, 2015; Someya dkk., 2002; Supriyanti dkk., 2015). Zhang (2015) menjelaskan bahwa senyawa-senyawa fitokimia yang telah teridentifikasi, termasuk tannin, flavon, triterpenoid, steroid, saponin, dan alkaloid memiliki peran perlindungan yang berhubungan dengan aktifitas antioksidan (Zhang dkk., 2015). Aktifitas antioksidan berhubungan kuat dengan potensi sebagai agen terapi penyakit kanker. Efek ini diperoleh melalui berbagai jalur, salah satunya adalah kemampuan menginduksi apoptosis.

Induksi apoptosis oleh senyawa-senyawa bioaktif dapat melalui beberapa mekanisme molekuler. Mekanisme tersebut dapat melalui penurunan *reactive oxygen species* (ROS) dan modulasi *signaling pathways* dengan menurunkan ekspresi Bcl-2 dan Bcl-XL serta meningkatkan ekspresi gen Bax dan Bak. Peningkatan protein Bax bersama-sama dengan protein lain seperti protein p53 akan mengaktifkan *cytochrom C* yang dilepas dari mitokondria dan selanjutnya akan terjadi aktivasi berantai terhadap *caspase 9-caspase 3*. *Caspase-3* merupakan enzim yang diperlukan pada fase eksekusi dan berperan memberikan efek berupa perubahan morfologi dan biokimia yang tampak pada sel. Kemampuan ini disebabkan karena *caspase-3* mampu berikatan dengan DNase bebas sehingga DNase bergerak ke inti. Pergerakan ini mengakibatkan rusaknya DNA dan berakhir pada kematian sel (CCRC, 2007; Cryns & Yuan, 1998; Meiyanto, 2002; Ren dkk., 2003).

Program induksi apoptosis yang dapat menyebabkan kematian pada sel kanker membuat banyak kelompok ilmuwan tertarik untuk mengembangkan terapi antikanker melalui program induksi apoptosis (Matsushita dkk., 2005). Pendekatan terapi kanker telah dilakukan dengan menghambat perkembangan sel kanker, baik melalui induksi apoptosis maupun penghambatan daur sel yang dapat teramati secara *in vitro* (Saphiro dan Harper, 1999 dalam Dai, 2014). Secara *in vitro*, T-47D *cell line* merupakan sel kanker payudara manusia yang dapat dijadikan model untuk menguji sitotoksik suatu senyawa terhadap apoptosis sel. Sel ini dipilih dengan beberapa alasan, satu diantaranya adalah sel kanker T-47D mampu memperlihatkan kondisi apoptosis yang disebabkan oleh termutasinya gen

p53 (Schafer dkk., 2000). Selain itu, sel kanker payudara T-47D ini memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (Burdall dkk., 2003).

Berbagai studi melaporkan adanya kemampuan menginduksi apoptosis sel kanker payudara T-47D oleh senyawa-senyawa antioksidan seperti flavonoid, tannin, dan terpenoid. Beberapa senyawa tersebut terkandung tanaman herba pacar air (IC_{50} 97,493 $\mu\text{g/ml}$), daun sirsak (IC_{50} 17,149 $\mu\text{g/mL}$), dan *Selaginella plana* (IC_{50} 4 $\mu\text{g/mL}$) (Handayani dkk., 2012; Rachmani, 2012; Rahmawati dan Muti, 2013). Maryati (2006) melaporkan bahwa senyawa flavonoid dapat memacu terjadinya apoptosis pada sel T-47D dengan meningkatkan ekspresi p53 dan Bax (Maryati, 2006). Namun, untuk pengujian induksi apoptosis sel T-47D oleh kulit pisang kepok belum pernah dilakukan sedangkan disisi lain kandungan antioksidannya yang tinggi diduga memiliki potensi kuat menginduksi apoptosis pada sel kanker. Hal ini yang kemudian mendukung perlunya dilakukan penelitian ini untuk menguji potensi ekstrak kulit pisang kepok sebagai kandidat agen terapi kanker payudara melalui metode *MTT assay* dan *flow cytometry*.

Metode *MTT assay* yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan enam variasi konsentrasi (1000 $\mu\text{g/ml}$; 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62.5 $\mu\text{g/ml}$, dan 31.25 $\mu\text{g/ml}$) dan kontrol positif dengan *Doxorubicin*. Melalui metode *MTT assay* dapat diketahui potensi ekstrak kulit pisang sebagai induktor apoptosis sel kanker berdasarkan viabilitas sel setelah sel diberi ekstrak kulit pisang. Selain itu, nilai IC_{50} yang didapatkan juga bisa menunjukkan potensi sitotoksik dari senyawa yang terkandung di dalamnya. Semakin besar nilai IC_{50}

maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Nugroho, 2012) dan pada penelitian ini, diharapkan ekstrak kulit pisang memiliki nilai IC_{50} rendah sehingga berpotensi toksik terhadap sel kanker payudara T-47D.

Metode *flow cytometry* yang digunakan pada penelitian ini menggunakan Annexin V/PI. Propidium iodide (PI) banyak digunakan bersamaan dengan Annexin V untuk menentukan apakah sel hidup, apoptosis, atau nekrosis dengan cepat melalui perbedaan integritas dan permeabilitas membran plasma (Rieger dkk, 2011). Proses apoptosis secara morfologis berbeda dari nekrosis pada berbagai karakteristik. Apoptosis bergantung pada energi dan proses aktivasi caspase sementara nekrosis tidak melibatkan energi dan ekspresi gen, melainkan merupakan proses spontan pasif (Rastogi dkk., 2009). Pengamatan hasil data *flow cytometry* dapat diketahui dari jumlah sel hidup, sel apoptosis, dan sel nekrosis yang terdapat pada setiap kuadran dan disajikan dalam bentuk persen (%).

Hal tersebut yang kemudian melatar belakangi pentingnya melakukan penelitian ini sehingga dapat diketahui potensi kulit pisang sebagai kandidat terapeutik kanker payudara. Potensi kulit pisang ini dapat diketahui melalui nilai IC_{50} dan persentase sel apoptosis akibat efek sitotoksik dari bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak kulit pisang terhadap sel T-47D secara *in vitro*. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait potensi kulit pisang kepok sebagai satu dari beberapa sumberdaya alam Indonesia untuk alternatif terapi kanker yang efektif, ekonomis, mudah diperoleh dan dapat mengurangi efek samping yang ditimbulkan oleh agen kemoterapi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, dapat dirumuskan pertanyaan pada penelitian ini adalah:

1. Berapakah nilai IC_{50} ekstrak kulit pisang kepok terhadap sel T-47D?
2. Berapakah persentase sel T-47D yang mengalami apoptosis setelah pemberian ekstrak kulit pisang kepok?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui nilai IC_{50} ekstrak kulit pisang kepok terhadap sel T-47D.
2. Untuk mengetahui persentase sel T-47D yang mengalami apoptosis setelah pemberian ekstrak kulit pisang kepok

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai potensi ekstrak kulit pisang kepok secara *in vitro* dalam menginduksi kematian sel T-47D sehingga dapat dimanfaatkan sebagai kandidat agen terapi kanker payudara.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Sampel yang digunakan adalah kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) jenis kuning (merah) muda yang diambil dari satu pohon yang sama di Desa Belahanrejo, Kedamean, Gresik, Jawa Timur dengan ciri ukuran sedang, kulit buahnya sangat tebal, berwarna hijau dan bergetah.

2. Sel yang digunakan adalah T-47D *cell line* dari koleksi Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, UGM Yogyakarta, yang diinkubasi dalam medium RPMI-1640.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker

2.1.1 Tinjauan Umum

Kanker adalah penyakit yang disebabkan oleh sel-sel yang berubah dan berkembang tak terkendali (American Cancer Society, 2016). Pertumbuhan sel yang abnormal ini (tumbuh sangat cepat, tidak terkontrol, dan tidak berirama) dapat menyusup dan menekan ke jaringan tubuh yang normal sehingga dapat mempengaruhi fungsi tubuh (Diananda, 2009). Sel kanker mempunyai ciri dapat memperbanyak diri secara berlebihan (berproliferasi), berdiferensiasi (menjadi pembuluh darah) dan memiliki daya tahan sel (kemampuan untuk tetap hidup dan tidak mati sehingga muncul benjolan) (Nurhayati dan Destyningtias, 2010).

Faktor resiko penyakit kanker dapat disebabkan oleh beberapa hal, seperti yang dipublikasikan oleh Kementerian Kesehatan RI Tahun 2015, yakni faktor genetik, faktor karsinogen, diantaranya seperti zat kimia, radiasi, virus, hormon, dan iritasi kronis, serta faktor perilaku/gaya hidup seperti merokok, pola makan yang tidak sehat, konsumsi alkohol, dan kurang aktivitas fisik. Penyakit ini dapat menyerang segala macam umur dan jenis kelamin. Berdasarkan hasil Riset Kesehatan Dasar Tahun 2013 oleh Kementerian Kesehatan RI, hampir semua kelompok umur penduduk memiliki prevalensi penyakit kanker yang cukup tinggi. Prevalensi penyakit kanker tertinggi berada pada kelompok umur 75 tahun

ke atas, yaitu sebesar 5,0% dan prevalensi terendah pada anak kelompok umur 1-4 tahun dan 5-14 tahun sebesar 0,1% (Kementrian Kesehatan RI, 2015).

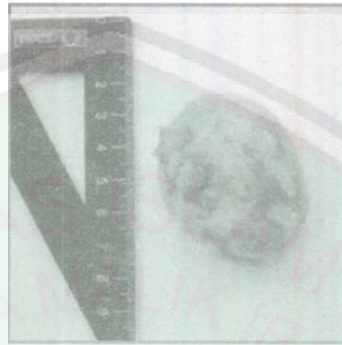
Semua lapisan masyarakat tanpa mengenal status sosial, umur, dan jenis kelamin dapat terserang penyakit kanker. Dari segi status sosial, penyakit ini dapat menyerang orang kaya, miskin, berpendidikan tinggi, maupun orang-orang yang tidak berpendidikan. Anak-anak, remaja, dan orang dewasa, begitu pula dengan pria dan wanita juga dapat terserang penyakit kanker. Namun, berdasarkan data yang ada diperkirakan sekitar 60% penderita kanker di Indonesia adalah wanita (Mardiana, 2007) dan kanker payudara adalah jenis kanker yang paling umum diderita oleh kaum wanita (Fadilah dkk., 2016).

2.1.2 Kanker Payudara

Kanker payudara menjadi pembunuh nomer satu di Indonesia. Setiap tahunnya diperkirakan terdapat 100 penderita baru per 100.000 penduduk yang ada di Indonesia. Berdasarkan Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2007, kanker payudara menempati urutan pertama pasien rawat inap di seluruh Rumah Sakit di Indonesia dengan persentase 16,85%, disusul kanker leher rahim 11,78% (Departemen Kesehatan, 2010 *dalam* Baswedan, 2014).

Kanker payudara adalah penyakit dimana sel-sel tubuh berubah bentuk dan fungsinya. Sel abnormal yang tumbuh '*out of control*' ini pada mulanya adalah tumor payudara (Gambar 2.1) dan dapat menjadi tumor ganas. Tumor ganas mempunyai sifat yang khas, yaitu dapat menyebar luas ke bagian lain di seluruh tubuh untuk berkembang menjadi tumor baru. Penyebaran ini disebut metastase. Saat tumor menyebar ke sekitar jaringan maupun organ, maka sel-sel ini berubah

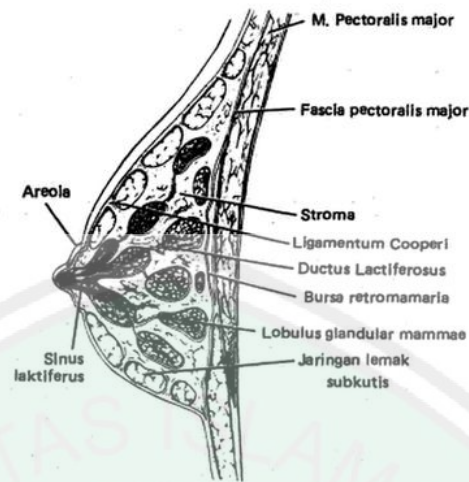
menjadi sel kanker. Potensi metastase ini diperbesar oleh perubahan genetik. Jika tidak diobati, kebanyakan kanker mengarah ke rasa sakit dan bahkan kematian (Nurhayati dan Lusiyanti, 2006; Nurhayati dan Destyningtias, 2010).



Gambar 2.1 Jaringan kanker payudara (Sumber: Rasjidi, 2010)

Kanker payudara menyerang pada jaringan payudara, namun tidak menyerang kulit payudara yang berfungsi sebagai pembungkus. Kanker payudara menyebabkan sel dan jaringan payudara berubah menjadi abnormal dan bertambah banyak secara tidak terkendali (Mardiana, 2007). Secara mammografi, kanker payudara dikenali dengan keberadaan lesi massa atau mikrokalsifikasi (Hartadi, Santoso dan Hidayatno, 2011).

Payudara merupakan kelenjar yang sering dikenal dengan nama *glandula mammae*. Organ ini terdiri atas 15-20 lobus atau jaringan yang dipisahkan oleh serabut-serabut fibrosa (Megawati, 2012). Penamaan kanker payudara berdasarkan pada area yang pertama kali munculnya sel kanker, baik di bagian duktus (86%) maupun bagian lobular (12%) (Gambar 2.2). Selain itu, sel kanker dapat terletak pada satu area (noninvasine/karsinoma in situ) atau menyebar mengelilingi payudara (invasive) (Keitel dan Kopala, 2000).



Gambar 2.2 Anatomi payudara (Sumber: Sabiston, 1995)

2.1.3 Faktor Penyebab

Proses timbulnya kanker payudara merupakan kejadian kompleks yang melibatkan berbagai faktor, sehingga penyebab pasti kanker payudara belum diketahui (Indrati, 2005). Secara garis besar, penyakit kanker dapat disebabkan baik oleh faktor eksternal (infeksi, radiasi, zat kimia tertentu, tembakau) maupun faktor internal (mutasi, hormon, kondisi sistem imun), yang keduanya dapat memicu terjadinya proses karsinogenesis (pembentukan kanker) (Kurniasih dkk., 2015).

Adanya infeksi kronis dan peradangan diperkirakan berkontribusi pada satu dari empat kasus kanker di seluruh dunia. Infeksi kronis dan peradangan menimbulkan respon inflamasi yang menghasilkan radikal bebas dan kemudian dapat merusak sel epitel dan stroma tetangga yang sehat. Radikal bebas dapat memodulasi pertumbuhan sel tumor melalui jalur transduksi sinyal, dan mengakibatkan induksi transkripsi *proto oncogen* yang terlibat dalam perangsang

pertumbuhan sel. Proses ini dapat mendorong karsinogenesis dengan mengubah target dan jalur yang penting untuk homeostasis jaringan normal (Hussain, Hofseth dan Harris, 2003).

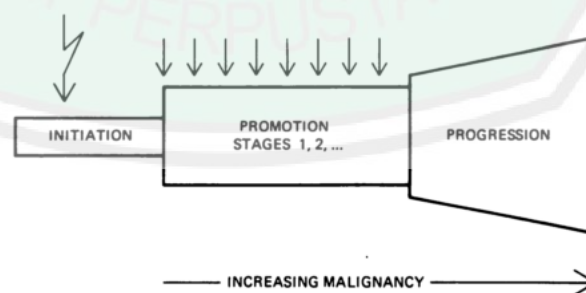
Hipotesis peran radikal bebas dalam karsinogenesis berasal dari penelitian *in vitro* yang menjelaskan peran radikal bebas dalam kerusakan DNA serta perubahan struktur dan fungsi protein. Salah satu radikal bebas, hidrogen peroksida (H_2O_2), dapat menginduksi fragmentasi kromosom dengan kehadiran *peroxidation activator*, $Fe_2(SO_4)_3$. Selain DNA, protein seperti *DNA-repair enzyme* yang terlibat dalam transduksi sinyal, modulator apoptosis dan protein p53 dapat juga berubah baik secara struktural maupun fungsional, bila terkena radikal bebas. Hal ini terbukti setelah paparan $NO\cdot$ dan derivatifnya, protein p53 mengalami perubahan. Selain itu, *DNA-repair* dan molekul transduksi sinyal, seperti *DNA-protein kinase*, diaktifkan oleh paparan $\cdot NO$. Radikal bebas $\cdot NO$ dan turunannya, mampu menyebabkan mutasi pada gen terkait kanker, menginduksi ekspansi klonal pada sel yang mutasi atau menyimpang, dan mempromotori angiogenesis. Hal ini terjadi karena $\cdot NO$ dapat bertindak sebagai inisiator dan promotor endogen pada proses pembentukan kanker pada manusia sehingga berpengaruh besar pada karsinogenesis, termasuk cekpoin siklus sel, apoptosis, dan perbaikan DNA (Hussain, Hofseth dan Harris, 2003).

2.1.4 Mekanisme Pembentukan Kanker

Sel kanker terbentuk melalui perubahan genetik rangkap/ganda dalam sel induk dari suatu organ tubuh. Sel kanker payudara yang pertama dapat tumbuh menjadi tumor sebesar 1 cm pada waktu 8-12 tahun. Sel kanker tersebut diam

pada kelenjar payudara dan dapat bersembunyi di dalam tubuh selama bertahun-tahun tanpa diketahui, menyebar melalui aliran darah ke seluruh tubuh dan tiba-tiba aktif menjadi tumor ganas atau kanker (Nurhayati dan Lusiyanti, 2006; Nurhayati dan Destyningtias, 2010).

Prinsip utama dalam studi tentang mekanisme pembentukan kanker (karsinogenesis) adalah proses yang berlangsung melalui beberapa tahap yakni *initiation*, *promotion*, dan *progression* (Gambar 2.3). Transisi antara tahap-tahap ini didorong oleh faktor eksogen dan endogen yang berbeda serta melibatkan mekanisme biokimia dan elemen genetik yang berbeda pula. Beberapa jenis bahan kimia memulai proses karsinogenik dengan menghasilkan spesies yang sangat reaktif yang berikatan kovalen dengan DNA sel. Agen ini mengubah urutan dan fungsi DNA selama proses replikasi dan transkripsi dengan mengaktifkan enzim selular tertentu, yaitu *protein kinase C* (PKC) (enzim yang memainkan peran penting dalam kontrol pertumbuhan). Hal ini mengakibatkan perubahan dalam membran dan pada akhirnya perubahan dalam diferensiasi dan proliferasi sel (Weinstein, 1988).



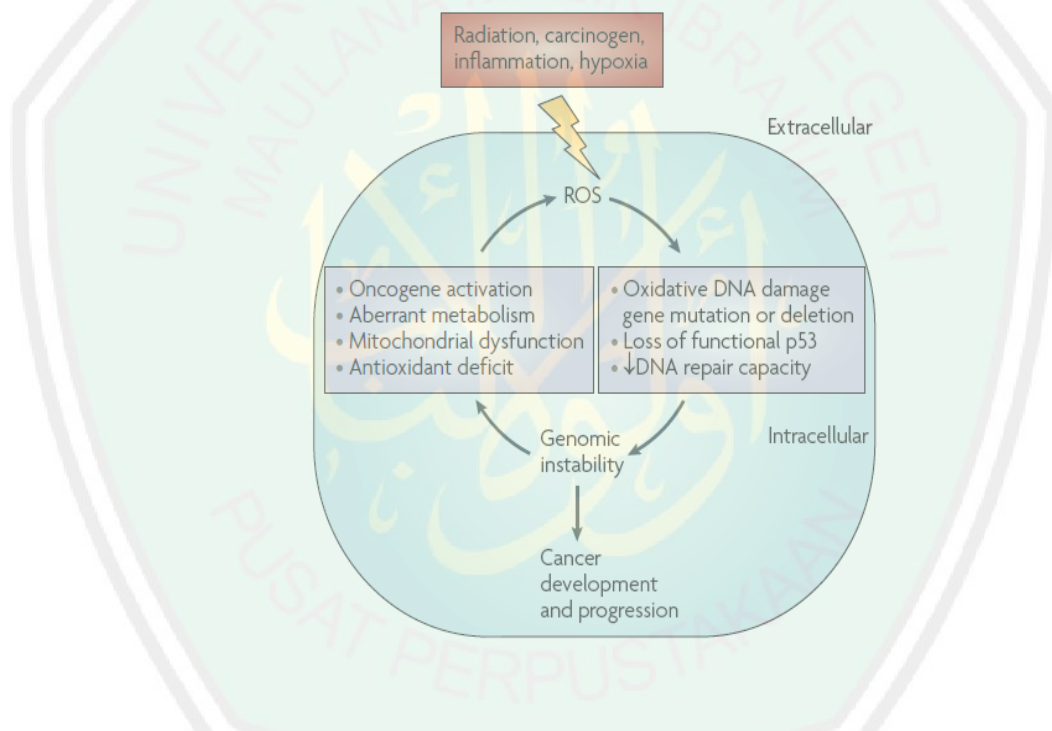
Gambar 2.3 Tahapan karsinogenesis (Sumber: Weinstein, 1988)

Tahapan-tahapan dalam karsinogenesis, yakni (Weinstein, 1988; Cipto, 2001; Miller, 2008):

- a. Inisiasi, tahap terjadinya paparan terbatas dari karsinogen dalam waktu singkat dan ireversibel. Karsinogen ini disebut inisiator. Tanpa adanya rangsangan karsinogen lebih lanjut sel yang telah terinisiasi ini tidak akan tumbuh menjadi sel tumor, tetapi perubahan ini tetap tinggal dalam sel turunannya (progeni). Tahapan inisiasi hanya membutuhkan sekali paparan tunggal agen karsinogen dan sudah menyebabkan kerusakan DNA.
- b. Promosi, terjadi setelah inisiasi dan timbul karena paparan berulang dengan bahan non karsinogenik (promotor). Efek promotor bersifat reversibel, jadi perubahan di jaringan bersifat sementara. Promotor memperpendek lama waktu yang dibutuhkan untuk pembentukan tumor setelah terpapar karsinogen, sedangkan promotor sendiri bukan mutagenik. Pada tahap ini terjadi perkembangbiakan pada sel yang rusak, hal ini terjadi ketika sel-sel yang mengalami mutasi itu terkena zat karsinogen yang mendorong terjadinya pembelahan secara cepat.
- c. Progresi, lebih ditandai munculnya neoplasma ganas diikuti perubahan genetik nyata yang melibatkan perubahan struktur dalam inti sel. Tahapan ini terjadi akibat paparan inisiator yang berulang-ulang. Tahapan progresi melibatkan konversi tumor jinak ke ganas dan tingkat keganasan tumor ini sering terus meningkat.

Sel kanker memiliki tingkat *reactive oxygen species* (ROS) yang meningkat dibandingkan dengan sel normal lainnya. *Reactive Oxygen Species*

(ROS) adalah molekul reaktif kimiawi yang memiliki fungsi penting dalam organisme hidup. ROS yang paling umum adalah *hydrogen peroxide* (H_2O_2), *superoxide ion* (O_2^-), dan *hydroxide radical* (OH^\cdot). Peningkatan ROS dapat menyebabkan proliferasi dan diferensiasi sel, sedangkan jumlah yang berlebihan dari ROS dapat menyebabkan kerusakan oksidatif lipid, protein dan DNA yang dapat menghasilkan aktivitas karsinogenik (Seifried, dkk., 2007; Trachootham, Alexandre dan Huang, 2009).



Gambar 2.4 Stres ROS pada perkembangan sel kanker (Sumber: Trachootham, Alexdanre dan Huang, 2009)

Gambar 2.4 menggambarkan efek ROS pada perkembangan sel kanker. *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dihasilkan dari sumber ekstraseluler atau intraseluler dapat menyebabkan mutasi atau delesi DNA, disfungsi p53, dan penurunan kemampuan sel dalam perbaikan DNA. Hal ini berakibat pada aktivasi

onkogen, stres metabolik, disfungsi mitokondria dan penurunan antioksidan. Peristiwa ini dapat meningkatkan kandungan ROS yang pada akhirnya akan menyebabkan kerusakan DNA dan terjadi perkembangan sel kanker (Trachootham, Alexdanre dan Huang, 2009).

ROS atau radikal dapat beraksi dengan dua cara yakni ketika radikal bebas bertemu dengan radikal bebas atau ketika radikal bebas bertemu non-radikal. 1) Jika dua radikal bebas bertemu, mereka dapat menggabungkan elektron mereka yang tidak berpasangan dan membuat ikatan kovalen (sepasang elektron bersama). Contohnya adalah *superoxide* dengan *nitric oxide* menjadi *peroxynitrite*. Pada pH fisiologis, *peroxynitrite* merusak langsung protein, dan terurai menjadi produk beracun seperti gas nitrogen dioksida ($\text{NO}_2\cdot$), radikal hidroksil, dan ion nitronium (NO_2^+). 2) Setiap radikal bebas reaktif yang dihasilkan cenderung bereaksi dengan non-radikal, sebab sebagian besar molekul dalam tubuh tidak radikal. Ketika bereaksi radikal bebas dengan non-radikal, sebuah radikal bebas berantai dihasilkan dan radikal baru terbentuk. Jika radikal hidroksil yang dihasilkan dekat dengan DNA, mereka bisa menyerang basa purin dan pirimidin dan menyebabkan mutasi. Misalnya, guanin diubah menjadi 8-*hydroxyguanine* dan produk lainnya (Halliwell, 1994).

Radikal bebas dalam jumlah normal bermanfaat bagi kesehatan misalnya, memerangi peradangan, membunuh bakteri, dan mengendalikan organ-organ dalam tubuh. Sementara dalam jumlah berlebih mengakibatkan stress oksidatif. Keadaan tersebut dapat menyebabkan kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel, jaringan, hingga ke organ tubuh yang mempercepat terjadinya proses penuaan dan

munculnya penyakit seperti kanker, diabetes mellitus, dan lain-lain. Pada pengobatan penyakit-penyakit ini, terapi antioksidan memiliki kepentingan yang besar, sebab antioksidan dibutuhkan untuk menunda atau menghambat reaksi oksidasi oleh radikal bebas (Rana, dkk., 2010; Kurniasih, dkk., 2015).

Peran antioksidan dalam proses fisiologis yang normal adalah transduksi sinyal, regulasi proliferasi dan respon imun. ROS telah dikaitkan dengan penyakit kanker dan antioksidan telah dipertimbangkan sebagai terapi yang menjanjikan untuk pencegahan dan pengobatan penyakit kanker (Seifried, dkk., 2007). Salah satu mekanisme aksi antioksidan yang sudah berhasil diungkap adalah sitotoksik (penghambatan siklus pembelahan sel) dan induksi apoptosis (merangsang proses bunuh diri sel kanker) (Kurniasih, dkk., 2015).

2.1.5 Terapi Kanker

Kanker yang menyerang wanita pada dasarnya dapat diobati dengan berbagai cara. Selama ini, cara yang banyak ditempuh oleh para penderita adalah dengan pengobatan medis melalui operasi, radioterapi, kemoterapi, hormonal terapi dan imunoterapi. Selain pengobatan secara medis, saat ini telah berkembang pengobatan dengan menggunakan tanaman obat. Terbukti tanaman obat mampu mengurangi dan menghambat perkembangan sel kanker dalam tubuh. Bahkan tidak sedikit penderita kanker yang sembuh total setelah mengonsumsi ramuan tanaman obat dalam jangka waktu tertentu. Pada prinsipnya tanaman obat yang digunakan dalam pengobatan kanker berfungsi menghambat pertumbuhan kanker, menghancurkan kanker, dan memperbaiki fungsi organ vital yang rusak oleh kanker. Namun, penggunaan tanaman sebagai salah satu alternatif

pencegahan dan penyembuhan kanker masih membutuhkan penelitian lebih lanjut oleh para ahli (Mardiana, 2007).

Allah telah berjanji dalam Al-quran surah asy-Syu'ara (26):80;

وَإِذَا مَرَضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ

Artinya : “Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan Aku”.

Kata *وَإِذَا مَرَضْتُ* atau “dan apabila aku sakit” menggunakan kata *idza* (*apabila*) yang mengandung makna besarnya kemungkinan atau bahkan kepastian terjadinya apa yang dibicarakan, dalam hal ini adalah sakit. Ini mengisyaratkan bahwa sakit berat atau ringan, fisik atau mental merupakan salah satu keniscayaan hidup manusia. Namun demikian, dalam hal penyembuhan, secara tegas Allah menyatakan bahwa yang melakukannya adalah Allah, Tuhan semesta alam (Shihab, 2006).

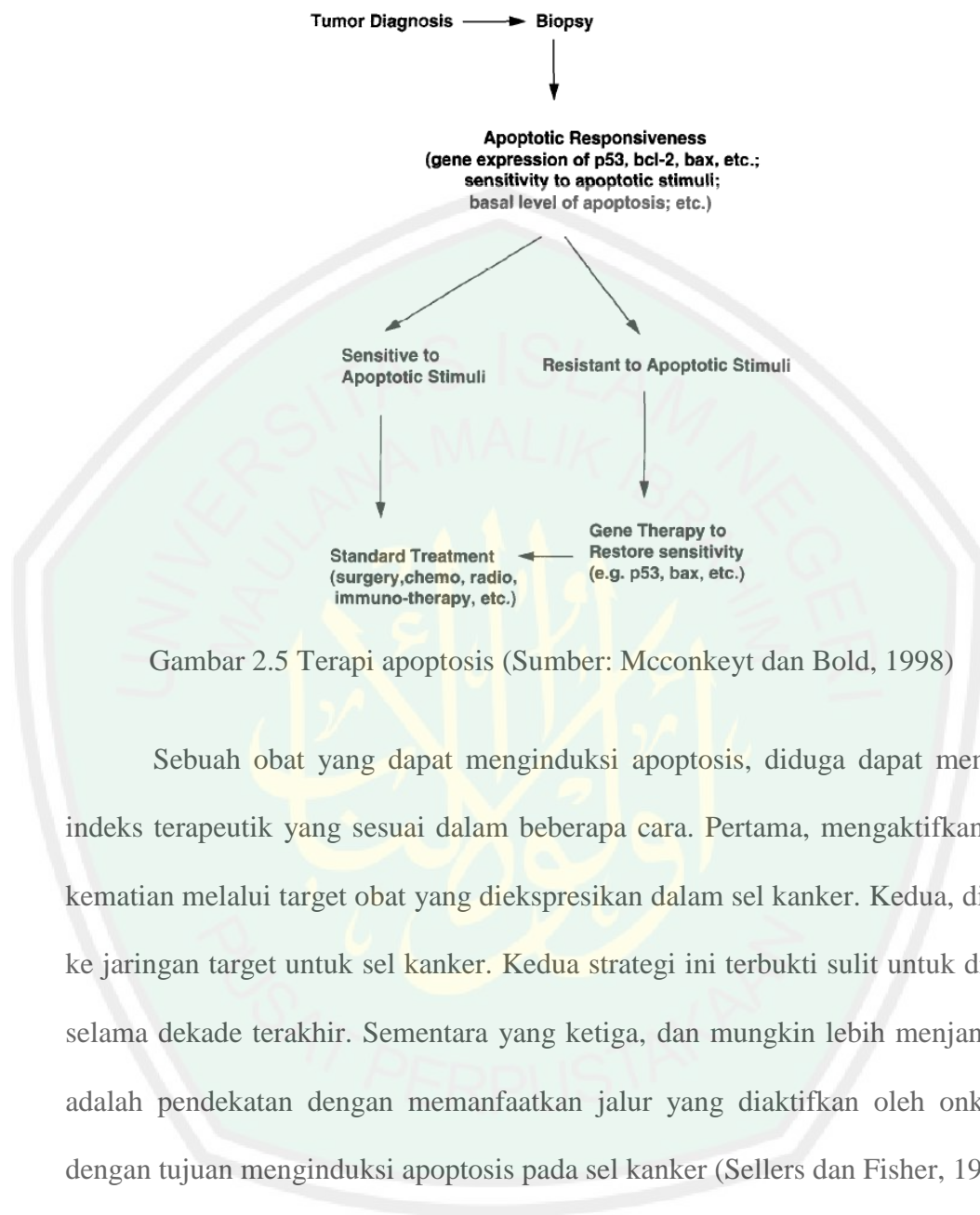
Ayat tersebut maksudnya yaitu seberat apapun penyakit yang diderita oleh seseorang, yang menyembuhkan adalah Allah SWT dan peran manusia dalam hal ini adalah untuk menggali ilmu Allah SWT mengenai obat yang tepat untuk penyakit tersebut dengan cara memikirkannya. Para ahli biologi kanker sekarang berfokus pada jalur molekuler kematian sel kanker untuk mendapatkan keberhasilan dalam pengobatan. Pendekatan terapi kanker dapat dilakukan melalui pemacuan apoptosis dan penghambatan daur sel yang dapat teramati secara *in vitro* (Saphiro dan Harper, 1999 dalam Dai, 2014).

Pengobatan antikanker dengan menggunakan obat sitotoksik dilakukan dengan cara mengaktifkan program apoptosis dan respon stres seluler serta

menghambat proliferasi sel. Target seluler untuk berbagai agen sitotoksik beragam, diantaranya adalah menjadi agen penghancur DNA (siklofosamid, cisplatin, doksorubisin), antimetabolit (metotreksat, 5-fluorourasil), inhibitor mitosis (vincristine), analog nukleotida (6-mercaptopurine), atau penghambat topoisomerase (etoposida). Agen-agen tersebut menginduksi apoptosis dengan cara menginisiasi molekul-molekul untuk mengembalikan keseimbangan sel (Herr, dkk., 2014).

Apoptosis, atau kematian sel terprogram, adalah mekanisme dimana sel mengalami kematian untuk mengendalikan proliferasi sel atau sebagai respons terhadap kerusakan DNA. Pemahaman apoptosis telah memberikan dasar untuk target terapi baru yang dapat menyebabkan kematian pada sel kanker atau membuat sel-sel tersebut peka terhadap agen sitotoksik dan terapi radiasi yang ada. Agen-agen baru ini termasuk yang menargetkan jalur ekstrinsik seperti reseptor ligan tumor nekrosis yang terkait dengan apoptosis, dan yang menargetkan jalur instrinsik famili Bcl-2 seperti *antisense bcl-2 oligonucleotides* (Ghobrial, Witzig dan Adjei, 2005).

Peran apoptosis dalam perkembangan kemoterapi dan radioterapi kanker akan mempengaruhi perkembangan pengobatan di masa depan. Terapi ini akan dipengaruhi pada dua area yang berbeda: (1) terapi berdasarkan karakteristik molekuler apoptosis dari tumor spesifik yang mengarah pada terapi lebih lanjut, dan (2) teknik terapi gen yang diarahkan pada jalur apoptosis yang akan digunakan (Mcconkey dan Bold, 1998).



Gambar 2.5 Terapi apoptosis (Sumber: Mcconkey dan Bold, 1998)

Sebuah obat yang dapat menginduksi apoptosis, diduga dapat mencapai indeks terapeutik yang sesuai dalam beberapa cara. Pertama, mengaktifkan jalur kematian melalui target obat yang diekspresikan dalam sel kanker. Kedua, dikirim ke jaringan target untuk sel kanker. Kedua strategi ini terbukti sulit untuk dicapai selama dekade terakhir. Sementara yang ketiga, dan mungkin lebih menjanjikan, adalah pendekatan dengan memanfaatkan jalur yang diaktifkan oleh onkogen, dengan tujuan menginduksi apoptosis pada sel kanker (Sellers dan Fisher, 1999).

2.1.6 Apoptosis

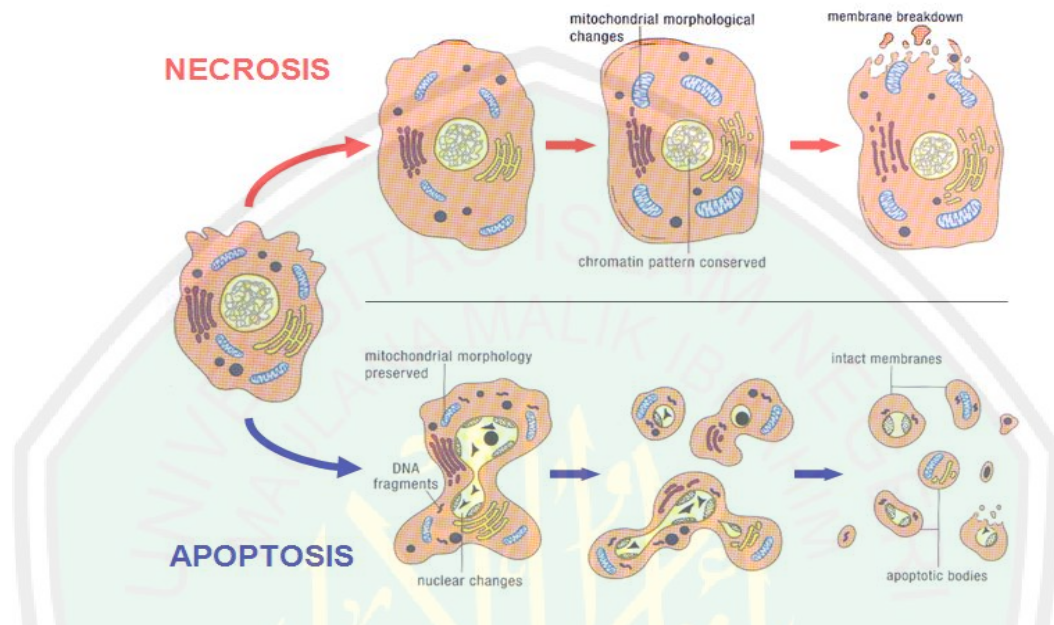
Kematian sel pada awalnya dikenal dengan nekrosis dan onkosis. Namun, setelah berkembangnya biologi molekuler, kematian sel dapat dilihat lebih mendalam melalui apoptosis (Sudiana, 2008). Apoptosis atau kematian sel yang

terprogram merupakan pengembangan dan pemeliharaan kesehatan pada organisme multiseluler. Sel yang mati ini merupakan respon terhadap berbagai stimulus dan selama apoptosis, sel ini dikontrol dan diregulasi, kemudian sel yang mati difagosit oleh makrofag (Lumongga, 2008).

Proses kematian sel (apoptosis) digambarkan oleh karakteristik morfologi, penyusutan nukleus, perubahan membran sel, kondensasi kromatin, dan fragmentasi nukleus (Schmitt dan Lowe, 1999). Secara morfologis, apoptosis ditandai dengan beberapa ciri yaitu adanya integritas membran, sel mengkerut karena berkurangnya sitoplasma, kondensasi nukleus dan fragmentasi sel, serta terbentuknya badan-badan apoptotik. Badan-badan apoptotik ini mengandung ribosom, mitokondria, dan bahan-bahan lain baik dari nukleus maupun sitosol, yang akan difagositosis oleh makrofag sehingga tidak menimbulkan inflamasi (Shi, 2004).

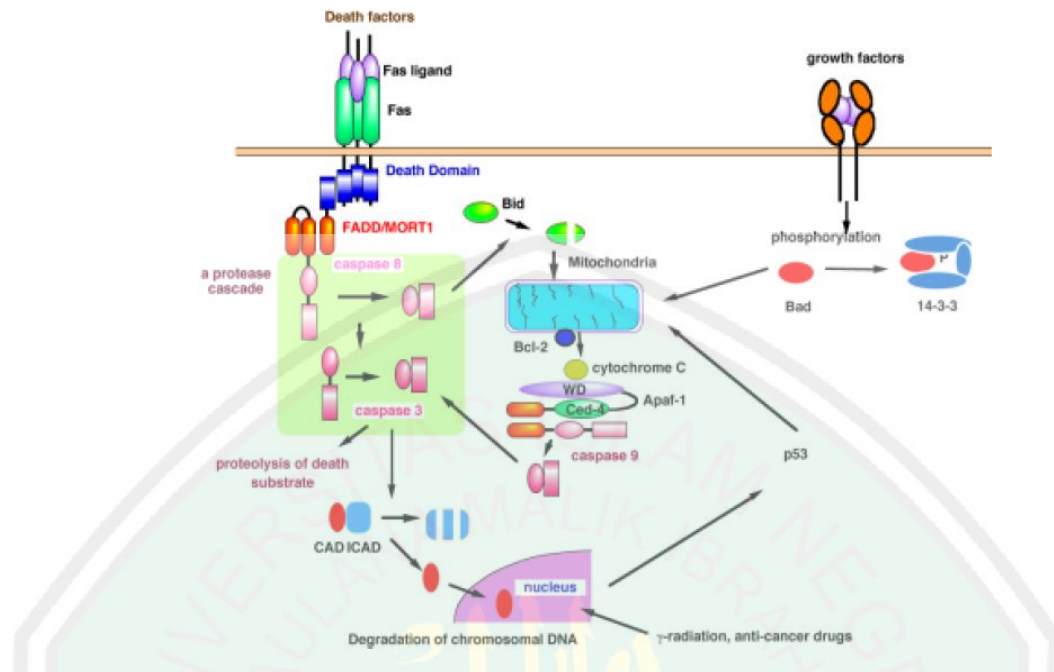
Apoptosis berbeda dengan nekrosis, pada nekrosis terjadi kematian sel yang tak terkontrol (Gambar 2.6). Nekrosis sendiri adalah kematian sel karena adanya kerusakan sistem membran yang disebabkan aktifitas suatu enzim lisozim. Sel yang mati pada nekrosis akan membesar dan kemudian hancur dan lisis pada suatu daerah yang merupakan respon terhadap inflamasi (Lumongga, 2008; Sudiana, 2008). Nekrosis terjadi bila sel terkena hipotermia, hipoksia, atau senyawa-senyawa kimia dan mikroorganisme yang menyebabkan kerusakan membran sel sehingga terjadi kegagalan homeostasis. Selanjutnya diikuti dengan masuknya air dan ion-ion di sekitar sel yang menyebabkan pembengkakan sel, rusaknya organel, dan pecahnya membran sel, sehingga seluruh kandungan sel

keluar ke cairan ekstraseluler. Kerusakan jaringan yang meluas pada nekrosis ini menyebabkan inflamasi (Guimarães CA, 2004).



Gambar 2.6 Perbedaan apoptosis dan nekrosis (Sumber: CCRC, 2007)

Kematian sel apoptosis dipicu oleh faktor intraseluler (seperti kerusakan DNA dan stres osmotik) dan faktor ekstraseluler (seperti *actor withdrawal*, *matrix detachment*, dan *direct cytokine-mediated killing*). Ada dua jalur utama yang terlibat dalam proses apoptosis, yakni yang melibatkan aktivasi protease caspase atau ekstrinsik dan melalui jalur mitokondria atau instrinsik (Gambar 2.7) (Sellers dan Fisher, 1999).



Gambar 2.7 Transduksi sinyal apoptosis (Sumber: CCRC, 2007)

Peristiwa apoptosis jalur ekstrinsik dimulai dari adanya pelepasan molekul sinyal yang disebut ligan oleh sel lain tetapi bukan berasal dari sel yang akan mengalami apoptosis. Ligan tersebut berikatan dengan *death receptor* yang terletak pada transmembran sel target yang menginduksi apoptosis. *Death receptor* yang terletak di permukaan sel adalah famili reseptor *TNF (Tumor Necrosis Factor)*, yang meliputi *TNF-R1*, *CD 95 (Fas)*, dan *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL)-R1* dan *R2* (CCRC, 2007).

Ligan yang berikatan dengan reseptor akan mengaktifkan caspase inisiator 8 setelah membentuk trimer dengan adaptor FADD (Fas Associated Death Domain). DED (*death effector domain*) dari FADD mengikat pro-caspase 8. Kompleks yang terbentuk disebut DISC (*death-inducing signaling complex*), kompleks ini mengaktifasi pro-caspase 8 menjadi caspase 8. Caspase 8 yang

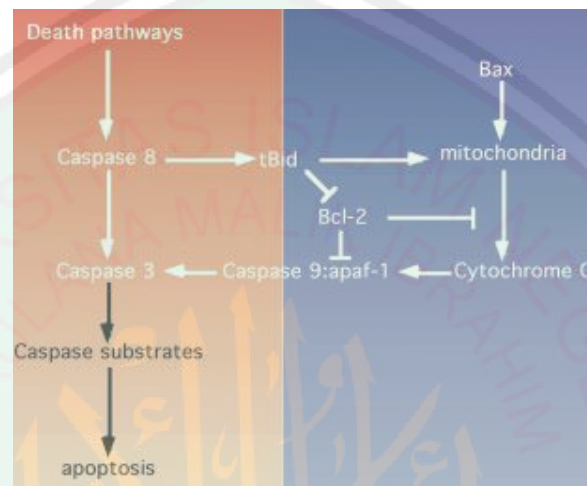
teraktivasi (heterotetramer) dilepaskan dari DISC ke sitoplasma. Caspase 8 termasuk caspase inisiator yang akan mengaktivasi caspase eksekutor terutama melalui pro-caspase menjadi caspase 3 yang merupakan caspase efektor yang melaksanakan apoptosis.

Apoptosis jalur instrinsik diinduksi oleh keadaan stress mitokondria yang disebabkan oleh senyawa kimia atau kehilangan faktor pertumbuhan, sehingga menyebabkan gangguan pada mitokondria dan terjadi pelepasan sitokrom c dari intermembran mitokondria. Protein caspase-8 akan memotong anggota famili Bcl-2 yaitu Bid. Kemudian Bid yang terpotong pada bagian ujungnya akan menginduksi insersi Bax dalam membran mitokondria dan melepaskan molekul proapoptotik seperti sitokrom c. Adanya dATP akan terbentuk kompleks antara sitokrom c, APAF-1 dan caspase 9 yang disebut apoptosom. Selanjutnya, caspase 9 akan mengaktifkan *downstream procaspase-3* dan caspase 3 menjadi aktif.

Protein caspase 3 yang aktif memecah berbagai macam substrat, diantaranya enzim *DNA repair* dan DNA protein kinase. Selain itu, caspase 3 juga mempunyai kemampuan untuk mengaktifkan caspase lainnya, seperti procaspase-6 dan procaspase-7 yang memberikan amplifikasi terhadap kerusakan seluler. Adanya gangguan stres seluler, meningkatkan ekspresi dari protein p53 yang mengakibatkan terjadinya *G1 arrest* atau apoptosis.

Kedua jalur proses apoptosis, baik ekstrinsik maupun instrinsik saling berhubungan dalam proses apoptosis sel (Gambar 2.8). Contohnya, caspase 8 memecah anggota famili Bcl-2, yang dikenal dengan Bid untuk menghasilkan

truncated Bid (*tBid*). Sebaliknya, *tBid*, bekerja sama dengan *Bax* untuk menginduksi pelepasan *cytochrome c*, yang menyebabkan caspase adaptor APAF-1 mengaktifkan caspase 9 dan caspase 3. Aktivasi caspase 3 berujung pada apoptosis sel (Sellers dan Fisher, 1999).

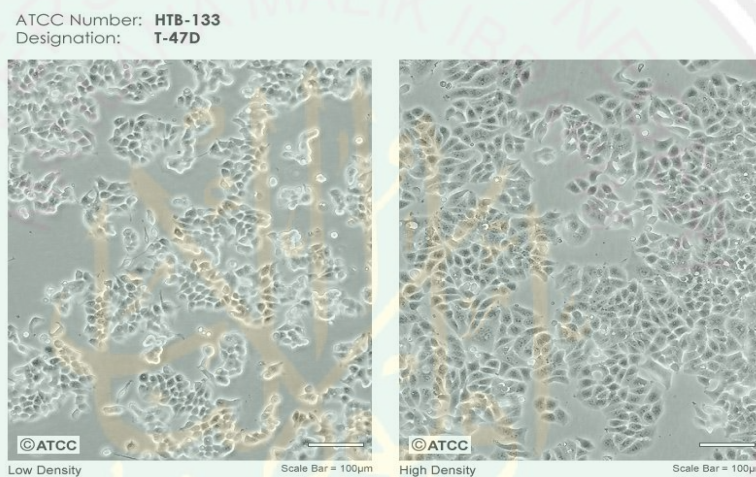


Gambar 2.8 Dua jalur utama apoptosis (Sumber: Sellers dan Fisher, 1999)

2.1.7 Sel Kanker T-47D

Sel T-47D termasuk *continous cell line*. *Continous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, dan memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas (Dwitiyanti, 2015). *Cell lines* banyak digunakan dalam penelitian laboratorium dan khususnya model *in vitro* dalam penelitian kanker. *Cell lines* memiliki beberapa keunggulan; misalnya, mudah untuk ditangani dan mewakili sumber replikasi diri yang tak terbatas yang dapat tumbuh dalam jumlah hampir tak terbatas. Selain itu, penggunaan *cell line* sebagai sumber kultur dapat mengurangi penggunaan hewan coba. Ketersediaan sel tunggal dalam jumlah cukup besar dalam kultur dapat memberikan keuntungan untuk purifikasi bahan alami maupun rekombinan (Murayama, dkk., 2001).

Sel T47D dipilih sebab merupakan sel yang paling sensitif terhadap ekstrak kasar (Nursid, Fajarningsih dan Chasanah, 2013). Sel T-47D menunjukkan tingkat homogenitas yang relatif tinggi dan mudah diganti dari stok beku jika hilang melalui kontaminasi. Namun, ada kelemahan; misalnya *cell lines* rentan terhadap genotipe dan fenotipe *drift* selama kultur yang terus-menerus. Hal ini terutama pada *cell lines* yang lebih sering digunakan dan disimpan selama bertahun-tahun (Burdall, dkk., 2003).



Gambar 2.9 Sel kanker payudara T-47D (Sumber: PBCF, 2012)

Sel T-47D merupakan sel kanker payudara yang diambil dari jaringan payudara wanita dewasa berumur 54 tahun yang terkena *ductal carcinoma*. Morfologi sel T-47D termasuk dalam sel epitel (Gambar 2.9). Media pertumbuhan yang digunakan dalam kultur sel T-47D adalah RPMI dengan penambahan serum janin sapi (*fetal bovine serum*) (ATCC, 2015). Media ini mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel. Medium RPMI 1640 berguna untuk memberikan nutrisi yang dibutuhkan sel supaya sel dapat bertahan hidup dan dapat memperbanyak diri (Dwitiyanti, 2015).

Sitosol dari sel T-47D mengandung reseptor spesifik berafinitas tinggi untuk hormon estradiol, progesteron, glucocorticoid dan androgen. Sel T-47D juga mengekspresikan reseptor estrogen (ER positif) serta mengekspresikan gen p53 yang termutasi pada residu 194 (dalam *zinc-binding domain* L2) sehingga p53 kehilangan fungsinya. Jika p53 tidak dapat mengikat *response element* pada DNA, maka akan mengurangi atau menghilangkan kemampuannya dalam meregulasi siklus sel dan memacu apoptosis (Keydar, dkk., 1979; Schafer, dkk., 2000).

Hilangnya fungsi p53, melalui mekanisme mutasi atau non mutasi, akan mengganggu stabilitas genom dan hilangnya faktor utama yang menghambat tumbuhnya tumor. Suatu tumor yang mengandung sel-sel dengan p53 termutasi lebih agresif dan lebih mudah bermetastase dibandingkan p53 normal. Jadi, hilangnya fungsi p53 menyebabkan sel-sel mengalami kerusakan DNA dan tidak dapat diperbaiki atau dimusnahkan melainkan berlanjut ke replikasi DNA yang rusak dan berujung pada pertumbuhan sel kanker (Istindiah dan Auerkari, 2002).

Sel T-47D sering digunakan pada penelitian *in vitro*, terutama uji sitotoksik. Pengamatan sel T-47D yang mengalami apoptosis dapat dilakukan dengan pemberian *tryphan blue* dan pengamatan di bawah mikroskop *inverted*, teknik MTT *assay* melalui nilai IC_{50} atau pewarnaan *double staining* melalui pengamatan morfologi DNA inti sel. Berikut adalah contoh gambar sel T-47D yang mati dan hidup dengan pewarnaan *tryphan blue* (Gambar 2.10). Jika sel T-47D mati maka akan terjadi kerusakan membran, sehingga *tryphan blue* akan masuk ke dalam sel dan berikatan dengan protein sehingga sel yang mati akan tampak biru. Sel yang hidup karena membran plasmanya masih utuh maka protein

dalam sel tidak akan berikatan dengan *tryphan blue* sehingga sel kelihatan mengkilap (Nurani, 2012).



Gambar 2.10 Sel T-47D (a) hidup; (b) mati (Sumber: Sumardika dkk., 2010)

Satu diantara beberapa contoh riset penggunaan model *cancer cell line* pada uji sitotoksisitas adalah riset yang dilakukan oleh Fajarningsih, dkk (2008). Hasil uji penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak makroalga *Turbinaria decurrens* terhadap *cell line* HeLa dan T-47D mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel tumor HeLa (LC50 ekstrak kasar = 29,9 ppm), namun tidak efektif terhadap sel T-47D (LC50 ekstrak kasar >1.000 ppm) (Fajarningsih dkk., 2008). Contoh penelitian lain adalah ekstrak daun sukun yang memiliki senyawa flavonoid dengan berbagai jenis pelarut terhadap sel T-47D. Hasil penelitian dari keempat ekstrak (etanol, heksana, etil asetat, butanol) dan senyawa turunan flavonoid (AC-5-1, AC-3-1, siklokomunol) yang diujikan menunjukkan bahwa sampel yang memiliki efek sitotoksik paling baik melalui mekanisme induksi apoptosis ditunjukkan oleh ekstrak etil asetat (60.54%) dan senyawa AC-5-1 (25.47%), hasil isolasi dari ekstrak etil asetat (Nurhayati, 2012).

Penelitian ini tidak menggunakan sel MCF-7 sebab sel MCF-7 merupakan sel kanker yang resisten terhadap agen kemoterapi, *wild type* p53 dan mutasi caspase-3 (Meiyanto, Susidarti dan Hdanayani, 2008). Sedangkan mayoritas penderita kanker termasuk jenis kanker payudara adalah yang mutasi pada gen p53, yakni lebih dari 50% kanker manusia (Nenutil, dkk., 2005; Smardova, Smarda dan Koptikova, 2005). Smardova, dkk (2005) melaporkan bahwa mutasi pada gen p53 banyak dijumpai menyertai penyimpangan genetik selama karsinogenesis pada sebagian besar jenis kanker dan *cancer derived cell lines* (Smardová, Pavlova dan Svitáková, 2005).

2.2 Pisang Kepok

2.2.1 Tinjauan Umum

Pisang merupakan buah tropis yang tersedia sepanjang tahun. Kulitnya berwarna hijau atau kuning, menjadi lembut dan mudah dikupas setelah masak. Bentuknya bulat panjang, rasanya manis jika sudah matang. Buah pisang mengandung flavonoid, gula, tepung, protein, lemak, dan kaya akan vitamin (A, B, C dan E), mineral (kalium, kalsium, fosfor dan besi), pektin, serotonin, 5-hidroksi triptamin, dopamin dan noradrenalin (Dalimartha, 2011). Daging dan kulit buah pisang termasuk sumber antioksidan alami karena mengandung provitamin A, karotenoid, fenolat, dan senyawa amina (Pereira dan Maraschin, 2015). Kandungan gizi dan senyawa-senyawa tersebut yang kemudian menjadi dasar penggunaan kulit pisang untuk berbagai macam manfaat. Allah berfirman dalam Al-Qur'an Surat Luqman (31):10;

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۗ وَأَلْقَىٰ فِي الْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَن تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا
 مِن كُلِّ دَابَّةٍ ۗ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١١٠﴾

Artinya: “Dia menciptakan langit dan bumi tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang, dan kami turunkan air hujan dari langit, lalu kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik”.

Al-Jaziri (2008) berpendapat bahwa lafadz زَوْجٌ mempunyai arti ‘jenis’, sedangkan lafadz كَرِيمٌ mempunyai arti ‘mulia dan banyak manfaatnya’, sehingga lafadz مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ berarti ‘setiap jenis dari tumbuh-tumbuhan yang indah, bermanfaat dan tidak membahayakan’. Menurut Shihab (2002), lafadz كَرِيمٌ digunakan untuk mensifati segala sesuatu yang baik sesuai objeknya. Tumbuhan yang baik adalah tumbuhan yang bermanfaat bagi makhluk hidup, termasuk tumbuhan yang dapat digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit.

Tumbuhan-tumbuhan obat dapat tumbuh dan berkembang dengan baik melalui air hujan yang diturunkan oleh Allah SWT. Tumbuhan-tumbuhan tersebut mempunyai banyak manfaat bagi makhluk hidup lainnya, termasuk pohon pisang yang dapat dimanfaatkan baik batangnya, bunganya, daunnya, buahnya, dan bahkan kulit buahnya. Kulit buah yang umumnya langsung dibuang menjadi limbah ternyata dapat bermanfaat di berbagai bidang, seperti untuk bahan pembuatan etanol, dapat menurunkan kadar glukosa darah, bahan pembuatan plastik *biodegradable* dan *edible film*, dan lain-lain. Vitasari (2013) menambahkan bahwa manfaat kulit pisang yang dapat diambil diantaranya dapat

meningkatkan kadar serotonin, baik untuk kesehatan mata, sebagai antioksidan alami, mampu memurnikan air dan logam berat dalam tubuh, meredakan nyeri, mengatasi gatal pada kulit dan mempercepat kesembuhan luka (Vitasari, 2013).

Pemanfaatan lebih lanjut dari kulit pisang dilakukan pada penelitian ini untuk mengetahui potensi dari kulit pisang kepok dengan kandungan gizi dan aktifitas antioksidannya untuk alternatif terapi kanker payudara. Sulaiman (2011) melaporkan bahwa nilai gizi dari kulit pisang lebih tinggi dibandingkan dengan buahnya sehingga penelitian lebih lanjut dibutuhkan untuk mengetahui aplikasi praktis dalam pemanfaatan yang lebih baik dari kulit pisang (Sulaiman dkk., 2011).

Berbagai penelitian yang telah dilakukan mendukung pernyataan bahwa kandungan senyawa antioksidan pada kulit buah pisang lebih tinggi daripada buahnya. Someya (2002) melaporkan bahwa nilai total fenolik pada kulit buah pisang sebesar 907 mg/100 g berat kering sedangkan pada buahnya sebesar 232 mg/100 g berat kering. Selain itu, dengan menggunakan HPLC, diketahui bahwa kandungan senyawa *Gallocatechin* pada kulit buah pisang yakni 158 mg/100 g berat kering sedangkan pada buah pisang hanya 29,6 mg/100 g berat kering (Someya, Yoshiki dan Okubo, 2002). Selain itu, Kanazawa (2000) juga melaporkan bahwa senyawa dopamin pada kulit pisang sebesar 80-560 mg/ 100 g sedangkan pada buahnya 2,5-10 mg/ 100 g (Kanazawa dan Sakakibara, 2000).

Kulit pisang yang digunakan pada penelitian ini yakni dari jenis pisang kepok merah (kuning) yang masih muda (Gambar 2.11). Daging buahnya yang sudah tua akan berwarna kuning, bertekstur agak keras, lebih manis dan enak

dibandingkan kepok putih. Kulit buah pisang kepok sangat tebal dan berwarna hijau kekuningan pada buah yang sudah masak (Cahyono, 2009) sedangkan pada buah yang masih muda, kulitnya berwarna hijau dan bergetah.



Gambar 2.11 Buah pisang kepok (Sumber: Dokumen pribadi)

Klasifikasi tanaman pisang kepok yang digunakan pada penelitian ini, sebagaimana hasil identifikasi tanaman di LIPI (Lampiran 2) adalah sebagai berikut (Backer dan Van den Brick, 1968; Cronquist, 1981):

- Kingdom : Plantae
- Divisio : Magnoliophyta
- Classis : Liliopsida
- Sub class : Zingiberidae
- Ordo : Zingiberales
- Familia : Musaceae
- Genus : Musa
- Spesies : *Musa balbisiana* (ABB) cv. Pisang kepok

Alasan utama pemilihan pisang kepok pada penelitian ini adalah adanya aktivitas antioksidan yang tinggi yakni sebesar 95,14% (Supriyanti, Sudana dan Rosdiana, 2015). Kapasitas antioksidan dari pisang terutama disebabkan oleh komponen seperti flavonoid (Darsini dkk., 2012). Flavonoid ini memiliki berbagai macam efek biologis, seperti penghambatan berbagai macam enzim hingga ikut mempengaruhi berbagai hormon. Aksi tersebut yang kemudian membuat flavonoid memiliki potensi terapeutik yang besar (Rohima, Astuti dan Ghufron, 2011).

Supriyanti (2011) melaporkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak kulit pisang ditentukan melalui uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit pisang dilakukan pada panjang gelombang 517 nm. Senyawa antioksidan yang terdapat pada ekstrak kulit pisang salah satunya yaitu epikatekin yang merupakan golongan senyawa flavonoid. Berdasarkan hasil yang diperoleh, aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit pisang kepok sebesar 95,14%. Dengan demikian, aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit pisang kepok cukup baik dalam menahan radikal bebas DPPH, sehingga ekstrak kulit pisang kepok sangat berpotensi sebagai sumber antioksidan (Supriyanti dkk., 2015).

Ada dua macam antioksidan, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintesis. Kulit buah pisang merupakan satu dari beberapa sumber antioksidan alami. Antioksidan alami kini menjadi alternatif yang sangat dibutuhkan sebab ada kekhawatiran akan kemungkinan efek samping yang belum diketahui dari antioksidan sintetik (Rohdiana, 2001). Antioksidan alami banyak ditemukan pada

tanaman dan lebih diminati karena tingkat keamanan yang lebih baik dan manfaat yang lebih luas di bidang makanan dan kesehatan (Hudaya, 2013).

Kulit buah pisang telah menjadi daya tarik untuk bahan baku pengembangan obat karena kaya akan senyawa bioaktif. Diantara banyak sumber senyawa bioaktif, kulit pisang dianggap sebagai salah satu tanaman yang kaya akan senyawa fitokimia bernilai tinggi terutama antioksidan. Kulit pisang matang mengandung antosianin delphinidin dan sianidin, serta katekolamin. Kulit pisang mentah mengandung leukosianidin dan flavonoid yang dapat mempercepat penyembuhan luka pada kulit, mengobati puting payudara dan maag lambung pada manusia. Studi dengan tikus telah menunjukkan kemampuan pisang mentah untuk mencegah dan mengobati maag lambung. Agen aktif dalam pisang mentah larut dalam air dan menjadi tidak aktif pada pisang masak (Pereira dan Maraschin, 2015). Pada penelitian ini jenis pisang yang digunakan adalah pisang kepok yang belum matang atau masih muda dengan warna kulit yang hijau dan bergetah.

2.2.2 Kandungan Bahan Aktif

Bahan aktif atau senyawa fitokimia adalah bahan kimia yang berasal dari tanaman. Dalam arti sempit istilah ini sering digunakan untuk menggambarkan sejumlah besar senyawa metabolik sekunder yang ditemukan pada tumbuhan. Fitokimia sering dikenal dapat memberikan perlindungan terhadap serangan serangga dan penyakit tanaman. Mereka juga menunjukkan sejumlah fungsi proliferasi bagi konsumen (manusia) (Iqbal, 2011). Senyawa fitokimia atau metabolit sekunder dalam tumbuhan yang berasal dari golongan senyawa fenolik atau polifenolik, nitrogen, saponin, kuinon, tanin, steroid atau triterpenoid,

saponin, turunan senyawa asam hidroksiamat, kumarin, vitamin, dan asam organik dipercaya sebagai senyawa antioksidan (Hudaya, 2013).

Bahan aktif yang terdapat pada buah-buahan dapat diketahui melalui uji fitokimia atau uji bahan aktif. Menurut Hayati (2008) dalam Asriyanti (2011), uji fitokimia merupakan uji kualitatif kandungan senyawa pada tumbuhan tingkat tinggi, sehingga dapat diketahui senyawa yang terdapat didalamnya. Iqbal (2011) melaporkan bahwa penggunaan metode fitokimia adalah sangat penting, yakni untuk menyaring dan menganalisis komponen bioaktif, tidak hanya untuk mengontrol kualitas simplisia, tetapi juga sebagai penjas mekanisme terapi (Iqbal, 2011).

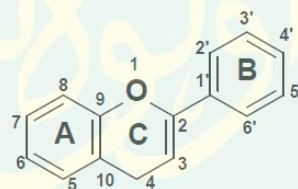
Berdasarkan beberapa penelitian uji fitokimia yang telah dilakukan, diketahui bahwa kulit pisang kepok mengandung beberapa senyawa fitokimia berupa flavonoid, tannin, saponin, terpenoid, kuinon, alkaloid, steroid, serotonin, dan dopamin (Saraswati, 2015). Berikut penjelasan terkait bahan aktif yang terkandung dalam kulit pisang kepok.

a. Flavonoid

Flavonoid merupakan satu dari beberapa kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆ (Gambar 2.12) (Redha, 2010). Golongan-golongan flavonoid yaitu seperti antosianin, proantosianidin, flavonol, flavon, glikoflavon, biflavonil, khalkon dan auron, flavanon, dan isoflavon. Flavonoid ditemukan pada tumbuhan sebagai

campuran beberapa golongan, sehingga jarang sekali dijumpai flavonoid tunggal dalam jaringan tumbuhan (Harborne,1996).

Senyawa fenolik ini dapat menghambat berbagai tahapan dalam proses karsinogenesis dengan mempengaruhi molekul dalam tahapan karsinogenesis: inisiasi, promosi dan progresi. Flavonoid dapat meningkatkan ekspresi-komponen proapoptotik dalam menginisiasi perkembangbiakkan sel dan mencegah atau menghambat perkembangan tumor (Ramos, 2007). Ekstrak kulit buah pisang memiliki kandungan turunan flavonoid yakni gallokatekin yang melimpah (GE: 106.6 $\mu\text{g/mL}$). Gallokatekin termasuk kelompok terbesar fenol alami dengan potensi antioksidan sehingga ekstrak kulit pisang mampu mencegah kerusakan oksidatif pada struktur seluler dengan mengontrol tingkat ROS (Pereira dan Maraschin, 2015).



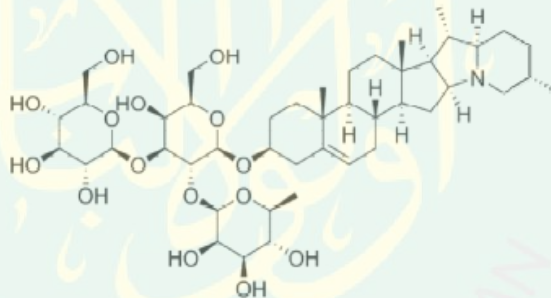
Gambar 2.12 Struktur senyawa flavonoid (Sumber: Jo dkk., 2016)

Atun (2007) melaporkan bahwa berdasarkan analisis data spektrum IR senyawa isolat dari kulit pisang kepok mentah menunjukkan adanya gugus hidroksil (3450 cm^{-1}), C=C aromatik ($1587\text{--}1514\text{ cm}^{-1}$), dan benzena tersubstitusi ($819,7\text{ cm}^{-1}$). Pola spektrum IR tersebut mengindikasikan senyawa isolat dari kulit pisang kepok mentah adalah golongan flavanoid (5,6,7,4- tetrahidroksi- 3,4-

flavan- diol). Sedangkan pada kulit pisang kepok matang merupakan senyawa baru turunan sikloheksenon, dari golongan keton monoterpen (Atun dkk., 2010).

b. Saponin

Saponin adalah glikosida triterpena dan sterol (Gambar 2.13) dan telah terdeteksi dalam lebih dari 90 suku tumbuhan. Saponin bersifat seperti sabun, serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah (Harborne, 1996). Saponin dapat dideteksi dengan uji busa dalam air panas. Busa yang stabil selama 30 menit dan tidak hilang pada penambahan 1 tetes HCl 2 N menunjukkan adanya saponin dikarenakan saponin bersifat polar (Harborne, 1984).



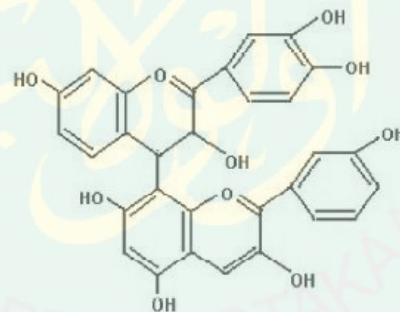
Gambar 2.13 Struktur senyawa saponin (Sumber: Septiana dan Asnani, 2012)

Trouillas, dkk (2005) melaporkan bahwa senyawa diosgenin, turunan saponin dapat mengubah siklus sel dan menginduksi apoptosis pada berbagai *cell line* kanker manusia. Diosgenin menyebabkan penghambatan pada pertumbuhan sel dengan *cycle arrest* dan induksi apoptosis melalui aktivasi p53 (Trouillas, dkk., 2005).

c. Tanin

Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang diketahui mempunyai beberapa khasiat yaitu sebagai antidiare, antibakteri dan antioksidan. Tanin merupakan komponen zat organik yang sangat kompleks, terdiri dari senyawa fenolik yang sukar dipisahkan dan sukar mengkristal, mengendapkan protein dari larutannya dan bersenyawa dengan protein tersebut (Gambar 2.14) (Desmiaty dkk., 2008 dalam Malangi, 2012).

Li (2003) melaporkan bahwa senyawa tanin, baik total tanin atau senyawa tanin murni, memiliki aktivitas yang besar dalam pencegahan kanker dan antikanker. Aktivitas ini membuat senyawa tanin dapat digunakan untuk pengembangan bahan agen pencegah kanker atau skrining obat-obatan antikanker (Li, H; Wang, Z; Liu, 2003).



Gambar 2.14 Struktur senyawa tanin (Sumber: Septiana dan Asnani, 2012)

d. Alkaloid

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam (Gambar 2.15). Hampir seluruh alkaloid berasal dari tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan tingkat tinggi. Sebagian besar alkaloid terdapat pada tumbuhan dikotil sedangkan untuk

tumbuhan monokotil dan pteridofita mengandung alkaloid dengan kadar yang sedikit (Widodo, 2007).

Alkaloid telah dikenal selama bertahun-tahun dan telah menarik perhatian terutama karena pengaruh fisiologinya terhadap mamalia dan pemakaiannya di bidang farmasi (Padmawinata, 1995). Suatu penelitian menunjukkan bahwa senyawa alkaloid dari *Lamellarin D* memiliki sifat sitotoksik yang ampuh dalam tindakan antitumor melalui dua jalur yang saling melengkapi, yakni rute nukleus melalui penghambatan topoisomerase I. *Lamellarin D* menginduksi apoptosis nukleus pada sel-sel leukemia tanpa *cell cycle arrest*. Sinyal yang dikirimkan oleh *Lamellarin D* menginisiasi apoptosis melalui jalur intrinsik dengan menginduksi aktivasi konformasi dari Bax dan menurunkan tingkat ekspresi protein antiapoptosis Bcl-2 dan cIAP2 yang terkait dengan aktivasi caspase-9 dan caspase-3 (Ballot dkk., 2009).



Gambar 2.15 Struktur senyawa alkaloid (Sumber: Harborne, 1987)

2.3 Mekanisme Induksi Apoptosis Sel T-47D

Konsumsi buah-buahan dan sayuran telah dikaitkan dengan penurunan resiko penyakit kronis seperti kanker. Senyawa fitokimia dalam buah-buahan dan sayuran berpotensi menjadi senyawa bioaktif utama yang bermanfaat bagi kesehatan (Sun dkk., 2002). Berbagai mekanisme yang berbeda dari aksi fitokimia telah diteliti oleh para peneliti. Senyawa fitokimia dapat menghambat

mikroorganisme, mengganggu beberapa proses metabolisme atau dapat memodulasi ekspresi gen dan jalur transduksi sinyal. Fitokimia baik digunakan sebagai agen kemoterapi yang dapat membalikkan atau menghambat tumorigenesis yang berlaku untuk terapi kanker, karena mekanisme molekulernya yang umum untuk agen pencegahan dan terapi kanker (Doughari, 2012).

Agen kemopreventif alami, diantaranya adalah flavonoid dari kelompok polifenol, dapat menghentikan fase G1. Penundaan daur sel ini melalui penghambatan aktivasi *cyclin-CDK* maupun protein kinase lainnya merupakan efek antiproliferatif dari senyawa antikanker tersebut. Efek antiproliferatif dibutuhkan pada sel kanker, sebab p53 pada sel kanker teraktifasi yang mengakibatkan proliferasi sel yang berlebihan. *Retinoblastoma* (Rb) dan protein p53 sebagai penekan tumor merupakan protein yang berperan penting dalam pengaturan siklus sel sebagai materi antiproliferasi maupun sebagai pengatur proses apoptosis karena adanya kerusakan DNA (Pan dkk., 2002).

Flavonoid telah menarik perhatian para peneliti karena sifat antikankernya. Mekanismenya cukup beragam seperti menstimulasi pengeluaran TNF-alpha, menghambat proliferasi sel, menginduksi apoptosis, dan menahan siklus sel serta menghambat oksidasi lipoprotein (Othman, 2012). Kandungan senyawa kimia flavonoid diduga merupakan senyawa antioksidan kuat yang berpotensi mencegah terkena resiko kanker dan memproteksi perkembangan sel kanker (Sudewo, 2012). Flavonoid pada kedelai, buah, dan sayuran memiliki kemampuan mencegah terikatnya hormon untuk pertumbuhan kanker (Suryo, 2010). Senyawa golongan flavonoid pada daun pandanwangi mampu menghambat proses

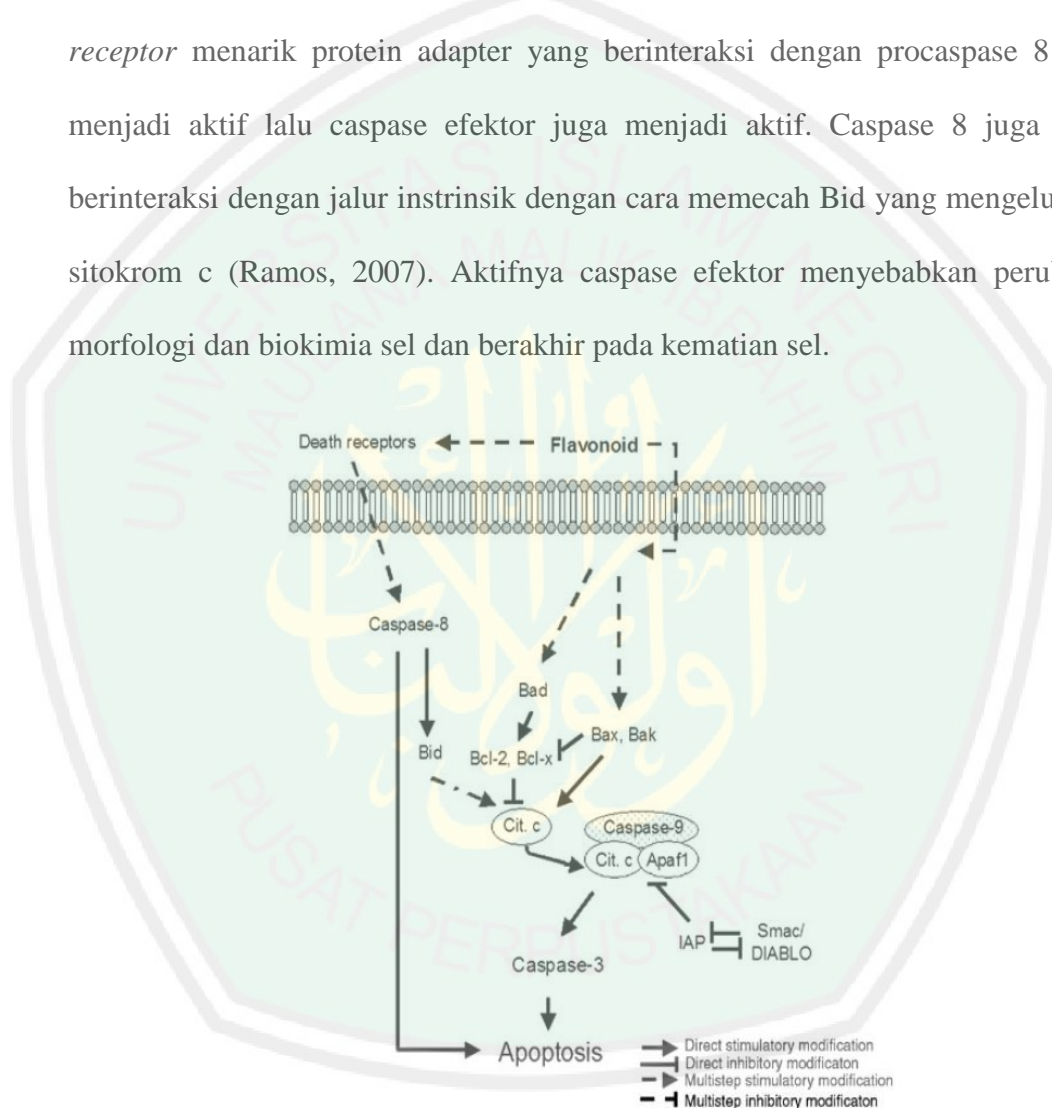
karsinogenesis baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Penghambatan terjadi pada tahap inisiasi, promosi maupun progresi melalui mekanisme molekuler antara lain inaktivasi senyawa karsinogen, antiproliferatif, penghambatan angiogenesis dan daur sel, induksi apoptosis, dan aktivitas antioksidan (Ren dkk., 2003).

Hasil penelitian sitotoksik suatu bahan yang mengandung senyawa flavonoid terhadap sel T-47D, menunjukkan adanya peningkatan ekspresi p53 dan Bax. Flavonoid dapat menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis pada sel kanker T-47D (Ren dkk., 2003) :

- a) Senyawa *flavonoid* menghambat proliferasi dengan cara menghambat proses oksidatif. Mekanisme ini terjadi melalui penurunan enzim *xanthin oksidase*, *siklooksigenase* (COX) dan *lipooksigenase* (LOX) yang diperlukan dalam proses prooksidasi sehingga flavonoid dapat menunda siklus sel.
- b) Aktivitas antikanker juga ditunjukkan flavonoid melalui induksi apoptosis. Flavonoid menghambat ekspresi enzim *topoisomerase* I dan *topoisomerase* II. Inhibitor enzim *topoisomerase* akan menstabilkan kompleks *topoisomerase* dan menyebabkan DNA terpotong dan mengalami kerusakan. Kerusakan DNA dapat menyebabkan terekspresinya protein pro-apoptosis seperti Bax dan Bak dan menurunkan ekspresi protein anti-apoptosis yaitu Bcl-2 dan Bcl-XL. Dengan demikian pertumbuhan sel kanker terhambat.

Ramos (2007) menambahkan bahwa mekanisme senyawa flavonoid menginduksi apoptosis pada sel kanker dapat melalui dua jalur yakni intrinsik dan ekstrinsik (Gambar 2.16). Jalur intrinsik atau mitokondria diinisiasi dengan

keluarnya sitokrom c yang mengikat Apaf1, dATP, dan procaspase-9 dan membentuk apoptosom. Kemudian, procaspase-9 terpecah dan mengaktifkan caspase efektor. Jalur ekstrinsik atau jalur sitoplasmatik terjadi pada permukaan sel dengan mengikat ligan spesifik yang terhubung dengan *death receptor*. *Death receptor* menarik protein adapter yang berinteraksi dengan procaspase 8 yang menjadi aktif lalu caspase efektor juga menjadi aktif. Caspase 8 juga dapat berinteraksi dengan jalur instrinsik dengan cara memecah Bid yang mengeluarkan sitokrom c (Ramos, 2007). Aktifnya caspase efektor menyebabkan perubahan morfologi dan biokimia sel dan berakhir pada kematian sel.



Gambar 2.16 Mekanisme flavonoid menginduksi apoptosis sel kanker (Sumber: Ramos, 2007)

Fu, dkk (2012) melaporkan bahwa senyawa fenolik baru yang diisolasi dari kulit pisang adalah senyawa XJP-1 (*7, 8-dihydroxy-3-methyl-isochromanone-4*). Senyawa ini dapat menurunkan perkembangan ROS, menghentikan translokasi *nuclear factor kappa B* (NF- κ B), mencegah aktivasi *c-Jun N-terminal kinase* (JNK)/*p38 pathway* pada sel endotel, dan berpotensi menghambat *angiotensin converting enzyme* (ACE) (Fu dkk., 2012). NF- κ b merupakan komponen paling penting dalam jalur persinyalan perkembangan tumor. Aktivasi NF- κ B dapat mengarah pada *overexpression* dari gen pengatur siklus sel dan penghambat apoptosis. NF- κ b dapat menghambat apoptosis melalui peningkatan ekspresi gen Bcl-2 dan Bcl-x (Karin dkk., 2002; Yu dkk., 2004). Aksi senyawa XJP-1 dengan menghentikan aktifitas NF- κ B membuat kulit pisang berpotensi mampu menginduksi apoptosis dan menghambat perkembangan sel kanker.

2.4 Ekstraksi

Ekstraksi pelarut merupakan metode pemisahan yang paling baik dan sering digunakan. Ekstraksi pelarut menyangkut distribusi suatu zat terlarut diantara dua fase cair yang tidak saling bercampur (Soebagio, 2005 dalam Asriyanti, 2011). Hasil dari proses ekstraksi disebut ekstrak. Ekstrak merupakan sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Departemen Kesehatan RI, 2000).

Metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut dilakukan dengan beberapa metode yang terbagi menjadi cara dingin dan panas. Cara dingin dapat dilakukan

dengan maserasi dan perkolasi. Sedangkan cara panas dapat dilakukan dengan metode refluks, soxhlet, digesti, infus, dan dekok (Departemen Kesehatan RI, 2000). Pada penelitian ini, metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi.

Metode maserasi berasal dari bahasa latin “*macerate*” (yang artinya “merendam”) merupakan proses paling sederhana. Pada metode ini, sampel yang sudah halus direndam dalam pelarut sampai meresap dan melunak susunan selnya sehingga zat-zat tertentu akan larut (Ansel, 1989). Keuntungan dari metode maserasi yaitu lebih praktis, pelarut yang digunakan lebih sedikit, dan tidak memerlukan pemanasan. Namun kekurangannya adalah waktu yang dibutuhkan relatif lama (Kristianti, 2008).

Pemilihan pelarut mempertimbangkan banyak faktor. Pelarut yang baik harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika, dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, selektif hanya menarik zat yang dikehendaki (Prawesti dalam Asriyanti, 2011). Pada umumnya pelarut yang sering digunakan adalah etanol karena etanol mempunyai polaritas yang tinggi dibandingkan jenis pelarut organik yang lain. Etanol mempunyai titik didih yang rendah, cenderung aman, dan juga tidak beracun dan berbahaya. Kelemahan penggunaan pelarut etanol adalah etanol larut dalam air, dan juga melarutkan komponen lain seperti karbohidrat, resin dan gum (Ramadhan dan Phaza, 2010). Tiwari, dkk (2011) mengatakan bahwa pelarut etanol memiliki sifat yang dapat melarutkan seluruh bahan aktif yang terkandung

dalam bahan alami, baik bahan aktif yang bersifat polar, semipolar, maupun non polar (Tiwari dkk., 2011).

Penelitian ini menggunakan pelarut etanol karena etanol adalah pelarut semi polar dan mampu menarik sebagian besar kandungan kimia dari simplisia. Etanol juga dapat menarik senyawa kimia yang lebih banyak daripada metanol dan air (Azizah dan Salamah, 2013). Saraswati (2015) melaporkan bahwa ekstraksi kulit pisang kepok kuning dengan pelarut etanol 96%, positif mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan kuinon (Saraswati, 2015).

2.5 Kultur Sel

Teknik kultur atau *in vitro* merupakan teknik kultur sel-sel yang berasal dari organ atau jaringan yang telah diuraikan secara mekanis atau secara enzimatis menjadi suspensi sel. Suspensi sel tersebut kemudian dibiakkan atau dikultur menjadi satu lapisan jaringan (monolayer) di atas permukaan yang keras seperti botol, tabung, dan cawan atau menjadi suspensi sel dalam media penumbuh (Malole, 1990 dalam Indradmojo, 2016). Teknik ini merupakan salah satu jenis teknik laboratorium yang penting dalam ilmu biologi, kedokteran, dan industri sebab menjadi alat penting untuk mempelajari sebagian besar proses biokimia dan fisiologis. Selain itu, penggunaan kultur sel hewan berskala besar telah menjadi semakin penting bagi produksi komersial senyawa spesifik untuk industri farmasi dan dianggap sebagai pengganti utama dalam eksperimen hewan (Jochems dkk., 2002; Butler, 2003).

Kondisi ini *in vitro* dapat diciptakan dengan menyiapkan lingkungan dan makanan (media dan nutrisi) yang hampir menyerupai kondisi asalnya (*in vivo*)

melalui pengaturan temperatur, pH, oksigen, CO₂, tekanan osmosis, permukaan untuk melekat sel, nutrisi dan vitamin, proteksi terhadap zat toksik, hormon, serta faktor pertumbuhan yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel. Media pertumbuhan yang diperlukan adalah media yang mengandung asam amino, vitamin, mineral, garam-garam anorganik, glukosa, dan serum, sedangkan pH optimum nya 7,4, gas CO₂ 5%, suhu inkubator 37°C, dan kelembapan relatif 95%. Untuk menstabilkan pH dapat ditambahkan NaHCO₃. Penggunaan antibiotik dalam medium juga diperlukan untuk mencegah kontaminasi oleh mikroorganisme. Antibiotik yang digunakan pada medium penelitian ini adalah penicillin, streptomycin dan fungizone (Freshney, 2000; Malole 1990 dalam Indradmojo, 2016).

Media kultur harus menyediakan semua nutrisi penting untuk metabolisme, pertumbuhan dan proliferasi sel. Ini termasuk prekursor biosintesis untuk anabolisme sel, substrat katabolik untuk metabolisme energi, vitamin dan elemen lain yang bersifat katalitik, dan ion anorganik (elektrolit) yang bersifat katalitik dan fisiologis, misalnya untuk mempertahankan pH medium kultur dan stabilitas osmotik. Medium tumbuh yang sesuai kondisi sel uji T-47D pada penelitian ini adalah medium RPMI-1640 dengan penambahan serum berupa FBS (*Fetal Bovine Serum*). Penambahan serum disebabkan sel tidak dapat hidup hanya dengan medium basal saja. Suplementasi media kultur basal dengan serum hewan sangat penting untuk pertumbuhan sel dan untuk stimulasi proliferasi (Banker G, 1998; Brunner dkk., 2010)

Fetal Bovine Serum (FBS) mengandung komponen-komponen dasar, seperti hormon dan faktor pertumbuhan. Serum adalah darah tanpa sel, trombosit dan faktor pembekuan (Jochems dkk., 2002) yang terbukti menyediakan berbagai makromolekul, protein carrier pembawa lipid dan *trace elements*, faktor perlekatan dan penyebaran, nutrisi, asam amino tambahan, asam lemak dan lipid, *protease-inhibitor*, detoksifikasi, tekanan osmotik, hormon dan faktor pertumbuhan sehingga dapat mendukung pertumbuhan sel (Gstraunthaler, 2003).

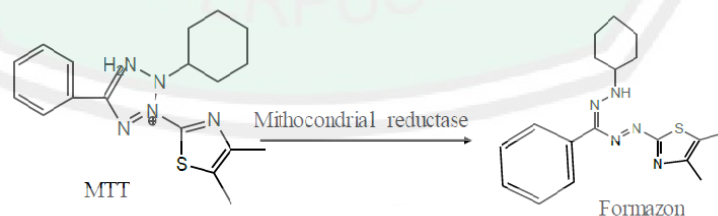
Fungsi utama serum di media kultur adalah sebagai (i) faktor hormonal yang merangsang pertumbuhan sel dan proliferasi, dan mempromosikan diferensiasi fungsi, (ii) mengangkut protein yang membawa hormon (misalnya transkortin), mineral dan *trace elements* (misalnya transferin), dan lipid (misalnya lipoprotein), (iii) faktor perlekatan dan penyebaran (yaitu komponen matriks ekstraselular), dan (iv) faktor penstabil dan detoksifikasi, yang diperlukan untuk mempertahankan pH atau untuk menghambat protease baik secara langsung atau tidak langsung, dengan bertindak sebagai wastafel tidak spesifik untuk protease dan molekul (racun) lainnya. Ini adalah fakta yang perlu diketahui bahwa gumpalan serum alami lebih efektif daripada plasma dalam merangsang proliferasi sel. Hal ini tampaknya disebabkan oleh pelepasan polipeptida tertentu dari platelet yang diaktifkan selama proses *clotting* (Gstraunthaler, 2003).

2.6 MTT assay

Metode *in vitro tetrazolium-based calorimetric assay* (MTT), pertama kali dijelaskan oleh Mosmann untuk mendeteksi kelangsungan hidup dan proliferasi sel mamalia, adalah suatu metode *rapid calorimetric* berdasarkan pembelahan

yellow tetrazolium salt (3-{4,5-dimethylthiazol-2-yl}-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) menjadi *purple formazan crystals* oleh enzim mitokondria dari sel yang aktif secara metabolik (Ciapetti dkk., 1993).

Uji sitotoksitas dilakukan untuk mengetahui efek suatu bahan secara langsung terhadap jaringan dalam kultur sel. MTT *assay* adalah suatu *assay* pada mikroplate yang tidak memerlukan transfer sel. Uji ini dapat digunakan untuk mengukur proliferasi dan sitotoksitas terhadap sel. Ujinya cukup sensitif, cepat, semiotomatis, dan tidak menggunakan radioisotop. Uji ini didasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyl-tetrazolium bromide (MTT)) yang berwarna kuning dan larut menjadi endapan formazan yang berwarna biru ungu dan tidak larut (Gambar 2.17). Reduksi garam terazolium terjadi secara intrasel serta melibatkan enzim dari retikulum endoplasma dan mitokondria. Dengan demikian jumlah sel yang hidup dapat diukur sebagai konsentrasi hasil produk MTT yang diukur dengan spektrofotometer (Siregarr dan Hadijono, 2000).



Gambar 2.17 Reaksi reduksi MTT menjadi formazan (Sumber: Mosmann, 1983)

Uji sitotoksik dapat menggunakan parameter nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan pertumbuhan sel sebesar 50% dari populasi dan menunjukkan potensi toksisitas suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar nilai IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Melannisa, 2004). Senyawa sitotoksik adalah senyawa yang bersifat toksik pada sel tumor secara *in vitro* dan jika toksisitas ini ditransfer menembus sel tumor *in vivo*, senyawa tersebut mempunyai aktivitas antitumor (Evans, 2002 dalam Heti, 2008).

2.7 Flow cytometry

Flow cytometry 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 poliploidi. Masing-masing jenis sel memiliki perbedaan pada jumlah set kromosom dimana pada fase G₀/G₁, fase S, fase G₂/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 G₀), 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).

Metode kuantitatif dengan metode *flow cytometry* memiliki banyak kelebihan dibandingkan metode yang lain seperti pengecatan DNA, degradasi PARP dengan *western blot*, dan *assay of cleavage of caspase* (Azizah, 2015). Ketika sel mengalami apoptosis, perubahan terjadi pada permukaan sel. Salah satu perubahannya adalah translokasi *phosphatidylserine* (PS) dari bagian dalam membran plasma ke lapisan luar. Oleh karena itu, paparan PS merupakan alat tes yang berguna untuk apoptosis tersebut. Kehadiran PS pada lapisan luar dapat dideteksi dengan menggunakan Annexin V (Elmore, 2007).

Annexin V adalah protein yang dapat digunakan sebagai probe sensitif untuk paparan PS pada lapisan luar membran sel dan sel apoptosis. Sel nekrosis juga terpapar PS dan karena hal itu, juga akan mengikat Annexin V. Untuk membedakan antara sel apoptosis dan nekrosis, maka dapat menggunakan PI (*Propidium Iodide*). PI akan menandai sel nekrosis, tetapi tidak sel apoptosis. Dalam pengujian ini, Annexin V mengikat fosfolipid PS, menandai sel apoptosis dan nekrosis, sedangkan PI mengikat DNA dan hanya menandai sel-sel nekrosis (Ranalli dkk., 2003 dalam Nursid, 2013).

Hasil dari *flow cytometer* dengan FACS-Calibur adalah empat kuadran: kiri bawah (R1), ditandai dengan warna hijau mengindikasikan sel yang hidup; kanan bawah (R2), ditandai dengan warna kuning mengindikasikan apoptosis awal; kanan atas (R3), ditandai dengan warna merah muda, mengindikasikan apoptosis akhir; dan kiri atas (R4), ditandai dengan warna merah mengindikasikan sel nekrosis (Arianingrum, dkk; 2015).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 ulangan untuk setiap perlakuan. Pembagian perlakuan tersebut yakni:

- Kontrol media: media yang tidak ditumbuhi sel
- K+ (kontrol positif): sel T-47D yang diberi *Doxorubicin*
- K- (kontrol negatif): sel T-47D yang tidak diberi perlakuan
- P1 (perlakuan 1): sel T47D yang yang diberi ekstrak kulit pisang kepok dengan konsentrasi 1000 µg/ml
- P2 (perlakuan 2): sel T47D yang yang diberi ekstrak kulit pisang kepok dengan konsentrasi 500 µg/ml
- P3 (perlakuan 3): sel T47D yang yang diberi ekstrak kulit pisang kepok dengan konsentrasi 250 µg/ml
- P4 (perlakuan 4): sel T47D yang yang diberi ekstrak kulit pisang kepok dengan konsentrasi 125 µg/ml
- P5 (perlakuan 5): sel T47D yang yang diberi ekstrak kulit pisang kepok dengan konsentrasi 62.5 µg/ml
- P6 (perlakuan 6): sel T47D yang yang diberi ekstrak kulit pisang kepok dengan konsentrasi 31.25 µg/ml

3.2 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Variabel bebas (*independent variable*), yang meliputi konsentrasi ekstrak kulit pisang kepok
2. Variabel terikat (*dependent variable*), yang meliputi persentase hidup sel dan persentase sel yang mengalami apoptosis
3. Variabel terkontrol atau kontrol, yang meliputi media kultur sel RPMI-1640, sel T-47D, pelarut dan sampel kulit pisang kepok

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Bulan Maret-September 2017 di dua tempat:

1. Persiapan sampel dan ekstraksi dilakukan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang pada Bulan Maret-Juni 2017
2. Uji Sitotoksik dan Induksi Apoptosis dilakukan di Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta pada Bulan September 2017

Berikut adalah uraian singkat waktu penelitian:

Tabel 3.1 Rancangan Waktu Penelitian

Kegiatan	Maret	April				Mei				Juni				Sept			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Pengambilan sampel																	
Persiapan sampel																	
Ekstraksi																	
Uji Sitotoksik																	
Uji Induksi Apoptosis																	
Analisis Data																	

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat-alat Penelitian

Pisau, gunting, spatula, kertas karton, blender, erlenmeyer, gelas ukur, beker glass, corong buchner, loyang, labu ukur, evaporator, kertas saring, tisu, corong, cawan penguap, desikator, oven, T-flask, *haemocytometer*, inkubator CO₂, mikroskop inverted, *ELISA reader*, timbangan analitik, autoklaf, *sentrifuge*, *sentrifuge tube* 15 dan 50 ml, *Laminar Air Flow cabinet* (LAF), tangki nitrogen cair, *cryogenic vials*, mikropipet, *vortex*, *conical tube*, *yellow tip*, *blue tip*, *culture dish*, *96-well plate* *6-well plate*, *syringe* 200 cc, *syringe filter*, *hot plate*, kulkas

4°C dan -20°C, kulkas -80°C, pipet tetes, tabung reaksi, lemari asam, porselen, kamera digital, rak tabung, dan BD Accuri.

3.4.2 Bahan-bahan Penelitian

a. Sampel Uji

Sampel uji yang digunakan untuk uji dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol kulit pisang kepok kuning (*Musa balbisiana* (ABB) cv. Pisang kepok). Sebelumnya, sampel uji dideterminasi di LIPI (Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia) Purwodadi, Pasuruan (Lampiran 2).

b. Sel Uji

Sel uji yang digunakan untuk uji sitotoksik dan uji induksi apoptosis adalah sel kanker payudara (sel T-47D) yang diperoleh dari stok Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

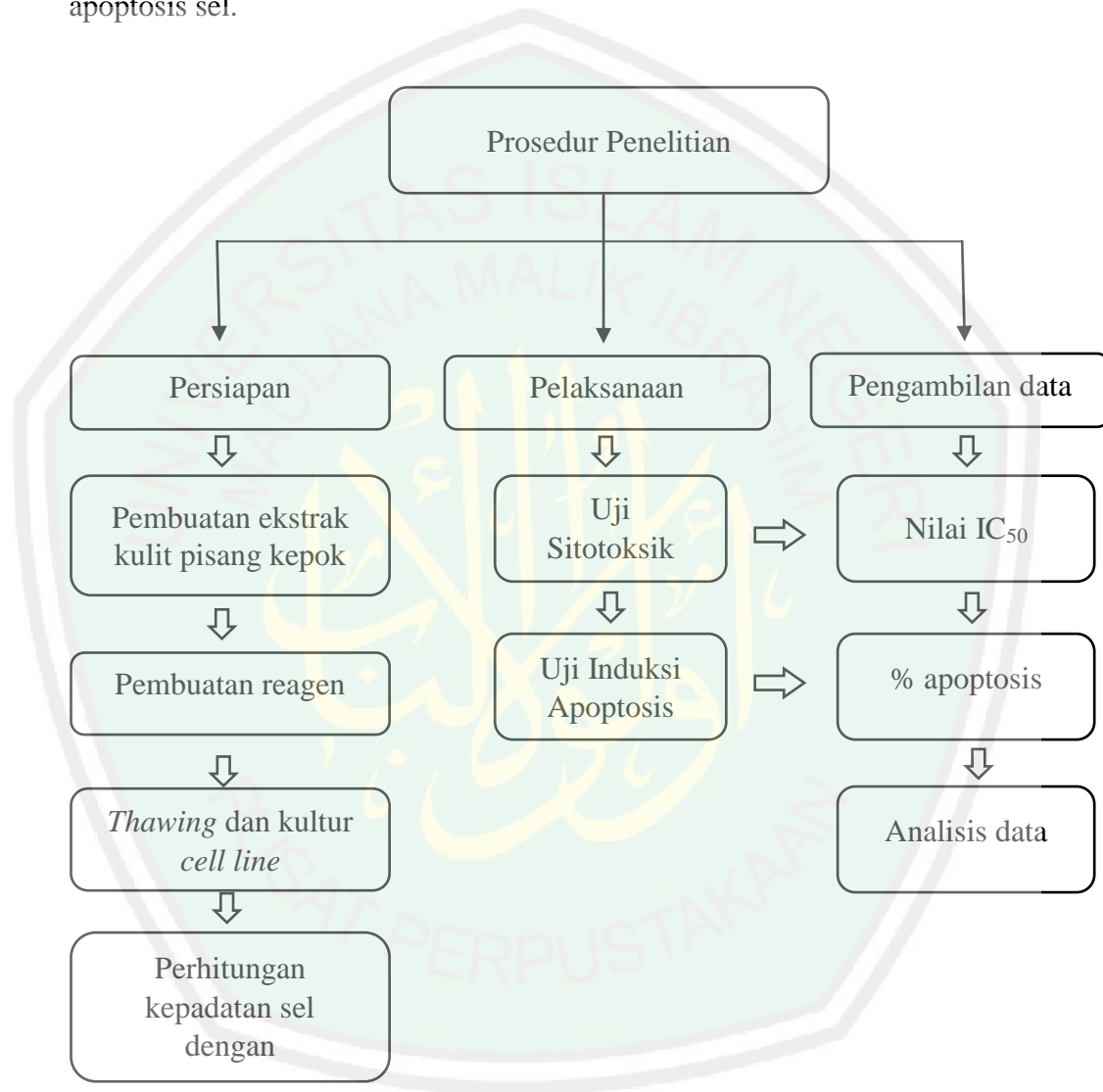
c. Bahan Kimia

Etanol 95% (*pro analysis*), aquades, *Dimethyl sulfoxide* (DMSO), tripsin-EDTA, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *Fetal Bovine Serum* (FBS), *natrium dodesil sulfat* (SDS), media kultur RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), reagen MTT (*3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide*), incubation buffer, reagen *annexin V-FITC*, dan reagen *Propidium Iodide* (PI).

3.5 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui tiga tahap (Gambar 3.1), yaitu (1) tahap persiapan yang meliputi: persiapan sampel ekstrak kulit pisang kepok, persiapan kultur sel T-47D, pembuatan reagen, dan perhitungan kepadatan sel, 2) tahap

pelaksanaan, meliputi: perlakuan ekstrak etanol kulit pisang kepok terhadap sel T-47D dengan uji sitotoksik (*MTT assay*) dan induksi apoptosis (dengan *flow cytometry*), dan 3) tahap pengambilan data meliputi: analisis data IC_{50} dan % apoptosis sel.



Gambar 3.1 Kerangka Prosedur Penelitian

3.6 Prosedur Kerja

3.6.1 Preparasi Sampel

Diambil limbah kulit pisang kepok dari Desa Belahanrejo, Kedamean, Gresik, Jawa Timur. Kulit pisang kepok satu tundun dikumpulkan, dicuci sampai bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada bagian dalam dan luar kulit. Kulit pisang kepok yang sudah dicuci bersih kemudian ditiriskan airnya dengan diangin-anginkan, setelah itu limbah kulit pisang kepok dirajang kecil-kecil dengan pisau/gunting untuk mempermudah proses pengeringan. Pengeringan dilakukan dengan oven suhu 45°C dan menghasilkan simplisia kering yang ditandai dengan mudahnya simplisia tersebut dipatahkan. Simplisia yang sudah kering kemudian dihaluskan sampai menjadi serbuk. Simplisia dibuat dalam bentuk serbuk karena bertujuan untuk memperluas permukaan simplisia sehingga kontak antara pelarut dengan simplisia lebih maksimal (Saraswati, 2015).

3.6.2 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi menggunakan pelarut etanol 95% (Saraswati, 2015). Ekstraksi dilakukan secara maserasi, terlindung dari sinar matahari langsung, dan berada pada suhu ruang. Sebanyak 100 gram kulit pisang kepok yang telah dihaluskan, dimaserasi dengan 300 ml etanol selama 1x24 jam. Ekstrak yang diperoleh kemudian disaring dengan kertas saring dan corong Buchner menggunakan erlenmeyer vakum dan filtrat yang diperoleh diuapkan dengan rotary *vacuum evaporator* dan di masukkan dalam inkubator suhu 20°C hingga didapat ekstrak kental lalu disimpan dalam *freezer* 4°C (Supriyanti, Sudana dan Rosdiana, 2015).

3.6.3 Pembuatan Reagen

Reagen-reagen yang dibuat dalam penelitian ini yaitu medium RPMI berserum, larutan PBS, SDS, MTT, *Flow cytometry*, dan Doxorubicin (Zakiah, 2011; Nurani, 2012; CCRC, 2013):

a. Pembuatan Medium Biakan Sel

Pembuatan media biakan RPMI 1640 adalah dengan melarutkan serbuk RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) 1640 sebanyak 100 mg ke dalam aquabidestilata kira-kira 80 ml, ditambah natrium bikarbonat 0.2 gram dan HEPES 0.2gram, ditambahkan aqua bidestilata sampai 100 ml. Larutan diaduk dengan pengaduk magnetik sekitar 10 menit hingga homogen, lalu didapar dengan HCl 1 N hingga pH 7,2–7,4. Kemudian, difiltrasi dengan *syringe filter* 0.2 μm *membrane non-pyrogenic*. Medium steril ini dapat disimpan pada suhu 2°C.

b. Pembuatan Medium Penumbuh Sel

Media penumbuh sel dibuat dengan cara mencampurkan FBS 10% sebanyak 5 ml, penisilin streptomisin 2% sebanyak 0.5 ml, fungizone 0.5% sebanyak 0.25 ml kemudian diencerkan menggunakan media RPMI 1640 sampai 50 ml. Selanjutnya larutan disaring dengan filter *syringe filter* 0.2 μm *membrane non-pyrogenic* secara aseptis. Disimpan dalam lemari es suhu 4°C dengan menggunakan botol steril tertutup.

c. Pembuatan Larutan SDS

Menimbang SDS sebanyak 10 gram, kemudian dilarutkan dalam 90 ml aquadest steril dan 10 ml HCl 0.01 N, kemudian diaduk sampai larut.

d. Pembuatan Larutan MTT

Untuk pengamatan proliferasi sel secara kolorimetri, 5 mg MTT dilarutkan dalam 1 ml PBS steril kemudian disterilisasikan dengan cara filtrasi menggunakan *syringe filter 0.2 µm membrane non-pyrogenic*. Reagen MTT diberikan sebanyak 10 µL per 100 µL medium pada tiap-tiap sumuran.

e. Pembuatan Larutan Doxorubicin

Doxorubicin yang digunakan sebagai kontrol positif, dibuat seri kadar 1000 µg/ml; 500 µg/ml; 250 µg/ml; 125 µg/ml; 62.5 µg/ml; dan 31.25 µg/ml.

3.6.4 Uji Sitotoksik (CCRC, 2013)

a. Persiapan sel

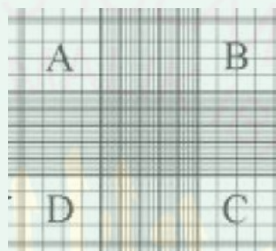
Sel kanker payudara T-47D diambil dari koleksi Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta diamati di bawah mikroskop inverted dan siap dipanen bila sudah konfluen 75-90%. Tahap panen sel yaitu media kultur dibuang terlebih dahulu, kemudian dicuci dengan PBS (ditambahkan sebanyak ± 5 mL serta dihomogenkan kemudian dibuang kembali). Ditambah trispsin-EDTA (tripsin 0,25%) 1 ml secara merata dan diinkubasi selama ± 3 menit. Langkah selanjutnya media RPMI 10% 5 mL ditambahkan untuk menginaktifkan tripsin serta dilakukan resuspensi sampai sel terlepas satu-satu, diamati dibawah mikroskop *inverted*, kemudian dipindah ke konikel dan ditambah media RPMI 10% hingga 10 ml lalu dilakukan perhitungan sel.

b. Penghitungan Sel

Sel yang telah dipanen kemudian diambil 10 µL dan dipindah ke *haemocytometer* (Gambar 3.2) dengan mikropipet, diamati dan dihitung dibawah

mikroskop *inverted*. *Haemocytometer* terdiri dari 4 kamar hitung. Setiap kamar hitung terdiri dari 16 kotak. Sel dihitung pada 4 kamar *haemocytometer*. Sel yang gelap (mati) dan sel yang berada dibatas luar di sebelah atas dan di sebelah kanan tidak ikut dihitung. Sel di batas kiri dan batas bawah ikut dihitung. Jumlah sel dapat diketahui dengan rumus perhitungan sebagai berikut:

$$\Sigma \text{ sel yang dihitung} = \frac{\Sigma \text{ sel kamar A} + \Sigma \text{ sel kamar B} + \Sigma \text{ sel kamar C} + \Sigma \text{ sel kamar D}}{4} \times 10^4 \dots\dots\dots (3.1)$$



Gambar 3.2 *Haemocytometer* (Sumber: CCRC, 2009)

c. Peletakan Sel pada *Plate*

Peletakan sel pada *96 well plate* harus diketahui berapa jumlah mL panen sel yang akan diletakkan pada setiap sumuran, dengan menggunakan persamaan berikut:

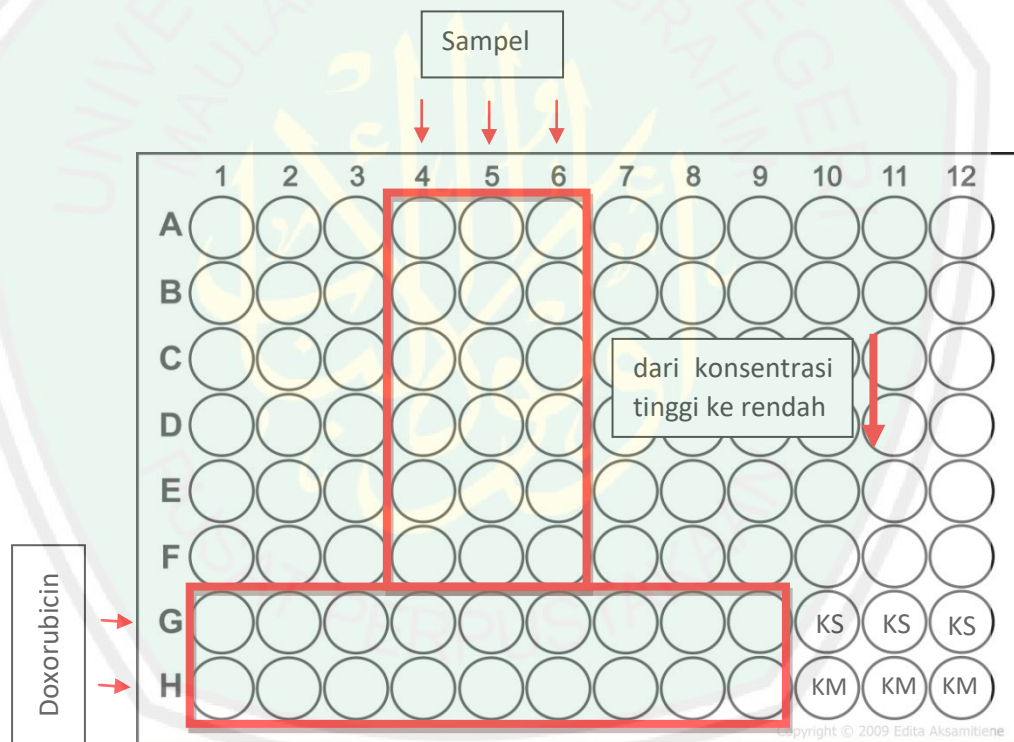
$$\Sigma \text{ panen sel yang ditransfer ke plate} = \frac{\Sigma \text{ total sel yang diperlukan}}{\Sigma \text{ sel terhitung / mL}} \dots\dots\dots (3.2)$$

Sel diletakkan dan media RPMI ditambahkan sesuai perhitungan ke dalam *96-well plate* dan diinkubasi kembali minimal 4 jam pada suhu 37 °C dalam inkubator CO₂ 5%, akan tetapi 6 sumuran bagian bawah disisakan untuk kontrol sel dan kontrol media.

d. Pembuatan Larutan Sampel dan Perlakuan Sampel pada Sel

Sampel ekstrak etanol kulit pisang kepok ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam 100 µL DMSO (*dimethyl sulfoxide*) kemudian dihomogenkan

dengan vortex. Langkah selanjutnya sel diambil dari inkubator, diamatai dibawah mikroskop inverted, kemudian media sel dibuang dengan cara dibalikkan *plate* 180° di atas tempat buangan dan ditekan secara perlahan di atas tissue untuk meniriskan sisa cairan, PBS 100 μ L dimasukkan kedalam semua sumuran yang terisi sel dan dibuang kembali, lalu 100 μ L larutan sampel dimasukkan dengan seri kadar 1000; 500; 250; 125; 62,5; dan 31,25 μ g/ml dan diulang sebanyak 3x (triplo) dan diinkubasi kembali minimal selama 24 jam. Hal ini juga dilakukan untuk kontrol positif dengan Doxorubicin (Gambar 3.3).



Gambar 3.3 Perlakuan sampel ke sel (*MTT assay*)

e. Pemberian Larutan MTT

Media sel dibuang dengan cara *plate* dibalik dan dicuci dengan PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Larutan MTT (reagen 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) berwarna kuning sebanyak 100 μ L dalam konikel

ditambahkan media kultur sampai 10 ml kemudian didistribusikan ke setiap sumuran. Inkubasi kembali selama 2 – 4 jam di dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37 °C (sampai terbentuk kristal formazan atau perubahan warna menjadi biru-ungu). Apabila kristal formazan telah terbentuk diamati kondisi sel dengan mikroskop *inverted*, ditambahkan 100 µL *stopper* SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10% dalam 0,1 N HCl. Langkah selanjutnya, *plate* dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi kembali di tempat gelap (suhu ruangan) selama semalam.

Tahapan selanjutnya adalah pembacaan nilai absorbansi dengan ELISA *reader* untuk mengetahui nilai IC₅₀ dari sampel ekstrak etanol kulit pisang kepok. Tahapan awal, dihidupkan ELISA *reader*, ditunggu proses *progressing* hingga selesai. Dibuka pembungkus *plate* dan tutup *plate*. Dimasukkan ke dalam ELISA *reader*. Dibaca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA *reader* dengan λ=550-600 nm (595 nm, tekan tombol *START*). Dimatikan kembali ELISA *reader*, kemudian dibuat grafik absorbansi dan dihitung persentase sel hidup. Data dari persentase sel hidup kemudian dianalisis untuk mengetahui nilai IC₅₀ dengan SPSS (probit/logit).

Perhitungan persentase sel hidup dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Persentase sel hidup} = \frac{(A-B)}{(C-B)} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.3)$$

Keterangan :

A = absorbansi perlakuan (sel + media kultur + sampel)

B = absorbansi kontrol media (media kultur)

C = absorbansi kontrol negatif (sel + media kultur)

3.6.5 Analisis Data Uji Sitotoksik

Potensi ekstrak kulit pisang pepok dalam menghambat atau membunuh sel kanker payudara T-47D dapat diketahui dengan melakukan uji nilai IC_{50} , menggunakan analisa *regression* probit SPSS dengan kepercayaan 95% untuk masing-masing konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; dan 31,25 $\mu\text{g/mL}$. Penggunaan nilai absorbansi yang diperoleh dari pengukuran ELISA *reader*, dapat menentukan persentase sel yang hidup dengan menggunakan rumus seperti Persamaan 3.3.

Data yang diperoleh juga dapat dianalisis dengan regresi linier, dibuat dalam bentuk tabel dan data yang *terinput* merupakan data hubungan antara konsentrasi dengan prosentase sel hidup, kemudian dibuat grafik dengan *chart type scatter* serta nilai maksimum sebesar 100. Selanjutnya dicari persamaan regresi linier dari grafik tersebut dengan menampilkan *add trendline*-regresi linier. $Y = 50\%$ dimasukkan pada persamaan regresi linier dan cari x nya sehingga diperoleh nilai IC_{50} . Data yang dihasilkan dimasukkan dalam tabel data sesuai pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Tabel data hasil uji sitotoksik setiap sampel

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi Sampel			Rata-rata	% Hidup
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
1000					
500					
250					
125					
62.5					
31.25					

3.6.6 Uji Induksi Apoptosis (CCRC, 2007)

a. Persiapan Sel

Kultur sel T-47D yang telah konfluen dipanen dan distribusikan masing-masing dengan konsentrasi 5×10^5 sel/sumuran dalam 2000 μ L media RPMI ke dalam 6 well plate. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂. Setelah itu dibuang media RPMI dan dicuci sel dengan PBS (Indradmojo, 2016).

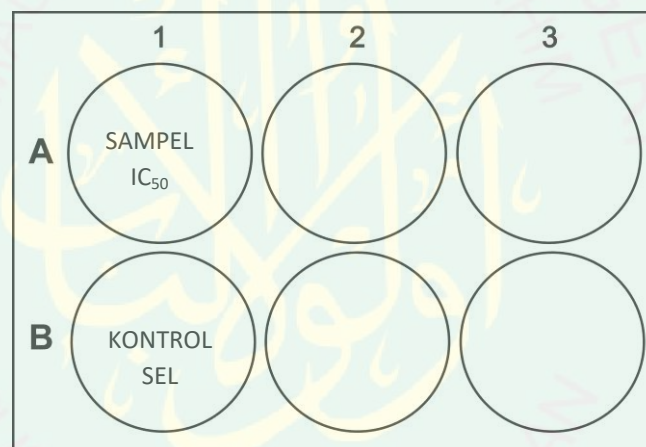
b. Perlakuan Sampel pada Sel

Pada tahap ini yang diuji menggunakan *flow cytometry* adalah sampel dengan konsentrasi ekstrak yang paling aktif yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T-47D atau menggunakan konsentrasi IC₅₀ -nya (Indradmojo, 2016). Pertama-tama dimasukkan sampel ekstrak kulit pisang kepok sesuai konsentrasi IC₅₀ pada well yang telah diisi sel dan untuk kontrol sel tidak diberi sampel ekstrak (Gambar 3.4). Diinkubasi di dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C.

Disiapkan 1 konikel 15 ml untuk 1 jenis perlakuan. Diambil medium RPMI dari sumuran dengan mikropipet 1 ml, ditransfer ke konikel. Diisikan 500 μ l PBS ke dalam setiap sumuran. Diambil PBS dengan mikropipet dan ditransfer ke dalam konikel. Ditambahkan 200 μ l tripsin-EDTA 0,25%, diinkubasi di inkubator selama 3 menit. Ditambahkan 1 ml medium ke dalam setiap sumuran, diresuspensi sampai sel lepas satu per satu, diamati di bawah mikroskop. Setelah sel terlepas satu-satu, ditransfer sel ke konikel. Ditambahkan kembali 500 μ l PBS ke dalam sumuran untuk mengambil sisa sel, kemudian ditransfer ke dalam konikel. Disentrifus konikel dengan kecepatan 5000 rpm selama 3 menit. Dibuang

medium atau supernatan dengan cara dituang, dicuci pellet sel dengan 500 μ l PBS dingin. Langkah selanjutnya, dipindah 500 μ l PBS + pellet dalam konikel ke *flowcyto-tube* dan disimpan konikel pada suhu ruang 37°C selama 30 menit (CCRC, 2014).

Ditambahkan *incubation buffer* 50 μ l pada setiap *flowcyto-tube* dan dihomogenasi. Ditambah reagen *flow cytometry* (5 μ l *Propidium Iodide* (PI) + 5 μ l Annexin FITC untuk satu *flowcyto-tube*) dan didiamkan selama 10 menit dalam ruang gelap dan suhu ruang. Ditambah 300 μ l *incubation buffer* dan dihomogenasi lalu dibaca hasilnya dengan menggunakan BD Accuri.



Gambar 3.4 Perlakuan sampel ke sel (*Flow cytometry*)

3.6.7 Analisis Data Uji Induksi Apoptosis

Hasil dari uji induksi apoptosis dengan *flow cytometry* adalah data persebaran sel yang 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 dipisahkan dengan metode *cell quest* dan diperoleh 4 quadrants. Hasil persentase sel hidup, apoptosis awal, apoptosis akhir, dan nekrosis ditampilkan pada tabel 3.3.

Tabel 3.3 Tabel data hasil uji induksi apoptosis

Sampel	Persentase sel (%)			
	Hidup	Apoptosis awal	Apoptosis akhir	Nekrosis
IC ₅₀				
Kontrol sel				

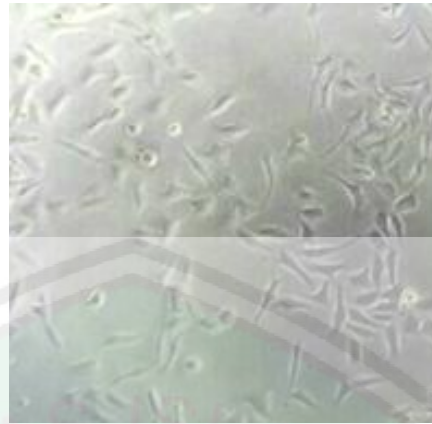
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kulit pisang kepok adalah salah satu bahan alam yang memiliki potensi yang cukup tinggi untuk digunakan sebagai kandidat agen terapi kanker. Potensi ini dimungkinkan karena kandungan berbagai senyawa fitokimia yang dimiliki. Untuk mengkonfirmasi potensi kulit pisang kepok tersebut, maka penelitian ini dilakukan melalui beberapa uji pemberian ekstrak kulit pisang kepok terhadap sel kanker payudara T-47D. Ekstrak didapat dengan ekstraksi metode maserasi menggunakan pelarut etanol 95%. Ekstrak diuji dengan uji sitotoksik menggunakan *MTT assay* untuk mengetahui nilai IC_{50} dan uji induksi apoptosis dengan *flow cytometry* untuk mengetahui jumlah sel yang mengalami apoptosis. Hasil uji sitotoksik dan uji induksi apoptosis pada penelitian ini disajikan sebagai berikut:

4.1 Uji Sitotoksik

Ekstrak kulit pisang kepok diuji aktifitas sitotoksiknya terhadap sel kanker secara *in vitro* menggunakan metode MTT. Hasil dari uji ini yang didapat adalah nilai IC_{50} yang dapat menunjukkan toksisitas sampel terhadap sel kanker payudara T-47D. Sebelum perlakuan, sel harus dikultur hingga mencapai konfluensi sebesar 75-90% dan diamati setelah 1x24 jam untuk mengetahui kesiapan sel untuk diberi perlakuan dengan sampel uji. Berikut ini hasil kultur sel T-47D selama 1x24 jam pada medium RPMI-1640 (Gambar 4.1).

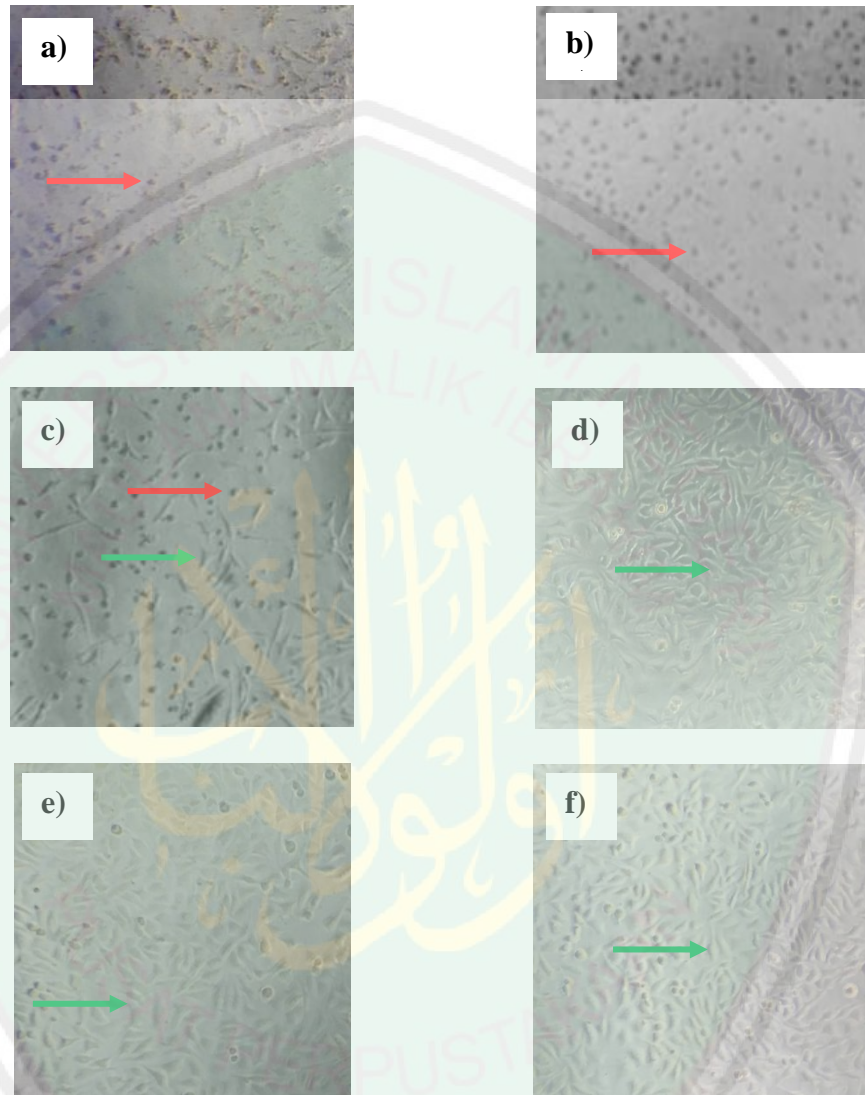


Gambar 4.1 Sel T-47D sebelum *treatment* (perbesaran 100x)

Hasil pengamatan di bawah mikroskop *inverted* pada sel T-47D setelah diberi perlakuan ekstrak kulit pisang kepok selama 1x24 jam menunjukkan perubahan pada tingkat kepadatan dan morfologi sel. Berdasarkan gambar 4.2, dapat diketahui bahwa pada konsentrasi rendah (250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 62.5 $\mu\text{g/mL}$, 31.25 $\mu\text{g/mL}$) banyak sel yang masih hidup, sedangkan pada konsentrasi tinggi (1000 $\mu\text{g/mL}$ dan 500 $\mu\text{g/mL}$) terlihat banyak sel yang mati atau tidak mengalami pertumbuhan.

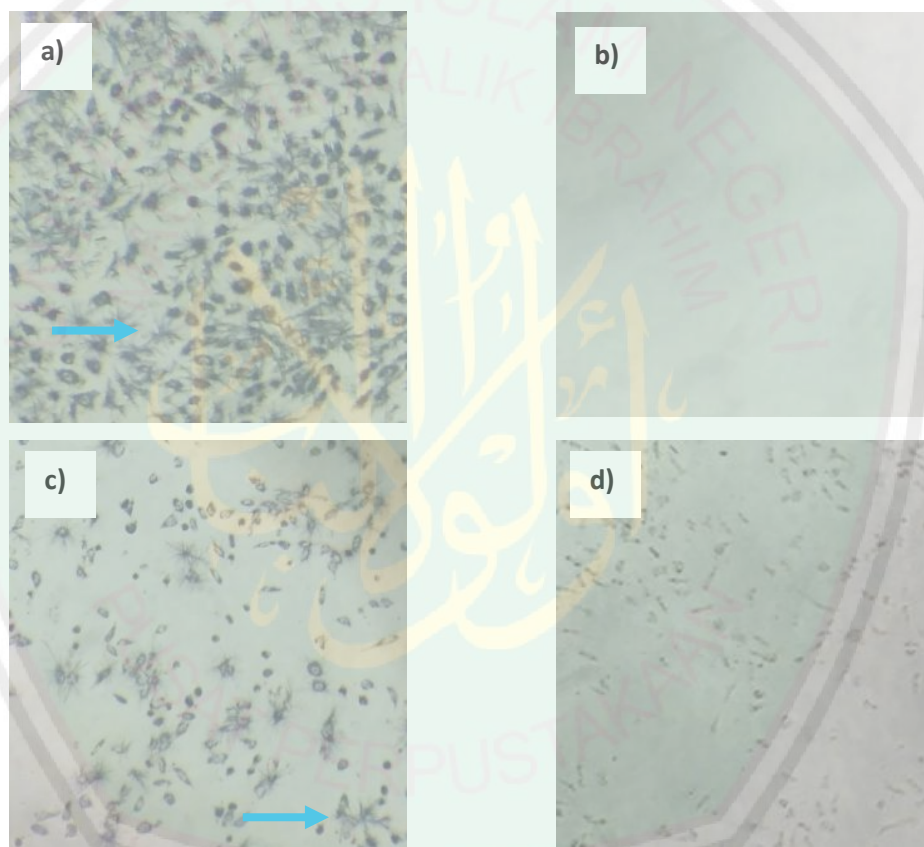
Semakin rendah konsentrasi pemberian ekstrak kulit pisang kepok, maka kepadatan sel semakin tinggi dan ditandai dengan dasar sumuran semakin dipenuhi oleh sel atau tingkat konfluenitas tinggi. Selain pengamatan kepadatan sel, perubahan morfologi sel juga dapat diamati perbedaannya antara sel yang mati dan hidup. Sel yang hidup ditandai dengan warna terang transparan serta bentuk sel yang masih lonjong memanjang, yakni kondisi sel yang masih melakukan proliferasi. Untuk sel yang sudah mati ditandai dengan warna yang gelap dan berbentuk bulat. Hal ini terlihat jelas perbedaannya antara konsentrasi

tinggi yang terlihat banyak sel mati dengan konsentrasi rendah (125 $\mu\text{g/mL}$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$, dan 31,25 $\mu\text{g/mL}$) yang masih banyak sel hidup.



Gambar 4.2 Sel T-47D setelah 1x24 jam diberi perlakuan ekstrak kulit pisang kepok dengan konsentrasi a) 1000 $\mu\text{g/mL}$; b) 500 $\mu\text{g/mL}$; c) 250 $\mu\text{g/mL}$; d) 125 $\mu\text{g/mL}$; e) 62.5 $\mu\text{g/mL}$; f) 31.25 $\mu\text{g/mL}$ (perbesaran 100x), tanda panah (→) menunjukkan sel hidup dan tanda panah (→) menunjukkan sel mati

Arty (2010) mengatakan bahwa kematian sel dapat dilihat dari morfologi sel akibat perlakuan senyawa suatu sampel. Sel yang mati pada pengamatan mikroskop akan menunjukkan warna hitam (gelap) karena sel yang mati akan kehilangan cairan sitoplasma akibat rusaknya membran sel. Sebaliknya, pada sel hidup akan terlihat warna terang, karena adanya cairan sitoplasma dari sel yang hidup meneruskan cahaya dari mikroskop.

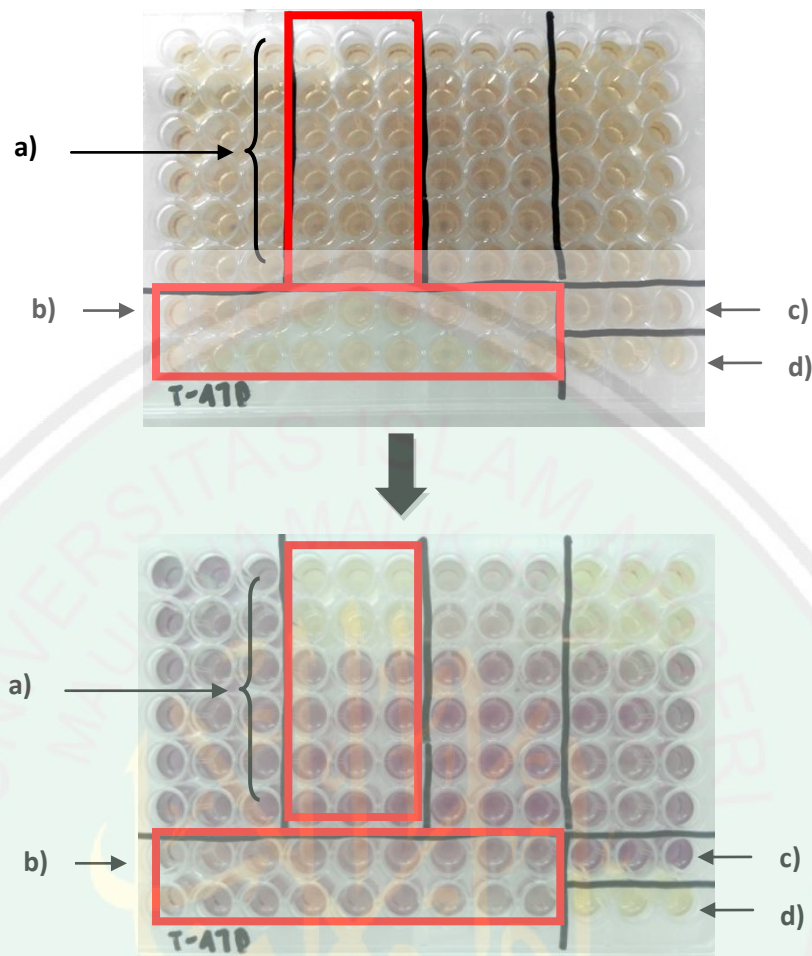


Gambar 4.3 Kristal formazan yang terbentuk setelah pemberian reagen MTT a) kontrol sel T-47D b) kontrol media c) doxorubicin (kontrol positif) d) perlakuan ekstrak kulit pisang kepok (perbesaran 100x), tanda panah (→) menunjukkan kristal formazan

Pengaruh pemberian ekstrak kulit pisang kepok diperkuat dengan hasil pengamatan di bawah mikroskop *inverted* setelah 4 jam pemberian reagen MTT

(reaksi kolorimetri). Pada Gambar 4.3 (a) tampak banyak sekali kristal formazan yang terbentuk sehingga menunjukkan banyak sel yang masih hidup atau masih melakukan metabolisme karena dapat mereduksi garam MTT. Gambar (b) menunjukkan kontrol media yang tidak terjadi kontaminasi oleh bakteri atau jamur. Sedangkan pada gambar (c) terlihat kadar terbentuknya formazan lebih sedikit bahkan pada gambar (d) sangat sedikit. Berdasarkan terbentuknya kristal formazan dan kepadatan sel, terlihat perbedaan antara kontrol sel dengan sel T-47D yang diberi perlakuan ekstrak kulit pisang kepok. Selain itu, hasil perlakuan dengan ekstrak kulit pisang kepok juga menyerupai kontrol positif (sel T-47D yang diberi doxorubicin), yakni banyak ditemukan sel T-47D yang mati. Hasil ini menunjukkan adanya potensi yang sama dari ekstrak kulit pisang kepok seperti obat doxorubicin, karena dapat menginduksi kematian pada sel kanker T-47D sehingga tidak bisa mereduksi garam MTT menjadi kristal formazan.

Berridge (1996) menyatakan bahwa MTT direduksi menjadi formazan oleh enzim mikrosomal pada retikulum endoplasma sel hidup yang membutuhkan reduksi nukleotida piridin seperti NADH dan NADPH. Reduksi MTT dengan NADH dan NADPH dapat melibatkan *superoxide*. Suksinat juga bisa menjadi donor elektron pada reduksi MTT melalui *mitochondrial succinate dehydrogenase* tetapi reduksi ini lambat dan berkontribusi kecil dari total reduksi selular MTT (Berridge dkk., 1996).



Gambar 4.4 Perubahan warna setelah pemberian *SDS stopper*; a) sampel ekstrak dari atas ke bawah (konsentrasi tinggi ke rendah), b) kontrol positif (doxorubicin), c) kontrol sel, d) kontrol media, warna kuning menunjukkan banyak sel yang mati dan warna ungu menunjukkan banyak sel yang hidup

Hasil pengamatan langsung secara visual atau kasat mata pada *96-well plate* setelah pemberian *SDS stopper* juga menunjukkan adanya pengaruh pemberian ekstrak kulit pisang kepok terhadap sel T-47D. Hal ini terlihat adanya warna kuning pada beberapa well dari *96 well plate* (Gambar 4.4), tepatnya pada konsentrasi $1000 \mu\text{g/mL}$ dan $500 \mu\text{g/mL}$. Sedangkan konsentrasi $250 \mu\text{g/mL}$, $125 \mu\text{g/mL}$, $62,5 \mu\text{g/mL}$, dan $31,25 \mu\text{g/mL}$ terjadi perubahan menjadi ungu,

menunjukkan sel-sel yang masih hidup karena melakukan metabolisme reduksi MTT.

Perubahan warna kuning menjadi ungu disebabkan oleh garam MTT yang bereaksi dengan hidrogen dari enzim dehidrogenase pada mitokondria sel hidup. Enzim ini 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 (Indradmojo, 2016). Kristal formazan berwarna ungu dapat larut dalam berbagai pelarut organik dan OD (*Optical Density*) dari larutan yang dihasilkan diukur menggunakan spektrofotometer *multiwell* (*ELISA plate reader*) (Twentyman dan Luscombe, 1987). Pada penelitian ini, sel T-47D diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm dan didapat hasil absorbansi sel untuk setiap perlakuan (Lampiran 5) yang kemudian dilakukan perhitungan untuk dapat mengetahui persentase hidup sel T-47D. Pengukuran absorbansi dilakukan karena dengan mengetahui nilai absorbansi sel dapat diketahui potensi ekstrak kulit pisang kepok dalam menghambat pertumbuhan sel kanker, artinya semakin besar nilai absorbansi maka semakin banyak sel kanker yang hidup. Berikut adalah persentase sel T-47D yang hidup (Tabel 4.1):

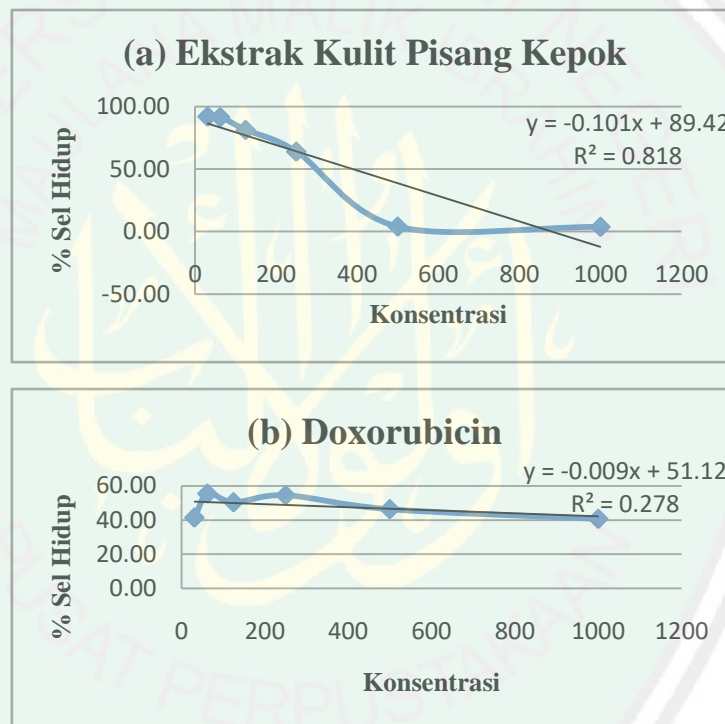
Tabel 4.1 Persentase sel T-47D yang hidup (%) setelah diberi perlakuan ekstrak kulit pisang kepok dan doxorubicin (kontrol positif) menggunakan metode MTT assay

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Persentase sel T-47D yang hidup (%) pada pemberian ...	
	Ekstrak	Doxorubicin
1000	3.74	40.72
500	3.94	46.36
250	63.90	54.51
125	81.23	50.42
62.5	91.45	55.47
31.25	91.97	41.47

Berdasarkan data tersebut, dapat diketahui bahwa ekstrak kulit pisang kepok dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ dapat menghambat 50% proliferasi sel sebesar 96,26% atau persel hidup sel 3,74%. Secara kuantitatif, terlihat adanya pengaruh pemberian ekstrak kulit pisang kepok terhadap sel T-47D. Pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ dan 500 $\mu\text{g/mL}$, persentase sel yang hidup hanya tinggal 3,74% dan 3,94%. Namun, pada konsentrasi rendah terlihat masih banyaknya sel T-47D yang hidup. Hal ini menunjukkan bahwa kenaikan konsentrasi sampel berbanding terbalik dengan persentase sel yang hidup, artinya semakin tinggi konsentrasi sampel yang diberikan, maka semakin rendah viabilitas sel. Pada konsentrasi tinggi, ekstrak kulit pisang kepok dapat menginduksi kematian sel kanker T-47D namun sebaliknya pada konsentrasi rendah justru mempertahankan hidup sel kanker T-47D.

Bila dibandingkan dengan kontrol positif atau sel yang diberi doxorubicin, sel T-47D cenderung mengalami kematian yang konstan pada semua konsentrasi yakni persentase sel hidup yang berkisar antara 40,72% - 55,67%. Namun, meskipun hasil persentase sel hidup yang didapat juga berbanding terbalik dengan

konsetrasi sampel uji, terjadi pengecualian pada konsentrasi 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Hal ini dapat disebabkan kesalahan dalam *pipetting* saat pengambilan sel atau sampe uji. Doxorubicin digunakan sebagai kontrol positif karena obat ini terbukti berpotensi baik dalam menghambat pertumbuhan sel kanker (Haryoto dkk., 2015). Berikut adalah perbandingan grafik persentase sel T-47D yang hidup setelah diberi perlakuan ekstrak kulit pisang kepok dengan doxorubicin (kontrol positif) menggunakan analisis regresi linier (Gambar 4.5).



Gambar 4.5 Persentase sel T-47D yang hidup setelah pemberian a) ekstrak kulit pisang kepok dan b) Doxorubicin

Persentase sel hidup dari setiap konsentrasi sampel dikonversikan dalam persamaan linear untuk mendapat nilai IC_{50} dengan SPSS probit (Lampiran 6). Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan pertumbuhan sel sebesar 50% dari populasi dan menunjukkan potensi toksisitas

suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar nilai IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Melannisa, 2004).

Nilai IC_{50} dari ekstrak kulit pisang kepok adalah 220,375 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan kontrol positif (Doxorubicin) nilai IC_{50} nya adalah 33,844 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 4.2). Bila dibandingkan dengan kontrol positif, nilai IC_{50} yang diperoleh tergolong tinggi dan menunjukkan ekstrak kulit pisang kepok kurang berpotensi untuk menginduksi apoptosis sel kanker payudara T-47D atau tidak toksik terhadap sel T-47D. Hal ini juga berdasarkan *The American National Cancer Institute*, yang menyatakan bahwa suatu ekstrak kasar dikatakan memiliki aktivitas sitotoksik apabila nilai $IC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$ (Lee dan Houghton, 2005).

Tabel 4.2 Nilai IC_{50} dari setiap perlakuan dengan analisis SPSS Probit

Perlakuan	Nilai IC_{50}
Ekstrak kulit pisang kepok	220,375 $\mu\text{g/mL}$
Doxorubicin	33,844 $\mu\text{g/mL}$.

Namun, bila dilihat dari persentase sel hidup dari sel kanker, ekstrak kulit pisang kepok berpotensi pada konsentrasi tinggi untuk menginduksi apoptosis sel kanker T-47D. Hal ini dilihat dari konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ dan 500 $\mu\text{g/mL}$ bahwa persentase sel yang hidup hanya tinggal 3,74% dan 3,94%. Selain itu didukung oleh Machana, dkk (2011) bahwa ekstrak yang berpotensi adalah yang memiliki nilai IC_{50} kurang dari 500 $\mu\text{g/ml}$. Meerlo, dkk (2011) menambahkan bahwa penurunan jumlah sel menunjukkan penghambatan pertumbuhan sel dan sensitifitas sampel biasanya spesifik pada konsentrasi obat yang dibutuhkan untuk

mencapai hambatan pertumbuhan sel sebesar 50% dibandingkan dengan pertumbuhan kontrol sel tanpa perlakuan atau pemberian sampel (Meerloo, Kaspers dan Cloos, 2011). Selain itu, berdasarkan penggolongan kategori sitotoksisitas suatu sampel (Tabel 4.3) diketahui bahwa ekstrak kulit pisang tergolong sitotoksik moderat. Kelompok senyawa dari suatu sampel yang berpotensi sitotoksik dapat digunakan sebagai agen antikanker sedangkan sitotoksisitas moderat dapat dimanfaatkan untuk kemoprevensi yang dapat mencegah dan menghambat pertumbuhan sel kanker (Tussanti dan Johan, 2014).

Tabel 4.3 Kategori sitotoksisitas berdasarkan nilai IC_{50}

Kategori	IC_{50}
sitotoksik potent	$IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$
sitotoksik moderat	$100 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$
tidak toksik	$IC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$

Sumber: (Prayong, Barusrux dan Weerapreeyakul, 2008)

Kemampuan ekstrak kulit pisang bersifat toksik terhadap sel kanker disebabkan oleh kandungan senyawa-senyawa yang dimilikinya, seperti flavonoid, tannin, terpenoid, alkaloid, saponin, dan kuinon (Fitrianingsih dan Purwanti, 2012; Saraswati, 2015; Someya dkk., 2002; Supriyanti dkk., 2015). Beberapa tanaman yang mengandung senyawa turunan dari flavonoid telah digunakan sebagai agen pencegahan dan terapi pada obat-obat tradisional di Asia selama ribuan tahun, termasuk antikanker.

Senyawa flavonoid menghambat proliferasi sel pada berbagai sel kanker manusia melalui penghambatan proses oksidasi yang dapat menginisiasi kanker. Mekanisme ini melalui penurunan *xanthin oxidase enzyme*, *Cyclooxygenase*

(COX) dan *Lipoxygenase* (LOX) yang dibutuhkan dalam proses oksidasi sehingga menunda siklus sel. Flavonoid juga menghambat ekspresi enzim topoisomerase I dan II yang memainkan peran pada katalis skring DNA (Wastuti, Suwarso dan Nasution, 2015). Senyawa tanin dapat menginduksi kematian pada sel kanker melalui peningkatan p27 dan Bax yang berujung pada penghambatan siklus sel menuju fase S sehingga sel tidak dapat berproliferasi dan kemudian mati (Nam, Smith dan Dou, 2001).

Mekanisme senyawa alkaloid sebagai antikanker meliputi kemampuan antiangiogenik, antiproliferasi, menghambat aktivitas topoisomerase, polimerisasi tubullin, dan induksi apoptosis. Saponin dapat mengenali sel kanker, karena sel kanker memiliki membran sel dan struktur yang berbeda dari sel normal. Membran sel kanker mengandung lebih banyak senyawa seperti kolesterol dan saponin dapat mengikat kolesterol tersebut sehingga mengganggu permeabilitas membran. Saponin juga dapat mengurangi ROS seperti H_2O_2 dan menghambat jalur persinyalan *phosphatidyl-inositol-3 kinase* sebagai penyebab tercegahnya kerusakan kromosom (Wastuti, Suwarso dan Nasution, 2015).

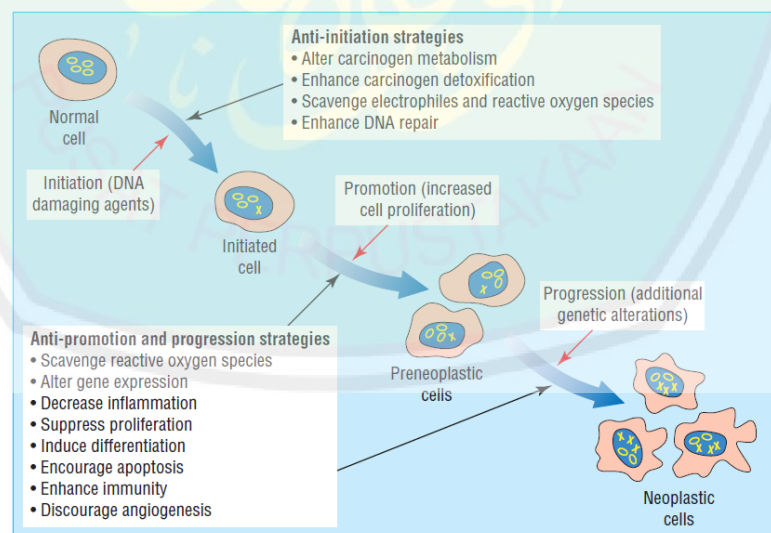
Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Nam (2014) menunjukkan bahwa kulit pisang ambon (*Musa sapientum*) yang mengandung triterpenoid dapat berperan sebagai agen pencegah pertumbuhan dan perkembangan sel kanker tanpa mengganggu sel normal. Oleh karena itu, kulit pisang ambon (*Musa sapientum*) memiliki potensi sebagai agen kemopreventif dan ko-kemoterapi pada kanker payudara (Nam dan I, 2014). Hal ini mendukung potensinya ekstrak kulit pisang kepok (*Musa balbisiana*) sebagai kandidat agen

kemopreventif kanker payudara, dilihat dari lebih tingginya aktivitas antioksidan yang dimiliki daripada kulit pisang ambon. Atun, dkk (2007) mengemukakan bahwa ekstrak kulit pisang kepok memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dengan kemampuan menghambat 50% oksidasi pada konsentrasi 693,15 mg/ml dibandingkan dengan ekstrak kulit pisang ambon yang menghambat 50% oksidasi pada konsentrasi 5000 mg/ml (Rosdiana, 2014).

Sundaram (2011) menambahkan bahwa kulit pisang yang belum matang lebih berpotensi memiliki antioksidan yang tinggi daripada kulit pisang yang sudah matang. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian, yaitu kulit pisang yang digunakan pada penelitian ini adalah jenis pisang kepok yang belum matang atau berwarna hijau sehingga tingginya kandungan antioksidannya mampu menginduksi kematian pada sel kanker payudara, terutama pada konsentrasi yang tinggi. Selain itu, didukung adanya senyawa gallokatekin pada kulit pisang (158 mg/100 g) yang lebih banyak dari buah (29.6 mg/100 g) dan senyawa dopamin pada kulit pisang (80–560 mg/ 100 g) juga lebih tinggi dari buahnya (2.5–10 mg/ 100 g) (Kanazawa dan Sakakibara, 2000; Someya, Yoshiki dan Okubo, 2002; Sundaram dkk., 2011).

Berdasarkan uji sitotoksik pada penelitian ini, dapat diketahui bahwa ekstrak kulit pisang dapat menghambat 50% pertumbuhan sel kanker T-47D pada konsentrasi 220,375 $\mu\text{g/mL}$ (nilai IC_{50}). Hal ini menunjukkan ekstrak kulit pisang kepok dengan potensi sitotoksitas moderat (sedang) dapat dimanfaatkan untuk kemoprevensi, sedangkan untuk kandidat agen terapi kanker memerlukan dosis tinggi agar dapat bekerja seperti doxorubicin.

Agen kemoprevensi dengan bahan alam dan agen sintetis menunjukkan harapan untuk mencegah, menahan, dan membalikkan fase inisiasi dari karsinogenesis, namun harus memiliki toksisitas rendah dibandingkan dengan agen kemoterapi yang digunakan pada pasien kanker (Greenwald, 2002). Aksi ini dapat diperoleh lewat senyawa yang terkandung oleh agen kemoprevensi. Senyawa kemoprevensi adalah senyawa yang dapat mencegah/memblok proses karsinogenesis sedini mungkin. Mekanisme senyawa kemoprevensi dalam pencegahan kanker diantaranya adalah menghambat pembelahan sel kanker, mencegah interaksi antara senyawa karsinogenik dengan molekul DNA, dan menginduksi kerja enzim yang berperan dalam detoksifikasi senyawa karsinogenik di dalam tubuh (Tedjo, Sajuthi dan Darusman, 2005). Berikut adalah gambaran strategi pencegahan agen kemoprevensi pada tahapan karsinogenesis (Gambar 4.6):

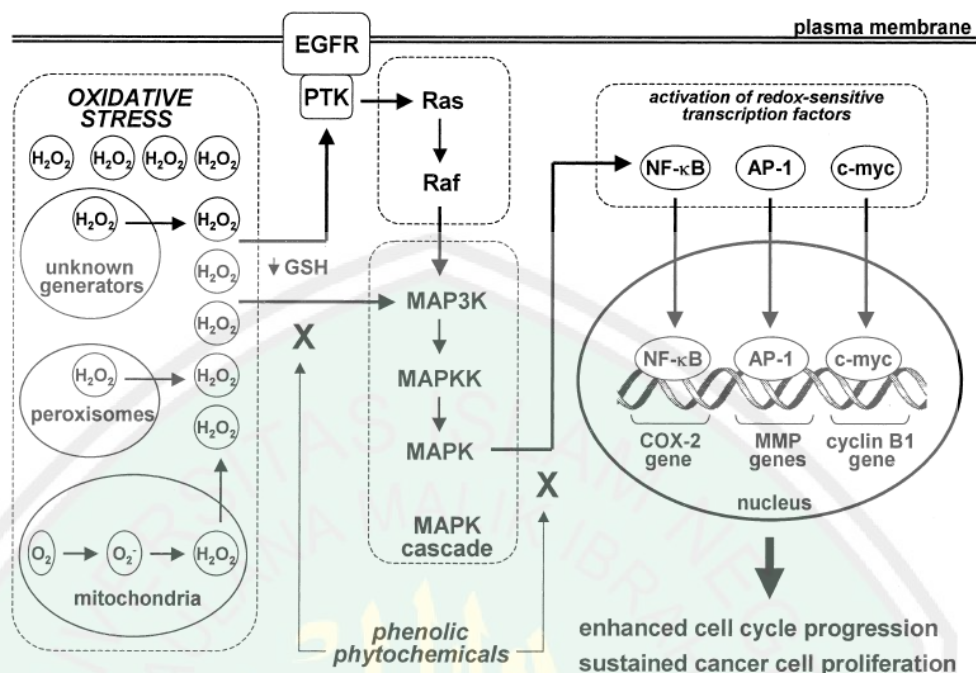


Gambar 4.6 Strategi pencegahan agen kemoprevensi pada tahapan karsinogenesis (Sumber: Hursting, dkk., 1999 dalam Greenwald, 2002)

Gambar 4.6 menjelaskan strategi agen kemoprevensi pada tahap-tahapan karsinogenesis. Pada tahap inisiasi, ditandai dengan konversi sel normal ke sel yang diinisiasi sebagai respons terhadap agen penghancur DNA (kerusakan genetik yang ditunjukkan oleh X). Tahap promosi ditandai dengan transformasi sel menjadi populasi sel preneoplastik, akibat perubahan ekspresi gen dan proliferasi sel. Tahap progresi melibatkan transformasi sel preneoplastik ke populasi sel neoplastik dan antioksidan mampu menghambat karsinogenesis pada tahap inisiasi dan promosi (Greenwald, 2002).

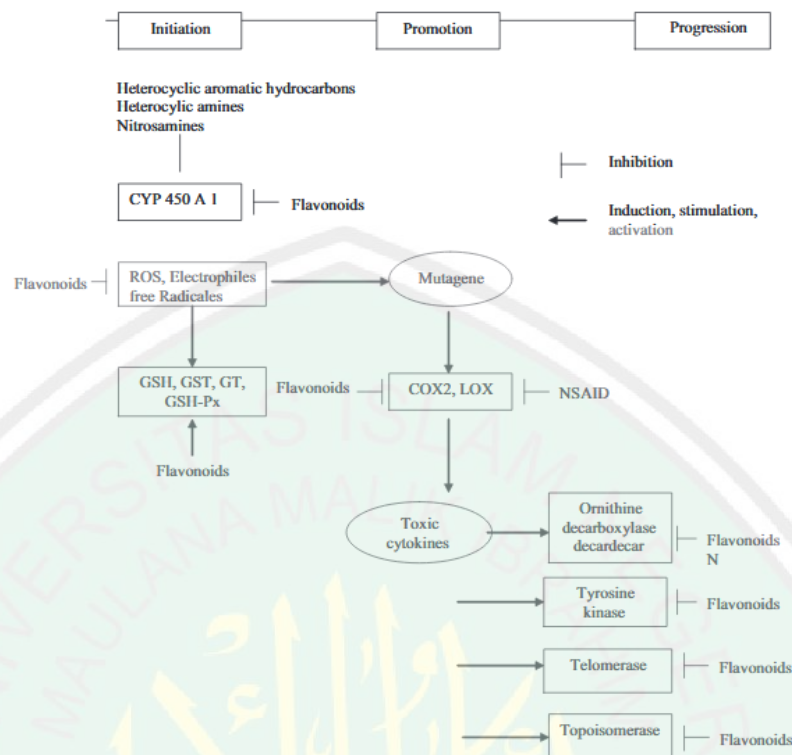
Antioksidan bekerja pada tahap inisiasi dengan memodifikasi karsinogenesis dengan cara: (1) mengubah aktivasi metabolik dari prokarsinogen; (2) mengubah enzim detoksifikasi; (3) interaksi langsung dengan karsinogenik spesies yang terdekat; atau (4) mengikat ROS. Pada tahap promosi, salah satunya dengan menghilangkan radikal anion superoksida yang bertanggung jawab untuk promosi tumor atau dengan merusak lipoksigenase (Ito dan Hirose, 1989).

Aktifitas antioksidan untuk menghambat karsinogenesis terkandung pada senyawa-senyawa yang terdapat dalam kulit pisang kepok, seperti senyawa fenolik (lihat gambar 4.7). Stres oksidatif pada sel kanker karena produksi dari H_2O_2 yang tinggi dan jalur pensinyalan protein kinase mitogen (MAPK) yang terlalu aktif, mengakibatkan pengaktifan faktor transkripsi yang sensitif dan terus-menerus sehingga mendorong viabilitas sel kanker. Adanya senyawa fitokimia fenolik dapat menangkal H_2O_2 atau menghambat fosforilasi protein, sehingga mengganggu perkembangan siklus sel dan proliferasi sel kanker (Loo, 2003).



Gambar 4.7 Peran senyawa fenolik dalam menghambat proliferasi sel kanker (Sumber: Loo, 2003)

Efek kemopreventif oleh senyawa flavonoid dapat dilakukan dengan beberapa mekanisme pada perkembangan karsinogenesis (lihat gambar 4.8). Flavonoid mampu menghambat aktivitas isozim P450 tertentu, seperti CYP1A1 dan CYP1A2, sehingga mereka cenderung memiliki peran protektif terhadap induksi kerusakan sel akibat aktivasi karsinogen. Mekanisme kerja lainnya adalah induksi enzim metabolisme fase II (misalnya GST, kuinon reduktase, dan UDP-GT) dimana karsinogen didetoksifikasi dan dihilangkan dari tubuh (Chahar dkk., 2011).



Gambar 4.8 Efek kemopreventif flavonoid terhadap tahapan karsinogenesis (Sumber: Chahar, dkk., 2011)

Tussanti (2014) menambahkan bahwa kemampuan dari setiap senyawa fitokimia tunggal sebagai agen kemoprevensi dalam menghambat pertumbuhan sel kanker bukan merupakan respon biologis tunggal namun hasil dari kombinasi beberapa proses intraseluler. Oleh karena itu, diperlukan isolasi fitokimia dan diuji sitotoksitas masing-masing komponen senyawa kulit pisang kepok terhadap sel kanker untuk mengetahui pengaruh setiap komponen aktif tersebut terhadap sel kanker payudara (Tussanti dan Johan, 2014).

Potensi kulit buah pisang kepok sebagai agen kemoprevensi ini merupakan salah satu dari tanda-tanda kebesaran Allah SWT dan suatu kenikmatan yang Allah SWT berikan kepada manusia. Allah SWT berfirman dalam QS. 'Abasa (80):25-32, yaitu:

أَنَا صَبَبْنَا الْمَاءَ صَبًّا ﴿٢٥﴾ ثُمَّ شَقَقْنَا الْأَرْضَ شَقًّا ﴿٢٦﴾ فَأَنْبَتْنَا فِيهَا حَبًّا ﴿٢٧﴾
 وَعِنَبًا وَقَضْبًا ﴿٢٨﴾ وَزَيْتُونًا وَنَخْلًا ﴿٢٩﴾ وَحَدَائِقَ غُلْبًا ﴿٣٠﴾ وَفَيْكِهَةً وَأَبًّا ﴿٣١﴾ مَتَعًا
 لَكُمْ وَلِأَنْعَامِكُمْ ﴿٣٢﴾

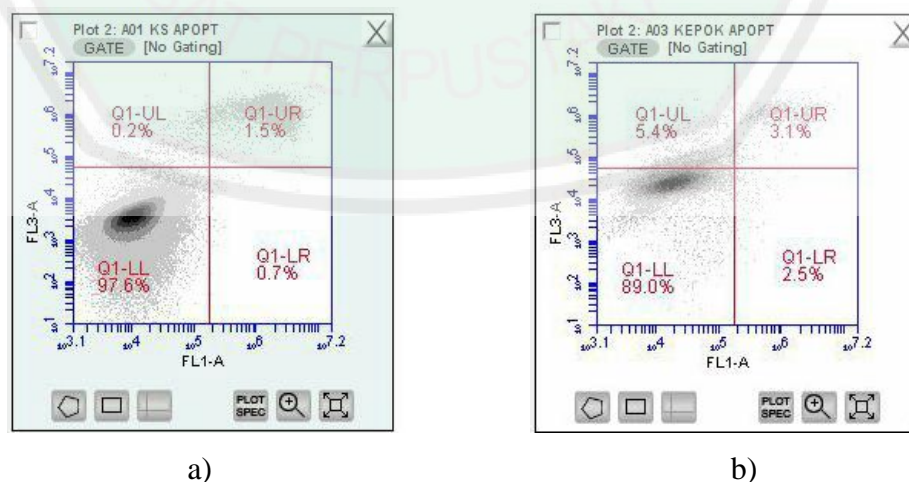
Artinya: “(25) Sesungguhnya Kami benar-benar telah mencurahkan air (dari langit), (26) Kemudian Kami belah bumi dengan sebaik-baiknya, (27) Lalu Kami tumbuhkan biji-bijian di bumi itu, (28) Anggur dan sayur-sayuran, (29) Zaitun dan kurma, (30) Kebun-kebun (yang) lebat, (31) Dan buah-buahan serta rumput-rumputan, (32) Untuk kesenanganmu dan untuk binatang-binatang ternakmu.”

Lafadz فَاكِهَةٌ adalah hasil yang dikeluarkan dari tumbuhan berupa buah-buahan dan Ibnu ‘Abbas mengatakan bahwa sesuatu yang dimakan dalam keadaan berair (Abdullah, 1994). Lafadz فَلَكِهَةٌ atau ‘buah-buahan’ yang dimaksud disini adalah buah selain yang disebutkan pada ayat sebelumnya, seperti delima, pisang dan lain-lain. Dilanjutkan dengan ayat مَتَاعًا لَكُمْ وَلِأَنْعَامِكُمْ atau ‘untuk kesenanganmu dan untuk binatang-binatang ternakmu’, maksudnya adalah telah Allah jamin hidup manusia dan hewan dengan menumbuhkan berpuluh-puluh macam buah-buahan segar yang dapat dimakan oleh manusia, serta rumput-rumputan yang dapat dimakan oleh hewan ternak yang diperlihara manusia tadi (Hamka, 1983). Beberapa mufasir lain seperti ‘Ali Sabuni, menafsirkan maksud kesenangan ialah Allah menumbuhkan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang dibutuhkan baik manusia maupun hewan. Begitu juga dikuatkan oleh Al-Zuhaili dalam kitab tafsirnya bahwa dengan permulaan Allah SWT menciptakan sebagian nikmatnya, akhirnya menjadikan manusia bisa merasakan kenyamanan baik segi

ekonomi, kebutuhan pokok dan lain-lain (Putri, 2015), termasuk kebutuhan medis untuk mencegah dan menghambat perkembangan sel kanker.

4.2 Uji Induksi Apoptosis

Uji lanjut yang dilakukan setelah uji sitotoksik dengan metode MTT adalah uji induksi apoptosis dengan metode *flow cytometry*. Pada uji ini, digunakan sampel uji ekstrak kulit pisang kepok dengan konsentrasi IC_{50} yang ditreatment ke sel kanker T-47D dan kontrol sel T-47D yang tidak diberi sampel uji. Sel yang mengalami apoptosis dihitung dengan *flow cytometry* (Andrijono dan Heffen, 2008). Hasil yang diperoleh dengan BD Accuri (Lampiran 5) kemudian dianalisis dengan metode *cell quest* atau pengelompokan berdasarkan jenis sel dan diperoleh 4 kuadran, yakni sel hidup; apoptosis awal; apoptosis akhir; dan nekrosis. Pemeriksaan aktivitas apoptosis dengan *flow cytometry* merupakan pemeriksaan yang lebih baik daripada metode lainnya. Sel-sel yang mengalami apoptosis dipresentasikan di kuadran kanan bawah, sedangkan sel-sel hidup di kuadran kiri bawah (Andrijono dan Heffen, 2008) (Gambar 4.9).



Gambar 4.9 Persentase sel setiap kuadran a) kontrol sel T-47D b) perlakuan ekstrak kulit pisang kepok IC_{50} terhadap sel-T-47D

Gambar 4.9 menunjukkan bahwa sel yang diberi ekstrak kulit pisang kepok memiliki persentase kematian sel yang lebih besar dibandingkan dengan kontrol sel, baik kematian disebabkan apoptosis maupun nekrosis. Melalui uji *flow cytometry* ini, antara sel hidup dan sel yang mati dapat dibedakan berdasarkan pada kemampuan Annexin V yang berikatan dengan *phosphatidilserin*. Pada kondisi normal, *phosphatidilserin* hanya terdapat pada lapisan intraseluler pada membran plasma sel sehat. Jika terjadi awal apoptosis, membran asimetri hilang dan *phosphatidilserin* mengalami translokasi ke lapisan eksternal membran sel. Namun, Annexin V tidak bisa membedakan antara sel yang apoptosis dan nekrosis, sehingga digunakan Propidium Iodide (PI) untuk membantu membedakannya. Propidium Iodide (PI) adalah pewarna fluoresen yang berikatan dengan DNA. Fase awal apoptosis sel tidak bereaksi dengan PI, sedangkan pada apoptosis fase akhir sel akan terwarnai oleh PI, karena pewarna ini akan menembus nukleus dan berikatan dengan DNA (Rahayu dan Roosmarinto, 2017).

Data hasil uji induksi apoptosis yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam tabel persentase populasi sel untuk memudahkan dalam analisis hasil (Tabel 4.4):

Tabel 4.4 Populasi sel T-47D (%) setelah diberi perlakuan ekstrak kulit pisang kepok terhadap sel T47D dengan *flow cytometry*

Perlakuan	Populasi sel T-47D (%)			
	Sel hidup	Apoptosis awal	Apoptosis akhir	Nekrosis
Kontrol sel	97,6	0,70	1,50	0,20
Ekstrak kulit pisang kepok IC ₅₀	89,0	2,50	3,10	5,40

Berdasarkan hasil tabel 4.4 dapat diketahui bahwa ekstrak kulit pisang kepok dengan konsentrasi IC_{50} (220 mg/ml) hanya dapat menginduksi sel T47D mengalami apoptosis awal sebesar 2,50%, apoptosis akhir sebesar 3,10%, dan nekrosis 0,20% sedangkan persentase sel yang hidup masih tinggi yakni 89,0%. Hal ini bila dibandingkan dengan kontrol sel yang tidak diberi perlakuan, sel yang mengalami apoptosis awal sebesar 0,70%, apoptosis akhir 1,50%, nekrosis 0,20% dan sel yang hidup adalah 97,6%.

Hasil persentase populasi sel T-47D setelah diberi ekstrak kulit pisang kepok menunjukkan bahwa ekstrak kulit pisang kepok dengan konsentrasi IC_{50} dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara T-47D namun tidak sekuat Doxorubicin. Nursid (2013) mengatakan bahwa sel T-47D mengalami apoptosis sebesar 74,8% setelah diberi Doxorubicin (Nursid, Fajarningsih dan Chasanah, 2013).

Sel-sel T-47D yang mengalami nekrosis (5,40%) lebih banyak dibandingkan sel yang mengalami apoptosis awal (2,50%) dan kematian sel nekrosis tidak terkait dengan jalur sinyal apoptosis (Prasetyo, Maryono dan Purwanto, 2017). Mekanisme program apoptosis sel, dapat terjadi dengan jalur ekstrinsik atau instrinsik yang terjadi secara tidak langsung. Mekanisme tersebut dapat melalui penurunan *reactive oxygen species* (ROS) dan modulasi *signaling pathways* dengan menurunkan ekspresi Bcl-2 dan Bcl-XL serta meningkatkan ekspresi gen Bax dan Bak. Peningkatan protein Bax bersama-sama dengan protein lain seperti protein p53 akan mengaktifkan *cytochrome C* yang dilepas dari mitokondria dan selanjutnya akan terjadi aktivasi berantai terhadap *caspase 9-*

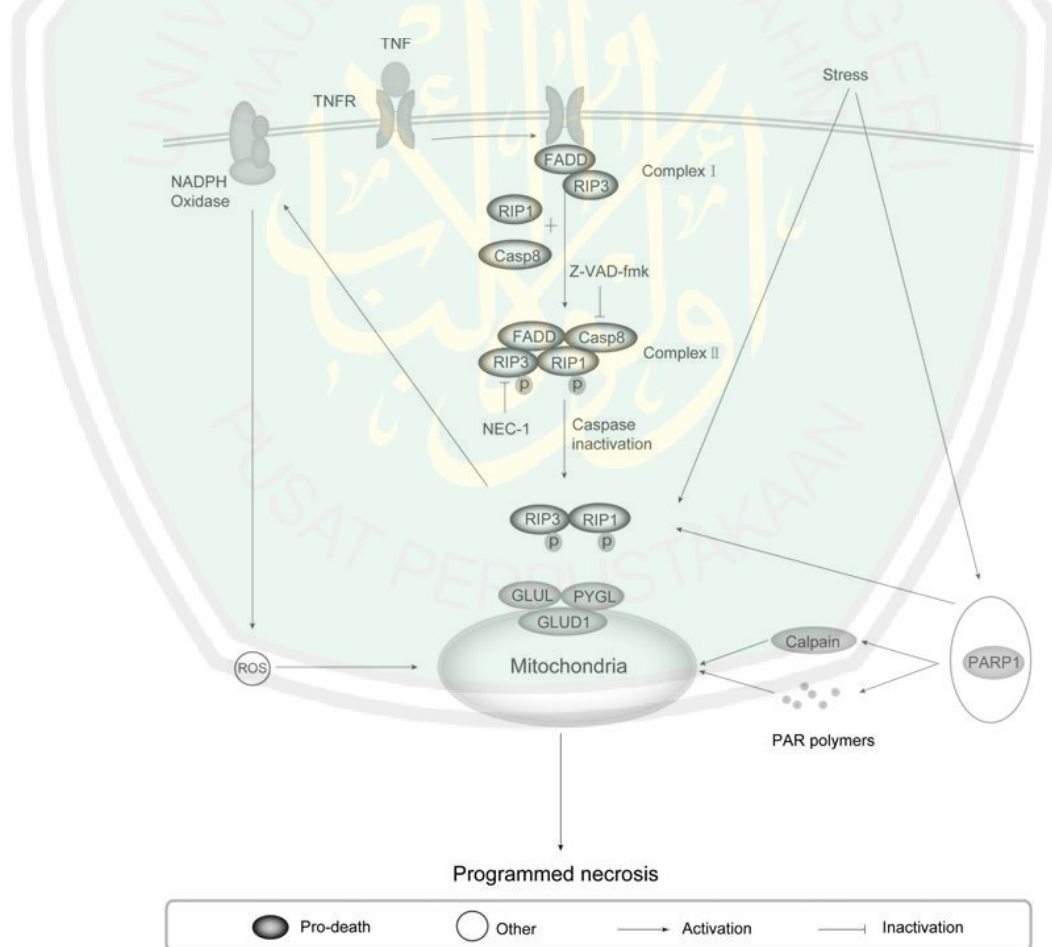
caspase 3 dan berakhir pada kematian sel (CCRC, 2007; Cryns & Yuan, 1998; Meiyanto, 2002; Ren dkk., 2003).

Nekrosis sel diduga dapat terjadi karena disebabkan oleh beberapa faktor, yakni seperti karena paparan toksik, benturan fisik, atau lamanya waktu inkubasi sehingga sel sudah melewati masa apoptosis dan menjadi nekrosis. Sel apoptosis dini jika tidak segera difagositosis dapat berkembang menjadi sel apoptosis lanjut atau disebut juga dengan sel nekrosis sekunder, dengan ciri terjadinya kebocoran membran plasma. Salah satu faktor utama yang menyebabkan perubahan status dari apoptosis dini ke apoptosis lanjut adalah kegagalan dari proses klirens atau pembuangan sel apoptosis (Poon, 2010 dalam Rachmawati, Karyono dan Suyuti, 2012).

Ouyang (2012) menjelaskan bahwa nekrosis sel dipicu oleh meningkatnya produksi ROS. ROS yang berlebihan bisa menyebabkan permeabilisasi membran mitokondria dan nekrosis terprogram berikutnya (Ouyang dkk., 2012). Proses nekrosis ini merupakan kematian sel patologis yang terjadi secara pasif, katabolik dan umumnya merupakan respon terhadap faktor-faktor toksik eksternal, seperti inflamasi, iskemia maupun *toxic injury*. Nekrosis ditandai dengan adanya pembengkakan mitokondria, rusaknya membran plasma, pemisahan kromatin dan destruksi struktur sel yang semula utuh (Wu, Ding dan Fisher, 2001 dalam Prasetyo dkk., 2017).

Tingkat ATP intraselular juga dapat mempengaruhi bentuk kematian sel, yaitu dengan tingkat ATP yang tinggi menyebabkan apoptosis, sedangkan tingkat ATP yang rendah menyebabkan nekrosis. Artinya, kekurangan ATP intraseluler

dapat mengubah kematian sel apoptosis yang bergantung pada energi menjadi nekrosis. Sherwood (2013) menambahkan bahwa nekrosis adalah pembunuhan sel yang tak disengaja dan tak terkendali terhadap sel-sel yang sudah cedera parah akibat paparan agen eksternal ke sel, seperti benturan fisik, kekurangan O_2 , atau penyakit. Sel nekrosis adalah korban pasif, sementara pada apoptosis sel turut serta secara aktif dalam proses kematiannya sendiri. Umumnya, pada nekrosis, jejak pencetus kematian sel mencederai banyak sel yang berdekatan, sehingga banyak sel-sel di sekitarnya yang ikut bengkak dan pecah akibat respon inflamasi (Chaabane dkk., 2013; Sherwood, 2013).

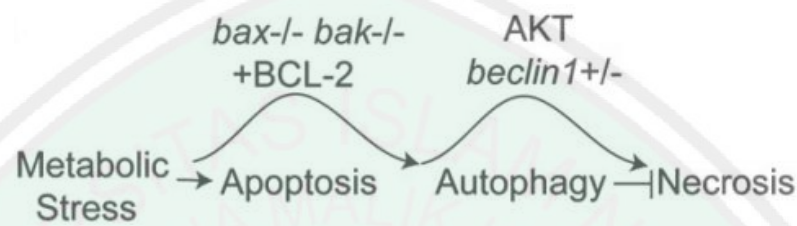


Gambar 4.10 Mekanisme program kematian nekrosis pada sel kanker (Sumber: Ouyang dkk., 2012)

Gambar 4.10 menggambar jalur kematian sel kanker secara nekrosis. Dalam kondisi normal, caspase-8 aktif membelah RIP1 dan menonaktifkannya. Namun, meskipun kemudian caspases mungkin tidak aktif, dalam kasus tersebut, ligasi reseptor kematian menghasilkan perakitan kompleks yang melibatkan caspase-8, FADD, RIP1 dan RIP3. Selanjutnya, RIP1-RIP3 yang pro-nekrotik berinteraksi dengan enzim metabolik, seperti *glycogen phosphorylase* (PYGL), *glutamat ammonia ligase* (GLUL) dan *glutamat dehidrogenase 1* (GLUD1) untuk meningkatkan metabolisme, disertai dengan peningkatan produksi spesies oksigen reaktif (ROS). ROS yang berlebihan dapat menyebabkan permeabilisasi membran mitokondria (MMP) dan selanjutnya akan terprogram kematian nekrosis. Ada sejumlah modulator lain yang terlibat dalam jalur nekrosis ini, termasuk PARP1, polimer PAR, NADPH osidase dan calpains. Stres sel nekrotik dapat mengaktifkan PARP1, yang berpotensi menginduksi nekrosis baik melalui aktivasi kinase RIP, aktivasi calpains atau dengan produksi polimer PAR. Selain itu, aktivasi reseptor kematian dapat menginduksi interaksi dan aktivasi kinase RIP1 dan RIP3, yang mempengaruhi mitokondria baik secara langsung maupun tidak langsung melalui oksidase NADPH, untuk menginduksi kenaikan ROS, sehingga menyebabkan nekrosis (Ouyang dkk., 2012).

Degenhardt (2006) menambahkan bahwa telah diidentifikasi jalur yang diaktifkan onkogen untuk kematian nekrosis sebagai respons terhadap tekanan metabolik (*ischemia*). Jalur nekrosis ini memerlukan penghambatan mekanisme kematian apoptosis sel dan autofag yang menopang fungsi dan viabilitas sel normal selama kekurangan energi. Dengan demikian, koordinasi genetik atau

kerusakan antara apoptosis dan autofag dapat meningkatkan kematian sel nekrotik secara *in vitro* dan *in vivo* (Gambar 4.11). Jadi, kematian nekrosis sel bisa dikendalikan secara genetik dan ada fungsi interaksi antara tiga mekanisme kematian sel (Degenhardt dkk., 2006).



Gambar 4.11 Regulasi jalur kematian yang menyebabkan nekrosis (Sumber: Degenhardt dkk., 2006)

Dampak dari tingginya sel yang mengalami nekrosis bila terjadi pada *in vivo* adalah timbulnya respon inflamasi. Komponen sitosol pada sel apoptosis akan difagosit oleh makrofag, berbeda dengan komponen sitosol sel nekrosis akan mengalir ke ruang interselular melalui membran plasma yang rusak sehingga menimbulkan respon inflamasi. Gangguan keseimbangan antara nekrosis dan apoptosis ini yang mungkin menjadi penyebab dalam pengembangan beberapa penyakit (Chaabane dkk., 2013). Akibat inflamasi dari kematian nekrosis ini, diharapkan ada penelitian lanjut terkait senyawa antiinflamasi yang mendampingi ekstrak kulit pisang kepok untuk mengatasi respon inflamasi tersebut.

Hasil uji induksi apoptosis ini menunjukkan ekstrak kulit pisang pada konsentrasi IC_{50} kurang kuat menginduksi apoptosis pada sel T-47D dan berpotensi sebagai agen kemoprevensi atau pencegahan kanker. Mengingat penelitian ini masih berada pada tahap awal untuk mengetahui potensi ekstrak

kulit pisang kepok, masih terdapat beberapa keterbatasan pada penelitian ini. Penelitian lanjutan sangat perlu dilakukan dan hal tersebut merupakan sebagian langkah dalam mempelajari dan mengembangkan ilmu pengetahuan sebagai sarana ibadah dan meningkatkan kualitas kesehatan manusia. Allah SWT berfirman dalam QS. Yunus (10):101;

قُلْ أَنْظَرُوا مَاذَا فِي السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَمَا تُغْنِي الْآيَاتُ وَالنُّذُرُ عَنْ قَوْمٍ لَا يُؤْمِنُونَ

Artinya: Katakanlah: "Perhatikanlah apa yang ada di langit dan di bumi. Tidaklah bermanfaat tanda kekuasaan Allah dan Rasul-rasul yang memberi peringatan bagi orang-orang yang tidak beriman".

Lafadz انظروا atau ‘perhatikanlah’ dengan *fi'il amr* berarti perintah atau arahan Allah SWT kepada hamba-hamba-Nya untuk berfikir tentang nikmat-nikmat-Nya dan apa yang telah Allah SWT ciptakan di langit dan bumi dari ayat-ayat yang agung untuk orang yang berakal (Abdullah, 1994). Kandungan ayat ini adalah menggambarkan bahwa pengembangan sains merupakan tugas manusia, karena terus meneliti untuk mendapatkan ilmu baru adalah kewajiban bagi manusia. Selain itu, Allah SWT juga menugaskan manusia untuk terus belajar dari apa yang telah diperoleh melalui kajian tersebut (Jumin, 2012).

Hasil dan riset ini juga merupakan cara untuk ‘memperhatikan’ ciptaan Allah. Pemanfaatan kulit pisang kepok sebagai agen kemoprevensi kanker payudara diharapkan dapat menekan resiko penyakit kanker payudara, mencegah dan menghambat pertumbuhan sel kanker, serta mengurangi jumlah penderita kanker payudara. Penelitian lanjutan masih sangat diperlukan, seperti perlu

dilakukan uji lebih lanjut untuk menguji toksisitas ekstrak kulit pisang kepok terhadap sel kanker payudara menggunakan variasi konsentrasi yang berbeda. Selain itu, perlu dilakukan uji terhadap sel normal (sel vero) sehingga tingkat keamanan ekstrak kulit pisang kepok terhadap sel normal dapat diketahui.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil uji sitotoksik (*MTT assay*) menunjukkan nilai IC_{50} ekstrak kulit pisang kepok terhadap sel kanker payudara T-47D adalah sebesar 220,375 $\mu\text{g/mL}$, artinya bersifat sitotoksik moderat dan berpotensi sebagai agen kemoprevensi kanker payudara.
2. Hasil uji induksi apoptosis (*Flow cytometry*) pada konsentrasi IC_{50} menunjukkan bahwa jumlah sel yang mengalami apoptosis awal sebanyak 2,50% dan apoptosis akhir sebanyak 3,10%.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini, disarankan untuk:

1. Dilakukan penelitian *MTT assay* lebih lanjut dengan perbandingan seri konsentrasi berbeda ($>250 \mu\text{g/mL}$) yang diharapkan menimbulkan efek antikanker yang lebih baik terhadap sel kanker payudara T-47D secara *in vitro*.
2. Dilakukan penelitian ekstrak kulit pisang kepok terhadap sel normal (sel *vero*) secara *in vitro* sehingga dapat diketahui pengaruh atau dampaknya pemberian ekstrak kulit pisang kepok terhadap sel normal.

3. Dilakukan penelitian lebih lanjut terkait pemberian ekstrak kulit pisang kepok terhadap sel kanker lainnya, seperti sel HeLa (kanker serviks), sel WiDr (kanker kolon), dan lain-lain sehingga dapat diketahui potensi ekstrak kulit pisang kepok sebagai kandidat terapeutik jenis kanker-kanker lain.
4. Dikembangkan lebih lanjut olahan dari ekstrak kulit pisang kepok menjadi sediaan fitofarmaka agar dapat dimanfaatkan oleh masyarakat untuk dikonsumsi (sebagai bagian dari *life style* seperti jamu) karena potensinya sebagai agen kemopreventif/ pencegah kanker payudara.



DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah bin Muhammad bin 'abdurrahman bin Ishaq Alu Syaikh. 1994. *Lubaab At-Tafsir Min Ibni Katsiri*, Kairo: Mu-assasah Daar al-Hilaal, Terj. M. Abdul Ghoffar, Abu Ihsan al-Atsari, Tafsir Ibnu Katsir, Jilid.4, Jakarta: Pustaka Imam Asy-Syafi'i
- Al-Jazari, S. A. B. J. 2009. *Aisar At-Tafaasir li Al-Kalaami Al-Aliyyi Al-Kabir*. Jakarta: Darus Sunnah Press.
- Al-Qarni, A. 2010. *Tafsir Muyassar*. Jakarta: Qisthi Press.
- Al-Qurthubi, S. I. 2008. *Tafsir Al-Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Alhabsyi, D. F., Suryanto, E. dan Wewengkang, D. S. 2014. Aktivitas antioksidan dan tabir surya pada ekstrak kulit buah pisang goroho (*Musa acuminata* L.), *Jurnal Ilmiah Farmasi Pharmacon*, 3(2): 107–114.
- Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A. dan Bora, U. 2008. Indian Medicinal Herbs as Sources of Antioxidants, *Food Research International*, 41(1): 1–15.
- American Cancer Society. 2016. *Cancer Facts & Figures 2016*. Atlanta.
- Andrijono, A. dan Heffen, W. 2008. Study of Apoptosis Induction of Hydatidiform Mole Trophoblastic Cell by the Administration of Retinoic Acid, *Indonesian Journal of Obstetrics and Gynecology (INAJOG)*, 32(2).
- Ansel, H. C. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi Edisi Keempat*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- ATCC. 2015. *T-47D, ATCC Product Sheet*. Available at: www.atcc.org.
- Atun, S., Arianingrum, R., Handayani, S., Rudyansah, R. dan Garson, M. 2010. Identification and Antioxidant Activity Test of Some Compounds from Methanol Extract Peel of Banana (*Musa paradisiaca* Linn.), *Indonesian Journal of Chemistry*, 7(1): 83–87.
- Azizah, B. dan Salamah, N. 2013. Standardization of Non Specific Parameter and Comparative Levels of Curcumin Extract Ethanol and Extract of Purified Turmeric Rhizome, *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 3(1): 21–30.
- Azizah, M. 2015. Penentuan Potensi Induksi Apoptosis Tilirosida dari Ekstrak Daun Jati Belanda (*G. Ulmifolia* Lamk.) terhadap Sel T47D dengan Metode Flow Cytometry. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.

- Backer, C. dan Van den Brick, B. 1968. *Flora of Java Vol.3*. The Netherlands: Noordhoff-Groningen.
- Ballot, C., Kluza, J., Martoriati, A., Nyman, U., Formstecher, P., Joseph, B., Bailly, C. dan Marchetti, P. 2009. Essential role of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by the marine alkaloid Lamellarin D, *Molecular Cancer Therapeutics*, 8,
- Banker G, G. K. 1998. *Culturing Nerve Cells*. USA: Massachusetts Institute of Technology.
- Berridge, M. V, Tan, A. N. S., Mccoy, K. D. dan Wang, R. U. I. 1996. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts, (4), pp. 4–9.
- Brunner, D., Appl, H., Pfaller, W. dan Gstraunthaler, G. 2010. Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive Online Database, *ALTEX*, 27(1): 53–62.
- Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R. J. dan Speirs, V. 2003. Breast cancer cell lines: friend or foe?, *Breast cancer research : BCR*, 5(2): 89–95.
- Butler, M. 2003. *Animal Cell Culture and Technology*. 2nd edn. United Kingdom: Taylor & Francis.
- Cahyono, B. 2009. *Pisang Usaha Tani dan Penanganan Pascapanen*. Yogyakarta: Kanisius.
- CCRC. 2007. *Mekanisme dan Regulasi Apoptosis*. CCRC Farmasi UGM. Available at: <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/mekanisme-dan-regulasi-apoptosis1.pdf> (Accessed: 1 December 2016).
- CCRC. 2009. *Prosedur Tetap Perhitungan Sel*, CCRC Farmasi UGM. Available at: <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/8-sop-perhitungan-sel.pdf> (Accessed: 1 December 2016).
- CCRC. 2013. *Uji Sitotoksik Metode MTT*. Available at: <http://www.ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/03.010.-Sitotoksik.pdf> (Accessed: 1 January 2017).
- CCRC. 2014. *Preparasi sampel untuk siklus sel dengan metode flowcytometry*. Available at: <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/03.014.-Flowcytometry.pdf> (Accessed: 1 January 2017).

- Chaabane, W., Mohamed, D. U., Jaksik, E. R., Ripk, Á. dan Vhl, Á. P. 2013. Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 61: 43–58.
- Chahar, M.K., Sharma, N., Dobhal, M. P. dan Joshi, Y.C. 2011. Flavonoids : A versatile source of anticancer drugs, *Pharmacognosy Reviews*, 5(9): 1–13.
- Ciapetti, G., Cenni, E., Pratelli, L. dan Pizzoferrato, A. 1993. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay, *Biomaterials*, 14(5): 359–364.
- Cipto, H. 2001. *Deteksi dan Penatalaksanaan Kanker Kulit Dini*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Cos, P., Hermans, N., Calomme, M., Maes, L., De Bruyne, T., Pieters, L., Vlietinck, A. J. dan Berghe, D. Vanden. 2003. Comparative study of eight well-known polyphenolic antioxidants, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55(9): 1291–1297.
- Cronquist, A. 1981. *Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York: Columbia University Press.
- Cryns, V. dan Yuan, J. 1998. Proteases to die for, *Genes & Development*, 12(11): 1551–1570.
- Dalimartha, S. dan F. A. 2011. *Fakta Ilmiah Buah dan Sayur*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Darsini, T. P., Maheshu, V., Vishnupriya, M. dan Sasikumar, J. M. 2012. In vitro antioxidant activity of banana (*Musa* spp. ABB cv. Pisang Awak), *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 49(2): 124–129.
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Nelson, D. A., Jin, S. dan White, E. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis, *Cancer Cell*, 10: 51–64.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat, pp. 2, 5-6, 10–31.
- Diananda. 2009. *Panduan Lengkap Mengenai Kanker*. Yogyakarta: Mirza Media Pustaka.

- Doughari, J. H. 2012. Phytochemicals : Extraction Methods , Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents, pp. 1–33. Available at: <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health/phytochemicals-extraction-methods-basic-structures-and-mode-of-action-as-potential-chemotherapeutic-%0AInTech>.
- Dwitiyanti. 2015. Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) sebagai Antikanker Payudara, *Pharm Sci Res*, 2(2): 79-88
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4): 495–516.
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A. dan Ab Wahab, M. S. 2014. Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of cancer, *Molecules*, 19(2): 2497–2522.
- Erguder, B., Avci, A., Devrim, E. dan Durak, I. 2007. Effects of cooking techniques on antioxidant enzyme activities of some fruit and vegetables, *Journal of Medicinal Science*, 37(3): 151–156.
- Fadilah, P. N., Astuti, P. dan Santy, W. H. 2016. Pengaruh Teknik Relaksasi Hand Massage Terhadap Nyeri pada Pasien Kanker Payudara di Yayasan Kanker Indonesia Surabaya, *Jurnal Ilmiah Kesehatan*, 9(2): 221–226.
- Fajarningsih, N. D., Nursid, M., Wikanta, T. dan Marraskuranto, E. 2008. Bioaktivitas ekstrak *Turbinaria decurrens* sebagai antitumor (HeLa dan T47D) serta efeknya terhadap proliferasi limfosit, *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 3(1): 21–28.
- Fitrianingsih, S. P. dan Purwanti, L. 2012. Uji Efek Hipoglikemik Ekstrak Air Kulit Buah Pisang Ambon Putih [*Musa* (AAA Group)] Terhadap Mencit Model Hiperglikemik Galur Swiss Webster, *Prosiding Seminar Nasional Penelitian dan PKM*, 3(1): 73–80.
- Freshney, R. I. 2000. *Basic Culture Of Animal Cells: A manual of Technique*. New York: Wiley-Liss Inc.
- Fu, R., Yan, T., Wang, Q., Guo, Q., Yao, H., Wu, X. dan Li, Y. 2012. Suppression of endothelial cell adhesion by XJP-1, a new phenolic compound derived from banana peel, *Vascular Pharmacology*. Elsevier Inc., 57(2–4): 105–112.
- Ghobrial, I. M., Witzig, T. E. dan Adjei, A. A. 2005. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy, *CA Cancer J Clin*, 55 (3): 178–194.
- Greenwald, P. 2002. Clinical review: Cancer chemoprevention, *BMJ*, 324 (7339): 71–718.

- Gstraunthaler, G. 2003. Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum : Serum-free Cell Culture, *ALTEX*, 20(4): 275–281.
- Guimarães CA, L. R. 2004. Programmed Cell Death: Apoptosis and Alternative Deathstyles, *Eur j Biochem*, 271 (9): 1638-1650
- Halliwell, B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence?, *Lancet*, 344(8924): 721–724.
- Halliwell, B. 2007. Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health?, *Cardiovascular Research*, 73(2): 341–347.
- Hamka. 1983. Tafsir Al-Azhar. Jakarta: Pustaka Panjimas
- Handayani, S., Risdian, C., Meiyanto, E., Udin, Z. dan Andriyani, R. 2012. Selaginella Active Fractions Induce Apoptosis on T47D Breast Cancer Cell, *Indonesian Journal of Pharmacy*, 23(1): 48–53.
- Handoko, F. F., Maruti, A. A., Rivanti, E., Dewi, D., Putri, P. dan Meiyanto, E. 2011. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanolik Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) Terhadap Sel Kanker Serviks HeLa dan Sel Kanker Kolon WiDr, *Majalah Kesehatan PharmaMedika*, 3(1): 222–226.
- Hartadi, R., Santoso, I. dan Hidayatno, A. 2011. Deteksi Potensi Kanker Payudara Pada Mammogram Menggunakan Metode Gray Level Co-Occurrence Matrices. *Skripsi*. Universitas Diponegoro Semarang.
- Haryoto, Irjayanti, A. N., Suhendi, A. dan Sujono, T. A. 2015. Cytotoxic Activity of Polar, Semipolar, and Non Polar Fraction of Ethanol Extract of Sala Plants Leaves (*Cynometra ramiflora* Linn.) Againsts WiDr cell, *Proceeding-ICB Pharma II Current Breakthrough in Pharmacy Materials and Analyses*, pp. 60–64.
- Herr, I., Debatin, K., Herr, I. dan Debatin, K. 2014. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy Review article, *BLOOD*, 98 (9): 2603–2614.
- Heti, D. 2008. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Herba Sisik Naga (*Drymoglossum piloselloides* Presl.) terhadap Sel T47D. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Hudaya, T. S. P. A. P. K. 2013. Ekstraksi, Isolasi, dan Uji Keaktifan Senyawa Aktif Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Sebagai Pengawet Makanan Alami. *Laporan Penelitian*. Universitas Katolik Parahyangan
- Hussain, S. P., Hofseth, L. J. dan Harris, C. C. 2003. Radical causes of cancer, *Nature Reviews Cancer*, 3(4): 276–285.

- Indradmojo, C. 2016. Aktivitas Antikanker dan Mekanisme Farmakologi Ekstrak Dan Fraksi Benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) pada Sel Kanker Payudara T47D. *Laporan Penelitian Kompetitif Dosen*. UIN Malang.
- Indrati, R. H. S. D. H. 2005. Faktor Faktor Risiko yang Berpengaruh terhadap Kejadian Kanker Payudara Wanita. *Master Thesis*. Program Pascasarjana Univeritas Diponegoro Semarang
- Iqbal, S. A. dan N. A. K. 2011. *Textbook of Phytochemistry*. New Delhi: Discovery Publishing House PVT. LTD.
- Istindiah, H. N. dan Auerkari, E. I. 2002. Peran p53 Sebagai Jalur Kritis pada Mekanisme Kontrol Siklus Sel Sebagai Pencegah Terjadinya Kanker Mulut, *Journal of Dentistry Indonesia*, 9(2): 30–34.
- Ito, N. dan Hirose, M. 1989. Antioxidants-Carcinogenic and Chemopreventive Properties, *Advances in Cancer Research*, 53: 247–302.
- Jo, F., Ni, F., Lp, D. O., Ca, E., Gr, P., Lc, C., Ec, C. dan Pharmacy, F. 2016. *Matricaria recutita* and its Isolate-Apigenin: Economic Value, Ethnopharmacology and Chemico-Biological Profiles in Retrospect, *Research and Reviews: Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(4): 17-31
- Jochems, C. E. A., Valk, J. B. F. van der, Stafleu, F. R. dan Baumans, V. 2002 The use of fetal bovine serum : Ethical or scientific problem?, *ATLA*, 30: 219–227.
- Jumin, H. B. 2012. *Sains dan Teknologi dalam Islam Tinjauan Genetis dan Ekologis*. Jakarta: PT. RajaGrafindo Persada.
- Kanazawa, K. dan Sakakibara, H. 2000. High Content of Dopamine, a Strong Antioxidant, in Cavendish, *J. Agric. Food Chem.*, 48(3): 844–848.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R. dan Li, Z. 2002. NF- κ B in Cancer : from Innocent Bystander to Major Culprit, *Nature Reviews Cancer*, 2: 1–10.
- Keitel, M. dan Kopala, M. 2000. *Counseling women with breast cancer: a guide for professionals*. California: Sage Publications.
- Kementrian Kesehatan RI. 2015. *Stop Kanker, infodatin-Kanker*. Jakarta.
- Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F. R., Delarea, J., Radu, M., Chaitcik, S. dan Brenner, H. J. 1979. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin, *European Journal of Cancer*, 15(5): 659–670.

- Kristianti, A. N. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kurniasih, N., Kusmiyati, M., Nurhasanah, Sari, R. P. dan Wafdan, R. 2015. Potensi Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn), Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis), dan Daun Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) sebagai antioksidan pencegah, IX(1): 162-184
- Lee, C. C. dan Houghton, P. 2005. Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer, 100: 237-243.
- Li, H; Wang, Z; Liu, Y. 2003. Review in the studies on tannins activity of cancer prevention and anticancer, *Zhong Yao Cai*, 26(6): 444-8.
- Loo, G. 2003. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (Review), *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14: 64-73.
- Lumongga, F. 2008. *Apoptosis*. USU Repository, Medan.
- Mardiana, L. 2007. *Kanker pada Wanita*. Bogor: Penebar Swadaya.
- Maryati. 2006. Mekanisme antiproliferatif isolat flavonoid daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) terhadap Sel T47D. Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Matsushita, H., Kuwabara, H., Ishikawa, S. dan Mochizuki, M. 2005. Apoptosis Induced in Human Cell Lines by a Butanol Extract from *Chlorophytum comosum* Roots, *Journal of Health Science*, 51(3): 341-345.
- Mcconkey, D. J. dan Bold, R. J. 1998. Apoptosis, cancer and cancer therapy, *Surgical Oncology*, 6(3): 133-142.
- Meerloo, J. Van, Kaspers, G. J. L. dan Cloos, J. 2011. Cell Sensitivity Assays : The MTT Assay, *Cancer cell culture: methods and protocols*, 731: 237-245.
- Megawati. 2012. Gambaran Ketahanan Hidup Lima Tahun Pasien Kanker Payudara Berdasarkan Karakteristik Demografi dan Faktor Klinis di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo Tahun 2007-2010. *Skripsi*. Universitas Indonesia.
- Meiyanto, E. 2002. *Biologi Molekuler*. Buku ajar. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Meiyanto, E., Susidarti, R. A. dan Handayani, S. 2008. Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang (*Areca catechu* L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7, *Apoptosis*, 19(1): 12-19.

- Melannisa, R. 2004. Pengaruh PGV-1 pada Sel Kanker Payudara T47D yang diinduksi 17 Beta-Estradiol: Kajian Antiproliferatif, Pemacuan Apoptosis, dan Antiangiogenesis. *Skripsi*. Universitas Gadjah Mada.
- Miller, G. 2008. *Pencegahan dan Pengobatan Penyakit Kanker*. Jakarta: PT. Pustakaraya.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2): 55–63.
- Murayama, K., Singh, N., Helmrich, A. dan Barnes, D. 2001. *Neural Cell Lines*. Totowa: Humana Press Inc.
- Nam, A. dan I, W. 2014. The Potency of Ambon Banana (*Musa sapientum*) Fruit Peel As The Chemopreventive and Co-Chemoteraphy Agent in Breast Cancer, *Medical Journal of Lampung University*, 3(5): 123–129.
- Nam, S., Smith, D. M. dan Dou, Q. P. 2001. Tannic Acid Potently Inhibits Tumor Cell Proteasome Activity , Increases p27 and Bax Expression, and Induces G 1 Arrest and Apoptosis, 10: 1083–1088.
- Nenutil, R., Smardova, J., Pavlova, S., Hanzelkova, Z., Muller, P., Fabian, P., Hrstka, R., Janotova, P., Radina, M., Lane, D. P., Coates, P. J. dan Vojtesek, B. 2005. Discriminating functional and non-functional p53 in human tumours by p53 and MDM2 immunohistochemistry, *Journal of Pathology*, 207: 251–259.
- Noorhidayah. 2016. Faktor-Faktor Yang Berhubungan dengan Kejadian Penyakit Kanker Payudara pada Pasien yang dirawat di Ruang Kemoterapi Rumah Sakit Umum Daerah Abdul Wahab Sjahranie Samarinda. *Jurnal Citra Keperawatan*, 3(1): 6035.
- Nugroho, I. S. 2012. Aktivitas sitotoksik fraksi semipolar ekstrak etanol daun srikaya (*Annona Squamosa* Linn.) terhadap sel T47D. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Nurani, L. H. 2012. Uji Sitotoksitas dan Antiproliferatif Sel Kanker Payudara T47D dan Sel Vero Biji *Nigella sativa* L., *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 2 (1): 17–29.
- Nurhayati, E. 2012. Sitotoksisitas Ekstrak dan Senyawa Flavonoid Daun Sukun (*Artocarpus altilis*) Terhadap Sel T47D Melalui Induksi Apoptosis. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor.
- Nurhayati, S. dan Lusiyanti, Y. 2006. Apoptosis dan Respon Biologik Sel Sebagai Faktor Prognosa Radioterapi Kanker, *Buletin Alara*, 7(3): 57–66.

- Nurhayati, T. dan Destyningtias, B. 2010 Identifikasi Kanker Payudara dengan Thermal, *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi*, (1):75–79.
- Nursid, M., Fajarningsih, N. D. dan Chasanah, E. 2013. Cytotoxic Activity and Apoptosis Induction of T47D Cell Lines by *Turbinaria decurrens* Extract, *Squalen*, 8(1): 23–28.
- Othman, N. H. 2012. Honey and cancer: Sustainable inverse relationship particularly for developing nations-a review, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2012: 1-10
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F., Zhou, T., Liu, B. dan Bao, J. 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, *Cell Proliferation*, 45(15): 487–498.
- Padmawinata, K. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: Penerbit ITB.
- Pan, M.-H., Chen, W.-J., Lin-Shiau, S.-Y., Ho, C.-T. dan Lin, J.-K. 2002. Tangeretin induces cell-cycle G1 arrest through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cells, *Carcinogenesis*, 23(10): 1677–1684.
- Pereira, A. dan Maraschin, M. 2015. Banana (*Musa spp*) from peel to pulp: Ethnopharmacology, source of bioactive compounds and its relevance for human health, *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier, 160: 149–163.
- Prasetyo, D., Maryono, S. dan Purwanto, B. 2017. Pengaruh Ekstrak Propolis Terhadap Peningkatan Ekspresi P21, Ekspresi Protein Bax dan Induksi Apoptosis Pada Kultur Sel Kanker Kolon (Cell Line WiDr), *Biomedika*, 9(1): 14–23.
- Prayong, P., Barusrux, S. dan Weerapreeyakul, N. 2008. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants, *Fitoterapia*. Elsevier B.V., 79 (7–8): 598–601.
- Putri, F. A. 2015. Kenikmatan Pangan Dalam Al- Qur'an (Studi Penafsiran Surat 'Abasa Ayat 24 -32). *Skripsi*. UIN Sunan Ampel Surabaya.
- Quthb, S. 2008. *Fi Zhilalil Qur'an*. Jakarta: Gema Insani.
- Rachmani, E. A. 2012. The Breast of Anticancer from Leaf Extract of *Annona muricata* Againsts Cell Line in T47D. *Skripsi*. Universitas Jenderal Soedirman.

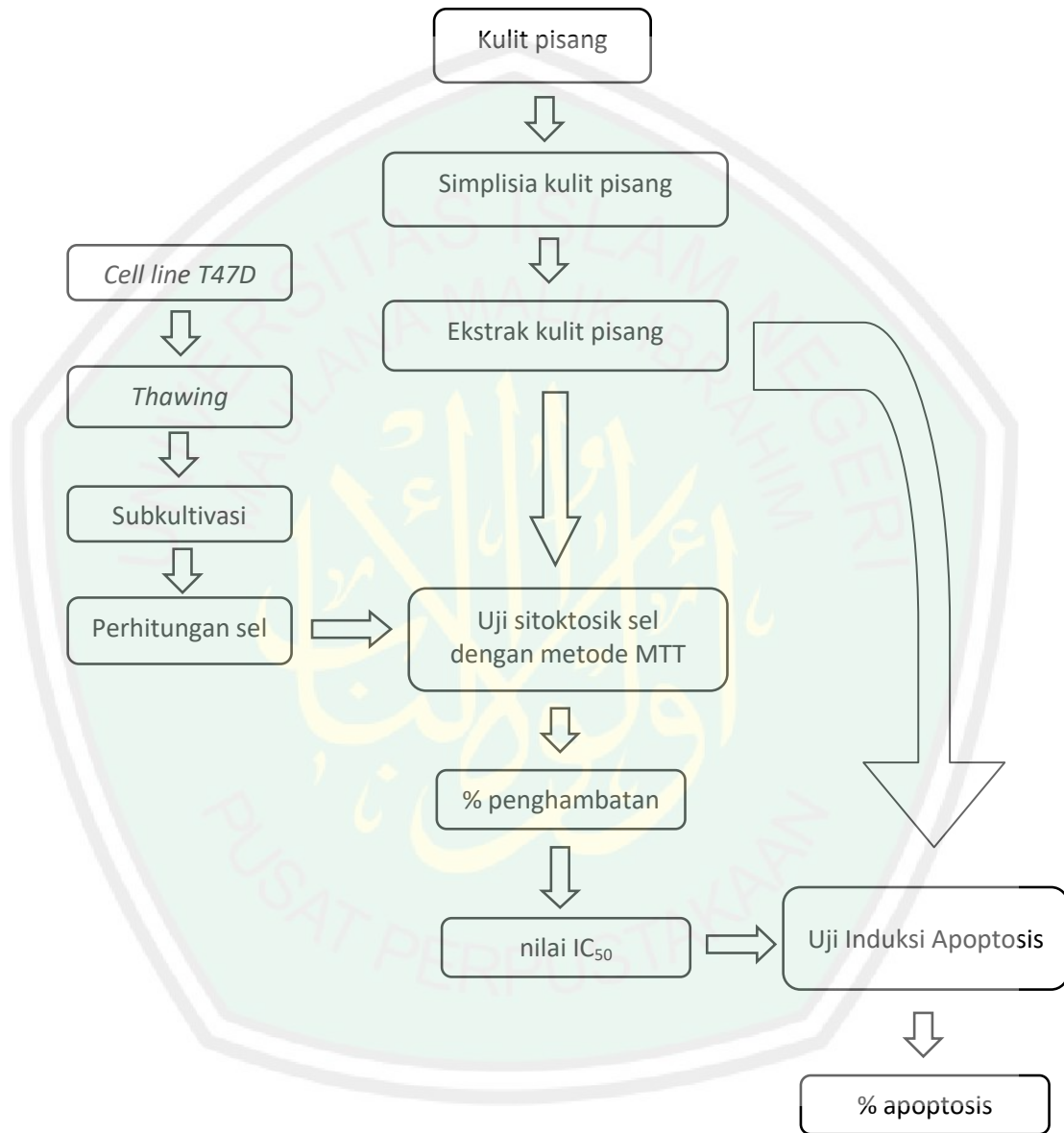
- Rachmawati, E., Karyono, S. dan Suyuti, H. 2012. Efek Ekstrak Etanolik Daun Sirsak pada Proliferasi dan Apoptosis Sel HeLa yang dimediasi oleh p53, *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 27(1): 28–33.
- Rahayu, M. dan Roosmarinto. 2017. Kajian Aktivitas Antikanker Ekstrak Daun Gude (*Cajanus cajan*) Terhadap Sel Kanker Kolon Secara in Vitro, *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 6(1): 1–8.
- Rahmawati, E. dan Muti, A. F. 2013. Aktivitas Antikanker Ekstrak N-Heksana dan Ekstrak Metanol Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn.) Terhadap Sel Kanker Payudara T47D, *Media Farmasi*, 10(2): 47–55.
- Ramadhan, A. E. dan Phaza, H. A. 2010. Pengaruh Konsentrasi Etanol, Suhu Dan Jumlah Stage pada Ekstraksi Oleoresin Jahe (*Zingiber officinale* Rosc) Secara Batch. *Skripsi*. Universitas Diponegoro Semarang.
- Ramos, S. 2007. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18 (7): 427–442.
- Rana, M. G., Katbamna, R. V, Dudhrejiya, A. D., Jivani, N. P. dan Sheth, N. R. 2010. In Vitro antioxidant and free radical scavenging studies of alcohol extract of *Medicago sativa* L., *Rom. J. Biol-Plant Bioll*, 55(1): 15–22.
- Rastogi, R. P., Richa dan Sinha, R. P. 2009. Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity, *EXCLI Journal*, 8: 155–181.
- Redha, A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya dalam Sistem Biologis, *Jurnal Berlin*, 9(2): 196–202.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L. dan Zhang, L. 2003. Flavonoids: Promising anticancer agents, *Medicinal Research Reviews*, 23(4): 519–534.
- Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D. dan Barreda, D. R. 2011. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death, *Journal of Visualized Experiments*, 50: 3–6.
- Rohdiana, D. 2001. Aktivitas Daya Tangkap Radikal Polifenol dalam Daun Teh, *Majalah Jurnal Indonesia*, 12(1): 53–58.
- Rohima, B. N., Astuti, I. dan Ghufon, M. 2011. Efikasi Fraksi Etanolik Akar Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) sebagai Kemoterapi Kanker Kolon Berdasarkan Ekspresi Caspase-9, *Mutiara Medika*, 11(1): 55–61.
- Rosdiana, R. 2014. Riska Rosdiana, 2014 Fortifikasi Tahu Menggunakan Antioksidan Dari Ekstrak Kulit Pisang Kepok (*Musa Bluggoe*) *Respositry UPI*, Universitas Pendidikan Indonesia Bandung.

- Saraswati, F. N. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 96% Limbah Kulit Pisang Kepok Kuning (*Musa balbisiana*) Terhadap Bakteri Penyebab Jerawat (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, dan *Propionibacterium acne*). Skripsi. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta
- Schafer, J. M., Lee, E. S., Regan, R. M. O., Yao, K., Jordan, V. C., Lurie, R. H. dan Cancer, C. 2000. Rapid Development of Tamoxifen-stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice, *Clinical Cancer Research*, 6: 4373–4380.
- Schmitt, C. A. dan Lowe, S. W. 1999. Apoptosis and Therapy, *Journal of Pathology*, 187(1): 127–137.
- Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I. dan Milner, J. A. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9): 567–579.
- Sellers, W. R. dan Fisher, D. E. 1999. Apoptosis and cancer drug targeting, 104(12): 1655–1661.
- Septiana, A. T. dan Asnani, T. 2012. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat, *Agointek*, 6(1): 22–28.
- Sherwood, L. 2013. *Fisiologi Manusia: dari Sel ke Sistem*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Shi, Y. 2004. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view., *Protein science : a publication of the Protein Society*, 13(8): 1979–87.
- Shihab, M. Q. 2006. *Tafsir Al-Mishbah*. Jakarta: Lentera Hati.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. dan Jemal, A. 2016. Cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, 66(1): 7–30.
- Siregarr, F. dan Hadijono, B. S. 2000. Uji Sitotoksitas dengan Esei MTT, *Jurnal Kedokteran Gigi UI*, 7: 28–32.
- Smardová, J., Pavlova, S. dan Svitáková, M. 2005. Analysis of p53 status in human cell lines using a functional assay in yeast : Detection of new non-sense p53 mutation in codon 124, *Oncology Reports*, (14): 901–907.
- Smardova, J., Smarda, J. and Koptikova, J. 2005. Functional analysis of p53 tumor suppressor in yeast, *Differentiation*, (73): 261–277.
- Someya, S., Yoshiki, Y. dan Okubo, K. 2002. Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*), *Food Chemistry*, 79(3): 351–354.
- Sudewo, B. 2012. *Basmi Kanker dengan Herbal*. Jakarta: Visimedia.

- Sudiana, I. 2008. *Patobiologi Molekuler Kanker*. Jakarta: Salemba Medika.
- Sulaiman, S. F., Yusoff, N. A. M., Eldeen, I. M., Seow, E. M., Sajak, A. A. B., Supriatno dan Ooi, K. L. 2011. Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa sp.*), *Journal of Food Composition and Analysis*. Elsevier Inc., 24(1): 1–10.
- Sumardika, I. wayan;, Indrayani, A. W., Jawi, I. M., Suprpta, D. N. dan Adnyana, L. 2010. Efek Sitotoksik dan Antiproliferatif Ekstrak Etanol Umbi Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L*) Terhadap Sel Line Kanker Payudara T47D, *Journal of Internal Medicine*, 11(1): 25-32
- Sun, J., Chu, Y. F., Wu, X. dan Liu, R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25): 7449–7454.
- Sundaram, S., Anjum, S., Dwivedi, P. dan Rai, G. K. 2011. Antioxidant Activity and Protective effect of Banana Peel against Oxidative Hemolysis of Human Erythrocyte at Different Stages of Ripening, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(7):1192–1206.
- Supriyanti, F. M. T., Suanda, H. dan Rosdiana, R. 2015. Pemanfaatan Ekstrak Kulit Pisang Kepok (*Musa bluggoe*) Sebagai Sumber Antioksidan Pada Produksi Tahu, *Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia VII*, Universitas Sebelas Maret Surakarta, pp. 393–400.
- Suryo, J. 2010. *Herbal Penyembuh Wasir dan Kanker Prostat*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Tedjo, A., Sajuthi, D. dan Darusman, L. K. 2005. Aktivitas kemoprevensi ekstrak temu mangga, *Makara, Kesehatan*, 9(2):. 57–62.
- Tiwari, P. K., Kaur, B., Kaur, M. dan G. Kaur, H. 2011. Phytochemical Screening and Extraction: A Review, *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1): 98-106
- Trachootham, D., Alexandre, J. dan Huang, P. 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?, *Nature reviews. Drug discovery*. Nature Publishing Group, 8(7): 579–591.
- Trouillas, P., Corbière, C., Liagre, B., Duroux, J.-L. dan Beneytout, J.-L. 2005. Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin., *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(4): 1141–1149.

- Tussanti, I. and Johan, A. 2014. Sitotoksitas in vitro ekstrak etanolik buah parioto (*Medinilla speciosa*, reinw. ex bl.) terhadap sel kanker payudara T47D, *Jurnal Gizi Indonesia*, 2(2): 53–58.
- Twentyman, P. R. dan Luscombe, M. 1987. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity, *Br. J. Cancer*, 56, pp. 279–285.
- Vitasari, L. N. 2013. Efek Perendaman Kulit Pisang Kepok Putih dan Kuning (*Musa acuminata L.*) Terhadap Penurunan Bilangan Penyabunan Minyak Jelantah. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Wachirasiri, P., Julakarangka, S. dan Wanlapa, S. 2009. The effects of banana peel preparations on the properties of banana peel dietary fibre concentrate, 31(6): 605–611.
- Wastuti, S., Suwarso, E. dan Nasution, P. 2015. The cytotoxic test and apoptotic of *Solanum sanitwongsei* Craib against HeLa cells, *International Journal of PharmTech Research*, 7(1): 16–21.
- Weinstein, I. B. 1988. The origins of human cancer: Molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment - Twenty-seventh G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture, *Cancer Research*, 48(15): 4135–4143.
- Widodo, N. 2007. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid Yang Terkandung Dalam Jamur Tiram Putih. *Tugas Akhir*. Universitas Negeri Semarang.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Wu, M., Ding, H. F. dan Fisher, D. E. 2001. *Apoptosis: Molecular Mechanisms*. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. United Kingdom: Nature Publishing Group.
- Yu, L., Yu, H., Yu, J., Luo, H., Xu, X. dan Li, J. 2004. Nuclear factor- κ B p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human colorectal carcinoma tissue, *World Journal of Gastroenterology*, 10(22): 3255–3260.
- Zakiah, K. 2011. Uji Efek Antiproliferatif Campuran Senyawa Eugenol dan Isolat Katekin Gambir (*Uncaria gambier*, Roxb) dari Fase Etil Asetat terhadap Kultur Sel Kanker Serviks (HeLa Cell Line). *Skripsi*. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Zhang, Y.-J., Gan, R.-Y., Li, S., Zhou, Y., Li, A.-N., Xu, D.-P. dan Li, H.-B. 2015. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases, *Molecules*, 20(12): 21138–21156.

Lampiran 1. Kerangka Penelitian



Lampiran 2. Determinasi Tanaman

 **LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA**
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
BALAI KONSERVASI TUMBUHAN
KEBUN RAYA PURWODADI
Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163
Telp. (+62 343) 615033, Faks. (+62 341) 426046
website : <http://www.krpurwodadi.lipi.go.id>



SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TUMBUHAN
No: 1050 /IPH.06/HM/VIII/2017

Kepala Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi LIPI dengan ini menerangkan bahwa material tumbuhan yang dibawa oleh:

Nama : Fauchil Wardati
NIM : 13620083
Instansi : UIN Maliki Malang / Fakultas Saintek /Jurusan Biologi
Tanggal material diterima : 7 Agustus 2017

Telah diidentifikasi/determinasi berdasarkan koleksi herbarium dan koleksi kebun serta referensi ilmiah, dengan hasil sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Division : Magnoliophyta
Class : Liliopsida
Subclass : Zingiberidae
Ordo : Zingiberales
Family : Musaceae
Genus : Musa
Species : *Musa balbisiana* (ABB) cv. Pisang kepok

Referensi:

1. Backer CA & Bakhuizen van den Brink RC. 1968. Flora of Java Vol. III. NVP No ordhoff, Groningen, The Netherlands. Hal. 162
2. E.W.M.Verheij dan R.E . Coronel, tahun 1992 editor PROSEA (Plants Resources of South-East Asia) No 2; Edible Fruits and nuts Hal.229
3. Cronquist A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants.Columbia University Press, New York, USA. Hal. XVIII

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 15 Agustus 2017
An. Kepala
Kepala Seksi Eksplorasi dan Koleksi Tumbuhan


Deden Mudiana, S.Hut., M.Si.

Lampiran 3. Sertifikat Kursus Kultur Sel



Lampiran 4. Ethical Approval



**KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
POLITEKNIK KESEHATAN KEMENKES MALANG**

**REKOMENDASI PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVAL RECOMMENDATION
Reg.No.: 548 / KEPK-POLKESMA/2017**

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Politeknik Kemenkes Malang telah menyelenggarakan Pertemuan pada tanggal 28 Agustus 2017 untuk membahas protokol penelitian

The Ethic Committee of Polytechnic of Health The Ministry of Health in Malang has convened a meeting on August 28th 2017 to discuss the research protocol

Judul <i>Entitled</i>	UJI POTENSI EKSTRAK KULIT PISANG KEPOK (<i>MUSA BALBISIANA</i>) SEBAGAI KANDIDAT TERAPEUTIK KANKER PAYUDARA SECARA IN VITRO DENGAN MENGGUNAKAN SEL T-47D <i>Potency of Pisang Kepok Peel Extract (<i>Musa Balbisiana</i>) As Therapeutic Candidate Of Breast Cancer By In Vitro Using T-47D Cell Lines</i>
Peneliti <i>Researcher</i>	Fauchil Wardati

Dan menyimpulkan bahwa protokol tersebut **telah memenuhi semua persyaratan etik**
And concluded that the protocol has fulfilled all ethical requirements

Malang, 31 Agustus 2017



Dr. ANNASARI MUSTAFA.,MSc.
Head of Committee

Lampiran 5. Perhitungan Data

L.5.1 Perhitungan Data dan Hasil Uji Sitotoksik

A. Perhitungan Konsentrasi Sel

- Jumlah sel dengan *haemocytometer* dibawah mikroskop *inverted*

Kuadran A 100	Kuadran B 92
Kuadran C 81	Kuadran D 82

- Jumlah sel yang dihitung (mL^{-1})

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\sum \text{sel kuadran A} + \sum \text{sel kuadran B} + \sum \text{sel kuadran C} + \sum \text{sel kuadran D}}{4} \times 10^4 \\
 &= \frac{100 + 92 + 81 + 82}{4} \times 10^4 \\
 &= 88 \times 10^4 \text{ sel/mL}
 \end{aligned}$$

- Jumlah mL panen sel yang ditransfer (konsentrasi sel)

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung}} \\
 &= \frac{100 \times 10^4}{88 \times 10^4 / \text{mL}} \\
 &= 1,2 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Volume panen sel yang ditransfer sebanyak 1,2 mL, ditambahkan hingga 10 mL media kultur RPMI (MK) karena setiap sumuran akan diisi 100 μL MK berisi sel, sehingga total volume yang diperlukan untuk menanam sel = 100 μL x 100 sumuran = 10.000 μL atau 10 mL.

B. Perhitungan Persentase Sel Hidup

- Data Uji Sitotoksik dengan *MTT Assay*

1. Ekstrak Kulit Pisang Kepok

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
1000	0.110	0.120	0.116	0.12	3.74
500	0.117	0.115	0.119	0.12	3.94
250	0.559	0.619	0.681	0.62	63.90
125	0.750	0.760	0.785	0.77	81.23
62,5	0.856	0.834	0.862	0.85	91.45
31,25	0.833	0.868	0.864	0.86	91.97

2. Kontrol Positif (Doxorubicin)

Konsentrasi	Absorbansi			Rata-rata	% Hidup
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
1000	0.428	0.423	0.425	0.43	40.72
500	0.481	0.470	0.467	0.47	46.36
250	0.547	0.512	0.564	0.54	54.51
125	0.485	0.480	0.555	0.51	50.42
62,5	0.497	0.518	0.632	0.55	55.47
31,25	0.430	0.430	0.435	0.43	41.47

3. Kontrol Sel dan Kontrol Media

Kontrol	Absorbansi			Rata-Rata
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
Sel	0.980	0.924	0.863	0.92
Media	0.081	0.083	0.088	0.08

- **Perhitungan Persentase Sel Hidup**

$$\text{Persentase sel hidup} = \frac{(A-B)}{(C-B)} \times 100 \%$$

Keterangan : A = absorbansi perlakuan (sel + media kultur + sampel)

B = absorbansi kontrol media (media kultur)

C = absorbansi kontrol negatif (sel + media kultur)

1. Ekstrak Kulit Pisang Kepok

- Konsentrasi 1000 → % *Hidup* = $\frac{0,12 - 0,08}{0,84 - 0,08} \times 100 \%$ = 3.74 %
- Konsentrasi 500 → % *Hidup* = $\frac{0,12 - 0,08}{0,84 - 0,08} \times 100 \%$ = 3.94 %
- Konsentrasi 250 → % *Hidup* = $\frac{0,62 - 0,08}{0,84 - 0,08} \times 100 \%$ = 63.90 %
- Konsentrasi 125 → % *Hidup* = $\frac{0,77 - 0,08}{0,84 - 0,08} \times 100 \%$ = 81.23 %
- Konsentrasi 62,5 → % *Hidup* = $\frac{0,85 - 0,08}{0,84 - 0,08} \times 100 \%$ = 91.45 %
- Konsentrasi 31,25 → % *Hidup* = $\frac{0,86 - 0,08}{0,84 - 0,08} \times 100 \%$ = 91.97 %

2. Kontrol Positif (Doxorubicin)

- Konsentrasi 1000 → % *Hidup* = $\frac{0,43 - 0,08}{0,84 - 0,08} \times 100 \%$ = 40.72 %
- Konsentrasi 500 → % *Hidup* = $\frac{0,47 - 0,08}{0,84 - 0,08} \times 100 \%$ = 46.36 %
- Konsentrasi 250 → % *Hidup* = $\frac{0,54 - 0,08}{0,84 - 0,08} \times 100 \%$ = 54.51 %
- Konsentrasi 125 → % *Hidup* = $\frac{0,51 - 0,08}{0,84 - 0,08} \times 100 \%$ = 50.42 %
- Konsentrasi 62,5 → % *Hidup* = $\frac{0,55 - 0,08}{0,84 - 0,08} \times 100 \%$ = 55.47 %
- Konsentrasi 31,25 → % *Hidup* = $\frac{0,47 - 0,08}{0,84 - 0,08} \times 100 \%$ = 41.47 %

L.5.2 Perhitungan Data dan Hasil Uji Induksi Apoptosis

A. Perhitungan Konsentrasi Sel

- Jumlah sel dengan *haemocytometer* dibawah mikroskop *inverted*

Kuadran A 116	Kuadran B 101
Kuadran C 105	Kuadran D 143

- Jumlah sel yang dihitung (mL^{-1})

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\sum \text{sel kuadran A} + \sum \text{sel kuadran B} + \sum \text{sel kuadran C} + \sum \text{sel kuadran D}}{4} \times 10^4 \\
 &= \frac{116 + 101 + 105 + 143}{4} \times 10^4 \\
 &= 116 \times 10^4 \text{ sel/mL}
 \end{aligned}$$

- Jumlah mL panen sel yang ditransfer (konsentrasi sel)

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel terhitung}} \\
 &= \frac{3 \times 10^6}{116 \times 10^4 / \text{mL}}
 \end{aligned}$$

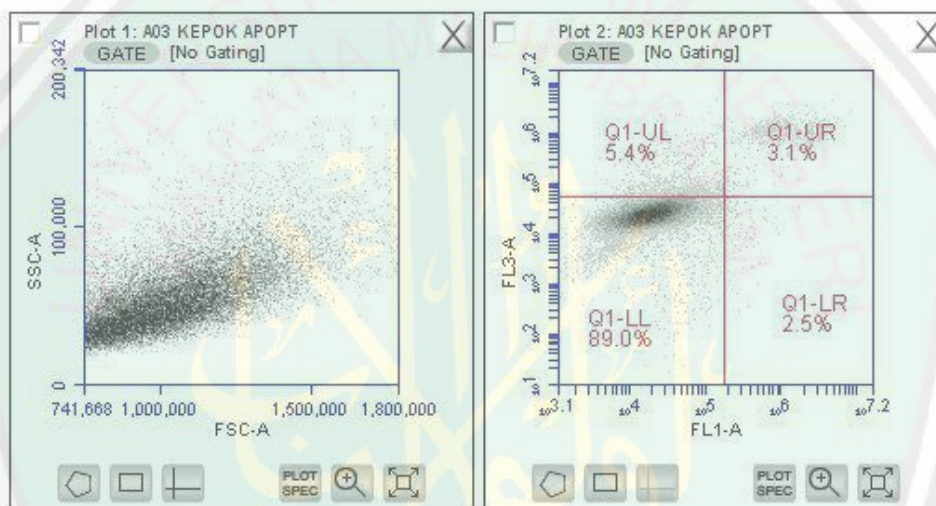
$$= 2,5 \mu\text{L}$$

Volume panen sel yang ditransfer sebanyak 2,5 μL setiap well dan ditambahkan 2 mL media kultur RPMI (MK) setiap well, sehingga total volume yang diperlukan untuk menanam sel = 200 mL x 2 sumuran = 400 mL.

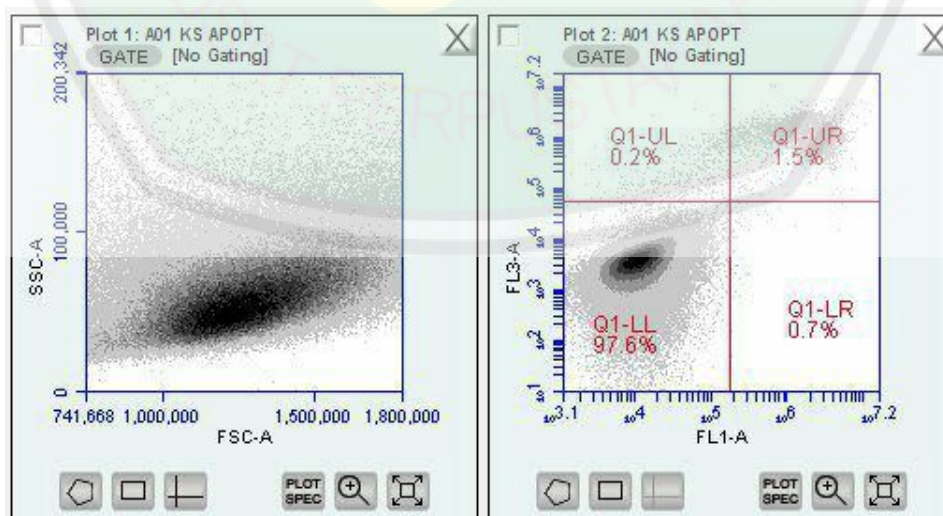
B. Hasil Pembacaan *BD Accuri*

Perlakuan	Presentase populasi sel T-47D (%)			
	Sel hidup	Apoptosis awal	Apoptosis akhir	Nekrosis
Kontrol sel	97,6	0,70	1,50	0,20
Ekstrak kulit pisang kepok IC ₅₀	89,0	2,50	3,10	5,40

- Ekstrak kulit pisang kepok



- Kontrol sel



Lampiran 6. SPSS Probit

Probit Analysis

→ [DataSet0]

Warnings

Relative Median Potency Estimates are not displayed because there is no grouping variable in the model.

Data Information

		N of Cases
Valid		6
Rejected	Missing	0
	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	12	Yes

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a						
0.01	1910.194	671.935	243336.618	3.281	2.827	5.386
0.02	1483.111	568.874	113410.951	3.171	2.755	5.055
0.03	1263.116	510.825	70010.087	3.101	2.708	4.845
0.04	1119.406	470.486	48767.214	3.049	2.673	4.688
0.05	1014.657	439.603	36376.470	3.006	2.643	4.561
0.06	933.258	414.583	28366.971	2.970	2.618	4.453
0.07	867.278	393.545	22825.222	2.938	2.595	4.358
0.08	812.168	375.381	18800.286	2.910	2.574	4.274
0.09	765.095	359.384	15768.518	2.884	2.556	4.198
0.1	724.180	345.078	13419.038	2.860	2.538	4.128
0.15	576.796	289.697	6926.992	2.761	2.462	3.841
0.2	481.371	249.469	4138.590	2.682	2.397	3.617
0.25	412.190	217.092	2689.152	2.615	2.337	3.430
0.3	358.580	189.364	1847.568	2.555	2.277	3.267
0.35	315.147	164.608	1322.494	2.499	2.216	3.121
0.4	278.808	141.878	978.153	2.445	2.152	2.990
0.45	247.643	120.660	744.029	2.394	2.082	2.872
0.5	220.375	100.753	580.398	2.343	2.003	2.764
0.55	196.110	82.202	463.374	2.293	1.915	2.666
0.6	174.189	65.221	377.795	2.241	1.814	2.577
0.65	154.104	50.085	313.627	2.188	1.700	2.496
0.7	135.438	37.017	264.039	2.132	1.568	2.422
0.75	117.823	26.115	224.290	2.071	1.417	2.351
0.8	100.890	17.340	191.002	2.004	1.239	2.281

Lampiran 7. Dokumentasi

L.7.1 Persiapan Sampel



Pengambilan sampel di Desa Belahanrejo, Kedamean, Gresik



Tahap pemisahan sampel kulit pisang dari buah dan pencucian sampel sampai bersih



Hasil dari tahap pengeringan sampel di suhu ruang selama semalam



Hasil dari tahap pengeringan sampel dengan oven suhu 45°C



Hasil dari tahap penghalusan menjadi
serbuk simplisia



L.7.2. Ekstraksi Maserasi



Tahap maserasi dengan pelarut etanol 95%



Tahap penguapan pelarut dengan *rotary evaporator*

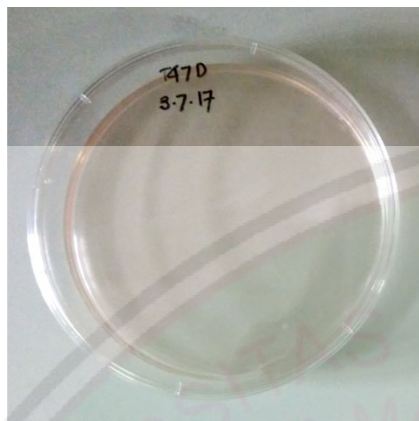


Hasil ekstrak etanol kulit pisang kepok dengan metode maserasi



Hasil ekstrak kulit pisang kepok pekat setelah di keringkan di dalam inkubator suhu 25°C

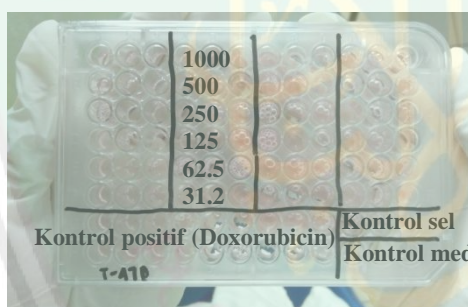
L.7.3. Uji Sitotoksik dengan metode MTT assay



Tahapan sel setelah di *thawing* kemudian disubkultivasi pada cawan dan siap dipanen



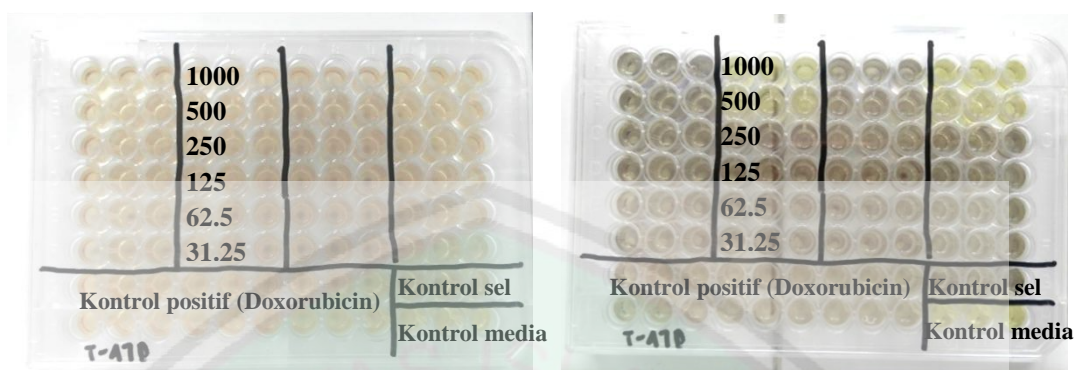
Hasil pengamatan sel uji dengan mikroskop inverted sebelum diberi perlakuan



Hasil penanaman sel pada *96-well plate*

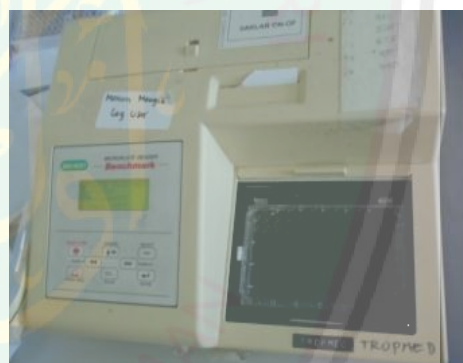
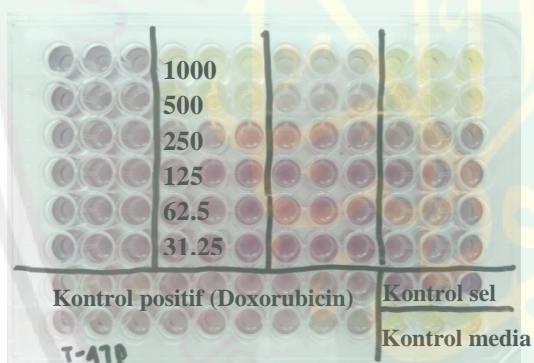


Hasil penimbangan 10 mg sampel dan dilarutkan dalam 100 ml DMSO



Hasil setelah pemberian sampel pada sel uji

Hasil setelah pemberian reagen MTT



Hasil setelah pemberian SDS stopper

Tahapan pembacaan absorbansi sel hidup dengan ELISA reader

L.7.4 Uji Induksi Apoptosis dengan *Flow cytometry*



Hasil penanaman sel T-47D pada
6-well plate



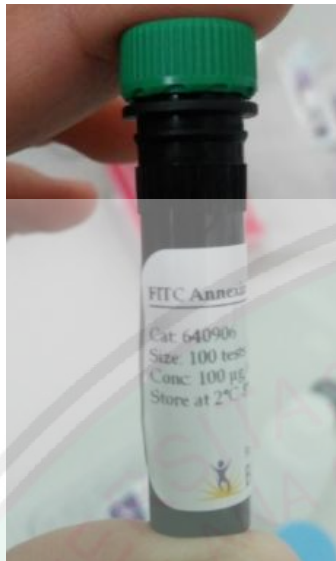
Tahap sentrifugasi setelah diberi
perlakuan sampel uji



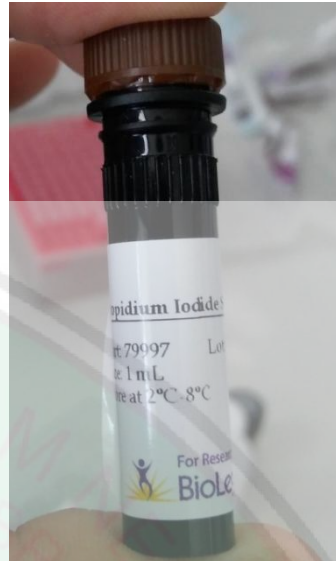
Hasil perlakuan sampel pada sel uji
setelah disentrifugasi dan siap diberi
reagen flowcytometry



Pemberian buffer (*incubation buffer*)



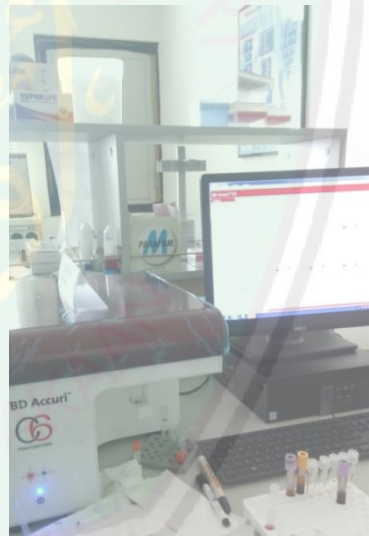
Pemberian reagen *Annexin FITC*



Pemberian reagen *Propidium Iodide*



Pemberian buffer (*binding buffer*)



Pembacaan hasil uji induksi apoptosis
dengan *BD Accuri*



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Fauchil Wardati
NIM : 13620083
Program Studi : Biologi
Semester : Ganjil TA 2017/2018
Pembimbing I : Kholifah Holil, M.Si
Judul Skripsi : Potensi Ekstrak Kulit Pisang Kepok (*Musa balbisiana*) Sebagai Kandidat Terapeutik Kanker Payudara secara *In Vitro* dengan Menggunakan Sel T-47D

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	TTD Pembimbing
1	18 Agustus 2016	Konsultasi judul	
2	8 September 2016	Konsultasi BAB I	
3	27 Oktober 2016	Revisi BAB I	
4	14 November 2016	Revisi BAB I	
5	1 Desember 2016	Revisi BAB I	
6	27 Februari 2017	Konsultasi BAB II	
7	27 Maret 2017	Revisi BAB II	
8	19 April 2017	Revisi BAB II	
9	1 Mei 2017	Revisi BAB II	
10	14 Juni 2017	Konsultasi BAB III	
11	14 Juli 2017	Revisi BAB III	
12	18 Oktober 2017	Konsultasi BAB IV dan BAB V	
13	22 November 2017	Kesimpulan + Abstrak	

Ketua Jurusan,

Romaidi, M.Si, D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

Malang, 18 Desember 2017
Pembimbing Skripsi I

Kholifah Holil, M.Si
NIP. 19751106 200912 2 002



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Fauchil Wardati
NIM : 13620083
Program Studi : Biologi
Semester : Ganjil TA 2017/2018
Pembimbing II : Umayyatus Syarifah, M.A
Judul Skripsi : Potensi Ekstrak Kulit Pisang Kepok (*Musa balbisiana*) Sebagai Kandidat Terapeutik Kanker Payudara secara *In Vitro* dengan Menggunakan Sel T-47D

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	TTD Pembimbing
1	21 Agustus 2016	Konsultasi BAB I dan II integrasi	
2	12 Desember 2016	Konsultasi BAB I dan II integrasi	
3	12 Juli 2017	Konsultasi BAB I dan II integrasi	
4	23 November 2017	Konsultasi BAB IV integrasi	
5	30 November 2017	Konsultasi BAB IV integrasi	
6	4 Desember 2017	Konsultasi abstrak bahasa arab	



Ketua Jurusan,

Romaidi, M.Si, D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

Malang, 18 Desember 2017
Pembimbing Skripsi II

Umayyatus Syarifah, M.A.
NIP. 19820925 200901 2 005