

PENELITIAN PENGUATAN PROGRAM STUDI

JUDUL PENELITIAN

TLC (Thin Layer Chromatography) Finger Printing dan aktivitas antikanker daun benalu (*Macrosolen cochinchinensis*) terhadap cell line kanker payudara T47D



**Roihatul Muti'ah, S.F, M.Kes, Apt
NIP. 19800203 200912 2003**

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MALIKI MALANG

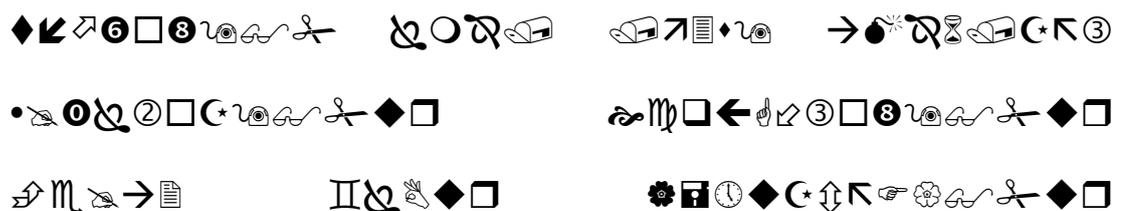
2016

BAB 1
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

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

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





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

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

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

Hasil penelitian Puspa (2011), bahwa dengan dosis 37,5 mg/gr BB ekstrak etanol daun benalu (*Macrosolen cochinchinensis*) dapat menurunkan jumlah total

limfosit tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinfeksi virus dengue. Pada penelitian ini, peneliti akan melakukan fraksinasi untuk mendapatkan fraksi yang mempunyai potensi aktivitas antikanker dan mengidentifikasi struktur kimia yang ada pada sampel yang diuji.

1.2 RUMUSAN MASALAH

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

1. Bagaimana potensi antikanker ekstrak etanol, fraksi n-heksana, etil asetat, n-butanol, dan air daun benalu (*Macrosolen cochinchinensis*) terhadap *cell line* kanker payudara T47D?
2. Bagaimana struktur senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak dan fraksi daun benalu (*Macrosolen cochinchinensis*) yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D?

1.3 TUJUAN

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah :

1. Mengetahui potensi antikanker ekstrak etanol, fraksi n-heksana, etil asetat, n-butanol, dan air daun benalu (*Macrosolen cochinchinensis*) terhadap *cell line* kanker payudara T47D.
2. Mengetahui struktur senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak dan fraksi daun benalu (*Macrosolen cochinchinensis*) yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D.

1.4 URGENSI PENELITIAN

Kegagalan yang sering terjadi dalam pengobatan kanker, utamanya melalui kemoterapi adalah disebabkan karena rendahnya selektifitas obat-obat antikanker terhadap sel normal sehingga menimbulkan efek samping yang serius pada pasien. Selain itu kegagalan kemoterapi tersebut juga disebabkan karena resistensi sel kanker terhadap agen-agen kemoterapi. Resistensi terhadap obat kemoterapi banyak ditemukan pada kanker kolon, payudara prostat dan leukemia.

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

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

BAB II

TINJAUAN KEPUSTAKAAN DAN *ROAD MAP* PENELITIAN

2.1 Deskripsi Benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*)

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

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



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

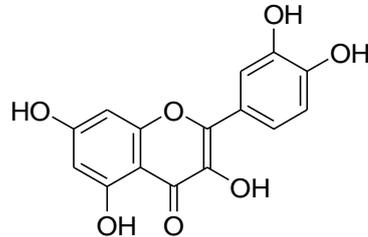
Divisi : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Santalales
Suku : Loranthaceae
Marga : Macrosolen
Jenis : *Macrosolen cochinchinensis* (Lour.) van
Tiegh (Backer and Van Den Brink, 1965).

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

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

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa *quercetin* merupakan salah satu golongan flavonoid yang memiliki efek antiproliferatif dan mampu menginduksi

kematian sel melalui mekanisme apoptosis pada leukimia, kanker payudara, kanker paru-paru, hepatoma, kanker oral, dan kanker kolon.



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

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

2.3 Kanker

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

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

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

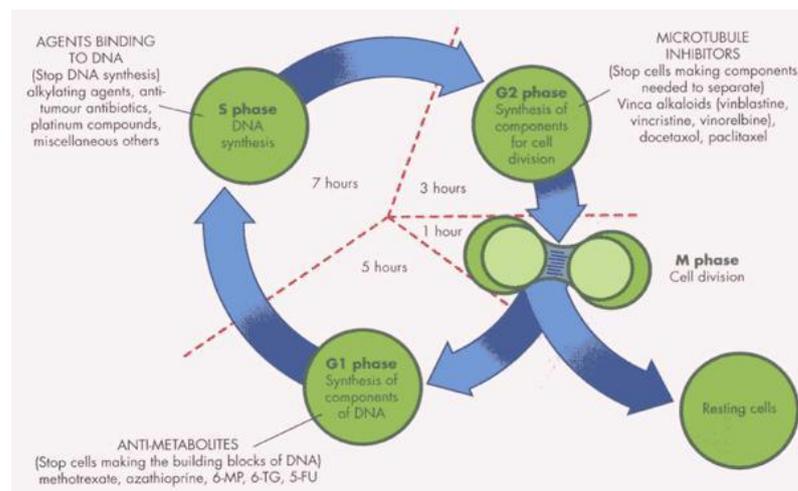
Kanker payudara adalah pertumbuhan sel yang abnormal pada jaringan payudara seseorang. Payudara wanita terdiri dari lobulus (kelenjar susu), duktus (saluran susu), lemak dan jaringan ikat, pembuluh darah dan *limfe*. Sebagian besar kanker payudara bermula pada sel-sel yang melapisi duktus (kanker duktal),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

2.4 Siklus Sel

Siklus sel merupakan proses vital dalam kehidupan setiap organisme. Secara normal, siklus sel menghasilkan pembelahan sel. Pembelahan sel terdiri dari 2 proses

utama, yaitu replikasi DNA dan pembelahan kromosom yang telah digandakan ke 2 sel anak (Muti'ah, 2014)..

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



Gambar 2.3 Siklus sel hidup

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

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

a. *Cyclin*

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

b. *Cyclin-dependent kinase* (Cdk)

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

c. *Cyclin dependent kinase inhibitor* (CKI)

CKI merupakan protein yang dapat menghambat aktifitas Cdk dengan cara mengikat Cdk atau kompleks *cyclin*-Cdk. CKI terdiri dari dua kelompok protein

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

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

Protein Rb bekerja dengan cara menghambat aktivitas faktor transkripsi dari sel, yakni E2F (King, 2000). E2F merupakan faktor transkripsi penting yang bekerja dengan cara menginduksi gen-gen transkripsi agar mengekspresikan protein-protein yang diperlukan untuk kelangsungan protein transisi sel dari fase G1 ke fase S (Pan *et al.*, 2002).

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

Ekspresi p53 akan meningkat jika selama fase S terjadi kerusakan DNA. Protein p53 ini akan memberikan tiga efek, yaitu perbaikan DNA, penghentian

sintesis DNA, dan atau pemacuan apoptosis. Stimulasi apoptosis bisa lewat mekanisme penurunan ekspresi protein Bcl-2 dan peningkatan protein Bax (King, 2000). Mekanisme kerja Bcl-2 menghambat apoptosis dengan aksi berlawanan terhadap factor induksi apoptosis Fasl yang biasanya diekspresikan jika sel dalam keadaan stress (Kampa *et al.*, 2003). Protein Bax merupakan pemacu terjadinya apoptosis (King, 2000).

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

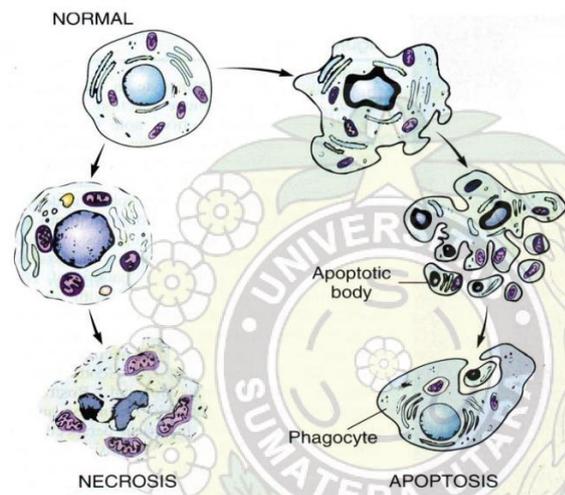
2.5 Apoptosis

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

Apoptosis dapat diamati pada penampakan fisiologis yaitu berupa pengkerutan sel, kerusakan membran plasma dan kondensasi kromatin. Sel yang mati dengan proses ini tidak kehilangan Kandungan internal sel dan tidak menimbulkan respon inflamasi. Jika program apoptosis sudah selesai, sel akan menjadi kepingan-kepingan sel mati yang disebut bapan apoptosis (*apoptotic body*)

badan apoptosis ini akan segera dikenali oleh sel makrofag, untuk selanjutnya dimakan (*engulfed*) (Wyllie *et al.*, 2000).

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



Gambar 2.4 Apoptosis dan nekrosis (Lumongga, 2008).

Sejak awal kemunculannya, metode uji *flowcytometric* propidium iodide (PI) telah digunakan secara luas sebagai uji apoptosis pada banyak model eksperimental. Metode ini didasarkan pada karakteristik sel yang mengalami apoptosis yaitu adanya

fragmentasi DNA dan hilangnya DNA pada inti sel. Metode ini menggunakan agen *fluorochrome*, contohnya PI, yang dapat berikatan dan melabeli DNA. Metode ini mampu mendapatkan hasil uji DNA sel yang cepat (selesai dalam 2 jam). Sejak publikasinya uji PI telah digunakan secara luas pada banyak laboratorium (Riccardi and Niccoleti, 2006).

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

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

2.6 Uji Aktivitas Antikanker

Uji sitotoksik merupakan uji *in vitro* dengan menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendekati tingkat ketoksikan suatu senyawa. Sistem tersebut merupakan uji kualitatif dengan menetapkan kematian sel. Dasar dari percobaan tersebut antara lain bahwa sistem penetapan aktivitas biologis seharusnya

memberikan kurva dosis respon yang menunjukkan hubungan lurus dengan jumlah sel (Anggraini, 2008).

Sel T47D merupakan *continous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. *Continous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penangannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan frozen stock jika terjadi kontaminasi (Burdall et al., 2003). Sel T47D memiliki morfologi seperti sel epitel. Sel ini dikulturkan dalam media DMEM + 10 % FBS + 2 mM L-Glutamin, diinkubasi dalam CO₂ inkubator 5 % dan suhu 37 °C (Abcam, 2007).

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

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*). Nilai IC₅₀ menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar harga IC₅₀ maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Senyawa sitotoksik adalah senyawa yang bersifat toksik pada sel. Uji sitotoksik dapat memberikan informasi konsentrasi obat yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Akhir dari uji sitotoksik adalah memberikan informasi

langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Amalina, 2008).

2.7 *Flowcytometry*

Flowcytometry merupakan suatu teknik yang digunakan untuk menganalisis jenis-jenis sel yang terdapat pada suatu populasi sel. Sel dilabel fluoresen, dilewatkan celah sempit, dan ditembak sinar. Pada suatu populasi sel yang sejenis, misal pada sel kanker yang diberi perlakuan suatu senyawa sitotoksik, dapat dilakukan analisis terhadap fase-fase daur sel, sel apoptosis, serta sel yang mengalami poliploidi. Masing-masing jenis sel tersebut memiliki perbedaan pada jumlah set kromosom di mana pada fase G_0/G_1 , fase S, fase G_2/M berturut-turut memiliki 2, 3, dan 4 set kromosom. Semakin banyak jumlah set kromosom, maka intensitas sinyal optik yang diberikan semakin kuat karena kemampuan fluoresen untuk berinterkalasi pada DNA semakin besar. Pada sel yang mengalami apoptosis (sub G_0), intensitas fluoresen sangat lemah karena kromosom telah mengalami fragmentasi. Sedangkan pada sel poliploidi, intensitas yang diberikan sangat kuat karena jumlah set kromosom yang lebih dari 4 set (CCRC, 2014).

Flow cytometry merupakan teknologi yang secara simultan mampu menghitung dan mengkarakterisasi berbagai macam sifat fisika dari partikel tunggal (biasanya sel). *Flow cytometry* dapat menganalisis suspensi partikel atau sel dengan dari ukuran 0,2-150 μm . Prinsip kerja *flow cytometry* adalah setiap sel akan dialirkan dalam sistem fluida, lalu ditembak dengan sinar laser, kemudian disebarkan oleh setiap sel. Selain itu, sinar laser tersebut juga dapat mengaktivasi senyawa fluoresen yang terdapat dalam sel. Setiap sinyal sinar yang disebarkan maupun yang difluoresensikan akan diubah menjadi impuls elektrik sehingga dapat terdeteksi dan tersimpan sebagai data di dalam komputer. *Flow cytometry* dapat digunakan untuk

deteksi adanya perubahan morfologi sel yang mengalami apoptosis menggunakan *nuclear staining* dan mampu menghitung jumlah sel yang mengalami apoptosis menggunakan *flow cytometry Annexin V* (Koolman *et al.*, 1994).

2.8 Skema Road Map

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

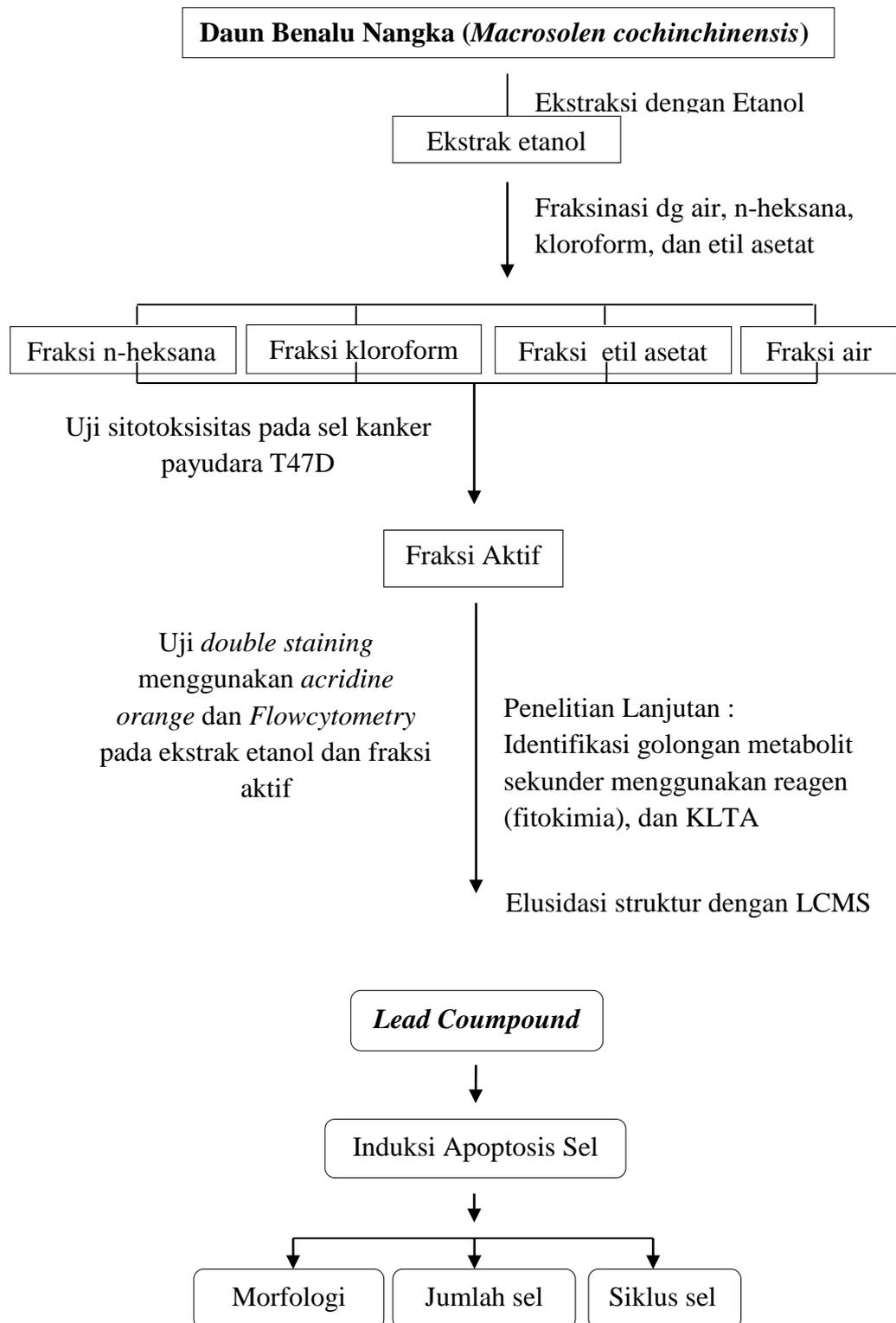
Tahapan penelitian ini adalah :

1. Determinasi tanaman yang bertujuan untuk memastikan kebenaran tanaman yang digunakan.
2. Ekstraksi dengan pelarut etanol benalu Nangka (*macrosolen cochinchinensis*) sehingga di dapatkan ekstrak etanol daun benalu Nangka (*macrosolen cochinchinensis*).
3. Ekstrak etanol aktif di fraksinasi dengan pelarut n-heksan, kloroform, dan etil asetat sehingga akan didapatkan ekstrak fraksi n-heksan, fraksi kloroform, fraksi

etil asetat, dan fraksi air. Pada masing-masing fraksi tersebut dilakukan pengujian aktivitas antikanker pada sel kanker payudara T47D. Pada tahapan ini akan diperoleh data aktivitas antikanker masing-masing fraksi benalu Nangka (*macrosolea cochinchinensis*).

4. Tahapan selanjutnya adalah mengetahui mekanisme kerja senyawa antikanker tersebut dengan pendekatan metode *Selective Apoptosis Antineoplastic Drug* (SAAND) yaitu suatu metode skrining aktivitas hasil isolasi bahan alam yang diharapkan memiliki aktifitas antikanker yang selektif hanya membunuh sel kanker tanpa membunuh sel normal melalui mekanisme apoptosis sel. Fenomena apoptosis sel di lihat dari morfologi sel dan jumlah apoptosis sel dengan metode pengecatan acridine orange dan flowcytometry. Sedangkan regulasi siklus sel dilakukan dengan metode flowcytometry. Ekstrak etanol dan fraksi aktif yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D di uji menggunakan metode *flowcytometry*.

SKEMA RANCANGAN PENELITIAN



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat

3.1.1 Bahan

3.1.1.1 Bahan Uji

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

3.1.1.2 Bahan untuk Ekstraksi dan Fraksinasi

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

3.1.1.3 Bahan untuk Kultur Sel

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

Sel kanker payudara T47D ditumbuhkan pada media penumbuh Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) ditambah dengan 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories), 1% v/v penicillin-streptomycin (Nacal Tesque), dan 1,0mM L-glutamin (Nacal Tesque). Semua sel dikultur dalam incubator pada 5% CO₂, 37°C.

3.1.1.4 Bahan untuk Uji Antikanker

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

3.1.1.5 Bahan untuk Uji Double Staining dan Flowcytometry

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

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

3.1.2 Alat

Alat utama yang diperlukan dalam penelitian ini adalah maserator, evaporator, sentrifus, spektrofotometer, tangki nitrogen cair, CO₂-Jacketed Incubator, *plate 96 well*, *plate 6 well*, *plate plate 24 well* yang telah dilapisi *coverslip*, FACS *Calibur*, *Laminar Air Flow cabinet* (Nuaire), vortex, sentrifuse, mikroskop *inverted*, Elisa reader, mikroskop *fluorescence*, dan seperangkat alat *flowcytometry*.

3.2 Pelaksanaan Penelitian

3.2.1 Determinasi Tanaman

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

3.2.2 Ekstraksi, Fraksinasi dan Isolasi

Secara singkat masing-masing serbuk daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensi*) di ekstraksi dengan cara maserasi (perendaman) menggunakan pelarut etanol 96 % rasio 1:5 selama selama 24 jam dan pengadukannya dibantu dengan shaker selama 3 jam, kemudian disaring. Diulangi perlakuan pada ampas yang diperoleh sampai diperoleh filtrat yang bening. Filtrat ekstrak kemudian digabungkan lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat tersebut diberi gas N₂ untuk menghilangkan residu pelarut. Selanjutnya ekstrak pekat ditimbang sampai diperoleh berat konstan untuk

meyakinkan bahwa pelarut telah menguap dan didiamkan selama ± 2 hari dengan ditutup *aluminium foil* yang dilubangi. Ekstrak yang diperoleh ditambah 100 ml aquadest dan kemudian dicampur untuk mendapatkan bentuk cair ekstrak etanol. Kemudian difraksinasi dengan n-heksana dalam corong pisah dengan perbandingan 1:1, dikocok secukupnya. Dibiarkan sampai terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan n-heksana dan lapisan air. Perlakuan ini dilakukan beberapa kali pengulangan sampai lapisan n-heksana terlihat jernih sehingga diperoleh fraksi n-heksana. Perlakuan untuk lapisan air ini dilakukan seperti perlakuan diatas dengan beberapa kali pengulangan fraksinasi menggunakan pelarut kloroform, dan etil asetat perbandingan 1:1. Hasil fraksi n-heksana, kloroform, etil asetat, dan air diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan fraksi kental. Masing-masing fraksi pekat tersebut diberi gas N₂ untuk menghilangkan residu pelarut. Selanjutnya masing-masing fraksi pekat ditimbang sampai diperoleh berat konstan untuk meyakinkan bahwa pelarut telah menguap dan didiamkan selama ± 2 hari dengan ditutup *aluminium foil* yang dilubangi.

3.2.3 Uji sitotoksik dengan metode MTT

Ekstrak dan fraksi daun benalu Nangka (*Macrosolen cochinchinensis*) dibuat dengan konsentrasi larutan uji. Sebagai kontrol positif digunakan doksorubisin. Masing-masing seri konsentrasi dibuat replikasi 3 kali. Suspensi sel kanker T47D dalam media RPMI dimasukkan ke dalam plate berisi 96 sumuran dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam media dibuang dan dicuci dengan PBS, dimasukkan seri konsentrasi ekstrak dan fraksi (*Macrosolen cochinchinensis*) ke dalam sumuran seri konsentrasi yang digunakan adalah 1000;500; 250; 125; 62,5; 31,25 ppm dan diulang sebanyak 3 x (triplo), kemudian diinkubasi selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, larutan dalam plate dibuang dan dicuci dengan PBS 1x kemudian

ditambahkan reagen MTT 100 μL dalam setiap sumuran. Sel yang telah diberi MTT diinkubasi selama 2-4 jam dalam inkubator (sampai terbentuk garam formazan). Setelah garam formazan terbentuk, ditambahkan *stopper* SDS 10% dalam 0,1 N HCl kemudian diinkubasi di tempat gelap selama semalam. Setelah itu dilakukan pembacaan dengan menggunakan *Elisa reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu (Rahmawati, 2013).

3.2.4 Uji *Double Staining* menggunakan *Acridine Orange*

Kultur sel T47D yang telah konfluen dipanen dan distribusikan dengan konsentrasi 5×10^4 sel/sumuran dalam 1000 μL media RPMI ke dalam *plate 24 well* (Nune) yang telah diberi *cover slip* (Nune). Setelah itu sel diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO_2 agar sel teradaptasi dan normal kembali. Selanjutnya *treatment* sampel terhadap sel T47D dengan perlakuan kontrol sel T47D dan sampel ekstrak dan fraksi benalu Nangka yang aktif yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D dengan menggunakan konsentrasi IC_{50} -nya selanjutnya diinkubasi kembali 24 jam ke dalam inkubator CO_2 . Pada akhir inkubasi media kultur RPMI dibuang dengan hati-hati dan dicuci menggunakan PBS, kemudian *cover slip* yang memuat sel dipindahkan ke atas obyek gelas lalu ditetesi dengan pereaksi *acridine orange* sebanyak 10 μL . pengamatan morfologi sel dilakukan dengan mikroskop fluoresense (CCRC, 2009).

3.2.4 Uji *Flowcytometry*

Tahapan selanjutnya yaitu pengujian mekanisme kerja sampel menggunakan *flowcytometry*, pada tahap ini yang diuji menggunakan *flowcytometry* adalah ekstrak

etanol dan fraksi yang paling aktif yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D.

Kultur sel T47D yang telah konfluen dipanen dan distribusikan dengan konsentrasi 5×10^5 sel/sumuran dalam 2000 μL media RPMI ke dalam *plate 6 well*. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO_2 . Setelah itu dibuang media RPMI dengan cara disedot dengan hati-hati dan dicuci sel dengan PBS. Selanjutnya *treatment* sampel terhadap sel T47D dengan perlakuan kontrol sel T47D dan sampel ekstrak dan fraksi benalu Nangka yang aktif yang memiliki potensi sitotoksik terhadap *cell line* kanker payudara T47D dengan menggunakan konsentrasi IC_{50} -nya selanjutnya diinkubasi kembali 24 jam ke dalam inkubator CO_2 .

Selanjutnya dilakukan preparasi sampel untuk *flowcytometry*. Pertama-tama disiapkan alat-alat yang akan digunakan. Disiapkan conical (per well 1 conical), diambil media dalam well ditampung dalam conical masing-masing. Dibilas dengan 1 mL PBS lalu ditampung dalam conical masing-masing. Ditambahkan 250 μL Tripsin, diinkubasi selama 3 menit, pastikan sel sudah lepas satu-satu. Tambah 1 mL MK dan diresuspensi. Ambil sel ditampung dalam conical ditambah 2 mL PBS. Selanjutnya disentrifuse dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Dibuang supernatan, untuk perlakuan apoptosis ditambah 1 mL PBS kemudian diresuspensi dan di pindah ke dalam eppendorf dan untuk perlakuan siklus sel ditambah 1 mL etanol dingin kemudian diresuspensi dan dipindah ke dalam eppendorf. Masing-masing eppendorf di inkubasi selama 30 menit dalam lemari es. Untuk perlakuan apoptosis masing-masing eppendorf disentrifuse pada 2000 rpm selama 3 menit dan sel siap untuk diuji dengan *flowcytometer*. Media pada tabung *eppendorf* dibuang, lalu dimasukkan 100 μL reagen Annexin V-PI ke dalam tabung *eppendorf* dan buffer

sebanyak 350 μ L. Agar bercampur maka divorteks, kemudian diinkubasi pada suhu ruang dan tempat gelap selama 10 menit. Suspensi sel tersebut dipindahkan ke *flowcyto-tube*. Suspensi sel siap untuk diinjek pada alat *flowcytometry*. Untuk perlakuan siklus sel yaitu reagen *flow cytometry* sebanyak 400 μ L pada tiap eppendorf, diresuspen dengan homogen. Tiap eppendorf dibungkus dengan aluminium foil dan diberi penandaan pada bagian atas eppendorf. Semua eppendorf diinkubasi di waterbath 37°C, 10 menit untuk mengaktivasi RNase. Diresuspen lagi sebelum ditransfer ke *flowcyto-tube*. Suspensi sel ditransfer ke dalam *flowcyto-tube* melalui filter (kain nylon/kain kaca) menggunakan mikropipet 1 ml. Tutup *flowcyto-tube* dilubangi terlebih dahulu. Selanjutnya dibaca dengan *flow cytometer* FACS Calibur untuk mengetahui profil *cell cycle*. Data *flow cytometry* dianalisis dengan program *cell quest* untuk melihat distribusi sel pada fase-fase daur sel sub G1, S, G2/M dan sel yang mengalami poliploidi (CCRC, 2009). *Flow cytometry* dilakukan dengan pancaran cahaya 488 nm dan dengan kecepatan medium (500 sel/detik).

3.3 Analisis Data

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

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

Keterangan: Abs : absorbansi

Prosentase sel hidup dihitung untuk memperoleh nilai IC50 yaitu konsentrasi yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan sebanyak 50% dari populasi sel

sehingga dapat diketahui potensi sitotoksiknya. Nilai IC50 ditentukan dengan analisis probit (*Statistic Product and Service Solution* (SPSS) 16.0 for windows). Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan analisis statistic menggunakan paired-samples T-test (SPSS 16.0 for windows) dengan taraf kepercayaan 95%. Perbedaan dengan rerata pada $p < 0,05$ dianggap signifikan, sedangkan $p > 0,05$ tidak signifikan secara statistic.

DAFTAR PUSTAKA

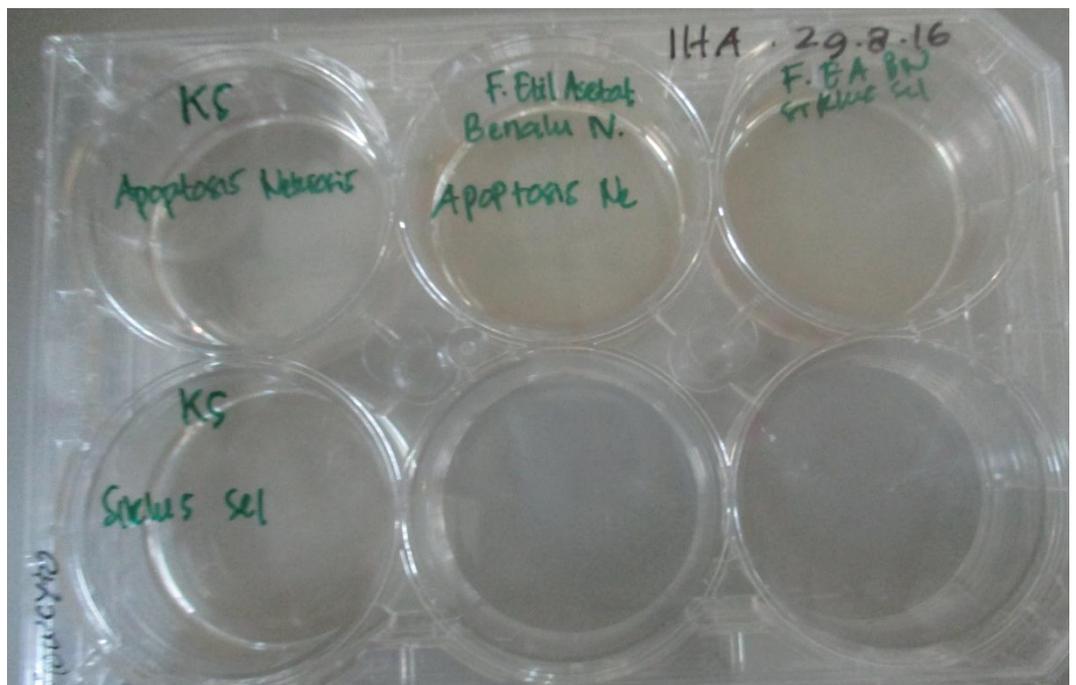
- Amalina, N. 2008. *Uji Sitotoksik Ekstrak 70% Buah Kemukus (Piper cubeba L.) Terhadap Sel Hela*. Universitas Muhamadiyah Surakarta.
- Anggraini, P. 2008. *Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Kemukus (Piper cubeba L.) Terhadap Sel Hela*. Universitas Muhamadiyah Surakarta.
- Artanti, Nina. 2006. *Pengembangan Senyawa Potensial Antikanker dari Benalu*. Serpong : Pusat Penelitian Kimia-LIPI.
- Backer, A dan Van De Brink B. 1965. *Flora of Java (Spermatophytes Only) Volume I, N.V.P. The Nederlands : Noordhoff-Groningen*.
- Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R. J., & Speirs, V. 2003. Breast cancer cell lines : friend or foe ? *Breast Cancer Research*, 5, 89–95. doi:10.1186/bcr577.
- CCRC. 2009. *Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi, UGM.
- Cotran R.S., Kumar, V., Collin, T. 1999. *Neoplasia in Robbins Pathologic Basic of Disease*. Sixth Edition, Philadelphia : W.B. Saunders Company.
- Davis, J.M., Navolanic, P.M., Weinstein-Opppenheimer, C.R., Steelman, L.S., Wei H., Konopleva, M., Blagosklonny, M.V., and McCubrey, J.A.. 2003. Raf-1 and Bcl-2 Induce Distinct and Common Pathways That Contribute to Breast Cancer Drug Resistance. *Clinical Cancer Research*, Vol. 9.
- Ellis, E.O., Schnitt, S.J., S.-Garau, X., Bussolati, G., Tavassaoli, F.A., Eusebi, V. 2003. *Pathology and Genetic of Tumours of The Breast and Female Genital Organs / WHO Classification of Tumours*. Washington: IARC Press.

- Ganiswara, S., Setiabudy, R., Suyatna, F, D., dan Purwastyastuti. 1995. *Farmakologi dan Terapi*, Edisi II. Jakarta : Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Gondhowiardjo, G. G. dan Skett, P. F. 1991. *Pengantar Metabolisme Obat*, diterjemahkan oleh Aisyah, I. B. Jakarta : Universitas Indonesia Press.
- Harbone, J. B. 1996. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan Kokasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: ITB.
- Hsiang, Y.H., Lihou, M.G., Liu L.F. 1989. Arrest of replication fork by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Research*, Vol. 49.
- Hutapea, J.R. 1999. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Jilid V. Jakarta : Departemen Kesehatan RI dan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Imani, A.K.Q. 2005. *Tafsir Nurul Quran Sebuah Tafsir Sederhana Menuju Cahaya al-Quran*, penerjemah Salman Nano. Jakarta : , Penerbit Al-Huda.
- Indrayani, L., Hartati S. dan Lydia S. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Jurnal Fakultas Sains dan Matematika*. Salatiga: Universitas Kristen Satya Wacana.
- Kementrian Kesehatan. 2012. <http://depkes.go.id/index.php/berita/press-release/1060-jika-tidak-dikendalikan-26-juta-or> diakses tanggal 29 November 2012.
- Koolman, Jan. 1994. *Atlas Berwarna dan Teks Biokimia* diterjemahkan oleh Septelia Inawati Wanadi *Jan Koolman, Klaus-Heinrich Rohm*. Jakarta : Hipokrates.

- Krishna, G., dan Makoto H. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Journal of Elsevier Science*. Vol. 455..
- Lindsay, S. 1992. *High Performance Liquid Chromatography* second edition. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore : John Wiley & Sons.
- Ningrum, Puspa. 2010. *Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Benalu (Macrosolen cochinchinensis) terhadap Penurunan Jumlah Total Limfosit Tikus Putih (Rattus norvegicus) yang Diinveksi Virus Dengue*. Jember : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Notarbartolo, M., Poma, P., Perri, D., Dusonchet, L., Cervello, M., and Alessandro, N. 2005. Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF- κ B activation levels and in IAP gene expression. *Cancer Letter*, Vol. 224.
- Rahmawati, Emma, dkk. 2013. Aktivitas Antikanker Ekstrak n-Heksana dan Ekstrak Metanol Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn) terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Media Farmasi* Vol. 10 No.2.
- Sriwahyuni. 2010. Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* L.) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas dengan Menggunakan Brine Shrimp. *Tugas akhir/Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki Malang.
- Van Steenis, C.G, 1975. *Flora Voor de Scholen in Indonesia*, diterjemahkan oleh Sorjowinoto, M, edisi VI. Jakarta : PT. Pradnya Paramitha.

LAMPIRAN-LAMPIRAN

1. PLATE UJI FLOWCYTO



2. WELL PLATE UJI MTT

