



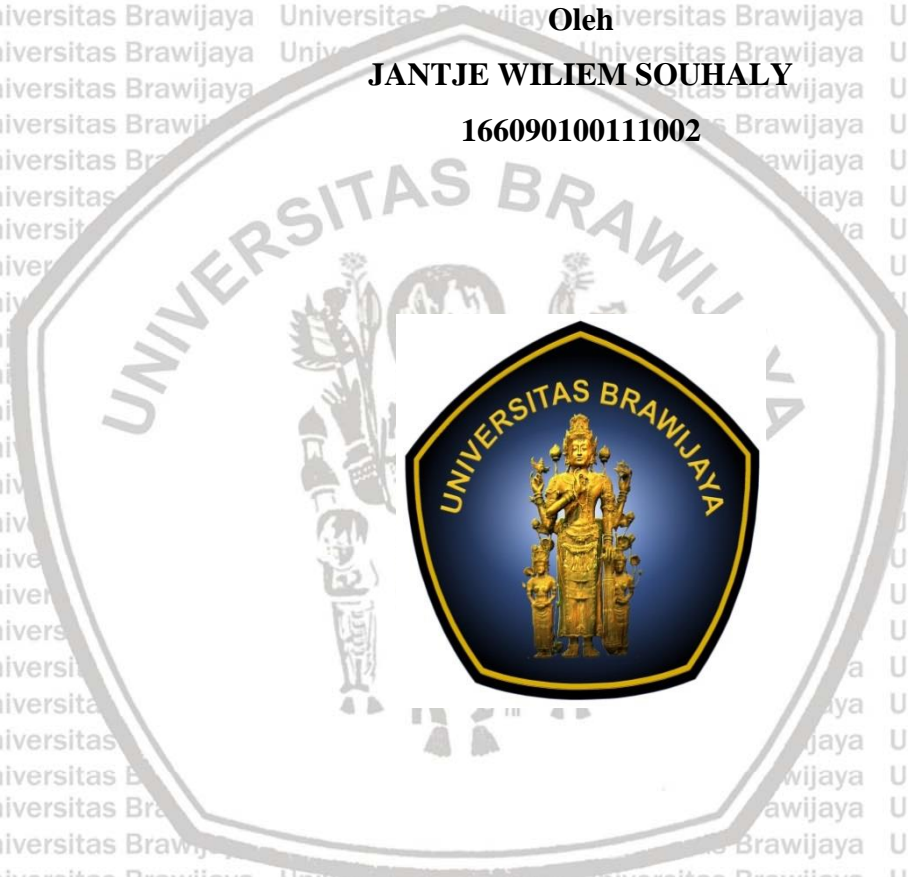
**KAJIAN AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK TERIPANG
(*Bohadschia argus*) PADA CELL LINE KANKER PAYUDARA T47D**

TESIS

Oleh

JANTJE WILIE M SOUHALY

166090100111002



PROGRAM MAGISTER BIOLOGI

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018



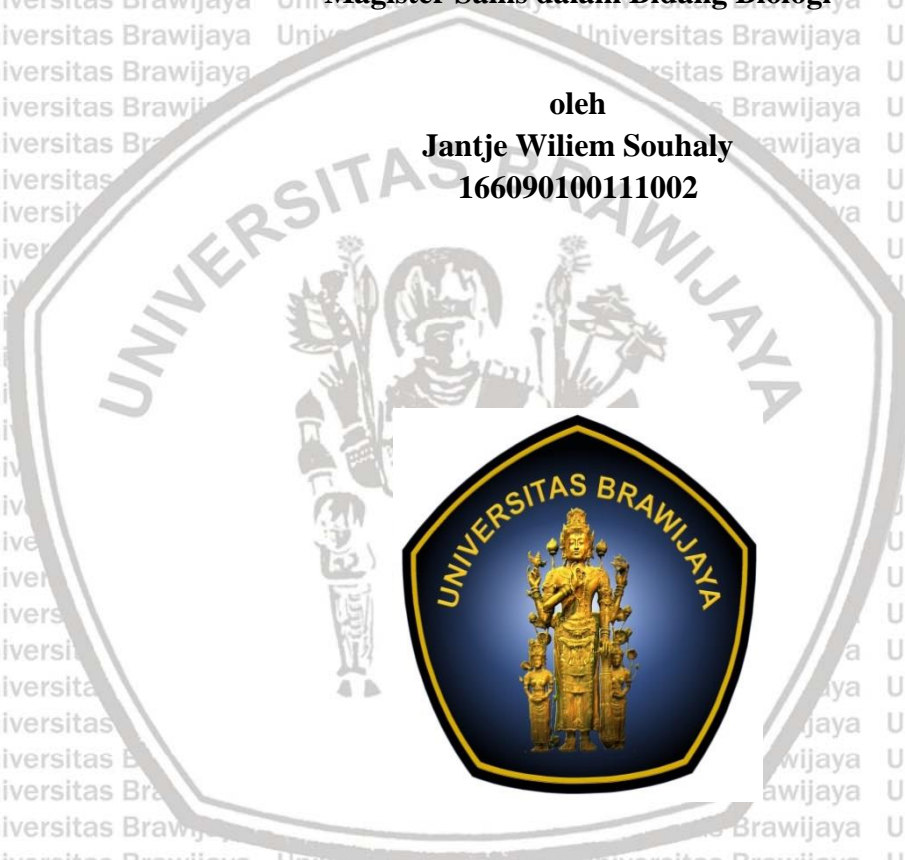
**KAJIAN AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK TERIPANG
(*Bohadschia argus*) PADA CELL LINE KANKER PAYUDARA T47D**

TESIS

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains dalam Bidang Biologi**

oleh

**Jantje Wiliem Souhaly
166090100111002**



PROGRAM MAGISTER BIOLOGI

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

HALAMAN PENGESAHAN TESIS

**KAJIAN AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK TERIPANG
(*Bohadschia argus*) PADA CELL LINE KANKER PAYUDARA T47D**

JANTJE WILIE M SOUHALY

166090100111002

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji

Pada tanggal 26 Juli 2018

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar

Magister Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Widodo, S.Si.,M.Si.,Ph.D.Med.Sc

NIP. 19730811 200003 1 002

Dr. Sri Rahayu, M.Kes

NIP. 19620528 198701 2 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Biologi

Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Nia Kurniawan, S.Si., MP., D.Sc

NIP 19781025 2003121 002

SUSUNAN KOMISI PEMBIMBING DAN PENGUJI

Judul Tesis:

**KAJIAN AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK TERIPANG (*Bohadschia argus*)
PADA CELL LINE KANKER PAYUDARA T47D**

Nama : Jantje Wiliem Souhaly

NIM : 166090100111002

KOMISI PEMBIMBING

Ketua : Prof. Widodo, S.Si.,M.Si.,Ph.D.Med.Sc

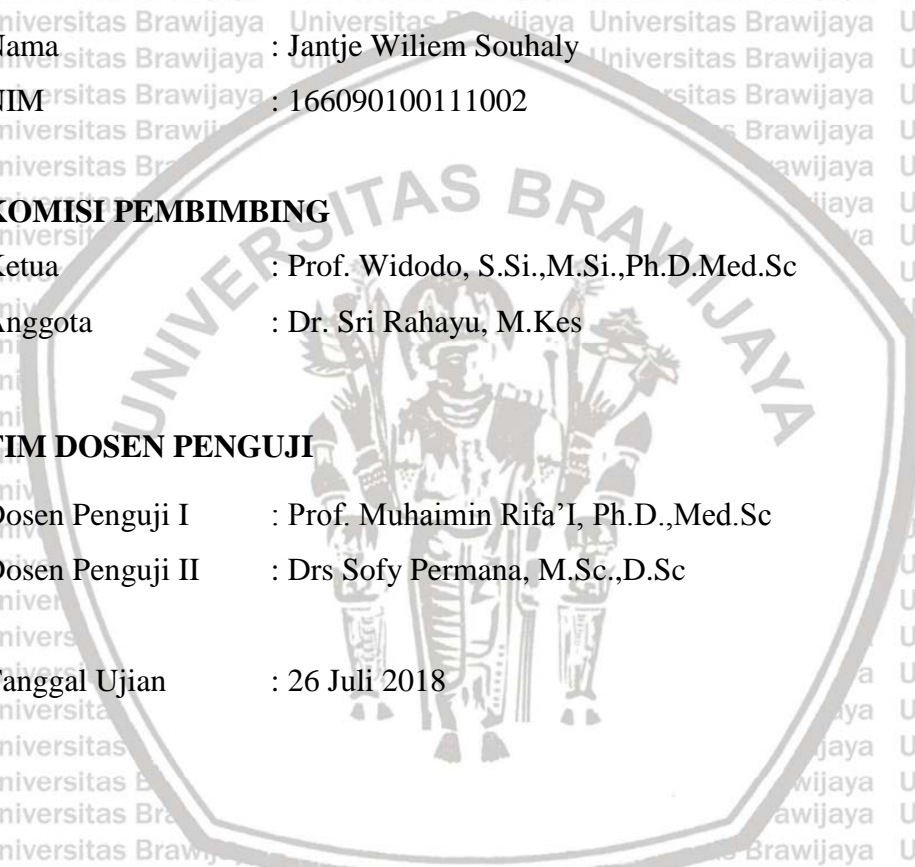
Anggota : Dr. Sri Rahayu, M.Kes

TIM DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji I : Prof. Muhaimin Rifa'I, Ph.D.,Med.Sc

Dosen Penguji II : Drs Sofy Permana, M.Sc.,D.Sc

Tanggal Ujian : 26 Juli 2018



PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, didalam Naskah Tesis ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam Naskah Tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia Tesis (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 2 dan pasal 70).

Malang, 26 Juli 2018

Nama : Jantje Wiliem Souhaly

NIM : 166090100111002





PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS

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

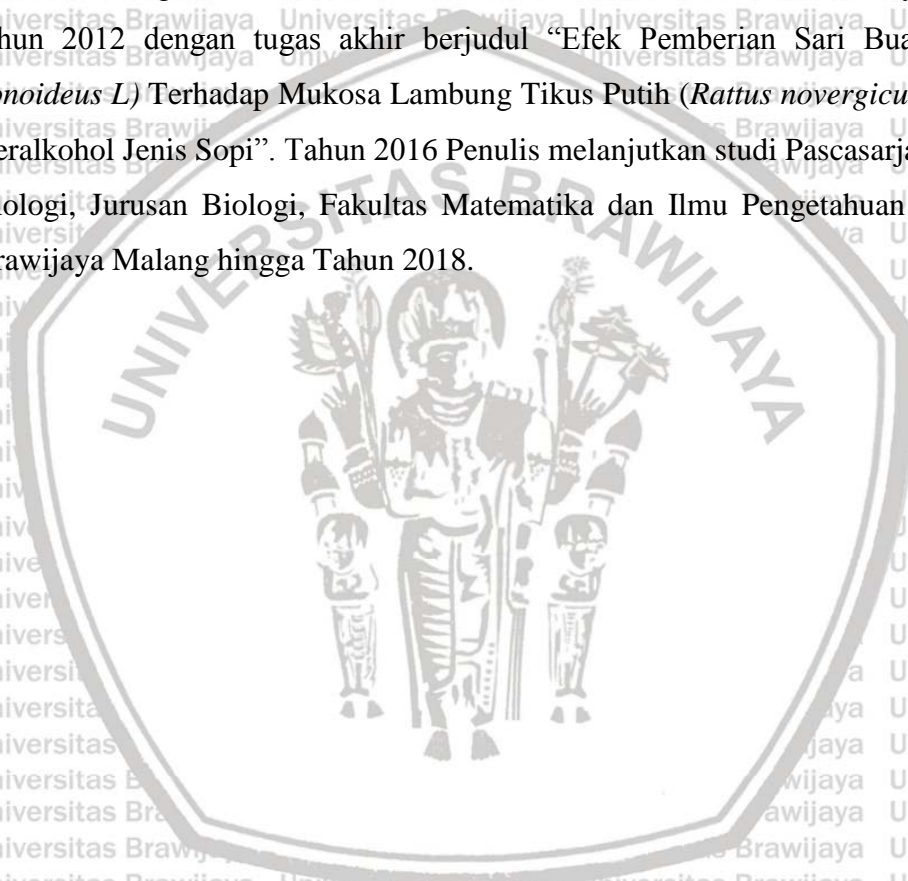


RIWAYAT HIDUP

Jantje Wiliem Souhaly lahir di Kamal pada tanggal 28 Januari 1990 anak dari Bapak Dominggus dan Ibu Neltje, pendidikan SD ditempuh di SD YPPK 2 Kamal. Pendidikan SMP ditempuh di SMP Negeri 3 Kairatu. Pendidikan SMA ditempuh di SMA Negeri 2 Ambon, lulus SMA tahun 2007, selanjutnya melanjutkan studi di jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pattimura Ambon dan menyelesaikan studi pada tahun 2012 dengan tugas akhir berjudul “Efek Pemberian Sari Buah Merah (*Pandanus conoides L*) Terhadap Mukosa Lambung Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Terpapar Minuman Beralkohol Jenis Sopi”. Tahun 2016 Penulis melanjutkan studi Pascasarjana Program Magister Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam di Universitas Brawijaya Malang hingga Tahun 2018.

Malang, Juli 2018

Penulis



RINGKASAN

Kajian Aktivitas Antikanker Ekstrak Teripang (*Bohadschia argus*) Pada Cell Line Kanker Payudara T47D

Jantje Wiliem Souhaly, Widodo, Sri Rahayu
Program Magister Biologi, Jurusan Biologi,
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang
2018

Kanker merupakan suatu keadaan yang ditandai dengan pertumbuhan sel atau jaringan yang tidak terkontrol akibatnya sel tidak dapat melakukan fungsinya dengan baik. Hal ini mempengaruhi beberapa hal seperti proliferasi sel, siklus sel, apoptosis sel, diferensiasi sel dan metastasis. Sel kanker dapat menekan apoptosis dengan mengekspresi protein Antiapoptosis seperti Bcl-2 maupun dengan menurunkan regulasi atau mutasi protein Proapoptosis Bcl-2 seperti BAX. Salah satu alternatif pengobatan kanker yaitu dengan memanfaatkan biota laut seperti teripang. Teripang jenis *Bohadschia argus* memiliki nilai ekonomi yang tinggi dan juga memiliki kandungan bioaktif seperti Tryterpene Glycoside, Glikosaminoglikan maupun Glikoprotein yang berpotensi sebagai antikanker dengan menghambat perkembangan siklus sel, proliferasi sel dan menginduksi terjadinya apoptosis baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antikanker ekstrak teripang *B. argus* pada *cell line* kanker payudara T47D. Teripang yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari perairan Desa Kamal Kabupaten Seram Bagian Barat Provinsi Maluku. Ekstraksi teripang menggunakan dua jenis ekstraksi yaitu air dan metanol. Komponen Kimia ekstrak air dianalisis *B. argus* menggunakan LC-MS dan SDS-PAGE, sedangkan ekstrak metanol *B. argus* dianalisis menggunakan GC-MS dan SDS-PAGE. Nilai IC_{50} ekstrak air dan metanol teripang pada *cell line* Kanker Payudara T47D dilakukan dengan dosis 0, 50, 100, 250 dan 500 $\mu\text{g/mL}$. Analisis sitotoksik sel dilakukan menggunakan *WST-1 assay*. IC_{50} yang didapatkan untuk ekstrak air adalah 480 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan IC_{50} untuk ekstrak metanol adalah 146 $\mu\text{g/mL}$. IC_{50} yang diperoleh digunakan untuk penelitian tahap berikutnya. Uji aktivitas antikanker ekstrak teripang pada *cell line* kanker payudara T47D dilakukan dengan perlakuan kontrol (tanpa perlakuan ekstrak), cisplatin (obat anti kanker), kelompok perlakuan ekstrak air dosis 480 $\mu\text{g/mL}$ dan ekstrak metanol dosis 146 $\mu\text{g/mL}$. Semua kelompok perlakuan dikultur pada media RPMI, suhu 37°C, kadar CO₂ 5%, diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam. Pengamatan Jumlah apoptosis sel, siklus Sel, proliferasi sel dan ekspresi Bcl-2 dilakukan dengan menggunakan *flow cytometry*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein dominan yang ditemukan pada Ekstrak Metanol adalah protein dengan berat molekul 55 kDa, sedangkan protein dominan yang ditemukan pada Ekstrak air adalah protein dengan berat molekul 55 kDa, 70 kDa, dan 80 kDa. Berdasarkan hasil LC-MS dan GC-MS ekstrak teripang jenis *B. argus* memiliki senyawa Tryterpene Glycoside dan Ethyl Acetate. Ekstrak air teripang dengan dosis 480 $\mu\text{g/mL}$ dan ekstrak metanol teripang dengan dosis 146 $\mu\text{g/mL}$ mampu menginduksi apoptosis, menghambat fase transisi G1 ke fase S, menghambat proliferasi dan menurunkan ekspresi protein Bcl-2 pada *cell line* kanker payudara T47D. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan

bahwa ekstrak teripang *B. argus* memiliki aktivitas antikanker pada *cell line* kanker payudara T47D.



SUMMARY

The Anticancer Activity Study of Sea Cucumber (*Bohadschia argus*) on The Breast Cancer Cell Line T47D

Jantje Wiliem Souhaly, Widodo, Sri Rahayu

Departement of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Brawijaya, Malang

2018.

Cancer is abnormal condition growth of cells or tissue controll. This affects several things such as cell proliferation, cell cycle, apoptotic cell, differentiation of cell and metastasis. Cancer cells may suppress Apoptosis by exposing antiapoptotic proteins such as Bcl-2 or by decreasing the regulation or mutation of the Bcl-2 Proapoptosis protein such as BAX. The one of alternative treatment of cancer is by utilizing Marine Organism such as sea cucumbers. Sea cucumber *Bohadshia argus* has a high economic value and also has potentially anti-cancer bioactive content such as Tryterpene Glycoside, Glikosaminoglikan or Glikoprotein by inhibiting the development of cell cycle, cell proliferation and inducing apoptotic both *in vitro* and *in vivo*.

The purpose of this study was to determine the anticancer activity of *B. argus* sea cucumber extract on Breast Cancer *cell line* T47D. Sea cucumbers used in this study were obtained from the sea of Kamal Village, West Seram Maluku. The Extraction of sea cucumbers uses two types of extraction water and methanol. The Chemical compound of *B. argus* water extracts were analyzed by LC-MS and SDS-PAGE, while for *B. argus* methanol extract was analyzed using GC-MS and SDS-PAGE for water and methanol extract. *WST-1 assay* was performed with dose of 0, 50, 100, 250 and 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ to determine IC_{50} in T47D cells. The IC_{50} was obtained for the water extract was 480 $\mu\text{g} / \text{mL}$, whereas the IC_{50} for Methanol Extract was 146 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The obtained IC_{50} is used for subsequent research. Anticancer activity test of Sea Cucumber Extract against T47D breast cancer cells was done by control treatment (without extract treatment), cisplatin (anti-cancer drug), 480 $\mu\text{g} / \text{mL}$ water extract and methanol extract dose 146 $\mu\text{g} / \text{mL}$. All treatment groups were cultured on RPMI media, 37°C, 5% CO₂, incubated for 24 hours and 48 hours. Observation of the number of apoptotic, cell cycle, cell proliferation and Bcl-2 expression was performed using *flow cytometry*.

The results of this study indicate that the protein found in methanol extract is a protein with a molecular weight of 55 kDa, while the protein found in water extract is a protein with a molecular weight of 55 kDa, 70 kDa, and 80 kDa. Based on the results of LC-MS and GC-MS extract of sea cucumber *B. argus* has anticancer compounds such as Tryterpene Glycoside and Ethyl Acetate. Water extract of sea cucumber with dose 480 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and methanol extract sea cucumber with dose 146 $\mu\text{g} / \text{mL}$ induced apoptotic, prevent in transition phase G1 to phase S, inhibit proliferation and induce proapoptotic protein Bcl-2 against cancer cell T47D. From the results of this study can be concluded that the extract of sea cucumber function as anticancer on breast cancer *cell line* T47D.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis persembahkan hanya kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkatnya penulis dapat menyelesaikan tesis ini untuk memperoleh gelar Magister Sains dalam bidang Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Proses penyusunan naskah tesis ini juga banyak dibantu oleh banyak pihak, oleh karena itu perkenankan penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Nia Kurniawan, S.Si, MP., D.Sc selaku Ketua Program Studi Pasca Sarjana Magister Biologi Universitas Brawijaya
2. Prof. Widodo, S.Si.,M.Si.,Ph.D.Med.Sc selaku Ketua Pembimbing dan Dr. Sri Rahayu, M.Kes selaku Anggota Komisi Pembimbing yang telah meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, dukungan, arahan, saran serta koreksi selama penulisan tesis ini.
3. Prof. Muhaimin Rifa'I, S.Si., Ph.D.Med.Sc dan Drs. Sofy Permana, M.Sc.,D.Sc selaku komisi penguji yang telah memberikan arahan serta koreksi untuk perbaikan penulisan tesis ini.
4. Orang Tua penulis Ibu Neltje Tlingkery dan juga (Alm) Mama Tua Rika serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan dukungan, materi dan doa sehingga terselesaikannya tesis ini.
5. Rizka Pantris R, M.Si dan Fika Agalia, M.Si selaku teman-teman seperjuangan dalam menyelesaikan proses ujian.
6. Teman-teman Program Pascasarjana Magister Biologi Angkatan 2016 Universitas Brawijaya yang selalu bersama-sama dalam proses studi maupun proses penelitian.
7. Bambang Pristiwanto, M.Si, Nurul Dhuha, M.Si, Karimatul Himmah, M.Si, Laila Rahma, S.Si, Didin Wahyu A, S.Si, Sapti Puspitarini,S.Si dan seluruh rekan-rekan Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi Universitas Brawijaya yang telah memberi saran dan bantuan selama proses penelitian dan penyusunan naskah.
8. Teman-Teman P.S Suara Nafiri dan J'wa Muda GKI Bromo Malang yang selalu memberikan dukungan dan doa bagi penulis.
9. Semua pihak yang namanya tidak dapat disebutkan satu per satu, terima kasih atas bantuannya kepada penulis.

Naskah tesis ini masih jauh dari sempurna, Oleh karena itu, segala kritik dan saran yang bersifat membangun sangat diharapkan untuk perbaikan di masa datang. Penulis berharap karya kecil ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan berbagai pihak.

Malang, Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
KATA PENGANTAR	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Deskripsi dan Klasifikasi Teripang (<i>Bohadschia argus</i>).....	4
2.2 Kandungan Bioaktif Teripang.....	5
2.3 Kanker.....	6
2.4 Viabilitas Sel.....	6
2.5 Siklus Sel.....	7
2.6 Proliferasi Sel.....	8
2.7 Apoptosis Sel.....	9
2.8 Bcl-2.....	10
2.9 Kerangka Konsep.....	11
BAB III METODE PENELITIAN	13
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	13
3.2 Kerangka Operasional.....	13

3.3 Rancangan Percobaan.....	14
3.4 Prosedur Penelitian	14
3.4.1 Ekstraksi Teripang (<i>B. argus</i>).....	14
3.4.1.1 Ekstraksi Menggunakan Metanol.....	14
3.4.1.2 Ekstraksi Menggunakan Air.....	14
3.5 Analisis Komponen Kimia Ekstrak Teripang.....	15
3.5.1 SDS PAGE.....	15
3.5.2 GC-MS dan LC-MS	15
3.6 Kultur Sel T47D.....	15
3.6.1 IC ₅₀ Ekstrak Teripang Pada Sel T47D.....	15
3.7 Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Teripang.....	17
3.7.1 Analisis Apoptosis Sel.....	17
3.7.2 Analisis Siklus Sel.....	18
3.7.3 Analisis Proliferasi Sel	18
3.7.4 Analisis Bcl-2.....	18
3.7.5 Analisis Data	19
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	20
4.1 Analisis Komponen Kimia Ekstrak Teripang.....	20
4.1.1 Profil Protein Ekstrak Teripang Menggunakan SDS-PAGE.....	20
4.1.2 Analisis Komponen Kimia Ekstrak Air Teripang <i>B. argus</i>	21
4.1.3 Analisis Komponen Kimia Ekstrak Metanol Teripang <i>B. argus</i>	22
4.2 Uji IC ₅₀ Sel Kanker Payudara T47D.....	24
4.3 Uji Aktivitas Antikanker Teripang Terhadap Induksi Apoptosis.....	24
4.4 Uji Aktivitas Antikanker Teripang Terhadap Siklus Sel Kanker T47D.....	27
4.5 Uji Aktivitas Antikanker Teripang Terhadap Proliferasi Sel Kanker T47D.....	29
4.6 Uji Aktivitas Antikanker Teripang Terhadap Bcl-2 Pada Sel Kanker T47D.....	31
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	34
5.1 Kesimpulan.....	34
5.2 Saran	34



DAFTAR PUSTAKA
LAMPIRAN

35
44





DAFTAR TABEL

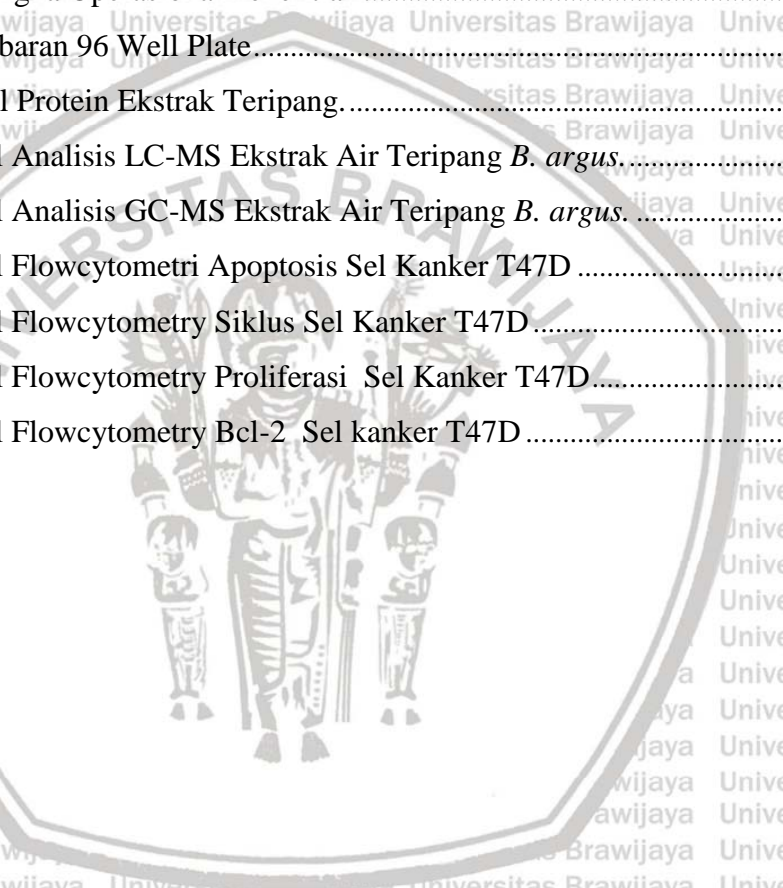
Nomor		Halaman
1	Komponen Kimia Ekstrak Air Teripang.....	22
2	Komponen Kimia Ekstrak Metanol Teripang.....	23
3	Presentase Viabilitas Sel Kanker T47D.....	24
4	Presentase Apoptosis pada Sel Kanker T47D.....	26
5	Presentase Jumlah Sel Pada Tahapan Siklus Sel Kanker T47D.....	29
6	Presentase Jumlah Sel Pada Proliferasi Sel Kanker T47D.....	31
7	Presentase Bcl-2 Pada Sel Kanker T47D.....	32





DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Teripang jenis <i>Bohadschia argus</i>	4
2	Ilustrasi siklus sel	8
3	Jalur Apoptosis	10
4	Kerangka konsep	11
5	Kerangka Operasional Penelitian	13
6	Gambaran 96 Well Plate	16
7	Profil Protein Ekstrak Teripang	20
8	Hasil Analisis LC-MS Ekstrak Air Teripang <i>B. argus</i>	21
9	Hasil Analisis GC-MS Ekstrak Air Teripang <i>B. argus</i>	23
10	Hasil Flowcytometri Apoptosis Sel Kanker T47D	25
11	Hasil Flowcytometry Siklus Sel Kanker T47D	28
12	Hasil Flowcytometry Proliferasi Sel Kanker T47D	30
13	Hasil Flowcytometry Bcl-2 Sel kanker T47D	32



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Teripang jenis <i>Bohadschia argus</i>	43
2	Komponen Kimia Ekstrak Teripang <i>B. argus</i>	48
3	Penentuan Dosis Ekstrak Teripang.....	51
4	Sertifikat Bebas Plagiasi.....	54



DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan

Keterangan

APS

Ammonium Persulfate

Bcl-2

B-cell lymphoma 2

CDK

Cyclin Dependent Kinase

CFSE

Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester

COX-2

Cyclooxygenase-2

FBS

Fetal Bovine Serum

FITC

Fluorescence Isothiocyanat

GC-MS

Gas Chromatography-Mass Spectrometry

LC-MS

Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

MTT

Microculture Tetrazolium Salt

PBS

Phosphate Buffered Saline

PI

Propidium Iodida

PS

Phosphatidylserine

Rb

Retinoblastoma

Media RPMI

Media Roswell Park Memorial Institute

RTK

Reseptor Tirosin Kinase

SDS-PAGE

Sodium Dodesil Sulfat-Elektroforesis Gel Poliakrilamida

WST

Cell Proliferation Reagent

μ

Mikro

α

Alpha

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Seiring berkembangnya pembangunan diberbagai sektor kehidupan, maka terjadi pula pencemaran zat yang bersifat mutagen dan karsinogen pada lingkungan hidup manusia.

Pencemaran tersebut telah melewati ambang batas pencemaran dan berdampak dengan timbulnya berbagai macam penyakit seperti kanker. Diperkirakan sebagian besar penyebab kanker adalah faktor lingkungan terutama polusi lingkungan maupun radiasi matahari, selain itu kebiasaan hidup yang tidak baik seperti merokok dan mengkonsumsi alkohol yang berlebihan juga menjadi pemicu terjadinya kanker (Fucito dkk., 2016).

Kanker merupakan suatu keadaan yang ditandai dengan pertumbuhan sel atau jaringan yang tidak terkontrol akibatnya sel tidak dapat melakukan fungsinya dengan baik. Hal ini diakibatkan karena adanya mutasi dari kelompok gen yang diketahui berperan penting untuk pengembangan kanker seperti Rb, p53, maupun PI3K (Leiserson dkk., 2013). Sel kanker mempengaruhi beberapa hal seperti proliferasi sel, siklus sel, apoptosis sel, diferensiasi sel, angiogenesis dan metastasis (Ramasamy, 2008). Perubahan sel menjadi abnormal, mengakibatkan kemampuan proliferasi dan diferensiasi sel menjadi sangat tinggi. Peningkatan proliferasi pada sel kanker yang mengalami mutasi p53 ditandai juga dengan peningkatan COX-2 yang memiliki peran dalam memodulasi proliferasi sel (Ikawati dkk., 2018). Sel kanker seperti sel kanker payudara (T47D) dapat menekan apoptosis dan resisten terhadap agen apoptosis, misalnya dengan mengekspresi protein antiapoptosis seperti Bcl-2 maupun dengan menurunkan regulasi protein proapoptosis Bcl-2 seperti BAX (Hassan dkk., 2014).

Selain itu juga kanker dapat mempengaruhi transisi fase G1-S pada siklus sel yang menginduksi ekspresi p21 yang merupakan penghambat siklin kinase dan penghambat siklin A, siklin E dan ekspresi siklin B (Fan dkk., 2017).

Kanker menjadi salah satu penyakit yang paling ditakuti hal ini disebabkan karena sebagian besar penderitanya berujung pada kematian. Kasus kematian diseluruh dunia akibat kanker dari tahun ke tahun terus meningkat, diperkirakan akan mencapai 13.1 juta jumlah kematian pada tahun 2030 (Ferlay dkk., 2015). Di Indonesia, setiap tahun terdapat 39.831 kasus baru kanker payudara. Laporan dari Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) pada tahun

2007 menunjukkan angka kejadian 26 kasus per 100.000 wanita. Pada tahun 2009 menunjukkan bahwa kanker payudara merupakan penyebab terbanyak kematian akibat penyakit kanker pada wanita yang dirawat di rumah sakit (Anonim, 2010) sehingga perlu adanya pengobatan untuk mencegah terjadinya hal ini. Pada umumnya pengobatan kanker menggunakan kemoterapi dan sejauh penggunaannya sampai saat ini telah berhasil dalam menekan pertumbuhan sel kanker namun pengobatan menggunakan kemoterapi relatif mahal dan juga memiliki efek samping yang besar salah satunya dapat merusak sel-sel normal (Citra, 2013) sehingga masyarakat banyak berpaling pada pengobatan tradisional yang relatif murah.

Penelitian tentang khasiat obat untuk membantu penyembuhan kanker telah lama dilakukan dan sampai sekarang masih terus dilakukan oleh para peneliti. Salah satu alternatif pengobatan kanker yaitu dengan memanfaatkan biota laut, hal ini dikarenakan letak geografis Indonesia yang sebagian besar memiliki perairan pantai yang cukup luas sehingga memiliki potensi kekayaan alam khususnya biota laut yang mengandung berbagai macam kegunaan dan manfaat. Salah satu biota laut yang memiliki nilai ekonomi yang tinggi adalah teripang (*Holothuria sp*). Nilai ekonomi pada teripang berasal dari tingginya kandungan senyawa bioaktif maupun nutrisi yang terdapat pada teripang (Elfidasari dkk., 2012). Hewan ini sering disebut timun laut karena bentuk tubuhnya seperti ketimun, hewan yang tergolong filum Echinodermata ini merupakan hewan invertebrata yang hidup di daerah lamun dan terumbu karang (Bechtel dkk., 2013). Kandungan bioaktif yang terdapat pada teripang antara lain glikosida triterpen (saponin), glikosaminoglikan (GAG), polisakarida sulfat, glikoprotein, glycosphingolipids (Bordbar dkk., 2011). Kandungan saponin pada teripang diduga merupakan pertahanan diri dari lingkungannya, selain itu kandungan ini diyakini bersifat sitotoksik, anti-inflamasi, antibakteri, serta antitumor (Osborn dkk., 2011). Glikosida triterpen menunjukkan aktivitas antikanker dengan menghambat perkembangan siklus sel dan mendorong terjadinya apoptosis (Zhao dkk., 2012). Isolasi triterpen glikosida dari teripang menunjukkan sitotoksitas yang signifikan terhadap sel tumor (Han dkk., 2009). Kandungan Frondosida A pada teripang berpotensi menghambat proliferasi sel kanker dan menginduksi apoptosis baik secara *in vitro* maupun *in vivo* (Al Shemali dkk., 2014). Berdasarkan hal ini maka perlu dilakukan penelitian tentang potensi teripang sebagai anti kanker.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan dalam penelitian ini adalah Apakah ekstrak teripang (*Bohadschia argus*) memiliki aktivitas anti kanker terhadap apoptosis sel, siklus sel, proliferasi sel dan Bcl-2 pada *cell line* kanker payudara T47D ?

1.3 Tujuan

Tujuan dalam penelitian ini adalah Apakah aktivitas antikanker ekstrak teripang (*B. argus*) dapat mempengaruhi apoptosis sel, siklus sel, proliferasi sel, dan Bcl-2 pada *cell line* kanker payudara T47D.

1.4 Manfaat

Manfaat penelitian ini yaitu :

- 1) Memberikan informasi ilmiah tentang potensi teripang (*B. argus*) sebagai Antikanker
- 2) Memberikan informasi kepada Masyarakat tentang potensi Teripang (*B. argus*) sebagai alternatif bahan pengobatan.
- 3) Penelitian ini diharapkan dapat berguna menjadi bahan acuan untuk penelitian lebih lanjut.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi dan Klasifikasi Teripang (*Bohadschia argus*)

Teripang merupakan Biota Laut yang memiliki bentuk tubuh selinder yang menyerupai timun, sehingga sering juga disebut timun laut. Merupakan hewan tidak bertulang belakang yang termasuk dalam filum Echinodermata dan memiliki tubuh yang lunak, memanjang dan memiliki kulit yang kasar (Tuwo, 2004). Beberapa negara di asia termasuk Indonesia menjadikan teripang sebagai sumber makanan dan sering dijual secara komersial dikarenakan potensi ekonomi yang tinggi pada teripang (Gambar 1).



Gambar 1. Teripang jenis *Bohadschia argus* (Conand, 2013)

Klasifikasi teripang (Conand, 2013) adalah sebagai berikut :

Filum : Echinodermata

Kelas: Holothuroidea

Ordo : Aspidochirotida

Famili : Holothuriidae

Teripang dewasa umumnya memiliki kulit yang kasar dengan panjang tubuh antara 150-400 mm dengan berat 500-2000 gr. Teripang dapat dikenali karena warnanya. Bagian dorsal teripang berwarna abu-abu kehitaman dengan garis-garis dan terdapat bintil-bintil halus, tubuh berlendir serta memiliki kulit yang tebal. Mulut berbentuk oval dikelilingi oleh tentakel yang berfungsi untuk mengambil makanan disekitarnya (Dewi, 2008).

Teripang dapat ditemukan diseluruh daerah perairan yang dangkal sampai perairan yang dalam. Di Indonesia teripang dapat dijumpai pada semua perairan pantai, daerah penyebarannya antara lain meliputi perairan Jawa Timur, Sulawesi Selatan, Nusa Tenggara Timur, Nusa Tenggara Barat dan Maluku. Teripang biasanya hidup di daerah yang airnya jernih dan relatif tenang, berada di dasar berpasir halus, terletak di antara terumbu karang, dan dipengaruhi oleh pasang surut air laut (Uni dkk.,2016).

2.2 Kandungan Bioaktif Teripang

Biota Laut memiliki sumber Senyawa Aktif berlimpah seperti Antioksidan, Asam Lemak tidak terlarut, Alkaloid dan Senyawa lainnya (Ottinger dkk., 2012). Teripang mengandung beberapa Senyawa Antikanker dan anti inflamasi diantaranya Monosulfated, Triterpenoid Glycoside, Frondoside A, Frondoside B, Frondoside C, dan Asam 12-Methyltetradecanoic (Janakiram dkk., 2015). Triterpene Glycoside dihasilkan oleh teripang sebagai bentuk mekanisme pertahanan diri secara kimiawi dari predator (Kim dkk., 2012). Senyawa Triterpene Glycoside diyakini memiliki efek biologis diantaranya sebagai anti jamur, sitotoksik melawan sel tumor, aktivitas kekebalan tubuh dan anti proliferasi pada sel kanker (Han dkk., 2010).

Frondanol A5 efektif dalam menghambat proliferasi sel dan siklus sel pada fase G2/M dengan mengurangi ekspresi Cdc25c, cyclin A, cyclin B dan meningkatkan p21 sehingga terjadi apoptosis pada sel kanker (Roginsky, 2010). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa Frondoside A memiliki potensi yang baik dalam pengobatan kanker payudara (Park dkk., 2012). Studi *in vitro* menunjukkan bahwa frondoside A menyebabkan viabilitas sel berkurang dan terjadi peningkatan apoptosis pada sel kanker melalui jalur caspase-3 yang tergantung dari peningkatan p53 (Al Marzouqi dkk., 2011).

2.3 Kanker

Kanker adalah suatu penyakit yang ditandai dengan adanya pertumbuhan sel yang tidak terkendali. Pertumbuhan sel yang tidak terkendali ini salah satu penyebabnya karena gen-gen pada sel normal mengalami mutasi. Mutasi pada DNA dapat terjadi karena berbagai sebab seperti faktor lingkungan maupun kebiasaan hidup yang tidak sehat seperti mengkonsumsi alkohol maupun merokok sehingga hormon dan faktor pertumbuhan sel tidak berkerja dengan baik (Hashibe dkk., 2007). Hormon dan faktor pertumbuhan berperan dalam pertumbuhan sel kanker hal ini disebabkan karena kerja keduanya diawali dan dipicu melalui ikatan dengan reseptornya apabila terjadi gangguan pada keduanya maka akan terjadi abnormal sel.

Berbagai jenis kanker yang sering terjadi dan diketahui menyebabkan kematian yang tinggi antara lain kanker payudara, kanker serviks dan juga kanker prostat. Kanker payudara merupakan kanker yang menyebabkan kematian tertinggi pada wanita dengan 1,3 juta kasus dan 450 ribu kematian pertahunnya di seluruh dunia (Jemal dkk., 2011). Terdapat beberapa model sel kanker payudara yang digunakan dalam penelitian diantaranya yaitu sel kanker T47D. Sel kanker T47D pada stadium awal ("T-47D ATCC® HTB-133™") mengekspresikan protein p53 yang termutasi sehingga p53 tidak memiliki kemampuan untuk meregulasi siklus sel.

Pada sel kanker payudara, Estrogen atau 17β -estradiol dan hormon steroid, memainkan peran penting dalam pengembangan sel. Reseptor estrogen- α ($ER\alpha$) bertindak sebagai faktor transkripsi dan transduser sinyal. $ER\alpha$ adalah faktor transkripsi yang bergantung pada ligan yang mengatur gen yang terlibat dalam proliferasi sel, diferensiasi, dan migrasi (Nilsson dkk., 2001). Perkembangan sel kanker payudara dikaitkan dengan regulasi pensinyalan $ER\alpha$ (Barnes, Vadlamudi, & Kumar, 2004). Estrogen akan berikatan dengan reseptor *estrogen* (ER) yang akan mengaktifasi reseptor tirosin kinase (RTK), selanjutnya RTK ini akan memberikan pensinyalan untuk proliferasi dan Apoptosis jika proses sinyal pensinyalan terganggu akibat kanker maka sel akan menjadi abnormal (Manavathi dkk., 2013).

2.4 Viabilitas Sel

Viabilitas Sel adalah kemampuan dari suatu sel untuk mempertahankan dirinya dalam kondisi normal dan mampu menjalankan aktivitas fisiologi secara baik. Analisis viabilitas

sering digunakan dalam menentukan sitotoksitas dan efisiensi dari suatu obat, (Stoddart, 2011). Salah satu metode yang dapat digunakan untuk analisis viabilitas yaitu kalorimetri. Metode kalorimetri yang biasanya digunakan seperti MTT dan WST-1 (Ngamwongsatit, 2008). WST-1 merupakan senyawa yang dapat larut dalam air.

WST-assay memiliki kelebihan untuk mengukur sampel dalam jumlah kecil dan hasil dari WST dapat digunakan untuk memprediksi sifat sitotoksik dari suatu sampel. WST diabsorpsi kedalam sel melalui reaksi reduksi oleh enzim reduktase menjadi formazan, Konsentrasi formazan dapat ditentukan secara spektrofotometri dimana semakin besar absorbansi menunjukkan semakin besar jumlah sel yang hidup (Berridge dkk., 2005).

Pada sel kultur seperti sel kanker T47D sering digunakan uji viabilitas sel untuk melihat tingkat ketoksikan suatu senyawa terhadap sel kanker. Parameter yang sering digunakan yaitu dengan melihat nilai IC_{50} , semakin besar nilai IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Haryoto dkk., 2013).

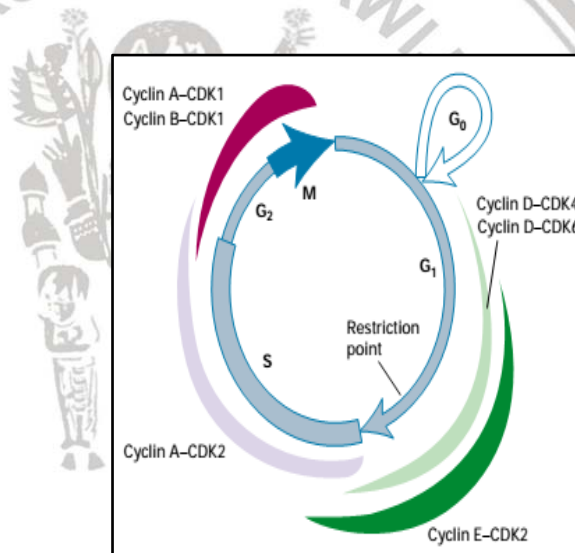
2.5 Siklus Sel

Siklus sel adalah suatu proses pertumbuhan dan perkembangan dari suatu sel dalam rangka mempertahankan hidupnya. Tahapan siklus sel yaitu fase Gap 1 (G1), fase sintesis (S), fase Gap 2 (G2), dan fase Mitosis (M). Fase G merupakan fase antara fase S dan fase M yang berfungsi untuk sel memonitor keadaan internal maupun eksternal yang memungkinkan untuk pembelahan pada fase S dan M (Gambar 2). Jika kondisi ekstraseluler tidak menguntungkan, maka sel akan memasuki fase G0 dimana sel berhenti berkembang. Namun sebaliknya, jika kondisi lingkungan mendukung dan terdapat sinyal pertumbuhan maka sel akan memasuki fase G1, perkembangan siklus sel dikendalikan melalui perubahan kadar dan aktivitas suatu kelompok protein yang disebut Cyclin (Lodish, 2008). Pada tahapan siklus sel tertentu, cyclin meningkat kemudian didegradasi dengan cepat, Cyclin menjalankan fungsi regulasinya melalui pembentukan kompleks dengan suatu protein yang disintesis secara konstitutif yaitu *Cyclin Dependent Kinase* (Cdk) (Shackelford dkk., 1999).

Pada saat fase transisi G1 ke fase S, Cdk2 menjadi aktif sehingga mengikat CycE. Kompleks Cdk2 dengan cycE selanjutnya masuk dalam proses fosforilasi memindahkan fosfat ke substrat, pRb dibantu dengan enzim kelompok kinase (Vermeulen dkk., 2003). Hal tersebut terjadi agar proses transkripsi yang dipacu E2F tetap aktif dan *restriction point* (R point) yang

ada pada batas fase G1/S dapat terlampaui. Syarat agar *restriction point* (R point) terlampaui yaitu jumlah cyclin, tidak adanya DNA damage, ukuran sel (sel akan membelah jika memenuhi ukuran tertentu) dan terpenuhinya cukup energi (Satyanarayana., 2009).

Pada Sel Kanker, *restriction point* (R point) sudah tak ada artinya lagi, akibatnya sel akan melewati fase-fase dalam siklus sel secara keseluruhan kemudian membelah. selain itu kinerja dari pRb dapat dinonaktifkan sehingga mempengaruhi kinerja dari cyclin yang bertanggung jawab dalam memulai fosforilasi. Adanya gangguan ini mengakibatkan aktivitas cyclin yang berlebihan dan inaktivasi yang tidak tepat dari pRb. Analisis siklus sel dapat dilakukan dengan pewarnaan PI. Prophidium Iodide (PI) merupakan senyawa yang akan mengikat dan mewarnai DNA sel, pada analisis siklus sel akan terlihat banyaknya sel yang berada pada fase DNA yaitu, fase G, M1, dan M2 (Parish dkk.,2009).



Gambar 2. Ilustrasi siklus sel (Lodish, 2008)

2.6 Proliferasi Sel

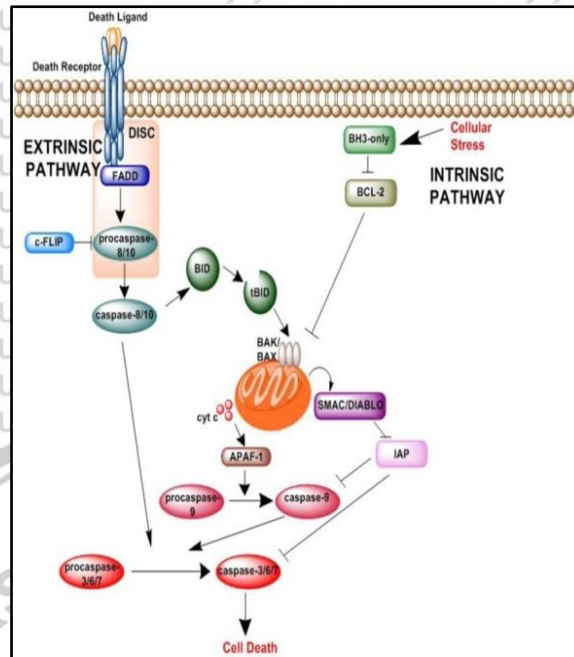
Proliferasi merupakan bagian penting dari perkembangan sel dan berhubungan erat dengan dengan siklus sel, sehingga apabila siklus sel terganggu maka proliferasi sel juga akan terganggu. Pada sel kanker proliferasi meningkat dengan sangat tinggi hal ini dikarenakan pembelahan sel yang sudah tidak terkontrol. Peningkatan Jalur transduksi sinyal yang terganggu juga merangsang pertumbuhan sel dan pengembangan kelangsungan hidup sel kanker (Feitelson dkk., 2015).

Pelabelan sel untuk analisis proliferasi dapat menggunakan menggunakan CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*). Pewarnaan CFSE merupakan cara yang efektif dan sering digunakan dalam melihat pembelahan sel karena ikatan kovalen CFSE mampu melabeli molekul intraseluler (Banks dkk., 2011). Penggunaan *flowcytometer* dapat digunakan untuk mengukur intensitas fluorescent, karena ketika sel membelah, turunan sel yang telah terlabel CFSE memiliki setengah jumlah molekul *Carboxyfluorescein-tagged* sehingga setiap pembelahan sel dapat dinilai dengan mengukur penurunan nilai fluoresensi sel (Quah dkk., 2007).

2.7 Apoptosis Sel

Apoptosis adalah mekanisme kematian sel yang terprogram terjadi dalam proses yang diatur sedemikian rupa yang secara umum memainkan peran penting dalam pengembangan organisme dan mengontrol homeostasis dari jaringan seperti keseimbangan Proliferasi dan Apoptosis (Du Toit, 2013). Pada tahap apoptosis terjadi translokasi *phosphatidylserine* (PS) yang berada dibagian dalam membran plasma menjadi berada dibagian luar membran plasma sehingga menutupi bagian permukaan sel. Pada penelitian yang berhubungan dengan analisis Apoptosis sering digunakan pewarnaan dengan *Annexin V* yang biasanya digunakan bersamaan dengan pewarnaan Propodium Iodida (PI) yang dapat mewarnai sel dengan cara berinteraksi dengan DNA. Sel normal mempunyai membran yang utuh sehingga PI tidak dapat menembus membran dan berinteraksi dengan DNA, sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi sel yang mengalami Apoptosis awal atau akhir (Karam, 2009).

Aktivasi enzim *caspase* dapat mengakibatkan terjadinya apoptosis sebab enzim ini dapat mengaktifasi nuklease sehingga terjadi degradasi DNA. Aktivasi enzim ini dipengaruhi oleh keseimbangan pada jalur molekuler pro dan anti Apoptosis (Karam, 2009). Apoptosis dapat melalui jalur ekstrinsik maupun intrinsik (Krenso, 2011). Apoptosis pada jalur ekstrinsik melibatkan interaksi yang dimediasi oleh reseptor transmembran seperti kelompok reseptor TNF. Jalur intrinsik melibatkan sejumlah stimulus yang tidak dimediasi oleh reseptor yang menghasilkan sinyal intraseluler yang langsung beraksi dengan sasaran intrasel dan berkaitan erat dengan mitokondria



Gambar 3. Jalur Apoptosis (Zaman dkk., 2014)

Apoptosis memiliki peranan penting dalam fenomena biologis, proses apoptosis yang tidak sempurna dapat menyebabkan timbulnya berbagai macam penyakit seperti kanker. Pada sel kanker, sinyal apoptosis diatur secara de-regulasi, terutama pengaktifan sistem anti-apoptosis akibatnya apoptosis menurun dengan sangat drastis yang memungkinkan sel kanker untuk melepaskan diri dari program ini dikarenakan hilangnya kemampuan DNA repair sehingga mengakibatkan proliferasi yang tidak terkontrol (Mohammad dkk., 2015).

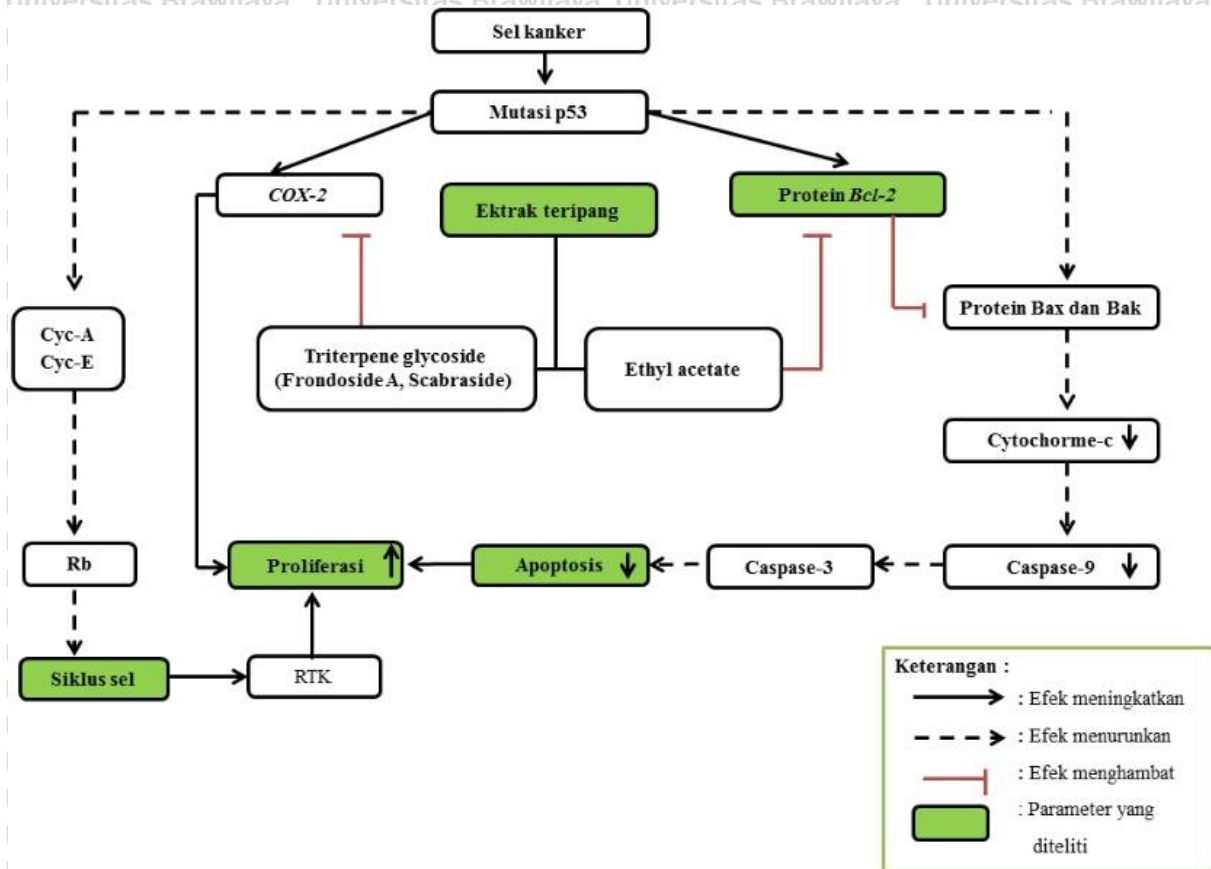
2.8 Bcl-2

Bcl-2 (B-cell lymphoma -2) adalah protein yang terlibat dalam fase inisiasi jalur intrinsik Apoptosis (Hatok dkk., 2016). Bcl-2 berada pada bagian membran mitokondria dan berperan dalam kelangsungan hidup sel dan menghambat protein proapoptosis. Protein proapoptosis seperti Bax dan Bak meningkatkan permeabilisasi membran mitokondria dan pelepasan sitokrom-c yang dapat mengaktifkan caspase sehingga terjadi apoptosis (Hardwick dkk., 2013).

Bcl-2 terlibat dalam regulasi fusi dan fisi mitokondria, juga pada sel beta pankreas yang diketahui Bcl-2 terlibat dalam pengendalian aktivitas metabolik dan sekresi insulin, dengan penghambatan Bcl-2 menunjukkan peningkatan aktivitas metabolik. Pada sel tumor,

mutasi dari gen Bcl-2 dapat menyebabkan peningkatan ekspresi protein Bcl-2 yang dapat menekan fungsi dari protein proapoptosis Bax dan Bak (Luciani dkk., 2013).

2.9 Kerangka Konsep



Gambar 4. Kerangka konsep

Sel kanker T47D mengekspresikan protein p53 yang termutasi. Adanya mutasi gen *p53* akan meningkatkan kadar protein Bcl-2 sehingga akan menekan proses apoptosis. Selain itu juga berpengaruh terhadap penurunan protein Bcl-2 Proapoptosis seperti BAX dan BAK yang berfungsi untuk melepaskan cytochrom-c yang diperlukan untuk mengaktivasi caspase-9 sehingga caspase-3 akan menurun yang berdampak pada penurunan Apoptosis dan meningkatkan proliferasi (Fulda, 2009). Selain itu mutasi *p53* akan meningkatkan COX-2 sehingga terjadi peningkatan proliferasi. Adanya mutasi *p53* menurunkan kinerja dari cyclin-A maupun cyclin-E yang akan menghambat siklus sel. Siklus Sel juga dipengaruhi oleh protein

Rb yang pada sel kanker jika mengalami peningkatan ekspresi akan meningkatkan kinerja reseptor tirosin kinase (RTK) sehingga terjadi peningkatan proliferasi. Pemberian ekstrak teripang mampu menekan ekspresi COX-2 karena memiliki kandungan bioaktif seperti Triterpene Glycoside (Han dkk., 2013) dan juga kandungan ethyl acetate yang mempunyai efek menekan protein bcl-2 yang nantinya meningkatkan aktifitas caspase-3 (Wang dkk., 2017)

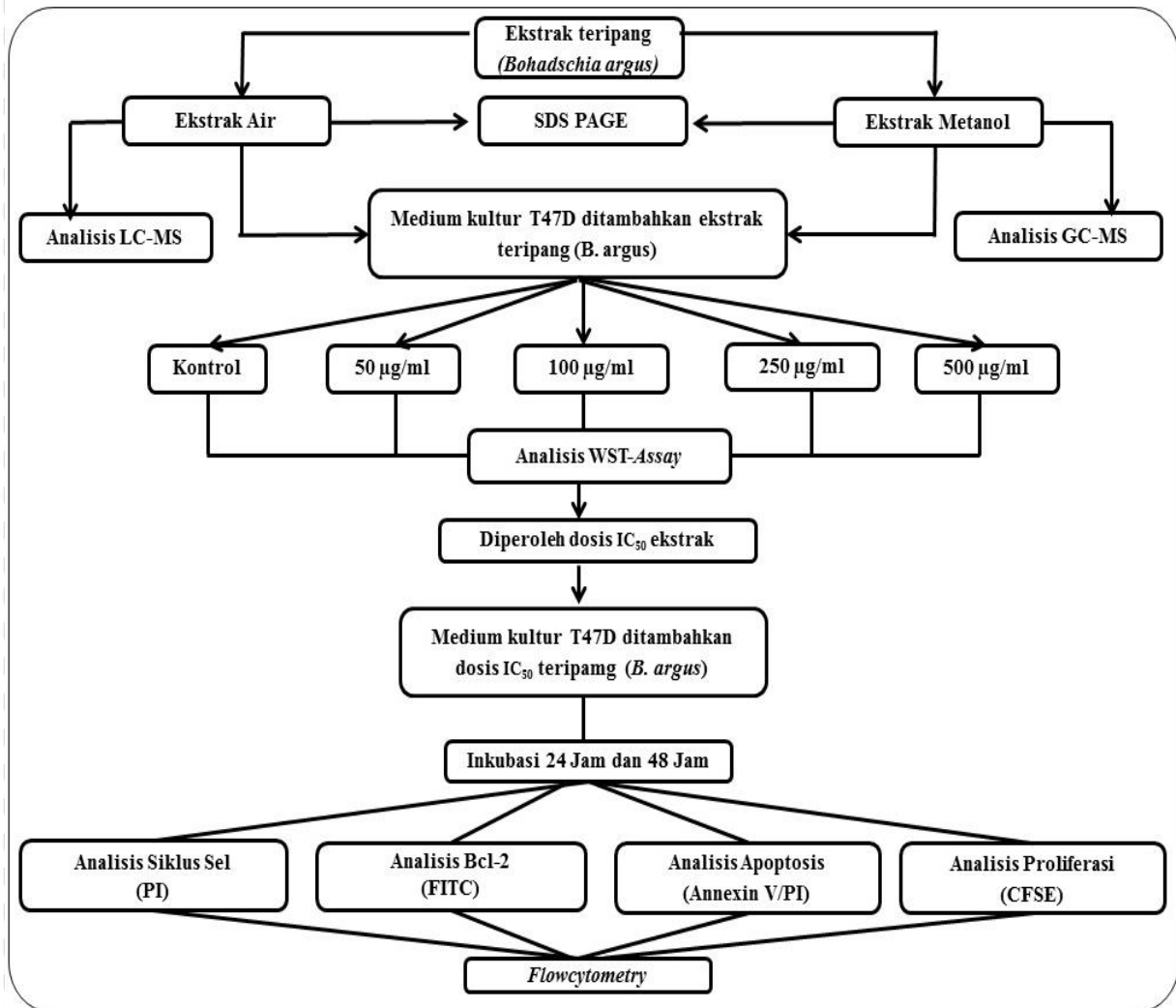


BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2017 - Januari 2018. Analisis aktivitas ekstrak teripang sebagai anti kanker dilakukan secara *in vitro* pada Laboratorium Fisiologi dan Struktur Perkembahangan Hewan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

3.2 Kerangka Operasional



Gambar 5. Kerangka operasional penelitian

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas anti kanker dari ekstrak teripang *B. argus* terhadap sel kanker payudara T47D. Sel Kanker diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam setelah diberi perlakuan. Penelitian ini menggunakan RAL (Rancangan acak lengkap) dengan 4 kelompok perlakuan yaitu:

- 1) K(-) : Kontrol yang tidak diberi ekstrak teripang
- 2) Cis : Kontrol cisplatin tanpa perlakuan ekstrak teripang
- 3) Air : Perlakuan Ekstrak Air Teripang
- 4) Met : Perlakuan ekstrak metanol teripang

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Ekstraksi Teripang (*B. argus*)

Ekstraksi teripang dilakukan menggunakan dua jenis ekstraksi yaitu ekstraksi metanol dan ekstraksi air. Sampel teripang yang digunakan dalam penelitian ini adalah teripang jenis *B. argus* diambil dari perairan Desa Kamal Kabupaten Seram Bagian Barat Provinsi Maluku.

3.4.1.1 Ekstraksi Menggunakan Metanol

Sampel teripang ditimbang sebanyak 25 gr kemudian digerus dan diletakan pada gelas beker. Selanjutnya dituangkan metanol ± 500 ml dan didiamkan ± 48 jam pada suhu ruang (sambil sesekali diaduk). Selanjutnya sampel disaring menggunakan kain saring dan kertas saring. Dievaporasi (Rotary evaporatore) $T = 60^{\circ}\text{C}$ sehingga didapatkan hasil ekstraksi berupa bubuk dan disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan untuk analisis selanjutnya.

3.4.1.2 Ekstraksi Menggunakan Air

Sampel teripang ditimbang sebanyak 25 gr kemudian digerus dan diletakan pada gelas beker. Selanjutnya dituangkan air panas ± 500 mL dan didiamkan ± 2 jam pada suhu 80°C (sambil sesekali diaduk). Selanjutnya sampel disaring menggunakan kain saring dan kertas saring. Sampel di *freezdrying* sehingga didapatkan hasil ekstraksi.

3.5 Analisis Komponen Kimia Ekstrak Teripang

3.5.1 SDS PAGE

Analisis profil protein ekstrak teripang dilakukan dengan menggunakan SDS PAGE dengan konsentrasi 10% untuk memisahkan protein yang bermuatan berdasarkan berat molekulnya, dibuat separating gel (H_2O 1900 μ l, Tris dengan pH 8,8 1300 μ l, 30% acryl-bisacrylamide mix 1700 μ l, 50 μ l SDS 10%, APS 10% 50 μ l, dan 2 μ l TEMED). Setiap penambahan dilakukan pipetting agar larutan homogen. Separating gel dimasukkan dalam cetakan dan ditambahkan aquades pada bagian atas. Setelah itu, ditunggu hingga mengeras dan setelah mengeras, aquades dibuang. Selanjutnya dibuat stacking gel (H_2O 1900 μ l, Tris dengan pH 8,8 1300 μ l, 30% acryl-bisacrylamide mix 1700 μ l, 50 μ l SDS 10%, APS 10% 50 μ l, dan 2 μ l TEMED) dan dimasukkan ke dalam sumuran pada bagian atas separating gel dan pasang sisiran. Ditunggu hingga mengeras dan setelah mengeras, cetakan dibuka serta dipindahkan dalam *chamber*. Dimasukkan sampel ekstraksi kemudian dinyalakan power supply pada 200V. Setelah selesai, gel dibuka dan direndam dengan air selama 5 menit dan dilanjutkan dengan merendam pada *coomassie dye* selama 1 jam dan digoyang perlahan. Setelah itu, dipindahkan pada larutan destaining selama semalam kemudian diamati (Fanglian, 2011).

3.5.2 GC-MS dan LC-MS

Analisis komponen kimia ekstrak teripang menggunakan GC-MS dan LC-MS. Ekstrak dianalisis dengan menggunakan GC-MS, Sampel sebanyak 1 μ l diinjeksikan ke GC-MS yang dioperasikan menggunakan kolom diameter 10 mL x 0,25 mm dengan temperatur oven diprogram antara 60-220°C dengan laju kenaikan temperatur 6°C /menit, gas pembawa Helium bertekanan 15 kPa, total laju 30 mL/menit. Sedangkan Ekstrak air dianalisis dengan menggunakan LC-MS, Sampel sebanyak 1 μ l diinjeksikan ke LC-MS dioperasikan menggunakan kolom diameter 2 mm x 150 mm dengan temperatur kolom 35°C. Laju aliran 0.5 mL/menit.

3.6 Kultur Sel T47D

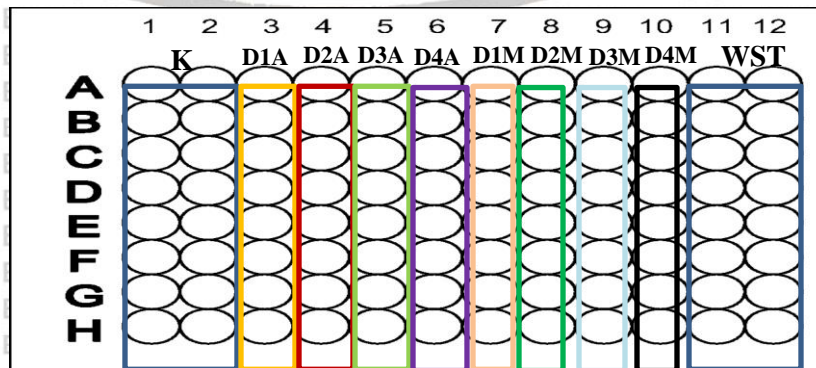
Sel T47D dikultur pada medium RPMI (ThermoFisher Cat. No. 1187503) komplet (nutrisi 10% fetal bovine serum (FBS) yang mengandung 1% antibiotik (Penisilin-

Streptomisin). Sel diinkubasi pada suhu 37°C kadar CO₂ 5%. Pertumbuhan sel diamati 24 jam sekali dan diikuti dengan pergantian media RPMI. Sel kultur yang telah diinkubasi dengan konfluensi sel 40% sampai 60% siap dipanen dengan cara tripsinasi untuk analisis selanjutnya.

3.6.1 IC₅₀ Ekstrak Teripang Pada Sel T47D

Langkah awal yang dilakukan untuk menentukan dosis ekstrak teripang yang akan digunakan dalam penelitian yaitu dengan mencari nilai IC₅₀. Hal ini dilakukan dengan cara menanam sel T47D pada 96 well plate dimana setiap well ditanam 5000 sel pada medium kultur 100 µl (Gambar 6). Plate yang telah berisi sel diinkubasi pada suhu 37°C kadar CO₂ 5% selama 24 jam. Setelah sel tumbuh konfluen sel kultur diberi perlakuan dengan dosis sebagai berikut :

- K : Kontrol tanpa perlakuan
- WST : Kontrol Medium WST
- D1A : Perlakuan Ekstrak Air Teripang 50 µg/ml
- D2A : Perlakuan Ekstrak Air Teripang 100 µg/ml
- D3A : Perlakuan Ekstrak Air Teripang 250 µg/ml
- D4A : Perlakuan Ekstrak Air Teripang 500 µg/ml
- D1M : Perlakuan ekstrak metanol teripang 50 µg/ml
- D2M : Perlakuan ekstrak metanol teripang 100 µg/ml
- D3M : Perlakuan ekstrak metanol teripang 250 µg/ml
- D4M : Perlakuan ekstrak metanol teripang 500 µg/ml



Gambar 6. Gambaran 96 well plate

Selanjutnya sel diinkubasi pada suhu 37°C kadar CO₂ 5% selama 24 jam. Analisis viabilitas sel untuk menentukan IC₅₀ dilakukan dengan cara medium kultur diganti dengan RPMI komplit sebanyak 100 µl kemudian ditambahkan 50 µl reagen WST-1 (Roche Cat. No. 05015944001) dan diinkubasi selama 3 jam. Setelah diinkubasi dilakukan analisis spektrofotometri dengan menggunakan alat elisa Reader ELX 808 pada panjang gelombang 450 nm dan dianalisis menggunakan metode regresi linear. Presentase viabilitas sel ditunjukkan pada persamaan sebagai berikut :

$$\% \text{ Viabilitas} = \frac{\text{Absorbansi sampel} - \text{Absorbansi medium}}{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi medium}} \times 100 \%$$

3.7 Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Teripang

Pada tahapan uji aktivitas antikanker digunakan perlakuan ekstrak teripang untuk melihat Apoptosis, siklus sel, proliferasi dan Bcl-2. Dengan perlakuan Kontrol, Cisplatin Ekstrak metanol dan ekstrak air. Perlakuan ekstrak teripang baik pada ekstrak metanol maupun ekstrak air digunakan dosis IC₅₀ yang didapatkan dari uji viabilitas sel.

- 1) K(-) : Kontrol yang tidak diberi ekstrak teripang
- 2) Cis : Kontrol cisplatin tanpa perlakuan ekstrak teripang
- 3) Air : Perlakuan Ekstrak Air Teripang dengan dosis IC₅₀
- 4) Met : Perlakuan ekstrak metanol teripang dengan dosis IC₅₀

3.7.1 Analisis Apoptosis Sel

Analisis Apoptosis sel dilakukan dengan menggunakan pewarnaan *Annexin V-PI* (BioLegend Cat. No. 640906). Sel kultur T47D ditanam pada 24 *well plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C kadar CO₂ 5% kemudian diberi perlakuan ekstrak teripang. Setelah diberi perlakuan selama 24 jam dan 48 jam sel dipanen dan disentrifugasi 2500 rpm selama 5 menit suhu 10°C. Kemudian *supernatant* dibuang dan *pellet* diresuspensi dengan *Annexin V-PI* dan diinkubasi pada pada kondisi gelap selama 20 menit. Setelah itu suspensi sel ditambahkan 500 µl PBS dan dimasukkan kedalam kuvet FCM untuk dapat dilakukan analisis dengan *flow cytometry* (BioLegend Protocol).

3.7.2 Analisis Siklus Sel

Analisis siklus sel dilakukan dengan menggunakan PI (BioLegend Cat. No. 421301), sel kultur T47D ditanam pada 24 *well plate* dan ditreatment selama 24 jam dan 48 jam selanjutnya dipanen dengan cara tripsinasi. Sel disentrifugasi 2500 rpm selama 5 menit suhu 10°C. Selanjutnya sel difiksasi dengan 150 µl etanol dingin 70% selama 30 menit dalam kondisi gelap dan disentrifugasi kembali pada 2500 rpm selama 5 menit suhu 10°C. Kemudian ditambahkan 500 µl reagen PI dan diinkubasi pada kondisi gelap selama 30 menit dan selanjutnya ditambahkan 500 µl PBS untuk dapat dilakukan analisis dengan *flow cytometry* (BioLegend Protocol)

3.7.3 Analisis Proliferasi Sel

Analisis proliferasi sel dilakukan dengan cara menyiapkan sel yang telah dipanen dalam tabung propilen. Selanjutnya ditambahkan 500 µl PBS dan ditambahkan 5 µl CFSE (BioLegend Cat. No. 79898). Selanjutnya sel diinkubasi selama 20 menit dalam kondisi gelap, kemudian ditambahkan dengan 500 µl PBS dan disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm pada suhu 10°C selama 5 menit. Kemudian supernatan dibuang dan pellet diresuspensi dengan 1200 µl medium komplet dan sel diberi perlakuan ekstrak teripang. Masing-masing media yang telah berisi sel berlabel CFSE dibagikan kedalam 24 *well plate* sebanyak 1 ml pada masing-masing *well* dan diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam pada suhu 37°C kadar CO₂ 5%. Selanjutnya sel dipanen dan ditambahkan dengan 400 µl PBS dan dilakukan analisis *flow cytometry* (BioLegend Protocol).

3.7.4 Analisis Bcl-2

Analisis Bcl-2 dilakukan dengan menggunakan pewarnaan *FITC_Bcl-2* (BioLegend Cat. No. 633503) Sel dipanen dan ditanam pada 24 *well plate* kemudian di *treatment* dengan dosis ekstrak teripang dan diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam dengan suhu 37°C kadar CO₂ 5%. Selanjutnya sel kultur dipanen dengan cara tripsinasi dan disentrifugasi 2500 rpm selama 5 menit suhu 10°C. Kemudian *supernatant* dibuang dan *pellet* diresuspensi dengan *FITC_Bcl-2* dan diinkubasi pada kondisi gelap selama 30 menit. Setelah itu suspensi sel ditambahkan 500 µl PBS dan dimasukkan kedalam kuvet FCM untuk analisis dengan *flowcytometry* (BioLegend Protocol).

3.7.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *one way* ANOVA dan dilanjutkan dengan uji *Tukey* apabila terjadi perbedaan yang nyata.



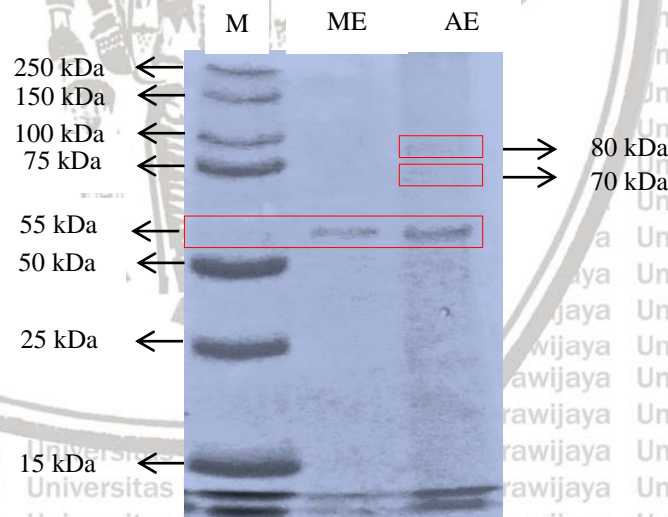
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Komponen Kimia Ekstrak Teripang

Pada penelitian ini digunakan dua cara ekstraksi yaitu ekstraksi menggunakan pelarut metanol dan air. Masing-masing ekstrak dianalisis profil proteinnya menggunakan SDS-PAGE. Selain itu juga dianalisis kimianya, Ekstrak Metanol Teripang di uji komponen kimianya menggunakan GC-MS sedangkan Ekstrak Air Teripang menggunakan LC-MS.

4.1.1 Profil Protein Ekstrak Teripang Menggunakan SDS-PAGE

Hasil analisis menggunakan SDS-PAGE menunjukkan bahwa pada ekstrak metanol teripang ditemukan satu pita protein dengan berat molekul 55 kDa sedangkan pada ekstrak air teripang terdapat tiga pita protein dengan berat molekul 55 kDa, 70 kDa, dan 80 kDa (Gambar 7).



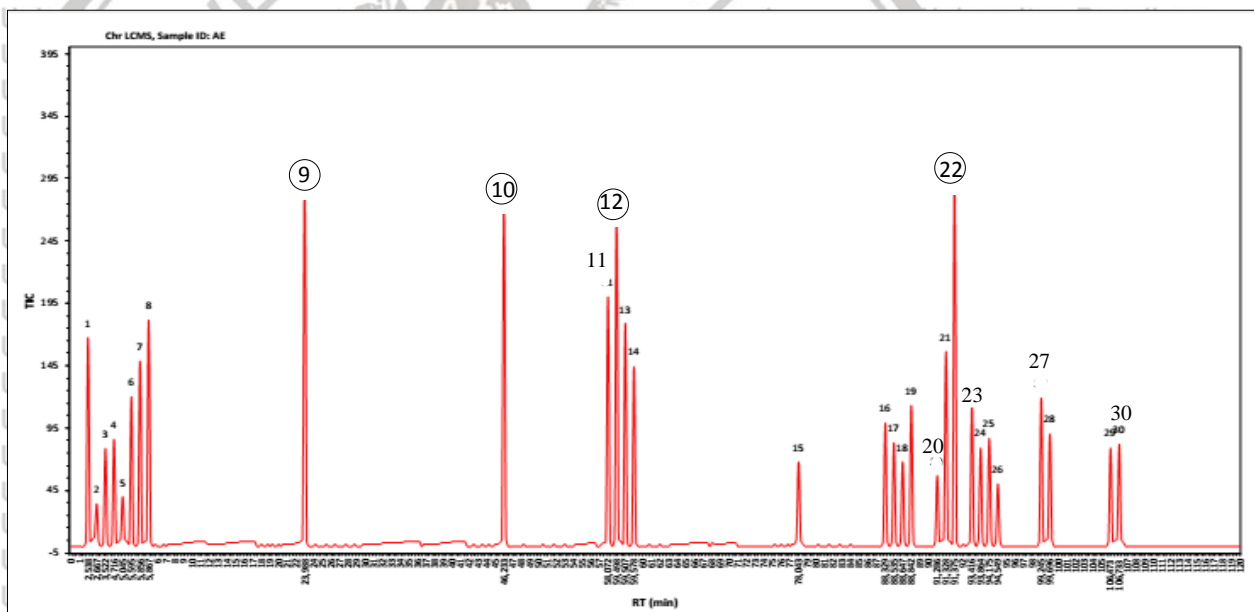
Gambar 7. Profil Protein Ekstrak Teripang. Keterangan, M : Marker, ME : Ekstrak metanol, AE : Ekstrak air

Ekstrak teripang *B. argus* yang digunakan pada penelitian ini berasal dari keseluruhan tubuh teripang sehingga secara kasar mengandung campuran protein dan makromolekul lain yang kompleks. Glikoprotein merupakan protein yang memiliki bobot molekul antara 10 – 80 kDa (Baumgartner, 2010). Glikoprotein berada pada lipid bilayer membran sel dan juga sering

merupakan protein membran yang penting karena berperan dalam interaksi sel-sel (Rudd dkk., 2001). Selain itu juga glikoprotein telah lama diakui memainkan peran mendasar dalam banyak proses fisiologis dan patologis, terutama dalam kanker dan perkembangannya (Li dkk., 2012).

4.1.2 Analisis Komponen Kimia Ekstrak Air Teripang *B. argus*

Hasil Analisis komponen kimia ekstrak air teripang *B. argus* menggunakan LC-MS disajikan pada gambar 8 dan tabel 1. Hasil kromatogram menunjukkan bahwa pada Ekstrak Air Teripang terdapat tiga puluh senyawa teridentifikasi. Komposisi senyawa tertinggi berada pada puncak no 9 yaitu jenis senyawa Chondroitin sulfate. Jenis-jenis senyawa yang berpotensi sebagai antikanker dapat dilihat pada tabel 1.



Gambar 8. Hasil Analisis LC-MS Ekstrak Air Teripang *B. argus*.

Berdasarkan tabel 1 dan hasil spektra pada gambar 8, ekstrak air teripang *B. argus* memiliki senyawa chondroitin sulfate sebanyak 7,74139 %. Senyawa ini berperan sebagai anti metastasis dengan menekan proliferasi sel kanker, menghambat adhesi, migrasi, dan invasi sel kanker (He dkk., 2014). Selain itu juga senyawa ini terkarakterisasi kedalam golongan senyawa glikosaminoglikan (Silver dkk., 2014).

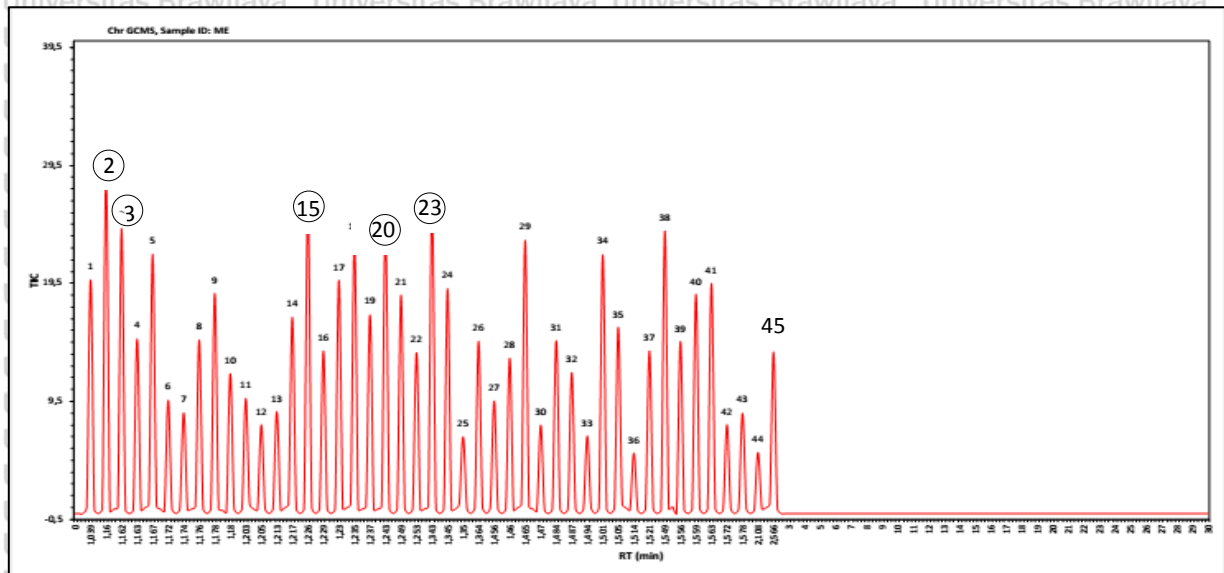
Tabel 1. Komponen kimia ekstrak air teripang yang berpotensi sebagai anti kanker

Puncak Senyawa	Nama Senyawa	Curve Area	Komposisi Senyawa (%)	Berat Molekul (m/z)	Golongan Senyawa
9	Chondroitin sulfat	298,92282	7,74139	463,3630	Glikosaminoglikan
10	Leucospilotaside C	276,55935	7,16223	714,8640	Triterpen glycoside
11	Scabraside	200,23484	5,18561	844,7720	Triterpen glycoside
12	Holothurin B	265,29944	6,87063	861,0060	Triterpen glycoside
20	Intercedenside A	56,92643	1,47426	1176,3045	Triterpen glycoside
22	Holothurin A	297,06936	7,69339	1199,3150	Triterpen glycoside
23	Echinoside A	112,41101	2,91118	1185,3320	Triterpen glycoside
27	Fronodoside A	119,09795	3,08435	1313,4590	Triterpen glycoside

Glykosaminoglikan merupakan golongan senyawa yang berasal dari ekstrak teripang yang berperan sebagai antitrombosis dan antikoagulasi yaitu keadaan dimana terhambatnya aliran darah dalam pembuluh darah akibat terjadi proses koagulasi (Mulloy dkk., 2016). Senyawa dengan puncak tertinggi lainnya yaitu puncak 10, puncak 12 dan puncak 22 masing-masing teridentifikasi jenis senyawanya yaitu Leucospilotaside C, Holothurin A dan Holothurin B yang ketiganya terkarakterisasi kedalam golongan senyawa triterpen glycoside. Triterpen Glycoside adalah jenis senyawa utama dan paling melimpah yang terdapat pada teripang (Li dkk., 2013). Triterpen Glycoside merupakan senyawa metabolit sekunder dari teripang yang sangat berperan dalam sel kanker karena dapat menginduksi apoptosis sel kanker melalui aktivasi caspase, anti proliferasi dan menahan siklus sel pada fase S atau G2/M (Aminin dkk., 2015). Selain ketiga senyawa tersebut terdapat senyawa lain yang digolongkan dalam triterpen glycoside yang berperan sebagai antikanker jenis senyawa tersebut yaitu Scabraside (Assawasuparek dkk., 2016), Intercedenside A (Zou dkk., 2003), Echinoside A (Chen dkk., 2017) dan Fronodoside A (Adrian dkk., 2018).

4.1.3 Analisis Komponen Kimia Ekstrak Metanol Teripang *B. argus*.

Hasil analisis GC-MS menunjukkan bahwa sebanyak empat puluh lima senyawa teridentifikasi dengan lima puncak senyawa tertinggi yang terdapat pada ekstrak metanol *B. argus* (Gambar 9). Jenis-jenis senyawa tersebut dapat dilihat pada tabel 2.



Gambar 9. Hasil Analisis GC-MS Ekstrak Metanol Teripang *B. argus*.

Tabel 2. Komponen Kimia Ekstrak Metanol Teripang

Puncak Senyawa	Nama Senyawa	Curve Area	Komposisi Senyawa (%)	Berat Molekul (m/z)	Golongan Senyawa
2	2 Methyl furan	28,71732	4,14510	82,1020	Volatil
3	Ethyl acetate	24,17628	3,48964	88,1060	Volatil
15	Ethyl propionate	25,81992	3,72689	102,1330	Volatil
20	Ethyl crotonate	24,18107	3,49033	114,1440	Volatil
23	Ethyl isobutyrate	26,16288	3,77639	116,1600	Volatil

Berdasarkan tabel 2 dan hasil spektra pada gambar 9, ekstrak metanol teripang *B. argus* memiliki senyawa 2 Methyl furan 4,14510%. Senyawa ini termasuk kedalam komponen senyawa volatil, senyawa volatil merupakan senyawa yang mudah menguap. Senyawa furan merupakan senyawa yang berperan dalam peroksidasi lipid (Zhang dkk., 2018).

Senyawa seperti ethyl crotonate yang berperan sebagai anti jamur, ethyl propionate berperan dalam menurunkan kolesterol (Bergman dkk., 1994). Senyawa yang memiliki kemampuan sebagai anti kanker dibandingkan dengan senyawa komponen tertinggi lainnya yaitu ethyl acetate merupakan. Ethyl acetate pada sel kultur kanker dapat menginduksi Apoptosis karena menekan protein anti-Apoptosis Bcl-2 (Tripathy dkk., 2015).

4.2 Uji IC₅₀ Sel Kanker Payudara T47D

Uji IC₅₀ Sel Kanker T47D sering digunakan untuk menentukan sitotoksisitas maupun efisiensi dari suatu bahan apakah bersifat toksik atau tidak. Sitotoksisitas ekstrak teripang *B. argus* terhadap Sel Kanker T47D dianalisis secara *in vitro* menggunakan *WST-1 assay* dengan melihat viabilitas sel. Nilai sitotoksik dapat dilihat dengan konsentrasi IC₅₀ (Tabel 3).

Tabel 3. Presentase viabilitas sel T47D setelah perlakuan

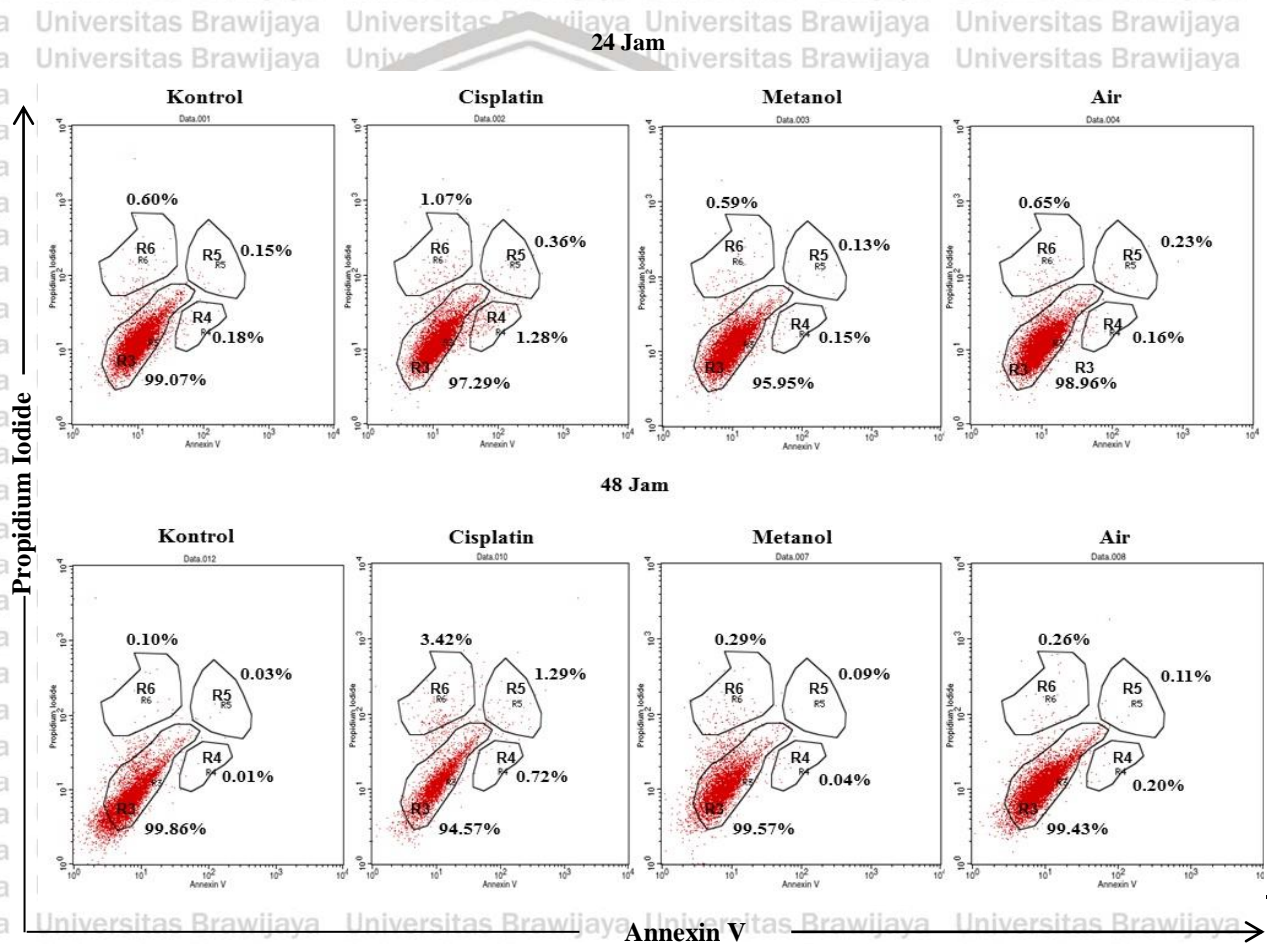
Ekstrak	50 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	IC ₅₀
Air	80.60%	83.80%	72.44%	40.61%	480.4 µg/mL
Metanol	79.34%	71.75%	13.15%	6.86%	146 µg/mL

Berdasarkan hasil penelitian nilai IC₅₀ Ekstrak Air yaitu 480.4 µg/mL sedangkan nilai IC₅₀ untuk Ekstrak Metanol yaitu 146 µg/mL. Nilai IC₅₀ yang diperoleh digunakan sebagai dosis optimal untuk pengujian. Nilai IC₅₀ Ekstrak Air dan Metanol merupakan Senyawa yang mempunyai nilai sitotoksik rendah. Nilai aktivitas sitotoksik tinggi apabila IC₅₀ ≤ 50µg sedangkan nilai sitotoksik rendah IC₅₀ 51-100µg (Manosroi dkk., 2006).

4.3 Uji Aktivitas Antikanker Teripang Terhadap Induksi Apoptosis Pada Sel Kanker T47D

Pengaruh ekstrak teripang *B. argus* terhadap induksi apoptosis dianalisis menggunakan *Flow cytometri* dengan pewarnaan *Annexin V-PI*. Kedua pewarnaan ini sering digunakan untuk mengetahui apoptosis suatu sel karena *Annexin V* merupakan molekul yang dapat berikatan dengan reseptor pada membran sel, sedangkan PI merupakan molekul yang dapat berikatan dengan inti sel. Pada tahap apoptosis terjadi perubahan pada permukaan sel sehingga dalam pewarnaan terbagi dalam dua bagian yaitu apoptosis awal dan apoptosis akhir. Apoptosis awal diketahui pada saat sel menerima signal maka *phosphatidylserine* (PS) yang berada dibagian dalam membran plasma menjadi berada dibagian luar membran plasma sehingga melingkupi seluruh bagian permukaan sel dan berikatan dengan *Annexin V* sehingga pada hasil *flow cytometri*, sel yang terwarnai akan memiliki *Annexin V⁺/PI* berada pada Apoptosis awal dan terletak pada kuadran R4. Sedangkan sel yang mengalami apoptosis akhir membran sel terdegradasi sehingga PI dapat langsung mewarnai inti sel sehingga sel yang

terwarnai akan memiliki $Annexin-V^+/PI^+$ dan terletak pada kuadran R5. Berbeda dengan sel yang mengalami Apoptosis, nekrosis merupakan kematian sel yang tidak terprogram sehingga pada saat terjadinya nekrosis sel pecah sehingga $Annexin-V$ tidak berikatan dengan PS dan PI akan langsung berikatan dengan inti sel dan terletak pada kuadran R6 sehingga sel yang terwarnai akan memiliki $Annexin-V/PI^+$. Pada kuadran LL merupakan sel normal, sel yang terwarnai akan memiliki $Annexin-V/PI$ (Crowley., 2016)



Gambar 10. Hasil *Flow Cytometri* Analisis Pengaruh Ekstrak Teripang *B. argus* Terhadap Induksi Apoptosis Pada Sel Kanker T47D

Berdasarkan hasil analisis menggunakan *Flow Cytometri* dapat dilihat presentase sel yang mengalami apoptosis pada masing-masing perlakuan (Gambar 10) dan Tabel 4.

Berdasarkan hasil analisis pengaruh ekstrak teripang *B. argus* terhadap induksi apoptosis sel kanker T47D, perlakuan dengan cisplatin menunjukkan pengaruh yang lebih baik dalam

menginduksi apoptosis dengan presentase yang lebih besar dari kontrol maupun dengan ekstrak air dan metanol. Perlakuan menggunakan cisplatin pada inkubasi 24 jam menunjukkan bahwa presentase pada apoptosis awal 1.28% sedangkan pada kontrol 0.18%, presentase pada apoptosis akhir 0.36% sedangkan kontrol 0.15%. Perlakuan menggunakan cisplatin pada inkubasi 48 jam menunjukkan presentase apoptosis awal 0.72% sedangkan kontrol 0.01%, presentase pada apoptosis akhir 1.29% sedangkan kontrol 0.03%.

Tabel 4. Presentase jumlah sel apoptosis pada sel kanker T47D setelah perlakuan.

Perlakuan	Lama inkubasi	Presentase Sel (%)			
		Sel Kanker (R3)	Apoptosis Awal (R4)	Apoptosis Akhir (R5)	Nekrosis (R6)
Kontrol		99.07%	0.18%	0.15%	0.60%
Cisplatin	24 Jam	97.29 %	1.28%	0.36%	1.07%
Metanol		95.95%	0.15%	0.13%	0.59%
Air		98.96%	0.16%	0.23%	0.65%
Kontrol		99.86%	0.01%	0.03%	0.10%
Cisplatin	48 Jam	94.57%	0.72%	1.29%	3.42%
Metanol		99.57%	0.04%	0.09%	0.29%
Air		99.43%	0.20%	0.11%	0.26%

Pada inkubasi 24 jam presentase apoptosis awal pada ekstrak air 0.16% dan untuk ekstrak metanol 0.15% sedangkan presentase apoptosis akhir pada ekstrak air 0.23% dan ekstrak metanol 0.13%. Pada inkubasi 48 jam presentase apoptosis awal pada ekstrak air 0.20% dan untuk ekstrak metanol 0.04% sedangkan presentase apoptosis akhir pada ekstrak air 0.11% dan untuk ekstrak metanol 0.10%.

Ekstrak metanol teripang memiliki kandungan seperti ethyl acetate yang dapat menginduksi apoptosis (Tripathy dkk., 2015). Berdasarkan analisis menggunakan GC-MS menunjukkan bahwa komposisi senyawa yang berperan sebagai antikanker pada ekstrak metanol tidak sebanyak senyawa pada ekstrak air. Berdasarkan hasil uji LC-MS, pada ekstrak air memiliki kandungan senyawa Triterpen glycoside yang merupakan jenis senyawa utama dan paling melimpah pada teripang (Li dkk., 2013). Jenis senyawa pada ekstrak air teripang seperti Scabraside, Echinoid A dan Frondoside A memiliki potensi sebagai anti kanker. Senyawa Scabraside dapat meregulasi gen caspase-3 dan menurunkan regulasi gen

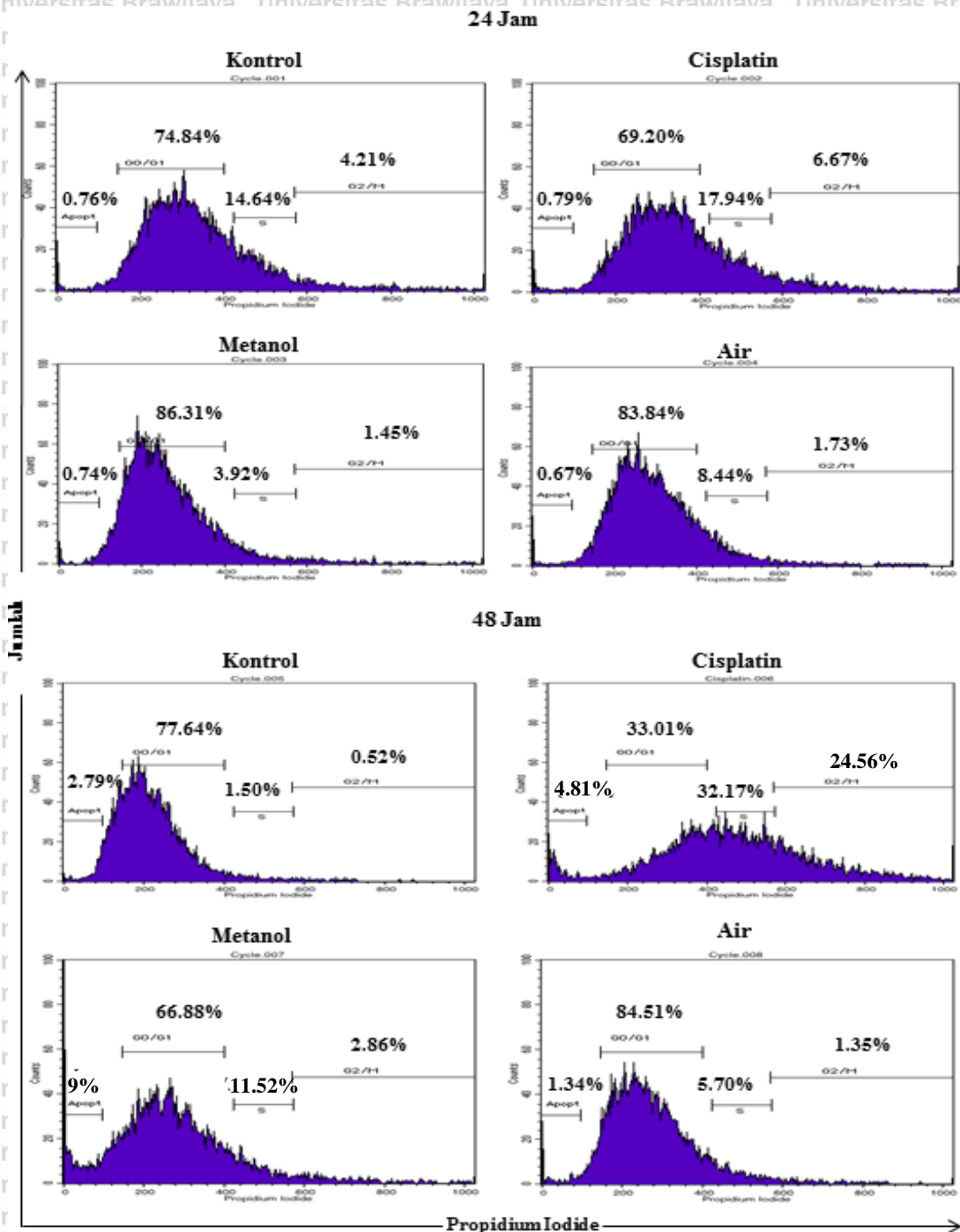
antiapoptosis seperti Bcl-2 (Assawasuparek dkk., 2016), Echinocide A mampu menginduksi apoptosis dengan menghambat pengikatan topoisomerase 2 α ke DNA (Li dkk., 2010) dan Frondoside A mampu menginduksi apoptosis sehingga dapat menghambat pertumbuhan sel kanker (Adrian dkk., 2018). Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak teripang berpotensi untuk menginduksi apoptosis namun secara keseluruhan presentase sel yang mengalami apoptosis sangat sedikit sehingga perlu dilakukan analisis lebih lanjut.

4.4 Uji Aktivitas Antikanker Teripang Terhadap Siklus Sel Kanker T47D

Berdasarkan hasil analisis menggunakan *Flow cytometri* dapat dilihat pengaruh ekstrak teripang terhadap siklus sel kanker T47D pada gambar 11 dan tabel 5. Berdasarkan hasil pengaruh Ekstrak Teripang *B. argus* terhadap Siklus Sel Kanker T47D dapat dilihat Pada inkubasi 24 jam ekstrak metanol, presentase sel pada tahap G0/G1 yaitu 86.31% sedangkan ekstrak air memiliki presentase sel 83.84%. Pada inkubasi 48 jam ekstrak metanol memiliki presentase sel 66.88% dan ekstrak air memiliki presentase sel 84.51%. Pada tahap G0/G1 memiliki presentase yang besar dikarenakan pada tahap ini merupakan pertumbuhan awal sel. Pada tahap ini disintesis berbagai enzim yang nantinya diperlukan pada tahap berikutnya untuk sintesis DNA (Mader.,2011).

Kandungan bioaktif pada teripang diduga dapat menghambat *cyclin*. Penghambatan *cyclin* dapat mengakibatkan transisi pada fase G1 menuju fase S akan terhambat sehingga proses fosforilasi Protein Retinoblastoma (pRb) akan terhenti yang mengakibatkan proses transkripsi yang dipacu oleh E2F tidak aktif dan *Restriction point* (R) yang berada pada batas *checkpoint* fase G1/S tidak terlampaui (Satyanayara.,2009). Senyawa pada ekstrak teripang seperti Echinocide A mampu menahan Siklus Sel pada tahap G0/G1 sehingga sangat berguna untuk menekan pertumbuhan sel kanker dikarenakan memiliki kemampuan untuk meningkatkan gen p21, menurunkan *cyclin* D dan juga menurunkan ekspresi Bcl-2 sehingga dapat meningkatkan cytochrome c dan mengaktifkan caspase-3 untuk apoptosis sel (Zhao dkk., 2012). Ekstrak teripang *B. argus* mampu menghambat transisi sel dari G0/G1 menuju fase sintesis dengan menginduksi sel menuju apoptosis, presentase jumlah sel yang mengalami apoptosis paling tinggi yaitu pada perlakuan menggunakan ekstrak metanol teripang, hal ini dikarenakan kandungan senyawa ethyl acetate ekstrak metanol yang dapat menginduksi

apoptosis (Tripathy dkk., 2015) selain itu senyawa ethyl acetate yang memiliki tingkat toksik yang tinggi dan spesifik bekerja pada sel kanker (Padumadasa dkk., 2016).



Gambar 11. Hasil *Flow cytometri* Analisis Pengaruh Ekstrak Teripang *B. argus* Terhadap Siklus Sel Kanker Payudara T47D

Tabel 5. Presentase Jumlah Sel Pada Siklus Sel Kanker T47D Setelah Perlakuan

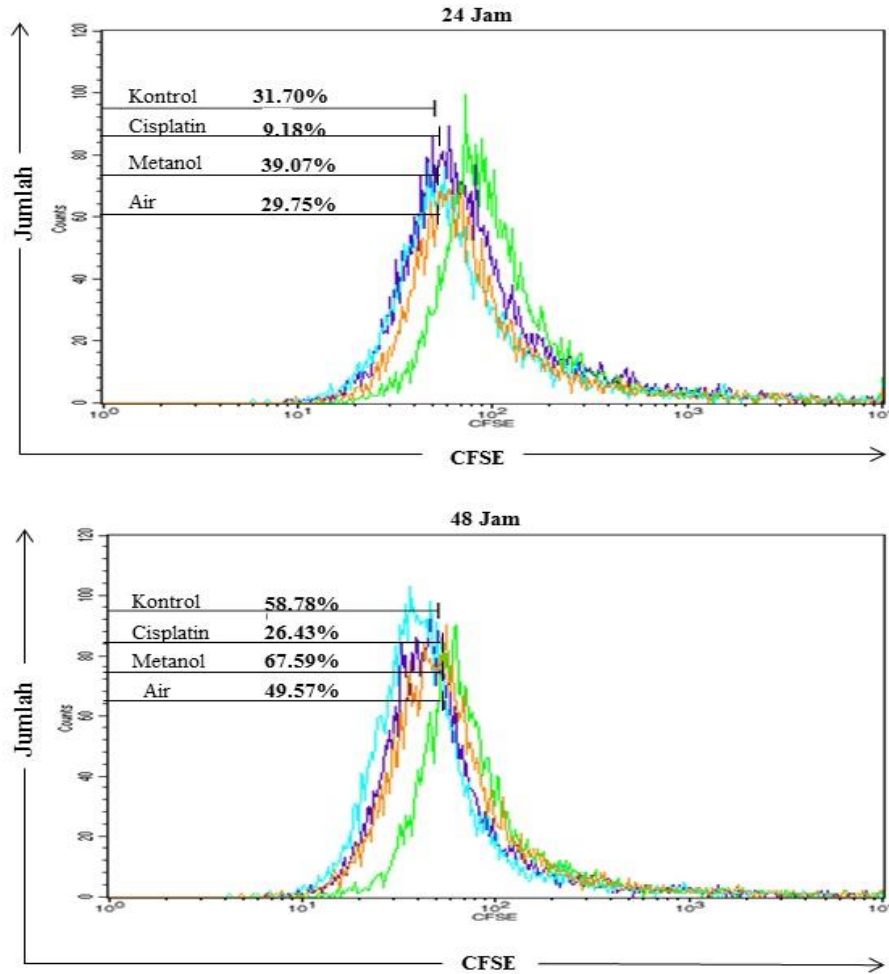
Perlakuan	Lama Inkubasi	Presentase Sel (%)			
		Apoptosis	G0/G1	S	G2/M
Kontrol		0.76%	74.84%	14.64%	4.21%
Cisplatin	24 Jam	0.79%	69.20%	17.94%	6.67%
Metanol		0.74%	86.31%	3.92%	1.45%
Air		0.67%	83.84%	8.44%	1.73%
Kontrol		2.79%	77.64%	1.50%	0.52%
Cisplatin	48 Jam	3.81 %	33.01%	32.17%	25.26%
Metanol		9 %	66.88%	11.52%	2.86%
Air		1.34%	84.51%	5.70%	1.35%

Berdasarkan hasil *Flow cytometry* menunjukkan bahwa pada fase G2/M, sebagian sel sudah memasuki fase Mitosis. Hal ini dapat dilihat dengan konsentrasi PI yang mengikat DNA dengan jumlah yang besar sedangkan pada tahap apoptosis perlakuan dengan Ekstrak Metanol memiliki presentase tertinggi. PI tidak hanya dapat mengikat DNA tetapi juga bisa mengikat RNA, sehingga sangat mempengaruhi penilaian presentase pada apoptosis (Rieger dkk.,2010).

4.5 Uji Aktivitas Antikanker Teripang Terhadap Proliferasi Sel Kanker T47D

Hasil analisis menggunakan Flowcytometri pengaruh ekstrak teripang *B. argus* terhadap proliferasi sel kanker payudara T47D dapat dilihat pada Gambar 12. dan Tabel 6.

Berdasarkan hasil analisis pengaruh ekstrak teripang *B. argus* terhadap proliferasi sel kanker T47D, maka perlakuan dengan cisplatin menunjukkan presentase jumlah sel yang mengalami proliferasi lebih rendah dari kontrol. Pada inkubasi 24 jam presentase jumlah sel yaitu 9.81% sedangkan kontrol 31.07% dan pada inkubasi 48 jam presentase jumlah sel yaitu 26.43% sedangkan kontrol 58.78%. Ekstrak air teripang juga demikian memiliki presentase jumlah sel yang rendah dibanding kontrol yaitu 29.75% pada inkubasi 24 jam sedangkan pada inkubasi 48 jam yaitu 49.57%. Berbeda dengan perlakuan cisplatin dan ekstrak air, ekstrak metanol memiliki presentase jumlah sel yang lebih tinggi dari kontrol yaitu 39.07% pada inkubasi 24 jam dan 49.57% pada inkubasi 48 jam.



Gambar 12. Hasil *Flow cytometry* pengaruh ekstrak *B. argus* terhadap Proliferasi sel kanker T47D. Keterangan — = Kontrol (tanpa perlakuan), — = Cisplatin, — = Ekstrak metanol teripang, — = Ekstrak Air Teripang.

Hasil analisis proliferasi sel kanker T47D menunjukkan bahwa perlakuan menggunakan cisplatin memiliki efek yang baik dalam menghambat proliferasi sel kanker. Hal ini dikarenakan cisplatin merupakan obat kemoterapi yang sudah terbukti penggunaannya dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Ekstrak Teripang mampu menghambat proliferasi yang ditunjukkan dengan penurunan presentase jumlah sel yang mengalami proliferasi dibanding kontrol terkecuali ekstrak metanol.

Beberapa penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa kandungan Glikoprotein pada teripang mampu menghambat proliferasi sel sehingga mempunyai efek sebagai anti-kanker (Soltani dkk., 2014).

Tabel 6. Presentase Jumlah Sel Pada Proliferasi Sel Kanker T47D Setelah Perlakuan

Lama Inkubasi	Perlakuan	Jumlah Sel
24 Jam	Kontrol	31,70 %
	Cisplatin	9,18 %
	Metanol	39,07 %
	Air	29,75 %
48 Jam	Kontrol	58,78 %
	Cisplatin	26,43 %
	Metanol	67,59 %
	Air	49,57 %

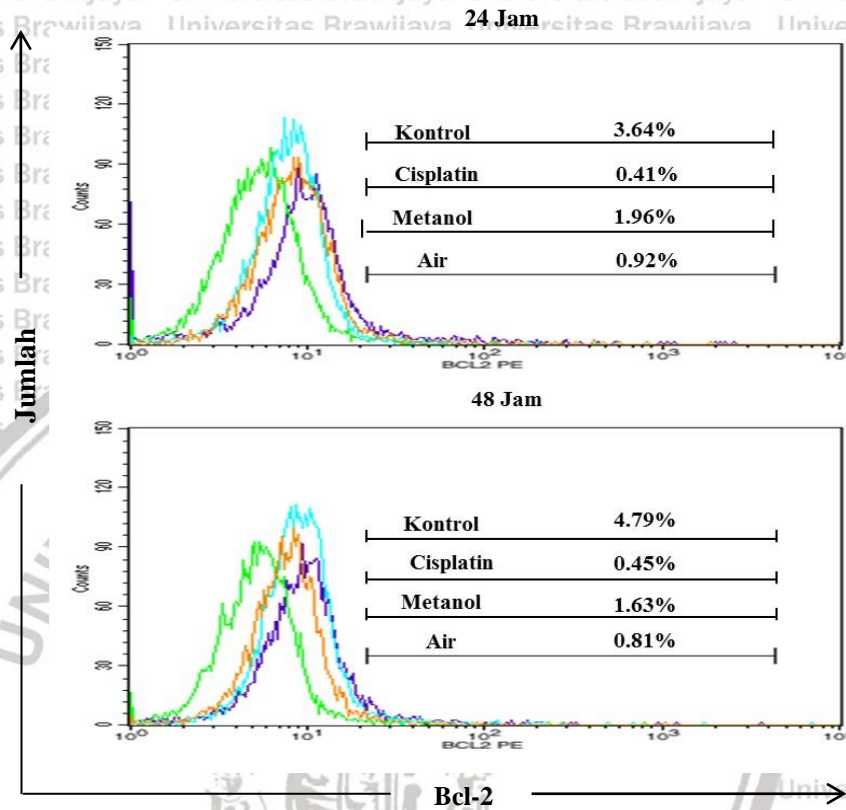
Senyawa phalinopside A pada teripang mampu menghambat RTK (reseptor tirosin kinase) yang berperan dalam proliferasi sel sehingga pada saat RTK dihambat maka proliferasi sel akan menurun (Tong dkk., 2005). Ekstrak metanol memiliki proliferasi yang lebih tinggi hal ini bisa diakibatkan karena senyawa dengan fraksi hexane yang diidentifikasi pada ekstrak metanol menggunakan GC-MS memiliki kemampuan dalam meningkatkan proliferasi sel (Fajarningsih, 2008). Asumsi lain bahwa peningkatan proliferasi juga karena setiap sel memiliki respon yang berbeda terhadap pemberian ekstrak teripang.

4.6 Uji Aktivitas Antikanker Teripang Terhadap Bcl-2 Pada Sel Kanker T47D

Pengaruh ekstrak teripang *B. argus* terhadap Bcl-2 pada sel kanker payudara T47D dianalisis dengan menggunakan FITC (fluorescein isothiocyanate) sebagai pelabelan. Berdasarkan hasil analisis menggunakan flowcytometri terhadap Bcl-2 pada sel kanker payudara T47D pada masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Gambar 13 dan Tabel 7.

Berdasarkan hasil analisis pengaruh ekstrak teripang *B. argus* terhadap Bcl-2 pada sel kanker T47D, maka perlakuan dengan cisplatin menunjukkan presentase jumlah sel yang mengekspresikan Bcl-2 yang lebih kecil dari kontrol. Pada inkubasi 24 jam presentase jumlah sel yaitu 0.41% sedangkan kontrol 3.64% dan pada inkubasi 48 jam presentase jumlah sel yaitu 0.45% dan kontrol 4.79%. Ekstrak air Teripang memiliki presentase jumlah sel yang mengekspresikan Bcl-2 rendah pada inkubasi 24 jam yaitu 0.92% dibanding ekstrak metanol

yaitu 1.96% sedangkan pada inkubasi 48 jam presentase jumlah sel pada ekstrak air yaitu 0.81% dan metanol 1.63%.



Gambar 13. Hasil *Flow cytometry* pengaruh ekstrak *B. argus* terhadap Bcl-2 sel kanker T47D. Keterangan — = Kontrol (tanpa perlakuan), — = Cisplatin, — = Ekstrak metanol teripang, — = Ekstrak Air Teripang.

Tabel 7. Presentase pengaruh ekstrak teripang terhadap Bcl-2 pada sel kanker T47D

Lama Inkubasi	Perlakuan	Jumlah Sel
24 Jam	Kontrol	3,64 %
	Cisplatin	0,41 %
	Metanol	1,96 %
	Air	0,92 %
48 Jam	Kontrol	4,79 %
	Cisplatin	0,45 %
	Metanol	1,63 %
	Air	0,81 %

Bcl adalah molekul transmembran pada mitokondria yang merupakan protein anti-Apoptosis, yang termasuk dalam anggota keluarga protein Bcl-2. Regulasi apoptosis melibatkan sejumlah molekul khususnya ekspresi protein Bcl dan Bax yang dapat menginduksi apoptosis (Ren dkk., 2008). Kelompok protein Bcl-2 tertentu yang bersifat antiapoptosis (seperti Bcl-2 dan Bcl-XL) dapat diimbangi oleh kelompok Bcl-2 yang bersifat proapoptosis (seperti Bax dan Bak). Pada keadaan seperti ini, kelompok Bcl-2 yang bersifat proapoptosis menjadi lebih tinggi, sehingga dapat mengaktifasi caspase dan menginduksi apoptosis. Hal ini dapat dijadikan catatan penting bahwa kelompok protein Proapoptosis dan antiapoptosis sebagai pertanda untuk kejadian Apoptosis ternyata tidak dapat berfungsi sendiri-sendiri karena melibatkan banyak protein secara sinergis dan berbagai proses tertentu yang dinamis (Chilmi dkk., 2014). Peningkatan p21 dapat mengakibatkan Cdk dapat ditekan hal tersebut dapat mengakibatkan siklus sel akan berhenti sehingga p53 akan memicu aktivitas Bax yang selanjutnya akan menekan aktivitas Bcl-2 sehingga terjadi perubahan membran permeabilitas mitokondria yang mengakibatkan pelepasan sitokrom c dan mengaktifasi *Caspase* sehingga terjadi apoptosis (Vermulen dkk., 2003).

Senyawa Frondoside A pada ekstrak teripang memiliki kemampuan dalam menginduksi apoptosis. Frondoside A menghambat pertumbuhan sel kanker payudara dengan cara meningkatkan protein Bcl-2 Proapoptosis seperti Bax, caspase 9, caspase 3, serta menahan siklus siklus sel dan meregulasi p21 (Attoub dkk., 2013).



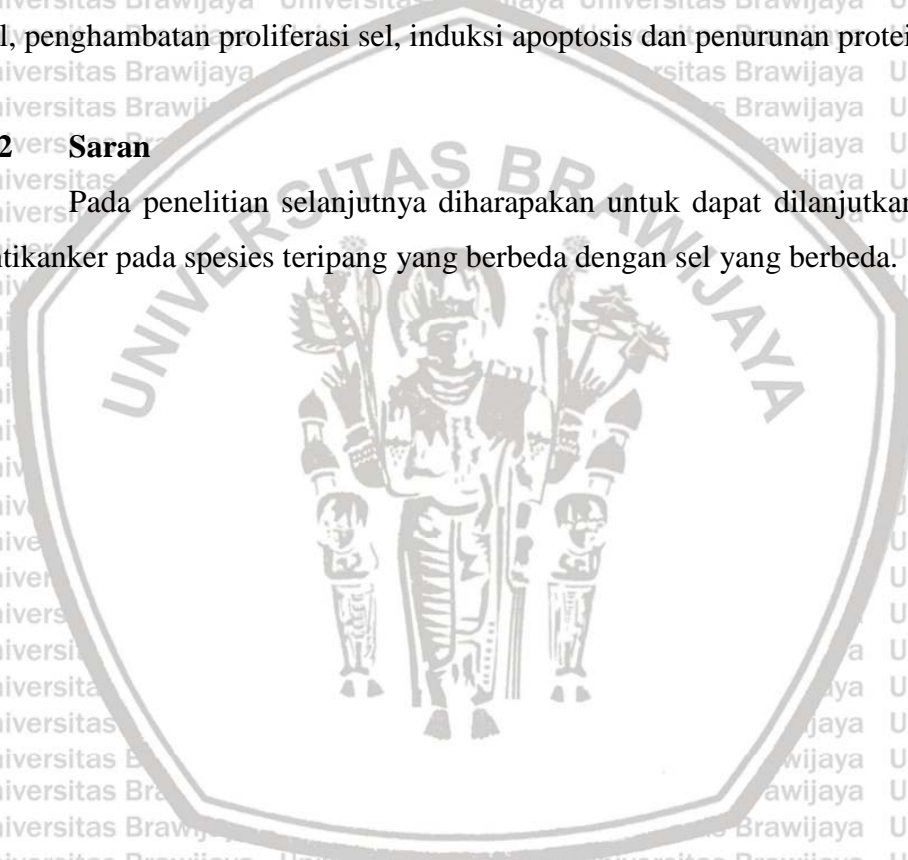
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian tentang uji aktivitas antikanker ekstrak teripang *Bohadschia argus* terhadap sel kanker T47D, maka diambil kesimpulan bahwa ekstrak teripang *B. argus* memiliki potensi sebagai antikanker ditandai dengan penghambatan fase G₀/G₁ pada siklus sel, penghambatan proliferasi sel, induksi apoptosis dan penurunan protein Bcl-2.

5.2 Saran

Pada penelitian selanjutnya diharapkan untuk dapat dilanjutkan dengan uji aktivitas antikanker pada spesies teripang yang berbeda dengan sel yang berbeda.



DAFTAR PUSTAKA

- Adrian, T. E., & Collin, P. 2018. The Anti-Cancer Effects of Frondoside A. *Marine Drugs*, 16(2). <https://doi.org/10.3390/md16020064>
- Allen, P., Dvies, D. 2013. Apoptosis detection by flowcytometry. *Journal of Immunology*.7-10
- Al Marzouqi, N., Iratni, R., Nemmar, A., Arafat, K., Ahmed Al Sultan, M., Yasin, J., Attoub, S. 2011. Frondoside A inhibits human breast cancer cell survival, migration, invasion and the growth of breast tumor xenografts. *European Journal of Pharmacology*, 668(1–2), 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.06.023>
- Al Shemali, J., Mensah, E., Parekh, K., Thomas, S., Attoub, S., Hellman, B., Nyberg, F., 2014. Frondoside A enhances the antiproliferative effects of gemcitabine in pancreatic cancer. 1391-1398. doi : 10.1016/j.ejca.2014.01.002.
- Anonim. 2010. Kemenkes RI. *Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 796/MENKES/SK/VII/2010 Tentang Pengendalian Kanker Payudara dan Kanker Leher Rahim*. Jakarta: Kemenkes RI.
- Aminin, D., Menchinskaya, E., Pislugin, E., Silchenko, A., Avilov, S., & Kalinin, V. 2015. Anticancer Activity of Sea Cucumber Triterpene Glycosides. *Marine Drugs*, 13(3), 1202–1223. <https://doi.org/10.3390/md13031202>
- Assawasuparek, K., Rawangchue, T., & Phonarknguen, R. 2016. Scabraside D Derived from Sea Cucumber Induces Apoptosis and Inhibits Metastasis via iNOS and STAT-3 Expression in Human Cholangiocarcinoma Xenografts. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 17(4), 2151–2157.
- Attoub, S., Arafat, K., Gélaude, A., Sultan, M. A. A., Bracke, M., Collin, P., Wever, O. D. 2013. Frondoside A Suppressive Effects on Lung Cancer Survival, Tumor Growth, Angiogenesis, Invasion, and Metastasis. *PLOS ONE*, 8(1), e53087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053087>
- Baumgartner s. 2010. Milk Allergen Detection. In: Molecular biological and immunological technique and application for food chemist. John Wiley and Sons, Inc. Canada.
- Banks, H. T., Sutton, K. L., Thompson, W. C., Bocharov, G., Doumic, M., Schenkel, T., Meyerhans, A. 2011. A New Model for the Estimation of Cell Proliferation Dynamics

- Using CFSE Data. *Journal of Immunological Methods*, 373(1–2), 143–160. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.08.014>
- Barnes, C. J., Vadlamudi, R. K., & Kumar, R. 2004. Novel estrogen receptor coregulators and signaling molecules in human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 61(3), 281–291. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3222-5>
- Bechtel, P. J., Oliveira, A. C., Demir, N., & Smiley, S. 2013. Chemical composition of the giant red sea cucumber, *Parastichopus californicus*, commercially harvested in Alaska. *Food Science & Nutrition*, 1(1), 63–73. <https://doi.org/10.1002/fsn3.12>
- Bergman, J. J., Groen, A. K., Huibregtse, K., & Tytgat, G. N. 1994. Addition of dimethylsulphoxide to methyl-tert-butyl ether and ethyl propionate increases cholesterol dissolving capacity and cholesterol gall stone dissolution in vitro. *Gut*, 35(11), 1653–1658.
- Berridge, M. V., P. M. Herst, & A.S. Tan. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *biothechnol Annu Rev*; 11:127–52
- Bordbar, S., Anwar, F., & Saari, N. 2011. High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumbers for Functional Foods—A Review. *Marine Drugs*, 9(12), 1761–1805. <https://doi.org/10.3390/md9101761>
- Chilmi, S., Gebyarani, I., Ima Monica, L., Rizall Pavliando, J., Nugroho, S., & Widjajanto, E. 2014. Apoptosis Related Protein in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*, 20, 210–215.
- Chen, X., Shao, X., Li, W., Zhang, X., & Yu, B. 2017. Total Synthesis of Echinaside A, a Representative Triterpene Glycoside of Sea Cucumbers. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 56(26), 7648–7652. <https://doi.org/10.1002/anie.201703610>
- Citra Tri Wahyumi Faisel. 2013. Gambaran efek samping kemoterapi berbasis antrasiklin pada pasien kanker payudara di RSUD Dokter Soedarso Pontianak. *Jurnal Mahasiswa PSPD FK Universitas Tanjungpura*, 1(1). Retrieved from <http://jurnal.untan.ac.id/index.php/jfk/article/view/1796>
- Conand, C., Gamboa, R. & Purcell, S. 2013. *Bohadschia argus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T180541A1645352. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T180541A1645352.en>

- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J. 2016. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(11). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>
- Du Toit, A. 2013. Cell death: balance through a bivalent regulator. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(9), 546. <https://doi.org/10.1038/nrm3637>
- Dewi, K.. 2008. Kajian Ekstraksi Steroid Teripang Pasir (*Holothuria scabra J*) Sebagai Sumber Testosteron Alami. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Elfidasari, D., Noriko, N., Wulandari, N., & Perdana, A. T. 2012. Identifikasi jenis teripang genus *Holothuria* asal perairan sekitar Kepulauan Seribu berdasarkan perbedaan morfologi. *Seri Sains dan Teknologi*, 1(3), 140–146.
- Fajarningsih, N. D., Nursid, M., Wikanta, T., & 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. <https://doi.org/10.15578/jpbkp.v3i1.6>
- Fan, L., Cao, X., Yan, H., Wang, Q., Tian, X., Zhang, L., Morigen, M. 2017. The synthetic antihyperlipidemic drug potassium piperate selectively kills breast cancer cells through inhibiting G1-S-phase transition and inducing Apoptosis. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16872>
- Fanglian, H. 2011. Laemmli-SDS-PAGE. *BIO-PROTOCOL*, 1(11).<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.80>
- Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., Newshean, S. 2015. Sustained proliferation in cancer: mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*, 35(Suppl), S25–S54. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Bray, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Fucito, L. M., Czabafy, S., Hendricks, P. S., Kotsen, C., Richardson, D., & Toll, B. A. 2016. Pairing Smoking-Cessation Services With Lung Cancer Screening: A Clinical

- Guideline From the Association for the Treatment of Tobacco Use and Dependence and the Society for Research on Nicotine and Tobacco. *Cancer*, 122(8), 1150–1159. <https://doi.org/10.1002/cncr.29926>
- Fulda, S. 2009. Apoptosis pathways and their therapeutic exploitation in pancreatic cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(7), 1221–1227. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00748.x>
- Han, H., Xu, Q.Z., Tang, H.F., Yi, Y.H., Gong, W. 2010. Cytotoxic holostane-type triterpene glycosides from the sea cucumber *Pentacta quadrangularis*. *Planta Med.* 76, 1900–1904.
- Han, L.-T., Fang, Y., Li, M.-M., Yang, H.-B., & Huang, F. 2013. The Antitumor Effects of Triterpenoid Saponins from the *Anemone flaccida* and the Underlying Mechanism. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM, <https://doi.org/10.1155/2013/517931>
- Han, H., Yi, Y.-H., Li, L., Liu, B.-S., Pan, M.-X., Yan, B., & Wang, X.-H. 2009. Triterpene Glycosides from Sea Cucumber *Holothuria leucospilota*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 7(5), 346–350. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1009.2009.00346>
- Hardwick, J. M., & Soane, L. 2013. Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008722>
- Haryoto, H., Muhtadi, M., Indrayudha, P., Azizah, T., & Suhendi, A. 2013. Activity of sitotoksik Etanol Extract Plant Growth (*Cynometra ramiflora* Linn) On Heavy Cell, T47D and WiDR. *Jurnal Penelitian Saintek*, 18(2). <https://doi.org/10.21831/jps.v18i2.2137>
- Hashibe, M., Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Boffetta, P. 2007. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(10), 777–789. <https://doi.org/10.1093/jnci/djk179>
- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., & Sakuragi, N. 2014. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Research International*, 2014, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2014/150845>

- Hatok, J., & Racay, P. 2016. Bcl-2 family proteins: master regulators of cell survival. *Biomolecular Concepts*, 7(4), 259–270. <https://doi.org/10.1515/bmc-2016-0015>
- He, M., Wang, J., Hu, S., Wang, Y., Xue, C., & Li, H. 2014. The effects of fucosylated chondroitin sulfate isolated from *Isostichopus badionotus* on antimetastatic activity via down-regulation of Hif-1 α and Hpa. *Food Science and Biotechnology*, 23(5), 1643–1651. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0224-z>
- Ikawati, Z., Nugroho, A., Astutiningsih Fakultas, W., & Mada, G. 2018. Penekanan Ekspresi Enzim COX-2 Pada Kultur Sel Raji Oleh Ekstrak Kloform Daun Cangkring (*Erythrina fusca Lour.*). Research Gate.
- Janakiram, N., Mohammed, A., & Rao, C. 2015. Sea Cucumbers Metabolites as Potent Anti-Cancer Agents. *Marine Drugs*, 13(5), 2909–2923. <https://doi.org/10.3390/md13052909>
- Jemal A, Bray F, Center MM. 2011. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.*;61(2):69-90.
- Karam., Jose, A., 2009. Apoptosis in Carcinogenesis and Chemoterapy. *Journal of Cancer*. 419-435
- Kim, S.K., Himaya, S.W. 2012. Triterpene glycosides from sea cucumbers and their biological activities. *Adv. Food. Nutr. Res*, 65, 297–319.
- Kresno BS. Ilmu dasar onkologi. Edisi Kedua. Badan Penerbit Fakultas Kedokteran. Univeritas Indonesia. 2011 :257-283.
- Leiserson, M. D. M., Blokh, D., Sharan, R., & Raphael, B. J. 2013. Simultaneous Identification of Multiple Driver Pathways in Cancer. *PLoS Computational Biology*, 9(5), e1003054. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003054>
- Li, M., Miao, Z.-H., Chen, Z., Chen, Q., Gui, M., Lin, L.-P., Ding, J. 2010. Echinoid A, a new marine-derived anticancer saponin, targets topoisomerase2 α by unique interference with its DNA binding and catalytic cycle. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 21(3), 597–607. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp335>
- Li, Q. K., Gabrielson, E., & Zhang, H. 2012. Application of Glycoproteomics in the Discovery of Biomarkers for Lung Cancer. *Proteomics. Clinical Applications*, 6(5–6), 244–256. <https://doi.org/10.1002/prca.201100042>
- Li, Y.-X., Himaya, S., & Kim, S.-K. 2013. Triterpenoids of Marine Origin as Anti-Cancer Agents. *Molecules*, 18(7), 7886–7909. <https://doi.org/10.3390/molecules18077886>

- Lodish, H. 2008. *Molecular cell biology*. Macmillan.
- Luciani, D. S., White, S. A., Widenmaier, S. B., Saran, V. V., Taghizadeh, F., Hu, X., Johnson, J. D. 2013. Bcl-2 and Bcl-xL Suppress Glucose Signaling in Pancreatic β -Cells. *Diabetes*, 62(1), 170–182. <https://doi.org/10.2337/db11-1464>
- Mader, S. S. 2011. *Inquiry Into Life ThitheentnEdition*. McGraw-Hill, Americas New York.
- Manavathi, B., Dey, O., Gajulapalli, V. N. R., Bhatia, R. S., Bugide, S., & Kumar, R. 2013. Derailed Estrogen Signaling and Breast Cancer: An Authentic Couple. *Endocrine Reviews*, 34(1), 1–32. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1057>
- Manosroi, J., Dhumtanom, P., & Manosroi, A. 2006. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Letters*, 235(1), 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.04.021>
- Mohammad, R. M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H.-Y., Lin, L.-T., Azmi, A. S. 2015. Broad targeting of resistance to Apoptosis in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 35(0), S78–S103. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.001>
- Mulloy, B., Hogwood, J., Gray, E., Lever, R., & Page, C. P. 2016. Pharmacology of Heparin and Related Drugs. *Pharmacological Reviews*, 68(1), 76–141. <https://doi.org/10.1124/pr.115.011247>
- Ngamwongsatit, P., P.P Banada, W. Panbangred, & A.K. Bhunia.2008. WST-1-based cell cytotoxicity assay a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic Bacillus species using CHO cell line. *J Microbiol Methods*. 73:211-5.
- Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Gustafsson, J. A. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews*, 81(4), 1535–1565.
- Osborn, A., Goss, R. J. M., & Field, R. A. 2011. The saponins: polar isoprenoids with important and diverse biological activities. *Natural Product Reports*, 28(7), 1261–1268. <https://doi.org/10.1039/c1np00015b>
- Ottinger, S., Klöppel, A., Rausch, V., Liu, L., Kallifatidis, G., Gross, W., Herr, I. 2012. Targeting of pancreatic and prostate cancer stem cell characteristics by Crambe crambe marine sponge extract. *International Journal of Cancer*, 130(7), 1671–1681. <https://doi.org/10.1002/ijc.26168>
- Padumadasa, C., Dharmadana, D., Abeysekera, A., & Thammitiyagodage, M. 2016. In vitro antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of ethyl acetate soluble

- proanthocyanidins of the inflorescence of *Cocos nucifera* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1335-2>
- Parish, C. R., M. H. Glidden, B. J. Quah, & H. S. Warren. 2009. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Curr Protoc Immunol.* 4:4-9.
- Park, S. Y., Kim, Y. H., Kim, Y., & Lee, S.-J. 2012. Frondoside A has an anti-invasive effect by inhibiting TPA-induced MMP-9 activation via NF- κ B and AP-1 signaling in human breast cancer cells. *International Journal of Oncology*, 41(3), 933–940. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1518>
- Quah, B. J. C., Warren, H. S., & Parish, C. R. 2007. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols*, 2(9), 2049–2056. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.296>
- Ramasamy, K., Agarwal, R. 2008. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Letters*, 269(2), 352–362. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.053>
- Rieger, A., Hall, B., Luong, L., Schang, L., & Barrenda, D. 2010. Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death. *Journal of Immunological Methods*, 81–92. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/1243515>
- Ren, G., Zhao, Y., Yang, L., Fu, C., 2008. Anti-proliferative effect of clitocine from the mushroom *Leucopaxillus giganteus* on human cervical cancer HeLa cells by inducing Apoptosis. *Cancer Lett.* 262, 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.12.013>
- Rudd, P. M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I. A., & Dwek, R. A. 2001. Glycosylation and the immune system. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5512), 2370–2376
- Roginsky, A.B., Ding, X.Z., Woodward, C., Ujiki, M.B., Singh, B., Bell, R.H., Jr., Collin, P., Adrian, T.E. 2010. Anti-pancreatic cancer effects of a polar extract from the edible sea cucumber, *Cucumaria frondosa*. *Pancreas*, 39, 646–652
- Satyanarayana, A., and Kaldis, P., 2009, Mammalian Cell-cycle Regulation: Several Cdks, Numerous Cyclins, and Diverse Compensatory Mechanisms, *Oncogene*, 28: 2925-2939

- Shackelford, R. E., Kaufmann, W. K., & Paules, R. S. 1999. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environmental Health Perspectives*, 107(Suppl 1), 5.
- Silver, D. J., & Silver, J. 2014. Contributions of chondroitin sulfate proteoglycans to neurodevelopment, injury, and cancer. *Current Opinion in Neurobiology*, 27, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.03.016>
- Soltani, M., & Baharara, J. 2014. Antioxidant and Antiproliferative Capacity of Dichloromethane Extract of *Holoturia leucospilota* sea cucumber. *International Journal of Cellular and Molecular Biotechnology*, 2014, 1–9. <https://doi.org/10.5899/2014/ijcmb-00013>
- Stoddart, M. J. 2011. Cell viability essays: introduction. *Methods Mol Biol.* 740:1-6
- T-47D ATCC ® HTB-133™ *Homo sapiens* mammary gland; derived f. (n.d.). Retrieved July 18, 2018, from <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-133.aspx>
- Tong, Y., Zhang, X., Tian, F., Yi, Y., Xu, Q., Li, L., Ding, J. 2005. Philinopside A, a novel marine-derived compound possessing dual anti-angiogenic and anti-tumor effects. *International Journal of Cancer*, 114(6), 843–853. <https://doi.org/10.1002/ijc.20804>
- Tripathy, D., Choudhary, A., Banerjee, U. C., Singh, I. P., & Chatterjee, A. 2015. Induction of Apoptosis and Reduction of Endogenous Glutathione Level by the Ethyl-Acetate Soluble Fraction of the Methanol Extract of the Roots of *Potentilla fulgens* in Cancer Cells. *PloS One*, 10(8), e0135890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135890>
- Tuwo, A. 2004. Status of Sea Cucumber Fisheries and farming in Indonesia. In *Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management*; Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J.F., Mercier, A., Eds.; FAO Fisheries Technical Paper No. 463; FAO:Rome, Italy, pp. 49–55
- Uni, W., Ramli, M., & Ishak, E. 2016. Keanekaragaman dan kepadatan teripang di perairan Tanjung Tiram Kecamatan Moramo Utara Kabupaten Konawe Selatan. *Jurnal Manajemen Sumber Daya Perairan*, 1(1). Retrieved from <http://ojs.uho.ac.id/index.php/JMSP/article/view/1379>
- Vermeulen, K., Berneman, Z.N., and Van Bockstaele, D.R., 2003, Cell Cycle and Apoptosis, *Cell Prolif.* 36(3): 165-175

- Wang, T., Cai, Y., Song, W., Chen, R., Hu, D., Ye, J., Ding, Y. 2017. Ethyl Acetate Extracts of Semen *Impatiensis* Inhibit Proliferation and Induce Apoptosis of Human Prostate Cancer Cell Lines through AKT/ERK Pathways. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1243515>
- Zaman, S., Wang, R., & Gandhi, V. 2014. Targeting the Apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leukemia & Lymphoma*, 55(9), 1980–1992. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.855307>
- Zhang, H., Geng, Y., Qin, L., Dong, X., Xu, X., Du, M., Dong, L. 2018. Characterization of volatile compounds in different dried sea cucumber cultivars. *Journal of Food Measurement and Characterization*. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9759-7>
- Zhao, Q., Xue, Y., Wang, J., Li, H., Long, T., Li, Z., Xue, C. 2012. In vitro and in vivo anti-tumour activities of echinoside A and ds-echinoside A from *Pearsonothuria graeffei*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(4), 965–974. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4678>
- Zou, Z.-R., Yi, Y.-H., Wu, H.-M., Wu, J.-H., Liaw, C.-C., & Lee, K.-H. 2003. Intercedensides A-C, three new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Mensamaria intercedens* Lampert. *Journal of Natural Products*, 66(8), 1055–1060. <https://doi.org/10.1021/np030064y>

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Statistik

Uji Apoptosis R6

1. Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kontrol	Cisplatin	Metanol	Air
N		6	6	6	6
Normal Parameters(a,b)	Mean	1,9217	5,2367	2,1733	2,8967
	Std. Deviation	,79741	2,41848	,26288	,89151
Most Extreme Differences	Absolute	,259	,276	,223	,192
	Positive	,259	,274	,146	,192
	Negative	-,234	-,276	-,223	-,172
Kolmogorov-Smirnov Z		,635	,676	,547	,470
Asymp. Sig. (2-tailed)		,814	,751	,925	,980

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Uji Apoptosis R5

1. Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kontrol	Cisplatin	Metanol	Air
N		6	6	6	6
Normal Parameters(a,b)	Mean	2,3817	9,7133	1,9783	2,9600
	Std. Deviation	1,33429	5,36695	,32400	,82263
Most Extreme Differences	Absolute	,277	,285	,193	,225
	Positive	,233	,285	,160	,225
	Negative	-,277	-,185	-,193	-,187
Kolmogorov-Smirnov Z		,679	,698	,474	,550
Asymp. Sig. (2-tailed)		,745	,715	,978	,923

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Uji Apoptosis R3

1. Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kontrol	Cisplatin	Metanol	Air
N		6	6	6	6
Normal Parameters(a,b)	Mean	93,6983	79,2300	94,1800	91,8867
	Std. Deviation	4,00505	6,14059	1,83593	1,25492
Most Extreme Differences	Absolute	,271	,188	,155	,170
	Positive	,208	,123	,122	,138
	Negative	-,271	-,188	-,155	-,170
Kolmogorov-Smirnov Z		,664	,460	,379	,417
Asymp. Sig. (2-tailed)		,771	,984	,999	,995

a. Test distribution is Normal.

Uji Apoptosis R4

1. Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kontrol	Cisplatin	Metanol	Air
N		6	6	6	6
Normal Parameters(a,b)	Mean	1,9983	5,8483	1,6683	2,2683
	Std. Deviation	2,02920	2,37338	1,62029	1,39299
Most Extreme Differences	Absolute	,282	,256	,292	,222
	Positive	,282	,256	,292	,222
	Negative	-,201	-,153	-,194	-,187
Kolmogorov-Smirnov Z		,690	,628	,715	,543
Asymp. Sig. (2-tailed)		,728	,825	,685	,930

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

2. Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Apoptosis

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,910	3	20	,454

3. Uji ANOVA

ANOVA

Apoptosis

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	68,480	3	22,827	6,378	,003
Within Groups	71,582	20	3,579		
Total	140,061	23			

4. Uji Lanjutan LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Apoptosis

	(I) Ekstrak	(J) Ekstrak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound
LSD	Kontrol	Cisplatin	-3,85000(*)	1,09226	,002	-6,1284	-1,5716
		Metanol	,33000	1,09226	,766	-1,9484	2,6084
		Air	-,27000	1,09226	,807	-2,5484	2,0084
	Cisplatin	Kontrol	3,85000(*)	1,09226	,002	1,5716	6,1284
		Metanol	4,18000(*)	1,09226	,001	1,9016	6,4584
		Air	3,58000(*)	1,09226	,004	1,3016	5,8584
	Metanol	Kontrol	-,33000	1,09226	,766	-2,6084	1,9484
		Cisplatin	-4,18000(*)	1,09226	,001	-6,4584	-1,9016
		Air	-,60000	1,09226	,589	-2,8784	1,6784
Air	Kontrol	,27000	1,09226	,807	-2,0084	2,5484	
	Cisplatin	-3,58000(*)	1,09226	,004	-5,8584	-1,3016	
	Metanol	,60000	1,09226	,589	-1,6784	2,8784	

* The mean difference is significant at the .05 level.

Apoptosis

Ekstrak	N	Subset for alpha = .05		
	1	2	1	
Duncan(a)	Metanol	6	1,6683	
	Kontrol	6	1,9983	
	Air	6	2,2683	
	Cisplatin	6		5,8483
	Sig.		,610	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.

Uji Siklus Sel Apoptosis

1. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Siklus_Sel

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7,035	3	20	,002

Uji Siklus Sel G0/G1

1. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Siklus_Sel

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
32,935	3	20	,000

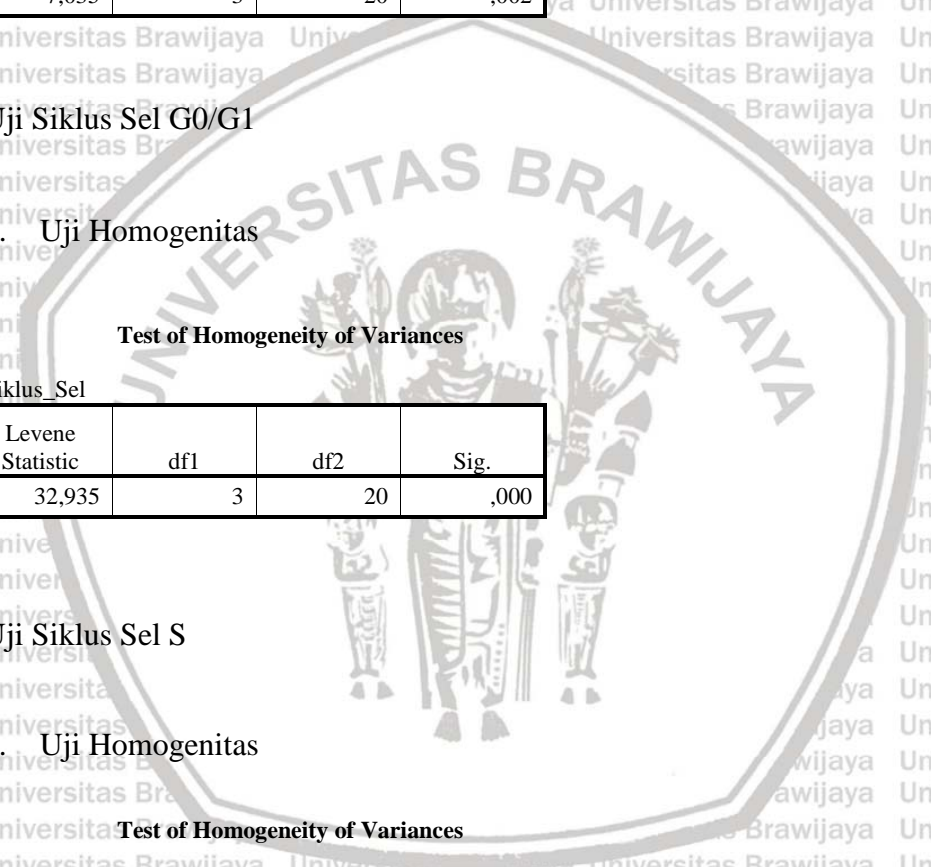
Uji Siklus Sel S

1. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Siklus_Sel

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6,991	3	20	,002



Uji Siklus Sel G2/M

1. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Siklus_Sel

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6,991	3	20	,002

Uji Proliferasi

1. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Poliferasi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
129,547	3	20	,000

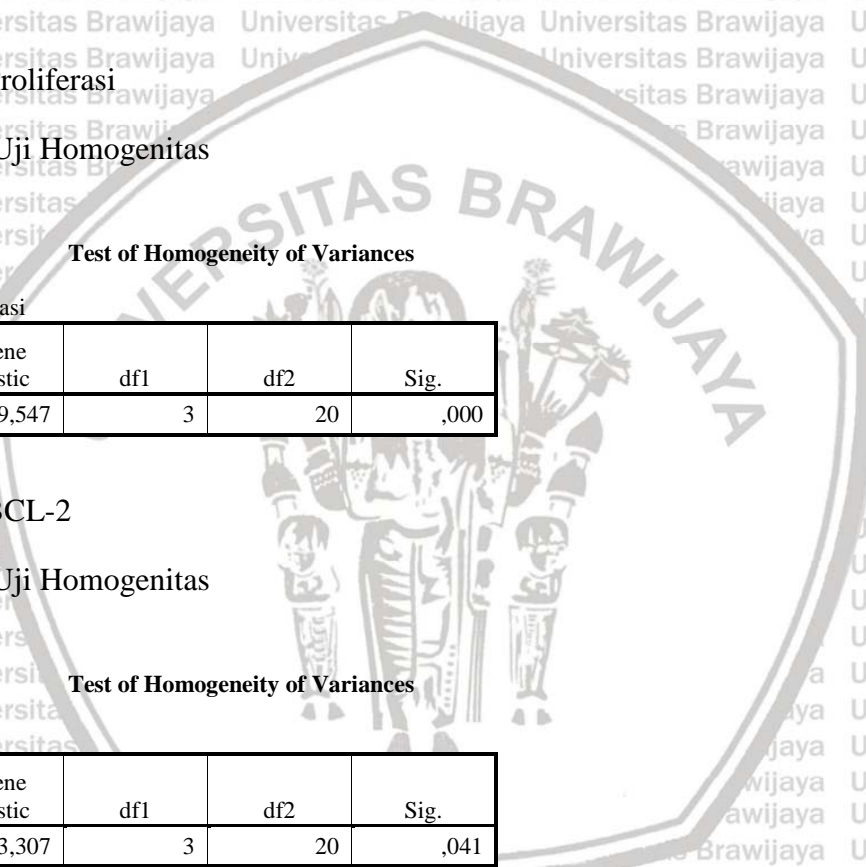
Uji BCL-2

1. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

BCL2

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,307	3	20	,041



Lampiran 2. Komponen Kimia Ekstrak Teripang B. argus

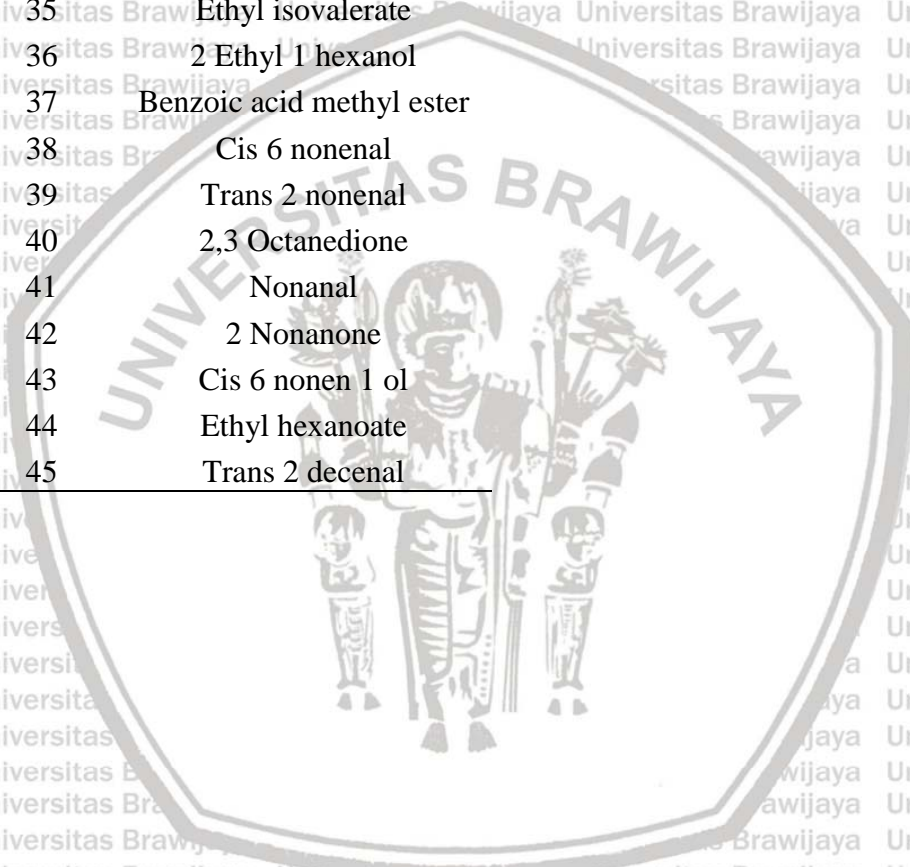
1. Komponen kimia Ekstrak Air Teripang dengan analisis LC-MS

NO	Komponen		
1	D Xylose	16	Pervicoside C
2	D Quinovose	17	Arguside E
3	Glucosamine	18	Arguside D
4	D Glucose	19	Fuscocineroside B
5	3 O Methyl D glucose	20	Intercedenside A
6	4 O Methyl D glucuronic acid	21	17 Hydroxyfuscocineroside B
7	2 Acetamido 2 deoxy D galactose	22	Holothurin A
8	6 Acetyl D glucose	23	Echinoside A
9	Chondroitin sulfate	24	Cucumarioside C2
10	Leucospilotaside C	25	Fuscocineroside A
11	Scabraside	26	17 Dehydroxyholothurinoside A
12	Holothurin B	27	Fronodoside A
13	Holothurin B4	28	Fronodoside D
14	Echinoside B	29	Arguside B
15	Cucumarioside G2		
30	Arguside C		

2. Komponen kimia ekstrak metanol teripang analisis GC-MS

NO	Komponen		
		14	2,3 Pentanedione
1	Acetic acid	15	Ethyl propionate
2	2 Methyl furan	16	Hexanal
3	Ethyl acetate	17	Benzaldehyde
4	1 Penten 3 one	18	Trans,trans 2,4 heptadienal
5	2 Methyl butanal	19	Cis 4 heptenal
6	2 Pentanone	20	Ethyl crotonate
7	3 Pentanone	21	Heptanal
8	2 Penten 1 ol	22	2 Heptanone
9	3 Methyl 1 butanol	23	Ethyl isobutyrate
10	2 Methyl 1 butanol	24	Ethyl butyrate
11	Dimethyl disulfide	25	1 Heptanol
12	2 Hexenal	26	Acetophenone
13	Trans 2 hexenal	27	1,5 Octadien 3 ol

- 28 2,5 Octadien 1 ol
- 29 Trans 2 octenal
- 30 6 Methyl 5 hepten 2 one
- 31 Dimethyl trisulfide
- 32 Ethyl tiglate
- 33 1 Octen 3 ol
- 34 Ethyl 2 methylbutyrate
- 35 Ethyl isovalerate
- 36 2 Ethyl 1 hexanol
- 37 Benzoic acid methyl ester
- 38 Cis 6 nonenal
- 39 Trans 2 nonenal
- 40 2,3 Octanedione
- 41 Nonanal
- 42 2 Nonanone
- 43 Cis 6 nonen 1 ol
- 44 Ethyl hexanoate
- 45 Trans 2 decenal



Lampiran 3. Penentuan Dosis Ekstrak Teripang

1. Hasil uji IC₅₀ menggunakan WST-1 Assay

Perlakuan	KA	KM	D1A (50 µg)	D2A (100 µg)	D3A (250 µg)	D4A (500 µg)	D1M (50 µg)	D2M (100 µg)	D3M (250 µg)	D4M (500 µg)	WST	WST
	1.41875	1.73275	1.31775	1.52325	1.225375	0.602375	1.2565	1.283625	0.532375	0.44325	0.415625	0.598571
	1.212125	1.812	1.3905	1.58075	1.28875	0.510375	1.3225	1.34975	0.529875	0.429125	0.339857	0.578286
	1.5125	1.89525	1.448875	1.623	1.240625	0.6205	1.3955	1.4115	0.51725	0.4215	0.38775	0.606375
	1.275125	1.970625	1.50025	1.6705	1.29075	0.532625	1.48075	1.476875	0.536625	0.41525	0.382	0.594
Rata2	1.603640625		1.435857143	1.551883333	1.2681	0.56931	1.34697	1.32331	0.5284	0.429844		0.424107

Rumus viabilitas sel

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\text{Absorbansi Sampel} - \text{Absorbansi Medium}}{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Medium}} \times 100\%$$

Persamaan regresi linear

$$Y = -0.001 + 0.9843 \text{ (Ekstrak Air)} \quad Y = -0.0036 + 1.0182 \text{ (Ekstrak Metanol)}$$

Rumus Penentuan IC₅₀

$$IC_{50} = \frac{0.5 - 0.9843}{0.001} \text{ (Ekstrak Air)}$$

$$IC_{50} = \frac{0.5 - 1.0182}{0.0036} \text{ (Ekstrak Metanol)}$$

Kontrol : 1.603640625

Medium : 0.424107

Ekstrak	50 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	% Sel Hidup				IC ₅₀
Air	1.435857143	1.551883333	1.2681	0.569309524	0.858373	0.95681	0.716047	0.12319	484.3 µg/mL
Metanol	1.346970238	1.323309524	0.5284	0.42984375	0.782961	0.762887	0.088482	0.004867	143.944 µg/mL

2. Hasil uji IC₅₀ menggunakan WST-1 Assay

Perlakuan	KA	KM	D1A (50 µg)	D2A (100 µg)	D3A (250 µg)	D4A (500 µg)	D1M (50 µg)	D2M (100 µg)	D3M (250 µg)	D4M (500 µg)	WST	WST
	2.213125	2.24475	1.80625	1.73225	1.721625	1.627875	1.71125	1.61175	0.54675	0.461125	0.35825	0.3605
	2.264	2.295875	1.797125	1.6835	1.776125	1.680625	1.807	1.631625	0.553875	0.46475	0.361125	0.363
	2.369375	2.363375	1.78075	1.731625	1.7275	1.64175	2.013	1.584	0.5605	0.468625	0.365125	0.3675
	2.428125	2.433875	1.7995	1.745375	1.783875	1.696875	2.076875	1.6585	0.5685	0.473625	0.3705	0.373375
Rata2	2.3265625		1.79846875	1.728666667	1.75394643	1.66000417	1.906238	1.624142	0.557406	0.467031		0.183047

Rumus viabilitas sel

$$\% \text{ Sel Hidup} = \frac{\text{Absorbansi Sampel} - \text{Absorbansi Medium}}{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Medium}} \times 100\%$$

Persamaan regresi linear

$$Y = -0.0008x + 0.08812 \text{ (Ekstrak Air)}$$

$$Y = -0.0033x + 0.9884 \text{ (Ekstrak Metanol)}$$

Rumus Penentuan IC₅₀

$$IC_{50} = \frac{0.5 - 0.08812}{0.0008} \text{ (Ekstrak Air)} \quad IC_{50} = \frac{0.5 - 0.9884}{0.0033} \text{ (Ekstrak Metanol)}$$

Kontrol : 2.3265625

Medium : 0.183047

Ekstrak	50 µg/mL	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	%Sel Hidup			IC ₅₀	
Air	1.79846875	1.728666667	1.753946429	1.660004167	0.75363196	0.72106766	0.732861	0.689035	476.5 µg/mL
Metanol	1.906238	1.624142	0.557406	0.467031	0.80390882	0.67230446	0.174647	0.13248521	148 µg/mL

Ekstrak	IC ₅₀	IC ₅₀	Rata-rata IC ₅₀
Air	484.3	476.5	480.4 µg/mL
Metanol	143.944444	148	145.9722 µg/mL



Lampiran 4. Sertifikat Bebas Plagiasi

