

**UJI AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN BUNGA MATAHARI  
(*Helianthus annuus* L.) TERHADAP APOPTOSIS, SIKLUS SEL, DAN  
EKSPRESI P53 PADA SEL KANKER SERVIKS *HeLa***

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**MOCHAMAD FIRMAN AMRULLOH**

**14670028**



**JURUSAN FARMASI  
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2018**

**UJI AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN BUNGA MATAHARI  
(*Helianthus annuus* L.) TERHADAP APOPTOSIS, SIKLUS SEL, DAN  
EKSPRESI P53 PADA SEL KANKER SERVIKS *HeLa***

**SKRIPSI**

**Diajukan Kepada:**

**Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan**

**Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang**

**Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam**

**Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S. Farm)**

**JURUSAN FARMASI**

**FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN**

**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM**

**MALANG**

**2018**

**UJI AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN BUNGA MATAHARI  
(*Helianthus annuus* L.) TERHADAP APOPTOSIS, SIKLUS SEL, DAN  
EKSPRESI P53 PADA SEL KANKER SERVIKS *HeLa***

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**MOCHAMAD FIRMAN AMRULLOH**

**14670028**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:**

**Tanggal: 5 Juni 2018**

**Pembimbing I**



**Dr. Roihatul Muti'ah, M. Kes. Apt**  
**NIP. 19800203 200912 2 003**

**Pembimbing II**



**dr. Ana Rahmawati, M. Biomed**  
**NIP. 19741203 200912 2 001**

**Mengetahui,**

**Ketua Jurusan Farmasi**



**Dr. Roihatul Muti'ah, M. Kes. Apt**  
**NIP. 19800203 200912 2 003**

**UJI AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN BUNGA MATAHARI  
(*Helianthus annuus* L.) TERHADAP APOPTOSIS, SIKLUS SEL, DAN  
EKSPRESI P53 PADA SEL KANKER SERVIKS *HeLa***

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**MOCHAMAD FIRMAN AMRULOH**

**14670028**

**Telah Dipertahan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan Untuk  
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S. Farm)**

**Tanggal: 5 Juni 2018**

**Ketua Penguji : drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort. (.....)**  
NIP. 19850720 200912 1 003

**Anggota Penguji : 1. Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt (.....)**  
NIP. 19800203 200912 2 003

**2. dr. Ana Rahmawati, M. Biomed (.....)**  
NIP. 19741203 200912 2 001

**3. Ach Nashichuddin, MA (.....)**  
NIP. 19730705 200003 1 002



**Mengesahkan,**

**Ketua Jurusan Farmasi**

**Dr. Roihatul Muti'ah, M. Kes. Apt**  
NIP. 19800203 200912 2 003

## LEMBAR KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mochamad Firman Amrulloh

NIM : 14670018

Jurusan : Farmasi

Fakultas : Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan

Judul Penelitian : “Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun Bunga Matahari (*Helianthus Annuus* L.) Terhadap Apoptosis, Siklus Sel, dan Ekspresi P53 pada Sel Kanker Serviks *HeLa*”

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

Malang, 27 Desember 2017

Yang membuat pernyataan,



Mochamad Firman Amrulloh

NIM. 14670028

## LEMBAR PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirabbil aalamiin, Puji dan Syukur senantiasa dipanjatkan ke hadirat Allah SWT beserta salawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW. Dengan rasa syukur yang mendalam, penulis persembahkan karya tulisan ini kepada:

Kedua orang tua, almarhum abah H. Nur Khozin dan Ibu Hj. Siti Khoiriyah yang selalu mendoakan, membimbing, dan mendukung sehingga penulis dapat menyelesaikan studi. kakak-adik saya, Mba Nikmatul dan keluarga, Mba Zuhroh dan keluarga, Mas Ahlul dan keluarga, Mas Wahab dan keluarga, Mas Fauzan dan keluarga, Mba Afida dan keluarga, Mas Jazuli, Mas Miftah, Adek Izza dan Faishol yang selalu mendoakan dan memberi semangat untuk menyelesaikan studi. Terimakasih sudah menjadi pendukung utama, penyemangat diri, dan penyenang hati.

Ibu Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt., ibu dr. Ana Rahmawati, M.Biomed. dan bapak drg. Arief Suryadinata, Sp.Ort. yang telah membimbing dan mendukung sehingga dapat terselesaikan tugas akhir ini. Kepada bapak Achmad Nashichuddin, M.A yang telah membimbing dari segi keagamaan. Terimakasih sebanyak-banyaknya telah membimbing dan mendukung hingga terselesaikan tugas akhir ini.

Kepada orang-orang disekitar penulis yang telah mendoakan dan mendukung serta memberi semangat. Tak cukup kata-kata untuk menggambarkan rasa terima kasih kepada semua orang yang telah mendoakan dan memberi dukungan kepada penulis, harapan penulis semoga semua yang telah mendukung diberikan kesehatan dan rezeki oleh Allah SWT.

## KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul **“Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun Bunga Matahari (*Helianthus Annuus L.*) Terhadap Apoptosis, Siklus Sel, dan Ekspresi P53 pada Sel Kanker Serviks *HeLa*”** dengan baik. Shalawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada junjungan kita baginda Rasulullah Muhammad SAW yang telah membawa ajaran agama islam kepada ummatnya sehingga kita dapat membedakan hal yang haq dan yang bathil. Skripsi ini disusun untuk memenuhi tugas akhir sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Seiring terselesaikannya penyusunan skripsi ini, saya haturkan ucapan terima kasih seiring do’a dan harapan jazakumullah ahsanal jaza’ kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Ibu Dr. Roihatul Muti’ah, M.Kes., Apt. selaku ketua Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Roihatul Muti’ah, M.Kes., Apt. dan Ibu dr. Ana Rahmawati, M.Biomed. selaku dosen pembimbing skripsi, yang telah banyak memberikan pengarahan, semangat dalam menyusun skripsi, kesabaran dan pengalaman yang berharga.
3. Bapak drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort. selaku dosen penguji utama dan Bapak Dr. Achmad Nashichuddin, M.A selaku dosen penguji agama.
4. Ayahanda dan Ibunda tercinta yang senantiasa memberikan doa, semangat, dalam menuntut ilmu terutama dalam menyelesaikan penyusunan skripsi ini.

Penelitian ini tidak luput dari bantuan semua pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh Karena itu, penulis menghaturkan terimakasih yang sedalam-dalamnya kepada:

1. Seluruh keluarga besar Abah H. Nur Khozin(alm.) dan Ibu Hj. Siti Choiriah yang telah memberikan segala bentuk fasilitas hingga terselesaikannya penulisan skripsi ini. Tidak lupa dukungan dari kakak-adik saya, Mba Nikmatul dan keluarga, Mba Zuhroh dan keluarga, Mas Ahnul dan keluarga, Mas Wahab dan keluarga, Mas Fauzan dan keluarga, Mba Afida dan keluarga, Mas Jazuli, Mas Miftah, Adek Izza dan Faishol yang memberi semangat tiada henti.

2. Bapak Prof. Dr. Abd Haris, M.,Ag Selaku Rektor Universitas Isalm Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Bapak Prof. Bambang Pardjianto, Sp. B., Sp.BP-RE (K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt. selaku Ketua Jurusan Farmasi, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus Dosen wali atas segala arahan dan nasihat kepada penulis.
5. Para Dosen Pengajar dan Staff Jurusan Farmasi, Dosen dan Staff Fakultas, Serta Dosen dan Staff Kampus UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan bimbingan dan memberikan ilmunya selama menempuh pendidikan di UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
6. Para Dosen dan staff bagian Parasitologi FK Universits Gadjah Mada yang telah membantu selama penelitian.
7. Sahabat penulis teman-teman Farmasi angkatan 2014 khususnya “*Have Fun squad*”(Fathan, Reyhan, Maya, Izza, Mba Rani), Teman-teman tim riset Antikanker dan Fitoestrogen, serta sahabat “Tikus” yang telah membagikan banyak waktu bersama untuk saling membantu dan saling mendukung di setiap kondisi. Semoga senantiasa terjaga persaudaraan kita.
8. Semua rekan penulis dan semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu atas segala bentuk bantuan dan dukungan kepada penulis.

Penulis menyadari adanya kekurangan dan keterbatasan dalam skripsi ini. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi penyempurnaan skripsi ini. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua

Malang, Mei 2018

Penulis

Mochamad Firman Amrulloh

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b>	
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b>	
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b>	
<b>HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN</b>	
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b>	
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	i
<b>DAFTAR ISI</b> .....	iii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	v
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	vi
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	vii
<b>ABSTRAK</b> .....	viii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	6
1.3 Tujuan Penelitian .....	7
1.4 Manfaat Penelitian .....	7
1.5 Batasan Masalah .....	8
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Tinjauan Tentang Tanaman <i>Helianthus annuus</i> .....	9
2.1.1 Pemanfaatan Tanaman Bunga Matahari dalam Perspektif Islam. ....	9
2.1.2 Klasifikasi dan Morfologi Tanaman <i>Helianthus annuus</i> .....	10
2.1.3 Kandungan senyawa dan Bioaktif Tanaman <i>Helianthus annuus</i> .....	12
2.2 Teknik Pemisahan Senyawa Metbolit Sekunder.....	14
2.3 Kanker Serviks .....	16
2.3.1 Patologi Kanker Serviks.....	17
2.3.2 P53 .....	19
2.3.3 Siklus Sel.....	20
2.3.4 Apoptosis.....	22
2.3.5 Kemoterapi.....	24
2.3.6 Cisplatin.....	25
2.4 Kultur Sel.....	27
2.5 Metode <i>Flowcytometry</i> .....	28
2.6 Metode Immunositokimia .....	30
<b>BAB III KERANGKA KONSEPTUAL</b>	
3.1 Bagan Kerangka Konseptual .....	31
3.2 Uraian Kerangka Konseptual .....	32
3.3 Hipotesis Penelitian.....	33
<b>BAB IV METODE PENELITIAN</b>	
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian .....	35
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian .....	35
4.3 Variabel Penelitian.....	35
4.3.1 Variabel Bebas.....	35

4.3.2 Variabel Tergantung.....	36
4.4. Definisi Operasional.....	36
4.5 Alat dan Bahan Penelitian.....	37
4.5.1 Sampel Penelitian .....	37
4.5.2 Alat Penelitian.....	37
4.5.3 Bahan Penelitian .....	37
4.6 Prosedur Kerja.....	38
4.6.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Bunga Matahari.....	38
4.6.2 Identifikasi Senyawa menggunakan Kromatografi Lapis Tipis .....	39
4.6.3 Pembuatan Media Kultur Sel.....	40
4.6.4 Penumbuhan Sel .....	41
4.6.5 Penggantian Media .....	41
4.6.6 Pemanenan Sel.....	41
4.6.7 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT. ....	42
4.6.8 Anlisa Siklus sel dengan <i>Flowcytometry</i> .....	44
4.6.9 Analisa aktivitas Apoptosis dengan <i>Flowcytometry</i> .....	45
4.6.10 Pengukuran Ekspresi P53 dengan Immunositokimia.....	46
4.6.11 Analisis Data.....	47
4.7 Skema Alur Penelitian.....	48
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
5.1 Preparasi Sampel .....	49
5.2 Analisa Kadar Air .....	50
5.3 Ekstraksi Maserasi Daun Bunga Matahari.....	51
5.4 Uji Kromatografi Lapis Tipis.....	53
5.5 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT.....	55
5.6 Analisa Siklus Sel dan Apoptosis dengan <i>Flow cytometry</i> .....	58
5.6.1 Apoptosis.....	60
5.6.2 Siklus sel.....	65
5.6 Analisa Ekspresi p53 dengan immunositokimia .....	68
<b>BAB V PENUTUP</b>	
4.1 Simpulan .....	75
4.2 Saran .....	75
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>76</b>
<b>LAMPIRAN-LAMPIRAN</b>	

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1</b> Tanaman Bunga Matahari.....	11
<b>Gambar 2.2</b> Daun Bunga Matahari.....	11
<b>Gambar 2.3</b> Senyawa bioaktif flavonoid dari <i>Helianthus annuus</i> .....	13
<b>Gambar 2.4</b> Struktur utama Sesquiterpen lakton.....	14
<b>Gambar 2.5</b> Jalur intrinsic dan ekstrinsik mekanisme apoptosis sel .....	23
<b>Gambar 2.6</b> Struktur Cisplatin.....	26
<b>Gambar 2.7</b> Prinsip Flow cytometry .....	29
<b>Gambar 3.1</b> Skema Kerangka Konsep.....	31
<b>Gambar 4.1</b> Skema Alur Penelitian .....	48
<b>Gambar 5.1</b> <i>Moisture Content Analyze</i> .....	51
<b>Gambar 5.2</b> Hasil uji KLT ekstrak daun bunga matahari.....	54
<b>Gambar 5.3</b> Penampakan sel setelah pemberian perlakuan selama 24 jam....	57
<b>Gambar 5.4</b> Hasil <i>flowcytometry</i> analisa apoptosis kontrol sel <i>HeLa</i> .....	61
<b>Gambar 5.5</b> Hasil <i>flowcytometry</i> analisa apoptosis kontrol positif sel <i>HeLa</i> dengan pemberian cisplatin.....	61
<b>Gambar 5.6</b> Hasil <i>flowcytometry</i> analisa apoptosis sel <i>HeLa</i> dengan pemberian ekstrak daun <i>Helianthus annuus</i> .....	62
<b>Gambar 5.7</b> Grafik prosentase apoptosis sel <i>HeLa</i> .....	63
<b>Gambar 5.8</b> Uji Anova nilai apoptosis sel <i>HeLa</i> .....	64
<b>Gambar 5.9</b> Persebaran siklus sel <i>HeLa</i> menggunakan program <i>cell quest</i> ....	66
<b>Gambar 5.10</b> Grafik prosentase persebaran siklus sel <i>HeLa</i> .....	67
<b>Gambar 5.11</b> Hasil pengamatan immunositokimia .....	70

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 5.1</b> Hasil Ekstraksi Daun Bunga Matahari .....	52
<b>Tabel 5.2</b> Hasil uji KLT ekstrak daun bunga matahari pada UV 366 .....	53
<b>Tabel 5.3</b> % Viabilitas sel hidup pada tiap konsentrasi ekstrak daun <i>Helianthus annuus</i> .....	57
<b>Tabel 5.4</b> % Viabilitas sel hidup perlakuan kontrol positif (Cisplatin) tiap konsentrasi .....	58
<b>Tabel 5.5</b> Nilai IC50 menggunakan MTT Assay .....	58
<b>Tabel 5.6</b> Prosentase nilai apoptosis sel kanker serviks <i>HeLa</i> .....	62
<b>Tabel 5.7</b> prosentase persebaran siklus sel <i>HeLa</i> .....	66
<b>Tabel 5.8</b> Hasil uji bed antar perlakuan terhadap siklus sel .....	68
<b>Tabel 5.9</b> nilai ekspresi p53 pada masing-masing perlakuan. ....	71

## DAFTAR SINGKATAN

ATP = *Adenosine- Triphospat*  
BRCA = *Breast Cancer Susceptibility Gene*  
CDK = *Cyclin Dependent Kinase*  
CKI = *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor*  
CtIP = *CtBP-Interacting Protein*  
DMSO = *Dimetil Sulfoksida*  
DNA = *DeoxyriboNucleatic Acid*  
DR = *Death Reseptor*  
ELISA = *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*  
FADD = *Fas- Associative Death Domain*  
FBS = *fetal bovine serum*  
HPV = *Human Papilloma Virus*  
LAF = *Laminar Air Flow*  
LSD = *Least Significant Difference*  
M = *Mitosis*  
MCA = *Moisture Content Analyzer*  
MK = *Media Komplit*  
MTT = *Microculture Tetrazolium Salt*  
PBS = *Phospat Buffer Saline*  
PI = *Propidium Iodide*  
Rb = *Retinoblastoma*  
RPMI = *Rosewell Park Memorial Institute*  
S = *Sintesis*  
SDS = *Sodium Dodesil Sulfat*  
TNF = *Tumor Necrotic Factor*  
UAE = *Ultrasonic Assisted Extraction*  
WHO = *World Health Organisation*

## ABSTRAK

Amrulloh, M. F. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus*) Terhadap Induksi Apoptosis, Siklus Sel, Dan Ekspresi P53 Sel Kanker Serviks *HeLa*.

Pembimbing: (I) Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt.  
(II) dr. Ana Rahmawati, M.Biomed

Bunga matahari (*Helianthus annuus*) selain dijadikan sebagai tanaman hias, juga telah dibuktikan memiliki aktivitas farmakologi antiinflamasi, antinyeri hingga antimalaria. Tanaman tersebut diketahui memiliki kandungan flavonoid dan sesquiterpen lakton yang tinggi sehingga diduga memiliki aktivitas antikanker. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol 96% daun bunga matahari terhadap induksi apoptosis, siklus sel, dan ekspresi p53 pada sel kanker serviks *HeLa*.

Ekstrak daun bunga matahari diperoleh dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan bantuan gelombang ultrasonik. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Pengujian aktivitas menggunakan nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh dengan metode MTT. Analisa induksi apoptosis dan siklus sel menggunakan *Flowcytometer* dan dilakukan pembacaan dengan program *cell quest*. pengukuran ekspresi p53 menggunakan *Immunocytochemistry* dengan pewarna antibodi p53.

Hasil penelitian menunjukkan nilai  $IC_{50}$  Ekstrak daun bunga matahari adalah 377,46  $\mu\text{g/mL}$ ; pemberian ekstrak daun dengan konsentrasi  $IC_{50}$  meningkatkan nilai apoptosis sel yaitu sebesar 7,17 % dibanding dengan kontrol (2,9 %) dan meningkatkan kematian sel secara nekrosis (90,44%). Ekstrak daun bunga matahari menyebabkan penurunan jumlah sel pada fase G0-G1 yakni 33,98% dan meningkatkan jumlah sel pada fase S dan G2-M masing-masing secara berturut-turut 17,45% dan 21,28% serta meningkatkan jumlah sel ke arah sub G0-G1(12,87%). Aktivitas ekstrak terhadap p53 menunjukkan skor 0. Pemberian ekstrak daun bunga matahari meningkatkan apoptosis sel, memengaruhi regulasi siklus sel dan tidak menunjukkan peningkatan ekspresi p53.

**Kata Kunci:** Ekstrak daun bunga matahari, apoptosis, siklus sel, p53, Sel kanker serviks *HeLa*.

## ABSTRACT

Amrulloh, M. F. The Activity of Ethanol 96% Extract of Sunflower Leaves (*Helianthus annuus*) through Induction of Apoptosis, Cell Cycle, and the expression of p53 in Cervical Cancer HeLa Cells.

Advisor: (I) Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt.  
(II) dr. Ana Rahmawati, M.Biomed.

Sunflower (*Helianthus annuus*) in addition to being used as an ornamental plant, it also been proved to have anti-inflammatory pharmacological activities. anti-pain up to anti-malaria. The plant had known to high content of flavonoids and sesquiterpen lactones substances so it was predicted to have an anti-cancer activity. The purpose of this research was to knowing The Activity of Ethanol 96% Extract of Sunflower Leaves (*Helianthus annuus*) through Induction of Apoptosis, Cell Cycle, and the expression of p53 in Cervical Cancer HeLa Cells.

Sunflower extracts were obtained by maceration method using ultrasonic wave. It was using Ethanol 96% as the solvent. The activity test used number of  $IC_{50}$  obtained by MTT assay. The analysis of apoptotic induction and cell cycle used Flowcytometer and read it used cell quest program. p53 expression measurements used immunocytochemistry with p53 colorants antibodies.

The results showed that number of  $IC_{50}$  sunflower leaves extract was 377,46  $\mu\text{g/mL}$ ; Treated of sunflower leaves extract  $IC_{50}$  increased the cell apoptosis that was 7,17 % compared to controls (2,9 %) and increased the cell-lethal necrosis (90,44%). The sunflower extracts caused a decrease in the number of cells in the G0-G1 phase i.e. 33,98% and increased the number of cells in the S phase and G2-M each in consecutive 17,45% and 21,28% as well increased the number of cells to sub G0-G1 phase (12,87%). Activity of the extract towards p53 showed a score of 0. The distribution of sunflower leaf extract improved cell apoptosis, influenced cell cycle regulation and did not indicate an increased p53 expression.

**Keywords:** *Sunflower Leaves extract, apoptosis, cell Cycle, p53, HeLa cervical Cancer Cells.*

## ملخص البحث

أمر الله، محمد فرمان. نشاط استخراج الإيثانول 96% أوراق زهرة الشمس (*Helianthus annuus*) في التعريف الإستماتي ودورة الخلية والتعبير p53 في خلايا سرطان عنق الرحم هيللا.

المشرف: الدكتور ريحة المطيعة الماجستير

أنا رحماتي الماجستير

زهرة الشمس (*Helianthus annuus*) بالإضافة إلى فائدتها كنبات الزينة فلها أنشطة دوائية مضادة للالتهاب وللآلم وللملاريا. واشتهرت أن تلك الزهرة تحتوي على الفلافونويد (*flavonoid*) وسسكويترينين لاكتون (*lactones sesquiterpen*) العالية حتى تشتهر أن لها نشاط مضاد للسرطان. يهدف هذا البحث إلى تحديد نشاط استخراج الإيثانول 96% لورق زهرة الشمس في التعريف الإستماتي ودورة الخلية والتعبير p53 في خلايا سرطان عنق الرحم هيللا.

ويحصل مستخرج أوراق زهرة الشمس بطريقة استخراج ميسيراسي باستخدام أداة الموجات فوق الصوتية. المذيب المستخدم هو الإيثانول 96%. واختبار النشاط باستخدام قيمة  $IC_{50}$  المحسولة بواسطة طريقة MTT. و تحليل التعريف الإستماتي ودورة الخلية باستخدام طريقة *Flowcytometer* وأجريت القراءة باستخدام برنامج *cell quest*. وعملية قياس التعبير p53 باستخدام *Immunocytochemistry* مع الصبغة المضادة للأجسام p53.

أظهرت نتائج البث إلى أن قيمة  $IC_{50}$  مستخرج أوراق زهرة الشمس هي 377,46 مكغ/مليتر. وعملية إعطاء مستخرجات الورق بتركيز  $IC_{50}$  تؤدي إلى زيادة قيمة استماتة الخلايا المبرمجة بقدر 7,17% بمقارنة السيطرة (2,9%) وإلى زيادة موت الخلايا بشكل نخر (90,44%). يؤدي مستخرج أوراق زهرة الشمس إلى انخفاض عدد الخلايا في مرحلة G0-G1 وهي 33,98% وإلى زيادة عدد الخلايا في مرحلة S و G2-M وهما بالمتواليه 17.45% و 21,28% وإلى زيادة عدد الخلايا إلى الاتجاه الفرعي G0-G1 (12,87%). وأظهر نشاط الاستخراج في p53 إلى قيمة 0. يؤدي إعطاء مستخرج أوراق زهرة الشمس إلى زيادة استماتة الخلايا المبرمجة وتؤثر إلى تنظيم دورة الخلية ولم يُظهر نمو تعبير p53.

الكلمات الرئيسية: أوراق زهرة الشمس ، موت الخلايا المبرمج ، دورة الخلية ، p53 ، خلية سرطان عنق الرحم HeL

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Kanker merupakan sekelompok kelainan yang ditandai dengan pertumbuhan sel-sel abnormal yang tidak terkendali. Suatu tumor berasal dari sel tunggal yang mengalami mutasi (Greene & Harris, 2008). Adanya mutasi tersebut menyebabkan terjadinya perubahan baik bentuk, ukuran, maupun fungsi dari sel tubuh yang asli. Mutasi gen dipicu oleh adanya paparan zat asing seperti bahan aditif makanan, radioaktif, oksidan, virus, atau karsinogen yang dihasilkan oleh tubuh secara alamiah. Sel kanker menyusup ke jaringan sekitarnya dan tersebar ke tempat yang lebih jauh melalui pembuluh darah dan pembuluh getah bening (Sumarno, 2008). Adapun tiga ciri utama suatu keberadaan kanker menurut Murray, (2003) diantaranya adalah pertumbuhan yang meningkat atau tidak terbatas, invasi pada jaringan setempat, dan metastasis (Penyebaran) ke bagian tubuh lain.

Kanker serviks merupakan penyebab kematian kedua akibat kanker yang terjadi pada wanita diseluruh dunia, yakni pada angka 240.000 kematian setiap tahunnya. Tiap tahunnya kasus baru dilaporkan sekitar 490.000 kasus kanker serviks. (Liao, 2008). Menurut data World Health Organization (WHO) diperkirakan sebanyak 90% dari 270.000 kematian pada tahun 2015 akibat kanker serviks terjadi di negara berkembang dengan penghasilan rendah hingga menengah (WHO, 2016). Di Indonesia, kanker serviks menjadi kasus kanker dengan

prevalensi tertinggi pada tahun 2013, sedangkan berdasarkan estimasi jumlah penderita kanker serviks terbanyak adalah di Jawa Timur dengan estimasi jumlah 21.313 kasus (InfoDATIN, 2015). Adapun menurut Bruni, *et al.* (2017) kejadian kanker serviks di Indonesia menempati peringkat kedua di dunia untuk jumlah penderita usia antara 15-44 tahun.

Infeksi *Human Papilloma Virus* (HPV) merupakan faktor risiko utama penyebab kanker serviks. HPV adalah kelompok virus yang dapat menginfeksi leher rahim. Infeksi-infeksi HPV sangatlah umum. Virus ini dapat ditularkan dari orang ke orang melalui kontak seksual (Saraswati, 2010). Beberapa tipe HPV dapat menyebabkan perubahan pada sel-sel leher rahim. Perubahan ini dapat menjurus pada kutil-kutil dibagian alat vital, kanker dan masalah-masalah lain (Maharani, 2009). Infeksi dengan HPV mengakibatkan terjadinya integrasi genom DNA HPV dengan *host* sehingga terjadi gangguan atau hilangnya gen virus E2 yang menyebabkan terekspresinya onkogen virus E6 dan E7. Produk E6 dan E7 menghambat aktivitas *tumor suppressor* p53 dan protein Rb (Frazer, 2004). Spesifiknya, sel E6 akan mengikat protein p53 yang merupakan *tumor suppressor* dan terjadinya percepatan degradasi p53 yang diperantarai ubiquitin. *tumor suppressor* p53 memiliki peran penting pada siklus sel, yakni pada transkripsi gen-gen yang terlibat pada fase *checkpoint* siklus sel, meregulasi fase istirahat dalam siklus sel untuk perbaikan DNA, dan proses apoptosis. Inaktivasi p53 menyebabkan terhambatnya proses-proses tersebut dan terjadinya mutasi gen p53 yang menjadi penyebab malignansi (Husnaa, *et al.*, 2017; Dipiro, *et al.*, 2008)

Pada kanker serviks stadium 1 dapat dilakukan penyembuhan dengan kombinasi operasi dan radioterapi; namun apabila sel kanker sudah menyebar hingga keluar panggul (stadium 4) umumnya sangat sulit disembuhkan, sedangkan pasien di negara berkembang umumnya baru melakukan pengobatan saat sudah memasuki stadium 4 (Frazer, 2004). Selama ini pengobatan untuk kanker serviks berupa radioterapi atau berupa pengangkatan rahim, karena kebanyakan pasien datang pada stadium lanjut. Gejala kanker serviks yang kadang tidak terasa membuat banyak wanita di negara berkembang baru menyadari paparan kanker serviks pada *stage* yang sudah tinggi. Pengobatan berupa radioterapi atau pengangkatan rahim tentu menimbulkan risiko yang tinggi misalnya pada radioterapi dapat menyebabkan efek samping seperti ketidaknyamanan, pusing, mual yang berlebihan, hingga kebotakan; sementara dengan pengangkatan rahim akan menyebabkan nyeri, menopause dini, gangguan saluran kencing, serta penurunan kualitas hidup. Oleh sebab itu pengembangan ilmu untuk mengembangkan alternatif pengobatan yang lebih aman dan memberikan efek samping sekecil mungkin perlu dilakukan.

Allah Subhaanahu wa ta'aala menciptakan suatu penyakit kepada manusia berikut menurunkan pula obat(penawar)nya. Sebagaimana disabdakan Rasulullah SAW yang diriwayatkan oleh Ibnu Mas'ud RA. Yang berbunyi:

إِنَّ اللَّهَ لَمْ يَنْزِلْ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً ، عِلْمُهُ مَنْ عِلْمَهُ وَ جَهْلُهُ مَنْ جَهْلُهُ (رواه ابن مسعود)

Artinya: “*Sesungguhnya Allah SWT tidaklah menurunkan sebuah penyakit melainkan menurunkan pula obatnya. Obat itu diketahui oleh orang yang bis mengetahuinya dan tidak diketahui oleh orang yang tidak bisa*

*mengetahuinya*” (HR. Ahmad 1/377,413, dan 453. Dan hadits ini dishahihkan dalam Ash-shahihah no.451)

Berdasarkan ayat diatas, suatu penyakit yang menimpa manusia, maka atas izin Allah-lah penyakit itu akan sembuh. Manusia dianugerahi akal oleh Allah SWT untuk berpikir dalam upaya mencari dan mengembangkan obat sebagai bentuk pertolongan-Nya dalam menyembuhkan suatu penyakit. Disebutkan pula bahwasnya obat itu diketahui oleh orang-orang bisa mengetahuinya dan tidak diketahui oleh orang yang tidak bisa mengetahuinya. Sejak dahulu sudah terdapat profesi yang mendalami dalam pengobatan dan pengembangan obat yang saat ini dikenal sebagai apoteker. Sebagai orang yang mengetahui tentang suatu pengobatan, apoteker bertugas dalam pengembangan obat dan penemuan obat-obat baru mengingat penyakit yang ada juga berkembang pula seiring berkembangnya zaman. Terlebih dari itu Allah juga memberikan petunjuk kepada manusia agar senantiasa memanfaatkan alam yang melimpah di muka bumi ini yang berpotensi untuk dijadikan kebutuhan sehari-hari termasuk dalam pengobatan. Sebagaimana Allah firmankan dalam QS. Asy-Syu'ara ayat 7-8 :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً وَمَا كَانَ أَكْثَرُهُمْ مُؤْمِنِينَ

Artinya: *“dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik? Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat suatu tanda kekuasaan Allah. dan kebanyakan mereka tidak beriman.”* (QS. Asy-Syu'ara 7-8)

Kata *Kariim* digunakan untuk menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatinya. Dalam tafsir Shihab (2012) diartikan bahwa tumbuhan yang baik itu merupakan tumbuhan yang tumbuh subur dan memberikan

manfaat. Dan Allah telah menumbuhkan berbagai tumbuhan yang baik diatas muka bumi ini. Pengembangan bahan alam di Indonesia masih sangat potensial, Indonesia merupakan negara yang kaya akan keanekaragaman hayati. Banyak pula bahan-bahan alam di indonesia yang terbukti berkhasiat sebagai obat-obatan termasuk sebagai antikanker. Beberapa penelitian bahan alam untuk pengembangan obat antikanker telah banyak dilakukan. Penggunaan agen antikanker dari bahan alam dipilih karena dinilai lebih aman dan tidak menimbulkan efek samping yang serius bagi pasien (Kar, 2014).

Bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) merupakan tanaman dalam family *Asteraceae* yang sering dimanfaatkan sebagai tanaman hias. Tetapi beberapa organ dari tanaman ini telah teruji sebagai tanaman obat, seperti bagian biji dan bunganya. Adapun telah dilaporkan bahwa minyak biji bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) memiliki aktivitas anti inflamasi atau penyembuh luka (Markues, 2004); sebagai antikanker, antimalaria, serta diabetes mellitus (Dwivedi & Sharma, 2014;). Berdasarkan penelitian Kamal (2011) bahwa pada daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) terdapat kandungan fenol dan flavonoid paling tinggi dibanding akar dan batang. Penelitian Mirghani *et al.* (2017) membuktikan adanya aktivitas antioksidan dari flavonoid yang diisolasi dari daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.). Seperti diketahui bahwa senyawa flavonoid memiliki potensi aktivitas antioksidan dan antikanker (Ren, *et al.*, 2003). Hasil penelitian lain menunjukkan adanya aktivitas kontraseptif pada ekstrak etanol daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) yang diujikan terhadap tikus wistar (Emamuzo, *et al.*, 2010). Daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) juga memiliki kandungan kimia

sesquiterpen lakton yang telah diuji oleh Muti'ah (2013) dimana kandungan ini memiliki aktivitas sebagai antimalaria. Kandungan sesquiterpen lakton pada daun bunga matahari juga diduga memiliki aktivitas antikanker berdasarkan pendekatan kemotaksonomi famili *Asteraceae* (Kreuger, *et al.*, 2012).

Organ daun dipilih dalam penelitian ini untuk diuji aktivitas antikankernya karena telah diketahui senyawa yang diduga memiliki aktivitas antikanker pada daun bunga matahari terkandung dalam jumlah yang tinggi. Penelitian untuk menunjukkan aktivitas antikanker pada tanaman bunga matahari belum banyak dilakukan sehingga pemanfaatan beberapa bagian tanaman bunga matahari belum maksimal. Oleh sebab itu penting untuk dilakukan penelitian yang membuktikan bahwa organ daun bunga matahari ini memiliki aktivitas antikanker.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas maka dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut.

1. Apakah pemberian ekstrak daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) dapat meningkatkan nilai apoptosis pada sel kanker serviks *HeLa*?
2. Bagaimana gambaran siklus sel kanker serviks *HeLa* setelah pemberian ekstrak daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.)?
3. Apakah ekstrak daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) meningkatkan ekspresi p53 pada sel kanker serviks *HeLa*?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut.

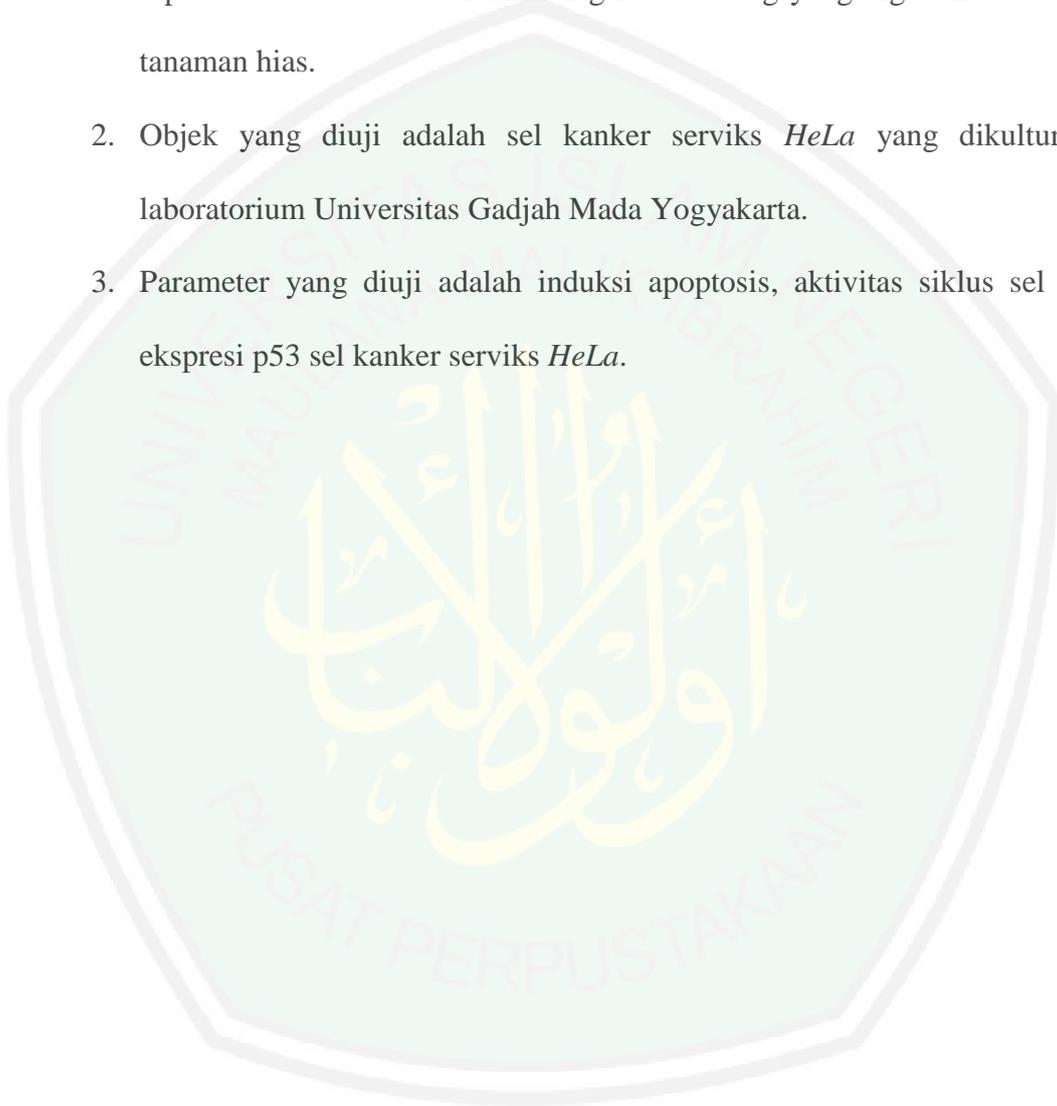
1. Mengungkap ada atau tidaknya aktivitas antikanker ekstrak daun bunga matahari terhadap apoptosis sel kanker serviks *HeLa*.
2. Mendeskripsikan gambaran siklus sel kanker serviks *HeLa* setelah pemberian ekstrak daun bunga matahari.
3. Untuk mengetahui apakah terdapat aktivitas ekspresi p53 pada sel kanker serviks *HeLa* setelah pemberian ekstrak daun bunga matahari.

### 1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi ilmiah tentang adanya aktifitas antikanker ekstrak daun bunga matahari
2. Sebagai bukti ilmiah tentang aktivitas ekstrak daun bunga matahari sebagai kemoprevensi dan kemoterapi ditinjau dari penghambatan siklus sel dan peningkatan apoptosis sel-sel kanker serviks *HeLa* secara in vitro
3. Sebagai dasar penelitian lanjutan untuk pengembangan sediaan obat tradisional, khususnya untuk pengembangan fitofarmaka antikanker yang memanfaatkan tanaman bunga matahari.

### 1.5 Batasan Masalah

1. Bahan yang diujikan adalah ekstrak etanol 96% daun bunga matahari yang diperoleh dari kecamatan Blimbing kota malang yang digunakan sebagai tanaman hias.
2. Objek yang diuji adalah sel kanker serviks *HeLa* yang dikultur di laboratorium Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
3. Parameter yang diuji adalah induksi apoptosis, aktivitas siklus sel dan ekspresi p53 sel kanker serviks *HeLa*.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan Tentang Tanaman *Helianthus annuus*

##### 2.1.1 Pemanfaatan Tanaman Bunga Matahari dalam Perspektif Islam

Tumbuh-tumbuhan yang berada di muka bumi ini diciptakan oleh Allah SWT dengan segala jenis dan bentuknya yang bermacam-macam. Sebagaimana yang telah disebutkan dalam Alqu'an surat Al-An'am/06 : 99, yaitu

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ ۗ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ

Artinya : “Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman.”

Adapun ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT menurunkan hujan dan menciptakan pelbagai jenis tumbuhan yang bermacam-macam, begitu juga disebutkan organ-organ seperti daun yang disebut sebagai sesuatu yang menghijau, tangkai yang menjulang, serta biji-bijian. Di bagian akhir ayat ini disebutkan " انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ " (amatilah buah-buahan yang dihasilkannya). Dalam tafsir Ibnu Katsir dimaknai bahwa pikirkanlah kekuasaan pencipta-Nya, dari tidak ada menjadi ada, dari berbagai ciptaan

Allah berupa berbagai warna, bentuk, rasa, aroma, dan pula manfaatnya (Abdullah, 2003). Pemerintah ini mendorong perkembangan Ilmu Tumbuh-tumbuhan (Botanik) yang sampai saat ini mengandalkan metode pengamatan bentuk luar seluruh organnya dalam semua fase perkembangannya. Semua itu menunjukkan tanda-tanda kekuasaan Allah SWT. Salah satu tanda kebesaran Allah adalah banyaknya tumbuh-tumbuhan yang memiliki manfaat beragam seperti bahan pangan, bahan baku pakaian, perabot rumah tangga hingga khasiat sebagai obat. Salah satu contoh tanaman yang memiliki manfaat beragam adalah tanaman bunga matahari. Selain banyak dibudidayakan sebagai tanaman hias, tanaman bunga matahari juga telah terbukti memiliki manfaat pengobatan.

### **2.1.2 Klasifikasi dan Morfologi Tumbuhan Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L.)**

*Helianthus annuus* (bunga matahari) merupakan tanaman herba yang termasuk dalam famili Compositae (Asteraceae) yang diduga berasal dari Amerika Utara, tapi sekarang dijumpai di daerah tropika dan penyebarannya makin meluas ke beberapa negara Subtropika. Di Indonesia, pada tahun 1919 mulai ditanam di Jawa, *Helianthus annuus* sudah meluas di seluruh wilayah nusantara baik sebagai tanaman hias, tanaman komoditi maupun sebagai tanaman yang berfungsi untuk pengobatan (Rukmana, 2004)

Adapun klasifikasi tanaman bunga matahari adalah sebagai berikut.

Kingdom : Plantae  
Subkingdom : Tracheobionta  
Superdivisio : Spermatophyta

Divisio	: Magnoliophyta
Classis	: Magnoliopsida
Subclassis	: Asteridae
Ordo	: Asterales
Familia	: Asteraceae
Genus	: <i>Helianthus</i>
Species	: <i>Helianthus annuus</i> (Steenis, 1978)



**Gambar 2.1.** Tanaman Bunga Matahari



**Gambar 2.2.** Daun Bunga Matahari

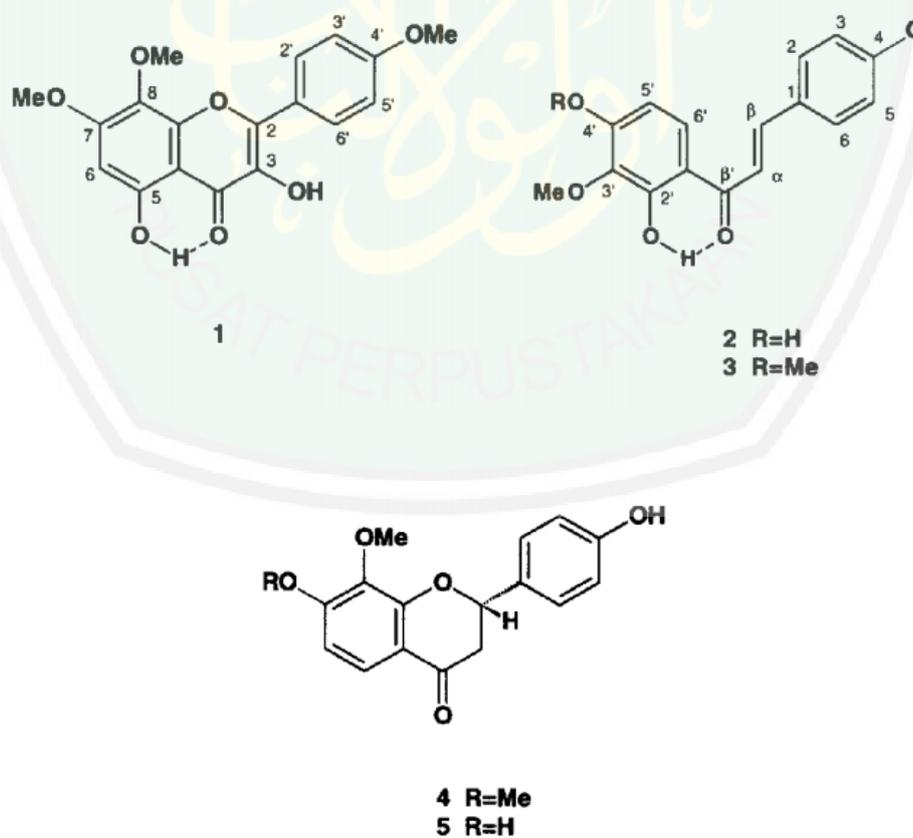
*Helianthus annuus* merupakan tanaman herba berasal dari Amerika Utara. *Helianthus annuus* berbatang basah (*herbaceus*) tumbuh tegak setinggi 0,3 sampai 5 meter. Seluruh permukaan batang berkulit kasar dan memiliki bulu. Bertangkai panjang. Helaian daunnya hijau berbentuk jantung, ujungnya runcing, panjang 10-25cm. Untuk bunganya, ukurannya besar berbentuk cawan dengan mahkota seperti pita kuning di sepanjang tepi cawan. Di tengah cawan itu terdapat bunga-bunga kecil berbentuk tabung dengan warna coklat. Bila dibuahi, bunga-bunga kecil ini menjadi biji-bijinya yang berwarna hitam

bergaris-garis putih itu berkumpul di dalam cawan. Memiliki sistem perakaran tunggang (Tjitrosoepomo, 2003; Rukmana, 2004).

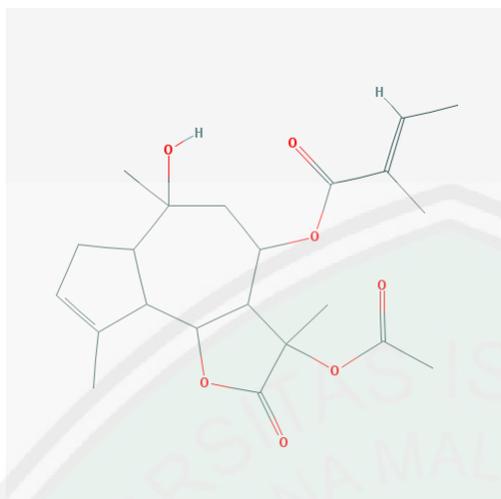
### 2.1.3 Kandungan Senyawa dan Bioaktivitas Tanaman Bunga Matahari

Penggunaan tanaman bunga matahari di masyarakat sangat luas, mulai dari makanan hingga bahan untuk agen pengobatan. Penggunaan sebagai pengobatan antara lain penyembuhan luka, mengatasi nyeri dada dan gangguan paru, meringankan rematik dan mengatasi asma (Saini & Sharma, 2011). Subashini & Rakshitha, (2012) telah mengevaluasi bahwa pada tanaman bunga matahari terkandung senyawa karbohidrat, flavanoid, tanin, alkaloid, saponin, fitosterol, steroid dan minyak. Sedangkan Macias, *et al.* (2008) telah mengisolasi senyawa glikosida ent-kurane bernama Helikauranoside A, senyawa sesquiterpen lakton yakni Annulide E dan tiga senyawa diterpenoid ent-kaurane lain yakni; asam kaur-16-en-19-oat; asam grandiflorat dan paniculoside IV. Telah diisolasi pula senyawa sesquiterpen lakton dari ekstrak etanol dari daun dan batang bunga matahari oleh Spring, *et al.* (1982) dan teruji memiliki aktivitas inhibisi pertumbuhan pada tanaman (*Allelopathy*). Kandungan sesquiterpen lakton juga telah diuji oleh Muti'ah (2013) dimana kandungan ini memiliki potensi sebagai antimalaria. Berdasarkan penelitian Kamal (2011) bahwa pada daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) terdapat kandungan fenol dan flavonoid paling tinggi dibanding akar dan batang. Penelitian Mirghani *et al.* (2017) membuktikan adanya aktivitas antioksidan dari flavonoid

yang diisolasi dari daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.). Senyawa golongan sesquiterpen lakton dan flavonoid diketahui memiliki aktivitas sebagai antikanker (Ren, *et al.*, 2003; Ghantous, *et al.*, 2010). Senyawa sesquiterpen lakton phartenolide dapat memediasi apoptosis pada sel leukemia dengan menghambat NF- $\kappa$ B dan mengaktivasi p53 untuk apoptosis (Guzman, *et al.*, 2014). Mekanisme dari kandungan flavonoid ini juga telah diteliti dapat menjadi alternatif agen antikanker melalui berbagai mekanisme. Seperti inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis bergantung p53 dan atau tidak bergantung p53, maupun antioksidan (Ren, *et al.*, 2003; Lazaro, 2002).



**Gambar 2.3** Senyawa bioaktif flavonoid dari *Helianthus annuus* (Macias, *et al.*, 1997)



**Gambar 2.4** Struktur utama Sesquiterpen lakton

## 2.2 Teknik Pemisahan Metabolit Senyawa Sekunder

Ekstrak adalah sediaan padat yang diperoleh dari menyari zat aktif dari tanaman atau hewan dengan menggunakan pelarut yang sesuai kemudian dilakukan penguapan terhadap pelarut tersebut sedemikian hingga tersisa massa serbuk atau ekstrak sesuai baku yang ditetapkan (Depkes RI, 1995). Ekstraksi adalah suatu proses untuk mendapatkan kandungan kimia dari suatu tanaman dan hewan dengan menggunakan pelarut atau penyari yang sesuai. Pelarut yang biasa digunakan adalah air, etanol, atau campuran dari keduanya (Depkes RI, 1995).

Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industry (Agoes, 2007). Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses

ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil.

Ekstraksi sonikasi merupakan metode non thermal yang digunakan dalam proses peningkatan rendemen ekstraksi dan pengurangan waktu ekstraksi senyawa-senyawa polifenol, antosianin, aromatik, polisakarida, dan senyawa fungsional lainnya (Vilkhu, et al., 2006). Metode ini menggunakan gelombang ultrasonik yaitu gelombang akustik dengan frekuensi lebih besar dari 20 kHz (Suslick, et al., 1986). Alat yang digunakan pada metode ini disebut dengan sonikator.

Prinsip kerja ekstraksi sonikasi adalah perambatan gelombang ultrasonik dari sumber getaran sonikator dalam medium pelarut secara longitudinal. Gelombang tersebut jika merambat melalui medium cair menyebabkan molekul air mengalami peregangan dan membentuk gelembung-gelembung mikro yang jika terus menerus menerima energi dari gelombang ultrasonik akan pecah sambil melepaskan energi yang besar yang disebut kavitasi. Kavitasi dengan energi besar akan menumbuk dinding sel bahan yang akan diekstrak dan memperbesar diameter pori. Akibat dari pori bahan yang

membesar, pelarut akan dengan mudah melarutkan senyawa yang terdapat pada bahan dengan proses difusi (Santos, et al., 2009).

### 2.3 Kanker serviks

Kanker adalah sekelompok penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan yang tidak terkendali pada sel tubuh tertentu yang berakibat merusak sel dan jaringan tubuh yang lain, bahkan sering berakhir pada kematian. Kondisi ini disebut sebagai penyakit keganasan. Kanker serviks adalah tumor ganas yang tumbuh di daerah leher rahim(serviks). Penyebaran sel kanker serviks dapat melalui pembuluh darah maupun pembuluh getah bening. Kanker leher rahim ini merupakan keganasan yang terjadi pada leher Rahim yang merupakan bagian terendah dari rahim yang menonjol ke puncak vagina. Kanker ini biasanya tumbuh secara lambat dan tidak memiliki gejala, namun dapat dideteksi dengan melakukan pemeriksaan *Pap Smear* (Depkes RI, 2009).

Kanker serviks menduduki urutan tertinggi di Negara berkembang dan urutan ke 10 di negara maju atau urutan ke 5 secara global. Di Indonesia, kanker serviks menduduki urutan pertama dari 10 kanker terbanyak ditemukan di 13 Laboratorium Patologi di Indonesia (Kemenkes RI, 2015). Tujuh dari 10 (70%) dari semua kasus kanker serviks dilaporkan di seluruh dunia disebabkan oleh dua jenis HPV: 16 dan 18. Sebanyak 90% dari kanker serviks adalah kanker sel skuamosa pada zona transformasi ectocervix dan 10% merupakan

adenokarsinoma yang timbul dalam lapisan kolumnar kelenjar endocervix (WHO, 2014).

Infeksi HPV (*Human Papilloma Virus*) merupakan penyebab utama kanker serviks. Virus ini bersifat spesifik dan hanya akan tumbuh dalam sel manusia terutama pada epitel mulut rahim atau sel-sel dilapisan permukaan. Virus HPV yang paling sering menyebabkan kanker adalah HPV tipe 16 dan 18 yang bekerja melalui sekuensi gen E6 dan E7 dengan mengkode pembentukan protein-protein yang penting (Shinta *et al*, 2010).

### 2.3.1 Patofisiologi Kanker Serviks

Perjalanan penyakit karsinoma serviks merupakan salah satu model karsinogenesis yang melalui tahapan atau multistep, dimulai dari karsinogenesis awal sampai terjadinya perubahan morfologi hingga menjadi kanker invasive. HPV merupakan factor inisiator kanker serviks. Onkoprotein E6 dan E7 yang berasal dari HPV merupakan penyebab terjadinya degenerasi keganasan. Onkoprotein E6 akan mengikat p53 sehingga Tumor suppressor Gene (TSG) p53 akan kehilangan fungsinya. Sedangkan onkoprotein E7 akan mengikat TSG Rb, ikatan ini menyebabkan terlepasnya E2F yang merupakan factor transkripsi sehingga siklus sel berjalan tanpa kontrol (Shinta *et al*, 2010).

Ikatan antara protein E6 dan gen p53 akan menyebabkan p53 tidak berfungsi sebagai gen supresi tumor yang bekerja di fase G1. Gen p53 akan menghentikan siklus sel di fase G1 dengan tujuan agar sel dapat memperbaiki

kerusakan sebelum berlanjut ke fase S. mekanisme kerja p53 adalah dengan menghambat kompleks CdK-cyclin yang akan menstimulasi sel untuk memasuki fase selanjutnya. Sehingga jika E6 berikatan dengan p53 maka sel terus bekerja sehingga sel akan terus membelah dan menjadi abnormal (Shinta *et al*, 2010).

Protein retinoblasma (pRb) dan gen lain yang menyerupai pRb (p130 dan p107) berfungsi mengontrol ekspresi sel yang diperantarai oleh E2F. Ikatan pRb dengan E2F akan menghambat gen yang mengatur sel keluar dari fase G1. Jika protein berikatan dengan protein E7 dari HPV maka E2F tidak terikat sehingga menstimulasi proliferasi sel yang melebihi batas normal sehingga sel tersebut menjadi sel karsinoma (Shinta *et al*, 2010).

Menurut *National Cancer Institute* (NCI) (2012), stadium kanker serviks didasarkan pada perkembangan dan persebaran sel-sel kanker, diantaranya : stadium I dimana sel-sel kanker hanya ditemukan di organ leher Rahim pasien; pada stadium II sel-sel kanker tumbuh hingga bagian atas serviks dan mulai berinvasi ke jaringan sekitar namun bukan bagian dinding pelvis; pada stadium III tumor membesar dan mengganggu saluran kencing pasien, sel-sel tumor sudah berinvasi ke dinding pelvis atau bagian bawah vagina; sedangkan pada stadium IV sel-sel tumor berinvasi hingga *bladder* atau rectum, dan atau sel-sel tersebut telah menyebar ke organ tubuh lain (metastasis) seperti paru-paru.

### 2.3.2 P53

P53 merupakan suatu polipeptida yang diekspresikan atau dikode oleh genP53 yang berperan dalam menjaga keutuhan sel atau integritas genom melalui jalur transkripsi tetramerik. p53 ini ditemukan dalam jumlah yang sangat rendah pada sel yang tidak terpapar oleh stressor. Namun, apabila terjadi suatu stressor, baik berupa hipoksia, kerusakan pada integritas seluler dan onkogen yang tidak sesuai, maka p53 tersebut akan diekspresikan dalam jumlah yang lebih tinggi untuk mengaktifkan berbagai jalur menuju ke arah modifikasi pascatranslasi protein dan stabilisasi (Syaifudin, 2007). P53 memiliki peranan yang penting dalam pengaturan siklus sel dengan melakukan kontrol terhadap sejumlah gen, termasuk gen untuk apoptosis jika terdapat kerusakan seluler yang berat. Peran p53 dalam proses apoptosis ini, terutama melibatkan mitokondria sebagai peran utama melalui pembebasan sitokrom c. Efek proapoptosis oleh p53 diperantarai melalui peningkatan sintesis Bax. Selanjutnya protein Bax tersebut akan mendorong pelepasan sitokrom c pada mitokondria, yang akhirnya akan membentuk suatu kompleks dengan *Apoptosis Inducing Factor-1* (APAF-1), prokaspase-9 dan *Adenosine- Triphospat* (ATP). Komplek tersebut mengakibatkan terjadinya aktivasi prokaspase-9 menjadi kaspase-9. Kemudian kaspase-9 akan memicu aktivasi dari kaspase-3. Kaspase-3 merupakan kaspase terakhir atau eksekutor yang memecah DNA dan substrat lainnya sehingga mengakibatkan terjadinya kematian sel (Kumar, *et al.*, 2005).

Pada sel yang mengalami mutasi atau kehilangan P53, maka sel tidak akan mampu mengekspresi p53 atau dapat terjadi ekspresi p53 secara

berlebih (*overekspresi* p53) namun tidak dapat bekerja sebagai pengaktivasi proses transkripsi pada beberapa gen target seperti gen *inhibitor cyclin-dependent kinase* CDKN1A (P21) dan GADD45. Sehingga tidak terjadi aktivasi p21, yang mengakibatkan siklus sel tidak berhenti pada akhir fase G1 dan tidak terjadi aktivasi GADD45, yang mengakibatkan perbaikan DNA tidak terjadi. Ditambah lagi, pada sel yang mengalami mutasi atau kehilangan gen P53, tidak adanya aktivasi pada gen apoptosis yaitu BAX mengakibatkan sel gagal mengalami apoptosis. Pada akhirnya, semua hal tersebut berdampak pada terfiksasinya mutasi pada sel yang membelah, khususnya DNA sehingga sel akan masuk menuju proses menuju transformasi ganas (Kumar, *et al.*, 2005).

### 2.3.3 Siklus Sel

Siklus sel merupakan proses vital dalam kehidupan setiap organisme. Secara normal, siklus sel menghasilkan pembelahan sel. Pembelahan sel terdiri dari 2 proses utama, yaitu replikasi DNA dan pembelahan kromosom yang telah digandakan ke 2 sel anak. Secara umum, pembelahan sel terbagi menjadi 2 tahap, yaitu mitosis (M) (pembelahan 1 sel menjadi 2 sel) dan interfase (proses di antara 2 mitosis). Interfase terdiri dari fase gap 1 (G1), sintesis DNA (S), gap 2 (G2) (Muti'ah, *et al.*, 2018).

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

- a. Cyclin. Jenis cyclin utama dalam siklus sel adalah cyclin D, E, A, dan B. Cyclin diekspresikan secara periodik sehingga konsentrasi cyclin berubah-ubah pada setiap fase siklus sel. Berbeda dengan cyclin yang lain, cyclin D tidak diekspresikan secara periodik akan tetapi selalu disintesis selama ada stimulasi *growth factor*.
- b. Cyclin-dependent kinases (Cdk). Cdk utama dalam siklus sel adalah Cdk 4, 6, 2, dan 1. Cdks merupakan treonin atau serin protein kinase yang harus berikatan dengan cyclin untuk aktivasinya. Konsentrasi Cdks relatif konstan selama siklus sel berlangsung. Cdks dalam keadaan bebas (tak berikatan) adalah inaktif karena *catalytic site*, tempat ATP dan substrat berikatan diblok oleh ujung C-terminal dari CKIs. Cyclin akan menghilangkan pengeblokan tersebut. Ketika diaktifkan, Cdk akan memacu proses *downstream* dengan cara memfosforilasi protein spesifik.
- c. Cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI), merupakan protein yang dapat menghambat aktivitas Cdk dengan cara mengikat Cdk atau kompleks cyclinCdk. Cyclin-dependent kinase inhibitor terdiri dari dua kelompok protein yaitu INK4 (p15, p16, p18, dan p19) dan CIP/KIP (p21, p27, p57). Keluarga INK4 membentuk kompleks yang stabil dengan Cdk sehingga mencegah Cdk mengikat cyclin D. INK4 bertugas mencegah progresi fase G1. Keluarga CIP/KIP meregulasi fase G1 dan S dengan menghambat kompleks G1 cyclin-Cdk dan cyclin B-Cdk1. Protein p21 juga menghambat sintesis DNA dengan menonaktifkan *proliferating cell nuclear antigen*

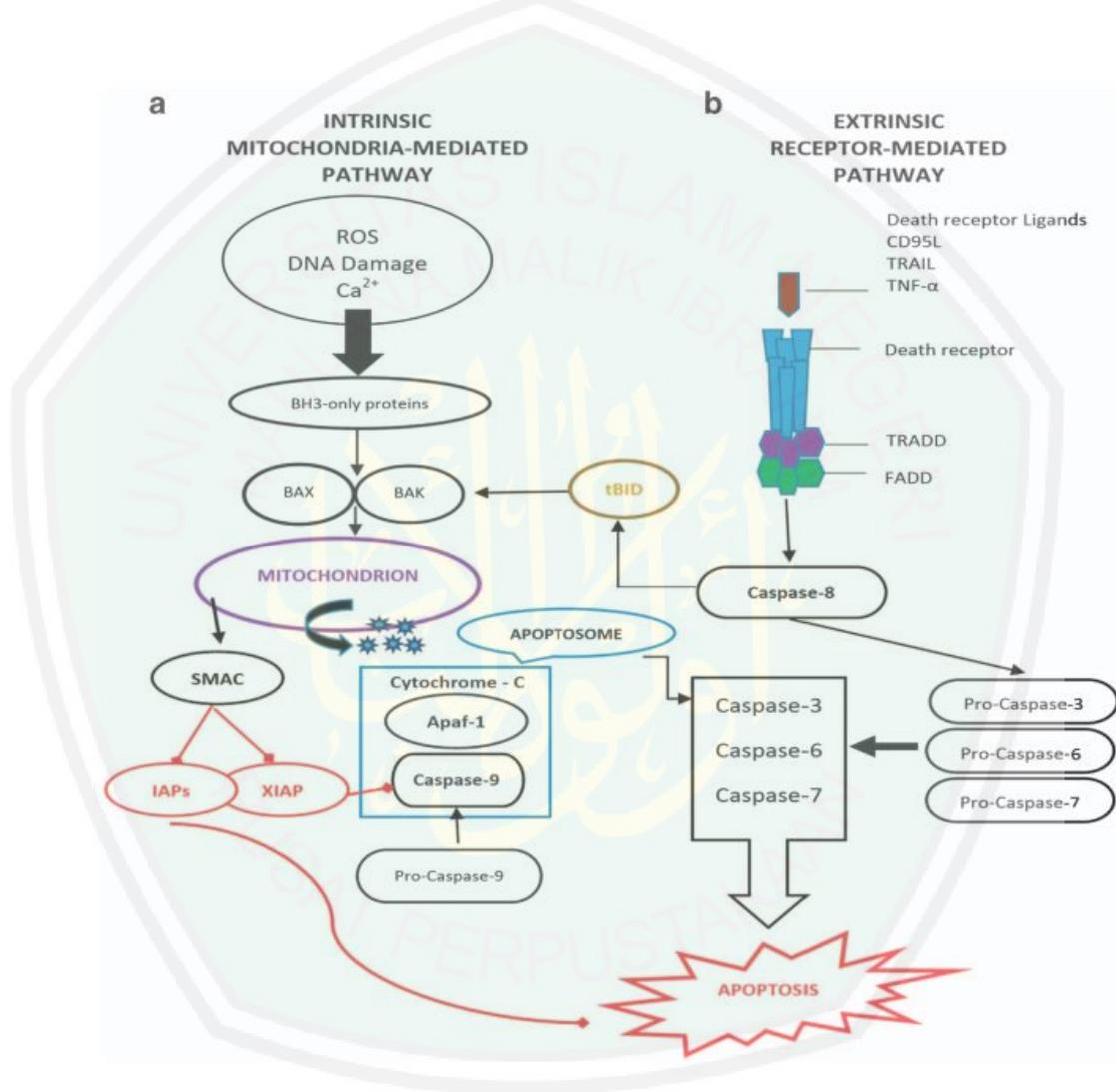
(PCNA). Ekspresi p21 diregulasi oleh p53 karena p53 merupakan faktor transkripsi untuk ekspresi p21 (Vermeulen *et al.*, 2003).

#### 2.3.4 Apoptosis

Apoptosis adalah kematian sel yang terprogram dan dapat terjadi pada keadaan fisiologis maupun patologis. Pada keadaan fisiologis, apoptosis untuk menjaga homeostasis jaringan pada hewan dewasa, pada sistem imun dimana sel B dan sel T mati selama proses maturasi serta untuk menghilangkan sel yang terinfeksi maupun sel yang rusak (Elmore, 2007). Apoptosis merupakan program bunuh diri intra seluler yang dilakukan dengan cara mengaktifkan protein kaspase, yang merupakan suatu sistein protease (Kumar dkk., 2010).

Secara umum, terdapat dua jalur utama dalam proses apoptosis, yaitu: jalur intrinsik dan ekstrinsik. Jalur intrinsik meliputi pemberian kode yang memicu proses *mitokondria-dependent* melalui pelepasan sitokrom c dan pengaktifan kaspase-9. Jalur ekstrinsik bekerja dengan cara mengaktifkan reseptor kematian atau *Death Reseptor* (DR), seperti Fas (reseptor 1 *Tumor Necrotic Factor* (TNF)), DR4 dan DR5 (Bai & Zhu, 2006). Adanya interaksi dengan ligan yang sesuai akan mengarah kepada proses transduksi sinyal yang diawali dengan peliputan molekul yang berhubungan dengan DR seperti *Fas-Associative Death Domain* (FADD), yang selanjutnya akan mengaktifkan kaspase-8. Kaspase ini kemudian mengkatalis sederet proses proteolitik yang menghasilkan perubahan biokimia dan morfologi khas yang berhubungan

dengan apoptosis. Selain itu, apoptosis juga merupakan suatu proses yang aktif, di mana menginduksi gen seperti BAX dan ekspresi antigen Fas maupun represi atau penekanan simultan gen seperti BCL2 (Kumar, *et al.*, 2005).



**Gambar 2.5** Jalur intrinsik dan ekstrinsik mekanisme terjadinya apoptosis sel (Baig, *et al.*, 2016)

### 2.3.5 Kemoterapi

Kemoterapi merupakan penggunaan obat berbobot molekul rendah yang secara selektif menghancurkan tumor atau setidaknya membatasi pertumbuhannya. Penggolongan kemoterapi secara umum terbagi dalam 5 mekanisme antara lain antimetabolite, *DNA-Interactive Agent*, Antitubulin, *Molecularly targeted agent*, dan terapi hormonal (Thurston, 2006).

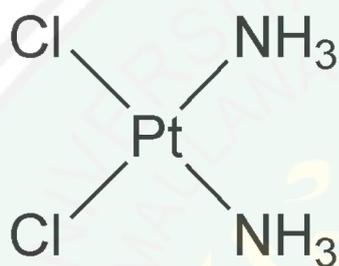
Salah satu keuntungan dari kemoterapi adalah bahwa, setelah pemberian intravena, obat-obat dengan berat molekul rendah didistribusikan ke sebagian besar jaringan tubuh dan juga dapat membunuh sel tumor di area yang dilindungi (misalnya, otak) atau sel-sel itu dalam proses metastasis. Namun, kerugian dari banyak agen sitotoksik termasuk efek samping yang tidak menyenangkan, seperti supresi sumsum tulang, lesi saluran GI, rambut rontok, mual, dan perkembangan resistensi klinis yang cepat. Efek samping terjadi karena agen sitotoksik, seperti obat DNA-interaktif, inhibitor tubulin, dan antimetabolites, bertindak pada kedua sel tumor (sering memicu apoptosis) dan sel-sel sehat. Mekanisme aksi mereka termasuk pengambilan dan tindakan yang berbeda secara lebih cepat dalam sel kanker yang lebih cepat membelah. Mekanisme alternatif termasuk dalam kasus agen-agen yang berinteraksi dengan DNA, kurangnya kemampuan sel-sel kanker untuk memperbaiki DNA. Efek samping mencerminkan fakta bahwa sel-sel sumsum tulang, saluran pencernaan, dan folikel rambut membelah pada tingkat yang lebih cepat daripada kebanyakan jaringan sehat. Beberapa keluarga agen baru, seperti inhibitor kinase, jauh lebih selektif untuk sel kanker. Mereka dapat diberikan secara oral dan memiliki efek samping beracun jauh lebih sedikit (Thurston, 2006).

### 2.3.6 Cisplatin

Cisplatin atau cisplatinum atau *cis* diamminedichloroplatinum(II) adalah obat kemoterapi kanker yang berbasis logam platinum. Pada dasarnya senyawa turunan platinum yang menunjukkan antitumor/antikanker telah ribuan yang disintesis. Tetapi hanya 28 dari mereka yang telah diujicoba secara klinis dan hanya 2 yang sangat aktif yaitu cisplatin itu sendiri dan carboplatin (Rebecca, et al., 2006).

Struktur kimia cisplatin adalah *cis*-PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Senyawa ini pertama kali ditemukan oleh M. Peyrone (1845) yang berasal dari garam Peyrone dan strukturnya ditentukan kemudian oleh Alfred Werner (1893). Senyawa cisplatin ini disintesis dengan memanfaatkan efek trans antara potassium tetrachloroplatinate(II), K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> dengan ligan amina (NH<sub>3</sub>). Struktur kimia yang terbentuk ini sesuai dengan syarat struktur klasik untuk menjadikan logam platinum memiliki aktivitas anti kanker, yaitu (1) Bilangan oksidasi Pt +2 atau +4, (2) Ligan amina harus dalam posisi *cis*, (3) Muatan total senyawa kompleks platinum harus netral, (4) Ligan amina (NH<sub>3</sub>) harus memiliki sedikitnya satu gugus N-H yang tersisa, dan terakhir (5) Gugus pergi harus anion yang kekuatan ikatannya medium seperti klorida atau turunan karboksilat. Cisplatin bekerja sebagai anti kanker dengan cara menempelkan diri pada DNA (*deoxyribonucleic acid*) sel kanker dan mencegah pertumbuhannya (Rebecca, et al., 2006). Secara umum, cisplatin dan senyawa berbasis platina lainnya dianggap sebagai obat sitotoksik yang membunuh sel kanker dengan merusak DNA, menghambat sintesis DNA dan mitosis, dan menyebabkan kematian sel

apoptosis. Beberapa mekanisme aksi molekuler termasuk induksi stres oksidatif yang ditandai dengan produksi spesies oksigen reaktif dan peroksidasi lipid, induksi sinyal p53 dan penangkapan sel siklus, menurunkan regulasi protein protoonkogen dan anti apoptosis, dan pengaktifan jalur intrinsik dan ekstrinsik apoptosis (Dasari & Tchounwou, 2014).



**Gambar 2.6** Struktur Cisplatin (Rebecca, *et al.*, 2006)

Cisplatin sebagaimana obat-obat umum lain yang digunakan untuk kemoterapi, juga mempunyai efek samping yang parah. Termasuk didalamnya Nefrotoksisitas yang sangat kronis dan berbahaya, tetapi nefrotoksisitas ini dapat diminimalisasi dengan cara hidrasi sang pasien dan menggunakan manitol untuk diuretic. Selain itu efek samping yang lain adalah neurotoksisitas, mual, muntah, keracunan sumsum tulang, kerontokan rambut (alopecia), dan penurunan kekebalan tubuh. Namun untungnya untuk kerontokan rambut dan penurunan kekebalan tubuh umumnya akan kembali normal setelah pengobatan (Rebecca, *et al.*, 2006).

## 2.4 Kultur Sel

Sel HeLa adalah sel yang berasal dari sel-sel kanker serviks yang diambil dari seorang penderita kanker serviks bernama Henrietta Lacks. Sel ini bersifat immortal dan produktif sehingga banyak digunakan dalam penelitian ilmiah. Sel HeLa mengalami transformasi akibat infeksi *Human Papilloma Virus* 18 (HPV 18). Sel kanker leher rahim yang diinfeksi HPV diketahui mengekspresikan 2 onkogen yaitu E6 dan E7. Protein E6 dan E7 terbukti dapat menyebabkan sifat immortal pada kultur primer keratinosit manusia, namun tidak bersifat tumorigenik hingga suatu proses genetic terjadi. Jadi, viral onkogen secara tidak langsung menginduksi pembentukan tumor, tetapi menginduksi serangkaian proses yang pada akhirnya dapat menyebabkan sifat kanker. Protein dari E6 dan E7 dari HPV memodulasi protein seluler yang mengatur daur sel. Protein E6 berikatan dengan tumor supresor protein p53 dan mempercepat degradasi p53 yang diperantarai ubiquitin. Protein E6 juga menstimulasi aktivitas enzim telomerase. Sedangkan protein E7 dapat mengikat bentuk aktif terhipofosforilasi dari p105Rb dan anggota yang lain dari family Rb. Ikatan ini menyebabkan destabilisasi Rb dan pecahnya kompleks Rb/E2F yang berperan menekan transkripsi gen yang diperlukan untuk cell cycle progression. Sebagian besar sel kanker termasuk sel HeLa mempunyai gen p53 dan p105Rb dalam bentuk wild type, Jadi gen pengatur pertumbuhan yang aktif dalam sel normal juga terdapat dalam sel kanker leher rahim. Namun aktivitasnya dihambat oleh protein E6 dan E7 dari HPV . (Muti'ah, 2014).

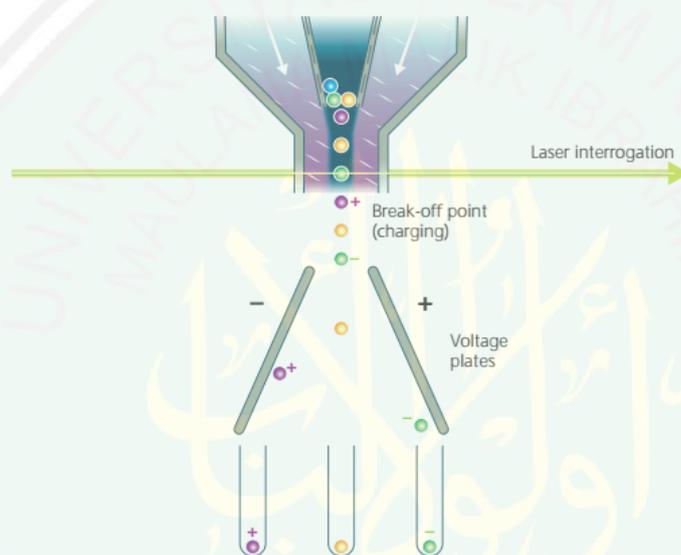
Sel HeLa dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan adalah media RPMI 1640-serum. Didalamnya mengandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan, yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon-hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel. Albumin berfungsi sebagai protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral berfungsi sebagai kofaktor enzim (Muti'ah, 2014).

### **2.5 Metode *Flow cytometry***

*Flow cytometry* merupakan suatu metode yang diaplikasikan untuk mampu menganalisa berbagai komponen seluler (asam nukleat, lemak, protein dll), organel (lisosom, mitokondria dll), bahkan fungsi (viabilitas, aktivitas enzimatis) sel. *Flow cytometry* adalah proses teknis yang memungkinkan pengukuran fluoresensi sel dengan tembakan cahaya. Proses ini dilakukan pada tingkat ribuan sel per detik. Metode ini digunakan untuk memilah-milah suatu sub-populasi sel. *Flow cytometry* memberikan beberapa kemudahan seperti ukuran instrumen yang lebih kecil, analisis yang murah, mudah digunakan, dan dapat digunakan untuk menganalisis data dalam jumlah yang banyak (Brown & Wittwer, 2000).

*Flow cytometry* menyediakan kesempatan untuk menyelidiki efek terapi obat secara in vitro seperti efikasi dari faktor-faktor antitumor untuk mengembangkan terapi baru. Pada onkologi, jumlah DNA sel dan distribusinya pada berbagai fase dalam siklus sel dapat dianalisa untuk mendeteksi sel yang

patologis untuk menentukan prognosis maupun untuk monitoring terapi. Analisa siklus sel dengan *flow cytometry* juga tidak terbatas digunakan pada model eksperimen selain hewan dan famili tumbuhan tingkat tinggi saja, namun juga dapat digunakan untuk meningkatkan pengetahuan pada model eksperimen seperti bakteri, jamur, ataupun alga uniseluler (CCRC UGM, 2009).



**Gambar 2.7** Prinsip *Flow cytometry*

Prinsip kerja *flow cytometry* adalah mengalirkan setiap sel dalam sistem fluida, kemudian ditembak dengan sinar laser. Tembakan sinar laser tersebut akan disebarkan oleh sel berdasarkan aktivasi senyawa fluoresen yang terdapat dalam sel. Setiap sinyal sinar yang disebarkan oleh sel kemudian akan ditransfer menjadi sinyal elektrik yang akan terkumpul dan masuk kedalam detektor. Data pada detektor kemudian dibaca menggunakan suatu program dalam komputer (Brown & Wittwer, 2000).

## 2.6 Metode Immunositokimia

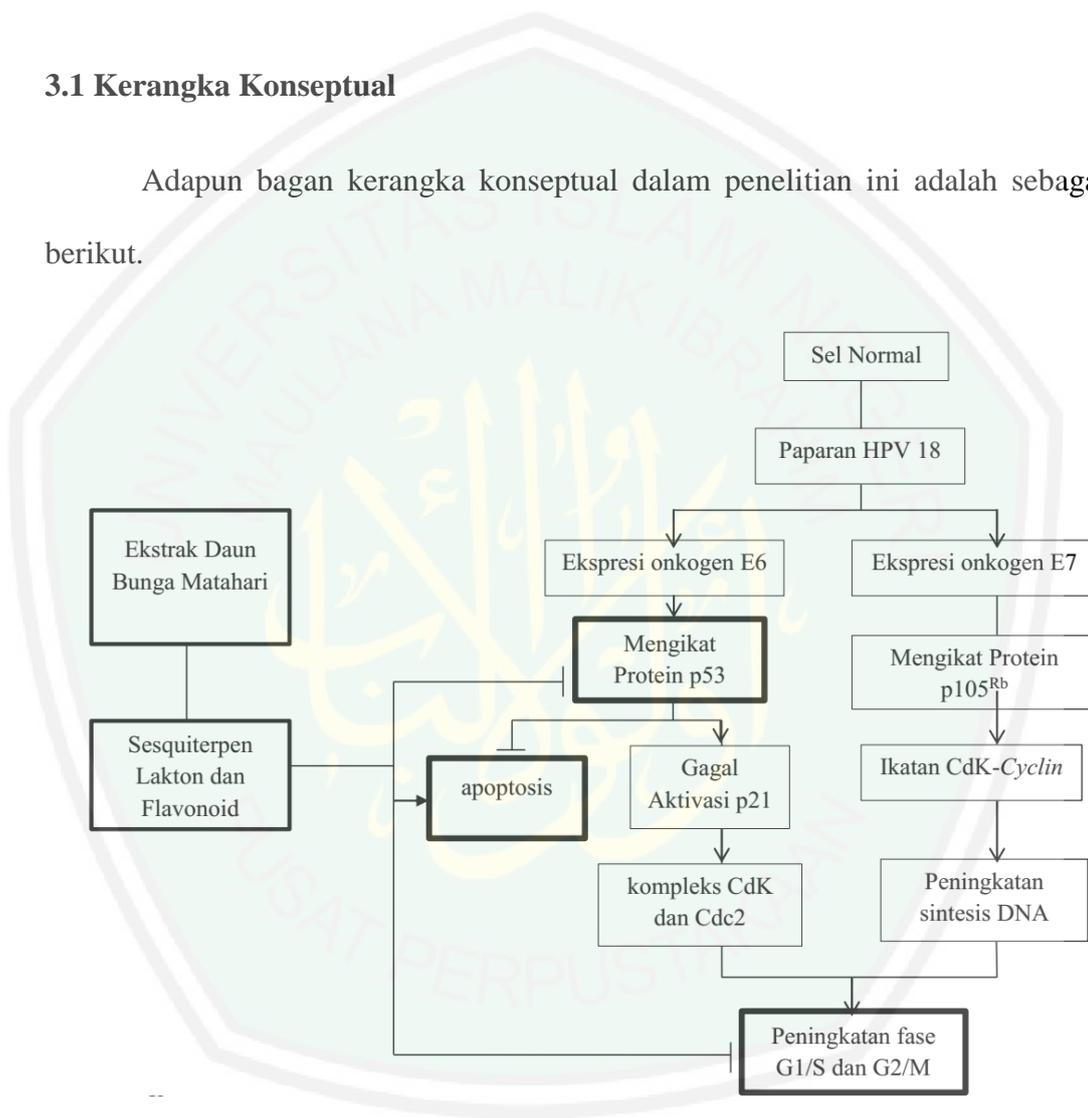
Imunositokimia merupakan suatu metode yang digunakan untuk mendeteksi adanya ekspresi suatu protein spesifik atau antigen dalam sel dengan menggunakan antibodi spesifik yang akan berikatan dengan protein atau antigen. Ada dua jenis metode immunositokimia, yaitu metode langsung dan metode tidak langsung. Pada metode langsung, antibodi yang mengikat fluoresen atau zat warna langsung berikatan dengan antigen pada sel. Sedangkan pada metode tidak langsung, antigen diikat pada antibodi primer secara langsung, kemudian ditambahkan antibodi sekunder yang mengikat enzim seperti peroksidase, alkali fosfatase, atau glukosa oksidase. Antibodi sekunder akan berikatan dengan antibody primer. Selanjutnya ditambahkan substrat kromogen yang akan diubah oleh enzim sehingga terjadi pembentukan warna (pigmen) yang akan mewarnai sel. Untuk menjamin antibodi agar dapat mengikat antigen, sel harus difiksasi dengan ditempelkan pada bahan pendukung padat sehingga antigen akan *immobile*. Ada dua macam metode fiksasi, yaitu pelarut organik dan reagen *cross-linking*. Pelarut organik seperti alkohol dan aseton akan memindahkan lipid, mendehidrasi sel, dan mengendapkan protein. Immunositokimia melibatkan inkubasi sel dengan antibodi. Antibodi akan berikatan dengan antigen atau protein spesifik di dalam sel. Antibodi yang tidak berikatan dipisahkan dengan pencucian, sedangkan antibodi yang berikatan dideteksi secara langsung dengan antibodi primer berlabel, maupun secara tidak langsung dengan antibodi sekunder berlabel enzim atau fluoresen (CCRC UGM, 2009).

**BAB III**

**KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS**

**3.1 Kerangka Konseptual**

Adapun bagan kerangka konseptual dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.



**Gambar 3.1** Skema Kerangka Konsep

Keterangan :

: tidak diteliti

: diteliti

→ : Memicu

—| : Menghambat

### 3.2 Uraian Kerangka Konseptual

Infeksi HPV merupakan penyebab utama kanker serviks. Virus ini bersifat spesifik dan hanya kan tumbuh didalam sel manusia terutama pada epitel mulut Rahim atau sel-sel lapisan permukaan. Jenis HPV yang paling sering menjadi penyebab kanker adalah HPV 16 dan atau HPV 18 yang merupakan *high risk papilloma virus*. Sel kanker leher rahim yang diinfeksi diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yakni E6 dan E7. Protein E6 dan E7 dari HPV memodulasi protein seluler yang mengatur siklus sel. Protein E6 akan berikatan dengan tumor suppressor protein p53 dan mempercepat degradasi p53, sedangkan E7 akan mengikat pRb. Kondisi ini menyebabkan tidak berfungsinya p53 dan pRb sebagai *suppressor tumor*.

Tumor suppressor p53 memiliki peran penting pada siklus sel, yakni pada transkripsi gen-gen yang terlibat pada fase *checkpoint* siklus sel, meregulasi fase istirahat dalam siklus sel untuk perbaikan DNA, dan proses apoptosis. Inaktivasi p53 menyebabkan terhambatnya proses-proses tersebut dan terjadinya mutasi gen p53 yang menjadi penyebab malignansi (Husnaa, *et. Al.*, 2017; Dipiro, *et. Al.*, 2008). Protein E7 mengikat bentuk aktif terhipofosforilasi dari p105Rb dan anggota lain dari famili Rb. Ikatan ini menyebabkan destabilisasi Rb dan pecahnya kompleks Rb/E2F yang berperan menekan transkripsi gen yang diperlukan untuk progresi siklus sel. Pada kondisi ini E2F tidak terikat sehingga menyebbkan proliferasi sel secara tidak terkendali atau menjadi sel karsinoma.

Bunga matahari (*Helianthus annuus L.*) merupakan salah satu tanaman yang termasuk dalam famili asteraceae. Daun bunga matahari diketahui memiliki

kandungan kimia sesquiterpen lakton. Senyawaan sesquiterpen lakton yang juga tinggi pada tanaman asterceae diketahui memiliki aktivitas terapi diantaranya antiinflamasi, antitumor, antimikroba, dan antivirus (Zhang, *et al.*, 2005). Penelitian Mirghani *et al.* (2017) membuktikan adanya aktivitas antioksidan dari flavonoid yang diisolasi dari daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.). Dari adanya kandungan tersebut diperkirakan bahwa senyawa bioaktif yang diekstrak dari daun bunga matahari memiliki potensi sebagai antikanker. Adapun mekanisme yang telah diteliti sebelumnya bahwa sesquiterpen lakton dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker dengan cara inhibisi angiogenesis dan metastasis; regulasi Nf-kB dan p53 *signaling*; dan modulasi kode epigenetik (Ghantous, *et al.*, 2010). Demikian juga flavonoid yang diduga memiliki aktivitas antikanker dengan cara mencegah aktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis, dan juga sebagai antioksidan (Ren, *et al.*, 2003). Penentuan jumlah p53 dalam penelitian ini menggunakan immunositokimia, sedangkan pengujian aktivitas apoptosis dan penghambatan siklus sel menggunakan *flowcytometry*.

### 3.3 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep diatas, dapat dirumuskan hipotesis sebagai berikut.

1. Pemberian ekstrak daun bunga matahari dapat meningkatkan apoptosis sel pada kultur sel kanker serviks *HeLa*
2. Pemberian ekstrak daun bunga matahari mempengaruhi regulasi siklus sel pada kultur sel kanker serviks *HeLa*.

3. Pemberian ekstrak daun bunga matahari meningkatkan ekspresi p53 pada kultur sel kanker serviks *HeLa*.



## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *true experimental post test only control group design* yang bertujuan untuk mengetahui dan membandingkan beberapa kelompok perlakuan. Penelitian ini menggunakan sel kanker serviks HeLa yang dikultur dan diberi perlakuan dengan penambahan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun bunga matahari.

#### **4.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Parasitologi Universitas Gadjah Mada Jogjakarta pada bulan Februari Sampai Maret 2018.

#### **4.3 Variabel Penelitian**

##### **4.3.1 Variabel Bebas**

Variable bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol 96% daun bunga matahari Variable bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak etanol 96% daun bunga matahari.

### 4.3.2 Variable Tergantung

Varibel tergantung dalam penelitian ini adalah nilai ekspresi p53, aktivitas induksi apoptosis dan penghambatan siklus sel pada pertumbuhan kultur sel serviks HeLa.

### 4.4 Definisi Operasional

- a. Daun bunga matahari diperoleh dari daerah Blimbing, Malang
- b. Ekstraksi daun bunga matahari dilakukan dengan cara ultrasonifikasi dan evaporasi dengan etanol 96%, dan ekstraksi dilakukan di Laboratorium Fitofarmasi Jurusan Farmasi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- c. Sel HeLa yang diujikan merupakan hasil kultur sel yang diinfeksi HPV yang dibiakkan di Laboratorium Parasitologi UGM Jogjakarta.
- d. Analisa ekspresi P53 dilakukan menggunakan metode immunositokimia.
- e. Induksi apoptosis merupakan suatu parameter adanya aktivitas antitumor diuji menggunakan *flowcytometry* dengan prinsip kerja menganalisa sel-sel dalam suatu populasi sel.
- f. Analisis siklus sel bertujuan untuk mengetahui adanya aktivitas penghambatan siklus selektif pada sel kanker. Analisa siklus sel juga dilakukan menggunakan flowcytometer berdsasarkan perbedaan jumlah set kromosom pada masing masing fase pada siklus sel.

## 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

### 4.5.1 Sampel Penelitian

Sel HeLa (koleksi Lab. Ilmu Hayati, UGM) ditumbuhkan dalam media RPMI 1640 (Gibco) yang mengandung 10 % v/v Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco), 1% v/v penisilin-streptomisin (Sigma), 0,5% v/v fungison (Sigma) dan 20% Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma).

### 4.5.2 Alat Penelitian

Alat yang dibutuhkan untuk pembuatan ekstrak etanol daun bunga matahari adalah timbangan analitik, gelas erlenmeyer, ultrasonikator, kertas saring, labu evaporasi, rotary evaporator, aliran listrik, botol kaca, oven, freezer, aluminium foil, *Beaker glass* 1000ml, *magnetic stirrer*, pH meter, Filter 0,2 mikron, Botol duran 1000 ml, Pipet Pasteur steril, *conical tube* kertas label, tabung eppendorf , rak tabung eppendorf , vortex , tissue, dan ELISA Reader. 6 *well plate* atau TCD, mikropipet 10, 20, 100, 200, 1000  $\mu\text{L}$  , tabung sentrifus 1,5 mL , rak tabung kecil, sentrifugator, penangas air 37°C, FACS-Calibur, Well plate, cover slip, inkubator, mikroskop, kaca preprat, deck glass.

### 4.5.3 Bahan Penelitian

Bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan ekstrak etanol daun bunga matahari adalah aquades, etanol 96%, dan simplisia daun bunga matahari (*Helianthus annus L.*), Media padat , aquabidest 1000ml ,  $\text{NaHCO}_3$  , HCl/NaOH, PBS , tripsin-EDTA, MK, DMSO, Larutan MTT, SDS 10% dan PBS, PBS , media kultur , Tripsin-EDTA 0,25% , RNase , propidium iodide , triton-X , buangan

basah dan buangan kering, Sampel ekstrak dengan konsentrasi tertentu , media , serum-free , PBS, metanol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, Human antibody p53, FBS 1%, antibody sekunder terbiotinilasi (KPL affinity purified biotin antibody to mouse IgG cat.no.216-1806), Streptavidin HRP, AEC (Aminoethyl Carbazole), dH<sub>2</sub>O, Mayer HE, gelatin 5%.

#### **4.6 Prosedur Kerja**

##### **4.6.1 Pembuatan Ekstrak Etanol daun bunga matahari**

Proses ekstraksi daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) dilakukan di Laboratorium Fitofarmasi Jurusan Farmasi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Adapun langkah kerjanya sebagai berikut.

##### **a. Proses Pengeringan dan Penyerbukan Simplisia**

Proses pengeringan ini dilakukan dengan ditimbang 500 gram daun bunga matahari, dibersihkan kulitnya dan dicuci dengan tujuan untuk menghilangkan debu maupun kotoran yang menempel pada permukaan daun bunga matahari. Pencucian dilakukan menggunakan air yang mengalir lalu ditiriskan. Proses selanjutnya adalah pengeringan menggunakan oven dengan suhu 40-45°C sampai kering. Perlakuan ini bertujuan untuk menghilangkan kadar air dalam daun bunga matahari. untuk mempermudah dalam penyerbukan. Selanjutnya daun yang telah kering di serbuk dengan menggunakan grinder yang dilakukan di Balai Materia Medika Kota Batu. Perlakuan ini bertujuan untuk memperluas permukaan sehingga mudah dalam proses ekstraksi untuk melarutkan kandungan kimia dari simplisia.

### b. Proses Maserasi

Serbuk simplisia tersebut kemudian dimaserasi. Maserasi simplisia daun bunga matahari menggunakan etanol 96% sebagai pelarut. Ekstraksi dengan bantuan alat ultrasonikasi. Ekstraksi sonikasi dilakukan selama 2 menit dengan 3 kali replikasi. Ekstraksi dilakukan dengan perbandingan 1:20 yaitu setiap 25 gram simplisia diekstraksi dengan 500 ml etanol 96%. Etanol dipilih karena selain relatif aman, sebagian besar senyawa organik larut dalam etanol. Penggunaan pelarut dibagi menjadi beberapa bagian untuk memaserasi serbuk, Setiap selesai maserasi, filtrat dikumpulkan sedangkan sisa endapan dilakukan maserasi lagi menggunakan pelarut yang baru hingga warna hasil pelarutan menjadi pucat. Setelah maserasi selesai, filtrat di *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak pekat. Setelah diperoleh ekstrak pekat/kental dapat dihitung rendemen ekstrak dengan perhitungan sebagai berikut.

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak yang didapat (g)}}{\text{berat simplisia awal (g)}} \times 100\%$$

#### 4.6.2 Identifikasi senyawa menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) bertujuan untuk menduga senyawa yang terdapat pada ekstrak. Langkah pertama yang dilakukan adalah ditimbang ekstrak akar, batang, biji dan daun sebanyak 10 mg. Kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 1 mL. Ekstrak daun dilarutkan menggunakan bantuan ultrasonikator hingga larut sempurna dengan etanol 96%. Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini adalah n-heksana dengan etil asetat. Perbandingan antara keduanya dilakukan optimasi terlebih dahulu dengan perbandingan 5:5; 6:4; 7:3 dan 8:2, kemudian fase gerak dijenuhkan. Berdasarkan penelitian sebelumnya sesquiterpen

lakton dapat digunakan fase gerak n-heksan dengan etil asetat (Arundina *et al.*, 2015). Saat penjenuhan fase gerak ditotolkan ekstrak daun yang telah dilarutkan dengan etanol 96% dengan pipa kapiler berukuran 2 $\mu$ L secara manual. KLT yang digunakan adalah silika gel F<sub>254</sub> dengan ukuran panjang 10 cm dengan lebar 6 cm, batas atas ukuran 0,5 cm sedangkan batas bawah 1,5 cm. Setelah fase gerak dijenuhkan selama 10 menit KLT dimasukkan *glass chamber* merek *chamag*. Setelah hasil KLT telah tereluen di batas atas KLT diambil kemudian diamati menggunakan visualizer setelah itu disemprot menggunakan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% v/v. Setelah, ditotolkan KLT dipanaskan pada TLC *Plate Heater* dengan suhu 105°C selama 5 menit. Tujuannya adalah untuk mengoksidasi solutesolute organik yang dapat mengganggu (Sudjadi, 2007).

#### 4.6.3 Pembuatan Media kultur sel

Pembuatan media kultur sel dilakukan dengan menyiapkan bahan media padat, aquabidest steril sebanyak 950 ml didalam *Laminar Air Flow*(LAF). Dituangkan serbuk media kedalam aquabidest dan dihomogenkan, selanjutnya ditambahkan 2,2 gram NaHCO<sub>3</sub> untuk setiap liter media yang dibuat, ditambahkan aquabidest hingga tepat 1000 mL kemudian dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut semua. Selanjutnya dilakukan penyesuaian pH dengan penmbahan asam-basa, kemudian dilakukan penyaringan media menggunakan filter 0,2 mikron dan ditampung kedalam botol Duran 1000 mL lalu diberi tanda dan disimpan didalam kulkas dengan suhu 4°C. Semua proses dilakukan secara aseptis didalam LAF.

#### 4.6.4 Penumbuhan Sel

Disiapkan media komplet yang sesuai untuk sel. Dimasukkan *dish* untuk sub kultur. Ampul (*cryo tube*) yang berisi sel diambil dari *freezer*  $-80^{\circ}\text{C}$ . Suspensi sel dalam *cryo tube* dicairkan pada suhu kamar sampai mencair. Suspensi sel diambil dengan mikropipet 1000  $\mu\text{l}$  dan ditambahkan tetes demi tetes ke dalam MK. *Clonical tube* ditutup dengan rapat dan disentrifugasi pada 600 gram selama 5 menit. Sebelum *clonical tube* dibuka, terlebih dahulu *clonical tube* dan tangan disemprot dengan alkohol 70%. *Clonica tube* dibuka dan supernatan MK dibuang ke dalam pembuangan. Dilakukan resuspensi sel sampai homogen dengan menambahkan 4 ml MK baru. 2 ml suspensi sel masing-masing ditransfer ke dalam 2 *dish*. Tiap *dish* ditambahkan 5 ml MK dan dihomogenkan. Kondisi sel diamati dengan mikroskop. Lalu disimpan dalam inkubator  $\text{CO}_2$ .

#### 4.6.5 Penggantian media

Media lama dihisap dan dibuang secara perlahan dengan mikropipet atau pipet Pasteur. 5-7 ml MK dituang ke dalam *dish* yang berisi sel dan dihomogenkan. Kondisi dan jumlah sel diamati secara kualitatif pada mikroskop *inverted*. MK diinkubasi semalam dan dibangi jika sudah berwarna merah pucat.

#### 4.6.6 Pemanenan Sel

Adapun langkah pertama dalam tahap pemanenan sel adalah mengambil sel dari inkubator  $\text{CO}_2$ , diamati kondisi sel, dan sel dapat dipanen setelah sel 80% konfluen. Langkah selanjutnya media dibuang dengan menggunakan mikropipet atau pipet Pasteur steril. Sel kemudian dicuci sebanyak 2 kali

menggunakan PBS berjumlah  $\frac{1}{2}$  dari volume media awal. Selanjutnya ditambahkan tripsin-EDTA secara merata dan diinkubasi dalam inkubator selama 3 menit. Setelah itu ditambahkan  $\pm 5$  ml media untuk menginaktifkan tripsin. Selanjutnya diamati pada mikroskop, jika masih terdapat sel menggerombol maka diresuspensi kembali. Kemudian sel-sel yang telah lepas ditransfer kedalam *conical tube* steril yang baru.

#### 4.6.7 Uji aktivitas antikanker dengan metode MTT

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

Langkah selanjutnya adalah dilakukan pembacaan nilai absorbansi menggunakan ELISA *reader*. ELISA *reader* dihidupkan dan ditunggu sampai proses *progressing* selesai. Selanjutnya dibuka pembungkus *plate* lalu

dimasukkan ke dalam ELISA *reader*. Dibaca absorbansi dari masing-masing sumuran dengan ELISA *reader* dengan  $\lambda = 550\text{-}600$  nm. Jika panjang gelombang menunjukkan 595 nm, maka ditekan tombol start. Selanjutnya dibuat grafik absorbansi vs konsentrasi. Lalu dihitung prosentase sel hidup dan dianalisis nilai  $IC_{50}$  dengan Excel.

Perhitungan  $IC_{50}$  dibuat dengan cara membuat grafik log konsentrasi vs prosentase sel hidup dengan *chart type scatter* dan *chart subtype compare pairs of values*. Prosentase sel hidup jika absorbansi kontrol pelarut sama dengan kontrol sel dihitung dengan rumus:

$$\begin{aligned} & \text{Prosentase sel hidup} \\ &= \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100\% \end{aligned}$$

Jika absorbansi kontrol pelarut lebih rendah dari absorbansi kontrol sel, maka prosentase sel hidup dihitung dengan rumus berikut:

$$\begin{aligned} & \text{Prosentase sel hidup} \\ &= \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol pelarut} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100\% \end{aligned}$$

Selanjutnya dicari persamaan regresi linier dari grafik tersebut dengan menampilkan *add trendline*-regresi linier. Dilihat parameter r pada persamaan regresi linier. Jika r lebih besar dari r tabel maka persamaan regresi linier memenuhi standar untuk mencari  $IC_{50}$ . Selanjutnya dimasukkan  $y = 50\%$  pada persamaan regresi linier dari dicari nilai X lalu dihitung antilog dari konsentrasi tersebut sehingga diperoleh  $IC_{50}$ .

#### 4.6.8 Analisa siklus sel dengan *flowcytometry*

Analisis siklus sel ini menggunakan pewarna Propidium Iodide (PI). Pewarna tersebut dapat digunakan untuk analisis sejumlah set DNA pada setiap sel. Sel sebanyak  $5 \times 10^5$  sel/sumuran ditanam dalam 6-well plate (untuk perlakuan dan untuk kontrol sel). Keadaan sel diamati di mikroskop untuk melihat distribusi sel. Kemudian sel diinkubasikan sampai normal kembali. Setelah sel normal kembali, dibuat seri konsentrasi sampel untuk perlakuan. Plate yang telah berisi sel diambil dari inkubator. Lalu media sel dibuang dengan menggunakan pipet pasteur secara perlahan-lahan. Semua sumuran yang berisi sel dicuci dengan 500  $\mu$ l PBS. Lalu PBS dibuang dengan pipet pasteur secara perlahan – lahan. Untuk perlakuan, dimasukkan 1000  $\mu$ l seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran. Sedangkan untuk kontrol sel, ditambahkan 1000  $\mu$ l MK ke dalam sumuran. Lalu diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Pada waktu akhir inkubasi, kondisi sel didokumentasikan untuk setiap perlakuan.

Langkah selanjutnya disiapkan 1 konikel untuk 1 jenis perlakuan. Media diambil dari sumuran dengan mikropipet 1 ml, dan ditransfer ke konikel. Ditambahkan 500  $\mu$ l PBS ke dalam sumuran. Lalu diambil PBS dengan mikropipet dan ditransfer ke dalam konikel. Ditambahkan 299  $\mu$ l tripsin-EDTA 0,25% dan diinkubasi di inkubator selama 3 menit. Kemudian ditambahkan 1 ml MK dan dilakukan resuspensi sampai sel lepas satu persatu. Diamati di bawah mikroskop. Setelah sel lepas satu persatu, sel ditransfer ke konikel dan ditambahkan kembali 500  $\mu$ l PBS ke dalam sumuran untuk mengambil sisa sel, lalu ditransfer ke dalam konikel. Konikel disentrifus dengan kecepatan 600 rpm

selama 5 menit. PBS dibuang dengan cara dituang, lalu *plate* sel dicuci dengan 500  $\mu$ l PBS dingin. Disentrifus kembali dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit. PBS dibuang dengan cara dituang. Lalu diteteskan 500  $\mu$ l alkohol 70% ke dalam konikel sambil digoyang perlahan. Konikel disimpan pada suhu ruangan ( $37^{\circ}\text{C}$ ) selama 30 menit. Disentrifus kembali dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit. Alkohol yang telah ditambahkan dibuang dan ditambahkan 500  $\mu$ l PBS, kemudian disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 3 menit. Dilakukan 2 kali pencucian dengan PBS. Konikel dibungkus dengan alumunium foil dan diberi tanda. Ditambahkan reagen *flowcytometry* dan didiamkan selama 30 menit. Kemudian suspensi sel ditransfer ke dalam *flowcyto-tube*. Lalu dibaca dengan *flowcytometer* FACS Calibur untuk mengetahui profil *cell cycle*.

Data *flowcytometry* dianalisis dengan program *cell quest* untuk melihat distribusi sel pada fase – fase siklus sel sub G1 (apoptosis), S, G2/M, dan sel yang mengalami poliploid. Penghambatan siklus sel yang terjadi dapat diketahui dengan membandingkan antara efek perlakuan larutan uji dengan kontrol.

#### 4.6.9 Analisa aktivitas apoptosis dengan flowcytometry

Sel sebanyak  $5 \times 10^5$  sel/sumuran ditanam dalam 6-well plate kemudian sel diinkubasikan hingga normal kembali. Sel diberi perlakuan pelarut DMSO (0,25%) dan isolate aktif. Sel kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam. Pada akhir waktu inkubasi, media diambil dan ditransfer ke dalam tabung sentrifus dan disentrifus (2000 rpm selama 3 menit), kemudian supernatan dibuang. Pada sumuran yang telah diambil medianya, ditambahkan PBS dan PBS ditransfer ke *microtube* yang sama, kemudian disentrifugasi (2000 rpm selama 3 menit). Sisa

panenan sel yang berada pada sumuran dibilas dengan PBS dan disentrifugasi lagi, kemudian PBS dibuang. Endapan ditambah reagen PI-Annexin V dengan hati – hati, dan segera dihomogenkan. *Microtube* yang berisi suspensi sel dibungkus aluminium foil dan diinkubasi dalam penangas air 37<sup>0</sup>C selama 5 menit. Suspensi sel dihomogenkan kembali dan ditransfer ke dalam tabung *flowcytometer* dengan menggunakan filter nilon, selanjutnya siap untuk dianalisis dengan *flowcytometer*.

#### **4.6.10 Pengukuran ekspresi dan jumlah protein p53 dengan immunositokimia**

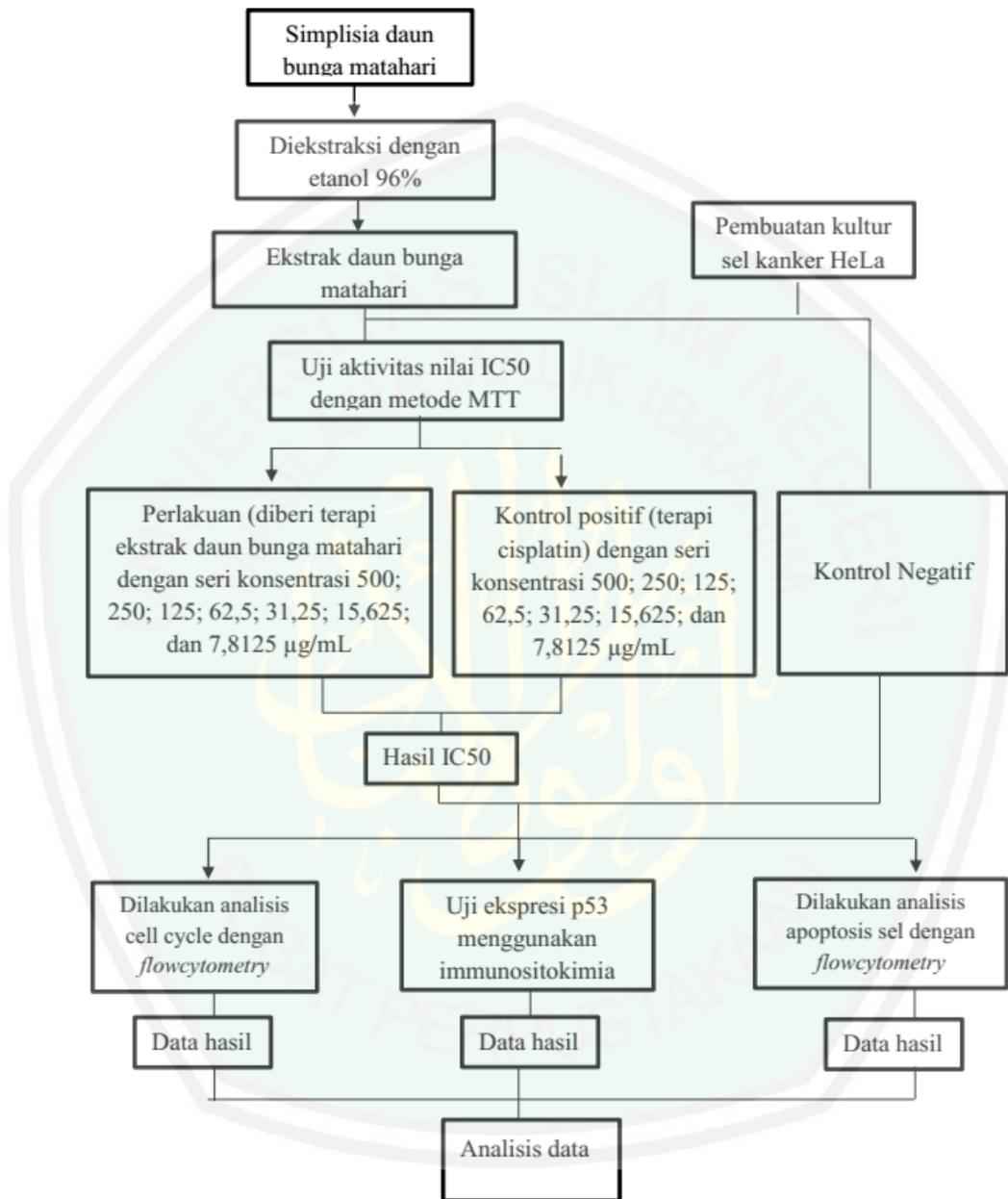
Jumlah sel yang ditransfer dalam 24-well plate yang sebelumnya telah diisi dengan cover slip adalah  $5 \times 10^3$  sel/sumuran, dilanjutkan dengan menginkubasi sel sampai konfluen. Setelah sel pulih kembali, medium lama dibuang dan ke dalam tiap sumuran ditambahkan secara bertahap serum-free, medium dan EEDS, kemudian diinkubasi selama 24 dan 48 jam. Pada akhir waktu inkubasi, sel dicuci PBS kemudian ditambahkan metanol dingin. Ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan secara berurutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dalam PBS pH 7,4, blocking buffer dan inkubasi 1 jam. Pada tiap sumuran ditambahkan antibodi primer (Human anti p53) dengan pengenceran 1:100 dalam PBS dengan 1% FBS. Sel diinkubasi semalam pada suhu 4<sup>0</sup>C. Kedalam masing-masing sumuran kemudian ditambahkan antibodi sekunder terbiotinilasi (KPL affinity purified biotin antibody to mouse IgG), streptavidin-HRP, AEC (Aminoethyl Carbazole), setelah itu dicuci menggunakan dH<sub>2</sub>O. Mayer HE ditetaskan ke masing-masing sumuran sebagai counterstaining kemudian dicuci

dengan dH<sub>2</sub>O. Coverslip kemudian diangkat dan diletakkan pada deck glass. Preparat dibaca pada mikroskop pada pembesaran 400 kali.

#### 4.6.11 Analisis Data

Data yang dihasilkan berupa data rasio dan disajikan dalam bentuk tabel. Pembuktian hipotesis penelitian dilakukan menggunakan uji kebermaknaan dengan uji statistik one way ANOVA. Sebelum menggunakan uji beda dan uji korelasi, data harus dianalisis menggunakan uji normalitas. Apabila data terdistribusi normal maka dilanjutkan uji statistik parametrik menggunakan uji statistik one way ANOVA. Hasil Pengujian yang diperoleh digunakan untuk menilai pengaruh pemberian ekstrak etanol daun bunga matahari terhadap aktivitas induksi apoptosis sel kanker serviks HeLa. Penelitian ini bermakna bila p nilai  $\leq 0,05$  yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan aktivitas apoptosis yang signifikan pada kelompok perlakuan. Uji statistik dilanjutkan dengan *post hoc Test* dengan *Least Significant Difference (LSD)* untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan lainnya.

#### 4.7 Skema Alur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) terhadap ekspresi p53, induksi poptosis dan siklus sel kanker serviks HeLa. Adapun tahap-tahap dalam penelitian ini antara lain preparasi sampel, analisa kadar air, ekstraksi daun bunga matahari, skrining firtokimia menggunakan TLC, uji antikanker dengan metode MTT, analisa siklus sel dan induksi apoptosis dengan metode *Flowcytometry* , serta analisa ekspresi p53 menggunakan immunositokimia. Uji aktivitas dilakukan menggunakan *cell line* kanker serviks HeLa yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

#### 5.1 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.). langkah pertama adalah dilakukan determinasi tanaman untuk memastikan bahwa tanaman yang akan dilakukan uji merupakan jenis tanaman yang dimaksud mengingat dalam pemanfaatannya, suatu tumbuhan memiliki berbagai jenis varietas yang memungkinkan ketidaktepatan spesies. Adapun bagian tanaman yang dilakukan determinasi adalah seluruh bagian tanaman bunga matahari (*Helianthus annuus* L.). Determinasi tanaman dilakukan di UPTD Materia Medika Kota Batu. Hasil determinasi diberikan berupa surat keterangan yang diterbitkan UPTD material Medika Kota Batu dengan nomor 074/406/102.7/2017

yang menyatakan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman *Helianthus annuus* L.

Langkah selanjutnya adalah penyiapan simplisia. Tanaman bunga matahari dipanen bagian daunnya, kemudian dilakukan pencucian, pengeringan, dan penyerbukan. Dilakukan pencucian bertujuan untuk menghilangkan pengotor yang mungkin menempel pada permukaan daun. Pengeringan dilakukan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 4 hari bertujuan untuk menghilangkan kandungan air sehingga daun bunga matahari dapat diserbukkan. Pengeringan juga bertujuan untuk menghindari pembusukan akibat tumbuhnya mikroba. Penyerbukan dilakukan menggunakan mesin grinder. Penyerbukan simplisia bertujuan untuk meningkatkan luas permukaan simplisia yang akan dilakukan ekstraksi sehingga senyawa dalam simplisia lebih banyak yang berinteraksi dengan pelarut. Hasil dari preparasi sampel ini adalah berupa serbuk simplisia daun bunga matahari (*Helianthii annii folium* sebanyak 62 gram).

## 5.2 Analisa Kadar Air

Kadar air merupakan salah satu parameter penting dalam menentukan kualitas simplisia. Kadar air yang tinggi dalam simplisia dapat menjadi media pertumbuhan jamur maupun mikroba. Kandungan air juga memungkinkan terjadinya reaksi enzimatik yang mampu menguraikan zat aktif pada simplisia. Adapun menurut Farmakope Indonesia edisi IV (1994), standar kadar air suatu simplisia sebagai persyaratan mutu obat tradisional adalah kurang dari 10%.

Serbuk daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) yang telah dipreparasi dilakukan analisa kadar air menggunakan instrumen *Moisture Content Analyzer* (MCA). Adapun prinsip kerja dari instrumen MCA ini menggunakan gravimetri yakni dengan menguapkan kandungan air pada simplisia. Sampel daun bunga matahari diratakan diatas *sample pan* hingga  $\pm 0,500$  gram kemudian dilakukan analisis.

Berdasarkan pengukuran kadar air dari serbuk daun bunga matahari diperoleh hasil sebesar 7,98% (Lampiran 2) sehingga dapat diketahui bahwa sampel yang diuji dalam penelitian ini memiliki nilai kadar air yang memenuhi standar sebagai persyaratan mutu untuk obat tradisional.



**Gambar 5.1** *Moisture Content Analyze*

### 5.3 Ekstraksi Maserasi Daun Bunga Matahari

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi simplisia daun bunga matahari dengan tujuan untuk memperoleh ekstrak dari daun bunga matahari untuk diuji

aktivitasnya. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE) yakni teknik maserasi dengan menggunakan gelombang ultrasonik yaitu gelombang akustik dengan frekuensi lebih besar dari 20 kHz (Suslick, *et al.*, 1986). Metode ini dipilih karena memiliki kelebihan diantaranya teknik ekstraksi yang cepat, lebih sedikit energi, dan memungkinkan pengurangan pelarut dengan hasil yang maksimal.

Serbuk daun bunga matahari ditimbang dan ditambahkan dengan etanol 96% dengan perbandingan 1:20 dimana penambahan pelarut dibagi dalam tiga tahap untuk mengoptimalkan pelarutan senyawa dalam daun bunga matahari. Hasil maserasi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Hasil pemekatan berupa ekstrak kental berwarna hijau pekat. Selanjutnya ekstrak kental dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40°C selama 14 hari untuk menguapkan sisa pelarut pada ekstrak kental. Ekstrak kering yang diperoleh kemudian ditimbang untuk ditentukan rendemen. Hasil ekstrak pekat ditunjukkan pada table 5.1 dengan perhitungan yang tercantum pada lampiran 3.

**Tabel 5.1** Hasil ekstraksi daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.)

<b>Pelarut</b>	<b>Serbuk + pelarut yang digunakan</b>	<b>Warna ekstrak pekat</b>	<b>Berat Ekstrak Pekat</b>	<b>% rendemen (b/b)</b>
Etanol 96%	58,2447 + 1000 mL	Hijau gelap	6,8776 gram	11,808 %

Berdasarkan table diatas diketahui persen rendemen ekstrak daun bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) adalah 11,808%. Berat rendemen diketahui

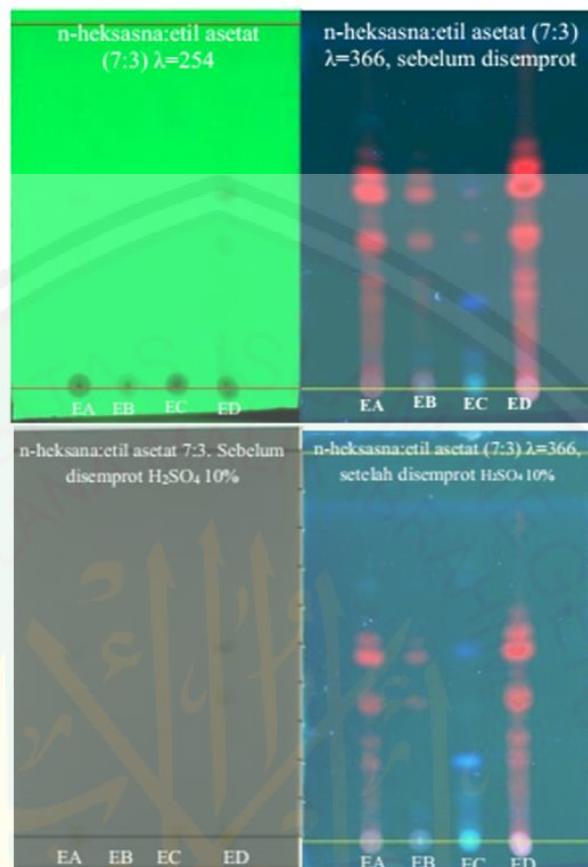
melalui perbandingan antara berat ekstrak yang dihasilkan dengan berat simplisia yang digunakan.

#### 5.4 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) bertujuan untuk menduga senyawa yang terdapat pada ekstrak. Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil optimasi dari fase gerak n-heksana dengan etil asetat. Hal ini, berdasarkan penelitian Arundina (2015) bahwa sesquiterpen lakton dapat diidentifikasi menggunakan fase gerak n-heksan dengan etil asetat. Perbandingan volume yang digunakan untuk optimasi fase gerak antara n-heksana dengan etil asetat adalah 5:5; 6:4; 7:3 dan 8:2. Sedangkan fase gerak hasil optimasi ditunjukkan pada perbandingan volume 7:3. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak daun bunga matahari ditunjukkan sebagai berikut.

**Tabel 5.2** Hasil KLT Ekstrak etanol 96% daun bunga matahari setelah derivatisasi menggunakan CAMAG TLC *visualizer*  $\lambda=366$

No.	Rf	Warna Noda
1	0,001	Merah
2	0,221	Merah
3	0,368	Merah
4	0,452	Merah
5	0,537	Merah
6	0,659	Merah
7	0,715	Merah
8	0,862	Merah



**Gambar 5.2** Hasil Uji KLT ekstrak etanol 96% daun bunga matahari (ditunjukkan pada kode ED).

Berdasarkan tabel dan gambar diatas, dapat diketahui bahwa noda yang tampak pada plat KLT berwarna merah dimana menurut Wagner (1996) hal itu menunjukkan adanya kandungan terpenoid. Hasil dari pengujian ini belum sepenuhnya spesifik karena identifikasi menggunakan KLT merupakan pengujian semi kuantitatif. Selanjutnya perlu dilakukan identifikasi yang lebih spesifik untuk dapat ditentukan senyawa yang berperan dalam memberikan aktivitas pengobatan khususnya sebagai antikanker.

### 5.5 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT

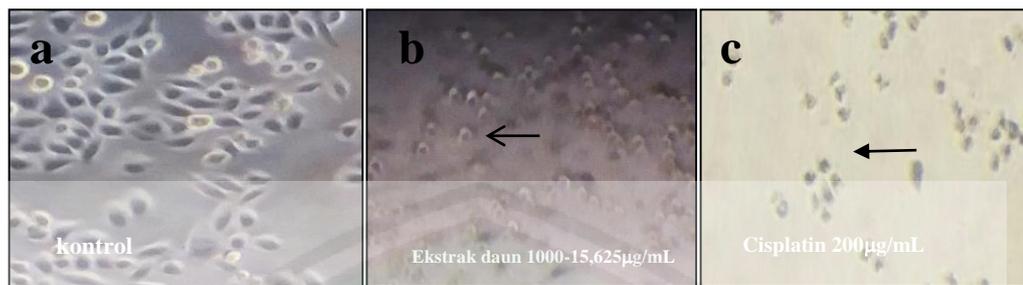
Ekstrak etanol 96% daun bunga matahari dilakukan uji aktivitas antikanker secara *in vitro* terhadap *cell line HeLa* menggunakan metode MTT *assay*. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas ekstrak berdasarkan penurunan viabilitas sel. Prinsip dari MTT Assay adalah terjadinya reaksi reduksi garam tetrazolium MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetra-zolium bromide) oleh system reductase. Suksinat tetrazolium dengan mitokondria sel-sel hidup akan membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Selanjutnya diberikan larutan *stopper* yang akan melarutkan kristal dan kemudian diukur dengan menggunakan ELISA reader. Sel *HeLa* dibiakkan dalam media komplet RPMI dan diinkubasi pada suhu 37°C dan CO<sub>2</sub> 5% selama 24 jam. Pemilihan media RPMI karena sesuai untuk menumbuhkan kultur sel kanker serviks *HeLa* dalam waktu yang singkat. Media RPMI mengandung 10% v/v *Fetal Bovine Serum* (FBS). FBS merupakan suplemen peningkat pertumbuhan yang efektif untuk sel kanker. FBS mengandung berbagai nutrisi untuk pertumbuhan dan perlindungan sel seperti asam amino, vitamin, garam-garam anorganik serta glukosa. Media RPMI juga mengandung penisilin-streptomisin 2% dan fungizon 0,5% yang berfungsi sebagai antibakteri dan antijamur untuk mencegah pertumbuhan mikroba maupun jamur yang dapat menyaingi pertumbuhan kultur sel kanker. Penisilin dan streptomisin merupakan antibiotik spektrum luas dan pada dosis yang sesuai tidak membahayakan sehingga dijadikan sebagai pilihan dalam kultur sel kanker.

Langkah selanjutnya adalah perhitungan sel menggunakan *hemocytometer* setelah sel dibiakkan selama 24 jam. Jumlah sel kanker dalam suspense yang

dihasilkan dari kultur penelitian ini adalah  $108,75 \times 10^4$  sel/mL. berdasarkan nilai tersebut selanjutnya disiapkan sejumlah sel yang akan ditanam kedalam *96-well plate* dengan menambahkan media RPMI ad 10 mL kemudian disuspensikan. Setiap sumuran diisi sebanyak 100  $\mu$ L suspense yang mengandung  $10^4$  sel. Kemudian sel diinkubasi kembali pada suhu  $37^\circ\text{C}$  ; 5%  $\text{CO}_2$  selama 24 jam.

Larutan stok dibuat sebagai perlakuan sel. Sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan kedalam 100  $\mu$ L *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO). DMSO digunakan sebagai *buffer* untuk melarutkan ekstrak dengan baik. Sedangkan untuk stok cisplatin tidak dilakukan pengenceran dimana konsentrasi telah diketahui yakni 3333  $\mu\text{M}$ . Selanjutnya ekstrak dibuat dengan seri konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,5; dan 15,625 ppm. Serta dibuat seri konsentrasi cisplatin yaitu 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625 ppm sebagai kontrol positif. Setiap konsentrasi disiapkan sebanyak 3 kali pengulangan yang bertujuan untuk mengetahui signifikansi peningkatan dosis dengan efek peningkatan proliferasi sel yang dihasilkan. Perlakuan ekstrak dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam. Setelah diberi perlakuan, kultur sel diinkubasi kembali selama 24 jam kemudian dilakukan pengamatan dibawah mikroskop.

Pada akhir inkubasi, sel kultur dalam tiap-tiap sumuran ditambahkan dengan 100  $\mu$ L larutan tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide] (MTT). MTT akan berubah menjadi formazan dalam mitokondria yang aktif pada sel hidup. MTT akan dipecah menjadi formazan yang berwarna ungu. Jumlah Kristal formazan yang terbentuk berkorelasi dengan viabilitas sel (Minggarwati, 2017).



**Gambar 5.3** Penampakan sel setelah pemberian perlakuan selama 24 jam ; a) kontrol ; b) Ekstrak daun bunga matahari ; c) Cisplatin 200  $\mu\text{M}/\text{mL}$ .

Setelah diberikan larutan MTT, sel kultur diinkubasi lagi selama 4 jam dalam inkubator hingga terbentuk kristal formazan. Sel kemudian diberi reagen *stopper Sodium Dodesil Sulfat* (SDS) untuk menghentikan reaksi MTT. SDS bekerja dengan tujuan untuk melisiskan membrane sel dan mendenaturasi protein sehingga reaksi antara MTT dengan mitokondria dapat dihentikan (Bhuyan, 2009). Setelah penambahan SDS, sel kultur kemudian dibungkus dengan kertas yang dapat melindungi dari cahaya dan disimpan selama 24 jam pada suhu kamar. Intensitas absorbansi yang terbentuk kemudian dilakukan pembacaan menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Data yang diperoleh berupa nilai absorbansi (Lampiran 4) yang selanjutnya dikonversikan ke dalam % viabilitas sel hidup

**Tabel 5.3** % Viabilitas sel hidup pada tiap konsentrasi ekstrak daun *Helianthus annuus*

Konsentrasi	% viabilitas sel hidup $\pm$ SD
1000	3.265993 $\pm$ 0.116636
500	44.98316 $\pm$ 1.738822
250	52.49158 $\pm$ 1.82658
125	63.60269 $\pm$ 4.346957
62.5	76.12795 $\pm$ 3.337922

31.25	71.61616 ± 1.617213
15.625	86.93603 ± 3.990858

**Tabel 5.4** % Viabilitas sel hidup perlakuan kontrol positif (Cisplatin) tiap konsentrasi

Konsentrasi	% viabilitas sel hidup ± SD
200	32.1937322 ± 9,8294039
100	26.1158594 ± 1,8536772
50	31.3390313 ± 1,8969596
25	50.4273504 ± 10,887267
12.5	61.6334283 ± 10,633309
6.25	75.7834758 ± 6,5979691
3.125	87.0845204 ± 2,7376135

Dari tabel 5.3 dan 5.4 dapat ditentukan nilai IC<sub>50</sub> dari ekstrak daun *Helianthus annuus* L. dan cisplatin.

**Tabel 5.5** Nilai IC<sub>50</sub> menggunakan MTT Assay

Perlakuan	Nilai IC <sub>50</sub> (µg/mL) ± SD
Ekstrak daun <i>Helianthus annuus</i>	377.4667 ± 20.66555
Cisplatin	23.8165965 ±

### 5.6 Analisa Siklus Sel dan Apoptosis dengan *Flow cytometry*

Ekstrak daun bunga matahari yang telah diketahui memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker serviks *HeLa* kemudian dilakukan analisis siklus sel dan induksi apoptosis sel menggunakan metode *Flowcytometry*. *Flowcytometry*

merupakan suatu metode yang diaplikasikan untuk mampu menganalisa berbagai komponen seluler (asam nukleat, lemak, protein dll), organel (lisosom, mitokondria dll), bahkan fungsi (viabilitas, aktivitas enzimatis) sel.

Adapun langkah pertama adalah pemanenan sel dan perhitungan sel untuk dilakukan kultur sel. Pada penelitian ini diperoleh hasil perhitungan jumlah sel pada suspensi yang dipanen adalah  $115 \times 10^4$  sel/mL. selanjutnya dilakukan perhitungan volume suspensi yang akan ditanam. Pada pengujian untuk *flowcytometry* digunakan plate berisi 6 *well* dan diisikan sebanyak 2 mL suspensi berisi  $50 \times 10^4$  sel/*well*. Kemudian sel diinkubasi dalam inkubator  $37^\circ\text{C}$ ; 5%  $\text{CO}_2$  selama 24 jam.

Setelah inkubasi Selama 24 jam, dibuat media berisi perlakuan dengan konsentrasi ekstrak daun bunga matahari sebesar  $377,46 \mu\text{g/mL}$  dari larutan stok  $100.000 \mu\text{g/mL}$ . sedangkan konsentrasi cisplatin yang dibuat adalah  $23,81 \mu\text{M}$  dari stok cisplatin dengan konsentrasi  $3333 \mu\text{M}$ . Media sebelumnya dikeluarkan dari sumuran, kemudian diganti dengan 2 mL perlakuan, media untuk kontrol juga diganti dengan media yang baru. Sel kultur kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam untuk dilakukan persiapan uji dengan *flowcytometry*.

Sel dalam sumuran kemudian dipindahkan kedalam *conical tube*. Satu *conical tube* untuk satu sumuran. Media ditampung dalam *conical tube*, kemudian diberi label. Selanjutnya dibilas dengan 1 mL PBS dan ditampung dalam *conical tube* yang sama untuk memindahkan sel-sel mati yang tidak menempel pada sumuran. Kemudian untuk meluruhkan sel-sel yang hidup ditambahkan  $200 \mu\text{L}$  tripsin-EDTA pada masing-masing sumuran dan diinkubasi dalam incubator Selama 3 menit hingga sel lepas satu per satu. Tripsin EDTA akan melepaskan

ikatan sel dengan sel lainnya atau dengan dinding plate kultur dengan cara membentuk khelat dengan kalsium pada membrane sel (Kohlhepp, et al., 1994). Sel-sel yang telah lepas kemudian dipindahkan kedalam *conical tube*. Sisa-sisa sel dalam sumuran selanjutnya dibilas dan diresuspensi dengan media kultur dan PBS secara bergantian kemudian ditampung kedalam *conical tube*. Tujuannya adalah untuk menampung semua sel yang diberi perlakuan untuk dilakukan pembacaan.

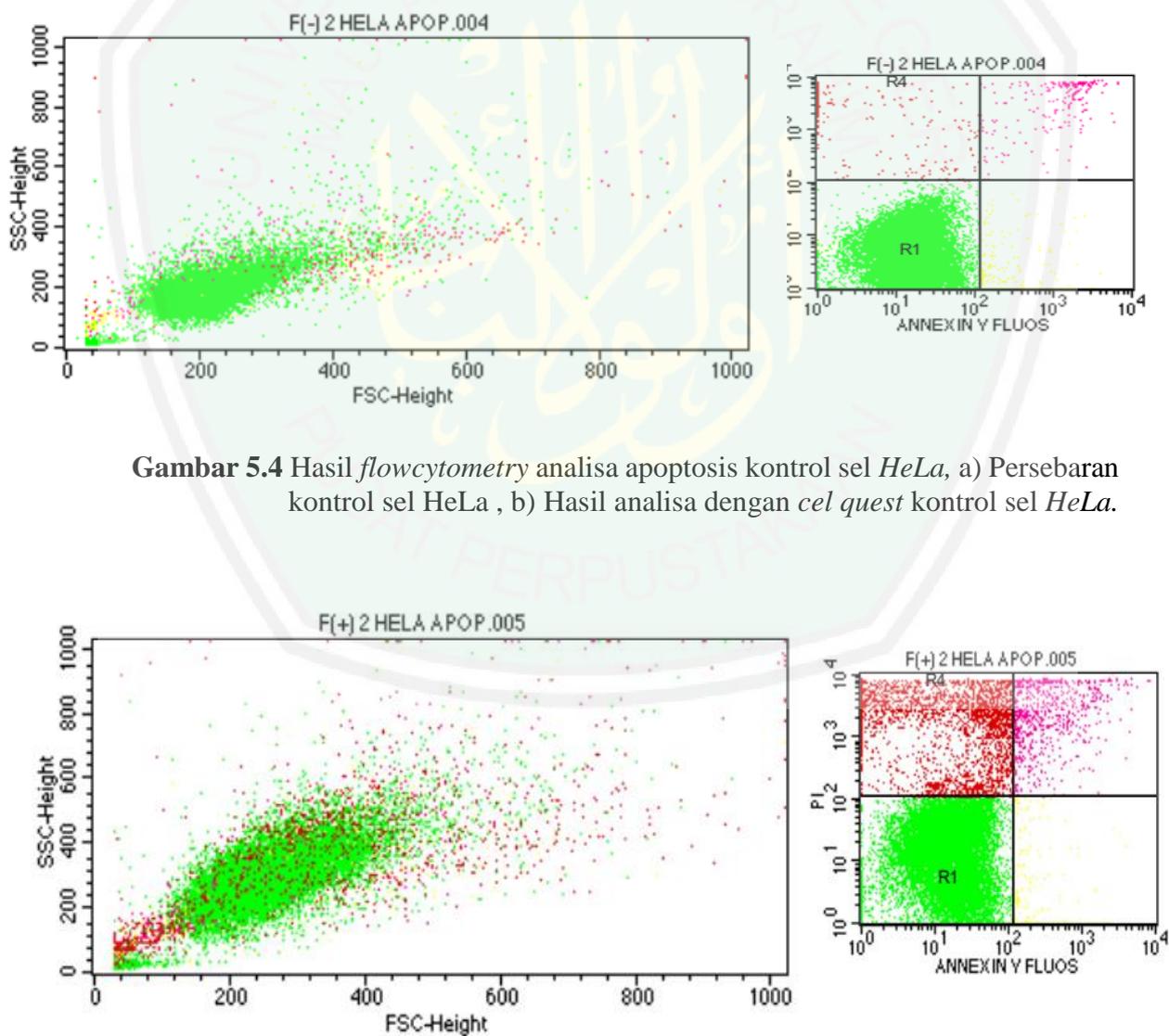
Suspensi dalam *conical tube* kemudian disentrifus pada putaran 2000 rpm selama 5 menit untuk memisahkan sel dengan supernatan, selanjutnya supernatan dibuang dan digantikan dengan 2 mL PBS kemudian diresuspensi. Hasil suspensi lalu dipindahkan kedalam mikrotube, diberi label dan disentrifus pada 2000 rpm selama 3 menit. Sel-sel tersebut selanjutnya dipersiapkan untuk pewarnaan. Pada penelitian ini dilakukan 2 macam pewarnaan, yaitu pewarnaan untuk analisa apoptosis sel menggunakan reagen *v annexin* dan *Propidium Iodide* (PI); Sedangkan untuk pewarnaan siklus sel menggunakan *Propidium Iodide* (PI). Pada mikrotube untuk pembacaan siklus sel, *supernatant* digantikan dengan 500 $\mu$ L ethanol 70% untuk fiksasi sel dan diinkubasi pada suhu kamar terlindung cahaya selama 1 jam .

### 5.6.1 Apoptosis

Hasil analisa *Flowcytometry* dianalisa menggunakan program *cell quest*. Yang menunjukkan persebaran sel-sel hidup, sel-sel yang mengalami apoptosis dan sel-sel yang mengalami nekrosis. Hasil pembacaan sel pada perlakuan ekstrak daun *Helianthus annuus* dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok

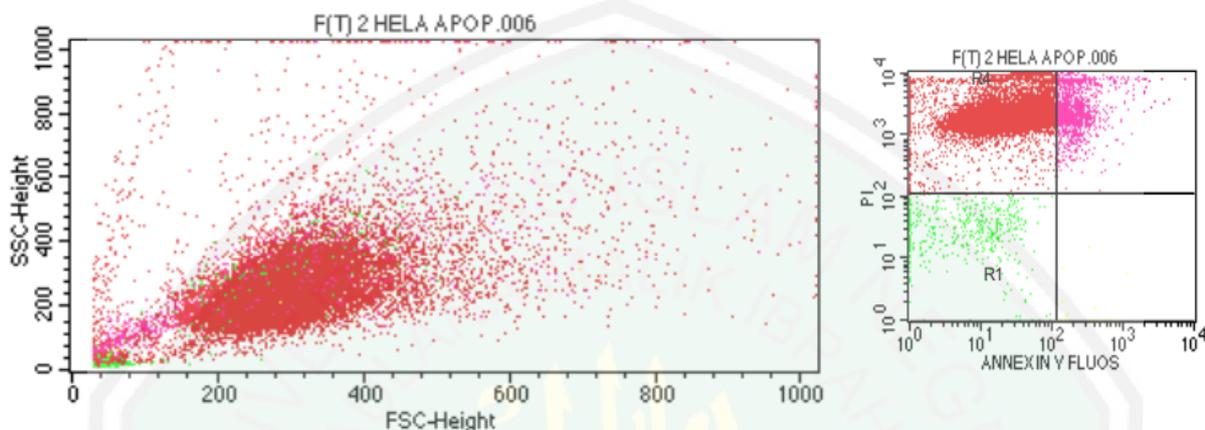
pemberian cisplatin. Pada analisa apoptosis dengan *Flowcytometry* ini menggunakan dua parameter dengan dua reagen pewarna sehingga diperoleh pemetaan data diameter sel pada bagian *Forward Angel Scatter* (FSC) dan konfirmasi struktur sel pada bagian *Side-single light scatter* (SSC) (Indradmojo, 2015).

Adapun hasil analisa induksi apoptosis menggunakan program *cell quest* ditunjukkan pada gambar berikut.



**Gambar 5.4** Hasil *flowcytometry* analisa apoptosis kontrol sel *HeLa*, a) Persebaran kontrol sel *HeLa* , b) Hasil analisa dengan *cel quest* kontrol sel *HeLa*.

**Gambar 5.5** Hasil *flowcytometry* analisa apoptosis kontrol positif sel *HeLa* dengan pemberian cisplatin 23,82  $\mu\text{M}/\text{mL}$ , a) Persebaran kontrol positif sel *HeLa* , b) Hasil analisa dengan *cel quest* kontrol positif sel *HeLa*.



**Gambar 5.6** Hasil *flowcytometry* analisa apoptosis sel *HeLa* dengan pemberian ekstrak daun *Helianthus annuus* konsentrsi 377,46  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a) Persebaran kontrol sel *HeLa* , b) Hasil analisa dengan *cel quest* kontrol perlakuan sel *HeLa* dengan pemberian ekstrak daun *Helianthus annuus*..

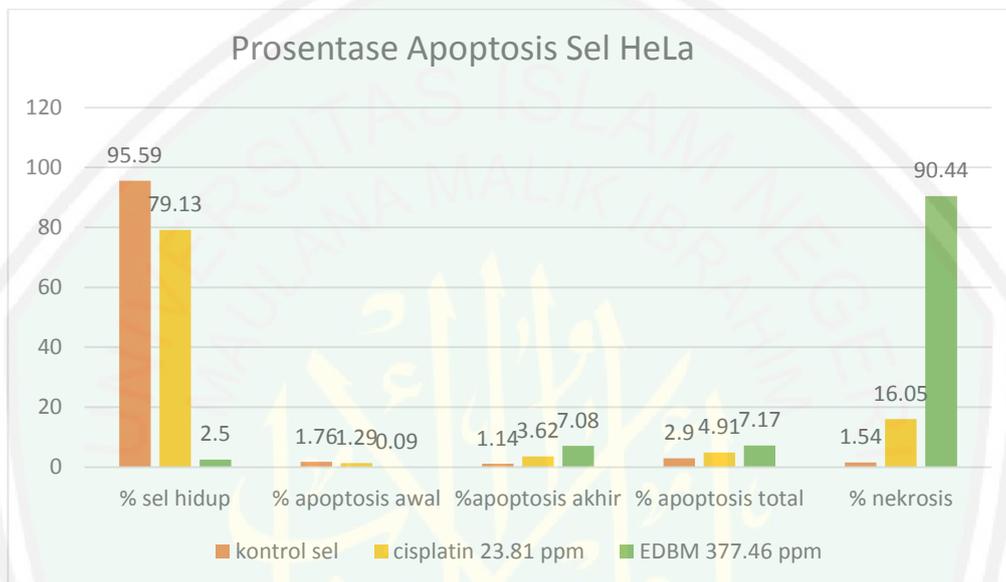
Gambar diatas menunjukkan data persebaran sel *HeLa* setelah diberi perlakuan. Absorbansi warna yang dihasilkan tiap sel dipisahkan sesuai dengan kondisi sel diantaranya sel hidup (R1), sel yang mengalami apoptosis awal (R2), apoptosis akhir (R3) dan nekrosis (R4). Adapun jumlah sel yang dianalisa dalam satu kali pembacaan *Flowcytometry* adalah sebanyak 20.000 sel.

**Tabel 5.6** Prosentasi nilai apoptosis sel kanker serviks *HeLa*

Prosentase populasi sel kanker serviks Hela	Perlakuan		
	kontrol sel	cisplatin 23.81 ppm	EDBM 377.46 ppm
% sel hidup	95.59	79.13	2.5
% apoptosis awal	1.76	1.29	0.09
% apoptosis akhir	1.14	3.62	7.08
% apoptosis total	2.9	4.91	7.17

% nekrosis	1.54	16.05	90.44
------------	------	-------	-------

Dari tabel 5.6 dapat dibuat grafik% nilai apoptosis sel *HeLa* pada masing-masing perlakuan.



**Gambar 5.7** Grafik prosentase apoptosis sel *HeLa*

Berdasarkan tabel 5.5 dan gambar 5.4 menunjukkan prosentase sel hidup dalam kultur yang tidak diberi perlakuan (kontrol sel) sebesar 95,59 % ; 2,9 % dari total sel mengalami apoptosis dan 1,54 % sel mengalami nekrosis. Sedangkan kultur sel yang diberi cisplatin 23,81 ppm menunjukkan penurunan persen sel hidup disbanding dengan kontrol sel menjadi sebesar 79,13 % ; 4,91 % sel mengalami apoptosis dan peningkatan jumlah sel yang mengalami nekrosis yaitu sebesar 16,05 %. Nilai tersebut menunjukkan bahwa persen sel hidup lebih tinggi dibanding sel yang mengalami kematian.

Pada perlakuan ekstrak daun *Helianthus annuus* dengan konsentrasi 377,46 ppm, sebanyak 7,17 % sel mengalami apoptosis ; 90,44 % sel mengalami nekrosis

dan 2,5 % dari total sel menunjukkan sel hidup. Angka apoptosis dan nekrosis tertinggi adalah pada perlakuan 377,46 ppm ekstrak daun *Helianthus annuus*. Hasil tersebut dinilai sangat aktif dalam menyebabkan kematian sel kanker sehingga perlu penyesuaian dosis kembali untuk mempertimbangkan keamanan penggunaan ekstrak daun *Helianthus annuus* untuk tujuan terapi antikanker.

Data presentase sel yang mengalami apoptosis dilakukan uji normalitas Shapiro wilk menggunakan IBM SPSS Versi 24. Kebermaknan uji normalitas dilihat dari nilai p. data terdistribusi normal jika nilai  $p > 0,05$ . Adapun data normalitas nilai apoptosis sel pada 3 kelompok perlakuan adalah dengan nilai  $p > 0,05$  hal ini menunjukkan bahwa data terdistribusi normal (Lampiran 7). Data selanjutnya dilakukan uji dengan *post hoc Tukey* untuk membandingkan antara kelompok perlakuan. Kebermaknaan signifikansi ditunjukkan pada nilai  $p < 0,05$ . Adapun hasil uji *post hoc* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan (sig.  $< 0,05$ ) nilai presentase apoptosis sel antara kontrol sel, perlakuan dengan cisplatin (kontrol positif) dan perlakuan ekstrak *Helianthus annuus*.

**ANOVA**

presentase

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27.381	2	13.690	1369.030	.000
Within Groups	.060	6	.010		
Total	27.441	8			

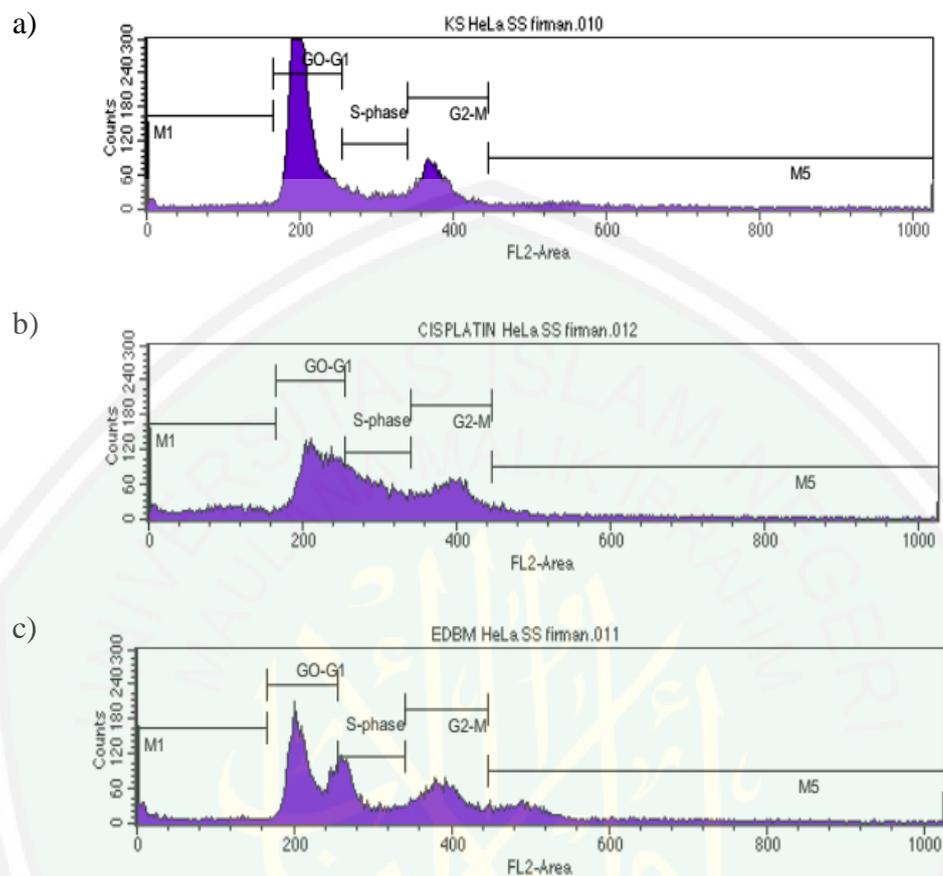
**Gambar 5.8** Analisis data uji beda antar kelompok terhadap apoptosis sel menggunakan ANOVA

Apoptosis merupakan mekanisme yang diharapkan dalam pengembangan agen antikanker. Apoptosis dapat diamati pada penampakan fisiologis yang berupa

pengkerutan sel, kerusakan membrane plasma dan kondensasi kromatin. Sel yang mati pada kondisi ini tidak kehilangan kandungan internal sel dan tidak menimbulkan respon inflamasi. Sedangkan nekrosis ditandai dengan adanya peningkatan volume sel dan kehilangan tekanan membran. Nekrosis diakibatkan oleh adanya pelepasan enzim lisis lisosomal seperti protease dan nuklease. Sehingga sel mengalami lisis yang kemudian diikuti oleh respon inflamasi. Nekrosis merupakan proses patologis karena adanya paparan tekanan fisik atau kimia yang sangat berpengaruh pada sel (Muti'ah, 2014).

### 5.6.2 Siklus Sel

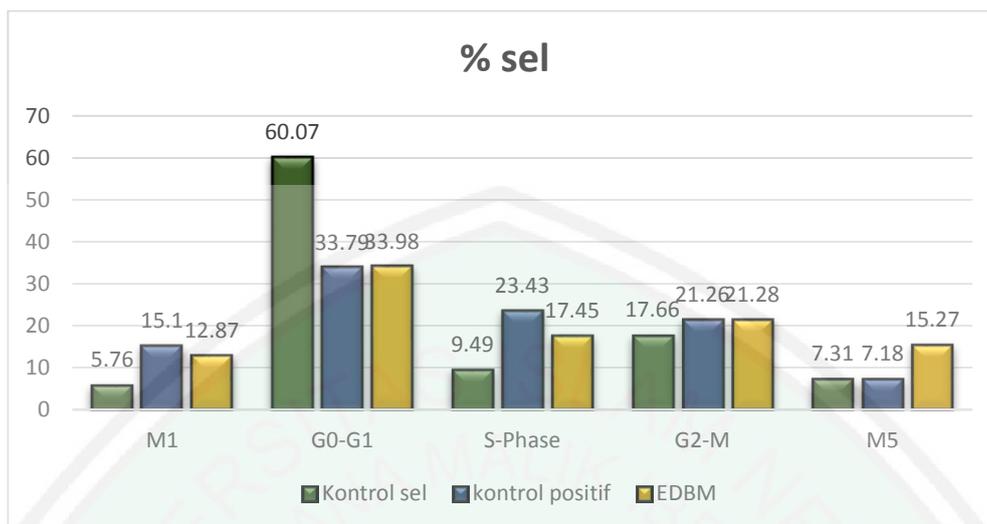
Pada analisis ini, metode *Flowcytometry* digunakan karena dapat mendeteksi setiap fase dalam siklus sel berdasarkan jumlah kromosom pada tiap-tiap fasenya. Dalam pengujian ini digunakan satu reagen pewarna yaitu *Propidium Iodide* (PI). Hasil analisa siklus sel menggunakan *flowcytometer* berupa histogram yang menunjukkan persebaran sel pada tiap fase yang dianalisa menggunakan program *cell quest*. *Flowcytometer* bekerja dengan mendeteksi jumlah kromosom pada tiap fasenya. Fase G1 memiliki jumlah kromosom  $2n$  yang selanjutnya masuk kedalam fase S. pada fase S, sel mengalami replikasi untuk persiapan memasuki fase G2 sehingga memiliki jumlah kromosom antara  $2n$  dan  $4n$ . sedangkan fase G2 dan M telah terjadi replikasi secara sempurna sehingga jumlah kromosom menjadi  $4n$  (Putri, 2014). Hasil pembacaan menggunakan *cell quest* ditunjukkan pada gambar berikut.



**Gambar 5.9** Persebaran siklus sel *HeLa* menggunakan program *cell quest*. a) kontrol sel ; b) cisplatin 23,81  $\mu\text{M}/\text{mL}$  ; c) Ekstrak daun bunga matahari 377,46  $\mu\text{g}/\text{mL}$

**Tabel 5.7** prosentase persebaran siklus sel *HeLa*

Fase	% sel		
	Kontrol sel	kontrol positif	Ekstrak daun bunga matahari
M1	5.76 %	15.1 %	12.87 %
G0-G1	60.07 %	33.79 %	33.98 %
S-Phase	9.49 %	23.43 %	17.45 %
G2-M	17.66 %	21.26 %	21.28 %
M5	7.31 %	7.18 %	15.27 %
$\Sigma$ M1 & M5	13,07 %	22,28 %	28,14 %



**Gambar 5.10** Grafik prosentase persebaran siklus sel *HeLa*

Berdasarkan grafik diatas, menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun *Helianthus annuus* 377,46  $\mu\text{g/mL}$  memiliki aktifitas dalam regulasi siklus sel kanker serviks *HeLa*. Pemberian ekstrak daun *Helianthus annuus* 377,46  $\mu\text{g/mL}$  menyebabkan penurunan prosentase sel pada fase G0-G1 (33,98%) dibanding dengan kontrol (60,07%), namun meningkatkan jumlah sel pada fase S dan G2-M yakni secara berturut-turut 17,45% dan 21,28% dibanding dengan kontrol sel yang menunjukkan persen sel pada fase S 9,49% dan fase G2-M 17,66%. Pemberian ekstrak daun *Helianthus annuus* juga meningkatkan jumlah sel pada fase M1. Penurunan jumlah sel pada fase G0-G1 dan fase S menunjukkan adanya penghambatan siklus sel. sedangkan Peningkatan jumlah sel pada fase M1 menunjukkan terjadinya apoptosis sel sehingga sel tidak melanjutkan siklus untuk pembelahan sel (Muti'ah, *et al.*, 2017).

Uji beda menggunakan analisis ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan pada masing-masing fase dalam siklus sel (Sig < 0,05). Adapun hasil uji beda disajikan dalam tabel berikut.

**Tabel 5.8** Uji beda antar kelompok perlakuan pada siklus sel

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GOG1	Between Groups	1371.363	2	685.681	#####	0.000
	Within Groups	0.040	6	0.007		
	Total	1371.403	8			
S	Between Groups	293.446	2	146.723	#####	0.000
	Within Groups	0.009	6	0.001		
	Total	293.454	8			
G2M	Between Groups	25.993	2	12.997	11140.029	0.000
	Within Groups	0.007	6	0.001		
	Total	26.000	8			
Debris	Between Groups	346.269	2	173.134	25460.926	0.000
	Within Groups	0.041	6	0.007		
	Total	346.309	8			

### 5.7 Analisa ekspresi p53 dengan immunisitokimia

Tujuan dari pengujian ini adalah untuk mengetahui nilai ekspresi p53 pada sel kultur *HeLa* yang diberi perlakuan ekstrak daun bunga matahari (*Helianthus annuus*). P53 merupakan salah satu protein yang memiliki peran dalam regulasi siklus sel dan apoptosis untuk menjaga sel-sel tubuh dalam kondisi dan jumlah yang normal sehingga diharapkan terjadi kenaikan ekspresi p53 pada sel kultur *HeLa* yang diberi perlakuan ekstrak daun bunga matahari. Pengujian ini dilakukan menggunakan metode immunisitokimia.

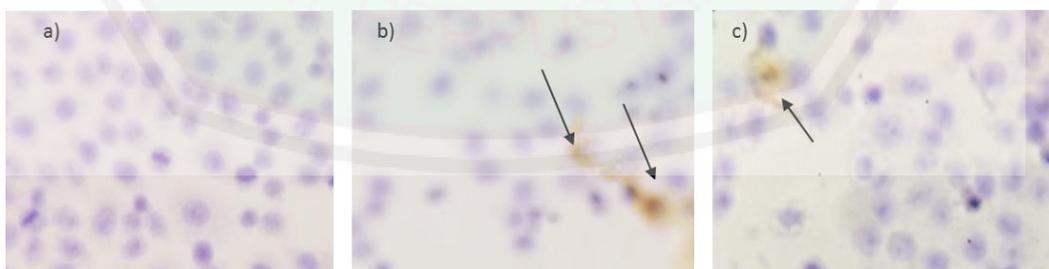
Sel *HeLa* ditanam pada 3 sumuran menggunakan *24-well plate* yang sebelumnya diberi *coverslip*. *Coverslip* merupakan lempeng kaca tipis berdiameter sesuai untuk *plate* kultur berguna untuk menampung sel dalam sumuran sehingga dapat diangkat dan dipreparasi untuk dilakukan immunositokimia. Tiap sumuran diisi masing-masing 1 mL suspensi sel berisi  $50 \times 10^3$  sel/*well*. Kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  ; 5%  $\text{CO}_2$  selama 24 jam. setelah inkubasi diberikan perlakuan dengan mengganti media dengan perlakuan dan media kultur untuk kontrol sel. Kultur sel kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam untuk persiapan immunositokimia.

Pada tahapan preparasi mula-mula sel ditambahkan buffer sitrat untuk menjaga pH sel. Kemudian sel dicuci dengan PBS untuk membersihkan sisa buffer. Selanjutnya penambahan methanol bertujuan untuk fiksasi sel agar menghentikan aktivitas pertumbuhannya. Sel kemudin dicuci menggunakan PBS dan akuades secara bergantian lalu ditambahkan  $\text{H}_2\text{O}_2$  10% dan diinkubasi selama 10 menit. Larutan  $\text{H}_2\text{O}_2$  berfungsi sebagai agen untuk menghentikan aktivitas enzim dalam sel. Pada sel dapat terjadi reaksi enzim yang tidak terdenaturasi saat fiksasi yang dapat menyebabkan positif palsu (Masruro, 2017).

Selanjutnya penambahan *blocking* serum dan inkubasi selama 15 menit. Tujuan penambahan *blocking* serum adalah untuk mengikat ikatan non spesifik yang memungkinkan terjadinya reaksi antara antibodi dengan protein non spesifik yang menyaingi ikatan antibodi dengan protein yang diinginkan (Masruro, 2017). Penambahan reagen selanjutnya adalah pemberian antibodi primer p53 dan dilakukan inkubasi selama 1 jam untuk masa reaksi antara protein p53 dengan

antibodi primer. Setelah inkubasi diberikan antibodi sekunder selama 20 menit. Antibodi primer bertugas mengenali antigen yang diidentifikasi pada jaringan (*first layer*), sedangkan antibodi sekunder akan berikatan dengan antibodi primer (*second layer*). Antibodi kedua merupakan anti-antibodi primer. Pelabelan antibodi sekunder diikuti dengan penambahan substrat berupa kromogen. Kromogen merupakan suatu gugus fungsi senyawa kimiawi yang dapat membentuk senyawa berwarna bila bereaksi dengan senyawa tertentu (Larasati, TT).

Langkah selanjutnya secara berturut-turut, sel ditambahkan HRP, DAB, dan Hematoxilin, kemudian sel dicuci kembali dengan aquadest hingga warna sisa reagen hilang. *Coverslip* selanjutnya diangkat dan dipasang dalam gelas preparat, difiksasi dengan dicelupkan ethanol dan direkatkan dengan *xylol*. Coverglass lalu ditutup dengan *cover glass* untuk dilakukan pengamatan dibawah mikroskop. Pemberian skor nilai ekspresi 0 (0-5%) ; 1 (5%-25%) ; 2 (25%-50%) ; 3 (50%-75%) dan 4 (75%-100%). Nilai ekspresi negatif jika skor ekspresi 0 dan nilai ekspresi positif jika skor ekspresi 1 sampai dengan 4 (Jing , *et al.*, 2013).



**Gambar 5.11** Hasil pengamatan immunositokimia ; a) kontrol sel, b) perlakuan cisplatin  $23,81\mu\text{M}$  , c) perlakuan ekstrak etanol 96% daun bunga matahari konsentrasi  $377,46\mu\text{g/mL}$ .

**Tabel 5.9** nilai ekspresi p53 pada masing-masing perlakuan.

Perlakuan	$\Sigma$ Sel	Ekspresi p53	% ekspresi	Skor
Kontrol sel	577	0	0%	0
Cisplatin 23,81 ppm	589	9	1,53%	0
Ekstrak daun <i>Helianthus annuus</i>	479	3	0.63%	0

Dari gambar diatas dapat diamati perbedaan antara kelompok kontrol, kelompok perlakuan cisplatin dan perlakuan ekstrak daun *Helianthus annuus*. Terlihat adanya ekspresi p53 baik pada perlakuan ekstrak daun *Helianthus annuus* maupun perlakuan pemberian cisplatin dibandingkan dengan kontrol sel namun dalam prosentase yang kecil. Sebagian besar agen kemoterapi bekerja dengan menginduksi apoptosis sel kanker. Adapun mekanisme penurunan proliferasi dan induksi apoptosis dapat dibedakan menjadi 2 macam yaitu mekanisme tergantung p53 dan mekanisme lain yang tidak tergantung p53 (Rachmawati, *et al.*, 2012). Berdasarkan hasil penelitian ini ditunjukkan adanya reaksi pewarnaan dengan jumlah yang sangat kecil pada pemberian ekstrak daun *Helianthus annuus* dan cisplatin, sehingga dimungkinkan terjadinya penurunan proliferasi sel melalui jalur lain yang tidak tergantung p53.

P53 merupakan protein yang berperan dalam regulasi perbaikan DNA dan pemacuan apoptosis dengan mencegah mencegah replikasi dari DNA yang rusak pada sel normal dan mendorong penghancuran sendiri sel yang mengandung DNA yang tidak normal (Muti'ah, 2014). adapun mekanisme yang tidak tergantung p53 dari aktivitas senyawa dapat berupa inhibitor enzim telomerase, modifikasi protein

E7, inhibitor ABC transporter seperti p-glikoprotein, peningkatan ekspresi HSP90 yang berperan kemungkinan dalam proses pelipatan protein onkogenik sehingga didegradasi oleh proteasome (Rachmawati, *et al.*, 2012).

Salah satu karunia Allah SWT adalah dengan menurunkan berbagai jenis tumbuhan dengan berbagai manfaat yang terkandung. Mempelajari tentang tumbuhan merupakan salah satu bentuk memahami kuasa Allah yang terkandung dalam Alqur'an. Sebagaimana Allah berfirman dalam surat Asy-Syu'ara ayat 7 :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: *“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”*

Ayat diatas mengandung seruan Allah untuk merenungi dan mengamati sebagian ciptaan Allah. Maka kita akan mengetahui berbagai manfaat dari apa-apa yang diciptakan oleh Allah. Sebagaimana ditafsirkan oleh Shihab ( 2002) bahwa kata زَوْجٍ كَرِيمٍ memiliki makna tanaman yang baik dan bermanfaat. Salah satu dari ciptaan Allah yaitu tanaman bunga matahari telah diketahui memiliki aktivitas untuk menurunkan proliferasi sel kanker melalui pengujian MTT menggunakan sel kanker serviks *HeLa*. Penelitian tersebut sekaligus menunjukkan bahwa tanaman bunga matahari dapat berpotensi untuk dijadikan sebagai terapi untuk penyakit kanker.

Beberapa mekanisme aktivitas ekstrak daun bunga matahari sebagai antikanker telah diketahui melalui penelitian ini, diantaranya menyebabkan

kematian secara nekrosis, meningkatkan fase S dan G2-M, dan terjadinya kematian sel tidak bergantung p53. Penggunaan antikanker dari bahan alam memiliki mekanisme yang beragam. Alternatif lain jalur kematian sel dapat berupa *autophagy*, kematian terprogram menyerupai nekrosis (*necroptosis*), *mitotic catastrophe*, maupun penuaan dini sel yang akhirnya menyebabkan kematian (Galimuhtasib, *et al.*, 2015). sel kanker yang kekurangan p53 membutuhkan pensinyalan ATM, ATR, Chk1, dan p38 MAPK / MK2 untuk penangkapan siklus sel; hilangnya respons ini menyebabkan aktivasi caspase-3 dan *mitotic catastrophe* setelah kerusakan DNA (McNamee, 2009).

*Mitotic catastrophe* merupakan kondisi kegagalan sel dalam memasuki fase mitosis akibat adanya tekanan kimia atau fisik. *Mitotic catastrophe* (MC) ditandai dengan perubahan morfologi dengan munculnya sel poliploid pada populasi sel yang terdampak MC dan meningkat pada sel yang tidak memiliki fungsi p53 (termasuk sel kanker serviks HeLa) dan merupakan hasil akumulasi cyclin B1 yang berlebihan pada sel yang mengalami penundaan di akhir siklus selnya (Ianzini & Mackey, 2007). Pernyataan tersebut memberikan gambaran bahwa kemungkinan mekanisme senyawa dalam ekstrak daun bunga matahari dalam menurunkan proliferasi sel adalah melalui mekanisme *mitotic catastrophe*. Namun perlu pembuktian ilmiah kembali mengetahui secara lebih rinci mekanisme kematian sel yang disebabkan oleh pemberian ekstrak daun bunga matahari.

Maha besar Allah dalam memberikan karunia kepada manusia. Segala sesuatu di dunia telah diatur dengan rapi dan manusia diberikan akal untuk berfikir dan merenungi keagungan Allah. Manfaat dari suatu ciptaan Allah akan diketahui

manusia jika manusia itu berfikir. Sebagaimana firman Allah dalam surat Ali-Imran ayat 190:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاجْتِذَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ

Artinya : “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal*”.

Ayat diatas menerangkan bahwa sesungguhnya pada penciptaan langit dan bumi, serta pergantian siang dan malam terdapat tanda keberadaan Sang Pencipta, yakni Allah SWT. Seorang mukmin menggunakan akalny untuk merenungkan Dzat Sang Pencipta yang telah menciptakan segala sesuatu yang memberikan hikmah dan manfaat terhadap kehidupan. Kuasa Allah tidak lekang oleh ruang dan waktu. Manusia yang beriman akan memikirkan ciptaan Allah dengan kerendahan hati dan mengingat betapa lemahnya manusia dimata Allah. Ilmu Allah tidak akan habis untuk pelajari mengingat pada ayat diatas yang menjelaskan bahwa kekuasaan Allah terdapat di langit dan bumi seisinya, serta sepanjang pergantian siang dan malam. Seperti pada penelitian ini yang memberikan informasi tentang potensi daun bunga matahari yang memiliki aktivitas antikanker pada kultur sel kanker serviks *HeLa* secara *in vitro* dan masih memerlukan kajian lanjutan untuk dapat dikembangkan sebagai obat antikanker dari daun bunga matahari.

## BAB VI

### PENUTUP

#### 6.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak etanol 96% daun bunga matahari (*Helianthus annuus*) dengan konsentrasi 377,46 µg/mL meningkatkan nilai apoptosis sel yaitu sebesar 7,17% dibanding dengan kontrol (2,9%).
2. Pemberian ekstrak etanol 96% daun bunga matahari (*Helianthus annuus*) pada konsentrasi 377,46 µg/mL menyebabkan penghambatan fase G0-G1 dan meningkatkan jumlah sel pada fase S dan G2-M serta meningkatkan jumlah sel ke arah sub G0-G1 dibandingkan dengan kontrol sel.
3. Pemberian ekstrak etanol 96% daun bunga matahari (*Helianthus annuus*) pada konsentrasi 377,46 µg/mL tidak menimbulkan adanya peningkatan ekspresi p53.

#### 6.2 Saran

Berdasar kesimpulan, peneliti memberikan saran untuk dilakukan pengujian pengaruh variasi konsentrasi pada apoptosis dan siklus sel untuk mengetahui dosis optimum penggunaan terapi pilihan ekstrak daun bunga matahari yang aman berdasarkan mekanisme kerjanya. Selain itu juga perlu dilakukan pengujian jalur penurunan proliferasi sel untuk mengetahui mekanisme utama ekstrak dalam menurunkan proliferasi sel.

## DAFTAR PUSTAKA

- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995. *Farmakope Herbal Edisi Pertama*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2009. *Buku Saku Pencegahan Kanker Leher Rahim dan Kanker Payudara*, Jakarta: Ditjen PP & PL.
- [NCI] National Cancer Institute. 2012. *What You Need To Know About: Cervical Cancer*. U.S. Department of Health and Human Services. National Institute of Health.
- [WHO] World Health Organization, 2018. *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in*. who.int diakses Januari 2018
- Abdullah bin Muhammad bin Abdurrahman bin Ishaq Al-Syeikh, DR. 2003. *Labaabut Tafsir Min Ibni Katsiir: Terjemah Abdul Ghofar*. Bogor : Pustaka Imam Syafi'i.
- Agoes, G., 2007. *Teknologi Bahan Alam*. Bandung: ITB press.
- Arundina, Ira; Theresia, Indah Budi; Muhamad, Luthfi; Retno, Indrawati. 2015. Identifikasi Kromatografi Lapis Tipis Sudamala (*Artemisia vulgari* L.) *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*. Volume 1, No.2.
- Baig, S. *et al.*, 2016. Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand?. *Cell Death and Disease*, Volume 7, pp. 1-11.
- Bhuyan, A. K., 2009. On The Mechanism of SDS-induced Protein Denaturation. *Biopolymer*, 93(2), pp. 186-199.
- Brown, M. & Wittwer, C., 2000. Flow Cytometry : Principle and Clinical Application in Hematology. *Clinical Chemistry*, 46(8(B)), pp. 1221-1229.
- Bruni L., Barrionuevo-Rosas L, Albero G, Serrano B, Mena M, Gomez D, Munoz J, Bosch FX, de Sanjose S. *ICO Information Centre on HPV and Cancer. Human Papillomavirus and Related Disease in Indonesia*. Summary Report 27 July 2017. [Accessed in December 2017]
- CCRC UGM, 2009. *Prosedur Tetap Pengamatan Ekspresi Protein dengan Metode Immunositokimia*. Yogyakarta, Universitas Gadjah Mada.

- Dasari, S. & Tchounwou, P. B., 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.*, p. 364–378.
- Dwivedi, A. & Sharma, G., 2014;. A review of Heliotropism Plant: *Helianthus annuus L.* *The Journal of Phytopharmacology* 3(2), pp. 149-155.
- Emamuzo, E. D. *et al.*, 2010. Effects of Ethanol Extract of Leaves of *Helianthus annuus* on The Fecundity of Wistar Rats. *Asian Pasific Journal of Tropical Medicine*, pp. 435-438 .
- Frazer, I. H., 2004. Prevention of Cervical Cancer Trough Papillomavirus Vaccination. *Nature Reviews : Immunology*, pp. 46-54.
- Galimuhtasib, H. *et al.*, 2015. *Cell Death Mechanisms of Plant-derived Anticancer Drugs : Beyond Apoptosis*, New York: Springer Science & Business Media.
- Ghantous , A. *et al.*, 2010. What Made Sesquiterpene Lactones Reach Cancer Clinical Trials? A Review. *Elsevier: Drug Discovery Today Vol 15 no 15*, pp. 668-678.
- Greene, R. J. & Harris, N. D., 2008. *Pathology and Therapeutics For Pharmacist: Third Edition*. London, UK: Pharmaceutical Press.
- Guzman, L. M. *et al.*, 2014. The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood Journal*, 105(11).
- Ianzini, F. & Mackey, M. A., 2007. *Mitotic Catastrophe*. In: Gewirtz D.A., Holt S.e., Grant S. (eds) *apoptosis, Senesence, And Cancer*. *Cancer Drug Discovery and Development*.:Humana Press
- InfoDATIN, 2015. *Kanker*, Jakarta: Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI .
- Indradmojo, C., 2015. *aktivitas Antikanker Dan Mekanisme Farmakologi Ekstrak Dan Fraksi Benalu Nangka (Macrosolen cochinchinensis) Pada Sel Kanker Payudara T47D. [skripsi]*, Malang: Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Jing , X., Li, Q. K., Bedrossian, U. & Michael, C. W., 2013. Morphologic and Immunocytochemical Performance of Effusion Cell Blocks Prepared Using 3 Different Methods. *American Society for Clinical Pathology*, Volume 139, pp. 177-182.
- Kar, A., 2014. *Farmakognosi dan Farmakobioteknologi Edisi 2 Vol.1*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- King, R., 2000. *Cancer Biology 2nd Edition*. New York: Pearson Education.

- Kohlhepp, S. J., Hermsmeyer, K., Land, R. A. & Gilbert, D. N., 1994. Aminoglycoside-Induced Increase of Intracellular Calcium in LLC-PK1 Cells Due to an Artifact Caused by Trypsin and EDTA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(5), pp. 1065-1070.
- Kreuger, M. R. O. *et al.*, 2012. Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. *Anti-Cancer Drugs*.
- Kumar, V., Abbas, A. & Fausto, N., 2005. *Robbins and Cotran Pathology Basic Disease 7th ed.*. Missouri, USA: Elsevier.
- Larasati, TT. *Prosedur Tetap Pengecatan Immunohistokimia p53*, Yogyakarta: CCRC Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.
- Lazaro, L., 2002. Flavonoids as Anticancer Agents: Structure-Activity Relationship Study. *curr. Med. Chem. - Anticancer Agent*, Volume 2, pp. 691-714.
- Liao, J. B., 2008. Viruses and Human Cancer: Cancer Mechanisms. *Yale Journal Of Biology and Medicine* 79, pp. 115-122.
- Macias, F. A. *et al.*, 1997. Bioactive Flavonoid from *Helinthus annuus* cultivar.. *phytochemistry*, 45(4), pp. 683-687.
- Macias, F. *et al.*, 2008. Helikuranoside A, A New Bioactive Diterpene. *Journal of Chemical Ecology*, 34(1), pp. 65-69.
- Maharani, S., 2009. *Kanker : Mengenal 13 Jenis Kanker dan Pengobatannya*. Jogjakarta: Katahati.
- Masruro, Y. A., 2017. *Pengecatan Immunohistokimia HER2 Menggunakan susu skim dan Normal Serum [Skripsi]*, Semarang: Fakultas Ilmu Keperawatan Dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang.
- McNamee, L. M., & Brodsky, M. H. (2009). p53-Independent Apoptosis Limits DNA Damage-Induced Aneuploidy. *Genetics*, 182(2), 423–435. <http://doi.org/10.1534/genetics.109.102327>
- Mingarwati, T. S., 2017. *Uji Aktivitas Antikanker Dan Identifikasi Senyawa Aktif Dari Fraksi Umbi Bawang Dayak (Eleitherine palmifolia (L.)Mer.) Terhadap Sel Kanker Serviks HeLa[Skripsi]*, Malang: Jurusan Farmasi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Muti'ah, R., 2014. *Pengembangan Fitofarmaka Antikanker: Panduan dan Teknik Pengembangan Obat Herbal Indonesia Menjadi Fitofarmaka*. Malang: UIN Maliki Press.
- Muti'ah, R., Widyawruyanti, A. & Sukardiman, S., 2017. Ethyl acetate fraction of *Calotropis gigantea* roots induce apoptosis through increased G2/M and

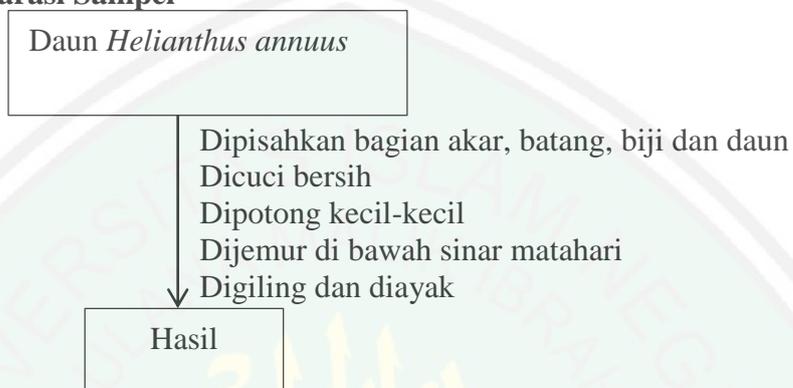
- increased expression of caspase-8 in colon cancer WiDr Cell Line. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(07), pp. 197-201.
- Mutiah R, Widyawaruyanti A. Sukardiman S. Calotropisid A: a Glycosides Terpenoids from *Calotropis gigantea* Induces Apoptosis of Colon Cancer WiDr Cells through Cell Cycle Arrest G2/M and Caspase 8 Expression. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2018; 19 (6):1457-1464.
- Muti'ah, R., 2014. *Pengembangan Fitofarmaka Antikanker: Panduan dan Teknik Pengembangan Obat Herbal Indonesia Menjadi Fitofarmaka*. Malang: UIN Maliki Press.
- Putri, H., 2014. *Preparasi Sampel untuk siklus sel dengan metode Flowcytometry*, Yogyakarta: CCRC Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.
- Rachmawati, E., Karyana, S. & Suyuti, H., 2012. Efek Ekstrak Etanolik Daun Sirsak Pada Proliferasi dan Apoptosis Sel HeLa yang Dimediasi Oleh p53. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 27(1), pp. 28-33.
- Rebecca, A. A., Matthew, D. H. & Trevor, D. H., 2006. The Discovery and Development of Cisplatin. *Journal of Chemical Education*, 83(5), pp. 728-734.
- Ren, W. *et al.*, 2003. Flavonoids : Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research Reviews* , 23(4), pp. 519-534.
- Rukmana, R., 2004. *Budidaya Bunga Matahari. Agrobisnis*. Semarang: Aneka Ilmu.
- Saini, S. & Sharma, S., 2011. *Helianthus annuus* (Asteraceae) : Review. *International Journal of Pharma Professional's Research*, 2(4), pp. 465-470.
- Santos, H., C., L. & J.L., C., 2009. *The Power of Ultrasound in Chemistry : Anilytical Applications*. s.l.:WILEY-VCH.
- Saraswati, S., 2010. *52 Penyakit Perempuan : mencegah dan mengobati 52 penyakit yang sering diderita perempuan*. jogjakarta: Katahati.
- Shihab, Quraish. 2002. *Tafsir Al-Misbah (Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an)*. Jakarta : Lentera Hati.
- Shinta et al, 2010. *Kanker Serviks dan Infeksi Human Papilloma Virus*, Jakarta: Javamedia.
- Spring, O., Albert, K. & Hanger, A., 1982. Three Biologically active Helingolides from *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*, 21(10), pp. 2551-2553.

- Steenis, C. V., 1978. *Flora. Untuk sekolah di Indonesia*. Jakarta: Pradnya Paramita.
- Subashini, R. & Rakshitha, S., 2012. Phytochemical Screening, Antimicrobial activity and in Vitro Antioxidant Investigation of methanolic extract of seed from *helianthus annuus*. *Chemical Science Review and Letter*, 1(1), pp. 30-34.
- Sumarno, 2008. *Pengaruh Ekstrak Sarang Semut (Myrmecodia pendens Merr & Perry) terhadap Aktifitas Proliferasi Sel dan Indeks Apoptosis Kanker Payudara Mencit C3H*. Semarang: Departemen Patologi Anatomi FK Unissula.
- Suslick, K. S., R.E., C. & D.A., H., 1986. *Journal of the American Chemical Society*.
- Syaifudin, M., 2007. Gen Penekan Tumor p53, Kanker dan Radiasi Pengion. *Buletin Alara*, 8(3), p. 119.128.
- Thurston, David E. 2006. *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*. New York : CRC Press Taylor and Francis Group
- Tjitrosoepomo, G., 2003. *Morfologi Tumbuhan*. Yogyakarta: GMU press.
- Vilkhu, K., R, M., L., S. & D., B., 2006. Application and Opportunities For Ultrasound Assisted Extraction In The Food Industry (A Review). *Food innovation: Emerging Science, Technologies & Application (FIESTA)*, Australia.
- Wagner, H., Bladt S. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer Science & Business Media.
- Zhang, S., Won, Y., Ong, C. & Shen, H., 2005. Anticancer potential of sesquiterpene lactone : Bioactivity and Molecular Mechanisms. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, pp. 239-249.

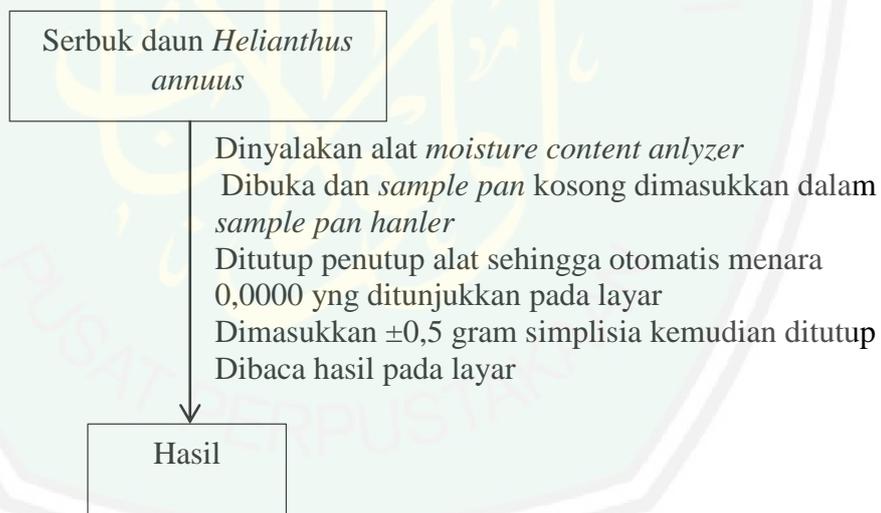
## LAMPIRAN

### Lampiran 1 Skema Kerja

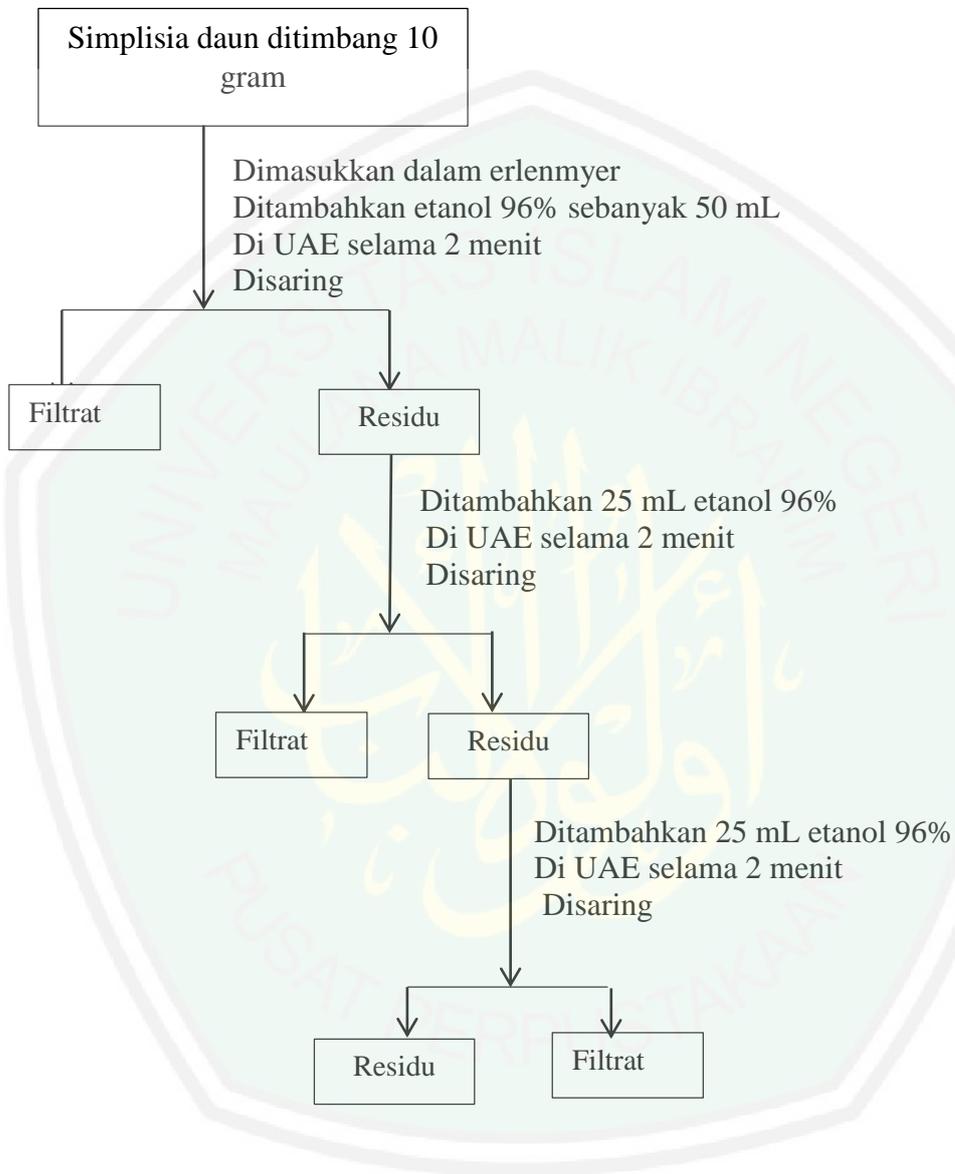
#### L.1.1 Preparasi Sampel



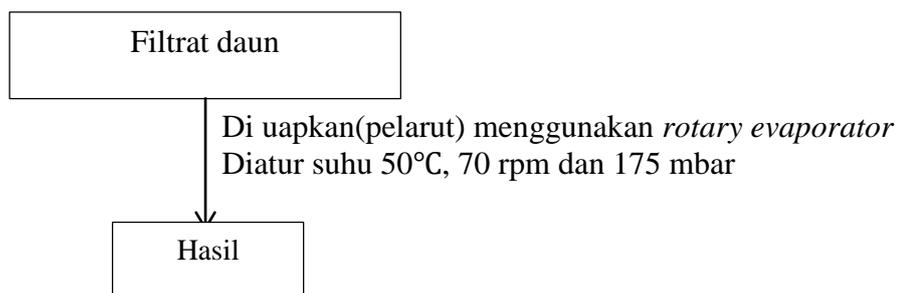
#### L.1.2 Analisa Kadar Air



### L.1.3 Ekstraksi

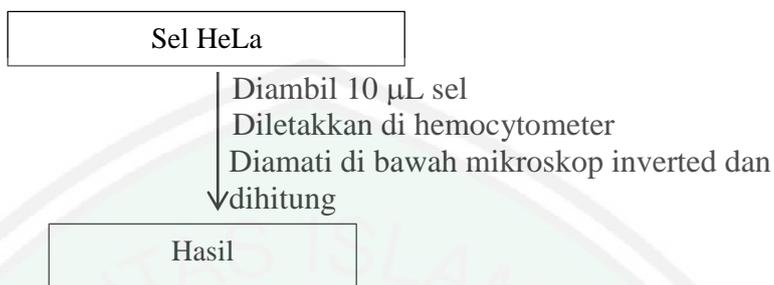


### L.1.4 Evaporasi

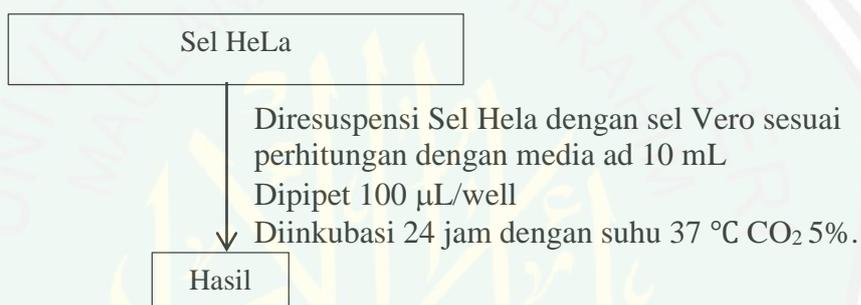


## L.1.5 Uji Aktivitas Antikanker

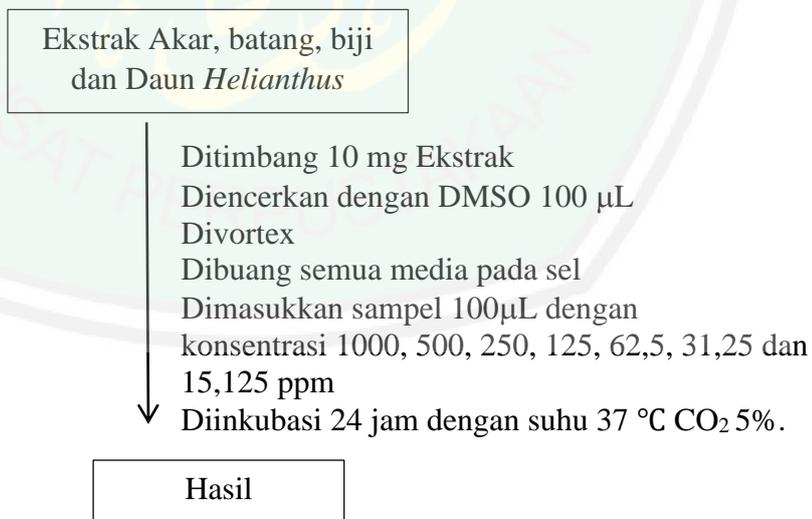
### L.1.5.1 Perhitungan Sel



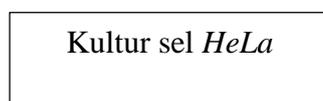
### L.1.5.2 Peletakkan sel



### L. 1.5.3 Pembuatan Larutan Sampel dan Pemberian Sampel

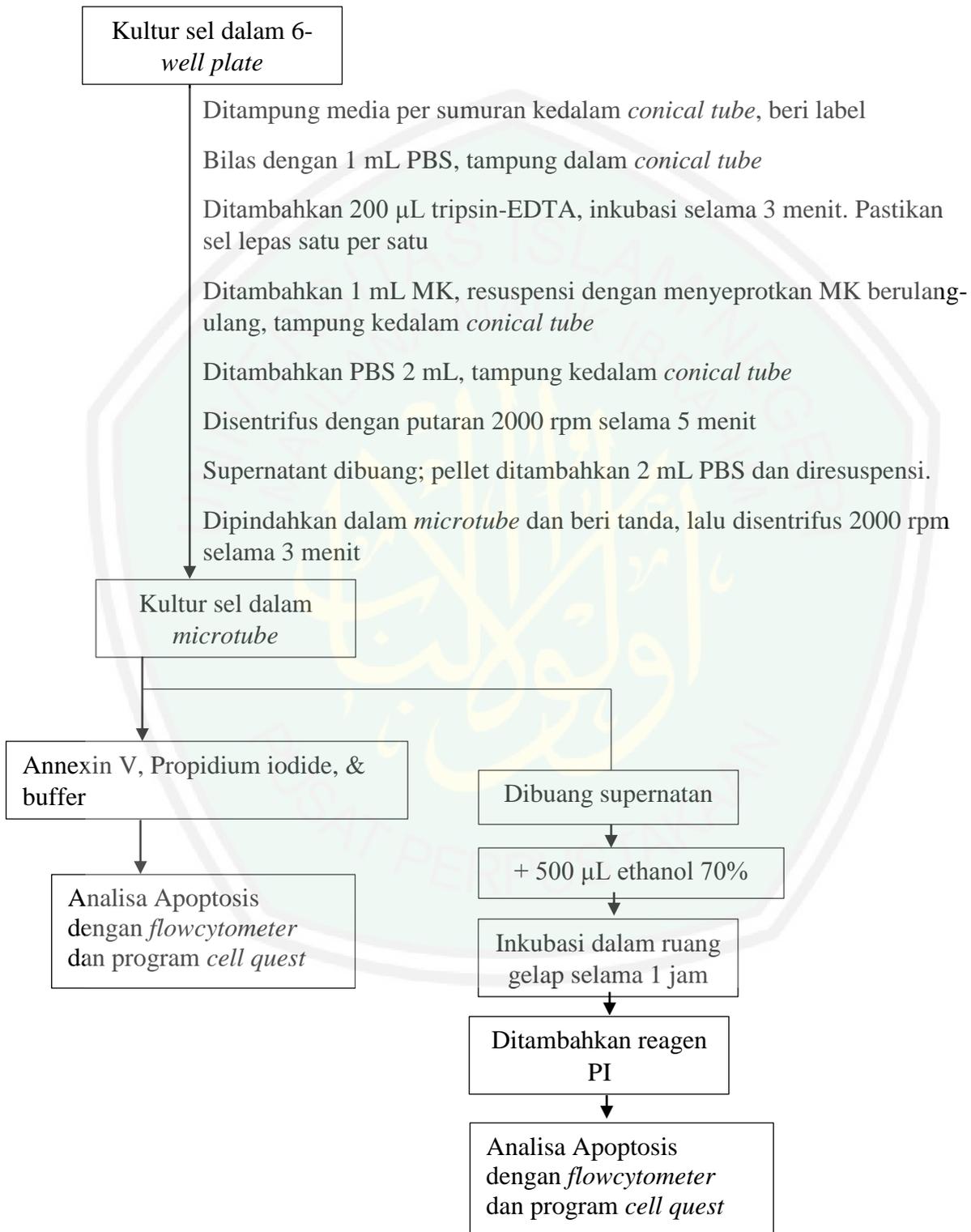


### L.1.6 Uji *Flowcytometry*

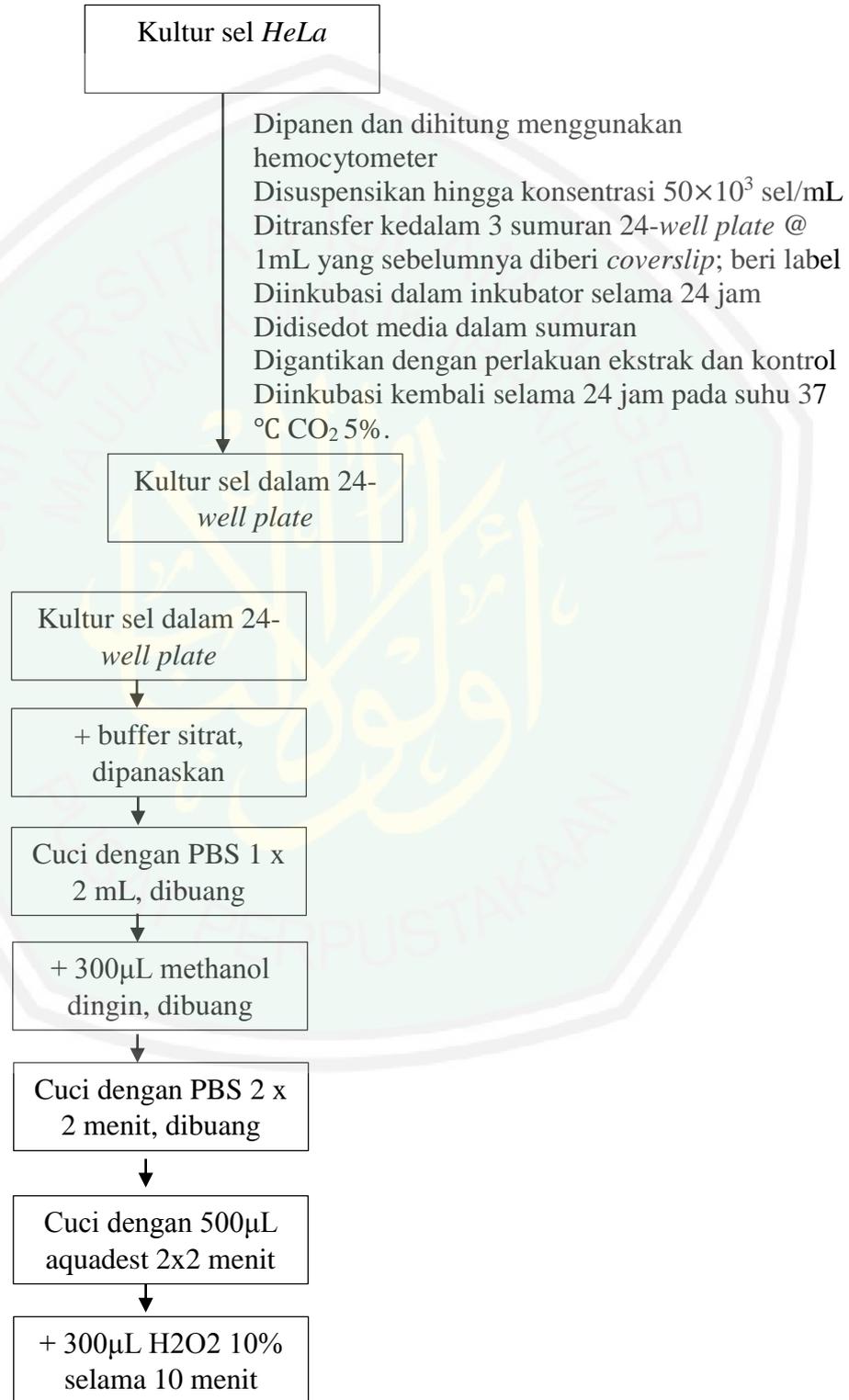


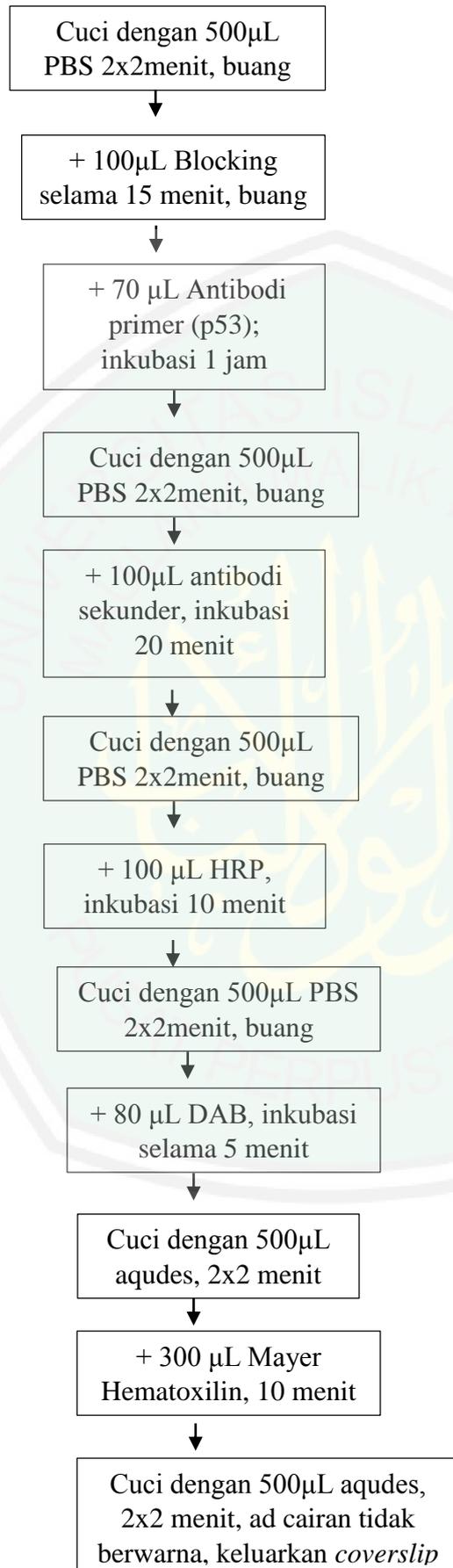
Dipanen dan dihitung menggunakan hemocytometer  
Disuspensikan hingga konsentrasi  $50 \times 10^4$  sel/mL  
Ditransfer kedalam sumuran 6-well plate @ 2mL; beri label  
Diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam  
Didisedot media dalam sumuran  
Digantikan dengan perlakuan ekstrak dan kontrol  
Diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37 °C CO<sub>2</sub> 5%.

Kultur sel dalam 6-well plate



### L.1.7 Uji Immunositokimia





Coverslip

Diletakkan pada plate kaca

Dicelupkan pada ethanol

Dicelupkan xylol

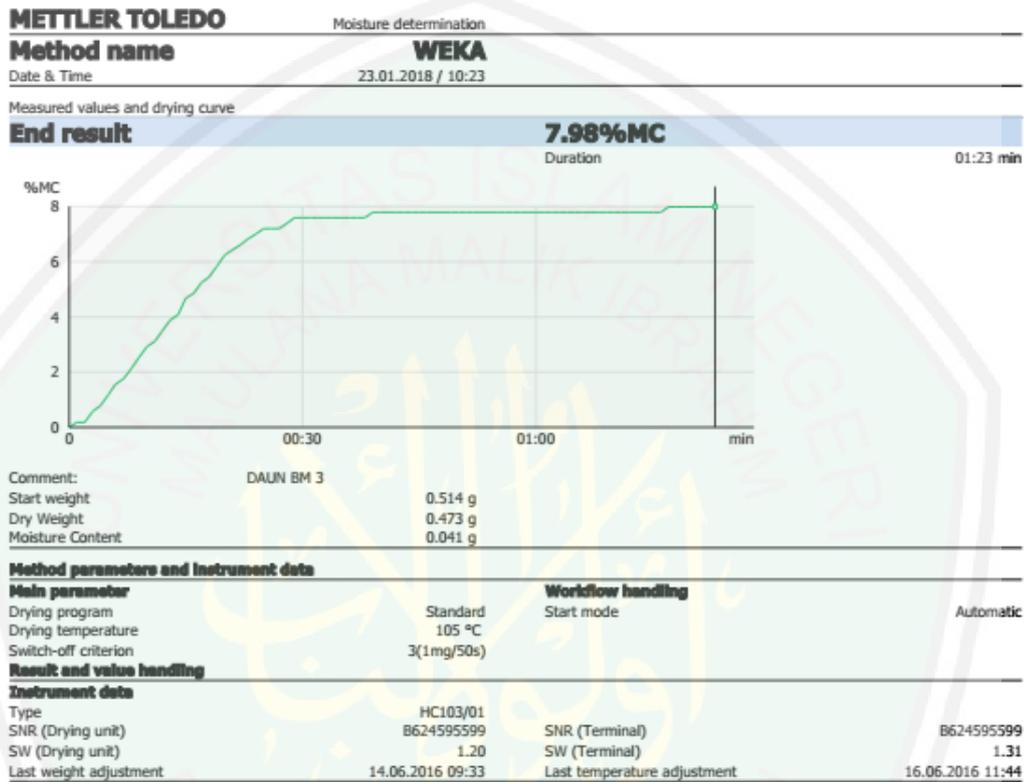
Ditutup dengan cover glass

Diamati pada perbesaran 40x

Hasil



## Lampiran 2. Uji Kadar Air Simplisia Daun Bunga Matahari



### Lampiran 3 Perhitungan Rendemen

#### 1. Daun tanaman Bunga Matahari

Berat simplisia = 59,2447 g

Berat cawan akhir (A) = 32,837 g

Berat cawan awal (A) = 29,823 g

Berat cawan akhir (B) = 33,738 g

Berat cawan awal (B) = 29,875 g

Rumus

$$\%rendemen = \frac{\text{Berat ekstrak yang didapat (g)}}{\text{Berat simplisia awal (g)}} \times 100\%$$

Jawab

$$\begin{aligned} \text{Berat ekstrak yang didapat (A)} &= \text{Berat cawan akhir (A)} - \text{Berat cawan awal (A)} \\ &= 32,837 \text{ gram} - 29,8226 \text{ gram} \\ &= 3,0144 \text{ gram} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Berat ekstrak yang didapat (B)} &= \text{Berat cawan akhir (B)} - \text{Berat cawan awal (B)} \\ &= 33,7384 \text{ gram} - 29,8752 \text{ gram} \\ &= 3,8632 \text{ gram} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Total berat ekstrak yang didapat} &= \text{Berat ekstrak(A)} - \text{Berat ekstrak(B)} \\ &= 3,0144 \text{ gram} - 3,8632 \text{ gram} \\ &= 6,8776 \text{ gram} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \%rendemen (\text{daun}) &= \frac{\text{Berat ekstrak yang didapat}}{\text{Berat simplisia awal}} \times 100\% \\ &= \frac{6,8776 \text{ gram}}{58,2447 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 11,808\% \end{aligned}$$

## Lampiran 4. Perhitungan Data dan Hasil Uji Aktivitas Ekstrak Daun Bunga

### Matahari

#### L.4.1 Perhitungan Konsentrasi Sel

- Kamar A = 103
- Kamar B = 141
- Kamar C = 112
- Kamar D = 104

$$\begin{aligned}\Sigma \text{ Sel} &= \frac{\Sigma \text{ sel kamar } (A+B+C+D)}{4} \times 10^4 \\ &= \frac{103+141+112+104}{4} \times 10^4 \\ &= 115 \times 10^4 \text{ sel/mL}\end{aligned}$$

#### ➤ Pro Flow cytometry (Tanam Sel)

6 well @ 2 mL mengandung  $50 \times 10^4$

$$\frac{6 \times 50 \times 10^4}{115 \times 10^4} = \frac{300}{115} = 2,608 \text{ mL}$$

#### ➤ Pro Immunocytochemistry

3 well @ 1 mL mengandung  $50 \times 10^3$

$$\frac{3 \times 50 \times 10^3}{115 \times 10^4} = \frac{15}{115} = 0.13 \text{ mL} = 130 \mu\text{L}$$

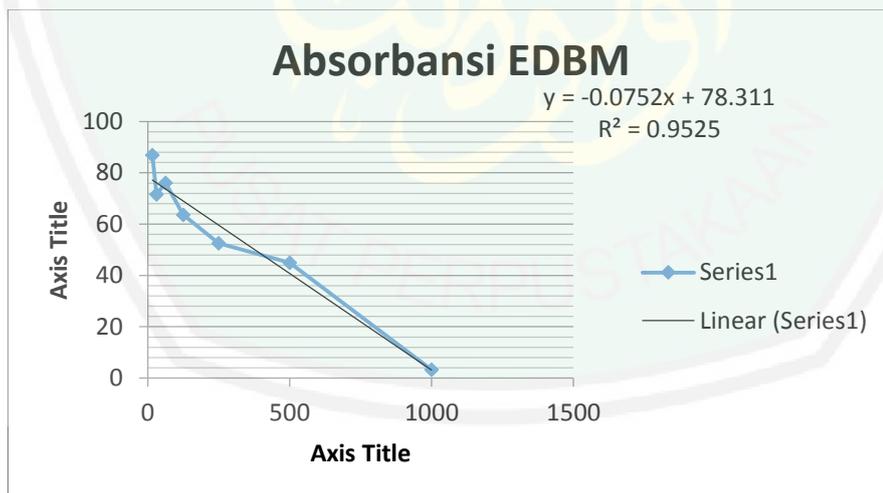
## L.4.2 Perhitungan IC<sub>50</sub>

### Ekstrak Daun Bunga Matahari

Konsentrasi	Absorbansi			%sel hidup
	1	2	3	
1000	0,112	0,11	0.11	3.265993
500	0,518	0,51	0.543	44.98316
250	0,615	0,579	0.6	52.49158
125	0,706	0,666	0.752	63.60269
62,5	0,794	0,848	0.854	76.12795
31,25	0,771	0,788	0.803	71.61616
15,625	0,94	0,899	0.978	86.93603

Kontrol sel

Kontrol Media	0.076	0.079	0.08	0.078333
Kontrol Sel	1.062	1.088	1.055	1.068333



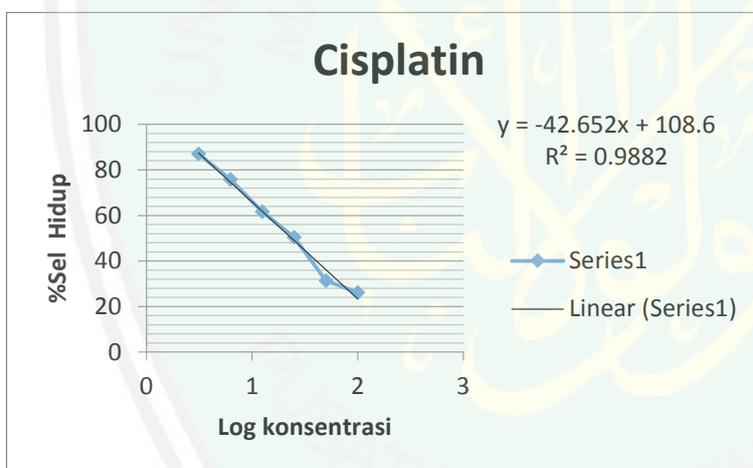
$$IC_{50} = \frac{50-B}{A}$$

$$\frac{50-78,31}{-0,075} = \frac{-28,31}{-0,075} = 377,46 \mu g/mL$$

## Cisplatin

Konsentrasi	Abs1	Abs2	Abs3	
100	0.156	0.169	0.162	26.1158594
50	0.188	0.175	0.179	31.3390313
25	0.288	0.243	0.212	50.4273504
12.5	0.33	0.268	0.263	61.6334283
6.25	0.311	0.343	0.356	75.7834758
3.125	0.385	0.366	0.378	87.0845204

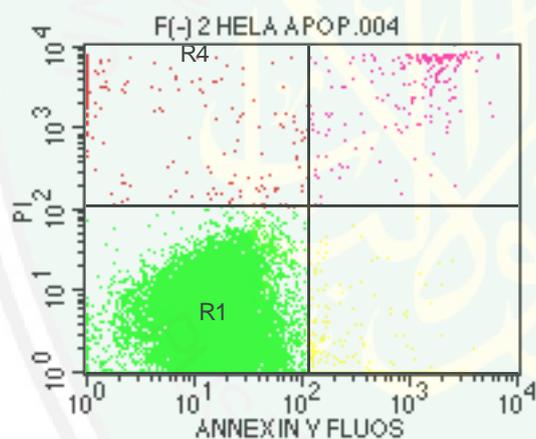
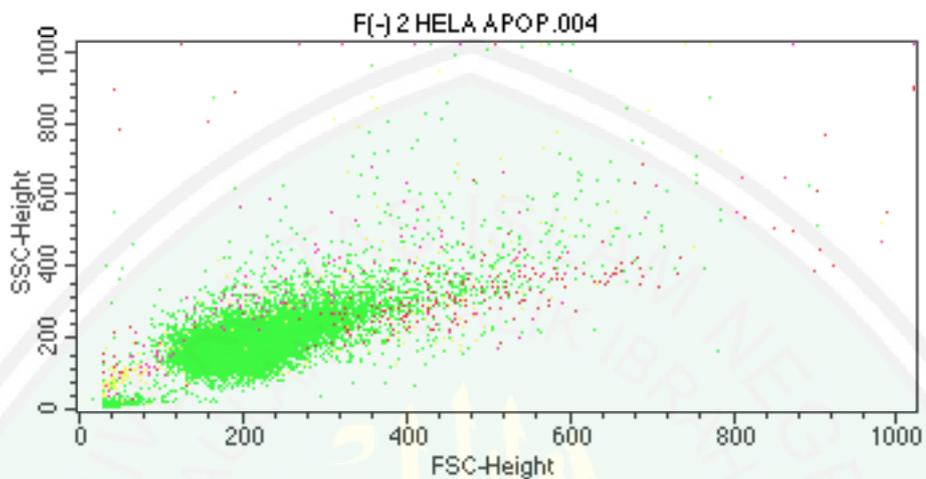
KM	0.074	0.069	0.069	0.070667
KS	0.415	0.431	0.419	0.421667



$$IC_{50} = \frac{50 - 108,6}{-42,56} = \frac{-58,6}{-42,56} = 1,376879699 ; \text{antilog} = 23,8165965$$

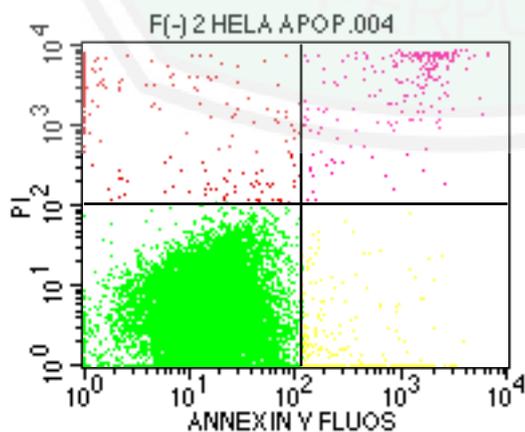
### L.4.3 Data Apoptosis dengan *Flow cytometri*

#### Kontrol Sel



File: F(-) 2 HELA APOP.004  
 Patient ID: 0323.18  
 Acquisition Date: 23-Mar-18  
 Gate: No Gate  
 Total Events: 20000

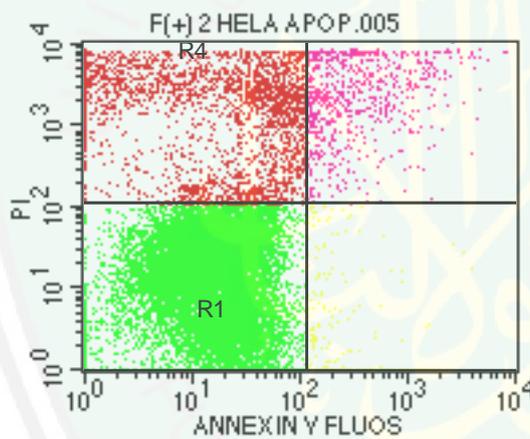
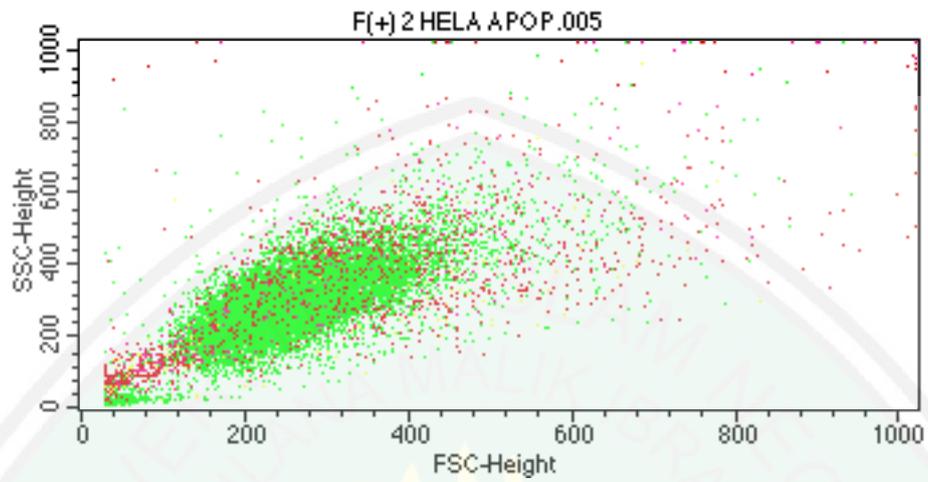
Region	% Gated	% Total
R1	95.59	95.59
R2	1.76	1.76
R3	1.14	1.14
R4	1.54	1.54



File: F(-) 2 HELA APOP.004  
 Patient ID: 0323.18  
 Acquisition Date: 23-Mar-18  
 Gate: No Gate  
 Total Events: 20000  
 Quad Location: 115, 100

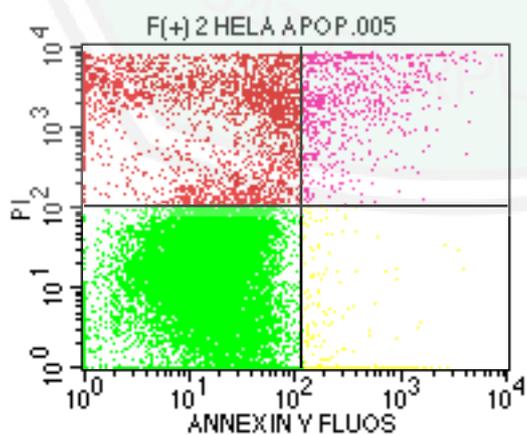
Quad	% Gated	% Total
UL	1.54	1.54
UR	1.14	1.14
LL	95.58	95.58
LR	1.75	1.75

### Kontrol Positif (Cisplatin)



File: F(+)-2 HELA APOP.005  
 Patient ID: 0323.18  
 Acquisition Date: 23-Mar-18  
 Gate: No Gate  
 Total Events: 20000

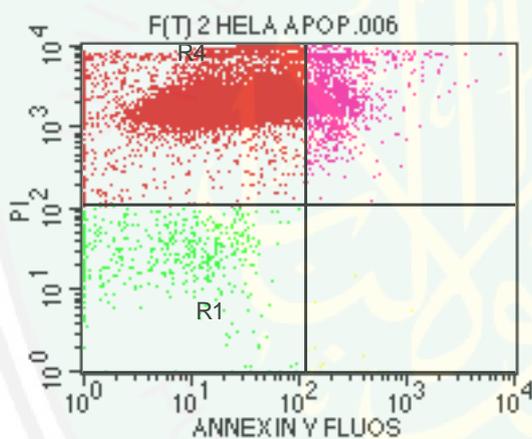
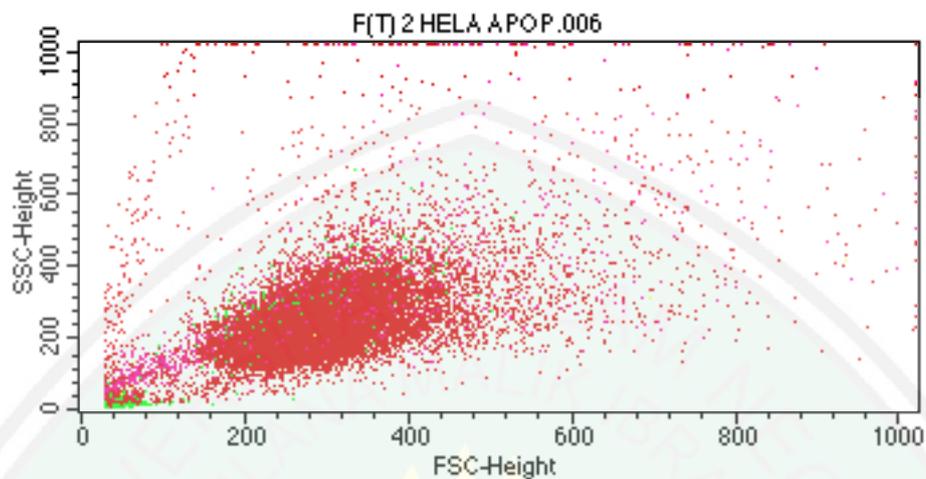
Region	% Gated	% Total
R1	79.13	79.13
R2	1.29	1.29
R3	3.62	3.62
R4	16.05	16.05



File: F(+)-2 HELA APOP.005  
 Patient ID: 0323.18  
 Acquisition Date: 23-Mar-18  
 Gate: No Gate  
 Total Events: 20000  
 Quad Location: 115, 100

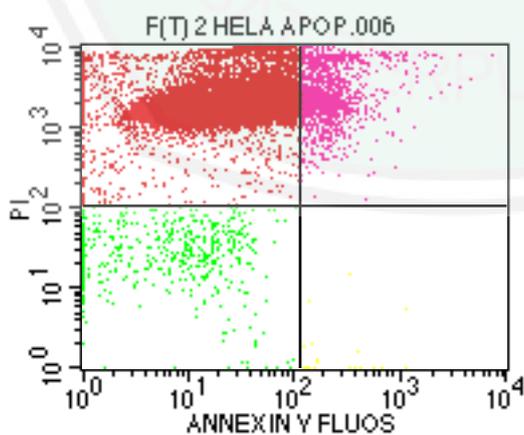
Quad	% Gated	% Total
UL	16.29	16.29
UR	3.62	3.62
LL	78.84	78.84
LR	1.26	1.26

**Ekstrak Daun Bunga Matahari**



File: F(T) 2 HELA APOP.006  
 Patient ID: 0323.18  
 Acquisition Date: 23-Mar-18  
 Gate: No Gate  
 Total Events: 20000

Region	% Gated	% Total
R1	2.50	2.50
R2	0.09	0.09
R3	7.08	7.08
R4	90.44	90.44

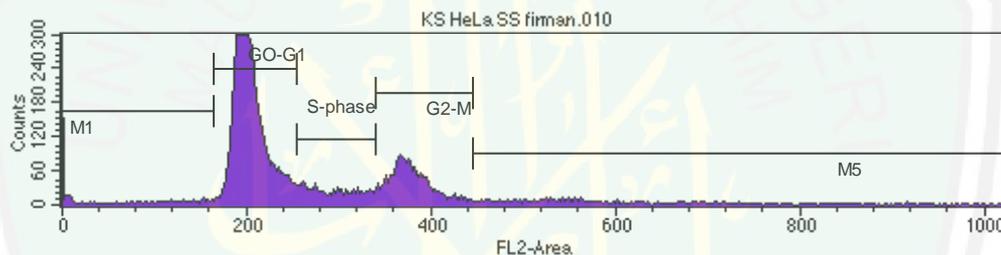
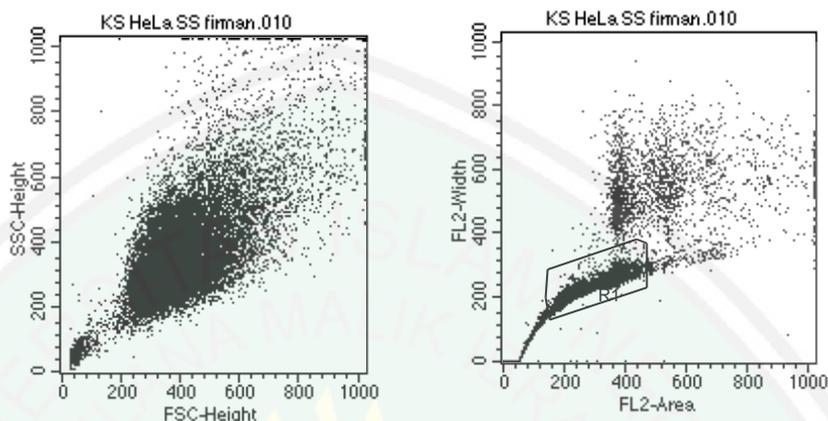


File: F(T) 2 HELA APOP.006  
 Patient ID: 0323.18  
 Acquisition Date: 23-Mar-18  
 Gate: No Gate  
 Total Events: 20000  
 Quad Location: 115, 100

Quad	% Gated	% Total
UL	90.45	90.45
UR	6.99	6.99
LL	2.47	2.47
LR	0.09	0.09

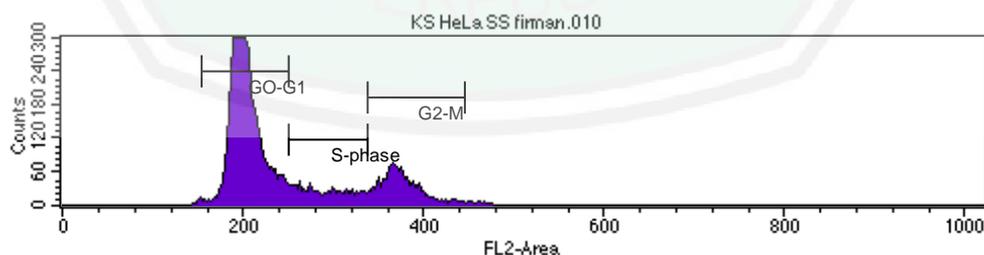
### L.4.4 Data Siklus Sel dengan *Flow cytometry*

#### Kontrol Sel



File: KS HeLa SS firman.010 Total Events: 20000  
 X Parameter: FL2-A FL2-Area (Linear)

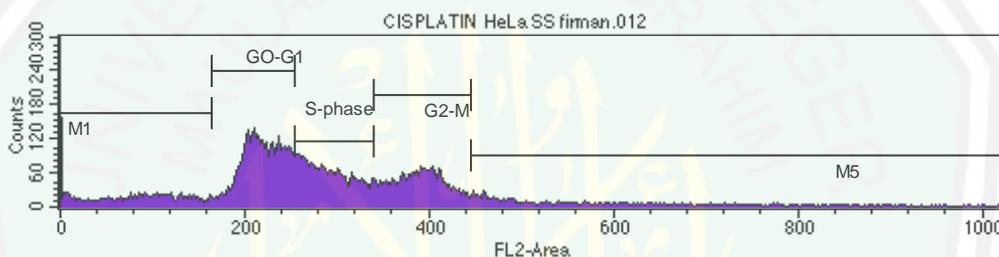
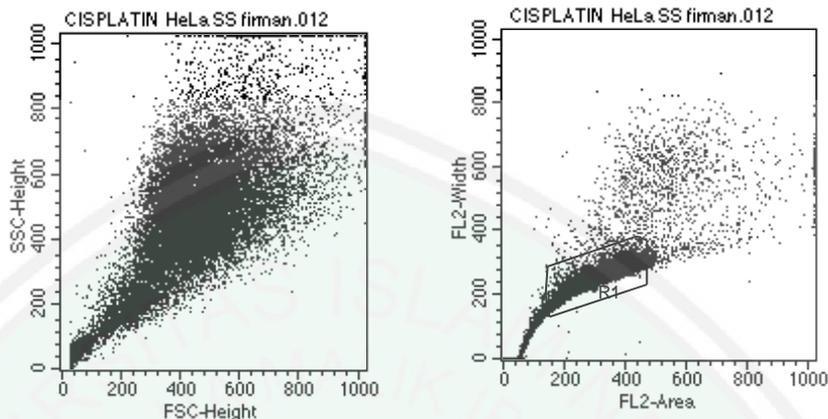
Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Median
All	20000	100.00	100.00	264.95	51.89	211.00
M1	1153	5.76	5.76	50.33	118.34	9.00
GO-G1	12014	60.07	60.07	204.10	8.22	200.00
S-phase	1898	9.49	9.49	295.56	8.78	296.00
G2-M	3533	17.66	17.66	377.94	5.92	374.00
M5	1462	7.31	7.31	623.05	25.14	564.00



File: KS HeLa SS firman.010 Total Events: 20000  
 X Parameter: FL2-A FL2-Area (Linear)

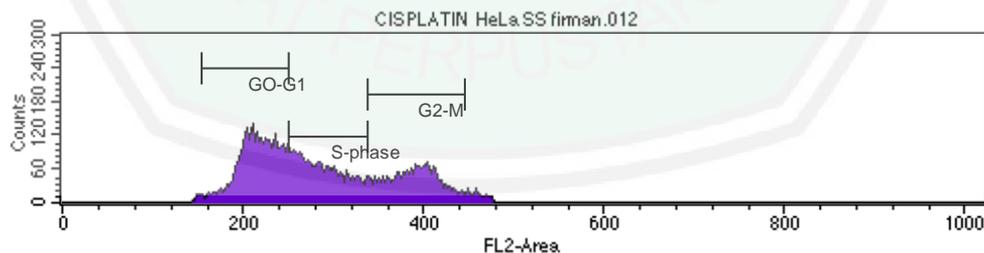
Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Median
All	16723	100.00	83.61	242.76	28.61	208.00
GO-G1	12004	71.78	60.02	203.63	8.19	200.00
S-phase	1901	11.37	9.50	293.25	8.96	293.00
G2-M	2770	16.56	13.85	374.80	5.72	372.00

**Kontrol Positif (Cisplatin)**



File: CISPLATIN HeLa SS firman.012 Total Events: 20000  
 X Parameter: FL2-A FL2-Area (Linear)

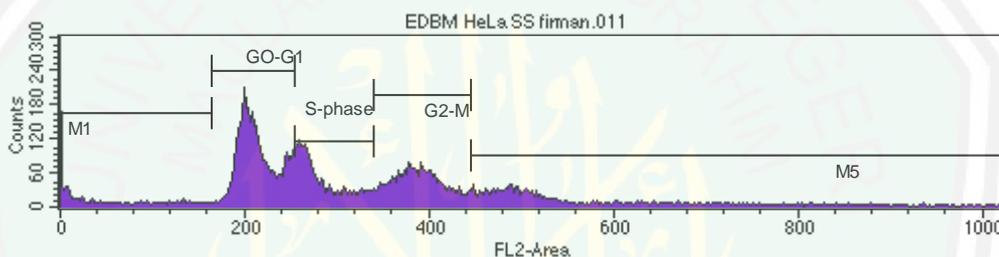
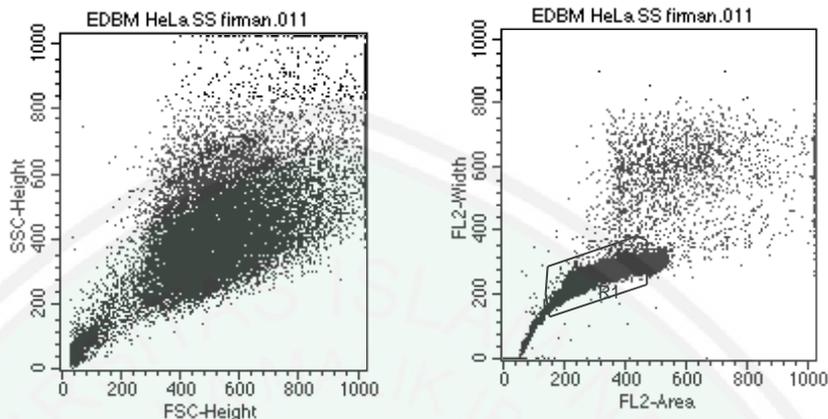
Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Median
All	20000	100.00	100.00	273.75	51.82	258.00
M1	3020	15.10	15.10	59.09	93.75	54.00
GO-G1	6759	33.79	33.79	219.89	9.45	220.00
S-phase	4687	23.43	23.43	290.73	8.34	288.00
G2-M	4252	21.26	21.26	389.31	6.79	391.00
M5	1436	7.18	7.18	582.54	25.38	528.00



File: CISPLATIN HeLa SS firman.012 Total Events: 20000  
 X Parameter: FL2-A FL2-Area (Linear)

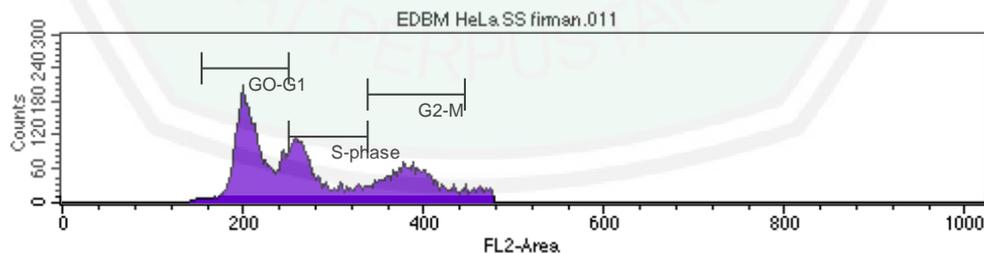
Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Median
All	15664	100.00	78.32	287.12	26.65	268.00
GO-G1	6649	42.45	33.25	218.16	9.77	219.00
S-phase	4721	30.14	23.61	288.61	8.44	285.00
G2-M	4042	25.80	20.21	388.42	6.82	390.00

**Ekstrak Daun Bunga Matahari**



File: EDBM HeLa SS firman.011 Total Events: 20000  
 X Parameter: FL2-A FL2-Area (Linear)

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Median
All	20000	100.00	100.00	293.48	58.01	262.00
M1	2574	12.87	12.87	26.51	175.30	0.00
GO-G1	6796	33.98	33.98	214.99	9.47	210.00
S-phase	3489	17.45	17.45	283.00	8.86	273.00
G2-M	4256	21.28	21.28	388.11	6.78	386.00
M5	3054	15.27	15.27	574.14	24.98	511.00



File: EDBM HeLa SS firman.011 Total Events: 20000  
 X Parameter: FL2-A FL2-Area (Linear)

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Median
All	14509	100.00	72.55	284.31	28.94	259.00
GO-G1	6649	45.83	33.25	213.41	9.38	210.00
S-phase	3579	24.67	17.89	280.69	8.80	271.00
G2-M	3865	26.64	19.32	387.21	6.81	385.00

## L.4.4 Analisa data dengan program SPSS

### Data Apoptosis

#### Case Processing Summary

	Perlakuan	Valid		Cases Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
presentase	ks	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	cispltin	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	ED	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%

#### Descriptives

	Perlakuan	Statistic	Std. Error		
presentase	ks	Mean	2.9000	.05774	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.6516	
			Upper Bound	3.1484	
		5% Trimmed Mean	.		
		Median	2.9000		
		Variance	.010		
		Std. Deviation	.10000		
		Minimum	2.80		
		Maximum	3.00		
		Range	.20		
		Interquartile Range	.		
		Skewness	.000	1.225	
		Kurtosis	.	.	
		cispltin	cispltin	Mean	4.9100
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			4.6616	
	Upper Bound			5.1584	
5% Trimmed Mean	.				
Median	4.9100				
Variance	.010				
Std. Deviation	.10000				
Minimum	4.81				
Maximum	5.01				
Range	.20				
Interquartile Range	.				
Skewness	.000			1.225	
Kurtosis	.			.	
ED	ED			Mean	7.1700

### Descriptives

Perlakuan		Statistic	Std. Error
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	6.9216	
	Upper Bound	7.4184	
5% Trimmed Mean		.	
Median		7.1700	
Variance		.010	
Std. Deviation		.10000	
Minimum		7.07	
Maximum		7.27	
Range		.20	
Interquartile Range		.	
Skewness		.000	1.225
Kurtosis		.	.

### Tests of Normality

Perlakuan	Statistic	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
presentase	ks	.175	3	.	1.000	3	1.000
	cisplatin	.175	3	.	1.000	3	1.000
	ED	.175	3	.	1.000	3	1.000

a. Lilliefors Significance Correction

### Oneway

#### Test of Homogeneity of Variances

presentase

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.000	2	6	1.000

## ANOVA

presentase

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27.381	2	13.690	1369.030	.000
Within Groups	.060	6	.010		
Total	27.441	8			

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: presentase

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ks	cispltin	-2.01000*	.08165	.000	-2.2605	-1.7595
	ED	-4.27000*	.08165	.000	-4.5205	-4.0195
cispltin	ks	2.01000*	.08165	.000	1.7595	2.2605
	ED	-2.26000*	.08165	.000	-2.5105	-2.0095
ED	ks	4.27000*	.08165	.000	4.0195	4.5205
	cispltin	2.26000*	.08165	.000	2.0095	2.5105

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## Homogeneous Subsets

presentase

Tukey HSD<sup>a</sup>

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
ks	3	2.9000		
cispltin	3		4.9100	
ED	3			7.1700
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

NPAR TESTS

## NPar Tests

### Kruskal-Wallis Test

#### Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank
presentase	ks	3	2.00
	cispltin	3	5.00
	ED	3	8.00
	Total	9	

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

presentase	
Chi-Square	7.200
df	2
Asymp. Sig.	.027

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

```
ONEWAY presentase BY Perlakuan
  /STATISTICS HOMOGENEITY
  /PLOT MEANS
  /MISSING ANALYSIS
  /POSTHOC=TUKEY ALPHA(0.05) .
```

## Oneway

### Test of Homogeneity of Variances

presentase

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.000	2	6	1.000

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: presentase

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean			95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
ks	cispltin	-2.01000*	.08165	.000	-2.2605	-1.7595
	ED	-4.27000*	.08165	.000	-4.5205	-4.0195
cispltin	ks	2.01000*	.08165	.000	1.7595	2.2605
	ED	-2.26000*	.08165	.000	-2.5105	-2.0095
ED	ks	4.27000*	.08165	.000	4.0195	4.5205
	cispltin	2.26000*	.08165	.000	2.0095	2.5105

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## Data Siklus Sel

### Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
GOG1	Kontrol Sel	0.175	3		1.000	3	1.000
	Cisplatin	0.175	3		1.000	3	1.000
	EDBM	0.175	3		1.000	3	1.000
S	Kontrol Sel	0.175	3		1.000	3	1.000
	Cisplatin	0.175	3		1.000	3	1.000
	EDBM	0.175	3		1.000	3	1.000
G2M	Kontrol Sel	0.175	3		1.000	3	1.000
	Cisplatin	0.175	3		1.000	3	1.000
	EDBM	0.175	3		1.000	3	1.000
Debris	Kontrol Sel	0.175	3		1.000	3	1.000
	Cisplatin	0.175	3		1.000	3	1.000
	EDBM	0.175	3		1.000	3	1.000

a. Lilliefors Significance Correction

### Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
GOG1	Based on Mean	1.612	2	6	0.275

	Based on Median	1.612	2	6	0.275
	Based on Median and with adjusted df	1.612	2	4.040	0.306
	Based on trimmed mean	1.612	2	6	0.275
S	Based on Mean	0.372	2	6	0.704
	Based on Median	0.372	2	6	0.704
	Based on Median and with adjusted df	0.372	2	4.699	0.708
	Based on trimmed mean	0.372	2	6	0.704
G2M	Based on Mean	1.371	2	6	0.323
	Based on Median	1.371	2	6	0.323
	Based on Median and with adjusted df	1.371	2	3.465	0.364
	Based on trimmed mean	1.371	2	6	0.323
Debris	Based on Mean	1.255	2	6	0.351
	Based on Median	1.255	2	6	0.351
	Based on Median and with adjusted df	1.255	2	4.158	0.375
	Based on trimmed mean	1.255	2	6	0.351

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GOG1	Between Groups	1371.363	2	685.681	#####	0.000
	Within Groups	0.040	6	0.007		
	Total	1371.403	8			
S	Between Groups	293.446	2	146.723	#####	0.000
	Within Groups	0.009	6	0.001		
	Total	293.454	8			
G2M	Between Groups	25.993	2	12.997	11140.029	0.000
	Within Groups	0.007	6	0.001		
	Total	26.000	8			
Debris	Between Groups	346.269	2	173.134	25460.926	0.000
	Within Groups	0.041	6	0.007		
	Total	346.309	8			

## Multiple Comparisons

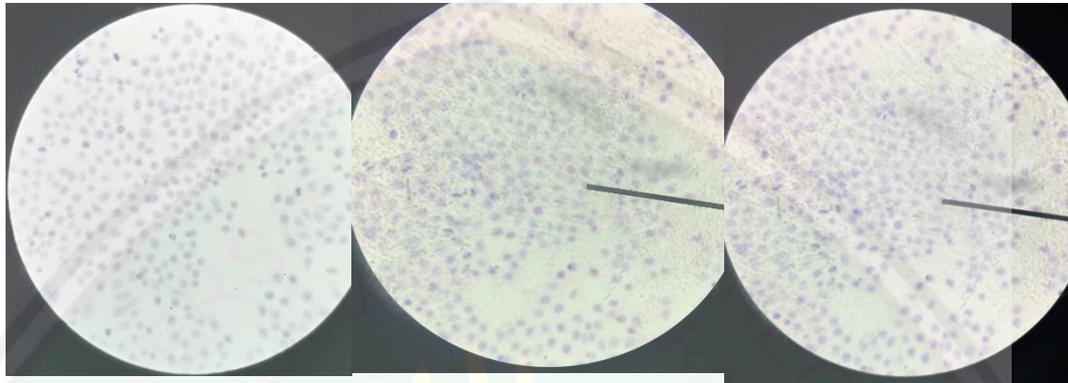
Tukey HSD

Dependent Variable			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
GOG1	Kontrol Sel	Cisplatin	26,28000 <sup>†</sup>	0.06683	0.000	26.0749	26.4851
		EDBM	26,09000 <sup>†</sup>	0.06683	0.000	25.8849	26.2951
	Cisplatin	Kontrol Sel	-26,28000 <sup>†</sup>	0.06683	0.000	-26.4851	-26.0749
		EDBM	-0.19000	0.06683	0.066	-0.3951	0.0151
	EDBM	Kontrol Sel	-26,09000 <sup>†</sup>	0.06683	0.000	-26.2951	-25.8849
		Cisplatin	0.19000	0.06683	0.066	-0.0151	0.3951
S	Kontrol Sel	Cisplatin	13,94000 <sup>†</sup>	0.03091	0.000	-14.0348	-13.8452
		EDBM	-7,96000 <sup>†</sup>	0.03091	0.000	-8.0548	-7.8652
	Cisplatin	Kontrol Sel	13,94000 <sup>†</sup>	0.03091	0.000	13.8452	14.0348
		EDBM	5,98000 <sup>†</sup>	0.03091	0.000	5.8852	6.0748
	EDBM	Kontrol Sel	7,96000 <sup>†</sup>	0.03091	0.000	7.8652	8.0548
		Cisplatin	-5,98000 <sup>†</sup>	0.03091	0.000	-6.0748	-5.8852
G2M		Cisplatin	-3,59000 <sup>†</sup>	0.02789	0.000	-3.6756	-3.5044

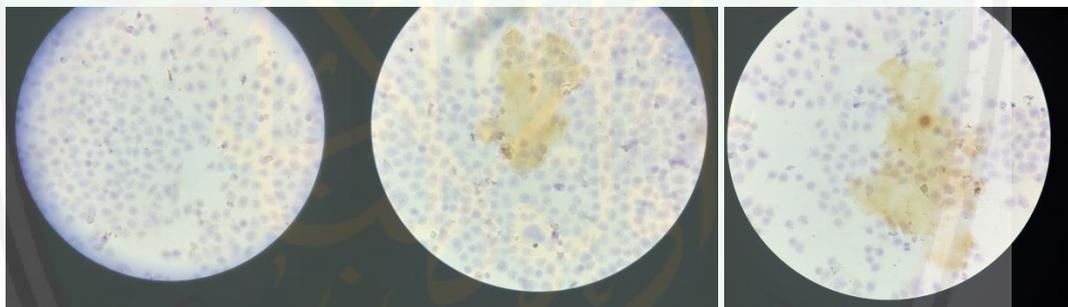
	Kontrol Sel	EDBM	-3,62000*	0.02789	0.000	-3.7056	-3.5344
	Cisplatin	Kontrol Sel	3,59000*	0.02789	0.000	3.5044	3.6756
		EDBM	-0.03000	0.02789	0.562	-0.1156	0.0556
	EDBM	Kontrol Sel	3,62000*	0.02789	0.000	3.5344	3.7056
		Cisplatin	0.03000	0.02789	0.562	-0.0556	0.1156
Debris	Kontrol Sel	Cisplatin	-9,21000*	0.06733	0.000	-9.4166	-9.0034
		EDBM	-	0.06733	0.000	-15.2766	-14.8634
			15,07000*				
	Cisplatin	Kontrol Sel	9,21000*	0.06733	0.000	9.0034	9.4166
		EDBM	-5,86000*	0.06733	0.000	-6.0666	-5.6534
	EDBM	Kontrol Sel	15,07000*	0.06733	0.000	14.8634	15.2766
		Cisplatin	5,86000*	0.06733	0.000	5.6534	6.0666

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

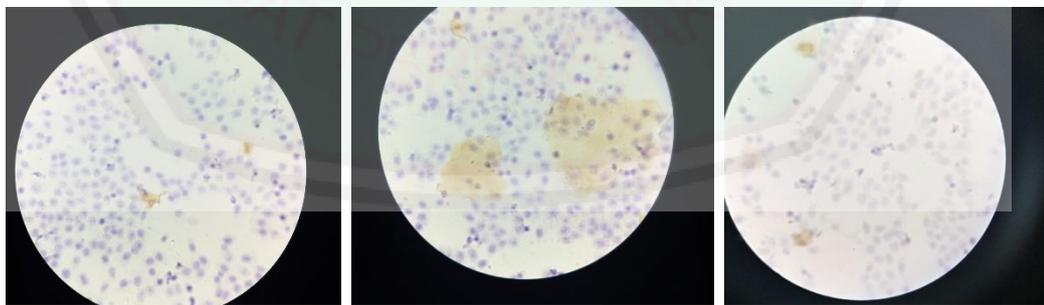
#### L.4.6 Immunositokimia Ekspresi p53



Kontrol sel



Cisplatin



Ekstrak daun bunga matahari

## Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian

### L.5.1 Preparasi Sampel



Tanaman bunga matahari



daun bunga matahari setelah pencucian



Daun bunga matahari kering

### L.5.2 Ekstraksi



Penyaringan filtrat



Penguanan pelarut

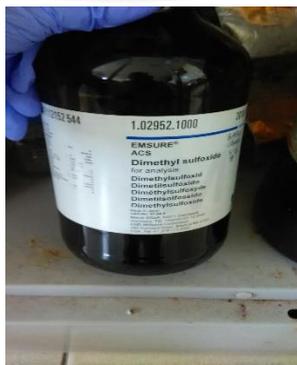


Penimbangan kstrak daun

### L.5.3 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode MTT



Media RPMI



DMSO



SDS

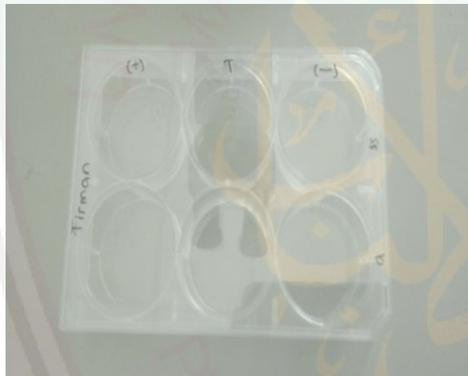


Kontrol sel setelah (pemberian MTT)

Cisplatin dosis tinggi (pemberian MTT)

Ekstrak daun bunga matahari dosis tinggi (pemberian MTT)

#### L.5.4 Uji Flowcytometry



### L.5.5 Uji Immunositokimia



	<b>FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN</b> <b>UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG</b> <b>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN</b> Gedung Klinik UMMI Lt 2 Jalan Gajayana No. 50, Dlimoyo, Kec Lowokwaru, Kota Malang E-mail: <a href="mailto:kepk.fkik@uin-malang.ac.id">kepk.fkik@uin-malang.ac.id</a> - Website : <a href="http://www.kepk.fkik.uin-malang.ac.id">http://www.kepk.fkik.uin-malang.ac.id</a>
	<b>KETERANGAN KELAIKAN ETIK</b> <b>(ETHICAL CLEARANCE)</b> <b>No. 002/EC/KEPK-FKIK/2018</b>

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG TELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN :

**Judul** Aktivitas Anti Kanker pada sel kanker serviks (HeLa) dan Toksisitas sel normal Vero dari bagian akar, biji, batang, dan daun (*Helianthus annuus*)

**Sub Judul** Aktivitas Anti Kanker pada sel kanker serviks (HeLa) dan Toksisitas sel normal Vero dari bagian akar, biji, batang, dan daun (*Helianthus annuus*)

**Peneliti** Mochamad Firman Amrulloh  
Jauza Ulfah  
dr. Ana Rahmawati, MBiomed

**Unit / Lembaga** Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

**Tempat Penelitian** Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM  
Laboratorium Farmasi UGM

DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN TERSEBUT TELAH MEMENUHI SYARAT ATAU LAIK ETIK.

Mengetahui  
Dekan **UIN Maulana Malik Ibrahim Malang**



Malang, **23 APR 2018**  
Ketua

Prof. Dr. H. Bambang Pardjianto, SpB. SpBP-RE(K)  
NIPT. 20161201 1 515

dr. Avin Ainur F, MBiomed  
NIP. 19800203 200912 2 002

- Keterangan :**
- Keterangan Laik Etik Ini berlaku 1 (satu) tahun sejak tanggal dikeluarkan.
  - Pada akhir penelitian, laporan Pelaksanaan Penelitian harus diserahkan kepada KEPK-FKIK dalam bentuk *soft copy*.
  - Apabila ada perubahan protokol dan/atau Perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR  
DINAS KESEHATAN  
UPT MATERIA MEDICA BATU

Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396  
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/ 400 / 102.7/ 2017  
Sifat : Biasa  
Perihal : Determinasi Tanaman Bunga Matahari

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : JAUZA ULFAH  
NIM : 14670023  
Instansi : JURUSAN FARMASI, FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

- Perihal determinasi tanaman bunga matahari  
Kingdom : Plantae (Tumbuhan)  
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)  
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)  
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)  
Kelas : Magnoliopsida  
Bangsa : Asterales  
Suku : Asteraceae  
Marga : Helianthus  
Jenis : *Helianthus annuus* L.  
Nama Umum : Bunga matahari, sunflower, mirasol, xiang ri kui, himawari, koujitsuki.  
Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15a-109b-119b-120a-121a-122a.
- Morfologi : Habitus: Terna semusim, tinggi 3-5 m tergantung varietasnya. Batang: Ditumbuhi rambut kasar, tegak, jarang bercabang. Daun: Tunggal, lebar, hijau. Bunga: Majemuk, terdapat dua tipe bunga: bunga tepi atau bunga lidah yang membawa satu kelopak besar berwarna kuning cerah dan steril, dan bunga tabung yang fertil dan menghasilkan biji, bunga tabung jumlahnya bisa mencapai 2000 kuntum dalam satu tandan bunga. Buah: Buah kurung (achene), buah kering ber dinding agak keras dan tak terlalu tebal ini sering disangka 'biji' bunga. Biji: Biji yang sesungguhnya terletak di dalam, terlindung oleh buah yang serupa tempurang. Akar: Tunggang, putih kotor.
- NamaSimplisia : Helianthii anii Herba / Herba Bunga Matahari.
- Kandungan kimia : Saponin dan tannin.
- Penggunaan : Penelitian.
- Daftar Pustaka
  - Anonim. <http://www.plantamor.com/index.php?plant=661>, diakses 11 Desember 2010.
  - Syamsufidayat, Sri Sugati dan Hutapea, Johny Ria. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
  - Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 13 November 2017  
Kepala UPT Materia Medica Batu  
  
Dr. Husin M. Sidiyasa, Drs., Apt., M.Kes.  
NIP. 19671102 199103 1 003



UNIVERSITAS GADJAH MADA  
FAKULTAS KEDOKTERAN, KESEHATAN MASYARAKAT,  
DAN KEPERAWATAN  
DEPARTEMEN PARASITOLOGI

Nomor : UGM/KU/Prst/18/M/05/07/03.18  
Hal : Ijin Penelitian.

16 Maret 2018

Kepada Yth.  
MUHAMMAD FIRMAN AMRULLOH  
NIM: 14670028  
Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim  
Malang

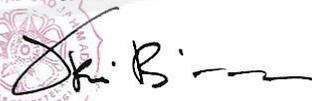
Dengan hormat,  
Menanggapi surat saudara tertanggal 15 Maret 2018 tentang ijin untuk melakukan penelitian di Laboratorium Parasitologi yang berjudul:

“UJI AKTIVITAS EKSTRAK DAUN BUNGA MATAHARI (*Helianthus annuus*) TERHADAP EKSPRESI P53, SIKLUS SEL DAN INDUKSI APOPTOSIS SEL KANKER SERVIKS HeLa”

Kami dapat mengizinkan penelitian tersebut dilakukan di Departemen Parasitologi FK. UGM., dengan catatan :

1. Mentaati peraturan yang berlaku di FK. UGM. dan Departemen Parasitologi FK. UGM.
2. Sebagai supervisor dalam pelaksanaan penelitian ini adalah Prof. dr. Supargiyono, DTM&H, SU., PhD., SpParK., dengan Teknisi: Juanna Nursanthi.
3. Menulis semua kegiatan dan hasil penelitian yang dilakukan di laboratorium dalam buku Log Penelitian; buku Log ditinggal di Laboratorium.
4. Menerapkan prinsip **Good Clinical Laboratory Practice** pada saat bekerja di laboratorium.
5. Setelah selesai melaporkan hasilnya kepada Kepala Departemen.

Atas perhatian dalam hal ini kami ucapkan terima kasih.

Kepala,  


dr. Tri Baskoro T. Satoto, MSc., PhD.  
NIP. 19580412 198601 1 001.

Tembusan Yth. :

1. Prof. dr. Supargiyono, DTM&H, SU., PhD., SpParK.
2. Juanna Nursanthi
3. Arsip

Gedung Prof. Drs. R. Radiopoetro Lt. IV Sayap Timur, Sekip, Yogyakarta 55281  
Telp. (0274) 546215. Fax. 546215. E-mail : parasitfkugm@yahoo.com

# SERTIFIKAT

Diberikan kepada

**Mochamad Firman Amrulloh**

Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

sebagai

**Peserta**

Kursus Singkat Kultur Jaringan yang diselenggarakan pada tanggal 12 – 15 Maret 2018  
di Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Yogyakarta, 15 Maret 2018  
Penyelenggara  
Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada



Prof. dr. Suparigiyo, DTM&H., SU., Ph.D., SpPark.  
NIP. 195309111978031001



**KEMENTERIAN AGAMA**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN**  
**JURUSAN FARMASI**

Jl. Ir. Soekarno No.34 Dadaprejo Batu, Telepon (0341) 577033 Faksimile (0341) 577033  
Website: <http://fkik.uin-malang.ac.id> E-mail: [fkik@uin-malang.ac.id](mailto:fkik@uin-malang.ac.id)

**LEMBAR PERSETUJUAN PERBAIKAN (REVISI) UJIAN SKRIPSI**

Naskah ujian skripsi yang disusun oleh:

Nama : Mochamad Firman Amrulloh  
NIM : 14670028  
Judul : Uji Aktivitas Ekstrak Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus L.*) Terhadap Apoptosis, Siklus sel, dan Ekspresi p53 pada Sel Kanker Serviks *HeLa*.

Tanggal Ujian Skripsi : Selasa, 5 Juni 2018

Telah dilakukan perbaikan sesuai dengan saran tim pembimbing dan tim penguji serta diperkenankan untuk melanjutkan ke tahap penelitian.

No	Nama Dosen	Tanggal Revisi	Tanda Tangan
1	Dr. Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt.	7 Juni 2018	
2	dr. Ana Rahamawati, M. Biomed.	26 Juni 2018	
3	drg. Arief Suryadinata, Sp. Ort.	26 Juni 2018	
4	Dr. Ach. Nashichuddin, MA	27 Juni 2018	

Catatan :

1. Batas waktu maksimum melakukan revisi 2 Minggu. Jika tidak selesai, mahasiswa TIDAK dapat mendaftarkan diri untuk mengikuti Yudisium
2. Lembar revisi dilampirkan dalam naskah skripsi yang telah dijilid, dan dikumpulkan di Bagian Administrasi Jurusan Farmasi selanjutnya mahasiswa berhak menerima Bukti Lulus Ujian Skripsi.

Malang, Juni 2018  
Mengetahui,  
Ketua Jurusan Farmasi  
  
Dr. Roihatul Muti'ah, M. Kes., Apt  
NIP. 19800203 200912 2003



Kedalaman Spiritual, Keagungan Akhlaq, Keluasan Ilmu dan Kematangan Profesional