

TESIS

UJI AKTIVITAS FRAKSI AKTIF HERBA PACAR AIR (*Impatiens balsamina* Linn.) TERHADAP APOPTOSIS, SITOTOKSIK DAN ANTIPROLIFERASI SEL KANKER PAYUDARA T47D



DEVI YULIANTI

04112681519018

**PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
2017**

TESIS

UJI AKTIVITAS FRAKSI AKTIF HERBA PACAR AIR (*Impatiens balsamina* Linn.) TERHADAP APOPTOSIS, SITOTOKSIK DAN ANTIPROLIFERASI SEL KANKER PAYUDARA T47D

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar
Magister Biomedik (M.Bmd)



DEVI YULIANTI

04112681519018

PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
2017

HALAMAN PENGESAHAN

UJI AKTIVITAS FRAKSI AKTIF HERBA PACAR AIR
(*Impatiens balsamina* Linn.) TERHADAP APOPTOSIS,
SITOTOKSIK DAN ANTIPROLIFERASI SEL KANKER
PAYUDARA T47D

TESIS

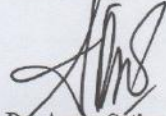
Diajukan untuk Melengkapi Salah Satu Syarat Memperoleh
Gelar Magister Biomedik (M.Bmd)

Oleh:

DEVI YULIANTI

04112681519018

Pembimbing I



Dr. Arum Setiawan, M.Si
NIP.19721122 199803 1 001

Palembang, Juli 2017
Pembimbing II



Sri Nita, S.Si, M.Si
NIP.19700716 199412 2 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran



dr. AH/Statif Husin, MS
NIP.19611209 199203 1 003

HALAMAN PERSETUJUAN

Karya tulis ilmiah berupa tesis ini dengan judul “Uji Aktivitas Fraksi Aktif Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn.) terhadap Apoptosis, Sitotoksik dan Antiproliferasi Sel Kanker Payudara T47D” telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji karya tulis ilmiah Fakultas Kedokteran Program Studi Magister Ilmu Biomedik Pasca Sarjana Universitas Sriwijaya pada tanggal 24 Juli 2017.

Palembang, 24 Juli 2017

Tim Penguji Karya Tulis Ilmiah berupa Tesis

Ketua:

1. dr. Dwi Handayani, M.Kes
NIP.19811004 200912 2 001

(.....)
Tanggal

Anggota:

2. Dr. Arum Setiawan, M.Si
NIP.19721122 199803 1 001

(.....)
Tanggal

3. Sri Nita, S.Si, M.Si
NIP.19700716 199412 2 001

(.....)
Tanggal

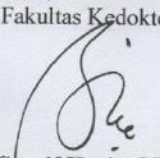
4. Dr. dr. H. Mgs. Irsan Saleh, M.Biomed
NIP.19660929 199601 1 001

(.....)
Tanggal

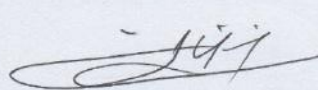
5. Dr. Salni, M.Si
NIP.19660823 199303 1 002

(.....)
Tanggal

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Unsri


dr. H. Syarif Husin, MS
NIP. 1964209 199203 1 003

Ketua Program Studi
Ilmu Biomedik


Dr. dr. Zen Hafv, M. Biomed
NIP. 19721229 199803 1 002

HALAMAN PERNYATAAN INTEGRITAS

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Devi Yulianti
NIM : 04112681519018
Judul : Uji aktivitas fraksi aktif herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) terhadap Apoptosis, Sitotoksik dan Antiproliferasi sel kanker payudara T47D

Menyatakan bahwa Laporan Tesis saya merupakan hasil karya sendiri didampingi tim pembimbing dan bukan hasil penjiplakan/plagiat. Apabila ditemukan unsur penjiplakan/plagiat dalam Laporan Tesis ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik dari Universitas Sriwijaya sesuai aturan yang berlaku.

Demikian, pernyataan ini saya buat dalam keadaan sadar dan tanpa ada paksaan dari siapapun.



Palembang, Juli 2017



Devi Yulianti

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

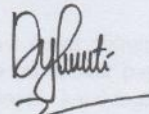
Nama : Devi Yulianti
NIM : 04112681519018
Judul : **Uji aktivitas herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.)
terhadap Apoptosis, Sitotoksik dan Antiproliferasi sel kanker
payudara T47D.**

Memberikan izin kepada pembimbing dan Universitas Sriwijaya untuk mempublikasikan hasil penelitian saya untuk kepentingan akademik dalam waktu 1 (satu) tahun untuk mempublikasikan karya penelitian saya.

Demikian, pernyataan ini saya buat dalam keadaan sadar dan tanpa ada paksaan dari siapapun.

Palembang, Juli 2017

Yang membuat pernyataan



Devi Yulianti

RINGKASAN

UJI AKTIVITAS FRAKSI AKTIF HERBA PACAR AIR (*impatiens balsamina* LINN.) TERHADAP APOPTOSIS, SITOTOKSIK DAN ANTIPROLIFERASI SEL KANKER PAYUDARA T47D

Karya Tulis Ilmiah berupa Tesis, 24 Juli 2017

Devi Yulianti; Dibimbing oleh Dr. Arum Setiawan, M.Si dan Sri Nita, S.Si, M.Si

Activity Test of Pacar Air (Impatiens balsamina Linn.) Herba Fractions activ to Apoptosis, Cytotoxicity and Antiproliferation of T47D Breast Cancer Cells
xix + 72 halaman, 10 tabel, 17 Gambar, 13 lampiran

RINGKASAN

Kanker payudara merupakan kanker yang berasal dari kelenjar, saluran kelenjar dan jaringan penunjang payudara. Pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) merupakan tanaman yang berfungsi sebagai antirematik, antiinflamasi, analgetik, peluruh haid, dan dapat melunakkan benjolan yang keras (tumor). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui uji aktivitas fraksi aktif herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) terhadap apoptosis, sitotoksik, dan antiproliferasi sel kanker payudara T47D secara *in vitro* dengan metode MTT (*microculture tetrazolium salt*). Analisis data menggunakan uji statistik Anova dan dilanjutkan dengan uji *post hoc* dengan spss 20.

Hasil penelitian didapatkan nilai IC₅₀ ekstrak metanol 166,47 µg/ml, fraksi n-heksan 67,29 µg/ml, fraksi etil asetat 25,34 µg/ml, fraksi metanol air 277,02 µg/ml, dan cisplatin 11,81 µg/ml. Hasil uji Anova $p < 0,05$ berarti ada perbedaan yang bermakna antara kelompok ekstrak dan fraksinasi terhadap nilai IC₅₀. Hasil *flowcytometry* menunjukkan hasil ekstrak metanol mengalami sel apoptosis sebesar 53,65%, fraksi n-heksan 71,26%, fraksi etil asetat 75,76%, dan fraksi metanol air 34,14%. Hasil *doubling time* pada ekstrak metanol pada jam ke 38, fraksi n-heksan jam ke 39, fraksi etil asetat jam ke 50, dan fraksi metanol air jam ke 34.

Dari hasil uji sitotoksik, apoptosis dan antiproliferasi dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat digolongkan kategori aktif terhadap sel kanker payudara T47D. Hasil uji KLT terbukti herba pacar air mempunyai kandungan flavonoid, terpenoid, tanin dan alkaloid pada ekstrak herba pacar air.

Kata kunci : Sitotoksik herba pacar air, Apoptosis, Antiproliferasi
Kepustakaan : 40 (1987-2016)

SUMMARY

ACTIVITY TEST OF PACAR AIR (*Impatiens balsamina* Linn.) HERBA FRACTION ACTIVE TO APOPTOSIS, CITOTOXICITY AND ANTIPROLIFERATION OF T47D BREAST CANCER CELL
Scientific Paper in the form of Tesis, July 24th 2017

Devi Yulianti; supervised by Dr. Arum Setiawan, M.Si and Sri Nita, S.Si., M.Si

Uji Aktivitas Fraksi Aktif Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn.) Terhadap Apoptosis, Sitotoksik dan Antiproliferasi Sel Kanker Payudara T47D

xix + 72 pages, 10 tables, 17 figures, 13 attachments

SUMMARY

Breast cancer is a cancer derived from gland, glandular channels and breast tissue. Pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) is a plant that functions as antirheumatic, anti-inflammatory, analgetic, menstruation launch menstruation and can soften hard bumps (tumor). This research was aimed to know activity of active fraction of Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn.) to apoptosis, citotoxic and antiproliferation of T47D breast cancer cell. It was *in vitro* research with MTT (microculture tetrazolium salt) method.

The result showed IC₅₀ of methanol extract was 166,47 µg/ml, fraction N-heksan 67,29 µg/ml, fraction asetic ethyl 25,34 µg/ml, fraction aqua-methanol 277,02 µg/ml and cisplatin 11,81 µg/ml. Result of Anova test p value < 0,05 showed there was significant difference between group extract and fraction to IC₅₀ level. Result of flowcitometry showed methanol extract experienced apoptosis 53,65%, N-heksan fraction 71,26%, asetic ethyl fraction 75,76% and fraction aqua-methanol 34,14%. Result of doubling time of methanol extract at 38th hour, N-heksan fraction at 39th hour, asetic ethyl fraction at 50th hour and fraction aqua-methanol at 34th hour.

From the result of citotoxicity, apoptosis and antiproliferation, it concluded that asetic ethyl fraction categorized active to T47D breast cancer cell. KLT test proved that Pacar Air contains of flavonoid, terpenoid, tanin and alkaloid in the extract of herba Pacar Air.

Key words : Citotoxicity, Herba Pacar Air, Apoptosis, Antiproliferasi

References : 40 (1987 – 2016)

KATA PENGANTAR

Puji syukur senantiasa penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT karena atas berkat rahmat dan karunia-Nya, penyusunan tesis yang berjudul “Uji Aktivitas Fraksi Aktif Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn.) terhadap Apoptosis, Sitotoksik Dan Antiproliferasi Sel Kanker Payudara T47D “dapat diselesaikan tepat pada waktunya.

Dalam penyelesaian tesis ini, penulis banyak mendapatkan pengarahan, masukan, motivasi dan bimbingan dari berbagai pihak, untuk itu dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr.dr. Zen Hafy, M.Biomed , selaku ketua program studi Biomedik
2. Drs. Joko Marwoto, selaku koordinator BKU
3. Dr. Arum Setiawan, M.Si , selaku pembimbing I
4. Sri Nita, S.Si, M.Si , selaku pembimbing II
5. Dr. dr. Mgs. Irsan Saleh, M. Biomed, Dr. Salni, M.Si dan dr. Dwi Handayani, M.Kes , selaku penguji
6. Prof. dr. Supargiono, DTM&H., SU., Ph.D., SpPark selaku supervisor laboratorium bagian parasitologi UGM
7. Suprihatin, selaku pendamping teknisi laboratorium bagian parasitologi UGM
8. Orang tua, yang salalu memberikan dukungan moral
9. Serta seluruh staf dosen dan karyawan Program Studi Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya. Teman-teman angkatan 2015 Program Studi Ilmu Biomedik yang senantiasa memberi semangat dan motivasi.

Penulis menyadari banyak kekurangan yang terdapat dalam penulisan tesis ini. oleh karena itu, penulis mengharapkan masukan dari berbagai pihak agar tercapainya sebuah tulisan ilmiah yang bermanfaat.

Palembang, Juli 2017

Penulis

DAFTAR RIWAT HIDUP

Nama : Devi Yulianti
Tempat/Tanggal Lahir : Palembang / 28 Juli 1992
Agama : Islam
Status : Belum Menikah
Nama Orang Tua : Ayah : Dadang Saepudin, SH
Ibu : Yustrilawati, S.Sos, S.Pd
Alamat : Jl. Musyawarah 1 No.288 RT.08/RW.02
Kel.Karang Jaya Kec. Gandus Musi 2 Palembang

Riwayat Pendidikan

STIKES Mitra Adiguna Palembang : Lulusan Tahun 2014
AKBID Heppy Zal Palembang : Lulusan Tahun 2013
SMA Negeri 1 Palembang : Lulusan Tahun 2010
SMP Negeri 17 Palembang : Lulusan Tahun 2007
SD Kartika II-3 Palembang : Lulusan Tahun 2004

HALAMAN PERSEMBAHAN

Tesis Ini Dipersembahkan Untuk :

- ***Kedua orang tuaku papa dan mama yang selalu memberikan semangat dan mengharapkan keberhasilanku, yang tidak pernah lelah mendoakanku.***
- ***Kakak dan Adik-adikku tersayang, yang telah memberikan semangat dan doa .***
- ***My love (erlangga wijaya kusuma) yang selalu memberikan semangat, pengertian dan doa yang terbaik.***
- ***Sahabatnya aku yang selalu memberikan dukungan dan semangat.***

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iv
HALAMAN INTEGRITAS.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	vi
RINGKASAN.....	vii
SUMMARY.....	viii
KATA PENGANTAR	ix
RIWAYAT HIDUP.....	x
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	xi
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR BAGAN.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
DAFTAR ISTILAH.....	xix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1..... Latar Belakang	1
1.2..... Rumusan Masalah	4
1.3..... Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Tujuan Umum.....	4
1.3.2. Tujuan Khusus.....	4
1.4..... Manfaat Penelitian	4
1.5..... Kerangka Pikir	6
1.6..... Premis- premis	7
1.7..... Hipotesis	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. Pacar Air.....	8
2.1.1.Deskripsi Pacar Air (<i>Impatien balsamina</i> Linn).....	8
2.1.2. Klasifikasi Pacar Air.....	9
2.1.3 Morfologi.....	9
2.1.3.1 Batang.....	9

2.1.3.2 Daun.....	9
2.1.3.3 Akar.....	9
2.1.3.4 Buah.....	10
2.1.3.5 Bunga.....	10
2.1.4. Anatomi Pacar Air.....	10
2.1.5 Fisiologi Pacar Air.....	11
2.1.6 Manfaat Pacar Air.....	12
2.1.7 Efek Farmakologis Pacar Air.....	12
2.1.8 Kandungan Kimia Tanaman Pacar Air.....	13
2.2 Ekstrak dan Fraksi.....	14
2.2.1. Ekstrak.....	14
2.2.2 Fraksinasi.....	15
2.3.Kanker Payudara.....	16
2.3.1. Defenisi.....	16
2.3.2. Jenis dan stadium kanker.....	17
2.3.3.Gejala kanker payudara.....	22
2.4. Sel T47D.....	24
2.5 Siklus sel.....	25
2.6 Penentuan Nilai IC ₅₀	32
2.7 Apoptosis.....	32
2.7.1 Peranan Apoptosis.....	33
2.7.2 Proses Apoptosis.....	34
2.7.3 Mengenali sel yang apoptosis.....	35
2.8 Uji Sitotoksik.....	37
2.9 Proliferasi.....	38
2.10 <i>Cisplatin</i>	38
2.11 Penelitian Terdahulu.....	40
2.12 Kerangka Teori.....	41
BAB III METODE PENELITIAN	42
3.1. Desain Penelitian	42
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian	42
3.3. Subjek Penelitian	42
3.4.Alat dan Bahan.....	43
3.4.1. Alat	43
3.4.2.Bahan.....	44
3.5. Cara Kerja.....	45
3.5.1. Ekstraksi	45
3.5.2.Fraksinasi.....	45
3.5.3.Penentuan Senyawa.....	46

3.6. Preparasi dan Panenan Sel.....	46
3.7. Uji Apoptosis dengan <i>flowcytometry</i>	47
3.8. Uji Sitotoksik dengan Metode MTT.....	48
3.9. Uji Antiproliferasi dengan tehnik <i>Doubling Time</i>	48
3.10. Variabel Penelitian	49
3.10.1 Variabel Independen.....	49
3.10.2 Variabel Dependen.....	50
3.11. Definisi Operasional.....	50
3.12. Analisis Data.....	51
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	52
4.1. Ekstrak dan Fraksinasi Herba Pacar Air.....	52
4.2. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	53
4.3. Aktivitas Antikanker Ekstrak dan Fraksi Pacar Air.....	55
4.4. Uji Apoptosis dengan <i>flowcytometry</i>	61
4.5. Uji Antiproliferasi dengan <i>Doubling Time</i>	65
4.6. Analisis Uji Statistik.....	68
4.6.1 Uji Normalitas.....	68
4.6.2 Pengaruh Aktivitas Sitotoksik.....	69
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	72
5.1 Kesimpulan.....	72
5.2 Saran.....	72
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	Halaman
Gambar 2.1 Pacar Air.....	8
Gambar 2.2 Kanker Payudara stadium I.....	19
Gambar 2.3 Kanker Payudara stadium II.....	20
Gambar 2.4 Kanker Payudara stadium III.....	20
Gambar 2.5 Kanker Payudara stadium IV.....	21
Gambar 2.6 Morfologi sel T47D.....	25
Gambar 2.7 Siklus Sel.....	27
Gambar 2.8 Ilustrasi siklus sel.....	28
Gambar 2.9 Onkogen dan DNA.....	30
Gambar 2.10 Regulasi p53	31
Gambar 2.11 Struktur kimia.....	39
Gambar 4.1 Hasil uji senyawa alkaloid, flavonoid, steroid dan tanin.....	56
Gambar 4.2 Mikroplate hasil perlakuan setelah diberi reagen MTT dan SDS 10%	58
Gambar 4.3 Morfologi sel T47D.....	60
Gambar 4.4 Grafik ekstrak dan fraksi herba pacar air	63
Gambar 4.4 Hasil kuadran flowcytometri.....	65
Gambar 4.5 Persamaan garis waktu inkubasi dengan log jumlah sel.....	68

DAFTAR TABEL

	Halaman
TABEL	
Tabel 3.11 Definisi Operasional.....	50
Tabel 4.1 Hasil Fraksinasi Herba Pacar Air.....	54
Tabel 4.2 Hasil Uji Fitokimia ekstrak dan fraksi Herba Pacar Air.....	56
Tabel 4.3 Nilai absorbansi, nilai persentase viabilitas dan nilai IC ₅₀	62
Tabel 4.5 Hasil Absorbansi pada perlakuan 0,24,48 dan 72 jam	67
Tabel 4.6 Hasil <i>Doubling Time</i>	68
Tabel 4.7 Uji normalitas data.....	70
Tabel 4.8 Hasil Uji Anova	71
Tabel 4.9 Hasil Uji Post Hoc (Konsentrasi bahan uji fraksi etil asetat dan n- heksan herba pacar air.....	71
Tabel 4.10 Hasil Uji Post Hoc (Konsentrasi bahan uji ekstrak dan fraksi metanol herba pacar air.....	72

DAFTAR BAGAN

1.5 Kerangka Pikir.....	6
-------------------------	---

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN

1. Lembar konsultasi
2. Persetujuan untuk Ujian Tesis
3. Lembar Persetujuan Pembimbing dan Penguji Ujian Tesis
4. Sertifikat persetujuan etik
5. Surat izin pembuatan ekstrak dan fraksi di FMIPA UNSRI
6. Keterangan selesai penelitian dari FMIPA UNSRI
7. Sertifikat kursus singkat kultur jaringan
8. Surat penelitian laboratorium Parasitologi UGM
9. Keterangan selesai penelitian laboratorium Parasitologi UGM
10. Hasil penelitian sitotoksik menggunakan Ms. Office Excel
11. Hasil penelitian apoptosis menggunakan *Flowcytometry*
12. Hasil penelitian antiproliferasi menggunakan Ms. Office Excel
13. Print out SPSS

DAFTAR SINGKATAN

- DNA : *Deoxyribonucleic Acid*
- EDTA : *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*
- FBS : *Fetal Bovine Serum*
- FTIC : *Flouorochrome*
- IC₅₀ : *Inhibition Concentration*
- KLT : *Kromatografi Lapis Tipis*
- LAF : *Laminal L Flow*
- DMEM : *Dulbecco's Modifield Eagle Medium*
- MTT : *Microculture Tetrazolium Salt*
- RPMI : *Roswell Park Memorial Institute*
- SDS : *Sodium Dodecyl Sulphate*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Kanker merupakan penyakit yang menakutkan dan momok bagi semua orang. Kanker merupakan salah satu penyebab utama kematian di Negara berkembang. Kanker yang muncul di permukaan tubuh biasa dikenali secara dini dalam bentuk benjolan. Semenetera itu, kanker yang tumbuh di dalam tubuh biasanya diketahui setelah stadium lanjut sehingga sulit diobati (Sudewo, 2012).

Kanker disebabkan oleh pertumbuhan sel-sel jaringan yang tidak normal dalam tubuh manusia. Sel-sel kanker ini akan cepat berkembang secara tidak terkendali, bahkan dapat menyebar dan menyerang organ-organ penting lainnya. Dalam keadaan normal, sel dalam tubuh kita akan membelah diri jika ada pergantian sel-sel yang telah mati dan rusak. Namun, sel kanker ini justru akan membelah diri terus-menerus meskipun tubuh kita tidak membutuhkannya (Sudewo, 2012).

Berdasarkan Data *GLOBOCAN*, *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, diketahui bahwa pada tahun 2012 terdapat 14.067.894 kasus baru kanker dan 8.201.575 kematian akibat kanker di seluruh dunia. Kanker payudara, kanker prostat, dan kanker paru merupakan jenis kanker dengan persentase kasus baru (setelah dikontrol dengan umur) tertinggi, yaitu sebesar 43,3% (kanker Payudara), 30,7% (kanker prostat), dan 23,1% (kanker paru). Sementara itu, kanker paru dan kanker payudara merupakan penyebab kematian (setelah dikontrol dengan umur) tertinggi akibat kanker (Kemenkes RI, 2015).

Berdasarkan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI tahun 2013, didapatkan prevalensi penderita kanker pada penduduk semua umur di Indonesia sebesar 1,4%. Prevalensi kanker tertinggi berada pada Provinsi DI Yogyakarta, yaitu sebesar 4,1%, jauh lebih tinggi dibandingkan dengan angka nasional. Prevalensi tertinggi berikutnya berada pada

Provinsi Jawa Tengah dan Bali, yaitu sebesar 2,1‰ dan 2,0‰. Tingginya prevalensi kanker di Indonesia perlu dicermati dengan tindakan pencegahan dan deteksi dini yang telah dilakukan oleh penyedia layanan kesehatan.

Kanker payudara merupakan kanker yang berasal dari kelenjar, saluran kelenjar, dan jaringan penunjang payudara. Sejumlah sel di dalam payudara tumbuh yang berkembang dengan tidak terkendali inilah yang disebut kanker payudara (Ariani, 2015).

Pada sel normal, ada keseimbangan antara proliferasi sel dengan apoptosis yang diregulasi melalui siklus sel dengan *cellular checkpoint* (Hartwell dan Kastan, 1994). Sedangkan pada sel kanker, kehilangan beberapa *molecular checkpoint* karena diregulasi siklus sel. Pada sebagian besar kanker, terjadi mutasi p53 (Scheffner *et al.*, 1993).

Sel T47D merupakan continuous cell line yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. Continuous cell line sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan frozen stock jika terjadi kontaminasi (Burdall *et al.*, 2003).

Beberapa usaha pengobatan kanker telah dilakukan dengan cara seperti pembedahan, radiasi, pemberian obat antikanker atau kemoterapi (Sukardja, 2000). Namun usaha-usaha ini belum memperoleh hasil yang memuaskan, bahkan efek dari kegagalan pembedahan dapat menyebabkan kanker menyebar ke bagian tubuh lain dengan kondisi yang parah (Rahmawati,dkk., 2013).

Menurut Mangan (2013) dijelaskan bahwa hal ini mendorong dikembangkannya obat baru yang mempunyai efek terapi yang baik. Penelitian untuk menemukan obat antikanker antara lain dilakukan dengan menggali senyawa- senyawa alam yang berasal dari tumbuhan. Khususnya yang selama ini telah dipercaya oleh sebagian masyarakat sebagai obat tradisional.

Salah satu tumbuhan sebagai obat adalah tanaman pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.). Bagian dari tanaman yang dimanfaatkan adalah biji yang

rasanya pahit, pedas dan sifatnya hangat, dan sedikit toksik (Dalimartha, 2003). Biji pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) berkhasiat untuk menghentikan perdarahan, meningkatkan fungsi pencernaan, antikanker, melunakkan massa yang keras (tumor), sebagai peluruh haid, dan mempermudah persalinan (Dalimartha, 2003).

Pada penelitian terdahulu tentang uji toksisitas ekstrak daun tolod (*Isotoma longiflora* Linn.), menunjukkan bahwa ekstrak yang paling toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach ternyata mengandung senyawa saponin yang terdapat pada ekstrak kloroform dengan harga IC_{50} $95,51 \pm 5,51$ $\mu\text{g/ml}$ (Wahyuni, 2004). Biji pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) mempunyai kandungan saponin, dan fixed oil (terdiri dari \hat{U} - spinasterol, \ddot{u} -ergosterol, balsaminasterol, parinaric acid, minyak menguap, quersetin, derivat kaempferol, dan naftokuinon) (Dalimartha, 2004). Saponin adalah glikosida triterpena dan sterol, telah terdeteksi dalam lebih dari 90 suku tumbuhan. Salah satu prinsip suatu tanaman dapat digunakan sebagai antikanker yaitu apabila tanaman tersebut mengandung senyawa yang bersifat toksik (Harborne, 1996).

Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rahmawati, dkk (2013), Herbal pacar air dikatakan memiliki aktivitasnya dilihat dari jumlah sel hidup yang telah diujikan terhadap sel kanker payudara (sel T47D) dengan metode MTT dalam rentang waktu 24 jam setelah pemberian konsentrasi larutan uji kemudian ditentukan harga IC_{50} dengan menggunakan probit analysis. Ekstrak n-heksan memiliki harga IC_{50} $97,493$ $\mu\text{g/ml}$ sehingga dikatakan moderate aktif terhadap sel kanker payudara T47D. Sedangkan ekstrak metanol memiliki harga IC_{50} $295,359$ $\mu\text{g/ml}$. Hasil uji KLT terbukti adanya kandungan flavonoid dan steroid.

Penelitian ini dilakukan untuk melengkapi penelitian sebelumnya dan dilakukan pada tahap fraksi. Peneliti akan melakukan penelitian dengan uji aktivitas fraksi metanol herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) terhadap apoptosis, sitotoksik dan antiproliferasi sel T47D.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka dirumuskan masalah penelitian:

1. Berapakah nilai IC_{50} fraksi aktif herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) terhadap sel T47D ?
2. Apakah jenis fraksi aktif herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) mempunyai aktivitas apoptosis pada sel T47D ?
3. Apakah fraksi aktif herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) mempunyai aktivitas antiproliferasi pada sel T47D ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dalam penelitian ini adalah Untuk mengetahui efek apoptosis, sitotoksik dan antiproliferasi herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) pada sel T47D.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui nilai IC_{50} fraksi aktif herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) terhadap sel T47D.
2. Untuk mengetahui aktivitas apoptosis sel T47D setelah pemberian fraksi aktif herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.)
3. Untuk mengetahui aktivitas antiproliferasi sel T47D setelah pemberian fraksi aktif herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.)

1.4 Manfaat Penelitian

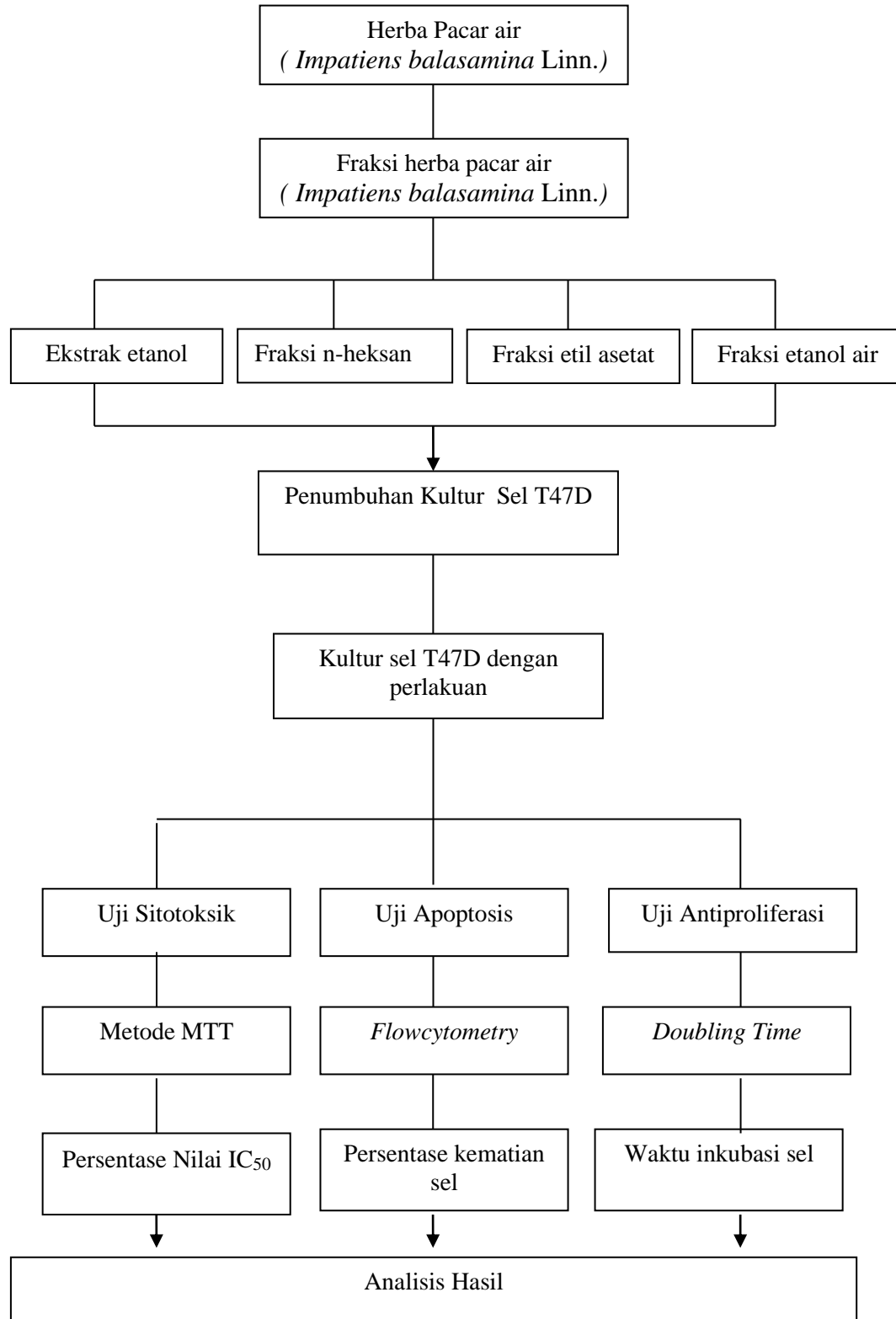
Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai kandungan senyawa kimia dari herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) sehingga merupakan data base bagi ilmu pengetahuan yang dapat dipublikasikan dalam berbagai jurnal penelitian.

2. Senyawa tersebut dapat digunakan untuk melacak jalur pembentukan senyawa toksik terhadap sel T47D, sehingga dapat dilakukan upaya untuk meningkatkan produksi senyawa toksik secara *in vitro*.
3. Sebagai justifikasi pada penggunaan bahan obat herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) sehingga dapat mendorong masyarakat menggunakan herba yang telah melalui telaah ilmiah sebagai pengobatan alternatif dan memelihara kesehatan.

Hasil penelitian diharapkan memperoleh stuktur senyawa yang menunjukkan efek sitotoksitas paling tinggi dan pacuan apoptosis yang tinggi terhadap Sel T47D yang dapat dikembangkan sebagai bahan kemopreventif pengobatan antikanker payudara yang aman di konsumsi dan tidak mengakibatkan efek samping dan dapat dimanfaatkan dalam upaya meningkatkan derajat kesehatan.

1.5 Kerangka Pikir



1.6 Premis - Premis

1. Ekstrak *n*-heksan herba pacar air dikatakan moderate aktif terhadap sel kanker payudara T47D secara *in vitro* dengan metode *Microculture Tetrazolium Salt* (MTT) (Rahmawati, 2013).
2. Daun pacar air mengandung senyawa kumarin, kuinon, flavonoid, steroid, triterpenoid, fenolik dan saponin (Adfa, 2007).
3. Penelitian *in vitro* ekstrak etanol daun pacar air membuktikan adanya aktivitas antitumor dengan LD₅₀ diatas 2000mg/kg (Baskar *et al*, 2012).
4. Tanaman pacar air ini memiliki khasiat sebagai antiinflamasi, analgesik, antikanker, peluruh haid dan dapat melancarkan peredaran darah serta melunakkan masa atau benjolan yang keras (Dalimartha, 2003).
5. Biji pacar air mengandung saponin dan *fixel oil* (terdiri dari : spinasterol, ergosterol, balsaminasterol, parinaric acid, minyak menguap, quercetin, derivat kaempferol, dan naphthaquinon) (Hariana, 2015).
6. Ekstrak air daun pacar air memiliki aktivitas analgesik dan antiinflamasi (Debrashee *et al.*, 2013).

1.7 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah:

Hipotesis *null* (H₀) : Tidak ada perbedaan nilai IC₅₀, apoptosis dan antiproliferasi pada sel T47D setelah pemberian fraksi aktif herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.).

Hipotesis Alternatif (H_a) : Ada perbedaan nilai IC₅₀, apoptosis dan antiproliferasi pada sel T47D setelah pemberian fraksi aktif herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pacar Air

2.1.1 Deskripsi Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn.)

Pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) adalah tanaman yang berasal dari Asia Selatan dan Asia Tenggara namun telah diperkenalkan ke Amerika pada abad ke-19. Tanaman ini adalah tanaman tahunan atau dua tahunan dan memiliki bunga yang berwarna putih, merah, ungu, atau merah jambu. Bentuk bunganya menyerupai bunga anggrek yang kecil. Tinggi tanaman ini bisa mencapai satu meter dengan batangnya yang tebal namun tidak mengayu dan daunnya yang bergerigi tepinya.

Pacar air juga dikenal sebagai bunga balsam yang merupakan tanaman semusim, berakar serabut, berbatang basah, bulat, licin, tegak, bercabang, warnanya hijau kekuningan dan biasa ditanam di halaman sebagai tanaman hias atau tumbuhan liar ditempat yang cukup mendapat air dan sinar matahari. Pacar air dapat hidup tanpa akar sebab batangnya bisa menghisap air tetapi apabila akarnya dihilangkan, maka pacar air harus diletakkan di gelas penuh air atau yang lainnya (Anonim, 2016).



Sumber: Plantamator, 2009

Gambar 2.1 Pacar Air (*Impatiens Balsamina* Linn.)

2.1.2 **Klasifikasi Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn.)**

Klasifikasi Tumbuhan Pacar Air adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Sub Kingdom	: Viridiplantae
Infra Kingdom	: Streptophyta
Super Divisi	: Embryophyta
Divisi	: Tracheophyta
Sub Divisi	: Spermatophytina
Kelas	: Magnoliopsida
Super Ordo	: Asteranae
Ordo	: Ericales
Famili	: Balsaminaceae
Genus	: <i>Impatiens</i> L.
Spesies	: <i>Impatiens balsamina</i> Linn

(Anonim, 2016)

2.1.3 **Morfologi**

2.1.3.1 **Batang**

Pacar air merupakan tanaman terna berbatang basah, lunak, bulat, bercabang, warna hijau kekuningan. Pacar air biasanya ditanam sebagai tanaman hias dengan tinggi 30-80 cm. arah tumbuhnya tegak, percabangannya monopodial.

2.1.3.2 **Daun**

Daunnya tunggal, tersebar, berhadapan, atau dalam karangan. Bentuk daun lanset memanjang, pinggirnya bergerigi, ujung meruncing, tulang daun menyirip. Warna daun hijau muda tanpa daun penumpu, jika ada daun penumpu bentuknya kelenjar. Bagian bawah membentuk roset akar. Tulang daun menyirip. Luas daunnya sekitar 2 sampai 4 inchi. Pangkal daun bergerigi tajam, runcing.

2.1.3.3 **Akar**

Tanaman ini berakar serabut.

2.1.3.4 Buah

Bakal buah menumpang, beruang 4-5. Dalam satu ruangan tersebut terdapat dua atau lebih bakal biji. Buah membuka kenyal dan termasuk buah batu dengan 5 inti. Bentuk buah elliptis, pecah menurut ruang secara kenyal. Benihnya endospermic. embrio akan mengalami diferensiasi.

2.1.3.5 Bunga

Tanaman ini memiliki aneka macam warna bunga. ada yang putih, merah, ungu, kuning, jingga, dll. Jika pacar air yang berbeda warna disilangkan, maka akan terbentuk keturunan yang beraneka ragam. Contoh persilangannya terdapat dalam album gambar.

Bunga zygomorph, berkelamin 2, di ketiak. Daun kelopak 3 atau 5, lepas atau sebagian melekat, bertaji. Daun kelopak samping berbentuk corong miring, berwarna, dan terdapat noda kuning di dalamnya. Sedikit di atas pangkal daun mahkota memanjang menjadi taji dengan panjang 0,2-2 cm. Daun mahkota 5, lepas. Daun mahkota samping berbentuk jantung terbalik dengan panjang 2-2,5 cm, yang 2 bersatu dengan kuku, yang lain lepas tidak berkuku dan lebih pendek. Ada 5 benangsari dengan tangkai sari yang pendek, lepas, agak bersatu. Kepala sarinya bersatu membentuk tudung putih. Bunga terkumpul 1-3. Setiap tangkai hanya berbunga 1 dan tangkainya tidak beruas. Memiliki 5 kepala putik.

2.1.4 Anatomy Pacar Air

Mesofil pada daun terdiri dari kristal kalsium oksalat. Dorsiventral, memiliki banyak bunga yang mengandung cairan yang tersimpan dalam petiolus dan tangkai. *Rhaphide-sacs* sedikitnya tampak pada daun dan tangkai. Kadang-kadang tampak ada bintik-bintik transparan pada daun yang seringkali berisi getah dan atau raphides.

Epidermis menyusun dinding sel yang tipis. Korteks relatif sempit, bagian luarnya terdiri dari sel kolenkimatis yang kecil dan bagian dalam besar. Perisikelnya tanpa sklerenkim. Batangnya yang keras ditegakkan oleh jaringan dasar *turgescens* yang kuat. Berkas pembuluh sendiri-sendiri dan

terangkai dalam lingkaran, 12 di antaranya tampak pada potongan melintang. Xilem menyusun jaringan dasar kecil dan berdinding sel tipis dengan pembuluh besar yang melekatkannya, spiral berkembang baik dengan menebal. Rantai-rantai floem dalam tiap berkas kecil, saling berhubungan. Yang menghubungkan adalah sel kecil tanpa dinding. Pembuluh-pembuluh pada berkas tidak mengalami perforasi. Interfascular kambium membangun batang tua di daerah jaringan sel kecil. interfascular kambium memberi perkembangan pada dinding tipis jaringan dalam. Jaringan ini sama dengan jaringan dasar xilem, hanya saja tidak memiliki pembuluh. Pith mencekung di tengah, terisolasi, annular. Pembuluh pith spiral dan menetap di solereder untuk membangun pith sebelum berkembangnya berkas-berkas pembuluh. pith memiliki sel-sel yang besar yang mengeluarkan getah dari parenkim dasar. Berkas raphides tampak pada korteks (Anonim, 2016).

2.1.5 Fisiologi Pacar Air

Tanaman ini termasuk tanaman C₃. Dalam sintesis C₃, CO₂ difiksasi ke gula berkarbon lima, yaitu ribulosa bifosfat (RuBP) oleh enzim karboksilase RuBP (rubisko). Molekul berkarbon enam yang terbentuk tidak stabil dan segera terpisah menjadi dua molekul fosfogliserat (PGA). Molekul PGA merupakan karbohidrat stabil berkarbon tiga yang pertama kali terbentuk sehingga cara tersebut dinamakan sintesis C₃.

Molekul PGA bukan molekul berenergi tinggi. Dua molekul PGA mengandung energi yang lebih kecil dibandingkan satu molekul RuBP, sehingga fiksasi CO₂ berlangsung spontan dan tidak memerlukan energi dari reaksi terang (fotosintesis). Untuk mensintesis molekul berenergi tinggi, energi dan electron dari ATP maupun NADPH hasil reaksi terang digunakan untuk mereduksi tiap PGA menjadi fosfogliseraldehida (PGAL). Dua molekul PGAL dapat membentuk satu molekul glukosa. Satu siklus Calvin telah lengkap bila pembentukan glukosa disertai dengan regenerasi RuBP. Satu molekul CO₂ yang tercampur menjadi enam molekul CO₂. Ketika enam molekul CO₂ bergabung dengan enam molekul RuBP dihasilkan satu glukosa dan enam RuBP sehingga siklus dapat dimulai.

2.1.6 Manfaat Pacar Air

Menurut Profesor Hembing Wijayakusuma (2013) bunga pacar air dapat dimanfaatkan dengan resep-resep berikut :

1. Rematik, radang kulit (dermatitis), dan bengkak. Bunga pacar air segar yang telah dihaluskan ditempelkan pada bagian yang sakit.
2. Tulang patah atau retak dan antiradang (antiinflamasi). Daun pacar air segar dihaluskan lalu ditempelkan pada bagian yang sakit.
3. Bisul (*furunculus*) dan radang kulit (dermatitis). 15 gram daun pacar air segar, 5 lembar daun cocor bebek segar, dihaluskan lalu ditempelkan pada bisul.
4. Radang kuku. Seluruh herba pacar air secukupnya dihaluskan lalu ditempelkan pada kuku dan dibungkus dengan kain kasa. Lakukan 7-14 hari secara rutin.

2.1.7 Efek Farmakologis Pacar Air

Efek farmakologis pacar air, diantaranya melancarkan peredaran darah dan melunakan masa/ benjolan yang keras. Efek farmakologi akar pacar air di antaranya peluruh haid (*emenagog*), anti-inflamasi (*antiflogistik=antiradang*), antirematik, kaku leher, kaku pinggang, sakit pinggang (*lumbago*), dan lain-lain. Efek farmakologis bunga pacar air, di antaranya peluruh haid, tekanan darah tinggi (*hipertensi*), pembengkakan akibat terpukul (*hematoma*), bisul (*furunculus*), rematik sendi, gigitan ular tidak berbisa, dan radang kulit (*dermatitis*). Efek farmakologis daun pacar air, di antaranya mengobati keputihan (*leucorrhoea*), nyeri haid (*dysmenorrhoea*), radang usus buntu kronis (*chronic appendicitis*), antiradang (*anti-inflamasi*), tulang patah atau retak (*fraktur*), mengurangi rasa nyeri (*analgetik*), bisul (*furunculus*), radang kulit (*dermatitis*), dan radang kuku. Sementara itu, biji pacar air memiliki efek farmakologis meluruhkan haid (*emenagog*), terlambat haid (*amenorrhoea*), mempermudah persalinan (*farturifasien*) dan mengobati kanker saluran pencernaan bagian atas (Hariana, 2015).

2.1.8 Kandungan Kimia Tanaman Pacar Air

Biji mengandung saponin dan fixel oil (terdiri dari : spinasterol, ergosterol, balsaminasterol, parinaric acid, minyak menguap, quercetin, derivat kaempferol, dan naphthaquinon). Bunga mengandung *anthocyanins*, *cyanidin*, *delphinidin*, *pelargonidin*, *malvidin*, *kaempferol*, *quercetin*. Akar mengandung *cynadin monoglycoside*. Pada daun pacar air mengandung kumarin, flavonoid, kuinon, saponin dan steroid (Hariana, 2015).

Flavonoid

Flavonoida dan isoflavonoida adalah salah satu golongan senyawa metabolit sekunder yang banyak terdapat pada tumbuh- tumbuhan. Kandungan senyawa flavonoida sendiri dalam tanaman sangat rendah, yaitu sekitar 0,25%. Senyawa- senyawa tersebut pada umumnya dalam keadaan terikat/ konjugasi dengan senyawa gula. Senyawa flavonoid terdistribusi secara luas pada bagian- bagian tanaman, baik pada akar, batang, daun maupun buah. Senyawa flavonoida untuk obat mula- mula diperkenalkan oleh seorang amerika bernama Gyorgy (1936) yang sekaligus sebagai pionir (pembuka) penggunaan senyawa tersebut dibidang terapeutik. Gyorgy menemukan senyawa yang disebut sebagai senyawa “bioflavonoids” atau vitamin P yang dinyatakan sebagai *antihemorrhage* (pendarahan).

Sejumlah tanaman obat yang mengandung flavonoid telah dilaporkan memiliki aktifitas antioksidan, antibakteri, antivirus, antiradang, antialergi dan antikanker (Miller, 1996). Efek antioksidan senyawa ini disebabkan oleh penangkapan radikal bebas melalui donor atom hidrogen dari gugus fungsi hidroksil flavonoid. Beberapa penyakit seperti asteroklorosis, kanker , diabetes, parkinson, alzeiner, dan penurunan kekebalan tubuh telah diketahui dipengaruhi radikal bebas dalam tubuh manusia (Amic *at al.*, 2000).

Saponin

Saponin merupakan senyawa glikosida triterpenoida ataupun glikosida steroida yang merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun

serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisa sel darah merah. Pola glikosida saponin kadang- kadang rumit, banyak saponin yang mempunyai satuan gula sampai lima dan komponen yang umum ialah asam glukuronat (Harborne, 1996).

2.2 Ekstrak dan Fraksi

2.2.1 Ekstrak

Ekstrak dibuat dengan menyaring simplisia nabati atau hewani menurut cara yang sesuai, yaitu maserasi, perkolasi atau penyeduhan dengan air mendidih. Ekstrak merupakan sediaan yang dapat berupa kering, kental dan cair. Pembuatan sediaan ekstrak dimaksudkan agar zat berkhasiat simplisia terdapat dalam bentuk kadar yang tinggi dan hal ini memudahkan agar zat berkhasiat dapat diatur dosisnya.

Ekstraksi adalah proses melarutkan komponen yang ada dalam simplisia secara selektif dengan pelarut yang sesuai. Secara umum ekstraksi dibedakan atas tiga macam pelarut yaitu: pelarut non polar akan melarutkan senyawa non polar, pelarut semi polar akan melarutkan senyawa semi polar dan pelarut polar akan melarutkan senyawa polar. Secara umum ekstraksi dilakukan secara berturut-turut mulai dari pelarut non polar (misalnya n-heksan, benzen), pelarut semi polar (misalnya, kloroform, etilasetat, dan metilenklorida), kemudian dengan pelarut polar (misalnya metanol dan etanol) (Ritiasa dkk., 2000).

Secara umum terdapat beberapa metode ekstraksi menurut Handa *et al.*, (2010) yang paling banyak digunakan untuk tanaman obat diantaranya:

1. Maserasi

Dalam proses maserasi, serbuk tanaman obat direndam menggunakan pelarut dalam kontainer tertutup selama tiga hari pada suhu kamar yang sesekali di aduk hingga zat terlarut dapat larut. Campuran antara residu dan filtrate dipisah dengan penyaringan atau dekantasi.

2. Infusa

Infusa merupakan proses preparasi tanaman obat dengan cara maserasi dalam waktu singkat dalam air mendidih atau air dingin.

3. Digesti

Digesti merupakan proses maserasi yang disertai dengan pemanasan selama proses berlangsung. Metode ini dapat digunakan jika bahan aktif terhadap panas. Pemanasan ini meningkatkan efisiensi pelarut.

4. Dekoktum

Dalam proses ini, tanaman obat dididihkan dalam volume dan waktu tertentu kemudian didinginkan dan disaring atau difiltrasi. Prosedur dekoktum cocok untuk bahan aktif larut air dan tahan panas. Metode ini digunakan dalam Ayur Weda. Perbandingan tanaman obat dan air biasanya tetap seperti 1 : 4 atau 1 : 16. Volume ini biasanya dipekatkan hingga seperempatnya dengan cara didihkan. Ekstrak yang pekat ini kemudian disaring atau difiltrasi.

5. Perkolasi

Metode perkolasi ini banyak digunakan untuk pembuatan ekstrak cair dan tingtur. Perkolasi merupakan proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang mengalir dalam alat perkolator.

6. *Hot Continuous Ekstraktion* (Soxhalet)

Dalam metode ini, serbuk tanaman obat diletakkan dalam kantong berpori dari kertas saring yang kuat dan diletakkan dalam alat Soxhalet. Pelarut dipanaskan dan uapnya dikondensasi dalam konsensor. Pelarut ini kemudian menetes dalam kantong yang mengandung serbuk tanaman obat yang mengekstraksi pada saat terjadi kontak. Proses ini berlangsung secara terus-menerus hingga diperoleh ekstrak yang diinginkan.

2.2.2 Fraksinasi

Fraksinasi adalah suatu proses pemisahan senyawa-senyawa berdasarkan tingkat kepolaran. Jumlah dan senyawa yang dapat dipisahkan menjadi fraksi berbeda-beda tergantung pada jenis tumbuhan. Praktik dalam melakukan fraksinasi digunakan dua metode yaitu corong pisah dan kromatografi kolom (Harborne, 1987).

Macam- macam proses fraksinasi:

1. Proses Fraksinasi Kering (*Winterization*)

Fraksinasi kering adalah suatu proses fraksinasi yang didasarkan pada berat molekul dan komposisi dari suatu material. Proses ini lebih murah dibandingkan dengan proses yang lain, namun hasil kemurnian fraksinasinya rendah.

2. Proses Fraksinasi Basah (*Wet fractionation*)

Fraksinasi basah adalah suatu proses fraksinasi dengan menggunakan zat pembasah (*Wetting agent*) atau disebut juga proses Hydrophilization atau detergent proses. Hasil fraksi dan proses ini sama dengan proses fraksinasi kering.

3. Proses Fraksinasi dengan menggunakan Solvent (pelarut)/ *Solvent Fractionation*

Suatu proses fraksinasi dengan menggunakan pelarut. Dimana pelarut yang digunakan adalah aseton. Proses fraksinasi ini lebih mahal dibandingkan dengan proses fraksinasi lainnya karena menggunakan bahan pelarut.

4. Proses Fraksinasi dengan Pengembunan (*Fractional condensation*)

Proses fraksinasi ini merupakan suatu proses fraksinasi yang didasarkan pada titik didih dari suatu zat/ bahan sehingga dihasilkan suatu produk dengan kemurnian yang tinggi. Fraksinasi pengembunan ini membutuhkan biaya yang cukup tinggi namun proses produksi lebih cepat dan kemurniannya lebih tinggi (Harborne, 1987).

2.3 Kanker Payudara

2.3.1 Definisi

Payudara adalah kelenjar yang terletak di bawah kulit dan diatas otot dada. Payudara dewasa beratnya kira- kira 200gr, yang kiri umumnya lebih besar dari yang kanan. Pada waktu hamil, payudara membesar, mencapai 600 gr dan pada ibu menyusui mencapai 800 gr.

Kanker payudara merupakan kanker yang berasal dari kelenjar, saluran kelenjar, dan jaringan penunjang payudara. Sejumlah sel di dalam payudara tumbuh yang berkembang dengan tidak terkendali inilah yang disebut kanker

payudara. Kumpulan besar dari jaringan yang tidak terkontrol ini disebut tumor atau benjolan. Namun, tidak semua tumor adalah kanker karena sifatnya yang tidak menyebar ke seluruh tubuh. Tumor yang dapat menyebar ke seluruh tubuh atau menyebar jaringan sekitar disebut kanker atau tumor ganas (Ariani, 2015).

Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) 8-9% perempuan akan mengalami kanker payudara. Ini menjadikan kanker payudara sebagai jenis kanker yang paling banyak ditemui pada perempuan. Setiap tahun lebih dari 250.000 kasus baru kanker payudara terdiagnosa di Eropa dan kurang lebih 175,000 di AS (Ariani, 2015).

The *American Cancer Society* (2008) memperkirakan sekitar 178.000 wanita dan 2.000 pria Amerika didiagnosa terkena kanker payudara setiap tahun. Kanker payudara merupakan penyebab utama kematian perempuan berusia 40-45 tahun., serta penyebab terbesar kedua kematian perempuan setelah kanker paru-paru.

2.3.2 Jenis dan Stadium Kanker Payudara

Tahap-tahap stadium kanker payudara biasanya ditandai dengan skal 0 – IV. Stadium 0 berarti kanker tersebut merupakan jenis yang tidak menyebar yang tetap tinggal di tempat awal dimana ia tumbuh. Sedangkan stadium IV berarti kanker tersebut telah menyebar hingga keluar dari payudara sampai dibagian lain dari tubuh (Savitri,dkk. 2015).

Banyak cara untuk menentukan stadium, namun yang paling banyak dianut saat ini yaitu berdasarkan klasifikasi sistem TNM yang direkomendasikan oleh UICC (*International Union Against Cancer* dari WHO atau *World Health Organization*)/ AJCC (*American Joint Committee on Cancer* yang disponsori oleh *American Cancer Society* dan *American College of surgeons*). TNM merupakan singkatan dari “T”, yaitu tumor size atau ukuran tumor “ N”, yaitu *Node* atau kelenjar getah regional, serta “M”, yaitu *metastasis* atau penyebaran jauh. Ketiga faktor T, N,M dinilai baik secara klinik sebelum dan sesudah operasi, serta dilakukan pemeriksaan histopatologi (PA) (Putra, 2015).

Pada kanker payudara, penilaian pada T, N,M adalah sebagai berikut:

1. T (Tumor *size*), ukuran tumor terdiri dari :
 - a. T 0 : tidak ditemukan tumor primer
 - b. T 1 : ukuran tumor diameter 2 cm atau kurang
 - c. T 2 : ukuran tumor diameter antara 2-5 cm
 - d. T 3 : ukuran tumor > 5 cm
 - e. T 4 : ukuran tumor berapa saja tetapi sudah menyebar ke kulit, dinding dada, atau pada keduanya dapat berupa borok, edema, atau bengkak. Kulit payudara kemerahan atau ada benjolan kecil pada kulit luar tumor utama.
2. N (Node), kelenjar getah bening regional (KGB):
 - a. N 0 : tidak terdapat metastasis pada kgb Regional di ketiak/*aksilla*.
 - b. N 1 : ada metastasis ke kgb *aksilla* yang masih dapat digerakkan
 - c. N 2 : ada metastasis ke kgb *aksilla* yang sulit digerakkan
 - d. N 3 : ada metastasis ke kgb diatas tulang selangkang (*supraclavicula*) atau pada KGB di *mammary internal* didekat tulang *sternum*
3. M (Metastasis), penyebaran jauh
 - a. M x : metastasis jauh belum dapat dinilai
 - b. M 0 : tidak terdapat metastasis jauh
 - c. M 1 : terdapat metastasis jauh

Setelah masing-masing faktor T,N,M didapatkan, ketiga faktor tersebut dan didapatkan stadium kanker sebagai berikut:

1. Stadium 0 : T0 N0 M0
2. Stadium 1 : T1 N0 M0
3. Stadium IIA : T0 N1 M0 / T1 N1 M0 / T2 N0 M0
4. Stadium II B : T2 N1 M0 / T3 N0 M0
5. Stadium III A : T0 N2 M0 / T1 N2 M0 / T2 N2 M0 / T3 N1 M0 / T2 N2 M0
6. Stadium III B : T4 N0 M0 / T4 N1 M0 / T4 N2 M0
7. Stadium II C : setiap T N3 M0
8. Stadium IV : setiap T-setiap N-M1

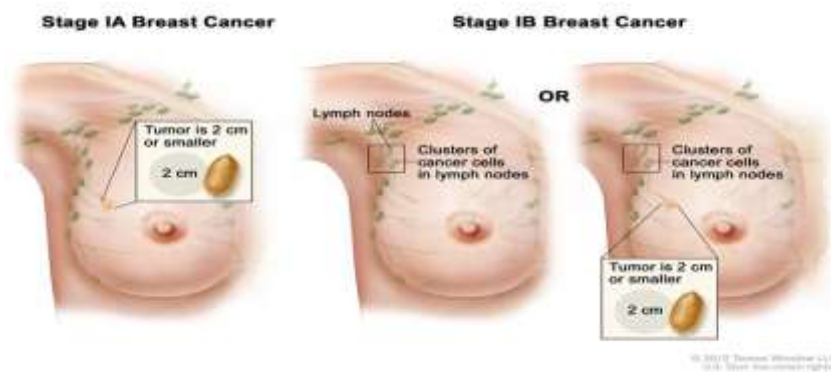
(Putra, 2015)

1. Stadium 0

Kanker payudara pada stadium ini disebut juga *Carcinoma in situ*. Ada tiga jenis *Carcinoma in situ* yaitu *ductal carcinoma in situ* (DCIS), *Lobular carcinoma in situ* (LCIS) dan penyakit *Paget* puting susu (Savitri,dkk. 2015).

2. Stadium 1

Pada stadium I, kanker umumnya sudah mulai terbentuk. Stadium I kanker payudara dibagi kedalam dua bagian tergantung ukuran dan bebrapada faktor lainnya.



Gambar 2.2 Kanker payudara stadium I (Savitri, dkk., 2015)

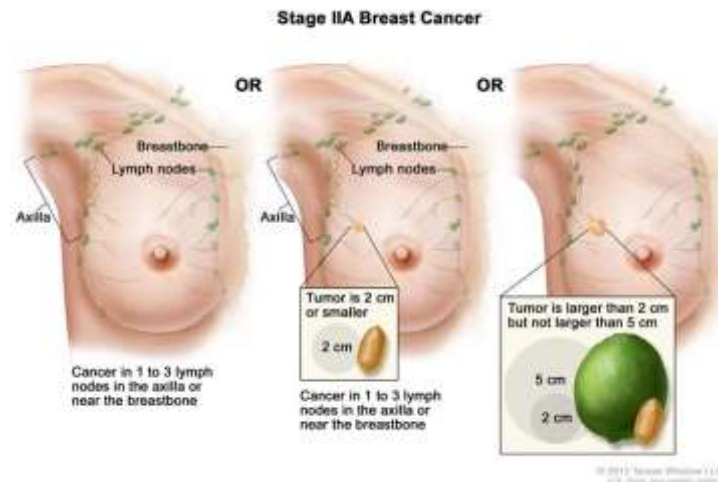
- Stadium IA. Tumor berukuran 2 cm atau lebih kecil dan belum menyebar keluar payudara.
- Stadium IB. Tumor berukuran sekitar 2 cm dan tidak berada pada payudara melainkan pada kelenjar getah bening.

3. Stadium II

Pada stadium II, kanker umumnya telah tumbuh membesar, Stadium II dibagi dalam dua bagian yaitu:

- Stadium IIA. Kanker berukuran sekitar 2-5 cm dan ditemukan pada 3 lajur kelenjar getah bening.

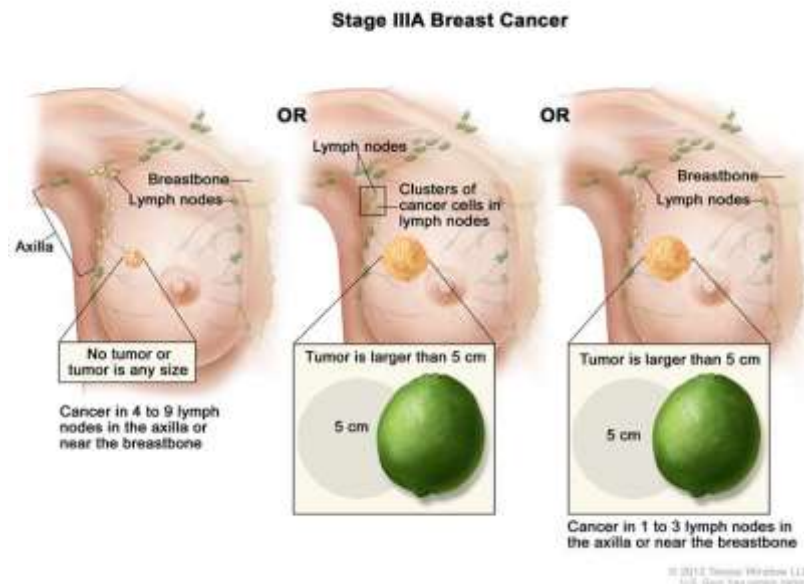
- Stadium IIB. Kanker berukuran sekitar 2-5 cm dan ditemukan menyebar pada 1-3 lajur kelenjar getah bening dan/atau terletak di dekat tulang dada.



Gambar 2.3 Kanker payudara stadium II
(Savitri, dkk., 2015)

4. Stadium III

Pada tahap ini, kanker dibagi menjadi tiga stadium yaitu:

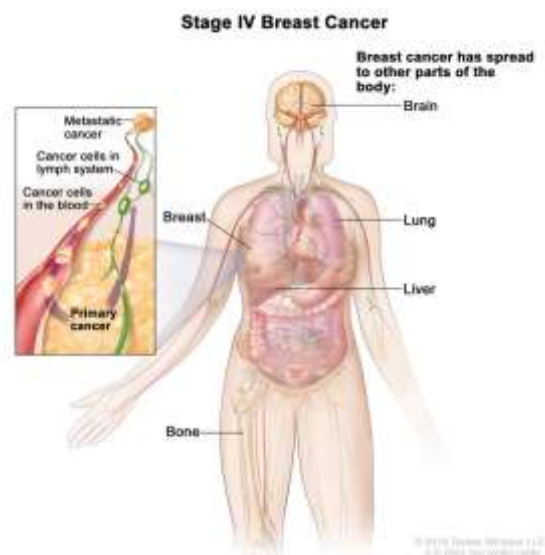


Gambar 2.4 Kanker payudara stadium III
(Savitri, dkk., 2015)

- Stadium IIIA. Kanker berukuran lebih dari 5 cm dan ditemukan pada 4-9 lajur kelenjar getah bening dan/atau di area dekat tulang dada.
- Stadium IIIB. Ukuran kanker sangat beragam dan umumnya telah menyebar ke dinding dada hingga mencapai kulit sehingga menimbulkan infeksi pada kulit payudara (*inflammatory breast cancer*).
- Stadium IIIC. Ukuran kanker sangat beragam dan umumnya telah menyebar ke dinding dada dan/atau kulit payudara sehingga mengakibatkan pembengkakan atau luka. Kanker juga mungkin sudah menyebar ke 10 lajur kelenjar bawah tulang selangka atau tulang dada.

5. Stadium IV

Pada stadium ini kanker telah menyebar dari kelenjar getah bening menuju aliran darah dan mencapai organ lain dari tubuh seperti otak, paru-paru, hati atau tulang.



Gambar 2.5 Kanker payudara stadium IV
(Savitri, dkk., 2015)

2.3.3 Gejala Kanker Payudara

Selama ini , penderita kanker payudara baru menyadari bahwa dirinya terserang kanker payudara setelah timbul rasa nyeri, sakit, ataupun benjolan tumbuh semakin membesar pada jaringan payudaranya. Sebenarnya, penderita yang mengalami kondisi ini sudah terserang kanker payudara stadium lanjut. Penderita yang terkena kanker payudara stadium awal tidak merasakan adanya nyeri atau sakit pada payudaranya. Namun, jika payudara diraba, ada benjolan yang tumbuh didalamnya. Besar kecilnya benjolan yang tumbuh itu sangat bervariasi tergantung seberapa cepat penderita bisa mendeteksinya. Setelah melewati stadium dini atau memasuki stadium lanjut gejala kanker payudara semakin banyak (kompleks) (Putra, 2015).

Sebelum menjelaskan berbagai gejala kanker payudara, berikut berbagai gejala umum kanker:

1. *Kelelahan yang dirasakan terus menerus.* Kelelahan tubuh termasuk salah satu gejala yang paling umum. Biasanya, gejala ini dirasakan pada awal penyakit kanker.
2. *Penurunan berat badan yang tidak disengaja.* Penurunan yang tidak signifikan, padahal tidak melakukan diet bisa menjadi gejala awal penyakit kanker.
3. *Demam.* Sebagian besar penderita kanker mengalami demam pada saat tertentu. Bisa jadi, disebabkan oleh penyakit kanker yang mempengaruhi sistem pertahanan tubuh atau sebagai respon pengobatan.
4. *Perubahan tertentu pada kulit tubuh.* Kulit menjadi kuning atau gelap, pertumbuhan rambut tidak normal, kemerahandan gatal pada kulit juga bisa sebagai indikasi adanya kanker jenis tertentu.
5. *Rasa Sakit.* Biassanya, rasa sakit dirasakan saat penyakit kanker sudah berlangsung (Putra, 2015).

Berbeda dengan gejala umum kanker tersebut, gejala klinik kanker payudara secara garis besar terbagi menjadi dua, yakni benjolan pada payudara dan erosi atau *eksema* pada puting susu. Gejala- gejala tersebut adalah sebagai berikut:

1. *Benjolan pada payudara.* Umumnya, berupa benjolan yang tidak nyeri pada payudara. Benjolan itu mula- mula kecil makin lama makin besar lalu melekat pada kulit payudara atau pada puting susu.
2. *Erosi atau eksema puting susu.* Kulit atau puting susu menjadi tertarik ke dalam (retraksi), berwarna merah muda atau kecoklatan sampai menjadi *oedema* hingga kulit kelihatan seperti kulit jeruk (*peau d'orange*), mengkerut, atau timbul borok (*ulkus*) pada payudara. Semakin lama, borok itu semakin besar dan mendalam, sehingga dapat menghancurkan seluruh payudara. Biasanya, berbau busuk dan mudah berdarah. Ciri- ciri lainnya antara lain:
 - a. Pendarahan pada puting susu,
 - b. Adanya ruam- ruam pada kulit di sekitar payudara, areola atau puting terlihat berisik, memerah, dan membengkak,
 - c. Keluar cairan dari puting susu,
 - d. Puting susu menjadi lunak,
 - e. Kulit payudara membengkak dan menebal,
 - f. Cekungan atau kerutan pada kulit payudara,
 - g. Rasa gatal dan ruam merah yang tidak kunjung sembuh di puting,
 - h. Terdapat benjolan di daerah bawah lengan,
 - i. Perubahan ukuran atau bentuk payudara (asimetris),
 - j. Puting susu tertekan kedalam (sebagian atau seluruhnya),
 - k. Pada umumnya, rasa sakit atau nyeri baru timbul bila tumor sudah besar, sudah timbul borok, atau ada *metastases* ke tulang- tulang, serta
 - l. Timbul pembesaran kelenjar getah bening di ketiak, bengkak (*edema*) pada lengan, dan penyebaran kanker ke seluruh tubuh.

Sementara itu, gejala pada kanker payudara lanjut sangat mudah dikenali dengan mengetahui kriteria *operbilis Heagensen* sebagai berikut:

- a. Terdapat edema luas pada kulit payudara (lebih 1/3 luas kulit payudara),

- b. Adanya nodul satelit pada kulit payudara,
- c. Kanker payudara jenis mastitis *karsinimatososa*,
- d. Terdapat model *parasternal*,
- e. Terdapat nodul *supraklavikula*,
- f. Adanya edema lengan,
- g. Adanya *metastase* jauh, serta
- h. Terdapat dua dari tanda- tanda *locally advanced*, yaitu ulserasi kulit, edema kulit, kulit terfiksasi pada dinding toraks, kelenjar getah bening *aksilla* berdiameter lebih 2,5 cm dan kelenjar getah bening *aksilla* melekat satu sama lain (Putra, 2015).

Selain berbagai gejala yang telah disebutkan sebelumnya, Haryanto, dkk (2005) menambahi empat gejala kanker payudara yang paling umum terjadi adalah sebagai berikut:

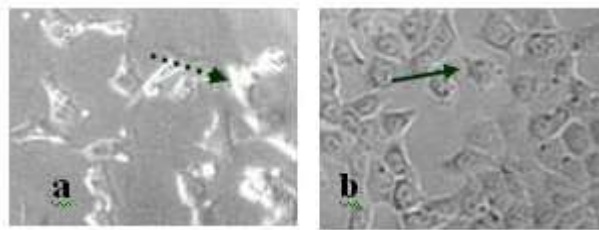
- a. Ada perlengketan dan lekukan pada kulit serta terjadinya luka yang tidak sembuh dalam waktu lama,
- b. Serasa tidak enak dan tegang pada payudara,
- c. Terjadi *retraksi* limfa,
- d. Terjadi pembengkakan lokal, serta
- e. Gejala lain yang ditemukan yaitu konsistensi payudara yang keras dan padat, benjolan tersebut berbatas tegas dengan ukuran kurang dari 5 cm, biasanya dalam stadium ini belum ada penyebaran sel-sel kanker di luar payudara (Erik T., 2005).

2.4 Sel T47D

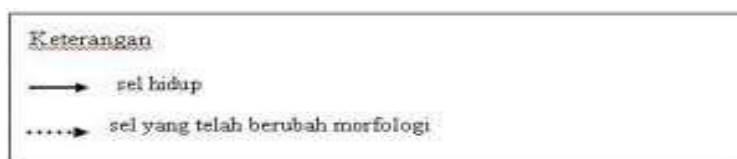
Sel T47D merupakan sel kanker yang mengekspresikan reseptor estrogen atau yang biasa disebut ER positif serta mengekspresikan p53 yang telah termutasi.

Sel T47D merupakan continuous cell line yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. Continuous cell line sering dipakai dalam penelitian kanker secara in vitro karena mudah penanganannya,

memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan frozen stock jika terjadi kontaminasi (Burdall et al., 2003). Sel T47D memiliki morfologi seperti sel epitel. Sel ini dikulturkan dalam media DMEM + 10% FBS + 2 mM L-Glutamin, diinkubasi dalam CO₂ inkubator 5% dan suhu 37°C (Abcam, 2007).



Gambar 2.6 Morfologi sel T47D akibat perlakuan EP 60 µg/mL (a) dibandingkan dengan sel tanpa perlakuan/kontrol sel (b). Dilakukan dengan menginkubasi 3×10^3 sel T47D dengan EP (30-210 µg/mL) selama 48 jam.



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

2.5 Siklus Sel

Siklus sel merupakan proses vital dalam kehidupan setiap organisme. Secara normal, siklus sel menghasilkan pembelahan sel. Pembelahan sel terdiri dari dua proses utama, yaitu replikasi DNA dan pembelahan kromosom yang telah

digandakan kedua sel anak. Secara umum, pembelahan sel terbagi menjadi 2 tahap yaitu mitosis (M) (pembelahan satu sel menjadi dua sel), sintesis DNA (S), gap 2 (G2). Setiap tahap dalam siklus sel dikontrol secara ketat oleh regulator siklus sel, yaitu:

a. *Cyclin*

Jenis *cyclin* utama dalam sel adalah *cyclin* D,E,A dan D. *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 tetapi selalu disintesis selama ada stimulasi *growth factor*.

b. *Cyclin-dependent* kinase (Cdk)

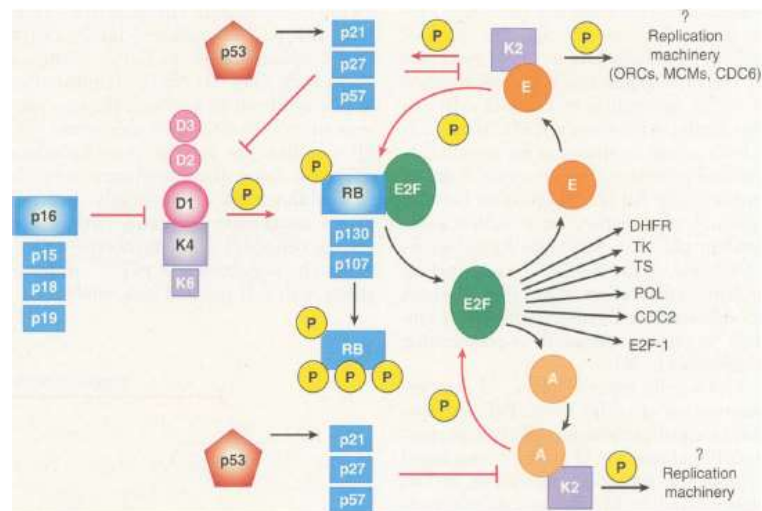
Cdk utama dalam siklus sel adalah Cdk 4,6,2 dan 1. Cdks merupakan periodik atau serin protein kinase yang harus berkaitan dengan *cyclin* untuk aktivitasnya. Konsentrasi Cdks relatif konstan selama siklus sel berlangsung. Cdks dalam keadaan bebas (tak berkaitan) adalah inaktif karena *catalytic site*, 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 aktifitas Cdk dengan cara mengikat Cdk atau kompleks *cyclin*-Cdk. *Cyclin* dependent kinase inhibitor terdiri dari dua kelompok protein yaitu INK4 (p15,p16,p18 dan p19) dan CIP/ KIP (p21,p27,dan p57). Keluarga INK4 membentuk kompleks yang stabil dengan Cdk sehingga mencegah Cdk mengikat *cyclin* D. INK4 bertugas mencegah progresifase G1. Keluarga CIP/ KIP meregulasi fase G1 dan S dengan menghambat kompleks G1 *cyclin* Cdk dan *cyclin* B-Cdk. Protein p21 juga menghambat sintesis DNA dengan diregulasi oleh p53 karena p53 merupakan faktor dan transkripsi untuk ekspresi p21.

Rb Pathway

Siklus sel dimulai dari masuknya sel dari fase G₀ (quiescent) ke fase G₁ karena adanya stimulus oleh *growth factor* (Gambar 2.7). Pada awal fase G₁, Cdk 4 atau 6 diaktifkan oleh *cyclin D* (cycD). Kompleks Cdk4/6 dengan cycD akan menginisiasi fosforilasi dari keluarga protein retinoblastoma (pRb) selama awal G₁. Efek dari fosforilasi ini, fungsi histon deasetilasi (HDAC) yang seharusnya menjaga kekompakan struktur kromatin menjadi terganggu. Akibatnya struktur DNA menjadi longgar dan faktor transkripsi yang semula diikat pRb menjadi lepas dan transkripsi dari E2F *responsive genes* yang dibutuhkan dalam progresi siklus sel ke fase S menjadi aktif. Gen tersebut antara lain cycE, cycA, Ddc25, DNA polimerase, timidilat kinase, timidilat sintase, DHFR dan lain- lain (Vermeulen *et al.*, 2003)

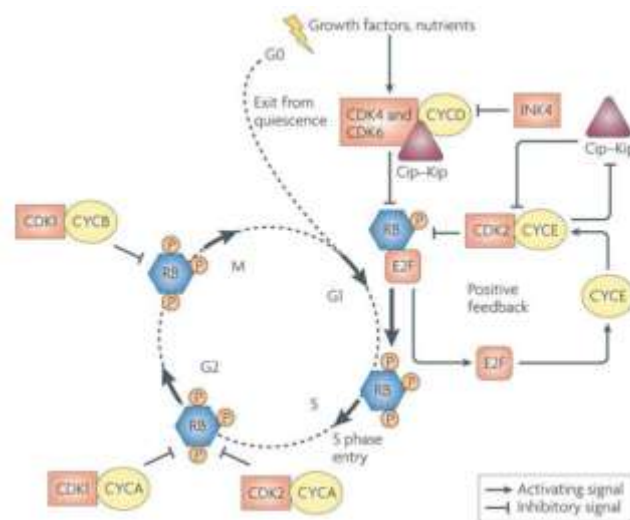


Gambar 2.7 Siklus Sel (Sher, 1996)

Pada transisi fase G₁ ke fase S, Cdk2 aktif dengan mengikat cycE. Kompleks tersebut melanjutkan proses fosforilasi pRb (status hiperfosforilasi) supaya proses transkripsi yang dipacu E2F tetap aktif dan *restriction point* (R) yang ada di batas fase G₁/S, kompleks Cdk2-cycE juga memfosforilasi inhibitor p27 sehingga p27 terdegradasi (Vermeulen *et al.*, 2003). Ketika siklus sel akan memasuki fase S,

cycE akan didegradasi dan Cdk2 yang dibebaskan akan mengikat cycA (Cooper, 2004).

Kompleks Cdk2-cycA dibutuhkan sel untuk mereplikasi DNA selama fase S. Kompleks Cdk2-cycA akan memfosforasi protein yang dibutuhkan dalam replikasi DNA supaya aktif, contohnya adalah protein CDC6 (*Cell Division Cycle 6*). Kompleks tersebut juga menjaga supaya tidak terjadi *multiplicity* replikasi DNA. Pada akhir fase S, cycA akan melepas Cdk2 dan mengikat Cdk1 (Cdc2) yang meregulasi transisi sel dari S ke G2 (Dhulipala *et al.*, 2006). Kompleks cycA-Cdk1 akan memfasilitasi kondensasi kromatin yang dibutuhkan untuk penggandaan sel (Lapenna and Giordano, 2009). Pada fase G2, sel juga memiliki kesempatan melakukan mekanisme *repair* apabila terjadi kesalahan sintesis DNA (Baumforth & Crocker, 2003).



Gambar 2.8 Ilustrasi siklus sel (Lapenna and Giordano, 2009)

Memasuki fase mitosis, cycA akan didegradasi dan terjadi peningkatan ekspresi cycB yang akan mengikat Cdk1. Kompleks Cdk1-cycB secara aktif memacu mitosis. Kompleks cycB-Cdk1 berperan penting dalam control *rearrangement* mikrotubulus selama mitosis (Dhulipala *et al.*, 2006). Cdk1 dapat dinonaktifkan oleh Wee1 dan Myt1 dengan cara Wee1 dan Myt1 akan memfosforilasi Cdk1 pada tirosin-15 dan atau theroenin-14. Defosforilasi pada

situs tersebut dapat dilakukan oleh Cdc25 sehingga Cdk1 menjadi aktif kembali dan siklus sel tetap berlangsung (Vermeulen *et al.*, 2003). Pada akhir fase mitosis, cycB akan didegradasi oleh *Anaphase Promoting Complex* (APC) melalui proses proteolitik. APC juga akan berfungsi untuk memacu kromatid untuk berpisah bergerak ke masing-masing kutub untuk menyelesaikan mitosis (anafase) (Lapenna and Giordano, 2009).

Checkpoint pada siklus sel

Untuk menjamin bahwa DNA berduplikasi dengan akurat dan separasi dari kromosom terjadi dengan benar, maka siklus sel melakukan mekanisme checkpoint. Checkpoint bertugas mendeteksi kerusakan DNA. Apabila terdapat kerusakan DNA, *checkpoint* akan memacu *cell cycle arrest* sementara untuk perbaikan DNA atau *cell cycle arrest* permanen sehingga sel memasuki fase *senescent*. Bila mekanisme *cell cycle arrest* tidak cukup menjamin DNA yang rusak diduplikasi, maka sel akan dieliminasi dengan cara apoptosis (Siu *et al.*, 1999).

Faktor *checkpoint* pertama pada sel mamalia dikenal dengan *restriction point* (R) dan muncul menjelang akhir G1 (Cooper and Hausman, 2004). Pada *checkpoint* ini, DNA sel induk diperiksa apakah terdapat kerusakan atau tidak. Bila terdapat DNA yang rusak, siklus sel dihentikan hingga mekanisme *repair* DNA rusak telah selesai. Setelah melampaui R, sel menjadi *committed* (komitmen) untuk menyelesaikan keseluruhan satu siklus (*no return point*) dan sel selanjutnya sel harus mampu melakukan replikasi DNA. Bila tidak melampaui R, sel dapat kembali ke fase G0. Hilangnya kontrol dari R akan menghasilkan *survival* DNA yang rusak.

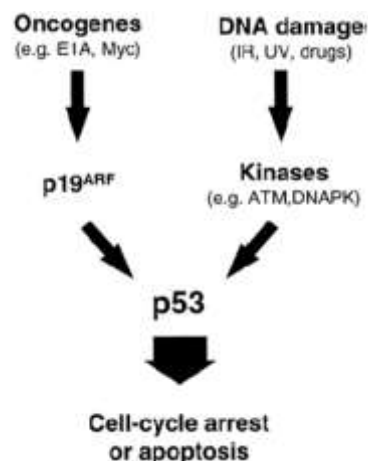
p53 pathway

Pada *checkpoint* G1/S, kerusakan DNA dapat memacu *cell cycle arrest* dan proses ini adalah *p53-dependent*. Secara umum, level p53 sel rendah karena diregulasi negatif oleh mdm2 yang mentarget degradasi p53, namun kerusakan DNA dapat menginduksi aktivitas p53 dengan cepat. p53 dikontrol oleh mdm2 dan p19ARF. Level protein p53 secara normal adalah pada konsentrasi rendah di dalam sel. Namun, sekali distimulasi, level protein secara cepat akan meningkat

sepanjang waktu paruhnya, sedangkan level mRNA relatif tidak berubah. Lalu, apa yang bisa disimpulkan dari fenomena ini? Bahwa regulasi p53 terjadi pada level protein (bukan DNA atau RNA) adalah hal yang sangat kritikal pada aktivasinya. Regulator negatif p53 yaitu mdm2 yang merupakan suatu p53-responsive gene (gen yang terekspresi melalui faktor transkripsi p53).

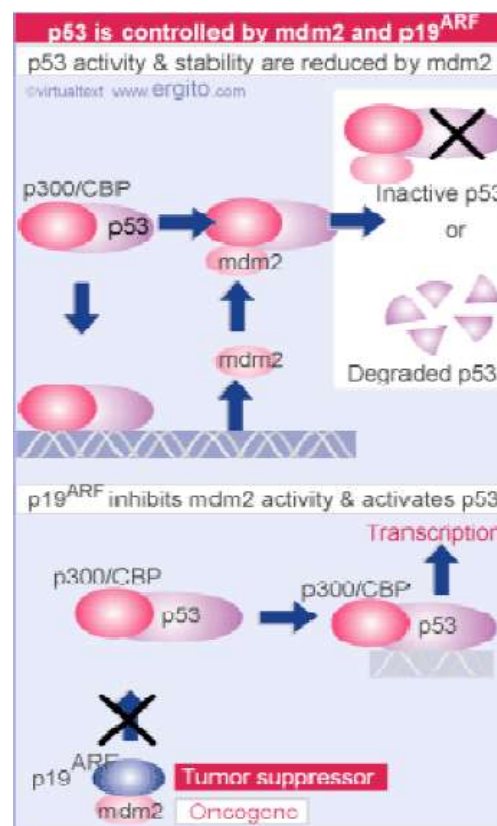
Sehingga dapat dibayangkan di sini ada loop umpan balik negatif di sini. p53 teraktifkan dan kemudian meningkatkan level mdm2. Mdm2 kemudian menginaktifkan p53 dengan cara mengikat kompleks atau mendegradasi p53. Jika sel ingin menaikkan level protein p53 maka sel perlu menghambat mdm2.

Fosforilasi p53 pada serin-15 dan serin-37 oleh ATM atau protein kinase lain setelah terjadi kerusakan DNA dapat mencegah ikatan MDM2 dengan p53. Jadi, ketika p53 terfosforilasi ini (Gambar 2.9), dia tidak bisa lagi mengikat mdm2. Kemudian, inilah yang mampu menghilangkan penghambatan p53 dimediasi mdm2. Jadi, p53 mengenali ketika sel telah mengalami kerusakan DNA dan menghentikan siklus sel (cell cycle arrest) sehingga sel dapat memperbaiki kerusakan (repair), atau dalam banyak kasus, hanya memberitahu sel untuk bunuh diri (apoptosis), yaitu dengan cara menstimulasi transkripsi gen seperti *p21* dan *Bax* sehingga siklus sel berhenti atau terjadi apoptosis (Siu *et al.*, 1999).



Gambar 2.9 Onkogen dan DNA *damage* agent mengaktifkan p53 melalui mekanisme yang berbeda (Lapenna and Giordanp, 2009)

Mekanisme lain untuk menghambat mdm2 adalah dengan onkogen, suatu protein mutan konstitutif aktif yang terus-menerus memberitahu sel untuk tumbuh (E1A, Ras,c-Myc). Jika p53 mengenali ketika hal ini terjadi dan menghentikan siklus sel. Namun, onkogen tidak mengarah pada pengaktifan ATM atau DNA-PK, pada kenyataannya, onkogen bahkan tidak mengarah pada fosforilasi p53 pada domain MDM2-binding. Dengan cara menginduksi ekspresi protein supresor tumor disebut p19ARF.



Gambar 2.10 Regulasi p53 dilakukan oleh mdm2 dan p19ARF
(Cooper & Hausman, 2004)

Oleh karena itulah, mudah di pahami bahwa p53 adalah gen yang paling sering termutasi pada kanker. Pada sel normal, p53 penting pada kontrol *checkpoint* utama. Dia dapat mengenali ketika kesalahan terjadi, contoh kerusakan DNA atau sel terstimulasi oleh onkogen, dan segera mengentikan siklus sel untuk mencegah sel menjadi kanker. Jika sel kehilangan p53, sel akan kehilangan fungsi

checkpointnya. Tidak hanya mutasi p53 termutasi saja yang ditemukan pada sel kanker, tetapi juga over ekspresi mdm2 (yang menghambat p53), juga hilangnya p19ARF. Selanjutnya *checkpoint* terdapat pada fase S yang berfungsi mendeteksi kerusakan DNA yang direplikasi. *Checkpoint* pada G2 mencegah inisiasi mitosis sebelum replikasi DNA selesai. *Checkpoint* utama dalam fase S/G2/M adalah Chk1. Ketika terdapat kerusakan DNA, protein kinase ATR akan memfosforilasi Chk1, kemudian Chk1 memfosforilasi Cdc25C pada serin-216. Fosforilasi tersebut menyebabkan kompleks cycB-Cdk1 yang bertanggung jawab pada progresi fase S. Dengan difosforilasinya Cdc25A oleh Chk1, kompleks cyc-Cdk menjadi tidak aktif dan terjadi *S arrest* (Xiao *et al.*, 2003; Beckerman *et al.*, 2009). *Checkpoint* yang terakhir, disebut *spindle checkpoint*, bertugas menjaga integritas genom menjelang akhir mitosis. Jika terjadi kegagalan pada penempatan pasangan kromosom pada *spindle*, akan terjadi mitosis *arrest*. Pada sel kanker, *checkpoint* tidak berfungsi dengan baik dan siklus sel berlangsung tanpa kendali (Cooper & Hausman, 2004).

2.6 Penentuan Nilai IC₅₀

IC₅₀ adalah konsentrasi yang dapat menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel sebanyak 50% dari populasi sel. Untuk menentukannya menggunakan microsoft excel 2010.

2.7 Apoptosis

Apoptosis adalah mekanisme kematian sel yang terprogram yang penting dalam berbagai proses biologi. Berbeda dengan nekrosis, yang merupakan bentuk kematian sel sebagai akibat sel yang terluka akut, apoptosis terjadi dalam proses yang diatur sedemikian rupa yang secara umum memberi keuntungan selama siklus kehidupan suatu organisme (Kanduc *et al.*, 2002).

2.7.1 Peranan Apoptosis

Kematian sel melalui apoptosis merupakan fenomenal yang normal, yaitu terjadi eliminasi sel yang tidak diperlukan lagi. Menurut Lumongga (2008) proses apoptosis secara fisiologis diperlukan untuk:

1. Terminal sel

Apoptosis dapat terjadi pada sel yang mengalami kerusakan yang tidak bisa di repair, infeksi virus, keadaan yang mengakibatkan stres pada sel. Kerusakan DNA akibat ionisasi radiasi maupun bahan kimia toxic juga dapat meneruskan apoptosis melalui aktivasi tumor supresor gen p53. Keputusan untuk apoptosis dapat berasal dari sel itu sendiri dari jaringan disekitarnya ataupun dari sel yang termasuk dalam immune sistem. Pada keadaan ini fungsi apoptosis adalah untuk mengangkat sel yang rusak, mencegah sel menjadi lemah, oleh karena itu kurangnya nutrisi dan mencegah penyebaran inveksi virus.

2. Mempertahankan homeostatis

Pada organisme dewasa, jumlah sel dalam suatu organ atau jaringan harus berada dalam keadaan yang relatif konstan. Proses keseimbangan ini termasuk dalam homeostatis yang dibutuhkan oleh makhluk hidup untuk mempertahankan lingkungan internalnya. Keseimbangan (homeostatis) ini dapat tercapai bila kecepatan mitosis pada jaringan seimbang dengan kematian sel. Bila keseimbangan ini terganggu, maka akan dapat mengakibatkan terbentuknya tumor atau jumlah sel semakin berkurang.

3. Perkembangan embrio

Kematian sel yang terprogram merupakan bagian dari perkembangan jaringan. Pada masa embrio, perkembangan suatu jaringan atau organ didahului oleh pembelahan sel dan diferensiasi sel yang besar-besaran dan kemudian dikoreksi melalui apoptosis.

4. Interaksi limfosit

Perkembangan limfosit B dan limfosit T pada tubuh manusia merupakan suatu proses yang kompleks yang akan membuang sel-sel yang berpotensi menjadi rusak. Sitotoksik T sel dapat secara langsung menginduksi apoptosis

pada sel melalui terbukanya suatu celah pada target membran dan pelepasan zat-zat kimia untuk mengawali proses apoptosis. Celah ini dapat terjadi melalui adanya sekresi perforin, granula yang berisi granzyme B, serine protease yang dapat mengaktifasi caspase melalui pemecahan reduksi aspartat.

5. Involusi hormonal pada usia dewasa

Apoptosis dapat terjadi misalnya pada pelepasan sel endometrium selama siklus menstruasi, regresi pada payudara setelah masa menyusui dan atresia folikel ovarium pada menopause.

2.7.2 Proses Apoptosis

Proses apoptosis yang dikemukakan Lumongga (2008) dikendalikan oleh berbagai tingkat sinyal sel, yang dapat berasal dari pencetus ekstrinsik maupun ekstrinsik. Di dalam sinyal ekstrinsik antara lain hormon, faktor pertumbuhan, nitric oxide dan sitokin. Semua sinyal tersebut harus dapat menembus membran plasma ataupun transduksi untuk dapat menimbulkan respon. Sinyal intrinsik apoptosis merupakan suatu respon yang diinisiasi oleh sel sebagai respon terhadap stress dan akhirnya dapat mengakibatkan kematian sel. Pengikatan respon nuklear oleh glukokortikoid, panas, radiasi, kekurangan nutrisi, infeksi virus dan hipoksia merupakan keadaan yang dapat menimbulkan pelepasan sinyal apoptosis intrinsik melalui kerusakan sel. Sebelum terjadi proses kematian sel melalui enzim, sinyal apoptosis harus dihubungkan dengan pathway kematian sel melalui regulasi protein. Pada regulasi ini terdapat dua metode yang telah dikenali untuk mekanisme apoptosis, yaitu melalui mitokondria dan penghantar sinyal secara langsung melalui adapter protein.

1. Ekstrinsik Pathway (diinisiasi oleh kematian reseptor)

Pathway ini diinisiasi oleh pengikat reseptor kematian pada permukaan sel pada berbagai sel. Reseptor kematian merupakan bagian dari reseptor tumor nekrosis faktor yang terdiri dari cytoplasmic domain, berfungsi untuk mengirim sinyal apoptosis. Reseptor kematian yang diketahui antara lain TNF reseptor tipe 1 yang dihubungkan dengan protein Fas (CD95). Pada saat Fas berikatan dengan ligandnya, membran menuju ligand (FasL). Tiga atau lebih

molekul Fas bergabung dengan cytoplasmic *death* domain membentuk binding site untuk adapter protein, FADD (*Fas-associated death domain*). FADD ini melekat pada reseptor kematian dan mulai berikatan dengan bentuk inaktif dari caspase 8. Molekul procaspase 8 ini kemudian dibawa keatas dan kemudian dipecah menjadi caspase 8 aktif. Enzim ini kemudian mencetuskan cascade aktivasi caspase dan kemudian mengaktifkan procaspase lainnya dan mengaktifkan enzim untuk mediator pada fase eksekusi.

2. Instrinsik Pathway (Mitokondrial)

Pathway ini terjadi oleh karena adanya permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul pro apoptosis ke dalam siplasma, tanpa memerlukan reseptor kematian. Faktor pertumbuhan dan sinyal lainnya dapat merangsang pembentukan protein antiapoptosis Bcl2, yang berfungsi sebagai regulasi apoptosis. Protein antiapoptosis yang utama adalah: Bcl-2 dan Bcl-x yang pada keadaan normal terdapat pada membran mitokondria dan sitoplasma. Pada saat sel mengalami stress, Bcl-2 dan Bcl-x menghilang dari membran mitokondria dan digantikan oleh pro-apoptosis protein, seperti Bak, Bax, Bim. Sewaktu kadar Bcl-2, Bax-x menurun, permeabilitas membran mitokondria meningkat, beberapa protein dapat mengaktifkan cascade caspase. Salah satu protein tersebut adalah cytochrom-c yang diperlukan untuk proses respirasi pada mitokondria. Di dalam sitosol, cytochrom-c berikatan dengan protein Apaf-1 (*Apoptosis activating factor-1*) dan mengaktivasi caspase-9. Protein mitokondria lainnya seperti *Apoptosis Inducing Factor* (AIF) memasuki sitoplasma dengan berbagai inhibitor apoptosis yang pada keadaan normal untuk menghambat aktivasi caspase.

2.7.3. Mengenali sel yang apoptosis

Kanduc *et al.*, (2000) menerangkan sel yang mengalami apoptosis dapat diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya maupun mikroskop eletron melalui ciri-ciri morfologis yang tampak. Ciri-ciri tersebut antara lain:

1. Sel menjadi bulat. Hal ini terjadi karena struktur protein yang menyusun sitoskeleton dicerna oleh enzim peptidase spesifik yang disebut caspase yang telah diaktifkan di dalam sel.
2. Kromatin (DNA dan protein-protein yang terbungkus di dalam inti sel) mulai mengalami degradasi dan kondensasi.
3. Kromatin mengalami kondensasi lebih lanjut, menjadi semakin memadat. Pada tahap ini, membran yang mengelilingi ini sel masih tampak utuh, walaupun caspase tertentu telah melakukan degradasi protein pori inti sel dan mulai mendegradasi lamin yang terletak dalam lingkungan inti sel.
4. Lingkungan dalam inti sel tampak terputus dan DNA di dalamnya terfragmentasi (proses ini dikenal dengan *karyorrhexis*). Inti sel pecah melepaskan berbagai bentuk kromatin atau unit nukleosom karena degradasi DNA.
5. Plasma membran mengalami *blebbing*.
6. Sel tersebut kemudian dimakan atau pecah menjadi gelembung- gelembung yang disebut *apoptotic bodies* dan kemudian dimakan.

Sel yang mengalami apoptosis juga dapat dikenali dengan:

1. Penandaan inti yang mengalami kondensasi dengan pewarnaan fluorescence hoeschst atau DAPI.
2. Sel yang mengalami apoptosis mengeluarkan PS (*Phosphatidil Serin*) pada permukaan ekstra selulernya, sehingga dapat ditandai dengan annexin V yang dilabeli fluorescence. PS secara normal terdapat pada *cytosolic surface* dari membran plasma (di bagian dalam membran plasma), tetapi didistribusikan ke permukaan ekstraseluler selama apoptosis oleh protein hipotetik yang dikenal sebagai *scramblase*.
3. DNA yang terfragmentasi dapat dideteksi dengan TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated UTP adn labelling*) atau elektroforesis DNA yang diisolasi dalam gel agarosa. TUNEL juga dapat digunakan untuk mendeteksi enzim yang terlibat dalam pengerusakan inti sel.

2.8 Uji Sitotoksik

Evaluasi preklinik merupakan salah satu hal yang penting untuk mengetahui potensi aktivitas neoplasmatiknya dalam pengembangan obat antikanker baru sebagai agen-agen kemoterapi kanker. Evaluasi ini tidak hanya digunakan untuk obat-obat antikanker, tetapi juga untuk obat-obat lainnya, kosmetik, zat tambahan makanan, peptisida dan lainnya. Evaluasi yang telah terstandarisasi untuk menentukan apakah suatu material mengandung bahan yang berbahaya (toksik) secara biologis disebut uji sitotoksitas. Syarat yang harus dipenuhi untuk sistem uji sitotoksitas diantaranya adalah sistem pengujian harus dapat menghasilkan kurva dosis-respon yang reproduibel dengan variabilitas yang rendah, kriteria respon harus menunjukkan hubungan linier dengan jumlah sel serta informasi yang didapat dari kurva dosis-respon harus sejalan dengan efek yang muncul pada *in vivo*. Salah satu metode yang umum digunakan untuk menetapkan jumlah sel adalah metode MTT (CCRC, 2012).

Senyawa sitotoksik adalah senyawa yang bersifat toksik pada sel, yang dapat diketahui dengan melakukan uji sitotoksik. Uji sitotoksik dapat memberikan informasi konsentrasi obat yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Akhir dari uji sitotoksik adalah memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Amalina, 2008).

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

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut tidak toksik. Klasifikasi aktivitas sitotoksik ekstrak terhadap sel kanker dapat digolongkan kategori sangat aktif jika nilai $IC_{50} < 10\mu g/$

ml, kategori aktif jika nilai IC_{50} 10-100 μ g/ml dan kategori cukup aktif jika nilai IC_{50} 100-500 μ g/ml (Weerapreeyakul *et al.*, 2012).

2.9 Proliferasi

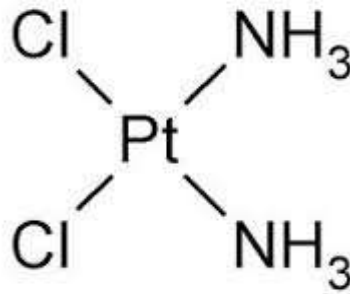
Proliferasi sel adalah pembelahan sel (*cell division*) dan pertumbuhan sel (*cell grow*), yang mendasari mekanisme dan pengaturan proliferasi sel adalah siklus sel. Proliferasi sel distimulus oleh faktor pertumbuhan instrinsik, kematian dan kerusakan sel, mediator biokimia dari lingkungan. Kelebihan stimulus atau kekurangan inhibitor akan menyebabkan pertumbuhan sel yang tak terkontrol atau terjadinya kanker. Penginduksian pertumbuhan sel dihubungkan dengan pemendekan siklus sel pada fase G_0 sampai memasuki siklus sel terdapat penghambatan fisiologi untuk terjadi proliferasi sel. Pertumbuhan sel dapat dicapai dengan memperpendek atau memperpanjang siklus sel (Hartono, 2009).

Sifat Antiproliferasi ditunjukkan dengan nilai *doubling time* yang lebih besar dibandingkan kontrol sel. *Cell cycle progression* merupakan parameter utama dalam mengukur sifat proliferasi suatu sel kanker. Senyawa yang dapat menunda *doubling time* sel, diduga dapat menghambat gen- gen atau protein yang mengatur daur sel. Penghambatan *cell cycle progression* dilakukan dengan uji *doubling time*. Hambatan proliferasi sel dilihat dari nilai *slope* pada kurva waktu inkubasi vs viabilitas sel atau dihitung dengan cara ekstrapolasi. *Slope* yang lebih kecil menunjukkan perpanjangan *doubling time* (Utami, 2011).

2.10 Cisplatin

Komponen standar *cisplatin* adalah molekul *platinum* (Pt) inorganik berbentuk segi empat, terdiri dari atom inti Pt divalen (II) memiliki *cis ligand* terdiri dari dua atom *klorin* atau golongan amin. Bentuk cis dari *cisplatin* ini penting untuk menentukan aktivitas sitotoksik *cisplatin* dan sebagai pembentuk ikatan yang optimal antara Pt (II) dengan *sulfur-donating cytosolic* (Pt-S) “platinofil” (seperti *gluthatione* dan *metionin*) atau dengan atom N7 rantai purin DNA (Pt-N). Toksisitas sistemik *cisplatin* ditentukan oleh reaksi pembentukan

ikatan Pt-N atau Pt-S yang terjadi setelah penggantian atom *klorin* secara nonezimatik pada reaksi hidrolisis.



Gambar 2.11 Struktur Kimia *Cisplatin*
(Santoso & Askandar, 2011)

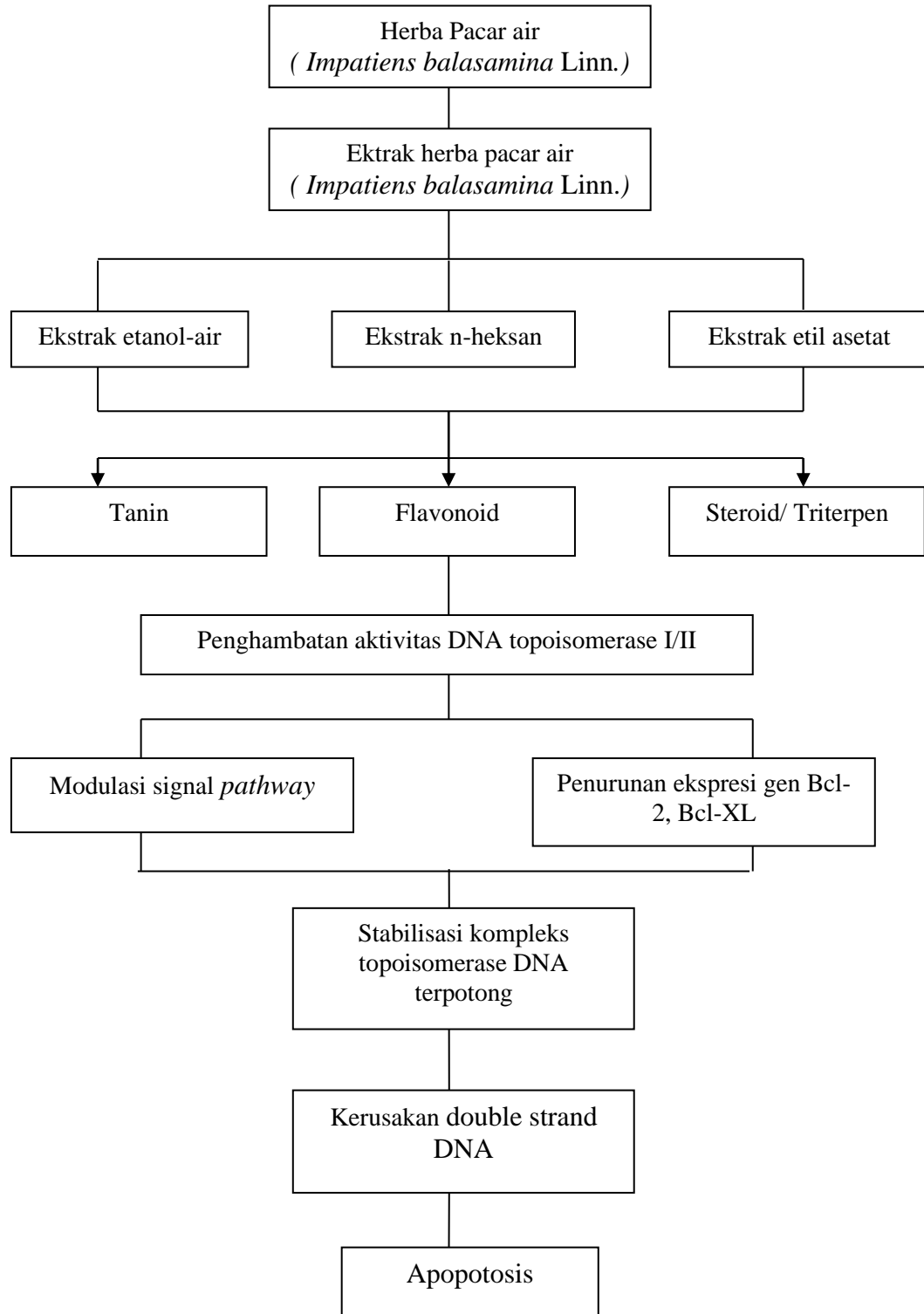
Aktivitas biologis cisplatin yaitu dapat bereaksi pada banyak komponen seluler, diantaranya RNA, protein, DNA, fosfolipid dan fosfatidilserin pada membran, merusak sitoskeleton dan mempengaruhi polimeriserin aktin. Target penting cisplatin pada mekanisme seluler adalah DNA nucleus. Cisplatin menyebabkan DNA-*adduct* yang berpengaruh terhadap replikasi dan traskripsi DNA sehingga dapat menyebabkan berhentinya siklus sel dan memicu terjadinya apoptosis pada sel kanker. Mekanisme antikanker cisplatin juga didukung kemampuannya berikatan dengan DNA mitokondria yang menyebabkan ketidakmampuan mitokondria melakukan perbaikan nukleotida DNA-*adduct* pada nukleus. Penghambatan cisplatin pada sel kanker juga terjadi dengan adanya pemendekan dan degradasi telomerase melalui penghambatan aktivitas telomerase (Jamieson & lippard, 1999). Cisplatin dilaporkan mampu menginduksi *downregulation* Bcl-2 pada sel T47D (Mokhatari dkk, 2012).

2.11 Penelitian Terdahulu

Penelitian yang sudah dilakukan oleh Rahmawati, dkk (2013), Herbal pacar air dikatakan memiliki aktivitasnya dilihat dari jumlah sel hidup yang telah diujikan terhadap sel kanker payudara (sel T47D) dengan metode MTT dalam rentang waktu 24 jam setelah pemberian konsentrasi larutan uji kemudian ditentukan harga IC_{50} dengan menggunakan probit analysis. Ekstrak n-heksan memiliki harga IC_{50} 97,493 $\mu\text{g/ml}$ sehingga dikatakan moderate aktif terhadap sel kanker payudara T47D. Sedangkan ekstrak metanol memiliki harga IC_{50} 295,359 $\mu\text{g/ml}$. Hasil uji KLT terbukti adanya kandungan flavonoid dan steroid.

Penelitian yang dilakukan oleh Redha (2010), Flavonoid sebagai salah satu kelompok senyawa fenolik yang banyak terdapat pada jaringan tanaman dapat berperan sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidatif flavonoid bersumber pada kemampuan mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam. Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan yang beragam pada berbagai jenis sereal, sayuran dan buah-buahan. Penelitian- penelitian mengenai peranan flavonoid pada tingkat sel, secara *in vitro* maupun *in vivo*, membuktikan pula adanya korelasi negatif antara asupan flavonoid dengan resiko munculnya penyakit kronis tertentu, salah satunya diduga karena flavonoid memiliki efek kardioprotektif dan aktivitas antiproliferatif.

2.12 Kerangka Teori



Gambar 2.12. Kerangka Teori

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan *design post test only* secara *in vitro*. Penelitian ini dilakukan pada kultur sel T47D dengan ekstrak metanol, fraksi n- heksan, fraksi etil asetat dan fraksi metanol-air dari herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.). Uji aktivitas sitotoksik dilakukan dengan menggunakan metode MTT (*Microculture Tetrazolium Technique*), pemeriksaan apoptosis menggunakan *flowcytometry*, pemeriksaan antiproliferasi menggunakan tehnik *doubling time*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium FMIPA Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya Palembang dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penelitian ini berlangsung pada bulan Februari - Maret 2017.

3.3 Subyek Penelitian

Subyek pada penelitian ini adalah sel uji yaitu sel T47D dan sediaan uji berupa ekstrak metanol, fraksi n- heksan, fraksi etil asetat dan fraksi metanol- air yang dibuat di Laboratorium Riset Terpadu Pascasarjana Universitas Sriwijaya Palembang.

- Sel T47D normal dapat diketahui dengan cara: sel kanker yang diambil dari tangki nitrogen cair diinkubasi dengan medium pertumbuhan DMEM selama 6 sampai 24 jam. Sel yang normal akan melekat didasar *flask* sedangkan sel yang tidak normal akan mengapung dipermukaan medium. Buang semua medium yang mengandung sel- sel yang tidak normal. Kemudian medium

pertumbuhan diganti dengan yang baru, dan bila sel kanker telah “*confluent*” sebesar 70-80% akan dilakukan sub-kultur sel.

- Jumlah sel : 1×10^4 sel /well

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

3.4.1.1 Alat Ekstraksi dan Fraksinasi

Dalam melakukan ekstraksi dan fraksinasi pada herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.), alat yang dibutuhkan adalah blender, tabung elemeyer, corong, kertas saring, *rotary evaporator*, gelas ukur, labu pisah 1000ml, penangas air, cawan petri, tiang penyangga, botol, timbangan analitik, dan flate silica.

3.4.1.2 Alat Uji Sitotoksik

Pada pengujian sitotoksik menggunakan teknik MTT. Alat yang digunakan saat kultur sel adalah inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C, mikropipet, blue tip, yellow tip, timbangan analitik, conical, micro tube, mikroskop inverted, vortex, LAF (*Laminal L Flow*), micro plate 96 sumuran, *Elisa reader* dengan panjang gelombang 595 Nm, sentripuge, reagen MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid), cisplatin, dan camera.

3.4.1.3 Alat Uji Apoptosis dan antiproliferasi

Pada pengujian antiproliferasi menggunakan tehnik *doubling time* dan uji apoptosis menggunakan tehnik *flowcytometry*. Alat yang digunakan saat kultur sel dan uji apoptosis yaitu inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C, mikropipet, blue tip, yellow tip, timbangan analitik, conical, micro tube, mikroskop inverted, vortex, LAF (*Laminal L Flow*), micro plate 6 sumuran, *Elisa reader* dengan panjang gelombang 595 Nm, sentripuge, flowcytometer, dan camera.

3.4.2 Bahan

3.4.2.1 Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) lalu diekstrak dengan pelarut metanol dan kemudian akan dilakukan fraksinasi dengan menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan metanol-air. Agen kemoterapi yang digunakan adalah *cisplatin* dari Laboratorium parasitologi UGM.

3.4.2.1 Bahan Kultur Sel

Sel yang digunakan adalah sel T47D yang merupakan koleksi dari Laboratorium Parasitologi UGM. Kultur sel ditumbuhkan pada media kultur RPMI dalam 1641 yang mengandung FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10%, penicilin-streptomisin 1%, dan fungizone 0,5%. Permenen sel dari *tissue culture disk* menggunakan tripsin-EDTA 0,25%.

3.4.2.2 Bahan Uji Sitotoksik dan uji antiproliferasi

pada pengujian uji sitotoksik dengan metode MTT. Reagen yang digunakan uji sitotoksik menggunakan MTT adalah (3-(4,5 dimetilthiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromida) MTT. Larutan induk MTT 5 mg/ml dibuat dengan melarutkan MTT dalam PBS 1x pH 7,4. Pereaksi kerja dibuat dengan menggunakan mengencerkan preaksi stok dengan menggunakan media kultur. Pereaksi stoper mengandung SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 10% dalam 0,01 N HCL yang digunakan untuk melarutkan formazan.

3.4.2.3 Bahan Uji Apoptosis dengan *Flowcytometry*

Bahan apoptosis yang digunakan adalah annexin V-FITC apoptosis *detection* kit. Bahan untuk uji apoptosis sama seperti pada pengujian uji sitotoksik.

3.5 Cara Kerja

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium FMIPA Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya Palembang untuk melakukan ekstraksi dan fraksinasi. Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjadarmas Yogyakarta untuk melakukan uji apoptosis, sitotoksik dan antiproliferasi. Tahapan-tahapan dalam penelitian ini yaitu:

3.5.1 Ekstraksi

Herba pacar air serbuk yang di peroleh dari Materia Medika Batu, Jawa Timur kemudian diekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol (masing-masing sebanyak satu liter), pada suhu ruang selama 48 jam untuk setiap ekstraksi. Hasil ekstraksi dirotaevaporator dan direndamannya dilarutkan kembali dengan metanol. Ekstrak metanol hasil rotaevaporasi diekstrak dengan 200 ml methanol dan larutan disuspensikan oleh penambahan 50 ml air dan difraksinasi. Ekstraksi dengan pelarut air, serbuk herba pacar air ditimbang dengan air (perbandingan 1 gr : 10 ml air) kemudian dipanaskan pada suhu 100°C kurang lebih 4 jam. Ekstrak yang diperoleh disaring dan di filtratnya di uapkan dengan rotaevaporaktor pada suhu 60%.

3.5.2 Fraksinasi

Tahap selanjutnya yaitu fraksinasi. Tahap fraksinasi dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Ekstraksi yang diperoleh dalam tahap ekstraksi sebelumnya ditambahkan dengan aquadest dengan perbandingan 1:1 yaitu sebanyak 200ml.
2. Selanjutnya ditambahkan pelarut n-heksan sebanyak 1 liter secara bertahap. Setiap kali dimasukkan sebanyak 200 ml n-heksan (4 x 200ml). Fraksi n-heksan dipisahkan dengan corong pemisah hingga berwarna jingga.
3. Dilanjutkan dengan penambahan pelarut etil asetat sebanyak 1 liter secara bertahap. Setiap kali dimasukkan sebanyak 200 ml etil esetat (4 x 200ml) kemudian dipisahkan, sehingga dari proses fraksinasi diperoleh 3 fraksi yaitu fraksi n-heksan, etil asetat, dan etanol air.

4. Fraksi n-heksan, etil asetat, dan etanol air kemudian masing- masing diuapkan di *rotary evaporator* dilanjutkan di penangas air, sehingga diperoleh fraksi berbentuk minyak untuk pengujian. Masing- masing fraksi akan di uji aktivitas antikanker. Fraksi yang terbukti memiliki aktivitas yang tinggi selanjutnya di fraksinasi menggunakan teknik kromatografi dengan fase silica gel.

3.5.3 Penentuan Senyawa dari Fraksinasi Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn)

Untuk mengetahui kelompok senyawa dalam ekstrak dan fraksinasi herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) dilakukan dengan metode (Kromatografi Lapis Tipis) KLT. Dengan melihat adanya bercak warna yang muncul dari golongan senyawa yang terkandung pada ekstrak dan fraksinasi herba pacar air. Ekstrak dan fraksinasi herba pacar air dilarutkan dalam metanol hingga konsentrasi 1% ambil cairan tekan pada *plate silica* gel F₂₅₄ ukuran *plate silica* (1cm x 6 cm) masukkan *plate silica* kedalam wadah yang berisi cairan diamkan selama 15-20 menit, ambil *plate silica* biarkan sampai mengering. Kemudian semprotkan dengan cairan H₂SO₄ 1% kemudian diletakkan di *hot plate*. Amati perubahan bercak yang terjadi.

3.6 Preparasi dan Panenan Sel

Sel yang inaktif dalam wadah ampul diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan pada suhu 37°C. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung konikal steril yang berisi media kultur RPMI. Suspensi sel disentrifuge 1200 rpm selama 10 menit, kemudian bagian supernatan dibuang, endapan putih yang terdapat di dasar konikal adalah koloni sel. Supernatan dibuang, pellet ditambah 1 ml media penumbuh dengan FBS 10%, diresuspensikan perlahan hingga homogen. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil (3-4 buah), diinkubasikan dalam inkubator suhu 37°C CO₂ 5%. Dilihat 2-3 hari, media diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen (sel telah memenuhi *flask*) dan jumlahnya cukup untuk penelitian.

Setelah jumlah sel cukup, media dibuang dan sel dicuci koloninya dengan cara ditambah larutan PBS dan jika perlu diresuspensikan perlahan, larutan tersebut dibuang. Sel dipindah ke dalam tabung konikal steril dan ditambah PBS sampai volume 10 ml. Sel dicuci dua kali menggunakan media yang sama dan dihitung jumlah selnya menggunakan *haemocytometer* di bawah mikroskop.

Cara perhitungan sel T47D yaitu:

$$\text{sel terhitung/ml} = \frac{\sum \text{sel kamar A} + \sum \text{sel kamar B} + \sum \text{sel kamar c} + \sum \text{sel kamar D}}{10^4}$$

Dengan menggunakan rumus tersebut sel yang digunakan untuk 100 sumuran sebanyak 0,79 ml dan media kultur yang dibutuhkan untuk 100 sumuran 10 ml.

3.7 Uji Apoptosis dengan *Flowcytometry*

Sel sebanyak 5×10^5 sel/sumuran ditanam dalam 6 *well plate* masing-masing sebanyak 1000 μ l MK (media kultur), kemudian diinkubasi hingga sel normal dan siap untuk diberi perlakuan. Sel diberi perlakuan cisplatin, ekstrak metanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi metanol air dengan seri konsentrasi nilai IC_{50} . Untuk kontrol sel ditambah 1000 μ l media kultur tiap dalam sumuran. Setelah perlakuan sel di inkubasi selama 24 jam pada inkubator CO_2 5% dengan suhu 37 $^{\circ}C$. Pada waktu akhir inkubasi, media sel transfer dalam conical yang sama dan selanjutnya dilakukan panen dengan penambahan tripsin 0,25% sebanyak 150 μ l/ sumuran dan diinkubasi selama 3 menit agar sel terlepas dari dasar plate. Media kultur ditambahkan sebanyak 1000 μ l/ml kemudian diresuspensi agar menjadi sel tunggal untuk kemudian ditransfer ke dalam conical yang sama. Sel kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 200rpm selama 5 menit dan supernatan dibuang. Palet ditambahkan PBS sebanyak 10 μ l dan dipindahkan ke dalam cryotube lalu disentrifuge kembali dengan kecepatan 500rpm selama 5

menit. Kemudian supernatan dibuang dan ditambahkan dengan reagen annexin V dan PI (propidium iodida) lalu dibaca dengan menggunakan *flowcytometry*.

3.8 Uji Sitotoksik dengan Metode MTT

Sel sebanyak 1×10^4 sel/sumuran ditanam dalam 96 *well plate* masing-masing sebanyak 100 μ g media kultur, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam media dibuang dan dicuci dengan PBS, dimasukkan seri konsentrasi ekstrak metanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi metanol air herba pacar air ke dalam sumuran kemudian diinkubasi selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, larutan dalam plate dibuang dan dicuci dengan PBS 1x kemudian ditambahkan reagen MTT 100 μ g. Sel yang telah diberi MTT diinkubasi selama 2-4 jam dalam inkubator (sampai terbentuk garam formazan). Setelah garam formazan terbentuk, ditambahkan *stopper* SDS 10% dalam 0,1N HCl kemudian diinkubasi di tempat gelap selama semalam. Setelah itu dilakukan pembacaan dengan menggunakan *ELISA reader*. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu.

3.9 Uji Antiproliferasi dengan Tehnik *Doubling Time*

Doubling time merupakan waktu yang diperlukan oleh sel untuk menggandakan dirinya menjadi dua kali lipat. Untuk preparasi dan panen sel sama seperti uji sitotoksik, hanya saja sel yang digunakan sejumlah 5×10^3 sel/ sumuran diinkubasi dalam 96 *well* dengan konsentrasi nilai $\frac{1}{2}$ IC₅₀ dan dilakukan pengamatan dan inkubasi pada 0 jam, 24 jam, 48 jam dan 72 jam dengan cara menghitung jumlah sel yang hidup. Pada masa akhir inkubasi, media dibuang dan diberi MTT 100 μ l tiap sumuran diinkubasi kembali selama 24 jam. Kemudian diberi reagen *stopper* SDS 10% tutup semalaman. Setelah itu pembacaan menggunakan *ELISA reader*.

3.10 Variabel Penelitian

3.10.1 Variabel Independen

Variabel independen adalah variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab terhadap variabel dependen (Sugiyono, 2013). Variabel independen dalam penelitian ini yaitu herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn).

- a. Untuk ekstrak metanol, fraksi metanol-air herba pacar air
 - Kelompok I : Konsentrasi Ekstrak, Fraksi Herba Pacar Air 1000 $\mu\text{g/ml}$
 - Kelompok II : Konsentrasi Ekstrak, Fraksi Herba Pacar Air 500 $\mu\text{g/ml}$
 - Kelompok III : Konsentrasi Ekstrak, Fraksi Herba Pacar Air 250 $\mu\text{g/ml}$
 - Kelompok IV : Konsentrasi Ekstrak, Fraksi Herba Pacar Air 125 $\mu\text{g/ml}$
- b. Untuk fraksi etil asetat herba pacar air
 - Kelompok I : Konsentrasi fraksi etil asetat 200 $\mu\text{g/ml}$
 - Kelompok II : Konsentrasi fraksi etil asetat 100 $\mu\text{g/ml}$
 - Kelompok III : Konsentrasi fraksi etil asetat 50 $\mu\text{g/ml}$
 - Kelompok IV : Konsentrasi fraksi etil asetat 25 $\mu\text{g/ml}$
 - Kelompok V : Konsentrasi fraksi etil asetat 12,5 $\mu\text{g/ml}$
- c. Untuk fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan herba pacar air
 - Kelompok I : Konsentrasi fraksi n-heksan 200 $\mu\text{g/ml}$
 - Kelompok II : Konsentrasi fraksi n-heksan 100 $\mu\text{g/ml}$
 - Kelompok III : Konsentrasi fraksi n-heksan 50 $\mu\text{g/ml}$
 - Kelompok IV : Konsentrasi fraksi n-heksan 25 $\mu\text{g/ml}$
 - Kelompok V : Konsentrasi fraksi n-heksan 12,5 $\mu\text{g/ml}$
- d. Untuk kontrol positif digunakan *Cisplatin*
 - Kelompok I : Konsentrasi *cisplatin* 100 $\mu\text{g/ml}$
 - Kelompok II : Konsentrasi *cisplatin* 50 $\mu\text{g/ml}$
 - Kelompok III : Konsentrasi *cisplatin* 25 $\mu\text{g/ml}$
 - Kelompok IV : Konsentrasi *cisplatin* 12,5 $\mu\text{g/ml}$

3.10.2 Variabel Dependen

Variabel dependen adalah variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat dari variabel independen (Sugiono, 2013). Variabel dependen pada penelitian ini adalah apoptosis, sitotoksik dan antiproliferasi.

3.11 Definisi Operasional

Tabel 3.11
Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur	Alat Ukur	Cara Ukur	Skala Ukur
1	Pengukuran Jumlah sel apoptosis	Jumlah sel yang mengalami apoptosis	Jumlah apoptosis	<i>Flowcytometry</i>	Jumlah sel yang apoptosis diukur menggunakan flowcytometry dengan pewarnaan annexin V dan PI	Nominal
2.	Aktivitas sitotoksik	Aktivitas sitotoksik dinyatakan dengan nilai IC ₅₀	IC ₅₀ (µg/ml)	Analisis excel	IC ₅₀ dihitung berdasarkan nilai viabilitas sel	Nominal
3.	Penghambatan proliferasi	Waktu yang diperlukan sel untuk berfloriferasi	Doubling time (waktu)	Analisis excel	Persamaan regresi linear antara log jumlah sel hidup dengan waktu inkubasi	Nominal

3.12 Analisis Data

3.12.1 Analisis Uji Sitotoksik

Analisis hasil uji sitotoksik diperoleh dari hasil pembacaan absorbansi dengan menggunakan ELISA reader pada setiap sumuran yang kemudian dikonversi dalam persen sel hidup (viabilitas sel) dengan menggunakan microsoft excell 2007 dengan perhitungan sel sebagai berikut:

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

Pada uji sitotoksik, persentase sel hidup digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} merupakan konsentrasi yang dapat menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel sebanyak 50% dari populasi sel. Dalam menentukan nilai IC_{50} menggunakan analisis probit dengan *software* SPSS versi 17.0 *for windows*. Data viabilitas sel ditampilkan dalam bentuk grafik garis.

3.12.2 Analisis Uji Apoptosis

Analisis apoptosis diperoleh dari hasil pembacaan dengan menggunakan *flowcytometry* yang dianalisis menggunakan microsoft excell 2007. Kuadran R1 menunjukkan sel yang hidup, R2 menunjukkan sel early apoptosis, R3 menunjukkan late apoptosis dan R4 menunjukkan nekrosis. Persentase kematian sel meliputi early apoptosis, late apoptosis, dan nekrosis yang ditampilkan dalam bentuk grafik garis.

3.12.3 Analisis Uji Antiproliferasi

Data yang didapat dianalisis dengan uji korelasi antara waktu pengamatan versus jumlah sel yang hidup untuk menentukan persamaan garis regresi.

3.12.4 Analisis Statistik

Analisis statistik menggunakan uji Anova untuk mengetahui perbedaan antar kelompok bahan uji herba pacar air yang akan dilanjutkan dengan uji post hoc untuk mengetahui kelompok bahan uji mana yang paling berpengaruh dengan *software* SPSS versi 17.0 *for windows*.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental secara *in vitro* untuk mengetahui pengaruh ekstrak dan fraksi herba pacar air terhadap Sitotoksik, Apoptosis dan Antiproliferasi pada Sel T47D. Sebagai kontrol sel digunakan Sel T47D yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, dan kontrol positif menggunakan Cisplatin. Proses Ekstraksi, Fraksinasi dan Uji KLT menggunakan reagen dilakukan di Laboratorium jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya Palembang. Sedangkan uji aktivitas antikanker ekstrak dan fraksi aktif herba pacar air terhadap sel T47D, pengukuran jumlah sel Apoptosis dan Antiproliferasi dilakukan di Laboratorium Parasitologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

4.1 Ekstrak dan Fraksinasi Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn)

Pada penelitian ini digunakan herba pacar air. Sampel herba pacar air yang didapat berbentuk serbuk. Sampel diekstraksi secara maserasi dengan cara direndam menggunakan 1 liter pelarut metanol selama 2 x 24 jam. Ekstrak kemudian disaring dan diupkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* sampai mengental dan didapat hasil sejumlah 39 gram. Sebanyak 20 gram ekstrak kental herba pacar air dipisah untuk dilakukan uji aktivitas antikanker menggunakan sel T47D, sisanya sebesar 19 gram untuk proses fraksinasi.

Ekstrak kental herba pacar air di fraksinasi dengan metode fraksi cair (FCC) menggunakan 3 jenis pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda, yaitu n-heksan (non polar), etil asetat (semi polar) dan metanol air (polar), dari fraksinasi tersebut didapatkan berat masing- masing fraksinasi sebagai berikut:

Tabel 4.1 Hasil fraksinasi herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn)

Pelarut	Berat (gram)	Persentase
Fraksi n-heksan	5,6	29,5%
Fraksi etil asetat	3,8	20%
Fraksi metanol air	9,6	50,5%
Total	19	100%

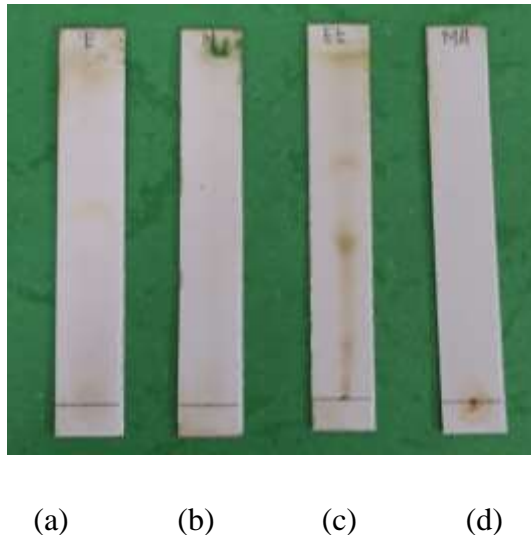
Dari tabel 4.1 dapat dilihat bahwa fraksinasi sebanyak 19 gram ekstrak herba pacar air menghasilkan fraksi n-heksan sebanyak 5,6 gram (29,5%), fraksi etil asetat sebanyak 3,8 gram (20%) dan fraksi metanol air sebanyak 9,6 gram (50,5%). Kemudian ekstrak, fraksi n-heksan, etil asetat dan metanol air yang didapat diuji aktivitas antikanker terhadap sel T47D dengan metode MTT Assay.

Pada penelitian ini digunakan metode ekstraksi maserasi karena metode ini memiliki banyak keuntungan dibandingkan dengan metode lainnya. Metode ekstraksi maserasi adalah proses pengekstrakan dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokkan atau pengadukan pada temperatur ruang kamar. Keuntungan metode ini adalah peralatan dan prosedur yang digunakan sederhana, kandungan senyawa yang disaring tidak rusak (karena maserasi merupakan proses ekstraksi dingin) dan memungkinkan sekstraksi senyawa berjalan dengan maksimal (karena dapat diatur lamanya perendaman yang diinginkan) (Depkes RI, 2000). Pada ekstraksi, pelarut yang digunakan adalah metanol. Pemilihan pelarut ini adalah berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya.

4.2 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pada penentuan golongan senyawa dapat ditentukan dengan menggunakan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Ekstrak dan fraksinasi herba pacar air dilarutkan dalam metanol hingga konsentrasi 1% ambil cairan tekan pada *plate silica* gel F₂₅₄ ukuran *plate silica* (1cm x 6 cm) masukkan *plate silica* kedalam wadah yang berisi cairan diamkan selama 15-20 menit, ambil *plate silica* biarkan

sampai mengering. Kemudian semprotkan dengan cairan H_2SO_4 1% kemudian diletakkan di *hot plate*. Amati perubahan bercak yang terjadi.



Gambar 4.1 Hasil uji Senyawa alkaloid, Flavonoid, terpenoid dan Tanin: (a) ekstrak (b) Fraksi N-Heksan (c) Fraksi Etil Asetat (d) Fraksi Metanol Air

Dari gambar 4.1 dapat dilihat bahwa dari keempat sampel ekstrak metanol memiliki senyawa flavonoid dan tanin, fraksi n-heksan memiliki senyawa terpenoid, fraksi etil asetat memiliki senyawa alkaloid dan flavonoid, dan fraksi metanol air memiliki senyawa tanin.

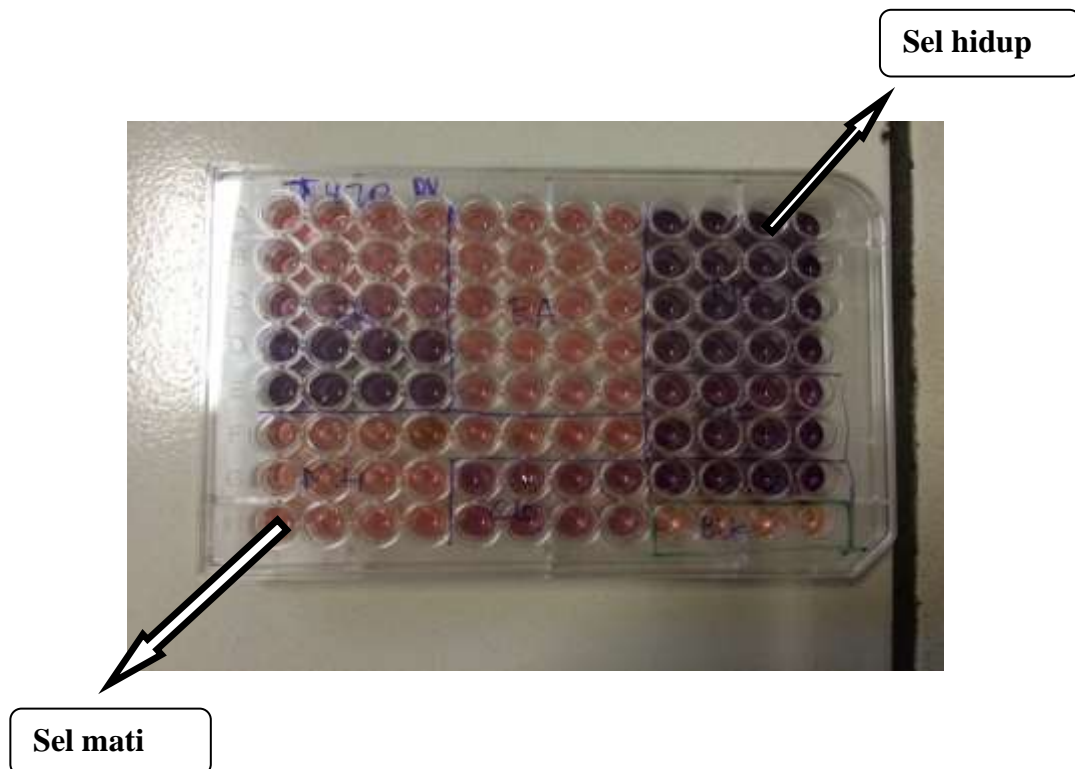
Tabel 4.2 Hasil uji KLT ekstrak dan fraksinasi herba pacar air

Bahan Uji	Warna Bercak	Golongan Senyawa
Ekstrak Metanol	Kuning tua, Coklat	Flavonoid, Tanin
Fraksi N-Heksan	Ungu	Terpenoid
Fraksi Etil Asetat	Orange, Kuning Tua	Alkaloid, Flavonoid
Fraksi Metanol Air	Coklat	Tanin

Dari tabel 4.2 ekstrak metanol memiliki golongan senyawa flavonoid dan tanin, fraksi n-heksan golongan senyawa terpenoid, fraksi etil asetat alkaloid dan flavonoid dan fraksi metanol air golongan senyawa tanin. Menurut penelitian Rahmawati, dkk (2013) ekstrak herba pacar air memiliki golongan senyawa flavonoid dan steroid.

4.3 Aktivitas Antikanker Ekstrak dan Fraksinasi Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn) dengan Metode MTT Assay

Penelitian aktivitas antikanker ekstrak dan fraksi herba pacar air dilakukan dengan metode MTT Assay (MTA). Ekstrak dan fraksi herba pacar air diuji aktivitas antikankernya terhadap sel T47D dengan konsentrasi 1000, 500, 250, 125 $\mu\text{g/ml}$ (untuk ekstrak dan fraksi metanol herba pacar air), konsentrasi 200, 100, 50, 25, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ (untuk fraksi etil asetat dan n-heksan). Untuk kontrol positif digunakan cisplatin dalam 4 variasi konsentrasi uji yaitu 100, 50, 25, dan 12,5. Untuk kontrol negatif digunakan kontrol media dan kontrol sel. Kepadatan sel T47D yang ditanam pada mikroplate adalah 1×10^4 sel/well.



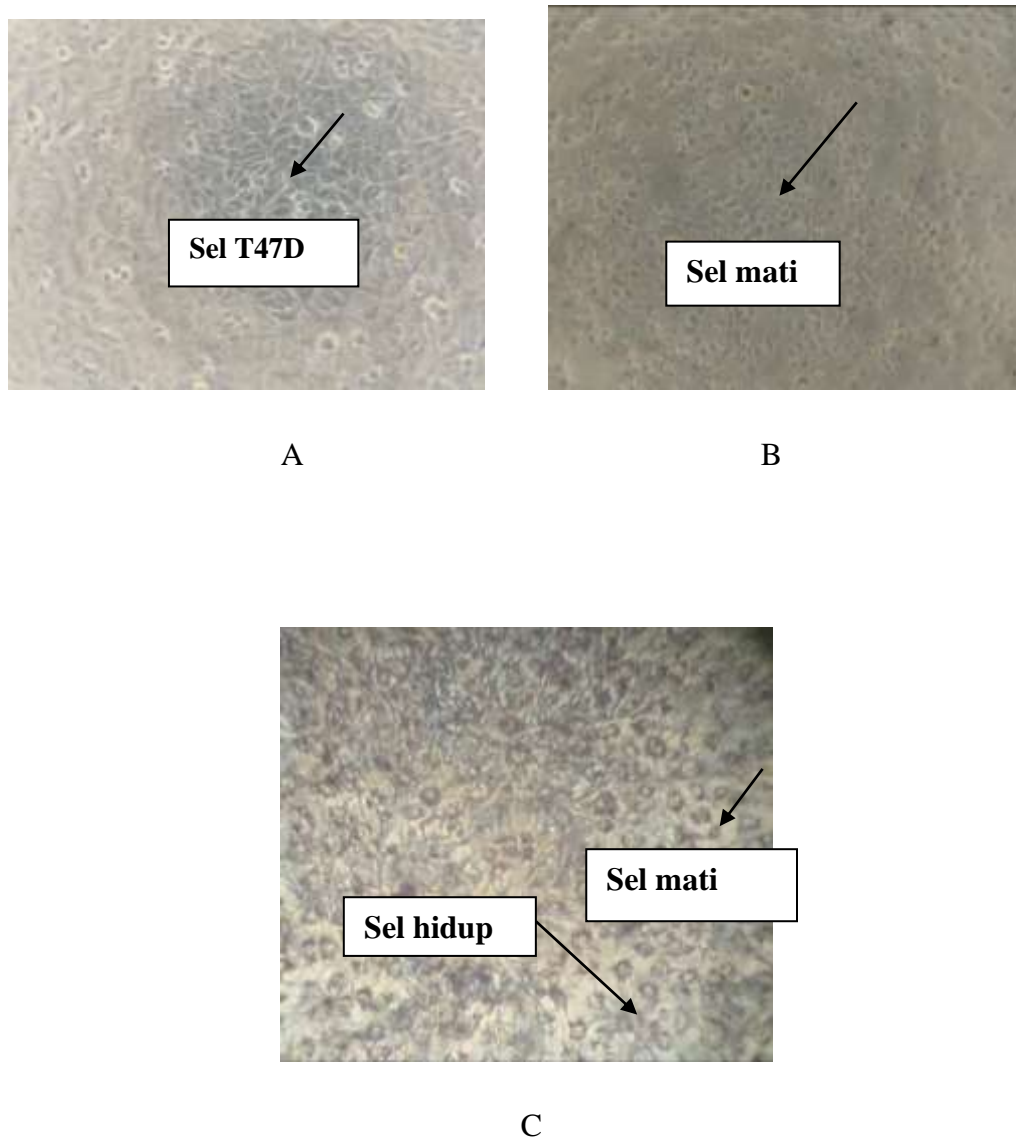
Gambar 4.2 Mikroplate Hasil perlakuan setelah diberi reagen MTT dan SDS 10% di inkubasi selama 24 jam pada suhu kamar

MTT Assay merupakan metode pengujian aktivitas antikanker. Metode ini menggunakan reagen berupa garam tetrazolium, yaitu 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida. Prinsip dari metode ini adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida menjadi kristal formazan yang berwarna ungu dan tidak larut dalam air (Chanda, Sumitra and Krupal Nagani, 2013; CCRC UGM, 2012), reaksi ini terjadi akibat aktivitas metabolisme sel aktif yang melibatkan koenzim Nikotinamid Adenin Dinukleotida (NAD^+ dan NADH). Penambahan *reagen stopper* (bersifat absorbansinya menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 595nm. Intensitas warna ungu yang terbentuk proposional dengan jumlah sel yang hidup). Sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka jumlah sel yang hidup semakin banyak (CCRC UGM, 2012).

Metode MTT Assay dipilih untuk uji aktivitas antikanker secara *in vitro* karena metode ini mampu mengevaluasi aktivitas antikanker secara kuantitatif melalui efek penghambatan pertumbuhan dan perkembangan sel kanker oleh senyawa uji. Selain itu, metode ini memberikan hasil yang akurat dengan waktu pengujian dan pengukuran yang singkat. Pengerjaannya juga mudah, reagen yang digunakan aman tanpa adanya substansi radioaktif, dan hasil pengujian dapat langsung memperlihatkan hubungan antara jumlah sel aktif dengan nilai absorbansi yang diperoleh sehingga dapat dihitung harga IC_{50} nya (ATCC, 2001). Nilai IC_{50} menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai agen sitotoksik. Semakin besar nilai IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik.

Pada penelitian ini sel yang di uji adalah sel T47D karena merupakan jenis sel kanker yang banyak diderita wanita diseluruh dunia. Sel ini sering digunakan dalam penelitian karena perkembangannya mudah dikontrol dan ditangani (Djajenegara, 2009). Sel T47D ditumbuhkan dalam media kultur DMEM-serum. Sel yang telah di *plating* kedalam *mikroplate 96 well* kemudian diinkubasi selama 24 jam lalu diberi perlakuan dengan ekstrak dan fraksi herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) serta cisplatin. Sel yang hidup setelah perlakuan akan berbentuk seperti epitel gepeng dan saling berdempetan serta menempel didasar

sumuran *microplate*. Sedangkan sel T47D yang mati akan berwarna bulat dan cenderung terpisah.



Gambar 4.3. Morfologi sel T47D (a) Sebelum mendapatkan perlakuan sel menempel pada plate dan berbentuk daun (b) setelah mendapat perlakuan sel mengapung dan terpisah (c) setelah pemberian MTT sel T47D yang hidup tampak berserabut dan dan sel T47D yang mati tampak bulat dan pecah.

Sedangkan sebagai kontrol positif digunakan cisplatin. Cisplatin merupakan *first line drugs* kemoterapi yang direkomendasikan oleh *The National*

Cancer Instituted untuk semua wanita yang menderita kanker (Satriotomo dkk, 2011). Aktivitas biologis cisplatin yaitu dapat bereaksi pada banyak komponen seluler, diantaranya RNA, protein, DNA, fosfolipid dan fosfatidilserin pada membran, merusak sitoskeleton dan mempengaruhi polimeriserin aktin. Target penting cisplatin pada mekanisme seluler adalah DNA nukleus. Cisplatin dilaporkan mampu menginduksi apoptosis melalui pelepasan sitokrom c dengan mengaktifasi caspase 8. Kombinasi antara cisplatin dengan Bcl-2 antisense pada sel MCF7 P53(+) dan MCF7 P53(-) dapat memberikan efek sitotoksik yang lebih tinggi dengan mengukur parameter viabilitas sel, apoptosis dan pelepasan sitokrom c dari pada perlakuan tunggalnya (Satriotomo dkk, 2011).

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antikanker ekstrak dan fraksi herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) terhadap sel T47D didapat hasil rata-rata persen viabilitas. Hasil yang diperoleh terdapat pada tabel 3.4 menunjukkan suatu pola bahwa besarnya viabilitas sel berbanding terbalik dengan besarnya konsentrasi perlakuan. Semakin tinggi konsentrasi perlakuan maka akan semakin rendah viabilitas sel yang dihasilkan. Viabilitas sel terendah terdapat pada fraksi etil asetat dengan konsentrasi 200 µg/ml yaitu 2,35%, dan pada fraksi n-heksan dengan konsentrasi 200 µg/ml yaitu 3,95%. Sedangkan pada kelompok kontrol (cisplatin) memberikan nilai viabilitas yang sangat jauh. Nilai viabilitas cisplatin pada konsentrasi 100 µg/ml yaitu 11,97%.

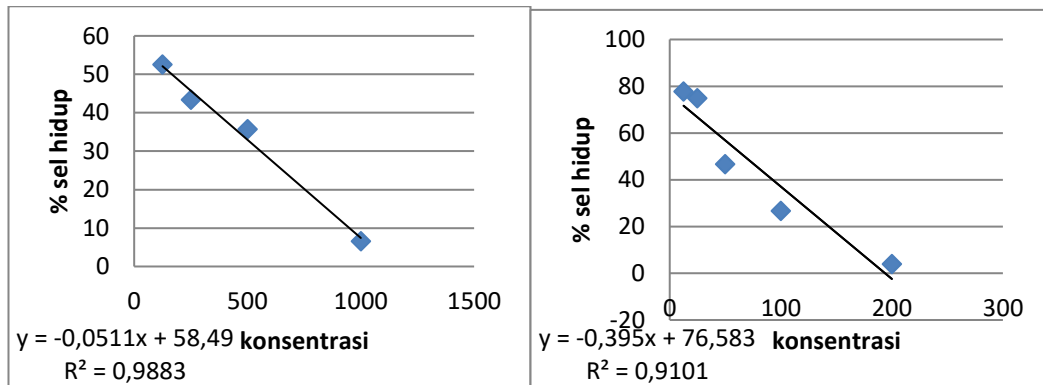
Mekanisme antikanker cisplatin juga didukung kemampuannya berikatan dengan DNA mitokondria yang menyebabkan ketidak mampuan mitokondria melakukan perbaikan nukleotida DNA-*adduct* pada nukleus. Penghambatan cisplatin pada sel kanker juga terjadi dengan adanya pemendekan dan degradasi telomerase melalui penghambatan aktivitas telomerase (Jamieson & Lippard, 1999).

Tabel 4.3 Nilai absorbansi, nilai rata-rata persentase viabilitas dan nilai IC₅₀ Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn)

Konsentrasi Bahan Uji	Rata-rata Absorbansi	Rata-rata Viabilitas sel (%)	Nilai IC ₅₀ (µg/ml)
Ekstrak Metanol	125	0,72	52,53062168
	250	0,621	43,40189508
	500	0,538	35,70603189
	1000	0,223	6,58654972
Fraksi N-Heksan	12,5	0,993	77,76750636
	25	0,961	74,87866882
	50	0,656	46,61428241
	100	0,439	26,62352669
	200	0,194	3,95192974
Fraksi Etil Asetat	12,5	0,815	61,31268777
	25	0,709	51,53686157
	50	0,556	37,41622371
	100	0,354	18,69655651
	200	0,177	2,357291426
Fraksi Metanol Air	125	0,776	57,70741853
	250	0,73	53,45504969
	500	0,524	34,43494338
	1000	0,335	16,940
Cisplatin	12,5	0,652	46,29073261
	25	0,540	35,96024966
	50	0,357	18,99699561
	100	0,281	11,97134273

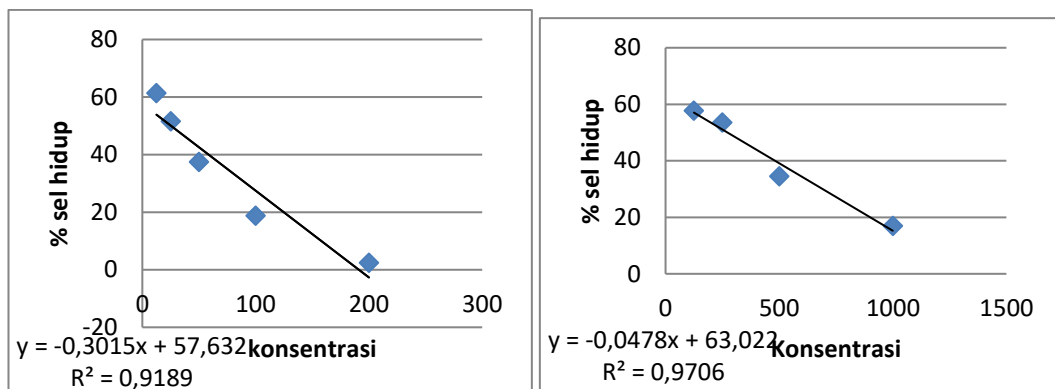
Dari tabel 4.3 diketahui bahwa ekstrak dan fraksi herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn) mempunyai aktivitas anti kanker cukup aktif terhadap sel T47D. Klasifikasi aktivitas sitotoksik ekstrak terhadap sel kanker digolongkan kategori aktif jika memiliki nilai IC₅₀ < 30µg/ml, kategori moderate aktif jika nilai IC₅₀ ≥30 µg/ml dan <100 µg/ml dan kategori tidak aktif jika nilai IC₅₀ >100 µg/ml (*National Cancer Institute (NCI).*, 2001). Dapat dilihat dari tabel diatas nilai IC₅₀ tertinggi diperoleh oleh fraksi metanol herba pacar air yaitu 277,02µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi metanol mempunyai aktifitas yang cukup rendah dimana sel baru dapat dihambat 50% pada konsentrasi 277,02µg/ml. Sedangkan nilai IC₅₀ terendah terdapat pada fraksi etil asetat dengan nilai IC₅₀ 25,34 µg/ml. Menurut penelitian Rahmawati, dkk (2013) Ekstrak n-heksan memiliki harga IC₅₀ 97,493 µg/ml sehingga dikatakan moderate aktif terhadap sel kanker payudara T47D. Sedangkan ekstrak metanol memiliki harga IC₅₀ 295,359 µg/ml. Dapat disimpulkan bahwa fraksi Etil Asetat lebih aktif

dibandingkan dengan ekstrak, fraksi n- heksan dan fraksi metanol air sebagai senyawa antikanker pada sel T47D. Hal ini menunjukkan bahwa keberadaan senyawa aktif yang mempunyai efek sitotoksik terdapat pada fraksi etil asetat. Pada kelompok kontrol positif (Cisplatin) nilai IC_{50} yang dihasilkan yaitu 11,81 $\mu\text{g/ml}$.



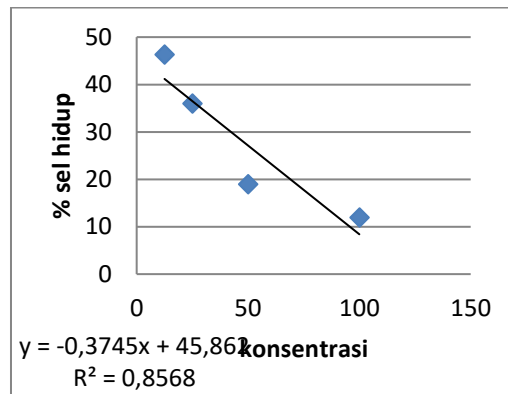
(a)

(b)



(c)

(d)



(e)

Gambar 4.4 Grafik ekstrak dan fraksi herba pacar air terhadap sel T47D (a) Ekstrak metanol; (b) Fraksi N-Heksan; (c) Fraksi Etil Asetat; (d) Fraksi Metanol Air; dan (e) Cisplatin

Dari gambar 4.4 grafik diatas dapat dilihat bahwa semakin tinggi konsentrasi yang di uji semakin banyak sel yang mati dan sebaliknya semakin rendah konsentrasi yang di uji semakin banyak pula sel yang hidup .

4.4 Uji Apoptosis dengan *Flowcytometry*

Aktivitas antikanker dari ekstrak dan fraksi herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) dalam menurunkan viabilitas sel T47D disebabkan oleh meningkatnya mekanisme apoptosis maupun nekrosis sel. Hal ini dibuktikan melalui pengukuran persen apoptosis yang dilakukan dengan metode *flowcytometry* terhadap ekstrak dan fraksi herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.). Kontrol negatif yang digunakan adalah sel T47D dan kontrol positif adalah cisplatin dengan konsentrasi nilai IC_{50} masing- masing senyawa.

Pengamatan dengan *flowcytometry* menggunakan sel 5×10^5 / sumuran ditanam dalam 6 sumuran masing- masing sebanyak 2000 μ l MK (Media Kultur), lalu di inkubasi 24 jam dan diberi perlakuan dengan konsentrasi ekstrak metanol 166,47 μ g/ml, fraksi n-heksan 67,29 μ g/ml, fraksi etil asetat 25,35 μ g/ml, fraksi metanol air 277,02 μ g/ml dan cisplatin 11, 81 μ g/ml.

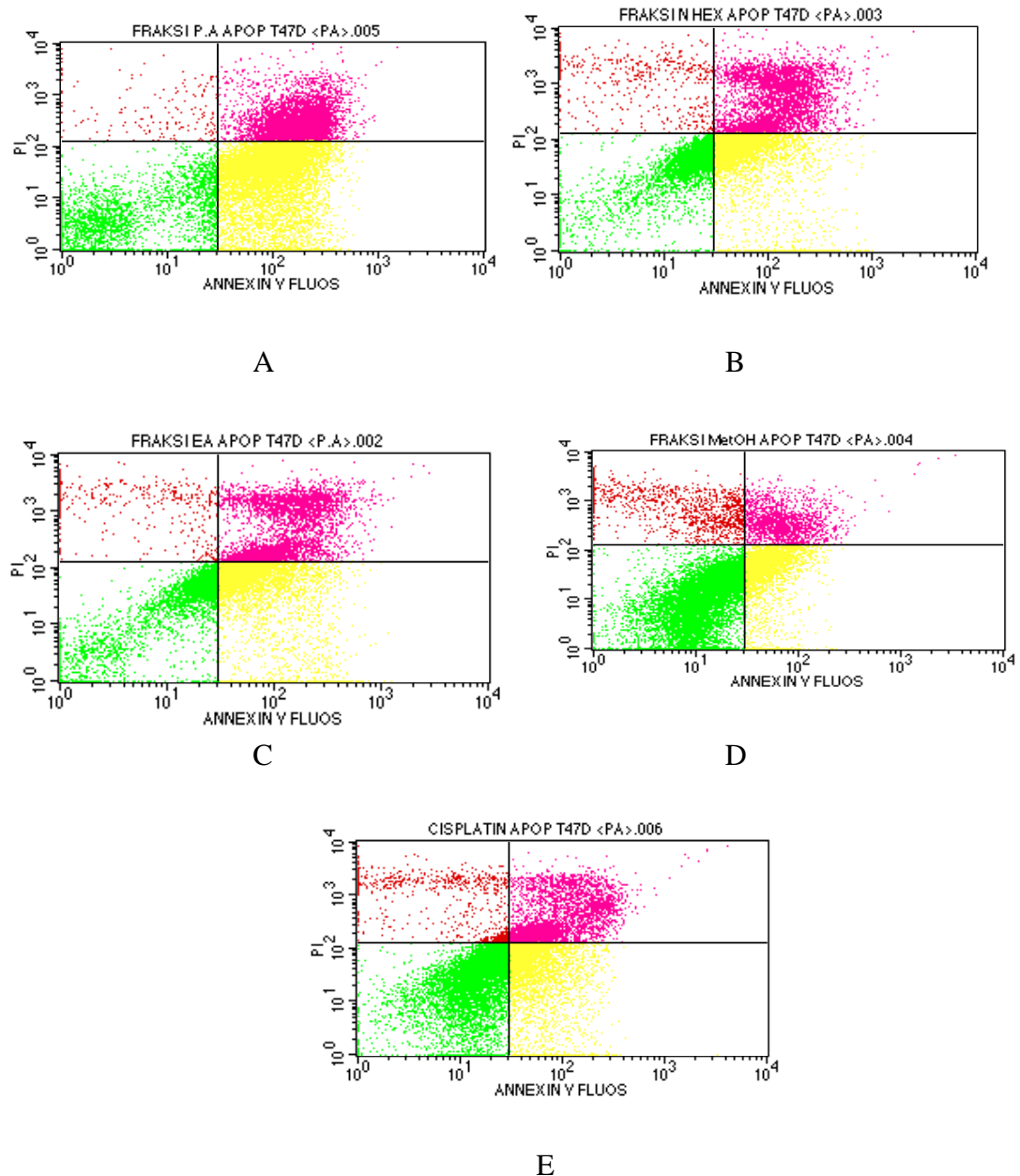
Dalam pembacaan dengan *flowcytometry* digunakan reagen Annexin V dan PI (Propidium Iodidan) untuk membaca jumlah sel hidup, jumlah sel yang mengalami apoptosis dan jumlah sel yang mengalami nekrosis. Data hasil pengukuran *flowcytometry* dapat dilihat pada tabel 4.4 berikut.

Tabel 4.4 Apoptosis dan Nekrosis Ekstrak dan Fraksi Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn.) dengan menggunakan *Flowcytometry*

Bahan Uji	Sel Hidup (%)	Sel Apoptosis Awal (%)	Sel Apoptosis Akhir (%)	Total Apoptosis (%)	Sel Nekrosis
Ekstrak Metanol	41,01	24,43	29,22	53,65	5,35
Fraksi Etil Asetat	22,13	26,85	48,91	75,76	2,12
Fraksi n-heksan	26,21	23,39	47,89	71,26	2,51
Fraksi Metanol air	59,44	9,32	24,82	34,14	6,42
Cisplatin	16,18	33,11	49,81	82,92	0,90

Dari tabel 4.4 menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi herba pacar air memiliki aktifitas apoptosis yang cukup baik. Hal ini terlihat bahwa persen apoptosis pada fraksi etil asetat (75,76%). Sedangkan pada cisplatin menunjukkan persen apoptosis sebesar (82,92%). Disini dapat dilihat bahwa efektifitas fraksi etil asetat herba pacar air dalam meningkatkan apoptosis terhadap sel T47D hampir menyertai kemampuan kontrol positif (cisplatin) . Sementara itu persen nekrosis tertinggi terdapat pada fraksi metanol air yaitu 6,42 %.

Pofil kematian sel diamati dengan menggunakan *flowcytometry* dengan *double labelling* berupa annexin V dan propodium iodidan (PI) untuk membedakan antara apoptosis dan nekrosis jika annexin ⁺, berarti adanya apoptosis, sedangkan jika PI⁺ berarti ada nekrosis.



Gambar 4.4 Hasil kuadran *flowcytometry*; ekstrak metanol; fraksi etil asetat; fraksi n-heksan; fraksi metanol air; dan cisplatin. Ket: warna **hijau** (kuadran LL/low-left) menunjukkan jumlah sel yang masih hidup; warna **merah** (kuadran UL/up-left) menunjukkan jumlah sel nekrosis; warna **kuning** (kuadran LR/low-right) menunjukkan jumlah sel tahap awal apoptosis; warna **pink** (kuadran UR/up-right) menunjukkan jumlah sel tahap akhir apoptosis.

Pada gambar 4.4 menunjukkan hasil kuadran *flowcytometry*. Sel pada tahap awal apoptosis mempunyai membran yang utuh sehingga PI tidak dapat

masuk ke dalam sel dan berikatan dengan DNA (Annexin V+, PI-) (warna kuning). Sementara itu dalam kondisi *late* apoptosis terjadi kerusakan membran sel sehingga PI berdifusi ke dalam sel dan mewarnai DNA (Annexin V+,PI+). Pada kondisi nekrosis terjadi kerusakan membran yang tidak disertai dengan translokasi *phosphatidylserine* (PS) ke permukaan membran. Akibatnya sel hanya mampu terdeteksi oleh PI (Annexin -, PI+) (warna merah). Metode Annexin V merupakan metode deteksi apoptosis yang sudah digunakan secara luas untuk mendeteksi apoptosis dengan *flowcytometry*. Annexin V merupakan anggota dari keluarga protein pengikat fosfolipid yang mampu mengikat kuat fosfolipid yang bermuatan negatif, fosfatidilserine pada membran sel. Annexin V yang terlabel dengan *fluorochrome* (FITC) mampu mendeteksi adanya *phosphatidylserine* (PS) pada permukaan membran sitoplasma sel yang telah mati melalui pembentukan ikatan kompleks yang akan mempertahankan afinitas tinggi pengikatan Annexin V terhadap fosfatidilserine. Penggunaan pewarna propidium iodidat (PI) mampu digunakan untuk membedakan kematian sel akibat apoptosis maupun nekrosis.

Pada penelitian ini persentase apoptosis tertinggi terdapat pada fraksi etil asetat, belum ada publikasi mengenai efek apoptosis dari fraksi etil asetat. Potensi fraksi etil asetat dalam memacu apoptosis sel kemungkinan disebabkan oleh senyawa aktif yang terkandung dalam fraksi yaitu senyawa flavonoid dan alkaloid. Flavonoid memiliki bahan preventif dalam pengobatan antikanker melalui efek dan sinyal transduksi dalam proliferasi sel.

Senyawa flavonoid telah diketahui dapat menginduksi terjadinya apoptosis. Mekanisme flavonoid dalam menginduksi apoptosis adalah melalui penghambatan aktivitas DNA topoisomerase I/II, modulasi signalling pathway, penurunan ekspresi gen Bcl-2 dan Bcl-XL, peningkatan ekspresi gen Bax dan Bak, serta aktivitas endonuklease (Ren *et al.*, 2003). Topoisomerase merupakan suatu enzim yang berfungsi memotong DNA yang berilitan ketat akibat pembukaan double strand DNA oleh enzim helikase, memutar balik dan kemudian menyambungkan lagi. Enzim tersebut bekerja pada saat perpanjangan replikasi DNA (Sismindari, 2002). Jika terjadi penghambatan terhadap aktivitas topoisomerase, akan terjadi stabilisasi kompleks topoisomerase-DNA yang

permanen. Kerusakan DNA akan mengaktifasi p53 dan memacu apoptosis (Beck *et al.*,2001).

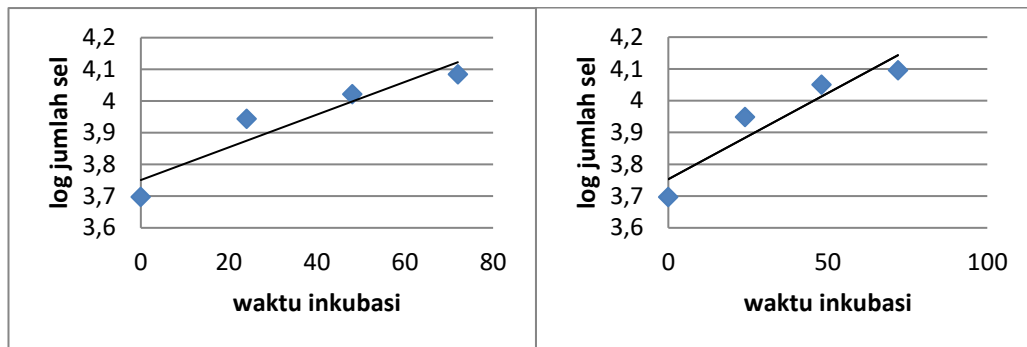
4.5 Uji Antiproliferasi *Doubling Time*

Cell cyscle progression merupakan parameter utama dalam mengukur sifat proliferasi suatu sel kanker. Penghambatan *cell cycle progression* dilakukan dengan uji *doubling time* menggunakan metode MTT. *Doubling time* adalah waktu yang diperlukan oleh sel untuk menggandakan dirinya menjadi dua kali lipat. Teknik pengujian ini dilakukan untuk mengetahui efek dari bahan uji terhadap kinetika proliferasi sel secara *In Vitro*.

Tabel 4.5 Hasil Absorbansi pada perlakuan 0, 24,48 dan 72 jam.

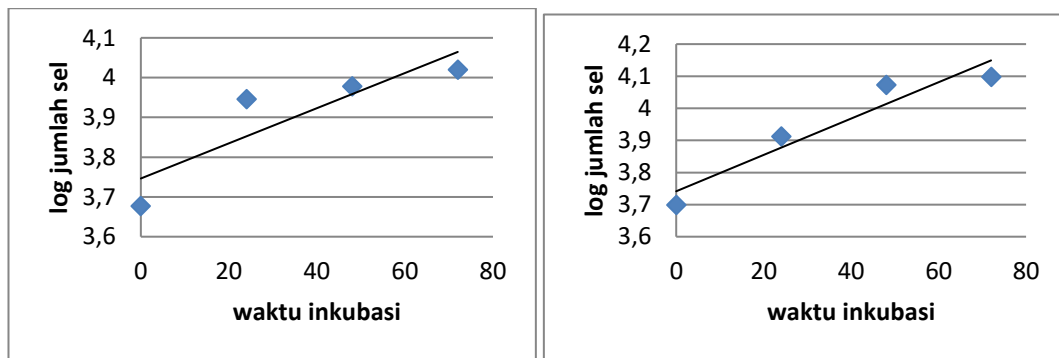
Bahan Uji	Jam	Rata- rata Absorbansi	Rata-rata viabilitas sel(%)	Jumlah Sel
Ekstrak Metanol	0	0,319	99,6052631	4980,263158
	24	0,525	90,1351351	8781,941028
	48	0,618	73,5944700	10515,56793
	72	0,730	70,1101405	12137,6428
Fraksi N-Heksan	0	0,319	99,4736842	4973,684211
	24	0,530	91,2162162	8887,271655
	48	0,654	78,6175115	11233,28672
	72	0,747	72,0850740	12479,54823
Fraksi Etil Asetat	0	0,308	95,1315789	4756,578947
	24	0,527	90,6756756	8834,606342
	48	0,567	66,5898617	9514,712373
	72	0,645	60,5013292	10474,14138
Fraksi Metanol Air	0	0,320	99,8684210	4993,421053
	24	0,494	83,8513513	8169,706759
	48	0,685	82,8110599	11832,48314
	72	0,749	72,3509305	12525,57397
Cisplatin	0	0,299	91,5789473	4578,947368
	24	0,530	91,2162162	8887,271655
	48	0,585	69,0783410	9870,279479
	72	0,658	61,9065704	10717,42024

Berdasarkan hasil absorbansi yang didapat pada tabel 4.5 , maka dapat dilihat pada grafik antara log sel hidup dan lama inkubasi, kemudian ditentukan perbedaan waktu untuk mencapai jumlah dua kali sel awal.



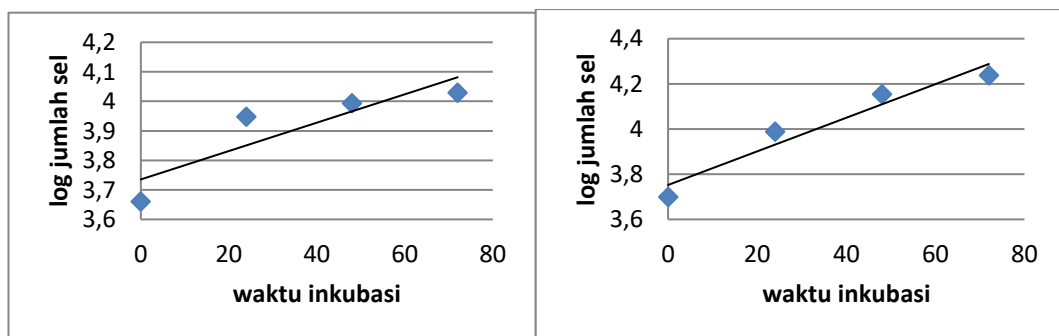
(a)

(b)



(c)

(d)



(e)

(f)

Gambar 4.5 Persamaan garis waktu inkubasi dengan log jumlah sel (a) Ekstrak metanol;(b) Fraksi n-heksan;(c)Fraksi etil asetat;(d) Fraksi metanol air;(e)Cisplatin; dan (f) Kontrol sel

Tabel 4.6 Hasil *Doubling Time*

Bahan Uji	Persamaan garis waktu inkubasi dengan log jumlah sel	Y	Doubling Time (jam)
-----------	--	---	---------------------

Ekstrak Metanol	$y=0,005x+3,750$	3,943591	38,72
Fraksi N-Heksan	$y=0,005x+3,753$	3,948768	39,15
Fraksi Etil Asetat	$y=0,004x+3,746$	3,946187	50,05
Fraksi Metanol	$y=0,005x+3,741$	3,912206	34,24
Cisplatin	$y=0,004x+3,735$	3,948768	53,44
Kontrol sel	$y=0,007x+3,752$	4	33,77

Berdasarkan tabel 4.6 menunjukkan fraksi etil asetat memiliki *doubling time* 50,05 yang artinya pada jam 50 sel akan membelah diri menjadi dua. Sedangkan kontrol sel membelah menjadi dua di jam ke 33,77. Dari harga *doubling time* diatas diketahui penghambatan bahan uji terhadap kecepatan sel untuk berproflerasi dengan membandingkan harga *doubling time* kontrol dengan nilai *doubling time* sampel.

Hasil penelitian menunjukkan fraksi etil asetat memiliki kemampuan menghambat proflerasi sel T47D berdasarkan variasi waktu terhadap kontrol sel. Dimana terjadi perpanjangan waktu penggandaan sel. Fraksi etil asetat mampu menghambat dimana pertumbuhan sel melalui *cell cycle arrest* sehingga menyebabkan kemampuan proflerasi sel menurun. Penelitian *in vivo* menunjukan bahwa *Flavonoid* pada makanan tertentu memiliki aktivitas anti tumor. Pola hidrosilasi pada cincin Plafon dan Plafonolol seperti luteolin dan quercetin yang mempengaruhi inhibisi aktivitas protein kinase dan antiproflerasi. Flavonolol dan flavon menargetkan sel permukaan enzim transduksi sinyal, seperti tirosin kinase protein dan adesi fokal kinase (AFK), dan proses angiogenesis menjadi sasaran yang menjanjikan sebagai obat anti kanker.

Penelitian yang dilakukan Pan *et al.*, (2002) menyatakan titik kerja flavonoid terletak pada hambatan kerja enzim Cdk-actvating kinase (CAK) sehingga menghambat terbentuknya kompleks Cdk-*cyclin* yang aktif. Flavonoid dapat berkaitan dengan protein kinase pada *ATP-binding site*-nya. Menurut Soeksmanto *et al.*, (2010) *check point* pada G1/S dan G2/M terganggu oleh adanya flavonid yang menghambat transduksi sinyal dari faktor pertumbuhan. Flavonoid mampu menginaktivasi protein-protein yang berperan dalam transduksi

sinyal, misalnya tirosin kinase. Pernyataan–pernyataan tersebut menjelaskan kemungkinan terjadi induksi *cell-cycle arrest* oleh peran flavonoid.

Selain senyawa flavonoid fraksi etil asetat daun pacar mengandung senyawa alkaloid.

4.6 Analisa Uji Statistik

Analisis statistik dilakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan antara bahan uji ekstrak dan fraksi daun pacar.

4.6.1 Uji Normalitas

Sebaran data dalam bentuk skala interval atau rasio, untuk dianalisis dengan uji parametrik maka harus memenuhi salah satu persyaratan yaitu sebaran data berdistribusi normal. Uji normalitas data dilakukan dengan uji *kolmogorof smirnov*, data yang akan diuji adalah nilai persen viabilitas sel masing-masing.

Tabel 4.7 uji normalitas data

Bahan Uji	<i>P value</i>
Ekstrak bahan pacar	0,927
Fraksi N-Heksan	0,999
Fraksi Etil Asetat	0,969
Fraksi metanol air	0,960
Cisplatin	0,988

Berdasarkan hasil tabel 4.7 *p value* > 0,05 maka akan berdistribusi normal. Semua data viabilitas dari ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi metanol air dan cisplatin berdistribusi normal.

4.6.2 Pengaruh Aktivitas Sitotoksik Perbedaan Ekstrak dan fraksi Herba Pacar Air terhadap nilai IC₅₀

Hasil penelitian pada tabel 4.7 menunjukkan semua bahan uji ekstrak dan fraksi daun pacar memiliki aktivitas sitotoksik. Untuk menguji antar kelompok bahan uji *one way anova* dan dilanjutkan dengan uji lanjut *turkey*. Hasil uji anova terlihat pada tabel 4.8

Tabel 4.8 Hasil Uji *oneway* Anova

Bahan uji	Uji Lavene (<i>P value</i>)	Uji Anova (<i>P value</i>)
Ekstrak bahan pacar	0,000	0,005
Fraksi metanol air		
Fraksi Etil Asetat		
Fraksi N-heksan	0,582	0,029
Cisplatin		

Dari tabel 4.8 menunjukkan bahwa hasil uji anova $p = 0,005$ ($p < 0,05$) sehingga ada perbedaan yang signifikan antara kelompok bahan uji terhadap nilai IC₅₀. Untuk mengetahui kelompok bahan uji yang paling bermakna, maka dilakukan uji lanjut Turkey yang ada pada tabel 4.9.

Tabel 4.9 Hasil Uji *Post Hoc* (Konsentrasi bahan uji Etil Asetat dan fraksi N Heksan)

Konsentrasi Bahan Uji		Uji Turkey (<i>p value</i>)
	25	0,919
12,5	50	0,186
	100	0,032
	12,5	0,919
25	50	0,415
	100	0,078
	12,5	0,186
50	25	0,415
	100	0,612
	12,5	0,032
100	25	0,078
	50	0,612

Hasil tabel 4.9 menunjukkan bahwa jumlah konsentrasi 12,5 tidak ada beda dengan konsentrasi bahan uji 25 dengan nilai p value = 0,919 ($p > 0,05$) jumlah konsentrasi 12,5 tidak ada terhadap jumlah konsentrasi 50 dengan nilai p value = 0,186 ($p > 0,05$) jumlah konsentrasi 12,5 ada beda nyata terhadap jumlah konsentrasi 100 p value = 0,032 (p value $< 0,05$), jumlah konsentrasi 25 tidak ada beda terhadap jumlah konsentrasi 12,5 yaitu p value 0,919 ($p > 0,05$) jumlah konsentrasi 25 tidak ada beda dengan jumlah konsentrasi 50 dengan nilai p value 0,415 ($p > 0,05$) jumlah konsentrasi 25 tidak ada beda terhadap jumlah konsentrasi 100 p value = 0,078 (p value $> 0,05$), jumlah konsentrasi 50 tidak ada beda terhadap jumlah konsentrasi 12,5 yaitu p value 0,186 ($p > 0,05$) jumlah konsentrasi 50 tidak ada beda dengan jumlah konsentrasi 25 dengan nilai p value 0,415 ($p > 0,05$) jumlah konsentrasi 50 tidak ada beda terhadap jumlah konsentrasi 100 p value = 0,612 (p value $> 0,05$), jumlah konsentrasi 100 ada beda terhadap jumlah konsentrasi 12,5 yaitu p value 0,032 ($p < 0,05$) jumlah konsentrasi 100 tidak ada beda dengan jumlah konsentrasi 25 dengan nilai p value 0,078 ($p > 0,05$) jumlah konsentrasi 100 tidak ada beda terhadap jumlah konsentrasi 50 p value = 0,612 (p value $> 0,05$). Kesimpulan uji *post hoc* adalah jumlah konsentrasi 100 dan 12,5 memiliki aktivitas sitotoksik yang baik dibandingkan dengan jumlah konsentrasi 50 dan 25

Tabel 4.10 Hasil Uji *Post Hoc* (Konsentrasi bahan uji ekstrak pacar air dan fraksi metanol air)

Konsentrasi Bahan Uji		Uji Turkey (p value)
125	250	0,643
	500	0,068
	1000	0,005
250	125	0,643
	500	0,207
	1000	0,009
500	125	0,068
	250	0,207
	1000	0,042
1000	125	0,005
	250	0,009
	500	0,042

Hasil tabel 4.10 menunjukkan bahwa jumlah konsentrasi 125 tidak ada beda dengan konsentrasi bahan uji 250 dengan nilai p value = 0,643 ($p > 0,05$) jumlah konsentrasi 125 tidak ada beda dengan terhadap jumlah konsentrasi 500 dengan nilai p value = 0,068 ($p > 0,05$) jumlah konsentrasi 125 ada beda nyata terhadap jumlah konsentrasi 1000 p value = 0,005 (p value $< 0,05$), jumlah konsentrasi 250 tidak ada beda terhadap jumlah konsentrasi 125 yaitu p value 0,643 ($p > 0,05$) jumlah konsentrasi 250 tidak ada beda dengan jumlah konsentrasi 500 dengan nilai p value 0,207 ($p > 0,05$) jumlah konsentrasi 250 tidak ada beda terhadap jumlah konsentrasi 1000 p value = 0,009 (p value $< 0,05$), jumlah konsentrasi 500 tidak ada beda terhadap jumlah konsentrasi 125 yaitu p value 0,068 ($p > 0,05$) jumlah konsentrasi 500 tidak ada beda dengan jumlah konsentrasi 250 dengan nilai p value 0,207 ($p > 0,05$) jumlah konsentrasi 500 ada beda nyata terhadap jumlah konsentrasi 1000 p value = 0,042 (p value $< 0,05$), jumlah konsentrasi 1000 ada beda terhadap jumlah konsentrasi 125 yaitu p value 0,005 ($p < 0,05$) jumlah konsentrasi 1000 ada beda dengan jumlah konsentrasi 250 dengan nilai p value 0,009 ($p < 0,05$) jumlah konsentrasi 1000 ada beda terhadap jumlah konsentrasi 500 p value = 0,042 (p value $> 0,05$). Kesimpulan uji *post hoc* adalah jumlah konsentrasi 1000 memiliki aktivitas sitotoksik yang baik dibandingkan dengan jumlah konsentrasi 125 , 250, dan 500.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Fraksi etil asetat Herba pacar air cukup aktif terhadap sel T47D dengan nilai IC_{50} 25,34 μg , fraksi n-heksan herba pacar air nilai IC_{50} 67,29 μg , ekstrak metanol herba pacar air nilai IC_{50} 166,47 μg , fraksi metanol air memiliki nilai IC_{50} 277,02 μg . Fraksi etil asetat herba pacar air memiliki aktifitas sitotoksik cukup aktif terhadap sel T4TD.
2. Ekstrak metanol memiliki kemampuan menginduksi apoptosis sebesar 53,65 %, fraksi etil asetat 75,76%, fraksi n-heksan 71,25 %, fraksi metanol air sebesar 34,14%.
3. Ekstrak metanol herba pacar air memiliki kemampuan untuk berproliferasi pada jam ke-38, fraksi n-heksan pada jam ke-39, fraksi etil asetat pada jam ke-50, dan fraksi metanol air pada jam ke-34.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antikanker herba pacar air (*Impatiens balsamina* Linn.) terhadap ekspresi gen.



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
Jl. Dr. Moh. Ali, Komplek RSMH Palembang 30126
Telp.+62711-311750 Fak.+62711-373438

NAMA
NIM
BKU
JUDUL

LEMBAR KONSULTASI

Devi Yulianti
04112681512018
Biologi Kedokteran
Uji Aktivitas Fraktal Aktif Herba Pasar Air (Impotensi
Balsamina Lem.) Terhadap Apoptosis, Sitotoksik dan Antiproliferasi
Sel Kanker Payudara T40

Pembimbing I : Dr. Arum Setiawan, M.Si

No	Tanggal	Topik Konsultasi	Tanda Tangan
1.	16 Juli 2017	Bab I, II, III	[Signature]
2.	19 Juli 2017	Bab I - III Acc	[Signature]
3.	01 Juli 2017	Bab IV - V	[Signature]
4.	10 Juli 2017	Bab IV - V Acc	[Signature]
5.	17 Juli 2017	Uji Statistik Acc	[Signature]
6.			
7.			
8.			

Pembimbing II : Sri Mita, Ssi, M.Si

No	Tanggal	Topik Konsultasi	Tanda Tangan
1.	17 Juni 2017	Bab I - IV	[Signature]
2.	20 Juli 2017	Bab I - III Acc	[Signature]
3.	11 Juli 2017	Bab IV Acc	[Signature]
4.	17 Juli 2017	Uji Statistik Acc	[Signature]
5.			
6.			
7.			
8.			

Mengetahui,
Ketua Prodi Magister Ilmu Biomedik,

[Signature]
Dr. Dewi Handayani, M.Kec
NIP: 198110042009122001



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
Jl. Dr. Moh. Ali, Komplek RSMH Palembang 30126
Telp.+62711-311750 Fak.+62711-373438

PERSETUJUAN UNTUK SEMINAR PROPOSAL/HASIL/TESIS

Yang bertandatangan di bawah ini, pembimbing tesis dari mahasiswa:

Nama : Devi Yulianti
NIM : 04112681519018
BKU : Biologi Kedokteran
Judul : Uji Aktivitas fraksi Aktif Herba Patir Air (Impatiens balsamina Linn) Terhadap Apoptosis, Sitotoksik dan Antiproliferasi sel Kanker payudara T47D

Dengan ini menyatakan bahwa proposal/hasil/tesis ini sudah layak untuk diseminarkan pada:

Hari/Tanggal : Senin, 24 Juli 2017
Pukul : 08.00 WIB
Tempat : Puang Biomedik

NO	PEMBIMBING	NAMA PEMBIMBING	NIP	PARAF
1	I	Dr. Arum Setiawan, M.Si		
2	II	Sri Nita, S.Si, M.Si		
3	II			

Palembang, Juli 2017
Mengetahui,
Koordinator BKU

Drs. Joko Marnoto, M.S
NIP:



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
Jl. Dr. Moh. Ali, Komplek RSMH Palembang 30126
Telp. +62711-311750 Fak. +62711-373438

LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING DAN PENGUJI
RENCANA SEMINAR PROPOSAL/HASIL/UJIAN TESIS

Nama : Devi Yulianti
NIM : 0912081512018
BKU : Biologi Kedokteran
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Hari/Tanggal : Senin, 24 Juli 2017
Pukul : 08.00 WIB

NO	NAMA PEMBIMBING/PENGUJI	STATUS PEMBIMBING/PENGUJI	TANDA TANGAN	KETERANGAN
1.	Dr. Arum Setiawan, M.Si	Pembimbing		
2.	Sri Mita, Ssi, M.Si	Pembimbing		
3.	Dr. dr. Ft. Mgs. Irsan Saleh, M. Biomed	Penguji		
4.	Dr. Salni, M.Si	Penguji		
5.	dr. Dwi Handayani, M. kes	Penguji		
6.				

Palembang..... Juli 2017
Mengetahui,
Ketua Prodi Magister Ilmu Biomedik,

dr. Dwi Handayani, M. kes
NIP: 198110042002122001



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KEPK FK UNSRI/RSMH
Jalan Dr. Moh. Ali Komplek RSMH Palembang 30126 Telpun (0711)352342 Faksimile (0711)373438
Email tu@unsri.ac.id

Rumah Sakit Umum Pusat Mohammad Hoesin dan Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya
Mohammad Hoesin Central General Hospital and Faculty of Medicine Sriwijaya University

Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Health Research Review Committee

SERTIFIKAT PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVAL CERTIFICATE

No. 27/kepkrsmhfkunsri/2017

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Rumah Sakit Umum Pusat Mohammad Hoesin Hospital dan
Health Research Review Committee of Mohammad Hoesin Central Hospital and

Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Palembang, Indonesia,
Faculty of Medicine, Sriwijaya University, Palembang Indonesia

berdasarkan penilaian terhadap proposal penelitian, dengan judul:
based on the review on research proposal, entitled:

Uji Aktivitas Fraksi Aktif Herba Pacar Air (*Impatiens balsamina* Linn) Terhadap Apoptosis, Sitotoksik dan
Antiproliferasi Sel Kanker Payudara T47D
Activity Test of Pacar Air (*Impatiens balsamina* linn.) Herba Fractions to in Vitro Apoptosis, Cytotoxicity and
Antiproliferation of T47D Breast Cancer Cells

atas usulan peneliti:
proposed by the researcher

Devi Yulianti

dari Bagian Biomedik
from the Department of Biomedic

dengan mengacu pada Pedoman Nasional Etik Penelitian Kesehatan beserta suplemennya
referring to National Ethical Guidelines on Health Research and its Supplements

dengan ini menyatakan bahwa penelitian kesehatan tersebut
hereby declares that the proposed health research is

layak etik; dan disetujui untuk dilaksanakan di lingkungan
ethically liable; and is approved to be carried out within

Rumah Sakit Mohammad Hoesin dan Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya
Mohammad Hoesin General Hospital and Faculty of Medicine Sriwijaya University

Palembang, 20 Februari 2017

Prof. dr. Chairil Anwar, DAP&E, SpParK, PhD
Ketua Tim Penilai
Team Leader of the Reviewer

Prof. dr. Hermansyah, SpPD-KR, FINASIM, CCD
Ketua Komisi
Head of the Committee



FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
Jl. Dr. Moh. Ali, Komplek RSMH Palembang 30126
Telp. +62711-311750, Faks. +62711-373438 email: biomedikkampus@gmail.com

Nomor
Perihal

098/UNS.1.4/BM/KM/2017
Izin Pembuatan Ekstrak dan Fraksinasi
An. Robiatul Adawiyah dkk

Palembang, 10 Februari 2017

Yth
Ketua Jurusan Biologi FMIPA
Universitas Sriwijaya
di
Tempat

Bergah hormat, bersama ini kami mengharapkan bantuan Saudara untuk dapat kiranya memberikan izin melakukan pembuatan ekstrak dan fraksinasi di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi jurusan Biologi FMIPA kedokteran Unsi a n dalam rangka Penelitian Tesis dan Mahasiswa S2 Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas

No	Nama	NIM	BRU	Judul Penelitian
1	Robiatul Adawiyah	04112681510016	Biologi Kedokteran	Pengaruh Fraksi Aktif dari Ekstrak Daun Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i> Kunth) terhadap uji Sitotoksik, Apoptosis dan Anti-proliferasi Kanker Payudara Sel T47D secara <i>In Vitro</i> .
2	Diana Pratiwi	04112681510017	Biologi Kedokteran	Pengaruh Fraksi Aktif Ekstrak Meranti Daun Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i> Kunth) terhadap Ekspresi Gen P53, Bcl-2, Bax pada Sel T47D Kanker Payudara secara <i>In Vitro</i> .
	Dev Yuliani	04112681510018	Biologi Kedokteran	Uji Aktivitas Fraksi Aktif Herba Patat Air Limbungan Balsamita Linn terhadap Apoptosis, Sitotoksik dan Anti-proliferasi Sel Kanker Payudara T47D

atas bantuan dan kerjasamanya diucapkan terima kasih





KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
JURUSAN BIOLOGI

Jalan Palembang-Prabumulih, KM 32 Inderalaya Kabupaten Ogan Ilir 30662
Telepon (0711)-580306, Laman : biologi.mipa.unsri.ac.id

SURAT KETERANGAN

No: 30 /UN9.1.7/4/PP/2017

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dra. Muharni, M.Si.
NIP : 19630603 199203 2 001
Pangkat/Gol : Pembina/ IVa
Jabatan : Kepala Laboratorium Genetika dan Bioteknologi
Unit Kerja : Fakultas MIPA Jurusan Biologi

Menerangkan dengan sesungguhnya bahwa :

Nama : Devi Yulianti
NIM : 04112681519018
Asal Perg. Tinggi : Universitas Sriwijaya
Fakultas : Fakultas Kedokteran Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Telah melakukan penelitian di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam mulai dari 13 Pebruari s/d 17 Pebruari 2017 untuk memperoleh data guna penyelesaian Tesis dengan Judul **Uji Aktivitas Fraksi Herbal Pacar Air (*Impatiens balsamina linn*) terhadap Apoptosis, Sitotoksik dan Antiproliferasi Sel Kanker Payudara T47D.**

Demikian surat ini dibuat agar dapat di gunakan sebagaimana mestinya.

Mengetahui
Kepala Jurusan,

Dr. Muharni, M.Si.
NIP. 196306031992031003

Indralaya, 27 Maret 2017
Kepala Laboratorium
Genetika dan Bioteknologi

Dra. Muharni, M.Si.
NIP. 19630603 199203 2 001

SERTIFIKAT

Diberikan kepada

Devi Yulianti S.ST

Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya Palembang

sebagai

Peserta

Kursus Singkat Kultur Jaringan yang diselenggarakan pada tanggal 21 – 24 Februari 2017
di Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Yogyakarta, 24 Februari 2017

Penyelenggara

Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada



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



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
Jl. Dr. Moh. Ali, Komplek RSMH Palembang 30126
Telp.+62711-311750. Fak.+62711-373438 email tu@fk.unsri.ac.id

Palembang, 27 Februari 2017

Nomor : 148 /UN9.1.4/BM/KM/2017
Perihal : Izin Melakukan Pelatihan Kultur Sel
An. Robiatul Adawiyah dkk

Yth.
Kepala Bagian Departemen Parasitologi
Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada
di Yogyakarta

Dengan hormat, bersama ini kami mengharapkan bantuan Saudara kiranya dapat memberikan izin melakukan Pelatihan Kultur Sel di Laboratorium Parasitologi dalam rangka penyelesaian tesis mahasiswa S2 Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Unsri atas nama:

No	Nama	NIM	BKU	Judul Penelitian
1.	Robiatul Adawiyah	04112681519016	Biologi Kedokteran	Pengaruh Fraksi Aktif dari Ekstrak Daun Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i> Kunth) terhadap uji Sitotoksik, Apoptosis dan Antiproliferasi Kanker Payudara Sel T47D secara <i>In Vitro</i> .
2.	Dieana Pratiwi	04112681519017	Biologi Kedokteran	Pengaruh Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Daun Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i> Kunth) terhadap Ekspresi Gen P53, Bcl-2, Bax pada Sel T47D Kanker Payudara secara <i>In Vitro</i> .
3.	Devi Yulianti	04112681519018	Biologi Kedokteran	Uji Aktivitas Fraksi Aktif Herba Pacar Air (<i>Impatiens balsamina</i> Linn) terhadap Apoptosis, Sitotoksik, Antiproliferasi Sel dan Ekspresi Gen Kanker Payudara T47D.

izin penelitian tersebut akan digunakan sebagai acuan untuk penelitian lebih lanjut.

Demikian atas bantuan dan kerjasamanya diucapkan terima kasih.



Ketua Program Studi,
Dr. dr. Mgs. H.M. Irsan Saleh, MBIomed
NIP. 19660929 199601 1 001



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
Jl. Dr. Moh. Ali, Komplek RSMH Palembang 30126
Telp.+62711-311750. Fak.+62711-373438 email tu@fk.unsri.ac.id

Palembang, 27 Februari 2017

Nomor : 149 /UN9.1.4/BM/KM/2017
Lampiran : 3 (tiga) lembar
Perihal : Izin Penelitian
An. Robiatul Adawiyah dkk

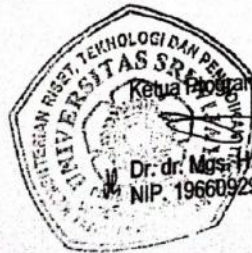
Yth.
Kepala Bagian Departemen Parasitologi
Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada
di
Yogyakarta

Dengan hormat, bersama ini kami mengharapkan bantuan Saudara kiranya dapat memberikan izin melakukan penelitian di Laboratorium Parasitologi dalam rangka penyelesaian tesis mahasiswa S2 Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Unsri atas nama:

No	Nama	NIM	BKU	Judul Penelitian
1.	Robiatul Adawiyah	04112681519016	Biologi Kedokteran	Pengaruh Fraksi Aktif dari Ekstrak Daun Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i> Kunth) terhadap uji Sitotoksik, Apoptosis dan Antiproliferasi Kanker Payudara Sel T47D secara <i>In Vitro</i> .
2.	Dieana Pratiwi	04112681519017	Biologi Kedokteran	Pengaruh Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Daun Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i> Kunth) terhadap Ekspresi Gen P53, BCl-2, Bax pada Sel T47D Kanker Payudara secara <i>In Vitro</i> .
3.	Devi Yulianti	04112681519018	Biologi Kedokteran	Uji Aktivitas Fraksi Aktif Herba Pacar Air (<i>Impatiens balsamina</i> Linn) terhadap Apoptosis, Sitotoksik, Antiproliferasi Sel dan Ekspresi Gen Kanker Payudara T47D.

izin penelitian tersebut akan digunakan sebagai acuan untuk penelitian lebih lanjut dan berikut kami lampirkan sertifikat persetujuan etik dari mahasiswa di atas.

Demikian atas bantuan dan kerjasamanya diucapkan terima kasih.



Ketua Program Studi,

Dr. dr. M. H. M. Irsan Saleh, M.Biomed A
NIP. 19660929 199601 1 001



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SRIWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
Jl. Dr. Moh. Ali, Komplek RSMH Palembang 30126
Telp.+62711-311750. Fak.+62711-373438 email tu@fk.unsri.ac.id

Palembang, 27 Februari 2017

Nomor : 150 /UN9.1.4/BM/KM/2017
Lampiran : 3 (tiga) lembar
Perihal : Izin Penelitian
An. Robiatul Adawiyah dkk

Yth.
Kepala Bagian Departemen Patologi
Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada
di Yogyakarta

Dengan hormat, bersama ini kami mengharapkan bantuan Saudara kiranya dapat memberikan izin melakukan penelitian di Laboratorium Patologi dalam rangka penyelesaian tesis mahasiswa S2 Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Unsri atas nama:

No	Nama	NIM	BKU	Judul Penelitian
1.	Robiatul Adawiyah	04112681519016	Biologi Kedokteran	Pengaruh Fraksi Aktif dari Ekstrak Daun Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i> Kunth) terhadap uji Sitotoksik, Apoptosis dan Antiproliferasi Kanker Payudara Sel T47D secara <i>In Vitro</i> .
2.	Dieana Pratiwi	04112681519017	Biologi Kedokteran	Pengaruh Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Daun Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i> Kunth) terhadap Ekspresi Gen P53, Bcl-2, Bax pada Sel T47D Kanker Payudara secara <i>In Vitro</i> .
3.	Devi Yulianti	04112681519018	Biologi Kedokteran	Uji Aktivitas Fraksi Aktif Herba Pacar Air (<i>Impatiens balsamina</i> Linn) terhadap Apoptosis, Sitotoksik, Antiproliferasi Sel dan Ekspresi Gen Kanker Payudara T47D.

Izin penelitian tersebut akan digunakan sebagai acuan untuk penelitian lebih lanjut dan berikut kami lampirkan sertifikat persetujuan etik dari mahasiswa di atas.

Demikian atas bantuan dan kerjasamanya diucapkan terima kasih.



Ketua Program Studi,

H. M. Irsan Saleh, M.Biomed
NIP. 19660929 199601 1 001



DEPARTEMEN PARASITOLOGI

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA

Gedung Prof. Drs. R. Radiopoetro Lt. IV Sayap Timur, Sekip, Yogyakarta 55281.

Telp. (0274) 546215. Fax. 546215. E-mail : parasitfkugm@yahoo.com

Nomor
Hal

: UGM/KU/Prst/095/M/05/07
: Ijin Penelitian.

2 Maret 2017

Kepada Yth.

: DEVI YULIANTI
Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran
Universitas Sriwijaya Palembang

Dengan hormat,

Menanggapi surat saudara tertanggal 24 Pebruari 2017 tentang ijin untuk melakukan penelitian di Laboratorium Parasitologi yang berjudul:

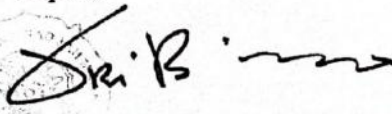
“UJI AKTIVITAS FRAKSI AKTIF HERBA PACAR AIR (*Impatiens balsamina* Linn.) TERHADAP APOPTOSIS, SITOTOKSIK DAN ANTIPROLIFERASI SEL KANKER PAYUDARA T47D”

Kami dapat mengijinkan 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: Suprihatin.
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. Suprihatin
3. Arsip



DEPARTEMEN PARASITOLOGI

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA

Gedung Prof. Drs. R. Radiopoetro Lt. IV Sayap Timur, Sekip, Yogyakarta 55281.

Telp. (0274) 546215. Fax. 546215. E-mail : parasitfkugm@yahoo.com

Nomor
Hal

: UGM/KU/Prst/095/M/05/07

2 Maret 2017

: Ijin Penelitian.

Kepada Yth.

: DEVI YULIANTI
Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran
Universitas Sriwijaya Palembang

Dengan hormat,

Menanggapi surat saudara tertanggal 24 Pebruari 2017 tentang ijin untuk melakukan penelitian di Laboratorium Parasitologi yang berjudul:

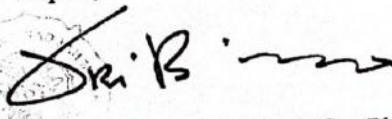
“UJI AKTIVITAS FRAKSI AKTIF HERBA PACAR AIR (*Impatiens balsamina* Linn.) TERHADAP APOPTOSIS, SITOTOKSIK DAN ANTIPROLIFERASI SEL KANKER PAYUDARA T47D”

Kami dapat mengijinkan 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: Suprihatin.
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. Suprihatin
3. Arsip



DEPARTEMEN PARASITOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA
Gedung Prof. Drs. R. Radopetro Lt. IV Satep Timur Sekip Yogyakarta 55281
Telp. (0274) 546215 Fax 546215 E-mail parasitkugm@yahoo.com

SURAT KETERANGAN
No. UGM/KU/Prst/148/TL/04/03

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Kepala Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta,
menerangkan dengan sesungguhnya bahwa

Nama : DENIYULIANTI
Instansi : Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran
Universitas Sriwijaya Palembang
NIM : 04112681519018

Telah melakukan penelitian di Departemen Parasitologi FK UGM dengan judul :

"UJI AKTIVITAS FRAKSI AKTIF HERBA PACAR AIR (*Impatiens balsamita* Linn.)
TERHADAP APOPTOSIS, SITOTOKSIK DAN ANTIPROLIFERASI SEL KANKER
PAYUDARA T47D"

Dibawah supervisi laboratorium Prof. dr. Supargiyono, DTM&H., SU., PhD., SpParK
Waktu Penelitian : 26 Februari 2017 sampai dengan 9 Maret 2017

Urusan administrasi telah diselesaikan oleh yang bersangkutan dan fasilitas laboratorium
yang dipakai telah dikembalikan, dengan demikian dinyatakan **bebas laboratorium**

Surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 23 Maret 2017

Kepala,

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

Kontrol	Absorbansi				Rata-Rata
	1	2	3	4	
Kontrol Sel	1,206	1,276	1,25	1,234	
Blank	0,142	0,155	0,156	0,154	0,152

Ekstrak metanol Konsentrasi	Absorbansi				Rata-rata	(% sel hidup)	Log konsentrasi
	1	2	3	4			
1000	0,226	0,245	0,207	0,214	0,223	6,586549572	3
500	0,521	0,514	0,559	0,558	0,538	35,70603189	2,698970004
250	0,629	0,62	0,619	0,617	0,621	43,40189508	2,397940009
125	0,713	0,729	0,721	0,717	0,72	52,53062168	2,096910013
						IC50 Ekstrak	166,4705882

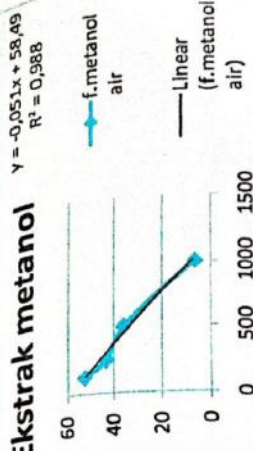
F. etil asetat	Absorbansi				rata-rata	% sel hidup	log
	1	2	3	4			
200	0,178	0,196	0,172	0,163	0,17725	2,357291426	2,301029996
100	0,322	0,349	0,359	0,386	0,354	18,69655651	2
50	0,557	0,569	0,541	0,559	0,5565	37,41622371	1,698970004
25	0,703	0,705	0,714	0,715	0,70925	51,53686157	1,397940009
12,5	0,815	0,814	0,817	0,814	0,815	61,31268777	1,096910013
						IC50 F. Etil Asetat	25,34883721

N- Heksan	Absorbansi				Rata-rata	Log konsentrasi	
	1	2	3	4			
200	0,184	0,173	0,232	0,189	0,1945	3,951929743	2,301029996
100	0,411	0,433	0,427	0,488	0,43975	26,62352669	2
50	0,559	0,886	0,586	0,593	0,656	46,61428241	1,698970004
25	0,941	0,972	0,975	0,959	0,96175	74,87866882	1,397940009
12,5	0,990	0,991	0,995	0,996	0,993	77,76750636	1,096910013

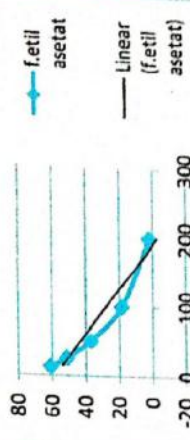
IC50 F.N H

67,29113924

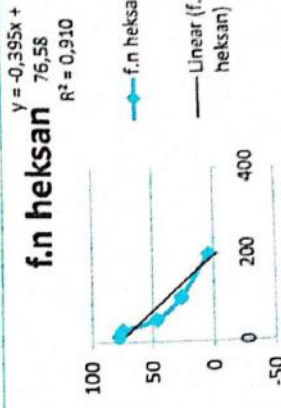
Ekstrak metanol



f. etil asetat

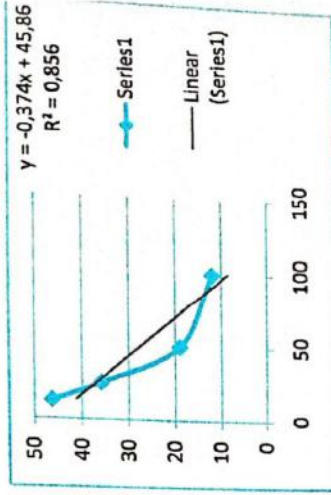
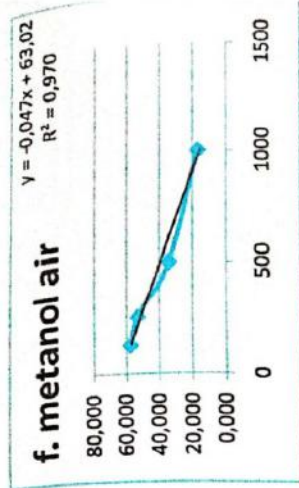


f.n heksan



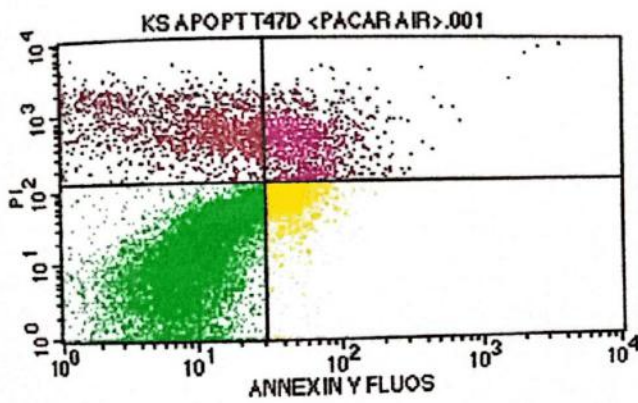
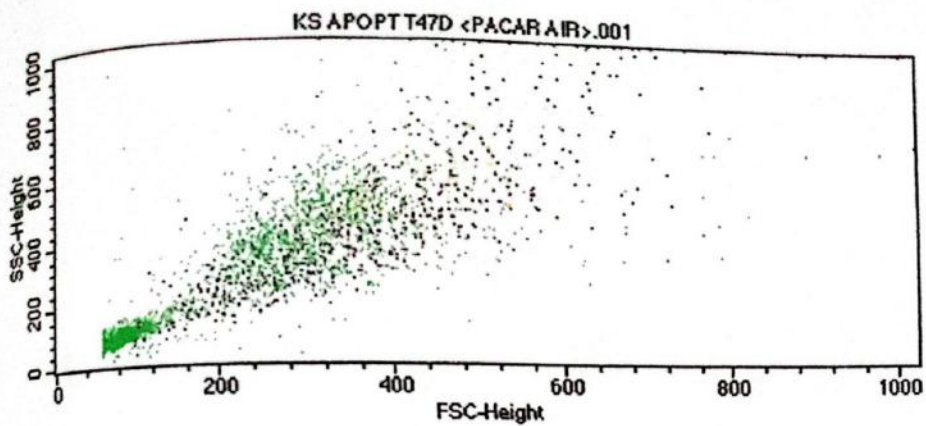
F. Metanol air	Absorbansi				Rata-rata	% sel hidup	log
	1	2	3	4			
1000	0,322	0,31	0,349	0,359	0,335	16,940	3
500	0,519	0,549	0,514	0,515	0,52425	34,43494338	2,698970004
250	0,741	0,709	0,753	0,717	0,73	53,45504969	2,397940009
125	0,769	0,768	0,78	0,787	0,776	57,70741853	2,096910013

IC50 F.MA 277,0212766



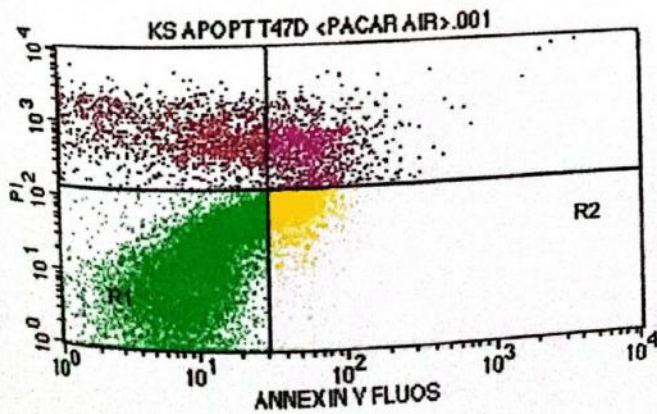
cisplatin	Absorbansi				Rata-rata	% sel hidup	log
	1	2	3	4			
100	0,269	0,295	0,267	0,294	0,28125	11,97134273	2
50	0,348	0,367	0,365	0,349	0,35725	18,99699561	1,698970004
25	0,52	0,512	0,514	0,617	0,54075	35,9602496	1,397940009
12,5	0,649	0,648	0,656	0,657	0,6525	46,29073261	1,096910013

IC50 cisplatin 11,786666667



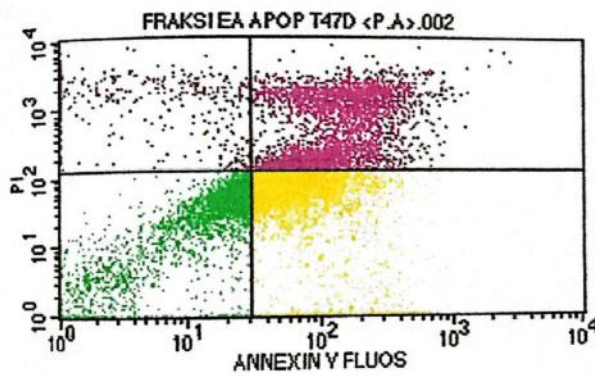
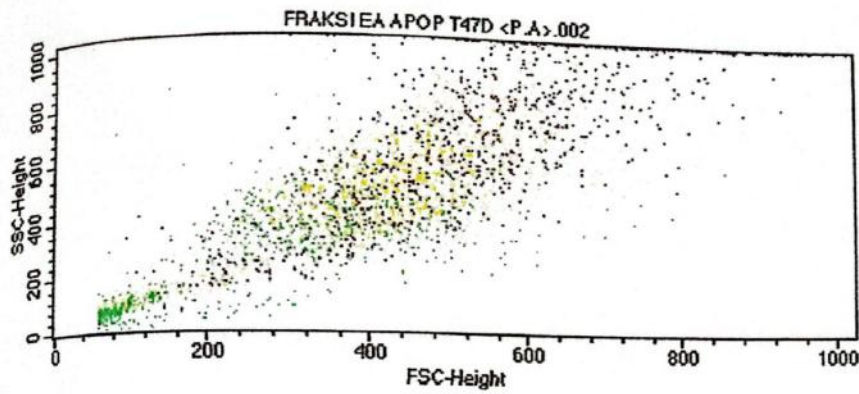
File: KS APOPT T47D <PACAR /
 Gate: No Gate
 Total Events: 20000

Quad	% Gated	% Total
UL	9.01	9.01
UR	5.85	5.85
LL	73.30	73.30
LR	11.84	11.84



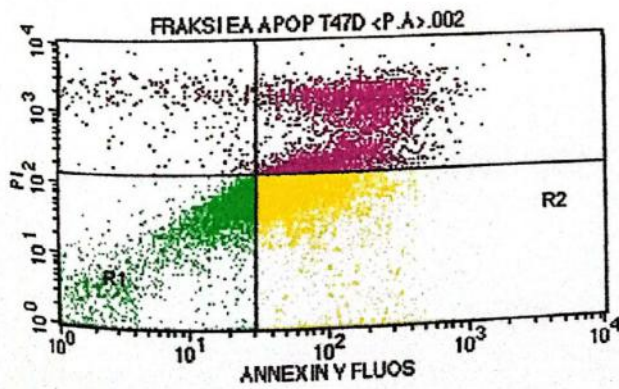
File: KS APOPT T47D <PACAR /
 Gate: No Gate
 Total Events: 20000

Region	% Gated	% Total
R1	73.09	73.09
R2	12.55	12.55
R3	5.80	5.80
R4	8.89	8.89



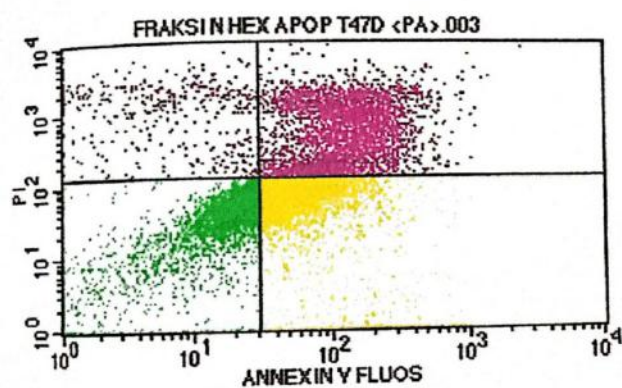
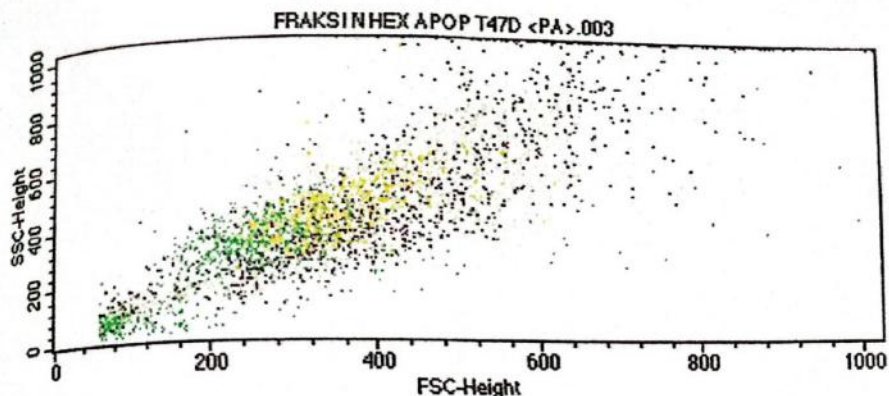
File: FRAKSI EA APOP T47C
 Gate: No Gate
 Total Events: 20000

Quad	% Gated	% Total
UL	2.12	2.12
UR	26.85	26.85
LL	22.13	22.13
LR	48.91	48.91



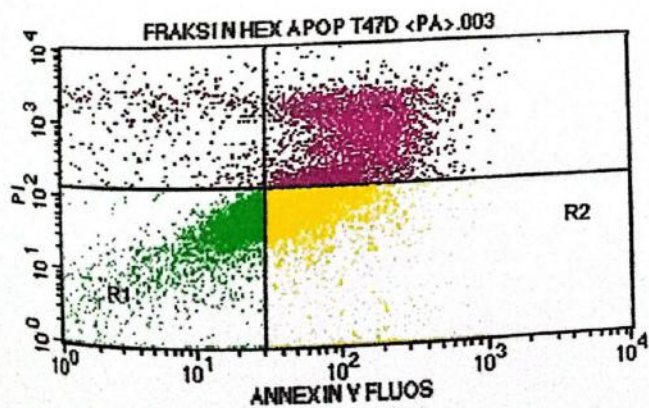
File: FRAKSI EA APOP T47D <P
 Gate: No Gate
 Total Events: 20000

Region	% Gated	% Total
R1	21.73	21.73
R2	51.27	51.27
R3	25.67	25.67
R4	2.10	2.10



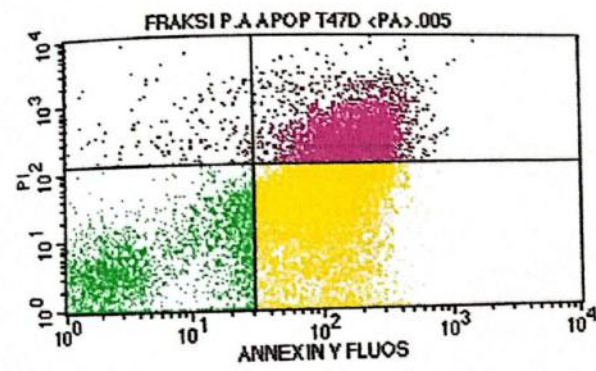
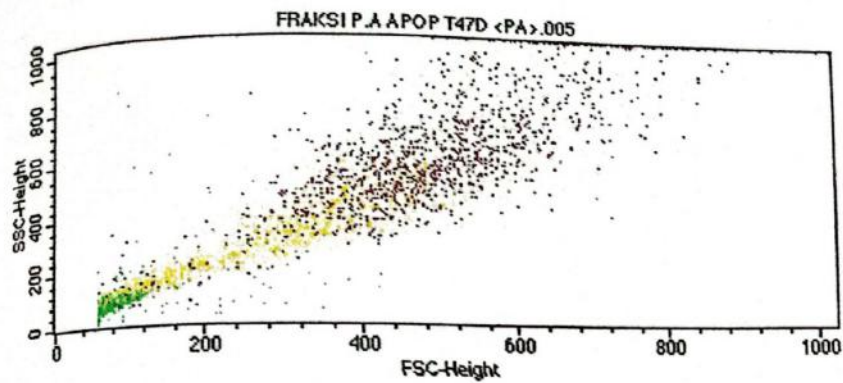
File: FRAKSI N HEX APOP T
 Gate: No Gate
 Total Events: 20000

Quad	% Gated	% Total
UL	2.51	2.51
UR	23.39	23.39
LL	26.21	26.21
LR	47.89	47.89



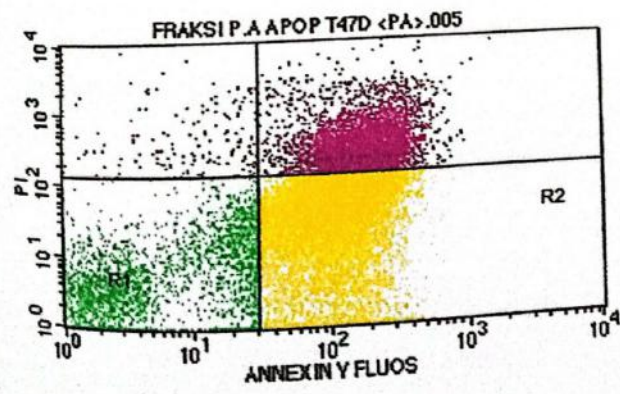
File: FRAKSI N HEX APOP T47D
 Gate: No Gate
 Total Events: 20000

Region	% Gated	% Total
R1	25.71	25.71
R2	49.86	49.86
R3	22.62	22.62
R4	2.45	2.45



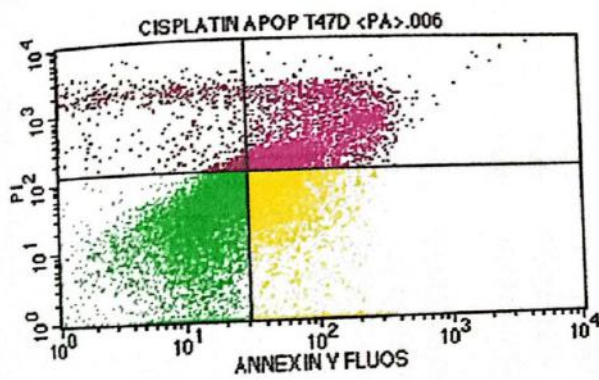
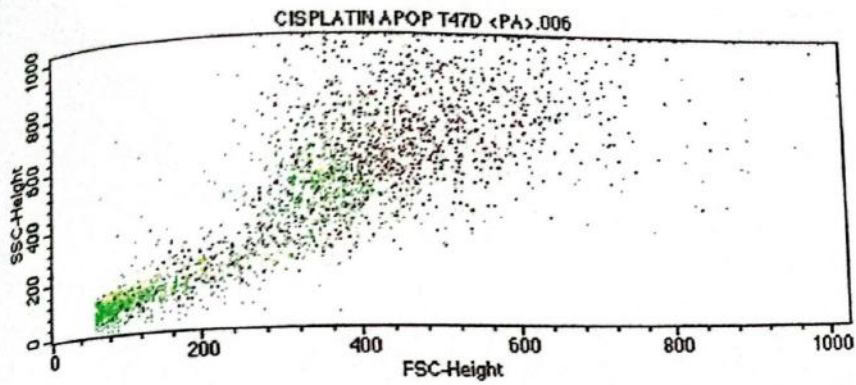
File: FRAKSI P.A APOP T47I
 Gate: No Gate
 Total Events: 20000

Quad	% Gated	% Total
UL	0.90	0.90
UR	33.11	33.11
LL	16.18	16.18
LR	49.81	49.81



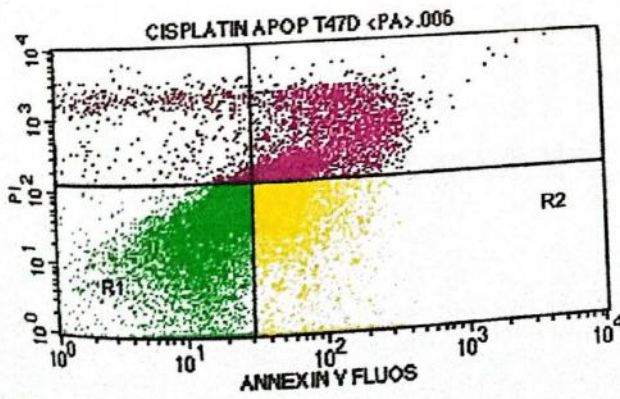
File: FRAKSI P.A APOP T47D <F
 Gate: No Gate
 Total Events: 20000

Region	% Gated	% Total
R1	16.10	16.10
R2	50.81	50.81
R3	32.51	32.51
R4	0.89	0.89



File: CISPLATIN APOP T47C
 Gate: No Gate
 Total Events: 20000

Quad	% Gated	% Total
UL	5.35	5.35
UR	29.22	29.22
LL	41.01	41.01
LR	24.43	24.43



File: CISPLATIN APOP T47D <P.
 Gate: No Gate
 Total Events: 20000

Region	% Gated	% Total
R1	41.06	41.06
R2	26.11	26.11
R3	28.67	28.67
R4	5.00	5.00

45 jam kontrol sel KM

	1	2	3 rata-rata
	0,839	0,82	0,769 0,809333
	0,086	0,084	0,088 0,086

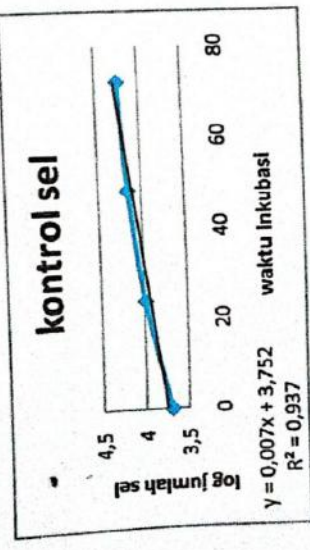
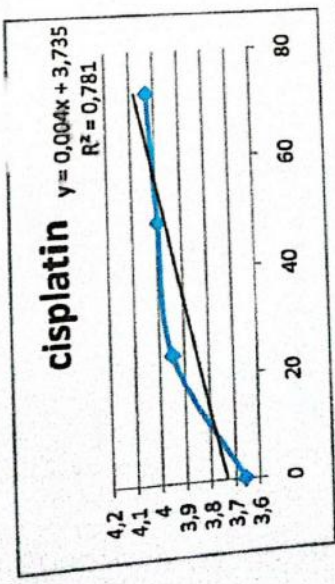
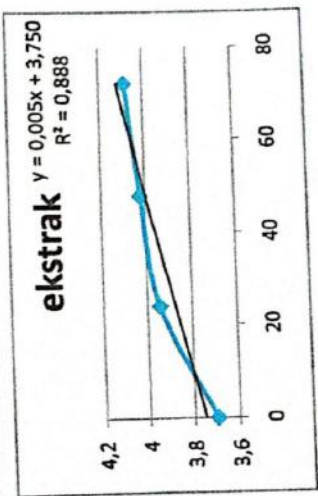
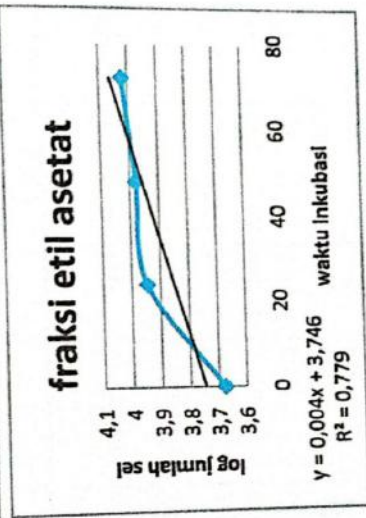
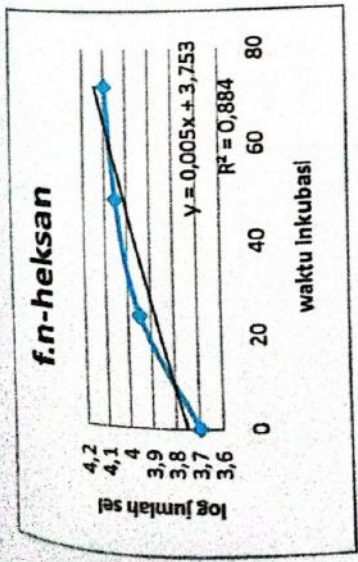
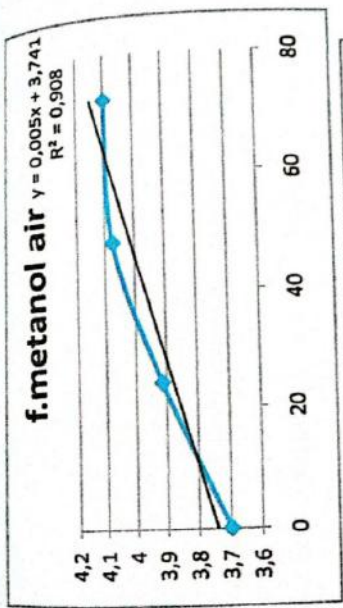
72 jam kontrol sel KM

	1	2	3 rata-rata
	0,967	1,012	0,998 0,992333
	0,114	0,11	0,12 0,114667

kontrol sel

	1	2	3 rata-rata
	0	0,33	0,32 0,311 5000 3,69897
	24	0,529	0,58 0,612 9736,842 3,988418
	48	0,839	0,82 0,769 14276,32 4,154616
	72	0,967	1,012 0,998 17322,37 4,238607

nilai x 33,77402



f.nh 39,15369
 metanol 34,24129

ea 50,0468
 ek 38,7181
 cis 53,44211

NPar Tests

[DataSet5] D:\data normalitas.sav

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	rata rata viabilitas	ekstrak pacar air	rata rata viabilitas	fraksi etil asetat	rata rata viabilitas fraksi N heksan	Fraksi N Heksan	rata rata viabilitas fraksi metanol air	fraksi Metanol Air	rata rata viabilitas cisplatin	cisplatin
N	4	4	5	5	5	5	4	4	4	4
Mean	34,55627225	2,50	34,26392020	3,00	45,96717780	3,00	40,6343475	2,50	28,3048250	2,50
Std. Deviation	19,874183354	1,291	23,980736289	1,581	31,571392371	1,581	18,75912557	1,291	15,65797648	1,291
Most Extreme Differences	,273	,151	,164	,136	,220	,136	,253	,151	,224	,151
Positive	,183	,151	,142	,136	,157	,136	,181	,151	,224	,151
Negative	-,273	-,151	-,164	-,136	-,220	-,136	-,253	-,151	-,188	-,151
Kolmogorov-Smirnov Z	,546	,301	,367	,305	,492	,305	,506	,301	,448	,301
Asymp. Sig. (2-tailed)	,927	1,000	,999	1,000	,969	1,000	,960	1,000	,988	1,000

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

[DataSet4] D:\data normalitas devi Ic 50.sav

Test of Homogeneity of Variances

rata.rata viabilitas sel.satu

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
644901850948285	3	4	,000
76,000			

ANOVA

rata.rata viabilitas sel.satu

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2196,213	3	732,071	24,745	,005
Within Groups	118,337	4	29,584		
Total	2314,550	7			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: rata rata viabilitas sel satu

Tukey HSD

	(I) bahan uji ekstrak pacar air dan fraksi metanol air	(J) bahan uji ekstrak pacar air dan fraksi metanol air	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
125	250	250	6,69055000	5,43914742	,643	-15,4514383	28,8325383
		500	20,04853000	5,43914742	,068	-2,0934583	42,1905183
		1000	43,35574050*	5,43914742	,005	21,2137522	65,4977288
250	500	125	-6,69055000	5,43914742	,643	-28,8325383	15,4514383
		1000	13,35798000	5,43914742	,207	-8,7840083	35,4999683
		250	36,66519050*	5,43914742	,009	14,5232022	58,8071788
500	1000	125	-20,04853000	5,43914742	,068	-42,1905183	2,0934583
		250	-13,35798000	5,43914742	,207	-35,4999683	8,7840083
		500	23,30721050*	5,43914742	,042	1,1652222	45,4491988
1000	250	125	-43,35574050*	5,43914742	,005	-65,4977288	-21,2137522
		500	-36,66519050*	5,43914742	,009	-58,8071788	-14,5232022
		1000	-23,30721050*	5,43914742	,042	-45,4491988	-1,1652222

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

Homogeneous Subsets

rata rata viabilitas sel satu

Tukey HSD

bahan uji ekstrak pacar air dan fraksi metanol air	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1000	2	11,7632745	35,0704850
500	2		48,4284650
250	2		55,1190150
125	2		
Sig.		1,000	,068

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Oneway
 [DataSet2] D:\data normalitas devi ic 50 2.sav

Test of Homogeneity of Variances

rata rata viabilitas sel dua

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
388210519776906 6,500	4	5	,000

ANOVA

rata rata viabilitas sel dua

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6146,937	4	1536,734	15,915	,005
Within Groups	482,792	5	96,558		
Total	6629,730	9			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: rata rata viabilitas sel dua

Tukey HSD

(I) bahan uji etil asetat dan fraksi n Heksan	(J) bahan uji etil asetat dan fraksi n Heksan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
12,5	25	6,332330000	9,826417251	,961	-33,08638956	45,75104956
	50	27,524840000	9,826417251	,166	-11,89387956	66,94355956
	100	46,880055000*	9,826417251	,025	7,46133544	86,29877456
	200	66,385480000*	9,826417251	,006	26,96676044	105,80419956
25	12,5	-6,332330000	9,826417251	,961	-45,75104956	33,08638956
	50	21,192510000	9,826417251	,325	-18,22620956	60,61122956
	100	40,547725000*	9,826417251	,045	1,12900544	79,96644456
	200	60,053150000*	9,826417251	,009	20,63443044	99,47186956
50	12,5	-27,524840000	9,826417251	,166	-66,94355956	11,89387956
	25	-21,192510000	9,826417251	,325	-60,61122956	18,22620956
	100	19,355215000	9,826417251	,392	-20,06350456	58,77393456
	200	38,860640000	9,826417251	,053	-5,5807956	78,27935956
100	12,5	-46,880055000*	9,826417251	,025	-86,29877456	-7,46133544
	25	-40,547725000*	9,826417251	,045	-79,96644456	-1,12900544
	50	-19,355215000	9,826417251	,392	-58,77393456	20,06350456
	200	19,505425000	9,826417251	,386	-19,91329456	58,92414456

	12,5	25	50	100
	-66,385480000*	-60,053150000*	-38,860640000	-19,505425000
	9,826417251	9,826417251	9,826417251	9,826417251
	,006	,009	,053	,386
	-105,80419956	-99,47186956	-78,27935956	-58,92414456
	-26,96676044	-20,63443044	,55807956	19,91329456

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

Homogeneous Subsets

rata rata viabilitas sel dua

Tukey HSD	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
bahan uji etil asetat dan fraksi n			
Heksan			
200	2	3,15461000	
100	2	22,66003500	42,01525000
50	2	42,01525000	63,20776000
25	2		69,54009000
12,5	2		,166
Sig.		,053	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

PROSES EKSTRAKSI



(a)



(b)



(c)

Proses Ekstraksi; (a) serbuk herba pacar air; (b) perendaman herba pacar air dengan metanol; (c) *rotary evaporatory*

PROSES FRAKSINASI



(a)



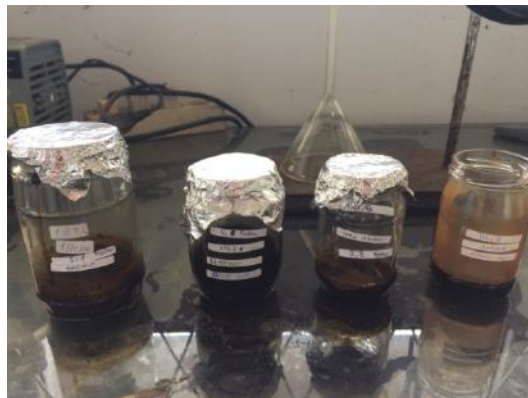
(b)



(c)



(d)



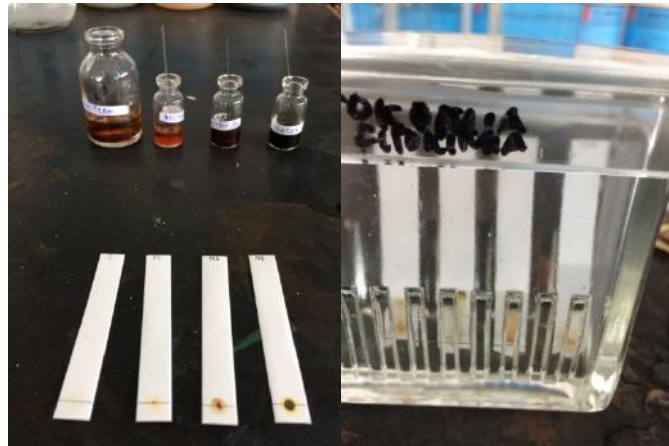
(e)

Proses Fraksinasi; (a) Fraksi n-heksan, (b) Fraksi etil asetat, (c) ekstrak herba pacar air; (d) *rotary evaporatory*; (e) hasil yang didapat dari proses fraksinasi pada n-heksan, etil asetat dan metanol air.

UJI Kromatografi Lapis Tipis (KLT)



(a)

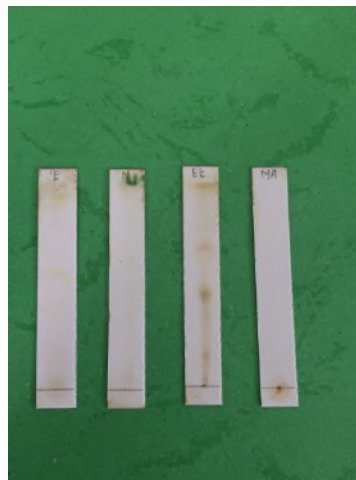


(b)

(c)

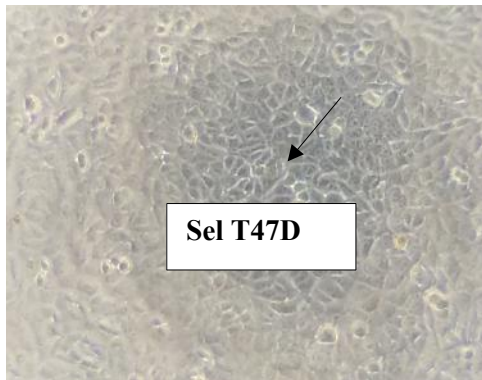


(d)



(e)

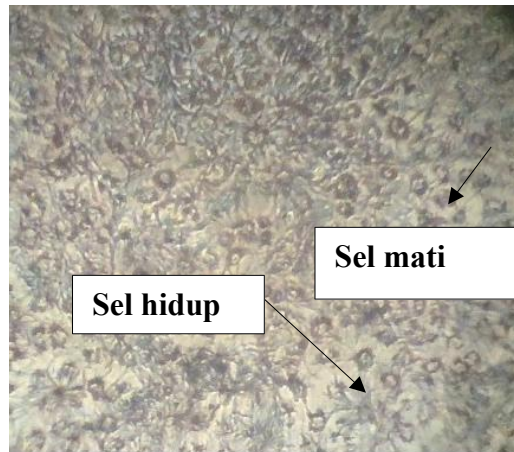
Proses penentuan golongan senyawa; (a) fraksi dan ekstrak yang dilarutkan dalam metanol; (b) cairan di tekan pada *plate silica* gel F₂₅₄; (c) Plate silica direndam dalam wadah yg berisi cairan; (d) hot plate; (e) hasil uji senyawa dari ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan metanol air.



A



B



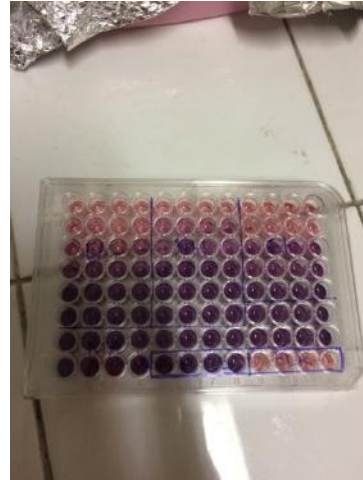
C

Morfologi sel T47D (a) Sebelum mendapatkan perlakuan sel menempel pada plate dan berbentuk daun (b) setelah mendapat perlakuan sel mengapung dan terpisah (c) setelah pemberian MTT sel T47D yang hidup tampak berserabut dan dan sel T47D yang mati tampak bulat dan pecah.

PEMBERIAN MTT DAN PEMBACAAN ELISA



(a)



(b)



(c)

Sample	OD
A	0.172
B	0.176
C	0.222
D	0.272
E	0.275
F	0.275
G	0.275
H	0.275
I	0.275
J	0.275
K	0.275
L	0.275
M	0.275
N	0.275
O	0.275
P	0.275
Q	0.275
R	0.275
S	0.275
T	0.275
U	0.275
V	0.275
W	0.275
X	0.275
Y	0.275
Z	0.275

(d)

Pemberian MTT dan pembacaan Elisa; (a) pemberian MTT; (b) sel T47D yang telah di inkubasi 24jam; (c) pembacaan Elisa; (d) Hasil pembacaan Elisa