

**EKSTRAK DAUN SUDAMALA (*Artemisia vulgaris*) SEBAGAI  
PROAPOPTOSIS PADA SEL KANKER PAYUDARA MCF-7**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**



**Oleh :**

**Angga Dewantara**

**0910710033**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2013**

**HALAMAN PENGESAHAN**

**TUGAS AKHIR**

**Ekstrak Daun Sudamala (*Artemisia vulgaris*) sebagai  
Proapoptosis pada Sel Kanker Payudara MCF-7**

Oleh :

Angga Dewantara

NIM: 0910710033

Telah diuji pada

Hari : Selasa

Tanggal : 26 Februari 2013

Dan dinyatakan lulus oleh:  
Penguji I

dr. Imam Sarwono Sp.PA  
NIP. 19521111 190802 1 001

Penguji II/Pembimbing I



dr. Soemardini, MPd

NIK. 110446417

Penguji III/Pembimbing II



Dra. Diana Lyrawati, Apt.Ms.PhD

NIP. 19681101 199303 2 004

Mengetahui,  
Ketua Program Studi



Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H., M.Sc., Sp.Par.K  
NIP. 19520410 198002 1 001

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis nyatakan kepada Tuhan Yesus Kristus yang telah memberikan hikmat dan kemampuan, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Ekstrak Daun Sudamala (*Artemisia vulgaris*) sebagai Proapoptosis pada Sel Kanker Payudara MCF-7”. Penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. dr. Karyono Mintaroem, SpPA. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. dr. Soemardini, MPd sebagai pembimbing pertama atas kesabaran dan bimbingannya kepada penulis dalam penulisan Tugas Akhir.
3. Dra. Diana Lyrawati, Apt. Ms. Phd sebagai dosen pembimbing kedua atas ketelitian dan bimbingannya kepada penulis dalam penulisan Tugas Akhir.
4. dr. Imam Sarwono SpPA sebagai dosen penguji yang telah memberikan waktu dan saran untuk mengoreksi penyelesaian Tugas Akhir.
5. Seluruh anggota Tim Tugas Akhir FKUB yang telah membantu penyelesaian Tugas Akhir.
6. Yang tercinta ayahanda Hendro Triyono, ibunda Retno Ernawati, adik Fendy Hendrawan, dan eyang Tarmine yang selalu mendoakan dan telah memberi dukungan pada penulis dalam penulisan Tugas Akhir ini dari awal sampai akhir.
7. Staf laboratorium farmakologi FKUB dan staf analis LPPT, ibu Yuli yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan Tugas Akhir.
8. DIKTI yang telah memberi bantuan dana pada penelitian ini.

9. Achmad Diyas, Andreas Budi dan teman-teman untuk kebersamaan, masukan dan semangat dalam pengerjaan Tugas Akhir ini.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penulisan Tugas Akhir yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulisan Tugas Akhir ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi semua yang membutuhkan.

Malang, 26 Februari 2013

Penulis



## ABSTRAK

Dewantara, Angga. 2013. Ekstrak Daun Sudamala (*Artemisia vulgaris*) sebagai Proapoptosis pada Sel Kanker Payudara MCF-7. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing:(1) dr.Soemardini, MPd. (2) Dra. Diana Lyrawati, Apt.Ms.PhD

Kanker payudara saat ini merupakan masalah global yang harus diperhatikan. Penilaian proliferasi dan apoptosis dapat untuk mengevaluasi pertumbuhan atau pengurangan massa tumor terhadap respon kemoterapi, radioterapi dan akhir-akhir ini dengan terapi hormonal. Terapi tersebut seringkali tidak terjangkau oleh masyarakat, maka dicari obat tradisional untuk pengobatan kanker. Ekstrak daun sudamala (*Artemisia vulgaris*) dengan kandungan eupatilin diharapkan menjadi salah satu alternatif obat yang mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara. Studi eksperimental dengan post-test only design dilakukan pada sel kanker MCF-7 in vitro. Pemberian ekstrak daun sudamala pada sel dilakukan dengan dosis 75 µg/ml, 150 µg/ml, 300 µg/ml dan kelompok kontrol. Apoptosis sel kanker diperiksa menggunakan TUNEL assay. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak artemisia menginduksi apoptosis pada kelompok uji dosis 75 µg/ml sebesar 0,4917%, dosis 150 µg/ml sebesar 0,8605%, dan dosis 300 µg/ml, sebesar 2,2730%. Kenaikan indeks apoptosis pada kelompok sel yang diberi perlakuan dengan kelompok kontrol memiliki perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ). Hasil uji korelasi menunjukkan bahwa semakin meningkatnya pemberian dosis ekstrak maka indeks apoptosis sel MCF-7 cenderung meningkat. Populasi sel kanker pada dosis 300 µg/ml menunjukkan tinggal 26% sel tersisa daripada kontrol. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak daun sudamala (*Artemisia vulgaris*) dapat menginduksi apoptosis pada sel MCF-7 dengan hasil relatif kecil. Pada dosis 300 µg/ml terjadi penurunan sel sebesar 74% dari kontrol sel. Berdasarkan hasil penelitian ini, disarankan penelitian lebih lanjut pada zat eupatilin pada daun Sudamala dan efeknya terhadap apoptosis sel atau mekanisme lain kematian sel secara molekuler.

Kata kunci : daun sudamala, eupatilin, apoptosis, sel kanker payudara

## ABSTRACT

Dewantara, Angga. 2013. Sudamala Leaves Extract (*Artemisia vulgaris*) as Proapoptosis in Breast Cancer MCF-7 Cells. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr.Soemardini, MPd. (2) Dra. Diana Lyrawati, Apt.Ms.Phd

Breast cancer is the global issue that must be aware now. Assessment of proliferation and apoptosis is able to evaluate the growth or reduction of tumor mass on the response of chemotherapy, radiotherapy and lately with hormonal therapy. Therapy is often unaffordable by the community, so that traditional medicine is considered for the treatment of cancer. Sudamala leaves (*Artemisia vulgaris*) with eupatilin are expected to be one of alternative drug that can inhibit the growth of breast cancer cells. Experimental studies with a post-test only design, conducted on MCF-7 cancer cells in vitro. Addition of sudamala leaves extract on cells was done with dose 75 µg/ml, 150 µg/ml, 300 µg/ml and control group. Apoptosis of the cells is determined by TUNEL assay. Results showed that the extract of artemisia induces apoptosis in the test group doses of 75 µg / ml for 0.4917%, the dose of 150 µg / ml for 0.8605%, and the dose of 300 µg / ml, for 2.2730%. The increase in apoptosis index in the group of treated cells with the control group had a significant difference ( $p < 0.05$ ). Correlation test results also showed that increasing the dosage extract the apoptosis index of MCF-7 cell is likely to increase. The population of cancer cells in dose of 300 µg / ml showed 26% live cells remaining than controls. The conclusion of this study is sudamala leaves extract can induce apoptosis in MCF-7 cells with a relatively small. At a dose of 300 µg / ml cells decreased by 74% of control cells. Based on these data, it is suggested further research of eupatilin in Sudamala and its molecular effects in apoptosis cells or other mechanism of cell death.

Keywords : sudamala leaves, eupatilin, apoptosis, breast cancer cells

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul .....	i
Lembar Pengesahan .....	ii
Kata Pengantar .....	iii
Abstrak .....	v
Abstract .....	vi
Daftar Isi .....	vii
Daftar Tabel .....	x
Daftar Gambar .....	xi
Daftar Lampiran .....	xii
Daftar Singkatan .....	xiii
 <b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang Masalah .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
 <b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Definisi Kanker Payudara .....	4
2.2 Epidemiologi dan Dampak Kanker.....	4
2.3 Terapi Kanker .....	5
2.4 Komplikasi Kanker Payudara .....	6
2.5 Patogenesis Kanker Payudara .....	6
2.6 Stadium Kanker Payudara .....	6
2.7 Apoptosis Pada Kanker .....	8

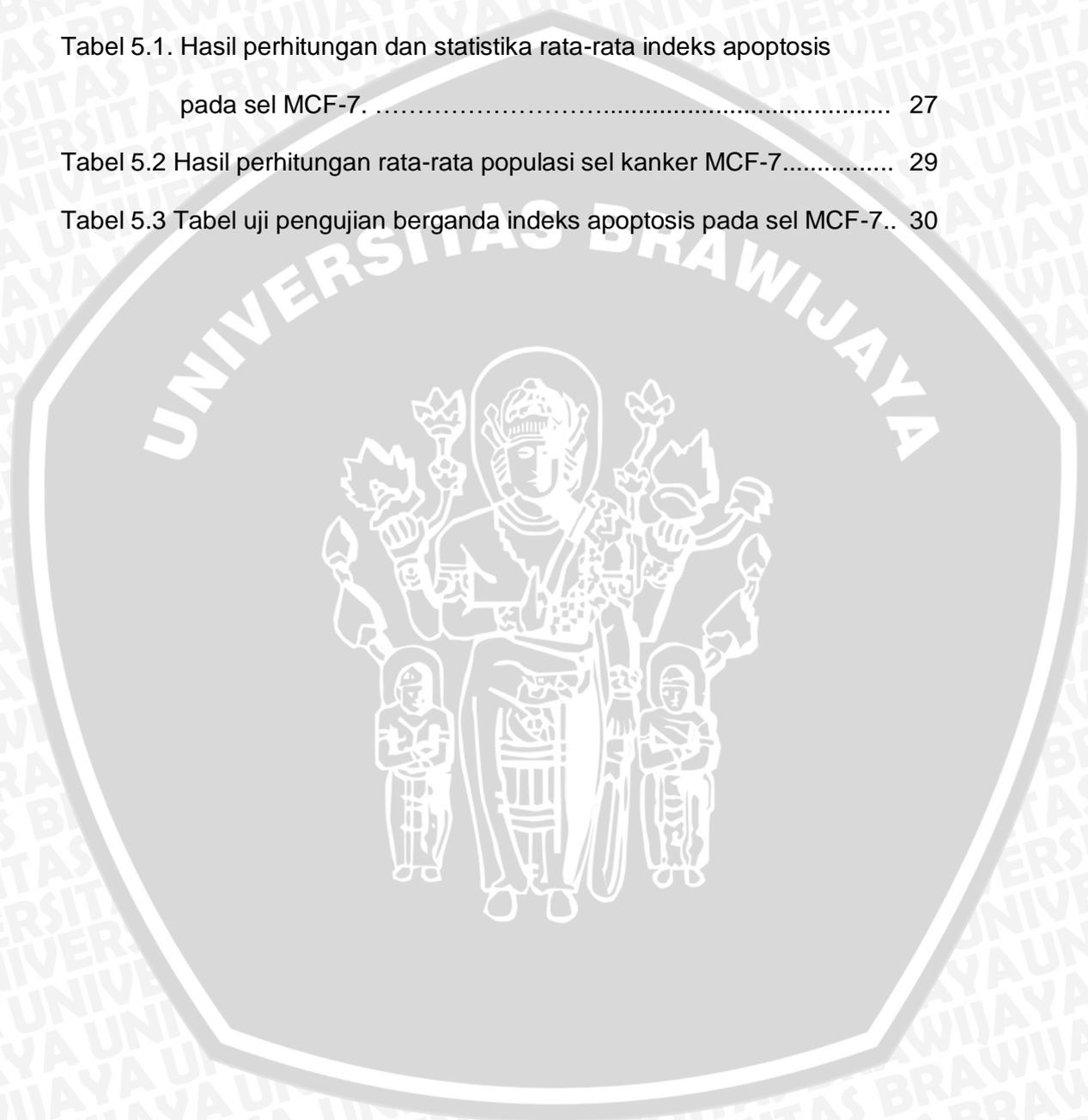
2.8 Mekanisme Apoptosis .....	8
2.8.1 Mekanisme Ekstrinsik .....	9
2.8.2 Mekanisme Intrinsik .....	10
2.9 Sel MCF-7 .....	11
2.10 Kultur Sel .....	12
2.11 Tumbuhan Sudamala .....	14
2.11.1 Klasifikasi Tumbuhan Sudamala .....	14
2.11.2 Morfologi dan Habitat Tumbuhan Sudamala.....	14
2.11.3 Karakteristik Fitokimia <i>Artemisia v.</i> dan Biomekanisme Eupatilin.....	15
<b>BAB 3 KERANGKA PIKIR DAN HIPOTESIS</b>	
3.1 Kerangka Pikir .....	17
3.2 Hipotesis .....	18
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b>	
4.1 Rancangan Penelitian .....	19
4.2 Sampel Penelitian .....	19
4.3 Penentuan Variabel Penelitian .....	20
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	20
4.5 Alat dan Bahan .....	20
4.6 Definisi Operasional .....	22
4.7 Prosedur Penelitian .....	23
4.7.1 Persiapan Medium DMEM 1 .....	21
4.7.2 Pembuatan Medium Lengkap .....	22
4.7.3 Cell Thawing .....	23
4.7.4 Kultur Sel Kanker Payudara .....	24
4.7.5 Proses Ekstraksi Daun <i>Artemisia vulgaris</i> .....	24

4.7.6 Hitung Sel .....	25
4.7.7 Starvasi .....	25
4.7.8 Pemberian Perlakuan .....	25
4.7.9 Persiapan Sel .....	26
4.7.10 Metode TUNEL Assay .....	26
4.7.11 Jadwal Penelitian .....	27
4.8 Analisis Data .....	27
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA</b>	
5.1 Hasil Penelitian .....	29
5.1.1 Indeks Apoptosis .....	29
5.2 Populasi Sel Kanker MCF-7 .....	32
5.2 Analisis Data .....	33
5.2.1 Uji One Way ANOVA .....	33
5.2.2 Analisis Pengujian Berganda .....	33
5.2.3 Uji Korelasi .....	34
<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b> .....	<b>36</b>
<b>BAB 7 PENUTUP</b>	
7.1 Kesimpulan .....	40
7.2 Saran .....	40
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>42</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>44</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN</b> .....	<b>49</b>
<b>KETERANGAN KELAIKAN ETIK</b> .....	<b>50</b>

## DAFTAR TABEL

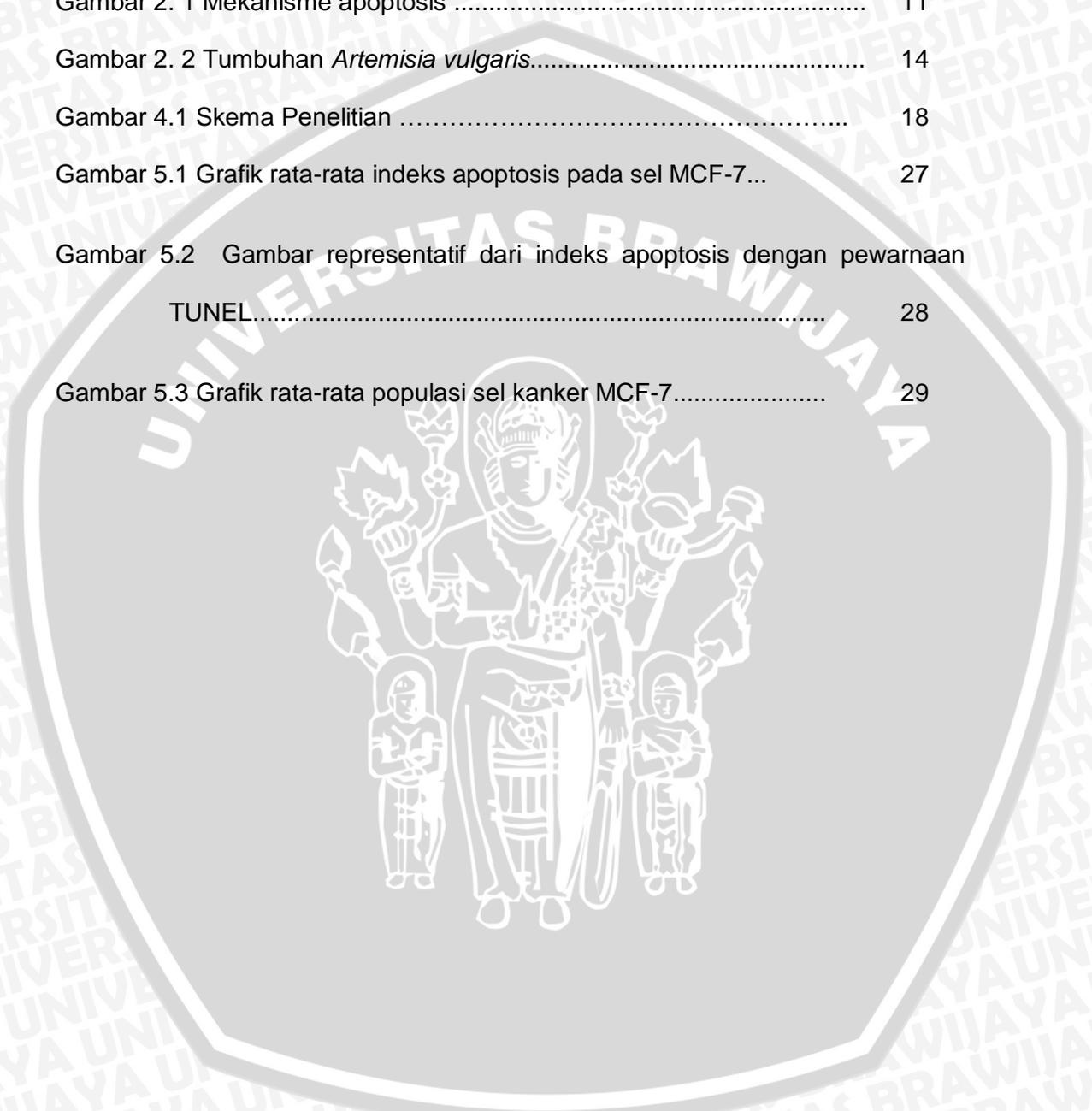
Halaman

Tabel 5.1. Hasil perhitungan dan statistika rata-rata indeks apoptosis pada sel MCF-7. ....	27
Tabel 5.2 Hasil perhitungan rata-rata populasi sel kanker MCF-7.....	29
Tabel 5.3 Tabel uji pengujian berganda indeks apoptosis pada sel MCF-7..	30



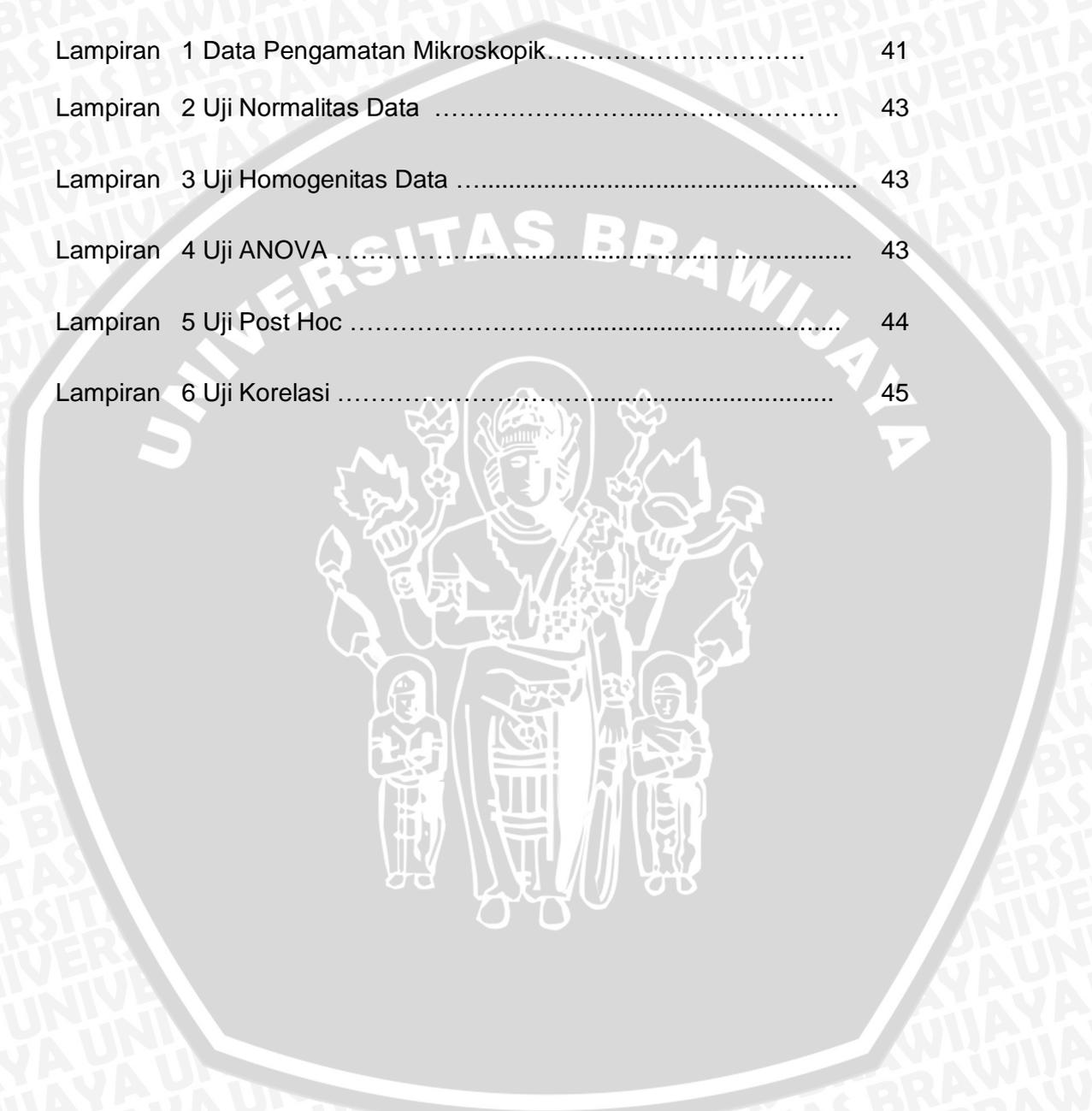
**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 2. 1 Mekanisme apoptosis .....	11
Gambar 2. 2 Tumbuhan <i>Artemisia vulgaris</i> .....	14
Gambar 4.1 Skema Penelitian .....	18
Gambar 5.1 Grafik rata-rata indeks apoptosis pada sel MCF-7...	27
Gambar 5.2 Gambar representatif dari indeks apoptosis dengan pewarnaan TUNEL.....	28
Gambar 5.3 Grafik rata-rata populasi sel kanker MCF-7.....	29

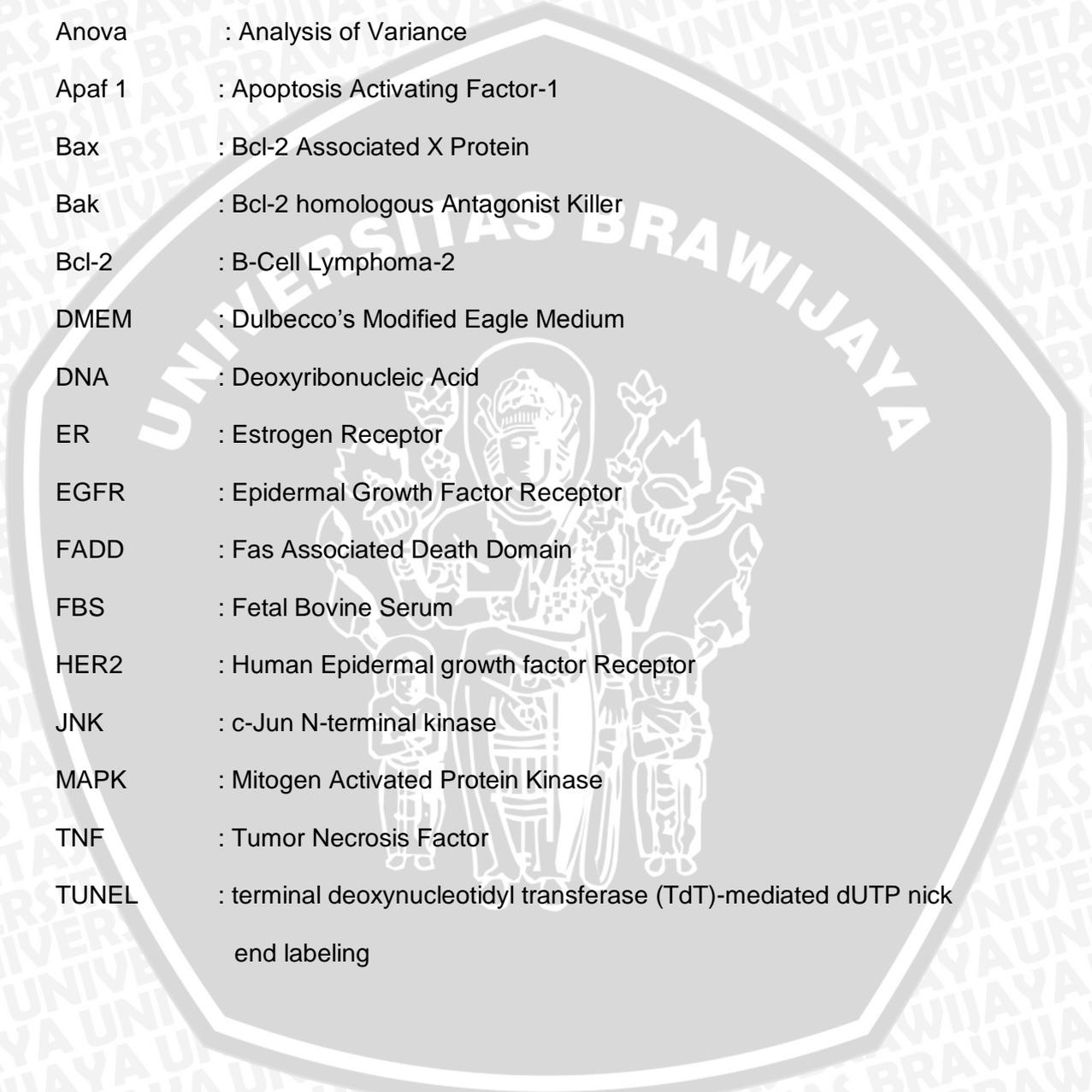


**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
Lampiran 1 Data Pengamatan Mikroskopik.....	41
Lampiran 2 Uji Normalitas Data .....	43
Lampiran 3 Uji Homogenitas Data .....	43
Lampiran 4 Uji ANOVA .....	43
Lampiran 5 Uji Post Hoc .....	44
Lampiran 6 Uji Korelasi .....	45



## DAFTAR SINGKATAN



Anova	: Analysis of Variance
Apaf 1	: Apoptosis Activating Factor-1
Bax	: Bcl-2 Associated X Protein
Bak	: Bcl-2 homologous Antagonist Killer
Bcl-2	: B-Cell Lymphoma-2
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
ER	: Estrogen Receptor
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
FADD	: Fas Associated Death Domain
FBS	: Fetal Bovine Serum
HER2	: Human Epidermal growth factor Receptor
JNK	: c-Jun N-terminal kinase
MAPK	: Mitogen Activated Protein Kinase
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TUNEL	: terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kanker payudara menempati urutan pertama penyakit neoplasma ganas di rumah sakit sejak 2004–2008. Jumlah penderita kanker payudara terus meningkat. Berdasarkan Profil Kesehatan Indonesia 2008, jumlah pasien kanker payudara pada tahun 2004 adalah 5.207 pasien. Pada tahun 2007 meningkat menjadi 8.277 pasien (Depkes RI,2009). Karena itu, kanker payudara merupakan masalah global yang harus diperhatikan. Saat ini peneliti berusaha untuk menemukan terapi yang terbaik untuk membunuh kanker payudara.

Populasi sel atau homeostasis jaringan ditentukan oleh kecepatan proliferasi sel, differensiasi dan apoptosis. Tiap sel mempunyai mekanisme pengawasan supaya sel selalu konstan untuk menjaga kestabilan integritas dengan genomnya. Bila terjadi mutasi onkogen maka akan terjadi mekanisme untuk membatasi perluasan atau perbanyak sel, dengan penekanan proliferasi dan meningkatkan (*triggering*) apoptosis. Gangguan keseimbangan antara apoptosis dan proliferasi adalah faktor penting untuk terjadinya perkembangan dari tumor dan progresi tumor(Bai et al,2007).

Penilaian proliferasi dan apoptosis dapat untuk mengevaluasi pertumbuhan atau pengurangan massa tumor terhadap respon kemoterapi, radioterapi dan akhir-akhir ini dengan terapi hormonal. Terapi kanker payudara meliputi pembedahan, radiasi, hormonal dan kemoterapi. Terapi tersebut seringkali biayanya tidak terjangkau oleh masyarakat, dan memiliki efek

psikologis, maka dicari obat tradisional untuk pengobatan kanker. Ada beberapa kelebihan penggunaan obat tradisional, harganya lebih murah karena dapat dibudidayakan, mudah didapat dan diharapkan efek samping lebih minimal dibanding obat antikanker sintetik (Candra A,2010).

Mekanisme apoptosis pada sel kanker diketahui dapat diinduksi oleh zat Eupatilin (2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-methoxychromen-4-one). Eupatilin mampu menginduksi apoptosis melalui mekanisme peningkatan *proapoptosis Bax* pada sel kanker kolon (Kim et al,2005). Dengan meningkatnya *proapoptosis Bax*, maka terjadi pengaktifan jalur apoptosis dan mengaktifkan *caspase cascade*. Dari hal tersebut, maka eupatilin akan menginduksi kematian sel melalui jalur apoptosis.

Daun tumbuhan sudamala (*Artemisia vulgaris*) mengandung zat eupatilin yang mampu menghambat pertumbuhan beberapa sel kanker. Daun sudamala banyak tumbuh di Indonesia. Di pulau Sumatera tumbuhan ini disebut tumbuhan Baru Cina atau Sudamala. Di pulau Jawa disebut suket gajahan dan di Sunda disebut Jokot Lukutmala sedangkan di Maluku disebut Kolo. Di luar negeri dikenal dengan nama mugwort, felon herb, moxa, wormwood. Daun tumbuhan sudamala (*Artemisia vulgaris*) berdasarkan laporan penelitian sebelumnya mengandung minyak atsiri, saponin, flavonoid dan polifenol (Bunrathep et al, 2005). Tumbuhan ini dikenal tidak hanya sebagai tanaman yang bisa di makan, kebanyakan sebagai bumbu dan sebagai sumber obat–obatan tradisional. Peneliti mengharapkan ekstrak daun sudamala dengan kandungan eupatilin di dalamnya merupakan salah satu alternatif obat yang mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara.

## 1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Apakah ekstrak daun *Artemisia vulgaris* dapat menginduksi apoptosis sel kanker payudara MCF-7?

## 1.3 Tujuan Penelitian

- 1.3.1 Tujuan umum : Untuk membuktikan bahwa ekstrak daun *Artemisia vulgaris* dapat menginduksi apoptosis sel kanker payudara.
- 1.3.2 Tujuan khusus : Untuk membuktikan pemberian ekstrak daun *Artemisia vulgaris* dapat meningkatkan indeks apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7.

## 1.4 Manfaat Penelitian

- 1.4.1 Manfaat praktis : memberikan informasi bagi masyarakat tentang penggunaan ekstrak daun *Artemisia vulgaris* untuk pengobatan kanker payudara maupun kanker yang lain.
- 1.4.2 Manfaat akademis : Menciptakan teoritis baru bahwa ekstrak daun *Artemisia vulgaris* sebagai pendekatan terapi kanker payudara.

## BAB II

## TINJAUAN PUSTAKA

**2.1 Definisi Kanker Payudara**

Kanker adalah pertumbuhan sel yang abnormal. Sel-sel kanker sangat cepat membelah walaupun ruang dan nutrisi terbatas. Kanker sangat heterogen, yang lebih dari 100 jenis kanker telah diketahui saat ini dan dalam setiap organ terdapat berbagai sub tipe kanker. Kanker payudara adalah perkembangbiakan tidak teratur (*malignant*) dari sel epitel *ductus* (saluran) atau *lobulus* pada payudara. Transformasi keganasan (*malignant*) sel epitel sekretori menimbulkan kanker payudara (Fattaneh,2003).

**2.2 Epidemiologi dan Dampak Kanker**

Kanker saat ini merupakan masalah kesehatan utama tidak hanya di negara maju namun juga di negara berkembang. *World Cancer Report* melaporkan berdasarkan data *The International Agency for Research on Cancer* bahwa pada tahun 2010 kanker merupakan penyebab kematian nomor satu. Diperkirakan 12 juta kasus kanker baru dan lebih dari 7 juta kematian akibat kanker pada tahun 2008. Jadi jika diprediksikan pada tahun 2030 akan ada 20-26 juta kasus kanker baru dan 13-17 juta kematian akibat kanker. Kanker payudara menempati urutan pertama penyakit neoplasma ganas di rumah sakit sejak 2004–2008. Jumlah penderita kanker payudara terus meningkat. Berdasarkan Profil Kesehatan Indonesia 2008, jumlah pasien kanker payudara pada tahun 2004 adalah 5.207 pasien. Pada tahun 2007 meningkat menjadi

8.277 pasien (Depkes RI,2009). Karena itu, kanker payudara merupakan masalah global yang harus diperhatikan.

Selain dampak buruk terhadap fisik, pasien kanker juga mengalami dampak buruk terhadap sosial (Pardue et al. 1989), psikologis, emosi dan spiritual mereka seperti rasa takut akan kambuh kembali, depresi, dan rasa percaya diri, rasa bersalah, dan gangguan dalam menjalin hubungan dengan orang lain atau menjalankan peranan di rumah serta di tempat kerja.

Risiko kanker pada negara berkembang semakin meningkat dengan bertambahnya usia. Hal tersebut akan berimbas pada peningkatan pengeluaran untuk pengobatan. Peningkatan insiden kanker tentu saja membawa dampak pada bidang ekonomi, sosial dan psikologis. Sebuah penelitian tahun 1990 memperkirakan total biaya yang dikeluarkan untuk terapi kanker menghabiskan sekitar \$96 juta, diantaranya secara kasar diperkirakan \$27 juta untuk pengeluaran langsung, \$10 juta untuk morbiditas dan disabilitas, dan \$58 juta untuk mortalitas (Chirikos,2001).

Peningkatan insiden kanker berimplikasi pada perlunya peningkatan layanan dan pengobatan termasuk penyediaan obat dan pengobatan alternatif. Bila pelayanan kesehatan dan pengobatan pasien kanker semakin baik maka akan dapat meningkatkan usia harapan hidup dan kualitas hidup.

### **2.3 Terapi kanker**

Selama ini di Indonesia ada lima modalitas dalam terapi kanker yaitu : modalitas bedah, Radioterapi, kemoterapi, Modalitas terapi hormon, terapi target. Sementara di beberapa negara seperti Cina, Jepang , India dan Jerman telah menggunakan modalitas keenam yaitu Complementary Alternative Medicine (seperti chiropractic, herbal, meditasi) sebagai pelengkap terapi.

#### 2.4 Komplikasi Kanker Payudara

Ada beberapa komplikasi dari kanker payudara, yaitu terjadinya gangguan neurovaskuler, fraktur patologi, dan fibrosis payudara. Akan tetapi, komplikasi yang paling serius dari kanker payudara adalah metastase atau penyebaran dari sel kanker ke jaringan tubuh yang lain, bisa melalui pembuluh darah maupun limfatik. Kebanyakan sel kanker payudara bermetastase ke otak, paru-paru, hati, tulang, dan kulit. Bila sel kanker sudah menyebar ke bagian tubuh yang lain, maka peluang untuk sembuh sangat kecil, bahkan bisa menyebabkan kematian (Sjamsuhidayat, 2004).

#### 2.5 Patogenesis Kanker Payudara

Terbentuknya kanker payudara kebanyakan dipengaruhi oleh teori *Estrogen receptor positive* dimana teori ini memberikan gambaran bahwa kanker payudara membutuhkan peran besar dari reseptor estrogen (ER). Sebagian besar reseptor estrogen yang terdapat pada kanker payudara merupakan ER-alfa. Adapun gen (onkogen) yang terlibat pada kanker payudara adalah EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), HER2/Neu (Human Epidermal growth factor Receptor) yang akan meningkatkan sinyal pertumbuhan. Dalam perkembangan kanker payudara MCF-7, mutasi (*knockdown*) BRCA1 (*tumor suppressor genes*) berpengaruh pada diferensiasi ER *stem/progenitor cells* menjadi ER+ *luminal cells*. Kanker payudara ER+ umumnya merupakan BRCA1 *carriers age* (Tung, 2010)

#### 2.6 Stadium Kanker Payudara

Penentuan stadium yang paling banyak dianut saat ini ialah sistem TNM yang direkomendasikan oleh UICC/AJCC. UICC adalah *International Union Against Cancer* dari WHO. Tiga indikator utamanya ialah "T" yaitu *tumor size*

atau ukuran tumor, "N" yaitu Node atau kelenjar getah bening regional dan "M" yaitu metastasis atau penyebaran jauh. Penilaian dilakukan sebelum dan sesudah operasi, serta melalui pemeriksaan histopatologi (PA):

a. T (*Tumor size*), ukuran tumor:

- T0: tidak ditemukan tumor primer
- T1: ukuran tumor diameter 2 cm atau kurang
- T2: ukuran tumor diameter antara 2-5 cm
- T3: ukuran tumor diameter > 5 cm
- T4: ukuran tumor berapa saja, tetapi sudah ada penyebaran ke kulit dan atau dinding dada, dapat berupa borok, bengkak, kulit payudara kemerahan atau ada benjolan kecil di kulit di luar tumor utama.

b. N (*Node*), kelenjar getah bening regional (kgb):

- N0: tidak terdapat metastasis pada kgb regional di ketiak/aksilla
- N1: ada metastasis ke kgb aksilla yang masih dapat digerakkan
- N2: ada metastasis ke kgb aksilla yang sulit digerakkan
- N3: ada metastasis ke kgb di atas tulang selangka (supraklavikula) atau pada kgb di *mammary interna* di dekat tulang sternum

c. M (*Metastasis*), penyebaran jauh:

- Mx: metastasis jauh belum dapat dinilai
- M0: tidak terdapat metastasis jauh
- M1: terdapat metastasis jauh

Setelah masing-masing faktor T,N,M didapatkan, ketiga faktor tersebut kemudian digabung dan didapatkan stadium kanker :

- Stadium 0: T0 N0 M0
- Stadium 1 : T1 N0 M0
- Stadium IIA : T0 N1 M0/ T1 N1 M0/T2 N0 M0
- Stadium IIB : T2 N1 M0/ T3 N0 M0
- Stadium IIIA : T0 N2 M0/ T1 N2 M0/T2 N2 M0/T3 N1 M0/T2 N2 M0
- Stadium IIIB : T4 N0 M0/T4 N1 M0/T4 N2 M0
- Stadium IIIC : Tiap T N3 M0
- Stadium IV : Tiap T-Tiap N –M1 (UICC, 2002)

## 2.7 Apoptosis pada kanker

Apoptosis merupakan mekanisme kematian sel yang aktif, terprogram, serta sangat selektif terhadap sel yang berlebih atau telah rusak. Apoptosis berhubungan dengan aktivasi kaskade caspase. Fragmentasi DNA dan isi sel, akibat dari apoptosis selanjutnya akan difagositosis oleh sel imunitas (Ali, 2008). Kematian sel terprogram ini merupakan proses penting dalam pengaturan homeostasis normal. Proses ini menghasilkan keseimbangan dalam jumlah sel jaringan tertentu melalui eliminasi sel yang rusak dan proliferasi fisiologis dan dengan demikian memelihara agar fungsi jaringan normal. Apoptosis ditandai dengan adanya kondensasi kromatin, fragmentasi sel dan fagositosis sel tersebut oleh sel tetangganya. Deregulasi apoptosis mengakibatkan keadaan patologis, termasuk proliferasi sel secara tidak terkontrol seperti dijumpai pada kanker. (Ali, 2008)

## 2.8 Mekanisme Apoptosis

Proses dasar mekanisme tersebut dapat dipahami sebagai empat komponen terpisah, yaitu *signaling*, regulasi, dan eksekusi. (Kumar, 2007). Proses yang pertama yaitu *signaling* (pemberian sinyal). Apoptosis dapat dipicu

dengan berbagai sinyal yang berkisar dari kejadian terprogram intrinsik (misalnya, pada perkembangan), kekurangan faktor tumbuh, interaksi ligan-reseptor spesifik, pelepasan granzim dari sel T sitotoksik, atau agen jejas tertentu. Apoptosis juga dapat dipicu sinyal ekstrinsik yaitu hormon, faktor pertumbuhan, dan sitokin. Sebelum terjadi kematian sel, sinyal dihubungkan dengan pathway kematian sel melalui regulasi. Ada dua metode yaitu melalui mitokondria dan melewati adapter protein (Kumar, 2007).

### 2.8.1 Mekanisme ekstrinsik

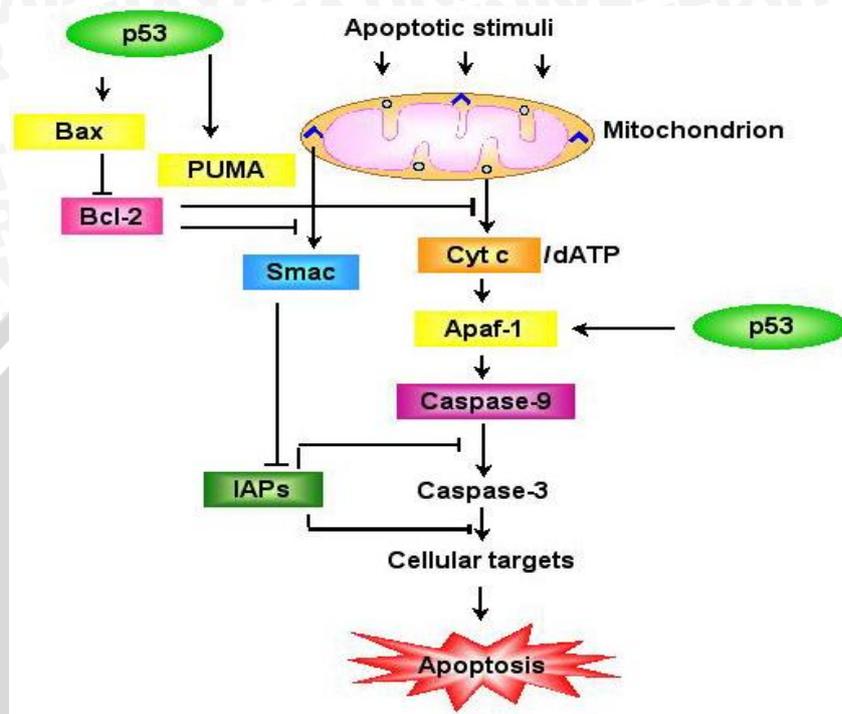
Mekanisme diawali oleh sel *surface death receptor* dari berbagai macam sel. *Death receptor* adalah anggota dari *tumor necrosis factor receptor family* (TNF) mempunyai *cytoplasmic domain* yang berisi protein interaksi disebut *death domain*, penting untuk mengirim *apoptotic signals*. Beberapa TNF receptor family tidak mempunyai *cytoplasmic death domain*, mekanisme apoptosisnya sedikit diketahui. *Death receptor* antara lain adalah Type I TNF receptor (TNFR I) dan protein yang berhubungan disebut Fas (CD95). Mekanisme apoptosis diinduksi oleh death receptor diilustrasikan dengan baik oleh Fas. Diawali *Fas ligand* (FasL) melepaskan *Fas* dari ligandnya. Molekul *Fas* menuju ke sitoplasma yang terdapat *death domain*, tempat untuk berikatan dengan adapter protein yang juga mempunyai *death domain* dan disebut FADD (*fas associated death domain*). FADD yang dilekatkan pada *death receptors* kembali berikatan dengan inaktif dari *caspase-8* (di manusia, *caspase 10*) melalui *death domain*. Multiple pro *caspase-8* molekul kemudian dibawa ke dekatnya dan mereka saling berikatan untuk mengaktifkan *caspase-8*, yang kemudian enzim tersebut akan mengaktifkan *cascade-caspase* dengan mengikat dan mengaktifkan *pro-caspase* yang lain serta mengaktifkan enzim yang melaksanakan *execution*

phase dari apoptosis. Mekanisme apoptosis dapat dihambat oleh protein yang disebut FLIP, yang berikatan dengan *procaspase-8* tetapi tidak dapat berikatan dan mengaktifkan enzim karena kurang mempunyai aktifitas enzim. Beberapa virus dan sel normal memproduksi FLIP dan digunakan untuk menghambat dan memproteksi infeksi dan memproteksi sel normal dari *Fas mediated apoptosis* (Macdonal, 2005).

### 2.8.2 Mekanisme intrinsik

Mekanisme diawali dari mitokondria yang disebabkan stimulus internal seperti kerusakan DNA dan stress oksidatif. Jalur intrinsik disebabkan oleh peningkatan permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul *pro apoptotic* ke sitoplasma. Growth factor dan *survival signal* menstimulasi produksi *anti-apoptotic members* dari *Bcl-2 family*. *Bcl-2 family* mempunyai lebih dari 20 macam protein, yang semuanya berfungsi regulasi apoptosis. Dua protein yang berfungsi anti apoptosis adalah Bcl-2 dan Bcl-X. Protein anti-apoptosis dalam keadaan normal berada disekitar membrane mitokondria dan sitoplasma. Ketika sel kehilangan kemampuan mempertahankan diri atau mengalami stress, Bcl-2 dan/atau Bcl-x akan menghilang dari membrane mitokondria dan digantikan kelompok protein pro-apoptotis seperti Bax, Bak dan Bim. Ketika Bcl-2/Bcl-x menurun, terjadi peningkatan permeabilitas membrane mitokondria menyebabkan keluarnya beberapa protein yang akan mengaktifkan *caspase cascade*. Salah satu dari protein tersebut adalah *cytochrome c*. Didalam cytosol *cytochrome c* berikatan dengan Apaf 1 (apoptosis activating factor-1) dan mengaktifkan *caspase-9*. ( Bcl-2 dan Bcl-x secara langsung menghambat aktivasi Apaf-1 dan kemudian menghilang dari sel yang menyebabkan dapat terjadi aktivasi Apaf-1). Protein mitokondria yang lain seperti *apoptosis initiating factor* (AIF) memasuki

sitoplasma yang akan berikatan untuk menetralkan berbagai macam inhibitor apoptosis. Hal tersebut akan mengaktifkan *caspase cascade* (Macdonal, 2005).



Gambar 2.1 Mekanisme apoptosis

Proses terakhir dalam apoptosis yaitu Eksekusi. Pemecahan protein oleh satu golongan protease yang baru dikenal, dinamakan *caspase*. Pada sistem eksperimental, ekspresi berlebih setiap *caspase* mengakibatkan apoptosis selular, mengesankan bahwa dalam kondisi normal, protein tersebut harus dikontrol secara ketat. Aktivasi satu atau lebih enzim *caspase* secara tak terduga menimbulkan rentetan bertingkat aktivasi *endonuklease down-stream* mengakibatkan fragmentasi DNA (Pecorico, 2005)

### 2.9 Sel MCF-7

Sel MCF-7 merupakan salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel ini pertama kali diisolasi pada tahun

1970, diperoleh dari jaringan epitel payudara dengan titik metastasis *pleural effusion breast adenocarcinoma* seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun bergolongan darah O dengan RH positif. Akronim dari MCF-7 yaitu Michigan Cancer Foundation-7.

Karakteristik sel ini antara lain resisten terhadap agen kemoterapi, karena mengekspresikan multidrug resistance transporter seperti P glycoprotein dan multidrug resistance protein. Sel ini mengekspresikan reseptor estrogen (ER+), ekspresi berlebih Bcl-2, dan tidak mengekspresikan caspase-3. Sel MCF-7 merupakan *cell line adherent*, yang akan tumbuh melekat. Sel ini dapat ditumbuhkan pada media mengandung RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) atau DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), FBS (*Fetal Bovine Serum*), dan antibiotik antimikotik.

### 2.10 Kultur Sel

Kultur sel telah banyak digunakan dalam berbagai aplikasi ilmiah saat ini, seperti genetika, biologi molekuler, dan teknik kultur jaringan. Kultur sel dimulai pertama kali pada abad ke-20 sebagai pembelajaran tingkah laku sel hewan yang bebas dari sistem variasi yang mungkin meningkat secara *in vivo* selama homeostasis normal dan dibawah tekanan dari sebuah percobaan (Freshney 2005). Kultur sel merupakan pertumbuhan sel yang dikembangkan secara *in vitro* dengan lingkungan yang disesuaikan seperti dalam tubuh manusia atau hewan. Teknik *in vitro* ini dapat digunakan dalam regulasi kandungan spesifik pada konsentrasi, waktu terpapar, dan tingkat metabolisme (Freshney, 2005).

Keuntungan kultur sel dalam pengujian sitotoksik obat adalah karakteristik sel yang digunakan homogen, lingkungan hidup kimia fisika (pH, suhu, tekanan osmotik, CO<sub>2</sub>, dan O<sub>2</sub>) dapat dikontrol, serta biaya lebih ekonomis (Freshney

2005). Keterbatasan dalam kultur sel yaitu diperlukan teknik aseptik dalam menangani kultur sel, serta dibutuhkan keterampilan dan pemahaman yang mendalam bagi peneliti untuk menganalisis permasalahan yang terjadi dalam kultur sel. Sel yang dikultur dapat terdiferensiasi, sel akan kehilangan sifat fenotip dari sel yang diisolasi, serta sel mengalami ketidakstabilan menyebabkan heterogenitas dalam pertumbuhan dan terjadi variasi ketika sel disubkultur.

Sel yang digunakan dalam kultur berasal dari jaringan asli yang ditransformasi dalam laboratorium. Sel asli yang diambil dari jaringan atau organ merupakan sel primer. Sel primer adalah sel normal yang diambil dari jaringan normal, bukan jaringan tumor. Sel primer akan ditransformasi menjadi sel tumor yang dibutuhkan untuk percobaan dengan beberapa cara, diantaranya dipaparkan dengan karsinogen kimia, radiasi ion, serta dengan transfeksi retrovirus atau DNA virus tumor. Transformasi sel primer dapat juga terjadi secara spontan. Sel primer memiliki waktu hidup yang terbatas dan mungkin menunjukkan beberapa karakteristik seperti penurunan protein dan sintesis DNA. Sel yang ditransformasi terkadang memiliki waktu hidup yang tak terbatas disebut dengan *immortal cell* atau *countinous cell*. Waktu hidup sel yang tidak terbatas membuat sel akan terus-menerus membelah, serta proses tersebut membuat sel secara kontinyu dapat dikultur.

Teknik aseptik dalam kultur sel sangat dibutuhkan untuk mengurangi kontaminan, serta untuk melindungi kultur sel dan pekerja. Adanya mikroorganisme seperti bakteri ataupun jamur yang berada di dalam kultur sel dapat menghambat pertumbuhan kultur sel. Penggunaan *laminar flow cabinet* sangat penting dalam kultur sel, selain itu dibutuhkan alat-alat dan media yang steril. Alat-alat yang digunakan dalam kultur sel disterilkan dalam autoklaf pada

suhu 121°C tekanan 1 atm selama 20 menit. Selain itu, untuk menjaga lingkungan kultur sel, *laminar flow cabinet* dibersihkan terlebih dahulu sebelum digunakan dengan menggunakan alkohol 70%, serta lingkungan disekitar kultur sel dijaga dengan bunsen (Freshney, 2005).

## 2.11 Tumbuhan Sudamala (*Artemisia Vulgaris*)

### 2.11.1 Klasifikasi Tumbuhan Sudamala

Kingdom: Plantae (Tumbuhan)

Super Divisi: Spermatophyta (Menghasilkan biji)

Divisi: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)

Kelas: Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)

Sub Kelas: Asteridae

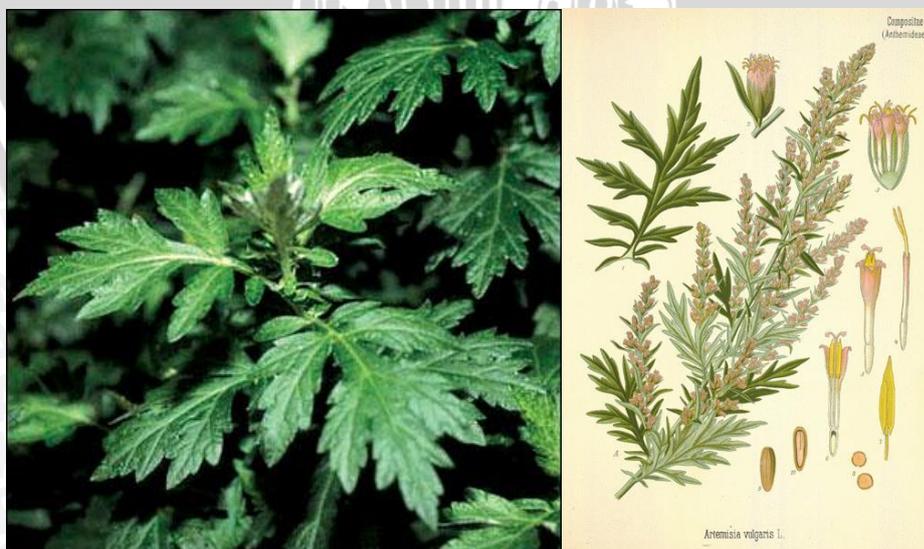
Ordo: Asterales

Famili: Asteraceae

Genus: *Artemisia*

Spesies: *Artemisia vulgaris* (Iqbal M,2011)

### 2.11.2 Morfologi dan Habitat Tumbuhan Sudamala



Gambar 2.2 Tumbuhan *Artemisia vulgaris*

Tumbuhan Sudamala merupakan tumbuhan liar yang tumbuh di lapangan terbuka. Tanaman ini tersebar luas di seluruh dunia yang terdiri dari lebih 800 spesis, dengan ketinggian 50 – 150 cm, berwarna hijau dan berbunga. Batang sudamala setengah berkayu, percabangan banyak, beralur dan berambut. Daunnya berbentuk bulat-telur dengan tepi berbagi menjari ujung meruncing, kedua permukaan daun berambut halus. Warna daun hijau, di bagian bawah warna lebih putih, duduk berseling. Bunga sudamala majemuk, kecil-kecil, warna kuning muda berbentuk bonggol tersusun dalam rangkaian berbentuk malai yang tumbuh menunduk, keluar dari ketiak daun dan ujung tangkai. Daun tumbuhan sudamala (*Artemisia vulgaris L.*) berdasarkan laporan penelitian sebelumnya mengandung senyawa saponin, flavonoida, polifenol (Judzentiene, A dan Buzelyte, J, 2006 ). Di pulau Sumatera tumbuhan ini disebut tumbuhan Baru Cina atau Sudamala. Di pulau Jawa disebut suket gajahan dan di Sunda disebut Jokot Lukutmala sedangkan di Maluku disebut Kolo. Di luar negeri dikenal dengan nama mugwort, felon herb, moxa, wormwood. Tumbuhan ini dikenal tidak hanya sebagai tanaman yang bisa di makan, kebanyakan sebagai bumbu dan sebagai sumber obat-obatan tradisional (Judzentiene,A dan Buzelyte, J, 2006).

### **2.11.3 Karakteristik Fitokimia *Artemisia v.* dan Biomekanisme Eupatilin**

Minyak menguap terdapat *Phellandrene, cadinene, thujvl alkoho), alfa-amirin, fernenol, dehydromatricaria ester, cineole, Terpinen-4-ol, beta-karyophyllene, 1-quebrachitol*. Akar dan batang mengandung *Inulin* (mengandung artemose), cabang kecil : *Oxytocin, yomogi alcohol, dan ridentin*. Daun mengandung *skopoletin* dan *isoskopoletin* (Iqbal M,2011).

Selain itu daun *Artemisia vulgaris* juga mengandung 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-methoxychromen-4-one atau bisa disebut

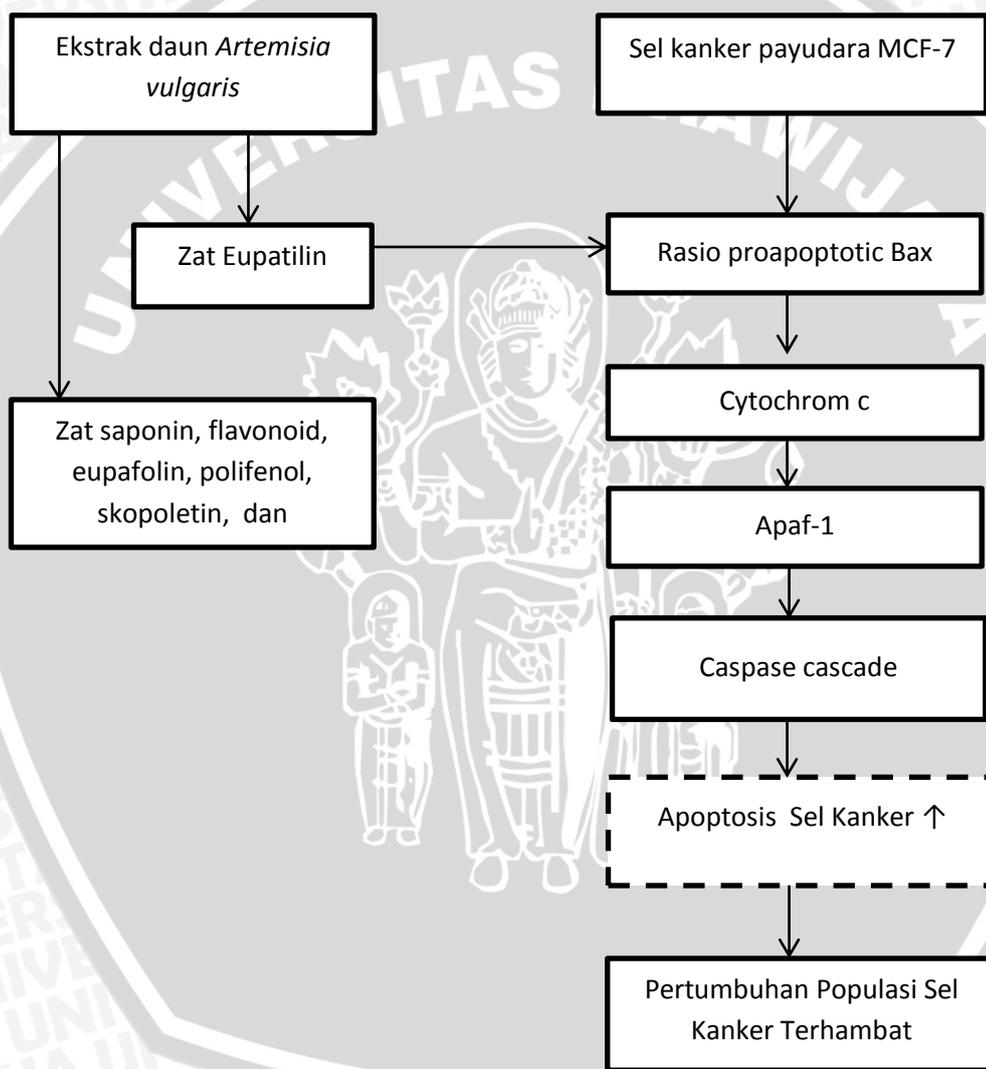
eupatilin. Menurut penelitian terdahulu, terdapat zat eupatilin rata-rata sebesar 43,8 mg per 100g daun dari genus Artemisia (Ryu S,2008). Zat aktif Eupatilin dapat menginduksi apoptosis dengan cara meningkatkan jumlah proapoptosis Bax (Shawi et al,2011) . Dengan peningkatan proapoptosis Bax maka akan menginduksi kematian sel kanker (Kim et al,2005). Dengan dihambatnya fase tersebut, maka pertumbuhan sel kanker yang tidak terkontrol diharapkan tidak akan terjadi.



BAB III

KERANGKA PIKIR DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Pikir



Didalam ekstrak daun *Artemisia vulgaris* terdapat kandungan zat eupatilin. Menurut penelitian terdahulu, zat eupatilin mampu meningkatkan rasio proapoptotic Bax. Dengan meningkatnya rasio tersebut, terjadi peningkatan

permeabilitas membran mitokondria menyebabkan keluarnya beberapa protein yang akan mengaktifkan *caspase cascade*. Salah satu dari protein tersebut adalah *cytochrome c*. Didalam cytosol *cytochrome c* berikatan dengan Apaf 1 (apoptosis activating factor-1). Hal tersebut mengaktifkan *caspase cascade* dan meningkatkan apoptosis pada sel kanker. Peningkatan apoptosis pada sel kanker akan menyebabkan pertumbuhan sel kanker terhambat.

### 3.2 Hipotesis

Ekstrak daun Sudamala (*Artemisia vulgaris*) dapat menginduksi apoptosis sel kanker MCF-7 .

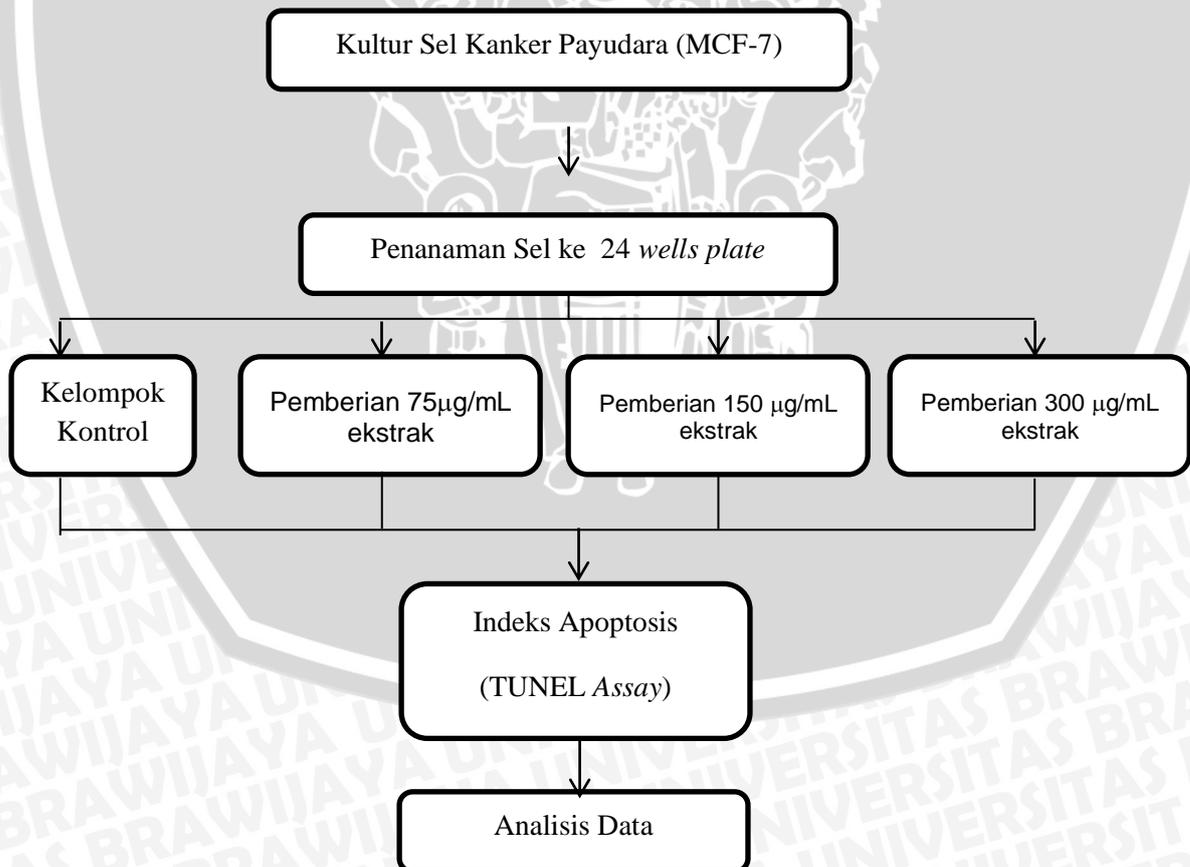


## BAB IV

## METODE PENELITIAN

## 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental*) yang dikerjakan di laboratorium secara *in vitro* dengan menggunakan rancangan percobaan *Randomized Group Post Test Only Design*. Penelitian eksperimental menggunakan penambahan ekstrak daun sudamala pada slide MCF-7 dengan 3 dosis yang berbeda dan 1 kelompok kontrol.



### Gambar 4.1 Skema penelitian

19

#### 4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah sel kanker payudara manusia dari kultur sel kanker payudara MCF7 *cell line*. Perhitungan besarnya pengulangan adalah :

$$(t-1)(r-1) \geq 15 \text{ dengan}$$

t : jumlah perlakuan,

r : jumlah ulangan (Hanafiah, 2005)

Pada penelitian ini t = 4 sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$(4-1)(r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15:3$$

$$r = 5 + 1 = 6$$

Penelitian ini dilakukan sebanyak 6 pengulangan.

#### 4.3 Penentuan Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini dibagi menjadi 2 variabel, yaitu :

##### A. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kasar (tanpa melalui proses isolasi zat) etanol daun *Artemisia vulgaris* pada dosis 75  $\mu\text{g/mL}$ , 150  $\mu\text{g/mL}$ , dan 300  $\mu\text{g/mL}$ .

##### B. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah indeks apoptosis menggunakan metode TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling).

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya, dan LPPT Jogjakarta

#### 4.5 Alat dan Bahan

##### 4.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah sebagai berikut :

##### A. Peralatan kultur sel kanker payudara (MCF7 *cell line*)

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Laminar air flow</li> <li>• autoclave</li> <li>• flask kultur</li> <li>• sentrifus dan alat vortex</li> <li>• mikropipet</li> <li>• shaker</li> <li>• beacker glass</li> <li>• eppendorf</li> <li>• disposable pipet</li> <li>• sumuran (well culture)</li> <li>• cover glass</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• stirer magnetik</li> <li>• timer</li> <li>• inkubator</li> <li>• spuit</li> <li>• membrane filter 0,2m</li> <li>• falcon</li> <li>• blue tip</li> <li>• white tip</li> <li>• yellow tip</li> <li>• neraca analitik</li> <li>• Mikroskop inverted</li> </ul>
---	--

##### B. Peralatan ekstraksi

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Satu set evaporator</li> <li>• Mortar</li> <li>• Labu destilasi</li> <li>• Gelas ekstraksi 250 ml</li> <li>• Neraca analitik</li> <li>• Pendingin spiral</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bak</li> <li>• Water bath</li> <li>• Sumber listrik</li> <li>• etanol</li> <li>• Aquades</li> <li>• Selang plastik</li> </ul>
--	--

### C. Peralatan pengukuran apoptosis

Untuk pengukuran apoptosis menggunakan TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling) Assay kit (GenScript®). 0,1% Triton X-100 dan 0,1 % Sodium sitrat. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam methanol.

#### 4.5.2 Bahan

##### A. Bahan untuk kultur sel kanker payudara (MCF7 cell line)

Sel kanker payudara (MCF-7 cell line) diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu, DMEM(Gibco), Penisilin-Streptomisin 1 %(Sigma), FBS 10% (*Fetal Bovine Serum*), Hepes, Natrium bikarbonat, HCl, Tripsin-EDTA.

##### B. Bahan untuk ekstraksi daun *Artemisia vulgaris*

Daun *Artemisia vulgaris* diperoleh dari Unit Pelaksana Teknis Materia Medica Batu, Malang, Jawa Timur.

#### 4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Indeks apoptosis dihitung dengan melihat jumlah sel apoptosis. Apoptosis adalah proses regulasi kematian sel untuk mengontrol jumlah sel dan menghilangkan sel yang rusak. Sel apoptosis mempunyai tanda-tanda kondensasi dan fragmentasi inti dan dikelilingi oleh halo, dapat dilabel dengan Tunel, yang akan mengekspresikan warna coklat pada inti sel. Penghitungan jumlah sel apoptosis yang terekspresi positif dengan cara tiap slide dihitung persentase sel apoptosis dari 5 lapangan pandang dengan pembesaran 40X, kemudian dinilai index apoptosis dengan rumus: Index apoptosis (IA) = (sel apoptosis/total sel) x 100%.

- 4.6.2 Tumbuhan sudamala yang dipakai adalah jenis *Artemisia vulgaris*. Sudamala dideterminasi dan diperoleh dari UPT Materia Medika Batu, Jawa Timur. Selanjutnya daun sudamala ini diekstrak dengan pelarut etanol.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Persiapan Medium DMEM 1 liter

1. Ditambahkan Natrium bikarbonat 2 gram
2. Ditambahkan Hepes 2 gram
3. Ditambahkan medium serbuk DMEM 10 gram untuk 1 liter
4. Dihomogenkan dengan diaduk
5. Filter media dan tampung ke botol
6. Simpan ke kulkas 4°C

##### 4.7.2 Pembuatan Medium Lengkap

1. Cairkan FBS dan pen-strep pada suhu ruangan
2. Disiapkan botol 100 ml
3. Ditambahkan FBS 10 ml
4. Ditambahkan penstrep 2 ml
5. Ditambahkan fungizone 0,5 ml
6. Ditambahkan DMEM hingga 100 ml
7. Diberi label

##### 4.7.3 Cell Thawing

1. Persiapkan DMEM
2. Ambil cryo tube berisi sel dari freezer
3. Cairkan suspensi dalam suhu ruangan hingga mencair

4. Ambil suspensi dengan mikropipet dan masukan ke dalam flask berisi medium lengkap
5. Dimasukkan ke inkubator CO<sub>2</sub> dan diamkan 1 jam.
6. Buang medium dan ditambahkan medium baru sekitar 10 ml
7. Diinkubasi dan ganti media setiap hari sampai siap dipanen

#### **4.7.4 Kultur Sel Kanker Payudara MCF-7 :**

1. Media yang ada dibuang, dan kemudian dicuci dengan media tanpa FBS
2. Buang Media
3. Ditambahkan Tripsin-EDTA sebanyak 1 ml
4. Ditambahkan media 15 ml ke dalam tabung
5. Sel MCF-7 disentrifuge 3000 rpm selama 8 menit,
6. Supernatan dibuang, kemudian pelet diresuspensi dengan medium kultur (DMEM) sebanyak 1 ml
7. Dihomogenkan

#### **4.7.5 Proses Ekstraksi daun *Artemisia vulgaris***

##### **4.7.5.1 Proses Ekstraksi**

1. Daun sudamala dicuci lalu dikeringkan
2. Lalu dihaluskan dengan diblender.
3. Ditimbang 100 gram dengan timbangan analitik.
4. Bungkus daun sudamala yang telah halus dengan menggunakan kertas saring.
5. Rendam dalam ethanol dan inapkan semalam ( $\pm$  12 jam).
6. Kemudian diteteskan pada beaker glass 20x/menit.
7. Tambahkan ethanol lagi sampai air ekstrak jernih.
8. Hasil siap dievaporasi.

#### 4.7.5.2 Proses Evaporasi

1. Pasang evaporator pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja.
2. Hasil ekstraksi dimasukkan dalam labu ekstraksi.
3. Satu set alat evaporasi diletakkan sedemikian rupa sehingga sebagian labu ekstraksi terendam aquadest pada water bath.
4. Water bath dihubungkan dengan sumber listrik dan dinaikkan suhunya sampai 70° C (sesuai dengan titik didih ethanol).
5. Ditunggu proses berjalan (pengembunan dan pemisahan di pendingin) sampai hasil evaporasi tersisa dalam labu ekstraksi.

#### 4.7.6 Hitung Sel

1. Coverslip dan slide hemocytometer (Improved Neubauer) dibersihkan
2. Ambil sel sebanyak 20  $\mu\text{L}$  dan campur dengan trypan blue dan masukkan ke dalam falcon
3. Dihomogenkan dan masukkan ke slide sebanyak 20  $\mu\text{L}$
4. Dihitung dengan mikroskop konfokal

#### 4.7.7 Starvasi

1. Coverslip dimasukkan ke dasar 24 wellsplate
2. Ditambahkan sel dengan kepadatan 50.000 per well yang telah dicampur media DMEM 0,5 %
3. Inkubasi selama 24 jam

#### 4.7.8 Pemberian Perlakuan

1. Sel yang telah distarvasi diganti dengan medium komplit

2. Dicampurkan ekstrak dan DMSO sesuai kebutuhan
2. Ditambahkan ekstrak 300 µg/mL, 150µg/mL dan 75 µg/mL dari eppendorf ke dalam well.
3. Inkubasi selama 24 jam

#### 4.7.9 Persiapan Sel

1. Fiksasi sampel dengan 4% Paraformaldehid dalam suhu ruangan selama 30 menit
2. Cuci dengan PBS
3. Inkubasi sel dengan 70 % ethanol dalam suhu 4°C selama 30 menit
4. Cuci dengan PBS sebanyak 3 kali tiap 5 menit
5. Inkubasi dengan *Blocking solution* selama 10 menit dalam suhu 25°C (*blocking solution* mengandung 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam methanol)
6. Cuci dengan PBS sebanyak 3 kali tiap 5 menit
7. Inkubasi dengan *Permeabilization solution* dalam es (2-8°C) selama 3-5 menit. (*Permeabilization solution* mengandung 0,1% Triton X-100 dan 0,1% Sodium sitrat dalam air)

#### 4.7.10 Metode TUNEL Assay (Labelling)

1. Slide dicuci 2 kali PBS setiap 5 menit
2. Tambahkan 50 µL TUNEL *Reaction Mixer* (45 µL Equilibration buffer, 1 µL biotin-11-dUTP, dan 4 µL TdT)
3. Slide dicuci dengan 3 x PBS tiap 5 menit
4. Ditambahkan 50 µL Streptavidin-HRP solution pada sampel. Inkubasi pada suasana lembab. Lindungi dari cahaya selama 30 menit pada 37°C

5. Slide dicuci dengan 3 x PBS tiap 5 menit
6. Tambahkan 50 ul DAB Working Solution (2,5 uL DAB-A dalam 50 ul H<sub>2</sub>O, 2,5 uL DAB-B, dan 2,5 uL DAB-C)
7. Slide dicuci dengan 3 x PBS tiap 5 menit
8. Diinkubasi selama 3 menit
9. Cover slip diambil dan ditempel ke object glass
10. Diamati dibawah mikroskop *cahaya*.

**4.7.11 Jadwal Penelitian**

No	Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2				Bulan 3			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<b>Tahap Persiapan</b>													
1.	Mengurus ethical clearance penelitian	■											
2.	Mengurus perijinan laboratorium												
3.	Belanja alat dan bahan penelitian		■	■									
<b>Tahap Pelaksanaan</b>													
1.	Ekstraksi Daun <i>Artemisia vulgaris</i>				■								
2.	Kultur sel kanker payudara (MCF-7)					■	■						
3.	Pengukuran indeks apoptosis							■	■	■			
4.	Analisis data										■		
<b>Tahap Penyelesaian</b>													
1.	Penyusunan laporan akhir											■	■

**4.8 Analisis Data**

Data indeks apoptosis dilakukan uji normalitas. Dan dilakukan uji normalitas data dan uji varian. Bila sebaran data normal dan varian data sama, uji hipotesis *one way anova*. Jika tidak sama, digunakan *Kruskal Wallis*. Setelah itu dilakukan uji korelasi *Spearman* . Penelitian ini bermakna bila nilai  $p < 0,05$



(Hanafiah, 2005). Seluruh teknis pengolahan data dianalisis secara komputerisasi dengan menggunakan *software statistical product and service solution* (SPSS) seri 17.



## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

#### 5.1 Hasil Penelitian

Pada penelitian ini, didapatkan data hasil penelitian, untuk masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan. Penelitian ini terdiri dari kelompok kontrol tanpa pemberian ekstrak daun sudamala dan kelompok perlakuan dengan tiga dosis berbeda dari ekstrak daun sudamala yaitu 75 µg/ml, 150 µg/ml dan 300 µg/ml selama 24 jam. Data hasil pengamatan pada kelompok kontrol dan ketiga kelompok uji yang masing-masing diberikan ekstrak etanol daun sudamala dosis 75 µg/ml, 150 µg/ml, 300 µg/ml berturut dapat dilihat pada tabel induk (lampiran 1).

##### 5.1.1 Indeks Apoptosis

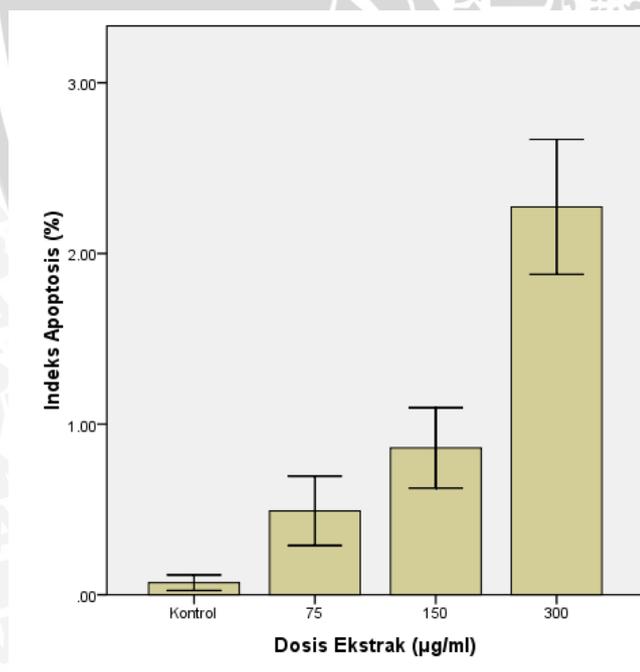
Pengukuran indeks apoptosis dilakukan ke seluruh kelompok dengan menggunakan TUNEL assay. Hasil pengukuran rata-rata indeks apoptosis pada masing-masing kelompok ditampilkan pada tabel 5.1. Penghitungan jumlah sel apoptosis yang tereksresi positif dengan cara tiap slide dihitung persentase sel apoptosis dari 5 lapangan pandang dengan pembesaran 40X, kemudian dinilai index apoptosis dengan rumus: Indeks apoptosis (IA) = (sel apoptosis/total sel) x 100%. Gambaran hasil pewarnaan TUNEL pada sel MCF-7 ditampilkan pada gambar 5.2.

Tabel 5.1 Hasil perhitungan dan statistika rata-rata indeks apoptosis pada sel MCF-7.

Dosis	Mean (%)	SD	N	p
Kontrol	0,0711	$\pm 0,0572$	6/9440	0,000 ( $p < 0,05$ )
75	0,4917	$\pm 0,2542$	33/7072	
150	0,8605	$\pm 0,2948$	41/4711	
300	2,2730	$\pm 0,4941$	55/2465	

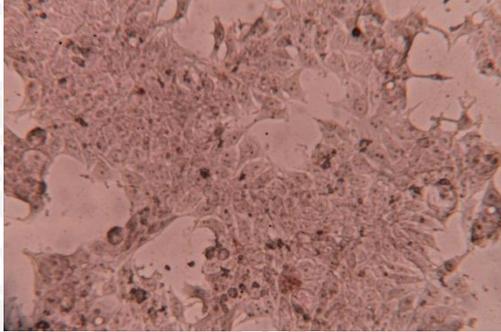
Keterangan : Dosis: konsentrasi  $\mu\text{g/ml}$  ekstrak daun sudamala. Mean : rata-rata dari persentase indeks apoptosis dengan 6 kali pengulangan. SD : standard deviation. N : sel apoptosis/total sel dalam 6 slide pengulangan

Perhitungan indeks apoptosis memberikan hasil : pada kelompok kontrol diperoleh indeks apoptosis rerata sebesar 0,0711% , sedangkan pada kelompok uji dosis 75  $\mu\text{g/ml}$ , sebesar 0,4917%, dosis 150  $\mu\text{g/ml}$  sebesar 0,8605%, dan dosis 300  $\mu\text{g/ml}$ , sebesar 2,2730%



Gambar 5.1 Grafik rata-rata indeks apoptosis pada sel MCF-7

Kontrol Sel



Pemberian Dosis 150 µg/ml



Pemberian dosis 75 µg/ml



Pemberian Dosis 300µg/ml



Gambar 5.2 Gambar representatif dari indeks apoptosis dengan pewarnaan TUNEL dengan pembesaran 40x.

Keterangan : tanda panah menunjukkan sel yang mengalami apoptosis dengan warna kecoklatan pada inti selnya.

Gambar:

I : Kontrol tanpa pemberian perlakuan

II : Perlakuan dengan ekstrak daun sudamala dengan dosis 75 µg/ml, menunjukkan sel yang mengalami apoptosis

III : Perlakuan dengan ekstrak daun sudamala dengan dosis 150 µg/ml, menunjukkan sel yang mengalami apoptosis lebih banyak daripada gambar II.

IV : Perlakuan dengan ekstrak daun sudamala dengan dosis 300 µg/ml, menunjukkan sel yang mengalami apoptosis lebih banyak daripada gambar III.

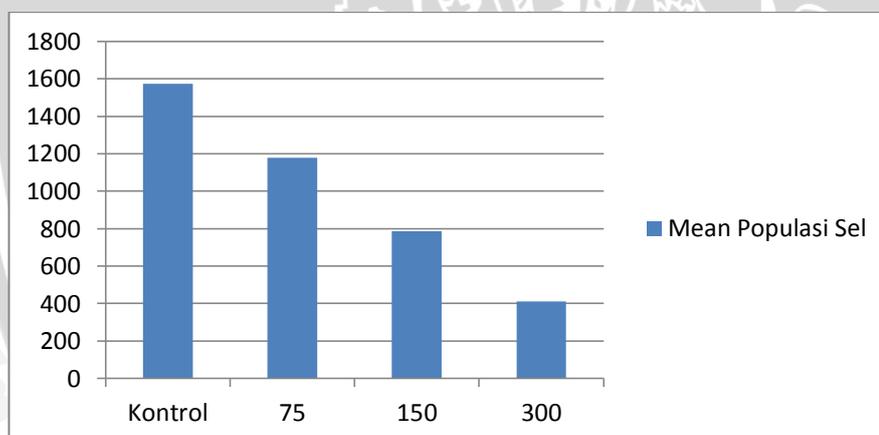
Dari gambar diatas dapat diketahui bahwa total populasi sel dalam lapang pandang semakin sedikit dengan penambahan dosis ekstrak daun sudamala.

## 5.2 Populasi Sel Kanker MCF-7

Tabel 5.2 Hasil perhitungan rata-rata populasi sel kanker MCF-7

Dosis	Mean	Persentase
Kontrol	1573,3	100 %
75 $\mu\text{g/ml}$	1178,7	75 %
150 $\mu\text{g/ml}$	785,2	50 %
300 $\mu\text{g/ml}$	410,8	26 %

Keterangan : Dosis: konsentrasi  $\mu\text{g/ml}$  ekstrak daun sudamala. Mean : rata-rata jumlah populasi sel dari setiap slide. Persentase : Persentase populasi sel setiap dosis terhadap kontrol.



Gambar 5.3 Grafik rata-rata populasi sel kanker MCF-7

Pada tabel dan grafik diatas menunjukkan penurunan populasi sel pada setiap dosis MCF-7. Pada dosis 75  $\mu\text{g/ml}$ , terjadi penurunan sebesar 25%, dosis 150  $\mu\text{g/ml}$  sebesar 50%, dan dosis 300  $\mu\text{g/ml}$ , sebesar 74% daripada kontrol sel MCF-7.

### 5.3 Analisis Data

#### 5.3.1 Uji One Way ANOVA

Dalam perhitungan hasil penelitian ini digunakan batas kepercayaan 95%. Data dianalisis menggunakan SPSS 17 for Windows. Uji statistik data menggunakan One-way ANOVA karena dalam penelitian ini data yang digunakan bersifat rasio serta memiliki satu variabel dependen dan satu variabel independen dengan beberapa kelompok berbeda (dosis ekstrak daun sudamala).

Uji normalitas data indeks apoptosis dengan uji Saphiro-Wilk, dan menunjukkan bahwa data terdistribusi normal(lampiran 2). Sedangkan uji homogenitas varian menunjukkan bahwa data tidak homogen. Oleh karena data menunjukkan data tidak homogen, maka dari itu perlu dilakukan transformasi data. Setelah melakukan transformasi data, data menjadi homogen. Data ini dapat dilihat di tabel yang ada di lampiran 3. Analisis yang dilakukan dengan one way ANOVA memberikan hasil  $p = 0.000$  ( $p < 0,05$ ) antara kelompok kontrol dan kelompok uji sehingga dapat disimpulkan bahwa paling tidak terdapat perbedaan indeks apoptosis yang signifikan antara dua kelompok.

#### 5.3.2 Analisis Pengujian Berganda

Analisis Post Hoc Multiple comparation (Tukey HSD) dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh pemberian ekstrak terhadap apoptosis sel MCF-7.

Hasil uji dapat dilihat pada tabel berikut ini.

Tabel 3 Tabel uji pengujian berganda indeks apoptosis pada sel MCF-7

Perbandingan antar perlakuan	Nilai signifikansi	Kesimpulan	
Kontrol	75	0.000	Signifikan

	150	0.000	Signifikan
	300	0.000	Signifikan
75	Kontrol	0.000	Signifikan
	150	0.073	-
	300	0.000	Signifikan
150	Kontrol	0.000	Signifikan
	75	0.073	-
	300	0.000	Signifikan
300	Kontrol	0.000	Signifikan
	75	0.000	Signifikan
	150	0.000	Signifikan

Dari hasil uji pengujian berganda menunjukkan bahwa terdapat perbedaan indeks apoptosis pada sel MCF-7 secara nyata antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan berbagai dosis ( $p=0,000$ ). Hal ini berlaku juga pada kelompok dosis 300  $\mu\text{g/ml}$  dengan kelompok kontrol, 75  $\mu\text{g/ml}$  dan 150  $\mu\text{g/ml}$  ( $p=0,000$ ). Antara kelompok dosis 75  $\mu\text{g/ml}$  dengan 150  $\mu\text{g/ml}$  memberikan nilai yang berbeda ( $p=0,073$ ), dan tidak lagi menunjukkan perbedaan yang signifikan.

### 5.3.3 Uji Korelasi

Untuk mengetahui besarnya hubungan dan pengaruh dari pemberian ekstrak daun sudamala terhadap apoptosis sel MCF-7, maka digunakan uji korelasi Spearman (lampiran 4). Berdasarkan hasil analisis tersebut dapat diketahui bahwa pada analisis korelasi diperoleh angka signifikansi 0,000 ( $p<0,05$ ) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan antara pemberian ekstrak daun

sudamala terhadap indeks apoptosis sel MCF-7. Besar korelasi  $R = 0,948$  menunjukkan bahwa semakin meningkat pemberian dosis ekstrak maka indeks apoptosis sel MCF-7 cenderung meningkat.



## BAB VI

## PEMBAHASAN

Berdasarkan penggunaan daun sudamala sebagai antikanker secara empiris, maka dilakukan penelitian ini sebagai salah satu usaha untuk membuktikan kebenaran penggunaan (evidence based) daun sudamala sebagai anti kanker khususnya kanker payudara. Apoptosis adalah proses penting untuk menjaga homeostasis dari sel. Banyak obat kemoterapi pada sel kanker, yang mekanismenya menginduksi apoptosis. Pada penelitian-penelitian sebelumnya, diketahui bahwa zat eupatilin mampu menghambat pertumbuhan dari sel kanker (Kim et al., 2005b; Lee et al., 2008). Eupatilin (5,7-dihydroxy-3',4', 6-trimethoxyflavone) adalah salah satu flavonoid. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa eupatilin mampu menginduksi apoptosis sel kanker payudara MCF10A-ras. MCF10A-ras adalah sel payudara normal MCF10A yang ditransformasi menjadi sel kanker. Mekanisme pada penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa zat eupatilin mampu meningkatkan rasio proapoptosis Bax dan menurunkan anti-apoptosis Bcl-2 sesuai dosis tertentu (Kim et al, 2004) dan meregulasi jalur Raf/MEK/Erk *signaling transduction* (Kim et al, 2007).

Pada penelitian sebelumnya, zat eupatilin telah diteliti dan ada pada daun *Artemisia princeps*. Penelitian itu menjelaskan bahwa kandungan zat eupatilin yang ada pada daun tersebut rata-rata sekitar 43,8mg per 100g daun (Ryu,2008). Berdasarkan hal tersebut, diduga bahwa daun sudamala yang mengandung zat eupatilin juga memiliki potensi untuk menginduksi apoptosis pada sel kanker payudara MCF-7. Penelitian ini menggunakan dosis ekstrak

etanol daun sudamala sebesar 75 µg/mL, 150 µg/mL, dan 300 µg/mL. Hasil pengamatan secara mikroskopik menunjukkan bahwa ekstrak daun sudamala untuk menginduksi apoptosis menunjukkan hasil yang sangat menarik. Peningkatan dosis yang diberikan pada sel menunjukkan peningkatan jumlah apoptosis secara signifikan ( $p < 0,05$ ). Dari hasil analisis data dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan antara kontrol dengan dosis perlakuan. Dosis 300 µg/mL ekstrak memberikan perbedaan yang signifikan dibanding dengan kelompok lain.

Hal ini mungkin berkaitan dengan zat eupatilin yang terkandung dalam daun Sudamala (*Artemisia vulgaris*) mampu meningkatkan propapoptosis Bax (Shawi et al, 2011). Dengan meningkatnya rasio tersebut, terjadi peningkatan permeabilitas membran mitokondria menyebabkan keluarnya beberapa protein yang akan mengaktifkan *caspase cascade*. Salah satu dari protein tersebut adalah *cytochrome c*. Didalam cytosol *cytochrome c* berikatan dengan Apaf 1 (apoptosis activating factor-1). Hal tersebut mengaktifkan caspase 9. Selanjutnya baik caspase 8 maupun caspase 9 akan mengaktifasi caspase 3, 6 atau 7. Pada penelitian sel kanker kolon, eupatilin mampu menghambat caspase-3. Mekanisme apoptosis pada sel MCF-7 tidak melalui aktivasi caspase 3 karena pada MCF-7 caspase 3 telah termutasi, sehingga dimungkinkan ekstrak sudamala menginduksi apoptosis lewat aktivasi caspase 6 atau caspase 7. Untuk ini kiranya masih perlu diteliti lebih lanjut.

Dari hasil data penelitian ini, peningkatan dosis ekstrak daun sudamala memang mampu meningkatkan indeks apoptosis, tetapi indeks apoptosis tersebut masih dapat dikatakan relatif kecil untuk menginduksi apoptosis. Penelitian lain yang menggunakan eupatilin pada sel hati menunjukkan bahwa

eupatilin juga memiliki sifat *cytoprotective*. Eupatilin menghambat aktivasi *bile acid-induced* dari *mitogen-activated protein kinase (MAPKs)* dan *c-Jun N-terminal kinase (JNK)*. Eupatilin yang menghambat *JNK* memiliki pengaruh terhadap penghambatan *caspase 8 cleavage* (Park,2006). Penelitian yang lain zat flavonoid lain seperti eupafolin yang terkandung dalam daun sudamala juga mempengaruhi pembengkakan mitokondria (Hererrias,2010). Perubahan mitokondria adalah salah satu tanda morfologis dari proses nekrosis. Dalam hal ini tidak menutup kemungkinan ekstrak daun sudamala juga mempengaruhi kematian sel melalui mekanisme nekrosis.

Ekstrak daun sudamala adalah ekstrak yang menarik karena variasi aktivitas biologinya khususnya anti kankernya. Hasil ini dapat dilihat dari hasil data bahwa total populasi sel berkurang setiap penambahan dosis ekstrak. Penelitian lebih lanjut diperlukan apakah kematian pada sel kanker ataupun berkurangnya populasi sel disebabkan oleh mekanisme apoptosis atau mekanisme lain seperti aktivitas anti proliferasi sel. Pada penelitian sebelumnya, zat aktif eupatilin juga dapat menghambat proliferasi sel kanker melalui mekanisme penghambatan siklus sel. Tahapan-tahapan dalam siklus sel antara lain G1 (*presynthetic*) yaitu sel menyiapkan diri untuk sintesis DNA dan biosintesis RNA dan protein. Selanjutnya dalah fase S (*DNA Synthesis*) yaitu replikasi DNA dan sintesis histone, pada fase akhir DNA mengandung sel ganda dan replikasi kromosom. Kemudian fase G2 (*premitotic*) yaitu sel menyiapkan diri untuk membelah, replikasi kompleks DNA dengan protein dan biosintesis. Dilanjutkan dengan fase M yaitu saat pembelahan inti dan sitoplasma menjadi 2 sel (Kumar,2007). Eupatilin menghambat siklus sel melalui penghambatan fase G2/M pada siklus sel (Kim et al,2005). Penelitian lain yang menggunakan ekstrak

daun *Artemisia vulgaris* mampu menurunkan viabilitas sel MCF-7. Hal ini tidak menutup kemungkinan bahwa ekstrak daun sudamala juga mampu menghambat *cell growth* melalui aktivitas antiproliferasi sel.

Dari penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak etanol dari *Artemisia vulgaris* memiliki sitotoksisitas yang cukup tinggi terhadap sel kanker. Hal ini ditunjukkan pada penelitian terhadap sel HepG-2 dan Hep-2. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak *Artemisia vulgaris* adalah yang paling tinggi bila dibandingkan dengan *A. annua*, *A. campestris*, *A. chamaemelifolia*, *A. fragrans*, *A. incana*, dan *A. persica* (Mashhadian et al, 2009).

Dalam penelitian ini perlu diteliti lebih lanjut apakah induksi apoptosis dan kematian oleh ekstrak daun sudamala dikarenakan oleh eupatilin itu sendiri atau merupakan efek gabungan atau *multiple agents* yang terkandung didalamnya. Zat lain seperti artemisinin yang terkandung dalam daun sudamala, selain terbukti untuk anti malaria, juga memiliki aktivitas anti kanker (Woong, 2006). Dari penelitian ini telah dapat diketahui bahwa indeks apoptosis mulai meningkat sejak pemberian ekstrak daun sudamala (*Artemisia vulgaris*) kadar 75 µg/mL pada sel MCF-7. Namun dalam penelitian ini masih belum diperoleh dosis optimal yang bila ditingkatkan tidak memberi efek lebih baik dan memiliki efek samping minimal. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan karena aktivitas antikanker pada daun sudamala memiliki potensi untuk dikembangkan.

## BAB 7

## PENUTUP

## 7.1 Kesimpulan

1. Ekstrak daun sudamala (*Artemisia vulgaris*) dapat menginduksi apoptosis pada sel MCF-7 dengan hasil relatif kecil yaitu pada kelompok uji dosis 75 µg/ml, sebesar 0,4917%, dosis 150 µg/ml sebesar 0,8605%, dan dosis 300 µg/ml, sebesar 2,2730%.
2. Peningkatan dosis dari ekstrak daun sudamala (*Artemisia vulgaris*) mampu meningkatkan apoptosis pada sel MCF-7.
3. Ekstrak daun sudamala mampu menurunkan total populasi sel kanker MCF-7. Pada dosis 75 µg/ml ekstrak, terjadi penurunan sebesar 25%, dosis 150 µg/ml sebesar 50%, dan dosis 300 µg/ml sebesar 74% dari kontrol sel MCF-7.

## 7.2 Saran

1. Perlu diteliti lebih lanjut apakah induksi apoptosis oleh ekstrak daun sudamala adalah dikarenakan eupatilin itu sendiri atau merupakan efek gabungan senyawa yang terkandung didalamnya.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang mekanisme molekular yang berperan dalam kematian sel yang dapat melalui mekanisme apoptosis, nekrosis, maupun antiproliferatif.

3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam tahap-tahap *drugs approval*, melalui tahap preklinis yaitu tes pada populasi hewan coba untuk mengetahui *safety*, *biological activity* dan formulasi obat.



## DAFTAR PUSTAKA

- Ali, Ahsan. 2008. Molecular Mechanisms of Apoptosis. Brief Review. *EurAsian Journal of BioMedicine* Vol. 1 No. 5: 19-23.
- Bai M, Agnantis N, Kamina S, Demou A, Zagorinakou P, Katsaraki A et al P.2001. *In vivo cell kinetics in breast carcinogenesis*. *Breast cancer res* 3: 276 - 83.
- Bunrathep S, Songsak T, Ruangrunsi N.2005. *Terpenoid Constituents from Leaves and Cell Cultures of Artemisia vulgaris var. Indica And Application of biotechnological Techniques to IncreaseDavanone Level*. *Thai J. Pharm, Sci*, 29 (3): 147 – 153.
- Candra A. 2010. Herbal China Percepat Penyembuhan Kanker. (<http://health.kompas.com/read/2010/08/20/14341837/Herbal.China.Percepat.Penyembuhan.Kanker>. Diakses tanggal 28 Januari 2011).
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI).2009.*Aktivitas Fisik dan Diet Seimbang Mencegah Kanker*. Jakarta : Depkes RI
- Diyas AK.2013. *Ekstrak Daun Suket Gajahan (Artemisia vulgaris) sebagai Antiproliferatif pada Sel Kanker Payudara MCF-7*. Malang: Universitas Brawijaya
- Fattaneh A, Tavassoli, Devilee P.2003. *Pathology & Genetics, Tumours of the Breast and Female Genetical Organs*. Hal : 10-19
- Hanafiah. 2005. *Statistik Kedokteran*. Jakarta: Bumi Cipta
- Herrerias T, Oliveira A, Belem ML.2010. *Effects of natural flavones on membrane properties and citotoxicity of HeLa cells*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*
- Iqbal M. 2011. <http://ccrcfarmasiugm.wordpress.com/ensiklopedia/ensiklopedia-tanaman-anti-kanker/ensiklopedia-4-2/mungsi-arab-artemisia-vulgaris-l/>. Diakses tanggal 5 Oktober 2011
- Johansson D, Kosova E, Moharer J, Ljuslinder I,Brannstrom T, Johansson A, Benham-Mothlag P. 2009. *Expression of Verotoxin-1 Receptor Bg3 in Breast Cancer Tissue and Verotoxin-1 Signal Transduction to Apoptosis*. *Bmc Cancer* 9: 6-7
- Judzentiene A dan Buzelyte J.2006.*Chemical composition of essential oils of Artemisia vulgaris L. ( mugwort ) from North Lithuania*. *Chemija T* 17 : 1,12–15
- Kim DH, Na HK, Oh TY, Kim WB, Surh YJ.2004. *Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from Artemisia plants, induces cell cycle arrest in ras-transformed human mammary epithelial cells*. *Biochem. Pharmacol.*, 68(6): 1081-1087.

- Kim MJ, Kim DH, Na HK, Oh TY, Shin CY, Surh Ph DPYJ .2005. *Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from Artemisia plants, induces apoptosis in human gastric cancer (AGS) cells*. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol, 24: 261-269.
- Macdonald F, Ford C.H.J & Casson A.G.2005. *Molecular biology of Cancer*, 2nd
- Mashhadian NV, Emami SA, Oghazia MB. 2009. *The Cytotoxicity Evaluation of Seven Species of Artemisia on Human Tumor Cell Lines*. Pharmacologyonline 1: 229-242
- Park SC, Yoon JH, Kim W, Gwak GY, Kim KM, Lee SH.2006. *Eupatilin attenuates bile acid-induced hepatocyte apoptosis*. Journal Gastroenterology 41: 772-8
- Pecorico L.2005.*Molecular biology of cancer, mechanism, targets and therapeutics*. New york: Oxford university press inc.Hlm 4-9.
- Ryu S.2008.*Environment Variation of Available Component in Mugwort (Artemisia princeps Pamp.)*.Korean Journal International Agricultural.20 (1): 40-46
- Shawi AA, Rasul A, Khan M,Iqbal F,Tonghui M..2011. *Eupatilin: A flavonoid compound isolated from the artemisia plant, induces apoptosis and G2/M phase cellcycle arrest in human melanoma A375 cells*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 5 : 582-588.
- Sjamsuhidayat.2004. *Buku Ajar Ilmu Bedah*. Jakarta: EGC
- UICC (International Union Against Cancer).2002. *Breast Tumours. TNM Classification of Malignant Tumours*. New York : Wiley-Liss: 131-141.
- Woong N . 2006. *Effects of artemisinin and its derivatives on growth inhibition and apoptosis of oral cancer cells*. Head and Neck vol 29 : 335 - 340

**LAMPIRAN 1 Data Pengamatan Mikroskopik**

Kontrol	
Apoptosis	Total Sel
0	133
0	181
0	247
0	376
1	247
Apoptosis	Total Sel
0	256
1	525
0	375
0	274
0	471
Apoptosis	Total Sel
0	321
0	274
0	171
0	375
1	451
Apoptosis	Total Sel
0	271
0	175
0	482
0	272
0	543
Apoptosis	Total Sel
0	272
0	402
0	501
1	378
0	313
Apoptosis	Total Sel
1	242
0	151
1	198
0	312
0	251

75	
Apoptosis	Total Sel
1	222
1	171
2	121
2	136
2	171
Apoptosis	Total Sel
1	223
2	147
1	371
2	251
1	275
Apoptosis	Total Sel
1	241
2	312
1	471
1	125
0	134
Apoptosis	Total Sel
1	371
2	251
0	141
0	125
1	198
Apoptosis	Total Sel
1	341
2	471
0	112
1	251
2	241
Apoptosis	Total Sel
1	241
1	215
1	198
0	254
1	291

150	
Apoptosis	Total Sel
2	57
1	59
4	222
3	361
2	74
Apoptosis	Total Sel
1	150
2	187
1	136
0	107
2	181
Apoptosis	Total Sel
1	167
1	181
0	121
2	196
1	166
Apoptosis	Total Sel
2	171
3	182
1	141
0	132
2	147
Apoptosis	Total Sel
1	121
2	184
1	131
1	152
0	101
Apoptosis	Total Sel
2	189
1	145
0	156
1	171
1	123



300	
Apoptosis	Total Sel
2	86
1	69
3	116
4	61
1	37
Apoptosis	Total Sel
3	87
2	65
1	54
2	71
1	67
Apoptosis	Total Sel
1	64
2	83
3	112
1	105
2	93
Apoptosis	Total Sel
3	151
1	71
2	101
1	62
1	59
Apoptosis	Total Sel
1	103
1	71
2	101
1	83
3	91
Apoptosis	Total Sel
2	102
3	96
1	69
3	81
1	54



**LAMPIRAN 2 Uji Normalitas**

**Tests of Normality**

	Dosis Ekstrak (µg/ml)	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Indeks Apoptosis (%)	Kontrol	.241	6	.200*	.896	6	.349
	75	.272	6	.187	.816	6	.081
	150	.263	6	.200*	.867	6	.215
	300	.231	6	.200*	.895	6	.347

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

**LAMPIRAN 3 Uji Homogenitas**

**Test of Homogeneity of Variances**

trn\_apopt

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.471	3	20	.706

**LAMPIRAN 4 Uji Anova**

**ANOVA**

trn\_apopt

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.982	3	1.661	69.930	.000
Within Groups	.475	20	.024		
Total	5.456	23			



LAMPIRAN 5 Uji Post Hoc

Multiple Comparisons

trn\_apopt  
Tukey HSD

(I) Dosis Ekstrak (µg/ml)	(J) Dosis Ekstrak (µg/ml)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	75	-.44840*	.08897	.000	-.6974	-.1994
	150	-.68090*	.08897	.000	-.9299	-.4319
	300	-1.26389*	.08897	.000	-1.5129	-1.0149
75	Kontrol	.44840*	.08897	.000	.1994	.6974
	150	-.23250	.08897	.073	-.4815	.0165
	300	-.81549*	.08897	.000	-1.0645	-.5665
150	Kontrol	.68090*	.08897	.000	.4319	.9299
	75	.23250	.08897	.073	-.0165	.4815
	300	-.58298*	.08897	.000	-.8320	-.3340
300	Kontrol	1.26389*	.08897	.000	1.0149	1.5129
	75	.81549*	.08897	.000	.5665	1.0645
	150	.58298*	.08897	.000	.3340	.8320

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

LAMPIRAN 6 Uji Korelasi Spearman

Correlations

			Dosis Ekstrak (µg/ml)	trn_apopt
Spearman's rho	Dosis Ekstrak (µg/ml)	Correlation Coefficient	1.000	.948**
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	24	24
trn_apopt	trn_apopt	Correlation Coefficient	.948**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	24	24

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Angga Dewantara

NIM : 0910710033

Program Studi : Program Studi Pendidikan Dokter

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 26 Februari 2013

Yang membuat pernyataan

Angga Dewantara

NIM. 0910710033



**KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 074/EC/KEPK-S1- JK / 03 / 2012

Setelah Tim Etik Penelitian Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan :

- Judul : Ekstrak Daun Suket Gajahan (*Artemisia vulgaris*) Sebagai Antiproliferasi dan Proapoptosis pada Sel Kanker Payudara MCF-7
- Peneliti : Angga Dewantara NIM : 0910710033  
Achmad Diyas K NIM : 0910710022  
Vidi Prasetyo Utomo NIM : 0910710128  
Yurike Mandrasari NIM : 105070104121001  
Yosephine Adisti W NIM : 105070104111014
- Unit / Lembaga : Jurusan Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
- Tempat Penelitian : Laboratorium Biomedik, Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.

Malang, 01 MAR 2012



An. Ketua  
Koordinator Divisi I

Prof. Dr. dr. Teguh W. Sardjono, DTM&H, MSc, SpParK  
NIP. 19520410 198002 1 001