

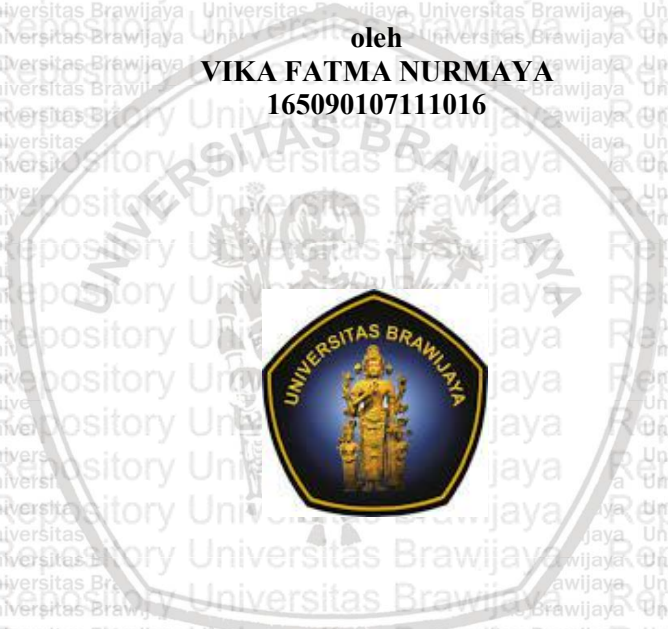


**PENGARUH EKSTRAK ETANOLIK DAUN TAPAK LIMAN
(*Elephantopus scaber*) SEBAGAI AGEN ANTIKANKER PADA SEL
KANKER PAYUDARA T47D**

SKRIPSI

oleh

**VIKA FATMA NURMAYA
165090107111016**



URUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

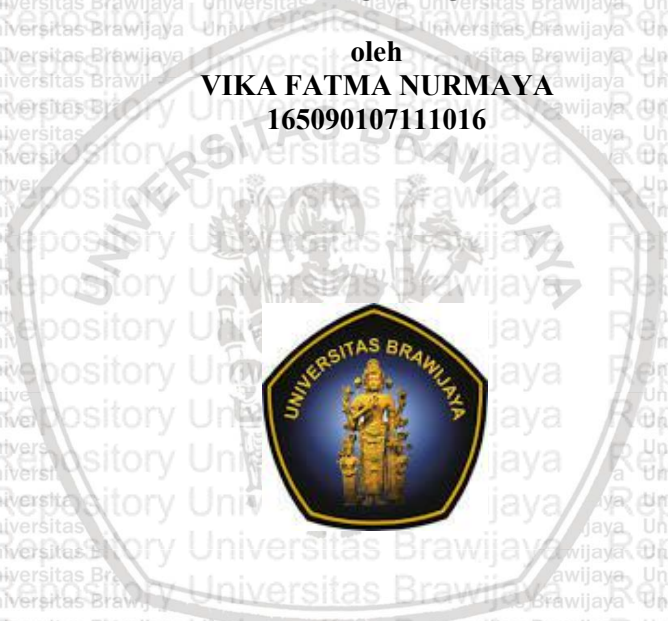
2020

**PENGARUH EKSTRAK ETANOLIK DAUN TAPAK LIMAN
(*Elephantopus scaber*) SEBAGAI AGEN ANTIKANKER PADA SEL
KANKER PAYUDARA T47D**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sain dalam
Bidang Biologi**

**oleh
VIKA FATMA NURMAYA
165090107111016**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2020**

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI
PENGARUH EKSTRAK ETANOLIK DAUN TAPAK LIMAN
(*Elephantopus scaber*) SEBAGAI AGEN ANTIKANKER PADA SEL
KANKER PAYUDARA T47D

VIKA FATMA NURMAYA
165090107111016

Telah dipertahankan di depan majelis penguji pada tanggal 6 juli 2020 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui,
Pembimbing

Prof. Dr. Ir. M. Sasmito Djati, MS
NIP. 196103041991031001

Mengetahui

Ketua Program Studi S-1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas



Dian Siswanto, S.Si., M.Sc., M.Si., Ph.D.

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Vika Fatma NurMaya

NIM : 165090107111016

Jurusan : Biologi

Penulis berjudul : Pengaruh Ekstrak Etanolik Daun Tapak Liman (*Elephantopus Scaber*) Sebagai Agen Antikanker Pada Sel Kanker Payudara T47D

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini benar-benar karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Proposal ini semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi.
2. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa isi Proposal saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 21 Juli 2020

Yang menyatakan



Vika Fatma NurMaya
165090107111016





PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Naskah skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulisan. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkan.



PENGARUH EKSTRAK ETANOLIK DAUN TAPAK LIMAN (*Elephantopus scaber*) SEBAGAI AGEN ANTIKANKER PADA SEL KANKER PAYUDARA T47D

Vika Fatma NurMaya· M. SasmitoDjati

JurusanBiologi, FakultasMatematikadanIlmuPengetahuanAlam

UniversitasBrawijaya Malang

2020

ABSTRAK

Kanker payudara merupakan suatu pertumbuhan sel yang abnormal pada jaringan payudara. Tapak liman mempunyai potensi yang dapat dikembangkan sebagai antikanker. Perlakuan ekstrak etanolik daun tapak liman terhadap sel T47D menunjukkan terjadinya apoptosis dengan adanya perubahan morfologi sel. Tujuan dilaksanakan penelitian adalah untuk mengetahui bagaimana pengaruh ekstrak etanolik daun tapak liman (*Elephantopus scaber*) pada uji siklus sel, apoptosis, dan Bcl-Bax terhadap sel kultur T47D. Metode yang digunakan dengan pembuatan simplisia daun tapak liman, ekstraksi, treatment ekstrak daun tapak liman, uji siklus sel T47D, uji apoptosis, dan uji Bcl-Bax serta dilakukan analisis data. Pemberian treatment ekstrak etanolik daun tapak liman pada uji siklus sel T47D dapat mengalami penghambatan pada pemberian dosis 3 dengan rendahnya nilai yang didapat pada *cell cycle arrest* dalam fase S dan G2/M. Secara signifikan berkurangnya pada sel T47D yang diberi perlakuan dosis 3 (75 µg/ml) menunjukkan bahwa siklus sel dapat menghambat. Apoptosis pada pemberian dosis 2 (150 µg/ml) didapatkan hasil yang optimal pada tahap apoptosis awal dan akhir dengan treatment dosis 2 mengalami apoptosis secara efektif dalam sel-sel T47D. Bcl-Bax terdapat ekspresi protein pro-apoptosis Bax pada semua perlakuan. Uji protein Bcl-Bax didapat nilai paling tinggi pada perlakuan dosis 3 (75 µg/ml).

Kata kunci : Tapak liman, sel T47D, kanker payudara, uji apoptosis, siklus sel, Bcl-Bax.

EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT OF TAPAK LIMAN LEAF (*Elephantopus scaber*) AS ANTICANKER AGENT IN CELL T47D BREAST CANCER

Vika Fatma NurMaya¹, M. SasmitoDjati

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

2020

ABSTRACT

Breast cancer is an abnormal cell growth in breast tissue. Tapak liman has the potential to be developed as an anticancer. The ethanolic extract of tapak liman leaves on T47D cells showed apoptosis with changes in cell morphology. The purpose of the research was to find out how the effect of the ethanolic extract of tapak liman (*Elephantopus scaber*) leaves on cell cycle test, apoptosis, and Bcl-Bax on T47D culture cells. The method used is by making limis tread leaf simplicia, extraction, tapak liman leaf extract treatment, T47D cell cycle test, apoptosis test, and Bcl-Bax test and data analysis. The treatment of ethanolic extract of liman tread leaves in the T47D cell cycle test can be inhibited by administering dose 3 with the low value obtained in cell cycle arrest in S and G2 / M phases. Significantly reduced T47D cells treated with a dose of 3 (75 µg / ml) showed that the cell cycle could inhibit. Apoptosis at the administration of dose 2 (150 µg / ml) obtained optimal results at the initial and final apoptosis stages with a dose 2 treatment undergoing apoptosis effectively in T47D cells. Bcl-Bax contained expression of pro-apoptotic protein Bax in all treatments. Bcl-Bax protein test obtained the highest value at treatment dose 3 (75 µg / ml).

Keywords: Tapak liman, T47D cells, breast cancer, apoptosis, cell cycle, Bcl-Bax

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT atas limpahan berkah, karunia dan ridhonya sehingga skripsi yang berjudul **“Pengaruh Ekstrak Etanolik Daun Tapak Liman (*Elephantopus Scaber*) Sebagai Agen Antikanker Pada Sel Kanker Payudara T47D ”** merupakan syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

Penyusunan skripsi ini tidak akan berhasil tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Maka dari itu dengan melalui tulisan penulis ini mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. M. Sasmito Djati, MS selaku dosen pembimbing yang telah banyak memberikan saran, arahan dan, nasihat sehingga penyusunan skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik.
2. Rahdian Mahendra yang selalu memberi dukungan dan doa hingga terselesainya penelitian skripsi ini.
3. Kedua orang tua tercinta yang senantiasa mendoakan, memotivasi dan dukungan.

Disadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih belum sempurna baik tulisan maupun bahasanya. Oleh karena itu, diharapkan kritik dan saran yang membangun untuk menjadi acuan dan bekal pada waktu yang akan datang.

Demikian disampaikan terima kasih.

Malang, 6 juli 2020

Vika Fatma NurMaya

165090107111016

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN PENGESAHAN	i
HALAMAN PERNYATAAN	ii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1.. Latar Belakang	1
1.2.. Rumusan Masalah	3
1.3.. Tujuan	3
1.4.. Manfaat	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1.. Tapak Liman (<i>Elephantopus scaber</i>)	4
2.2.. Kanker Payudara	5
2.3.. Apoptosis sel	6
2.4.. Cell line T47D	6
2.5.. Medium RPMI	6
BAB III METODE PENELITIAN	8
3.1 Waktu dan Tempat	8
3.2 Pembuatan simplisia daun tapak liman	8
3.3 Ekstraksi daun tapak liman <i>Elephantopus scaber</i>	9
3.4 Kultur sel T47D dan pembuatan media RPMI	9

vi



3.5	Treatment ekstrak daun tapak liman <i>Elephantopus scaber</i>	9
3.6	Uji Apoptosis T47D.....	10
3.7	Uji Siklus sel T47D.....	10
3.8	Uji Bcl dan Bax.....	11
3.9	Analisis data.....	11
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....		12
4.1	Hasil Treatment Ekstrak Etanolik Daun Tapak Liman pada Siklus Sel	12
4.2	Hasil Treatment Ekstrak Daun Tapak Liman pada Uji Apoptosis.....	14
4.3	Hasil Treatment Ekstrak Daun Tapak Liman Pada Uji Bcl-Bax.....	16
BAB V PENUTUP.....		18
5.1	Kesimpulan.....	18
5.2	Saran.....	18
DAFTAR PUSTAKA.....		19
DAFTAR LAMPIRAN.....		22

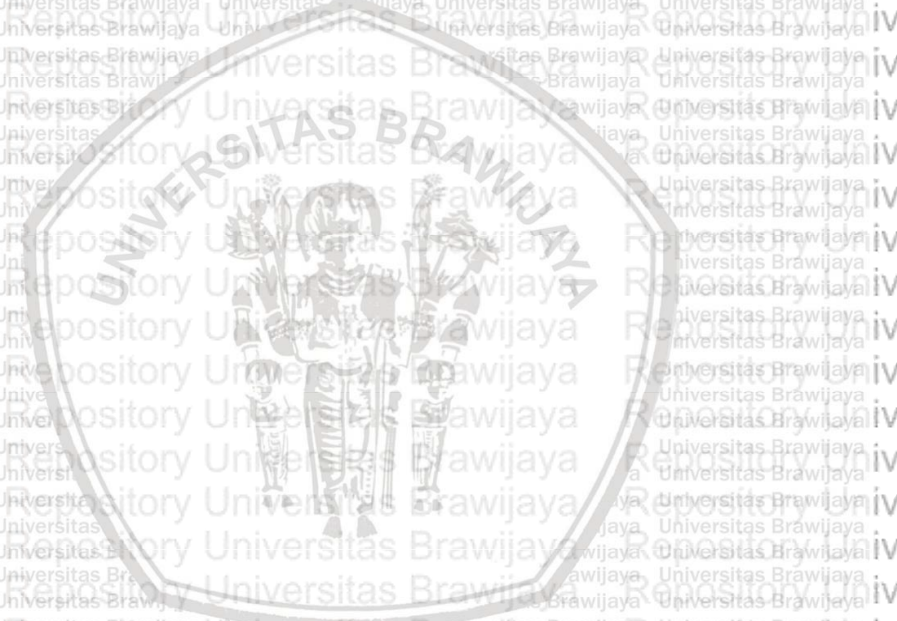


DAFTAR TABEL

Nomor

Halaman

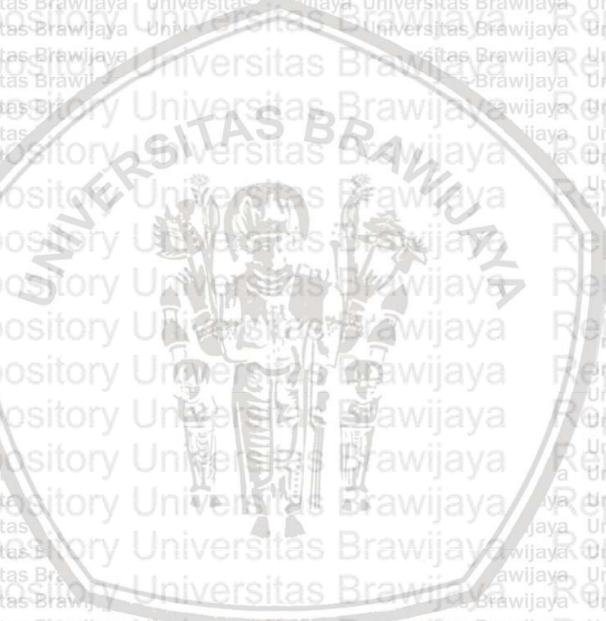
1. Kelompok perlakuan..... 14





DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1.... Daun tapak liman (<i>Elephantopus scaber</i>).....	5
2.... Uji siklu sel T47D	13
3.... Uji apoptosis T47D	14
4.... Uji Bax-Bcl	17





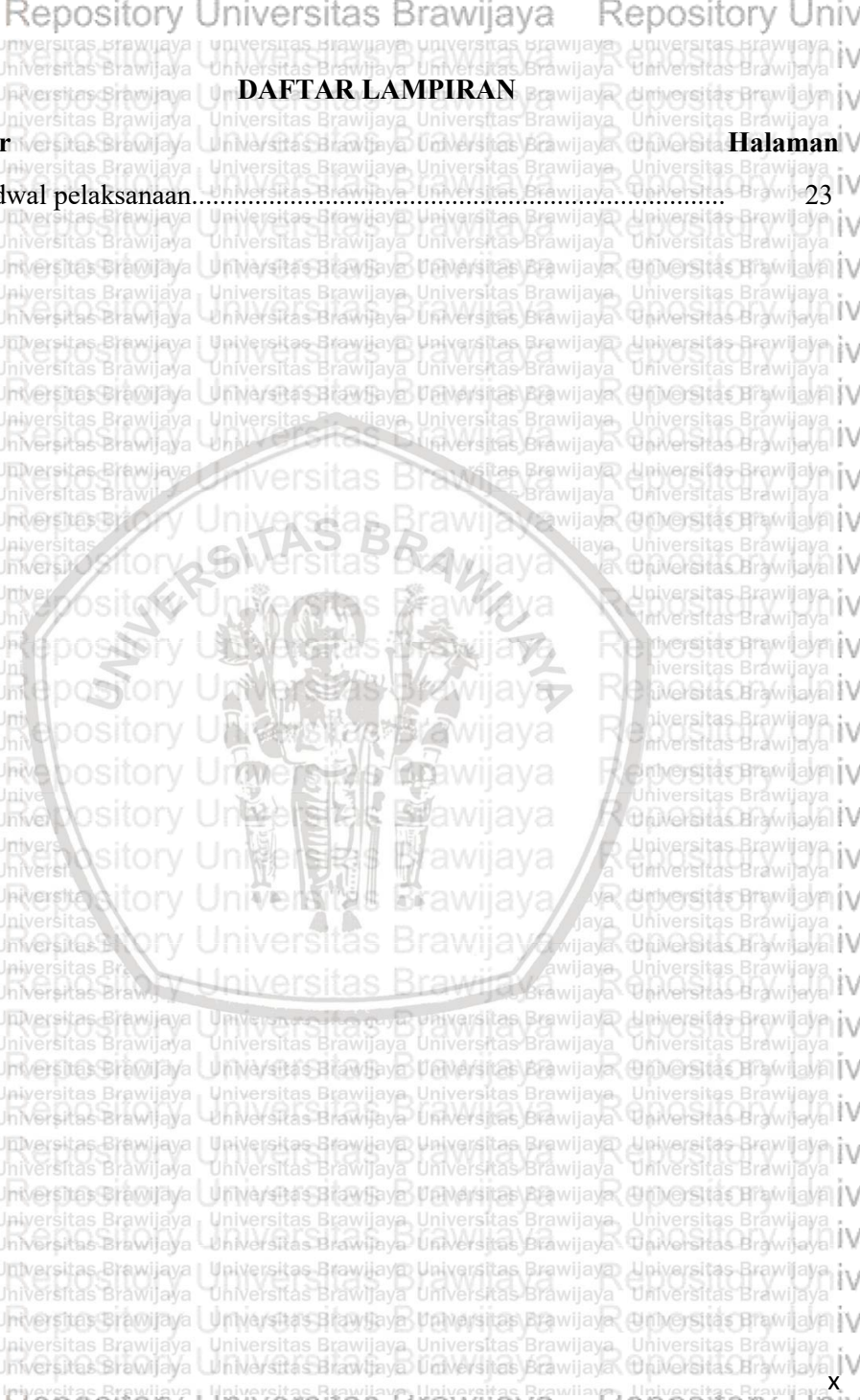
DAFTAR LAMPIRAN

Nomor

Halaman

1. Jadwal pelaksanaan

23



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan suatu kondisi sel telah kehilangan pengendalian dan mekanisme normalnya sehingga mengalami pertumbuhan yang tidak normal. Kanker payudara adalah jenis tumor ganas yang terbanyak pada perempuan. Keganasan kanker payudara dapat menyerang lapisan epitel atau jaringan mesenkim (KemenKes, 2012). Kanker merupakan penyakit yang menyerang manusia lewat jaringan disetiap bagian tubuh baik laki-laki maupun perempuan dan kanker dapat menjangkit semua golongan umur. Kanker merupakan penyakit yang dapat menyerang siapapun dan kanker dapat terjadi disemua kalangan umur, namun sebagian besar terjadinya tipe meningkat dengan bertambahnya usia (Masoro & Austad, 2006). Kanker yang dialami kalangan wanita yaitu kanker payudara atau breast cancer. Kanker payudara di Indonesia terjadi pada 40 dari 100.000 wanita dan kanker payudara ini merupakan penyakit yang dapat menyebabkan kematian nomor dua setelah kanker servik (Tunjung & sayekti, 2019).

Perawatan medis kanker payudara sekarang banyak digunakan. Tetapi perawatan medis mampu efek samping pada kematian sel-sel sehat sel kanker di sekitarnya. Pengobatan kanker payudara mempunyai banyak metode seperti terapi anti-angiogenesis, penghambat siklus sel, dan terapi fotodinamik. Induksi apoptosis adalah pengobatan terapi kanker yang paling umum karena apoptosis mempunyai kemampuan yang bisa membunuh sel-sel tertentu. Salah satu ciri sel kanker, yaitu hilangnya kemampuan untuk apoptosis. Apoptosis mempunyai kemampuan membunuh sel-sel abnormal untuk mencegah

terjadinya pertumbuhan kanker. induksi apoptosis melalui tiga jalur, yaitu ekstrinsik, jalur intrinsik dan perforin/ granzyme (Tunjung & Sayekti, 2019).

Tanaman tapak liman tumbuh di daerah hutan gugur tropis. Secara tradisional tanaman tapak liman digunakan sebagai obat tradisional oleh komunitas suku di seluruh India. Tapak liman mempunyai potensi yang dapat dikembangkan sebagai antikanker (Mandal dkk., 2018).

Tapak liman memiliki beberapa kandungan kimia antara lain flavonoid, deoxyelephantopin, isodeoxyelephantopin dan steroid. Deoxyelephantopin dan isodeoxyelephantopin menghambat fase S dan / atau fase G2 / M transisi dengan menurunkan ekspresi cyclin-dependent kinase 1 (CDK1), CDK2, CDK4, CDK6, cyclin A2, cyclin D1, cyclin D3, cyclin B1, cyclin B1 , dan cdc2 sambil meningkatkan ekspresi p21 (penghambat CDK) dan p53, gen penekan tumor yang mengatur *cycle arrest* siklus sel pada fase yang berbeda dengan menginduksi p21. *Deoxielephantopin* dan *isodeoxyelephantopin* memicu aktivasi apoptosis ekstrinsik dengan mengaktifkan caspase-8 yang pada gilirannya menginisiasi jalur apoptosis ekstrinsik tipe 1 dengan mengaktifkan jalur hilir efektor caspase-3 atau jalur apoptosis ekstrinsik tipe 2 dengan memotong Bid. *Deoxyelephantopin* dan *isodeoxyelephantopin* menginduksi apoptosis intrinsik dengan menghilangkan potensi membran mitokondria dan memodulasi ekspresi protein Bcl-2 yang menghasilkan aktivasi caspase-3. Selanjutnya, caspase-3 yang teraktivasi menyebabkan apoptosis oleh pembelahan substrat. *Deoxyelephantopin* mengaktifkan c-Jun N-terminal kinase (JNK) dan p38 dan menghambat aktivasi *Phosphatidylinositol-3-Kinase* (PI3K) / AKT / mammalian target of rapamycin (mTOR). *Deoxyelephantopin* menghambat aktivasi *extracellular signal-*

regulated kinase (ERK), *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan mengaktifkan caspase-9 dan menginduksi apoptosis (Mehmood dkk., 2017).

Pentingnya dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh tapak liman (*Elephantopus scaber*) terhadap sel kanker. Berdasarkan masalah yang telah dipaparkan, maka penelitian ini penting dilakukan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak etanolik daun tapak liman secara *in vitro* dalam uji siklus sel, apoptosis, dan uji Bcl-Bax.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanolik daun tapak liman (*Elephantopus scaber*) pada uji siklus sel, apoptosis, dan Bcl-Bax terhadap sel kultur T47D?

1.3 Tujuan

Tujuan dilaksanakan penelitian adalah untuk mengetahui bagaimana pengaruh ekstrak etanolik daun tapak liman (*Elephantopus scaber*) pada uji siklus sel, apoptosis, dan Bcl-Bx terhadap sel kultur T47D.

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai alternated pengobatan kanker payudara dengan penggunaan tanaman obat, khususnya pada tanaman tapak liman peneitian ini dapat digunakan sebagai bukti ilmiah untuk penelitian selanjutnya,

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tapak Liman (*Elephantopus scaber*)

Obat tradisional berasal dari hewan, tumbuhan dan mineral campuran dari bahan tersebut diolah secara tradisional dan dijadikan sebagai obat. Tapak liman adalah tanaman suku asteraceae berbentuk gulma. Tapak liman mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai antikanker. Senyawa yang terkandung dalam tapak liman sekuiterpen lakton (*deoxyelephantopin* dan *isodeoxyelephantopus*) menunjukkan sifat sitotoksik terhadap sel kanker (Sulstyani & Nurkhasanah, 2017).

Tanaman obat banyak menghasilkan senyawa bioaktif dan bisa digunakan untuk pengobatan banyak penyakit. Penggunaan tanaman sebagai terapi pengobatan ramuan alami telah dilakukan sejak dahulu. Salah satunya untuk pengobatan antikanker (Sulstyani dan Nurkhasanah, 2017). Tapak liman (*Elephantopus scaber*) tanaman yang tumbuh di alam liar didaerah wilayah tropis dunia. Kandungan fitokimia yang terdapat pada tanaman tapak liman elephantopin, lactones, flavonoid, triterpenoid, stigmasterol, epofriedelinoil dan lupeol. Tapak liman (*Elephantopus scaber*) adalah tanaman yang digunakan untuk pengobatan tradisional, rebusan tanaman dapat digunakan untuk merangsang diuresis, mengurangi demam dan menghilangkan batu kandung kemih, obat penurun panas dan diaforetik terhadap batuk, bronkitis dan asma. Rebusan akar *Elephantopus scaber* untuk mempercepat kontraksi daerah perut dan mencegah peradangan setelah melahirkan. Ekstrak air dari daun tapak liman untuk menyembuhkan radang sendi. *Deoxyelephantopus* (DET) merupakan salah satu lakton sekuiterpen yang berasal dari *Elephantopus scaber*, *Deoxyelephantopus* mempunyai aktivitas sitotoksis

terhadap berbagai sel kanker dan tumor ganas (Gambar. 1)
Deoxyelephantopus telah menunjukkan sitotoksisitas yang signifikan terhadap sel kanker (Mehmood dkk., 2017)

Berdasarkan ilmu taksonomi, klasifikasi tanaman tapak liman adalah sebagai berikut (Yuniarti, 2008).

- Kingdom : Plantae
- Divisi : Spermatophyta
- Subdivisi : Angiospermae
- Kelas : Dicotyledonales
- Subkelas : Asteridae
- Bangsa : Asterales
- Familia : Astreaceae
- Genus : *Elephantopus*
- Jenis : *Elephantopus scaber* L



(Mehmood dkk., 2017)

Gambar 1. Daun tapak liman

2.2 Kanker Payudara

Kanker payudara merupakan penyakit pada gangguan atau kegagalan mekanisme pengaturan multiplikasi pada organisme multiseluler sehingga

mengakibatkan terjadinya perubahan yang tidak terkontrol. Perubahan sel (transformasi) karena adanya perubahan gen di dalam sel. Sel yang mengalami transformasi secara terus menerus berproliferasi dan menekan pertumbuhan sel normal. Sel normal mengalami perubahan menjadi kanker dengan melalui tiga tahap yaitu tahap inisiasi, promosi dan progresi. Tahap inisiasi adanya faktor inisiator yang memulai pertumbuhan sel abnormal seperti radiasi, virus, mutasi spontan, dan bahan kimia. Tahap promosi dipicu oleh promotor seperti faktor pertumbuhan, tumor promotor, dan virus sehingga mengakibatkan terbentuknya sel-sel polimorfis dan anplastik. Tahap progresi disebabkan adanya invasi sel ganas kemembran basal dan kapsul (Sun dkk., 2017).

2.3 Apoptosis

Apoptosis merupakan bagian penting untuk menjaga keseimbangan dan kehidupan pada organisme multiseluler dan dalam mempertahankan homeostasis seluler. Sel yang mengalami kegagalan menjalani apoptosis dan terjadi pada perkembangan kanker karena memungkinkan sel-sel DNA yang rusak. Apoptosis ditandai dengan sel menyusut, membulat, blebbing, terdapat bentuk apoptotik, kondensasi (kariopiknosis) dan frAGMENTASI nukleus (karioreksis) tidak terdapat kariopiknosis dan karioreksis. Caspase ada di dalam sel sebagai pro-enzim yang tidak aktif dan bisa diaktifkan melalui proses auto-katalitik atau diaktifkan caspase lain, p53 sel normal mempunyai peran dalam menginduksi untuk terjadinya apoptosis (Mooney dkk., 2002).

2.5 Medium RPMI -1640

Media RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) merupakan media yang dikembangkan oleh More dkk. untuk kultur sel normal manusia dan neoplastik *in vitro*. Media RPMI 1640 adalah media yang umum digunakan.



Modifikasi medium 5A McCoy, medium ini dirancang untuk mendukung pertumbuhan sel limfoblastoid manusia dalam kultur suspensi. Media perlu ditambah dengan serum janin sapi 5-20% (HiMedia Laboratories, 2011).



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2019 – Maret 2020.

Labratorium Fisiologi Hewan, jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penlitian yang digunakan merupakan rancangan ACak Lengkap (RAL). Jenis penelitian yang diguakan merupakan penelitian eksperimental (*in vitro*). Perlakuan yang digunakan meliputi kontrol (K), kanker dengan perlakuan cisplatin (CISP), kanker dengan ekstrak etanolik tapak liman 300 μ l/mg dengan 4700 μ l media (D1), kanker dengan ekstrak tapak liman 150 μ l/mg dengan 4850 μ l, kanker dengan ekstrak tapak liman 75 μ l/mg dengan 4925 μ l/ Tabel 1.

Table 1. Pemberian perlakuan

Perlakuan	Lambang	Keterangan
Kontrol	K	Sel kanker
Cisplatin	CISP	Kanker + cisplatin
Dosis 1	D1	Kanker + ekstrak tapak liman 300 μ l
Dodis 2	D2	Kanker + ekstrak tapak liman 150 μ l
Dosis 3	D3	Kanker + ekstrak tapak liman 75 μ l

3.2. Prosedur Penelitian

3.2.1 Pembuatan Simplisia Daun Tapak Liman

Daun tapak liman dicuci pada tap water setelah itu daun tiriskan pada rak. Daun tapak liman dirajang, kemudian daun dikeringkan menggunakan oven suhu 30 °C hingga kadar air maksimum 10%. Daun tapak liman digiling menggunakan penggiling halus dan kasar.

3.2.2. Ekstraksi

Simplisia daun tapak liman diambil 100 gram kemudian ditambah dengan ethanol 96% teknis sebanyak 1000 ml dan diaduk sampai 15 menit. Didiamkan selama 24 jam, dalam sehari harus diaduk sebanyak dua kali. Setelah 24 jam dievaporasi menggunakan evaporator sampai menjadi pasta ekstra. Alkohol yang berisi simplisia diambil masukan dalam labu alat bulat sampel. Isi air pada water bath kemudian panaskan water bath suhu 30°C. Atur kecepatan pemutaran labu sampai 150 rpm. Tunggu ekstra hingga menjadi pasta.

3.2.3 Kultur Sel T47D dan Pembuatan Media RPMI

Medium RPMI diambil 50 ml ditempatkan ditabung propilen. Tambahkan penisilin 1% / 50 ml kedalam tabung propilen yang berisi media RPMI. Tambahkan fetal bovine serum (FBS) sebanyak 10% atau 5 ml kedalam tabung propilen yang berisi media RPMI dan penisilin, syringe 10 ml dan filter syringe, filter media tersebut (RPMI, penisilin dan FBS) kedalam tabung propilen baru. Setiap hari media harus diganti, sel kanker payudara (T47D) diamati setiap hari.

Sel T47D dimasukan dalam T *flask* kemudian tambahkan 1 ml *trypsin*. Ambil 2/3 dan tambahkan 1/3 kedalam T *flask* yang sudah diberi medium sel diinkubasi pada 37° C 24 jam

3.2.4. Treatment Ekstrak Daun Tapak Liman (*Elephantopus scaber*)

Stok ekstrak etanol daun tapak liman ditimbang 60 mg lalu larutkan ke dalam 500 µl sehingga didapatkan ekstrak per 0,5 ml. Dosis I dibuat dengan cara ekstrak diambil 300 µl, lalu dilarutkan ke medium RPMI sebanyak total volum 1/10 dari volume ekstrak per 5 ml yaitu 4,750 ml , dosis II (150 µl) dan dosis III (75 µl) (Nurkhasanah dkk, 2017).

3.2.5. Uji Apoptosis T47D cell line

T flask stok kultur T47D ditambahkan trypsin 1 ml, kemudian ambil 10 μ l dan dihitung jumlah sel menggunakan cell counter TC10™. Sel dari T flask ditambahkan ke 22 well yang berisi stok dosis dengan 1 kontrol dan 1 perlakuan cisplastin, 3 perlakuan dosis sebanyak 3 kali pengulangan. Inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Sel T47D dicuci menggunakan 100 μ l PBS dan dipisah dari well, kemudian tambahkan trypsin 200 μ l lalu homogenisasi. Resuspensi dimasukan ke microtube, kemudian sentrifuge kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Setelah di sentrifuge pelet ditambahkan 400 μ l PBS dan resuspensi. Sel T47D ditambah 40 μ l P1/ Annexin V, lalu inkubasi suhu ruang selama 20 menit, setelah itu tambahkan 400 μ l PBS dan dilakukan *flowcytometry*.

3.2.6. Uji Siklus sel T47D

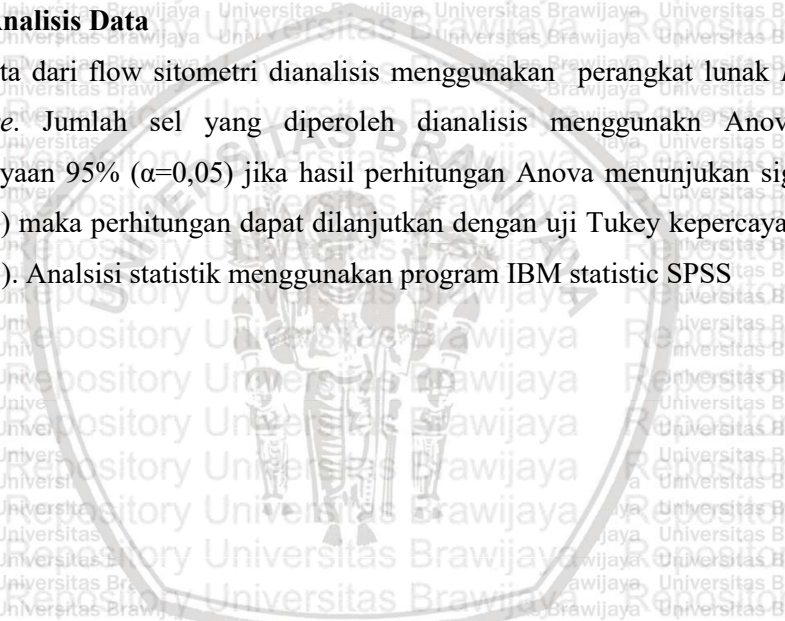
Sel T47D didalam T flask ditambahkan trypsin 1 ml, kemudian ambil 10 μ l stok dan dihitung jumlah selnya di cell counter. Sel dari T flask ditambahkan ke 22 well yang berisi stok dosis 1 kontrol, 1 perlakuan cisplatin, 3 perlakuan dosis sebanyak 3 kali pengulangan. Sel T47D diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Sel kultur T47D dicuci dengan PBS 100 μ l PBS. Sel T47D dan medium dipisah, lalu tambahkan trypsin 100 μ l dan tambahkan 200 μ l PBS dan resuspensi. Sel kultur T47D dimasukan ke microtube, setelah itu sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Setelah di sentrifuge pelet ditambahkan 70% alkohol sebanyak 500 μ l dan inkubasi 1 menit. Sentrifugasi kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Pelet ditambah 400 μ l PBS dan resuspensi. Sel T47D ditambah 40 μ l P1/ Annexin V, lalu inkubasi suhu ruang selama 20 menit, setelah itu tambahkan 400 μ l PBS dan dilakukan *flowcytometry*.

3.2.7. Uji Bcl dan Bax

Sel yang sudah dipanen dari well lalu masukan ke mikrutube. Sel sentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Pelet diberi *fixaction buffer* sebanyak 40 μ ldan inkubasi 20 menit. Pelet diberi *intracellular staining perm wash buffer* sebanyak 40 μ l. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Pelet diberi reagen Bcl-Bax 40 μ l dan inkubasi 20 menit dalam suhu ruang ditempat gelap lalu sel dianalisis menggunakan flowcytometer.

3.2.8. Analisis Data

Data dari flow sitometri dianalisis menggunakan perangkat lunak *Flowing Software*. Jumlah sel yang diperoleh dianalisis menggunakan Anova taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) jika hasil perhitungan Anova menunjukkan signifikan ($p\leq 0,05$) maka perhitungan dapat dilanjutkan dengan uji Tukey kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Analisis statistik menggunakan program IBM statistic SPSS



BAB IV

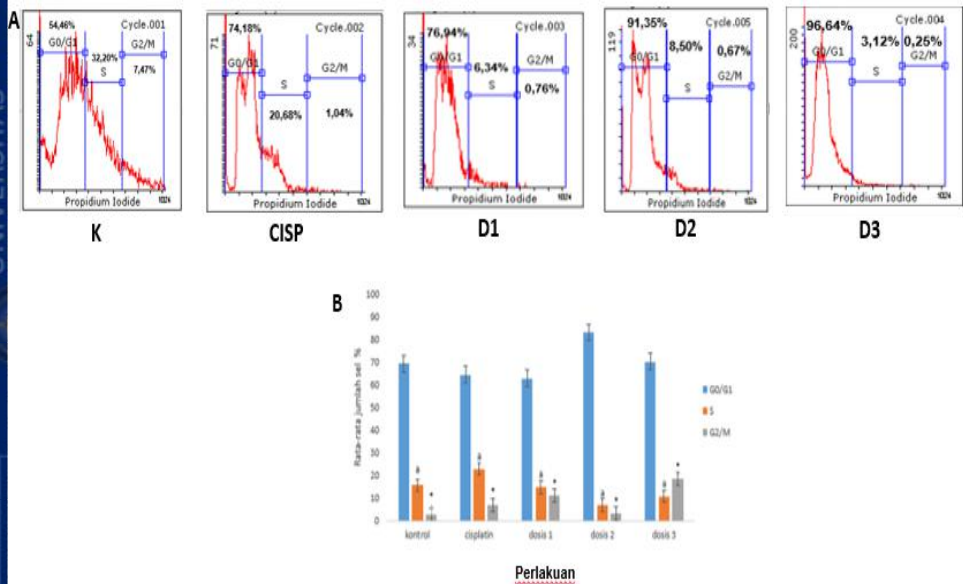
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Treatment Ekstrak Etanolik Daun Tapak Liman pada Siklus Sel

Hasil penelitian menunjukkan bahwa treatment dengan ekstrak etanolik daun tapak liman pada dosis 1 (300 $\mu\text{g/ml}$) menyebabkan fase S dan G2/M rendah dan sel cenderung tinggi ke fase G0/G1. Dosis 2 (150 $\mu\text{g/ml}$) menyebabkan fase S dan G2/M rendah dan sel cenderung ke fase G0/G1. Pemberian dosis 3 (75 $\mu\text{g/ml}$) menyebabkan fase S dan G2/M nya rendah dan sel cenderung ke fase G0/G1, yang berarti menunjukkan adanya *cell cycle arrest* pada fase G2/M dan S yang ditunjukkan dengan tingginya fase G0/G1 (Gambar.5). Treatment menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel mulai fase sub G1 atau sel-sel mati sebelum tumbuh ke tahap berikutnya. Sementara itu, sel T47D yang diberi dengan dosis 3 nilai S dan G2/M paling rendah dari pada pemberian cisplatin, dosis 1, dan dosis 2. Menurut Sulistyani dan Nurkhasanah., (2017) treatment ekstrak etanolik daun tapak liman pada uji siklus sel fase sub G1 sel mengalami kematian sebelum memasuki ke tahap berikutnya. Menurut Rollando dan Kestrilia (2017) cisplatin menyebabkan akumulasi di fase S, akumulasi sel kemungkinan karena terjadi *cell cycle arrest* pada fase tersebut.

Menurut penelitian Kabber dkk., (2017). Pemberian treatment *Deoxyelephantopin* (DET) menyebabkan peningkatan pada fase sel G2/M dan penurunan jumlah fase G1 dan S. Peningkatan jumlah sel fase sub G1 sebagai induksi apoptosis dengan pemberian *Deoxyelephantopin* (DET). Cyclin kompleks B/cdc2 digunakan untuk regulasi G2 dan transisi G2/M di sel eukariot. p21, cdk1 dapat menginduksi penangkapan siklus sel G2/M dengan menonaktifkan cyclin B1/ cdc2 complex. Di sel T47D yang membawa mutan bentuk p53 nonfungsional, *Deoxyelephantopin* menyebabkan peningkatan kadar protein p53 yang

menyebabkan apoptosis dan penangkapan siklus sel fase G2/M. Peningkatan regulasi protein p21 dalam sel T47D yang ditreatment dengan *Deoxyelephantopin* (DET) menunjukkan bahwa *Deoxyelephantopin* menginduksi ekspresi p21 karena berperan dalam penangkapan siklus sel.

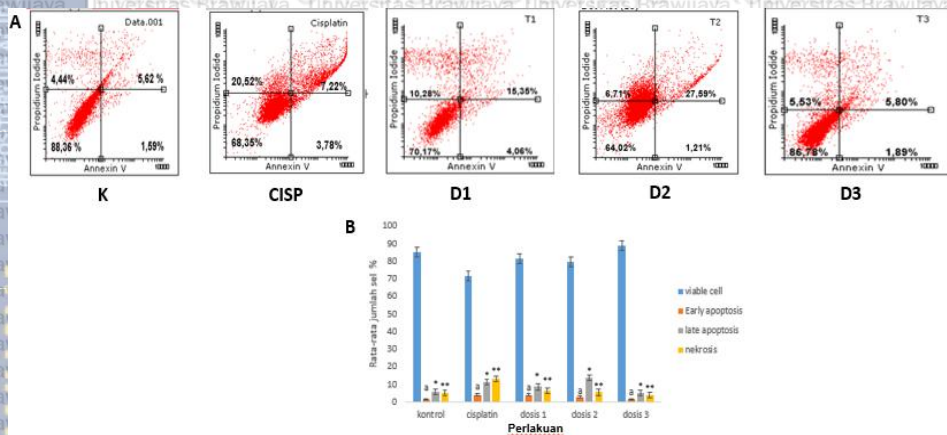


Gambar 5. (A) Prosentase jumlah sel T47D pada fase G0/G1, S dan G2/M setelah treatment dengan ekstrak etanol *Elephantopus scaber*. Keterangan: A) kontrol (K), cisplatin (CISP), D1 (300 µg/ml), D2 (150 µg/ml), D3 (75 µg/ml). B) Grafik rata-rata jumlah sel T47D.

4.2 Hasil Treatment Ekstrak Etanolik Daun Tapak Liman pada Uji Apoptosis

Induksi apoptosis diamati untuk mengetahui mekanisme sel akibat perlakuan dari ekstrak etanolik tapak liman pada sel kanker payudara T47D yang diinkubasi Selama 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa treatment ekstrak etanolik daun tapak liman pada sel T47D yang ditreatment dengan dosis 2 secara signifikan meningkatkan persentase sel dalam proses apoptosis awal 1,21 % dan apoptosis akhir 27,59 %. Hasil menunjukkan bahwa pemberian treatment ekstrak etanolik daun tapak liman tidak menunjukkan hasil yang tidak berbeda secara signifikan pada pemberian cisplatin, dosis 1, dosis 2, dan dosis 3 (Gambar. 6). Walaupun perbedaannya tidak signifikan pemberian ekstrak etanolik tapak liman dosis 2 menunjukkan nilai terendah pada apoptosis awal dan nilai tertinggi pada apoptosis akhir dibanding pemberian cisplatin maupun tidak diberi perlakuan.

Menurut kabber dkk., (2014) *Isodeoxyelephantopin* menyebabkan apoptosis pada sel tumor. Caspase yang diaktifkan dipicu oleh sinyal dari faktor kematian atau perubahan mitokondria dalam proses apoptosis. Aktivasi caspase-3 adalah titik konvergensi jalur apoptosis instrinsik dan ekstrinsik yang mengarah ke fase apoptosis dan akhirnya kematian sel.



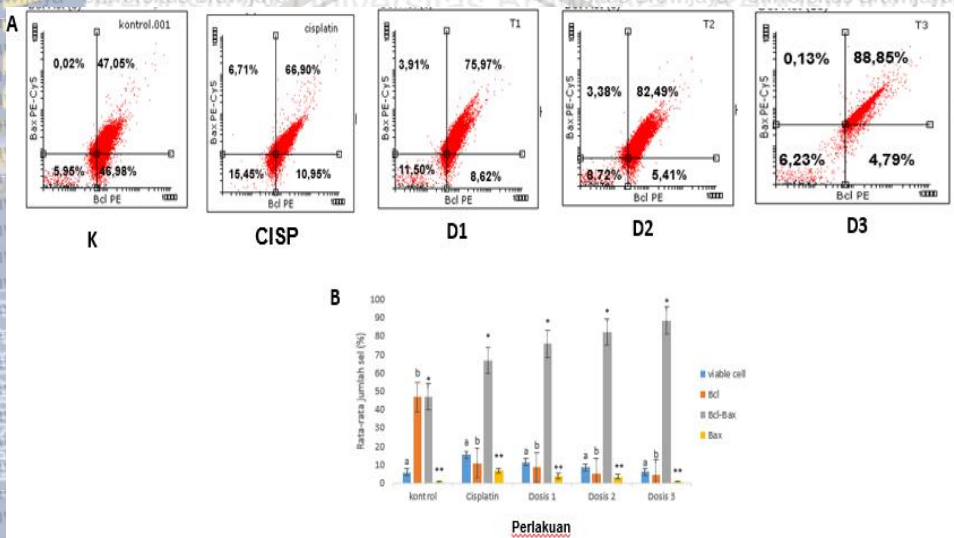
Gambar 6. Prosentase jumlah sel T47D yang mengalami apoptosis setelah treatment dengan ekstrak etanolik *Elephantopus scaber*. A) Analisis *flowcytometry* sel T47D setelah treatment dengan ekstrak etanol *E. scaber*; B) Grafik rata-rata jumlah sel T47D yang mengalami apoptosis awal dan apoptosis akhir setelah treatment dengan ekstrak etanol *E. scaber*. Keterangan: K= sel T47D tanpa treatment; K+C= control+cisplatin; D1: dosis1 300 $\mu\text{g/ml}$; D2: dosis2 150 $\mu\text{g/ml}$; D3: dosis3 75 $\mu\text{g/ml}$.

4.3 Hasil Treatment Ekstrak Daun Tapak Liman Pada Uji Bcl-Bax

Hasil penelitian menunjukkan bahwa treatment ekstrak etanolik daun tapak liman pada sel T47D terlihat adanya ekspresi Bcl 4,79% dan ekspresi yang terlibat dalam Bcl-bax meningkat 88,85% sedangkan pada ekspresi Bax mengalami penurunan 0,13% pada sel T47D yang ditreatment dengan dosis 3. Hasil menunjukkan bahwa pemberian treatment ekstrak etanolik daun tapak liman tidak menunjukkan hasil yang tidak berbeda secara signifikan pada pemberian cisplatin, dosis 1, dosis 2, dan dosis 3 (Gambar. 7). Walaupun perbedaannya tidak signifikan rasio Bcl-Bax yang lebih tinggi pada dosis 3 menjadi penanda hasil yang lebih baik. Menurut Roy dkk., (2015), Apoptosis dikaitkan dengan peningkatan regulasi Bax proapoptosis, peningkatan Bax/Bcl-2, disipasi potensi membrane mitokondria, aktivasi caspase-3 dan pembelahan poli (ADP-ribosa) polimerasi (PARP). Peningkatan ROS (*reactive oxygen species*) memicu peningkatan ekspresi protein P53 dan menyebabkan oligomerasi Bax (oligomer Bax menyebabkan peningkatan permeabilitas membrane yang mengarah ke apoptosis), depolarisasi potensi membrane mitokondria dan induksi caspase cascade (caspase-3/7 dan -9). Caspase cascade mengakibatkan pembelahan PARP yang akhirnya mengaktifkan fragmentasi DNA dan akhirnya apoptosis.

Menurut Sun dkk., (2016) berkurangnya ekspresi Bcl-2 berpotensi membuat sel lebih rentan terhadap stimulasi pensinyalan apoptosis. Bcl-2 telah menjadi target untuk intervensi terapeutik untuk meningkatkan kerentanan terhadap terapi pada kanker payudara positif ER. Menurut Rollando dan Kestrilia (2017) cisplatin dapat menginduksi *downregulation* Bcl-2 pada sel kanker payudara sel T47D. *Downregulation* Bcl-2 (protein anti-apoptosis) menurunkan ketahanan pada hidup sel serta terjadi peningkatan sensitivitas terhadap agen kemoterapi (Rollando dan Kestrilia, 2017). Protein Bcl-2 adalah protein anti-apoptosis

sedangkan protein Bax bersifat proapoptosis. Pada kedua protein berperan dalam regulasi apoptosis melalui pelepasan Cyt. Ekspresi Bcl-2 mencegah terjadinya pelepasan Cyt c dari mitokondria sedangkan pada ekspresi Bax menginduksi pelepasan Cyt c. Cyt c yang ada didalam sitosol terbentuk kompleks dengan apaf-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1), ATP dan procaspase-9. Apoptosom yang mengaktifkan caspase-9 dan caspase-9 mengaktifasi caspase 6,7 yang mengeksekusi apoptosis (Arianingrum dkk, 2016).



Gambar 7. Prosentase jumlah sel T47D setelah treatment dengan ekstrak etanolik *Elefantopus scaber*. A) Analisis flowcytometry sel T47D setelah treatment dengan ekstrak etanol E. scaber; B) Grafik rata-rata jumlah sel T47D yang diberi marker Bcl-Bax setelah treatment dengan ekstrak etanol E. scaber. Keterangan: K= sel T47D tanpa treatment; K+= control+cisplatin; D1: dosis1 300 µg/ml; D2: dosis2 150 µg/ml; D3: dosis3 75 µg/ml

BAB V PENUTUP

4.1 Kesimpulan

Pemberian treatment ekstrak etanolik daun tapak liman pada uji siklus sel T47D dapat mengalami penghambatan pada pemberian dosis 3 dengan rendahnya nilai yang didapat pada penangkapan siklus sel dalam fase S dan G2/M. Secara signifikan berkurangnya pada sel T47D yang diberi perlakuan dosis 3 menunjukkan bahwa siklus sel dapat menghambat. Uji apoptosis pada pemberian dosis 2 didapatkan hasil yang optimal pada tahap apoptosis awal dan akhir dengan treatment dosis 2 mengalami apoptosis secara efektif dalam sel-sel T47D. Uji Bcl-Bax terdapat ekspresi protein pro-apoptosis Bax pada semua perlakuan. Uji protein Bcl-Bax didapat nilai paling tinggi pada perlakuan dosis 3.

4.2 Saran

Penelitian selanjutnya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun tapak liman (*Elephantopus scaber*) yang memainkan peran dalam uji antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Arianingrum, R., Sunarminingsih, R & Meiyanto, E., Mubarika, S. (The Effect Of p-Hidroxy m-Methoxy Chalcone (pHmMK) on Bcl-2 and Bax Protein Expression In MCF-7 Breast Cancer Cell Lines). *Jurnal Penelitian Sainstek*, Vol 21(1).
- HiMedia Laboratories. 2018. RPMI-1640 With L-Glutamine Without Glucose and Sodium bicarbonate. HiMedia cell Culture Enabling Breakthroughs.
- Holliday, Deborah & Speirs, Valerie. 2011. Choosing the Right Cell Line for Breast Cancer Research. *Holliday and Speirs Breast Cancer Research*, 13 (215).
- KementrianKesehatan.2012.<http://depkes.go.id/indek.php/berita/pressrealease/106>
0-jika-tidak-dikendalikan -26-juta-or. Diakses tanggal 22 april 2020.
- Kabeer, F., Dhanya, R & Mangalam, N., Remani, P. 2017. Molecular Mechanisme of Anticancer Activity of Deoxyelephantopin Cancer Cell. *Intergrative Medicine Research* 6(2): 190-206.
- Kabeer, F., Dhanya, R & Mangalam, N., Remani, P., Gheeta, S. Latha, G. 2014. Iso-deoxyelephantopin from *Elephantopus scaber* (Didancoa) Induces Cell Cycle Arrest and Caspase-3-Mediated Apoptosis In Breast Carcinoma T47D Cells and Lung Carcinoma A549 Cells. *Journal Chinese Medicine* 9(14).
- Mandal, S. K., Pai, H & Pai, I., Bose, S. Biological Potential of *Elephantopus scaber* Linn. *Journal. Pharm.* 50(2) : 130-134
- Mehmood, T., Maryam, A & Ghramh, H.A., Khan, M., Ma, T. 2017. Deoxyelephantopin and Iso-deoxyelephantopin as Potential Anticancer Agents with Effects on Multiple Signaling Pathways. *Journal Molecules* 22. 1013.
- Pavani, Chalasani. 2019. Breast Cancer.

<https://emedicine.medscape.com/article/1947145-overview>. Diakses 11 November 2019.

Mandal, S. K., Pai, H. & Pai, I., Bose, S. 2018. Biological Potential of *Elephantopus scaber* Linn. *Journal. Pharm* 50(2) : 130-134.

Mooney, L.M., Al-Sakkaf, K & Brown., Dobson, P. 2002. Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Cancer* 87, 909–917.

Nurkhasanah., sulistyani, N & Mahdi, L. 2017. Fraksi kloroform ekstrak etanol daun tapak liman (*Elephantopus scaber* Linn.) meningkatkan ekspresi p53 pada sel kanker payudara T47D. *Pharmaciana* 7(2): 141– 14.

Rollando & Kestrillia, P. 2017. Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Faloak (*Sterculia Quadrifida* R.Br) Menginduksi Apoptosis Dan Siklus Sel Pada Sel Kanker Payudara T47d. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*, 14(1), 1-14.

Roy, R., Hossan, S & Rahmatullah, M. 2015. Anticancer Potential Of *Elephantopus Scaber* and its Phytoconstituents. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(10): 86-94.

Rosdiana, A & Hadisaputri, Y. 2016. Studi pustaka tentang prosedur kultur sel. *Farmaka* 14(1).

Schafer, J.M., Lee, E.S & O'Regan, R.M., Yao, K., dan Jordan, V.C. 2000. Rapid Development of Tamoxifen-stimulated Mutant p53 Breast Tumors (T47D) in Athymic Mice. *Clinical Cancer Research*. (6) 4373-4380.

Sun, Y., Zhao, Z & Yang, Z., Xu, F., Lu, H. 2017. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Journal of Biological* 13(11): 1387 -1397.

Sun, J., Fu, X. & Wang, Y., Liu, Y., Zhang, Y., Hao, T., Hu, C]X. 2016. Erianin Inhibits the Proliferation of T47D cells by Inhibiting Cell Cycles,

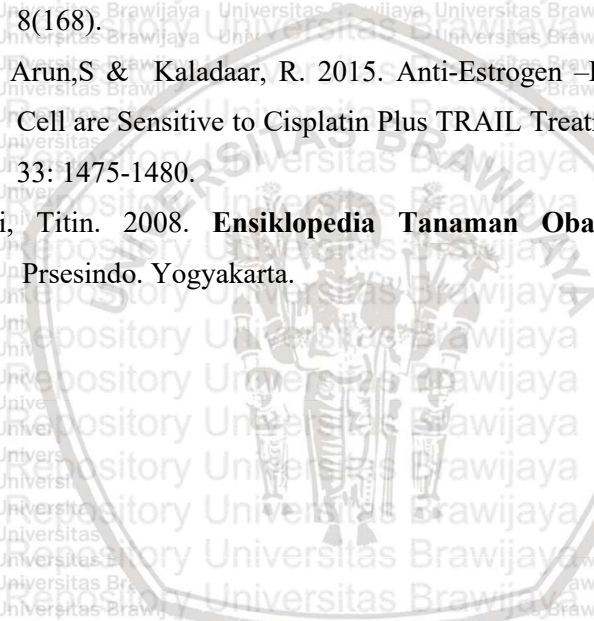
Inducing Apoptosis and Suppressing Migration. *Am J Transl Res* 8(7):3077-3086.

Sulistiyani, N & Nurkhasanah. 2017. The Cytotoxic Effect Of (*Elephantopus Scaber*) Linn Extract Against Breast Cancer (T47D) Cells. *IOP conf. Series: material science and engineering* 259.

Tunjung, W. A & Sayekti, P. R., 2019. Apoptosis Induction on Human Breast Cancer T47D Cell Line by Ekstraks of Ancorina sp. *f1000 Research* 8(168).

Yin, s., Arun,S & Kaladaar, R. 2015. Anti-Estrogen –Resistant Breast Cancer Cell are Sensitive to Cisplatin Plus TRAIL Treatment. *Oncology Reports* 33: 1475-1480.

Yuniarti, Titin. 2008. **Ensiklopedia Tanaman Obat Tradisional**. Media Prsesindo. Yogyakarta.



LAMPIRAN

Penentuan dosis ekstrak Tapak Liman :

60 mg/ml ekstrak + media 10 ml

D1 = 300 µg/ml

300 µg/ml + 4700 µl/ml

D2 = 150 µg/ml

150 µg/ml + 4850 µl/ml

D3 = 75 µg/ml

75 µg/ml + 4925 µl/ml

