

## PROPOSAL PENELITIAN DOSEN MUDA



### JUDUL PENELITIAN :

**Analisa Kandungan Senyawa Kimia dan Uji Aktivitas Antikanker Fraksi Kloroform dari Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) pada Sel Kanker Serviks HeLa : Studi *In Vitro***

### Oleh :

Rifki Febriansah, M.Sc., Apt.

(0527028701 / 173188)

Hari Widada, M.Sc., Apt.

(0521077701 / 173172)

Diajukan untuk memperoleh dana Hibah Penelitian Dosen Muda  
Universitas Muhammadiyah Yogyakarta  
Tahun Anggaran 2016/2017

**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA  
SEPTEMBER, 2016**

HALAMAN PENGESAHAN  
PENELITIAN DOSEN

1. Judul : Analise Kandungan Senyawa Kimia dan Uji Aktivitas Antikanker Fraksi Kl.iform dari Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) pada Sel Kanker Serviks HeLa : Studi *In Vitro*
2. Bidang : Kesehatan / Kedokteran Tropis
3. Ketua Tim Pengusul :
- a. Nama Lengkap : Rifki Febriansah, M.Sc., Apt.
  - b. Jenis Kelamin : Pria
  - c. NIDN/NIK : 0527028701 / 173 188
  - d. Disiplin Ilmu : Farmasi Bahan Alam
  - e. Pangkat/Golongan : Asisten Ahli / IIG3
  - f. Jabatan : -
  - g. Fakultas/Jurusan : FKIK / Farmasi
  - h. Alamat : Jl. Lingkar Selatan, Tamantirto, Kasihan, Bantul
  - i. Telp/Fax : 0274387656 ext. 201 / Fax 0274387646
  - j. Alamat Rumah : Jln. H. Agus Salim no.6 Notoprajan, Ngampilan
  - k. Telp/Fax : 081804042212
  - l. E-mail : briansysh\_rifki@yahoo.com
4. Jumlah Anggota Tim : 1 orang  
Nama Anggota (1) : Hri Widada, M.Sc., Apt.  
NIDN : 0521077701
5. Waktu Program : 5 bulan
6. Biaya yang diusulkan : Rp. 10.000.000,00

Yogyakarta, 25 September 2016

Mengetahui,  
Kaprosdi Farmasi FKIK UMY

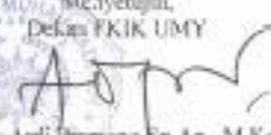


Subhanil Hafidmurti, Ph.D., Apt.  
NIDN. 0523027304

Ketua Tim Pengusul



Rifki Febriansah, M.Sc., Apt.  
NIDN . 0527028701



Megetujui,  
Dekan FKIK UMY  
dr. H. Andi Prasmono, Sp. An., M.Kes  
NIDN. 0513126902

## PERSONALIA PENELITIAN

- a. Ketua Peneliti : Rifki Febriansah
- b. Nama Lengkap dan Gelar : Rifki Febriansah, M.Sc., Apt.
- c. Golongan Pangkat dan NIK : IIIB / 173 188
- d. Jabatan Fungsional : Asisten ahli
- e. Jabatan Struktural : -
- f. Fakultas/Program Studi : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan / Farmasi
- g. Perguruan Tinggi : Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
- h. Bidang Keahlian : Farmasi Bahan Alam
- i. Waktu untuk Penelitian ini : 5 jam/minggu
- j. Tema (*khusus KPD*) : Kedokteran Tropis
- k. Tenaga Laboran/Teknisi : Satriaaji Amurwawijaya, A.Md.
- l. Pekerja Lapangan : -
- m. Tenaga Administrasi : -

## ABSTRAK

Kanker merupakan masalah kesehatan yang menyeluruh di dunia. Pengobatan kanker dengan agen kemoterapi, seperti doxorubicin sering menimbulkan berbagai efek samping yang merugikan. Efikasi agen kemoterapi juga diturunkan dengan adanya resistensi sel kanker (*multi drug resistance*). Penggunaan agen kemopreventif alami dalam kombinasinya dengan agen kemoterapi (ko-kemoterapi) dimungkinkan dapat menjadi metode yang menjanjikan untuk mengatasi masalah tersebut. Salah satu bahan alam yang mempunyai potensi sebagai agen antikanker serviks adalah herba bandotan (*Ageratum conyzoides* L.). Herba bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) mengandung beberapa senyawa penting yang berperan dalam pengatasan kanker, yakni friedelin, kumarin dan stigmasterol yang mampu menghambat perkembangan sel kanker. Pada hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak kloroform (*Ageratum conyzoides* L.) mempunyai efek sitotoksik terhadap sel Myeloma dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 16,33  $\mu\text{g/ml}$ .

Mekanisme antikanker serviks dapat melalui target hormonal (direpresentasikan dengan *estrogen receptor*) dan target non hormonal. Pengkajian mekanisme tersebut dapat melalui metode *in silico*, *in vitro* maupun *in vivo*. Secara *in vitro*, penggunaan sel HeLa terpilih karena merupakan sel kanker serviks dengan karakteristik yang dapat memberikan mekanisme secara menyeluruh. Agen kokemoterapi yang diujikan adalah fraksi kloroform dari ekstrak herba bandotan dengan obat doxorubicin.

Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan mekanisme kerja biomolekuler fraksi kloroform dari herba bandotan secara *in vitro* yang akan berguna sebagai dasar ilmiah pengembangan ko-kemoterapi dalam pengobatan formal. Pada penelitian ini akan dilakukan: 1). Ekstraksi, fraksinasi dan identifikasi senyawa aktif ekstrak bandotan 2). Uji sitotoksik secara *in vitro* menggunakan turunan sel kanker HeLa. Target luaran dari penelitian ini adalah mengetahui mekanisme ko-kemoterapi fraksi kloroform ekstrak herba bandotan melalui uji *in vitro*. Hasil penelitian ini diharapkan akan menjadi dasar penggunaan herba bandotan dan hasilnya akan dipublikasikan pada jurnal terakreditasi nasional dan internasional.

**Kata kunci:** Fraksi kloroform Herba bandotan, HeLa, Doxorubicin, *In vitro*, Ko-kemoterapi

## **JUDUL PENELITIAN**

Analisa Kandungan Senyawa Kimia dan Uji Aktivitas Antikanker Fraksi Kloroform dari Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) pada Sel Kanker Serviks HeLa : Studi *In Vitro*

## **I. PENDAHULUAN**

### **a. Latar Belakang**

Kanker merupakan penyakit yang insidensinya semakin meningkat dari tahun ke tahun. Kanker serviks merupakan penyebab kematian ketiga akibat kanker di Amerika Serikat (*National Cancer Institute, 2010*). Pengobatan kanker menggunakan kemoterapi memberikan banyak efek samping, terutama pada sel normal. Efikasi agen kemoterapi juga diturunkan dengan adanya resistensi sel kanker (*multi drug resistance mechanism*). Untuk itu dikembangkan penelitian tentang penggunaan senyawa yang berasal dari alam sebagai agen kemoprevensi yang berpotensi sebagai agen pendamping kemoterapi. Agen kemoprevensi dimaksudkan untuk meningkatkan sensitivitas sel kanker dan mengurangi efek samping akibat agen kemoterapi. Agen kemoprevensi umumnya memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan tumor melalui mekanisme *cell cycle arrest*, pemacuan apoptosis (Fisher, 1994) ataupun menghambat ekspresi protein yang berperan dalam *Multi Drug Resistance* (Kitagawa, 2006).

Salah satu bahan alam yang dapat digunakan sebagai agen antikanker serviks adalah herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*). Herba bandotan (*Ageratum conyzoides L.*) dipercaya mengandung tiga senyawa penting yang berperan dalam pengatasan kanker, yakni flavonoid, alkaloid dan terpenoid yang mampu menghambat perkembangan sel kanker. Flavonoid memiliki efek antitoksik, dalam hal ini sebagai antikanker dan juga sebagai antibiotik alami sehingga mampu menjaga organ tubuh yang belum terserang kanker untuk menolak kanker, sedangkan alkaloid berfungsi untuk meregenerasi sel yang rusak pada organ yang hancur karena kanker sehingga pulih kembali dan alizarin berfungsi sebagai pemutus hubungan pembuluh darah dan nutrisi ke sel kanker atau tumor dan menyebabkan jaringan kanker akan kering / luruh kemudian mati.

Dalam penelitian ini akan diuji apakah fraksi kloroform dari herba bandotan mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker Serviks HeLa. HeLa merupakan sel kanker serviks yang diambil dari pasien kanker wanita berusia 76 tahun dan dikembangkan menjadi sel uji. Pengujian yang akan dilakukan adalah identifikasi kandungan senyawa kimia dan uji sitotoksik dari ekstrak tersebut pada sel kanker serviks.

## **b. Perumusan Masalah**

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah kandungan senyawa kimia pada fraksi kloroform dari herba bandotan yang mempunyai efek sitotoksik pada sel kanker Serviks HeLa?
2. Apakah fraksi kloroform dari herba bandotan mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker Serviks HeLa?

## **c. Keaslian Penelitian**

Fraksi kloroform dari herba bandotan terbukti memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 (Bintang, 2011). Fraksi kloroform dari herba bandotan menunjukkan sinergisme dengan doxorubicin pada sel MCF-7, sehingga mampu memacu apoptosis pada sel MCF-7. Ekstrak tersebut juga menginduksi apoptosis dan menekan ekspresi Bcl-2 pada sel myeloma NS-1 (Yasmina, 2005). Namun, aktivitas fraksi kloroform dari herba bandotan terhadap sel kanker serviks HeLa belum pernah ditelusuri. Penelitian yang akan dilakukan ini berbeda dari penelitian-penelitian yang pernah dilakukan karena menitikberatkan pada pengamatan sitotoksik pada sel HeLa oleh perlakuan fraksi kloroform dari herba bandotan sebagai dasar pengembangan fraksi kloroform dari herba bandotan untuk agen kokemoterapi kanker serviks.

## **d. Faedah Penelitian**

Penelitian ini bukanlah penelitian awal melainkan lanjutan dari hasil-hasil penelitian yang sudah ada guna mendapatkan informasi yang lebih mendalam mengenai aktivitas fraksi kloroform dari herba bandotan sebagai agen kemopreventif. Untuk itu dipilih jenis sel kanker serviks. Penelitian ini melengkapi data penggunaan fraksi kloroform dari herba bandotan sebagai agen kokemoterapi selain dengan doxorubicin. Pengujian fraksi kloroform dari herba bandotan tunggal terhadap sel HeLa diperlukan untuk memperoleh kondisi yang sama dengan pengujian kombinasi agar hasilnya dapat dibandingkan. Hasil akhir penelitian ini adalah diperolehnya agen kokemoterapi yang poten dari bahan alam. Hasil penelitian ini akan memberikan informasi yang berharga bagi dunia sains penemuan obat karena memberikan pendekatan sistematis dalam pengembangan agen kokemoterapi di Indonesia. Pendekatan ini diharapkan dapat dilakukan juga di berbagai tempat riset di Indonesia.

## **e. Tujuan Penelitian**

### **1. Tujuan Khusus**

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kandungan senyawa kimia dan menguji aktivitas sitotoksik fraksi kloroform dari herba bandotan terhadap sel kanker serviks HeLa.

## 2. Tujuan Umum

### a) *Untuk Pengembangan Keilmuan Farmasi*

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar ilmiah bagi pengembangan fraksi kloroform dari herba bandotan sebagai agen kemopreventif untuk kanker serviks.

### b) *Untuk Pembangunan Nasional*

Penelitian ini dapat dijadikan pemacu kreativitas dan keaktifan peneliti untuk mengeksplorasi kekayaan bahan alam dalam rangka pengembangannya sebagai agen terapi untuk berbagai penyakit, khususnya penyakit kanker, yang angka kejadiannya terus meningkat dari waktu ke waktu, termasuk di Indonesia.

## f. Tinjauan Pustaka

### 1. Kanker dan Kanker Serviks

Kanker adalah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagalan pengaturan multiplikasi dan fungsi homeostatis lainnya pada organisme multiseluler (Ganiswara dan Nafrialdi, 2005). Kanker merupakan penyakit yang disebabkan oleh ketidakaturan kerja hormon sehingga mengakibatkan jaringan baru yang abnormal dan bersifat ganas (Tjay dan Rahardja, 2002).

Kanker serviks (*Cervical Carcinoma*) adalah suatu penyakit neoplasma yang ganas yang berasal dari *parenchyma*. Penyakit ini oleh *World Health Organization* (WHO) dimasukkan ke dalam *International Classification of Diseases* (ICD) dengan kode nomor 174. Kanker serviks dapat terjadi karena adanya beberapa faktor genetik yang diturunkan dari orang tua kepada anaknya. Gen pensupresi tumor yang berperan penting dalam pembentukan kanker serviks diantaranya adalah gen E6 dan E7 (Moningkey dan Kodim, 1998).

Gejala klinis kanker serviks dapat berupa benjolan pada serviks, erosi atau eksema puting susu. Umumnya berupa benjolan yang tidak nyeri pada serviks. Benjolan itu mulanya kecil dan semakin besar lalu melekat pada kulit dan menimbulkan perubahan pada kulit serviks atau pada puting susu. Kulit atau puting susu tersebut menjadi tertarik ke dalam (retraksi), berwarna merah muda atau kecoklat-coklatan sampai menjadi oedema hingga kulit kelihatan seperti kulit jeruk (*peau d'orange*), mengkerut, atau timbul borok (ulkus) pada serviks. Borok itu makin lama makin besar dan mendalam sehingga dapat menghancurkan seluruh serviks, sering berbau busuk dan mudah berdarah (Handoyo, 1990).

### 3. Biji Labu kuning (*Cucurbita moschata*)

Tanaman labu kuning berasal dari Ambon (Indonesia). Ada lima spesies labu yang umum dikenal, yaitu *Cucurbita maxima* Duchenes, *Cucurbita ficifolia* Bouche, *Cucurbita mixta*, *Cucurbita moschata* Duchenes, dan *Cucurbita pipo* L. Kelima spesies cucurbita tersebut di Indonesia disebut labu kuning (waluh) karena mempunyai ciri-ciri yang hampir sama. Buah labu kuning berbentuk bulat pipih, lonjong, atau panjang dengan banyak alur (15-30 alur). Ukuran pertumbuhannya cepat sekali, mencapai 350 gram per hari. Tanaman *Cucurbita moschata* Duch ex Poiret memiliki beberapa nama daerah yaitu Labu parang (Melayu), Waluh (Sunda), Waluh (Jawa Tengah).

Klasifikasi Tanaman labu kuning sebagai berikut :

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Cucurbitales
Familia	: Cucurbitaceae
Genus	: <i>Cucurbita</i>
Spesies	: <i>Cucurbita moschata</i> Duch. (Hutapea, J.R, <i>et al.</i> , 1994)

Labu kuning mengandung karotenoid (betakaroten), Vitamin A dan C, mineral, lemak serta karbohidrat. Dua senyawa glikosida fenolik yang termasuk golongan isoflavon telah diisolasi dari biji *Cucurbita moschata* yaitu (2-hydroxy) phenylcarbiny 5-O-benzoyl-beta-D-apiofuranosyl(1→2)-beta-D-glucopyranoside (1) dan 4-beta-D-(glucopyranosyl hydroxymethyl) phenyl 5-O-benzoyl-beta-D-apiofuranosyl (1→2)- beta- D-glucopyranoside (2) (Li *et al.*, 2009). Lima senyawa glikosida fenolik baru cucurbitosides A—E (1—5), diisolasi dari biji *Cucurbita moschata* yaitu 2-(4-hydroxy) phenylethanol 4-O-(5-O-benzoyl)-β-D-apiofuranosyl (1→2)-β-D-glucopyranoside (1), 2-(4-hydroxyphenyl)ethanol 4-O-[5-O-(4-hydroxy)benzoyl]-β-D-apiofuranosyl(1→2)-β-D-glucopyranoside (2), 4-hydroxybenzyl alcohol 4-O-(5-O-benzoyl)-β-D-apiofuranosyl(1→2)-β-D-glucopyranoside (3), 4-hydroxybenzyl alcohol 4-O-[5-O-(4-hydroxy) benzoyl]-β-D-apiofuranosyl (1→2)-β-D-glucopyranoside (4) dan 4-hydroxyphenyl 5-O-benzoyl-β-D-apiofuranosyl(1→2)-β-D-glucopyranoside (5) (Koike, *et al.*, 2005).

### 4. Ekstraksi dan KLT

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair yang dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewan menurut cara yang cocok, di luar matahari langsung (Anonim, 1979).

Metode dasar penyarian adalah maserasi, perlokasi, dan soxhletasi. Pemilihan terhadap ketiga metode tersebut disesuaikan dengan kepentingan dalam memperoleh sari yang baik (Anonim, 1989).

Maserasi adalah salah satu metode dari ekstraksi dimana terjadi proses penetrasi pelarut ke dalam sel melalui dinding sel. Pelarut akan melarutkan zat aktif, kemudian membawanya keluar sel berdasarkan perbedaan konsentrasi zat aktif di dalam dan diluar sel. Pelarut yang keluar membawa zat aktif, akan digantikan oleh pelarut baru. Hal tersebut terjadi berulang-ulang hingga tercapai kesetimbangan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel. Untuk mengekstraksi senyawa yang terkandung dalam tanaman diperlukan pelarut yang sesuai. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan cara pemisahan campuran senyawa menjadi senyawa murninya, analisisnya cepat dan memerlukan bahan yang sangat sedikit, baik penyerap maupun cuplikannya (anonim, 2009).

## **5. Docking Molekuler**

*Docking* molekuler merupakan suatu metode komputasi untuk menggambarkan interaksi antara suatu molekul sebagai ligan dengan suatu reseptor atau protein, hal ini termasuk salah satu uji *in silico*. Proses *docking* diawali dengan penerapan *docking algorithm* yang memposisikan ligan pada sisi aktif dengan konformasi tertentu dan urutan pencarian konformasi tertentu, kemudian *scoring function* yang melengkapi *docking algorithm* akan mengevaluasi konformasi dengan melakukan perhitungan berdasarkan sifat fisikokimia untuk memperoleh struktur molekul yang optimal. Software yang dapat digunakan diantaranya *docking PLANTS* yang merupakan program yang dikembangkan untuk memprediksi interaksi ligan dengan target biomakromolekul.

## **6. Uji Sitotoksik**

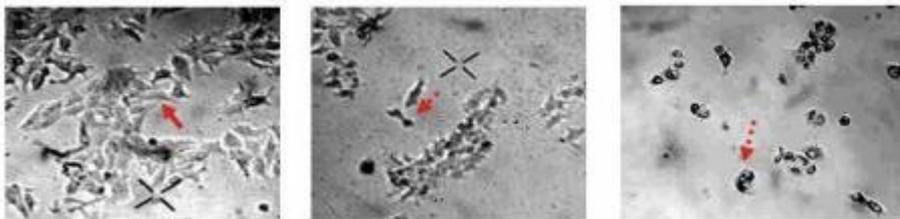
Dua metode umum yang digunakan untuk uji sitotoksik adalah metode perhitungan langsung (*direct counting*) dengan menggunakan biru tripan (*trypan blue*) dan metode MTT *assay* (Junedy, 2005).

Uji MTT *assay* merupakan salah satu metode yang digunakan dalam uji sitotoksik. (Doyle dan Griffith, 2000). Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter nilai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai  $IC_{50}$  merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel (Meiyanto, 2003). Semakin besar harga  $IC_{50}$  maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Melannisa, 2004). Akhir dari

uji sitotoksisitas dapat memberikan informasi persen sel yang mampu bertahan dihidup, sedangkan pada organ target memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Doyle dan Griffiths, 2000 *cit* Nurrochmad, 2001).

## 7. Sel HeLa

Sel HeLa merupakan salah satu model sel kanker serviks yang banyak digunakan dalam penelitian. Sel tersebut diambil dari jaringan serviks seorang wanita Kaukasian berumur 69 tahun golongan darah O, dengan Rh positif, berupa sel *adherent* (melekat) yang dapat ditumbuhkan dalam media penumbuh DMEM atau RPMI yang mengandung *fetal bovine serum* (FBS) 10% dan antibiotik Penicilin-Streptomycin 1% (Anonim, 2007). Sel HELA memiliki karakteristik antara lain resisten agen kemoterapi (Mechetner et al., 1998; Aouali et al., 2003), mengekspresikan reseptor estrogen (ER +), overekspresi Bcl-2 (Butt et al., 2000; Amundson et al., 2005).



**Gambar 1.** Morfologi sel HELA pada perlakuan EP dan FKP. Uji dilakukan dengan menginkubasi  $5 \times 10^3$  sel HELA dengan EP (25-100  $\mu\text{g/mL}$ ) dan FKP (10-500  $\mu\text{g/mL}$ ) selama 48 jam. A adalah kontrol sel, B adalah sel dengan perlakuan EP 75  $\mu\text{g/mL}$ , C adalah sel dengan perlakuan FKP 70  $\mu\text{g/mL}$ .

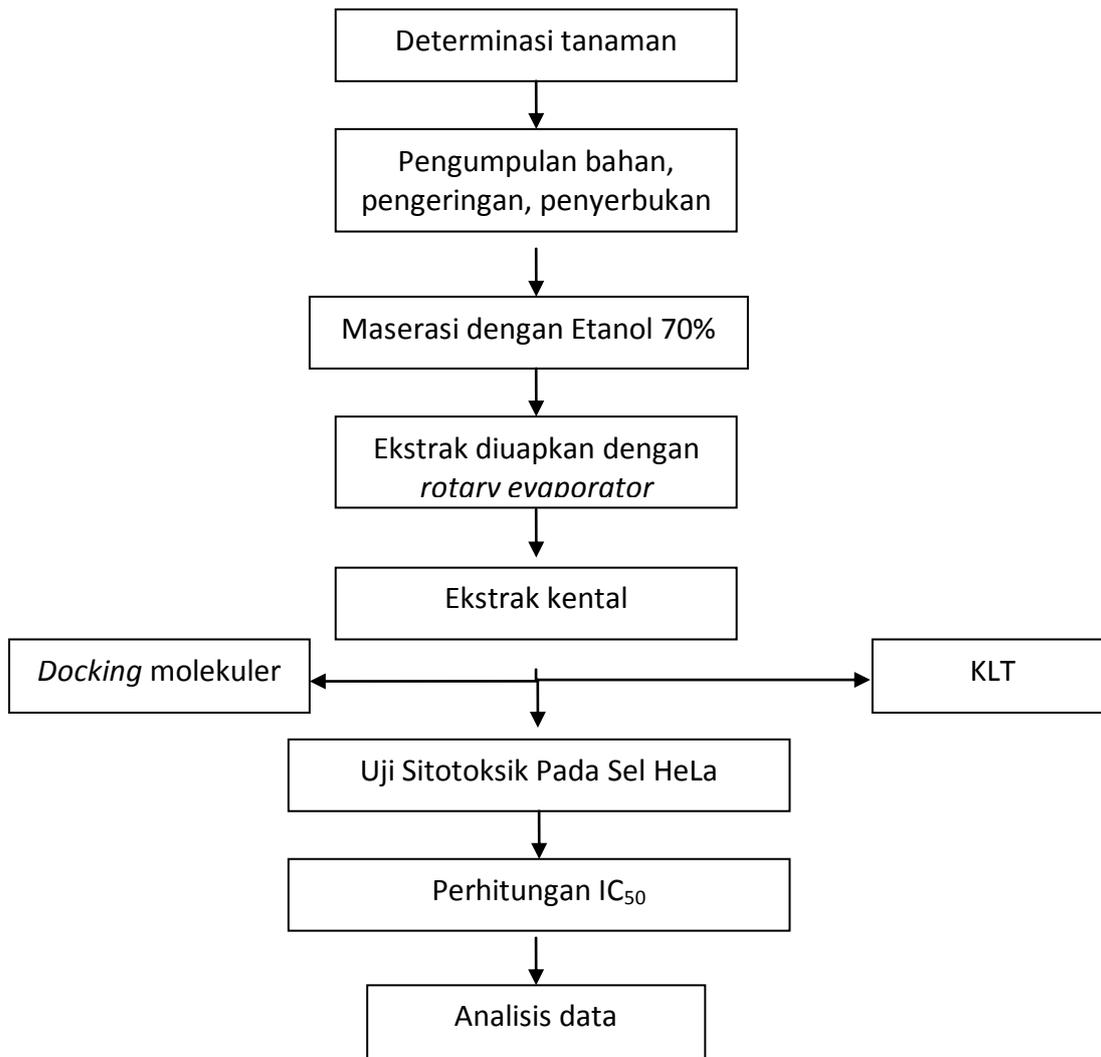
## II. METODOLOGI PENELITIAN

### a. Waktu dan Tempat Pelaksanaan penelitian

Waktu : Bulan November 2016 – Maret 2017

Tempat pelaksanaan : Laboratorium Penelitian dan lab In Vitro FKIK UMY

### b. Rancangan Penelitian



### c. Variabel Penelitian

Variabel penelitian terdiri atas 2 (dua) macam yaitu : variabel bebas (*independent variabel*) atau variabel yang tidak tergantung pada variabel lainya, dan Variabel tergantung (*dependent variabel*) atau variabel yang tergantung pada variabel lainya. Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kloroform biji labu kuning, konformasi optimal struktur senyawa cucurmosin.

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek sitotoksik terhadap sel kanker serviks HeLa, skor *docking* senyawa cucurmosin dengan protein bcl-2.

**d. Cara Kerja**

**A. Pembuatan ekstrak etanolik biji labu kuning (*Cucurbita moschata*) dengan metode maserasi**

**1. Pembuatan serbuk biji labu kuning**

Biji labu kuning yang telah dideterminasi dicuci bersih, ditiriskan kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan. Biji yang telah kering ini kemudian dibuat serbuk dengan blender dan diayak dengan ayakan no. 100, kemudian dilakukan perhitungan prosentase bobot kering terhadap bobot basah.

**2. Pembuatan ekstrak dengan metode maserasi dan uji KLT**

Serbuk biji labu kuning ditimbang sebanyak 500,0 gram dimasukkan kedalam bejana kemudian di rendam dengan 750 mL etanol 70%. Proses maserasi dilakukan selama  $\pm$  5 hari. Kemudian diekstrak dan diambil maseratnya. Sisa serbuk hasil penyaringan di remaserasi dengan 250 mL etanol 70% selama  $\pm$  2 hari. Ekstrak yang didapat dipekatkan dengan kompor dan *rotary evaporator* sampai kental dan bebas etanol. Setelah itu di lakukan pula kromatografi dengan kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam berupa silika gel GF<sub>254</sub> fase gerak berupa kloroform, etil asetat, heksane, dan air dalam berbagai variasi perbandingan dengan pembanding berupa *flavonoid* (*rutin*) guna mengetahui golongan senyawa *flavonoid*, sedangkan identifikasi senyawa *terpenoid* dengan menyemprotkan pereaksi *Lebermann-burchard* yang akan berfluoresensi pada uv 360 nm.

**B. Docking Molekuler (*In silico*)**

Pertama-tama dilakukan pengunduhan protein Bcl-2 yang akan diposisikan sebagai reseptor, pengunduhan ini dilakukan melalui PDB (*Protein Data Bank*) dengan alamat <http://www.pdb.org>. Mula-mula dilakukan proses validasi pada reseptor tersebut dengan ligan asli yang di unduh dari PDB. Tahapan proses validasi yang meliputi preparasi *ligand*, *ref\_ligand.mol2*, dan *running docking simulation*. Parameter validasi berupa nilai RMSD. Nilai RMSD yang kurang dari 2

menunjukkan metode ini valid dan dapat digunakan untuk men-*docking*-kan senyawa *5-fluorourasil* (5-FU) yang merupakan obat antikanker sebagai ligan pembanding, dan ligan dari senyawa aktif yang diketahui melalui uji KLT dalam ekstrak etanolik labu kuning (golongan triterpenoid dan *flavonoid*) yang diuji. Hasil *docking* antara senyawa 5-FU dan senyawa aktif dalam ekstrak etanolik labu kuning dinyatakan dalam skor *docking*. Semakin besar nilai mutlak skor *docking* maka senyawa tersebut semakin potensial untuk berikatan dengan reseptor.

### C. Uji Sitotoksitas

#### 1. Sterilisasi alat

Semua alat yang akan dipakai dicuci dengan menggunakan sabun dan dikeringkan, kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C, dengan tekanan 15 lb lalu dikeringkan dalam oven. Pengerjaan dilakukan secara aseptis dalam *Laminar Air Flow Hood* (LAF) yang telah disterilisasi dengan sinar UV selama 30 menit, disemprot etanol 70% dan dilap.

#### 2. Pembuatan larutan media dan media kultur

Larutan RPMI dibuat dengan melarutkan RPMI dalam aquades, ditambah 2,0 gram NaHCO<sub>3</sub> dan 2,0 gram Hepes. Larutan selanjutnya distirer sampai homogen kemudian dibuffer dengan HCl encer 1N hingga pH 7,2-7,4 diukur dengan pH meter. Selanjutnya larutan disaring dengan filter polietilensulfon steril 0,2 µm secara aseptis. Media kultur dibuat dengan cara mencampurkan larutan RPMI steril dengan FBS 10%, dan penisilin-streptomisin 1% secara aseptis di dalam LAF.

#### 3. Preparasi sel

Sel yang inaktif dalam ampul diambil dari tangki nitrogen cair, segera dicairkan pada suhu 37°C, kemudian ampul disemprot dengan etanol 70%. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung konikal steril berisi media kultur. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 3000 *rpm* selama 5 menit, supernatan dibuang, pellet ditambah 1 ml media penumbuh yang mengandung 10% FBS, resuspensi perlahan hingga homogen, selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *tissue culture flask* kecil, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO<sub>2</sub>. setelah 24 jam, media diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian.

#### 4. Panen sel

Setelah jumlah sel cukup, media dibuang dan sel dicuci koloninya dengan jalan penambahan larutan PBS dan jika perlu resuspensikan perlahan, buang larutan tersebut,

tambahkan larutan 1 ml tripsin 2,5% pada sel, namun agar merata ditambah 3 ml larutan PBS, diamkan selama 3-5 menit agar tripsin bekerja dengan baik. Sel dipindah ke dalam tabung konikal steril dan ditambah PBS sampai volume 10 ml dan disentrifugasi pada 3000 *rpm* selama 3 menit. Sel dicuci dua kali menggunakan media yang sama dan dihitung jumlah selnya menggunakan haemositometer. Suspensi sel ditambah jumlah media kultur sehingga diperoleh konsentrasi sel sebesar  $5 \times 10^3$  sel/100  $\mu$ l dan siap digunakan untuk penelitian.

#### **5. Pembuatan larutan uji**

ekstrak etanolik daun Waru dibuat stok dengan kadar  $2 \times 10^5$   $\mu$ g/ml dalam DMSO. Selanjutnya dari larutan stok tersebut dibuat seri konsentrasi dalam media kultur.

#### **6. Uji sitotoksitas menggunakan metode MTT (Mosmann, 1983)**

Sel dengan kepadatan  $5 \times 10^3$  sel/sumuran didistribusikan ke dalam *plate* 96 sumuran dan diinkubasi selama 48 jam untuk beradaptasi dan menempel di dasar sumuran. Keesokannya media diambil, dicuci PBS kemudian ditambahkan 100  $\mu$ L media kultur yang mengandung DMSO 0,2% saja (kontrol) atau sampel uji dalam bentuk tunggal (Ekstrak etanolik daun Waru) diinkubasi selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang, dicuci dengan 100  $\mu$ L PBS. Kemudian ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100  $\mu$ L media kultur yang mengandung 5 mg/ml MTT, inkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 4 jam, media yang mengandung MTT dibuang, dicuci PBS kemudian ditambahkan larutan *stopper* SDS dalam HCl 0,1% 200  $\mu$ L untuk melarutkan kristal formazan. Digoyang di atas *shaker* selama 10 menit kemudian dibaca dengan dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm.

### **e. Analisis dan Pengolahan Data**

#### **1. Uji sitotoksitas**

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran dikonversi ke dalam persen sel hidup dan dianalisis dengan statistik, menggunakan metode uji korelasi yang diikuti dengan uji signifikansi untuk mengetahui signifikansi perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Persen sel hidup dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{Hidup} = \frac{\text{AbsorbansiSelDenganPerlakuan} - \text{AbsorbansiKontrolMedia}}{\text{AbsorbansiKontrolSel} - \text{AbsorbansiKontrolMedia}} \times 100\%$$

Dari data % sel hidup dan log konsentrasi dihitung nilai  $IC_{50}$  menggunakan analisis probit (SPSS 14.0) untuk mengetahui potensi sitotoksitasnya. Nilai  $IC_{50}$  adalah konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel, digunakan sebagai parameter sitotoksik.

## 2. Uji *Docking* Molekuler (*In Silico*)

Dari *docking* molekuler nantinya akan diperoleh skor *docking* dan nilai RMSD. Nilai RMSD digunakan sebagai parameter validitas, jika nilainya kurang dari dua, menunjukkan bahwa reseptor yang digunakan valid dan dapat digunakan untuk proses *docking*. Skor *docking* digunakan sebagai parameter potensi ligan terhadap reseptor. Apabila skor *docking* senyawa hasil penelusuran KLT dari ekstrak etanolik labu kuning mirip, mendekati atau lebih besar dari skor *docking* senyawa obat 5-FU maka senyawa tersebut memiliki aktivitas yang mirip atau lebih baik dibandingkan dengan senyawa-senyawa obat anti kanker serviks dan artinya ekstrak tersebut poten atau lebih poten sebagai alternatif agen antikanker alami.

### JADWAL PELAKSANAAN KEGIATAN

Jadwal Kegiatan	Bulan				
	1	2	3	4	5
<b>Tahap Uji</b>					
<b>1. Tahap Persiapan</b>					
a. determinasi tanaman	√				
b. pengumpulan bahan tanaman	√				
<b>2. Tahap Pelaksanaan</b>					
a. percobaan pendahuluan					
- persiapan ekstrak etanolik biji labu kuning		√			
- pemekatan ekstrak biji labu kuning		√			
- kontrol kualitas ekstrak etanolik		√			
- persiapan sel		√			
b. uji sample terhadap sel		√	√	√	
c. pengamatan setelah perlakuan			√	√	
<b>3. Tahap Penyelesaian</b>					
a. pengumpulan data penelitian				√	
b. pengolahan data				√	
c. analisis data					√
d. penyusunan laporan akhir					√
e. pengumpulan laporan akhir					√

## RINCIAN BIAYA PENELITIAN

Nama	Jumlah	Satuan	Harga Satuan, Rp.	Jumlah, Rp (dalam ribuan)
Biji labu kuning	10	Kg	40.000	400
Tripsin	1	Mg	713.000	713
Asam asetat glasial	1	L	50.000	50
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anhidrat	1	g	12.880	12,88
Aquades	1	botol	100.000	100
Etanol teknis	1	L	10.000	10
HCL	1	L	80.000	80
Sel HELA	1	Flash	750.000	750
Penisilin-streptomisin (Glibco)	1	Botol	150.000	150
Fungizon (Glibco)	1	Botol	200.000	200
Filter 0,22 mM ( Whatman)	1	buah	30.000	30
DMSO (Sigma)	1	Liter	300.000	300
DMEM (Gibco)	1	Pak	1.362.500	1.362,5
MTT	1	Kit	500.000	500
PBS	1	pak	55.200	55,2
Jumlah				3.713,58
SDS	1	Ucl	289.000	289
Etidium bromide 10 ml	1	Botol	174.000	174
Akridin oranye 20 gr	1	G	92.000	92
Eppendorf tube	50	Buah	500	25
Blue tips	1	pak	300.000	300
Yellow tips	1	Pak	200.000	200
96-well plate	1	Buah	40.000	40
Coverslips	1	Pak	250.000	250
Cover glass	1	Boks	100.000	100
Slide glass	1	boks	20.000	20
Centrifuge tube 15ml	2	buah	20.000	40
Culture flask	2	buah	20.000	50
Flacon	10	Buah	2000	20
Parafim	1	Rol	200.000	200
Wharman Filter paper, d= 7 cm	1	Pak	201.400	201,4
spreader	2	Buah	15.000	30
Cawan petri	2	Buah	50.000	100
Running ELISA	2	Kali	30.000	60
Masker	1	Boks	40.000	40
Sarung tangan	1	boks	50.000	50
Tisu	2	rol	2.500	5
Jumlah				6.286,4
<b>Jumlah Total</b>				<b>10.000.000,00</b>

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustinisari I.1998. *Pengaruh Ekstrak Jahe (Zingiber Officittale Roscoe) Segar dan Bertunas Terhadap Proliferasi Beberapa Alur Sel Kanker Dan Normal*. Skripsi Institute Pertanian Bogor, Bogor.
- Anjelisa,P.Z., Nainggolan,M.. 2007. *Penentuan Sifat Kimia Fisika Senyawa Alkaloid Hasil Isolasi Dari Daun Labu kuning (Cucurbita moschatainn.) Poppy Anjelisa Z. Hasibuan dan Marline Nainggolan*. Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi USU.
- Anonim. *Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Strating Doses for Acute Toxicity*. [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invidocs/guidance/gd\\_s2.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invidocs/guidance/gd_s2.pdf).
- ATCC (American Type Cultere Collection). 1992. *Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*. 7<sup>th</sup> American type collection.
- Barus Br.,Mutiara. 2011. *Perubahan Jumlah Total Limfosit Sebagai Alternatif Pemeriksaan CD4 Pada Pasien HIV/AIDS Yang Diberikan Antiretroviral*. FK USU.
- Bogoriani N.W.,Santi S.R.,Asih I.A.R.A.. 2007. *Isolasi Senyawa Sitotoksis Dari Daun Andong (Cordyline Terminalis Kunth)*. Jurusan Kimia FMIP Universitas Airlangga. Bukit Jimbaran.
- Chen, T.R., Drabkowski, D., Hay, R.J., Macy, M and Peterson, W. Jr.. 1987. *WiDr is a derivative of Another Colon Adenocarcinoma Cell Line, HT-29*. Cancer GenetCytogenet, 27(1):125-34.
- Cotran R.S., V.Kumar and S.L. Robbins. 1994. *Phatologic Basis of Disease*. W.B. Saunders Company, philadelphia.
- Doyle, A., Griffiths, J.B. 2000. *Cell and Tissue Culture for medical research*. John Willey and Sons Ltd : New York
- Fitrianisa, F., Ridwan, M., Aditya, D.P..2012. *Kajian Secara In-Silico dan In-Vitro EkstrakEtanolik Herba Labu kuning Sebagai Antikanker Serviks Yang Potensial dan Murah*.Jurusan Farmasi FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- Freshney, I.R. 1987. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Alan R. Liss, New York.
- Friboulet A, Rieger F,dkk. 1990.*Interaction of anorganophosphate with peripheral site on Acetylcholinesterase*. Biochemistry,29, 914-920.
- Goodwin,E.,DiMaio,D.2000. *Repression Of Human Papillomavirus Oncogenes in WiDrCervical Carcinoma Cells Causes The Orderly Reactivation Of Dormant Tumor Suppressor Pathways*. Biochemistry 97 (23):12513-12518.

- Janibah R. 2009. *Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol Herba Labu kuning (Cucurbita moschata) Terhadap Sel T47d Dan Profil Kromatografi Lapis Tipis*. Skripsi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Jansen, W.J.M., Zwart, B., Hulscher, S.T.M., Giaccone, Pinedo, H.M. and Boven, E.. 1997. *CPT-11 in Human Colon-Cancer Cell Lines and Xenografts: Characterization of Cellular Sensitivity Determinants*. *Int. J. Cancer*, **70**:335-340.
- King, S.B. 2000. *Cancer Biology*. Pearson Education : London
- Meiyanto, E., Supardjan, Muhammad D., dan Dewi A. 2006. *Efek Antiproliferasi Pentagamavunon-0 Terhadap Sel Kanker Serviks T47D*. *Jurnal kedokteran Yarsi* 141.
- Meyer, F., Putnam, Jacobsen N., dan Mc. Laughlin. 1982. *Brine Shrimp; A Convenient General Bioassay for Active Lant Constituents*. *Plant Medica* 45.
- Palozza, P., Serini, S., Maggiano, N., Giuseppe, T.. 2005. *B-Carotene Downregulates the Steady-State and Heregulin-a-Induced COX-2 Pathways in Colon Cancer Cells*. *J.Nutr.* 135:129-136
- Sukardja. 2000. *Onkologi Klinik Edisi 2*. Airlangga University Press: Jakarta.
- Voigt, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Diterjemahkan oleh Soewardi
- Wijaya Kusuma, H, S salimarta & AS wirian. 1996. *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*. Jakarta.

## Biodata Ketua Tim Pengusul

1	Nama Lengkap (dengan gelar)	Rifki Febriansah, S. Farm., M.Sc., Apt.
2	Jenis Kelamin	L
3	Jabatan Fungsional	Asisten Ahli
4	NIP/NIK/Identitas lain	173188
5	NIDN	0527028701
6	Tempat dan Tanggal Lahir	Bantul, 27 Februari 1987
7	E-mail	<a href="mailto:briansyah_rifki@yahoo.com">briansyah_rifki@yahoo.com</a>
8	Nomor Telepon/ HP	081804042212
9	Alamat Kantor	Jl. Lingkar Selatan, Taman Tirto, Kasihan, Bantul, DIY 55183
10	Nomor Telepon/ Faks	(0274) 387656 / (0274) 387646
12	Lulusan yang Telah Dihilangkan	S1= 7 orang, S2= - orang; S3= - orang
13	Mata kuliah yang diampu	1. Fitomedisinal 2. Biologi Molekuler 3. Biologi Farmasi

### A. Riwayat Pendidikan

	S-1	S-2	S-3
Nama Perguruan Tinggi	UGM	UGM	-
Bidang Ilmu	Farmasi Bahan Alam	Ilmu Farmasi	-
Tahun Masuk-Lulus	2005 - 2009	2010 - 2012	-
Judul Skripsi/Tesis/Disertasi	Uji In Vivo Aktivitas Antikanker Ekstrak etanolik Rumput Mutiara pada Tikus terinduksi DMBA	Uji In Silico dan In Vitro Senyawa Hesperidin sebagai Agen Kokemoterapi dengan Doxorubicin untuk Mengatasi Resistensi Sel Kanker Payudara	-
Nama Pembimbing/Promotor	Muthi Ikawati, M.Sc., Apt	Prof. Dr. Agung Endro, M.Si., Apt	-

### B. Pengalaman Penelitian dalam 5 Tahun Terakhir (Bukan Skripsi, Tesis maupun Disertasi)

No	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber	Jml (Juta Rp)
1	2012	Optimasi Efek Antiinflamasi senyawa Turunan Piperine dengan Docking Molekuler Metode PLANTS	UMY	3,000,000
2	2013	Analisis Kandungan Vitamin E dalam Daging Buah Siwalan dengan Metode <i>High Performance Liquid Chromthography</i> (HPLC)	UMY	3,500,000

**C. Pengalaman Pengabdian Kepada Masyarakat dalam 5 Tahun Terakhir**

No	Tahun	Judul Pegabdian Kepada Masyarakat	Pendanaan	
			Sumber	Jml (Juta Rp)
1	2012	Penyuluhan dan Pelatihan Pembuatan Es Krim Empon-empon di Desa Mutihan, Bantul	FKIK UMY	500,000
2	2014	Penyuluhan tanaman obat antihipertensi di dusun Mutihan Wirokerten	FKIK UMY	500.000

**D. Publikasi Artikel Ilmiah dalam Jurnal dalam 5 Tahun Terakhir**

No	Judul Artikel Ilmiah	Nama Jurnal	Volume/ Nomor/Tahun
1	Hesperidin as a preventive resistance agent in MCF-7 breast cancer cells line resistance to doxorubicin	<i>Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine</i>	4(3): 228-233; tahun 2014

**E. Pemakalah Seminar Ilmiah (Oral Presentation) dalam 5 Tahun Terakhir**

No	Nama Pertemuan Ilmiah/Seminar	Judul Artikel Ilmiah	Waktu dan Tempat
1	24 <sup>th</sup> Federation of Asia Pharmaceutical Associations Congress (FAPA)	In-vitro Study og K-PGV-0 as Co-Chemotherapy Agent with Doxorubicin on HeLa Cervic Cancer Cell Line	September 13 <sup>rd</sup> – 16 <sup>th</sup> 2012, di Bali

	Scientific Symposium (IJSS)	Resistance Agent in MCF-7 Breast Cancer Cells Line Resistant Doxorubicin By Inducing Cell Death And Inhibiting Pgp Expression	2012, di Jepang
3	2nd International Conference on Pharmacy and Advance Pharmaceutical Sciences (ICPAPS)	Study of Hesperidin as Preventive Resistance Agent in MCF-7 Breast Cancer Cell Lines Resistant Doxorubicin	July 20 <sup>th</sup> 2011, di Yogyakarta

**F. Karya Buku dalam 5 Tahun Terakhir**

No	Judul Buku	Tahun	Jumlah Halaman	Penerbit
1	-	-	-	-

**G. Perolehan HKI dalam 5-10 Tahun Terakhir**

No	Judul/Tema HKI	Tahun	Jenis	Nomor P/ID
1	-	-	-	-

**H. Pengalaman Merumuskan Kebijakan Publik/ Rekayasa Sosial Lainnya dalam 5 Tahun Terakhir**

No	Judul/Tema/Jenis Rekayasa Sosial Lainnya yang Telah Diterapkan	Tahun	Tempat Penerapan	Respon Masyarakat
1	-	-	-	-

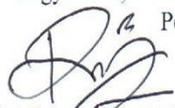
**I. Penghargaan dalam 10 Tahun Terakhir (dari Pemerintah, asosiasi, atau institusi)**

No	Jenis Penghargaan	Institusi Pemberi Penghargaan	Tahun
1	Dosen Pendamping Finalis PKM di UMY tahun	DIKTI	2012
2	Juara 1 Pemilihan Peneliti Remaja Indonesia	LIPI	2009
3	Mahasiswa Berprestasi tingkat Fakultas	Farmasi UGM	2009

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila di kemudian hari ternyata ketidaksesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima sanksi.

Demikian biodata ini saya buat dengan sebenarnya untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam pengajuan Hibah Pengabdian KKN PPM.

Yogyakarta, 20 Mei 2016

 Pengusul,

(Rifki Febriansah, M.Sc., Apt)



## UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA

Alamat : Jln. Lingkar Selatan, Tarmatirto, Kasihan, Bantul, Yogyakarta 55183  
Telp. (0274) 387886, Fsx. (0274) 387 688

### SURAT PERNYATAAN KETUA PENELITIAN/PELAKSANA

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rifki Febriansah, M.Sc., Apt.  
NIDN : 0527028701  
Pangkat / Golongan : Asisten Ahli / III B  
Jabatan Fungsional : -

Dengan ini menyatakan bahwa proposal penelitian sssv dengan judul:

#### **ANALISA KANDUNGAN SENYAWA KIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIKANKER FRAKSI Kloroform DARI HERBA BANDOTAN (*Ageratum conyzoides L.*) PADA SEL KANKER SERVIKS HeLa : STUDI *IN VITRO***

yang diusulkan dalam skema Hibah Penelitian Dosen Muda LP3M UMY untuk tahun anggaran 2016/2017 bersifat original dan belum pernah didanai oleh lembaga / sumber dana lain.

Bilamana di kemudian hari ditemukan ketidaksesuaian dengan pernyataan ini, maka saya bersedia dituntut dan diproses sesuai dengan ketentuan yang berlaku dan mengembalikan seluruh biaya penelitian yang sudah diterima ke kas UMY.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan sesungguhnya dan dengan sebenar-benarnya.

Yogyakarta, 25 September 2016

Mengetahui,  
Keprosdi Farmasi FKIK UMY,



(Sabtanti Harinarti, Ph.D., Apt.)  
NIDN. 0523027304



(Rifki Febriansah, M.Sc., Apt.)  
NIDN. 0527028701