



**UJI SITOTOKSISITAS FRAKSI SENYAWA SEMBRANOID  
DAUN TEMBAKAU TERHADAP VIABILITAS  
SEL KANKER SERVIKS HeLa**

**SKRIPSI**

Oleh

**Zilfi Dita Fitriyani  
NIM 151810401063**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2019**



**UJI SITOTOKSISITAS FRAKSI SENYAWA SEMBRANOID  
DAUN TEMBAKAU TERHADAP VIABILITAS  
SEL KANKER SERVIKS HeLa**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Ilmu Biologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh:

**Zilfi Dita Fitriyani  
NIM 151810401063**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2019**

## PERSEMBAHAN

Dengan nama Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, skripsi ini penulis persembahkan kepada :

1. kedua orang tua saya, Ayahanda Muslih dan Ibunda Sri Utami atas segala kasih sayang, dukungan, nasehat, dan bimbingan serta doa yang terus terpanjat dalam setiap sujudnya;
2. saudara dan seluruh keluarga atas dukungan dan motivasinya serta doa setulus hati;
3. guruku yang telah menuangkan ilmunya dan membimbing sejak TK hingga Perguruan Tinggi;
4. dosen pembimbing dan dosen penguji yang selalu saya jadikan panutan;
5. almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;

## MOTTO

Ya Allah, limpahkanlah shalawat atas cahaya di antara segala cahaya, rahasia di antara segala rahasia, penawar duka dan pembuka pintu kemudahan, Sayyidina Muhammad manusia pilihan, juga kepada keluarganya yang suci dan sahabatnya yang baik, sebanyak jumlah kenikmatan Allah dan karunia-Nya.

(Wali Qutub Al-Imam Ahmad Al-Badawi ra)<sup>\*)</sup>

Musuh yang paling berbahaya di atas dunia ini adalah penakut dan bimbang.  
Teman yang paling setia, hanyalah keberanian dan keyakinan yang teguh.

(Andrew Jackson)<sup>\*\*)</sup>

---

\*) Wali Qutub Al-Imam Ahmad Al-Badawi ra. Shalawat Nuril Anwar Agus Abdurahim Dahlan. 2015. Al – Majmu’us Sariful Kamil. Garut : CV Penerbit Jumanatul ‘Ali – ART.

\*\*\*) Andrew Jackson. 1839. *Truth is mighty and will always ultimately prevail-it is the attribute of duty*: South Carolina.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Zilfi Dita Fitriyani

NIM : 151810401063

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Uji Sitotoksisitas Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau Terhadap Viabilitas Sel Kanker Serviks HeLa” adalah benar-benar hasil karya sendiri dan belum pernah diajukan pada insitusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini didanai oleh Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes serta hasil penelitian tidak dapat dipublikasikan tanpa ijin dari pihak yang mendanai. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 01 Juli 2019

Yang menyatakan

Zilfi Dita Fitriyani

NIM 151810401063

**SKRIPSI**

**UJI SITOTOKSISITAS FRAKSI SENYAWA SEMBRANOID  
DAUN TEMBAKAU TERHADAP VIABILITAS  
SEL KANKER SERVIKS HeLa**

Oleh:

Zilfi Dita Fitriyani  
151810401063

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dra. Mahriani, M. Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes.

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Uji Sitotoksitas Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau Terhadap Viabilitas Sel Kanker Serviks HeLa” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

**Tim Penguji:**

Ketua

Anggota 1

Dra. Mahriani, M.Si  
NIP. 195703151987022001

Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes  
NIP. 197005091999032001

Anggota II

Anggota III

Syubbanul Wathon, S. Si., M. Si  
NRP. 760016783

Drs. Rudju Winarsa, M. Kes  
NIP. 196008161989021001

Mengesahkan  
Dekan

Drs. Sujito, Ph.D  
NIP. 196102041987111001



## RINGKASAN

**Uji Sitotoksitas Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau Terhadap Viabilitas Sel kanker Serviks HeLa:** Zilfi Dita Fitriyani, 151810401063; 2015: 53 halaman; Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Kanker merupakan penyakit tidak menular yang ditandai dengan pertumbuhan sel terus-menerus dan tidak terkendali yang dapat merusak jaringan sekitarnya. Di Indonesia, kanker yang mempunyai prevalensi tinggi antara lain kanker payudara sebesar 0,5% dan kanker serviks sebesar 0,8%. Kanker serviks merupakan jenis kanker urutan kedua yang terjadi pada wanita di Indonesia dengan tingkat morbiditas dan mortalitas tinggi. Kanker serviks sebagian besar disebabkan oleh HPV (*Human Papillomavirus*), penyebaran infeksi oleh virus ini sebagian besar melalui hubungan seksual. Pengobatan kanker serviks umumnya dilakukan melalui radioterapi, tetapi pengobatan ini memiliki efek samping antara lain menyebabkan toksisitas kulit akut, komplikasi sistem saraf pusat dan kelainan pada jantung. Selain itu, biaya yang digunakan untuk radioterapi mahal, sehingga dibutuhkan cara pengobatan yang lain dengan pemanfaatan tanaman herbal yang berpotensi sebagai anti kanker. Salah satu bahan alam yang dapat digunakan sebagai anti kanker adalah daun tembakau.

Daun tembakau memiliki kandungan senyawa kimia salah satunya adalah senyawa sembranoid. Senyawa sembranoid pertama kali ditemukan pada *soft coral* laut yang diduga memiliki banyak kesamaan struktur dengan sembranoid tembakau. Beberapa penelitian melaporkan bahwa pemberian sembranoid yang diisolasi dari *soft coral* dapat menghambat proliferasi sel kanker karena mampu menginduksi *cell cycle arrest* dan memicu apoptosis dengan menjaga aktivitas protein p53 dan pRb. *Soft coral* memiliki kemampuan reproduksi yang lambat sehingga pemanfaatan senyawa sembranoid pada *soft coral* secara terus menerus dapat mengancam kelestarian dan dapat mengganggu ekosistem terumbu karang. Salah satu tumbuhan yang mengandung senyawa sembranoid yang berperan penting dalam mencegah resiko terkena kanker serviks adalah daun tembakau



(*Nicotiana tabacum* L.). Daun tembakau yang mengandung senyawa sembranoid merupakan salah satu hasil produk pertanian yang menjadi komoditi ekspor unggulan Kabupaten Jember. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian aktivitas sitotoksik ekstrak daun tembakau terhadap sel HeLa untuk pencegahan resiko kanker serviks.

Penelitian dilakukan secara *in vitro*, bertujuan untuk mengetahui konsentrasi fraksi senyawa sembranoid daun tembakau yang menyebabkan kematian sel HeLa ( $IC_{50}$ ). Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan fraksi senyawa sembranoid pada  $IC_{50}$  57,56  $\mu\text{g/ml}$  dapat menyebabkan kematian terhadap sel HeLa sebesar 50%. Perlakuan fraksi senyawa sembranoid daun tembakau pada  $IC_{50}$  terhadap sel HeLa tersebut hanya menyebabkan persentase kematian yang kecil pada sel Vero (sel normal), yaitu pada konsentrasi  $IC_{50}$  115,39  $\mu\text{g/ml}$  hanya menyebabkan kematian pada sel normal sebesar 25,356%, sehingga tidak berbahaya bagi sel normal.

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala anugerah dan rahmat-Nya, sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Sitotoksisitas Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau Terhadap Viabilitas Sel Kanker Serviks HeLa”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu prasyarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Ibunda Sri Utami dan Ayahanda Muslih, kedua orang tua saya tercinta yang tak kenal lelah mendoakan, memberi dukungan, perhatian, serta kasih sayang yang teramat tulus selama ini;
2. Keluarga besar saya yang senantiasa memberikan dukungan, doa dan kasih sayang kepada saya dalam menempuh pendidikan di Universitas Jember;
3. Dra. Mahriani, M. Si. selaku dosen pembimbing utama dan dosen pembimbing akademik yang dengan penuh kesabaran telah meluangkan waktu, pikiran, saran, serta memberikan motivasi dan semangat yang tiada hentinya selama penyusunan skripsi ini;
4. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes. selaku dosen pembimbing anggota yang telah memberikan bimbingan, saran, motivasi, meluangkan waktunya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik, serta melibatkan penulis dalam penelitiannya;
5. Syubbanul Wathon, S. Si., M. Si. dan Drs. Rudju Winarsa, M. Kes. selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak kritik dan saran yang sangat membangun dalam penyusunan skripsi ini;
6. Ari Satia Nugraha, S. F., G. Dipsc., M. Sc., Ph. D., Apt. selaku pembina protokol dalam melaksanakan metode kerja selama di laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Jember;

7. Bapak dan Ibu dosen, *staff* akademik, serta teknisi Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, teknisi Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Jember, dan teknisi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada;
8. Rekan penelitian Laboratorium Zoologi Lidia Maziyyatun, Fara Difka Afdilla, Reno Astin Andriyani, Hilda Aunillah, Resa Miftahatu Yuniar, Rilla Nofita Putri, Isna Quratul Akyun, Yenny Febriana Ramadhan Abdi terima kasih atas segala semangat dan kebersamaannya;
9. Segenap teman-teman Biologi 2015, keluarga KKN PPM 2018, sahabat-sahabat saya terkasih terima kasih atas keceriaan, motivasi dan dukungannya selama ini;
10. Keluarga besar Kos Rumah Bunda Hasna Primis Yana, Siti Rohimah, Indah Yunitasari dan Kos Sumatra terima kasih atas kebersamaan, motivasi, serta dukungannya selama ini;
11. Serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 01 Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	ii
HALAMAN MOTO .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iv
HALAMAN PEMBIMBING .....	v
HALAMAN PENGESAHAN .....	vi
RINGKASAN .....	vii
PRAKATA .....	ix
DAFTAR ISI .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	3
1.5 Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Kanker Serviks dan Regulasi Siklus Sel .....	4
2.2 Kandungan Senyawa Kimia Daun Tembakau ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.) .....	7
2.3 Peran Senyawa Sembranoid Daun Tembakau ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.) Sebagai Anti kanker .....	8
2.4 Uji Sitotoksisitas dengan Menggunakan MTT ( <i>Microculture Tetrazolium Technique</i> ) .....	9
2.5 Hipotesis .....	10
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>11</b>

3.1 Tempat dan Waktu .....	11
3.2 Alat dan Bahan .....	11
3.3 Rancangan Penelitian .....	12
3.4 Prosedur Penelitian .....	13
3.5 Parameter Penelitian .....	19
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>21</b>
4.1 Uji Sitotoksitas Doksorubisin Terhadap Sel Kanker Serviks HeLa sebagai Kontrol Positif.....	21
4.2 Uji Sitotoksitas Fraksi Senyawa Sembranoid Terhadap Viabilitas Sel Kanker Serviks HeLa.....	22
4.3 Uji Sitotoksitas Fraksi Senyawa Sembranoid Terhadap Viabilitas Sel Vero (sel normal) .....	27
<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>	<b>31</b>
5.1 Kesimpulan.....	31
5.2 Saran.....	31
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>32</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>43</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
4.1 Pengaruh Fraksi Senyawa Sembranoid Terhadap Viabilitas Sel HeLa ..	23
4.2 Pengaruh Fraksi Senyawa Sembranoid Terhadap Viabilitas Sel Vero (sel normal) .....	28





**DAFTAR GAMBAR**

2.1	Mekanisme Integrasi DNA HPV oleh Onkoprotein E6 dan E7 .....	5
2.2	Mekanisme Molekuler Karsinogenesis Kanker Serviks .....	6
2.3	Struktur Senyawa Sembranoid Tembakau $\alpha$ -CBT dan $\beta$ -CBT-diol .....	9
2.4	Reaksi Reduksi MTT menjadi Formazan .....	10
4.1	Grafik Persentase Viabilitas Sel Pada Perlakuan Fraksi Senyawa Sembranoid Terhadap Sel HeLa .....	23
4.2	a) Morfologi Sel Kanker Serviks HeLa Sesudah Pemberian Ekstrak .....	25
	b) Morfologi Sel kanker Serviks HeLa Setelah Pemberian larutan MTT.....	25
4.3	Mekanisme Kematian Sel Kanker Secara Apoptosis .....	26
4.4	Grafik Persentase Viabilitas Sel Pada Perlakuan Fraksi Senyawa Sembranoid Terhadap Sel Vero .....	29
4.5	Grafik Perbandingan Perlakuan Fraksi Senyawa Sembranoid Terhadap Persentase Viabilitas Sel Hidup Vero dan HeLa .....	29
4.6	a) Morfologi Sel Vero Sesudah Pemberian Ekstrak .....	30
	b) Morfologi Sel Vero Setelah Pemberian larutan MTT .....	30



**DAFTAR LAMPIRAN**

A.	Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Tembakau ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.).....	43
B.	Hasil Analisis GC-MS Dengan Kecepatan 40 Menit.....	44
C.	Komposisi Pembuatan Media Kultur Lengkap (MK).....	45
D.	Penentuan Konsentrasi Fraksi Senyawa Sembranoid.....	45
E.	Perhitungan Persentase Sel Hidup HeLa dan Vero.....	46
F..	Tabel Persentase Sel Hidup Perlakuan Doksorubisin dan Fraksi Senyawa Sembranoid Terhadap Viabilitas Sel Kanker Serviks HeLa dan Vero.....	48
G.	Hasil Analisis Probit Fraksi Senyawa Sembranoid Terhadap Viabilitas Sel kanker Serviks HeLa.....	48
H.	Hasil Analisis Statistik Uji <i>Two Way</i> GLM Univariat Pengaruh Fraksi Senyawa Sembranoid Terhadap Sel kanker Serviks HeLa dan Sel Vero..	51
I.	Hasil Uji Lanjut Duncan Pengaruh Fraksi Senyawa Sembranoid Terhadap Sel Kanker Serviks HeLa dan Sel Vero.....	53

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyakit tidak menular yang ditandai dengan pertumbuhan sel terus-menerus dan tidak terkendali yang dapat merusak jaringan sekitarnya (Depkes, 2009). Di Indonesia, kanker yang mempunyai prevalensi tinggi antara lain kanker payudara sebesar 0,5% dan kanker serviks sebesar 0,8% (Depkes, 2013). Kanker serviks merupakan jenis kanker urutan kedua yang terjadi pada wanita di Indonesia (IARC, 2015), dengan tingkat morbiditas dan mortalitas tinggi (Yudhani, 2016). Kanker serviks sebagian besar disebabkan oleh HPV (*Human Papillomavirus*), penyebaran infeksi oleh virus ini sebagian besar melalui hubungan seksual (Setiawati, 2014). Menurut Ibeanu (2011), menyatakan bahwa DNA onkogenik ditemukan pada HPV penyebab kanker serviks.

Pengobatan kanker serviks umumnya dilakukan melalui radioterapi, tetapi pengobatan ini memiliki efek samping antara lain menyebabkan toksisitas kulit akut, komplikasi sistem saraf pusat dan kelainan pada jantung (Fitriatuzzakiyah, 2017). Selain itu, biaya yang digunakan untuk radioterapi mahal, sehingga dibutuhkan cara pengobatan yang lain dengan pemanfaatan tanaman herbal yang berpotensi sebagai anti kanker. Bahan alam sebagai obat herbal memiliki efek samping yang rendah, dan memiliki kelebihan berupa khasiat farmakologis, sehingga *World Health Organization* (WHO, 2013) menganjurkan untuk memanfaatkan tanaman herbal sebagai bahan alami untuk menjaga kesehatan (Katno, 2008). Menurut Darma *et al.* (2009), bahwa ekstrak etanolik herba ciplukan (*Physalis angulata* L.) memiliki efek sitotoksik terhadap sel HeLa dengan  $IC_{50}$  158  $\mu\text{g/ml}$  dan menginduksi ekspresi protein p53 sebagai regulator proliferasi sel. Penelitian Amalia dan Haryoto (2018), menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun ashitaba (*Angelica keiskei*) dengan nilai  $IC_{50}$  351,99  $\mu\text{g/ml}$  menunjukkan efek sitotoksik yang dapat digunakan sebagai kemopreventif dan menghambat pertumbuhan sel kanker serviks.

Tembakau merupakan salah satu hasil produk pertanian yang menjadi komoditi ekspor unggulan Kabupaten Jember (BPS, 2012). Kandungan senyawa kimia pada daun tembakau antara lain terpenoid, diterpenoid, alkaloid, selulosa, pektin, isoprenoid, steroid, dan flavonoid (Podlejski dan Olejniczak, 1983; Palic *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2010; Leffingwell, 1999; Puspita, 2011). Senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun tembakau memiliki potensi sebagai anti bakteri, anti jamur, dan anti inflamasi (Taiga dan Friday, 2009; Bakh *et al.*, 2012; Amania, 2018). Hal ini disebabkan flavonoid memiliki spektrum anti bakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri (Cowan, 1999; Naidu, 2000). Penelitian Amania (2018), menunjukkan bahwa dengan konsentrasi 80 µg/ml ekstrak flavonoid daun tembakau kasturi dapat menghambat produksi iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*) pada h-PBMCs (*Human Peripheral Blood Mononuclear Cell*) yang distimulasi lipopolisakarida. Selain itu, senyawa steroid dan terpenoid pada daun tembakau yang merupakan golongan minyak atsiri juga berperan sebagai anti bakteri. Nychas dan Tassou (2000) menyatakan bahwa minyak atsiri dapat menghambat enzim yang terlibat pada produksi energi dan pembentukan komponen struktural sehingga pembentukan dinding sel bakteri terganggu.

Senyawa terpenoid termasuk dalam golongan minyak atsiri memiliki turunan monoterpenoid, sesquiterpenoid, dan diterpenoid (Silva *et al.*, 2013). Salah satu golongan dari diterpenoid adalah sembranoid yang banyak ditemukan pada daun tembakau (Wahlberg dan Enzell, 1987). Sembranoid pertama kali ditemukan pada *soft coral* laut yang diduga memiliki banyak kesamaan struktur dengan sembranoid tembakau (Fujiki, 1993). Penelitian Liu *et al.* (2015) menyebutkan bahwa sembranoid dari *soft coral Sarcophyton elegans* memiliki kemampuan menghambat migrasi sel tumor payudara manusia MDA-MB-231 dengan dosis 10 µM. Penelitian Su *et al.* (2013), menunjukkan bahwa senyawa sembranoid diterpen dari *soft coral Sinularia flexibilis* memiliki efek sitotoksik terhadap pertumbuhan sel HeLa, HepG2, MCF-7 dan MDA-MB-231. Menurut

Yuan *et al.* (2019), menyatakan bahwa sembranoid yang diisolasi dari tembakau memberikan efek anti kanker pada sel HepG2 dengan menghambat proliferasi sel.

*Soft coral* memiliki kemampuan reproduksi yang lambat sehingga pemanfaatan senyawa sembranoid pada *soft coral* secara terus menerus dapat mengancam kelestarian dan dapat mengganggu ekosistem terumbu karang. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai fraksi senyawa sembranoid pada ekstrak daun tembakau yang diduga berperan sebagai anti kanker, sehingga diharapkan mampu digunakan sebagai obat anti kanker.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan uraian di atas, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut: Apakah fraksi senyawa sembranoid daun tembakau menunjukkan aktivitas sitotoksitas terhadap sel kanker serviks HeLa?

## **1.3 Batasan Masalah**

Batasan masalah dalam penelitian ini menggunakan daun tembakau varietas kasturi dan menggunakan sel kanker serviks HeLa.

## **1.4 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi fraksi senyawa sembranoid daun tembakau terhadap viabilitas sel kanker serviks HeLa.

## **1.5 Manfaat Penelitian**

Dapat memberikan informasi ilmiah potensi fraksi senyawa sembranoid daun tembakau kasturi yang dapat digunakan sebagai alternatif ] penyakit kanker serviks.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kanker Serviks dan Regulasi Siklus Sel

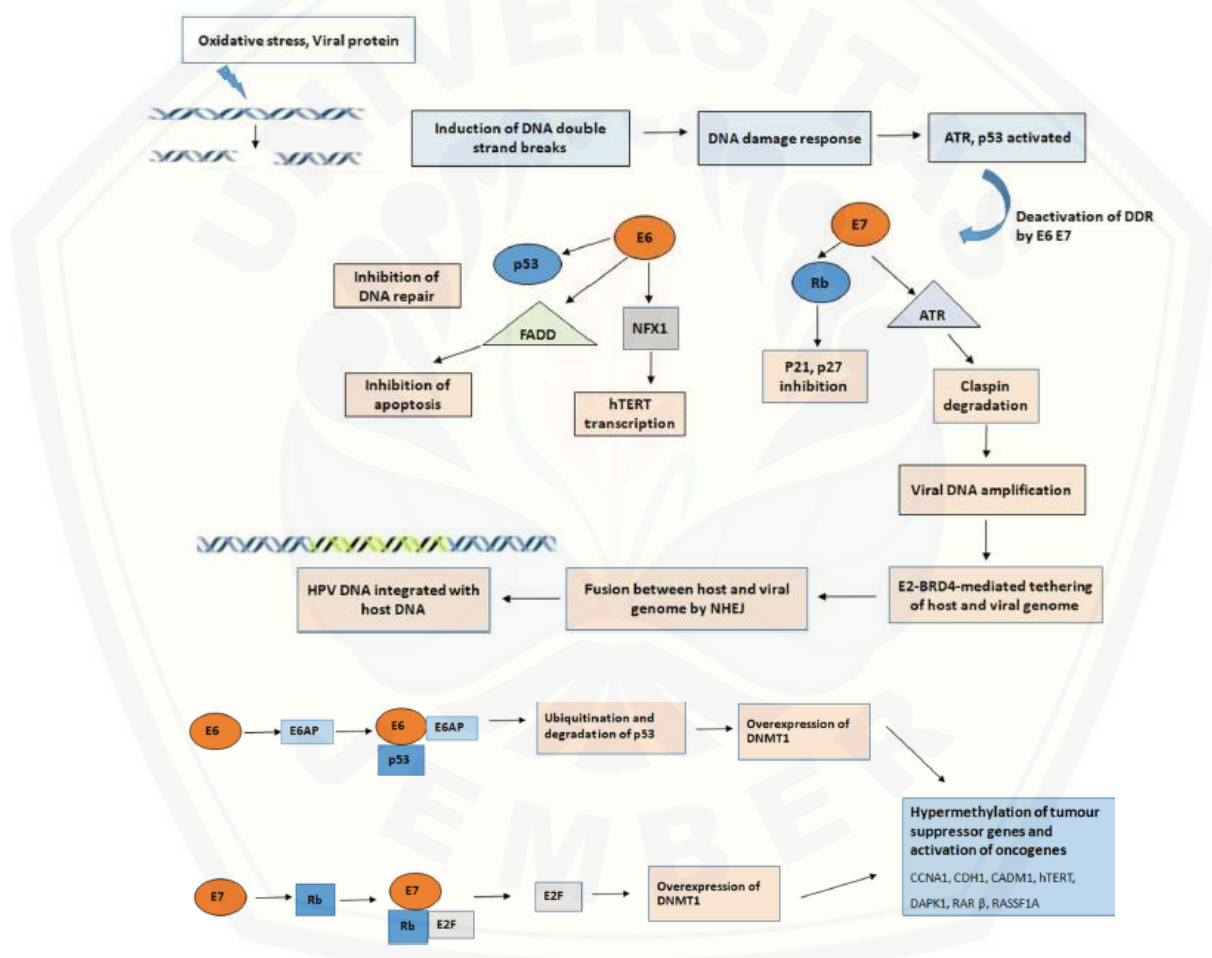
Kanker serviks merupakan penyebab kedua kematian terkait kanker pada wanita di seluruh dunia. WHO melaporkan bahwa pada tahun 2010, diperkirakan 529.828 wanita didiagnosis menderita kanker serviks, 275.128 meninggal tiap tahun, dan diperkirakan akan meningkat menjadi 70% selama dua dekade ini (IARC, 2015). Menurut Departemen Kesehatan (2010), kanker serviks sebagian besar disebabkan oleh HPV (*Human Papillomavirus*), penyebaran infeksi oleh virus tersebut sebagian besar melalui hubungan seksual. Menurut Ibeanu (2011), menyatakan bahwa DNA onkogenik ditemukan HPV penyebab kanker serviks.

Kanker pada dasarnya merupakan sel dengan proliferasi yang tidak terkendali akibat kerusakan gen, utamanya pada regulator siklus sel, sehingga menyebabkan ketidakseimbangan antara proliferasi sel dan kematian sel (Ruddon, 2007). Proses pertumbuhan kanker dinamakan karsinogenesis, dimulai dari satu sel yang memperbanyak diri dan membentuk koloni kecil dalam jaringan yang sama. Karsinogenesis pada prinsipnya terkait dengan perubahan ekspresi dan regulasi gen-gen yang berperan dalam siklus sel (Mutiah, 2015). Siklus sel tumor pada dasarnya sama dengan siklus sel normal (Ganiswara, 1995). Siklus sel dibagi menjadi dua, yaitu mitosis dan *interphase*. *Interphase* dibagi menjadi 3 fase yaitu fase G<sub>1</sub> merupakan fase persiapan sel untuk melakukan replikasi DNA, sintesis DNA (S), *post* duplikasi DNA (G<sub>2</sub>). Fase M merupakan fase tersingkat yang di dalamnya terjadi pembagian nukleus dan sitoplasma sel yang telah berduplikasi secara komplit dan akan menghasilkan dua sel anak. Akhir fase G<sub>1</sub>, terjadi peningkatan RNA disusul dengan fase S yang merupakan terjadinya replikasi DNA kromosom. Fase G<sub>1</sub> sel mempersiapkan diri untuk membelah dan mempersiapkan dua set kromosom (Gondhowiardjo, 2004).

Regulasi siklus sel diatur *tumor suppressor gen* melalui ekspresi protein Retinoblastoma (pRb) dan p53. Protein Rb berperan dalam regulasi siklus sel secara umum, sedangkan protein p53 berperan dalam perbaikan DNA dan stimulasi apoptosis (King, 2000). Sel kanker serviks yang diinfeksi HPV diketahui



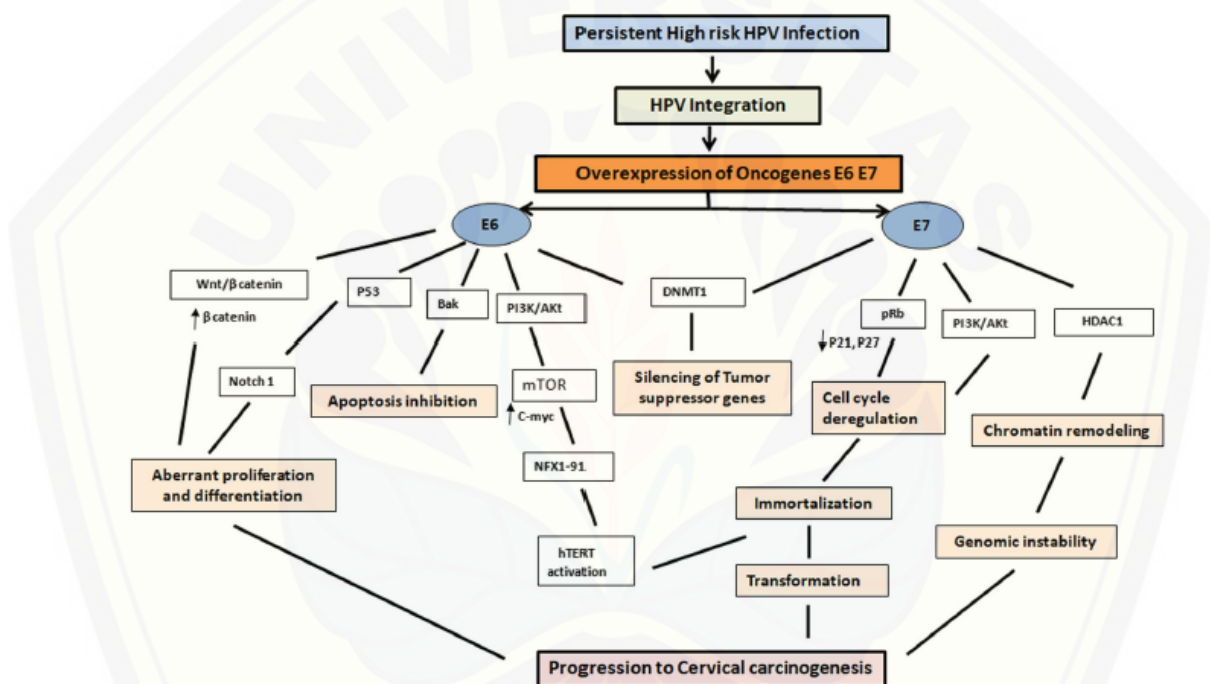
mengekspresikan 2 onkogen, yaitu gen *E6* dan *E7*. Gen *E6* merupakan onkogen yang menginaktivasi dan mendegradasi protein p53 (Narisawa dan Saito, 2007). Ekspresi dari gen *E6* membentuk kompleks dengan enzim *ubiquitin ligase* yang disebut dengan *E6 Associated Protein* (E6AP). Kompleks ini berinteraksi dengan berbagai molekul untuk memicu pertumbuhan dan perkembangan sel tumor. E6AP mendegradasi protein p53 dengan bantuan enzim ligase sehingga menyebabkan gagalnya proses apoptosis pada sel tumor (Beaudenon dan Huibregtse, 2008).



Gambar 2.1 Mekanisme integrasi DNA HPV oleh onkoprotein *E6* dan *E7* (Gupta dan Mania-Pramanik, 2019).

Gen *E7* menginduksi pertumbuhan sel tumor dengan menginaktivasi protein Retinoblastoma (pRb) (Narisawa dan Saito, 2007). Gen *E7* mengikat bentuk aktif hipofosforilasi p105 Rb dan anggota lain dari famili Rb. Ikatan ini menyebabkan destabilisasi Rb dan pecahnya kompleks Rb/E2F yang berperan

dalam menekan transkripsi gen yang diperlukan untuk *cell cycle progression* (DeFilippis *et al.*, 2003). Protein Retinoblastoma (pRb) dalam keadaan normal akan berikatan dengan transkripsi E2F yang menghambat ekspresi dari gen penyebab pertumbuhan sel tumor (Teissier *et al.*, 2007). E2F merupakan faktor transkripsi yang bekerja dengan menginduksi gen transkripsi untuk mengekspresikan protein pada fase G<sub>1</sub> ke fase S (Pan *et al.*, 1998). Namun, gen E7 pada HPV 16 akan merusak pRb dengan enzim *cystein protease claspin* teraktivasi kalsium (McLaughlin dan Drubin, 2009).



Gambar 2.2 Mekanisme molekuler karsinogenesis kanker serviks (Gupta dan Mania-Pramanik, 2019).

Sebagian besar sel kanker serviks, termasuk sel HeLa mempunyai gen *p53* dan *p105 Rb* dalam bentuk *wild type*. Oleh karena itu, gen pengatur pertumbuhan yang aktif dalam sel normal juga terdapat dalam sel kanker serviks. Namun, aktivitasnya dihambat oleh ekspresi protein E6 dan E7 dari HPV (Goodwin dan DiMaio, 2000). Sel HeLa merupakan sel yang berasal dari sel kanker serviks bernama Henrietta Lacks. Sel ini bersifat immortal, mempunyai telomerase aktif selama pembelahan sel, sehingga mencegah pemendekan telomerase yang menyangkut penuaan dan apoptosis sel,



dan mudah dikultur sehingga banyak digunakan dalam penelitian ilmiah (Sharrer, 2006).

## 2.2 Kandungan Senyawa Kimia Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.)

Tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) termasuk anggota famili *solanaceae*, yang merupakan salah satu tanaman tropis asli Amerika. Tanaman tembakau mempunyai akar tunggang, batang berbentuk bulat dan lunak, daunnya berbentuk lonjong dengan tulang daun menyirip (Basyir, 2006). Daun tembakau secara umum diklasifikasikan berdasarkan letaknya pada batang, yang dimulai dari urutan bawah ke atas, yaitu daun pasir (*zand blad/lugs*), kaki (*voet blad/cutters*), tengah (*midden blad/leaf*), dan atas (*top blad/tips*) (Cahyono, 1998). Daun tembakau dapat berperan sebagai tanaman herbal yang dimanfaatkan sebagai anti bakteri, anti jamur, dan anti oksidan (Taiga dan Friday, 2009; Bakh *et al.*, 2012; Miller, 1973). Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa daun tembakau bagian atas dan tengah mengandung alkaloid, flavonoid, terpenoid dan steroid, sedangkan daun tembakau bagian bawah hanya mengandung alkaloid, flavonoid dan terpenoid (Rusli *et al.*, 2011). Pelczar *et al.* (1993) menyatakan bahwa beberapa senyawa metabolit sekunder yang meliputi fenol, alkaloid, dan minyak atsiri (*essensial oil*) memiliki sifat anti bakteri. Mekanisme anti bakteri dapat mempengaruhi penghambatan mikroorganisme melalui sintesis dinding sel, integrasi membran sel, sintesis protein, replikasi DNA dan *repair*, transkripsi, dan metabolit *intermediate* (Wax *et al.*, 2008).

Menurut Andersen *et al.* (1991), senyawa alkaloid pada tembakau adalah penentu aroma yang terkait dengan kualitas tanaman tembakau. Senyawa tersebut didominasi oleh nikotin hingga 95% (Shen *et al.*, 2006). Senyawa kimia lainnya yang terdapat pada tembakau adalah flavonoid. Flavonoid merupakan golongan terbesar dari fenol. Flavonoid umumnya terdapat dalam tumbuhan berbentuk aglikol maupun terikat pada gula sebagai glikosida (Middleton dan Chitan, 1994). Selain flavonoid, pada daun tembakau terdapat senyawa steroid dan terpenoid yang merupakan golongan minyak atsiri yang dapat berperan sebagai anti bakteri,

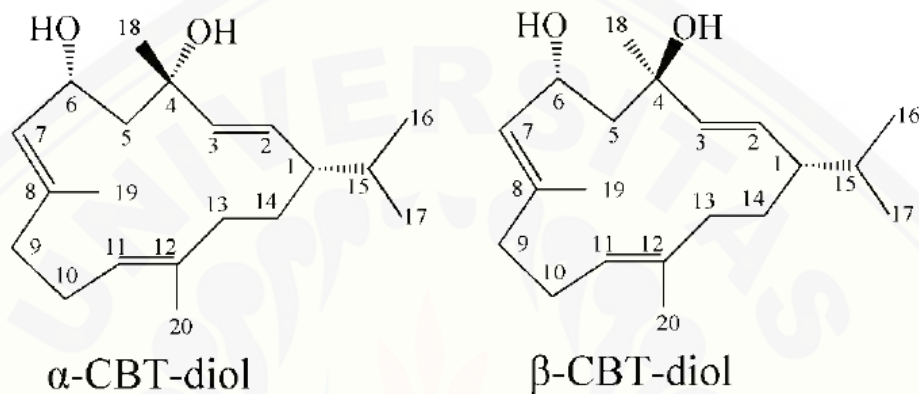
yaitu pada konsentrasi 1 mg/ml mempunyai kemampuan anti bakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Palic *et al.*, 2002). Nychas dan Tassou (2000) menyatakan bahwa minyak atsiri dapat menghambat pembentukan komponen struktural sehingga mengganggu pembentukan dinding sel bakteri terganggu. Senyawa terpenoid yang termasuk dalam golongan minyak atsiri memiliki turunan monoterpenoid, sesquiterpenoid, dan diterpenoid (Silva *et al.*, 2013). Salah satu golongan dari diterpenoid adalah sembranoid yang banyak ditemukan pada daun tembakau (Wahlberg dan Enzell, 1987). Sembranoid daun tembakau mempunyai sifat anti mikroba, anti tumor dan neuroprotektif, sehingga berpotensi untuk pengembangan obat di masa mendatang untuk pengobatan AIDS, kanker dan penyakit neurodegeneratif (Wahlberg *et al.*, 2001).

### **2.3 Peran Senyawa Sembranoid Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.)**

#### **Sebagai Anti kanker**

Sembranoid merupakan diterpenoid siklik dengan cincin 14 karbon yang ditemukan pada tanaman teresterial kelompok *Nicotiana* dan *Pinus*, Coelenterata laut, dan kelompok karang lunak laut (Wahlberg *et al.*, 1986; Rodriguez, 1995). Senyawa sembranoid pertama kali ditemukan pada *soft coral* laut dan diduga memiliki kesamaan struktur dengan sembranoid tembakau (Fujiki, 1993). Penelitian Liu *et al.* (2015) menyatakan bahwa sembranoid dari *soft coral Sarcophyton elegans* memiliki kemampuan menghambat migrasi sel tumor payudara manusia MDA-MB-231 dengan dosis 10  $\mu$ M. Penelitian Saito *et al.* (1985) menyatakan bahwa dua diastereoisomer CBT (*cembra-2-7,11-triene-4,6-diol*) dapat berikatan dengan TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) untuk mengikat reseptor membran sel dalam menghambat transformasi asam arakidonat. CBT dapat memberikan efek penghambatan pada pembentukan tumor melalui pengumpulan radikal oksigen yang dihasilkan selama proses promosi karena CBT diubah menjadi *cembra-triene triol* melalui reaksi oksigen tunggal. Baraka *et al.* (2011) mengisolasi sembranoid tipe (*1S, 2E, 4R, 6R, 7E, 11E*)-*cembra-2-7,11-triene-4,6-diol* (*4R*) dari *Nicotiana tabacum*, dan menunjukkan bahwa sembranoid

tipe 4R mempunyai aktivitas antimigrasi terhadap sel kanker prostat, sehingga dapat digunakan sebagai alternatif dalam pencegahan kanker prostat. Sayed dan Sylvester (2007), melaporkan bahwa pada daun tembakau terdapat 87 struktur sembranoid yang sudah berhasil diketahui, tetapi terdapat dua kelompok utama yaitu  $\alpha$ -sembranoid dan  $\beta$ -sembranoid. Struktur senyawa sembranoid tembakau dapat dilihat pada Gambar 2.1

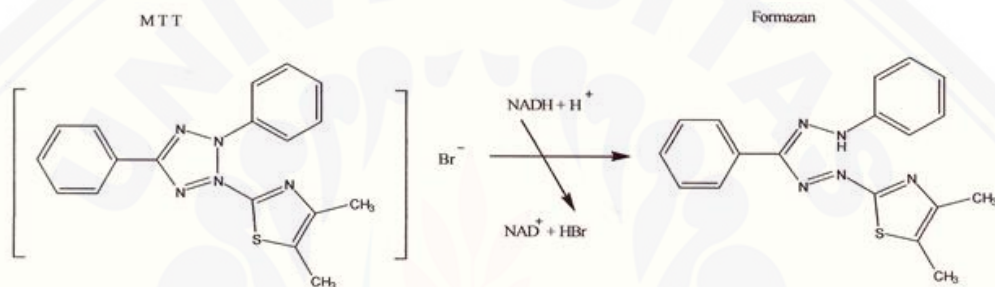


Gambar 2.3 Struktur senyawa sembranoid tembakau  $\alpha$ -CBT-diol dan  $\beta$ -CBT-diol (Yan *et al.*, 2019).

#### 2.4 Uji Sitotoksitas dengan Menggunakan MTT (*Microculture Tetrazolium Technique*)

Uji sitotoksitas merupakan uji *in vitro* dengan menggunakan kultur sel untuk memprediksi keberadaan obat sitotoksik baru dari bahan alam yang berpotensi sebagai anti kanker (Doyle dan Griffiths, 2000). Uji sitotoksitas digunakan untuk menentukan nilai  $IC_{50}$  (*Inhibitory Concentration*), yang menunjukkan nilai konsentrasi dengan hasil hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi sitotoksik suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar nilai  $IC_{50}$ , maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Meiyanto *et al.*, 2003). Uji sitotoksitas dilakukan menggunakan MTT. Prinsip dari MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT [(3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] oleh sistem reduktase (CCRC, 2015). Reaksi reduksi MTT menjadi formazan dapat dilihat pada Gambar 2.2. Senyawa MTT [3-4,5-

*dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid]* akan diabsorpsi oleh sel hidup dan direduksi oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium yang ada dalam rantai respirasi mitokondria menjadi formazan yang tidak larut dalam air tetapi larut dalam SDS 10%. Sel hidup mampu mereduksi MTT sehingga membentuk kristal formazan, sedangkan sel yang mati tidak mampu mereduksi MTT. Penambahan SDS 10% dalam 0,1 N HCl (*reagen stopper*) akan melarutkan kristal berwarna ungu yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA *reader* (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) pada panjang gelombang antara 500-600 nm (CCRC, 2015).



Gambar 2.4 Reaksi Reduksi MTT menjadi formazan (Wyllie *et al.*, 1980)

## 2.5 Hipotesis

Pemberian fraksi senyawa sembranoid daun tembakau akan menyebabkan kematian terhadap sel kanker serviks HeLa.

### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia, Fakultas Farmasi, Universitas Jember untuk ekstraksi daun tembakau kasturi. Uji GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*) dilakukan di Laboratorium Biosains, Politeknik Negeri Jember. Uji Sitotoksitas dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Waktu pelaksanaan penelitian dimulai pada Bulan November 2018 sampai Maret 2019.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah destilator, *rotary evaporator*, blender, *erlenmeyer*, *magnetic stirrer*, *shaker*, corong *Buchner*, inkubator CO<sub>2</sub>, lampu UV, *Laminar Air Flow Cabinet*, *tissue culture flask* (Iwaki), tangki nitrogen cair, *conical tube* 15 ml (Iwaki), *96-well plate* (*tissue culture plate*) (Iwaki), *haemocytometer*, pipet pasteur steril, *centrifuge*, *yellow tip*, *blue tip*, vortex, mikroskop *inverted* (Olympus), *mini tube*, GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*), *ELISA reader*, mikropipet, *waterbath*, *Camera Digital*, masker, sarung tangan, spidol marker, autoklaf, lampu spiritus, dan rak tabung.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah stok fraksi sembranoid daun tembakau kasturi dari Kabupaten Jember, sel kanker serviks (HeLa) (ATCC) dan sel vero yang diperoleh dari Laboratorium Parasit Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, metanol teknis, *n-hexane*, *dichloromethane*, *ethyl acetate*, HCl 10%, aquades, alkohol 70%, *Dragendorff reagent*, media penumbuh sel RPMI 1640 (*Rosewell Park Memorial Institute*) (Gibco), *Penicillin-streptomycin* 1% (Gibco), *fungizone* 0,5%, FBS (*Fetal Bovine Serum*), trypsin-EDTA (Gibco), DMSO (*Dimetil Sulfoksida*) (E-Merck), SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) dalam 0,01 N HCl (E-Merck), MTT (3-(4,5



*dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolium bromida*) (Sigma), PBS (*Phosphate Buffer Saline*), dan doksorubisin (Kalbe).

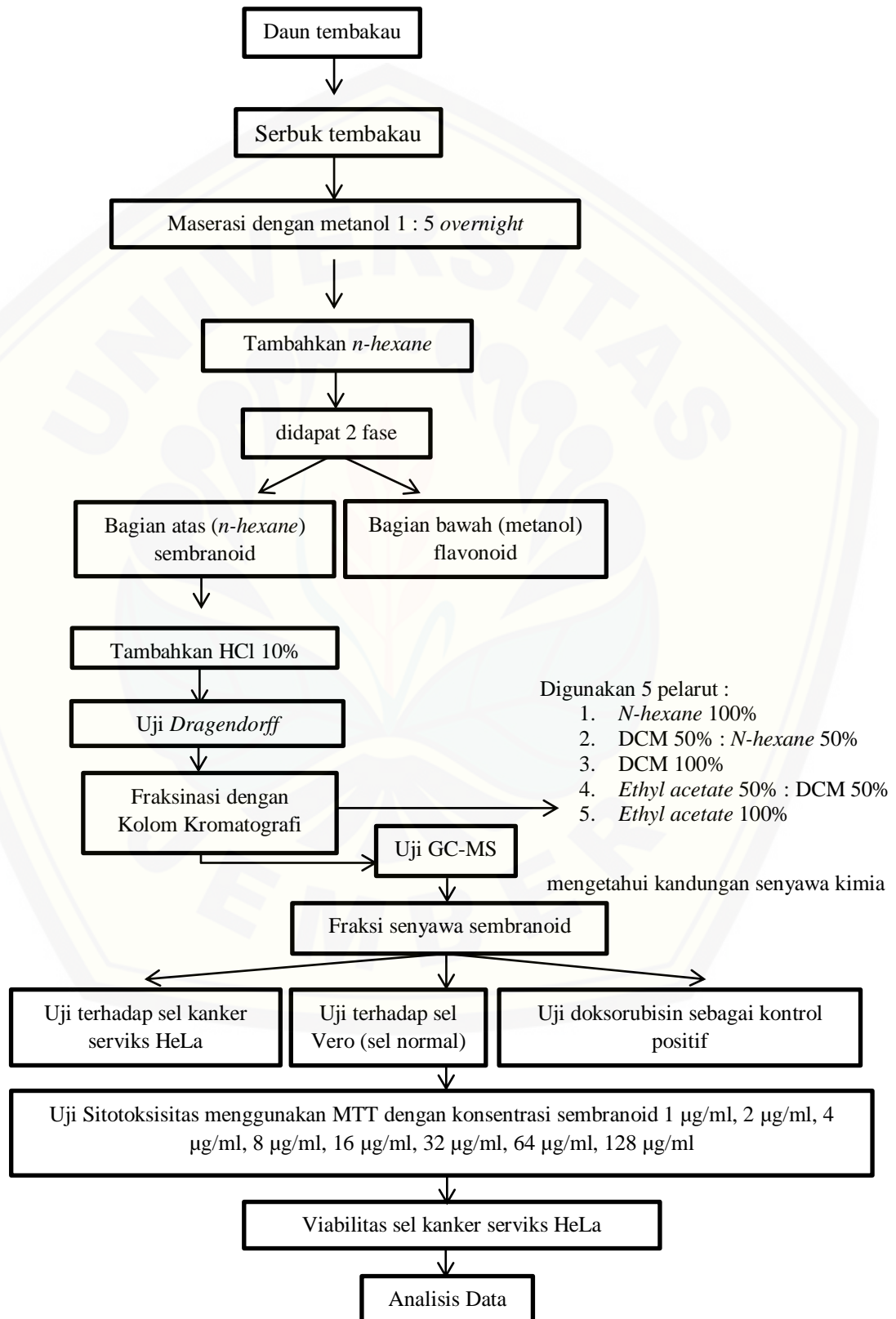
### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimental laboratoris secara *in vitro* dengan rancangan percobaan *Post Test Only Control Group Design*. Rancangan penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan dengan kontrol. Penelitian ini dilakukan pada kultur sel kanker serviks HeLa dengan pemberian fraksi senyawa sembranoid daun tembakau dengan konsentrasi 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, 128 µg/ml (Hegazy *et al.*, 2011). Variabel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

1. Variabel Terikat : Sel kanker serviks (HeLa)
2. Variabel Bebas : Fraksi senyawa sembranoid
3. Variabel Terkontrol : Sitotoksisitas

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Alur Penelitian





### 3.4.2 Tahap Persiapan

Persiapan penelitian dimulai dengan pengumpulan daun tembakau kasturi di Antirogo, Jember. Daun tembakau segar disortasi basah dan dilanjutkan dengan kering angin selama 1 bulan pada suhu ruang. Simplisia kering yang diperoleh dihaluskan dan diayak hingga diperoleh ukuran serbuk yang seragam.

### 3.4.3 Preparasi Sampel dan Pembuatan Ekstrak Daun Tembakau Kasturi

Serbuk daun tembakau kasturi sebanyak 100 gr dimaserasi menggunakan pelarut metanol dengan perbandingan 1 (sampel) : 6 (pelarut) untuk menarik senyawa polar dan non polar, *stirrer overnight* kemudian didiamkan selama 10 menit (Prastiwati *et al.*, 2010). Ekstrak metanol disaring menggunakan corong *Buchner* hingga pelarut berwarna jernih, kemudian ditambahkan *n-hexane* untuk menarik senyawa non polar, *stirrer* selama 20 menit. Hasilnya terdapat dua fase, lapisan yang bawah (metanol), sedangkan lapisan yang atas (*n-hexane*) yang memiliki massa jenis lebih rendah dari metanol. Ekstrak *n-hexane* ditambahkan HCl 10% untuk menghilangkan nikotin, *stirrer* selama 30 menit, kemudian diuji *Dragendorff reagent* untuk menguji bebas nikotin, kemudian dievaporasi (Taufik *et al.*, 2017).

### 3.4.4 Fraksinasi Ekstrak Daun Tembakau Menggunakan Kromatografi Kolom

Hasil evaporasi yang dihasilkan adalah ekstrak *n-hexane*, kemudian dimasukkan ke dalam kolom kromatografi yang sudah diisi dengan *silica gel*. Selanjutnya, diberi pelarut *n-hexane* 100%; *n-hexane* 50% : DCM 50%; DCM 100%; DCM 50% : *ethyl acetat* 50%, dan *ethyl acetat* 100% secara bertahap (Jayanti, 2012). Selanjutnya, lima fraksi yang diperoleh diuji menggunakan GC-MS untuk mengetahui fraksi yang mengandung senyawa sembranoid.

### 3.4.5 Uji GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*)

Hasil ekstraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom, dianalisis menggunakan GC-MS Thermo ISQ (ThermoFisher, Radano, Italy) yang

dilengkapi dengan kolom DB-5MS. Untuk deteksi GC-MS, digunakan sistem ionisasi elektron dengan energi ionisasi 70 eV. Gas helium digunakan sebagai gas pembawa pada laju aliran konstan 1 ml/menit. Gas pembawa helium bertekanan 12 kPa, total laju 30 mL per menit dan split ratio sebesar 1:50 (Novitasari *et al.*, 2016; Qian *et al.*, 2014). Sampel ekstrak kental daun tembakau kasturi sebanyak 1  $\mu$ l diinjeksikan ke GC-MS yang dioperasikan menggunakan kolom kaca panjang 30 m, diameter 0,25 mm dan ketebalan 0,25  $\mu$ m. Temperatur kolom diprogram dari suhu awal 160°C, kemudian ditahan selama 2 menit, setelah itu suhu kolom ditingkatkan 10°C/menit sampai 210°C, selanjutnya ditahan selama 35 menit, kemudian suhu kolom ditingkatkan kembali 10°C/menit hingga mencapai suhu 250°C (Zhou *et al.*, 2016). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *software* GC-MS. Hasil berupa kromatogram-kromatogram dan spektra massa digunakan untuk analisis kualitatif berupa struktur senyawa yang diinginkan yaitu fraksi senyawa sembranoid dan analisis kuantitatif yang berupa kadar atau konsentrasi senyawa dalam sampel.

#### 3.4.6 Penentuan Konsentrasi

##### a. Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan larutan uji dilakukan dengan membuat larutan stok terlebih dahulu yang kemudian dibuat menjadi konsentrasi yang diinginkan. Pada penelitian ini, konsentrasi sembranoid yang dibuat adalah konsentrasi 1  $\mu$ g/ml, 2  $\mu$ g/ml, 4  $\mu$ g/ml, 8  $\mu$ g/ml, 16  $\mu$ g/ml, 32  $\mu$ g/ml, 64  $\mu$ g/ml, 128  $\mu$ g/ml. Sedangkan konsentrasi doksorubisin adalah 0,78  $\mu$ g/ml. Untuk sampel fraksi sembranoid dan doksorubisin masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dalam DMSO sebanyak 100  $\mu$ l dan dihomogenisasi menggunakan vortex hingga larut, sehingga diperoleh larutan stok 100.000  $\mu$ g/l. Larutan stok tersebut dihitung volume yang akan diambil untuk masing-masing konsentrasi yang ingin dibuat. Untuk konsentrasi 128  $\mu$ g/ml, volume yang diambil dari larutan stok untuk dilarutkan dalam media 1000  $\mu$ l adalah 1,28  $\mu$ l. Selanjutnya, untuk konsentrasi dibawah 64  $\mu$ g/ml, diambil setengah media pada konsentrasi 128  $\mu$ g/mL dan

diresuspensikan kedalam 500 µl media baru. Untuk konsentrasi selanjutnya dilakukan hal yang sama (CCRC, 2017).

#### 3.4.7 Pembuatan Media untuk Kultur Sel

##### a. Pembuatan Media RPMI

Media dibuat dengan melarutkan 10,4 gram (untuk 1 liter) RPMI ditambah 2 gram NaHCO<sub>3</sub> dan 2 gram HEPES. Selanjutnya, *stirrer* hingga homogen dan dibuffer dengan HCl 1 N sehingga pH menjadi 7,2-7,4. Kemudian larutan disaring dengan filter polietilen sulfon steril 0,2 µm secara aseptis (CCRC, 2017).

##### b. Pembuatan FBS (*Fetal Bovine Serum*)

Larutan FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10% sebanyak 10 ml, *fungizone* 0,5 ml dan *Penisillin-streptomycin* 2 ml dicampur dalam wadah steril kemudian ditambah media RPMI hingga 100 ml dan dihomogenasi. Selanjutnya, larutan disaring dengan filter polietilen sulfon steril 0,2 µm secara aseptis (CCRC, 2017).

##### c. Pembuatan Media MTT

Larutan MTT dibuat dengan melarutkan 1000 µl MTT kedalam *conical tube* dan ditambahkan media RPMI sampai 10 ml, kemudian dihomogenkan (CCRC, 2017).

#### 3.4.8 Persiapan Kultur Sel HeLa

Preparasi dan pengujian sitotoksitas mengikuti protokol uji dari CCRC (*Cancer Chermoprevention Research Center*) Farmasi Universitas Gadjah Mada:

##### a. Preparasi Sel HeLa dan *Thawing*

Sel HeLa yang inaktif dalam wadah ampul diambil dan dikeluarkan dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan pada suhu 37°C dalam *water bath* selama beberapa menit hingga mencair. Selanjutnya, ampul disemprot dengan etanol 70%, ampul dibuka dan sel dipindahkan dalam *conical tube* yang berisi 6-10 ml media kultur yang mengandung RPMI 1640 dengan 10% FBS, 2%

*Penicillin-streptomycin*, dan *fungizone* 0,5 % dalam ruang *Laminar Air Flow*. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 15 menit. Endapan yang terbentuk ditambah 6-10 ml media RPMI 1640-serum dan diresuspensikan hingga homogen. Suspensi sel dimasukkan dan ditumbuhkan sebanyak 2-3 buah dalam *tissue culture flask* kecil dan dilihat dibawah mikroskop. Sel yang hidup nampak bulat, jernih dan bersinar. *Flask* yang berisi sel kemudian diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37°C selama 24 jam.

b. Panen Sel dan Sub Kultur

Sel diambil dari inkubator CO<sub>2</sub> dan diamati morfologinya. Pemanenan sel dilakukan setelah sel 80% konfluen, yaitu sel tumbuh hingga menutupi hampir seluruh permukaan *flask*. Media kultur dibuang menggunakan pipet pasteur kecil steril. Sel HeLa dicuci 2 kali dengan PBS (volume PBS  $\pm$  ½ volume media awal), kemudian sel HeLa yang melekat pada dinding *tissue culture flask* dilepas dengan ditambahkan tripsin-EDTA 0,25% sebanyak 1 ml secara merata ke dalam *tissue culture flask* dan inkubasi di dalam inkubator selama 3 menit agar tripsin bekerja baik. Selanjutnya, ditambahkan media kultur  $\pm$  6 ml ke dalam *tissue culture flask* dan resuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu (tidak menggerombol). Sel diamati menggunakan mikroskop. Sel yang telah lepas satu-satu dimasukkan ke dalam *conical tube* steril. Suspensi sel sebanyak  $\pm$  300  $\mu$ l diambil dan dimasukkan ke dalam *conical tube* baru kemudian ditambahkan 5-7 ml medium lengkap dan resuspensi kembali. Sel dituangkan kedalam *flask* baru kemudian diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37°C.

*Flask* yang berisi sel dikeluarkan dari inkubator CO<sub>2</sub> dan media kultur dibuang, sel dicuci menggunakan RPMI 1640 sebanyak 3 kali kemudian ditambahkan tripsin-EDTA 0,25% 0,5 ml secara homogen dan diinkubasi dalam inkubator selama 3 menit. Selanjutnya, ditambahkan media kultur  $\pm$  6 ml untuk menginaktifkan tripsin. Sel diresuspensi dengan pipet sampai terlepas satu-satu (tidak menggerombol). Apabila sel sudah terlepas, sel dipindahkan ke *conical tube* 15 ml yang berisi media lengkap dan disentrifuge selama 5 menit dengan



kecepatan 1500 rpm, kemudian media dibuang lalu diganti dengan media lengkap yang baru dan dihomogenisasi menggunakan vortex.

c. Perhitungan Sel

Sel dihitung jumlahnya menggunakan *haemocytometer* dengan cara mengambil 10  $\mu$ l suspensi sel kemudian diteteskan pada *haemocytometer* dan dihitung jumlah selnya dibawah mikroskop *inverted*. Jumlah sel dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Jumlah sel/ml} = \frac{n}{4} \times 10^4 \text{ sel/ml}$$

$$n = \text{jumlah sel dalam 4 bilik}$$

Jumlah sel total yang diperlukan:

Jika ingin menanam sel pada tiap sumuran *96-well plate* maka jumlah total sel yang diperlukan adalah  $5 \times 10^3/\text{sumuran} \times 100 \text{ sumuran (dibuat lebih)} = 5 \times 10^5$ .

Menghitung volume panen sel yang diperlukan dalam (mL):

$$\text{Volume panen sel yang ditransfer} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel yang terhitung tiap ml}}$$

d. Penanaman Sel

Volume panen sel yang didapat ditambahkan dengan media kultur RPMI sampai 10 ml. Selanjutnya, ditanam pada tiap sumuran *96-well plate* 100  $\mu$ l dan diinkubasi 24 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37°C.

### 3.4.9 Uji Sitotoksitas dengan Menggunakan MTT

Uji sitotoksitas dilakukan terhadap sel kanker serviks HeLa. Sel kanker serviks HeLa tersebut dikulturkan dalam media RPMI 1640. Setelah 24 jam inkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dengan suhu 37°C, media dibuang dengan cara *microplate* yang berisi sel dikeluarkan dari inkubator CO<sub>2</sub> kemudian *microplate* dibalik 180°C untuk membuang sisa media. Kemudian *microplate* ditekan diatas tisu untuk meniriskan sisa cairan media. Sebanyak 100  $\mu$ l ekstrak sampel yang telah dibuat didistribusikan ke dalam *96-well microplate* secara triplo (3 kali ulangan). Kelompok perlakuan secara terperinci adalah sebagai berikut:

- a. Kontrol sel berisi 100  $\mu$ l suspensi sel kanker serviks HeLa dengan media lengkap.
- b. Kontrol media berisi 100  $\mu$ l media lengkap.
- c. Kelompok kontrol positif ditambahkan doksorubisin dengan konsentrasi 0,78  $\mu$ g/ml. Doksorubisin yang dimasukkan ke dalam tiap sumuran 96-*well plate* sebanyak 100  $\mu$ l.
- d. Kelompok perlakuan terdiri dari beberapa konsentrasi yaitu: 1  $\mu$ g/ml, 2  $\mu$ g/ml, 4  $\mu$ g/ml, 8  $\mu$ g/ml, 16  $\mu$ g/ml, 32  $\mu$ g/ml, 64  $\mu$ g/ml, 128  $\mu$ g/ml berisi suspensi sel kanker serviks HeLa dengan media lengkap. Senyawa yang diuji dimasukkan ke dalam tiap sumuran sebanyak 100  $\mu$ l.

Kondisi setiap sel didokumentasikan di akhir inkubasi. Selanjutnya, masing-masing sumuran ditambahkan 100  $\mu$ l MTT (5 mg dalam 1 ml PBS + 10 ml medium lengkap). Inkubasi selama 4 jam sampai terbentuk kristal formazan. Sel yang hidup akan memetabolisme MTT membentuk kristal formazan yang berwarna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan *reagen stopper* SDS 10% dalam 0,01% HCl sebanyak 100  $\mu$ l, lalu diinkubasi semalam pada suhu ruang dengan ditutup *aluminium foil* pada tempat gelap selama 24 jam. Serapan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm. Data absorbansi tiap sumuran digunakan untuk menghitung viabilitas sel kanker serviks HeLa yang diberi perlakuan dibandingkan dengan kontrol (tanpa perlakuan).

### 3.5 Parameter Penelitian

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah viabilitas sel kanker serviks HeLa pasca pemberian fraksi senyawa sembranoid.

### 3.6 Analisis Data

Uji sitotoksitas terhadap sel kanker serviks HeLa dilakukan menggunakan analisis probit dan ditentukan nilai  $IC_{50}$  dari masing-masing ekstrak. Analisis probit diperoleh dari konversi prosentase viabilitas sel, yang dihitung dengan menggunakan rumus:



$$\% \text{ sel hidup} = \frac{(\text{Abs. Perlakuan} - \text{Abs. Kontrol media})}{(\text{Abs. Kontrol sel} - \text{Abs. Kontrol media})} \times 100\%$$

Keterangan :

Abs. Perlakuan : Absorbansi perlakuan (media lengkap+sel+senyawa uji)

Abs. Kontrol Media : Absorbansi media (media lengkap)

Abs. Kontrol Sel : Absorbansi kontrol sel (media lengkap+sel)

Selanjutnya dibuat grafik log konsentrasi sampel terhadap prosentase sel yang hidup, kemudian dicari persamaan regresi linier dari grafik tersebut. Nilai  $IC_{50}$  kecil menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki efek sitotoksik yang tinggi, begitu pula sebaliknya, nilai  $IC_{50}$  yang besar menunjukkan bahwa efek sitotoksiknya rendah.  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel HeLa.  $IC_{50}$  dihitung dengan menggunakan analisis probit program SPSS 15. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  makin poten senyawa uji tersebut (Meiyanto, 2008).

Data yang diperoleh dari perhitungan  $IC_{50}$  kemudian dilanjutkan dengan uji *Two Way* GLM Univariat dengan taraf kepercayaan 99% atau  $\alpha = 0,01$  dan Uji Lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk melihat beda nyata antar kelompok perlakuan konsentrasi (Steel dan Torrie, 1993). Uji Analisis Probit, Uji *Two Way* GLM Univariat, dan Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) ditentukan menggunakan program SPSS 15.

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Fraksi senyawa sembranoid daun tembakau memiliki efek sitotoksisitas terhadap sel kanker serviks HeLa dengan  $IC_{50}$  57,56  $\mu\text{g/ml}$ .
2. Perlakuan fraksi senyawa sembranoid daun tembakau konsentrasi 128  $\mu\text{g/ml}$  dapat menyebabkan kematian sel Vero hanya sebesar 25,356% atau persen sel hidup sebesar 74,644%. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi sembranoid tidak berbahaya terhadap sel Vero (sel normal), sehingga berpeluang untuk dikembangkan sebagai obat kanker.

### 5.2 Saran

Penelitian ini merupakan langkah awal dalam mengkaji potensi sitotoksisitas fraksi senyawa sembranoid daun tembakau terhadap sel kanker serviks HeLa, sehingga untuk penelitian lebih lanjut dapat disampaikan beberapa saran sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan pemurnian fraksi senyawa sembranoid daun tembakau supaya diperoleh bahan aktif yang lebih murni.
2. Perlu dilakukan penelitian pengaruh fraksi senyawa sembranoid daun tembakau terhadap proliferasi sel kanker serviks HeLa.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Achmad, M. H. 2013. Pengaruh senyawa Flavonoid Ekstrak Sarang Semut (*Mymecodia pendans*) Terhadap Hambatan Proliferasi dan Hambatan Angiogenesis. *Disertasi*. Makassar: Universitas Hasanuddin.
- Amalia, D. A., Haryoto. 2018. Uji Sitotoksik 3 Fraksi Ekstrak Etanol Daun Ashitaba (*Angelica keiskei*) Terhadap Sel Kanker Serviks. *The 7<sup>th</sup> University Research Colloquium*: 188-191.
- Amania, H. N. 2018. Pengaruh Ekstrak Flavonoid Daun Tembakau Kasturi Terhadap Kadar Inducible Nitric Oxide Synthase pada Human Peripheral Blood Mononuclear Cell yang Dipapar Lipopolisakarida Porphyromonas gingivalis. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Andersen, R. A., P. D. Fleming, T. R. Hamilton-Kemp, dan D.F. Hildebrand. 1991. pH Changes In Smokeless Tobaccos Undergoing Nitrosation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 10(39): 320-321.
- Badan Pusat Statistik. 2012. *Kabupaten Jember Dalam Angka*. Jember: BPS Jawa Timur.
- Bakht, J., Azra, dan M. Shafi. 2012. Antimicrobial Activity of *Nicotiana tabacum* Using Different Solvents Extracts. *Pakistan: Khyber Pukhtum Khwa Agricultural University* 44(1): 459-463.
- Baraka, H. N., M. A. Khanfar, J. C. Williams, E. M. El-Giar, Emad, dan K. A. ElSayed. 2011. Bioactive Natural, Biocatalytic, and Semisynthetic Tobacco Cembranoids. *Planta Medica* 77(5): 467-476.
- Basyir, A. U. 2006. Mengapa Ragu Tinggalkan Rokok?. Jakarta: Pustaka At Tazkia.
- Beaudenon, S., dan J. M. Huibregtse. 2008. HPV E6, E6AP and Cervical Cancer. *BMC Biochemistry* 9(1): 1-7.

- Cahyono. 1998. *Tembakau Budidaya dan Analisis Usaha Tani*. Yogyakarta: Kanisius.
- Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC). 2017. *Protokol In Vitro Indonesian Society for Cancer Chemoprevention*. Yogyakarta: UGM.
- Cotran, R. S., V. Kumar, T. Collin. 1999. *Neoplasia In Robbins Pathologic Basic of Disease Sixth Edition*. Philadelphia: W.B. Saunders Company pp 260-325.
- Cowan, M. M. 1999. Plant Product as Antimicrobial Agents. *Clinic Microbiology Reviews* 12(4): 564-82.
- Darma, A. P., R. A. Ashari, P. A. Nugroho, A. Monikawati, I. A. Fauzi, A. Hermawan, dan E. Meiyanto. 2009. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) Pada Sel Kanker Leher Rahim HeLa Melalui Modulasi Ekspresi Protein p53. *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.
- DeFillippis, R. A., E. C. Goodwin, L. Wu, dan D. DiMaio. 2003. Endogenous Human Papillomavirus E6 and E7 Proteins Differentially Regulate Proliferation, Senescence, and Apoptosis in Hela Cervical Carcinoma Cells. *Journal of Virology* 77(2): 1551-1563.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2009. *Sistem Kesehatan Nasional*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. Jakarta: Depkes RI.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2013. *Riset Kesehatan Dasar*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. Jakarta: Depkes RI.
- Doyle, A., dan J. B. Griffith. 2000. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures In Biotechnology*. England: John Wiley & Sons Ltd.
- Ebrahim, H. Y., M. M. Mohyeldin, M. M. Hailat, dan K. A. El Sayed. 2016. (1S,2E,4S,7E,11E)-2,7,11-Cembratriene-4,6-diol Semisynthetic Analogs

as Novel c-Met Inhibitors for The Control of c-Met-dependent Breast Malignancies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 24(22): 5748-5761.

El-Deiry, W. S., T. Tokino, T. Waldman, J. D. Oliner, V. E. Veleculscu, M. Burrell, D. E. Hill, E. Heal, J. L. Rees, S. R. Hamilton, K. W. Kinzler, dan B. Vogelstein. 1995. Topological Control of p21<sup>(WAF1/CIP1)</sup> Expression In Normal and Neoplastic Tissues. *American Association for Cancer Research* 55: 2910-2919.

Fitriatuzzakiyyah, N., R. K. Sinuraya, dan I. M. Puspitasari. 2017. Terapi Kanker dengan Radiasi: Konsep Dasar Radioterapi dan Perkembangannya di Indonesia. *Jurnal Farmasi Klinik Indonesia* 6(4): 311-320.

Fujiki, H., M. Suganuma, dan J. Yatsunami. 1993. Significant Marine Natural Product In Cancer Reseach. *Advances In Cancer Research*. 61: 143-194.

Ganiswara, S. G., dan Nafraldi. 1995. *Farmakologi dan Terapi Edisi keempat*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Gastout, B. S., K. C. Podratz, dan R. M. Mc Govern. 1996. *Human Leukocyte Antigen Genes (HLA) Association with Servical Cancer*. *Journal of Gynecologic Oncology* 62: 415-416.

Gewies, A. 2003. Introduction to Apoptosis. *Aporeview* 1:1-26.

Goncalves, E. M., C. A. Ventura, T. Yano, M. L. D. Macedo, dan S. C. Ganeri. 2006. Morfological And Growth Alteration In Vero Cells Transformed By Cisplatin. *Cell Biology International* 30(6): 485-494.

Gondhowiardjo, S. 2004. Proliferasi Sel dan Keganasan. *Majalah Kedokteran Indonesia* 54(7): 289-299.

Goodwin, E. C., D. DiMaio. 2000. Repression of Human Papillomavirus Oncogenes in HeLa Cervical Carcinoma Cells Causes the Orderly Reactivation of Dormant Tumor Suppressor Pathways. *Proceedings The National Academy of Sciences* 07 November 2000. *National Academy of Sciences* 97(23): 12513-12518.



- Gupta, M. A., dan J. Mania-Pramanik. 2019. Molecular Mechanisms In Progression of HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Journal of Biomedical Science* 26(1): 28
- Hailat, M. M., H. Y. Ebrahim, M. M. Moheyldin, A. A. Goda, A. B. Siddique, dan K. A. El Sayed. 2017. The Tobacco Cembranoid (1S,2E,4S,7E,11E) 2,7,11 cembratriene-4,6-diol as a Novel Angiogenesis Inhibitory Lead for The Control of Breast Malignancies. *Bioorganis & Medicinal Chemistry* 25(15): 3911–3921.
- Hassan, H. M., A. A. Sallam, R. Mohammed, M. S. Hifnawy, D. T. A. Youssef, dan K. A. El Sayed. 2011. Semisynthetic Analogues Of The Marine Cembranoid Sarcophine as Prostate And Breast Cancer Migration Inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 19(16): 4928-4934.
- Hegazy, M. F., A. Moustafa, dan A. A. El-Beih. 2011. Cytotoxic Cembranoids from The Red Sea Soft Coral *Sarcophyton glaucum*. *Natural Product Communications* 6(12): 1809-1812.
- Ibeanu, O. A. 2011. Molecular Pathogenesis of Cervical Cancer. *Cancer Biology & Therapy* 11(3): 295-306.
- International Agency for Research on Cancer WHO (IARC). 2015. *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence*, tersedia dalam [www.http://globocan.iarc.fr/](http://globocan.iarc.fr/) , diakses tanggal 16 September 2018.
- Jayanti, N. W., M. D. Astuti, N. Komari, dan K. Rosyidah. 2012. Isolasi dan Uji Toksisitas Senyawa Aktif dari Ekstrak Metilena Klorida (MTC) Lengkuas Putih (*Alpinia galanga* (1) Willd). *Chemistry Progress* 5(2): 100-108.
- Katno. 2008. *Tingkat Manfaat, Keamanan dan Efektivitas Tanaman Obat dan Obat Tradisional*. Jawa Tengah: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan.
- King, R. J. B. 2000. *Cancer Biology*. Second Edition. London: Person Education Limited.



- Ko, L. J. dan C. Prives. 1996. p53 : Puzzle and Paradigm. *Genes & Development* 10(9): 1054-1072.
- Lane, D. P. 1992. p53, Guardian of The Genome. *Journal Nature* 358(6381): 15-16.
- Leffingwell, J. C. 1999. Basic Chemical Constituents of Tobacco Leaf and Differences among Tobacco Types. Dalam: *Tobacco production, chemistry, and technology*. Davis, D.L., and Nielsen, M.T. Oxford: Coresta Blackwell Science 281.
- Liu, X., J. Zhang, Q. Liu, G. Tang, H. Wang, C. Fan, dan S. Yin. 2015. Bioactive Cembranoids From The South China Sea Soft Coral *Sarcophyton elegans*. *Journal Molecules* 20(7): 13324-13335.
- Machado, P. A., H. Fu, R. J. Kratochivi, Y. Yuan, T. S. Halm, C. M. Sabliv, C. I. Wei, dan Y. M. Lo. 2010. Recovery of Solanesol from Tobacco As a value Added Product For Alternative Application. *Journal Bioresources Technology* 101(3): 1091-1096.
- May, P., dan E. May. 1999. Twenty Years of p53 Research: Structural and Functional Aspects of The p53 Protein. *Journal Oncogene* 18(53): 7621-7636.
- McLaughlin-Drubin, M. E., dan K. Munger. 2009. The Human Papillomavirus E7 Oncoprotein. *Journal Virology* 384(2): 335-344.
- Meiyanto, E., Sismindari, L. Chandra, dan Moordiani. 2003. Penelitian Efek Antiproliferatif Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Tanaman Cangkring (*Erythrina fusca* Lour.) Terhadap sel HeLa. *Majalah Farmasi Indonesia* 14(3): 124-131.
- Middleton, E., dan K. Chitan. 1994. The Impact of Plant Flavonoids on Mammalian Biology: Implication for Immunity, Inflammation and Cancer. Di dalam: Harborne JB (ed) *The Flavonoids*. London: Chapman and Hall.

- Miller, L.P. 1973. *Phytochemistry Organic Metabolites* Van Nostrand and Reinbold Company. New York 2: 382-384.
- Mutiah, R. 2015. *Evidence Based* Kurkumin dari Tanaman Kunyit (*Curcuma longa*) Sebagai Terapi Kanker Pada Pengobatan Modern. *Jurnal Farma Sains* 1(1): 28-41.
- Mutiah, R., R. A. Kristanti, dan S. Maimunah. 2017. Efek Sinergisme Doxorubisin Dengan Glikosida Kardenolid Dari Akar *Calotropis gigantea* Pada Sel Kanker Serviks HeLa. *Tradisional Medicine Journal* 22(2): 116-123.
- Nacoulma, A. P., V. Megalizzi, L. R. Pottier, M. De Lorenzi, S. Thoret, J. Dubois, O. M. Vandeputte, P. Duez, D. Vereecke, dan M. El Jaziri. 2013. Potent Antiproliferative Cembrenoids Accumulate In Tobacco Upon Infection with *Rhodococcus fascians* and Trigger Unusual Microtubule Dynamics In Human glioblastoma Cells. *Journal PLoS ONE* 8(10): 1-12.
- Nafrialdi, dan S. Ganiswara. 2007. Antikanker dalam Ganiswara, S, R. Setiabudy, F. D. Suyatna, Purwastyastuti, Nafrialdi (Eds). *Farmakologi dan Terapi Edisi ke-5*. Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Naidu, A.S. 2000. *Natural Food Antimicrobial Systems*. USA: CRC Press.
- Narisawa., M. Saito, dan J. M. Huibregtse. 2007. Basic Mechanisms of High Risk Human Papillomavirus Induced Carcinogenesis: Roles of E6 and E7 Proteins. *Cancer Science* 98(10): 1505-1511.
- Novitasari, M. R., L. Febrina, R. Agustina, A. Rahmadani, dan R. Rusli. 2016. Analisis GC-MS Senyawa Aktif Antioksidan Fraksi Etil Asetat Daun Libo (*Ficus variegata* Blume.). *Jurnal Sains dan Kesehatan* 1(5): 221-225.
- Nurhayati, E. 2012. Sitotoksisitas Ekstrak Dan Senyawa Flavonoid Daun Sukun (*Artocarpus altilis*) Terhadap Sel T47D Melalui Induksi Apoptosis. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.

- Nychas, G. J. E., dan C. C. Tassou. 2000. Traditional Preservatives-oils and Spices. Di dalam: Robinso R.K., Batt, C.A.,Patel, P.D. (eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. London: Academic Press.
- Okomato, K., dan D. Beach. 1994. Cyclin G is a Transcriptional Target of The p53 Tumor Suppressor Protein. *The EMBO Journal* 13(20): 4816-4822.
- Palic, R. G., S. Stojanovic, M. Alagic, Nikolic, dan Z. Lepojevic. 2002. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of The Essential Oil and CO<sub>2</sub> Extract of Semi-oriental Tobacco, Otlja. *Flavour and Fragrance Journal* 15(5): 335-338.
- Pan, H., C. Yin, N. J. Dyson, E. Harlow, L. Yamasaki, dan T. V. Dyke. 1998. Key Roles for E2F1 in Signaling p53-dependent Apoptosis and In Cell Division Within Developing Tumors. *Journal Molecular Cell* 2(3): 283-292.
- Pelczar, M. J., dan E. C. S. Chan. 1998. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Podlejski, J., dan W. Olejniczak. 1983. Methods and Technique In Research of Tobacco Flavour. *Molecular Nutrition Food Research* 27(5): 429-436.
- Prastiwati, R.W., S. Rahayu, dan D. Hartanti. 2010. Perbandingan Daya Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) dengan Rutin Terhadap Radikal Bebas 1,1-Diphenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH). *Jurnal Farmasi Indonesia* 7(1): 1-10.
- Puspita, P. E. 2011. Aktivitas Antibakteri Tembakau Temanggung Varietas Genjah Kemloko. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Qian, X. B., J. P. Ye, X. M. Chen, C. H. Zhang, Y. J. Liang, Z. H. Li, dan J. Yang. 2014. Analysis of Cembranoids in Flued-cured Tobacco by Accelerated Solvent Extranstion and Gas Chromatography Mass Spectrometry Selected Ion Monitoring. *Journal of The Chinese Chemical Society* 61(10): 1133-1140.
- Ruddon, R. W. 2007. *Cancer Biology*. New York: Oxford University Press.

- Saito, Y., H. Nishino, D. Yoshida, S. Mizusaki, dan A. Ohnishi. 1988. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated  $^{32}\text{P}$ i Incorporation Into Phospholipids and Protein Phosphorylation by 2,7,11 cembratriene-4,6 diol an Antitumour-promoting Agent. *Journal Oncology* 45(2): 122–126.
- Saito, Y., H. Takizawa, S. Konishi, D. Yoshida, dan S. Mizusaki. 1985. Identification of Cembratriene-4-6-diol as Antitumor Promoting Agent From Cigarette Smoke Condensate. *Journal Carcinogenesis* 6(8): 1189-1194.
- Semeniuk, E. C., S. Wolczynski, M. Dabrowska, D. Janusz, dan A. Tomasz. 2004. The Effect Of Doxorubicin And Retinoids On Proliferation, Necrosis And Apoptosis In MCF-7 Breast Cancer Cells. *Via Medica Journal* 42(4): 221-227.
- Setiawati, D. 2014. Human Papilloma Virus dan Kanker Serviks. *Al-Sihah: Public Health Science Journal* 6(2): 450-459.
- Sharrer, T. 2006. HeLa Herself. *The Scientist* 20(7): 22.
- Shen, J., dan X. Shao. 2006. Determination Of Tobacco Alkaloids by Gas Chromatography-Mass Spectrometry Using Cloud Point Extraction as a Reconcentration Step. *Journal Analytica Chimica Acta* 561(1-2): 83-87.
- Shibuya, M. 2011. Vascular Endothelial Growth factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro Angiogenic Therapies. *Journal Genes and Cancer* 2(12): 1097-1105.
- Silva, E. D. O., N. A. J. C. Furtado, J. Aleu, dan I. G. Collado. 2013. Terpenoid Biotransformations by Mucor Species. *Journal of Flow Chemistry* 12(4): 857-876
- Su, C. C., B. S. Wong, C. Chin, Y. J. Wu, dan J. H. Su. 2013. Oxygenated Cembranoids From the Soft Coral *Sinularia flexibilis*. *International Journal of Molecular Sciences* 14(2): 4317-4325.



- Sukardiman, N. Cholies, Sismindari. 2006. Induksi Apoptosis dan Peningkatan Ekspresi p53, Bax serta Aktivasi Enzim Caspase Sel Kanker Payudara Manusia oleh Pinostrobin dari *Kaempferia pandurata* Roxb. *Laporan Penelitian Hibah Bersaing Tahun I Lembaga Penelitian*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Susilowati, S., A. Claresa, dan I. Arifin. 2011. Uji Sitotoksitas Fraksi n-Heksana Ekstrak Etanol Herba Alfaalfa (*Medicago sativa* L.) Pada Sel T47D dan Sel HeLa Serta Identifikasi Kandungan Senyawa Kimianya. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*.
- Taiga, A., dan E. Friday. 2009. Variations In Phytochemical Properties of Selected Fungicidal Aqueous Extracts of Some Plant Leaves in Kogi state, nigeria. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 3(3): 407-409.
- Taufik, M., R. Wanto, Athaillah, A. S. Daulay, L. K. Siahaan, D. Ardilla, M. Razali, dan M. H. Sinaga. 2017. Analisis Nikotin dalam Daun Tembakau Deli (*Nicotiana tabacum* L.). *Jurnal Sains Teknologi Farmasi dan Kesehatan* 1(2): 114-122.
- Teissier, S., Y. B. Khalifa, M. Mori, P. Pautier, C. Desaintes, dan F. Thierry. 2007. A New E6/P63 Pathway, Together with a Strong E7/E2F Mitotic Pathway, Modulates the Transcriptome in Cervical Cancer Cells. *Journal of Virology* 81(17): 9368-9376.
- Tjay, T. H., dan K. Rahardja. 2007. *Obat-Obat Penting : Kasiat, Penggunaan, dan Efek-Efek Sampingnya Edisi Keenam*, Cetakan Pertama. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.
- Vogelstein, B., D. Lane, dan A. J. Levine. 2000. Surfing the p53 Network. *Nature International Journal of Science* 408: 307-310.
- Wahlberg, I. dan C. R. Enzell. 1984. Tobacco Cembranoids. *Beitrage zur Tabakforschung International* 12: 93-104.
- Wahlberg, I. dan C. R. Enzell. 1987. Tobacco Isoprenoids. *Natural Product Report* 4: 237.

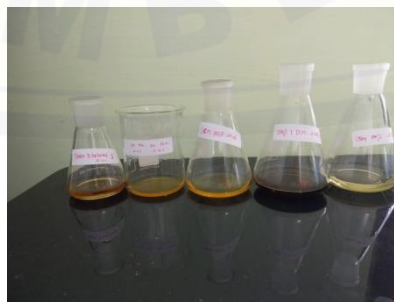
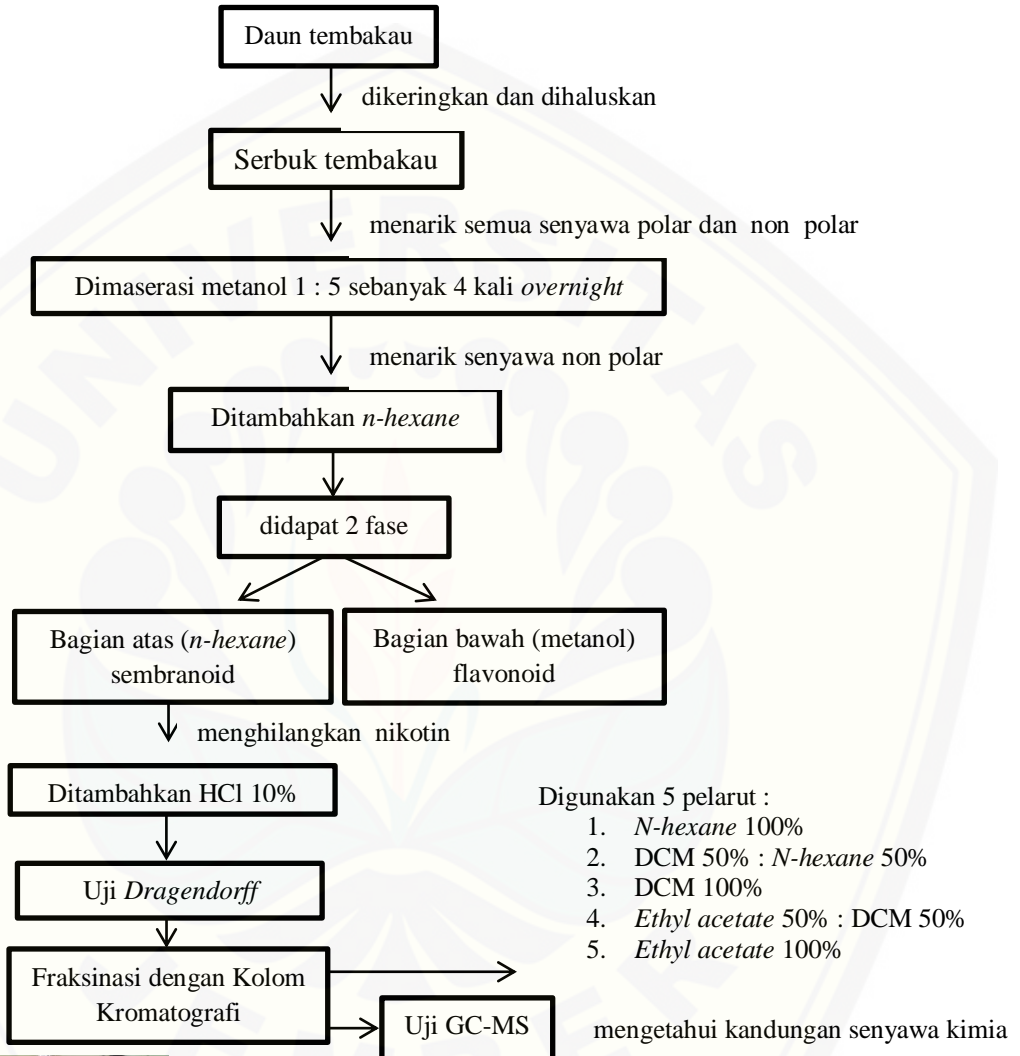


- Wahlberg, I., E. Olsson, dan J. E. Berg. 1992. Application of 2D-NMR Methods and Molecular Mechanistic Calculations In Structural Elucidation of Flavor Precursors: Cembranic Diterpenoids. In: Progress in Flavour Precursor Studies. Analysis-Generation-Biotechnology. *Proceedings of the International Conference Wurzburg Germany*.
- Walpole, R. E. 1993. *Pengantar Statistika Edisi Ke-3*. Sumantri B. Penerjemah. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Wax, G. R., K. Lewis, A. A. Salyer, dan H. Taber. 2008. *Bacterial Resistance to Antimicrobials Second Edition*. London: CRC Press.
- Wikanta, T., D. Gusmita, L. Rahayu, dan E. Marraskuranto. 2012. Kajian Awal Bioaktivitas Ekstrak Etanol Dan Fraksinya Dari Spons *Callispongia* sp. Terhadap Sel Lestari Tumor HeLa. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan* 7(1): 1-10.
- World Health Organization (WHO). 2013. *WHO Guidance Note: Comprehensive Cervical Cancer Prevention and Control: A Healthier Future for Girls and Women*. Geneva: WHO Press.
- World Health Organization (WHO). 2016. *WHO Guidance Note: Comprehensive Cervical Cancer Prevention and Control: Human papillomavirus (HPV) and Cervical Cancer Fact Sheet*. Geneva: WHO Press.
- Wulandari, D., dan T. M. Sudiro. 2014. Pengembangan Antivirus Human Papilloma Virus Berbasis Molekul Kecil. *Makalah Kedokteran Andalas* 37(1): 58-63.
- Wyllie, A. H., J. F. Kerr, dan A. R. Curie. 1980. Cell Death : The Significant of Apoptosis. *International Review of Cytology* 68: 251-306.
- Yan, N., Y. Du, X. Liu, H. Zhang, Y. Liu, dan Z. Zhang. 2019. A Review on Bioactivities of Tobacco Cembranoid Diterpenes. *Journal Biomolecules* 9(1): 30.

- Yuan, X. L., X. X. Mao, Y. D. Du, P. Z. Yan, X. D. Hou, dan Z. F. Zhang. 2019. Anti Tumor Activity of Cembranoid Type Diterpenes Isolated From *Nicotiana tabacum* L. *Journal Biomolecules* 9(2): 45.
- Yudhani, R. D., R. N. Pesik, dan D. Indarto. 2016. Metformin Enhances Anti Proliferative Effect of Cisplatin in Cervical Cancer Cell Line. *Indonesian Journal of Clinical Pharmacy* 5(2): 75-83.
- Zhou, Y., Y. Yang, X. L. Li, Z. Y. Chen, Q. B. Liu, X. L. Zhu, dan J. Yang. 2016. Determination of Cembrenediols in Tobacco by Gas Chromatography Mass Spectrometry-Selected Ion Monitoring with Precolumn Derivatization. *Acta Chromatographica* 28(4): 513-524.
- Zubair, M. S., S. Anam, K. O. Al-Footy, A. Abdel-Lateef, dan W. M. Alarif. 2014. Cembranoid Diterpenes as Antitumour: Molecular Docking Study to Several Protein Receptor Targets. *Proceedings Of The 3rd International Conference on Computation for Science and Technology* 2. Januari 2015. Atlantis Press: 121–125.

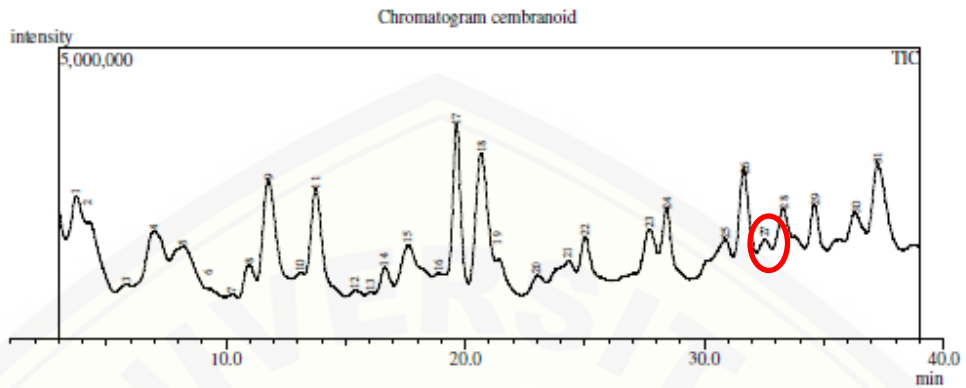
LAMPIRAN

A. Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Tembakau Kering (*Nicotiana tabacum L.*)



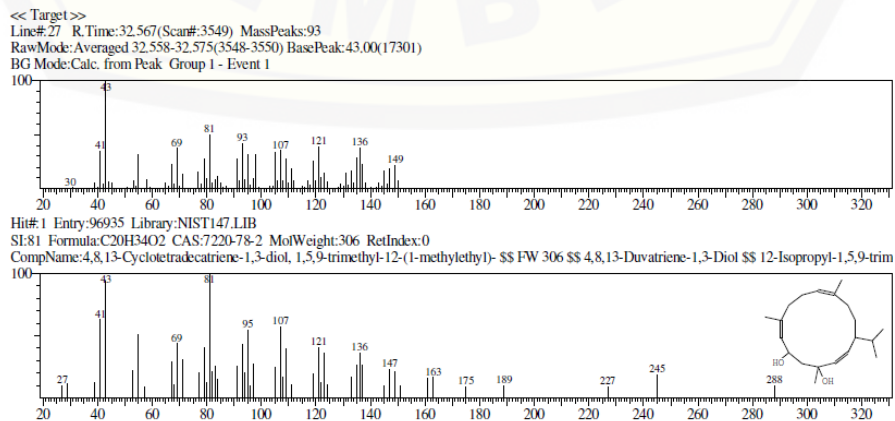
- Dihasilkan 5 pelarut :
1. *N-hexane* 100%
  2. DCM 50% : *N-hexane* 50%
  3. DCM 100%
  4. *Ethyl acetate* 50% : DCM 50%
  5. *Ethyl acetate* 100%

**B. Hasil Analisis GC-MS (Gas Chromatography Mass Spectrometry) dengan Kecepatan 40 menit**



Peak#	R.Time	Area	Area%	Height	Height%	Name	Base m/z
1	3.750	30702852	2.91	944477	3.42	Nonane, 5-(2-methylpropyl)-	57.05
2	4.249	24738199	2.34	727721	2.64	Pentadecane, 8-hexyl-	71.00
3	5.849	3588183	0.34	144899	0.52	Cyclopropanemethanol, 2-methyl-2-(4-methyl	69.00
4	6.968	60141498	5.69	1074672	3.89	Nonane, 3-methyl-5-propyl-	57.05
5	8.232	56406638	5.34	843346	3.05	2-Hexyl-1-octanol	43.00
6	9.283	467852	0.04	15065	0.05	8,12-Tetradecadienoic acid, 5-ethenyl-3,5,9,13	120.95
7	10.236	1150339	0.11	64515	0.23	1-Hexadecanol	55.05
8	10.973	16940146	1.60	569292	2.06	Pentadecanal-	57.05
9	11.777	85304158	8.08	2031546	7.36	Tetrapentacosane, 1,54-dibromo-	57.05
10	13.091	11540842	1.09	426374	1.54	Nonane, 5-methyl-5-propyl-	71.05
11	13.745	67057419	6.35	1860090	6.74	Octadecanal	43.00
12	15.421	2898813	0.27	112797	0.41	Heptadecane, 2,6,10,15-tetramethyl-	57.05
13	16.063	1648906	0.16	76967	0.28	Cyclododecane	70.00
14	16.652	14471169	1.37	504613	1.83	Pentadecanal-	82.00
15	17.619	50687025	4.80	880955	3.19	Pentadecane, 8-hexyl-	57.05
16	18.920	10518687	1.00	391506	1.42	Hexadecane, 1-iodo-	71.05
17	19.636	75474573	7.14	2957639	10.71	Tetradecanal	57.05
18	20.684	91360909	8.65	2446674	8.86	Tetradecanoic acid	73.00
19	21.389	17019465	1.61	622563	2.25	Nonane, 3-methyl-5-propyl-	57.05
20	23.028	10469362	0.99	316198	1.14	9-Octadecene, 1,1-dimethoxy-, (Z)-	71.00
21	24.336	29011909	2.75	510661	1.85	17-Pentatriacontene	57.05
22	25.032	33124214	3.14	897235	3.25	Heptadecane, 2,6,10,15-tetramethyl-	57.05
23	27.729	42375749	4.01	922184	3.34	Pentadecanoic acid, 15-bromo-	73.00
24	28.436	36488221	3.45	1249751	4.53	Hexadecane, 1-iodo-	57.05
25	30.879	31622239	2.99	614209	2.22	Octadecanamide	59.00
26	31.692	54380698	5.15	1690672	6.12	Tetracontane, 3,5,24-trimethyl-	57.05
27	32.570	15278554	1.45	500655	1.81	4,8,13-Cyclotetradecatriene-1,3-diol, 1,5,9-tri-	43.00
28	33.338	47275238	4.48	989287	3.38	1-Pentacosanol	83.00
29	34.646	28451977	2.69	974809	3.53	Pentadecane, 8-hexyl-	57.05
30	36.346	43978209	4.16	747008	2.70	Octirane, 2-decyl-3-(5-methylhexyl)-, cis-(-)-,	57.05
31	37.285	61773846	5.85	1508330	5.46	9-Octadecanamide, (Z)-	59.00
		1056347889	100.00	27616710	100.00		

**Library Line 27**



### C. Komposisi Pembuatan Media Kultur Lengkap (MK)

No.	Bahan	Jumlah (%)	Jumlah (per 100 ml)
1.	Penicillin.streptomycin (P-S)	2%	2 ml
2.	Fungizon	0,5%	0,5 ml
3.	FBS (Fetal Bovine Serum)	10%	10 ml
4.	Media (RPMI/DMEM)	Ad 100%	Ad 100 ml

### D. Penentuan Konsentrasi Fraksi Senyawa Sembranoid

Pengulangan 1 (sel HeLa)

- Jumlah sel yang dihitung ( $\text{mL}^{-1}$ )

$$\begin{aligned}\sum \text{ sel yang dihitung} &= \frac{\sum \text{ sel kamar } (A+B+C+D)}{2} \times 10^4 \\ &= 173 \times 10^4/\text{mL}\end{aligned}$$

Pengulangan 2 dan 3 (sel HeLa)

- Jumlah sel yang dihitung ( $\text{mL}^{-1}$ )

$$\begin{aligned}\sum \text{ sel yang dihitung} &= \frac{\sum \text{ sel kamar } (A+B+C+D)}{2} \times 10^4 \\ &= 167 \times 10^4/\text{mL}\end{aligned}$$

- ❖ Jumlah mL panen sel yang ditransfer (konsentrasi sel)

Ekstrak Fraksi Sembranoid

$$\begin{aligned}\text{➤ } V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 1600 \times 128 &= V_2 \times 100000 \\ V_2 &= 2,048 \\ V_2 &= 2 \mu\text{l} + \text{Media Kultur RPMI } 1600 \mu\text{l} \\ &(\text{untuk konsentrasi } 128 \mu\text{g/mL})\end{aligned}$$

Doksorubisin (kontrol positif)

$$\begin{aligned}\text{➤ } V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 1600 \times 0,78 &= V_2 \times 2000\end{aligned}$$



$$V_2 = 1,602$$

$$V_2 = 2 \mu\text{l} + \text{Media Kultur MI99 } 800 \mu\text{l}$$

(untuk konsentrasi 100  $\mu\text{g/mL}$ )

### E. Perhitungan Persentase Sel Hidup HeLa dan Vero

#### Kontrol Sel HeLa

Replikasi	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Ulangan 5	Jumlah	Rata-rata
1	1,13	1,153	1,13	1,074	1,086	4,667	0,933
2	0,901	0,878	0,964	0,921	-	3,664	0,916
3	0,946	0,991	0,994	0,997	-	3,928	0,982

#### Kontrol Media HeLa

Replikasi	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Ulangan 5	Jumlah	Rata-rata
1	0,399	0,449	0,422	-	-	1,27	0,423
2	0,327	0,304	0,314	0,352	-	1,297	0,324
3	0,353	0,349	0,366	0,403	-	1,471	0,367

#### Kontrol Sel Vero

Replikasi	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Ulangan 5	Jumlah	Rata-rata
1	0,679	0,783	0,675	0,842	-	2,979	0,745
2	0,431	0,444	0,443	0,434	-	1,752	0,438
3	0,457	0,41	0,393	0,382	-	1,642	0,411

#### Kontrol Media Vero

Replikasi	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Ulangan 5	Jumlah	Rata-rata
1	0,095	0,086	0,087	0,085	-	0,353	0,088
2	0,107	0,087	0,083	0,09	-	0,367	0,092
3	0,095	0,088	0,081	0,084	-	0,348	0,087

Rumus :

$$\text{Persen sel hidup} = \frac{(\text{Abs. Perlakuan} - \text{Abs. Kontrol media})}{(\text{Abs. Kontrol sel} - \text{Abs. Kontrol media})} \times 100\%$$

K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Rata"	SD
128	35,6833	38,143	31,9221	38,6565	35,6147	40,1774	50,1832	40,7407	42,3687	39,2766	5,1666
64	71,8488	73,006	78,9372	52,8517	65,019	66,2019	68,5796	72,6496	70,2076	68,8113	7,2629
32	80,6732	89,208	84,579	79,3832	80,5661	78,5382	75,58	85,6736	83,8828	82,0094	4,176
16	69,1002	84,868	88,0509	81,2421	89,0156	90,0296	82,092	81,4408	85,8364	83,5196	6,3223
8	93,5481	94,85	91,6675	94,7613	96,2822	100,676	96,744	91,3716	91,5344	94,6039	3,0405
4	99,4792	83,422	90,5102	94,2543	97,6341	95,7752	99,186	90,232	89,5808	93,3415	5,3297
2	101,215	97,454	99,3346	90,8745	101,69	103,211	90,232	97,3952	99,6744	97,8979	4,5741
1	99,3346	97,743	100,058	94,5923	94,4233	107,436	90,7204	79,65	76,0684	93,3362	9,9654

K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Rata"	SD
0,78	74,4527	78,069	71,8488	68,3988	59,1044	59,1044	64,184	69,556	70,37	68,3431	6,4981

Rata-rata sel hidup HeLa (%), Sembranoid dan Doksorubisin

K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Rata"	SD
128	17,327	13,671	23,115	89,603	82,9603	155,163	124,575	80,68	84,699	74,644	48,817
64	65,004	77,494	85,872	98,556	104,043	119,061	136,322	96,136	91,19	97,075	21,352
32	93,488	97,449	105,98	102,89	100	99,1336	94,8995	99,845	95,518	98,8	3,9831
16	96,078	96,382	94,859	99,711	115,885	105,487	104,482	104,79	120,87	104,28	9,0193
8	78,865	96,535	111,77	108,95	122,816	108,087	91,1901	89,954	91,19	99,928	13,781
4	82,369	108,42	117,4	105,78	115,018	109,242	95,5178	100,77	106,03	104,5	10,626
2	81,607	105,22	114,97	113,29	118,773	116,462	94,2813	102,94	116,23	107,08	12,462
1	95,316	113,9	98,058	123,1	116,751	108,087	101,391	125,5	96,445	108,73	11,608

K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Rata"	SD
0,78	70,944	68,203	63,176	54,079	55,2347	52,6354	52,2411	55,641	58,114	58,919	6,9045

Rata-rata sel hidup Vero (%), Sembranoid dan Doksorubisin

**F. Tabel Persentase Sel Hidup Perlakuan Doksorubisin dan Fraksi Senyawa Sembranoid Terhadap Viabilitas Sel Kanker Serviks HeLa dan sel Vero**

P	Kons. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Sel Vero ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )	IC <sub>50</sub>	Sel HeLa ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )	IC <sub>50</sub>	Sign.
K+	0,78	59,0156 <sup>e</sup> $\pm$ 6,90	-	68,3422 <sup>e</sup> $\pm$ 6,50	-	0,182
	1	108,7289 <sup>c</sup> $\pm$ 11,61		93,3356 <sup>abc</sup> $\pm$ 9,97		0,028
	2	107,0867 <sup>c</sup> $\pm$ 12,46		97,8967 <sup>bc</sup> $\pm$ 4,57		0,188
	4	104,5133 <sup>c</sup> $\pm$ 10,63		93,3400 <sup>abc</sup> $\pm$ 5,33		0,110
P	8	99,9300 <sup>c</sup> $\pm$ 13,78	115,	94,6033 <sup>abc</sup> $\pm$ 3,04	57,	0,445
	16	104,2811 <sup>c</sup> $\pm$ 9,02	39	83,5322 <sup>abd</sup> $\pm$ 6,32	56	0,003
	32	98,8011 <sup>bc</sup> $\pm$ 3,98		82,0089 <sup>ad</sup> $\pm$ 4,18		0,017
	64	97,0744 <sup>abc</sup> $\pm$ 21,35		68,8122 <sup>de</sup> $\pm$ 7,26		0,000
	128	74,6444 <sup>d</sup> $\pm$ 48,82		39,2744 <sup>f</sup> $\pm$ 5,17		0,000

**G. Hasil Analisis Probit Fraksi Senyawa Sembranoid Terhadap Viabilitas Sel Kanker Serviks HeLa**

Sel HeLa

**Chi-Square Tests**

	Chi-Square	df(a)	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	14,867	5	,011(b)

a Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b Since the significance level is less than ,500, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

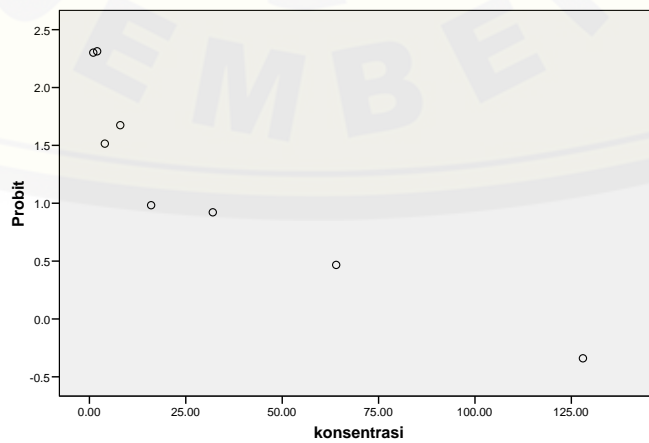
**Confidence Limits**

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT(a)			
,010	144,294	85,866	530,876
,020	134,131	79,913	491,554
,030	127,683	76,125	466,616
,040	122,833	73,269	447,863
,050	118,887	70,941	432,613
,060	115,529	68,956	419,637
,070	112,584	67,212	408,263

,080	109,948	65,648	398,081
,090	107,550	64,223	388,823
,100	105,343	62,910	380,304
,150	96,204	57,446	345,056
,200	88,941	53,069	317,077
,250	82,710	49,281	293,107
,300	77,115	45,846	271,613
,350	71,930	42,629	251,731
,400	67,010	39,537	232,904
,450	62,249	36,500	214,734
,500	57,564	33,454	196,909
,550	52,879	30,336	179,156
,600	48,119	27,069	161,216
,650	43,199	23,548	142,817
,700	38,014	19,612	123,654
,750	32,418	14,968	103,370
,800	26,187	8,995	81,584
,850	18,925	,069	58,154
,900	9,786	-16,877	34,389
,910	7,579	-22,247	29,926
,920	5,181	-28,634	25,631
,930	2,545	-36,248	21,499
,940	-,400	-45,358	17,491
,950	-3,758	-56,354	13,526
,960	-7,704	-69,873	9,468
,970	-12,554	-87,097	5,082
,980	-19,003	-110,645	-,096
,990	-29,165	-148,608	-7,409

a A heterogeneity factor is used.

Probit Transformed Responses



Sel Vero (sel normal)

#### Chi-Square Tests

		Chi-Square	df(a)	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	11,043	5	,051(b)

a Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b Since the significance level is less than ,500, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

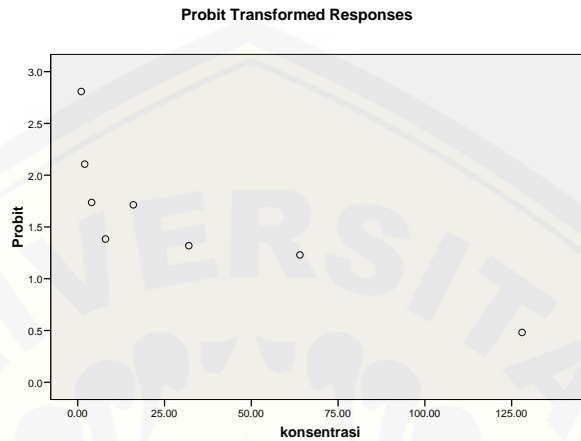
#### Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT(	286,850	.	.
a)	266,758	.	.
,010	254,010	.	.
,020	244,421	.	.
,030	236,620	.	.
,040	229,981	.	.
,050	224,160	.	.
,060	218,947	.	.
,070	214,207	.	.
,080	209,843	.	.
,090	191,777	.	.
,100	177,418	.	.
,150	165,100	.	.
,200	154,038	.	.
,250	143,787	.	.
,300	134,060	.	.
,350	124,649	.	.
,400	115,387	.	.
,450	106,125	.	.
,500	96,714	.	.
,550	86,987	.	.
,600	76,736	.	.
,650	65,674	.	.
,700	53,355	.	.
,750	38,997	.	.
,800	20,930	.	.
,850	16,567	.	.
,900	11,826	.	.
,910	6,614	.	.
,920	,793	.	.
,930	-5,847	.	.
,940	-13,647	.	.
,950		.	.
,960		.	.



,970	-23,237	.	.
,980	-35,984	.	.
,990	-56,076	.	.

a A heterogeneity factor is used.



**H. Hasil Analisis Statistik Uji *Two Way* GLM Univariat Pengaruh Fraksi Senyawa Sembranoid Terhadap Sel Kanker Serviks HeLa dan Sel Vero**

**Tests of Normality**

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
Selh idup	K+ Doxo vero	,245	9	,127	,863	9	,104
	K+ Doxo hela	,170	9	,200(*)	,943	9	,613
	Sel vero konsentrasi 128	,216	9	,200(*)	,909	9	,307
	Sel vero konsentrasi 64	,150	9	,200(*)	,979	9	,960
	Sel vero konsentrasi 32	,159	9	,200(*)	,964	9	,836
	Sel vero konsentrasi 16	,224	9	,200(*)	,887	9	,184
	Sel vero konsentrasi 8	,181	9	,200(*)	,954	9	,735
	Sel vero konsentrasi 4	,214	9	,200(*)	,923	9	,418
	Sel vero konsentrasi 2	,246	9	,123	,857	9	,089
	Sel vero konsentrasi 1	,181	9	,200(*)	,909	9	,311
	Sel hela konsentrasi 128	,166	9	,200(*)	,936	9	,538
	Sel hela konsentrasi 64	,190	9	,200(*)	,904	9	,278
	Sel hela konsentrasi 32	,181	9	,200(*)	,978	9	,953
	Sel hela konsentrasi 16	,248	9	,118	,855	9	,084
	Sel hela konsentrasi 8	,166	9	,200(*)	,910	9	,317
	Sel hela konsentrasi 4	,147	9	,200(*)	,930	9	,479
	Sel hela konsentrasi 2	,235	9	,166	,877	9	,145
	Sel hela konsentrasi 1	,210	9	,200(*)	,925	9	,434

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

a Lilliefors Significance Correction

**Descriptive Statistics**

Dependent Variable: Selhidup

Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
K+ Doxo vero	59,0156	6,82925	9
K+ Doxo hela	68,3422	6,49999	9
Sel vero konsentrasi 128	74,6444	48,81633	9
Sel vero konsentrasi 64	97,0744	21,35317	9
Sel vero konsentrasi 32	98,8011	3,98307	9
Sel vero konsentrasi 16	104,2811	9,01729	9
Sel vero konsentrasi 8	99,9300	13,78118	9
Sel vero konsentrasi 4	104,5133	10,63633	9
Sel vero konsentrasi 2	107,0867	12,46145	9
Sel vero konsentrasi 1	108,7289	11,60571	9
Sel hela konsentrasi 128	39,2744	5,16714	9
Sel hela konsentrasi 64	68,8122	7,26425	9
Sel hela konsentrasi 32	82,0089	4,17596	9
Sel hela konsentrasi 16	83,5322	6,33585	9
Sel hela konsentrasi 8	94,6033	3,04141	9
Sel hela konsentrasi 4	93,3400	5,33015	9
Sel hela konsentrasi 2	97,8967	4,57524	9
Sel hela konsentrasi 1	93,3356	9,96538	9
Total	87,5123	23,10364	162

**Levene's Test of Equality of Error Variances(a)**

Dependent Variable: selhidup

F	df1	df2	Sig.
7,737	17	144	,000

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

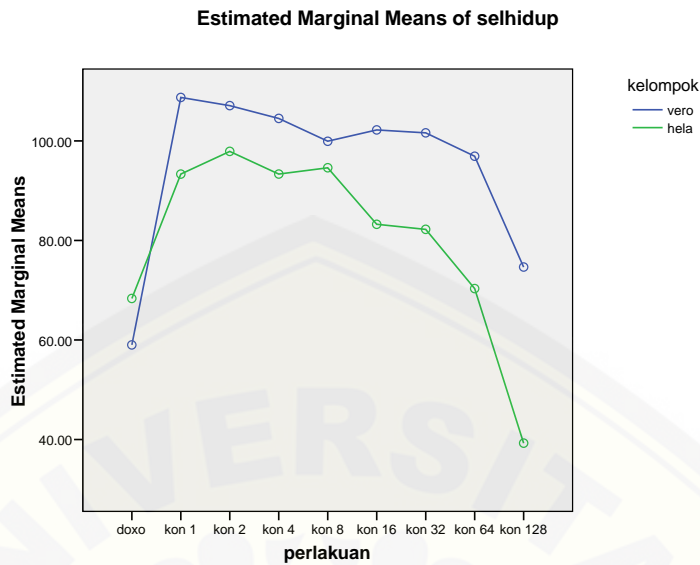
a Design: Intercept+kelompok+perlakuan+kelompok \* perlakuan

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: selhidup

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	54327,420(a)	17	3195,731	14,558	,000
Intercept	1240660,774	1	1240660,774	5651,700	,000
Kelompok	8835,192	1	8835,192	40,248	,000
Perlakuan	39502,131	8	4937,766	22,493	,000
kelompok * perlakuan	5990,097	8	748,762	3,411	,001
Error	31610,869	144	219,520		
Total	1326599,063	162			
Corrected Total	85938,289	161			

a R Squared = ,632 (Adjusted R Squared = ,589)



**I. Hasil Uji Lanjut Duncan Pengaruh Fraksi Senyawa Sembranoid Terhadap Sel Kanker Serviks HeLa dan Sel Vero**

Homogenous Subsets  
Sel hidup

Perlakuan	N	Subset						
		1	2	3	4	5	6	1
Duncan (a,b)								
Sel hela konsentrasi 128	9	39,2744						
K+ Doxo vero	9			59,0156				
K+ Doxo hela	9			68,3422	68,3422			
Sel hela konsentrasi 64	9			68,8122	68,8122			
Sel vero konsentrasi 128	9				74,6444			
Sel hela konsentrasi 32	9				82,0089	82,0089		
Sel hela konsentrasi 16	9				83,5322	83,5322	83,5322	
Sel hela konsentrasi 1	9					93,3356	93,3356	93,3356
Sel hela konsentrasi 4	9					93,3400	93,3400	93,3400
Sel hela konsentrasi 8	9					94,6033	94,6033	94,6033
Sel vero konsentrasi 64	9					97,0744	97,0744	97,0744
Sel hela konsentrasi 2	9						97,8967	97,8967
Sel vero konsentrasi 32	9						98,8011	98,8011
Sel vero konsentrasi 8	9							99,9300
Sel vero konsentrasi 16	9							104,2811
Sel vero konsentrasi 4	9							104,5133
Sel vero konsentrasi 2	9							107,0867
Sel vero konsentrasi 1	9							108,7289
Sig.		1,000	,187	,052	,058	,059	,067	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type II Sum of Squares. The error term is Mean Square(Error) = 217,391. a.) Uses Harmonic Mean Sample Size = 9,000. b.) Alpha = ,05.