



UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO
(*Theobroma cacao L*) TERHADAP SEL KANKER SERVIKS
(*HeLa cell line*)

SKRIPSI

Oleh

Kristin Rizki Mustika

NIM 161610101033

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2020



UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO
(*Theobroma cacao L*) TERHADAP SEL KANKER SERVIKS
(*HeLa cell line*)

SKRIPSI

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

Oleh
Kristin Rizki Mustika
NIM 1616101010333

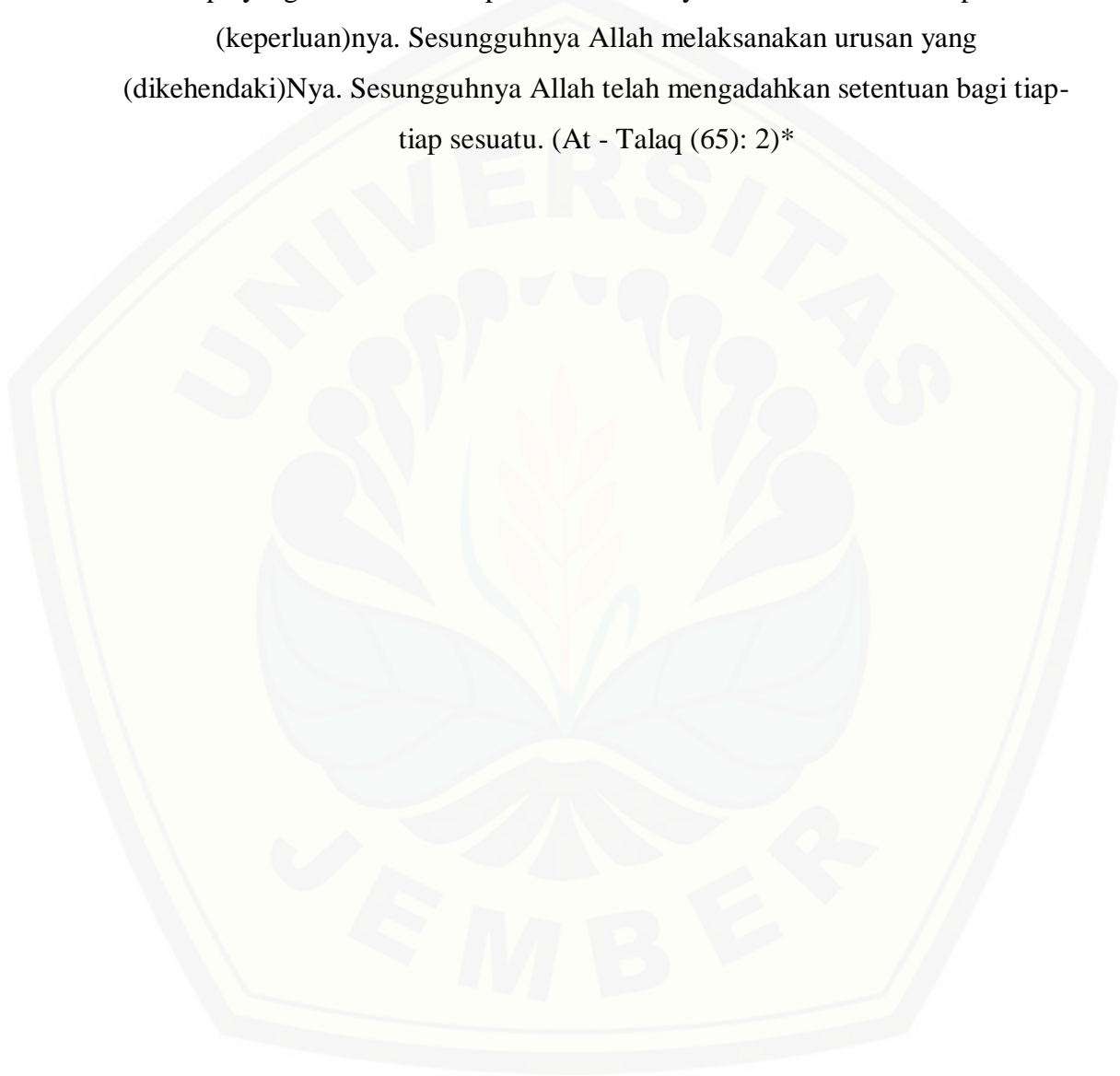
PERSEMBAHAN

Dengan setulus hati skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Papa Dr. Sutomo, M.Si, Mama Dra. Suwarti, kakak tercinta Tegar Succliftom, S.T, dan keluarga besar atas segala dukungan, kasih sayang, motivasi, nasehat dan bimbingan, serta doa setulus hati yang tiada henti diberikan sampai saat ini;
2. Guru–guruku yang telah menuangkan ilmunya dan membimbing sejak TK hingga Perguruan Tinggi;
3. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTO

Dan memberikan rezeki dari arah yang tiada disangka-sangkanya. Dan barang siapa yang bertawakkal kepada Allah niscaya Allah akan mencukupkan (keperluan)nya. Sesungguhnya Allah melaksanakan urusan yang (dikehendaki)Nya. Sesungguhnya Allah telah mengadakan ketentuan bagi tiap-tiap sesuatu. (At - Talaq (65): 2)*



*Al-Qur'anulkarim, *Special for Muslimah*. 2012. Bandung: Cordoba Internasional Indonesia

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Kristin Rizki Mustika

NIM : 161610101033

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Uji Sitotoksitas Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap Sel Kanker Serviks (*Hella celliae*)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 7 Agustus 2020

Yang menyatakan,

Kristin Rizki Mustika

NIM 161610101033

SKRIPSI

**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO
(*Theobroma cacao L.*) TERHADAP SEL KANKER SERVIKS
(*Hella celliae*)**

Oleh

**Kristin Rizki Mustika
NIM 161610101033**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Yani Corvianindya Rahayu M. KG

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Muhammad Nurul Amin, M. Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Sitotoksitas Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Sel Kanker Serviks (*HeLa cell line*)” ini telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

hari : Jumat
tanggal : 7 Agustus 2020
tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Dosen Penguji Utama,

Dosen Penguji Anggota

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

drg.Izzata Barid, M.Kes
NIP. 196805171997022001

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

drg. Yani Corvianindya Rahayu, M.KG
NIP. 197308251998022001

drg. Muhammad Nurul Amin, M.Kes
NIP. 197702042002121002

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost
NIP. 1969011219996011001

RINGKASAN

Uji Sitotoksisitas Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*); Kristin Rizki Mustika 161610101033, 69 halaman. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Tumbuhan yang dapat dikembangkan sebagai agen kemopreventif pada sel kanker salah satunya yaitu kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*). Kulit buah kakao kaya akan komponen-komponen senyawa fenolik, antara lain : katekin, epikatekin , proantosianidin, asam fenolat, tannin dan flavonoid lainnya. Flavonoid terkondensasi yang terdapat dalam kulit buah kakao dapat menghambat reaksi oksidasi dikarenakan mampu mentransfer elektron kepada senyawa radikal bebas. Kulit buah kakao mempunyai potensi sebagai bahan antioksidan alami, antara lain : mempunyai kemampuan untuk memodulasi sistem imun, efek kemopreventif untuk pencegahan penyakit diabetes dan kanker. Selain itu polifenol kakao bersifat antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen dan bakteri kariogenik. Namun perlu adanya uji sitotoksik menggunakan kultur sel HeLa untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari ekstrak kulit buah kakao. Penggunaan uji sitotoksik pada kultur sel merupakan salah satu cara penetapan *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat sitotoksik. Sistem ini merupakan uji kuantitatif dengan cara menetapkan kematian sel.

Uji sitotoksisitas MTT *assay* dilakukan pada kultur sel HeLa dengan konsentrasi 2400 µg/ml, 1200 µg/ml, 600 µg/ml, 300 µg/ml, 150 µg/ml, 75 µg/ml. Elisa *reader* digunakan untuk melihat jumlah sel dalam satuan *optical density* kemudian di konversikan dalam rumus viabilitas sel.

Hasil penelitian menunjukkan Ekstrak kulit buah kakao merupakan biomaterial alternatif yang memiliki nilai IC_{50} 69.825 µg/ml pada sel HeLa sehingga berdasarkan tabel klasifikasi sitotoksik ekstrak kulit buah kakao tidak toksik terhadap sel HeLa atau tidak dapat menghambat pertumbuhan kultur sel HeLa . Hasil ini dapat diakibatkan karena kulit buah kakao memang tidak memiliki efek sebagai antikanker terhadap sel HeLa , namun juga dapat diakibatkan karena kesalahan dalam pengerjaan yang dapat berupa kontaminan

Kata kunci: ekstrak kulit buah kakao, uji sitotoksisitas, sel HeLa , IC_{50} .

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Sitotoksisitas Ekstrak Kulit Buah Kakao Terhadap Sel Kanker Serviks (*Hella celliae*)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
2. drg. Yani Corvianindya Rahayu, M.KG selaku pendamping penelitian dan dosen pembimbing skripsi yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini.
3. drg. Muhammad Nurul Amin, M.Kes, drg. Dwi Merry Christmarini Robin, M.Kes, selaku dosen pembimbing skripsi yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini.
4. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes., dan drg. Izzata Barid, M.Kes, selaku dosen penguji skripsi yang telah memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini.
5. drg. Dyah Indartin Setyowati, M.Kes selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi dalam perjalanan studi selama penulis menjadi mahasiswa.
6. Ayahanda Dr. Sutomo, M.Si, Ibunda Dra. Suwarti yang telah memberikan dukungan, kasih sayang, do'a dan semangat dalam menyelesaikan skripsi.
7. Kakak tercinta Tegar Succliftom, ST., yang dengan tulus memberikan do'a dan dukungan dalam setiap langkah adiknya.
8. Pak Rosi selaku staf Puslit Kopi dan Kakao yang telah membantu dalam mendapat sampel kulit buah kakao.
9. Mbak Dea dan Mbak Larissa selaku staf Laboratorium Kedokteran Molekuler CDAST Universitas Jember.

10. Mbak Azizah, Bu Widi, Bu Wayan selaku Teknisi Laboratorium yang telah membantu dalam penelitian.
11. Kawan penelitian Nurhalimah, Karelina Amarta, dan Devi Komala.
12. Sahabatku sekaligus *support system* Hana, Anya, Balqis, Dhea, Nada, dan Diska.
13. Teman-teman kelompok tutorial 4
14. Teman-teman KKN yang telah menyemangati Afri, Elin, dan Faninda
15. Seluruh teman-teman seperjuangan FKG angkatan 2016.
16. Semua pihak yang telah membantu kegiatan penelitian; atas perhatian, perkenan dan bantuan yang telah diberikan hingga tersusunya skripsi ini.

Semoga Tuhan Yang Maha Kuasa senantiasa membalas segala kebaikan yang telah diberikan pada penulis selama penyelesaian skripsi. Penulis menerima kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan kontribusi yang berarti bagi perkembangan ilmu pengetahuan bagi semua pihak.

Jember, 7 Agustus 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	ii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Penyakit Kanker	6
2.2 Kanker Serviks	7
2.3 Radikal Bebas	8
2.4 Mekanisme Kerusakan Sel oleh Radikal Bebas	9
2.5 Tanaman Kakao.....	10
2.6 Antioksidan	15
2.7 Uji Antioksidan dengan DPPH	16
2.8 Kultur Sel HeLa	18

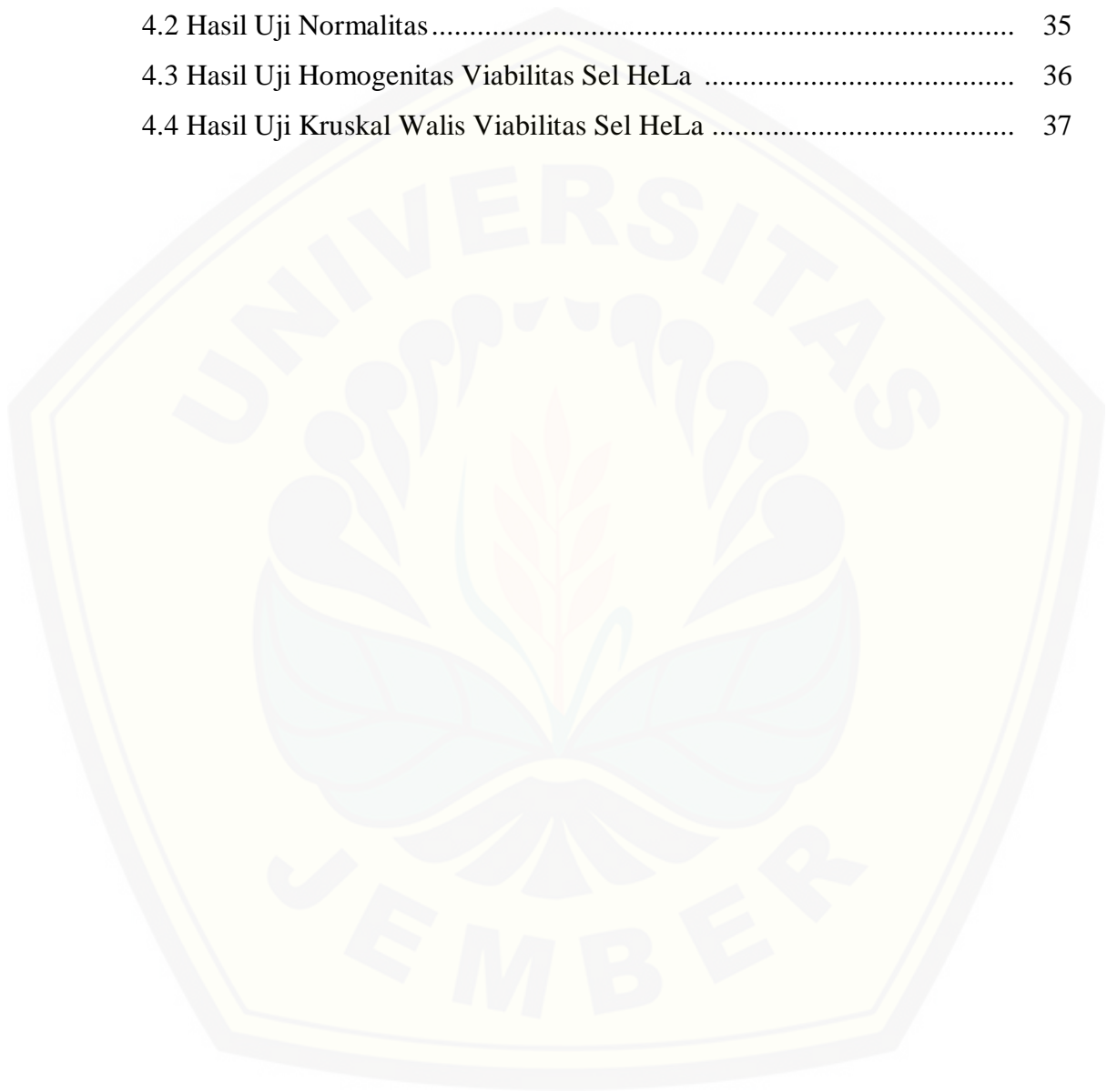
2.9 Uji Sitotoksitas	19
2.10 Kerangka Konsep	21
2.11 Penjelasan Kerangka Konsep	22
2.12 Hipotesis	22
BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN	23
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	23
3.2 Tempat Penelitian	23
3.3 Waktu Penelitian	23
3.4 Variabel Penelitian	23
3.5 Definisi Operational Penelitian.....	24
3.5.1 Kulit Buah Kakao.....	25
3.5.2 Kultur sel HeLa	24
3.5.3 Uji sitotoksitas.....	24
3.6 Sampel Penelitian	25
3.7 Alat dan bahan.....	26
3.8 Prosedur Penelitian.....	27
3.9 Analisis Data	31
3.10 Alur Penelitian	33
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	33
4.1 Hasil Penelitian	33
4.2 Analisa Data.....	37
4.3 Pembahasan.....	37
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	43
5.1 Kesimpulan	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Tanaman Kakao	11
3.1 Sampel Penelitian	25
4.1 Gambaran Morfologi sel HeLa	32
4.2 Diagram Pengaruh Kulit Buah Kakao terhadap Viabilitas sel HeLa	33
4.3 Regresi Linier Pengaruh Kulit Kakao terhadap Viabilitas sel HeLa	34
4.4 Bagan Flavonoid dalam menghambat signal transduksi	40

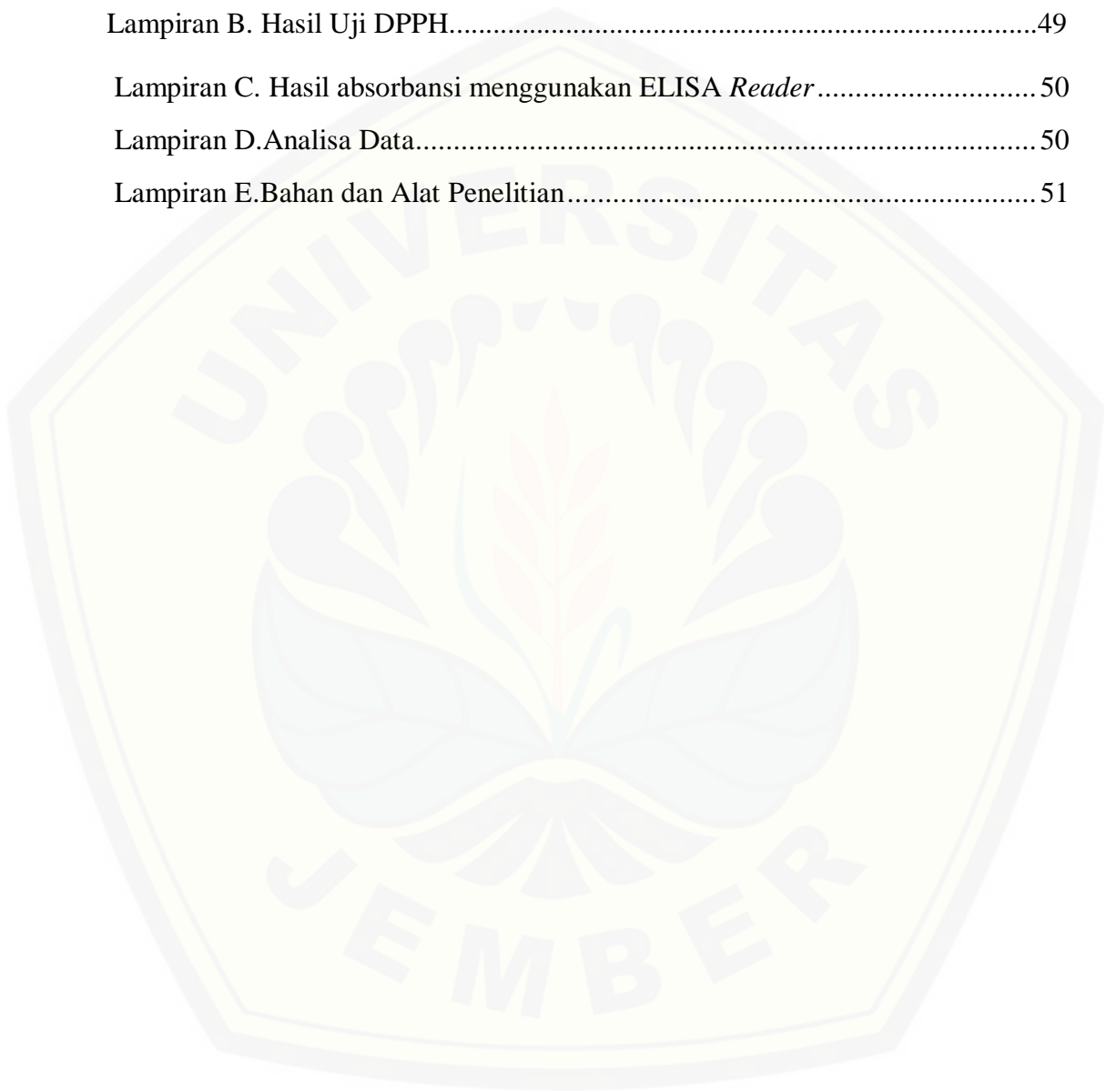
DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Kategori Sitotoksik Bahan Alam Berdasarkan Jumlah IC_{50} ,	19
4.2 Hasil Uji Normalitas	35
4.3 Hasil Uji Homogenitas Viabilitas Sel HeLa	36
4.4 Hasil Uji Kruskal Walis Viabilitas Sel HeLa	37



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A.Surat Keterangan <i>Ethical Clearance</i>	48
Lampiran B. Hasil Uji DPPH.....	49
Lampiran C. Hasil absorbansi menggunakan ELISA <i>Reader</i>	50
Lampiran D.Analisa Data.....	50
Lampiran E.Bahan dan Alat Penelitian.....	51



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker serviks memiliki insidensi cukup tinggi di dunia, menyebabkan kematian terbesar ketiga pada wanita di dunia dan pada negara-negara berkembang kanker ini membunuh wanita lebih banyak dibanding kanker lainnya. Pada negara di Asia terdapat 245.000 kasus kematian tiap tahun disebabkan oleh kanker serviks. Berdasarkan kondisi ini, maka pengatasan kanker serviks dengan menghambat dan mematikan pertumbuhan sel kanker secara selektif dan aman perlu diupayakan. Salah satunya dengan pengembangan agen kemopreventif dari bahan alam yang dapat memperlambat atau mencegah perkembangan sel kanker. Sebagian besar bahan alam khususnya tanaman mengandung zat aktif alamiah dengan berbagai aktivitas biologis antara lain sebagai antikanker (Davis *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2007).

Di Indonesia tanaman kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan tanaman yang terus dibudidayakan hingga saat ini, karena kakao mempunyai nilai ekonomi yang tinggi yang dapat dijadikan sebagai sumber pendapatan perkebunan ataupun kelompok masyarakat (Sukamto, 2013). Perkebunan kakao (*Theobroma cacao L.*) di Indonesia tercatat seluas 1.677245 ha, dengan sebagian besar (94,51%) dikelola oleh rakyat sedangkan selebihnya dikelola oleh perkebunan besar negara dan swasta (Robiyan, 2014). Pada saat panen, umumnya petani memanen biji kakao untuk diolah menjadi coklat, dan menghasilkan limbah kulit buah kakao yang cukup banyak. Keberadaan limbah tersebut sering kali tidak dimanfaatkan secara baik dan kadang dibiarkan begitu saja menjadi sampah pertanian. Limbah kulit buah kakao yang dihasilkan dalam jumlah banyak akan menjadi masalah jika tidak ditangani dengan baik karena produksi limbah padat ini mencapai lebih dari 60% dari total produksi buah (Harsini & Susilowati, 2010).

Di sisi lain, kulit buah kakao dapat dikembangkan sebagai agen kemopreventif pada sel kanker. Kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) kaya akan komponen-komponen senyawa fenolik, antara lain : katekin, epikatekin , proantosianidin, asam fenolat, tannin dan flavonoid lainnya. Kulit buah kakao mempunyai potensi sebagai bahan antioksidan alami, antara lain : memiliki manfaat kesehatan untuk penyakit kronis seperti inflamasi, penyakit kardiovaskular, gangguan neurodegeneratif, dan kanker (Arlorio, 2009; Rimbach, 2009; Schinella, 2010). Kandungan polifenol pada kulit buah kakao sangat tinggi sehingga dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan. Fapundan dan Afolayan (2012) mengemukakan bahwa ekstrak dari kulit buah kakao teridentifikasi adanya senyawa terpenoid, polifenol, tannin, flavonoid, asam sinamat, alkaloid dan pirogalol yang berperan sebagai antioksidan. Kakao juga mempunyai kapasitas antioksidan lebih tinggi dibanding teh dan anggur merah (Lee *et al*, 2003). Selain itu polifenol kakao bersifat antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen dan bakteri kariogenik (Osawa *et al*, 2000; Bouchers, 2002; Lamuela-Raventos, 2005).

Dalam penelitian sebelumnya ekstraksi kulit buah kakao dengan menggunakan pelarut aseton-air menunjukkan aktivitas antioksidan kulit buah kakao dengan penyari aseton-air lebih tinggi bila dibandingkan dengan penyari etanol:air, dikarenakan jumlah kandungan senyawa flavonoid terkondensasi lebih banyak dari flavonoid lain yang terdapat dalam kulit buah kakao, dimana senyawa flavonoid terkondensasi (tanin terkondensasi) sangat baik diekstraksi dengan penyari aseton-air (7:3) (Sartini, 2013; Mita,2015).

Penelitian lain menunjukkan kulit buah kakao memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Ekstrak metanol kulit buah kakao memiliki aktivitas penangkap radikal bebas seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Ekstrak metanolik kulit buah kakao memiliki kemampuan kuat sebagai donor elektron dan dapat bereaksi dengan radikal bebas untuk diubah menjadi produk yang sangat stabil serta mengakhiri reaksi rantai radikal. Kemampuan tersebut menjadikan kulit buah kakao mampu bertindak sebagai *radical scavenger* terhadap metabolit

antara reaktif senyawa karsinogen, sehingga mengurangi insiden terjadinya kanker (Baharum *et al.*, 2014).

Uji sitotoksik memiliki peran sebagai bagian dari evaluasi bahan agar dapat diterima oleh jaringan tubuh dan mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Penggunaan uji sitotoksik pada kultur sel merupakan salah satu cara penetapan *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat sitotoksik. Sistem ini merupakan uji kuantitatif dengan cara menetapkan kematian sel (Haryoto, 2013).

Hasil akhir uji sitotoksik dapat memberikan konsentrasi yang maksimum yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Uji sitotoksitas pada organ target memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Djayanegara dan Wahyudi, 2009).

Penelitian ini menggunakan sel HeLa dikarenakan sel tersebut cukup aman digunakan untuk kepentingan kultur, bersifat immortal atau tidak dapat mati dalam usia tua, dan dapat membelah secara tidak terbatas selama memenuhi kondisi lingkungan yang sesuai (Mutiah, 2014).

Penelitian sebelumnya didapatkan bahwa konsentrasi yang dapat menghambat proliferasi sel sebesar 50% (IC_{50}) ekstrak etanol kulit buah kakao sebesar 1236 $\mu\text{g/ml}$ terhadap sel kanker payudara (MCF-7). Sementara itu, pada ekstrak kulit buah kakao dengan pelarut metanol memiliki kemampuan antiproliferatif terhadap sel HeLa sebesar 688,7 $\mu\text{g/ml}$. Dalam penelitian ini, digunakan dosis konsentrasi yang mencakup kedua nilai IC_{50} penelitian sebelumnya dengan serial dilution dengan konsentrasi 75 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$, 600 $\mu\text{g/ml}$, 1200 $\mu\text{g/ml}$, 2400 $\mu\text{g/ml}$ (Ariza 2015; Baharum, 2014).

Melalui penelitian ini akan diketahui aktivitas sitotoksik ekstrak aseton-air kulit buah kakao pada sel kanker serviks HeLa. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar pengembangan kulit buah kakao sebagai agen kemopreventif terhadap sel kanker serviks.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak aseton-air kulit buah kakao pada konsentrasi 75 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$, 600 $\mu\text{g/ml}$, 1200 $\mu\text{g/ml}$, 2400 $\mu\text{g/ml}$ bersifat toksik terhadap sel kanker serviks HeLa ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dalam penelitian ini yaitu untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak kulit buah kakao pada sel kanker serviks HeLa

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberi informasi tentang efek sitotoksitas ekstrak kulit buah kakao terhadap sel kanker serviks HeLa .
2. Sebagai acuan penelitian berikutnya mengenai sitotoksitas ekstrak kulit buah kakao terhadap sel kanker serviks HeLa .
3. Memberikan informasi kepada masyarakat bahwa pengembangan bahan dibidang kedokteran gigi dapat memanfaatkan limbah kulit buah kakao sehingga memiliki nilai ekonomi yang tinggi.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Kanker

2.1.1 Pengertian Kanker

Kanker merupakan suatu penyakit yang disebabkan pertumbuhan tidak normal sel-sel jaringan yang tumbuh tidak terkendali, menginfiltrasi dan menekan jaringan tubuh sehingga mempengaruhi fungsi organ tubuh (Akmal, dkk., 2010). Penyakit kanker menurut Sunaryati merupakan penyakit yang ditandai pembelahan sel tidak terkendali dan kemampuan sel-sel tersebut menyerang jaringan biologis lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan yang bersebelahan (invasi) atau dengan migrasi sel ke tempat yang jauh (metastasis) (Sunaryati, 2011). Kanker adalah suatu kondisi sel telah kehilangan pengendalian dan mekanisme normalnya, sehingga mengalami pertumbuhan yang tidak normal, berkembang cepat dan terus membelah diri, hingga menjadi penyakit berat (Diananda, 2009; Maharani, 2012).

2.1.2 Pertumbuhan Penyakit Kanker

Pertumbuhan sel kanker tidak terkendali disebabkan kerusakan deoxyribose nucleic acid (DNA), sehingga menyebabkan mutasi gen vital yang mengontrol pembelahan sel. Beberapa mutasi dapat mengubah sel normal menjadi sel kanker. Mutasi-mutasi tersebut diakibatkan agen kimia maupun fisik yang edisebut karsinogen. Mutasi dapat terjadi secara spontan maupun diwariskan (Sunaryati, 2011). Sel-sel kanker membentuk suatu masa dari jaringan ganas yang kemudian menyusup ke jaringan di dekatnya dan menyebar ke seluruh tubuh. Sel-sel kanker sebenarnya dibentuk dari sel normal melalui proses transformasi terdiri dari dua tahap yaitu tahap iniasi dan promosi. Tahap inisiasi, pada tahap ini perubahan bahan genetik sel yang memancing sel menjadi ganas. Perubahan sel genetik disebabkan unsur pemicu kanker yang terkandung dalam bahan kimia, virus, radiasi, atau sinar matahari (Sunaryati, 2011). Pada tahap promosi, sel menjadi ganas disebabkan gabungan antara sel yang peka dengan karsinogen. Kondisi ini menyebabkan sistem kekebalan tubuh berusaha merusak sebelum sel

berlipat ganda dan berkembang menjadi kanker. Sistem kekebalan tubuh yang tidak berfungsi normal menjadikan tubuh rentan terhadap kanker (Sunaryati, 2011).

2.1.3 Faktor Penyebab Terjadinya Kanker

Penyebab kanker berupa gabungan dari sekumpulan faktor genetik dan lingkungan (Akmal, dkk., 2010). Harmanto dalam Sunaryati (2011) menyebutkan bahwa, faktor penyebab tumbuhnya kanker bersifat internal dan eksternal. Faktor internal diantaranya yaitu faktor keturunan, baik dari pihak orang tua secara langsung maupun nenek moyang, daya tahan tubuh yang buruk. Faktor eksternal seperti pola hidup tidak sehat di antaranya mengonsumsi makanan dengan bahan karsinogen, makanan berlemak, minuman beralkohol, kebiasaan merokok, diet salah dalam waktu lama; sinar ultraviolet dan radioaktif; infeksi menahun/perangsangan/iritasi; pencemaran lingkungan atau polusi udara; obat yang mempengaruhi hormon; berganti-ganti pasangan (Sunaryati 2011).

2.2 Kanker Serviks

Kanker serviks adalah tumbuhnya sel-sel abnormal pada jaringan leher rahim (serviks). Data Kemenkes Republik Indonesia menunjukkan bahwa pada tahun 2013 terdapat 98.682 penderita kanker serviks di Indonesia (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2015). Terjadinya peningkatan kematian akibat kanker serviks diduga disebabkan keterlambatan dalam penanganan. Purwoto dan Nurrana mengatakan bahwa lebih dari 70 persen penderita kanker serviks yang datang berobat ke rumah sakit sudah pada stadium lanjut, yaitu stadium II dan III (Purwoto, 2000).

Terjadinya kanker serviks sering dikaitkan dengan Human Papilloma Virus (HPV). Menurut Fitzgerald, lebih dari 99% kanker serviks mengandung HPV. Infeksi dalam waktu yang lama dari jenis tertentu HPV dapat menyebabkan kanker serviks. Aziz mengatakan bahwa infeksi HPV sering terdapat pada perempuan yang telah aktif secara seksual (Fitzgerald, 2014; Aziz, 2000).

Ada beberapa faktor yang dapat menyebabkan seseorang yang terinfeksi HPV terkena kanker serviks, yaitu: riwayat kehamilan; perilaku seksual;

penggunaan kontrasepsi; merokok; nutrisi; dan genetik. Winawer dan Shike mengatakan bahwa perempuan yang hamil sebelum berusia 18 tahun dan mengalami banyak kehamilan berisiko terkena kanker serviks. Terkait dengan perilaku seksual, Fitzgerald, menjelaskan bahwa perempuan yang melakukan hubungan seksual di usia dini dan yang mempunyai banyak pasangan seksual berisiko terkena kanker serviks. Selain riwayat kehamilan dan perilaku seksual, faktor penggunaan kontrasepsi; merokok; nutrisi; dan genetik juga merupakan faktor yang dikaitkan dengan risiko terkena kanker serviks. Penggunaan kontrasepsi oral lebih dari empat tahun, menurut Aziz dapat meningkatkan risiko. Bahan-bahan yang terdapat pada tembakau dapat menyebabkan kanker serviks. Terkait nutrisi, beberapa penelitian ditemukan ternyata kekurangan asam folat, vitamin C, vitamin E dan beta carotin dihubungkan dengan peningkatan risiko kanker serviks (Fitzgerald, 2014; Aziz, 2000).

Selain faktor-faktor di atas, faktor gen juga turut memengaruhi terjadinya kanker. Gen merupakan informasi genetika yang diturunkan dari satu generasi ke generasi berikutnya. Artinya, perempuan yang memiliki riwayat keluarga dengan kanker lebih berisiko terkena kanker termasuk kanker serviks dibanding dengan perempuan yang tidak memiliki riwayat keluarga dengan kanker (Rasjidi, 2013).

Meskipun ganas dan dapat menyebabkan kematian, kanker serviks dapat dicegah. Pencegahan dapat dilakukan dengan berbagai cara seperti mengontrol perilaku seksual diri sendiri dan pasangan; memerhatikan kontrasepsi yang digunakan; tidak merokok; serta mengonsumsi makanan yang bergizi. Karena penyakit ini sangat dikaitkan dengan HPV, maka infeksi virus ini dapat dicegah dengan melakukan vaksinasi (Kivistik, 2011).

2.3 Radikal Bebas

Radikal bebas (Bahasa Latin: *radicalis*). Radikal bebas adalah suatu molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan (tidak stabil). Keberadaan radikal bebas tidak selalu merugikan, bahkan radikal bebas juga diperlukan antar lain untuk proses pematangan sel dalam tubuh. Selain itu, leukosit mengeluarkan radikal bebas untuk memusnahkan mikroorganisme patogen sebagai salah satu mekanisme pertahanan tubuh melawan infeksi. Terbentuknya radikal bebas melalui reaksi enzimatik melibatkan rantai respiratori dalam proses fagositosis, sintesis prostaglandin dan sistem sitokrom P450 (enzim yang berfungsi sebagai katalis oksidator pada lintasan metabolisme steroid, asam lemak, obat, racun dan karsinogen. Oleh karena radikal bebas yang tidak memiliki pasangan elektron, mempunyai kecenderungan untuk memperoleh pasangannya dengan cara menyerang dan berikatan dengan pasangannya, maka akan terjadi kerusakan pada senyawa yang diserangnya, maka sel sel makromolekul seperti protein, karbohidrat, lemak dan asam nukleat akan hancur. Kerusakan yang terjadi yaitu seperti gangguan fungsi dan struktur sel. Selain itu, dampak lain yang diakibatkan oleh radikal bebas ketika mencari pasangannya adalah terbentuknya radikal bebas baru yang berasal dari molekul yang elektronnya terambil. Radikal bebas menjadi stabil ketika berikatan dengan radikal bebas lain. Hal ini menyebabkan seseorang terkena penyakit di bagian mulut khususnya yang paling sering terjadi adalah penyakit periodontal (Winarsi, 2011).

Terdapat banyak jenis radikal bebas, tetapi yang paling banyak dalam sistem biologis tubuh adalah radikal yang berasal dari oksigen dan dikenal sebagai *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS terbagi menjadi oksigen radikal dan non-radikal. Bentuk dari oksigen radikal antara lain radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$), radikal peroksil ($\bullet\text{OOH}$), dan ion superoksida ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Sedangkan bentuk dari oksigen non-radikal adalah singlet oksigen ($^1\text{O}_2$), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan ion hipoklorit (ClO^-) (Birben, 2012).

Menurut Pendyala, sumber ROS terdiri atas dua bagian yaitu sumber endogen dan sumber eksogen. Sumber endogen berasal dari proses metabolik normal dalam tubuh manusia, antara lain: (1) Proses oksidasi makanan dalam

menghasilkan tenaga di mitokondria yang dikenal sebagai transport elektron akan memproduksi anion superoksida ($\bullet\text{O}_2^-$). (2) Leukosit secara khusus memproduksi oksigen radikal yang digunakan untuk menghancurkan patogen yang menyerang. (3) Sejumlah obat yang memiliki efek oksidasi pada sel dan menyebabkan produksi ROS. (4) Proses oksidasi *xanthine* (senyawa yang ditemukan di sebagian besar jaringan tubuh dan bertindak sebagai enzim yang terlibat dalam mengkatalis perubahan dari *hypoxanthine* menjadi *xanthine* yang menghasilkan hidrogen peroksida) (Yuslianti, 2018).

Senyawa radikal bebas timbul akibat berbagai proses kimia kompleks dalam tubuh, berupa hasil sampingan dari proses oksidasi atau pembakaran sel yang berlangsung pada waktu bernafas, metabolisme sel, olahraga yang berlebihan, peradangan atau trauma, tubuh terpapar polusi lingkungan seperti polusi, asap kendaraan, asap rokok, bahan pencemar dan radiasi matahari (Winarsi, 2011).

2.4 Mekanisme Kerusakan Sel oleh Radikal Bebas

Tubuh manusia mempunyai beberapa mekanisme untuk bertahan terhadap radikal bebas. Pertahanan yang bervariasi saling melengkapi satu dengan yang lain karena bekerja pada oksidan yang berbeda atau dalam bagian seluler yang berbeda. Suatu garis pertahanan yang penting adalah sistem enzim yang bersifat protektif atas radikal bebas seperti superoksida dismutase R (SOD), katalase, glutathion synthetase, glucose-6-phosphate dehydrogenase dan glutathion peroxidase (Dawn, 2000).

Dengan demikian secara umum dapat disimpulkan tahapan reaksi jejas sel oleh radikal bebas adalah inisiasi (permulaan terbentuknya radikal bebas), propagasi (serangkaian reaksi yang berkembang atas timbulnya radikal bebas, transfer atau penambahan atom) dan terminasi (inaktivasi radikal bebas oleh antioksidan endogen atau eksogen maupun enzim superoksida dismutase) (Dawn, 2000).

Reactive Oxygen Species (ROS) dapat menyebabkan kerusakan sel dengan berbagai mekanisme, yaitu melalui proses peroksidasi lipid yang terjadi apabila

radikal bebas seperti radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) berdekatan dengan membran fosfolipid sehingga akan menyerang rantai lipid tersebut dan mengambil elektron dari lipid dan akan membentuk radikal peroksil yang mengakibatkan kerusakan sel. Selain itu, ROS juga merusak asam Deoksiribonukleat (DNA) dengan memutus rantai basis hidroksil. ROS merusak protein *proteoglycan* dan *gingival hyaluronic acid* yang diketahui dapat membantu proses penyembuhan gingivitis serta merangsang proses inflamasi dengan mengeluarkan proinflamatori sitokin dari monosit sehingga akan menstimulasi inflamasi secara terus menerus yang menyebabkan inflamasi periodontal (Winarsi, 2011).

2.5 Tanaman Kakao

Pohon kakao merupakan pohon dengan tinggi 12-25 kaki, serta bercabang di bagian puncaknya. Batangnya tegak lurus dengan panjang 1,5-2 meter. Kayunya terang dan putih, kulit kayunya tipis, halus, dan kecokelatan. Benihnya banyak, berukuran 2,5 cm, bagian luar berwarna merah kecokelatan, bagian dalam coklat gelap dan dibungkus dengan lapisan keputih-putihan, manis serta berminyak (Ide, 2008).

Pohon kakao memiliki daun lebar dan mengkilat yang berwarna merah ketika muda dan hijau saat matang. Kuncupnya berjumlah ribuan berupa bunga kecil berwarna merah muda (pink) atau putih yang tumbuh dalam kelompok dan mekar bersamaan di batang dan cabang tua pohon kakao. Tetapi hanya 3-10% yang akan matang menjadi buah (Ide, 2008).



Gambar 2.1 Tanaman Kakao tipe Lindak (Sankar, 2007)

Klasifikasi tanaman kakao menurut Tjitrosoepomo (1988) dalam Bajeng, 2012 dapat diuraikan sebagai berikut:

Divisi : Spermatophyta
Sub divisi : Angiospermae
Class : Dicotyledoneae
Sub class : Dialypetalae
Ordo : Malvales
Family : Sterculiaceae
Genus : Theobroma
Spesies : Theobroma cacao L.

2.2.5 Kandungan Kimia

Kakao mengandung sekitar 600 komponen kimia dan sekitar 230 dianggap bermanfaat bagi kesehatan. Kebanyakan dari komponen ini berupa polifenol (atau flavonoid) yang mampu bertindak sebagai antioksidan. Kulit buah kakao mengandung jumlah flavonoid alami yang lebih kaya dibanding brokoli atau teh hijau (Ide, 2008).

Jumlah kandungan senyawa polifenol pada kakao akan bervariasi tergantung pada tingkat kematangan buah, varietas/kultivar dan lingkungan tempat tumbuh tanaman kakao tersebut. Senyawa polifenol di alam diklasifikasikan menjadi (1) fenol sederhana; (2) benzoquinon; (3) asam fenolik; (4) acetophenon; (5) asam fenilasetat; (6) asam hidroksi-sinamat; (7) fenilpropen; (8) coumarin; (9) chromone; (10) naphtoquinon; (11) xanthon; (12) stilbene; (13) anthraquinon; (14) flavonoid; (15) lignan; dan (16) lignin (Wollgast dan Anklam, 2000). Senyawa polifenol pada kakao yang lebih banyak didominasi oleh gugus flavonoid yang terdiri dari grup proantosianidin sebanyak $\pm 58\%$, flavan-3-ol/flavanol sebanyak $\pm 37\%$, anthocyanidin sebanyak $\pm 4\%$ dan flavonol glycoside sebanyak $\pm 1\%$ (Hii et al., 2009; Chin et al., 2013).

Kulit buah kakao diketahui mengandung senyawa aktif alkaloid yaitu theobromin (3,7-dimethylxantine). Salah satu efek dari theobromin adalah sebagai penenang, sehingga zat tersebut menjadi faktor pembatas pada pemakaian limbah kulit buah kakao sebagai pakan ternak (Helmestein, 2010). Senyawa alkaloid merupakan senyawa organik yang memiliki atom nitrogen dan bersifat basa (alkali) dan dapat menyebabkan koagulasi protein sel bakteri, sehingga menyebabkan penghambatan pertumbuhan bakteri. Koagulasi protein akan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri yang menyebabkan lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh, sehingga menyebabkan kematian sel bakteri (Mulyatni, 2012).

Kulit buah kakao mengandung senyawa aktif flavonoid atau tanin terkondensasi atau terpolimerisasi (Mulyatni, 2012). Berdasarkan strukturnya, tanin dibedakan menjadi dua kelas yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terhidrolisis biasanya ditemukan dalam konsentrasi yang lebih rendah pada tanaman dibandingkan dengan tanin terkondensasi.

Tanin terkondensasi terdiri dari beberapa unit flavonoid (flavan-3-ol) yang dihubungkan oleh ikatan karbon (Lisan, 2015). Tanin terkondensasi biasanya tidak dapat dihidrolisis, tetapi dapat terkondensasi menghasilkan asam klorida. Tanin jenis ini kebanyakan terdiri dari polimer flavonoid yang merupakan senyawa fenol. Nama lain dari tanin ini adalah proanthocyanidin, yang merupakan polimer dari flavonoid yang dihubungkan melalui ikatan C-8 dengan C-4 (Lisan, 2015). Tanin terhidrolisis biasanya berikatan dengan karbohidrat dengan membentuk jembatan oksigen, maka dari itu tanin ini dapat dihidrolisis dengan menggunakan asam sulfat atau asam klorida. Salah satu contoh jenis tanin ini adalah gallotanin, dua asam galat akan membentuk tanin terhidrolisis yang disebut ellagitanin (Lisan, 2015).

Senyawa fenolik akan berinteraksi dengan protein membran sel bakteri melalui proses adsorpsi dengan cara terikat pada bagian hidrofilik membran sel. Senyawa fenolik selanjutnya akan masuk ke dalam membran sel dan menyebabkan presipitasi protein sel. Hal tersebut mengganggu permeabilitas membran sel, sehingga membran sel dapat mengalami lisis (Mulyatni, 2012). Menurut Hii et al., 2009 Ada tiga komponen utama polifenol pada kakao, yakni katekin (37%), antosianin (4%), dan proantosianidin (58%).

Katekin adalah senyawa polifenol alami, merupakan metabolit sekunder dan termasuk dalam penyusun golongan tanin. Katekin biasanya disebut juga asam catechoat dengan rumus kimia $C_{15}H_{14}O_6$ tidak berwarna dan dalam keadaan murni sedikit tidak larut dalam air dingin tetapi sangat larut dalam air panas, larut dalam alkohol dan etil asetat, hampir tidak larut dalam kloroform, benzene dan eter. Katekin merupakan senyawa fenolik yang kompleks (polifenol) yang berkhasiat sebagai antibakteri, hemostasis, astringen dan antioksidan (Lestari et al, 2009). Menurut Naba'atin I dkk (2015), katekin memiliki efek antioksidan, antimutagenik, antidiabetes, antiinflamasi, antibakteri, antivirus, dan antikanker.

Antosianin termasuk golongan senyawa flavonoid dan merupakan kelompok terbesar pigmen alami pada tumbuhan yang larut dalam air dan bertanggung jawab untuk memberikan warna pada bunga, buah, dan sayuran. Pigmen ini bertanggung jawab terhadap timbulnya warna oranye, jingga, merah, ungu dan biru pada beberapa daun bunga dan buah (Lestario, 2011). Antosianin dapat juga bermanfaat bagi kesehatan sebagai sumber antioksidan. Hal ini disebabkan senyawa polifenolik ini merupakan glikosida turunan polihidroksi dan polimetoksi dari 2-Phenilbenzopiriliumat atau garam flavilium) (Maulid dan Laily, 2015).

Proantosianidin merupakan polimerisasi dari flavan-3-ol. Senyawa aktif ini memiliki keuntungan bagi kesehatan manusia seperti imunomodulator, antikanker, antioksidan dan antiinflamasi (Hee et al, 2008)

Kulit buah kakao berpeluang untuk dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan karena mengandung senyawa polifenol dengan total fenolik sebesar 5,78 % (Lecumberri dkk., 2007). Polifenol pada kulit biji kakao antara lain prosianidin, epikatekin, p-hidroksibenzoic acid, antosianin, proantosianidin dan clovamid. Senyawa polifenol kulit buah kakao terdiri dari proantosianidin 58 %, katekin 37% dan antosianidin 4 %.(Arlorio dkk., 2005; Zou dkk., 2012; Gu dkk., 2006).Antosianin kulit buah kakao memiliki aktifitas antioksidan yang kuat (Wiyono, 2002 dalam Nuciferani, 2004). Antosianin tergolong senyawa flavonoid dengan rangka senyawa C6-C3-C6. Sifat antioksidan tersebut memungkinkan antosianin untuk ditambahkan pada produk olahan yang mudah mengalami oksidasi untuk menahan laju oksidasinya.

Sebagai antioksidan, polifenol maupun flavonoid dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif dan berbagai penyakit degeneratif yang berhubungan dengan stress oksidatif. Antioksidan mampu menstabilkan atau menonaktifkan radikal bebas sebelum menyerang sel – sel. Antioksidan sangat penting untuk menjaga kesehatan sel dan sistemik. Mekanisme efek antioksidan dapat meliputi: (1) menekan pembentukan oksigen reaktif baik oleh penghambatan enzim atau

elemen yang terlibat dalam produksi radikal bebas; (2) membersihkan spesies oksigen reaktif; (3) meregulasi atau melindungi pertahanan antioksidan (Winarsih, 2010).

Ekstrak kulit buah kakao dengan penyari aseton-air (7:3) memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi bila dibandingkan dengan penyari lainnya dikarenakan ekstrak kulit buah kakao mengandung senyawa antioksidan berupa flavonoid terkondensasi (tanin terkondensasi). Ekstraksi yang paling baik yaitu dengan menggunakan aseton-air (Mita, 2015). Berdasarkan penelitian Rachmawaty melalui analisis fitokimia menggunakan etanol dan metanol diketahui kulit buah kakao mengandung senyawa alkaloid, saponin, tanin, triterpenoid, flavonoid dan fenol. Sementara pada ekstrak aseton-air memiliki kandungan yang serupa hanya saja tidak memiliki senyawa triterpenoid. Penelitian milik Hidayati menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah kakao yang dilarutkan dalam aseton mengandung senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid dan saponin (Rachmawaty, 2017; Candra 2013)

2.6 Antioksidan

Antioksidan merupakan inhibitor yang bekerja menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tak reaktif yang relatif stabil, Antioksidan adalah senyawa yang dapat melindungi sistem biologis di dalam tubuh. Aktivitas antioksidan di dalam tubuh merupakan suatu kesatuan sistem yang saling terkait dan saling mempengaruhi, contohnya Superoxide dismutase, katalase dan glutathion peroxylase. Kekurangan salah satu komponen ini dapat menyebabkan terjadinya penurunan status antioksidan secara menyeluruh dan mengakibatkan perlindungan terhadap serangan ROS menjadi lemah (Sofia, 2006).

Sebagai antioksidan, flavonoid dapat melindungi sel terhadap kerusakan oksidatif dan membatasi resiko berbagai macam penyakit degeneratif yang berhubungan dengan stress oksidatif. Selain itu, mekanisme antioksidan dapat meliputi: (1) menekan pembentukan spesies oksigen reaktif baik oleh penghambatan enzim atau elemen yang terlibat dalam produksi radikal bebas; (2)

sebagai penangkap (*scavenger*) spesies oksigen reaktif; dan (3) melindungi pertahanan antioksidan. Flavonoid mempunyai beberapa efek biologis lainnya seperti penghambatan atau pengurangan enzim yang berbeda dan interaksi dengan jalur transduksi sinyal dan reseptor sel. Flavonoid mampu menurunkan mediator proinflamasi (TNF- α , IL, PGE2) dan kegiatan enzim proinflamasi (COX 2, iNOS) (Grassi dkk., 2010).

2.7 Uji Antioksidan dengan Metode DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazil).

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan secara *in vitro* dengan metode DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazil). Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna violet gelap. Penangkap radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Sunarni, dkk., 2007).

Metode DPPH merupakan metode *in vitro* yang sering dipilih sebagai metode pengujian aktivitas antioksidan karena sederhana, mudah, cepat, peka dan memerlukan sedikit sampel. Metode ini hanya membutuhkan senyawa DPPH yang bersifat stabil dan senyawa perbandingan seperti vitamin A, vitamin C dan vitamin E. Selain itu, metode ini tidak memerlukan substrat karena radikal bebas sudah tersedia secara langsung untuk mengganti substrat.

Hasil dapat diamati dengan perubahan larutan dari ungu menjadi kuning. Perubahan warna menunjukkan bahwa DPPH telah tereduksi oleh proses donasi hydrogen atau electron dari senyawa antioksidan sehingga warnanya berubah dari violet ke kuning dan DPPH tidak memberikan serapan pada panjang gelombang 517 nm.

Metode ini menggunakan IC50 sebagai parameter untuk menentukan konsentrasi senyawa antioksidan yang mampu menghambat 50% oksidasi. Semakin kecil nilai IC50, maka semakin tinggi aktivitas antioksidan.

2.8 Kultur Sel HeLa

Kultur sel HeLa atau *HeLa cell line* merupakan *continuous cell line* yang diturunkan dari sel epitel kanker serviks (cervix) seorang wanita penderita kanker serviks bernama Henrietta Lacks yang meninggal akibat kanker pada tahun 1951. Kultur sel ini memiliki sifat semi melekat dan digunakan sebagai model sel kanker dan untuk mempelajari sinyal transduksi seluler.

Sel HeLa ini cukup aman dan merupakan sel manusia yang umum digunakan untuk kepentingan kultur sel (LabWork, 2000). HeLa bersifat imortal yang tidak dapat mati karena tua dan dapat membelah secara tidak terbatas selama memenuhi kondisi dasar bagi sel untuk tetap hidup masih ada. Strain-strain baru dari sel HeLa telah dikembangkan dalam berbagai macam kultur sel, tapi semua sel HeLa berasal dari keturunan yang sama. Sel HeLa telah mengalami transformasi akibat infeksi human papillomavirus 18 (HPV 18) dan berbeda dengan sel serviks yang normal (Anonim, 2006).

Sel HeLa dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan adalah media RPMI 1640-serum. Di dalamnya terkandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan, yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon-hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel. Albumin berfungsi sebagai protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral berfungsi sebagai kofaktor enzim (Freshney, 2010).

Sel HeLa adalah sel kanker serviks akibat infeksi Human Papillomavirus (HPV 18) sehingga mempunyai sifat yang berbeda dengan sel serviks normal. Sel kanker serviks yang diinfeksi HPV diketahui mengekspresikan 2 onkogen, yaitu E6 dan E7. Protein E6 dan E7 terbukti dapat menyebabkan sifat imortal pada kultur primer keratinosit manusia, namun sel yang imortal ini tidak bersifat tumorigenik hingga suatu proses genetik terjadi. Jadi, viral onkogen tersebut tidak secara langsung menginduksi pembentukan tumor, tetapi menginduksi serangkaian proses yang pada akhirnya dapat menyebabkan sifat kanker (Goodwin dan DiMaio, 2000).

Protein E6 dan E7 dari HPV memodulasi protein seluler yang mengatur daur sel. Protein E6 berikatan dengan tumor suppressor protein p53 dan mempercepat degradasi p53 yang diperantarai ubiquitin. Protein E6 juga menstimulasi aktivitas enzim telomerase. Sedangkan protein E7 dapat mengikat bentuk aktif terhipofosforilasi dari p105Rb dan anggota lain dari famili Rb. Ikatan ini menyebabkan destabilisasi Rb dan pecahnya kompleks Rb/E2F yang berperan menekan transkripsi gen yang diperlukan untuk cell cycle progression (De Filipis, et al., 2003).

Sebagian besar sel kanker serviks, termasuk sel HeLa, mempunyai gen p53 dan p105Rb dalam bentuk *wild type*. Jadi, gen pengatur pertumbuhan yang aktif dalam sel normal ini juga terdapat dalam sel kanker serviks. Namun, aktivitasnya dihambat oleh ekspresi protein E6 dan E7 dari HPV (Goodwin dan DiMaio, 2000).

2.9 Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas adalah uji toksisitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Penggunaan uji sitotoksitas pada kultur sel merupakan salah satu cara penetapan *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat sitotoksik. Sistem ini merupakan uji kuantitatif dengan cara menetapkan kematian sel (Freshney, 1987).

Parameter yang digunakan untuk uji sitotoksik yaitu nilai IC50. Nilai IC50 menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai IC50 dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Nilai IC50 menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan penghambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel (Meiyanto dkk, 2003).

Semakin besar harga IC50 maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Akhir dari uji sitotoksitas pada organ target memberikan informasi langsung

tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Djajanegara dan Wahyudi, 2009).

Dua metode umum yang digunakan untuk uji toksisitas adalah metode perhitungan (*direct counting*) dengan menggunakan biru tripan (*trypan blue*) dan metode MTT *assay*. Metode dalam uji sitotoksitas yang umum digunakan adalah uji kolorimetrik menggunakan MTT *assay* karena sangat sensitif untuk mengevaluasi viabilitas sel. Kelebihan MTT *assay* adalah valid, dapat dibuat semiotomatis, tidak memerlukan transfer sel, dan tidak menggunakan radioisotop (Carmichael dkk. dan Van dkk. dalam Rizki, 2016). Metode uji kolorimetrik dengan menggunakan MTT *assay* [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide] merupakan metode uji sitotoksitas berdasarkan aktivitas enzim reduktase mitokondria sel hidup yang mereduksi senyawa *methylthiazol tetrazolium* (MTT), sehingga memberikan tampilan berwarna ungu (Craig dan Powers, 2012).

Dasar uji enzimatik MTT adalah dengan mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel. Uji ini banyak digunakan untuk mengukur proliferasi seluler secara kuantitatif atau untuk mengukur jumlah sel yang hidup. MTT adalah molekul larut berwarna kuning yang dapat digunakan untuk menilai aktifitas ensimatik seluler. Uji ini menghitung aktifitas dehidrogenase selular, mengubah bahan kimia yang disebut MTT, sejumlah bahan reduksi selular menjadi senyawa biru, formazan yang tidak larut. Reaksi warna biru keunguan digunakan sebagai ukuran dari jumlah sel hidup.

Ketika jumlah formazan ungu diproduksi oleh sel yang mendapatkan perlakuan dibandingkan dengan sel kontrol yang tidak mendapatkan perlakuan, efektivitas agen yang menyebabkan formazan ungu dapat dilarutkan dalam *stopper reagent* untuk menghentikan reaksi MTT yaitu dengan sodium DMSO, atau deodesil suflat, atau isopropanolol yang diasamkan (Dewi, 2007).

Perubahan warna yang terjadi dapat dihitung dengan menggunakan *assay colorimetric* sederhana, dibaca dengan menggunakan spektrofometer (*elisa miroplate reader*). Hasil pembacaan *elisa miroplate reader* pada panjang gelombang 540 – 570 nm, berupa nilai absorbansi (OD) sehingga prosentase

densitas optik yang semakin tinggi menunjukkan sel metabolik yang aktif sehingga dapat mereduksi MTT semakin baik pula (Rachadini, 2007). Akhir dari uji sitoksisitas dapat memberikan informasi persentase sel yang mampu bertahan hidup, jumlah persentase sel yang hidup dengan nilai absorbansi yang dapat dihitung dengan rumus

$$\text{persentase sel hidup} = \frac{\text{perlakuan} + \text{kontrol media}}{\text{kontrol sel} + \text{kontrol media}} \times 100\%$$

Keterangan:

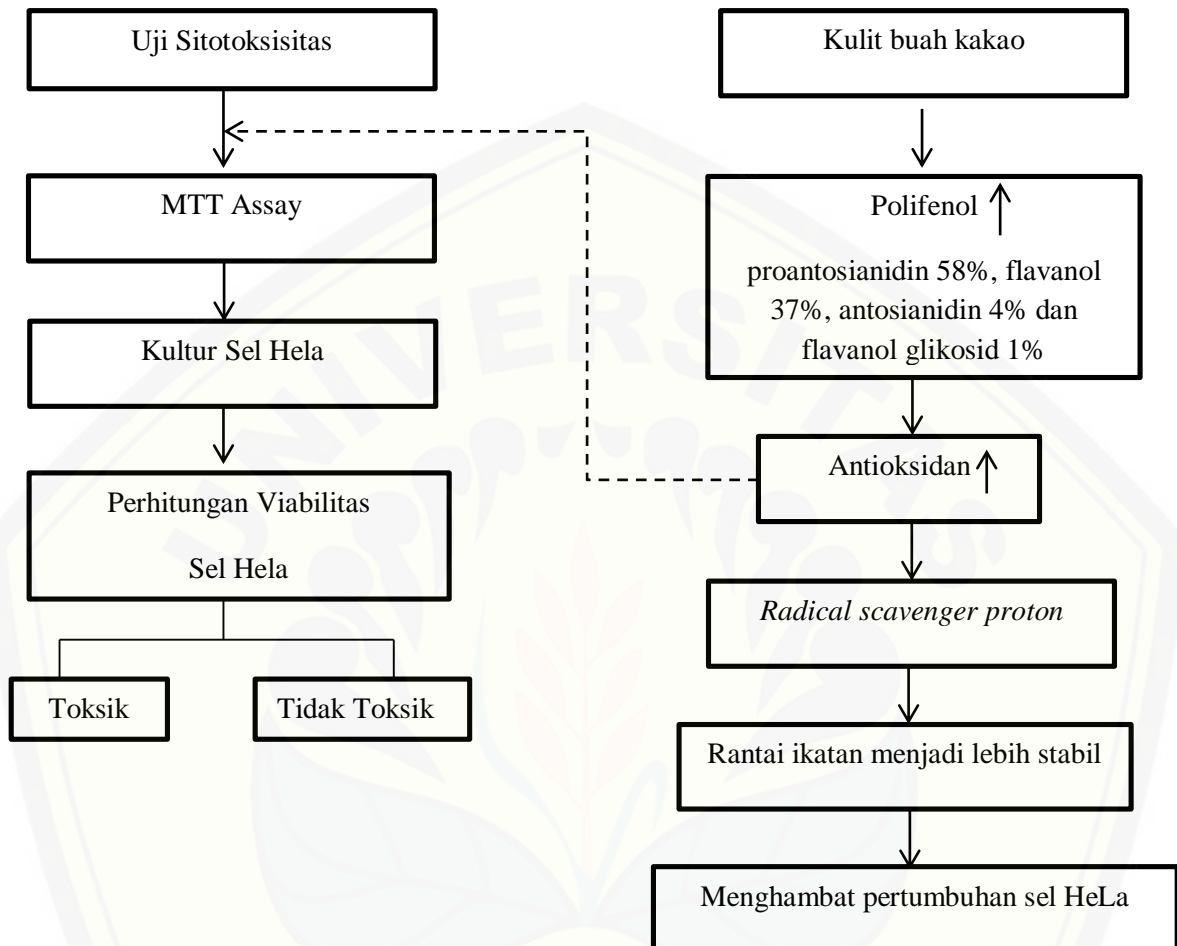
Dengan persentase sel hidup= prosentase jumlah sel setelah perlakuan,
 perlakuan = nilai densitas optik formazan pada setiap sampel setelah perlakuan,
 kontrol media = nilai densitas optik formazan pada kontrol media,
 kontrol sel = nilai densitas optik formazan sel kontrol.

% Kematian = 100% - % viabilitas

Balantyne (1999) membuat kategori sitotoksik untuk bahan alam berdasarkan jumlah IC₅₀, seperti tercantum pada tabel 1.

IC ₅₀	Kategori
10 µg/ml(10 ⁶ Sel/ ml) < IC ₅₀	Sangat toksik
10 µg/ml < IC ₅₀ < 100 µg/ml	Toksik
100 µg/ml < IC ₅₀ < 1000 µg/ml	Moderat
IC ₅₀ > 1000 µg/ml	Tidak toksik

2.9 Kerangka Konseptual



Gambar 2.1 Kerangka Konsep Penelitian

2.10 Penjelasan Kerangka Konsep

Kulit buah kakao mengandung polifenol yang tinggi, salah satu komponen polifenolnya yaitu flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang dapat menghambat reaksi oksidasi. Hal ini berkaitan dengan kemampuan flavonoid sebagai antioksidan karena mampu mentransfer elektron kepada senyawa radikal bebas (*radical scavenger proton*) yang kemudian dapat menghambat pertumbuhan sel HeLa .

Uji sitotoksik memiliki peranan sebagai bagian dari evaluasi bahan agar dapat diterima oleh jaringan tubuh dan mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Penggunaan uji sitotoksik pada kultur sel merupakan salah satu cara penetapan *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat sitotoksik di kemudian hari. Sistem ini merupakan uji kuantitatif dengan cara menetapkan kematian ataupun kehidupan sel.

Oleh karena itu, perlu dilakukan uji sitoksisitas kulit buah kakao dengan menggunakan metode *MTT assay* untuk mengetahui aktivitas neoplastik sehingga dapat diketahui apakah kulit buah kakao memiliki sifat toksik atau tidak terhadap sel HeLa .

2.11 Hipotesis

Ekstrak aseton-air kulit buah kakao bersifat toksik terhadap kultur sel HeLa pada konsentrasi yang diteliti.

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *the post test only control group design*.

3.2 Tempat Penelitian

Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Kakao di Laboratorium Biofarmasi Farmasi UNEJ

Pembuatan stok indukan dan pengenceran di Laboratorium Kimia Analisis Farmasi UNEJ

Kultur sel HeLa dan uji MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay dilakukan di Laboratorium Kedokteran Molekuler CDAST-UNEJ (Center for Development of Advance Science and Technology)

3.3 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan bulan April – Juni 2020.

3.4 Variabel Penelitian

a. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) pada konsentrasi 2400 µg/ml, 1200 µg/ml, 600 µg/ml, 300 µg/ml, 150 µg/ml dan 75 µg/ml

b. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah persentase viabilitas sel HeLa (IC₅₀)

c. Variabel terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kultur sel HeLa (media kultur, suhu inkubasi, lama inkubasi).

3.5 Definisi Operasional Penelitian

- a. Kulit buah Kakao yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dilakukan uji identifikasi untuk mengetahui bahwa kulit buah kakao yang digunakan berasal dari buah kakao dengan spesies *Theobroma cacao L* didapatkan dari PT Perkebunan Nusantara XII Jember. Uji identifikasi ini dilakukan di Laboratorium Tanaman Politeknik Jember. Kulit buah kakao yang digunakan adalah semua bagian kulit segar dan matang dengan jenis *Theobroma cacao L*. tipe kakao lindak (Forastero). Kriteria kulit buah kakao yang dipakai adalah spesies *Theobroma cacao L*. dengan tipe kakao lindak (forastero). Bagian yang digunakan dari kulit buah kakao yaitu semua bagian kulit yang segar dan masak. Ekstrak kulit buah kakao adalah ekstrak yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari kulit buah kakao menggunakan pelarut aseton dan aquadest dengan perbandingan 7:3 dengan Elmasonik (Ultrasonik)
- b. Kultur sel HeLa merupakan sel yang diturunkan dari sel epitel kanker serviks (cervix) dari wanita penderita kanker serviks dengan padatan sel 5×10^4 yang terdapat di Laboratorium Kedokteran Molekuler CDAST-UNEJ (Center for Development of Advance Science and Technology). Sel HeLa normal berbentuk lonjong dan melekat pada dasar sumuran.
- c. Uji sitotoksitas dilakukan menggunakan metode MTT *assay* dan kemudian diukur dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 560 nm. Hasil pengukuran didapatkan nilai absorbansi yang kemudian dikonversikan kedalam rumus viabilitas sel yang ditunjukkan dengan persentase viabilitas sel. Hasil perhitungan didasarkan pada nilai IC_{50} .

3.6 Sampel Penelitian

Pada penelitian ini sampel dibagi menjadi 8 kelompok dengan 3 kali replikasi yang terdiri dari:

1. Kelompok I (K1) adalah kelompok perlakuan yang berisi ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) 2400 µg/ml yang dipaparkan pada sel HeLa .
2. Kelompok II (K2) adalah kelompok perlakuan yang berisi ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) 1200 µg/ml yang dipaparkan pada sel HeLa .
3. Kelompok III (K3) adalah kelompok perlakuan yang berisi ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) 600 µg/ml yang dipaparkan pada sel HeLa
4. Kelompok IV (K4) adalah kelompok perlakuan yang berisi ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) 300 µg/ml yang dipaparkan pada sel HeLa
5. Kelompok V (K5) adalah kelompok perlakuan yang berisi ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) 150 µg/ml yang dipaparkan pada sel HeLa
6. Kelompok VI (K6) adalah kelompok perlakuan yang berisi ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) 75 µg/ml yang dipaparkan pada sel HeLa
7. Kelompok VII (K7) adalah kelompok kontrol yang berisi sel HeLa dan media RPMI.
8. Kelompok VIII (K8) adalah kelompok kontrol media yang berisi medium RPMI.



Gambar 1.1 Sampel penelitian (Sumber: Dokumen pribadi)

3.7 Alat dan bahan

3.7.1 Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- *Handscoon*
- Masker
- Tissue
- Timbangan Analitik (Adam PW254, Inggris)
- Spatula kaca
- *Conical tube*
- Tabung *eppendorf*
- *Hemacytometer*
- *Tally Counter handheld*
- Vortex shaker (Labinco 46 power mixer, Belanda)
- Mikroskop inverted (EVOS™ XL Core, ThermoFisher)
- Mikropipet
- Pippet tips 10-100 μ l
- Inkubator 37°C, CO₂ 5% (Forma Steri-cycle i160, ThermoFisher)
- Laminar Flow (1300 Series A2, ThermoFisher)
- Sentrifugator (TOMY MX-307, Amerika)

- 96-well plate (Eppendorf, Jerman)
- ELISA Reader (Corona SH-1000, Jepang)

3.7.2 Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Ekstrak kulit buah kakao,
- Kultur sel HeLa ,
- Media komplit sel HeLa (RPMI), 10% fetal bovine serum (FBS), Penicillin-Streptomycin 2%, Fungizone 0,5%),
- Trypan Blue Stain 0,4% (Gibco, UK REF: 15250-061)
- PBS 10% (*Phospat Buffer Saline*),
- 0,5 mL Tripsin EDTA 0,25%,
- DMSO (*DimetilSulfoxide*),
- MTT Cell Viability Assay Kit (CellQuanti CQMT-500, BioAssay system)

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Pembuatan ekstrak aseton-air kulit buah kakao

Metode ekstraksi yang digunakan adalah *Ultrasonic Bath*. Kulit buah kakao jenis *Forastero* sebanyak 5kg dibersihkan kemudian dipotong kotak-kotak, selanjutnya dikeringkan di dalam oven dengan suhu 50⁰C selama 2 hari. Simplisia kulit buah kakao diblender sehingga diperoleh serbuk halus. Sebanyak 400gr serbuk kulit buah kakao ditambahkan pelarut aseton:air 7:3 dalam beaker glass, kemudian diultrasonik selama 3x3 menit. Setiap 3 menit dilakukan pengadukan sebelum diultrasonik kembali. Hasil larutan disaring dengan menggunakan labu Buchner dan kertas saring Whatmann no. 41, filtrat ditampung, residu yang diadapatkan dimasukkan dalam beaker glass, ditambahkan aseton-air 7:3 dan diultrasonikkembali selama 3x3 menit, filtrat digabung dengan filtrat pertama. Pelarut aseton-air dalam filtrat diupkan menggunakan *rotary vacum evaporator* sampai diperoleh ekstrak dengan berat konstan. Kemudian ekstak di oven hingga mendapatkan ekstrak pekat kulit buah kakao (Rizki,2016; Suwarni,2016)

3.8.2 Pengenceran Ekstrak Kulit Buah Kakao

Kulit buah kakao sebanyak 100mg dalam 10 ml DMSO dengan konsentrasi 10% sehingga didapatkan konsentrasi stok indukan sebesar 10.000ppm atau 10.000 $\mu\text{g/ml}$. Kemudian untuk membuat konsentrasi 2400 $\mu\text{g/ml}$ maka diambil 240 μl ekstrak kulit buah kakao dan ditambahkan media RPMI sebanyak 760ml. Lalu dilakukan serial dilution untuk pembuatan konsentrasi 1200 $\mu\text{g/ml}$, 600 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, dan 75 $\mu\text{g/ml}$.

3.9 Prosedur Kultur Sel HeLa

Kultur sel HeLa diambil dari stok kultur sel HeLa yang tersedia di Laboratorium Kedokteran Molekuler CDAST-UNEJ (Center for Development of Advance Science and Technology).

3.9.1 Panen Sel dan Perhitungan Sel (CCRC, 2017)

Sel diamati dibawah mikroskop hingga 80% confluent maka dilakukan prosedur panen sel dan siap untuk dilakukan *treatment*. Media kultur RPMI 1640 dibuang dengan menggunakan mikropipet, lalu sel dicuci dengan PBS 10% sebanyak 2 kali dan digoyang-goyangkan untuk menghilangkan FBS yang tersisa. Kemudian menambahkan tripsin-EDTA 0,25% sebanyak 0,5 ml secara merata untuk melepaskan sel dari permukaan *plate*. Sel diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C selama 3 menit. Sel yang telah diinkubasi dilakukan pengamatan mikroskopis untuk memastikan semua sel sudah terlepas. Lalu menambahkan medium RPMI sebanyak \pm 3 ml untuk menginaktifkan tripsin. Sel diresuspensi dengan pipet sampai semua sel terlepas satu-satu. Sel ditransfer kedalam *conical tube* kemudian RPMI ditambahkan sebanyak 2 ml. sel diresuspensi kembali. Sentrifuge dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit, kemudian buang supernatannya dan peletnya ditambahkan media kultur komplet di homogenkan, menghitung sel yang di dapat. Panenan sel diambil 10 μl dan dipipetkan ke *hemacytometer*. Sel dihitung dibawah mikroskop *inverted* dengan *counter*. Jumlah sel yang dihitung/ml didapatkan melalui rumus:

Jumlah sel yang dihitung/ml = Σ sel pada kamar $\frac{A+B+C+D}{4} \times 10^4$. Sejumlah sel ditransfer sebanyak yang diperlukan ke dalam *conical tube* dan media lengkap ditambahkan sesuai dengan konsentrasi sel yang dikehendaki.

3.9.2 Pendistribusian Sel

Sel dengan densitas 5×10^3 ditransfer ke dalam 96 *well plate*, dengan 18 *well* diberi perlakuan dan 3 *well* berupa kontrol sel. Tiga *well* kosong disisakan sebagai kontrol media. Kemudian keadaan sel diamati dengan mikroskop inverted untuk melihat distribusi sel. Sel diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam agar sel menempel kembali setelah dipanen.

3.9.3 Tahap Perlakuan

Setelah 24 jam *plate* yang telah berisi sel diambil dari inkubator CO₂ dan diamati di bawah mikroskop inverted sebelum perlakuan. medium kultur dibuang dan menambahkan ekstrak kulit buah kakao yang telah dilarutkan dalam media kultur komplit kedalam *microplate* sebanyak 100 μ l, larutan di setiap tabung diberikan pada sel pada *well* secara triplicate. Memberikan perlakuan dengan menambahkan ekstrak aseton-air kulit buah kakao konsentrasi 2400 μ g/ml pada *well* C10-C12. Memberikan perlakuan dengan menambahkan ekstrak aseton-air kulit buah kakao konsentrasi 1200 μ g/ml pada *well* D10-C12. Memberikan perlakuan dengan menambahkan ekstrak aseton-air kulit buah kakao konsentrasi 600 μ g/ml pada *well* E10-E12. Memberikan perlakuan dengan menambahkan ekstrak aseton-air kulit buah kakao konsentrasi 300 μ g/ml pada *well* F10-F12. Memberikan perlakuan dengan menambahkan ekstrak aseton-air kulit buah kakao konsentrasi 150 μ g/ml pada *well* G10-G12. Well A7-A9 pada *microplate* 96 diisi dengan medium dan kultur sel HeLa sebagai kontrol sel dan Well C7-D9 pada *microplate* 96 diisi dengan medium sebagai kontrol medium. *Microplate* diinkubasi selama 24 jam, kemudian media sel dibuang di atas tempat buangan dengan jarak 15 cm dengan membalikkan *plate* 180° dan dikeringkan dengan cara diketuk-ketuk. Menambahkan 100 μ l MTT pada masing-masing *well* dan inkubasi selama 4 jam. Menambahkan pemberian stopper (Solubilizer) 100 μ l pada setiap *well* kemudian di shaker selama 1 jam. Melakukan pembacaan menggunakan

mesin ELISA *reader* dengan panjang gelombang 560 nm, lalu menghitung kehidupan sel.

3.9.4 Pengamatan hasil

Persentase viabilitas sel dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (CCRC, 2017):

$$\% \text{ Viabilitas Sel} = \frac{\text{Absorbansi tes} - \text{Absorbansi media}}{\text{Absorbansi Sel} - \text{Absorbansi media}} \times 100\%$$

Keterangan:

% viabilitas sel = persentase jumlah kehidupan sel setelah di uji.

Absorbansi tes = Nilai Optical Density (OD) formazan setiap sampel

Absorbansi Media = Nilai OD formazan pada rata-rata setiap kontrol media.

Absorbansi Sel = Nilai OD formazan pada rata-rata kontrol sel.

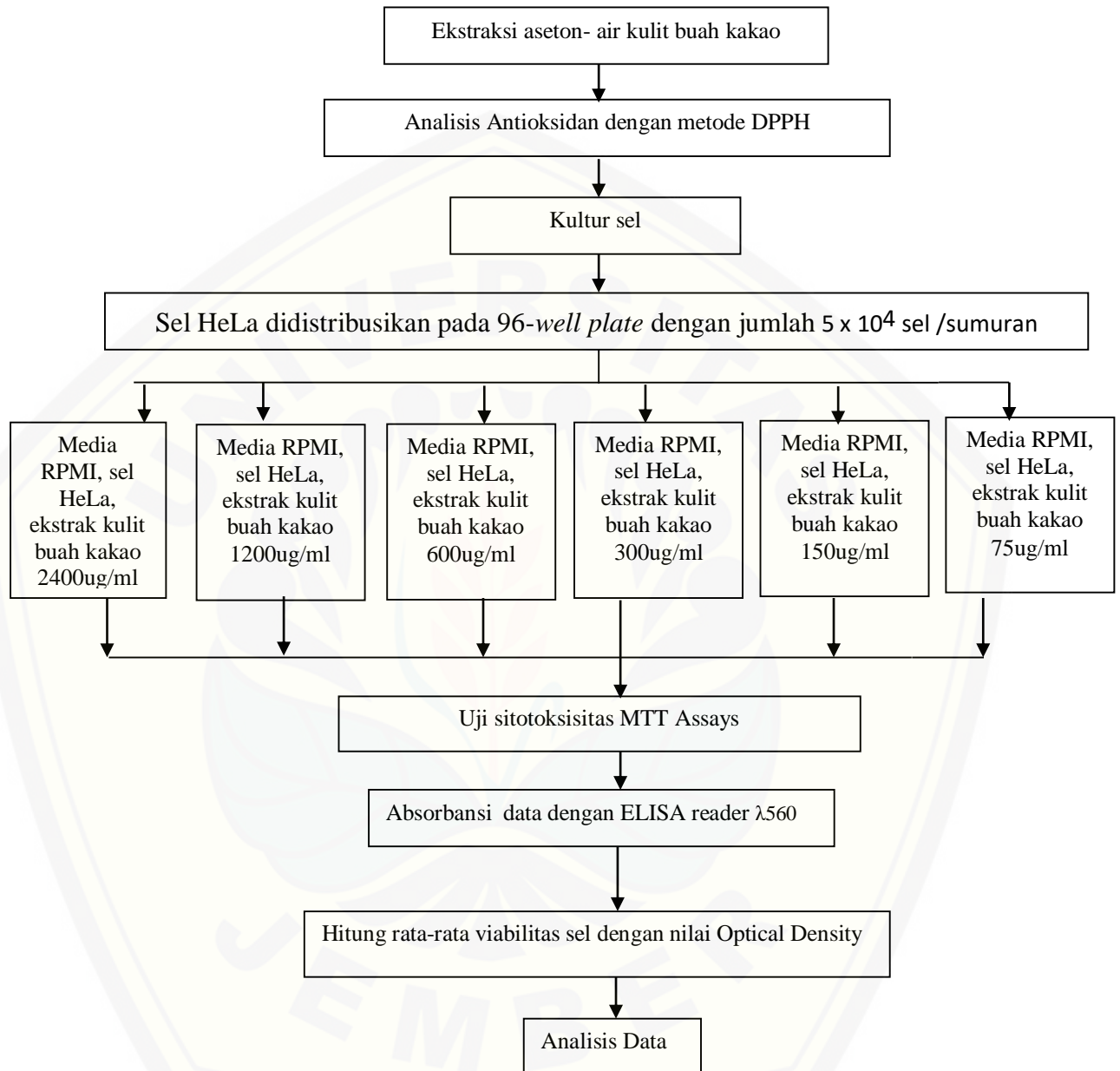
Balantyne (1999) membuat kategori sitotoksik untuk bahan alam berdasarkan jumlah IC_{50} , seperti tercantum pada tabel 1.

IC_{50}	Kategori
$10 \mu\text{g/ml} (10^6 \text{ Sel/ml}) < IC_{50}$	Sangat toksik
$10 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$	Toksik
$100 \mu\text{g/ml} < IC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$	Moderat
$IC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$	Tidak toksik

3.10 Analisis Data

Setelah data hasil penelitian diperoleh, data tersebut dianalisis dengan software komputer SPSS Statistic 26, selanjutnya dilakukan uji normalitas menggunakan Uji Shaphiro-wilk, karena jumlah sampel kurang dari 50 (Razali dan Wah, 2011). Selanjutnya dilakukan uji homogenitas menggunakan Levene's test. Apabila hasil menunjukkan data berdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$), maka dilakukan uji statistik parametrik One Way Anova kemudian dilanjutkan dengan uji LSD (Least Significant Differences). Sedangkan jika data tidak berdistribusi normal ($p < 0,05$) maka dilakukan uji statistik non parametrik Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan uji Uji Mann Whitney (Surya, 2007; Prestiandari, 2018).

3.11 Alur Penelitian



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Ekstrak aseton: air kulit buah kakao merupakan bahan alam alternatif yang memiliki nilai IC_{50} 69.825 $\mu\text{g/ml}$ terhadap sel HeLa pada konsentrasi 75 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$, 600 $\mu\text{g/ml}$, 1200 $\mu\text{g/ml}$, 2400 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan tabel klasifikasi sitotoksitas ekstrak kulit buah kakao bersifat tidak toksik terhadap sel HeLa atau tidak dapat menghambat pertumbuhan kultur sel HeLa .

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan saran yang dapat diberikan adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan uji karakteristik lain dari ekstrak kulit buah kakao yang dapat berpotensi sebagai antioksidan dan antikanker melalui fraksinasi ekstrak kulit buah kakao dengan pelarut etanol atau metanol.
2. Dapat dijadikan acuan untuk penelitian selanjutnya dengan konsentrasi atau sampel yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin. 2014. Faktor Risiko Kanker Payudara. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Diagnosis* Vol. 4 No. 2
- Anderson, R.G.W. dan K. Jacobson. 2002. A Role for Lipid Shells in Targeting Proteins to Caveolae, Rafts, and Other Lipid Domains. *Science*. 296:1821–1825.
- Akmal, Mutaroh, dkk., 2010. *Ensiklopedi Kesehatan untuk Umum*. Jogjakarta: Ar- Ruzz Media
- Andries Shinta C. 2016. Pengaruh Pemberian Vitamin C terhadap Anak yang Mengalami Gingivitis. UNHAS
- Anonim, 2006, HeLa is also The German Name for Hel, Poland and The Cruiser SMS HeLa , Wikipedia the Free Encyclopedia, Wikimedia Foundation, <http://en.wikipedia.org/wiki/HeLa> , diakses tanggal 20 Januari 2006.
- Arisandi, Y, dan Andiriani, Y. 2009. *Khasiat Berbagai Tanaman Untuk Pengobatan*. Eska media, Jakarta
- Arlorio, M, dkk., *Protective activity of Theobroma cacao L. Phenolic extract on AML12 AND MLP29 liver cells by preventing apoptosis and inducing autophagy*. *J. Agric. Food Che.* 2009, 57, 10612-10618.
- Asaolu, M.F., Asaolu, S.S., Fakunle, J.B., B.O. Emman, Okon , Ajayi E.O., and Togun, R.A., 2010, Evaluation of in-vitro Antioxidant Activities of Methanol Extracts of Persea americana and Cnidoscus aconitifolius, *Pakistan Journal of Nutrition*, 9 (11): 1074-1077
- Brown, D.A. 2001. Seeing is Believing: Visualization of Rafts in Normal Membranes. *Proc Nat. Acad Sci.* 98(19): 10517-10518.
- Baharum, Z, dkk., 2014. *In vitro Antioxidant dan Antiproliferative Activities of Methanolic Plant Part Extrcats of Theobroma cacao*. *Molecules* 2014,19, 18317-18331.
- Brooks, George A. 2009. Cell-cell and intracelullar lactate shuttles.n *J Physiol.* 2009.178350.
- CCRC. 2017. *Prosedur tetap uji sitotoksik metode MTT*. Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi UGM

- Diananda, R. 2009. *Panduan Lengkap Mengenai Kanker*. Yogyakarta: Mirza Media Pustaka.
- Dipahayu, Damarani. 2018. Karakteristik Fisika Masker Gel dan Krim Wajah dengan Kandungan Ekstrak Kulit Buah Kakao sebagai Antioksidan Topikal. *Jurnal Ilmial Ilmu Farmasi dan Sains*. Vol. 3, No. 2. P-ISSN: 2527-6238
- DeFillippis, R.A., Goodwin, E.C., Wu, L., DiMaio, D., 2003, Endogenous Human Papillomavirus E6 and E7 Proteins Differentially Regulate Proliferation, Senescence, and Apoptosis in HeLa Cervical Carcinoma Cells, *Journal of Virology*, Vol.77, no.2, 1551-1563.
- Davis, J.M., Navolonic, P.M., Weinstein, C.R., Steelman, L.S., Hu, W., Konovlepa, M., Blagosklonny, M.V., and McCubrey, J.A., 2003, Raf and Bcl-2 Induce Distinct and Common Pathway That Contribute to Breast Cancer Drug Resistance, *Clin. Canc., Res.*, 9:1161-1170
- Dewi, UT dan TR Saraswati. 2009. Efek Rebusan Daun Tapak Dara pada Dosis dan Frekuensi yang Berbeda terhadap Kerusakan dan Akumulasi Glikogen pada Hepar Mencit (*Mus musculus*). *BIOMA* 11 (1) : 1-5
- Ewesuedo R B and M J Ratain. 2003. *Principle of Cancer Chemoterapy. Oncologic Therapies*. Edited by : Everett E.V and Harvey M.G. Springer : Berlin. p: 44
- Freshney, R.I., 2010, *Culture of Animal Cell: A Manual of Basic Technique and Specialized*. 6th ed. New York: Wiley Liss Inc, 2010:108,243
- Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, and Thun MJ. 2007. *Global Cancer Facts & Figures*. Atlanta, GA: America Cancer Society
- George Hajishengallis and Richard J. Lamont. 2014 *Breaking bad: Manipulation of the host response by Porphyromonas gingivalis*. *Breaking bad: Manipulation of the host response by Porphyromonas gingivalis*. *Eur. J. Immunol.* 2014. 44: 328–338
- Goodwin, E.C., DiMaio, D., 2000. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways, *Biochemistry*, Vol.97, no.23. Labwork Study Guide and Lecture Notes, 2000, Henrietta Lacks, www.micro.msb.le.ac.uk/Labwork/Lack1.htm.
- Guyton, A.C. 1995. *Fisiologi Manusia dan Mekanisme Penyakit Edisi 3*. Jakarta:EGC.

- Grassi D. 2010. Flavonoids : Antioxidant Against Atherosclerosis. *Nutrients* 2: 889-902
- Hanahan, D. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *cell*, 144:646-647
- Haryoto, dkk. 2013. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Tumbuhan Sala terhadap Sel HeLa , T47D dan WiDR. *Jurnal Penelitian Saintek*, Vol.18 No.2.
- Hii, C. L., Law, C. L., Suzannah, S., Misnawi, & Cloke, M., 2009, Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.), *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2, 04, 702-722.
- Ide, P. 2008. *Dark Chocolate Healing*. PT Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia. Jakarta
- Iriawati. 2009. *Struktur dan Fungsi Membran Sel*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C. and Thun, M.J., 2008, Cancer statistics, *Cancer J. Clin.*; 56(2):106-130.
- Katja, D.G., Suryanto, E., dan Wehantouw, F., 2009, Potensi Daun Alpukat (*Persea Americana* Mill) Sebagai Sumber Antioksidan Alami, *Chem. Prog.* 2 (1) : 58-64.
- Kembuan MV, 2012. Peran Vitamin C terhadap Pigmentasi Kulit. E-journal Unsrat
- Kumar V, Cotran RS, Robbin SL, 2007. Buku ajar Patologi. Ed 7, Vol.1. Jakarta: EGC, 2007: 860-1
- Lisan, FR. 2015. Penentuan jenis tanin secara kualitatif dan penetapan kadar tanin dari serabut kelapa (*Cocos nucifera* L.) secara permanganometri. *Calyptra: jurnal ilmiah mahasiswa universitas surabaya* 4(1): 1-16.
- Ma'at, S. 2011. *Teknik Dasar Kultur Sel*. Cet 1. Surabaya: Pusat Penerbitan dan Percetakan UNAIR.
- Maharani, S. 2012. *Kanker: Mengenal 13 Jenis Kanker dan Pengobatannya*. Jakarta: kata hati
- Meiyanto, E. 2002. *Biologi Molekuler*, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta
- M. Long. 2016. Extraction and Characteristic of Proanthocianidins from Grape Seed. *The Open Food Science Journal*, 6.pp.5-11
- Mulyatni, A. S. Budiani, A. dan Taniwiryo, D. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap *Escherichia coli*,

- Bacillus subtilis, dan Staphylococcus aureus. Menara Perkebunan, 80 (2): 77-84.
- Nester, E.W. 2007. *Microbiology: A Human Perspective*. 5thed. New York: McGraw-Hill.
- Notoatmojo, S. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Cetakan III. Jakarta: PT. Rineka Cipta.
- Noreen, H. 2017. Measurement of Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Aerial Parts Of Medicinal Plant *Coronopus didymus*. *Asian pacific Journal of Tropical Medicine*. P792-801
- Oemiati, R., Rahajeng, E, dan , Yudi K., 2011, Prevalensi Tumor Dan Beberapa Faktor Yang Mempengaruhinya di Indonesia, *Bul. Penelit. Kesehat*, 39 (4) : 190 – 204.
- Pendyala, G., B. Thomas, dan S. Kumari. 2008. The Challenge of Antioxidants to Free Radicals in Periodontitis. *J Indian Soc Periodontal*. 12(3): 79-83.
- Rachmawaty, 2018. Active Compound Extraction of Cocoa Pod Husk (*Theobroma cacao* L.) and Potential as Fungicides. *Journal of Physics*. IOP Publishing.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., and Zhang, L., 2003, Flavonoids: Promising Anticancer Agents, *Medicinal Research Review*, 23 (4):519-53
- Soekardjo B dan Siswando. 2000. *Kimia Medisinal Jilid II*. Airlangga University Press, Surabaya
- Sunaryati, S. 2011. *Penyakit Paling Sering Menyerang dan Sangat Mematikan*. Flashbook: Yogyakarta
- Schinella, G., dkk. *Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa product industrially processed*. *Food Res. Int.* 2010,43,1641-1623.
- Tahar, N., dkk. 2015. Uji Aktivitas Penghambatan Fraksi Non Polar Ekstrak Klika Anak Dara Terhadap Sel Kanker HeLa . *JF FIK UINAM* Vol.3 No.3
- Winarsi, 2011. Radikal bebas dan Antioksidan. In: *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*, ed 5, Yogyakarta, pp.1-278

LAMPIRAN

A. Surat Keterangan *Ethical Clearance*

The image shows a formal document titled 'ETHIC COMMITTEE APPROVAL' from the Faculty of Dentistry at Universitas Jember. The document is framed with a decorative border and contains the following information:

**KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER
(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH
FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)**

**ETHIC COMMITTEE APPROVAL
No.932/UN25.8/KEPK/DI/2020**

Title of research protocol : "Cytotoxic Test of Cocoa Ekstract (*Theobroma Cacao L*) Against Cervical Cancer (*Helis Celceae*)"

Document Approved : Research Protocol

Pincipal investigator : Kristin Rizki Mustika

Member of research : -

Responsible Physician : Kristin Rizki Mustika

Date of approval : Juni 2020-Selesai

Place of research : CDAST Universitas Jember


The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember States That the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.

Jember, June 19th 2020

Dean of Faculty of Dentistry
Universitas Jember
(Drg. H. Habsyryan P. M. Kes, Sp. Pros.)

Chairperson of Research Ethics Committee
Faculty of Dentistry Universitas Jember
(Prof. Dr. drg. Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si.)

B. Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Kakao dengan metode DPPH

 Chemical Analysis Service Unit
Pharmaceutical Chemistry Division, Faculty of Pharmacy
University of Jember

REPORT OF ANALYSIS

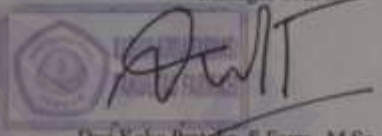
Analysis No. : 01/CASU/ IV/2020
Customer Name : Kristin Rizki M / drg. Yani Corvianindya Rahayu (FKG – UNEJ)
Sample Marks : SOLID
Description : 1 (one) sample in vials

The result of requested analysis or testing are as follows :

Tested For	Sample	IC ₅₀ (mg/L)
Antioxidant activity	Cocoa peel extract	26.3

1. Test Method : Spectrophotometry
2. Nussen, H.; Semmar, N.; Farnan, M.; McCullagh, J. S.O. 2017. Measurement of Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Aerial Parts of Medicinal Plant *Coronopus didymus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. p792-801.

Jember, April 15th, 2020
Manager CASU


Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc., Apt

Note / Collection of sample has taken by customer

C. Hasil absorbansi menggunakan ELISA Reader

KONSENTRASI	VIABILITAS SEL 1	VIABILITAS SEL 2	VIABILITAS SEL 3
2400	84,23	84,79	77,54
1200	81,34	83,25	79,51
600	78,04	85,82	85,22
300	89,69	90,13	114,58
150	117,94	113,51	105,32
75	111,03	99,79	94,98
KS	0,935	0,977	0,999
KM	0,041	0,004	0,045

D. Analisa Data

D.1 Hasil Uji Normalitas *Shapiro-wilk*

Tests of Normality

Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
P2400	.360	3	.	.808	3	.133
P1200	.176	3	.	1.000	3	.976
P600	.239	3	.	.975	3	.698
P300	.350	3	.	.829	3	.187
P150	.244	3	.	.971	3	.675
P75	.269	3	.	.949	3	.566
KS	.248	3	.	.968	3	.659
KM	.353	3	.	.822	3	.169

D.2 Hasil Uji Homogenitas *Levene-Test*

Test of Homogeneity of Variances

		Levene			
		Statistic	df1	df2	Sig.
Viabilitas	Based on Mean	5.248	7	16	.003
	Based on Median	.863	7	16	.555
	Based on Median and with adjusted df	.863	7	4.454	.591
	Based on trimmed mean	4.665	7	16	.005

D.3 Hasil Uji Kruskal Wallis

Ranks

	Konsentrasi	N	Mean Rank
Viabilitas	P2400	3	10.67
	P1200	3	10.00
	P600	3	12.67
	P300	3	19.67
	P150	3	21.67
	P75	3	18.33
	KS	3	5.00
	KM	3	2.00
	Total		24

Test Statistics^{a,b}

Viabilitas	
Kruskal-Wallis H	20.733
Df	7
Asymp. Sig.	.004

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Konsentrasi

E. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan dan Alat	Keterangan	Bahan dan Alat	Keterangan
	Ekstrak Aseton : Air Kulit Buah Kakao		Tripsin EDTA
	PBS (<i>Phospat Buffer Saline</i>)		<i>Trypan Blue</i>
	Timbangan analitik		Eppendorf dan rak eppendorf



Mikropipet



Vortex



Conical tube



Petridish



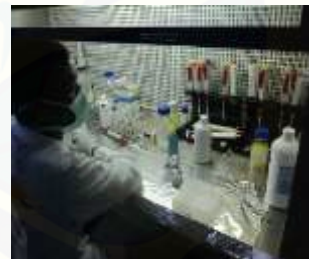
Blue tip dan yellow tip



inkubator
CO₂ 5%,
suhu 37°C



Botol duran



Laminar flow



96 microwell plate



Mikroskop
inverted



Elisa reader



MTT kit

