



**POTENSI FRAKSI SENYAWA SEMBRANOID DAUN TEMBAKAU
KASTURI (*Nicotiana tabacum* L.) SEBAGAI AGEN ANTIKANKER
PADA SEL KANKER KOLON**

TESIS

Oleh

Lidia Maziyyatun Nikmah

171820401003

**MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER**

2019



**POTENSI FRAKSI SENYAWA SEMBRANOID DAUN TEMBAKAU
KASTURI (*Nicotiana tabacum* L.) SEBAGAI AGEN ANTIKANKER
PADA SEL KANKER KOLON**

TESIS

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Magister Biologi (S2)
dan mencapai gelar Magister Sains

Oleh:

**Lidia Maziyyatun Nikmah
171820401003**

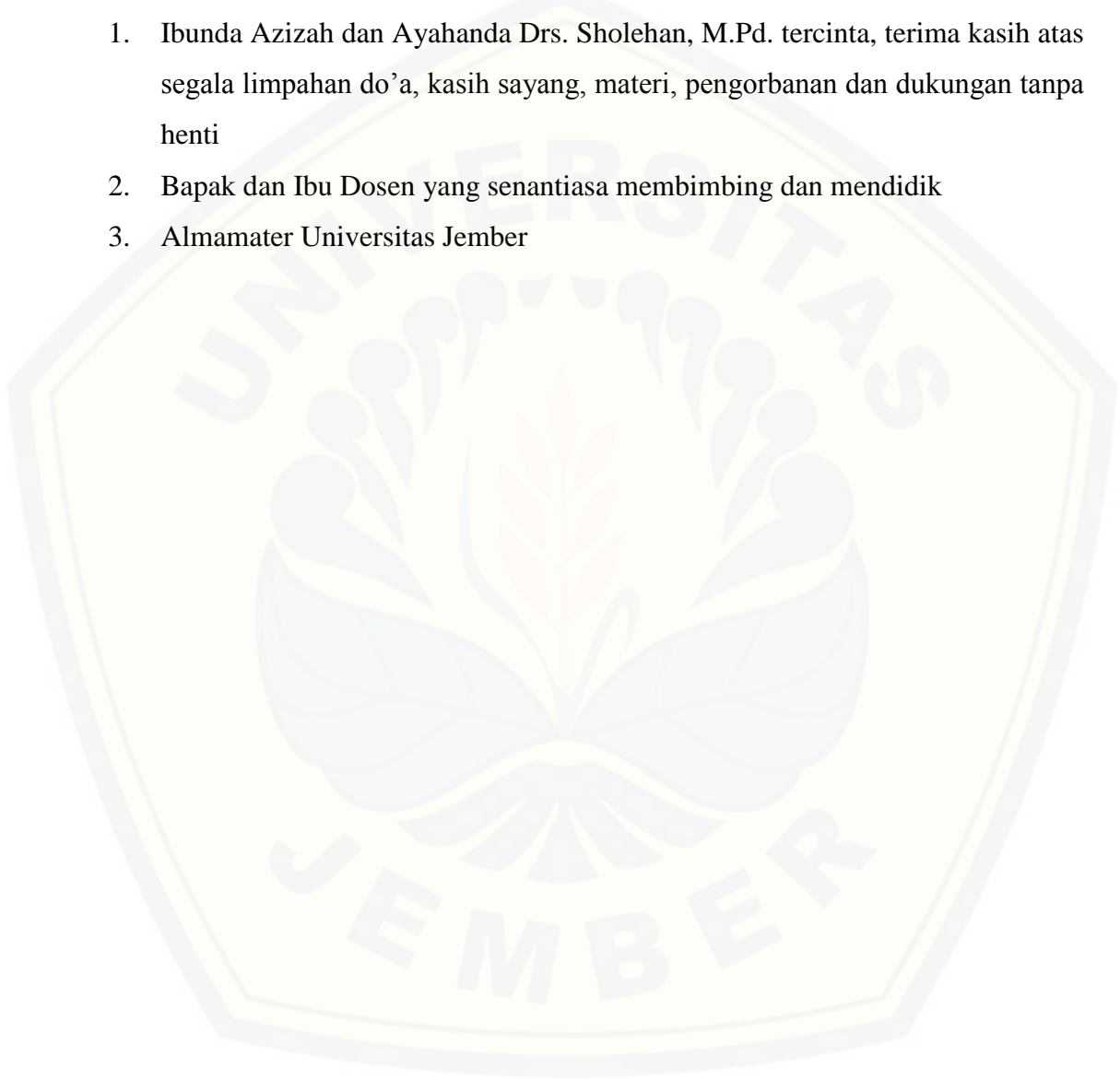
**MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER**

2019

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut asma Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, tesis ini penulis persembahkan kepada:

1. Ibunda Azizah dan Ayahanda Drs. Sholehah, M.Pd. tercinta, terima kasih atas segala limpahan do'a, kasih sayang, materi, pengorbanan dan dukungan tanpa henti
2. Bapak dan Ibu Dosen yang senantiasa membimbing dan mendidik
3. Almamater Universitas Jember



MOTO

“Allah tidak membebani seseorang melainkan dengan kesanggupannya”
(QS.Al-Baqarah 2: 286)

“Janganlah engkau berduka cita, sesungguhnya Allah beserta kita”
(QS.At-Taubah 40).



*) Kementerian Agama Republik Indonesia, Yayasan Penyelenggara Penterjemah/Pentafsir Al Qur'an. 1971. *Mushaf Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Jakarta: Nur Publishing.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Lidia Maziyyatun Nikmah

NIM : 171820401003

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Potensi Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) sebagai Agen Antikanker pada Sel Kanker Kolon" adalah benar-benar hasil karya ilmiah sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini didanai oleh Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes. tidak dapat dipublikasikan tanpa izin dari pihak yang mendanai. 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, 19 Juli 2019

Yang Menyatakan,

Lidia Maziyyatun Nikmah

NIM 171820401003

TESIS

**POTENSI FRAKSI SENYAWA SEMBRANOID DAUN TEMBAKAU
KASTURI (*Nicotiana tabacum* L.) SEBAGAI AGEN ANTIKANKER
PADA SEL KANKER KOLON**

Oleh

Lidia Maziyyatun Nikmah
NIM 171820401003

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Rer. Nat. Kartika Senjarini, M. Si.

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

PENGESAHAN

Tesis berjudul “**Potensi Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) sebagai Agen Antikanker pada Sel Kanker Kolon**”, telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji,

Ketua,

Sekretaris,

Dr.rer.nat.Kartika Senjarini, S.Si., M.Si.
NIP 197509132000032001

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

Anggota I,

Anggota II,

Dr. Dra. Rike Oktarianti, M. Si.
NIP 196310261990022001

Mukhamad Su'udi, Ph. D.
NIP 760016788

Mengesahkan
Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D
NIP 196102041987111001

RINGKASAN

Potensi Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) sebagai Agen Antikanker pada Sel Kanker Kolon; Lidia Maziyyatun Nikmah, 171820401003; 2019: 65 halaman; Magister Biologi Universitas Jember.

Kanker merupakan penyakit yang banyak menyerang masyarakat dan pada umumnya sulit untuk diobati. Salah satu pengobatan penyakit kanker adalah menggunakan kemoterapi, radioterapi, dan lain-lain. Akan tetapi pengobatan yang demikian dapat menimbulkan efek samping pada pasien seperti mual, rambut rontok, gangguan fungsi jantung, serta biaya yang harus dikeluarkan untuk pengobatan kanker tersebut tidak murah. Sehingga diperlukan adanya obat alternatif yang murah dan berpotensi sebagai antikanker serta tidak memiliki efek buruk bagi tubuh. Masyarakat pada umumnya mengobati berbagai penyakit menggunakan tanaman herbal (obat), salah satu tanaman herbal (obat) yang biasa digunakan sebagai antikanker antara lain rimpang kunyit dan daun tembakau. Daun tembakau diduga memiliki kandungan senyawa yang berpotensi sebagai antikanker yaitu sembranoid. Sembranoid pada daun tembakau memiliki struktur kimia yang hampir sama dengan sembranoid pada koral lunak yang berperan sebagai antikanker pada beberapa macam kanker seperti kanker payudara, kanker hati, dan lain-lain. Oleh karena itu, diduga sembranoid pada daun tembakau memiliki aktivitas yang sama dengan sembranoid pada koral lunak, sehingga diperlukan adanya penelitian tentang potensi sembranoid daun tembakau sebagai agen antikanker.

Penelitian ini menggunakan sel WiDr (sel kanker kolon) dan sel Vero (sel normal) untuk mengetahui pengaruh pemberian fraksi senyawa sembranoid daun tembakau kasturi terhadap sel kanker dan sel normal. Pada penelitian ini dibagi menjadi dua kelompok, yaitu: kelompok kontrol positif (sel Vero dan sel WiDr diberi perlakuan *doxorubicin*), dan kelompok perlakuan dengan pemberian fraksi senyawa sembranoid pada sel Vero dan sel WiDr dengan konsentrasi 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL, dan 128 µg/mL. Uji yang dilakukan yaitu uji sitotoksitas menggunakan MTT yang dilanjutkan dengan

uji antiproliferasi menggunakan *doubling time*. Hasil yang diperoleh dianalisis probit pada program SPSS dan dilanjutkan dengan uji GLM.

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini diketahui bahwa pemberian fraksi senyawa sembranoid dengan konsentrasi 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, dan 128 µg/ml tidak bersifat toksik terhadap sel vero (sel normal), dan pada konsentrasi 128 µg/ml bersifat toksik pada sel WiDr. Konsentrasi optimal untuk menghambat 50% hidup sel WiDr yaitu pada konsentrasi IC_{50} 80,382 µg/mL. Uji lanjut antiproliferasi pada sel kanker kolon menunjukkan pemberian fraksi senyawa sembranoid dengan konsentrasi 4 IC_{50} (321,528 µg/mL) memiliki aktivitas antiproliferasi paling tinggi daripada konsentrasi yang lainnya. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian fraksi senyawa sembranoid dengan konsentrasi yang tinggi memiliki potensi sebagai agen antikanker dan antiproliferasi pada sel kanker kolon (WiDr). Dan konsentrasi optimal fraksi senyawa sembranoid yang dapat digunakan sebagai antiproliferasi yaitu konsentrasi 4 IC_{50} (321,528 µg/mL).

PRAKATA

Puji Syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tesis yang berjudul “Potensi Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) sebagai Agen Antikanker pada Sel Kanker Kolon”. Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata dua (S2) Magister Biologi Universitas Jember.

Penyusunan tesis ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, M. Si., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran serta perhatiannya guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi terselesaikannya penulisan tesis ini;
2. Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si., selaku Dosen Penguji I dan Mukhamad Su’udi, Ph.D., selaku Dosen Penguji II, yang telah membantu memberikan saran serta kritik yang membangun dalam penulisan tesis ini;
3. Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M. Pd., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing serta memberikan masukan dan saran selama penulis menjadi mahasiswa;
4. Dra. Mahriani, M.Si., yang telah meluangkan waktu dan membantu penulis dalam menyelesaikan tesis ini;
5. Ari Satia Nugraha, S. F., G. Dipsc., M. Sc., Ph.D., Apt., yang telah banyak meluangkan waktunya untuk membantu demi kelancaran selama penulis melakukan penelitian;
6. Ibu Wayan, selaku Teknisi Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah membantu demi kelancaran selama penulis melakukan penelitian;
7. Ibu Novita selaku Teknisi Laboratorium Biosain Politeknik Jember yang telah membantu demi kelancaran selama penulis melakukan penelitian;

8. Ibu Rumbi selaku Teknisi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada yang telah membantu demi kelancaran selama penulis melakukan penelitian;
9. Ibu Ulfa, selaku Teknisi Laboratorium Botani Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah membantu demi kelancaran selama penulis melakukan penelitian;
10. kakakku Annisatun Nikmah Mar'atus Sholihah, kedua adikku yaitu Muhammad Misbahus Sururi dan Welly Amaliyatus Sholihah, dan keluarga besarku terimakasih atas limpahan doa'a, kasih sayang, pengorbanan, dan motivasi yang tak henti demi terselesaikannya tesis ini;
11. rekan-rekan kerja kultur sel, yaitu: Zilfi Dita Fitriyani, dan Fara Difka Afdila, kalian partner kerja sekaligus keluarga baru yang tidak akan pernah tergantung;
12. teman-teman seperjuangan: Maulfi Dwi Lestari, Azizah, Yenny Febriana Ramadhan Abdi, Mas Farid, Mbak Yusra, terima kasih atas do'a dan dukungannya;
13. sahabat-sahabatku Siti Sholihatul Muza, Fresha Aflahul Ula, Ahmad Alfian Abdullah, Robby S. N., Siti Fatimah, Clarista Mugistika, dan Maulana Mahmud, terima kasih atas segala bantuan, do'a, motivasi, masukan, serta semangat yang kalian berikan;

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

Jember, 19 Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Batasan Masalah.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kanker Kolon dan Faktor yang Berpengaruh Terhadap Perkembangannya.....	4
2.2 Klasifikasi Tanaman Tembakau dan Kandungan Senyawa Kimia pada Daun Tembakau	6
2.3 Potensi Sembranoid Sebagai Antikanker	8
BAB 3. METODE PENELITIAN	11
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	12

3.2	Alat dan Bahan	12
3.2.1	Alat.....	12
3.2.2	Bahan	12
3.3	Rancangan Penelitian	13
3.4	Prosedur Penelitian.....	13
3.5	Metode Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
3.5.1	Pembuatan Ekstrak Tembakau	Error! Bookmark not defined.
3.5.2	Fraksinasi Ekstrak Daun tembakau Menggunakan Kromatografi Kolom.....	Error! Bookmark not defined.
3.5.3	Uji GC-MS (Gas Chromatography Mass Spectrofotometer)...	Error! Bookmark not defined.
3.5.4	Pembuatan Konsentrasi Sampel.....	Error! Bookmark not defined.
3.5.5	Pengadaan Sel Kanker Kolon (WiDr), Pemanenan, dan Penghitungan Sel.....	Error! Bookmark not defined.
3.5.6	Uji Sitotoksik menggunakan Metode MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	15
3.5.7	Uji Proliferasi	15
3.6	Parameter Penelitian.....	16
3.7	Analisi Data	16
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....		17
4.1	Hasil Uji Kandungan Senyawa Sembranoid pada Daun Tembakau Kasturi.	18
4.2	Sitotoksisitas Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau Kasturi terhadap Sel WiDr dan Sel Vero (Sel Normal).....	19
4.3	Pengaruh Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau Kasturi terhadap Proliferasi Sel Vero (Sel Normal).....	Error! Bookmark not defined.
4.4	Pengaruh Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau Kasturi terhadap Proliferasi Sel Kanker Kolon (WiDr)	Error! Bookmark not defined.
BAB 5. PENUTUP.....		23
5.1	Kesimpulan.....	23
5.2	Saran	23
DAFTAR PUSTAKA		24

LAMPIRAN..... 36



DAFTAR TABEL

Halaman

2.1 Karakteristik Tembakau Kasturi 7

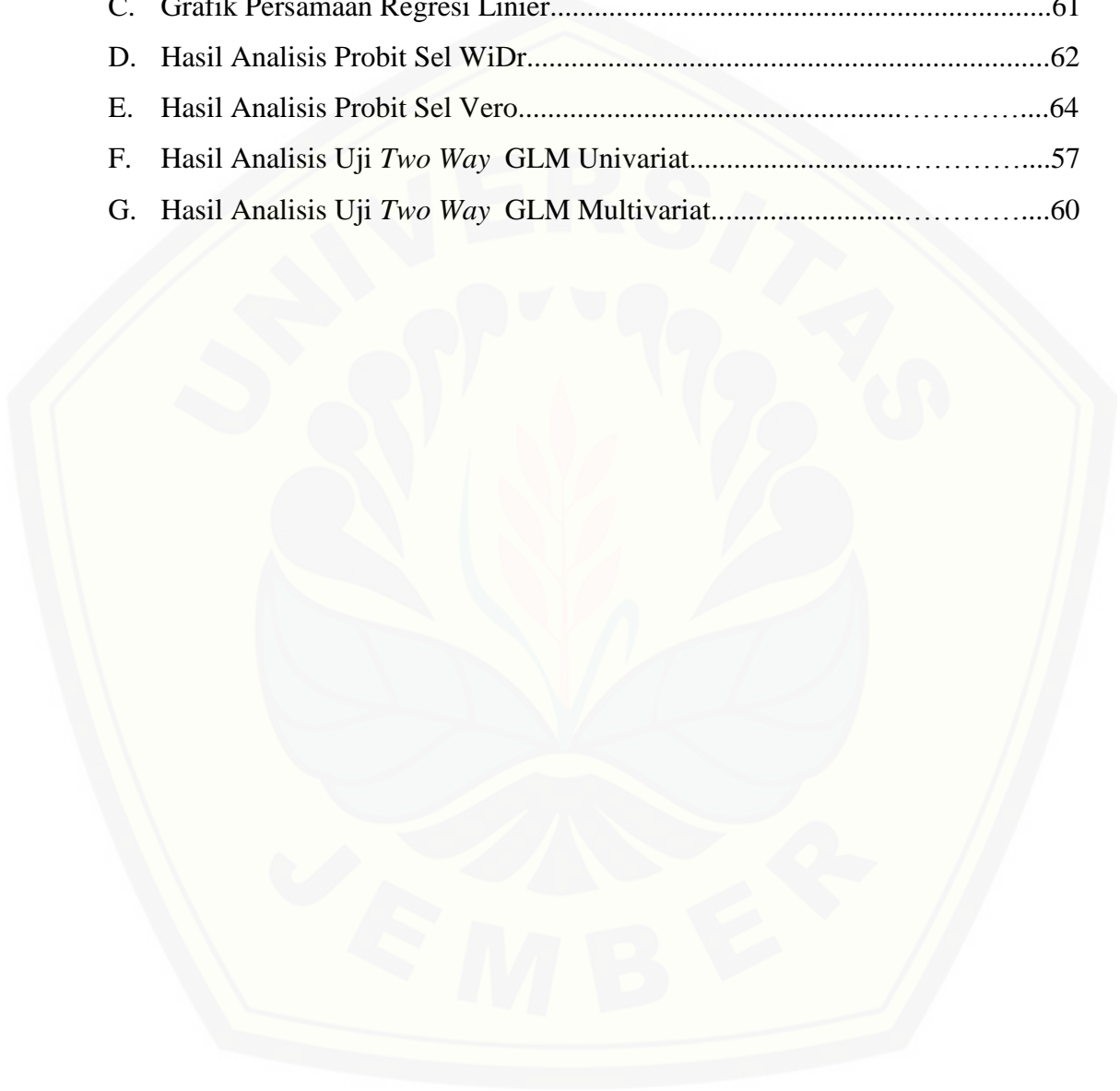


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Pertumbuhan Kanker Kolorektum	4
2.2 Sel WiDr	5
2.3 Tanaman Tembakau Kasturi	7
2.4 Struktur Senyawa Sembranoid.....	10
2.5 Siklus Sel	11
3.1 Alur Penelitian.....	14
4.1 Hasil GCMS.....	20
4.2 Struktur Kimia Senyawa Sembranoid Daun Tembakau Kasturi.....	20
4.3 Identifikasi Fraksi Senyawa Sembranoid.....	21
4.4 Grafik Persen Hidup Sel WiDr dan Sel Vero.....	23
4.5 Morfologi Sel Vero dan Sel WiDr setelah Uji Sitotokisitas.....	25
4.6 Grafik Persen Hidup Sel Vero Setelah Uji Proliferasi.....	27
4.7 Sel Vero Setelah Uji Proliferasi.....	28
4.8 Grafik Persen Hidup Sel WiDr Setelah uji Proliferasi.....	31
4.9 Sel WiDr setelah Uji Proliferasi.....	34

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Hasil Analisis GCMS.....	49
B. Penentuan Konsentrasi Fraksi Senyawa Sembranoid.....	59
C. Grafik Persamaan Regresi Linier.....	61
D. Hasil Analisis Probit Sel WiDr.....	62
E. Hasil Analisis Probit Sel Vero.....	64
F. Hasil Analisis Uji <i>Two Way</i> GLM Univariat.....	57
G. Hasil Analisis Uji <i>Two Way</i> GLM Multivariat.....	60



DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

APC	= <i>Anaphase Promoting Complex</i>
DCC	= <i>Deleted in Colorectal Cancer</i>
p53	= <i>Protein 53</i>
MTT	= <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
DMEM	= <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
PBS	= <i>Phosphat Buffer Saline</i>
Cox-2	= <i>Cyclooxygenase-2</i>
Caspase	= <i>Cystein-Dependent Aspartate-Specific Aroteases</i>
HCT-116	= <i>Human Colon Carcinoma Cell Line</i>
WiDr	= <i>Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line</i>
Vero	= <i>Verda Reno</i>
IC ₅₀	= <i>Inhibition Concentration 50</i>
DNA	= <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
FBS	= <i>Fetal Bovine Serum</i>
Apaf	= <i>Apoptosis Activating Factor</i>
Bcl-2	= <i>B Cell Lymphoma-2</i>
CDK	= <i>Cyclin Dependent Kinase</i>
DMSO	= <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
p21	= <i>Protein 21</i>
PKC	= <i>Protein Kinase C</i>
pRB	= <i>Protein Retinoblastoma</i>
RPMI	= <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	= <i>Sodium Dodesil Sulfat</i>
K-Ras	= <i>K Rat Sarcoma</i>
HT29	= <i>Human Colon Cancer</i>
CACO-2	= <i>Colonic Adenocarcinoma</i>
HepG2	= <i>Human Hepatocarcinoma</i>
BRAF	= Jalur Map/Kinase yang berkaitan dengan pembelahan seluler dan diferensiasi serta sekresi

PIK3CA = Mengkode kinerja p1 10 alpha sebagai kinase pada jalur seluler, proliferasi pembelahan seluler, migrasi dan pertahanan seluler

PI3K = *Phosphatidyl-inositol-3-kinase*

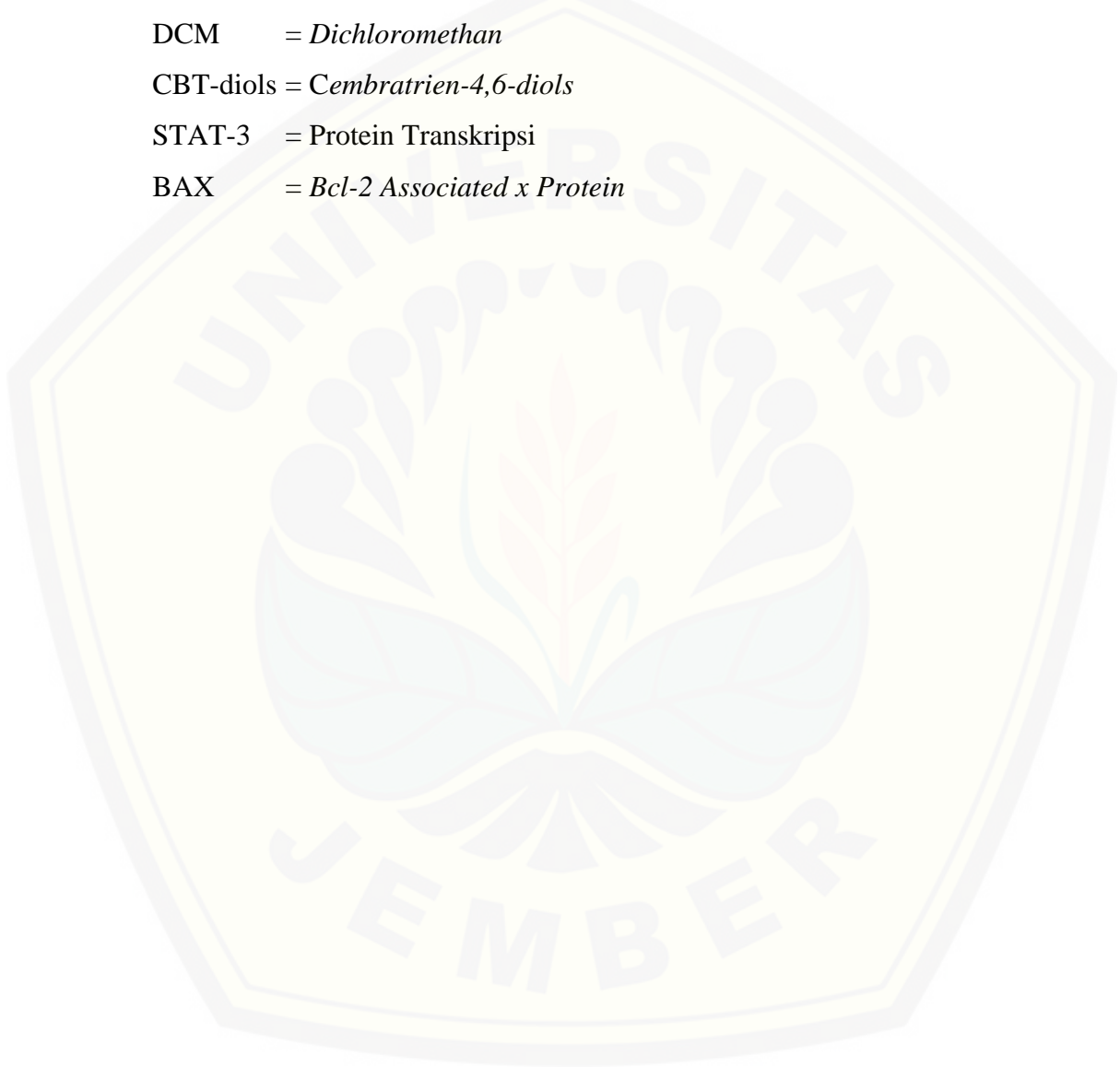
NMDA = *N-methyl-D-aspartate*

DCM = *Dichloromethan*

CBT-diols = *Cembratrien-4,6-diols*

STAT-3 = Protein Transkripsi

BAX = *Bcl-2 Associated x Protein*





BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyakit yang ditandai dengan adanya pertumbuhan abnormal sel secara terus menerus dan tidak terkendali pada jaringan tubuh. Kanker kolorektum termasuk dalam kelompok lima besar penyebab kematian terbanyak di dunia selain kanker hati, kanker lambung, kanker paru-paru, dan kanker payudara (American Cancer Society, 2015). Pada tahun 2018, terdapat 1,8 juta kasus kanker kolorektal dengan insiden kanker kolon menyebabkan kematian pada laki-laki mencapai 9 – 14,4 % tiap 100.000 penduduk (International Agency for Research Cancer, 2018; Ferlay *et al.*, 2013).

Pengobatan terhadap kanker khususnya kanker kolon biasanya dilakukan menggunakan kemoterapi dan radioterapi (American Cancer Society, 2018). Namun, pemberian kemoterapi pada pasien dapat memberikan efek samping (American Cancer Society, 2018) dan biaya yang harus dikeluarkan untuk kemoterapi cukup mahal sehingga dibutuhkan adanya obat alternatif yang lebih murah. Terdapat beberapa jenis tanaman yang biasa digunakan sebagai obat dan berpotensi sebagai antikanker, antara lain: rimpang kunyit (Li *et al.*, 2012), daun tembakau (Wahlberg and Eklund, 1992), dan lain-lain.

Tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) adalah salah satu tembakau Indonesia yang terpusat di daerah Jember dengan luas area penanaman 3.000 ha yang juga terdapat di daerah Bondowoso (Djajadi, 2015). Tanaman tembakau biasa digunakan oleh masyarakat untuk membuat rokok dan pestisida (Agriculture Forestry & Fisheries, 2015). Kandungan senyawa kimia pada daun tembakau antara lain : Alkaloid, flavonoid, minyak atsiri, polifenol, asam organik, pektin, selulosa, asetaldehid (Podlejski & Olejniczak, 1983; Palic *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2010), dan terpenoid (Leffingwell, 1999).

Salah satu senyawa dalam daun tembakau yang diduga berperan sebagai antikanker adalah senyawa sembranoid yang merupakan golongan diterpenoid

(Wahlberg and Eklund, 1992). Beberapa penelitian menyebutkan bahwa sembranoid berpengaruh terhadap tumor dan kanker. Sembranoid yang diisolasi dari koral laut lunak *Sarcophyton elegans* dan *Sarcophyton glaucum*, diketahui memiliki aktivitas antitumor pada dosis 10 μM terhadap sel tumor payudara dan bersifat sitotoksik terhadap sel HCT116 pada dosis 8,9 dan 17,5 $\mu\text{mol/L}$. Sembranoid dari koral lunak memiliki aktivitas antitumor dengan menginduksi penghentian siklus sel khususnya pada fase G0/G1 dan fase S yang berpengaruh terhadap proliferasi sel (Liu *et al.*, 2015; Ayyad *et al.*, 2015).

Koral merupakan biota laut yang memiliki kemampuan reproduksi yang lama dan pengambilan senyawa dari koral laut akan menyebabkan terganggunya ekosistem di laut, sehingga diperlukan adanya sumber sembranoid lain yang dapat diambil dan tidak menimbulkan kerusakan pada ekosistemnya. Menurut El-Sayed dan Sylvester (2007), struktur kimia dari sembranoid daun tembakau memiliki kemiripan dengan struktur kimia sembranoid yang ada pada koral lunak. Sehingga sembranoid pada daun tembakau diduga memiliki aktivitas antikanker yang sama dengan sembranoid dari koral lunak. Sembranoid daun tembakau pada penelitian ini akan diujikan secara *in vitro* pada *cell line* WiDr yang merupakan sel kanker kolon. Uji sitotoksik secara *in vitro* pada *cell line* oleh suatu sampel tanaman dapat dilakukan untuk mengetahui aktivitas antikanker suatu tanaman (Thompson, 1985). Tembakau merupakan tanaman yang mudah diperoleh dan sembranoid dari daun tembakau masih belum banyak dilakukan penelitian di Indonesia, oleh karena itu perlu adanya uji fraksi senyawa sembranoid daun tembakau pada sel kanker untuk mengetahui pengaruh senyawa tersebut dalam menghambat proliferasi sel kanker kolon.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah fraksi senyawa sembranoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum*) berpotensi sebagai agen antikanker pada sel kanker kolon ?

2. Berapakah konsentrasi optimal fraksi senyawa sembranoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum*) yang berpotensi sebagai agen antikanker pada sel kanker kolon ?

1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui pengaruh fraksi senyawa sembranoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum*) yang berpotensi sebagai agen antikanker pada sel kanker kolon
3. Untuk mengetahui konsentrasi optimal fraksi senyawa sembranoid daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum*) yang berpotensi sebagai agen antikanker pada sel kanker kolon

1.4 Batasan Masalah

1. Daun tembakau yang digunakan adalah daun tembakau varietas kasturi 1 dari daun yang tidak dipakai oleh petani (daun sisa yang masih ada pada tanaman).
2. Sel kanker kolon yang digunakan adalah Sel WiDr.

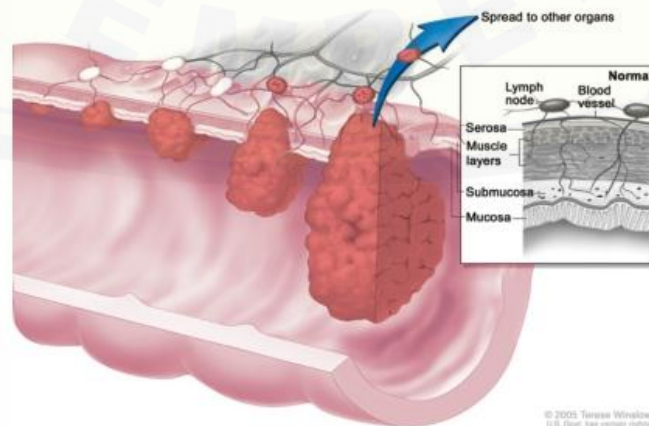
1.5 Manfaat Penelitian

Uji fraksi senyawa sembranoid tembakau kasturi secara *in vitro* pada sel kanker kolon dilakukan hingga tahap proliferasi untuk mengetahui potensi antitoksik fraksi ini terhadap sel normal, dan mencegah proliferasi sel kanker kolon. Sehingga hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar penggunaan fraksi senyawa sembranoid untuk alternatif pengobatan kanker.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Kolon dan Faktor yang Berpengaruh Terhadap Perkembangannya

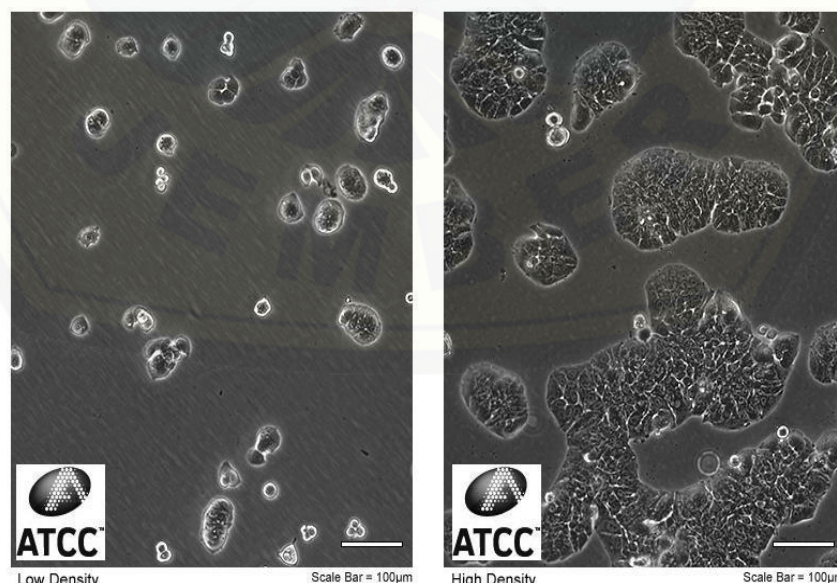
Kanker kolon atau lebih sering dikenal dengan kanker kolorektum merupakan kanker yang berkembang dari polip pada lapisan dalam dinding kolon atau rektum dan berkembang secara perlahan selama 10 sampai 20 tahun. Polip adenoma muncul dari sel kelenjar yang memproduksi mukus kolon dan rektum. (Levine dan Ahnen, 2006; Risio, 2010; Schatzkin *et al.*, 1994). Kanker kolorektum dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain: adanya mutasi pada DNA; berhentinya proses transkripsi dari gen penekan tumor, gen pengontrol siklus sel, dan apoptosis, atau juga dapat disebabkan oleh adanya onkogen seperti K-RAS dan CTNNB1. Beberapa dari gen penekan tumor yaitu: APC, DCC, BRAF, PIK3CA, dan TP53 (Siegel *et al.*, 2012). Salah satu gen yang berpengaruh pada perkembangan kanker kolon adalah APC yang merupakan gen penekan tumor dan RAS yang berperan dalam aktivasi gen seperti cascade (de Miranda *et al.*, 2009). Pertumbuhan kanker kolon dapat dilihat pada Gambar 2.1. Kanker kolon ditandai dengan polip pada lapisan mukosa kolon yang berkembang menembus dinding kolon dan kelenjar getah bening (Alteri *et al.*, 2014).



Gambar 2.1. Pertumbuhan kanker kolorektum (American Cancer Society, 2017).

Kanker kolon juga dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti gaya hidup dan diet (Steffensen *et al.*, 1997). Faktor adanya penyakit kolitis ulseratif, penyakit *Chron*, penyakit turunan poliposis kolon, rektum, ovarium, endometrium, kanker payudara, serta diabetes melitus juga memiliki resiko hingga 30-50% untuk berkembang menjadi kanker kolorektum (Granados-Romero *et al.*, 2017).

Sel WiDr (Gambar 2.2.) merupakan turunan dari karsinoma kolon manusia yang mempunyai ciri-ciri adanya ekspresi enzim Cox-2 yang tinggi (Palozza, 2005). Peningkatan enzim Cox-2 akan memicu proliferasi sel dan berperan dalam modulasi pertumbuhan sel kanker (Propivanova *et al.*, 2008). Cox-2 merupakan enzim yang merubah asam arakidonat bebas dari membran fosfolipid menjadi prostaglandin H_2 (PGH_2) yang merupakan prekursor pembentukan mediator inflamasi (Ishikawa *et al.*, 2011). Cox-2 juga berperan dalam mengkatalis asam arakidonat menjadi PGE_2 yang dapat menghambat apoptosis melalui peningkatan ekspresi protein anti apoptosis Bcl-2 yang menyebabkan penurunan terhadap aktivitas caspase-3 dan caspase-9. Caspase 3 dan Caspase 9 merupakan salah satu jenis caspase yang berperan dalam pemotongan komponen seluler selama apoptosis (Fink dan Cookson, 2005).



Gambar 2.2. Sel WiDr (ATCC Collection) (<http://www.atcc.org>)

Cox-2 dan prostaglandin memiliki peran pada regulasi diferensiasi sel, proliferasi sel, dan tumorigenesis dengan cara aktivasi PI3K dari jalur RAS/MAPK dan NFκB. PI3K dari jalur RAS/MAPK berperan dalam peningkatan proliferasi sedangkan NFκB berperan dalam penghambatan proses apoptosis (Hanahan dan Weinberg, 2011).

2.2 Klasifikasi Tanaman Tembakau dan Kandungan Senyawa Kimia pada Daun Tembakau

Tanaman tembakau diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Solanales
Famili	: Solanaceae
Genus	: Nicotiana
Spesies	: <i>Nicotiana tabacum</i> L. (Herawati, 2016).

Tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum*) merupakan tanaman yang memiliki mahkota bunga berwarna merah muda sampai merah, mahkota bunga berbentuk terompet panjang, daunnya berbentuk lonjong dengan ujung daun meruncing, kedudukan daun pada batang tegak, tanaman tembakau jenis ini memiliki tinggi sekitar 120 cm (Cahyono, 1998). Tembakau kasturi merupakan jenis tembakau kerosok lokal *Voor Oogst* (VO) yang digunakan sebagai bahan campuran untuk rokok kretek serta banyak dibudidayakan di daerah Jember dan Bondowoso. Berdasarkan SK menteri tahun 2007 No: 132/Kpts/SR.120/2/2007 dan 133/Kpts/SR.120/2/2007 terdapat 2 jenis tembakau kasturi yang dibudidayakan yakni Kasturi 1 dan Kasturi 2 yang memiliki karakteristik yang berbeda satu sama lain (Herminingsih, 2014). Karakteristik dari tembakau kasturi 1 dan kasturi 2 dapat dilihat pada Tabel 2.2. dan gambar tanaman tembakau dapat dilihat pada Gambar 2.3.

Tabel 2.2 Karakteristik Tembakau Kasturi 1 dan Kasturi 2

Karakteristik	Kasturi 1	Kasturi 2
Asal	Seleksi massa	Seleksi massa
Varietas	Positif kasturi mawar, Jember	Positif kasturi Ledok Ombo
Bentuk daun	Lonjong	Lonjong
Ujung daun	Meruncing	Meruncing
Tepi daun	Rata	Licin
Permukaan daun	Rata	Rata
Phylotaxi	2/5 putar ke kiri	2/5 putar ke kiri
Indeks daun	0,486	0,529
Jumlah daun	16-19 lembar	17-19 lembar
Produksi	1,75 ton krosok/ha	1,75 ton krosok/ha
Indeks mutu	81,75 ± 0,98	82,40 ± 1,03
Kadar nikotin	3,21 ± 0,08	3,54 ± 0,04

Sumber : <http://balittas.litbang.pertanian.go.id>



Gambar 2.3. Tanaman Tembakau Kasturi

Kandungan senyawa kimia dari daun tembakau antara lain: Pati, gula, glukosida, selulosa, hemiselulosa, pektin, karbohidrat, ammonia, nikotin, alkaloid, diterpenoid, flavonoid, dan steroid (Lefingwell, 1999). *Nicotiana tabacum* merupakan tanaman yang bernilai ekonomi penting karena daunnya dapat digunakan sebagai obat, insektisida, sedatif, diaphoretic, dan anestesi (The Editorial Committee of the Administration Bureau of Flora of China, 2005). Kandungan non folatil utama pada daun tembakau yaitu: diterpenoid, sesquiterpenoid, flavonoid, dan alkaloid (Fathiazad *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006).

Senyawa alkaloid pada daun tembakau merupakan penentu aroma yang memiliki kandungan nikotin hingga 95% (Andersen *et al.*, 1991; Shen dan Shao, 2006), nornikotin dan anabasin yang bersifat aditif saat dikonsumsi (Nugroho *et al.*, 2002). Senyawa alkaloid pada daun tembakau diketahui memiliki aktivitas antibakteri dengan mengganggu sintesis DNA dan dinding sel (Cowan, 1999). Senyawa flavonoid pada daun tembakau yaitu rutin berfungsi sebagai obat diabetes, regenerasi sel, anti tumor, serta dapat digunakan sebagai pewarna makanan dan minuman (Fathiazad *et al.*, 2006; Grinberg *et al.*, 1994; Sambantham, 1985; Evans, 1996). Senyawa steroid dan terpenoid dari golongan minyak atsiri pada daun tembakau memiliki aktivitas antibakteri pada *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli*, dan *P. aeruginosa* yang ditunjukkan dengan adanya zona hambat (Palic *et al.* 2002). Selain itu, salah satu senyawa pada kelompok terpenoid yaitu sembranoid diketahui berperan sebagai fungisida dengan merusak struktur bagian dalam dari jamur (Duan *et al.*, 2016).

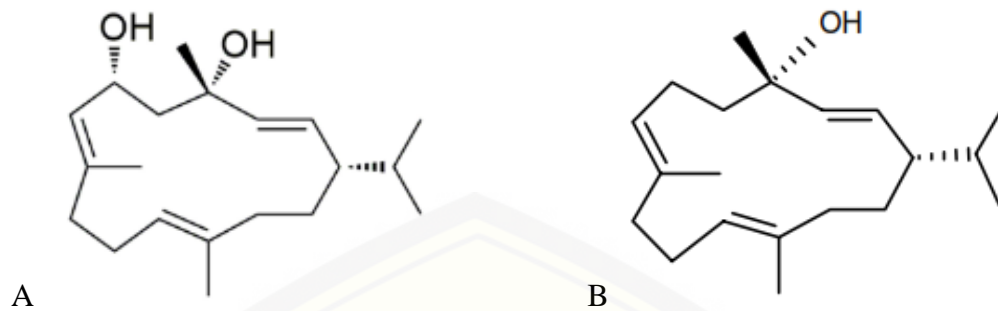
2.3 Potensi Sembranoid Sebagai Antikanker

Sembranoid merupakan salah satu senyawa yang termasuk dalam golongan diterpenoid dengan 14 cincin karbon yang memiliki derajat oksigenasi yang bervariasi (Wahlberg and Eklund, 1992). Sarcophine merupakan salah satu derivat sembranoid yang diisolasi dari koral lunak *Sarcophytum glaucum* pada tahun 1970 oleh Kashman dan kawan-kawan (Bernstein *et al.*, 1974). Sarcophine

merupakan senyawa yang diketahui melindungi koral dari predator. Selain itu, diketahui juga bahwa semisintetik analog sarcophine mampu melawan sel kanker payudara MDA-MB-231 dan sel prostat PC-3 pada uji wound-healing assays secara *in vitro* (Hassan *et al.*, 2011). Menurut Sawant *et al.* (2006), sarcophine yang merupakan derivat sembranoid memiliki aktivitas anti-migrasi metastasis pada sel melanoma B16B15b tikus.

Sembranoid dari daun tembakau diketahui memiliki struktur kimia yang mirip dengan sembranoid yang berasal dari koral laut (El-Sayed dan Sylvester, 2007) yang dapat dilihat pada Gambar 2.4. Sembranoid pada daun tembakau disintesis dari glandular trikoma yang merupakan faktor kimia yang menghasilkan komponen metabolik seperti polisakarida, terpen, fenilpropanoid, dan flavonoid (Graham *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2016; Schillmiller *et al.*, 2008). Yang membedakan antara struktur kimia sembranoid tembakau dengan sembranoid yang berasal dari koral lunak adalah pada rantai C6 sembranoid daun tembakau dapat berikatan dengan OH sedangkan pada sembranoid koral lunak rantai C6 tidak berikatan dengan OH.

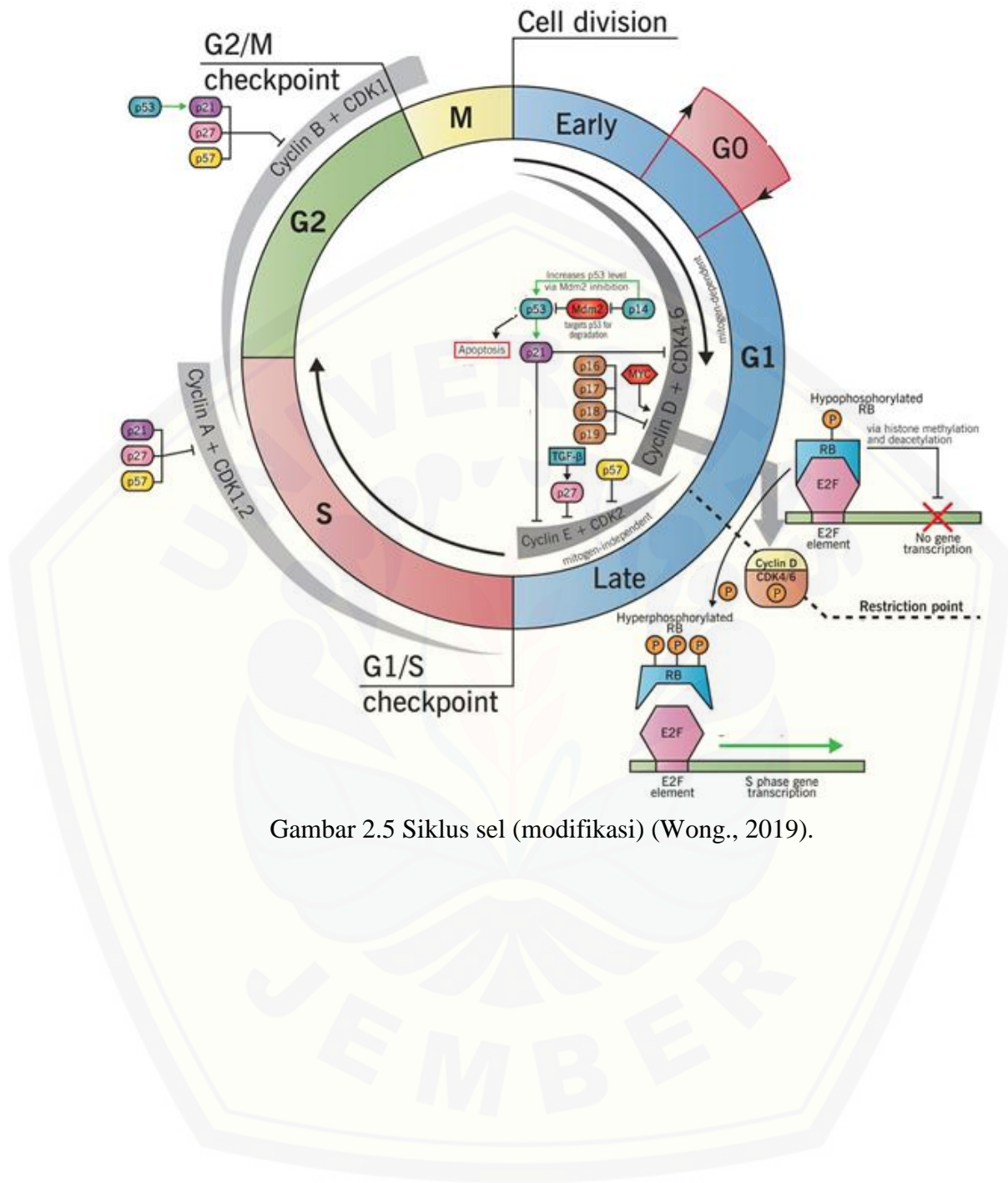
Sembranoid yang berasal dari tanaman seperti tembakau juga diketahui memiliki efek untuk melindungi saraf (Ferchmin *et al.*, 2001) yang dibuktikan dengan penelitian tentang *Hippocampal slice* akut menggunakan NMDA yang berperan sebagai stimulus sitotoksik dari luar. Sembranoid tembakau memiliki 2 komponen utama yaitu (1*S*, 2*E*, 4*S*, 6*R*, 7*E*, 11*E*)- 2, 7, 11-cembratriene-4, 6-diol (α -CBT,1) dan (1*S*, 2*E*, 4*R*, 6*R*, 7*E*, 11*E*) 2, 7, 11-cembratriene-4, 6-diol (β -CBT,2) yang ditemukan pada tahun 1962 (Wahlber dan Enzel, 1987; Wahlberg dan Eklund, 1992) dan diketahui memiliki peran sebagai antikanker (El Sayed dan Sylverster, 2007).



Gambar 2.4 Struktur sembranoid pada daun tembakau (A) (Leffingwell, 1999; Sui *et al.*, 2018), struktur sembranoid dari karang lunak (B) (El Sayed dan Sylvester, 2007).

Senyawa terpenoid termasuk dalam golongan minyak atsiri yang memiliki derivat yaitu: monoterpenoid, sesquiterpenoid, dan diterpenoid (Silva *et al.*, 2012). Diterpenoid memiliki analog berupa sembranoid yang dapat ditemukan pada *Nicotiana tabaccum* (Yang *et al.*, 2015). Senyawa terpenoid dapat menghambat proses mitosis yaitu dengan menghambat siklus sel pada fase G2/M dan menstabilkan benang-benang *spindle* pada fase mitosis (Setiawati *et al.*, 2014).

Apoptosis maupun proliferasi pada sel terjadi selama siklus sel. Sel melakukan suatu aktivitas yang disebut siklus sel (Gambar 2.5.) yang dibagi menjadi 4 fase yakni Gap-1 (fase antara mitosis dan sintesis DNA, G1), Sintesis (S), Gap-2 (fase antara sintesis dan mitosis, G2) dan Mitosis (M). Fase S dan M adalah fase yang paling mudah dipengaruhi oleh berbagai faktor. Adanya faktor yang mempengaruhi sel, dapat menyebabkan terhentinya siklus sel pada fase G1 atau G2. Setelah adanya perbaikan DNA, maka pembelahan sel akan memasuki fase berikutnya. Namun, jika sel mengalami kerusakan yang tidak dapat diperbaiki, maka sel akan melakukan apoptosis yakni kematian sel terprogram melalui digesti enzimatik oleh dirinya sendiri (Wyllie *et al.*, 1980).



Gambar 2.5 Siklus sel (modifikasi) (Wong., 2019).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan Ekstrak Daun Tembakau dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Jember dan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember, pada bulan Oktober 2018 sampai Februari 2019. Pembuatan dan Pengujian ekstrak sampel terhadap sel kanker kolon dilakukan di Laboratorium Parasitologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, pada bulan Maret 2019. Uji GC-MS dilakukan di Laboratorium Biosain Politeknik Jember pada tanggal 14 November 2018 sampai selesai. Uji ELISA dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, pada bulan Maret 2019.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari: pipet *pasteur* steril, *conicall tube* steril 15 ml (Iwaki), *sentrifuge*, mikropipet, *mikrotube*, mikroskop *inverted* (Olympus), hemasitometer, *handcounter*, vortex, timbangan analitik, *96-well plate (tissue culture plate)* (Iwaki), tangki nitrogen cair, *tissue culture flask* 70 ml (Iwaki), inkubator CO₂ 5%, LAF (*Laminar Air Flow*), *ELISA reader*, sarung tangan, masker, dan tisu.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari: daun tembakau kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) yang diperoleh dari tembakau Ledok Ombo, Sel Kanker Kolon (WiDr) (ATCC CCL-218), sel vero (ATCC CCL-81), Tripsin-EDTA (Gibco), media RPMI, FBS, fungizon, streptomisin–penisilin (Gibco), MTT (Sigma), DMSO (E-Merck), SDS dalam 0,01 N HCl (E-Merck), PBS,

doxorubicin (Kalbe), metanol teknis, n-heksan, HCl 10%, dichloromethan, ethyl asetat, reagen *dragendraf*.

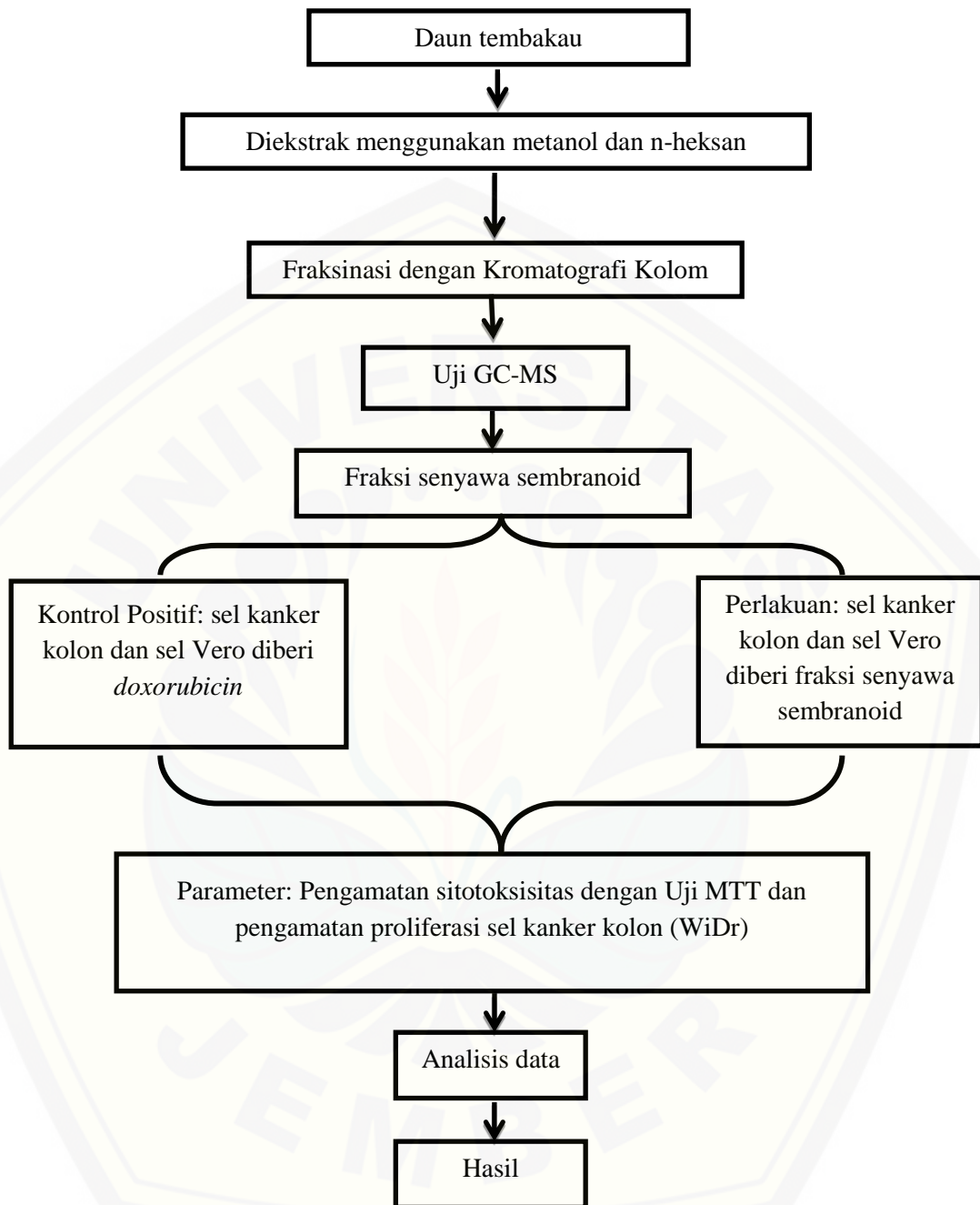
3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan *eksperimental laboratory in vitro* menggunakan *Post test only control group design*. Penelitian ini dilakukan pada kultur sel kanker kolon WiDr dan sel vero (sel normal) dengan perlakuan pemberian fraksi senyawa sembranoid daun tembakau konsentrasi 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, dan 128 µg/ml dan *doxorubicin* sebagai kontrol positif dengan konsentrasi 0,78 µg/ml. Pemberian fraksi senyawa sembranoid pada sel kanker kolon dan sel vero dilakukan tiga kali (triplo) pada masing-masing konsentrasi, begitu pula dengan pemberian *doxorubicin*. Perlakuan yang diberikan dibagi menjadi dua kelompok, yaitu:

1. Kontrol positif : sel kanker kolon diberi *doxorubicin* 0,78 µg/ml
2. Perlakuan : sel vero dan sel kanker kolon diberi fraksi sembranoid dengan konsentrasi 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, dan 128 µg/ml.

3.4 Prosedur Penelitian

Prosedur yang dilakukan dalam penelitian ini dimulai dengan ekstraksi daun tembakau kasturi menggunakan pelarut yang kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan kolom kromatografi. Setelah itu dilakukan uji GC-MS untuk mengetahui fraksi yang mengandung senyawa sembranoid. Kemudian fraksi yang mengandung sembranoid diaplikasikan pada sel kanker kolon dan sel vero dengan *doxorubicin* sebagai kontrol positif. Secara keseluruhan, alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Alur penelitian

3.4.1 Uji Sitotoksik menggunakan Metode MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Sel dengan konsentrasi 5×10^4 sel/sumuran didistribusikan ke dalam plate 96 sumuran dan diinkubasikan selama 24 jam agar sel dapat beradaptasi dan menempel di sumuran. Setelah 24 jam kemudian media diambil, dicuci dengan PBS sebanyak 100 μ L lalu ditambah 100 μ L media kultur RPMI (kontrol) maupun sampel, kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, media yang mengandung sampel dibuang, dicuci dengan 100 μ L PBS. Kemudian ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 100 μ L media yang mengandung MTT, inkubasi kembali selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Setelah 4 jam inkubasi, media yang mengandung MTT dibuang, kemudian ditambahkan 100 μ L larutan stopper SDS untuk melarutkan kristal formazan. Sel diinkubasi 12 jam pada suhu ruangan dan terlindung dari cahaya. Pada akhir inkubasi, plate digoyang-goyang sebentar secara horizontal, kemudian dibaca dengan ELISA reader pada λ 595 nm (Kusuma *et al.*, 2010). Data persen viabilitas sel diperoleh dari konversi masing-masing sumuran dengan rumus rumus :

$$\% \text{ Sel hidup} : \frac{(\text{Absorbansi Perlakuan} - \text{Absorbansi Kontrol Media})}{(\text{Absorbansi Kontrol Negatif} - \text{Absorbansi Kontrol Media})} \times 100\%$$

(Kusuma *et al.*, 2010).

3.4.2 Uji Proliferasi

Sel kanker kolon WiDr diambil dari inkubator CO₂, diamati dan dilakukan pemanenan serta perhitungan sel. Dilakukan pengenceran sel dengan media kultur kemudian 100 μ l sel ditransfer ke dalam masing-masing sumuran, disisakan 3 sumuran kosong untuk kontrol media. Diamati keadaan sel di mikroskop, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ dengan lama inkubasi mulai dari 24, 48, dan 72 jam. Setelah itu dibuat seri konsentrasi sampel untuk perlakuan. Kemudian x plat berisi sel dari inkubator dimasukkan dan media dalam sel dibuang. Sel dalam sumuran dicuci menggunakan PBS 100 μ l, kemudian PBS

dibuang. Setelah itu 100 µl seri konsentrasi sampel dimasukkan ke dalam sumuran dengan replikasi 3 kali (triplo) dan diinkubasi di inkubator CO₂. Kemudian dibuat stok MTT 5 mg/ml dan reagen MTT untuk perlakuan (0,5 mg/ml). Setelah itu media sel dibuang dan dicuci dengan PBS 1x. Kemudian 100 µl MTT 0,5 mg/ml ditambahkan ke setiap sumuran dan diinkubasi selama 2 sampai 4 jam. Kemudian ditambahkan stopper SDS 10% dalam 0,01 N HCl. Setelah itu, plate dibungkus dengan kertas atau alumunium foil dan diinkubasi di ruang gelap 12 jam. Kemudian plate dishaker selama 10 menit. Data yang didapat berupa absorbansi sel hidup yang diperoleh dari hasil pengukuran dengan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 595 nm (CCRC, 2017).

Penentuan konsentrasi fraksi senyawa sembranoid untuk uji proliferasi diperoleh dari IC₅₀ hasil uji sitotoksik, setelah itu dibuat seri konsentrasi ½ IC₅₀, IC₅₀, 2 IC₅₀, dan IC₅₀ untuk masing-masing sel Vero dan sel WiDr (Lampiran B).

3.5 Parameter Penelitian

Pengamatan dilakukan dengan melihat daya sitotoksik fraksi sebranoid daun tembakau pada sel normal (sel vero) dan sel kanker kolon, mengamati efek sitotoksis dan proliferasi fraksi senyawa sembranoid daun tembakau terhadap sel kanker kolon (WiDr).

3.6 Analisi Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis menggunakan analisis probit untuk mendapatkan IC₅₀ menggunakan SPSS 15. Analisis probit diperoleh dari prosentase viabilitas sel yang dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Sel hidup} : \frac{(\text{Absorbansi Perlakuan} - \text{Absorbansi Kontrol Media})}{(\text{Absorbansi Kontrol Negatif} - \text{Absorbansi Kontrol Media})} \times 100\%$$

Kemudian hasil persen sel hidup dimasukkan dalam program SPSS beserta masing-masing konsentrasi yang digunakan. Selanjutnya program SPSS akan menunjukkan hasil IC₅₀ dari konsentrasi yang digunakan. IC₅₀ menunjukkan kemampuan suatu senyawa atau ekstrak dalam menghambat 50% hidup sel. IC₅₀ < 100 µg/mL menunjukkan suatu senyawa bersifat agen antikanker, sedangkan IC₅₀

> 100 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan suatu senyawa bersifat kemopreventif (Darma *et al.*, 2009).

Setelah analisis probit, analisis dilanjutkan dengan uji *General Linier Model* (GLM) dengan taraf kepercayaan 95% atau $\alpha=0,05$ dan Uji *Post Hock* (*Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dan LSD) (Steel dan Torrie, 1993).



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Pemberian fraksi senyawa sembranoid dengan konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$, 32 $\mu\text{g/ml}$, 64 $\mu\text{g/ml}$, dan 128 $\mu\text{g/ml}$ tidak bersifat toksik terhadap sel vero (sel normal), dan pada konsentrasi 128 $\mu\text{g/ml}$ bersifat toksik pada sel WiDr. Konsentrasi optimal untuk menghambat 50% hidup sel WiDr yaitu pada konsentrasi IC_{50} 80,382 $\mu\text{g/mL}$. Uji lanjut antiproliferasi pada sel kanker kolon menunjukkan pemberian fraksi senyawa sembranoid dengan konsentrasi 4 IC_{50} (321,528 $\mu\text{g/mL}$) memiliki aktivitas antiproliferasi paling tinggi daripada konsentrasi yang lainnya. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian fraksi senyawa sembranoid dengan konsentrasi yang tinggi memiliki potensi sebagai agen antikanker dan antiproliferasi pada sel kanker kolon (WiDr). Dan konsentrasi optimal fraksi senyawa sembranoid yang dapat digunakan sebagai antiproliferasi yaitu konsentrasi 4 IC_{50} (321,528 $\mu\text{g/mL}$).

5.2 Saran

Adapun saran yang dapat diajukan untuk penelitian selanjutnya yaitu: perlu dilakukan fraksinasi yang lebih murni untuk memperoleh senyawa sembranoid. Perlu dilakukan uji lanjut seperti uji apoptosis dan antimigrasi dari fraksi senyawa sembranoid terhadap sel kanker kolon guna mengetahui pengaruh fraksi tersebut terhadap apoptosis dan migrasi dari sel kanker kolon. Selain itu, dilakukan juga uji imunositokimia untuk mengetahui enzim ataupun protein yang berperan dalam metabolisme sel ketika diberi perlakuan dengan fraksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agriculture Forestry & Fisheries, 2015. Production Guideline: Tobacco. Republic of South Africa: Department Agriculture, Forestry And Fisheries.
- Al-lihaibi, S. S., W. M. Alarif, A. Abdel-Lateff, S. N. Ayyad, A. B. Abdel-Naim, F. F. El-Senduny, dan F. A. Badria. 2014. Three New Cembranoid-Type Diterpenes from Red Sea Soft Coral *Sarcophyton glaucum*: Isolation and Antiproliferative Activity Against HepG2 Cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 1-81.
- Alteri, R., B. Durado, G. Ted, H. Annemarie, J. Eric, K. Debbie, K. Joan, L. Bernard, M. Cathy, M. Marji, P. Anthony, S. Mona, S. Scott, S. Robert, T. Brian, W. Dana, dan W. Gregg. 2014. *Colorectal Cancer Facts & Figure 2014-2016*. Atlanta: American Cancer Society.
- American Cancer Society. 2015. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. *Am Cancer Soc*. 800:1–64.
- American Cancer Society. 2017. Colorectal Cancer Fact & Figure 2017-2019. Atlanta: American Cancer Society Inc.
- American Cancer Society. 2018. *Chemotherapy and Radiation Therapy For Colorectal Cancer*. [[Chemotherapy for Colorectal Cancer.html](#) dan [Radiation Therapy for Colorectal Cancer.html](#). diakses tanggal 29 September 2018].
- Andersen, R. A. , P. D. Fleming, H. R. Burton, T. R. Hamilton-Kemp, dan T.G. Sutton. 1991. *J Agric Food Chem* 39:1280.
- Arif, J. M., S. S. Sawant, K. A. El-Sayed, M. Kunhi, P. M. Subraiman, M. Y. Shidiqui, D. T. A. Yousef, K. Al-Hussain, N. Mohammed, M. N. Al-Ahdal, dan F. Al-Khodairi. 2007. Antiproliferative Potential of Sarcophine And It's Semisynthetic Sulfur-Containing Derivatives gains Human Mamary Carcinoma Cell Lines. *Journal of Ntaural Medicines*. 61(2): 154-158.

ATTC Collection. <https://www.atcc.org/product/all/CCL-218.aspx> [diakses tanggal 28 November 2018]

Ayyad, S. N., A. Abdel-Lateff, K. O. Alfooty, H. Alorfi, T. M. Abdelghany, dan A. N. E. Hamed. 2015. Antiproliferative Effect Of Cembranoid Derivatives Obtain From Red Sea Soft Coral *Sarcophyton glaucum* On Human Colorectal Cancer Cell Lines. *Advances in Modern Oncology Research*. 1-9.

Bernstein, J., U. Shmeuli, E. Zadock, Y. Kashman, dan I. Néeman. 1974. Sarcophine A New Epoxy Cembranolide From Marine Origin. *Tetrahedron*. 30: 2817–2824.

Brivanlou, A. H. Dan E. J. Darnell. 2002. Signal Transduction and The Control Cell Ekspresion. *Science*. 295: 813-818

Bromberg, J. F., H. M. Wrzeszczynska, g. Devgan, Y. Zhao, G. R. Pestell C. Albanese, dan E. J. Darnell. 1999. STAT 3 as Oncogene. *Cell*. 98: 295-303.

Cahyono, B. 1998. *TEMBAKAU, Budi daya dan Analisis Tani*. Yogyakarta : Kanisius.

CCRC. 2017. Protokol *In vitro* Indonesian Society for Cancer Chemoprevention, CCRC(Cancer Chemoprevention Research Center) ISCC. Yogyakarta: UGM.

Coffer, P. J., L. Koenderman, dan P, R. De groot. 2000. The role of STATs in Myeoid Differentiation and leukimia. *Oncogene*. 19: 2511-2522.

Cowan, M. M. 1999. Plant Products As Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 564–82.

Darma, A. P., R. A. Ashari, P.A. Nugroho, A. Monikawati, I. A. Fauzi, A. Hermawan, E. Meiyanto. 2009. *Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanolik Herba Ciplukan (Physalis angulate L.) Pada Sel Kanker Leher Rahim*

Hela Melalui Modulasi Ekspresi Protein p53. Yogyakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada.

de Miranda, N. F., M. Nielsen, D. Pereira, M. van Puijenbroek, H. F. Vasen, F. J. Hes, T. van Wezel, dan H. Morreau. 2009. MUTYH-Associated Polyposis Carcinomas Frequently Lose HLA Class I Expression - A Common Event Amongst DNA-Repair-Deficient Colorectal Cancers. *J Pathol*. 219, 69–76.

Djajadi, D. 2015. Tobacco Diversity In Indonesia: A Review. *Journal of Biological Researches*. 20: 27-32.

Drummond, C. 2007. The Mechanism of Anti-tumour Activity of the DNA Binding Agent SN 28049. *Thesis*. New Zealand: University of Auckland.

Duan, S., Y. Du, X. Hou, N. Yan, W. Dong, X. Mao, dan Z. Zhang. 2016. Chemical Basis of The Fungicidal Activity of Tobacco Extract against *Valsa mali*. *Molecules*. 21 (1743): 1-17.

El-Sayed, K., dan P. W. Sylvester. 2007. Review: Biocatalytic and Semisynthetic Studies of The Anticancer Tobacco Cembranoids. *Expert Opin. Investig. Drug*. 16(6).

Evans, W. C. 1996. *Trease and Evans Pharmacognosy* 14th Edition. London: Wb Saunders Company. Hal 251.

Fathiazad, F. A., R. Delazar, dan S. D. Amiri. 2006. Sarker, Extraction Of Favonoids And Quantification Of Rutin From Waste Tobacco Leaves, Iran. *J. Pharm. Res*. 3: 222–227

Ferchmin, P. A., R. J. Lukas, dan R. M. Hann. 2001. Tobacco Cembranoids Block Behavioral Sensitization To Nicotine And Inhibit Neuronal Acetylcholine Receptor Function. *J Neurosci Res*. 64(1): 18-25.

Ferlay, J., I. Soerjomataram, dan M. Ervik. 2013. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incident and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11*. France: International Agency For Research on Cancer.

- Ferreira, A. L. A., L. S. Matsubara, dan B. B. Matsubara. 2008. Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Cardiovasc. Hematol, Agents Med. Chem.*, 6: 278281.
- Fink, S. L., dan B. T. Cookson. 2005. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanism Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect. Immune*. 73(4): 1907-1916.
- Foster, J. S., D. C. Henley, S. Ahamed, dan J. Wimalasena. 2001. Estrogen And Cell Cycle Regulation in Breast Cancer. *Trend in Endocrinology and Metabolism*. 12(7): 320-327.
- Graham, I. A., K. Besser, S. Blumer, C. A. Branigan, T. Czechowski, L. Elias, I. Guterman, D. Harvey, P. G. Isaac, dan A. M. Khan. 2010. The Genetic Map of *Artemisia Annu L*. Identifies Loci Affecting Yield of The Antimalarial Drug Artemisinin. *Science*. 327: 328–331.
- Granados-Romero, J. J., A. I. Valderaama-Trevino, E. H. Contereras-Flores, B. Barrera-Mera, M. H. Enriquez, K. Uriarte-Ruiz, J. C. Ceballos-Villalva, A. G. Estrada-Mata, C. A. Rodriguez, dan G. Arauz. Pena. 2017. Colorectal Cancer: A Review. *International Cancer of Research in Medical Sciences*. 5(11): 4667-4676.
- Grinberg, L. N., E. A. Rachmilewitz, dan H. Newmark. 1994. Protective Effect of Rutin Against Hemoglobin Oxidation. *Biochem Pharmacol*. 43:643-649.
- Gu, X. G., dan J. H. Tong. 2006. Simultaneous Determination Of Six Polyphenols In Tobaccos By High Performance Liquid Chromatographic Method. *J. Anhui Agric. Univ*. 33: 134–137.
- Hailat, M. M., Y. H. Ebrahim, M. M. Moheyldin, A. A. Goda, B. a. Siddique, dan A. K. 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. *Bioorg. Med. Chem*. 15: 3911-3921.

Hanahan, D., dan R. A. Weinberg. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 144(5) :646-74.

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. *Bioorg. Med. Chem.* 19: 4928–4934.

Hegazy, M. F. A. A. El-Beih, A. Y. Moustofa, A. A. Hamdy. M. A. Alhammady, R. M. Selim, M. Abdel-Rehim, dan P. W. Pare. 2011. Cytotoxic Cembranoids From The Red Sea Soft Coral *Sarcophyton glaucum*. *Natural Product Communication*. 6(12):1-4.

Herawati, W. D. 2016. *Teknik Budidaya Tembakau Varietas Virginia, Cetakan Ketiga*. Jogjakarta : Trans Idea Publishing.

Herminingsih, H. 2014. Hubungan Adaptasi Petani Terhadap Perubahan Iklim Dengan Produktivitas Tembakau Pada Lahan Sawah Dan Tegalan Di Kabupaten Jember. *JSEP*. 7(2): 31-44.

Horvath, C. M., dan E. J. Darnell. 1997. The state of the STAT's : recent Development in the study of signal Transduction to the nucleus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:233-239.

<http://balittas.litbang.pertanian.go.id>[diakses tanggal 25 November 2018]

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>[diakses tanggal 8 Juni 2019]

Ihle, J. N. 1996. STAT's Signal Transducers and Activators of Transcription. *Cell*. 84: 331-334.

International Agency for Research on Cancer (IARC). 2018. *Latest Global Cancer Data: Cancer Burden Rises 18.1 Million New Case and 9.6 Million Cancer Death in 2018*. France: Course Albert Thomas, 69372 Lyon CEDEX 08.

- Ishikawa, T., M. Oshima, dan H. R. Herschman. 2011. Cox-2 Deletion In Myeloid And Endothelial Cells, But Not In Epithelial Cells, Exacerbates Murine Colitis. *Carcinogenesis*.32(3):417-426.
- King, R. J. B. 2000. *Cancer Biology*. Edisi Ke-2. London : Pearson Education Limited. 157-165.
- Kumar, V., A. K. Abas, dan N. Foustro. 2005. *Patholgy Basic of Disease*. New York: Elsevier Inc.
- Kusuma, W. A., N. A. Nurulita, dan D. Hartanti. 2010. Efek Sitotoksik Dan Antiproliferatif Kuersetin Pada Sel Kanker Kolon WiDr. *Pharmacy*. 7(3)1-16.
- Leffingwell, J. C. 1999. *Leaf Chemistry: Basic Chemical Constituent of Tobacco Leaf And Differences Among Tobacco Types*. Georgia, USA: Leffingwell And Associates. In Davis, D. L., dan M. T. Nielson. 1999. *Tobacco: Production, Chemsitry, and Technology*. Blackwell Science (Pub).
- Levine, J. S., dan D. J. Ahnen. 2006. Clinical practice. Adenomatous polyps of the colon. *N Engl J Med*. 355: 2551-2557.
- Li, Q. H., J. L. Jin, F. Wu, Y. X. Li, S. J. You, H. Z. Cao, D. Li, dan P. Y. Xu. 2012. Effect of Curcumin on Proliferation, Cell Cycle and Caspase and MCF-7 Cells. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 16(12): 864-870
- 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*. *Molecules*. 20: 13324-13335.
- Lupertz, R., W. Watjen, R. Kahl, dan Kovolou. 2010. Dose And Time Dependent Effects of *Doxorubicin* on Cytotoxicity, Cel Cycle and Apoptotic Cell Death in Human Colon Cancer Cell. *Toxicology*. 271: 115-121.

- Ma, D., Y. Hu, C. Yang, B. Liu, L. Fang, Q. Wan, W. Liang, G. Mei, L. Wang, dan H. Wang. 2016. Genetic Basis For Glandular Trichome Formation In Cotton. *Nat. Commun.* 7: 1–9.
- Machado, P. A., H. Fu, R. J. Kratochivi, Y. Yuan, T. S. Hahm, C. M. Sabliov, C. I. Wei, dan Y. M. Lo. 2010. Recovery of Solanesol from Tobacco As Avalue Added Product For Alternative Application. *J. Bioresources Technology.* 101: 1091-1096.
- Mao, X., X. Hou, Y. Du, X. Yuan, P. Yan, W. Dong, J. Zhang, H. Wang, dan Z. Zhang. 2017. Isolation and Anti HepG2 Activity Study of A Cembratriene-diol from Tobacco. *Chin. Tob. Sci.* 38: 80-85.
- Mora, L. B., R. Buettner, J. Seigne, J. Diaz, N. Ahmad, T. Bowman, R. Falcone, R. Fairelough, A. Cantor, dan C. Moro-Cacho. 2002. Constitutive Activation of STAt3 on Human Prostate Tumors And Cell Line: Direct Inhibition of STAT3 signaling Includes Apoptosis of Prostate Cancer Cell. *Cancer Res.* 62: 6659-6666.
- Mulyawati, A. P., E. K. Hayati, A. Nasihuddin, dan Tukimin. 2010. Uji Efektivitas dan Aktivitas Senyawa Ekstrak Biji Sirsak (*Annona muricata* Linn) yang Bersifat Bioaktif Insektisida Nabati Terhadap Hama Thripsin. *Alchemy.* 2(1):1-9.
- Nacoulma, A. P., V. Megalizzi, L. R. Pottier, M. De Lorenzi, S. Thoret, J. Dubois, M. O. Vandepute, P. Duez, D. Vereecke, dan M. El Jaziri. 2013. Potent Antiproliferative Cembrenoids Accumulate In Tobacco Upon Infection with *Rhodococcus fascians* and Trigger Unusual Microtubule Dinamycs in Human Glioblastoma Cells. *Plos ONE.* 8: e77529.
- Nugroho, L. H., A. M. G. Peltenburg-Looman, H. de Vos, M. C. Verberne, dan R. Verpoorte. 2002. Nicotine and Related Alkaloids Accumulation in Constitutive Salycyclic Acid Producing Tobacco Plants. *J Plant Science.* 162: 575-581.
- Palic, R., G. Stojanovic, S. Alagic, M. Nikolic, dan Z. Lepojevic. 2002. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of The Esential Oil and CO₂ Extract of Semi-oriental Tobacco, Prilep. *Flavour Fragr J.* 17: 323-326.

- Palozza, P., S. Serini, N. Maggiano, T. Giuseppe, P. Navarra, dan F. O. Ranelletti. 2005. β -Carotene Downregulates the Steady –State and Heregulin a Induced Cox-2 Pathways in Colon Cancer Cell. *J. Nutr.* 135: 129-136.
- Paramartha, D., dan Y. Lazuardi. 2013. Pemanfaatan Nikotin Pada Daun Tembakau Untuk Memproduksi Bioinsektisida Dengan Proses Ekstraksi Cair-Cair. *Jurnal teknologi Kimia dan Industri.* 2(2): 233-239.
- Podlejski, J., dan W. Olejniczak. 1983. Methods and Technique In Research of Tobacco Flavour. *Nahrung.* 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). *Pharmacy.* 7(1): 1-10.
- Prayong, B., dan Weerapreeyakul. 2008. Cytotoxic Activity Screening of Some Indigenouse Thai Plants. *Elsever:* 79(4).
- Propivanova, B. K., K. Kazuya, W. Yu, K. Toshikazu, K. Takashi, K. Shiuchi, O. Masanobo, F. Chifumi, dan M. Naofumi. 2008. Blocking TNF- α in Mice Reduces Colorectal Carcinogenesis Associated With Chronic Colitis. *The Journal of Clinical Inflammation.* 118(2).
- Quintanilla-Martinez, I., M. Kremer, K. Specht, J. Calzada-Wack, M. Nathrath, R. Schaich, H. Hofler, dan F. Freud. 2003. Analysis of Signal Transducer and Transcription 3 (STAT 3) Pathway in Multiple Myeloma: STAT 3 Activation and cyclin D1 dysregulation are Mutually Exclusive Event. *Am. J. Pathol.* 162: 1446-1461.
- Risio, M. 2010. The Natural History Of Adenomas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 24: 271-280.
- Roethle, P. A., dan D. Trauner. 2008. The Chemistry of Marine Furanocembranoids, Pseudopteranes, gersolanes, and Related Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* 25: 298-317.

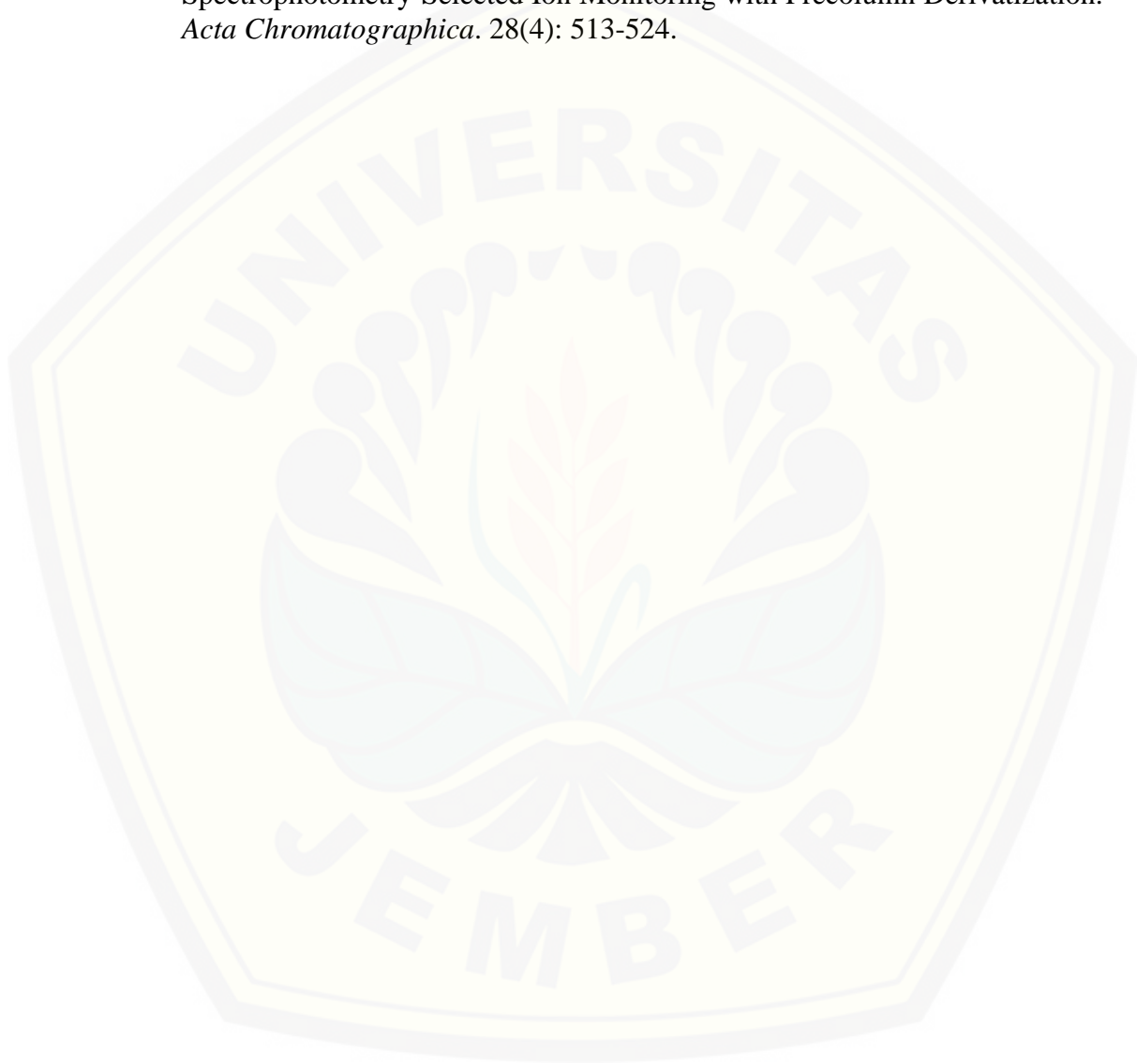
- Saito, Y., H. Takizawa, S. Konishi, D. Yoshida, dan S. Mizusaki. 1985. Identification of Cembratriene-4,6-diol as Antitumor Promoting Agent from Cigarette Smoke Condensate. *Carcinogenesis*. 6: 1189-1194.
- Saito, Y., H. Nishino, D. Yoshida, S. Mizusaki, dan A. Ohnishi. 1988. Inhibitor of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate Stimulated $^{32}\text{P}_i$ Incorporation Into Phospholipid and Protein Phosphorylation by 2,7,11,-cembratriene-4,6-diol, an Antitumor Promoting Agent. *Oncology*. 45: 122-126.
- Sambantham, P. 1985. Analgesic Activity of Certain Bioflavonoids. *Indian J Pharm Sci*. 47: 230-231.
- Sawant, S. S., D. T. Youssef, J. Reiland, M. Ferniz, D. Marchetti, dan K. A. El Sayed. 2006. Biocatalytic And Antimetastatic Studies Of The Marine Cembranoids Sarcophine And 2-Epi-16-Deoxysarcophine. *J. Nat. Prod.* 69: 1010–1013.
- Schatzkin, A., L. S. Freedman, S. M. Dawsey, dan E. Lanza. 1994. Interpreting precursor studies: What polyp trials tell us about large-bowel cancer. *J Natl Cancer Ins*. 86:1053-1057.
- Schillmiller, A. L., R. L. Last, dan E. Pichersky. 2008. Harnessing Plant Trichome Biochemistry For The Production Of Useful Compounds. *Plant. J.* 54: 702–711.
- Setiawati A., E. P. Septisetyani, T. R. Wijayanti, dan M. R. Rokhman. 2014. Sambung Nyawa (*Gynura Procumbens* (Lour.) Merr.) sebagai Agen Kemopreventif. *Research Gate*. 1-13.
- Shen, J., dan X. Shao. 2006. Determination of Tobacco Alkaloids by Gas Chromatography-Mass Spectrometry Using Cloud Point Extraction as A Preconcentration Step. *J Analytica Chimica Acta*. 561: 83-87.
- Siegel, R. L., K. Miller, dan A. Jemal. 2015. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 65: 5-29.

- Silva, E. D., N. A. J. C. Furtado, J. Aleu, dan I. G. Collado. 2012. Terpenoid Biotransformation by *Mucor* Species. *Phytochem Rev.* 1-20.
- Sobolewski, C., C. Corella, M. Dicato, L. Ghibelli, dan M. Dieldrich. 2010. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Maligancies. *International Journal of Cell Biologi.* 1-21.
- Steffensen, I. L., J. E. Paulsen, dan J. Alexander. 1997. Genetic and environmental factors in colorectal cancer. Mutations in the familial adenomatous polyposis gene. *Tidsskr Nor Laegeforen.* 117: 2046–2051.
- Steel, R. G. D., dan J. H. Torrie. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika (Pendekatan Biometrik) Penerjemah B. Sumantri.* Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Sudiana, K. I. 2008. *Patobiologi Molekuler Kanker.* Jakarta: Salemba Medika.
- Su, C., B. Wong, C. Chin, Y. Wu, dan J. Su. 2013. Oxygenated Cembranoids From Soft Coral *Sinularia flexibilis*. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 4317-4325.
- Sui, J., C. Wang, X. Liu, N. Fang, Y. Liu, W. Wang, N. Yan, H. Zhang, Y. Du, X. Liu, T. Lu, Z. Zhang, dan H. Zang. 2018. Fromation of α and β Cembatriene-Diols in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) is Regulated by Jasmonate Signaling Component Via Manipulating Multiple Cembranoid Synthetic Genes. *Molecules.* 23: 1-14.
- Szymanski, P.T., B. Kuppast, S. A. Ahmed, S. Khalifa, dan H. Fahmi. 2012. Sarcophine-Diol, a Skin Cancer Chemopreventive Agent, Inhibits Proliferation and Stimulates Apoptosis in Mouse Melanoma B16F10 Cell Line. *Mar. Drugs.* 10: 1-19.
- Tacar, O., P. Sriamornsak, dan R. C. Dass. 2013. *Doxorubicin: An Update On Anticancer Molecular Action, Toxicity and Novel Drug Delivery System.* *J Pharm Pharmacol.* 65(2): 157-170.

- Tan, C. P., Y. Y. Lu, N. L. Ji, dan W. Z. Mao. 2014. Metallomics Insight Into The Programmed Cell Death Induced By Metal Based Anticancer Compound. *Metallomics*. 6: 987-995.
- The Editorial Committee of the Administration Bureau of Flora of China, Flora of China. 2005. Beijing: Beijing Science & Technology Press, vol. 67, p. 152.
- Thompson, E. B. 1985. Drug Bioscreening: Drug Evaluation Technique in Pharmacology. New York: Graceway Publishing Company.
- Ueda, J. Y., Y. Tezuka, H. A. Banskota, L. Q. Tran, Y. Harimaya, I. Saiki, dan S. Kadota. 2002. Antiproliferative Activity of Vietnamese Medicinal Plants. *Biol. Pharm. Bull.* 25(6): 753-760.
- Wahlberg, I., dan C. R. Enzell. 1987. Tobacco Isoprenoids. *Nat. Prod. Rep.* 4: 237-276.
- Wahlberg, I., dan A. M. Eklund. 1992. *Cembranoids, Pseudopteranoloids And Cubitanoids Of Natural Occurrence*. In: Herz, W., G. W. Kirby, R. E. Moore, W. Steglich, dan C. H. Tamm, editors. *Progress In The Chemistry Of Organic Natural Products, Vol. 59*. Wien, New York: Springer-Verlag. 141-294.
- Wong, E. <http://www.pathophys.org/introneoplasia>[diakses pada 26 Juni 2019].
- Wyllie, A. H., J. F. Kerr, dan A. R. Curie. 1980, Cell Death : The Significant of Apoptosis, 68, 251, *Int. Rev Cytol.*
- Yang, C.Y., L. J. Mo, dan P. L. Sun. 2015. Review On Chemical Constituents And Bioactivities Of Nicotiana Tabacum. *Nat. Prod. Res. Dev.* 28: 1657.
- Xu, Y. J., C. M. Bai, K. J. Zhong, J. G. Huang, W. Y. Tang, X. Lu, dan G. W. Xu. 2006. Analysis Of Alkaloids In Tobacco By Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chin. J. Anal. Chem.* 34: 382-384.

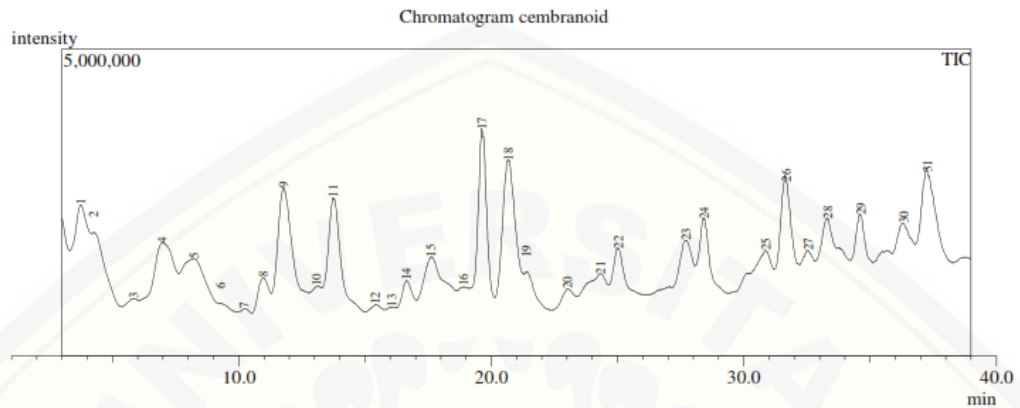
Zhang, X., V. Kundoor, S. Khalifa, D. Zeman, H. Fahmi, dan C. Dwivedi. 2007. Chemopreventive effects of Sarcophine-diol on Skin Tumor Development in CD-1 mice. *Cancer Lett.* 253: 53-59.

Zhou, Y., Y. Yang, X. L. Li, Z. Y. Chen, Q. B. Liu, X. L. Zhu, dan J. Yang. 2016. Determination of cemrenediols in Tobacco by Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry-Selected Ion Monitoring with Precolumn Derivatization. *Acta Chromatographica.* 28(4): 513-524.

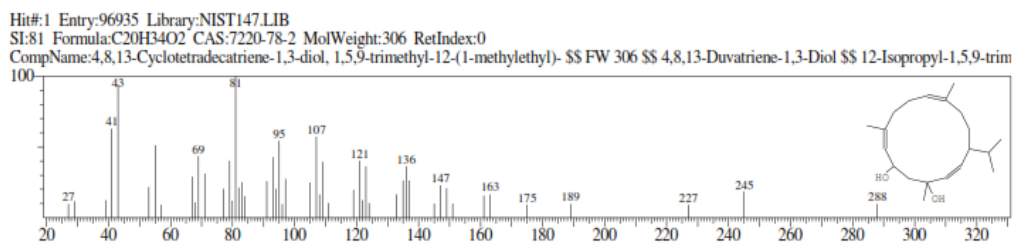


LAMPIRAN

A. Hasil Analisis Gas Chromatography Mass Spectrophotometri (GCMS) dengan Waktu 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	Tetrapentacontane, 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-trir	43.00
28	33.338	47275238	4.48	989287	3.58	1-Pentacontanol	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	Oxirane, 2-decyl-3-(5-methylhexyl)-, cis-(./-).	57.05
31	37.285	61773846	5.85	1508330	5.46	9-Octadecenamide, (Z)-	59.00
		1056347889	100.00	27616710	100.00		



B. Penentuan Konsentrasi Fraksi Senyawa Sembranoid Daun Tembakau

Kasturi (*Nicotiana tabacum* L.)

➤ Jumlah Sel yang dihitung untuk ditanam pada tiap well per *plate* (mL^{-1})

$$\begin{aligned} \text{Jumlah sel yang dihitung} &= \frac{\text{jumlah sel pada tiap kamar (1+2+3+4)}}{4} \times 10^4 \\ &= 79 \times 10^4 \\ &= 790000 \text{ cell/mL} \end{aligned}$$

Ekstrak Fraksi Senyawa Sembranoid

$$\begin{aligned} \diamond V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 1600 \times 128 &= V_2 \times 100000 \\ V_2 &= 2,048 \end{aligned}$$

Karena pengambilan menggunakan mikropipet tidak dapat dilakukan jika 0,048, maka V_2 yang diambil dari stok senyawa adalah 2 μl .

2 μl + 1600 μl media kultur RPMI (digunakan untuk konsentrasi 128 $\mu\text{g/mL}$).

Untuk pembuatan konsentrasi dibawah 128, maka diambil 800 μl larutan dari tabung konsentrasi 128 dan diresuspensi kedalam tabung baru berisi media kultur RPMI 800 μl .

Doxorubicin (sebagai kontrol positif)

$$\begin{aligned} \diamond V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 1600 \times 0,78 &= V_2 \times 2000 \\ V_2 &= 1,603 \end{aligned}$$

Pengambilan menggunakan mikropipet tidak dapat dilakukan jika 0,003 maka V_2 yang diambil dari stok *Doxorubicin* dibulatkan menjadi 2 μl .

2 μl + 1600 μl media kultur RPMI (digunakan untuk konsentrasi 0,78 $\mu\text{g/mL}$).

Penentuan Konsentrasi untuk uji Proliferasi

1. Sel WiDr

$$\text{Dox} = 0,78$$

$$\frac{1}{2} \text{IC}_{50} \text{ WiDr} = 40,191$$

$$\text{IC}_{50} \text{ WiDr} = 80,382$$

$$2 \text{IC}_{50} \text{ WiDr} = 160,764$$

$$4 \text{IC}_{50} = 321,528$$

2. Sel Vero

$$\text{Dox} = 0,78$$

$$\frac{1}{2} \text{IC}_{50} \text{ Vero} = 68,845$$

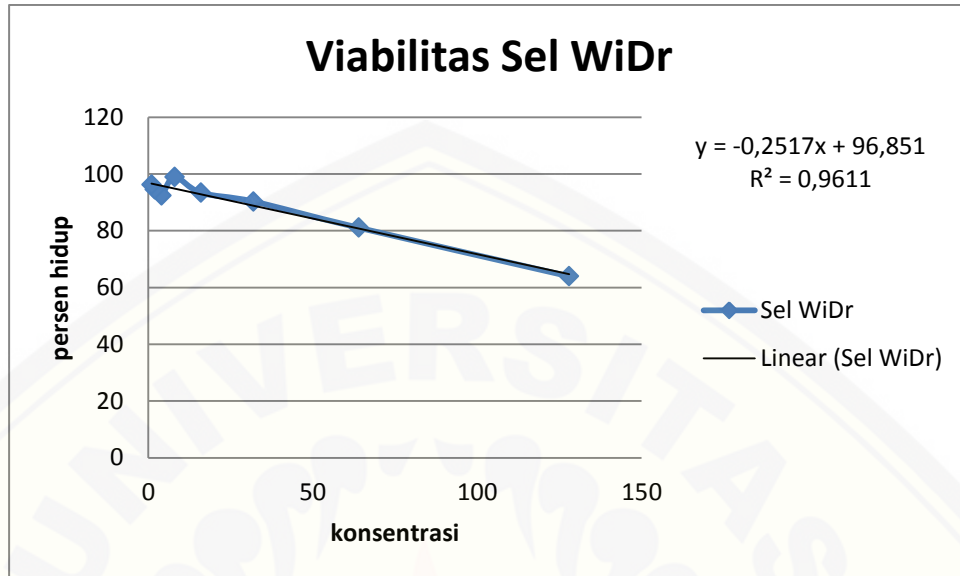
$$\text{IC}_{50} \text{ Vero} = 137,690$$

$$2 \text{IC}_{50} \text{ Vero} = 275,38$$

$$4 \text{IC}_{50} \text{ Vero} = 550,76$$

C. Grafik Persamaan regresi Linier

1. Viabilitas Sel WiDr



2. Viabilitas Sel Vero

