

AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETANOL
Sargassum duplicatum, *Padina australis*, DAN TAURIN SEBAGAI
SUPRESOR GEN *p21* TERHADAP SEL KANKER SERVIKS (*HeLa*)

(Tesis)

Oleh

YOSI DWI SAPUTRA



PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023

ABSTRAK

AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETANOL *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, DAN TAURIN SEBAGAI SUPRESOR GEN *p21* TERHADAP SEL KANKER SERVIKS (*HeLa*)

Oleh

YOSI DWI SAPUTRA

Kanker merupakan kondisi patologis yang menjadi salah satu utama penyebab kematian di dunia. Selama beberapa dekade terakhir penerapan berbagai strategi pencegahan dan pengobatan kanker terutama kanker serviks banyak dikembangkan. Berdasarkan beberapa penelitian secara *in vitro*, diketahui bahwa ekstrak etanol *Sargassum duplicatum*, dan *Padina australis*, mengandung fucoidan yang memiliki bioaktivitas pada sel seperti induksi apoptosis, antikanker, dan antiproliferasi. Kemampuan fucoidan tersebut berpotensi untuk dijadikan sebagai agen kemopreventif dan antikanker pada berbagai jenis kanker termasuk kanker serviks *HeLa*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui mekanisme senyawa bioaktif yang terkandung didalam ekstrak *Sargassum duplicatum*, *Padina australis* dan Taurin terhadap sitotoksitas, antiproliferasi dan ekspresi gen *p21* sel kanker serviks (*HeLa*). Ekstraksi *Sargassum duplicatum* dan *Padina australis* dilakukan dengan metode maserasi, dengan menggunakan pelarut etanol analyse. Uji sitotoksitas pada penelitian ini menggunakan beberapa seri konsentrasi yaitu 62,5, 125, 250, 500, 1000, dan 2000 ppm. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Sargassum duplicatum*, *Padina australis* bersifat sitotoksik terhadap sel *HeLa* mampu menurunkan viabilitas sel kanker serviks *HeLa* secara signifikan dibandingkan kontrol sel serta kontrol obat Doxorubicin. Selain itu *Sargassum duplicatum* dan *Padina australis* bersifat antiproliferatif dapat dibuktikan dengan nilai *doubling time* masing - masing perlakuan lebih tinggi dari kontrol yaitu 38 jam, sedangkan pada perlakuan *Sargassum duplicatum* konsentrasi 1000 dan 2000 ppm *doubling time* mencapai 235 dan 326 jam, perlakuan *Padina australis* konsentrasi 500 ppm mencapai 319 jam. Perlakuan taurin menunjukkan waktu yang berturut-turut dari konsentrasi 62,5-2000 ppm yaitu 38 jam. Hal tersebut diduga sebagian besar sel mampu meregulasi senyawa taurin yang membuat senyawa tersebut tidak efektif dalam penghambatan. Selain itu *Sargassum duplicatum*, dan *Padina australis* mampu meningkatkan ekspresi *p21* yang dibuktikan dengan meningkatnya nilai ekspresi gen *p21* dibandingkan dengan kontrol. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol *Sargassum duplicatum* dan *Padina australis* memiliki potensi dikembangkan sebagai agen antikanker pada kanker serviks *HeLa*.

Kata Kunci : *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, Taurin, Sitotoksik, Antiproliferasi, dan Ekspresi *p21*.

ABSTRACT

ANTICANCER ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACT *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, AND TAURINE AS *p21* GENE SUPPRESSORS AGAINST CERVIC CANCER CELLS (*HeLa*)

By

Yosi Dwi Saputra

Cancer is a pathological condition which is one of the main causes of death in the world. Over the last few decades the application of various strategies for the prevention and treatment of cancer, especially cervical cancer, has been developed. Based on several *in vitro* studies, it is known that the ethanol extracts of *Sargassum duplicatum* and *Padina australis* contain fucoidan which has bioactivity in cells such as induction of apoptosis, anticancer and antiproliferation. The ability of fucoidan has the potential to be used as a chemopreventive and anticancer agent in various types of cancer, including *HeLa* cervical cancer. This study aims to determine the mechanism of the bioactive compounds contained in the extracts of *Sargassum duplicatum*, *Padina australis* and Taurine on cytotoxicity, antiproliferation and expression of the *p21* gene in cervical cancer cells (*HeLa*). Extraction of *Sargassum duplicatum* and *Padina australis* was carried out by maceration method, using ethanol analyse. The cytotoxicity test in this study used several concentration series, namely 62.5, 125, 250, 500, 1000 and 2000 ppm. The results of this study indicate that the ethanol extract of *Sargassum duplicatum*, *Padina australis* is cytotoxic to *HeLa* cells and can significantly reduce the viability of *HeLa* cervical cancer cells compared to control cells and the drug Doxorubicin. In addition, *Sargassum duplicatum* and *Padina australis* are antiproliferative which can be proven by the doubling time value of each treatment which is higher than the control, which is 38 hours, whereas in the treatment of *Sargassum duplicatum* concentrations of 1000 and 2000 ppm the doubling time reaches 235 and 326 hours, the treatment of *Padina australis* concentrates 500 ppm reaches 319 hours. The taurine treatment showed successive times from concentrations of 62.5-2000 ppm, namely 38 hours. It is suspected that most cells are able to regulate taurine compounds which make these compounds ineffective in inhibition. In addition, *Sargassum duplicatum*, *Padina australis* was able to increase *p21* expression as evidenced by the increased expression of the *p21* gene compared to the control. Based on the results of this study it can be concluded that the ethanol extracts of *Sargassum duplicatum* and *Padina australis* have the potential to be developed as anticancer agents in *HeLa* cervical cancer.

Keywords: *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, Taurine, Cytotoxic, Antiproliferation, and *p21* Expression.

**AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETANOL
Sargassum duplicatum, *Padina australis*, DAN TAURIN SEBAGAI
SUPRESOR GEN *p21* TERHADAP SEL KANKER SERVIKS (*HeLa*)**

Oleh

Yosi Dwi Saputra

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
MAGISTER SAINS

Pada

**Program Studi Magister Biologi
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

Judul Tesis : **AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK
ETANOL *Sargassum duplicatum*,
Padina australis, DAN TAURIN SEBAGAI
SUPRESOR GEN *p21* TERHADAP SEL
KANKER SERVIKS (*HeLa*)**

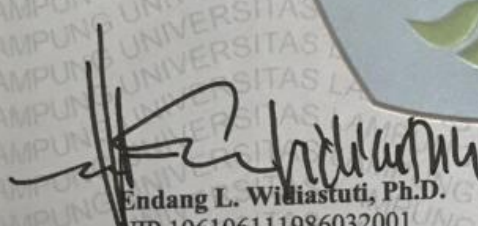
Nama Mahasiswa : **Yosi Dwi Saputra**

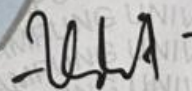
NPM : 2127021013

Jurusan : Magister Biologi

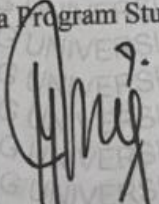
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam




Endang L. Widiastuti, Ph.D.
NIP.196106111986032001


Prof. Dr. Med. Sc. Apt. Melisa Intan Berliana
NIP.197909192010122002

2. Ketua Program Studi Magister Biologi


Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc.
NIP. 196603051991032001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Endang L. Widiastuti., Ph.D

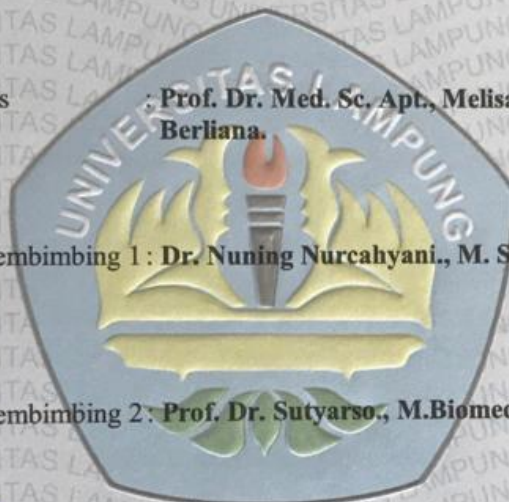
Sekretaris

: Prof. Dr. Med. Sc. Apt. Melisa Intan Berliana.

Penguji

Bukan Pembimbing 1 : Dr. Nuning Nurcahyani., M. Sc.

Bukan Pembimbing 2 : Prof. Dr. Sutyarso., M.Biomed



Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 197110012005011002

3. Direktur Program Pascasarjana



Prof. Dr. Ahmad Saudi Samosir, S.T., M.T
NIP. 197104151998031005

4. Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 27 Maret 2023

**SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN TESIS**

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama	: Yosi Dwi Saputra
NPM	: 2127021013
Prodi	: Magister Biologi
Fakultas	: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi	: Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya dan sejujurnya, bahwa tesis saya berjudul:

**“ AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETANOL
Sargassum duplicatum, *Padina australis*, DAN TAURIN SEBAGAI
SUPRESOR GEN *p21* TERHADAP SEL KANKER SERVIKS (*HeLa*) “**

Dengan ini menyatakan bahwa baik gagasan, tulisan, data, maupun pembahasannya adalah **benar** karya saya sendiri yang saya susun dengan mengikuti norma dan etika akademik yang berlaku.

Demikian pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila dikemudian hari terbukti pernyataan saya ini tidak benar, maka saya bersedia mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 27 Maret 2023

Yang menyatakan,



(Yosi Dwi Saputra)

NPM: 2127021013

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Yosi Dwi Saputra lahir di Natar, Provinsi Lampung, Kabupaten Lampung Selatan pada tanggal 04 September 1998 merupakan anak kedua dari dua saudara. Penulis lahir dari pasangan suami istri Bapak Margono dan Ibu Sawiyem. Pekerjaan orang tua buruh bangunan dan ibu rumah tangga. Penulis sekarang bertempat tinggal di Dusun IV Sari Rejo Natar, RT 13, RW 06, Kecamatan Natar, Lampung Selatan.

Peneliti menyelesaikan pendidikan di Sekolah Dasar di SD Negeri 2 Negara Ratu di Kecamatan Natar Kabupaten Lampung Selatan pada tahun 2010. Pada tahun itu juga peneliti melanjutkan Pendidikan di SMP Negeri 1 Natar Kecamatan Natar dan tamat pada tahun 2012, kemudian melanjutkan Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 1 Natar pada tahun 2012 dan selesai pada tahun 2015. Pada tahun 2016 peneliti melanjutkan pendidikan di perguruan tinggi negeri, tepatnya di Universitas Lampung Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam pada Program Studi Biologi Murni dan meraih gelar Sarjana Sains (S.Si) pada tahun 2020. Pada tahun 2021, penulis tercatat sebagai mahasiswa Program Studi Magister Biologi FMIPA Universitas Lampung, Penulis melakukan penelitian sebagai bahan penyusun tugas akhir di Laboratorium Biomolekuler Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung dan *Cell Culture Assay Laboratory*, *Clinical Biochemistry Laboratory* Jurusan Farmasi Universitas Padjajaran Bandung. Hingga akhirnya penulis berhasil menyelesaikan pendidikannya Magisternya pada 27 Maret 2023 dengan tesis yang berjudul **AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETANOL *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, DAN TAURIN SEBAGAI SUPRESOR GEN *p21* TERHADAP SEL KANKER SERVIKS (*HeLa*).**

PERSEMBAHAN

Puji syukur kehadiran Allah SWT

Tuhan yang Maha Esa dan Maha Sempurna atas

Ridho dan Karunia-nya. Kebagian ini dapat kuraih

Kupersembahkan karya kecilku ini. Buah manis dari perjuangan dan jerih payahku kepada :

Kedua orang tuaku tesayang Bapak Margono dan Ibu Sawiyem yang telah memberikan kasih dan sayangnya yang sangat luar bisa dalam membesarkanku, mendidik, mendoakan serta merestui setiap langkahku ini dalam mewujudkan cita-citaku.

Kakakku Desca Ema Wati

Terima kasih untuk segalanya cinta dan dukungan yang kau berikan.

Ponakanku Radhitya Azka Chandra Pratama, Rakha Chandra Winata,

& Raffasyah Arfa Chandra

Terima kasih sudah menjadi ponakan yang lugu dan manis untukku.

Para Dosen dan Guru yang sangat berjasa

Tanpa kalian tak kan mungkin saya bisa sampai di sini.

Para sahabat dan Teman Seperjuanganku

Magister Biologi 2021

Terima kasih untuk canda, tawa, tangis, dan perjuangan yang kita lewati bersama serta kenangan manis yang telah kalian berikan kepada ku.

Almamater tercinta "Universitas Lampung"

MOTO

Always grateful, whatever the ordeal problem that you passed stay grateful and you have to be sure that behind every trial there must be a story even more beautiful, hopefully in every trial that you pas can be a lesson for you.

Ketika jalan yang kamu lalui terasa susah, kamu tidak boleh menyerah, ketika semua suara membuat kamu ragu, kamu harus tetap maju, ketika semua orang melakukan berbagai macam cara, untuk membuat kamu jatuh, kamu harus tetap berdiri teguh, karena suatu hari nanti, saya yakin kamu pasti bisa melihat kembali dengan bangga, dan ingat akan masa- masa ini, masa – masa dimana kamu punya pilihan untuk menyerah, tapi kamu menolak untuk pasrah, masa – masa di mana kamu bukan hanya mengumbar kata-kata, tapi kamu membuktikannya dengan usaha.

Untukmu sang pejuang masa depan, mungkin banyak hal yang terlihat tidak mungkin untuk dilalui bahkan untuk digapai. Namun, tidak ada yang tidak mungkin dalam kuasa Tuhan. Tetap berusahalah meskipun saat ini belum terlihat hasilnya. Kamu berhak bermimpi, kamu berhak sukses apa pun latar belakangmu. Kuatkanlah dirimu untuk berdiri diatas dua kakimu sendiri. Orang lain tidak akan peduli betapa sakitnya kamu. Tidak semua orang paham bagaimana hebatnya kamu menjaga isi hati dan kepala untuk terlihat baik-baik saja. Kamu harus sayang sama diri sendiri. Kalau saat ini kamu merasa sedih dan sangat tersiksa, berarti suatu saat kamu juga akan merasa sangat bahagia. Karena secarik kertas putih tidak akan menghasilkan lukisan yang indah jika tidak ada berbagai coretan warna yang melukisnya. Manisnya hidup akan terasa selepas kamu berjuang melawan kerasnya dunia. Ketika kamu ikhlas menerima semua kekecewaan dalam hidup, Tuhan akan membayar lunas dengan beribu-ribu keindahan. “Josefina”.

SANWANCANA

Assallammuallaikum. WR. WB.

Alhamdulillah hirobbilallami, puji syukur penulis kepada kehadiran Allah SWT atas ridho dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETANOL *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, DAN TAURIN SEBAGAI SUPRESOR GEN p21 TERHADAP SEL KANKER SERVIKS (*HeLa*).**

Tesis ini didanai oleh Penelitian Hibah BLU Universitas Lampung – Pascasarjana dengan nomor kontrak 818/UN26.21/PN/2022. Penyusunan tesis tidak lepas dari bantuan berbagai pihak berupa bimbingan, informasi, saran serta dukungan moril dan materil. Oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan banyak terima kasih kepada :

1. Terima kasih Allah SWT yang telah memberikan kekuatan serta keberkahan yang sangat luar biasa untuk penulis dalam menyelesaikan tesis ini.
2. Kedua orang tuaku tercinta “Bapak Margono dan Ibu Sawiyem” yang telah membesarkan, mendidik dan memberikan kasih sayang serta doa yang sangat luar biasa dan tiada henti yang mengiringi perjalanan penulis dalam mencapai cita- cita.
3. Kakak ku tersayang “Desca Ema Wati” yang telah memberikan kasih sayang serta doa yang sangat luar biasa dan tiada henti yang mengiringi perjalanan penulis dalam mencapai cita- cita.
4. Ibu Endang L. Widiastuti, Ph. D., selaku Pembimbing I dan Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, arahan, bantuan secara moril

maupun materil, masukan, kritik, saran serta motivasi dalam pelaksanaan penulisan dan penyelesaian tesis.

5. Ibu Prof. Dr. Med. Sc. Apt. Melisa Intan Berliana., selaku Pembimbing II, yang telah memberikan bimbingan, arahan, bantuan secara moril maupun materil, masukan, kritik, saran serta motivasi dalam pelaksanaan penulisan dan penyelesaian tesis.
6. Ibu Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc., selaku Pembahas I dan sebagai Ketua Program Studi Magister Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, yang telah memberikan bimbingan, arahan, bantuan secara moril maupun materil, masukan, kritik, saran serta motivasi dalam pelaksanaan penulisan dan penyelesaian tesis.
7. Bapak Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed., selaku Pembahas II yang telah memberikan bimbingan, arahan ,bantuan secara moril maupun materil, untuk kesempurnaan tesis.
8. Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A.,I.P.M., selaku Rektor Universitas Lampung.
9. Bapak Prof. Dr. Ahmad Saudi Samosir, S.T., M.T. selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Lampung.
10. Bapak Dr. Eng. Heri Satria., S.Si.,M.Si. selaku Plt. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
11. Bapak Dr. Jani Master., S.Si.,M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi yang telah memberikan bimbingan, arahan serta masukan dan dukungan kepada penulis.
12. Ibu Riezki Amalia, M.Si., Ph.D. Ibu Eli Mirdayani, A.Md.AK. dan Teh Hasna selaku Laboran Laboratorium Sitogenetika *Cell Culture* dan Genetika Molekuler Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran Bandung yang telah memberikan saran,bimbingan, arahan serta masukkan dan doa selama penulis melakukan penelitian.
13. Bapak dan Ibu Dosen serta segenap Karyawan (Teh Leha, Ibu Kus, Ibu Rusnah, Mas Sudar, Pak Rus, Pak Tamrin, Mb Oni, Mb Nunung, Mas Yanto dan Mas Fajar) yang tidak bisa disebutkan satu-persatu di Jurusan Biologi FMIPA Unila, atas ilmu,bimbingan, dan bantuan kepada penulis.
14. Teman seperjuangan penelitian Ainun Rohmawati Bareta.,S.Si., M.Si. dan Eka Ayu Lailatul Istikhomah terima kasih atas motivasi, dukungan maupun canda dan tawa yang diberikan kepada penulis.

15. Teman dan sahabat seperjuangan tesis Bagus Susilo Putra terima kasih atas motivasi, dukungan maupun canda dan tawa yang diberikan ke penulis.
16. Keluarga besar Magister Biologi 2021 soon to be M.Si, Kk Jonatan Puji Sarwoko, Mb Mai Sari, Mb Septria Juwita, Agis Agita, Mb Intan Okta Nabilla., M.Si., Mb Rina Maryani., M.Si., Kk Redy Trinanda, Mb Ferisa Desi Aulia, Mb Risa Malintan Umar, Vera Liony, Ibu Eva Lestari, Pak Sofwan Halimi, yang tidak bisa disebutkan satu-persatu, terima kasih atas saran, kritikan, canda, tawa, dukungan dan kebersamaan kepada penulis.
17. Mb Indah Yusni.S.Si,M.Si, Mb Sabti Martini.S.Si,M.Si, Mb Silvia Andriani.S.Si,M.Si, Mb Suharyani.,M.Si, Mb Ade Silvinia.S.Si,M.Si., dan Putri Kendari.S.Si,M.Si, terima kasih atas bimbingan serta arahan maupun kritikan serta dukungan kepada penulis.
18. Team Kanker Tifanny Nurya Safitri,S.Si, Argauli Sidabalok,S.Si, Ulfah Astriani, S.Si, Ainun Jariyah, Dafara Rifqia, Kezia Anynda, Nadia Nurrisa, terima kasih atas bantuan serta kebersamaannya kepada penulis.
19. Keluarga besar ASJ (Aneka Sumberbumi Jaya), Mb Megafhit Puspitarini,S.Si, Mb Adetia Fatmawati,S.Si, Bapak Selamat Riyadi, Mang Emon, Mas Juanda, Erna Apriliana.S.M, Mas Agus, Pak Aris, Kk Deksa Putra Ashari, Mas Joko, Mas Feri Kurniawan, yang tidak bisa disebutkan satu-persatu, terima kasih atas saran, kritikan, tawa, dukungan dan kebersamaan kepada Penulis.
20. Seluruh keluarga besar Mbah Rubinem terima kasih dukungan dan doa kepada penulis.
21. Almamater tercinta Universitas Lampung.

Semoga Allah membalas semua kebaikan yang telah diberikan. Penulis menyadari bahwa Tesis ini masih banyak terdapat kekurangan, untuk itu penulis mengharapkan saran dan masukan dikemudian hari. Besar harapan saya semoga Tesis ini dapat bermanfaat bagi kita semua amiin.

Bandar Lampung, 27 Maret 2023

Penulis

Yosi Dwi Saputra

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
HALAMAN JUDUL DALAM	iii
HALAMAN PERSETUJUAN	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
PERNYATAAN KEASLIHAN TESIS	vi
RIWAYAT HIDUP	vii
HALAMAN PERSEMBAHAN	viii
MOTTO	ix
SANWACANA	x
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	5
D. Manfaat Penelitian.....	5
E. Kerangka Pikir	5
F. Hipotesis	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Karsinogenesis	7
B. Mekanisme Siklus Sel	8
C. Peran <i>p21</i> dan CDK (<i>Cylin Dependent Kinase</i>)	10
1. Kanker Serviks	14
2. Mekanisme Senyawa Antikanker	15

a) Agen Antitubulin dan Inhibitor Perkembangan	15
b) Penginduksi Atophagy dan Kematian Sel	15
c) Inhibitor Angiogenesis, Metastasis, dan Migrasi.....	16
d) Memblokir MAPK	17
3. Perkembangan Kanker Serviks.....	17
D. Tumbuhan <i>Sargassum duplicatum</i>	19
1. Klasifikasi Tumbuhan <i>Sargassum duplicatum</i>	20
2. Morfologi Tumbuhan <i>Sargassum duplicatum</i>	20
3. Kandungan Kimia Tumbuhan <i>Sargassum duplicatum</i> ...	21
4. Manfaat Tumbuhan <i>Sargassum duplicatum</i>	23
E. Tumbuhan <i>Padina australis</i>	23
1. Klasifikasi Tumbuhan <i>Padina australis</i>	24
2. Morfologi Tumbuhan <i>Padina australis</i>	24
3. Kandungan Kimia Tumbuhan <i>Padina australis</i>	25
4. Manfaat Tumbuhan <i>Padina australis</i>	26
F. Taurin	27
G. Doxorubicin	28
H. Uji Sitotoksik Metode WST-8 Assay	29
III. METODE PENELITIAN	
A. Waktu dan Tempat	31
B. Alat dan Bahan Penelitian	31
C. Jenis dan Rancangan Penelitian	32
1. Populasi	33
2. Sampel.....	33
3. Teknik Pengambilan Sampel.....	34
D. Pelaksanaan Penelitian	34
1. Pembuatan Ekstrak Etanol <i>Sargassum duplicatum</i> dan <i>Padina australis</i> ,	34
2. Prosedur Pengujian Fitokimia Ekstrak Etanol <i>Sargassum</i> <i>duplicatum</i> dan <i>Padina australis</i>	36
E. Pembuatan Media Kultur.....	36
F. Mekanisme Kultur dan Pemanenan <i>cell line HeLa</i>	37
G. Perhitungan Sel	37
H. Preparasi Sampel.....	38
I. Uji Sitotoksik dengan Metode WST-8 2-(2-methoxy-4- nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)- 2H-tetrazolium, monosodium salt).....	38
J. Uji Antiproliferatif dengan Metode WST-8 2-(2-methoxy-4- nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H- tetrazolium, monosodium salt).....	40
K. Uji Ekspresi <i>p21</i> dengan Metode RT-PCR (<i>Reverse</i> <i>Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>).....	40
a) Desain Primer RNA	41
b) Isolasi Total RNA	41
c) Pengujian Ekspresi <i>p21</i> Menggunakan RT-PCR (<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)	43
L. Analisis Data.....	45
M. Diagram Penelitian	47

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil Pengamatan	48
A.1. Hasil Ekstraksi Etanol <i>Sargassum duplicatum</i> dan <i>Padina australis</i>	48
A.2. Hasil Analisis Fitokimia Ekstrak Etanol <i>Sargassum duplicatum</i> dan <i>Padina australis</i>	49
A.3. Hasil Uji Antivitas Sitotoksik Sel <i>HeLa</i>	49
a) Uji Sitotoksik Sel <i>HeLa</i> dengan Ekstrak Etanol <i>Sargassum duplicatum</i>	50
b) Uji Sitotoksik Sel <i>HeLa</i> dengan Ekstrak Etanol <i>Padina australis</i>	51
c) Uji Sitotoksik Sel <i>HeLa</i> dengan Taurin	52
A.4. Hasil Uji Antiproliferasi Sel <i>HeLa</i>	61
A.5. Uji Ekspresi <i>p21</i>	66
B. Pembahasan.....	68
V. KESIMPULAN	
A. Kesimpulan	80
B. Saran	80

DAFTAR PUSTAKA
LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Prosedur Pengujian Fitokimia Ekstrak <i>Sargassum duplicatum</i> , dan <i>Padina australis</i> ,	36
2. Komponen Master MIX RT-PCR	44
3. Siklus Qpcr	44
4. Hasil Ekstraksi Etanol <i>Sargassum duplicatum</i> dan <i>Padina australis</i>	48
5. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol 96% <i>Sargassum duplicatum</i> dan <i>Padina australis</i>	49
6. Hasil Analisis Uji Lanjut Antiproliferasi Ekstrak Etanol <i>Sargassum duplicatum</i> , <i>Padina australis</i> , Taurin dan Doxorubicin	64
7. Hasil Analisa <i>Doubling Time</i> Pada Perlakuan Senyawa Uji	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Mekanisme Kanker	8
2. Fase Kritis Pembelahan Sel Normal	9
3. Fase Transisi G2/M dan Protein Kunci Pada Regulasi Kompleks CDK1-Cylin B	13
4. <i>Human Papilloma Virus</i>	14
5. Proses Apoptosis.....	15
6. Perkembangan Sel Kanker Serviks	18
7. Perbedaan Sel Normal dan Sel Yang Terkena Kanker	19
8. Morfologi <i>Sargassum duplicatum</i>	21
9. Morfologi <i>Padina australis</i>	25
10. Taurin	27
11. Prinsip Kerja Uji Sitotoksik Metode WST-8 Assay.....	30
12. Diagram Penelitian	47
13. Hasil Uji Sitotoksik dengan Metode WST-8 Setelah Pemberian Beberapa Konsentrasi Ekstrak Etanol <i>Sargassum duplicatum</i> Pada Kultur Sel Serviks <i>HeLa</i>	50
14. Hasil Uji Sitotoksik dengan Metode WST-8 Setelah Pemberian Beberapa Konsentrasi Ekstrak Etanol <i>Padina australis</i> Pada Kultur Sel Serviks <i>HeLa</i>	51
15. Hasil Uji Sitotoksik dengan Metode WST-8 Setelah Pemberian Beberapa Konsentrasi Taurin Pada Kultur Sel Serviks <i>HeLa</i> .	52
16. Hasil Uji Sitotoksik dengan Metode WST-8 Perbesaran 1000 Kali Pada Morfologi Sel <i>HeLa</i> Pada Kelompok Kontrol Sel (a), Kontrol Obat Menggunakan Doxorubicin 0,625 ppm (b), Kontrol Obat Doxorubicin 1,25 ppm (c), Kontrol Obat Doxorubicin 2,5 ppm (d), Kontrol Obat Doxorubicin 5 ppm (e), Kontrol Obat Doxorubicin 10 ppm (f), dan Kontrol Obat Doxorubicin 20 ppm (g).	54
17. Hasil Uji Sitotoksik dengan Metode WST-8 Perbesaran 1000 Kali Pada Morfologi Sel <i>Hela</i> Setelah Perlakuan Ekstrak <i>Sargassum duplicatum</i> Pada Konsentrasi 62,5 ppm (a),Konsentrasi 125 ppm (b), Konsentrasi 250 ppm (c), Konsentrasi500 ppm (d), Konsentrasi 1000 ppm (e), dan Konsentrasi 2000 ppm (f)	56

18. Hasil Uji Sitotoksik dengan Metode WST-8 Perbesaran 1000 Kali Pada Morfologi Sel <i>HeLa</i> Setelah Perlakuan Ekstrak <i>Padina australis</i> Pada Konsentrasi 62,5 ppm (a), Konsentrasi 125 ppm (b), Konsentrasi 250 ppm (c), Konsentrasi 500 ppm (d), Konsentrasi 1000 ppm (e), dan Konsentrasi 2000 ppm (f)	57
19. Hasil Uji Sitotoksik dengan Metode WST-8 Perbesaran 1000 Kali Pada Morfologi Sel <i>HeLa</i> Setelah Perlakuan Taurin Pada Konsentrasi 62,5 ppm (a), Konsentrasi 125 ppm (b), Konsentrasi 250 ppm (c), Konsentrasi 500 ppm (d), Konsentrasi 1000 ppm (e), dan Konsentrasi 2000 ppm (f).....	59
20. Aktivitas Sitotoksik Senyawa Uji Terhadap Sel Kanker Serviks <i>Hela</i> dalam Nilai IC ₅₀ . (A). <i>Sargasum duplicatum</i> Terhadap Sel <i>HeLa</i> (IC ₅₀ 1108 ppm), (B). <i>Padina australis</i> Terhadap Sel <i>HeLa</i> (IC ₅₀ 681 ppm), (C). Taurin Terhadap Sel <i>HeLa</i> (IC ₅₀ -), dan (D). Doxorubicin Terhadap Sel <i>Hela</i> (IC ₅₀ 1,15 ppm).....	60
21. Pemberian Senyawa Uji Terhadap Rerata Viabilitas Sel Pada Waktu Inkubasi yang Berbeda 24, 48, dan 72 Jam. (A). <i>Sargasum duplicatum</i> Terhadap Sel <i>HeLa</i> , (B). <i>Padina australis</i> Terhadap Sel <i>HeLa</i> , (C). Taurin Terhadap Sel <i>HeLa</i> dan (D). Doxorubicin terhadap sel <i>HeLa</i>	62
22. Rerata Ekspresi Relatif qRT-PCR mRNA <i>p21</i> Setelah Pemberian Beberapa Konsentrasi Ekstrak Pada Kultur Sel Serviks <i>HeLa</i>	67
23. Pembuatan Larutan Stok (<i>Sargassum duplicatum</i> , <i>Padina australis</i> , Taurin dan Doxorubicin	98
24. Pemetaan Pada 96-Well Microplate Sel <i>HeLa</i>	99
25. Perhitungan Nilai IC ₅₀ Aktivitas Antikanker Serviks <i>HeLa</i>	99
26. Perhitungan Nilai <i>Doubling Time</i> <i>Padina australis</i>	100
27. Pengambilan dan Penjemuran Sampel	100
28. Penggilingan Simplisia Makroalga	100
29. Penimbangan Simplisia dan Proses	100
30. Penyaringan Sampel Makroalga dan Hasil Filtrat	100
31. Evaporasi (<i>Rotary Evaporator</i>)	101
32. Pasta Kental	101
33. Hasil Uji Flavonoid	101
34. Hasil Uji Alkaloid	101
35. Hasil Uji Saponin	101
36. Hasil Uji Steroid	101
37. Hasil Uji Tanin	101
38. Hasil Uji Terpenoid.....	101
39. Tempat Penyimpanan Sel.....	102
40. Pengujian Pelarut	102
41. Sterilisasi Media	102
42. Proses <i>Seeding</i>	102
43. Inkubator CO ² (<i>Thermo scientific</i>).....	102
44. Sentrifuge	102

45. Treatmen Perlakuan	102
46. <i>Cell Counting Ket-8</i>	102
47. <i>Nanodrop Reader</i>	102
48. Hasil Setelah Pemberian <i>Cell Conting Ket-8</i>	102
49. Hasil Uji Sitotoksik dan Antiproliferasi (<i>Sargassum duplicatum</i> , <i>Padina australis</i> dan Taurin).....	103
50. Perhitungan Sel.....	103
51. Pemberian Ribozol Pada Kultur Sel	104
52. Pembuatan MaterMix.....	104
53. Cloroform dan Etanol 70%	104
54. Sentrifuge Thermoscientific	104
55. Fase Pemisahan RNA.....	104
56. Isolasi RNA	104
57. Pengukuran Kosentrasi RNA Total	104
58. Pengukuran Ekspresi <i>p21</i>	104
59. Optimasi Suhu	105
60. Hasil Pembacaan RT-PCR	105

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Sampai saat ini kanker serviks masih menjadi masalah kesehatan bagi wanita Indonesia karena angka kejadian dan kematiannya yang tinggi. Menurut WHO, sekitar 490.000 wanita di seluruh dunia menderita kanker serviks setiap tahun dan 80% wanita di negara berkembang termasuk Indonesia menderita kanker serviks. Menurut *American Cancer Society*, 2019 kanker merupakan penyebab kematian dengan jumlah 9,5 juta orang di dunia meninggal pada tahun 2018. Kanker serviks menempati urutan keempat di negara maju setelah kanker payudara, usus besar dan endometrium. Di sisi lain, kesadaran dan pengetahuan masyarakat tentang kanker, seperti faktor risiko dan upaya pencegahannya masih kurang. Padahal 90 – 95% faktor risiko kanker adalah perilaku dan lingkungan. Oleh karena itu, diperlukan latihan kolektif, komprehensif dan berkesinambungan untuk meningkatkan kesadaran masyarakat akan kanker, khususnya kanker serviks (Ferlay, 2018).

Kanker pada manusia ditandai dengan pertumbuhan yang menyimpang dan sel abnormal yang bermetastasis; penyebaran yang tidak terkontrol (metastasis) menyebabkan kematian inang. Terlepas dari upaya dan kemajuan luar biasa dalam penelitian medis, kanker tetap menjadi salah satu penyebab utama kematian manusia di seluruh dunia. Serangkaian strategi terapi seperti kemoterapi, terapi radiasi, pembedahan dan kombinasi telah digunakan untuk mengobati berbagai jenis kanker (Ruiz-tores, 2017). Namun, beberapa dari pengobatan ini hanya memberikan sedikit manfaat. Selain itu, komplikasi dan efek samping jangka panjang dari perawatan ini dapat terjadi (Ajdari *et al.*, 2016). Potensi terapi senyawa bioaktif alami seperti polisakarida sekarang

telah banyak dilaporkan. Aktivitas antikanker yang terkait dengan keanekaragaman hayati alami dari rumput laut mendukung pengembangan generasi baru langkah-langkah terapi melawan kanker selama bertahun-tahun (Hsu and Wang, 2019).

Kanker servik adalah tumor ganas primer yang berasal dari sel epitel skuamosa akibat adanya *Human Papiloma Virus* (HPV) (Hidayat *et al.*, 2014). Gen yang terlibat dalam kanker servik adalah Gen *p21* Codon 31 rs 1801270 terletak pada kromosom *6p21.1* yang terdiri dari 3 ekson dan 2 intron dan mengkode protein 21-kd (Susanto, Maryono, dan Purwanto, 2017). Polimorfisme gen *p21* dapat mempengaruhi ekspresi dan aktivitas protein berperan dalam ketahanan terhadap kanker serviks. Gen *p21* berperan sebagai regulator siklus sel bila terjadi kerusakan DNA, yaitu pada *checkpoint* fase G1/S. Kerusakan DNA akan ditahan pada *checkpoint* G1 melalui transaktivasi *p53*-dependent yaitu *p21*. Sel – sel yang masuk ke fase S setelah melalui fase G1 yang singkat akan menunjukkan instabilitas genetik, sehingga bila kerusakan DNA terjadi sebelum fase S, maka tidak akan dapat repair selama replikasi. Hal ini akan menyebabkan bentuk abnormal nukleotida dan kegagalan replikasi sebelum masuk ke fase M dari siklus sel (Wibisono, 2018).

Protein *p21* merupakan salah satu *cyclin dependent kinase* (CDK) yang memiliki peran dalam menghambat siklus sel. Ekspresi dari protein tersebut akan menyebabkan terhentinya siklus pembelahan sel (Diana, Lagiran, Sanif, 2021). Hal ini sejalan dengan penelitian Widiastuti *et al.*, 2022 yang menyatakan, bahwa pada kondisi normal, produksi protein *p53* akan meningkat saat DNA mengalami kerusakan, dan peningkatan protein *p53* tersebut akan mengaktifkan protein *p21* yang memiliki fungsi untuk menghambat aktifitas *cyclin-cyclin dependent kinase* (CDK). Hal tersebut menyebabkan pRb tidak terfosforilasi dan E2F tidak aktif. Jika E2F tidak aktif gen tidak mampu mentranskripsikan DNA-nya. Kemudian sel akan berhenti di G1 dan kemudian melakukan perbaikan. Jika perbaikan tersebut

mengalami kegagalan sel akan di induksi untuk apoptosis (Widiastuti *et al.*, 2022).

Saat ini penggunaan obat tradisional di Indonesia mengalami kemajuan yang sangat pesat. Sementara obat-obatan modern dan sintetik masih beredar di pasaran, obat-obatan tradisional kini digunakan kembali oleh masyarakat sebagai pengobatan alternatif kanker maupun yang lain. Obat tradisional yang terbuat dari tumbuh-tumbuhan dan bahan-bahan alami juga memiliki efek samping, namun risiko penggunaan jangka panjang jauh lebih rendah dibandingkan dengan bahan kimia (Triyasa, Diantini, dan Berliana, 2020). Makroalga merupakan tumbuhan yang terdiri dari banyak genus dan spesies. Organisme laut ini secara tradisional digunakan sebagai sumber makanan dan agen terapeutik, terutama di beberapa bagian Asia seperti Jepang, Korea dan China. Makroalga merupakan sumberdaya alam laut yang banyak mengandung metabolit sekunder yang menunjukkan kemampuan sebagai bahan antikanker (Firdaus *et al.*, 2018).

Fucoidan merupakan senyawa bioaktif dari alga cokelat yang diketahui memiliki sifat anti proliferasi, antitumor dan antikanker dengan menginduksi apoptosis, menghambat invasi, metastasis, dan angiogenesis sel kanker. Zat ini telah diketahui mampu menghambat pertumbuhan beberapa jenis kanker (Firdaus *et al.*, 2018).

Tanaman *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, diketahui memiliki banyak potensi sebagai obat. Beberapa diantaranya memiliki potensi sebagai antioksidan, antimikroba, dan antikanker (Sun *et al.*, 2018). Bagian dari tumbuhan *Sargassum duplicatum*, *Padina australis* yang dapat dimanfaatkan adalah akar, kulit batang, dan daun. Tumbuhan *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, sendiri diketahui mengandung senyawa flavonoid, polifenol, tanin, senyawa fenolat, klorofil, karotenoid, steroid, terpenoid dan alkaloid (Arsianti *et al.*, 2020). Karena kandungan senyawa ini, tanaman *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, biasa digunakan sebagai antikanker,

antibakteri, antimalaria, antivirus dan antioksidan (Suganya *et al.*, 2019). Hal ini sejalan dengan penelitian Widiastuti *et al.*, 2022 yang menunjukkan bahwa kandungan tanaman *Sargassum duplicatum*, dan *Padina australis* mampu mematikan sel kanker serviks *HeLa* yang diduga memiliki kandungan flavonoid. Selain itu sifat antikanker juga dimiliki oleh taurin (*2-aminoethane sulfonic acid*), yaitu asam organik turunan dari asam amino sistein yang mengandung sulfur (sulfhidril) (Vijayaraj *et al.*, 2017). Senyawa ini mampu menghambat proses pertumbuhan dari beberapa macam kanker, dan beberapa penelitian biologi menunjukkan bahwa metabolit ini juga bersifat farmakologis dalam pengobatan kanker Arsianti *et al.*, 2020. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Arini *et al.*, 2016. Bahwa pemberian taurin dapat mengikat radikal bebas sehingga potensi antioksidan yang dimiliki taurin dapat mengurangi stres oksidatif yang dihasilkan benzo(a)piren sehingga menekan terjadinya inflamasi pada saluran pernafasan. Metabolit sekunder yang banyak terdapat didalam sumber daya alam terutama laut seperti *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, mengandung macam zat yang berperan sebagai agen antikanker. Karena potensi efek antikanker dari tanaman ini penulis mengembangkan produk kelautan Indonesia dengan fokus meneliti *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, yang tersebar luas di pesisir laut Indonesia sebagai pengobatan kanker terbaru Alvest *et al.*, 2018.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang sudah dijelaskan, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana aktivitas sitotoksik pada sel *HeLa* setelah pemberian ekstrak etanol *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, dan taurin.
2. Bagaimana aktivitas antiproliferasi pada sel *HeLa* setelah pemberian ekstrak etanol *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, dan taurin.
3. Bagaimana ekspresi gen *p21* pada sel *HeLa* setelah pemberian ekstrak etanol *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, dan taurin.

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan uraian dan permasalahan yang ada maka tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

- 1) Membuktikan efek pemberian ekstrak etanol *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, dan taurin terhadap sel kanker serviks *HeLa* melalui uji sitotoksik.
- 2) Mengkaji bahwa ekstrak etanol *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, dan taurin memiliki sifat antiproliferatif terhadap sel kanker serviks *HeLa*.
- 3) Membuktikan bahwa ekstrak etanol *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, dan taurin dapat meningkatkan ekspresi gen *p21* terhadap sel kanker serviks *HeLa*.

D. Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat seperti :

1. Memberikan informasi yang bermanfaat dalam perkembangan pengetahuan pengobatan kanker serviks yang kemudian dapat digunakan sebagai obat alami yang lebih efektif.
2. Memberikan informasi dan gambaran mengenai kandungan metabolit sekunder dan senyawa bioaktif sebagai agen antikanker.

E. Kerangka Pikir

Kanker merupakan kondisi patologis yang menjadi salah satu utama penyebab kematian di dunia. Kanker pada manusia ditandai dengan adanya pertumbuhan yang menyimpang dan sel abnormal yang bermetastasis yang menyebabkan kematian inang. Serangkaian strategi terapi seperti kemoterapi, pembedahan dan kombinasi telah digunakan untuk mengobati berbagai jenis kanker. Namun, beberapa dari pengobatan ini hanya memberikan sedikit manfaat, selain itu komplikasi maupun efek samping jangka panjang dari perawatan ini dapat terjadi.

Saat ini banyak upaya yang dilakukan untuk menemukan obat yang dapat menginduksi kematian sel kanker secara apoptosis dan memberikan efek samping seminimum mungkin, salah satunya dengan memanfaatkan makroalga, karena makroalga ini memiliki kandungan senyawa bioaktif yang dapat dimanfaatkan sebagai obat. Potensi terapi senyawa bioktif alami saat ini banyak digunakan untuk pengobatan alternatif penyakit kanker seperti fucoidan. Kandungan bioaktif yang terdapat di makroalga *Sargassum duplicatum* serta *Padina australis* diduga mampu menginduksi gen *p21* yang dapat menghentikan siklus sel pada kanker. Hal ini membuat siklus sel dapat memberikan kesempatan DNA repair protein untuk memperbaiki DNA yang telah rusak. Dengan adanya suatu senyawa yang terkandung di tanaman *Sargassum duplicatum*, *Padina australis* dan taurin, maka ekstrak tersebut mempunyai potensi untuk dapat digunakan sebagai obat – obat alternatif. Namun demikian, perlu diteliti secara lebih jauh tentang tingkat keamanannya. Oleh karena itu, diperlukan penelitian untuk dapat membuktikan Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, dan Taurin Sebagai Penentu Aktivitas Gen Supresor (*p21*) Terhadap Sel Kanker *HeLa* Secara *In-Vitro*.

F. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol *Sargassum duplicatum*, *Padina australis* dan Taurin Sebagai Supresor Gen *p21* Terhadap Sel Kanker Serviks (*HeLa*) adalah sebagai berikut :

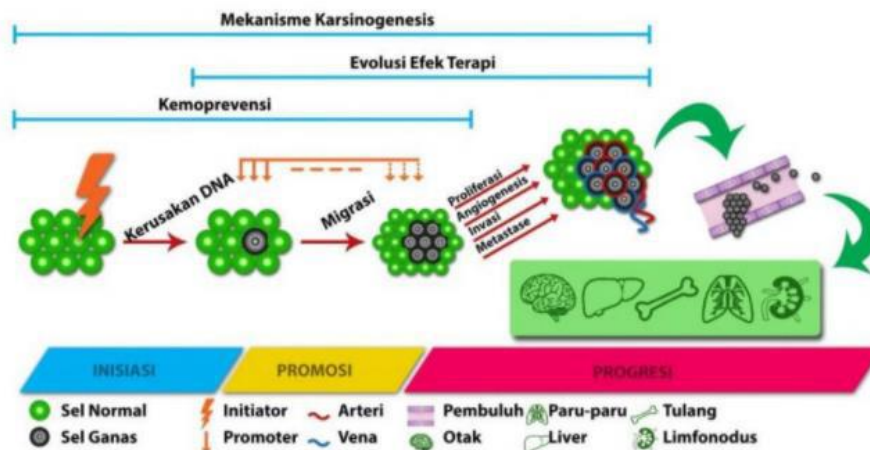
1. Ekstrak etanol *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, dan taurin dapat meningkatkan sitotoksik pada kultur sel kanker serviks.
2. Ekstrak etanol *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, dan taurin dapat meningkatkan antiproliferasi pada kultur kanker serviks.
3. Ekstrak etanol *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, dan taurin mampu meningkatkan ekspresi gen *p21* pada sel kanker serviks.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Karsinogenesis

Kanker adalah suatu penyakit yg ditandai dengan hilangnya kemampuan buat mengontrol regulasi dari suatu sel maupun fungsi homeostatis sel di suatu organisme multiseluler (Zafrial *et al.*, 2018). Kanker bisa berkembang dimana saja di bagian tubuh makhluk hidup. Kanker sendiri ada banyak sekali macam jenis, diantaranya sarkoma yaitu kanker yang tumbuh berasal jaringan penyambung dan penyokong, karsinoma yaitu kanker yang tumbuh pada jaringan epitelial seperti kulit serta jaringan penyusun dinding organ, adenokarsinoma ialah kanker yang tumbuh diberbagai organ tubuh, limfoma artinya kanker yang tumbuh di jaringan limpa (Hoadley *et al.*, 2018) .

Prosedur kanker terdiri dari tiga tahapan, yaitu (a) tahap inisiasi adalah terjadinya mutasi di sel somatik normal sebagai sel yang abnormal serta berpotensi menjadi neoplastik/ sekumpulan sel abnormal. Tahap inisiasi bisa terjadi sebab adanya mutasi gen seperti delesi, duplikasi, serta translokasi di kromosom serta diakibatkan virus, bahan kimia reaktif, dan radikal bebas. (b) tahap promosi ialah tahapan awal bagi sel yang mengalami inisiasi serta akan membuat klon dan melalui pembelahan. (c) tahap progresif ditandai dengan perubahan genomik yang cepat dimana pertumbuhan sel mengarah di keganasan bila tidak dihambat oleh lingkungan mikro di dalam sel (Kurniasari, 2017). Berdasarkan uraian di atas mekanisme kanker dapat dilihat pada (Gambar 1).



Gambar 1. Mekanisme Kanker (Kurniasari, 2017).

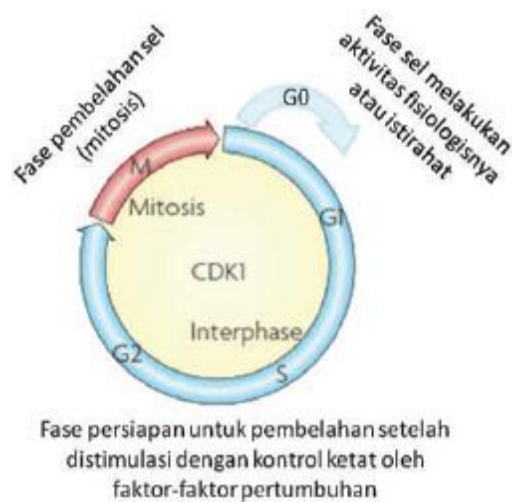
Faktor yang mampu mengakibatkan kanker dikelompokkan menjadi tiga bagian, pertama ialah karsinogen atau zat pemicu timbulnya kanker, dimana yang tergolong pada karsinogen adalah virus, bahan kimia, maupun radiasi. Kelompok kedua ialah gaya hidup yang kurang sehat, dimana dapat dicontohkan seperti obesitas, kurangnya mengkonsumsi buah serta sayur, aktivitas fisik yang kurang, merokok, mengkonsumsi alkohol, polusi udara, serta usia. Sedangkan pada kelompok ketiga merupakan faktor genetik atau keturunan (Kurniasari, 2017).

B. Mekanisme Siklus Sel

Siklus sel terdapat 3 tahapan yaitu tahap pertama ialah proses pembelahan di (daur proliferasi), kedua fase istirahat (fase G₀), serta ketiga fase sintesis (S) sedangkan pembagaian kromosom masuk kedalam fase M, diantara fase S serta M dipisahkan menggunakan “gap” yang dianggap fase G₁ dan G₂ (Mutiah *et al.*, 2017). Proses daur sel normal tergantung di frekuensi pertumbuhan dari lingkungan. Saat frekuensi pertumbuhan tidak mencukupi, maka sel yang berada di fase G₁ bisa keluar lalu memasuki fase *cell cycle arrest* atau fase G₀ (Mutiah, 2014). Di tahap G₁ sel terus tumbuh serta melakukan persiapan buat sintesis DNA. Sel akan melakukan sintesis DNA dimana terjadi proses replikasi kromosom di saat berada pada tahap S (Gambar 2) (Murti *et al.*, 2007).

Fase G1 merupakan tahap satu-satunya dimana siklus selnya diatur oleh stimuli ekstra seluler seperti mitogens dan adhesion. Pada fase G1 ini juga terdapat *Restriction point* dan *checkpoint* (Istindiah dan Auerkari, 2001). Pada tahap S sel melakukan replikasi DNA, sehingga memiliki 2 set DNA lengkap yang selanjutnya dapat membelah menjadi 2 sel anak dimana setiap sel memiliki satu *copy* DNA. Dengan demikian sel siap memasuki fase G.

Tahap G2 (*second gap*) merupakan tahap akhir dari sintesis DNA untuk selanjutnya memasuki tahap M (Istindiah dan Auerkari, 2001). Pada G2 sel yang telah mereplikasi kromosom pada fase G1 akan menduplikasi keseluruhan komponen seluler lainnya. Selain itu juga terjadi sintesis mRNA dan beberapa protein tertentu (Murtiah *et al.*, 2018). Menurut Istindiah dan Auerkari, 2001. Saat memasuki tahap akhir yakni tahap M, selama tahap ini sel membelah menjadi 2 sel anak, sel memiliki 2 pilihan yaitu yang pertama siklus dimulai kembali dengan memasuki tahap G1 atau yang kedua sel dapat keluar dari siklus sel dan menjadi non-aktif dengan memasuki tahap G0 (Gambar 2).



Gambar 2. Fase Kritis Pembelahan Sel Normal (Kresno, 2012).

Regulasi daur sel biasanya diatur oleh tiga jenis gen, yaitu *oncogen*, *supressor gene*, dan gen yang mengatur replikasi dan repair DNA. Kerusakan pada gen tersebut menjadi pemicu terjadinya proliferasi sel secara tidak terkontrol yang dapat menyebabkan terjadinya kanker (Muti'ah, 2017).

Perubahan dari fase satu menuju fase lainnya berhubungan dalam setiap tahap siklus sel yang dikontrol oleh beberapa *checkpoint* yang berfungsi untuk memastikan bahwa kromosom siklus sel telah utuh dan sempurna sebelum memasuki tahapan selanjutnya. Pengaturan tersebut melibatkan *cyclin*, aktivasi *Cyclin Dependent Kinase* (CDKs), dan *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor* (CDKIs) (Ruddon, 2007). Interaksi antara ketiganya dapat mengontrol berbagai tahap siklus sel serta mencegah ke tahap selanjutnya jika terjadi kerusakan DNA melalui mekanisme *checkpoint* dan regulasi proses ini berperan dalam terjadinya kanker (King dan Robins, 2006). Regulasi daur sel melalui gen suppressor biasanya melalui gen *Retino blastoma* (Rb) dan gen *p53*. Protein Rb berperan dalam regulasi daur sel secara umum sedangkan *p53* berperan dalam perbaikan DNA dan pemacuan apoptosis. Gen *p53* mencegah adanya replikasi dari DNA yang rusak pada sel normal dan mendorong program penghancuran sendiri, sel yang mengandung DNA yang tidak normal (Muti'ah, 2014). Ketika terjadi kerusakan DNA maka gen *p53* akan teraktivasi dan mengaktifkan *p21* yakni *CDK inhibitor*. Gen *p21* ini akan mengikat dan menginaktivkan kompleks CDK₄ yang akan menyebabkan forforilasi Rb terhambat sehingga pelepasan faktor transkripsi E2F terhenti dan mengakibatkan siklus sel terhenti pada tahap G₁ dan S. Saat siklus sel terhenti DNA mempunyai kesempatan untuk memperbaiki diri sebelum memasuki tahap pembelahan selanjutnya (Yusni, 2008; Ramos *et al.*, 2008).

C. Peran Gen *p21* dan CDK (*Cyclin Dependent Kinase*)

Telah diketahui dengan baik bahwa kanker serviks adalah penyakit yang heterogen. Meskipun kemajuan luar biasa telah dibuat dalam deteksi dini dan pengobatan kanker serviks selama bertahun-tahun, perilaku bervariasi. Oleh karena itu, penting untuk mengidentifikasi penanda potensial untuk prognosis dan juga membantu pemilihan terapi yang tepat, dan mungkin bermanfaat dalam pengelolaan pasien individu. Gangguan kontrol daur sel, yang sangat krusial buat pertumbuhan normal dan diferensiasi serta diatur oleh siklus kinase independen, hal ini bisa mengakibatkan pertumbuhan & progresi

tumor Wahyudi, 2011. *p21* (Waf-1) merupakan suatu inhibitor berdasarkan siklin kinase, dan peningkatan regulasi *p21*, yang menginaktivasi kompleks siklependen kinase (CDK) *G1-associated*, dikaitkan menggunakan *p53-mediated G1 / S cell cycle arrest* Wahyudi, 2011. Setelah penggambaran karsinogen, pengaturan *p21* dan *p53* bisa menahan perkembangan melewati titik siklus G1. Mutasi dalam *p21* bisa mengakibatkan hilangnya kontrol homeostatik selama karsinogenesis manusia. Gen *p21* (disebut juga CDKN1A) terletak pada kromosom 6*p21* dua terdiri berdasarkan tiga ekson & dua intron dan mengkode protein 21-kd (Susanto, Maryono, dan Purwanto, 2017).

Beberapa penelitian sudah menyatakan polimorfisme *p21* mampu mengubah ekspresi dan aktivitas protein yang berperan dalam kerentanan terhadap sel kanker. Dua mayor *p21* polimorfisme pada kodon 31 (*p21* C98A & dbSNP rs1801270) pada daerah 3' (*p21* C70T & dbSNP rs1059234), baik sendiri atau dalam kombinasi bisa mempunyai pengaruh pada karsinogenesis. Yang paling umum membuat penelitian polimorfisme *p21* Ser31Arg (rs1801270), substitusi C ke A pada ketiga kodon 31 *p21* output serine buat substitusi asam amino arginin pada DNA mengikat protein Yu *et al.*, 2013. Sampai waktu ini, jumlah studi epidemiologi molekuler sudah dilakukan buat mengevaluasi interaksi antara polimorfisme *p21* Ser31Arg & risiko tumor dalam majemuk populasi. Jenis tumor termasuk kanker payudara, kanker paru-paru, kanker esofagus, kanker lambung, kanker kolorektal, kanker endometrium, limfoma, leukemia, melanoma kulit, dan seterusnya. Terdapat interaksi antara alel *p21* SNP rs1801270A dan penurunan risiko buat serviks kanker pada populasi perempuan Tiongkok. Haplotype AGT yang dibuat oleh *p21* SNP (rs1801270, rs3176352 & rs1059234) pula menaruh pengaruh proteksi pada perkembangan kanker serviks dalam populasi ini Yazid dan Aviyanti, 2012.

Pengatur siklus sel *p21*, produk protein yang dikodekan oleh gen *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A* (CDKN1A), pertama kali diidentifikasi sebagai inhibitor *acyclin-dependent kinase* (Cdk) dengan kemampuan untuk

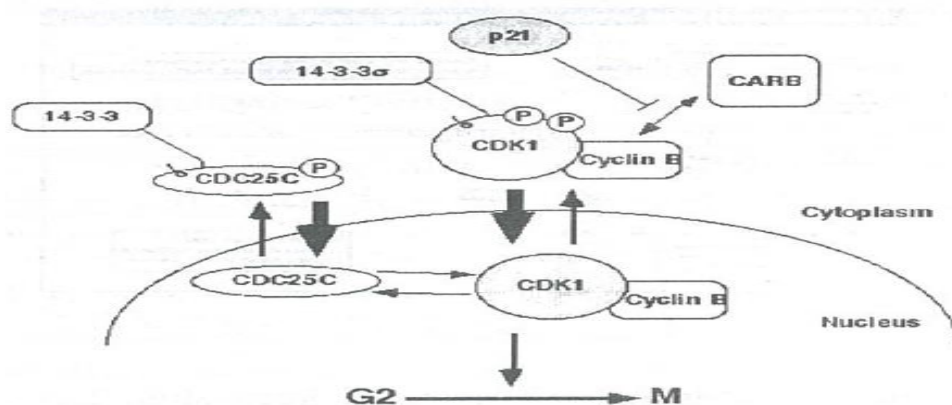
menyebabkan penghentian pertumbuhan melalui penghambatan Cdks, yang diperlukan untuk G1 ke S trans (Abbas dan Dutta, 2009). Selain itu, melalui interaksi dengan *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), CDKN1A/ *p21* ditemukan dapat menghambat replikasi DNA (Rossig *et al.*, 2001). *p21* diekspresikan secara luas pada tingkat rendah di sebagian besar jaringan di bawah kondisi mapan, ekspresinya meningkat sebagai respons terhadap kerusakan DNA atau stresor seluler kimia atau fisik lainnya, memainkan peran penting dalam kelangsungan hidup sel, menghasilkan aktivasi pos pemeriksaan siklus sel sampai perbaikan telah terjadi. Karena karsinogenesis terkait erat dengan regulasi siklus sel, peran *p21* dalam perkembangan karsinoma telah menarik perhatian besar. Beberapa penelitian telah menyarankan CDKN1A / *p21* mempromosikan tumor, mungkin juga memediasi fenotipe resistensi obat (Hawthorne *et al.*, 2009 ; Cheng *et al.*, 2010), dan studi klinis telah menunjukkan bahwa ekspresi *p21* yang tinggi berkorelasi dengan prognosis yang buruk (Liu *et al.*, 2014; Taghavi *et al.*, 2010). Namun, peran fungsional dari CDKN1A / *p21* dalam karsinogenesis masih kontroversial. Hilangnya ekspresi atau fungsi CDKN1A / *p21* telah terlibat dalam genesis atau perkembangan berbagai karsinoma, termasuk kanker payudara (Abbas dan Dutta *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012), dan telah berkorelasi dengan prognosis yang buruk secara klinis. Pengamatan kontras ini tidak diragukan lagi telah meningkatkan signifikansi *p21* di bidang biologi kanker.

Gen *p21* berfungsi sebagai pengatur siklus sel ketika terjadi kerusakan DNA, yaitu di pos pemeriksaan G1/S. Kerusakan DNA dihentikan di pos pemeriksaan G1 dengan transaktivasi tergantung *p53*, atau *p21*. Sel yang memasuki fase S setelah fase G1 pendek menunjukkan ketidakstabilan genetik sehingga kerusakan DNA yang terjadi sebelum fase S tidak dapat diperbaiki selama replikasi. Hal ini menyebabkan pembentukan nukleotida abnormal dan kegagalan replikasi sebelum memasuki fase M dari siklus sel (Diana *et al.*, 2021).

CDK (*Cyclin Dependent Kinase*) mengawali regulasi siklus sel dan berhubungan dengan diferensiasi dan apoptosis. Perkembangan tumor sendiri

dihubungkan dengan sejumlah perubahan dari CDK (Meijer, 1996). CDK merupakan enzim yang mengatur laju siklus sel, yaitu integrasi kontrol sinyal pertumbuhan dengan komponen siklus sel (Brugarolas *et al.*, 1998). *p21* merupakan inhibitor CDK yang berperan sebagai perantara *G1 arrest*. Sel yang berkurang *p21* akan mengalami kerusakan DNA sehingga menginduksi *G1 arrest*. Cterminus *p21* berikatan dengan PCNA (*poliferating cell nuclear antigen*) untuk menghambat replikasi DNA. Pada *cekpoint* fase *G2/M*, *p21* dapat memisahkan kompleks CARB *cyclin B1* pada Cterminus, dimana pemisahan CARB dimaksudkan untuk regulasi kompleks CDK1 *cyclin B1*. Aktivitas utama kompleks CDK1/*cyclin B1* mengawali sel masuk ke fase M (mitosis), yang ditandai dengan translokasi ke nukleus dan mengawali perubahan mitotik, seperti kondensasi kromosom dan penghancuran membran inti.

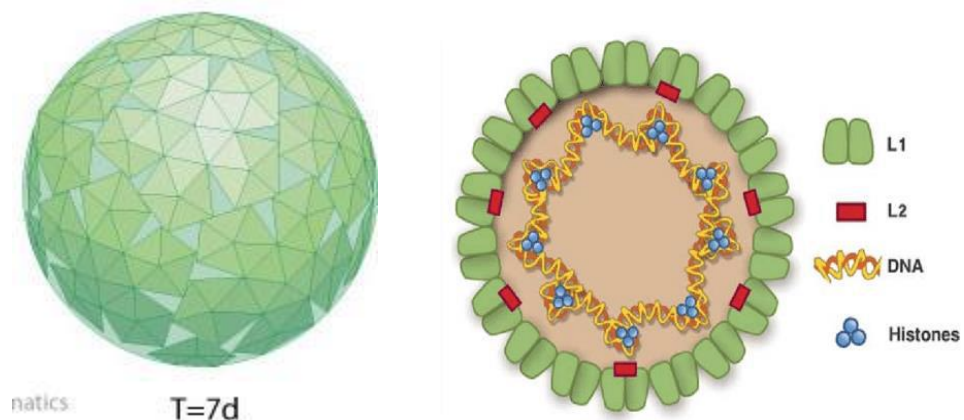
Aktivasi kompleks CDK 1- *cyclin B1* memerlukan inhibisi fosforilasi oleh CDC25C Funk *et al.*, 2001; Lozano *et al.*, 1998. Sedangkan CARB (C1P1-*assosiated regulator of cyclin B1*) merupakan protein yang meregulasi *cyclin B1* pada *p21*, dan bermanfaat buat retensi sitosolik *cyclin B1* ke sentrosom sebagai akibatnya melindungi *cyclin B1* berdasarkan degradasi proteolitik (Gambar 3).



Gambar 3. Fase Transisi G2/M dan Protein Kunci pada Regulasi Kompleks Cdk1-Cylin B (Sumber: Corvianindya, 2001).

1. Kanker Serviks

Kanker serviks *Human Papilloma Virus* merupakan pemicu utama kanker leher rahim. Ada banyak pemicu infeksi ini, seperti buruknya kebersihan diri yang menyebabkan terjadinya kanker (Dianti dan Isfandiari, 2016). Perempuan dengan personal *hygiene* buruk berpeluang 19.386 lebih besar dari pada perempuan dengan personal *hygiene* baik untuk terkena kanker leher rahim. Infeksi *human papilloma virus* diawali pada lapisan berlapis basal epitel skuamosa. Genom HPV dapat diintegrasikan ke dalam genom inang atau tetap dalam bentuk episomal. Delapan puluh tiga persen kasus HPV-positif memperlihatkan bukti penggabungan sel inang genom *Human Papilloma Virus*. Infeksi ini beresiko tinggi dengan menyebabkan proliferasi sel serviks mengakibatkan abnormalitas pada tipe 16 dan 18 (Pal dan Kundu, 2019). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kanker leher rahim 90% diakibatkan tipe 18 dan 16 *Human Papilloma Virus* (Gambar 4) (Serano *et al.*, 2017).



Gambar 4. *Human Papilloma Virus* (Evriarti, 2019).

Kanker dimulai ketika sel dalam tubuh mengalami pertumbuhan yang tidak terkendali. Leher rahim menghubungkan tubuh rahim ke vagina. Endoserviks adalah bagian serviks yang paling dekat dengan tubuh rahim. Bagian rahim yang paling dekat dengan vagina adalah eksoserviks. Kanker serviks dimulai di sel yang melapisi serviks, terutama di bagian bawah rahim yang dikenal sebagai serviks rahim. Hanya ada dua jenis sel yang menutupi serviks, sel kelenjar dan sel skuamosa. Kedua jenis sel ini bertemu di suatu tempat yang disebut zona transformasi. Lokasi zona transformasi berubah seiring bertambahnya usia seseorang dan setelah

melahirkan. Kanker serviks umumnya berasal dari zona transformasi. Sel normal tidak berubah menjadi sel kanker secara tiba-tiba, sel normal serviks awalnya menjadi prakanker dan kemudian berubah menjadi kanker (Kashyap *et al.*, 2019).

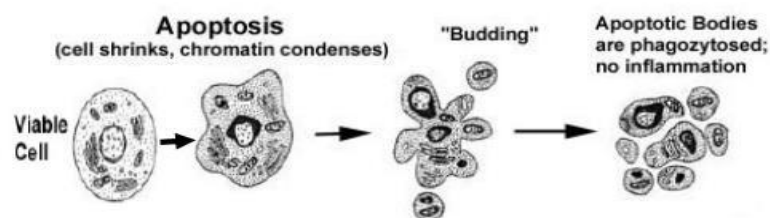
2. Mekanisme Senyawa Antikanker

Studi aktivitas sitotoksik *in vitro* didasarkan pada skrining agen antikanker terutama pada garis sel tumor dengan menggunakan tipe hewan. Pusat penyelidik menelah menemukan banyak target molekuler terikat dengan jenis tumor tertentu. Skrining merupakan pemeriksaan kesehatan dalam penemuan obat antikanker yang berfokus pada pemeriksaan cepat dalam identifikasi organisme laut (Shilpha *et al.*, 2017).

a) Agen Anti-Tubulin dan Inhibitor Perkembangan

Mikrotubula merupakan subunit tubulin yang tersusun seperti tabung. Sistem ini merupakan bagian penting sitoskeleton. Hal ini, mengakibatkan sistem mikrotubula berperan sangat penting dalam proses mitosis maupun pembelahan sel, serta merupakan target obat antitumor. Agen anti-tumor dapat menghambat gelendong mitosis dan mengganggu keseimbangan mikrotubulus yang bertindak sebagai agen antimitotik (Ercolano *et al.*, 2019).

b) Penginduksi *Autophagy* dan Kematian sel



Gambar 5. Proses Apoptosis (Sharma *et al.*, 2014).

Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram bertujuan untuk mempertahankan kestabilan populasi, sel ini terlibat dalam berbagai kegiatan proses, termasuk pembuangan sel yang rusak, morfogenesis,

dan pemeliharaan homeostasis jaringan. Kematian sel terprogram dan mutasi dapat menyebabkan keganasan sel. Mekanisme ini merupakan jalur kematian ekstrinsik reseptor. Hal ini terkait dengan proses pembelahan Caspase 3 hingga menyebabkan terjadinya fragmentasi *Deoxyribo Nuclei Acid*, sitoskeleton dan pengurangan protein. Jalur pensinyalan endogen dirangsang oleh stresor intraseluler seperti radiasi, penipisan variabel perkembangan, defisiensi sitokin, dan obat sitotoksitas. (Ercolano *et al.*, 2019). *Autophagy* merupakan jalur seluler untuk menghilangkan organel maupun senyawa protein rusak atau berlebih. Mekanisme ini dapat aktif ketika terjadi hipoksia, malnutrisi, hingga stimulasi obat. Protein rapamycin 1 mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*) teraktif yang terlibat dari mekanisme autophagy, angiogenesis pada mamalia (Ruiz-Torez *et al.*, 2017).

c) **Inhibitor Angiogenesis, Metastasis, dan Migrasi**

Angiogenesis merupakan mekanisme fisiologis normal terlibat dalam migrasi, perbanyakan, serta morfogenesis sel endotel. Pada tumor, angiogenesis memberikan waktu bagi perkembangan sel kanker dan menyalurkan sel ini dengan aliran darah pada organ lain (Ruiz-Torez *et al.*, 2017). Sel ini dapat dikontrol melalui kesetimbangan tepat dari stimulan angiogenesis dan inhibitor dari (VEGF). (VEGF) *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) merupakan mediator terjadinya angiogenesis yang memiliki peranan penting dalam mitosis sel, perubahan bentuk sel dan meningkatkan permeabilitas vaskuler. VEGF dianggap sebagai faktor angiogen penting dalam pertumbuhan dan perkembangan kanker kolorektal Cong *et al.*, 2016. Hal ini karena VEGF diekspresikan secara besar pada sel tumor. Matriks metaloproteinase (MMPs) adalah proteinase yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi komponen matriks ekstraseluler dan

mempengaruhi kejadian penyusupan dan penyebaran sel tumor (Criscitiello *et al.*, 2014).

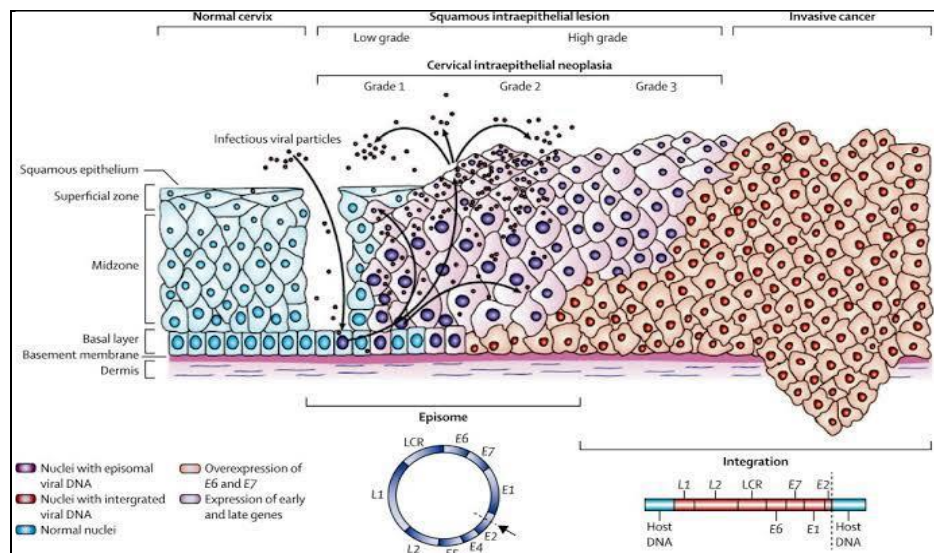
d) **Memblokir MAPK**

Mitogen-activated protein kinase merupakan suatu protein spesifik memfosforilasi serin, treonin, dan tirosin asam amino. Protein ini aktif akibat eksternal spesifik variabel melalui sinyal intraseluler fosforilasi dan pengarahan ke target. Biologis sel dianggap seperti penguat sinyal dari MAPK. *Mitogen-activated protein kinase* sesekali diekspresikan secara besar dalam regulasi sel tumor (Ruiz-Tores, 2017). Fosfolipid yang terlibat di dalam proses mekanisme yaitu protein sintesis, gen ekspresi, diferensiasi, proliferasi sel, dan karsinogenik sangat tergantung pada PKC (Protein Kinase C). Protein PKC adalah salah satu enzim yang berperan dalam pengendalian fungsi protein (Ruiz-Tores, 2017).

3. **Perkembangan Kanker Serviks**

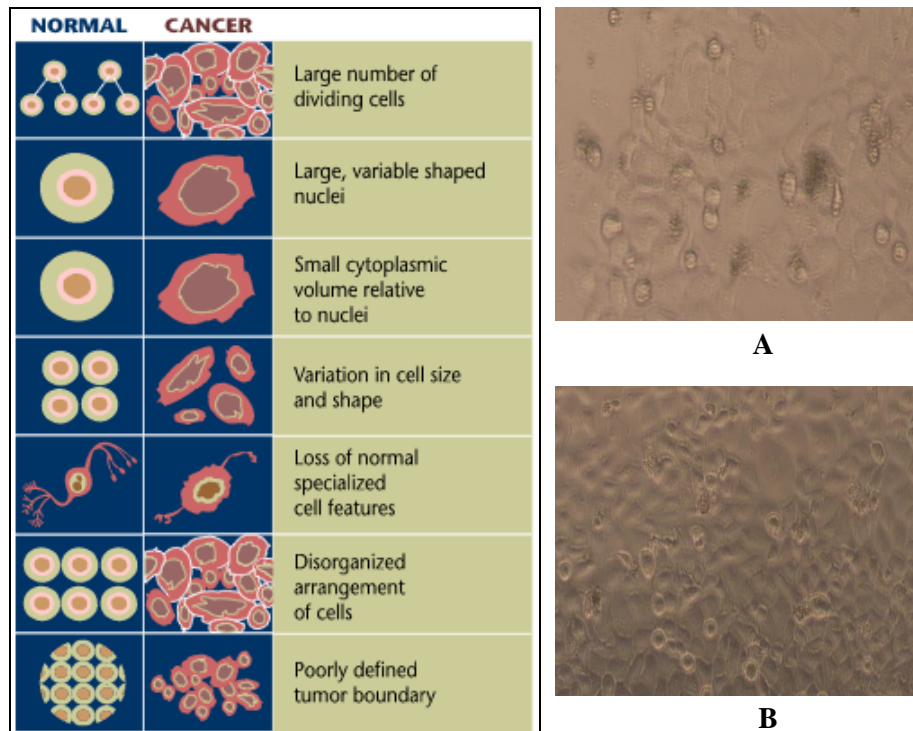
Kanker serviks merupakan suatu bentuk keganasan yang terjadi pada leher rahim (serviks) yang disebabkan oleh adanya pertumbuhan yang abnormal dari jaringan epitel serviks. Epitel serviks memiliki tiga zona, zona pertama (ektoserviks) terdiri dari sel epitel pipih berlapis, zona kedua (endoserviks) terdiri dari sel epitel kolumnar selapis, dan zona ketiga adalah zona peralihan dari sel epitel pipih menjadi sel epitel kolumnar (*transformation zone*) Toshiyuki *et al.*, 2012, jaringan epitel serviks memiliki beberapa lapisan yakni lapisan basal (stratum basal), tengah (stratum spinosum dan stratum granulosum), dan bagian suprabasal (stratum korneum) Toshiyuki *et al.*, 2012, pada tahap awal kanker serviks, ditemukan lesi abnormal sel-sel epitel serviks yang bersifat non-invasif namun dapat berkembang menjadi kanker serviks diberi nama *Cervical Intraepithelial Neoplasia* (CIN) Eileen *et al.*, 2003.

Ada beberapa stadium CIN (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*) yaitu CIN tahap I, CIN tahap II, dan CIN tahap III. Pada CIN tahap I, lesi abnormal terjadi pada 1/3 bagian jaringan epitel. Tahap ini memerlukan waktu sekitar 3 tahun dari sejak infeksi pertama terjadi, CIN tahap II lesi abnormal mencapai 2/3 jaringan epitel. CIN tahap III lesi abnormal terjadi pada lebih dari 2/3 jaringan epitel bahkan hampir seluruh jaringan epitel mengalami lesi abnormal (*carcinoma in situ*). CIN tahap III memerlukan waktu 3-6 tahun. Apabila tidak mendapat pengobatan, infeksi HPV dapat menjadi persisten selama 5-10 tahun dan kemudian dapat berkembang menjadi kanker invasif (Gambar 6) Toshiyuki *et al.*, 2012; Margareth *et al.*, 2012.



Gambar 6. Perkembangan Kanker Serviks (Evriarti, 2019).

Sel epitel normal (warna sel biru) mengalami mikroabrasi atau luka sehingga partikel virus masuk dan menginfeksi sel basal epitel. Infeksi HPV mulai menyebar ke sel epitel seiring diferensiasi sel epitel (sel epitel warna pink berinti ungu). Pada tahap selanjutnya HPV mengintegrasikan genomnya ke sel host (sel warna jingga berinti merah) sehingga terjadi delesi pada gen E2 virus. Delesi gen E2 menyebabkan over ekspresi E6 dan E7 yang berujung pada terbentuknya kanker serviks Ciaran BJ *et al.*, 2014. Kanker serviks terbentuk dari sel normal yang bermutasi akibat adanya faktor lingkungan maupun yang lain. Perbedaan sel normal dan sel yang terkena kanker dapat dilihat pada (Gambar 7).



Gambar 7. Perbedaan Sel Normal dan Sel Yang Terkena Kanker (Utari *et al.*, 2013). Morfologi Sel *HeLa* (a) Sel *HeLa* dengan Kepadatan $2 \times 10^4/100$ Suhu 37°C Sampel dengan Seri Konsentrasi Selama 24 Jam, dengan $100 \mu\text{l}$ Direaksikan dengan MTT Selama Lebih kurang 6 jam, MTT Akan Dipecah Oleh Sistem Reduktase Suksinat Tetrazolium Membentuk Formazan (b) Morfologi Sel *Hela* Tanpa Perlakuan (CCRC UGM, 2013).

D. Tumbuhan *Sargassum duplicatum*

Di Indonesia terdapat banyak jenis rumput laut yang bernilai ekonomis cukup tinggi salah satu diantaranya *Sargassum duplicatum* yang mengandung bahan alginat dan iodin yang digunakan pada industri makanan, farmasi, kosmetik dan tekstil. Selain itu juga *Sargassum duplicatum* memiliki sekitar 12 macam spesies yang ada di Indonesia, seperti: *Sargassum duplicatum*, *Sargassum histrix*, *Sargassum echinocarpum*, *Sargassum gracilimum*, *Sargassum obtusifolium*, *Sargassum binderi*, *Sargassum polycystum*, *Sargassum crassifolium*, *Sargassum microphyllum*, *Sargassum aquofilum*, *Sargassum vulgare*, dan *Sargassum polyceratium* (Sinurat & Kusumawati, 2017). *Sargassum duplicatum* merupakan salah satu jenis alga cokelat yang

banyak terdapat di perairan Indonesia. Alga coklat mengandung metabolit sekunder yang bermanfaat bagi kesehatan antara lain senyawa alkaloid, glikosida, tanin dan steroid yang banyak digunakan dalam pengobatan dan industri farmasi (Satyarsa, 2019). Alga coklat juga mengandung senyawa bioaktif seperti fucoxantin, steroid, selulosa, fenolat, terpenoid, phlorotannin, flavonoid dan saponin (Widiastuti *et al.*, 2022).

1. Klasifikasi Tumbuhan *Sargassum duplicatum*

Berdasarkan sistematika dari *Sargassum duplicatum* adalah sebagai berikut: (Silberfeld *et al.*, 2014).

Kerajaan	: Chromista
Filum	: Phaeophyta
Kelas	: Phaeophyceae
Ordo	: Fucales
Famili	: Sargassaceae
Genus	: <i>Sargassum</i>
Spesies	: <i>Sargassum duplicatum</i> J.Ag.

2. Morfologi Tumbuhan *Sargassum duplicatum*

Sargassum duplicatum merupakan alga coklat yang hidup pada habitat karang dengan kedalaman 0,5-10 meter. *Sargassum duplicatum* adalah salah satu genus dari kelompok rumput laut coklat yang merupakan genera terbesar dari family Sargassaceae. *Sargassum duplicatum* memiliki ciri umum seperti *Sargassum* lainnya yaitu batang silindris, tegak, panjang talus sekitar 35 cm, warna thallus coklat kekuningan, holdfast berbentuk

discoid berrhizoid, dengan axis silindris. Mempunyai talus bentuk batang dan vesikel. Talus batang pendek, percabangan utama tumbuh rimbun di bagian ujungnya. Panjang talus bentuk daun 1,3 - 4,2 cm. Lebar talus bentuk daun 0,25 - 1,15 cm. Pada umumnya berbentuk membujur dan runcing atau membulat, dengan tepi bergerigi. Cryptostoma jelas, urat daun tidak begitu jelas. Vesikel berbentuk oval atau spherical, berukuran kecil, jumlah banyak pada talus dewasa, dengan diameter 1,5 - 3 mm. Ujung berduri dan membulat, melekat pada talus batang primer atau sekunder, dapat secara bergerombol atau soliter. Reseptakel bulat memanjang atau gepeng dengan pinggir berduri terdapat dalam satu rangkaian bersama daun dan vesikel (Kumalasari *et al.*, 2018).



Gambar 8. Morfologi *Sargassum duplicatum* (Dokumen pribadi, 2022)

3. Kandungan Kimia Tumbuhan *Sargassum duplicatum*

Komponen aktif dari alga coklat sudah banyak diteliti yang berkaitan dengan sumber antioksidan alami, serta tinggi kadar senyawa fenolik. Plorotanin adalah anggota keluarga senyawa fenolik yang spesifik ditemukan pada alga coklat, dan diketahui sangat kuat bioaktivitas antioksidannya (Lann *et al.*, 2016; Sanjeewa *et al.*, 2016). Beberapa peneliti telah mengungkapkan potensi *Sargassum duplicatum* dari berbagai wilayah perairan Indonesia sebagai sumber antioksidan alami. Menurut

Nurilmala *et al.*, (2018) meneliti *Sargassum* sp. dari Kepulauan Seribu, Jakarta. Potensi antioksidan ekstrak metanolnya termasuk kuat dengan IC_{50} sebesar 57,05 $\mu\text{g mL}$, kandungan Vitamin E nya sebesar 165.19 $\mu\text{g mL}$, serta mengandung beberapa senyawa aktif fenolik, flavonoid, dan triterpenoid.

Sargassum duplicatum kaya senyawa metabolit sekunder seperti : fenolik, flavonoid, tannin, sterol, terpenoid, saponin, alkaloid (Balanquit dan Fuentes, 2015 ; Baleta *et al.*, 2017) juga glikosida (Kumbar, 2015). Hal ini sejalan dengan penelitian (Widiastuti *et al.*, 2022) bahwa alga coklat juga mengandung senyawa bioaktif seperti, saponin, tannin, alkaloid, terpenoid, dan flavonoid. Selain itu banyak penelitian yang menggunakan tanaman ini sebagai aktivitas antikanker seperti penelitian Arsianti *et al.*, 2020. *Sargassum* sp mempunyai aktivitas sitotoksik terkuat melawan sel HeLa sebesar IC_{50} 38,3 ($\mu\text{g/ml}$). Sedangkan Ekstrak n-heksan *Sargassum polycystum* memiliki kemampuan untuk membunuh sel *HeLa* sebesar IC_{50} 12,78 ($\mu\text{g/ml}$). Hal ini membuat senyawa yang terkandung dapat dijadikan sebagai obat antikarsinogenik yang sangat berguna untuk menghambat sel kanker serviks *HeLa* melalui induksi apoptosis (Vashegi *et al.*, 2018).

Sargassum sp memiliki kandungan Antioksidan tinggi senyawa ini yang dapat mencegah proses oksidasi radikal bebas. Radikal bebas tanpa kita sadari terbentuk secara terus - menerus di dalam tubuh baik berupa proses metabolisme sel normal, peradangan, kekurangan gizi, serta akibat respon terhadap pengaruh dari luar tubuh, misalnya polusi lingkungan, ultraviolet (UV), dan asap rokok. Radikal bebas sering dihubungkan dengan berbagai peristiwa fisiologis misalnya peradangan, penuaan, dan penyebab kanker. Konsumsi antioksidan dapat menurunkan terjadinya penyakit degeneratif, misalnya kardiovaskular, kanker, aterosklerosis, dan osteoporosis (Darmawati *et al.*, 2016).

4. Manfaat Tumbuhan *Sargassum duplicatum*

Sargassum duplicatum merupakan salah satu makroalga yang memiliki nilai ekonomi, walaupun bukan merupakan produk unggulan rumput laut. Selain dimanfaatkan sebagai sumber alginat, *Sargassum duplicatum* juga dimanfaatkan dalam bidang industri farmasi. Berdasarkan Pramesti *et al.*, (2017), menjelaskan bahwa *Sargassum duplicatum* memiliki sifat farmakologis yang menjanjikan seperti antivirus, antitumor, antioksidan, antifouling, dan antijamur. Selain itu pemanfaatan dari *Sargassum duplicatum* dapat sebagai sumber polisakarida bioaktif dari laut. Senyawa polifenil dari *Sargassum duplicatum* memiliki aktivitas antioksidan yang merupakan senyawa bioaktif dari rumput laut cokelat yang diketahui memiliki sifat antiproliferasi, antitumor dan antikanker dengan menginduksi apoptosis, menghambat invasi, metastasis, dan angiogenesis sel kanker. Zat ini telah diketahui mampu menghambat pertumbuhan beberapa jenis kanker (Firdaus *et al.*, 2018).

E. Tumbuhan *Padina australis*

Padina australis merupakan salah satu spesies anggota dari makroalga coklat atau Phaeophyta yang menghasilkan alginat. Selain alginat, *Padina australis* juga mengandung berbagai senyawa kimia lain. Secara umum, *Padina australis* tumbuh tersebar mulai zona intertidal sampai zona subtidal. Alga ini dapat tumbuh lebih baik pada substrat berbatu (Kautsari dan Ahadiansyah, 2016), karang mati (Kemenangan *et al.*, 2017) serta sebagai epifit pada makroalga lain dan lamun. Kondisi ekologi setiap lokasi tentu tidak sama persis. Sebagai contoh, jenis substrat, kuat arus, kecerahan, oksigen terlarut, serta makro dan mikro nutrisi cenderung memiliki variasi yang tinggi. Perbedaan kondisi lingkungan tentunya berdampak terhadap variasi morfologi tumbuhan.

Padina australis memiliki pertumbuhan yang lebih baik pada substrat berbatu dibandingkan substrat berpasir (Kautsari dan Ahadiansyah, 2016). Perbedaan

lingkungan yang berdampak pada perbedaan morfologi tidak hanya terjadi pada tumbuhan rendah seperti *Padina australis*, tetapi terjadi juga pada tumbuhan tingkat tinggi seperti pada Ubi Jalar (Warhamni *et al.*, 2013) Mentimun dan Labu (Zufahmi *et al.*, 2019).

1. Klasifikasi Tumbuhan *Padina australis*

Klasifikasi *Padina australis* menurut Silberfeld *et al.*, (2014) adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Chromista
Filum	: Ochrophyta
Kelas	: Phaeophyceae
Ordo	: Dictyotales
Famili	: Dictyotaceae
Genus	: <i>Padina</i>
Spesies	: <i>Padina australis</i> Hauck

2. Morfologi Tumbuhan *Padina australis*

Padina australis berdasarkan hasil penelitian, *Padina australis* yang ditemukan berbentuk seperti kipas, berupa lembaran tipis bersegmen dengan garis yang cenderung melingkar. Pinggiran talus cenderung melengkung ke dalam. Talus berwarna coklat muda-kehijauan. *Holdfast* berbentuk cakram kecil dan berserabut. Menurut Cribb (1996), *Padina australis* memiliki habitat di sekitar genangan air pada batu karang pantai. Morfologinya berbentuk seperti kipas dengan diameter 3-4 cm dengan lingkaran konsentris. Warnanya coklat kuning atau kadang keputih-putihan akibat pengapuran. Adapun menurut Kepel *et al.*, (2018), talus *Padina* sp. memiliki garis-garis konsentrik ganda pada permukaan bawah dengan jarak yang sama satu sama lain, berkisar 2-3 mm.

Pengapuran terjadi di bagian permukaan. Alga ini hidup pada substrat berpasir dan karang. *Padina australis* berupa lembaran tipis bersegmen-segmen (*lobus*) dengan garis berambut radial yang berbentuk seperti kipas (Ghazali *et al.*, 2021). *Padina australis* tumbuh menempel pada bebatuan di daerah rata-rata terumbu karang. Alga ini memiliki *holdfast* untuk melekat pada bebatuan atau pasir, dengan tangkai yang pipih dan pendek untuk menghubungkan alat pelekat ini dengan ujung meruncing dari talus yang berbentuk kipas (Kemenangan *et al.*, 2017).



Gambar 9. Morfologi *Padina australis* (Dokumen pribadi, 2022)

3. Kandungan Kimia Tumbuhan *Padina australis*

Hasil pemeriksaan simplisia menunjukkan bahwa, *Padina australis* mengandung alkaloid, flavonoid, kuinon, saponin, steroid, dan tanin (Nuzul *et al.*, 2018). Selain itu, *Padina australis* juga mengandung protein, lemak, karbohidrat, dan serat (Manteu *et al.*, 2018) serta senyawa bioaktif lainnya. Alkaloid yang terkandung didalam tumbuhan *Padina australis* mampu memodulasi jalur pensinyalan yang terlibat dalam proliferasi, siklus sel, dan metastasis. Senyawa ini bekerja dengan cara menyebabkan kerusakan DNA, menginduksi apoptosis, dan bertindak sebagai agen antiproliferatif. Alkaloid mampu meningkatkan apoptosis dengan cara menginduksi kerusakan DNA (Habli, 2017). Selain itu steroid memiliki efek antitumor pada berbagai macam sel kanker manusia dengan

menargetkan fase siklus sel G1/S (Bary, 2018). Fase G1 merupakan fase yang penting dalam mempengaruhi siklus sel. Jika sel pada fase G1 memutuskan untuk melanjutkan siklus sel, sel akan memasuki tahap selanjutnya yaitu fase S. Oleh karena itu, untuk menghambat proliferasi sel kanker, senyawa steroid menghambat perkembangan sel pada tahap G1 (Haryono, 2018). Flavonoid yang terkandung di pada *Padina* sp termasuk ke dalam senyawa polifenol, metabolit sekunder yang memiliki aktivitas sebagai antikanker. Flavonoid memberikan stimulasi pada aktivitas enzim sehingga terjadi proses penginduksian apoptosis, menghambat siklus hidup sel, mengatur fungsi imun tubuh dan menghambat terbentuknya inflamasi, angiogenesis sel kanker dan, antiproliferasi (Ismayarni, 2018).

4. Manfaat Tumbuhan *Padina australis*

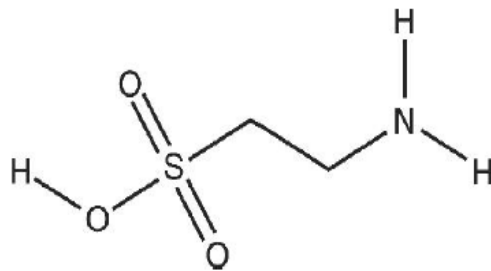
Padina australis sangat berpotensi sebagai sumber senyawa antibakteri (Puasa *et al.*, 2018), antikanker dan antioksidan (Handayani dan Zuhrotun, 2017; Husni *et al.*, 2014a), pengawet bahan makanan (Husni *et al.*, 2014b), bahkan sebagai biosorpsi logam (Bijang *et al.*, 2018; Murugaiyan, 2020; Siahaan *et al.*, 2017). Besarnya pemanfaatan senyawa dari *Padina* sp, membuat spesies ini mulai dikaji karakteristik habitat (Safitri *et al.*, 2020) dan peluang untuk dibudidayakan (Kemenangan *et al.*, 2017). Meskipun demikian, alga ini belum dimanfaatkan oleh masyarakat secara luas seperti *Sargassum* sp, *Caulerpa* sp, *Codium* sp, dan lain-lain (Ghazali dan Nurhayati, 2018).

F. Taurin

Pada tahun 1827, ilmuwan Jerman yaitu Friedrich Tiedemann dan Leopold Gmelin pertama kali mengisolasi taurin dari empedu sapi. Pada manusia, taurin ditemukan pada otot rangka, jantung, sel darah putih dan sistem saraf pusat. Selain itu, senyawa ini juga dapat ditemukan pada beberapa sayuran hijau dan kacang-kacangan. Burhan, (2004)

menjelaskan, pada mamalia sintesis taurin terjadi dalam pankreas melalui jalur asam sistein sulfinik untuk membentuk *hypotaurine*.

Taurin ialah salah satu jenis asam amino non esensial yang mengandung sulfur serta memiliki fungsi dalam proses fisiologi tubuh mahluk hidup seperti sebagai antioksidan, osmoregulasi, serta menjaga stabilitas membran sel (Ginguay *et al.*, 2016), homeostasis dari kalsium dalam sel, serta mampu memacu pertumbuhan dan penglihatan (Widyasti *et al.*, 2013). Taurin adalah asam amino nonesensial, tetapi tidak termasuk kelompok protein karena tidak memiliki gugus karboksil (-COOH) yang diperlukan untuk membentuk ikatan peptida (Gambar 10). Taurin tidak digolongkan sebagai asam amino karena tidak memiliki gugus karboksil. Namun, taurin memiliki gugus sulfonat sehingga disebut asam sulfonat amino (Burhan, 2004).



Gambar 10. Taurin (Strange dan Jackson, 1997).

Beberapa studi *in vitro* menunjukkan bahwa rendahnya level taurin pada tubuh berbagai spesies hewan berkaitan dengan timbulnya beragam penyakit patologis, seperti kardiomiopati, degenerasi retina, serta pertumbuhan yang terhambat. Taurin telah digunakan secara klinis dalam pengobatan berbagai penyakit seperti penyakit kardiovaskuler, hiperkolesterolemia, epilepsi, alzheimer, gangguan hati, alkoholisme, dan fibrosis, dengan tingkat keberhasilan yang beragam. Taurin berfungsi sebagai antikarsinogenik dengan cara melindungi sel - sel tubuh dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Selain itu peranan dari taurin dapat sebagai antikanker menurut Tu *et al.*, (2015), bahwa sel yang diberikan taurin terbukti memiliki efek dalam proses penghambatan proliferasi sel, dan diduga mampu menginduksi

mekanisme apoptosis pada sel *human hepatocellular carcinoma* (HHCC) HepG2.

G. Doxorubicin

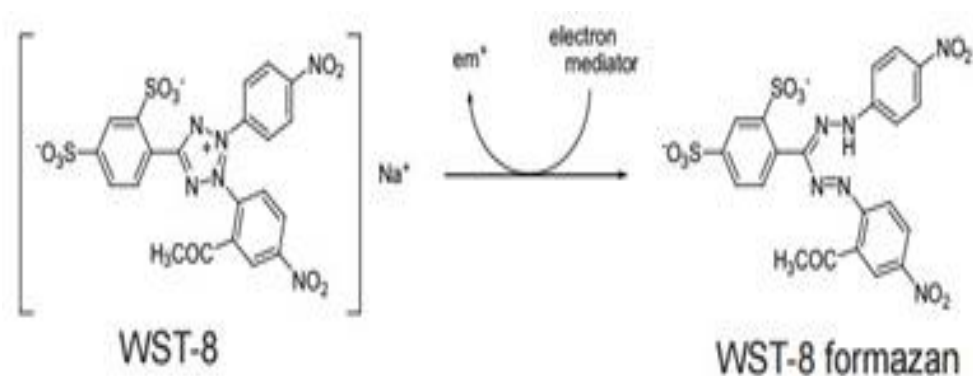
Doxorubicin merupakan obat kemoterapi yang digunakan untuk berbagai macam jenis kanker seperti leukemia akut, kanker payudara, kanker tulang dan ovarium. Senyawa ini diisolasi dari *Streptomyces peucetius var. caesius* dan digunakan secara luas dalam pengobatan kanker. Umumnya Doxorubicin digunakan dalam bentuk kombinasi dengan obat anti kanker lainnya seperti siklofosamid, cisplatin dan 5-FU (Minoti *et al.*, 2004). Mekanisme kerja doxorubicin melalui empat mekanisme yaitu; 1) Penghambat Topoisomerase II; 2) Interkalasi DNA sehingga mengakibatkan penghambatan sintesis DNA dan RNA; 3) Pengikatan membran sel yang menyebabkan aliran dan transport ion; 4) Pembentukan radikal bebas semiquinolon dan radikal bebas oksigen melalui proses yang tergantung besi dan proses reduktif yang diperantai oleh enzim (Bruton *et al.*, 2005). Doxorubicin biasa digunakan untuk terapi pengobatan kanker. Doxorubicin adalah antibiotik golongan antrasiklin dengan mekanisme aksi pada penghambatan Topoisomerase II dan berinteraksi dengan DNA sehingga timbul penghambatan DNA dan RNA. Mekanisme aksi lainnya dari Doxorubicin yang mendukung penghambatan proliferasi sel, menjadikan Doxorubicin sebagai agen kemoterapi yang baik. Toksisitas Doxorubicin juga telah banyak diketahui dan dapat menyebabkan kardiotoxikitas pada penggunaan jangka panjang. Efek samping pada pemakaian kronisnya bersifat ireversibel, termasuk terbentuknya cardiomyopathy dan congestive heart failure (Childs *et al.*, 2002). Dalam penggunaannya, Doxorubicin banyak digunakan dalam pengobatan kanker terutama kanker payudara. Doxorubicin merupakan agen kemoterapi pilihan pertama untuk kanker payudara. Doxorubicin bekerja dengan cara mengikat DNA sel kanker dan memblok enzim yang penting seperti topoisomerase II. Ini membuat DNA menjadi kecil dan sel kanker tidak dapat berkembang (Minoti *et al.*, 2004). Efek samping yang ditimbulkan oleh Doxorubicin cukup banyak, salah satunya adalah efek kardiotoxik. Pada

pemakaian Doxorubicin dapat meningkatkan produksi oksidan yang sangat berbahaya bagi jantung dalam artikel ini, akan dibahas mengenai efek kardiotoxik akibat penggunaan Doxorubicin (Childs *et al.*, 2002).

H. Uji Sitotoksik Metode WST-8 Assay

Uji sitotoksik secara *in-vitro* menggunakan kultur sel telah banyak digunakan sebagai uji sitotoksitas bahan kimia dan untuk pengujian obat. Saat ini, uji sitotoksik juga digunakan dalam penelitian di bidang onkologi untuk mengevaluasi toksisitas senyawa dan penghambatan pertumbuhan sel tumor selama pengembangan obat. Kelebihan dari uji sitotoksik *in-vitro* ini yaitu cepat, murah, dan dapat menguji sampel dalam jumlah besar. Namun, tes ini memiliki beberapa kelemahan karena secara teknis mereka belum mampu untuk menggantikan tes pada hewan coba (Aslantürk, 2018).

Uji sitotoksik merupakan uji yang dilakukan secara *in-vitro* menggunakan kultur sel untuk mengetahui toksisitas atau tingkat kemampuan suatu bahan dalam merusak organisme. Uji toksisitas secara *in-vitro* ini umumnya digunakan untuk uji pendahuluan dalam bidang farmasi, kosmetik, bahan tambahan pangan, serta pestisida. Metode uji sitotoksik yang umum digunakan adalah metode WST-8 Assay. Penggunaan WST-8 Assay yang paling umum adalah menentukan sitotoksitas obat atau senyawa pada konsentrasi yang berbeda (Gambar 11).



Gambar 11. Prinsip Kerja Uji Sitotoksik Metode WST-8 Assay (Liu, 2012).

Metode ini menggunakan WST-8 atau garam tetrazolium yang berwarna kuning, dimana garam tersebut akan dimetabolisme oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat pada mitokondria sel dan akan berubah menjadi kristal formazan berwarna ungu. Intensitas warna ungu yang terbentuk tersebut kemudian dibaca menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm. Intensitas warna yang dihasilkan akan berbanding lurus dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme (sel hidup) (Dona *et al.*, 2019). Parameter nilai *the half maximal inhibitory concentration* (IC_{50}) digunakan untuk menilai toksisitas. Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar nilai IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Akhir dari uji sitotoksik dapat memberikan informasi persentase sel yang mampu bertahan hidup (Aslantürk, 2018).

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli – September 2022. Pembuatan ekstrak etanol dan uji fitokimia ekstrak etanol *Sargassum duplicatum* dan *Padina australis* dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Sedangkan pengujian sitotoksik, antiproliferasi dan ekspresi *p21* dilakukan di Laboratorium Kultur Sel Sitogenetika dan Genetika Molekuler, Fakultas Farmasi, Universitas Padjajaran Bandung. Penelitian ini merupakan hibah (LPPM) Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Lampung yang telah mendanai sepenuhnya penelitian ini melalui BLU Funding 2022 – Skema Pascasarjana dengan nomor kontrak 818/UN26.21/PN/2022 dan penelitian ini merupakan kerjasama Fakultas Farmasi, Universitas Padjajaran Bandung dan Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan Penelitian

1. Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut peralatan gelas, gelas ukur, spatula, timbangan analitik, oven, *blender*, kertas saring, gelas corong, dan *rotary evaporator*. Tabung reaksi, rak tabung reaksi, *micro-pipett*, gelas beaker, pipet tetes, dan *micro-tips*. Inkubator CO₂, sentrifuge, *flask*, *conical tube*, *microtube 1,5 ml*, *96 well plate*, *clifton*, *laminar air flow cabinet*, *haemocytometer*, *micro pipet*, *serological pipet*, *pipet gun*, cawan petri, *vortex*, *6 well plate*.

Mikropipet 10, 20, 100, 200, 1000 μ l , tabung sentrifuge 1,5 ml , rak tabung kecil, sentrifugator, penangas air 37°C, cover slip, inkubator CO₂, mikroskop, kaca preparat, dan *deck glass* RT-PCR terdiri dari *Eppendorf*®RNA/DNA *LiBind* micro sentifuge tube 1,5 ml dari Sigma Aldrich Z2555548, *vortex*, sentrifuge, tip (*yellow, blue, white*) *axygen*, *Light cycle*®software dari ROCHE, kulkas -80° C, *Tecan Infinite 200 Pro* dan *plate tecan 16 flat bottom black Quarz/Alu* (Kuantifikasi RNA) dan *Nano Drop 2000* (*Thermoscientific*).

2. Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah, *Sargassum duplicatum*, *Padina australis* masing - masing 100 gr simplisia, taurin (kimia mart), kultur sel *HeLa*, kertas saring, alumunium foil, botol film, plastik wrap, akuades, media kultur sel DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles' Medium*), Ribozol, klorofom (CHCl₃), *Penisillin* *Streptomisin* 1%, *fetal bovine serum* (FBS), *trypsin-EDTA* 0,25%, *Phosphate Buffersaline* (PBS), *tripanblue* 0,4% , larutan *dimethyl sulfoxide* (DMSO), isopropanol, *Human antibody p21*, Primer *p21*, *Real Time* PCR kit Promega, RT – PCR *mix* dari *intron Biotechnology* dengan nomor katalog REF 25109 yang terdiri dari *RealMOD*TM*Green* qRT – PCR *mix* (2x) 1,25 ml, qRT – PCR *EnzymeMix* (50x), DNase/RNA sefree *water* 1 ml, *AMV RT-ase*, *AMV RT-buffer*, dNTP *mix*, *Rnase inhibitor* EEBR, *Quer*, *CIS*, *Ethanol 75%*, *RNA Isolation kit* dari *lysis buffer*, *binding buffer*, *washing buffer A*, *washing buffer B*, *elution buffer*, kolom (tabung) dan *collection tube*, *cell counting kit-8*, primer β -aktin (*Housekeeping*), *MEM non essential amino acid solution*, *trypsin*, *Minimum essential medium*, *Neoleae free water* (NFW), *go taq DNA polymerase*, *go script*, *Mgcl2*, dan *Doxorubicin*.

C. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang memiliki tujuan membandingkan

kelompok perlakuan dengan menggunakan sel kanker serviks *HeLa* yang diberi perlakuan dari beberapa konsentrasi ekstrak etanol *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, serta Taurin. Dalam penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan faktorial 3 x 6 yang terdiri dari 3 jenis bahan uji, 6 seri konsentrasi untuk uji sitotoksik. Uji sitotoksik dilengkapi dengan kontrol media (blanko) dan kontrol sel. Selanjutnya untuk uji antiproliferatif atau *doubling time* menggunakan faktorial 3 x 6 x 3 yaitu 3 bahan uji, 6 seri konsentrasi, dan 3 waktu inkubasi. Sedangkan untuk pengujian ekspresi *p21* menggunakan faktorial 3 x 2 yaitu 3 bahan uji, dan 2 seri konsentrasi.

1. Populasi

Jumlah sel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu suspensi sel \pm 20.000.000 sel *HeLa* yang di dapat dari Laboratorium Kultur Sel dan Sitogenetika, Fakultas Farmasi, Universitas Padjajaran Bandung (UNPAD), selanjutnya melakukan pengkulturan dengan media DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles' Medium*), serta penambahan *Penicillin Streptomisin*, (1% fetal bovine serum (FBS), *Trypsin Ethylene Dimamine Tetra Acid* (EDTA) 0,25%, dan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) menurut CCRC (2013).

2. Sampel

Sampel penelitian yang digunakan telah memenuhi persyaratan kriteria inklusi dan eksklusi.

- a. Inklusi, kriteria sel *HeLa* yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kemampuan tumbuh mencapai *confluency* 80% - 90% dan diambil dari induk yang sama.
- b. Eksklusif, selama penelitian sel *HeLa* dalam pengkulturan tidak dapat berkembang ataupun terjadinya kontaminasi.

Tiga perlakuan waktu (jam) dipilih untuk kelompok dalam pengujian sitotoksitas dan antiproliferasi: 24, 48, dan 72 jam. Kelompok perlakuan diberikan tiga macam ekstrak yaitu ekstrak etanol *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, dan taurin dengan konsentrasi bertingkat 62,5, 125, 250, 500, 1000, dan 2000 ppm. Sedangkan kelompok kontrol sel (K-) tanpa diberikan perlakuan, serta kontrol positif (K+) diberikan Doxorubicin dengan konsentrasi 20, 10, 5, 2,5, 1, 25, dan 0,625 ppm.

3. Teknik Pengambilan Sampel

Penelitian ini menggunakan *simple random sampling* yaitu karena dalam populasinya dianggap homogen. Media DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles' Medium*) digunakan untuk mengencerkan subkultur sel *HeLa* yang *confluency* di dalam sumur sehingga setiap sumur berisi sekitar 5×10^4 sel *HeLa*. Sumur yang mengandung *cell line HeLa* kemudian dibagi menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan secara acak.

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Etanol *Sargassum duplicatum*, dan *Padina australis*.

Pembuatan ekstrak etanol tanaman dapat menggunakan metode maserasi, yaitu dengan cara merendam simplisia menggunakan etanol 96% sebagai pelarut karena yang memiliki sifat yang mampu melarutkan hampir semua zat, baik yang bersifat polar, semipolar, maupun non polar serta memiliki kemampuan untuk mengendapkan protein yang menghambat kerja enzim sehingga dapat menghindari proses hidrolisis dan oksidasi (Firtya *et al.*, 2010; Salamah dan Hanifah, 2014).

Sargassum duplicatum dan *Padina australis* didapatkan dari Pantai Dollar Beach Pedada, Kabupaten Lampung Selatan, Provinsi Lampung. *Sargassum duplicatum* dan *Padina australis* semua komponen tanaman ini digunakan untuk membuat ekstrak. Pengambilan sampel uji dilakukan pada jarak ± 5 meter dari garis pantai dengan kedalaman maksimum mencapai 0,5 meter saat permukaan air surut.

Proses selanjutnya yaitu mencuci *Sargassum duplicatum* dan *Padina australis* hingga bersih dengan air mengalir kemudian dikering anginkan pada suhu ruang. Untuk menghilangkan kadar air di dalam *Sargassum duplicatum*, dan *Padina australis* dilakukan proses pengeringan menggunakan oven dengan suhu 30°C selama 2-3 hari. Setelah kering, proses selanjutnya yaitu penggilingan sampel hingga menjadi bubuk dengan blender. Bubuk yang telah diperoleh dilakukan pengayakan hingga bubuk memiliki ukuran yang sama, kemudian di timbang dengan neraca analitik dengan berat yang telah ditentukan. Setelah sampel ditimbang selanjutnya proses maserasi yaitu dengan sampel *Sargassum duplicatum* dan *Padina australis* di masukkan ke dalam pelarut etanol 96% menggunakan perbandingan 1:10 dengan waktu 3 x 24 jam. Selanjutnya maserat disaring dengan gelas corong dan kertas saring. Ekstrak etanol yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* yang bertujuan untuk memisahkan pelarut dengan ekstrak tanaman, proses ini menggunakan suhu 50° C sampai diperoleh ekstrak kental. Selanjutnya, ekstrak kental yang didapatkan dimasukkan kedalam oven dengan suhu 30°C hingga berbentuk pasta dan dapat disimpan di dalam botol kaca (Nurfitri, 2019).

2. Prosedur Pengujian Fitokimia Ekstrak *Sargassum duplicatum*, dan *Padina australis* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Prosedur Pengujian Fitokimia (Tasmin *et al.*, 2014)

Jenis Uji	Perlakuan	Indikator
Saponin	0,5 mL sampel + 5 mL akuades, kemudian dikocok selama 30 Detik	Terbentuk busa
Terpenoid	0,5 mL sampel + 0,5 mL asam asetat glacial + 0,5 mL H ₂ SO ₄	Warna sampel berubah menjadi merah atau kuning
Tanin	1 mL sampel + 3 tetes larutan FeCl ₃	Warna larutan menjadi hitam kebiruan
Alkaloid	0,5mL Sampel + 5 tetes kloroform + 5 tetes pereaksi Mayer (1 g KI dilarutkan dalam 20 mL akuades dan ditambahkan 0,271 g HgCl ₂ hingga larut)	Warna larutan putih kecokelatan
Steroid	0,5 mL sampel + 0,5 mL aquades, dihomogenkan selama 30 detik	Warna sampel berubah menjadi biru atau ungu
Flavonoid	0,5 mL sampel + 0,5 gr serbuk Mg + 5 mL HCl pekat (ditambahkan tetes demi tetes)	Warna larutan merah atau kuning, terbentuk busa

E. Pembuatan Media Kultur

Media biakan sel *HeLa* dibuat menggunakan media DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles' Medium*) hingga 50 ml dan 5 ml larutan *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, serta Pensterp (*Penicillin Streptomycin*) 0,5 mL yang telah dicairkan di ruangan suhu CCRC (2009).

F. Mekanisme Kultur dan Pemanenan *Cell Line HeLa*

Sel *HeLa* dicairkan dalam *Hot Plate* pada suhu 37°C selama dua sampai tiga menit setelah dikeluarkan dari tangki nitrogen cair. Lalu, sel dipindahkan ke *Laminary Air Flow* (LAF) kemudian dimasukkan ke dalam *conical tube* steril dengan 10 mL media kultur DMEM dan diinkubasi pada inkubator CO₂ dengan suhu 36°C selama 24 jam. Berikutnya dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan sel kanker dari medium, selama 5 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Supernatan yang dihasilkan kemudian dibuang dan sel *HeLa* ditanam di dalam cawan petri dengan media DMEM yang mengandung 10% FBS, setelah 3-4 hari media dimodifikasi dan sel-sel ditumbuhkan kembali hingga *confluency* 80% untuk penelitian (80%) (Junaedi, 2009).

Saat sel mencapai *confluency* 80%, sebagaimana ditandai oleh sel yang mengisi cawan petri, kemudian sel dihisap dari dinding cawan petri menggunakan pipet pasteur steril. Sel dilakukan pencucian dua kali dengan 5 ml PBS. Setelah menambahkan larutan *trypsin* EDTA 0,25%, sel diinkubasi selama 3-5 menit pada suhu 36°C dalam inkubator CO₂ untuk melepaskan sel. Kemudian, dengan menggunakan pipet, sel disuspensi kembali dalam 5 ml media yang mengandung 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS) dan Pensterp (*Penicillin Streptomisin*) hingga tidak bergerombol. Setelah itu, sel yang telah diresuspensi ditempatkan di dalam *conical tube* steril (Junaedi, 2009).

G. Perhitungan Sel

Sel *HeLa* dapat dilepaskan dari cawan petri menggunakan tripsin untuk menghitung jumlah sel. Media kultur sel *HeLa* di cawan petri yang telah diinkubasi selanjutnya dihisap dan dibuang kemudian dibilas dengan 10 mL larutan *Fosfat Buffer Saline*. Setelah itu diberikan 3 mL tripsin dan dilakukan inkubasi kembali ke dalam inkubator CO₂ selama lima menit.

Kemudian ditambahkan media 3 mL, dan campuran tersebut dipindahkan ke *conical tube*. Sesudah itu, sel disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Berikutnya membuang supernatan, 10 mL media ditambahkan ke nathan yang diendapkan. 10 μ l *trypan blue* dan 10 μ l sel dipipet ke dalam *well plate*. Sel hidup berwarna bening atau tidak berwarna, tetapi sel mati berwarna biru. Empat kamar hitung dipilih untuk melakukan perhitungan menggunakan *haemocytometer* CCRC (2009).

$$\begin{aligned} \text{Rataan sel} &= \frac{\text{Jumlah sel semua kamar hitung}}{4} \\ \text{Jumlah sel hitung/mL} &= \text{Rataan sel} \times \text{faktor pengenceran} \times 10^4 \\ \text{Jumlah total sel yang diperlukan} &= \text{Jumlah sumuran} \times \text{jumlah sel per sumuran} \\ \text{Volume transfer panen sel} &= \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel hitung/ml}} \end{aligned}$$

H. Preparasi Sampel

Untuk persiapan sampel sebelum uji sitotoksisitas dan antiproliferatif, sebanyak 10 mg ekstrak etanol *Sargassum duplicatum*, *Padina australia*, dan taurin (kimia mart) dapat dilarutkan ke dalam 1 mL *dimetil sulfoksida* (DMSO) 1%. Larutan stok kemudian diencerkan hingga konsentrasi 62,5, 125, 250, 500, 1000, dan 2000 ppm. Sedangkan untuk Doxorubicin menggunakan konsentrasi 20, 10, 5, 2,5, 1,25 dan 0,625 ppm. Ekstrak yang sudah disiapkan dapat diujikan pada *sel line* di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* secara aseptis (CCRC, 2009).

I. Uji Sitotoksik dengan Metode WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)

Sebelum pengujian sitotoksik, dilakukan proses pembuatan media kultur sel *HeLa* dengan menyiapkan media seperti *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%,

Penicillin Streptomisin, DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles' Medium*) yang telah dipanaskan di atas waterbath selama 5 menit, setelah itu dilakukan proses kultur sel (*Seeding*) dengan menggunakan sel hasil perhitungan yang telah ditentukan. Selanjutnya dilakukan pencampuran media pertumbuhan ke dalam *conical tube* dan dilakukan sentrifuge selama 4 menit, setelah itu supernatan dibuang dan natan ditambahkan media DMEM, *Penicillin Streptomisin* dan FBS hingga diperoleh volume akhir *suspense* sel untuk uji. Kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam. Hal ini bertujuan supaya sel dapat menempel pada dinding cawan petri (CCRC,2009).

Sel yang sudah dikultur di dalam cawan petri selama 24 jam dikeluarkan dari inkubator kemudian sel dilakukan pembilasan menggunakan *phosphate buffer saline* (PBS) dan ditambahkan tripsin 3 ml kemudian diinkubasi kembali selama 5 menit. Setelah itu sel dimasukkan ke dalam *conical tube* untuk di sentrifuge. Sel diambil 10 µl ditambahkan *tripan blue solution* 10 µl selanjutnya dihitung dengan menggunakan *haemocytometer* di bawah mikroskop (sel yang hidup menjadi tidak berwarna).

Untuk uji sitotoksik setiap sumuran diberikan 100 µl *suspense* sel, kemudian plate tersebut diberikan media DMSO, dan FBS serta ekstrak tiap sumuran kemudian diberi masing – masing ekstrak dan taurin (kimia mart) dengan konsentrasi 62,5, 125, 250, 500, 1000, dan 2000 ppm sebanyak 50 µl dan di inkubasi lagi selama 24 jam pada inkubator CO₂ dengan suhu 36°C. setelah 24 jam di inkubasi sel yang telah dikultur dikeluarkan kemudian diamati di bawah mikroskop. Selanjutnya sel yang terdapat pada *well plate* diberikan reagen *cell counting kit-8* yang bertujuan agar sel terwarnai pada reagenya. Pemberian sel *counting kit-8* berkisar 1000 µl ke dalam plate. Dilakukan inkubasi kembali hingga 1,5- 2 jam pada suhu 36 °C di inkubator CO₂ sel yang hidup akan bermetabolime. Serapan kemudian dibaca dengan *Nano drop reader* pada panjang gelombang 450 nm (CCRC, 2013).

J. Uji Antiproliferatif dengan Metode WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)

Uji antiproliferatif disebut juga dengan uji *doubling time* dengan kata lain waktu yang diperlukan oleh populasi sel untuk menjadikan jumlahnya dua kali dari jumlah semula sebelum dilakukan proses pengujian, dalam pengujian antiproliferatif tiap sumuran diberikan 100 µl *suspense* sel, kemudian dilakukan proses inkubasi selama 24 jam di dalam inkubator CO₂ dengan suhu 36°C. Tujuan dari proses inkubasi ini supaya sel dapat menempel pada dinding cawan petri menurut CCRC (2009).

Sel yang sudah dikultur di dalam cawan petri selama 24 jam dikeluarkan dari inkubator kemudian sel dilakukan uji antiproliferatif, setiap sumuran diberikan 100 µl *suspense* sel, kemudian ditambahkan ekstrak dan taurin dengan konsentrasi 62,5, 125, 250, 500, 1000, dan 2000 ppm sebanyak 50 µl dan di inkubasi dengan perlakuan waktu yang berbeda seperti: 24, 48, dan 72 jam pada inkubator CO₂ dengan suhu 36°C. Setelah 24 jam di inkubasi sel yang telah dikultur, selanjutnya sel yang terdapat pada *well plate* diberikan reagen *cell counting kit-8* yang bertujuan agar sel terwarnai pada reagensinya. Pemberian *cell counting kit-8* berkisar 1000 µl ke dalam *plate*. Dilakukan inkubasi kembali hingga 1,5- 2 jam pada suhu 36 °C di inkubator CO₂ sel yang hidup akan bermetabolime. Serapan kemudian dibaca dengan *Nano drop reader* pada panjang gelombang 450 nm, kemudian dilakukan proses analisis statistik yang bertujuan untuk mengetahui viabilitas sel pada waktu inkubasi yang berbeda (CCRC, 2013).

K. Uji Ekspresi *p21* dengan Metode RT-PCR (Real Time-Polymerase Chain Reaction)

Pada kultur *cell line HeLa* yang telah diberikan ekstrak *Sargassum duplicatum* dan *Padina australis* serta taurin selanjutnya dilakukan pengujian ekspresi *p21* dengan menggunakan metode RT-PCR (Real Time-Polymerase

Chain Reaction). Dalam pengujian ekspresi *p21* memiliki tiga tahapan yaitu desain primer RNA, isolasi RNA total, dan pengukuran ekspresi *p21* dengan PCR (qPCR).

a) Desain Primer RNA

Desain Primer untuk PCR dapat dilakukan dengan dua cara yaitu studi literatur kemudian dilakukan pengecekan dengan menggunakan software Blast (blast.ncbi.nlm.nih.gov) melalui data NCBI. Urutan basa utama yang akan diperiksa dimasukkan ke dalam kolom "*Enter Query Sequence*" pada layar "BLAST", setelah menu "*nucleotide blast*" dipilih, dan tombol "BLAST" diklik. Informasi dari pengujian ini disajikan sebagai daftar spesies yang mempunyai kemiripan hingga 99-100% dengan urutan basa primer (NCBI) yang diuji dan setelah itu bisa dilakukan proses mendesain primer *p21*. Urutan primer ekspresi *p21 codon 31* dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: primer forward 5'- CTGAGCCGCGACTGTGTGATGCG-3 dan primer reserve 5'- GGTCTGCCGCCGTTTTCGACC-3 (Lin *et al.*, 2019).

b) Isolasi Total RNA

Sebelum isolasi RNA dilakukan pembuatan larutan stok dengan cara, ekstrak etanol 10 mg *Sargassum duplicatum* dan *Padina australis* diberikan dengan 1 mL (DMSO) *dimetil sulfoksida* untuk membuat larutan dengan konsentrasi 250 dan 500 ppm, sedangkan Doxorubicin 0,5 ppm dan 1 ppm. Untuk mempersiapkan sampel, dilakukan proses *seeding* sel *HeLa* yang ditumbuhkan pada 6 disk sel kultur sampai *confluency*. Adapun mekanisme dalam isolasi RNA adalah sebagai berikut: Langkah pertama, setelah sel *confluency* diberikan treatment dengan pemberian ekstrak maupun kontrol obat yang telah ditentukan dan inkubasi selama 24 jam, kemudian sel ditambahkan larutan ribozol reagen 500 µl per 1 dish (1 plat dish terdapat 6 dish) berikutnya diresuspensi agar melisis sel dan di inkubasi selama 24 jam. Sel yang sudah dikultur di dalam cawan petri selama 24 jam dikeluarkan dari

inkubator dimasukkan ke dalam tube free RNase diberi label proses ini disebut dengan lysis (Sampel *Homogenization*).

Selanjutnya fase pemisahan (*Separation Phase*) sampel yang telah dihomogenkan diinkubasi pada suhu kamar selama 5-10 menit. Selanjutnya diberikan 100 µl kloroform dihomogenkan dengan shaker selama 15 detik dan didiamkan pada suhu ruang selama 3 menit dan tube disentrifugasi 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Hal ini mengakibatkan terjadinya tiga fase yaitu bagian warna merah pada dasar (*fase fenol-chloroform*), warna putih pada bagian tengah (*interphase*), dan warna bening bagian atas (*aqueous phase*) bagian inilah RNA berada. Pindahkan sampel RNA pada fase *aqueous* sebanyak 50 µl dipindahkan ke mikrotube dan ditambahkan NFW (*Neolase Free Water*) 100 µl dilakukan sentrifuge kembali.

Fase presipitasi RNA (*Precipitation of DNA*) sampel RNA fase *aqueous* dimasukkan 250 µl isopropanol. Larutan ini divorteks selama 5-10 detik dan diinkubasi kembali dalam suhu kamar selama 10 menit. Langkah selanjutnya adalah melakukan sentrifuge kembali pada 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Hasil dari fase presipitasi ini didapatkan pelet putih yang transparan yang terdapat di dasar tube merupakan pelet berisi RNA.

Selanjutnya fase pencucian (*Washing*) Supernatan dibuang dan kemudian pelet ditambahkan etanol 70% yang telah diencerkan dengan RNase free water berikutnya ditambahkan 500 µl etanol 70%. Larutan di sentrifuge kembali pada 7,500 rpm selama 5 menit. Fase pelarutan pelet RNA

(*Re-dissolve the RNA Pellet*) setelah dilakukan washing selanjutnya etanol dibuang sehingga pellet RNA dapat dikeringkan. Kedalam pellet RNA ditambahkan larutan *nuclease free-water* sebanyak 25 µl (*Modifikasi Life Technologies, 1999*). Isolat divorteks dengan DNase 0,01 U/ µl kemudian disimpan didalam freezer -80 °C sebelum dilanjutkan ke proses sintesis RT-PCR.

Fase purity RNA konsentrasi dan tingkat kemurnian RNA diukur dengan spektrofotometer NanoDrop 2000 (260/280 nm) dari *Thermo Scientific* dengan volume sampel 2 µl/sampel. Fungsi dari alat spektrofotometer

Nano drop reader 2000 yaitu untuk mengetahui nilai absorbansi dari suatu larutan. Sampel yang dapat di ukur dengan menggunakan alat ini seperti asam nukleat (DNA/RNA), protein dan lama waktu pengukuran absorbansi relative singkat.

c) Pengujian Ekspresi *p21* Menggunakan Real-time PCR (qPCR)

Sebelum melakukan qPCR RNA yang didapatkan, ekspresi *p21* dievaluasi menggunakan teknik RT-PCR. Namun sebelum proses RT-PCR dilakukan pembuatan master mix qPCR berdasarkan Tabel 2. Untuk amplifikasi menggunakan primer *β -actin* sebagai gen *housekeeping* (untuk normalisasi) dan *p21* sebagai (gen target). Komposisi Master Mix didapatkan dengan volume total 20 μ l Seperti pada tabel berikut ini:

Tabel 2. Komponen Master Mix (RT-PCR)

<i>Master Mix</i>	<i>Volume</i>
<i>Go taq</i>	10 μ l
<i>Go Script</i>	0,4 μ l
<i>10 μl forward primer</i>	1 μ l
<i>10 μl Reverse Primer</i>	1 μ l
<i>MgCl2</i>	1 μ l
<i>NFW (Neolease Free Water)</i>	4,6 μ l
<i>Template RNA</i>	2 μ l

Langkah selanjutnya setelah mendapatkan isolat RNA yaitu pengukuran ekspresi *p21* dengan menyiapkan tube ke dalam es box, setelah itu dimasukkan 18 μ l master mix qPCR ke dalam tube yang diikuti sampel RNA template 2 μ l dengan volume total reaksi mix 20 μ l. *Well-plate* ditutup dengan optical strips dan disentrifuge selama 5 menit pada 3.000 rpm. Running didalam mesin qPCR diprogram sesuai dengan tabel 3. Pengukuran ekspresi *p21* menggunakan suhu denaturasi = 95°C, suhu *annealing* = 61°C

dan suhu ekstension = 72°C. *Melting time* primer *p21* adalah masing - masing 55°C. Pengukuran konsentrasi gen dapat menggunakan metode kuantitatif relatif, seperti metode livak atau perbandingan delta-delta treshhold atau metode *plaffl*.

Tabel 3. Siklus qPCR

No.	Reaksi	Suhu (°C)	Waktu (menit)	Jumlah siklus
Pre-inkubasi				
1	<i>Pre-denaturation</i>	95,0	02:00	1
Amplifikasi				
2	<i>Denaturation</i>	95,0	02:00	40
3	<i>Annealing</i>	61,0	01:00	
4	<i>Ekstension</i>	72,0	01:00	
<i>Melting Curve</i>				
5	<i>Denaturation</i>	95,0	10:00	1
6	<i>Annealing</i>	61,0	10:00	

(cycling diulang sebanyak 40 kali).

ΔCT eksperimen = CT target pada eksperimen - CT *housekeeping* pada eksperimental

ΔCT kontrol = CT target pada control-CT *housekeeping* control

$\Delta\Delta CT = \Delta CT$ eksperimental - ΔCT control

Perbandingan level ekspresi gen dapat menggunakan $2^{\Delta\Delta CT}$ dengan konsentrasi *p21* yang di ukur menggunakan program *Light Cycler® software* dengan acuan (rumus livak) sehingga diperoleh nilai konsentrasi ekspresi *p21* dalam ukuran picogram. Sebagai kontrol internal dalam penelitian ini yaitu *β-actin* sebagai *housekeeping gene*, sedangkan KIT yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Promega dengan *p21* sebagai target.

L. Analisis Data

Data pengamatan dari sejumlah pengujian ditampilkan dalam bentuk tabel dengan menggunakan software SPSS versi 16.0, dan diperiksa normalitasnya. Untuk data yang berdistribusi normal, dilakukan uji ANOVA pada taraf 5% untuk membandingkan lebih dari dua perlakuan. Uji Post Hoc dilanjutkan jika data berbeda nyata ($p < 0,05$). Tes non-parametrik yang dikenal sebagai uji Kruskal Wallis digunakan untuk mengevaluasi data jika tidak terdistribusi secara teratur. Pengujian lebih lanjut atau penghitungan selisih rata-rata antara kedua perlakuan sama-sama dilakukan dengan menggunakan uji Wilcoxon.

Uji sitotoksik didapatkan dengan menghitung presentase viabilitas sel kanker *HeLa*. Data absorbansi yang diperoleh dari uji sitotoksik sel dikonversi ke dalam persen sel hidup dihitung dengan rumus:

$$\text{Presentase Viabilitas Sel} = \frac{(\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol Sel} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100$$

Kemudian diubah dalam bentuk nilai probit untuk menentukan nilai IC_{50} . Aktivitas sitotoksik dinyatakan dalam IC_{50} (konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel) yang dianalisis dengan menggunakan program *Microsoft Excel* yang mengacu pada *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC, 2013).

Pada uji antiproliferatif data yang diperoleh dilakukan analisis menggunakan program *Microsoft Excel* untuk mendapatkan nilai *doubling time*. Hal ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan jumlah sel hidup pada perlakuan ekstrak dan taurin dengan waktu inkubasi yang berbeda. Nilai *doubling time* dari setiap perlakuan dapat menggunakan rumus sebagai berikut (Nurani, 2011).

$$\text{Doubling time} = \frac{Y-A}{B} \times 100\%$$

Keterangan : Y = Log (2 x Jumlah sel hidup awal)

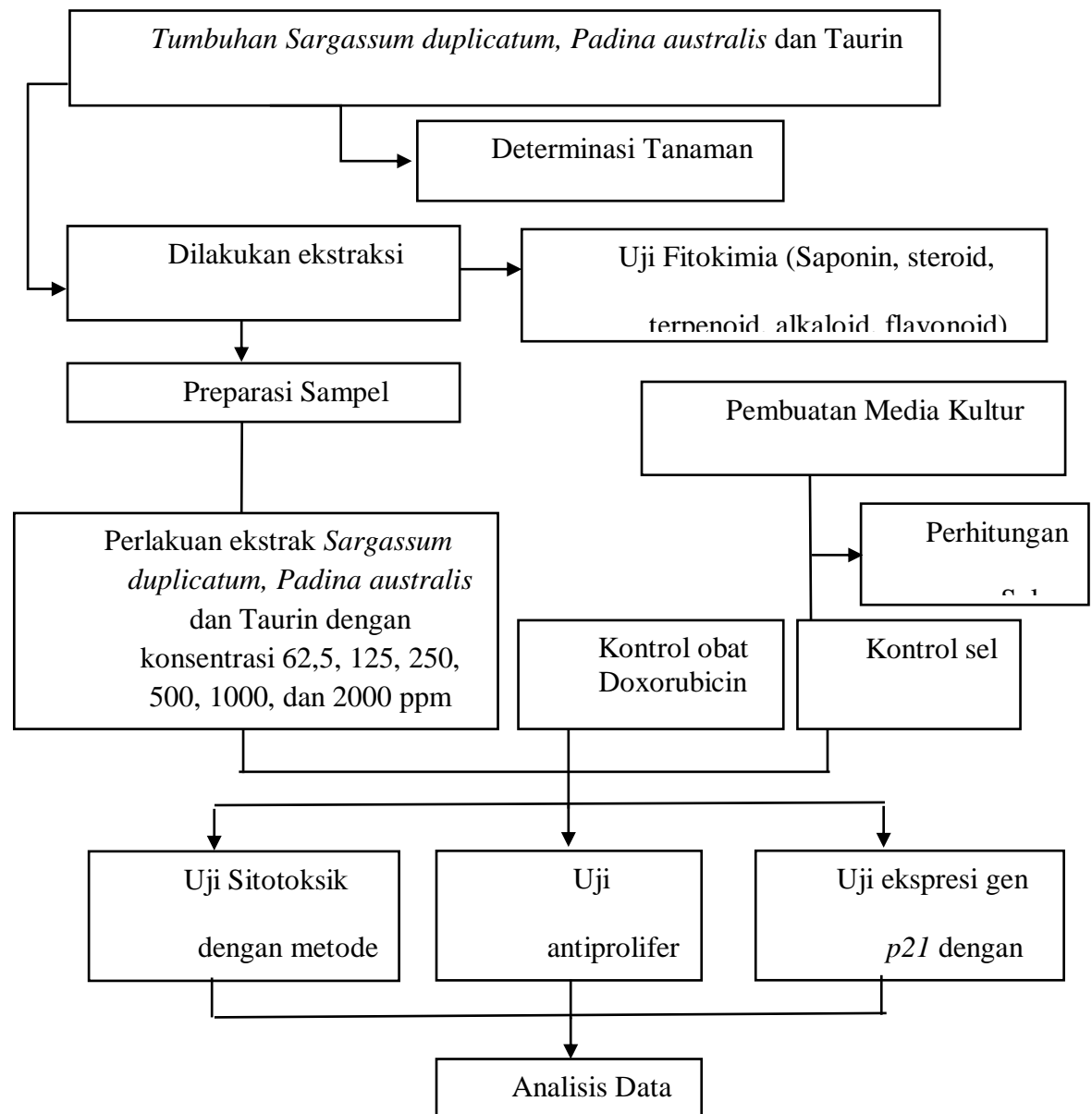
A = Intersep

B = Slope

Data absorbansi yang diperoleh dari uji antiproliferatif sel yang didapatkan selanjutnya dilakukan analisis ragam *One Way* ANOVA dengan SPSS pada taraf kepercayaan 95%, dan apabila ada perbedaan dari antar perlakuan akan diuji lanjut dengan uji *Least Significant Difference* (LSD).

Analisis data uji ekspresi *p21* menggunakan metode *livak* atau perbandingan delta-delta *threshhold*. Nilai CT dari uji PCR dipindahkan ke program *Microsoft Excel* untuk menghitung tingkatan ekspresi relatif dengan menggunakan rumus *livak* yang sudah diautomatisasi, perbandingan level ekspresi gen dapat menggunakan $2^{\Delta\Delta CT}$ dengan konsentrasi *p21* yang di ukur menggunakan program *Light Cycler® software* sehingga diperoleh nilai konsentrasi ekspresi *p21* dalam ukuran picogram.

M. Diagram Alir Penelitian



Gambar 12. Diagram Alir Penelitian.

V. KESIMPULAN

A. Kesimpulan

Adapun kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Aktivitas ekstrak etanol *Sargassum duplicatum* dan *Padina australis* bersifat sitotoksik terhadap sel kanker serviks *HeLa* dengan IC_{50} 110.8 $\mu\text{g/mL}$. dan IC_{50} 681 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan taurin tidak menunjukkan adanya sitotoksik terhadap sel *HeLa* pada penelitian ini.
2. Ekstrak etanol *Sargassum duplicatum*, *Padina australis*, dan taurin bersifat antiproliferatif terhadap sel kanker serviks *HeLa*. Dibuktikan dengan nilai *doubling time* yang merupakan parameter kinetika proliferasi sel.
3. Ekstrak etanol *Sargassum duplicatum* dan *Padina australis* dapat meningkatkan ekspresi *p21* pada kultur sel kanker serviks *HeLa* yang terbukti dengan melihat rerata ekspresi *p21* dengan senyawa uji *Padina australis* konsentrasi 250 ppm lebih tinggi dibandingkan kontrol maupun obat doxorubicin konsentrasi 0,1ppm secara nyata.

B. Saran .

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji LDH (Laktat dehidrogenase), western blotting, dan imunositokimia untuk ekspresi *p21* pada uji induksi apoptosis. Hal ini melihat potensi toksisitas dari *Sargassum duplicatum* dan *Padina australis*, maka ke depannya perlu diteliti kembali toksisitas dan selektivitasnya pada sel kanker lain serta dapat dikombinasikan dengan obat kemoterapi pada sel *HeLa*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, T., Dutta, A. 2009. *p21 in cancer: Intricate network and multiple activities*, *Nat Rev Cancer*.1-14.
- Abdih, H., Kelly.C.J., Bouchier-Hayes, D., Mary Barry & Kearns, S. 2000. Taurine Prevents Interleukin-2-Induced Acute Lung Injury in Rats. *European Surgical Research* 32(6): 347–352.
- Adams, J.M., and Cory, S. 2007. *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*. *Oncogene*; 26:1324-1337.
- Ajdari, Z., Rahman, H., Shameli, K., Abdullah, R., Abd Ghani, M. A., Swee Yeap, S., Abbasiliasi, S., Ajdari, D., & Ariff, A. 2016. Novel Gold Nanoparticles Reduced by *Sargassum glaucescens*: Preparation, Characterization and Anticancer Activity. *Molecule*, 21(123): 1-17.
- Alvest ,C., Silva, J., Pinteus, S., Gaspar, H., Alpoim, M.C., Botana, L.M., Pedrosa, R. 2018. *From marine origin to therapeutics: The antitumor potential of marine algae-derived compounds*. *Front. Pharmacol.* 9:777.
- Amallia, N., Mas'ud.,Z.A, Ratnadewi.,D. 2020. Production of Secondary Metabolite Compounds of Gotu Kola (*Centella asiatica*) Under Salinity and Drought Stress. *J.Jamu Indones.* 5(2):68–75. doi: 10.29244/jji.v5i2.102.
- American Cancer Society. 2019. Breast Cancer: *Treating Breast Cancer*. *American Cancer Society*, 1–120. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment.html>.
- Anisa, F. 2021. Karakterisasi Dan Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap Ekstrak Non Polar, Semi Polar, Dan Polar Dari Daun Sungkai (Doctoral dissertation, Universitas perintis Indonesia).
- Anggadiredja, J.T., Zatnika, A., Purwanto, H., dan Istina, S. 2008. *Rumput Laut, Pembudidayaan, Pengolahan dan Pemasaran Komoditas Perikanan Potensial*. Penebar Swadaya. Jakarta.

- Arisanty, D. 2013. *In Vitro Cytotoxic Study and Detection of Apoptosis on Breast Cancer Cell lines MDA-MB 231 after Exposed to Azadirachta indica A. Juss (neem) Extract*. *J Kesehat Andalas*. 2(2):80. doi: 10.25077/jka.v2i2.125.
- Arsianti, A., Wangsaputra, Bahtiar, A., Fachri, V.K., Azizah N.N., W., Nadapdap, L.D., Ajeng, M.F.A.M., Tanimoto, H., Kakiuchi, K. 2020. *Phytochemical Composition and Evaluation of Marine Algae Sargassum polycystum for Antioxidant Activity and In Vitro Cytotoxicity on Hela Cells*. *Pharmacogn J*. 12(1):88–94.
- Arouma, O.I., B. Halliwell, B.M. Hoey dan Butler, J. 1988. *The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors*. *Biochem Journal*. 256:251-255
- Aslantürk, Ö. S., 2018, *In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*, 1–18.
- Atmadja, W. S. A., Kadi, Silistijo, dan Rachmaniar. 1996. *Pengenalan Jenis- Jenis Rumput Laut Indonesia*. Puslitbang Oseanologi- LIPI, Jakarta.
- Bambang, B.S., Kumalaningsih, S., Susinggih, W., & Hardoko. 2013. *Pholyphenol Content and Antioxidan Activities of Crude Extract from Brown Algae by Various Solvents*. *J. Life Sci. Biomed*. 3 (6); 439-43.
- Balanquit, Brian, J.R., & Rolly, F.G. 2015. *Preliminary Phycochemical Screening and Antioxidant Activity of Some Brown Algae Sargassum Species for Lawaan, Eastern Samar*. *J. Nature Stud*. 14 (1): 12–21. DOI : 10.1017/CBO9 781107415324.004.
- Baleta, Francis, N., Bolaños, J.M., Ruma, O.C., Baleta, A.N., & Cairel, J.D. 2017. *Phytochemicals Screening and Antimicrobial Properties of Sargassum Oligocystum and Sargassum Crassifolium Extracts*. *J. Med. Plants Stud*. 5(1):382–87.
- Bary, K., Elamraoui, B., Laasri, F. E., Mzibri, E.I, M., Benbacer, L., & Bamhaoud, T. (2018). *Cytotoxic Effect of Extracts from The Moroccan Marine Sponge on Human Prostate Cancer Cell Line*. *International Journal of New Technology and Research*, 4(1), 74-78.
- Bendary, E., Francis, R.R., Ali, H.M.G., Sarwat, M.I. & El Hady, S. 2013. *Antioxidant and Structure–activity Relationships (SARs) of Some Phenolic and Anilines Compounds*. *Annals Agricul. Sci*. 58 (2): 173–81. DOI : 10.1016/j.aos.2013.07.002.

- Bijang, C.M., Latupeirissa, J., dan Ratuhanrasa, M. 2018. Biosorpsi Ion Logam Tembaga (Cu²⁺) pada Biosorben Rumpun Laut Coklat (*Padina australis*). *Indo. J. Chem. Res*, 6(1), 26–37.
- Brugarolas, J., Bronsons, R.T., Jacks T. 1998. *p21 is a critical CDK2 regulator essential for proliferation control in Rb-deficient cells*, *Journal of Cell Biology* (141)2 :503-4.
- Budiani, D.R., Setiawan, Y., Wijono, W.Y., Pesik, R.N., Dlidir, D., Mudigdo, A. 2007. Pengaruh ekstrak batang sarang semut (*Myrmecodia pendans*, Merr & Perry) terhadap ekspresi protein p53 mutan galur sel kanker payu-dara T47D. PIT: IAPI Banjarmasin.
- Burhan, E. 2004. Angka tahan hidup penderita kanker paru jenis karsinoma bukan sel kecil yang layak dibedah. (Tesis). Departemen Pulmonologi dan Ilmu Kedokteran Respirasi FKUI. Jakarta.
- Cancer Chemoprevention Riset Center (CCRC) Farmasi UGM. 2009. Prosedur Tetap Kerja In vitro*, Fakultas Farmasi UGM
- Cancer Chemoprevention Riset Center (CCRC) Farmasi UGM. 2013. Sel Kanker*, Fakultas Farmasi UGM.
- Cancer Chemoprevention Riset Center (CCRC). 2009. Uji Sitotoksik Metode MTT*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.
- Cancer Chemoprevention Riset Center (CCRC). 2009. Perhitungan Sel*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.
- Cancer Chemoprevention Riset Center (CCRC). 2013. Prosedur Uji Sitotoksik dengan Metode MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazoliumbromida*. Yogyakarta. Universitas Gajah Mada. *Immunositokimia*. Yogyakarta, Universitas Gadjah Mada.
- Cheng, X., Xia, W., Yang, J.Y., Hsu, J.L., Chou, C.K., Sun, H.L., Wyszomierski, S.L., Mills, G.B., Muller, W.J., Yu, D., dan Hung, M.C. 2010. Aktivasi p21 (CIP1 / WAF1) di epitel mammae mempercepat tumorigenesis mammae dan meningkatkan metastasis paru. *Biochem Biophys Res Commun*; 403: 103-107.
- Chen, N.J.Y., Fauzi, A.N., Khaw, K.Y., Choi, S.B., Yaacob, N.S., Lai, C.S. 2019. *Free Radical Scavenging and Cytotoxic Properties of Acylated and Non-Acylated Kaempferol Glycosides from Stenochlaena Palustris: a Perspective on Their Structure – Activity Relationships*. *Pharm Chem J*; 53(3):188-193.
- Chen, Y.A., Chen, Y.C. 2011. *A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention.*, 46(4):564-574.e

- Chi-Kang,L., Shu-Ting, L., Cheng-Chang,C., Shih-Ming,H. 2019. *Regulatory mechanisms of fluvastatin and lovastatin for the p21 induction in human cervical cancer HeLa cells. PloS ONE* 14 (4):e0214408.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214408>.
- Ciaran, B.J., Woodmann. 2014. *The natural history of cervical HPV Infection. Medscape*.
- Cong, O., Du, Z., Liao, W., Zhang, L., Yao, Y., Ding, K. 2016. *Sulfated fucoidan FP08S2 inhibits lung cancer cell growth in vivo by disrupting angiogenesis via targeting VEGFR2/VEGF and blocking VEGFR2/Erk/VEGF signaling. Cancer Lett* 382:44–52 68.
- Coughlin, S.S., Ekwueme, D.U. 2009. *Breast cancer as a global health concern. Cancer Epidemiol.* 33: 315-8.
- Cribb, A.B. 1996. *Seaweeds of Queensland: A naturalists guide*. Australia: Queensland.
- Criscitiello, C., Esposito, A.,Curigliano, G. 2014. *Tumor-stroma crosstalk: Targeting stroma in breast cancer. Curr. Opin. Oncol*, 26, 551–555.
- Dianti, N., R. & Isfandiari, M. A. 2016. *Cervical cancer risk difference based on personal Hygiene among childbearing age women at yayasan kanker Wisnuwardhana Surabaya. Jurnal Promkes*, 4(1): 82–91.
- Diana, Legiran, Rizal, S. 2021. Polimorfisme Gen *p21* Codon 31 Rs 1801270 dengan Kejadian Kanker Serviks Pada Etnis Melayu di Sumatera Selatan. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan.Publikasi Ilmiah Fakultas Kedokteran Univeritas Sriwijaya*. Volume 8,No.2.
- Dona, R., Frimayanti, N., Ikhtiarudin, I., Iskandar, B., Maulana, F., & Silalahi, N. T. 2019. Studi In Silico, Sintesis, dan Uji Sitotoksik Senyawa P-Metoksi Kalkon terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 6(3), 243-249.
- Dwi, S., Yusnawan, E. 2017. Peningkatan Kandungan Metabolit Sekunder Tanaman Aneka Kacang sebagai Respon Cekaman Biotik. *Iptek Tanam Pangan*.11(2):167–74.
- Eileen, M. B. 2003. *Human papillomavirus and cervical cancer. Clinical Microbiology Reviews*.6(1) : 1-17.
- Ercolano, G., De, C.P. and Ianaro, A. 2019. *New Drugs from the Sea: Pro-Apoptotic Activity of Sponges and Algae Derived Compounds. Marine Drug*. 1–31.

- Evriarti, P.R., Yasmon, A. 2019. *Patogenesis Human Papillomavirus (HPV) pada Kanker Serviks Jurnal Biotek Medisiana Indonesia Vol.8.1. 2019; Hal.23-32.*
- Ferlay,J., Colombet, M., Soerjomataram, I. 2018.*Global and Regional Estimates of the Incidence and Mortality for 38 Cancers: GLOBOCAN 2018. Lyon: International Agency for Research on Cancer/World Health Organization.*
- Firdaus, M., Setijawati, D., Islam, I., Nursyam, H., Kartikaningsih, H., Yufidasari, H. S., Jaziri, A. A. 2018. *The reducibility of HeLa cell viability by Sargassum duplicatum extracts. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 137, 012064. doi:10.1088/1755-1315/137/1/012064.*
- Fransiska, A. N., Masyrofah, D., Marlian, H., Sakina, I. V., & Tyasna, P. S. 2021. Identifikasi Senyawa Terpenoid dan Steroid pada Beberapa Tanaman Menggunakan Pelarut N-Heksan. *Jurnal Health Sains, 2(6), 733-741.*
- Fridiana, R., Arifin, I. 2018. Pengaruh Ekstrak Etanolik Biji Sirsak Terhadap Induksi Apoptosis Sel Kanker Serviks Dengan *Metode Flowcytometry*.1–17.
- Geraldino, P.J.L., Liao, L.M., dan Boo, S.M. 2005. *Morphological study of the marine algal genus Padina (Dictyotales, Phaeophyceae) from Southern Philippines: 3 species new to Philippines. Algae 20 (2): 99-112.*
- Gross, S., Rahal, R., Stransky, N., Lengauer, C., Hoeflich, K.P. 2015. *Targeting cancer with kinase inhibitors. J. Clin. Investig. 125, 1780–1789.*
- Ghazali, M., dan Nurhayati. 2018. Peluang dan Tantangan Pengembangan Makroalga Non Budidaya sebagai Bahan Pangan di Pulau Lombok. *Jurnal Agrotek, 5(2), 135–140.*
- Ginguay, A., De, B.J.P dan Cynober, L. 2016. Indikasi dan kontraindikasi untuk menanamkan asam amino tertentu. (Leucine, gluta mine, arginine, citrulline dan taurine) pada penyakit kritis. *Curr. pendapat. klinik nutrisi Meta Peduli 19, 161-169.*
- Guiry, M.D. 2007. *Seasonal Growth and Phenotypic Variation in Poryphyra Linearis (Rhodophyta) populations on The West Coast of Ireland. Journal of Phycology 43 : 90-100.*
- Habli, Z., Toumieh, G., Fatfat, M., Rahal, O. N., & Gali-Muhtasib, H. 2017. *Emerging Cytotoxic Alkaloids In The Battle Against Cancer: Overview Of Molecular Mechanisms. Molecules, 22(2), 250.*

- Handayani, N.K., dan Zuhrotun, A. 2017. *Padina australis* dan Potensinya sebagai Obat Herbal Antikanker, Antibakteri dan Antioksidan. *Farmaka*, 15(2), 90–96.
- Haryono, S. J., Anwar, S. L., & Salim, A. 2018. *Daasar-Dasar Molekuler Kanker Bagi Praktisi Klinis*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Hawthorne, V.S., Huang, W.C, Neal, C.L, Tseng, L.M., Hung, M.C., dan Yu, D. 2009. ErbB2-dimediasi Src dan transduser sinyal dan aktivator transkripsi 3 aktivasi mengarah ke upregulasi transkripsi *p21Cip1* dan chemoresistance dalam sel kanker payudara. *Mol Kanker Res*.7: 592-600.
- Hermansyah, A., & Murcitra, B. G. 2017. Uji Microtetrazolium (MTT) Ekstrak Metanol Daun *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl terhadap sel kanker payudara MCF. *Alotrop*, 1(1), 27–32.
- Hidayat, E., Sari, D.H., Fitriyati, Y. 2014. Hubungan Kejadian Kanker Serviks Dengan Jumlah Paritas Di RSUD Dr. Moewardi Tahun 2013. *J Kedokteran Dan Kesehatan Indonesia*.6(3):128-136.
- Hoadley, K. A., Yau, C., Hinoue, T., Stuart, J. M., Benz, C. C., Laird, P. W., Hoadley, K. A., Yau, C., Hinoue, T., Wolf, D. M., & Lazar, A. J. 2018. *Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Article Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10, 000 Tumors from 33 Types of Cancer*. 291–304. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.022>.
- Hsu, H.Y., and Hwang, P.A. 2019. *Clinical applications of fucoidan in translational medicine for adjuvant cancer therapy*. *Clin. Translational Medicine*. 8:15.
- Husni, A., Putra, D.R., dan Lelana, I.Y.B. 2014a. *Antioxidant Activity of Padina sp. at Various Temperature and Drying Time*. *JPB Perikanan*, 9(2), 165–173.
- Husni, A., Ustadi, dan Hakim, A. 2014b. *The Use of Seaweed Padina sp. Extract to Extend Shelf Life of Refrigerated Red Nile Fillet*. *Agritech*, 34(03), 239-246.
- Ibanez, E., Herrero, M., Mendiola, J.A. and Puyana, C. 2012;. *M. Extraction and Characterization of bioactive compound with health benefits from marine sources: Macro and micro algae, cyanobacteria and invertebrates*. In: Hayes, M. (Ed.), *Marine bioactive compounds: Sources, characterization and applications*, Springer US. pp. 55–98.
- Ismaryani, A., Salni, S., Setiawan, A., & Triwani, T. 2018. Aktivitas Sitotoksik, Antiproliferasi Dan Penginduksi Apoptosis Daun Salung (*Psychotria viridifl* Ora Reinw. Ex. Blume) Terhadap Sel Kanker Serviks Hela. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 16(2), 206-213.

- Istindiah, H., dan Auekari, E. 2001. Mekanisme Kontrol Sel (Suatu Tinjauan Khusus Peran Protein Regulator Pada Jalur Retinoblastoma (Rb)). *JKGUI*. 9.39-47.
- Fiedor, Joanna, & Burda, K. 2014. *Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease*. *Nutrients* 6 (2): 466–88. DOI :10.3390/nu6020466.
- Firtya, F., Anwar, L., and Novita, E.S. 2010. Isolasi Senyawa Fenolat dari Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Tumbuhan Gandaria. *Jurnal Penelitian Sains*, 13 (1).
- Jiumao, L., Lihui, W., Aling, S., Qiaoyan, C., Wei, X., Huang, L., Youzhi, Z., Zhenfeng, H., and Jun, P. 2013. *Hedyotis difussa* Willd extract suppresses sonic hedgehog signaling leading to the inhibition of colorectal cancer angiogenesis. *International Journal of Oncology*; 42:651-656.
- Juana, K.R.S. 2009. *Biologi laut: Ilmu pengetahuan tentang biota laut*. Jakarta: Djambatan.
- Kashyap, N., Krishnan, N., Kaur, S., & Ghai, S. 2019. *Risk Factors of Cervical Cancer: A Case-Control Study*. *Asia-Pacific Journal of Oncology Nursing*, 6(3), 308–31.
- Kautsari, N., dan Ahadiansyah, Y. 2016. *Abundance, Biomass and Alginate Yield of Padina australis in Sumbawa Aquatic*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 6(1), 13–29.
- Kemenangan, F.R., Manu, G.D., dan Manginsela, F.B. 2017. Pertumbuhan Alga Coklat *Padina australis* di Perairan Pesisir Desa Serei, Kecamatan Likupang Barat, Kabupaten Minahasa Utara. *Jurnal Ilmiah Platax*, 5(2), 243–253.
- Kepel, Charles, R., Mantiri, Helena, D.M., Anton, R., dan Nasprianto. 2018. Biodiversitas makroalga di perairan pesisir Desa Blongko, Kecamatan Sinonsayang, Kabupaten Minahasa Selatan. *Jurnal Ilmiah Platax* 6 (1): 174-187.
- King, R.J., dan Robins, M. 2006. *Cancer Biology Third edition*. England: Person Education Limited. Malang: Uin-Maliki Press.
- Kresno, S.B. 2012. Ilmu dasar onkologi. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E, Vaux, D. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*; 12:1463-67

- Kurniasari, F. N., Leny, B. H. A. D. 2017. *Buku Ajar Gizi dan Kanker* (UB Press). UB Press.
- Kumalasari, D.E, Sulistiyowati, H., Setyati, D. 2018. (*Species Composition of Macrobentic Algae Division Phaeophyta in Intertidal Zone Pancur Beach Alas Purwo National Park*). *Jurnal BERKALA SAINSTEK* 2018, VI (1): 28-30.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C. 2008. *Robbins Basic Pathology. 10 th ed.* Elsevier Saunders. Philadelphia.
- Kumbar, R. 2015. Phytochemical Screening and Isolation of Fucoxanthin Content of *Sargassum Illicifolium*. *J. Pure App. Biosci* 3(6):218–22. DOI : 10.18782/2320-7051. 2180.
- Langdon, S. P. 2003. Cancer Cell Culture. *Cancer Cell Culture*, 731, 237–245. <https://doi.org/10.1385/1592594069>
- Le, L.K., Surget, G., Couteau, C., Coiffard, L., Cérantola, S., Gaillard, F. & Larnicol, M. 2016. *Sunscreen, Antioxidant, and Bactericide Capacities of Phlorotannins from the Brown Macroalga Halidrys Siliquosa*. *J. App. Phycol.* 28(6):3547–59. DOI : 10.1007/s10811-016-0853-0.
- Lienggonegoro, L.A. 2020. Soursop leaf (*Annona muricata*) and its potential as an anti-cancer. *Badan Litbang Kesehat.* 6(1):653–7. doi: 10.13057/psnmbi/m060128.
- Liu, X., Yu, H., Cai, H., dan Wang, Y. 2014. Ekspresi CD24, p21, p53, dan c-myc pada kanker lambung penghasil alfa-fetoprotein: Korelasi dengan karakteristik klinikopatologis dan kelangsungan hidup. *J Surg Oncol.* 109: 859-864.
- Liu, W. 2012. *Desain dan Seleksi Rekayasa Protein*, 25(1), 1 (2012)
- Lozano, J.C. 1998. A Presumptive Developmental Role for a sea urchin cyclin B splice variant. *Journal of Cell Biology.* (140) 2; 283.
- Manteu, S.H., Nurjanah, N., dan Nurhayati, T. 2018. (*Sargassum polycystum* dan *Padina minor*) dari Perairan Pohuwato. *JPHPI*, 21(3), 396–405.
- Margareth, A.S. 2012. Epithelial cell response to infection with *human papilloma virus*. *Clinical Biology Review Journals.* 25(2) : 215-222.
- Meijer, L. 1996. *Chemical inhibitor cyclin-dependent kinase. Trends in cell Biology.* vol 6; 393-94.

- Murugaiyan, K. 2020. Distribution of Heavy Metals in *Padina pavonica* (Brown Algae), Seawater and Sediment of Tuticorin Coast, Southeast Coast of India. *Plant Archives*, 20(1), 1765–1768.
- Murti, H., Boediono, A., Setiawan, B., dan Sandra, F. 2007. Regulasi Siklus Sel : Kunci Sukses Somatic Cell Nuclear Transfer. *CDK*. 6.159-319.
- Mutiah, Roihatul, I., Christyaji, H., Helda, D., Pramesti, G., Tias, L., Anik and Ramdhani, R. 2017. *Induction of Apoptosis and Phase-Cell Cycle Inhibitor of G0-G1, S, G2-M of T47D Breast Cancer Cells on Treatment with Ethyl Aceatate Fraction of Jackfruit Parasite Leaves (Macrosolen cochinensis)*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Volume 7. Nomor 10.
- Mutiah, Roihatul, Aty, W., Sukardiman. 2018. *Calotropis A: aGlycosides Terpenoids from Calotropis Gigantea Induce Apoptosis Trough Increased G2/M And Caspase-8 Expression*. *Journal Of Applied Pharnaceutical Science*, 19(60), 1457-1464.
- Nurjanah, Nurilmala, M., Anwar, E., Luthfiyana, N., & Hidayat, T., 2017. *Identifcation of Bioactive Compounds of Seaweed Sargassum sp. and Eucheuma cottonii Doty as a Raw Sunscreen Cream*. *Proc. Pakistan Academy Sci*. 54:311–18.
- Noviardi, H., Yuningtyas, S., Agustin, L. 2020. Induksi Apoptosis Sel MCF-7 Kanker Payudara Dari Kombinasi Ekstrak Kulit Jengkol (*Archidendron jiringa*) Dan Daun Petai Cina (*Leucaena leucocephala*). *J Farm Sains dan Prakt.*;6(2): 157–65.
- Nuzul, P., Lantang, D., dan Dirgantara, S. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Alga Coklat Jenis *Padina* sp. dari Pantai Sorido Biak terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Shigella dysenteriae*. *Pharmacy Medical Journal*, 1(1), 16-25.
- O'Brien, M.A., Kirby, R. 2008. Apoptosis: a review of pro-apoptotic and antiapoptotic pathways and dysregulation in disease. *J Vet Emerg Crit Care*;18(6):572-85
- Pal and Kundu, R. 2019. *Human Papilloma Virus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy*. *Frountiers in Microbiology*, 10(3116): 1–15.
- Paransa, Darus, S.J., Kemer, K., Rumengan, A.P., & Mantiri, D.M.H. 2014. Analisis Jenis Pigmen Dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Pigmen Xantofil Pada Alga Coklat *Sargassum polycystum* (C.Agardh). *J. LPPM Bidang Sains Dan Teknol*. 1(1):90–96.
- Pramesti, R., Setyati, W. A., Zainuddin, M., & Puspita, M. 2017. Bioecology of *Sargassum* sp. and its Extract Bioactivity as Anti-MDR Bacteria. *ILMU*

KELAUTAN: Indonesian Journal of Marine Sciences, 22(4), 185.
<https://doi.org/10.14710/ik.ijms.22.4.185-192>

- Puasa, E.S., Mantiri, D.M.H., dan Rumengan, A. 2018. Analisis Antibakteri Alga *Padina australis* Hauck di Perairan Teluk Totok dan Perairan Blongko. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 6(1), 14-20.
- Purnamasari, M. 2019. Efek Ekstrak Metanol Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) Terhadap Induksi Apoptosis Sel Kanker WiDr. *J.Univ Muhammadiyah Surakarta*.
- Raju, J., Patlolla, J.M.R., Swamy, M.V., Rao, C .V. 2004. *Diosgenin, a steroid saponin of Trigonella foenum graecum (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*;13(8):1392-1398.
- Ramos, S. 2008. *Cancer Chemoprevention and Chemotherapy. Dietary Polyphenols and Signalling Pathways. Mol Nutr Food res.* 52(50.507-26.
- Redmon, H., P. Stapleton dan David. 1983. *Immunustrition The ple of Taurine. Nutrition* 14: 559-604.
- Ruddon, R.W. 2007. *Cancer Biology Fourth Edition*. New York: Oxford University Press.
- Ruiz-Torres, V., Encinar, J. A., Herranz-Lopez, M., Perez-Sanchez, A., Galiano, V., Barrajon-Catalan, E., Micol, V. 2017. An Updated Review on Marine Anticancer Compounds: The Use of Virtual Screening for the Discovery of Small-Molecule Cancer Drugs. *Molecules*, 22(7): 1037.
- Roselyn, A.P, dan Widiastuti, E.L., dan Susanto, G.N., and Sutyarso.2016. Pengaruh Pemberian Taurin Terhadap Deskripsi Histopatologis *In Vivo* Carcinogen-Induced Lung Mencit yang diberi Benzo Piren. *Jurnal Natur Indonesia*, 17 (1). hal. 22-32. ISSN 14109379
- Rossig, L., Jadidi, A.S., Urbich, C., Badorff, C., Zeiher, A.M dan Dimmeler, S. 2001. Fosforilasi *p21* (Cip1) yang bergantung pada undang-undang mengatur pengikatan PCNA dan proliferasi sel endotel. *Sel Mol Biol*; 21: 5644-5657.
- Safitri, D.D., Melani, W.R., dan Suryanti, A. 2020. Karakteristik Habitat *Padina australis* di Perairan Pulau Karas Kecamatan Galang Kota Batam Provinsi Kepulauan Riau. *Jurnal Manajemen Riset dan Teknologi*, 2(1), 10–20.
- Salamah, N., & Hanifah, L. 2014. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun suruhan (*Peperomia pellucida* (L) H. B&K) dengan metode Fosforlibdat. *Prosiding SPOA XVI dan Muktamar XII PERHIPBA*, pp. 341-349.

- Sanjeewa, K.K.A., Kim, E.A., Son, K.T., & Jeon, Y.J. 2016. *Bioactive Properties and Potentials Cosmeceutical Applications of Phlorotannins Isolated from Brown Seaweeds: A Review. J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 162:100-105. DOI : 10.1016/j.jphotobiol.2016.06.027.
- Sari, L.M. 2018. Apoptosis: Mekanisme Molekuler Kematian Sel. *Cakradonya Dent J.*10(2):65-70.
- Satyarsa, A.B.S. 2019. *Potential of Fucoidan From Brown Seaweeds (Sargassum sp.) as Innovation Therapy on Breast Cancer. Journal of Medicine & Health*, 2(3), 909–919.<https://doi.org/10.28932/jmh.v2i3.1235>
- Schaffer, S., & Kim, H.W. 2018. *Effects and mechanisms of taurine as a therapeutic agent. Biomolecules & therapeutics*, 26(3), 225.
- Sharma, H. P., Jain, P., Amit, P., & Sinha, A. 2014. *Apoptosis (programmed cell death) -a review. February 2015.*
- Sedjati, S., Supriyantini, E., Ridlo, A., Soenardjo, N., & Santi, V. Y. 2018. Kandungan Pigmen, Total Fenolik Dan Aktivitas Antioksidan *Sargassum sp.* *Jurnal Kelautan Tropis*, 21(2), 137. <https://doi.org/10.14710/jkt.v21i2.3329>
- Seenivasan, R., & Indu, H. 2013. *In Vitro Antioxidant Activity of Selected Seaweeds From Southeast Coast of India. Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5(2):474–84.
- Serrano, B., Brotons, M., Bosch, F.X., Bruni, L. 2017. *Epidemiology and burden of HPV-related disease. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*1–13.
- Shilpha, J., Satish, L., & Ramesh, M. 2017. *Recent Advancements in the Clinical Evaluation of Plant-Derived Anticancer Compounds. Anticancer Plants: Clinical Trials and Nanotechnology*, 233–252.
- Shuo, T.u, X. Zhang, D. Luo, Z. Liu, X. Yang, H. Wan, L. Yu, H. Li dan F. Wan. 2015. *Effect Of Taurine On The Proliferation And Apoptosis Of Human Hepatocellular Carcinoma Hepg2 Cells. Experimental and Therapeutic Medicine* 10(1): 193–200.
- Siahaan, B., Mantiri, D.M.H., dan Rimper, J.R.T.S.L. 2017. Analisis Logam Timbal (Pb) dan Konsentrasi Klorofil pada Alga *Padina australis* Hauck dari Perairan Teluk Totok dan Perairan Blongko, Provinsi Sulawesi Utara. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 2(1), 31–37.
- Siregarr, F., & Hadijono, B. S. 2000. Uji Sitotoksisitas Dengan Esei Mtt. *Jurnal Kedokteran Gigi*, 7, 28–32.

- Sitorus, S. 2013. *Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Angiopteris angustifolia C. Pres1 terhadap Kultur Sel Kanker Payudara (MCF-7 Cell Line) secara In Vitro*. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Silberfeld, T., Florence, R., and Bruno, D.R.. 2014. *An Updated Classification of Brown Algae (Ochrophyta, Phaeophyceae)*. *Criptogamie, Algologie* 35(20), 117-156.
- Sinurat, E., & Kusumawati, R. 2017. Optimasi Metode Ekstraksi Fukoidan dari Rumput Laut Cokelat *Sargassum binderi* Sonder. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. JPB Kelautan Dan Perikanan*, 12(2), 125–134.
- Strange, W., dan Jackson. 1997. Penaeid Shrimp Nutrition for the Comercial Feed Industry. In *Proceeding of the Aquaculture Feed*.
- Sudhakar, M.P., Ananthalakshmi, J.S., & Nair, B.B. 2013. *Extraction, Purification and Study on Antioxidant Properties of Fucoxanthin from Brown Seaweeds*. *J. Chem. Pharm. Res.* 5(7):169–75.
- Sun, Y., and Peng, Z.L. 2009. *Programmed cell death and cancer*. *Postgraduate Medical Journal*;85:134-140.
- Stahl, W., & Sies, H. 2003. Antioxidant Activity of Carotenoids. *Mol. Aspects Med.* 24.(6):345–51. DOI: 10.1016/S0098-2997(03)00030-X.
- Suganya, S., Ishwarya, R., Jayakumar, R., Govindarajan, M., Alharbi, N.S, Kadaikunnan, S., Khaled, J.M., Alanbr, M.N., & Vaseeharan, B. 2019. Insektisida dan antimikroba baru yang berasal dari *Sargassum berati* dan *Halimeda gracillis* rumput laut: Toksisitas terhadap vektor nyamuk dan aktivitas antibiofilm terhadap patogen mikroba. *Jurnal Botani Afrika Selatan* 125: 466-480.
- Sun, Y., Hou, S., Song, S., Zhang, B., Ai, C., Chen, X., Liu, N. 2018. *Impact of acidic, water and alkaline extraction on structural features, antioxidant activities of Laminaria japonica polysaccharides*. *Int. J. Biol. Macromol*, 112:985–995.
- Susanto, Hadi. T., Maryono, S., Purwanto, B. 2017. Pengaruh Ekstrak Propolis Terhadap Ekspresi Protein *Bcl2*, *p21*, dan Induksi Apoptosis Pada Sel Hela. *Biomedika*. Volume 9 Nomor 2.
- Tabassum, H., H. Rehman, B. D., Banerjee, S., Raisuddin dan S. Parvez. 2006. *Attenuation of tamoxifen-induced hepatotoxicity by taurine in mice*. *Clinica Chimica Acta* 370:129–136
- Taghavi, N., Biramijamal, F., Sotoudeh, M., Moaven, O., Khademi, H., Abbaszadegan, M.R., dan Malekzadeh, R. 2010. Asosiasi ekspresi *p53* /

p21 dengan merokok dan prognosis pada pasien karsinoma sel skuamosa esofagus. *Dunia J Gastroenterol.* 16: 4958- 4967.

- Tasmin, N. 2014. *Isolasi, Identifikasi Dan Uji Toksisitas Senyawa Flavonoid Fraksi Kloroform Dari Daun Terap (Artocarpus odoratissimus Blanco)*. *Jurnal Kimia Mulawarman*. Volume 12 Nomor 1.
- Toshiyuki, S., Hiroaki, T., and Satoru, M. 2012. *Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. Journal Infect Chemother.* 18:807–815. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Triyasa, Komang, S, Ajeng. D, and Barliana. M.I. 2020. "Aktivitas Sitotoksik Manggu Leweung (*Garcinia celebica* L.) Pada Berrbagai Lini Sel Kanker." *Medical Sains: Jurnal Ilmiah Kefarmasian* 5.(1).63-68.
- Utari, E.N.T, A. I.S, , Rafi, K.S., W.A.K., Harti, A. 2013. Kegunaan Daun Sirsak (*Annona muricata* L) untuk Membunuh Sel Kanker dan Pengganti Kemoterapi. *KesMaDaSka*. 1–6.
- Vaseghi, G., Sharifi, M., Dana, N., Ghasemi, A., and Yegdaneh, A. 2018. Cytotoxicity of *Sargassum angustifolium* Partitions against Breast and Cervical Cancer Cell Lines. *Advanced Biomedical Research.* 7(43).
- Vermeulen, K., Berneman, Z., Van, B.D. 2003. *Cell cycle and apoptosis*, *Cell Prolif.* 36: 165-75.
- Vijayaraj, R., Kumaran N. S., Swarnakala. 2017. Evaluation of Anti-Tumour Potential of *Acanthus ilicifolius* (Linn.) in HepG2 Cell Line Induced Hepatocellular Carcinoma in Mice. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 9(6):892-897
- Wang, Q., Wang, Y., Hyde, D.M., Gotwals, P.J., Koteliensky, V.E., Ryan, S.T & Giri, S.N. 1999. *Reduction of Bleomycin Induced Lung Fibrosis by Transforming Growth Factor β Sluble Receptor in Hamster*. *Thorax* 54: 805–812.
- Warhamni, W., Boer, D., dan Muzuni, M. 2013. Keragaman Morfologi Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* (l.) Lam.) Asal Kabupaten Muna. *Jurnal Agroteksos*, 3(2), 121–126.
- Wahyudi A. Perbedaan Tingkat Ekspresip *p21* Intra Nukleus Dan Sitoplasmik Pada Low Dan High Grade Karsinoma Kolorektal. Published Online 2011.
- Wibisono, J.J. 2018. Pengaruh *p53* dan YY1 Terhadap Terjadinya Kanker Serviks. *Medicinus*. Volume 5 Nomor 1.

- Widiatuti, E.L., and Yusni. I., and Martini.S., and Nurcahyani. N. 2022. Determination Of The Supresor Gen (*p53*) On The Administration Of Taurine And Ethanol Extract *Padina sp.* As Well As *Sargassum sp.* Again HeLa Cells In-Vitro. (Proses Submitted).
- Widiatuti, E.L., and Rima, K., and Busman, H. 2020. Anticacncer Potency Of Holly Magrove Leaf (*Acanthus ilicifolius*) Methanol Extract With Taurin By In Vitro Test In Cell Culture Of HeLa Cervical Cancer. Iop Conf. Series: Earth And Environmental Sciece. ISSN 1755-1315 (Submitted).
- Widyasti, S., Widyastuti, E.L., Kanedi, M., Rivai, I.F. 2013. pemberian senyawa taurine pada pakan alami dan pakan komersil terhadap tingkat pertumbuhan juvenil ikan gurami (*Osphronemus gouramy*). Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung, Lampung-Indonesia. pp 315- 320.
- Xia, Z., C. Bi, Y., Fan, Q., Cui, D., Chen, Xiao, Y., dan Q. P. Dou. 2008. *Induction of tumor cell apoptosis by taurine Schiff base copper complex is associated the with inhibition of proteasomal activity. International Journal of Molecular Medicine 22(5): 677–682*
- Yani,C.R., Elza, I.A. 2001. Studi Molekuler Pada Instabilitas Genetik: Mekanisme Kerusakan DNA dan Proses Perbaikannya. Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.8(3):44-50.
- Ying Shi, Chen-Hui, W., Xing- Guo,G. 2008. Apoptosisinducing effects of two anthraquinones from *Hedyotis difussa* Willd. *Biol. Pharm. Bull*; 31(6):1075-1078.
- Yu, L., Chang, K., Han, J., Deng, S., Chen, M. 2013. *Association Between Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism And Susceptibility To Cervical Cancer: A Meta-Analysis. Plos One.8(2);E55835.*
- Yusni, M.A. 2008. *Perbedaan Pengaruh Pemberian Fraksi Etanolik Bawang Dayak (Eleutherine palmifolia L. Merr) Dengan 5-Fluoroutacii Terhadap Penghambatan Pertumbuhan Galur Sel Karsinoma Kolon HT29 Dan Ekspresi Gen p53 Mutan. Tesis Diterbitkan. Surakarta: Universitas Sebelas Maret Surakarta.*
- Zafrial, R. M., Amalia, R., Studi, P., Farmasi, S., Farmasi, F., & Padjadjaran, U. 2018. *ARTIKEL TINJAUAN : Anti Kanker Dari Tanaman Herbal. 16, 15–23.*
- Zailanie, Kartini & Sukoso. 2014. *Study on of Fucoxanthin Content and Its Identification in Brown Algae from Padike Vilage Talango District, Madura Islands. J. Life Sci. Biomed. 4(1):1–3.*

Zufahmi, Z., Dewi, E., dan Zuraida. 2019. Hubungan Kekerbatan Tumbuhan Famili Cucurbitaceae Berdasarkan Karakter Morfologi di Kabupaten Pidie sebagai Sumber Belajar Botani Tumbuhan Tinggi. *Jurnal Agroristek*, 2(1), 7–14.