

**AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETANOL LAMUN
(*Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides*) SERTA TAURIN
SEBAGAI SUPRESOR *p21* TERHADAP SEL *HeLa***

(Tesis)

Oleh

**EKA AYU LAILATUL ISTIKOMAH
2127021012**



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

ABSTRAK

AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETANOL LAMUN (*Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides*) SERTA TAURIN SEBAGAI SUPRESOR *p21* TERHADAP SEL *HeLa*

Oleh

EKA AYU LAILATUL ISTIKOMAH

Kanker serviks berkembang di dalam serviks atau mulut rahim yang dapat menyebabkan kematian apabila tidak segera ditangani. Beberapa cara yang dilakukan untuk mengobati kanker serviks seperti pembedahan, penyinaran radiasi, dan kemoterapi. Akan tetapi, hal tersebut memiliki efek samping setelah menjalani pengobatan. Alternatif lain untuk pengobatan kanker serviks dengan mencari bahan alam yang memiliki fungsi sebagai antikanker seperti lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* karena memiliki senyawa bioaktif seperti alkaloid, flavonoid, saponin, dan steroid. Tujuan dari penelitian ini untuk menganalisis dan membuktikan adanya aktivitas dari ekstrak etanol *C. rotundata* dan *E. acoroides* serta taurin terhadap uji sitotoksik, antiproliferatif, dan ekspresi *p21* pada sel kanker serviks *HeLa*. Ekstraksi *C. rotundata* dan *E. acoroides* dilakukan dengan metode maserasi, menggunakan pelarut etanol *analyse* 96%. Konsentrasi yang digunakan yaitu 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm. Uji Sitotoksik dengan perhitungan nilai IC_{50} yang diperoleh dari metode CCK8. Uji antiproliferasi ditentukan dengan nilai *doubling time*, dan pengukuran ekspresi gen *p21* menggunakan RT-PCR. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol *C. rotundata* dan *E. acoroides* bersifat sitotoksik dengan nilai IC_{50} ekstrak *C. rotundata* yaitu 856,65 ppm, ekstrak *E. acoroides* 645,96 ppm. Pada taurin tidak menunjukkan sitotoksik dengan nilai IC_{50} sebesar 45218,18 ppm. Ekstrak etanol *C. rotundata* dan *E. acoroides* serta taurin bersifat antiproliferasi dibuktikan dengan nilai *doubling time* perlakuan *C. Rotundata*, *E.acoroides* dan taurin lebih tinggi dibandingkan kontrol sel. Ekstrak *C. rotundata* konsentrasi 500 ppm mampu meningkatkan ekspresi mRNA *p21* dibandingkan dengan kontrol sebesar 1,10 *fold change*, sedangkan perlakuan *E. acoroides* konsentrasi 250 ppm dan 500 ppm berada di bawah kontrol sel. Kesimpulan ekstrak etanol *C. rotundata* dan *E. acoroides* memiliki potensi dikembangkan sebagai agen antikanker pada kanker serviks *HeLa*.

Kata Kunci: Antiproliferasi, *Cymodocea rotundata*, *Enhalus acoroides*, *p21*, Sel *HeLa*, Sitotoksik, Taurin

**AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETANOL LAMUN
(*Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides*) SERTA TAURIN
SEBAGAI SUPRESOR *p21* TERHADAP SEL *HeLa***

Oleh
EKA AYU LAILATUL ISTIKOMAH

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 LAMUN (*Cymodocea rotundata* dan
Enhalus acoroides) SERTA TAURIN
SEBAGAI SUPRESOR *p21* TERHADAP SEL
*HeLa***

Nama Mahasiswa

: **Eka Ayu Lailatul Istikomah**

Nomor Pokok Mahasiswa

: 2127021012

Program Studi

: Magister Biologi

Fakultas

: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Erdang Linirin Widiastuti, Ph. D.
NIP 196106111986032001

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

2. **Ketua Program Studi Magister Biologi**

Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc.
NIP 196603051991032001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

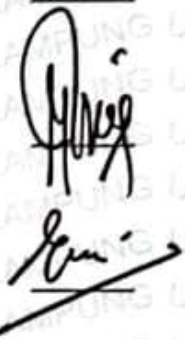
Ketua : Endang Linirin Widlastuti, Ph. D.

Sekretaris : Prof. Dr. Med. Sc. Apt. Melisa Intan Barliana

Penguji

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

Bukan Pembimbing 2 : Dr. Endah Setyaningrum, M.Biomed



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



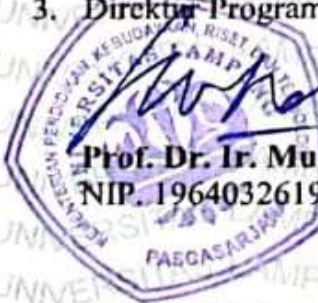
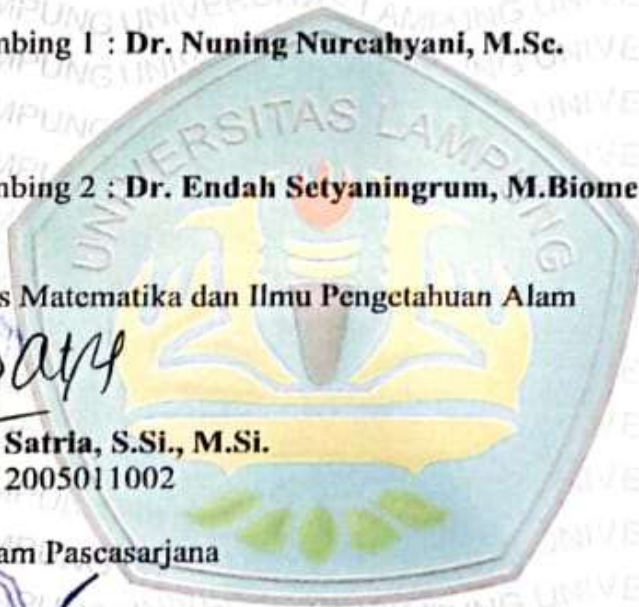
Dr. Ing. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 197110012005011002

3. Direktur Program Pascasarjana



Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si.
NIP. 196403261989021001

4. Tanggal Lulus Ujian : 1 Agustus 2023



PERNYATAAN KEASLIAN HASIL KARYA

Nama yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama Mahasiswa : Eka Ayu Lailatul Istikomah
Nomor Pokok Mahasiswa : 2127021012
Program Studi : Magister Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa dalam karya ilmiah ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila ternyata kelak dikemudian hari terbukti ada ketidakbenaran dalam pernyataan saya di atas, maka saya akan bertanggung jawab sepenuhnya.

Bandar Lampung, 7 Agustus 2023

Yang menyatakan,



Eka Ayu Lailatul Istikomah
2127021012

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan pada tanggal 10 Juli 1998 di Desa Sumber Baru, Kecamatan Seputih Banyak, Kabupaten Lampung Tengah. Merupakan anak pertama dari dua bersaudara pasangan Bapak Lasno dan Ibu Nurkayah. Alamat penulis yaitu di Bratasena Adiwarna, Blok 1 Jalur 5 Nomor 9, Kecamatan Dente Teladas, Kabupaten Tulang Bawang.

Penulis mengawali pendidikan formal di TK Bratasena Adiwarna pada tahun 2003, kemudian melanjutkan pendidikan di SD Negeri 1 Dente Teladas dan berlanjut di SMP Negeri 1 Dente Teladas yang diselesaikan pada tahun 2013. Pada tahun ini penulis diterima di SMA Negeri 1 Kota Gajah hingga lulus pada tahun 2016. Selanjutnya, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Program Studi Pendidikan Biologi Jurusan Pendidikan MIPA FKIP Universitas Lampung melalui jalur SBMPTN dan meraih gelar Sarjana Pendidikan (S.Pd) pada tahun 2021. Penulis melanjutkan studi di magister biologi FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2021.



Dengan menyebut nama Allah yang Maha pengasih lagi Maha penyayang

PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirobbil ‘alamin, dengan mengucapkan syukur kepada Allah SWT karena atas karunia rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.

Teriring doa, rasa syukur, dan segala kerendahan hati.

Dengan segala cinta dan kasih sayang kupersembahkan karya ini untuk orang-orang yang sangat berharga dalam hidupku:

Ayahku (Lasno) dan Ibuku (Nurkayah)

Yang senantiasa mendoakan ku, memberi nasehat dan motivasi, memberi kasih sayang tiada henti, memberikanku segalanya demi kebahagiaanku dan mendukungku dalam meraih cita-citaku, kalian merupakan semangat terbesar dalam hidupku dan aku akan selalu berusaha membanggakan dan membahagiakan kalian.

Adikku (Siti Kalya Arrauzahra)

Yang telah memberikan semangat dan sering menemani disaat senang maupun sedih.

Kakek Nenek dan Seluruh Keluarga Besar

Yang selalu mendoakan kebbaikanku, menyayangiku, memberikan dukungan untukku dan sering menjadi tempatku untuk bercerita.

Para Pendidikku (Guru dan Dosen)

Yang telah memberikan ilmu-ilmu yang bermanfaat, membimbingku, memberi nasihat-nasihat yang berharga, dan kasih sayang yang tulus.

Teman-Teman Seperjuanganku Magister Biologi 2021

Yang senantiasa membantuku, menghiburku, memberiku motivasi, memberikan kenangan yang indah dan seru selama perkuliahan.

Almamaterku tercinta. Universitas Lampung

MOTTO

“Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah nasib suatu kaum kecuali kaum itu sendiri yang mengubah apa-apa yang ada pada diri mereka”
(Q.S. 13:11)

“Barang siapa yang menunjuki kepada kebaikan, maka ia akan mendapat pahala seperti pahala orang yang mengerjakannya”
(HR. Muslim)

“Jangan jadikan pendidikan sebagai alat untuk mendapatkan harta, demi memperoleh uang untuk memperkaya dirimu. Belajarlah supaya tidak menjadi orang bodoh dan dibodohi oleh orang”
(Ulilamrir Rahman)

“Sukses adalah guru yang buruk. Sukses menggoda orang yang tekun ke dalam pemikiran bahwa mereka tidak dapat gagal”
(Bill Gates)

SANWACANA

Puji Syukur kehadiran Allah SWT, atas segala berkat rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini yang berjudul **“AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETANOL LAMUN (*Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides*) SERTA TAURIN SEBAGAI SUPRESOR p21 TERHADAP SEL *HeLa*”**.

Penelitian ini mendapatkan pendanaan dari Penelitian Hibah BLU Universitas Lampung - Pascasarjana dengan nomor kontrak 818/UN26.21/PN/2022. Tesis ini dibuat sebagai salah satu syarat dalam meraih gelar Magister Sains pada Program Studi Magister Biologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.

Penulis menyadari ini bukanlah hasil jerih payah sendiri akan tetapi berkat bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak baik moril maupun materil sehingga penulisan Tesis ini dapat selesai. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan ucapan rasa terima kasih yang tulus kepada:

1. Ibu Prof. Lusmeilia Afriani, D.E.A., I.P.M. selaku Rektor Universitas Lampung.
2. Ibu Endang Linirin Widiastuti, Ph.D. selaku Pembimbing I dan Pembimbing Akademik yang telah memberikan ilmu, bimbingan, bantuan baik moril dan materil, nasihat, saran, dan pengarahan, baik selama perkuliahan maupun dalam penyusunan tesis ini.
3. Ibu Prof. Dr. Med. Sc. Apt. Melisa Intan Barliana selaku Pembimbing II yang telah memberikan ilmu, bimbingan, bantuan baik moril dan materil, nasihat, saran, dan pengarahan, baik selama perkuliahan maupun dalam penyusunan tesis.
4. Ibu Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc. selaku Pembahas I dan Ketua Program Studi Magister Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung atas ilmu, bantuan, bimbingan, nasihat, saran, dan pengarahan, baik selama perkuliahan maupun dalam penyusunan tesis.

5. Ibu Dr. Endah Setyaningrum, M.Biomed selaku Pembahas II atas semua ilmu, bimbingan, saran, dan arahan selama perkuliahan maupun dalam penyusunan tesis.
6. Bapak Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si. selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Lampung.
7. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
8. Bapak Dr. Jani Master., M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.
9. Bapak Dr. Mahfut, M.Sc. selaku Kepala Laboratorium Biomolekuler dan mba Nunung Cahyawati, A.Md. selaku laboran yang telah mengizinkan dan membantu penulis melaksanakan penelitian di Laboratorium Biomolekuler.
10. 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 bimbingan, arahan dan doa selama penulis melakukan penelitian.
11. Seluruh Dosen Program Studi Magister Biologi yang telah memberikan motivasi, nasehat, dan memberikan ilmu-ilmu yang sangat bermanfaat.
12. Rekan-rekan Magister Biologi, kakak dan adik tingkat di Biologi FMIPA Unila atas rasa persahabatan, motivasi dan cerita seru yang kalian berikan.
13. Sahabat-sahabat baikku di Magister Biologi Yosi Dwi Saputra, Ainun R. Bareta, Mai Sari, Rina Maryani, Bagus Susilo Putra, Septria Juwita, Jonathan Puji Sarwoko, dan Agis Agita yang telah banyak membantu, menemani dan menghibur penulis di saat-saat sulit maupun senang, serta Intan Okta Nabilla, Bu Eva Lestari, Pak Sofwan Halimi, Risa Malintan Umar, Redy Trinanda, Ferisa Desi Aulia, dan Vera Liony, Kartika Permata Insani yang telah banyak memberikan support terbaik bagi penulis, memberikan cerita seru dan kenangan indah selama 2 tahun ini.
14. Sahabat-sahabat baikku masa sekolah Agung Riansyah, Yulinda Aini Ulfa, Desiana Putri, Ardina Sinta Deni, Fuji Utari Rahmawati, Fajar Adi Putra, Septi Nurhayati, Deni Fahrul Rifai, Neneng Indah, Tika Wulandari, dan Fyla Murni

Permata Sari yang telah menemani penulis selama liburan dan menghibur penulis saat susah maupun senang.

15. Sahabat-sahabat baik kosanku Melati, Ocha, Pita, Wulan, Putri, Anya, Nancy, Cindy, Indah dan juga kucing kosan Sambo dan Menir yang sering random buat acara makan-makan di kosan, terimakasih atas cerita serunya selama kos bareng di tempat ibu.
16. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian tesis ini.

Alhamdulillah rabbil 'aalamiin, tesis ini telah selesai dan dipersembahkan untuk orang-orang terkasih. Akhir kata, penulis berharap semoga tesis ini dapat bermanfaat dan berguna bagi kita semua.

Bandar Lampung, 7 Agustus 2023
Penulis,

Eka Ayu Lailatul Istikomah

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI.....	iv
------------------------	-----------

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Manfaat Penelitian.....	5
E. Hipotesis Penelitian.....	5
F. Kerangka Pikir.....	5

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Kanker	7
B. Kanker Serviks	9
C. Gen <i>P21</i>	13
D. Lamun	15
E. Taurin	19

BAB III METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian	22
B. Alat dan Bahan Penelitian	22
C. Jenis dan Rancangan Penelitian	23
D. Pelaksanaan Penelitian	24
E. Pembuatan Media Kultur	26
F. Kultur Sel Kanker Serviks <i>HeLa</i>	26
G. Pemanenan Sel <i>HeLa</i>	26
H. Perhitungan Sel	27
I. Pembuatan Larutan Stok	27
J. Uji Sitotoksik dengan <i>Cell Counting Kit-8</i> (CCK-8).....	28
K. Uji Antiproliferasi dengan Metode <i>Cell Counting Kit-8</i> (CCK-8)	28
L. Uji Ekspresi Gen <i>p21</i> dengan Metode RT-PCR (<i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i>).....	29
M. Analisis Data	33
N. Diagram Alur Penelitian	35

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Pengamatan.....	36
B. Pembahasan.....	53

BAB V SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan	64
B. Saran.....	64

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Prosedur Pengujian Senyawa Metabolit Sekunder	25
2. Perbandingan Konsentrasi Master Mix RT-PCR.....	32
3. Pengaturan Program Amplifikasi RT-PCR.....	33
4. Ekstrak Etanol <i>Cymodocea rotundata</i> dan <i>Enhalus acoroides</i>	36
5. Uji Fitokimia Ekstrak Etanol 96% Tumbuhan <i>Cymodocea rotundata</i> dan <i>Enhalus acoroides</i>	37
6. Nilai Doubling time Perlakuan Ekstrak <i>Cymodocea rotundata</i> , <i>Enhalus acoroides</i> , Taurin dan Doxorubicin	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Perkembangan kanker melalui paparan HPV	10
2. Morfologi Sel <i>HeLa</i>	13
3. Regulasi p21 melalui jalur dependen p53	14
4. <i>Cymodocea rotundata</i>	17
5. <i>Enhalus acoroides</i>	18
6. Struktur taurin	20
7. Diagram Alur Penelitian	35
8. Hasil Uji Sitotoksik Menggunakan Ekstrak Etanol <i>Cymodocea rotundata</i> Pada Kultur Sel <i>HeLa</i>	38
9. Hasil Uji Sitotoksik Menggunakan Ekstrak Etanol <i>Enhalus acoroides</i> Pada Kultur Sel <i>HeLa</i>	39
10. Hasil Uji Sitotoksik Menggunakan Taurin Pada Kultur Sel <i>HeLa</i>	40
11. Aktivitas Sitotoksik Sel <i>HeLa</i> dalam IC ₅₀ pada Berbagai Senyawa Uji	42
12. Morfologi Sel <i>HeLa</i> pada kontrol sel dan penambahan Doxorubicin	44
13. Morfologi Sel <i>HeLa</i> pada pemberian <i>Cymodocea rotundata</i>	45
14. Morfologi Sel <i>HeLa</i> pada pemberian <i>Enhalus acoroides</i>	46
15. Morfologi Sel <i>HeLa</i> pada perlakuan menggunakan Taurin	47
16. Rata-rata Viabilitas Sel pada Waktu Inkubasi 24, 48, dan 72 jam	49
17. Rataan ekspresi relatif RT-PCR mRNA <i>p21</i> pada sel <i>HeLa</i> setelah diberi perlakuan	52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Perhitungan Rendemen	77
2 Pembuatan Larutan Stok	77
3 Perhitungan Sel	78
4 Pembuatan Ekstrak.....	79
5 Uji Fitokimia	79
6 Uji Sitotoksik, antiproliferasi dan ekspresi gen p21	80
7 Data Uji Sitotoksik.....	82
8 Hasil Uji Antiproliferasi.....	85
9 Hasil Uji ekspresi gen <i>p21</i>	87
10 Uji analisis data sitotoksik	90

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kanker merupakan suatu penyakit yang terjadi akibat pertumbuhan jaringan baru secara abnormal sebagai akibat dari proliferasi sel secara terus menerus dan dapat menyerang dan merusak jaringan lainnya. Kanker dapat terbentuk dari sel apapun dalam jaringan tubuh yang digolongkan berdasarkan jaringan dan jenis sel asalnya (Parwata, 2014). Terbentuknya kanker diakibatkan karena adanya perubahan pada suatu gen, sehingga sel yang seharusnya membentuk sel baru dengan menggantikan sel lama menjadi sel yang tidak normal dan terus tumbuh.

Perubahan gen tersebut disebabkan beberapa faktor seperti faktor genetik, faktor karsinogen (zat kimia, radiasi, virus, hormon, dan iritasi kronis), dan faktor gaya hidup (merokok, pola makan tidak sehat, konsumsi alkohol, dan kurang aktivitas fisik) (Pusdatin Kemenkes RI, 2015).

Prevalensi kasus kanker di dunia cenderung meningkat sepanjang tahun, dan apabila tidak ditangani dengan penanganan yang tepat maka kemungkinan pada tahun 2030 akan mengalami peningkatan sebanyak 3 kali lipat (Widiyastuti dkk, 2019). Kasus kanker di dunia dengan jumlah kejadian tertinggi berada pada negara-negara di Asia. Hal ini berkaitan dengan jumlah penduduk yang besar berada pada benua di Asia. Indonesia berada di Asia yang memiliki jumlah kasus kanker sebanyak 398.914 dengan kategori tertinggi yaitu kanker payudara sebesar 16,6% dan diikuti kanker serviks sebesar 9,2% pada tahun 2020 (GLOBOCAN, 2020). Kanker serviks merupakan salah satu jenis kanker yang berkembang di dalam serviks atau mulut rahim yang berada pada sepertiga bagian bawah uterus dan berhubungan dengan vagina melalui ostium uteri eksternum (Kemenkes RI, 2017).

Kejadian kanker serviks terjadi karena virus HPV (*Human Papilloma Virus*). Wanita dengan partner aktivitas seksual yang banyak dan dimulai pada usia muda

sebelum 18 tahun dapat meningkatkan terjadinya kanker serviks. Hal ini dikarenakan sel kolumnar serviks lebih peka terhadap metaplasia pada saat usia dewasa di atas 18 tahun (Rasjidi, 2009). Adapun HPV 16 dan 18 merupakan onkogen yang bertanggung jawab terhadap 70-80% kasus kanker serviks di dunia (Jaspers dkk,2011). Gen onkoprotein E6 dan E7 pada HPV berperan penting dalam inisiasi dan proliferasi sel kanker serviks, karena kemampuannya dapat mengakibatkan peningkatan degradasi *p53* dan mengganggu kontrol siklus sel, serta tetap dapat melakukan replikasi meskipun terjadi kerusakan pada DNA (Gultom, 2021). Akibat dari replikasi ini mengakibatkan terbentuknya kanker.

Gen *p53* sendiri berperan sebagai penginduksi apoptosis dan penghentian siklus sel apabila terjadi kerusakan DNA. *p21* juga berperan dalam regulasi apoptosis, namun karena adanya onkogen HPV menyebabkan menurunnya ekspresi gen dari *p53* dan juga *p21* ini (Endharti dkk, 2018). Efektor terkuat dari *p53* yaitu *p21* yang berfungsi dalam penghentian siklus sel sehingga sel kanker dapat ditekan pertumbuhannya (Bakri dkk, 2019). Peran utama *p21* untuk mengendalikan aktivitas proliferasi seluler dengan menghambat kelompok protein dari *cyclin dependent kinase (Cdk)*, sehingga siklus sel dapat tertunda. Penundaan siklus sel ini dapat memberikan kesempatan terhadap DNA repair untuk memperbaiki DNA yang mengalami kerusakan (Harper dkk, 1993).

Beberapa cara yang dilakukan untuk mengobati kanker serviks seperti pengangkatan jaringan kanker terlokalisasi (pembedahan) merupakan jenis pengobatan kanker yang paling banyak dilakukan pada tahun 2018, penyinaran radiasi, dan kemoterapi. Pengobatan ini dilakukan sesuai dengan jenis dan stadium kanker ketika didiagnosis (Pusdatin Kemenkes RI, 2019). Terapi tersebut memiliki efek samping yang menjadi pertimbangan pasien. Efek samping tersebut diantaranya terdapat bekas luka pada tempat pembedahan, mengalami *alopecia* (kerontokan rambut), mual, emesis (muntah), anemia, kelelahan, infeksi, infertilitas, menopause, perubahan berat badan, hepatoksik dan menginduksi kanker di organ lain (Satyarsa, 2019).

Upaya yang sudah dilakukan untuk mengatasi kanker, salah satunya dengan mencari bahan alam yang memiliki fungsi sebagai antikanker. Bahan aktif yang dapat digunakan mampu menekan proliferasi sel tumor, memiliki efek sitotoksik, atau mampu menginduksi proses apoptosis sel kanker (Wikanta dkk, 2011). Penggunaan senyawa antikanker dapat digunakan untuk menginduksi mekanisme apoptosis pada sel kanker, sehingga mekanisme apoptosis spesifik pada sel kanker menjadi lebih efektif dan toksisitas pada sel normal menjadi minim (Fatmawati dkk, 2018). Senyawa antikanker ini dapat ditemukan pada taurin yang merupakan salah satu asam amino bebas yang berfungsi sebagai antikanker dan antioksidan yang berpengaruh terhadap penangkapan radikal bebas dan perlindungan dalam melawan oksidasi (Hagar, 2004). Taurin membantu dalam mencegah kerusakan sel dan jaringan karena adanya oksidasi (Murray, 1996). Pemberian taurin pada sel *Human Hepatocellular Carcinoma* HepG2 memberikan efek signifikan terhadap antiproliferasi sel dan juga mampu untuk menginduksi proses apoptosis pada sel (Shuo dkk, 2015).

Lamun merupakan salah satu tumbuhan laut yang tumbuh di perairan dangkal dan memiliki senyawa bioaktif sebagai antikanker seperti lamun *Cymodecea rotundata* dan *Enhalus acoroides*. Ekstrak daun lamun *Enhalus acoroides* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, steroid dan tanin (Permana dkk, 2020). Selain itu, kedua jenis lamun ini mengandung senyawa bioaktif seperti alkaloid, flavonoid, saponin, dan steroid (Nurafni dan Nur, 2018), yang mempunyai keefektifan sebagai obat, antioksidan, antitumor, dan antikanker (Robinson, 1995). Pemanfaatan lamun *Enhalus acoroides* dapat digunakan sebagai antikanker karena memiliki senyawa aktif secara biologis dan merupakan biomedis penting serta dapat dimanfaatkan sebagai obat yang potensial. Hal ini didukung dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa lamun dapat digunakan sebagai antikanker, antimikroba, antivirus dan memiliki kandungan antioksidan di dalamnya (Kala, 2021). Pada penelitian yang dilakukan oleh Widiastuti dkk (2019) menyebutkan bahwa ekstrak lamun *Enhalus acoroides* berpotensi sebagai antikanker karena bersifat sitotoksik dan mampu menghambat proliferasi sel kanker serviks *HeLa*. Penelitian yang sama juga dilakukan oleh Yusni (2022) yang menyebutkan bahwa pada ekstrak lamun *Cymodecea rotundata* dan *Enhalus*

acoroides bersifat sitotoksik dan menghambat terjadinya proliferasi pada sel *HeLa*. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam pemanfaatan lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* sebagai antikanker dengan menggunakan kultur sel *HeLa*. Perbandingan yang digunakan yaitu asam organik taurin serta Doxorubicin sebagai kontrol positif antikanker.

B. Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut:

1. Bagaimana aktivitas sitotoksik ekstrak etanol lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta taurin terhadap sel kanker serviks *HeLa*?
2. Bagaimana aktivitas antiproliferasi ekstrak etanol lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta taurin terhadap sel kanker serviks sel *HeLa*?
3. Bagaimana ekspresi gen *p21* setelah perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta taurin terhadap sel kanker serviks *HeLa*.

C. Tujuan

Tujuan dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut:

1. Menganalisis aktivitas sitotoksik dari pemberian ekstrak etanol lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta taurin terhadap sel kanker serviks *HeLa*.
2. Membuktikan adanya aktivitas antiproliferasi dari pemberian ekstrak etanol lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta taurin terhadap sel kanker serviks *HeLa*.
3. Menganalisis peningkatan ekspresi gen *p21* setelah pemberian ekstrak etanol lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta taurin terhadap sel kanker serviks *HeLa*.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini yaitu:

1. Sebagai sumber informasi ilmiah mengenai kandungan dalam ekstrak etanol lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta taurin sebagai antikanker.
2. Memberikan informasi untuk pengembangan obat alternatif kanker serviks dengan menggunakan ekstrak dari lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides*.

E. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut:

1. Pemberian ekstrak etanol lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta taurin dapat bersifat toksik terhadap sel kanker serviks *HeLa*.
2. Pemberian ekstrak etanol lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta taurin dapat bersifat antiproliferatif pada sel kanker serviks *HeLa*.
3. Pemberian ekstrak etanol lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta taurin dapat meningkatkan ekspresi *p21* terhadap sel kanker serviks *HeLa*.

F. Kerangka Pikir

Kanker serviks memiliki kasus paling tinggi kedua di dunia setelah kanker payudara. Terjadinya kanker serviks dikarenakan adanya infeksi pada jaringan epitel serviks dan masuknya onkogen HPV sehingga terjadi infeksi. Karena adanya onkogen ini, mengakibatkan penurunan ekspresi dari *p53* dan berakibat pada penurunan *p21*, sehingga replikasi DNA yang rusak terus terjadi karena penurunan aktivitas apoptosis. Gen pengendali kanker yaitu gen *p53* yang memiliki efektor terkuat sebagai penghentian siklus sel berupa protein *p21*. Protein ini akan berikatan dengan kompleks *Cyclin Dependent Kinase* (CDK) sehingga dapat melakukan penghentian siklus sel. Penghentian siklus sel perlu dilakukan apabila terjadi kerusakan pada DNA, sehingga dapat diperbaiki atau menghidupkan jalur apoptosis untuk mencegah perbanyakan sel yang abnormal.

Pengobatan kanker yang saat ini sering dilakukan yaitu operasi pengangkatan jaringan, kemoterapi, dan penyinaran radiasi. Namun, pengobatan ini cenderung kurang efektif karena memberikan efek samping pada penderitanya. Oleh karena itu, saat ini banyak upaya yang dilakukan untuk mencari obat yang efektif untuk kanker dengan efek samping seminimum mungkin namun tetap mampu untuk menginduksi penghentian siklus sel dan apoptosis sel kanker. Upaya yang dapat dilakukan yaitu dengan memanfaatkan sumber daya alam yang ada di sekitar, seperti lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta taurin.

Pemanfaatan bahan tersebut dikarenakan memiliki kandungan senyawa bioaktif yang dapat berperan sebagai antikanker. Sehingga, penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat mengenai kandungan senyawa bioaktif dari ekstrak etanol lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta Taurin untuk pengobatan kanker serviks yang efektif dengan efek yang seminimum mungkin. Untuk membuktikan potensi senyawa bioaktif dari lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta taurin, maka perlu dilakukan penelitian dengan cara mengaplikasikannya pada sel *HeLa*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Kanker

Kanker berasal dari kumpulan sel yang dapat menghancurkan inang selnya secara genetik sehingga sel menjadi tidak normal. Sel kanker terbentuk karena adanya beberapa sel yang tidak merespon mekanisme regulasi kerja dalam sel, sehingga sel tersebut dapat terus berkembang karena mengambil nutrisi yang berasal dari sel normal. Kegagalan sel dalam merespon regulasi kerja sel dikarenakan adanya kerusakan DNA, sehingga menyebabkan mutasi pada gen yang mengontrol pembelahan sel. Sel kanker dapat menyebar dan tumbuh ke jaringan tubuh lain dengan melalui pembuluh darah dan pembuluh darah bening (Huspa, 2009).

Kanker dapat terbentuk karena adanya perubahan pada susunan gen. Sel yang seharusnya membentuk sel baru untuk mengganti sel lama, sebaliknya membuat sel yang tidak normal dengan terus mengalami pembelahan dan terus tumbuh. Sel kanker terkadang dapat menyebar dan tumbuh ke bagian tubuh lain. Penyebaran sel kanker ini biasa disebut *secondary tumor* atau metastasis (Cancer Research UK). Penamaan sel kanker dapat dilihat dari awal mula sel berasal dan dimana letak sel tersebut berkembang (Kelvin dkk., 2011).

Pada proses siklus sel terdapat 2 macam gen, yaitu gen pemicu terjadinya tumor dan gen penekan terjadinya tumor. Gen pemicu terjadinya tumor atau dengan nama medis *tumor oncogenes*. Sedangkan gen penekan terjadinya tumor atau dengan nama medis *tumor suppressor*, contohnya adalah *p53* dan *Rb* (retinoblastoma) (Prayitno dkk., 2005). Tahapan terbentuknya sel kanker ada 3, yaitu tahap inisiasi, promosi, dan progresi. Tahap inisiasi terjadi karena adanya faktor inisiator karsinogen yang dapat mengakibatkan terbentuknya sel abnormal (Sjamsuhidajat, 2005). Beberapa faktor risiko kanker akibat paparan karsinogen fisik, seperti *ultraviolet (UV)* dan radiasi ion. Karsinogen kimiawi, seperti *benzo(a)pyrene*, formalin dan aflatoxin (kontaminan makanan), dan serat

contohnya abses. Karsinogen biologis, seperti infeksi virus, bakteri dan parasit. Intervensi terhadap faktor risiko kanker tidak hanya bertujuan untuk menurunkan kasus baru kanker, namun juga menurunkan kemungkinan penyakit lainnya yang disebabkan faktor risiko tersebut (Pusdatin, 2015). Mekanisme tahap inisiasi terjadi ketika zat-zat karsinogen dan zat inisiator diaktivasi oleh enzim tertentu dan mengakibatkan terjadinya mutasi pada gen, sehingga DNA menjadi salah dalam menterjemahkan dan sel memperbanyak diri secara terus menerus hingga tidak terkontrol. Tahap selanjutnya yaitu promosi yang dipicu oleh promotor, *growth factor*, dan virus sehingga terbentuk sel-sel polimorfis dan anaplastik. Pada tahap ini terjadi kesalahan pada DNA ketika terjadi pembelahan sel karena terpapar zat karsinogen (Muti'ah, 2014). Tahap progresi merupakan tahap lanjutan dari promosi. Proliferasi sel yang disebabkan karena agen promosi mengakibatkan terjadinya kerusakan sel yang dapat memperluas diri secara berkoloni (Ruddon, 2007). Pada tahap progresi ditandai dengan adanya invasi sel ganas ke membran basalis (Sjamsuhidajat, 2005).

Pilihan terapi untuk kanker disebut sebagai obat antikanker, yaitu suatu senyawa kemoterapeutik yang digunakan untuk pengobatan kanker yang sering pula disebut sebagai obat sitotoksik, sitostatik atau senyawa antineoplasma. Tujuan utama kemoterapi kanker adalah merusak secara selektif sel kanker tanpa mengganggu sel normal. Tujuan ini sering mengalami kegagalan dan sampai sekarang belum ditemukan obat antikanker pilihan yang bekerja secara selektif untuk pengobatan jenis kanker tertentu. Kegagalan tersebut disebabkan antara lain:

1. Perbedaan morfologi dan biokimia sel normal dan sel kanker sangat kecil sehingga obat antikanker tidak ada yang selektif terhadap sel kanker tertentu.
2. Banyak sel kanker bukan sesuatu yang asing bagi tuan rumah (*host*), sehingga tidak menimbulkan respons imunologis. Hal ini berbeda dengan infeksi mikroba yang pertahanan imunologisnya berperan penting dalam membantu kerja obat kemoterapi.
3. Sel kanker dapat cepat menjadi kebal terhadap obat antikanker.
4. Banyak obat antikanker bersifat sangat toksik, misal dapat menekan respon kekebalan.

5. Banyak obat antikanker bersifat karsinogenik, teratogenik dan mutagenik (Widana, 2014).

Pengobatan kanker dapat dilakukan dengan cara:

1. Pembedahan, terutama untuk tumor padat terlokalisasi.
2. Radiasi digunakan untuk pengobatan tambahan sesudah pembedahan dan untuk pengobatan tumor seperti seminoma testikular dan karsinoma nasofaring.
3. Pemberian kemoterapi untuk pengobatan tumor yang tidak terlokalisasi seperti leukemia, koriokarsinoma, multiple mieloma, penyakit limfoma Hodgkin, limfoma Burkitt dan digunakan untuk pengobatan tambahan sesuai pembedahan.
4. Endokrinoterapi merupakan bagian dari kemoterapi yaitu penggunaan hormon untuk pengobatan tumor pada organ yang proliferasinya tergantung pada hormon.
5. Imunoterapi, masih dalam penelitian dan berperan penting pada pencegahan mikrometastatis (Siswandono dan Soekardjo, 1995).

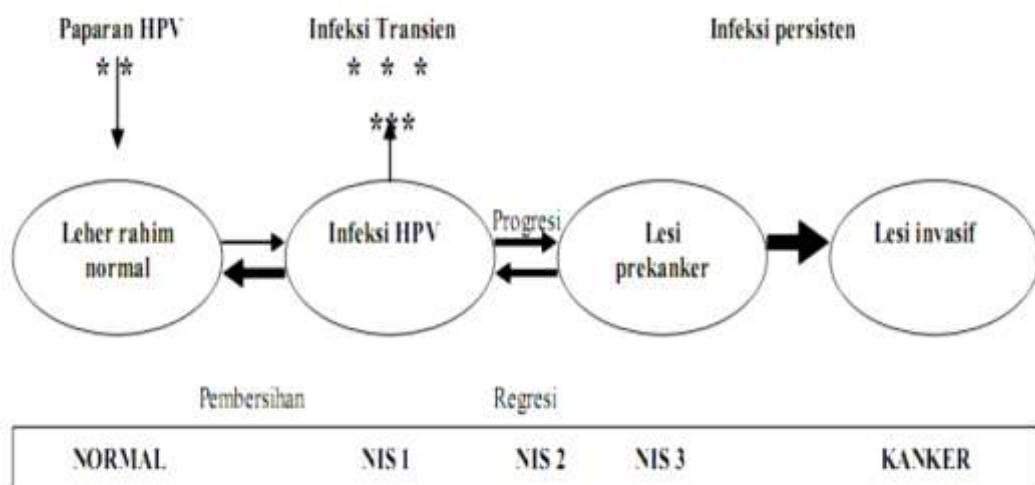
B. Kanker Serviks

Kanker serviks tumbuh dalam leher rahim, yaitu suatu daerah pada organ reproduksi wanita yang terletak di antara vagina dengan uterus. Kanker serviks terjadi karena adanya pertumbuhan abnormal dari jaringan epitel serviks karena infeksi dari *Human Papilloma Virus* (HPV) dengan penyebab kejadian sebesar 90%. HPV sendiri merupakan virus DNA sirkuler rantai ganda yang tidak memiliki selubung dan termasuk dalam *Papillomaviridae* (Teissier dkk, 2010). HPV yang menginfeksi jaringan mukosa dibedakan menjadi *low risk* dan *high risk*. HPV berdasarkan *low risk* contohnya HPV-6 dan HPV-11 yang menyebabkan terbentuknya tumor jinak seperti kutil kelamin. HPV berdasarkan *high risk* contohnya HPV-16, HPV-18 dan HPV-31 yang dapat menyebabkan kanker, seperti kanker serviks, vagina dan anus (Chung dkk, 2010).

Saat ini diketahui genom HPV terbagi dalam tiga kategori, yaitu regulator (10%), *early* (50%), dan *late* (40%). Gen *early* terdiri atas *E1* sampai *E7*, sedangkan gen *late* terdiri atas *L1* dan *L2* (Fatima, 2014). HPV-16 dan HPV-18 merupakan virus

DNA yang memiliki oncogen E6 dan E7 (Choudhari dkk, 2013). Oncogen E6 dan E7 berpengaruh terhadap ketidakseimbangan dari apoptosis sehingga mempengaruhi siklus sel (Teissier dkk, 2010).

Perkembangan virus HPV ini diduga karena terjadinya hubungan seks pada usia muda (di bawah 18 tahun), perilaku seks berisiko, merokok atau terpapar asap rokok, kurang dalam menjaga kebersihan (Syaiful, Tarigan dan Zuska, 2018), mempunyai anak banyak, sosial ekonomi rendah, pemakaian pil KB, penyakit menular seksual, dan gangguan imunitas tubuh (Kemenkes RI, 2017).



Gambar 1. Perkembangan kanker melalui paparan HPV (Depkes, 2008)

Perkembangan kanker invasif berawal dari terjadinya lesi neoplastik pada lapisan epitel serviks, dimulai dari neoplasia intraepitel serviks (NIS) 1, NIS 2, NIS 3 atau karsinoma *in situ* (KIS). Setelah menembus membran basalis selanjutnya akan berkembang menjadi karsinoma mikroinvasif dan invasif.

Adapun klasifikasi stadium dari kanker serviks ini adalah sebagai berikut (Kemenkes RI, 2017):

- 0 Karsinoma *in situ* (karsinoma preinvasif)
- I Karsinoma serviks terbatas di uterus (ekstensi ke korpus uterus dapat diabaikan)

- IA Karsinoma invasif didiagnosis hanya dengan mikroskop. Semua lesi yang terlihat secara makroskopik, meskipun invasi hanya superfisial, dimasukkan ke dalam stadium IB
- IA1 Invasi stroma tidak lebih dari 3,0 mm kedalamannya dan 7,0 mm atau kurang pada ukuran secara horizontal
 - IA2 Invasi stroma lebih dari 3,0 mm dan tidak lebih dari 5,0mm dengan penyebaran horizontal 7,0 mm atau kurang
- IB Lesi terlihat secara klinik dan terbatas di serviks atau secara mikroskopik lesi lebih besar dari IA2
- IB1 Lesi terlihat secara klinik berukuran dengan diameter terbesar 4,0 cm atau kurang
 - IB2 Lesi terlihat secara klinik berukuran dengan diameter terbesar lebih dari 4,0 cm
- II Invasi tumor keluar dari uterus tetapi tidak sampai ke dinding panggul atau mencapai 1/3 bawah vagina
- IIA Tanpa invasi ke parametrium
- IIA1 Lesi terlihat secara klinik berukuran dengan diameter terbesar 4,0 cm atau kurang
 - IIA2 Lesi terlihat secara klinik berukuran dengan diameter terbesar lebih dari 4,0 cm
- IIB Tumor dengan invasi ke parametrium
- III Tumor meluas ke dinding panggul/ atau mencapai 1/3 bawah vagina dan/atau menimbulkan hidronefrosis atau afungsi ginjal
- IIIA Tumor mengenai 1/3 bawah vagina tetapi tidak mencapai dinding panggul
- IIIB Tumor meluas sampai ke dinding panggul dan / atau menimbulkan hidronefrosis atau afungsi ginjal
- IVA Tumor menginvasi mukosa kandung kemih atau rektum dan/atau meluas keluar panggul kecil (*true pelvis*)
- IVB Metastasis jauh (termasuk penyebaran pada peritoneal, keterlibatan dari kelenjar getah bening supraklavikula, mediastinal, atau para aorta, paru, hati, atau tulang)

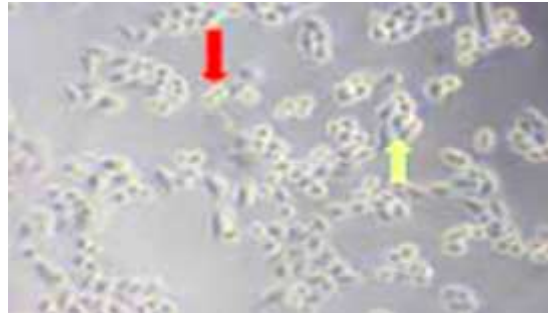
Kanker pada serviks sulit dideteksi dan disebut sebagai *ladies silent killer* karena sering kali terjadi keterlambatan dalam penanganannya. Penyakit ini sebagai salah satu penyebab kematian yang ada di seluruh dunia (Kurnaesih dkk, 2018). Di Indonesia sendiri terjadi peningkatan jumlah penderita kanker serviks dan menjadi penyebab kematian pada usia produktif. Penyebab utama meningkatnya mortalitas kanker di negara berkembang adalah kurangnya program skrining efektif yang dapat mendeteksi keadaan sebelum kanker, maupun mendeteksi kanker pada stadium dini sehingga penanganannya dilakukan sebelum kanker pada stadium lanjut. Selain kurangnya program skrining, juga rendahnya pengetahuan dan kemampuan serta aksesibilitas untuk pengobatan (Marfianti, 2021). Tindakan operasi akan sulit dilakukan apabila penyakit sudah parah dan keterlambatan penanganan dapat berakibat fatal berupa kematian (Kurnaesih dkk, 2018).

Sel *HeLa* merupakan sel kanker serviks yang diambil dari seorang wanita bernama Henrietta Lack. Sel ini bersifat immortal dan aktif membelah sehingga banyak digunakan untuk penelitian secara *in vitro* (Rahbari, 2009). Sel *HeLa* terbentuk karena adanya onkogen *Human Papilloma Virus* (HPV) yang mampu menginduksi serangkaian proses yang akhirnya menimbulkan sifat kanker (Teissier dkk, 2010). Oncogen merupakan gen yang berasal dari protooncogen yang mengalami mutasi. Aktivasi dari adanya oncogen merangsang produksi reseptor faktor pertumbuhan yang tidak sempurna dan memberi isyarat untuk melakukan proliferasi secara terus menerus. Proliferasi yang terjadi tidak diiringi maturasi sel mengakibatkan gangguan pada diferensiasi sel, sehingga dapat mengakibatkan progresifitas sel menjadi ganas (Allen, 1998).

Sel *HeLa* diperbanyak dengan cara dikultur. Kultur sel *HeLa* menggunakan media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 serum yang mengandung asam amino, vitamin, garam organik, glukosa, serum yang mengandung hormon, albumin dan lipid yang dibutuhkan oleh sel kultur untuk bertahan hidup dan memperbanyak diri (Freshney, 1986). Selain menggunakan media RPMI, kultur sel *HeLa* juga dapat menggunakan *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) dengan kandungan asam amino, vitamin, dan komponen tambahan lain.

Kandungan di dalamnya empat kali lebih banyak dibanding formula aslinya dan dengan kadar glukosa yang lebih tinggi (Rohanova, dkk, 2014).

Adapun morfologi dari sel *HeLa* sebagai berikut:



Gambar 2. Morfologi sel *HeLa*, sel hidup ditunjukkan panah warna hijau dan sel mati ditunjukkan panah warna merah (mikroskop inverted perbesaran 100X) (Susanto dkk, 2017)

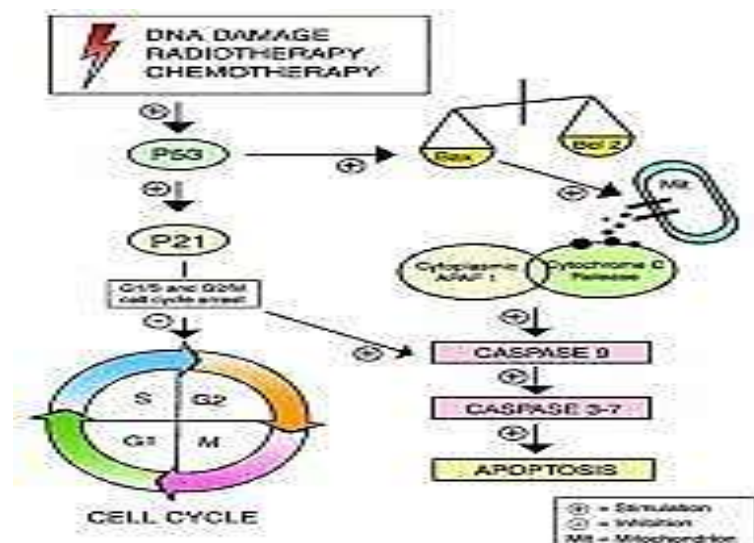
C. Gen *P21*

Adanya *Human Papilloma Virus* (HPV) 16 dan 18 pada tubuh manusia dapat menyebabkan terjadinya kanker serviks karena memiliki onkogen E6 dan E7. Onkogen E6 yang berpengaruh terhadap pembentukan kanker serviks dimulai dengan terbentuknya ikatan antara E6 dengan E6-Associated Protein (E6-AP) untuk membentuk *ubiquitin ligase* (E3), sehingga mengakibatkan degradasi pada gen *p53*. Degradasi ini mengakibatkan *p53* menjadi tidak dapat menjalankan fungsinya untuk apoptosis (Jimenez dkk, 2013). Pada sel normal, terjadi pengikatan protein retinoblastoma (pRb) dengan E2F sebagai penekan transkripsi gen pada siklus sel ketika memasuki fase G1 menuju fase S. Adanya E7 dalam sel mengakibatkan terjadi pengikatan E7 dengan pRb yang mengakibatkan inaktivasi pada E7-pRb. Sedangkan E2F akan mengikat DNA dan memberikan signal proliferasi sel secara terus-menerus (Jimenez dkk, 2013). Pathway antara pRb dan *p53* bermula pada fosforilasi p105Rb yang selanjutnya melepaskan kompleks Rb/E2F dengan perantara cyclin-dependent kinase yang akan dihambat oleh gen *p21*. Gen *p21* merupakan target transkripsi dari *p53* (Horner dkk, 2003).

Gen *p21* memiliki peran sebagai pengendali dari aktivitas proliferasi sel dengan melakukan penghambatan terhadap kelompok protein *cyclin dependent kinase* (Cdk). Penghambatan ini bertujuan agar DNA Repair dapat memperbaiki kerusakan yang terjadi tanpa perlu melakukan apoptosis (Harper, dkk, 1993).

Siklus sel berlangsung melalui aktivasi sekuensial dan inaktivasi cyclin-dependent kinases (CDKs). Transisi dari fase G1 ke S diketahui diatur oleh inhibitor CDK (Teramena dkk, 2011). Adanya gangguan pada kontrol siklus sel yang diatur oleh siklus kinase independen dapat mengakibatkan terjadinya pertumbuhan dan progresi tumor. *p21* (Waf-1) adalah inhibitor dari siklin kinase, dan peningkatan regulasi *p21*, yang menginaktivasi kompleks siklependen kinase (CDK) G1-associated, dikaitkan dengan p53-mediated G1 / S *cell cycle arrest*. Setelah paparan karsinogen, pengaturan *p21* dan *p53* dapat menunda perkembangan melewati titik G1. Mutasi pada *p21* dapat menyebabkan hilangnya kontrol homeostatik selama karsinogenesis manusia. Ikatan antara *p21* dengan CDK yang berhubungan dengan transisi fase G1-S yaitu cyclin D dan cyclin E memiliki peran sebagai suatu *checkpoint* dari kemajuan suatu siklus sel untuk mencegah terjadinya replikasi pada DNA yang rusak (Abdukhdeir dan Park, 2005).

Gen *p21* (juga bernama CDKN1A) terletak di kromosom 6*p21.2* terdiri dari 3 ekson dan 2 intron dan mengkode protein 21-kd (Diana dkk, 2021). Inhibitor cyclin-dependent kinase (CDK) (*p21*) adalah regulator negatif terpenting dari siklus sel. *p21* dapat berinteraksi dengan beberapa faktor transkripsi, seperti penghambatan komplemen protein E2F dan efek pada kompleks cyclin/ CDK, untuk meningkatkan penekanan gen E2F dan menginduksi penghentian siklus sel. Ketika *p21* ditemukan di sitoplasma, ia bertindak sebagai onkogen, mendorong proliferasi dan progresi sel melalui siklus sel (Jassim dkk, 2021).



Gambar 3. Regulasi p21 melalui jalur dependen p53 (Gillham, 2007)

Gen *p21* memiliki 164 asam amino, 2 terminal polipeptida N dan C, dan beberapa dari domain interaksinya berkaitan dengan protein cyclin, CDK, PCNA, ASK-1, dan NLS (*nuclear localization signal*). Pada kondisi normal *p21* berada di dalam nukleus, memiliki fungsi utama dalam penghentian siklus sel, dengan cara berikatan dengan kompleks *Cyclin Dependent Kinase* (CDK). CDK6 bekerja sama dengan *cyclin* D1, mengendalikan progresi siklus sel fase G1 ke S melalui fosforilasi dan selanjutnya inaktivasi protein Rb. Beberapa penelitian mengungkapkan fungsi CDK6, antara lain dalam tumori-genesis, memutus proliferasi seluler dan diferensias (Bakri dkk, 2019). *p21* bertindak sebagai inhibitor universal dari CDK, secara langsung menghentikan siklus sel pada fase G1/S (Bakri dkk, 2019). *p21* dalam menginduksi penghentian siklus sel, diferensiasi terminal, atau apoptosis, perubahan pada gen *CDKN1A* dan ekspresinya mungkin memainkan peran penting dalam patogenesis kanker (Bau dkk, 2007).

D. Lamun

Lamun merupakan tumbuhan berbunga (Angiospermae) yang dapat menyesuaikan dirinya untuk hidup di dalam air laut (Rosmawati dkk, 2020). Tumbuhan ini terdiri dari rhizoma, daun dan akar. Rhizoma adalah batang yang terbenam dan merayap secara mendatar, serta berbuku-buku. Pada buku-buku tersebut tumbuh batang pendek yang tegak ke atas, berdaun dan berbunga, serta tumbuh akar. Rhizoma dan akar inilah yang menahan hempasan ombak dan arus (Azkab, 2006). Secara ekologis, lamun memainkan peranan penting di perairan laut dangkal sebagai habitat biota lainnya seperti ikan, produsen primer serta melindungi perairan dari erosi (Fachrul, 2007).

Lamun dapat tumbuh subur pada daerah pasang surut terbuka dan perairan pantai yang memiliki dasar perairan lumpur berpasir, kerikil dan patahan karang mati (Wagey dan Sake, 2013). Di Indonesia terdapat 13 spesies lamun dan yang paling mudah ditemukan adalah spesies dari *Enhalus acoroides* dan *Thalassia hemprichii* (Nurafni dan Nur, 2018). Saat ini ada sekitar 60 spesies lamun yang dikenal di dunia. Karena keragaman yang tinggi ini, baru-baru ini ada minat yang

meluas untuk mengevaluasi berbagai parameter struktural dan dinamis morfometrik pada lamun (Wagey, 2011).

Lamun memiliki kandungan nutrisi dan serat yang baik dan juga memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder tumbuhan yang berpotensi sebagai obat-obatan (Sami dkk, 2020). Beberapa kandungan lamun antara lain karbohidrat, protein, lemak, fenol hidroquinon, steroid, triterpenoid dan flavonoid. Flavonoid merupakan golongan fenol terbesar dan selain itu juga terdapat beberapa jenis fenol lainnya seperti fenol monosiklik sederhana, fenilpropanoid dan kuinon fenolik. Salah satu manfaat dari flavonoid yaitu sebagai antioksidan. Antioksidan ialah molekul yang dengan mudah dapat memberikan elektronnya ke molekul radikal bebas sehingga dapat menstabilkan molekul radikal bebas dan mencegah proses oksidasi yang tidak diinginkan dalam sel (Zheng dan Wang, 2001).

1. *Cymodocea rotundata*

Ciri-ciri umum *Cymodocea rotundata* memiliki daun lurus, panjang dan memiliki 1 tulang tengah daun yang tidak menonjol serta seludang daun tertutup sempurna. Ujung daun *Cymodocea rotundata* berbentuk huruf m, tepi daun halus tidak bergerigi. Rata-rata panjang daun 94,27 mm, rata-rata lebar daun 5,00 mm dan jarak antar nodus 28,36 mm. Akar tumbuh pada rhizoma yang menjalar mendatar dan memanjang. Pada daerah ini *C. rotundata* tumbuh pada substrat pasir pecahan karang (Rawung dkk, 2018). lamun jenis *Cymodocea rotundata* memiliki akar bercabang yang tidak teratur pada setiap ruas dengan adanya senyawa flavonoid ini bisa membantu melindungi akar-akar lamun ini dari serangan bakteri (Haryanti, 2010). Lamun memiliki beberapa sifat yang dapat membuatnya mampu hidup di lingkungan laut, yaitu mampu hidup di media air bersalinitas tinggi, mampu berfungsi normal dalam keadaan terbenam, mempunyai sistem perakaran jangkar yang berkembang baik, serta mampu melaksanakan penyerbukan dan daur generatif dalam keadaan terbenam (Dahuri 2003).



Gambar 4. *Cymodocea rotundata*

Klasifikasi *Cymodocea rotundata* adalah sebagai berikut (Ascherson dan Schweinfurth 1870 dalam Rawung dkk, 2018).

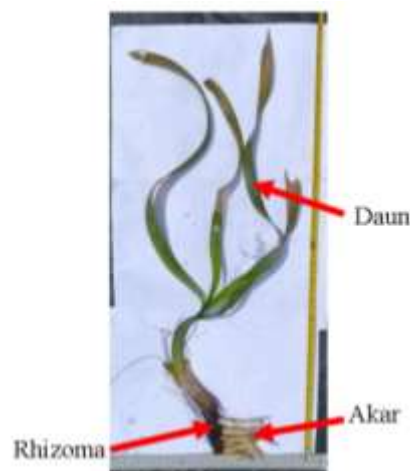
Kerajaan : Plantae
 Filum : Tracheophyta
 Kelas : Magnoliopsida
 Bangsa : Alismatales
 Suku : Cymodoceaceae
 Marga : *Cymodocea*
 Spesies : *Cymodocea rotundata*

Cymodocea rotundata mengandung senyawa bioaktif yang dapat dijadikan sebagai antibakteri yaitu alkaloid, flavonoid, dan triterpenoid (Pradana dkk, 2018). Menurut Winarsi (2007) senyawa flavonoid memiliki aktivitas antioksidan yang kuat pada system biologis yaitu mampu menghambat penggumpakan sel darah. Lamun *Cymodocea rotundata* memiliki senyawa flavonoid dan fenolik yang bersifat antioksidan tetapi tidak mampu menghambat kerusakan oksidasi lemak atau minyak pada sampel minyak ikan tongkol (Puspasari dkk, 2017). Pada lamun jenis *Cymodocea rotundata* senyawa flavonoid ditemukan pada bagian akar lamun tersebut. Fungsi akar pada lamun yaitu sebagai tempat menyimpan oksigen untuk proses fotosintesis (Haryanti, 2010). Lamun jenis ini juga mengandung senyawa steroid yang mampu bersifat sebagai antibakteri dengan mekanisme merusak membran sel bakteri, sehingga menghambat pertumbuhan bakteri pada lamun (Mossi dkk, 2009).

Pada uji fitokimia ekstrak *Cymodocea* sp. mengandung senyawa golongan saponin, steroid, flavanoid, fenol hidrokuinon, dan terpenoid. Ekstrak kasar metanol daun *Cymodocea* sp. mempunyai aktivitas antioksidan paling tinggi dengan nilai IC_{50} 518.57 ppm dan total fenol 26.73 mg (Permana dkk, 2016). Senyawa saponin bersifat antikarsinogenik sebagai antioksidan dan sitotoksik terhadap sel kanker. Senyawa terpenoid memiliki efek toksik dengan mengganggu proses pembentukan sel yang diasumsikan sebagai sel kanker (Kartikasari, 2010).

2. *Enhalus acoroides*

Ciri-ciri umum *Enhalus acoroides* memiliki rambut-rambut berwarna hitam yang tumbuh pada rhizoma dan memiliki akar yang banyak. Ujung daun tumbuhan ini terdapat gerigi. *Enhalus acoroides* tumbuh pada substrat pasir, pasir berlumpur dan pasir pecahan karang (Rawung dkk, 2018).



Gambar 5. *Enhalus acoroides*

Klasifikasi *Enhalus acoroides* adalah sebagai berikut (Linneaus F, Royle 1839 dalam Rawung dkk, 2018).

Kerajaan : Plantae
 Filum : Tracheophyta
 Kelas : Magnoliopsida
 Bangsa : Alismatales
 Suku : Hydrocharitaceae
 Marga : *Enhalus*
 Spesies : *Enhalus acoroides*

Enhalus acoroides mengandung senyawa bioaktif yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, dan steroid (Nurafni dan Nur, 2018). Flavonoid didalam tumbuhan biasanya terikat dengan gugus gula sebagian glikosida dan aglikogen dalam beberapa bentuk kombinasi glikosida. Keberadaan senyawa kimia golongan flavonoid, alkaloid dan steroid dalam ekstrak kasar *Enhalus acoroides* menunjukkan bahwa kedua jenis lamun tersebut memiliki potensi sebagai bahan kimia alami antifouling, antibakteri, antifungi, serta bahan baku farmasi lainnya (Robinson, 1995). Selain itu, ekstrak etanol lamun juga memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat, dengan nilai IC_{50} sebesar 38,008 $\mu\text{g/ml}$ terhadap radikal ABTS (Sami dkk, 2020).

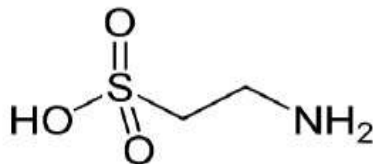
Penelitian yang dilakukan oleh Dewi dkk (2012).menunjukkan hasil uji toksisitas ekstrak metanol *Enhalus acoroides* bersifat sangat toksik dengan nilai LC_{50} 5,74 ppm, sedangkan ekstrak n-heksana *Enhalus acoroides* bersifat tidak toksik ditunjukkan dengan nilai LC_{50} 1309,42 ppm. Penelitian yang dilakukan oleh Arifudin (2013) menunjukkan bahwa lamun jenis *Enhalus acoroides* bersifat sitotoksik terhadap *Artemia salina*.

Daun lamun *Enhalus acoroides* mengandung senyawa bioaktif berupa alkaloid, steroid dan tanin. Hasil ekstraksi menggunakan pelarut metanol menunjukan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak daun lamun *Enhalus acoroides* tergolong sedang dengan nilai IC_{50} 148,67 ppm. Secara keseluruhan, lamun jenis *Enhalus acoroides* ini memiliki potensi sebagai bahan aktif antioksidan (Permana dkk, 2020). Ekstrak metanol lamun juga bersifat sitotoksik terhadap sel *HeLa* dan juga dapat menghambat terjadinya proliferasi pada sel kanker (Widiastuti dkk, 2019).

E. Taurin

Taurin adalah asam amino yang mengandung belerang, yang secara kimia dikenal sebagai *2-aminoethane sulfonic acid*. Taurine (*2-aminoethane sulfonic acid*) merupakan salah satu senyawa yang bersifat antioksidan. Antioksidan dalam taurin dapat membantu dalam mencegah kerusakan sel dan jaringan akibat adanya oksidasi. Oleh karena itu, taurin dapat dimanfaatkan sebagai antikarsinogenik

dengan melindungi sel dalam tubuh terhadap kerusakan yang diakibatkan oleh adanya radikal bebas (Redmon, dkk, 1983). Antioksidan ini mencegah akumulasi ROS dalam sel tumor dan mengontrol perkembangan dari sel kanker. Taurin mengaktifkan penekan tumor PTEN dan P53 sehingga taurin dianggap sebagai antikanker (Yousuf, dkk, 2022).



Gambar 6. Struktur taurin (Widiyanti, 2003)

Asam Amino Taurin (*2-aminoethanesulphonic Acid*) dapat diproduksi sendiri oleh tubuh apabila tidak didapat dari makanan. Tidak seperti asam amino lain, taurin tidak ikut dalam sintesis protein dan banyak ditemukan dalam jaringan otot jantung dan otak manusia (Guz dkk., 2007). Perubahan kadar taurin sering digunakan untuk memprediksi pembentukan dan transformasi ganas beberapa tumor. Tingkat taurin ditemukan jauh lebih rendah pada pasien karsinoma dibandingkan pada orang sehat. *Long non-coding RNA Taurine Unregulated Gene 1* (TUG1) dilaporkan terlibat dalam inisiasi dan perkembangan dari kanker. Tingkat ekspresi TUG1 sangat hiperbolik dalam sampel unit linier metrik dan garis sel. *Knockdown* TUG1 sangat menekan proliferasi, sehingga dapat menyebabkan penghentian dari siklus sel (Borges dkk, 2020).

Taurin hampir terdapat pada semua jaringan hewan dan paling banyak asam amino intraseluler. Efek dari taurin pada glukosa homeostasis dan metabolisme dalam konteks diabetes, taurin diberikan pada berbagai tindakan biologis, termasuk antioksidan, osmoregulasi, modulasi, dan konjugasi asam empedu, yang mempertahankan homeostasis fisiologis. Rendahnya kandungan taurin dalam tubuh beberapa jenis hewan mengakibatkan beberapa penyakit patologis seperti kardiomiopati, degenerasi retina, serta pertumbuhan yang terhambat. Taurin dapat dimanfaatkan dalam pengobatan kardiovaskuler, hiperkolesterolemia, epilepsi, alzheimer, dan gangguan hati (Birdsall, 1998).

Pemanfaatan taurin terhadap sel kanker dapat menginduksi apoptosis sel dan juga sebagai antiproliferasi dari sel kanker payudara dan kolorektal (Srivastava, 2010). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian taurin secara signifikan dapat menghambat proliferasi dari sel kanker serviks *HeLa* selaras dengan konsentrasi dan waktu perlakuan yang diberikan (Li dkk, 2019). Taurin sebagai antikanker melalui proses antioksidasi, immunomodulasi, peningkatan perbaikan pada DNA dan penghambatan proliferasi sel (Zhang dkk, 2008).

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli-September 2022. Pembuatan ekstrak etanol dan uji fitokimia *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung. Pengujian sitotoksik, antiproliferasi, dan ekspresi gen *p21* dilakukan di Laboratorium kultur sel Sitogenetika dan Genetika Molekuler, Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Bandung, Jawa Barat.

B. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak adalah peralatan gelas, spatula, timbangan analitik, oven, *blender*, kertas saring, corong gelas, dan *rotary evaporator*. Pada pengujian fitokimia alat yang digunakan adalah tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, gelas beaker, *micro-pipett*, dan *micro-tips*. Pada pengujian sitotoksik, antiproliferasi dan ekspresi *p21* alat yang digunakan adalah inkubator CO₂, sentrifuge, *flask*, *conical tube*, *microtube*, *96 well plate*, *laminar air flow cabinet*, *hemocytometer*, *micro pipet*, *serological pipet*, *pipet gun*, *vortex*, *inverted microscope*, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader*. *6 well plate*, mikropipet 10, 20, 100, 200, 1000 µL, tabung sentrifus 1,5 mL, rak tabung kecil, sentrifugator, penangas air 37°C, cover slip, inkubator, mikroskop, kaca preparat, dan *deck glass* RT-PCR terdiri dari *Eppendorf® RNA/DNA LiBind* microsentifuge tube 1,5 ml dari Sigma Aldrich Z2555548, *vortex*, sentrifuge, tip (*yellow, blue, white*) *axygen*, *Light cycle®software* dari ROCHE, kulkas -80°C dan *NanoDrop Spectrophotometer*.

Bahan yang digunakan untuk membuat ekstrak adalah *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides*, Taurin (kimia mart), kultur sel *HeLa*, etanol fraksi 96%, akuades, media kultur sel *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)*, asam asetat glasial (CH₃COOH), asam sulfat (H₂SO₄), Besi (III) klorida (FeCl₃),

klorofom (CHCl_3), kalium iodida (KI), raksa (II) klorida (HgCl_2), serbuk magnesium (Mg), asam klorida pekat (HCl), *Penicillin streptomisin* 1% , *fetal bovine serum* (FBS), *trypsin-EDTA* 0,25%, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), Natrium Bikarbonat (NaHCO_3), *Tripan Blue* 0,4% , larutan Dimethyl sulfoxide (DMSO), hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%, Streptavidin horseradish peroxidase (HRP), Aminoethyl Carbazole (AEC), distilled-water (dH_2O), Mayer Hans Eberhard (HE), gelatin 5%. Primer *p21*, *Real Time PCR kit RealMODTM Green* qRT – PCR *mix* dari intron Biotechnology yang terdiri dari *RealMODTM Green* qRT – PCR *mix* (2x) 1,25 ml, qRT – PCR *Enzyme Mix* (50x), DNase/RNase free water 1 ml, *Chloroform*, *Ethanol*, RNA Isolation kit dari *lysis buffer*, *binding buffer*, *washing buffer A*, *washing buffer B*, *elution buffer*, kolom (tabung), *collection tube*, *go taq DNA polymerase*, *go script*, MgCl_2 , *Nuclease-Free Water*, *Cell Counting Kit-8 (CCK-8)* dan Doxorubicin.

C. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan eksperimental untuk membandingkan 3 kelompok perlakuan dengan menggunakan kultur sel *HeLa*. Perlakuan yang diberikan yaitu dengan beberapa konsentrasi ekstrak etanol *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta taurin. Rancangan dalam penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan faktorial 6x3 dengan 6 seri konsentrasi (2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, dan 62,5 ppm) dan 3 jenis bahan uji (*Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* dan taurin). Untuk pengujian sitotoksik serta dilengkapi dengan kontrol obat (Doxorubicin sebagai pembanding) dan kontrol sel. Untuk uji antiproliferasi atau *doubling time* menggunakan faktorial 6x3x3 dengan 6 konsentrasi, 3 jenis bahan uji, dan 3 waktu inkubasi (24 jam, 48 jam, dan 72 jam). Pada pengujian ekspresi *p21* menggunakan faktorial 2x2, yaitu 2 konsentrasi di bawah nilai IC_{50} (250 ppm dan 500 ppm) dengan 2 bahan uji (*Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides*).

Pada penelitian ini menggunakan 3 kelompok waktu perlakuan, yaitu 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Masing-masing kelompok yaitu kontrol negatif (K-) yang merupakan kultur sel tanpa perlakuan, kontrol positif (K+) diberikan Doxorubicin

20 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2,5 ppm, 1,25 ppm, dan 0,625 ppm. Pada kelompok perlakuan diberikan 3 bahan uji, yaitu ekstrak etanol *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta taurin dengan konsentrasi bertingkat 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, dan 62,5 ppm.

1. Populasi

Kultur sel *HeLa* didapat dari koleksi Laboratorium Kultur Sel dan Sitogenetika, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran (UNPAD) Bandung yang dikultur dalam media *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), *Penisillin-Streptomisin* (1% fetal bovine serum (FBS), *trypsin-Ethylene Dimamine Tetra Acid* (EDTA) 0,25%, *phosphate buffer saline* (PBS). Jumlah sel yang digunakan yaitu suspensi sel $\pm 20.000.000$ sel *HeLa* (CCRC, 2013).

2. Sampel

Sampel yang digunakan merupakan populasi yang memenuhi persyaratan kriteria inklusi dan eksklusi.

- a. Inklusi, pada penelitian ini sel *HeLa* diperoleh dari induk yang sama dan dapat tumbuh dikultur mencapai konfluen 80-90%.
- b. Eksklusi, pada penelitian ini sel *HeLa* yang tidak dapat berkembang atau terkontaminasi selama penelitian.

3. Teknik Pengambilan Sampel

Teknik dalam pengambilan sampel menggunakan *simple random sampling* karena populasi dianggap homogen. Sumuran berisi subkultur sel yang sudah konfluen selanjutnya diencerkan dengan medium *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) sehingga sel *HeLa* pada tiap sumuran berjumlah sekitar 5×10^4 sel. Sumuran secara acak dibagi menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Etanol *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides*

Bahan uji *Enhalus acoroides* dan lamun *Cymodocea rotundata* diperoleh dari Pantai Tegal Perak Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung. Seluruh bagian digunakan dalam pembuatan ekstrak. Untuk pengambilan bahan uji dilakukan

dengan jarak \pm 5 meter dari bibir pantai dengan kedalaman maksimal 0,5 meter pada saat permukaan air laut surut.

Selanjutnya bahan uji *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* dicuci hingga bersih dengan air mengalir dan kemudian dikering anginkan. Setelah kering, bahan kemudian dihaluskan hingga menjadi simplisia bubuk, dan bubuk tersebut kemudian dimaserasi dalam pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 atau 1 liter etanol digunakan untuk 100 gram simplisia selama 24 jam hingga diperoleh maserat. Hasil maserasi kemudian disaring dengan gelas corong dan kertas saring. Ekstrak etanol yang telah diperoleh kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental (Nurfitri, 2019). Selanjutnya, ekstrak kental dimasukkan ke dalam oven pada suhu 30°C hingga diperoleh ekstrak dalam bentuk pasta dan disimpan dalam wadah tertutup.

2. Pengujian Fitokimia Ekstrak *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides*

Pengujian fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak bahan uji *C. rotundata* dan *E. acoroides*.

Pengujian ini diantaranya memeriksa senyawa saponin, tanin, alkaloid, dan flavonoid dengan prosedur pengujian sebagai berikut.

Tabel 1. Prosedur Pengujian Senyawa Metabolit Sekunder (Tasmin dkk, 2014).

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

E. Pembuatan Media Kultur

Pembuatan media kultur sel *HeLa* dengan menyediakan media sebanyak 5 ml larutan *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, dan Pensterp (*Penisilin streptomisin*) 0,5 ml yang sudah dicairkan di suhu ruang dicampur dalam botol steril kemudian ditambah media *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) hingga 50 ml (CCRC, 2009).

F. Kultur Sel Kanker Serviks *HeLa*

Sel *HeLa* diambil dari tangki nitrogen cair kemudian dicairkan dalam penangas air pada suhu 37°C selama 2-3 menit. Sel dimasukkan ke dalam tabung *conical* steril yang sudah berisi media kultur DMEM 10 ml dan diinkubasi selama 3-4 jam pada suhu 36°C. Selanjutnya dilakukan pemisahan sel kanker dengan media menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit.

Supernatan yang diperoleh dibuang dan sel *HeLa* ditumbuhkan dalam 3-4 buah *tissue culture flask* dalam media DMEM yang mengandung 10% FBS. *Flask* diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 36°C dengan aliran CO₂ 5% dengan tutup *flask* dikendorkan untuk mengoptimisasi aerasi untuk pertumbuhan sel. Medium diganti setelah 3 hari dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen 80% dan jumlahnya cukup untuk penelitian (Junaedi, 2009).

G. Pemanenan Sel *HeLa*

Setelah sel mencapai konfluen 80% yang ditandai dengan sel memenuhi *tissue culture flask*, kemudian sel dilepaskan dari dinding *flask* dengan cara media disedot dengan pipet *pasteur* steril. Sel dicuci sebanyak 2 kali dengan PBS 5 ml. Sel ditambahkan dengan larutan tripsin EDTA 0,25% untuk melepas sel dan diinkubasi selama 3-5 menit dalam inkubator CO₂ suhu 36°C. Selanjutnya sel ditambahkan 5 ml media yang sudah dicampur dengan *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, dan Pensterp (*Penisilin streptomisin*) dan diresuspensi dengan pipet hingga tidak bergerombol. Sel yang sudah diresuspesi kemudian dimasukkan ke dalam *conical tube* steril (Junaedi, 2009).

H. Perhitungan Sel

Sel dalam *conical tube* kemudian ditambahkan media sebanyak 3 ml. Selanjutnya sel disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan media ke dalam endapan natan yang terbentuk sebanyak 10 ml. 10 μ l sel dipipet ke dalam *well plate* dan ditambahkan 10 μ l tripan blue. 10 μ l campuran sel dan *tripan blue* kemudian dipipet pada *hemocytometer* untuk dilakukan perhitungan jumlah sel. Sel yang hidup tidak berwarna atau berwarna jernih, sedangkan sel yang tidak hidup berwarna biru. Perhitungan dengan *hemocytometer* dilakukan dengan memilih 4 kamar hitung di bawah mikroskop. Berikut adalah rangkaian perhitungan jumlah sel yang akan dikultur (CCRC, 2009).

$$\text{Rataan sel} = \frac{\text{jumlah sel semua kamar hitung}}{4}$$

$$\text{Jumlah sel hitung/ml} = \text{rataaan sel} \times \text{faktor pengenceran} \times 10^4$$

$$\text{Jumlah total sel yang diperlukan} = \text{jumlah sumuran} \times \text{jumlah sel per sumuran.}$$

Selanjutnya volume panen sel yang diperlukan dihitung untuk ditanam di 96 well microplate dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Volume transfer panen sel} = \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel hitung/ml}}$$

Hasil perhitungan volume panen sel ditransfer ke *conical tube* dan ditambahkan media.

I. Pembuatan Larutan Stok

Pembuatan larutan stok ekstrak etanol *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* dan taurin dilakukan sebelum melakukan uji sitotoksik dan antiproliferasi. Larutan stok dibuat dengan melarutkan ekstrak sebanyak 10 mg dengan 1 ml *dimethyl sulfoxide* (DMSO) 5%, sedangkan untuk taurin sebanyak 100 mg dilarutkan dengan akuades sebanyak 1 ml. Selanjutnya dimasukkan ke penangas suhu 30°C hingga ekstrak larut. Larutan stok dimasukkan ke dalam microtube steril yang tertutup dan disimpan dalam lemari es. Saat akan digunakan, larutan stok kemudian diencerkan kembali hingga menjadi konsentrasi 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm pada ekstrak etanol *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* dan taurin. Sedangkan untuk Doxorubicin menggunakan konsentrasi 20 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2,5 ppm, 1,25

ppm, dan 0,625 ppm. Larutan ekstrak, taurin dan Doxorubicin dalam berbagai konsentrasi yang telah siap kemudian diujikan pada sel *HeLa* dan dilakukan di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* secara aseptis (CCRC, 2009).

J. Uji Sitotoksik dengan Metode *Cell Counting Kit-8* (CCK-8)

Volume akhir panen sel ditambah dengan media hingga diperoleh volume akhir suspensi sel untuk uji sitotoksik, masing-masing sumuran diisi dengan 100 μ l suspensi sel, kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam dengan suhu 36°C di dalam inkubator CO₂ 5% (CCRC, 2009). Sel yang sudah dikultur di dalam *well plate* selama 24 jam dikeluarkan dari inkubator kemudian diamati di bawah mikroskop. Kemudian media kultur dibuang dan sel dibilas dengan *phosphate buffer saline* (PBS). Tiap sumuran kemudian diberi masing-masing ekstrak dan taurin sebanyak 50 μ l dengan konsentrasi 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm dan untuk Doxorubicin menggunakan konsentrasi 20 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2,5 ppm, 1,25 ppm, dan 0,625 ppm. Pada kontrol sel tidak diberi perlakuan, dan DMSO dimasukkan ke dalam *well plate* sebagai kontrol pelarut yang kemudian diinkubasi lagi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 36°C. Setelah 24 jam kemudian masing-masing *well plate* perlakuan ekstrak dan taurin dibuang mediumnya dan tiap sumuran dibilas menggunakan *phosphate buffer saline* (PBS) dan kemudian diberi reagen CCK-8 sebanyak 50 μ l dan diinkubasi kembali selama 2 jam dalam inkubator CO₂ suhu 36°C. Setelah 2 jam inkubasi selanjutnya dihitung absorbansi sampel menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm, yang mengacu pada *Cancer Chemoprevention Research Center* (Ace Biolabs, 2018; CCRC, 2013; Dona dkk, 2019).

K. Uji Antiproliferasi dengan Metode *Cell Counting Kit-8* (CCK-8)

Untuk uji antiproliferasi masing-masing sumuran diisi dengan 100 μ l suspensi sel, kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C di dalam inkubator CO₂ (CCRC, 2009). Sel yang sudah dikultur di dalam *well plate* selama 24 jam dikeluarkan dari inkubator kemudian diamati di bawah mikroskop. Kemudian media kultur dibuang dan sel dibilas dengan *phosphate buffer saline* (PBS). Tiap sumuran kemudian diberi masing-masing ekstrak dan taurin sebanyak 50 μ l dengan konsentrasi 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm dan

2000 ppm dan untuk Doxorubicin menggunakan konsentrasi 20 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2,5 ppm, 1,25 ppm, dan 0,625 ppm. Pada kontrol sel tidak diberi perlakuan, dan DMSO dimasukkan ke dalam well plate sebagai kontrol pelarut. Kemudian dilakukan inkubasi dengan perlakuan waktu yang berbeda yaitu, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 36°C. Setelah waktu perlakuan tercapai larutan uji kemudian dibuang, dan sumuran dibilas dengan larutan *phosphate buffer saline* (PBS) dan diberi reagen CCK-8 sebanyak 50 µl dan diinkubasi kembali selama 2 jam dalam inkubator CO₂ suhu 36°C. Setelah 2 jam inkubasi selanjutnya dihitung absorbansi sampel menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 450 nm, dan dilakukan analisis statistik untuk mengetahui perbedaan jumlah sel hidup pada waktu inkubasi yang berbeda, yang mengacu pada *Cancer Chemoprevention Research Center* (Ace Biolabs, 2018; CCRC, 2013; Dona dkk, 2019).

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

Pemeriksaan ekspresi *p21* dilakukan dengan metode RT-PCR (*Real Time-Polymerase Chain Reaction*) pada kultur sel *HeLa* yang diberi perlakuan ekstrak etanol *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta taurin. Ada tiga tahapan untuk pemeriksaan ekspresi *p21* yaitu desain primer RNA, isolasi total RNA (*Ribonukleat acid*) dan pengukuran ekspresi gen *p21* menggunakan RT-PCR.

1. Desain Primer RNA

Desain primer *p21* dilakukan dengan menggunakan literatur dari jurnal terdahulu kemudian dilakukan pengecekan spesifisitas primer dan probe menggunakan BLAST melalui database NCBI. Pada halaman “BLAST” dipilih menu “nucleotide blast” dan selanjutnya urutan basa primer yang akan diuji dimasukkan pada kolom “Enter Query Sequence” dan klik tombol “BLAST”. Data hasil pengujian berupa daftar spesies yang memiliki kemiripan 99-100% dengan urutan basa primer yang diuji (NCBI). Pada penelitian ini urutan basa primer ekspresi gen *p21* berdasarkan penelitian dari Lin dkk (2019):

Gen *p21 codon 31* menggunakan

primer forward 5'-CTGAGCCGCGACTGTGATGCG-3' dan

primer reserve 5'-GGTCTGCCGCCGTTTTTCGACC-3'

2. Isolasi RNA

Sebelum dilakukan isolasi RNA, dilakukan pelarutan ekstrak *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* dan preparasi sampel terlebih dahulu. Ekstrak etanol *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* 10 mg dilarutkan dengan DMSO 1 ml dan dibuat pengenceran dengan konsentrasi 250 ppm dan 500 ppm, sedangkan untuk Doxorubicin dengan konsentrasi 0,5 ppm dan 1 ppm. Selanjutnya, medium DMEM dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* 50 ml dan diberi ekstrak dari pengenceran sesuai perhitungan. Preparasi sampel dilakukan dengan mengkultur sel *HeLa* pada 6 *disk* sel kultur hingga sel konfluen. Kemudian diberikan treatment dengan medium sebelumnya dibuang terlebih dahulu dan ditambahkan dengan medium yang sudah diberi ekstrak ke dalam 6 *disk* sel kultur tersebut dan diinkubasi selama 24 jam. Tahapan isolasi RNA sebagai berikut:

a. Lysis (*Sample Homogenization*)

Proses lisis dilakukan langsung pada *disk* sel kultur dengan membuang media pada *disk* dan ditambahkan 500 µl ribozol per 1 *disk* (1 *disk* 6 cm² dan ada 6 *disk*). Selanjutnya dihomogenkan atau diresuspensi dengan tips untuk melisis sel beberapa kali. Setelah homogen, sel dipindahkan ke dalam *tube free RNase*.

b. Fase Pemisahan (*Speparation Phase*)

Inkubasi sampel yang telah dihomogenkan pada suhu ruang selama 5-10 menit agar dapat memastikan disosiasi kompleks nucleoprotein terjadi. Tambahkan 100 µl chloroform per 500 µl ribozol dan homogenkan *tube* dengan mengocok atau *shake tube* selama 15 detik dan diinkubasi kembali pada suhu ruang selama 2-3 menit. Kemudian *tube* disentrifuge pada kecepatan 12.000 rpm suhu 4°C. Setelah disentrifuge maka akan terbentuk 3 jenis fase, yaitu warna merah di bawah (fase fenol-chloroform), warna putih di tengah (*interphase*), dan warna bening/*colorless* di atas (*aqueous phase*). RNA akan berada di bagian *aqueous phase*, oleh karena itu hanya bagian bening yang akan digunakan.

Pindahkan 80% *aqueous phase* ke dalam tube baru. Pada tube yang berisi sisa larutan aqueous sebelumnya kemudian ditambahkan NFW (Nuclease Free Water) 100 µl untuk me re-extract 20% aqueous yang tidak terambil di awal. Selanjutnya divorteks kembali dan disentrifuge dengan suhu, waktu dan kecepatan yang sama seperti sebelumnya untuk memisahkan lapisan tiap fasenya. Ambil kembali lapisan aqueous dan digabungkan dengan larutan sebelumnya.

c. Presipitasi RNA (*Precipitation of RNA*)

Larutan fase aqueous sebelumnya dipindahkan ke tube RNase Free baru yang kemudian ditambahkan dengan 0,25 ml isopropanol per 500 µl ribozol yang ditambahkan di awal. Inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit dan disentrifuge kembali dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Hasil yang akan didapat berupa pelet berwarna putih yang agak transparan di dasar tube. Pelet tersebut berisi RNA.

d. Pencucian (*Washing*)

Buang supernatant yang ada di dalam tube dan jangan sampai pelet terambil. Pelet dicuci dengan etanol 70% yang sudah diencerkan dengan RNase Free Water. Jumlah etanol 70% yang ditambahkan untuk 1 kali pencucian sebanyak 500 µl per jumlah ribozol yang ditambahkan sebelumnya. Proses washing dapat dilakukan 1-2 kali. Selanjutnya divortex dan disentrifuge dengan kecepatan 7.500 rpm suhu 4°C selama 5 menit.

e. Pelarutan Pelet RNA (*Re-dissolve the RNA Pellet*)

Setelah proses washing, selanjutnya supernatant dibuang tanpa mengenai pelet. Keringkan pelet selama 5-10 menit, namun jangan sampai pelet kering sepenuhnya karena dapat menurunkan kelarutan RNA. Larutkan RNA dalam RNase Free Water dengan 25 µl NFW untuk 5×10^6 sel atau untuk dish 10 cm² kemudian divortex. Setelah homogen lalu dimasukkan dalam waterbath selama 10 menit pada suhu 55-65°C agar larut sepenuhnya. Setelah larut sampel dapat disimpan dalam freezer -20°C sebelum dilakukan proses RT-PCR.

f. Purity RNA

Konsentrasi dan tingkat kemurnian RNA diukur dengan spektrofotometer *Nano Drop* 2000. Purity RNA dihitung dengan absorbansi A260/A280. Sebelum dilakukan uji RT-PCR RNA sampel diambil hingga mencapai suhu ruang.

3. Pengukuran Ekspresi Gen *p21* dengan RT-PCR (*Real Time-Polymerase Chain Reaction*)

Setelah mendapatkan sampel isolat RNA selanjutnya dilakukan pengukuran ekspresi gen *p21* dengan metode RT-PCR. Namun sebelumnya dilakukan pembuatan master mix terlebih dahulu dan amplifikasi menggunakan primer β -actin sebagai housekeeping untuk normalisasi dan gen *p21* sebagai gen target. Master mix dengan volume total reaksi mix 20 μ l disiapkan, dengan komposisi seperti pada Tabel berikut :

Tabel 2. Perbandingan Konsentrasi Master Mix RT-PCR (modifikasi Promega®, 2018)

Master Mix	Volume
GoTaq®qPCR Master Mix	10 μ l
GoScript™ RT Mix	0,4 μ l
10 μ l forward primer	1 μ l
10 μ l Reverse Primer	1 μ l
MgCl ₂	1 μ l
<i>Nuclease-Free Water</i>	4,6 μ l
Sampel RNA Template	2 μ l
Total volume reaksi	20 μ l

Sebanyak 18 μ l master mix qPCR dari masing-masing primer dimasukkan ke dalam multiwell plate beserta sampel RNA template sebanyak 2 μ l. Multiwell plate kemudian ditutup dengan *sealing foil*. Selanjutnya dilakukan pengaturan program *Light Cycler*® 480 Real-Time PCR yang akan digunakan untuk proses amplifikasi. Setelah campuran reaksi total PCR dan program amplifikasi siap, campuran reaksi total PCR kemudian diletakkan pada mesin RT-PCR. Instrumen RT-PCR akan mengamplifikasi melalui monitor dalam bentuk kurva.

Tabel 3. Pengaturan Program Amplifikasi RT-PCR (modifikasi Promega®, 2018; Rahardianti dan Nur, 2017)

Reaksi	Suhu (°C)	Waktu	Jumlah Siklus
Pre-incubation			
Predenaturation	95	10 menit	1
Amplifikasi			
Denaturation	95	10 detik	40
Annealing	60	30 detik	
Extension	72	30 detik	
Melting Curve			
Denaturation	95	25 detik	1
Annealing	60	1 menit	
Denaturation	95	50 detik	
Annealing	60	25 detik	

Sebagai kontrol internal (*housekeeping gene*) adalah β -actin dan KIT yang digunakan yaitu Promega dengan gen p21 sebagai gen target.

M. Analisis Data

Data hasil pengamatan dari berbagai uji, disusun dalam Tabel dan dianalisis distribusi normalitasnya dengan software SPSS version 16.0. Data yang berdistribusi normal, dilakukan uji ANOVA pada taraf 5% untuk membandingkan lebih dari 2 perlakuan. Jika data berbeda nyata ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan uji Post Hoc. Jika data tidak berdistribusi normal, maka data dianalisis dengan non parametric test yakni uji Kruskal Wallis. Untuk uji lanjutnya atau melihat perbedaan rata-rata antara 2 perlakuan dilakukan uji Wilcoxon.

Pada uji sitotoksik, presentase viabilitas sel *HeLa* diperoleh dengan rumus sebagai berikut, yang mengacu pada *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC, 2013).

$$\text{Persentase Viabilitas Sel} = \frac{(\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi control media})}{(\text{absorbansi control sel} - \text{absorbansi control media})} \times 100$$

Nilai persentase viabilitas sel kemudian diubah dalam bentuk nilai probit untuk menentukan nilai IC_{50} menggunakan program *Microsoft Excel*.

Pada uji antiproliferasi pengolahan data dilakukan untuk mengetahui perbedaan jumlah sel hidup pada perlakuan ekstrak dan taurin dengan berbagai konsentrasi terhadap waktu inkubasi yang berbeda untuk menentukan nilai *doubling time* dari setiap perlakuan menggunakan rumus 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

Analisis uji ekspresi gen *p21* didapat dengan menggunakan perbandingan level ekspresi gen = $2^{\Delta\Delta CT}$

Nilai CT dipindahkan dari software RT-PCR ke Microsoft Excel untuk menghitung tingkat ekspresi relatif.

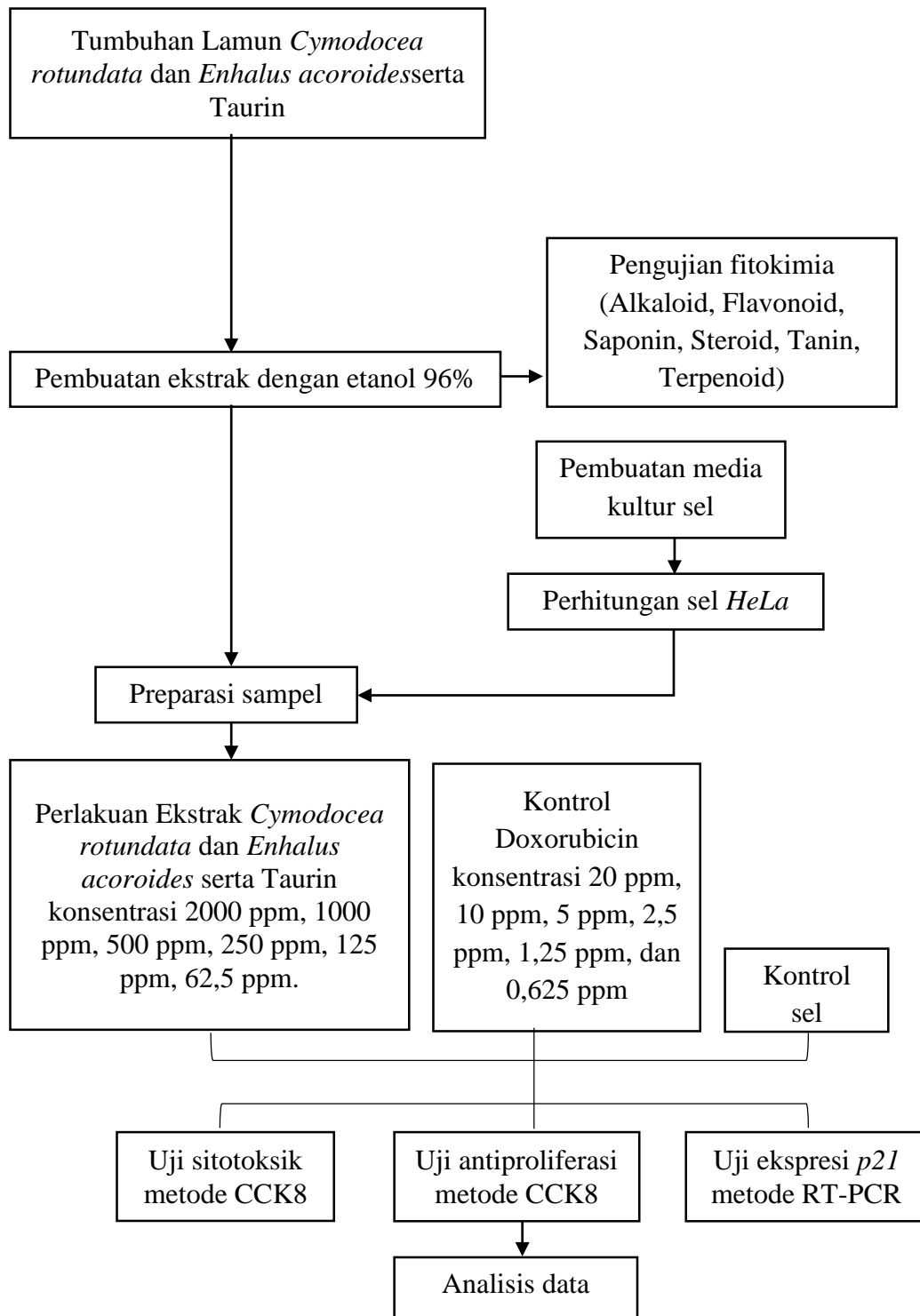
ΔCT eksperimen = CT target pada eksperimen - CT housekeeping pada eksperimental

ΔCT kontrol = CT target pada kontrol - CT housekeeping kontrol

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

Pengukuran konsentrasi gen *p21* pada penelitian ini menggunakan program *Light Cycler®software* yang mengacu pada kuantifikasi rumus *Livak* yang sudah diautomatisasi sehingga didapat nilai konsentrasi ekspresi gen *p21* dalam ukuran picogram (Schmittgen & Livak, 2008).

N. Diagram Alur Penelitian



Gambar 7. Diagram Alur Penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Adapun kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Aktivitas ekstrak etanol lamun *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* bersifat sitotoksik terhadap sel kanker serviks *HeLa*, dibuktikan dengan persentase viabilitas sel dengan nilai IC_{50} 856,65 ppm untuk *C. rotundata*, dan 645,96 ppm untuk *E. Acoroides*, sedangkan pada taurin tidak menunjukkan aktivitas sitotoksik.
2. Aktivitas ekstrak etanol *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* serta taurin bersifat antiproliferasi terhadap sel *HeLa*. Hal ini dapat dilihat pada nilai *doubling time* yang merupakan parameter kemampuan proliferasi sel.
3. Ekspresi gen *p21* mengalami peningkatan pada ekstrak etanol *C. rotundata* konsentrasi 500 ppm yang lebih tinggi dibandingkan kontrol obat Doxorubicin 0,1 ppm.

B. Saran

Adapun saran yang dapat dilakukan untuk penelitian selanjutnya sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan uji lanjutan menggunakan kultur sel normal (sel vero) pada pengujian sitotoksik dan antiproliferasi untuk mengetahui tingkat keamanan senyawa uji terhadap sel normal.
2. Untuk ekstraksi perlu dilakukan menggunakan pelarut non polar agar metabolit sekunder yang terdapat dalam *Cymodocea rotundata* dan *Enhalus acoroides* dapat diidentifikasi untuk senyawa non polarnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ace Biolabs. *CCK-8 Cell Counting Kit*. Ace Biolabs CO., LTD. Taiwan.
- Ahmed, N., Vasantha, K. S., John, A. K., Shobana, C., & Usharani, B. 2022. Anticancer activity of hydroalcoholic extract of *Enhalus acoroides*. *International Journal of Health Sciences*, 6(S1), 9528–9537.
- Arifudin, M. 2013. *Sitotoksisitas Bahan Aktif Lamun dari Kepulauan Spermonde Kota Makasar Terhadap Artemia salina*. Universitas Hassanuddin. Makasar.
- Azkab, M. H. 2006. Ada Apa Dengan Lamun. *Oseana*. Volume 31, Nomor 3: 45-55.
- Bakri, N., Kurniasari, N., Fauziah, D. 2019. Analisis Ekspresi *p21* dan *CDK6* pada Karsinoma Payudara Invasif Tipe Luminal A, Luminal B dan *HER2/neu*. *Majalah Patologi*, vol 28 no 1. 39-44.
- Birdsall, T. C. 1998. Therapeutic Applications of Taurine. *Alternative Medicine Review*, 3(2):128-136.
- Bruton, L., Lazo JS, Parker KL. 2005. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Edisi ke 11. McGrawHill.
- Cahyana, N., Subarnas, A., Hadisaputri, Y E. 2017. Aktivitas Antiproliferasi Senyawa Kalkon Dari Daun Jambu Air (*Eugenia aquea* Burm f.) Terhadap Sel Kanker Prostat DU145. *Jurnal Farmaka*. Vol 15 No 3: 27-31.
- CCRC. 2009. *Prosedur Tetap Pengamatan Ekspresi Protein dengan Metode Immunositokimia*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- CCRC. 2009. *Prosedur Uji Proliferasi Sel (Doubling time)*. Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- CCRC. 2013. *Prosedur Uji Sitotoksik dengan Metode MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazoliumbromida*. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.

- Cronquist, A. 1981. *An Intefrated System of Clasification of Flowering Plants*. Columbia University Press. New York.
- Fatima SS, Desu J. 2014. Proteome Analysis And Antigenic Peptide Prediction of Beta Corona Virus, a Cause of MERS. *Helix*. Nomor 5:590–683.
- Fatmawati, D., Suparmi, Y I., 3, Israhnanto. 2018. Selektivitas Antikanker Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*) Pada Lini Sel Kanker Payudara Anticancer Selectivity Of Sirsak (*Annona muricata*) Leaf Extract On Breast Cancer Cell Lines. *Bio-site*. Vol. 04 No. 2: 78 – 83.
- Freshney, R.I. 1986. *Animal Cell culture, A Practical Approach, 1 ed*, IRL Press, Washington DC.
- Dahuri R. 2003. *Keanekaragaman Hayati Laut Aset Pembangunan Berkelanjutan Indonesia*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Dewi C S.U., Soedharma D, Kawaroe M. 2012. Komponen Fitokimia Dan Toksisitas Senyawa Bioaktif Dari Lamun *Enhalus acoroides* Dan *Thalassia hemprichii* Dari Pulau Pramuka, Dki Jakarta. *Jurnal Teknologi Perikanan dan Kelautan*. Vol. 3. No. 2: 23-27.
- Diana, L., Sanif R. 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 Universitas Sriwijaya*. Volume 8, No.2: 127-137.
- 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 dan Klinis*. Vol 6 No 3: 243-249.
- Dwitiyanti. 2015. Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) sebagai Antikanker Payudara. *Pharm Sci Res*. Vol. 2 No. 2: 79-88. ISSN 2407-2354
- Endharti, A.T., Sulastri, E., Umanailo. R., Yuniacle., Nurseta, T., Handono. K. 2018. Mango mistletoe *Dendrophthoe pentandra* leaf extract acts synergistically with 5-Fluorouracil to induce apoptosis and increase *p21* expression in human cervical adenocarcinoma *HeLa* cells by reducing survivin expression. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Vol. 8 No 7: 10-15.

- Globocan. 2020. *Indonesia – Global Cancer Observatory*. <https://gco.iarc.fr/>
- Gultom, D.A. 2021. Patogenitas Human Papillomavirus (Hpv) Dalam Onkogenesis Kanker Serviks dan Pengembangan Vaksin Pencegahannya. *Jurnal Pro-Life* Volume 8 Nomor 2: 134-147.
- Gustavina, N L G W B., Dharma, I G B S. Faiqoh, E. 2018. Identifikasi Kandungan Senyawa Fitokimia Pada Daun dan Akar Lamun di Pantai Samuh Bali. *Journal of Marine and Aquatic Sciences*. 4(2), 271-277
- Guz, G., E. Oz, N & Lortlar. 2007. The effect of taurine on renal ischemia-reperfusion injury. *Amino Acids*. Vol 32 No 3: 405–411.
- 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.
- Hagar, H.H. 2004. The Protective effects of Taurine against cyclosporine induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Toxicology Letter*. Vol 151 no 2:335-342.
- Hanahan, D., dan Weinberg, R.A. 2011. Hallmark of Cancer: The Next Generation. *Cell* 100: 57-70.
- Hardoko., Primaoktasa, D., Yuli, E. 2016. Anticancer potential of Seagrass leaves *Cymodecea serrulata* CRUDE extract on *HeLa* cell. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. Vol 8 No 1: 571-576.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. *Cell*. 1993 (75):805-16.
- Haryanti, S. (2010). Jumlah dan distribusi stomata pada daun beberapa spesies tanaman dikotil dan monokotil. *Buletin Anatomi dan Fisiologi dan SELULA*, 18(2), 21-28.
- Hernawan, UE, Rahmawati, S., Ambo-rappe, R., Sjafrie, NDM, Hadiyanto, H., Yusup, DS, Nugraha, AH, La, YA, Adi, W., Prayudha, B., Irawan, A., Rahayu, YP, Ningsih, E., Riniatsih, I., Supriyadi, IH, & McMahan, K. 2021. Ilmu Lingkungan Total Kajian skala nasional pertama mengidentifikasi habitat lamun karbon biru yang berharga di Indonesia berada dalam kondisi sedang. 782.

- Huspa, D H P. 2009. *Senyawa Antikanker dan Insektisida dari Genus Aglaia*. Unpad Press. Bandung.
- Ismaryani, A., Salni., Setiawan, A., Triwani. 2018. Aktivitas Sitotoksik, Antiproliferasi dan Penginduksi Apoptosis Daun Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) terhadap Sel Kanker Serviks HeLa. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Vol 16 No 2: 206-213.
- Jaspers L, Budiningsih S, Wolterbeek R, Henderson F, Peters A. 2011. Parental acceptance of human papillomavirus (HPV) vaccination in Indonesia: A cross-sectional study. *Vaccine*. No 29:7785-7793.
- Jassim, M M A., Rasool, K H., Mahmood, M M. 2021. p53, p21, and cyclin d1 protein expression patterns in patients with breast cancer. *Veterinary World*, vol 14. 2833- 2838 EISSN: 2231-0916
- Junedi S. 2009. Prosedur Tetap Panen Sel, *Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi UGM*. 1-3.
- Junedi, S. 2009. Prosedur Tetap Perhitungan Sel, *Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi UGM Yogyakarta*. 1-4.
- Kabel, AM., Fahad, H B. 2015. *Breast Cancer : Insights into Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Management*. Vol 3 no 2: 28–33.
- Kartikasari, FG. 2010. *Uji Toksisitas Fraksi dari Spongs Laut Xestospongia sp. dengan Metode Brine Shrimp Test (BST)*. Skripsi. ITS. Surabaya.
- Kelvin, J F. dkk., 2011. *100 Tanya-Jawab mengenai Gejala Kanker dan Efek Samping Pengobatan Kanker Edisi Kedua*. PT. Indeks. Jakarta Barat.
- Kemenkes RI. 2017. *Profil Kesehatan Indonesia*. Kemenkes RI. Jakarta.
- Lebang, R T A., Latuconsina, V Z., Rahawarin, H., Hutagalung, I., SilalahiParningotan Y., Maruanaya S. 2021. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Alga Cokelat (*Sargassum Sp.*) terhadap Hitung Jenis Leukosit Mencit (*Mus Musculus*) Pasca Diinduksi Stres Akut. *Pattimura medical review*. Volume 3, Nomor 2, Oktober 2021. 8-24.
- Li, H., Wen, J.R., Li, Q.L., Hui, F.W., Xiao, H.Y., Wei, F.Z., Xia, L.Z., Fu, S.W., Le, H.Y. 2019. Impact of Taurine on The Proliferation and Apoptosis of

Human Cervical Carcinoma Cells and its Mechanism. *Chinese Medical Journal*. Volume 132 Nomor 8: 948-956.

Lin, C.K., Liu, S.T., Chang, C.C., Huang, S.M. 2019. *Regulatory mechanisms of fluvastatin and lovastatin for the p21 induction in human cervical cancer HeLa cells*. Plos One. Taiwan.

Lisdawati, V. 2002. Senyawa Lignan dari Fraksi Etil Acetat Daging Buah Mahkota Dewa *Phaleria macrocarpa* (Scheff.). Boerl. *Thesis*. Universitas Indonesia. Jakarta.

Marfianti E. 2021. Peningkatan Pengetahuan Kanker Payudara dan Keterampilan Periksa Payudara Sendiri (SADARI) untuk Deteksi Dini Kanker Payudara di Semutan Jatimulyo Dlingo. *JAMALI - Jurnal Abdimas Madani dan Lestari*. Vol. 03, no 01: 25 – 31.

Melinda, S., Annisaa', E., Sasikirana, W. 2021. Potensi Sitotoksik Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa*) Terpurifikasi pada Sel Kanker Serviks HeLa. *Journal of Research in Pharmacy*. Vol 2 edisi 1. 47-55

Meiyanto, E.S., Susidarti, S.A., Handayani, S., Rahmi, F. 2008. Ekstrak Etanolik Buah Biji Pinang (*Areca catechu* L.) Mampu Menghambat Proliferasi dan Memacu Apoptosis Sel MCF-7. *Majalah Farmasi Indonesia*. Vol 9 No 1: 12-19.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. *Antracyclins: Molecular Advances and pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity*. *Pharmacol Rev*; 2004.185-228

Mossi, A. J., Mazutti, M., Paroul, N., Corazza, M. L., Dariva, C., Cansian, R. L., & Oliveira, J. V. (2009). Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. *Brazilian Journal of Biology*, 69(2), 339-345.

Molyneux, P. 2004. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. <https://doi.org/10.1287/isre.6.2.144>

Murray, R.W. 1996. *Biokimia Kedokteran Harper, Edisi 24*, Penerbit Buku Kedokteran EG. Jakarta.

- Nafis, F D R., Sofian, F F. 2018. Review Jurnal: Aktivitas Anti Kanker Payudara Beberapa Tanaman Herbal. *Farmaka Suplemen*. Volume 16 Nomor 2. 84-95.
- National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 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*). *Jurnal Farmasi Sains Dan Praktis*. Vol 6 No 2: 157-165.
- Nur, S., Baitanu, J. A., & Gani, S. A. 2019. Pengaruh Tempat Tumbuh dan Lama Penyulingan secara Hidrodestilasi terhadap Rendemen dan Profil Kandungan Kimia Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum canum* Sims L.). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. <https://doi.org/10.33096/jffi.v6i2.507>
- Nuraini, L H. 2011. Uji Sitotoksitas Dan Antiproliferatif Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa* Lour) Terhadap Sel Mieloma. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. Vol 1 No 2: 11-21.
- Nurafni, N R M. 2018. Identifikasi Senyawa Bioaktif Jenis-Jenis Lamun Di Perairan Pulau Morotai. *Seminar Nasional Pendidikan Biologi Kepulauan Aula Banau, Ternate*. 26-32.
- Nurfitri, W. A. 2019. *Pemberian Ekstrak Metanol Daun dan Buah Jeruju (Acanthus ilicifolius L.) serta Taurin Terhadap Penurunan Kadar Glukosa dan Kolesterol Total Darah Serta Kualitas dan Kuantitas Spermatozoa Mencit (Mus musculus L.) yang diinduksi Aloksan*. Tesis. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Nursid M., Noviendri D., Rahayu L., Novelita V. 2016. Isolasi Fukosantin Dari Rumput Laut Coklat *Padina australis* dan Sitotoksitasnya Terhadap Sel Mcf7 Dan Sel Vero. *JPB Kelautan dan Perikanan* Vol. 11 No. 1: 83-90
- Paputungan, W A., Rotinsulu, H. YamLean, P V.Y. 2017. Standardisasi Parameter Spesifik Dan Uji Aktivitas Antikanker Terhadap Sel Kanker Kolon (*WiDr*) Dari Ekstrak Etanol Lamun (*Enhalus acoroides*). *PHARMACON Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT* Vol. 6 No. 3:189-199.
- Parwata, I M O A. 2014. *Kanker dan Antikanker*. Bahan Ajar Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana. Bali.

- Permana, A H C., Husni, A., Budhiyanti, S A. 2016. *Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Lamun Cymodocea sp. Jurnal Teknologi Pertanian*. Vol. 17 No. 1: 37-46.
- Permana, R., Andhikawati, A., Akbarsyah, N., Putra, P K D. N. Y. 2020. Identifikasi Senyawa Bioaktif dan Potensi Aktivitas Antioksidan Lamun *Enhalus acoroides* (Linn. F). *Jurnal Akuatek*. Vol. 1, No. 1: 66-72.
- Pradana, N.E., Wardiwira, F.F., Hakim, L., Imamah, A.N., Istianisa, W. 2018. Efektivitas Ekstrak Lamun *Cymodocea rotundata*, *Thalassia hemprichii*, dan *Enhalus acoroides* Dari Perairan Jepara Sebagai Antibakteri Pada Fillet Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Selama Penyimpanan Dingin. *Saintek Perikanan* Vol.12 No.2: 143-147.
- Pranata, A., I. N. Suwastika., P. Paserang. 2018. Jenis - jenis lamun (seagrass) di kecamatan tinangkung , banggai kepulauan , sulawesi tengah. *Natural Science: Journal of Science and Technology*, 7(3): 349–357.
- Prayitno, A dkk., 2005. *Ekspresi Protein p53, Rb, dan c-myc pada Kanker Serviks Uteri dengan Pengecatan Immunohistokimia*. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Pusdatin Kemenkes RI. 2015. *Situasi penyakit Kanker*. Kemenkes RI. Jakarta.
- Purnamasari, M. 2019. Efek Ekstrak Metanol Daun Kersen (*Muntingia calabura* L .) Terhadap Induksi Apoptosis Sel Kanker WiDr. *J.Univ Muhammadiyah Surakarta*.
- Puspasari, A.R., Dewi, E.N., Rianingsih, L. 2017. Aplikasi Antioksidan dari Ekstrak Lamun (*Cymodocea rotundata*) pada Minyak Ikan Tongkol (*Euthynnus affinis*). *AGRITECH*, Vol. 37, No. 2: 115-120.
- Putri N R., Lyrawati D., Indra M. R. 2014. Efek Ekstrak Alga Coklat (*Sargassum* sp.) sebagai Supresor Protein Bcl-2 *in vitro* pada Sel HeLa. *Majalah Kesehatan FKUB*. Volume 1, No 4: 200-209.
- Ragupathi Raja Kannan R, Arumugam R, Iyapparaj P, Thangaradjou T, Anantharaman P. 2013. In vitro antibacterial, cytotoxicity and haemolytic activities and phytochemical analysis of seagrass from the Gulf of Mannar, South India. *Food Chem*, 136: 1484-1489.

- Rahardhian, M R R., Utami, D. 2018. Uji Sitotoksik Dan Antiproliferasi Ekstrak Eter Daun Binahong (*Androdera cordifolia* (Tenore) Steen.) Terhadap Sel *HeLa*. *Media Farmasi Indonesia*. vol 13, no 1: 1284-1292.
- Rahbari. 2009. *A novel L1 Retrotransposon Marker for HeLa Cell Line identification Biotechniques*. Volume 46, Nomor 4: 77-78.
- Rawung S., Ferdinand F. T., Ari B. R. 2018. Inventarisasi Lamun Di Perairan Marine Field Station Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Unsrat Kecamatan Likupang Timur Kabupaten Minahasa Utara. *Jurnal Ilmiah Platax* Vol. 6 no 2: 38-45.
- Redmon, H., Stapleton, P., David. 1983. Immunostription The Ple Of Taurine. *Nutrition*. Vol 14. 559-609.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. ITB. Bandung.
- Rohanova, D., Boccaccini, A.R., Horkavcova, D., Bozdechova, P., Bezdiccka, P., Castralova, M. 2014. Is Non-buffered DMEM Solution a Suitable Medium Fot In Vitro Bioactivity Test?. *Journal of Materials Chemistry B*. Vol 2: 5068-5076.
- Ruhana, A., Istiqomah, N N., Prijadi, B. 2016. Pengaruh Waktu dan Suhu Penyimpanan Terhadap Kadar Asam Amino Taurin pada ASI. *Indonesian Journal of Human Nutrition, Desember 2016, Vol. 3 No.2 : 60 – 68* 60
- Rumiyanti. 2006. Protein Kelompok BCL-2 Sebagai Target Senyawa Antikanker. *Jurnal Kedokteran Yarsi*. Vol 14 No 3: 238-242.
- Salim. 2006. *Penentuan Daya Inhibisi Ekstrak air dan Etanol Daging Buah Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl.) Terhadap Aktifitas Enzim Tirosin Kinase Secara In Vitro*. Skripsi. Bogor: Departemen Kimia, Fakultas MIPA, IPB.
- Sami, F.J., Nur. S., Sapra, A., Libertin. 2020. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Lamun (*Enhalus acoroides*) Asal Pulau Lae-Lae Makassar Terhadap Radikal ABTS. *Media Kesehatan Politeknik Kesehatan Makassar*. Volume 15 Nomor 2: 116- 120.
- Sari, D.P., D.H.C. Pangemanan dan Juliatri. 2016. Uji Daya Hambat Ekstrak Alga Coklat (*Padina australis* Hauck) terhadap Pertumbuhan Bakteri

- Porphyromonas Gingivalis Secara In Vitro. *Jurnal e-GiGi*. Vol 4 No 2: 140-144.
- Sastyarina Y., Khotib J., Sukardiman. 2010. Efek Ekstrak Sambiloto (*Andrographis Paniculata* Nees) Pada Ekspresi Telomerase Dari Kanker Payudara Tikus Yang Diinduksi Dengan DMBA *J. Trop. Pharm. Chem.* Vol 1. No. 1. 67-75
- Satyarsa, A B.S. 2019. Studi Pustaka: Potensi *Furoidan* dari Rumput Laut Coklat (*Sargassum* sp.) sebagai Inovasi Terapi pada Kanker Payudara. *Journal of Medicine and Health*. Vol 2 No 3. 909-919.
- Sebayang, A N O. 2019. EFEK KARDIOTOKSIK OBAT KEMOTERAPI DOXORUBICIN. *JIMKI Volume 7 No.1: 1-5*.
- Septiana A T dan Asnani A. 2013. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut *Sargassum duplicatum*. *Jurnal Teknologi Pertanian* Vol. 14 No. 2: 79-86.
- Setiawati T, Alifah M, Mutaqin AZ, Nurzaman M, Irawan B. 2010. Studi Morfologi Beberapa Jenis Lamun Di Pantai Timur Dan Pantai Barat, Cagar Alam Pangandaran. Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam , Universitas. Published online: 487-495.
- Shao, X Dkk. 2012. Taurine Protects Methamphetamine-Induced Developmental Angiogenesis Defect Through Antioxidant Mechanism. *Toxicology And Applied Pharmacology*. Vol 260: 260–270
- Shuo, Tu 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 Appoptosis of Human Hepatoceluller Carcinoma HEPG2 Cell. *Experimental and Therapeutic Medicine*. Vol 10 No 1: 193-200.
- Siswandono, dan Soekardjo, B. 1995. *Kimia Medisinal*. University Airlangga Press. Surabaya.
- Subagio dan Kasim M. S H. 2019. Identifikasi Rumput Laut (*Seaweed*) di Perairan Pantai Cemara, Jerowaru Lombok Timur Sebagai Bahan Informasi Keanekaragaman Hayati Bagi Masyarakat. *Jurnal Ilmu Sosial dan Pendidikan*. Vol. 3 No. 1. 308-321. ISSN 2598-9944

- Susanto, T H., Maryono, S., Purwanto, B. 2017. Pengaruh Ekstrak Propolis Terhadap Ekspresi Protein Bcl2, P21, Dan Induksi Apoptosis Pada Sel *HeLa*. *Biomedika*. Vol 9 No 2: 6-14.
- Tasmin, Nur. 2014. *Isolasi, Identifikasi Dan Uji Toksisitas Senyawa Flavonoid Fraksi Kloroform Dari Daun Terap (Artocarpus Odoratissimus Blanco)*. *Jurnal Kimia Mulawarman Volume 12 Nomor 1*.
- The Angiosperm Phylogeny Group. 2003. An Update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of The Linnean Society*, 141, 399-436.
- Tohme, Y., Sakaki, K., Shinozaki, M. Isthani. 2011. *Genetics From Genes to Genomes*. Edisi ke 4. New York: The mcGraw Hill. Halaman 154
- Trono Jr., G.C. dan GanzonF. 1988. *Phillippine Seaweds*. National Book Store, Lnc. Phillippine.
- Ulfa, A.M., Herdwiani1, W., Purwidyaningrum, I. 2021. Kajian Literatur Aktivitas Antikanker Tanaman Bunga Matahari (*Helianthus Annus L*) Terhadap Berbagai Kultur Sel Kanker. *Pharmacy Medical Journal*. Vol 4 No 2. 73-82.
- Wagey, B. T. 2011. Morphometric Analysis of Seagrasses Species in Negros Oriental.
- Wagey, B. T. dan Sake, W. (2013). Variasi Morfometrik Beberapa Jenis Lamun di Perairan Kelurahan Tongkeina Kecamatan Bunaken. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 3(1), 36-44.
- Widana G A B. 2014. Kajian Tentang Potensi Terkini Senyawa Kompleks Sebagai Antikanker. *Seminar Nasional FMIPA UNDIKSHA IV Tahun 2014*. 331-334.
- Widiastuti, E L., Rima, K., Busman, H. 2019. Anticancer Potency of Seagrass (*Enhalus acoroides*) Methanol Extract in The *HeLa* Cervical Cancer Cell Culture. *Proceedings of the International Conference on Sustainable Biomass*. Vol 202.
- Widiyastuti, Y., Sholikhah, I Y M., Haryanti, S. 2019. Efek Sitotoksik Formula Jamu Daun Sirsak, Buah Takokak, dan Umbi Bidara Upas terhadap Sel

Kanker Payudara MCF-7. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. Vol 9 No.2:140-149

Wikanta, T., Handayani, V F. 2011. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etil Asetat *Ulva fasciata* Delile dan *Turbinaria decurrens* Bory Terhadap Laju Pertumbuhan Tumor Kelenjar Susu Pada Mencit C3H. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Volume 6 Nomor 1: 57-66.

Winarsi, H. (2007). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius, Yogyakarta..

Wong, R.S.Y. 2011. Apoptosis In Cancer: From Pathogenesis To Treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. Vol 30 No 1:30-87.

Wulansari, I. D., Admadi, B., Mulyani, S. 2020. Pengaruh Suhu Penyimpanan Terhadap Kerusakan Antioksidan Ekstrak Daun Asam (*Tamarindusindica* L). *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*. Vol. 8, No. 4: 544-550.

Yousuf, M., Shamsi, A., Mohammad, T., Azum, N., Alfaifi, S Y. M., Asiri, AM., Elsbali, A M., Islam, A., Hassan, Md I and Haque, Q M R. 2022. *Inhibiting Cyclin-Dependent Kinase 6 by Taurine: Implications in Anticancer Therapeutics*. ACS OMEGA. Published by American Chemical Society.

Yuguchi, Y., Tran, V.T.T, Bui, L.M., Takebe, S., Suzuki, S., Nakajima, N., Kitamura, S., & Thanh, T.T.T. 2016. Primary Structure, Conformation in Aqueous Solution, and Intestinal Immunomodulating Activity of Fucoidan from Two Brown Seaweed Species *Sargassum crassifolium* and *Padina australis*. *Journal Carbohydrate Polymers*. Vol 147: 69–78.

Yuliani, H., Rasyid, M.I. 2019. EFEK PERBEDAAN PELARUT TERHADAP UJI TOKSISITAS EKSTRAK PINEUNG NYEN TEUSALE. *Jurnal.Farmasi Fitofarmaka Indonesia*. Vol 6 No 2: 347-352

Yusni, I. 2022. Pemberian Ekstrak Metanol Lamun (*Enhalus acoroides* Dan *Cymodocea rotundata*) Serta Taurin Sebagai Supressor *p53* Pada Sel Kanker Serviks *HeLa* Secara In-Vitro. *Tesis FMIPA Universitas Lampung*. Bandar Lampung.

Zhang, X., Bi, C., Fan, Y., Cui, C., Chen, D., Xiao, Y & Dou, QP. 2008. Induction of tumor cell apoptosis by taurine Schiff basecopper complex is associated the with inhibition of proteasomal activity. *Int J Mol Med*. Vol 22 no 5: 677–682.

Zheng W. dan Wang S. Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. FoodChem.* 49: 5165-5170

LAMPIRAN

1. Perhitungan Rendemen

Lamun *Cymodocea rotundata*

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang didapat (g)}}{\text{Berat simplisia awal (g)}} \times 100\%$$

$$\% \text{ rendemen} = \frac{4,586(g)}{100 (g)} \times 100\%$$

Lamun *Enhalus acoroides*

$$\% \text{ rendemen} = \frac{4,952 (g)}{100 (g)} \times 100\%$$

2. Pembuatan Larutan Stok

Larutan stok dibuat dari 100 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 ml DMSO

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{Massa zat (g)}}{\text{Volume pelarut (mL)}}$$

$$1 \text{ ppm} = \frac{100 \text{ mg}}{10 \text{ ml}}$$

$$1 \text{ ppm} = \frac{100.000 \mu\text{l}}{10 \text{ ml}} = 10.000 \mu\text{l/ml} \text{ atau } 10.000 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} 2000 \text{ ppm} &= V1.N1:V2.N2 \\ &= 10.000 \mu\text{l/ml} \cdot N1 : 10 \text{ ml} \cdot 2000 \mu\text{l} \\ &= 2 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 1000 \text{ ppm} &= V1.N1:V2.N2 \\ &= 2.000 \mu\text{l/ml} \cdot N1 : 10 \text{ ml} \cdot 1000 \mu\text{l} \\ &= 5 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 500 \text{ ppm} &= V1.N1:V2.N2 \\ &= 1.000 \mu\text{l/ml} \cdot N1 : 10 \text{ ml} \cdot 500 \mu\text{l} \\ &= 5 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 250 \text{ ppm} &= V1.N1:V2.N2 \\ &= 500 \mu\text{l/ml} \cdot N1 : 10 \text{ ml} \cdot 250 \mu\text{l} \\ &= 5 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$125 \text{ ppm} = V1.N1:V2.N2$$

$$= 250 \mu\text{l/ml} \cdot N1 : 10 \text{ ml} \cdot 125 \mu\text{l}$$

$$= 5 \text{ ml}$$

$$62,5 \text{ ppm} = V1.N1:V2.N2$$

$$= 125 \mu\text{l/ml} \cdot N1 : 10 \text{ ml} \cdot 62,5 \mu\text{l}$$

$$= 5 \text{ ml}$$

3. Perhitungan sel

$$\text{Rataan sel} = \frac{\text{jumlah sel semua kamar hitung}}{4}$$

$$\text{Rataan sel} = \frac{48+52+60+45}{4} = 51,25$$

$$\text{Jumlah sel hitung/ml} = \text{rataan sel} \times \text{faktor pengenceran} \times 10^4$$

$$\text{Jumlah sel hitung/ml} = 51,25 \times 2 \times 10^4$$

$$= 1.025.000 \times 4$$

$$= 4.100.000 \text{ sel/ml}$$

$$\text{Jumlah total sel yang diperlukan} = \text{jumlah sumuran} \times \text{jumlah sel per sumuran}$$

$$= 96 \times 0,1 \text{ ml}$$

$$= 9,6 \text{ ml}$$

Selanjutnya volume panen sel yang diperlukan dihitung untuk ditanam di 96 well microplate dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Volume transfer panen sel} = \frac{\text{jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{jumlah sel hitung/ml}}$$

$$\text{Volume transfer panen sel} = \frac{9,6 \text{ ml}}{4.100.000 \text{ ml}}$$

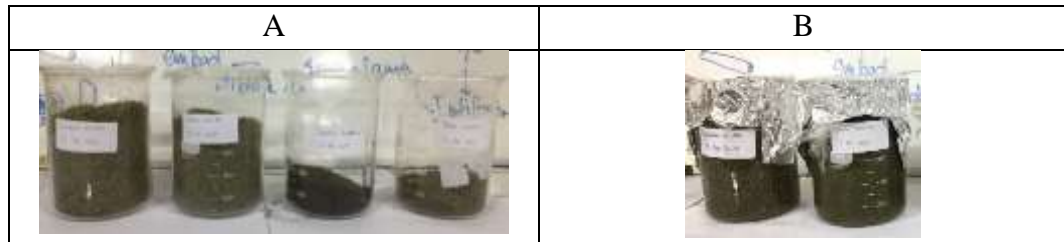
$$= 2,34 \text{ ml}$$

. Lampiran Gambar Penelitian

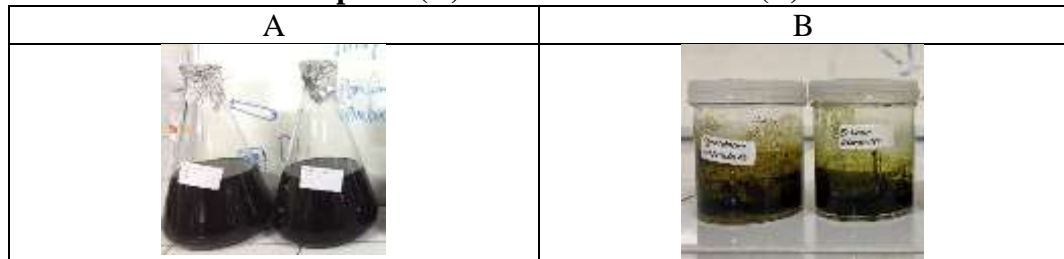
1. Pembuatan Ekstrak



Gambar 14. Sampel (A) lamun *Cymodocea rotundata* (B), lamun *Enhalus acoroides*

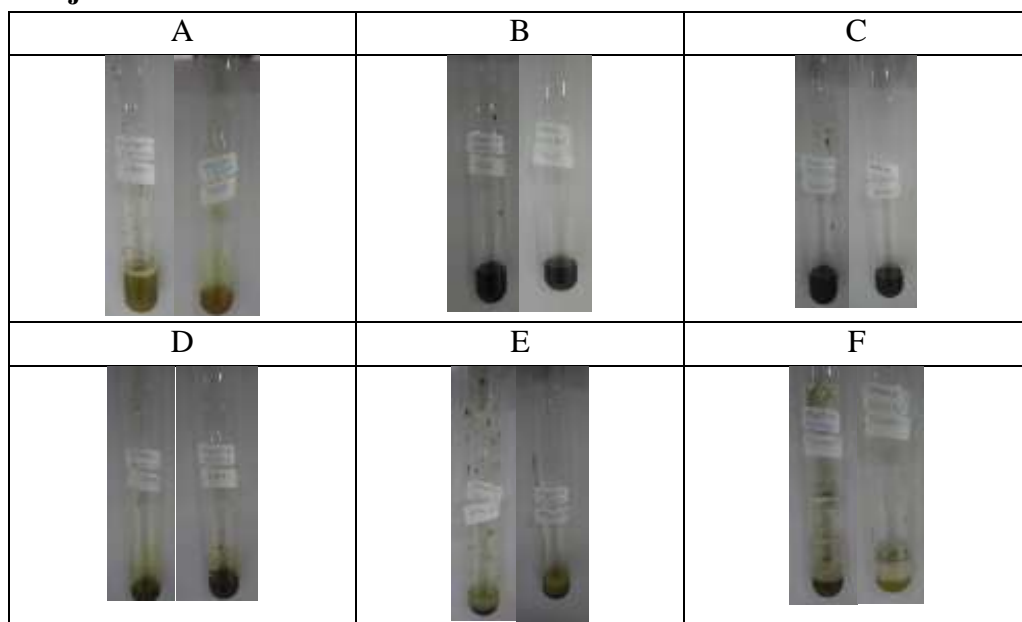


Gambar 15. Serbuk simplisia (A) dan Proses Maserasi (B)



Gambar 16. Ekstrak dalam bentuk cair (A) dan Ekstrak dalam bentuk pasta (B)

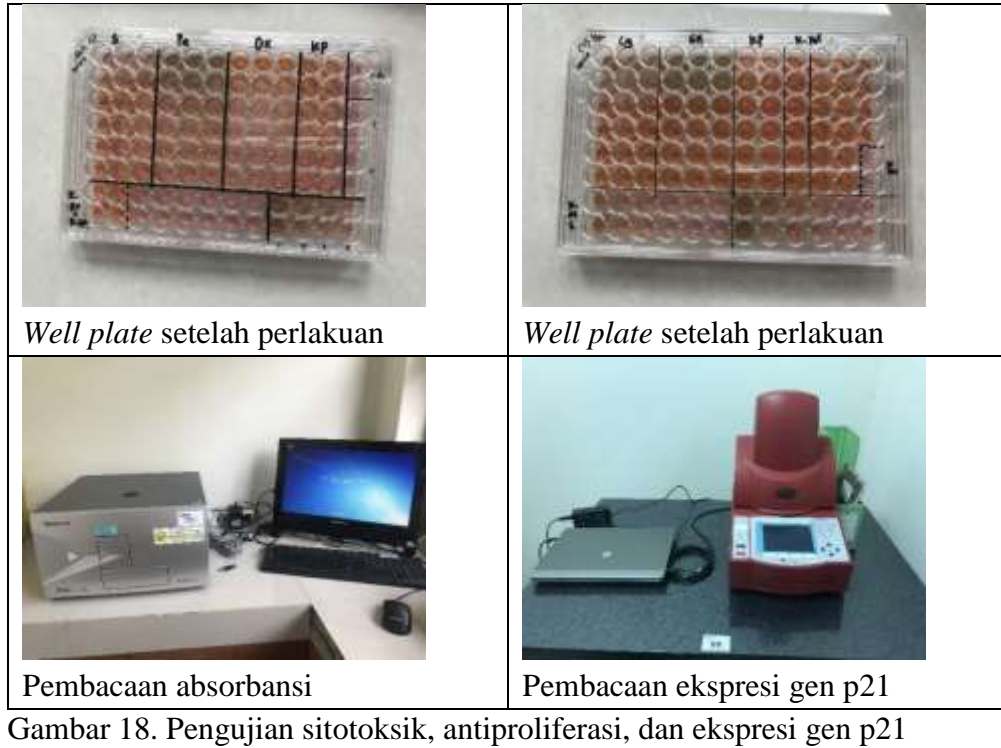
2. Uji Fitokimia



Gambar 17. Hasil Uji Fitokimia Saponin (A), Steroid (B), Terpenoid (C), Tanin (D), Alkaloid (E), Flavonoid (F)

3. Uji Sitotoksik, antiproliferasi dan ekspresi gen p21

			
Penyimpanan sel		Penimbangan ekstrak	
			
Pengujian pelarut		Sterilisasi media	
			
<i>laminar air flow</i> (pengkulturan)		Pengecekan sel	
			
Sentrifuge		Inkubator CO2	



Gambar 18. Pengujian sitotoksik, antiproliferasi, dan ekspresi gen p21

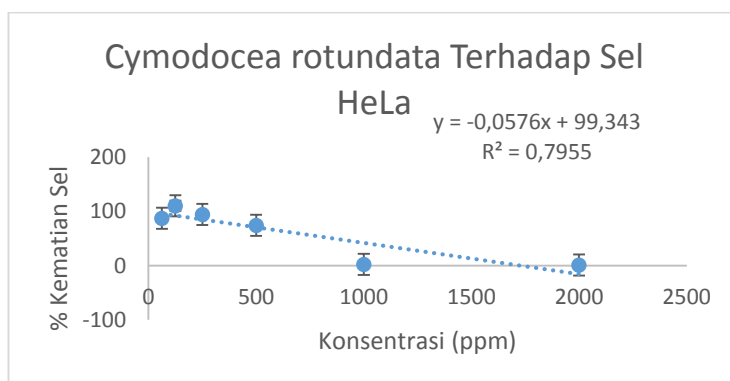
Lampiran Data

1. Data Uji Sitotoksik

Tabel 13. Uji Sitotoksik *Cymodocea rotundata*

Absorbansi sampel			
1	2	3	Average
0,9333	0,9565	0,9694	0,953
0,5379	0,5488	0,5603	0,549
1,1076	1,1478	1,1646	1,140
1,3539	1,253	1,154	1,254
1,8742	1,2113	1,0739	1,386
1,2683	1,224	1,1288	1,207

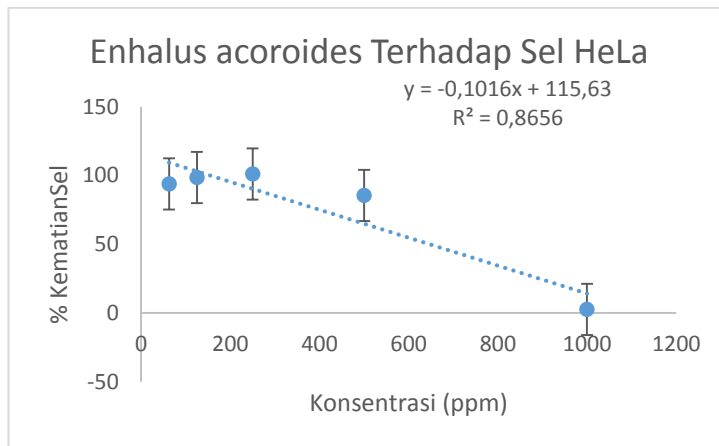
konsentrasi (ppm)	Mean	STDEV	S.E	IC 50 (ppm)
2000	0,979	3,051	1,762	856,649
1000	2,387	1,135	0,655	
500	74,118	2,767	1,598	
250	94,422	9,422	5,440	
125	110,366	39,582	22,853	
62,5	87,143	6,005	3,467	



Tabel 14. Uji Sitotoksik *Enhalus acoroides*

Absorbansi sampel			
1	2	3	Average
1,5602	1,5117	1,5001	1,524
0,7925	0,7903	0,8318	0,805
1,4149	1,3208	1,4602	1,399
1,3939	1,3716	1,4204	1,395
1,2941	1,2917	1,3234	1,303
1,2322	1,2635	1,4208	1,305

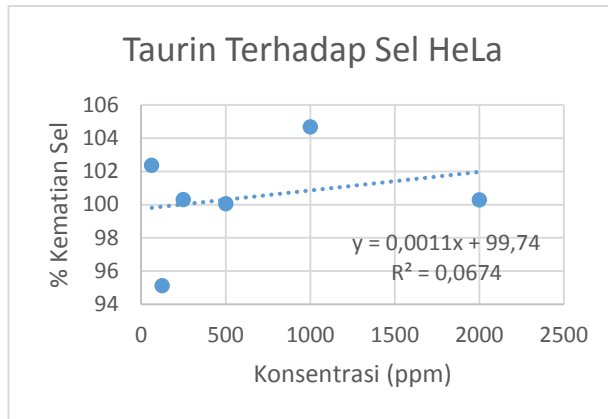
konsentrasi (ppm)	Mean	STDEV	S.E	IC 50 (ppm)
2000	14,519	5,318	3,070	645,965
1000	2,561	2,366	1,366	
500	85,421	6,718	3,879	
250	101,075	2,303	1,330	
125	98,425	1,633	0,943	
62,5	93,838	8,515	4,916	



Tabel 15. Uji Sitotoksik Taurin

Absorbansi sampel			
1	2	3	Average
1,2212	1,1347	1,2053	1,187
1,1933	1,3159	1,1858	1,232
1,2002	1,1916	1,1622	1,185
1,2264	1,1879	1,1474	1,187
1,1562	1,1225	1,1244	1,134
1,2005	1,285	1,1393	1,208

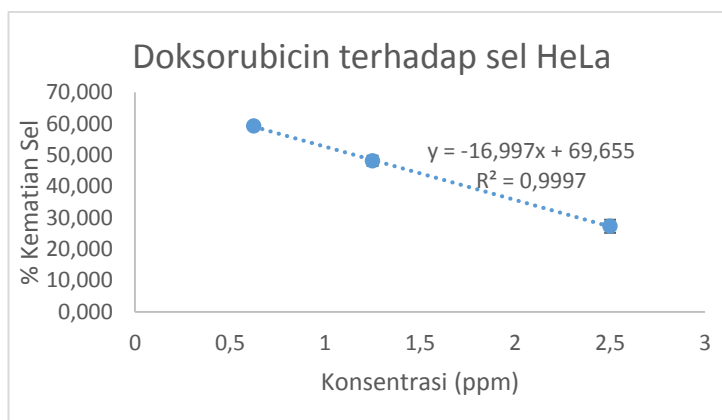
konsentrasi (ppm)	Mean	STDEV	S.E	IC 50 (ppm)
2000	100,289	4,512	2,605	45218,182
1000	104,660	7,159	4,133	
500	100,054	1,953	1,127	
250	100,305	3,872	2,235	
125	95,124	1,855	1,071	
62,5	102,367	7,170	4,140	



Tabel 16. Uji Sitotoksik Doxorubicin

Absorbansi sampel			
1	2	3	Average
0,7733	0,8309	0,7419	0,782
0,5738	0,6393	0,6269	0,613
0,5226	0,5407	0,5	0,521
0,4718	0,5145	0,51	0,499
0,801	0,7165	0,71	0,742
0,9319	0,8371	0,8652	0,878

konsentrasi (ppm)	Mean	STDEV	S.E	IC 50 (ppm)
20	47,458	3,704	2,138	1,156
10	35,856	2,855	1,648	
5	28,702	1,673	0,966	
2,5	27,263	1,925	1,111	
1,25	48,104	4,166	2,405	
0,625	59,235	3,995	2,307	

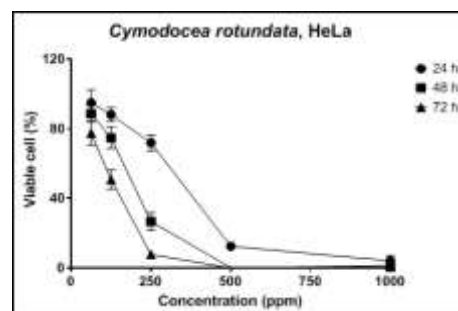


2. Hasil Uji Antiproliferasi

Cymodocea rotundata

Concentration (ppm)	24 h			48 h		
	1000	3,7591	7,1094	0,9871	0,8238	-0,1513
500	12,9017	11,863	12,1768	-0,0189	-0,1096	-0,034
250	76,0857	66,9548	72,4313	20,7801	29,0001	29,9211
125	92,667	85,9468	85,5751	68,1511	75,4887	80,4793
62,5	100,0239	86,3801	98,2073	90,8912	91,7358	83,1197

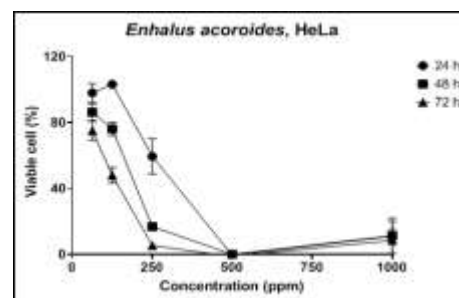
Concentration (ppm)	72 h		
	1000	1,8236	0,7472
500	-0,1041	-0,1829	-0,4923
250	6,634	7,3256	8,7728
125	44,2882	54,3394	53,3406
62,5	70,3805	77,1394	84,4697



Enhalus acoroides

Concentration (ppm)	24 h			48 h		
	1000	10,1928	7,6791	15,3237	22,7506	9,8654
500	0,8337	-2,3453	-0,6156	0,274	-0,7349	0,6131
250	49,5656	57,8472	70,8225	18,3038	16,4067	15,7319
125	105,672	102,2222	101,7989	78,8242	71,5628	78,0216
62,5	93,2244	96,2859	104,3715	81,8003	91,7041	85,2544

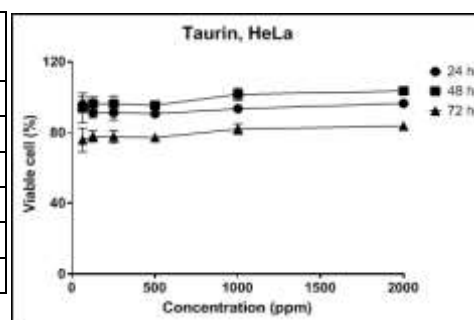
Concentration (ppm)	72 h		
	1000	-4,3087	16,373
500	-0,5783	-2,4251	-1,1069
250	5,2813	6,3858	4,5114
125	43,4775	47,2923	53,0553
62,5	81,4396	70,5721	72,8999



Taurin

Concentration (ppm)	24 h			48 h		
	2000	96,0039	99,008	94,4122	104,4814	104,3368
1000	93,8218	93,4332	93,1493	103,2841	104,1123	97,367
500	93,0222	90,332	88,5011	96,908	95,8154	93,6402
250	91,6098	86,872	95,152	97,362	99,8665	91,1955
125	94,2104	89,1363	89,9135	92,5326	100,3405	96,1397
62,5	99,8748	91,7967	96,0263	102,7652	86,0967	92,6723

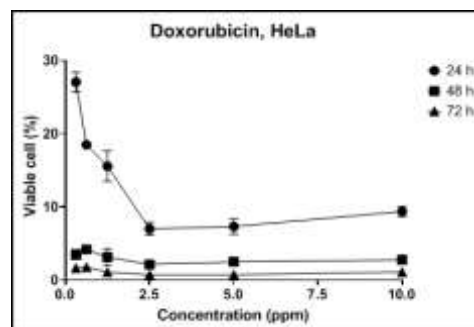
Concentration (ppm)	72 h		
	2000	84,3755	84,2587
1000	83,4085	84,0774	78,6301
500	78,2595	77,3771	75,6205
250	78,6261	80,6487	73,6463
125	74,726	81,0314	77,639
62,5	82,9895	69,5286	74,8388



Doksorubicin

Concentration (ppm)	24 h			48 h		
	10	9,7945	8,5572	9,7494	2,9865	2,992
5	7,9341	7,8889	6,1097	2,4933	2,9317	2,0056
2,5	7,2206	7,7715	6,0014	2,4056	1,9179	2,0549
1,25	17,7783	15,2314	13,6329	2,6413	4,4222	2,2796
0,625	18,1034	18,9162	18,4285	4,2414	4,6195	3,6879
0,3125	28,2005	25,5633	27,3967	4,1537	3,518	2,7947

Concentration (ppm)	72 h		
	10	1,368	1,1111
5	0,8885	0,9613	0,3318
2,5	0,9912	0,4731	0,7258
1,25	1,1754	0,8585	1,1754
0,625	1,4537	1,7277	2,0531
0,3125	1,6464	1,7534	1,4794



3. Hasil Uji ekspresi gen p21

sampel	reff gene	target gene	Δ Ct	kontrol	$\Delta\Delta$ Ct	Fold Gene	AVERAGE	normalisasi	AVERAGE	STD DEV
	(B-Actin)	(P21)								
KP 2	36,67353264	21,08656914	15,58696349	4,663059004	-20,2500225	8,01929E-07		7,7252E-07		
KP 2	16,02392658	20,42150806	4,397581487	4,663059004	0,265477517	0,831923331		0,801414361		
KP 2	16,08106382	20,8876287	4,806564883	4,663059004	0,143505879	1,104586101	0,79460141	1,064077819	0,76546114	0,401695886
KP 3	15,46590377	20,28198622	4,816082446	4,663059004	0,153023442	1,111897224		1,071120824		
KP 3	15,71880334	20,35989722	4,641093884	4,663059004	-0,02196512	0,984890254		0,948771556		
KP 3	16,66308947	20,88061107	4,217521595	4,663059004	0,445537409	0,734310733		0,707381491		
KSEL 1	15,60766771	20,9926422	5,384974485	4,663059004	0,721915481	1,649370468		1,58888341		
KSEL 1	16,11532698	20,86624394	4,750916956	4,663059004	0,087857952	1,062791027		1,023815488		
KSEL 1	16,30900506	21,32244446	5,013439394	4,663059004	0,35038039	1,274896731		1,228142679		
KSEL 2	15,88464099	20,8019101	4,917269111	4,663059004	0,254210108	1,192682557		1,14894353		
KSEL 2	15,96181304	20,55250067	4,590687634	4,663059004	0,072371369	0,951073426	1,03806891	0,916194886	1	0,295664804
KSEL 2	16,37402979	20,4266634	4,052633611	4,663059004	0,610425393	0,655003539		0,630982716		
KSEL 3	16,30697157	20,98941874	4,682447176	4,663059004	0,019388172	1,013529564		0,976360583		
KSEL 3	16,74071868	20,96314336	4,222424687	4,663059004	0,440634317	0,73681058		0,709789662		
KSEL 3	16,24715403	20,59989201	4,352737979	4,663059004	0,310321025	0,806462287		0,776887045		
EN500 1	17,45769758	21,3501217	3,892424112	4,663059004	0,770634892	0,586159465	0,52916785	0,564663347	0,50976178	0,561893912
EN500 1	17,18105704	22,87384907	5,692792027	4,663059004	1,029733023	2,041646401		1,966773481		

EN500 1	17,19689586	19,89498546	2,698089606	4,663059004	1,964969398	0,256144639		0,246751094		
EN500 2	16,85572484	20,14289415	3,287169314	4,663059004	-1,37588969	0,385315015		0,371184428		
EN500 2	17,38094576	20,29775637	2,916810619	4,663059004	1,746248384	0,298075895		0,287144613		
EN500 2	16,20605675	19,84571306	3,639656309	4,663059004	1,023402694	0,491954674		0,473913312		
EN500 3	16,75584665	19,58280967	2,826963015	4,663059004	1,836095988	0,280078668		0,269807395		
EN500 3	17,16908662	18,76177165	1,592685027	4,663059004	3,070373976	0,119048886		0,114683028		
EN500 3	17,21742824	20,16304344	2,945615203	4,663059004	-1,7174438	0,304087032		0,292935305		
EN250 1	16,73607982	20,126672	3,390592176	4,663059004	1,272466828	0,413951362		0,398770601		
EN250 1	17,17273122	20,47216438	3,299433156	4,663059004	1,363625848	0,388604403		0,374353186		
EN250 1	16,75871695	20,49843957	3,739722624	4,663059004	-0,92333638	0,527288201		0,507951059		
EN250 2	15,61493171	20,68516619	5,070234488	4,663059004	0,407175484	1,326087051		1,277455706		
EN250 2	16,17186665	20,52029589	4,348429239	4,663059004	0,314629765	0,804057307	0,74634651	0,774570263	0,71897589	0,319967561
EN250 2	16,80621231	20,41419836	3,60798605	4,663059004	1,055072954	0,481272884		0,463623253		
EN250 3	15,27942062	20,14253926	4,863118642	4,663059004	0,200059638	1,148745841		1,106618097		
EN250 3	15,7035185	20,21700619	4,513487691	4,663059004	0,149571313	0,901518303		0,868457089		
EN250 3	15,85224472	20,0525367	4,200291986	4,663059004	0,462767018	0,725593271		0,698983724		
CY500 1	15,45398156	20,01075111	4,556769552	4,663059004	0,106289452	0,928974273	1,14482763	0,894906172	1,10284358	0,352299335

CY500 1	15,46844549	19,94112729	4,472681799	4,663059004	0,190377205	0,876376555				
CY500 1	15,40626074	20,11334823	4,707087488	4,663059004	0,044028484	1,030988674		0,993179418		
CY500 2	15,417624	20,46397146	5,046347461	4,663059004	0,383288458	1,304311498		1,256478724		
CY500 2	14,69830215	20,21808196	5,519779814	4,663059004	0,85672081	1,810917484		1,744506043		
CY500 2	14,8839452	20,24474126	5,360796056	4,663059004	0,697737053	1,621958664		1,562476875		
CY500 3	15,96186272	20,1297522	4,167889479	4,663059004	0,495169524	0,709478306		0,683459739		
CY500 3	15,47450358	20,27391513	4,799411552	4,663059004	0,136352549	1,099122775		1,058814849		
CY500 3	15,63341037	20,17824433	4,544833963	4,663059004	0,118225041	0,921320461		0,887533047		
CY250 1	15,70203781	19,26199654	3,559958727	4,663059004	1,103100276	0,465515053		0,448443305		
CY250 1	16,14957865	19,33682315	3,187244502	4,663059004	1,475814502	0,359530358		0,346345368		
CY250 1	15,88944423	19,24459428	3,355150049	4,663059004	1,307908955	0,403905877		0,389093512		
CY250 2	15,89121672	19,99078019	4,099563466	4,663059004	0,563495537	0,67666068		0,651845628		
CY250 2	15,27113494	20,01599887	4,744863932	4,663059004	0,081804928	1,058341283	0,59290803	1,019528929	0,57116443	0,407843897
CY250 2	15,58669154	20,83097061	5,244279062	4,663059004	0,581220059	1,496113948		1,441247238		
CY250 3	16,76011778	19,06994299	2,309825209	4,663059004	2,353233795	0,195706856		0,188529735		
CY250 3	15,58080405	18,83380114	3,252997088	4,663059004	1,410061916	0,376295537		0,362495721		
CY250 3	15,78254854	18,72823815	2,945689611	4,663059004	1,717369393	0,304102716		0,292950414		
DX0.1 1	17,23781998	21,47452135	4,236701373	4,663059004	-0,42635763	0,74413814	1,1037041	0,7168485	1,06322817	0,612064645

DX0.1 1	16,46533374	21,64656434	5,181230599	4,663059004	0,518171595	1,432139071		1,3796185		
DX0.1 1	16,16064111	21,02336297	4,862721863	4,663059004	0,199662859	1,148429949		1,10631379		
DX0.1 2	16,13276033	21,87045479	5,737694458	4,663059004	1,074635454	2,106189805		2,028949896		
					-					
DX0.1 2	19,77857434	20,77402533	0,995450998	4,663059004	3,667608006	0,078693702		0,075807783		
					-					
DX0.1 2	17,8353277	21,14045123	3,305123528	4,663059004	1,357935476	0,390140189		0,37583265		
DX0.1 3	15,8452999	20,60548798	4,760188082	4,663059004	0,097129079	1,069642785		1,030415973		
DX0.1 3	15,85610344	21,32227317	5,466169731	4,663059004	0,803110727	1,744859325		1,680870422		
DX0.1 3	15,73543912	20,6843193	4,948880183	4,663059004	0,285821179	1,219103978		1,174396004		
DX0.05 1	14,97041965	21,17184912	6,20142947	4,663059004	1,538370466	2,904662346		2,798140202		
DX0.05 1	15,70565699	21,71610265	6,010445662	4,663059004	1,347386658	2,544507878		2,451193612		
DX0.05 1	15,29236316	21,96145726	6,669094097	4,663059004	2,006035093	4,016767878		3,869461694		
DX0.05 2	15,33254278	21,01531467	5,682771889	4,663059004	1,019712886	2,027515419		1,953160721		
					-					
DX0.05 2	18,63644502	20,7021127	2,06566768	4,663059004	2,597391324	0,165237	1,66461806	0,159177294	1,60357183	1,279097522
DX0.05 2	15,85986989	21,10031186	5,240441962	4,663059004	0,577382958	1,492140057		1,437419081		
DX0.05 3	16,42886386	21,34335215	4,914488289	4,663059004	0,251429285	1,190385852		1,146731052		
					-					
DX0.05 3	17,0030913	20,31313057	3,310039275	4,663059004	1,353019729	0,391471795		0,377115422		
					-					
DX0.05 3	17,91156957	20,56811785	2,656548278	4,663059004	2,006510726	0,248874319		0,239747397		

Lampiran Analisis data

1. Uji analisis data sitotoksik

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ekstrak Etanol	Konsentrasi	Viabilitas Sel Uji Sitotoksik
N		24	24	24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2,50	5,00	67,27796
	Std. Deviation	1,142	3,176	38,062074
Most Extreme Differences	Absolute	,169	,126	,225
	Positive	,169	,126	,129
	Negative	-,169	-,104	-,225
Test Statistic		,169	,126	,225
Asymp. Sig. (2-tailed)		,074 ^c	,200 ^{c,d}	,003 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

Ada data yang tidak normal, maka dilanjutkan dengan uji non parametrik

Viabilitas Sel Uji Sitotoksik across Ekstrak Etanol

Independent-Samples Kruskal-Wallis Test

Summary

Total N	24
Test Statistic	9,487 ^a
Degree Of Freedom	3
Asymptotic Sig.(2-sided test)	,023

a. The test statistic is adjusted for ties.

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Ekstrak Etanol	N	Mean Rank
Viabilitas Sel Uji Sitotoksik	Cymodocea rotundata	6	11,00
	Enhalus acoroides	6	11,83
	Taurin	6	19,67
	Doxorubicin	6	7,50
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

Viabilitas Sel
Uji Sitotoksik

Kruskal-Wallis H	9,487
df	3
Asymp. Sig.	,023

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Ekstrak Etanol

Pairwise Comparisons of Ekstrak Etanol

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Doxorubicin-Cymodocea rotundata	3,500	4,082	,857	,391	1,000
Doxorubicin-Enhalus acoroides	4,333	4,082	1,061	,288	1,000
Doxorubicin-Taurin	12,167	4,082	2,980	,003	,017
Cymodocea rotundata-Enhalus acoroides	-,833	4,082	-,204	,838	1,000
Cymodocea rotundata-Taurin	-8,667	4,082	-2,123	,034	,203
Enhalus acoroides-Taurin	-7,833	4,082	-1,919	,055	,330

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same.

Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,05.

a. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

Viabilitas Sel Uji Sitotoksik across Konsentrasi

Independent-Samples Kruskal-Wallis Test

Summary

Total N	24
Test Statistic	10,947 ^{a,b}
Degree Of Freedom	11
Asymptotic Sig.(2-sided test)	,448

a. The test statistic is adjusted for ties.

b. Multiple comparisons are not performed because the overall test does not show significant differences across samples.

Kruskal-Wallis Test

	Ranks		
	Konsentrasi	N	Mean Rank
Viabilitas Sel Uji	2000	3	8,00
Sitotoksik	1000	3	9,33
	500	3	13,67
	250	3	18,67
	125	3	19,00
	62,5	3	16,33
	20	1	8,00
	10	1	7,00
	5	1	6,00
	2,5	1	5,00
	1,25	1	9,00
	0,625	1	10,00
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

Viabilitas Sel Uji Sitotoksik	
Kruskal-Wallis	10,947
H	
df	11
Asymp. Sig.	,448

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
Konsentrasi

Wilcoxon Signed Ranks Test

		Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Konsentrasi - Ekstrak Etanol	Negative Ranks	3 ^a	4,50	13,50
	Positive Ranks	18 ^b	12,08	217,50
	Ties	3 ^c		
	Total	24		

a. Konsentrasi < Ekstrak Etanol

- b. Konsentrasi > Ekstrak Etanol
 c. Konsentrasi = Ekstrak Etanol

Test Statistics^a

Konsentrasi -
 Ekstrak
 Etanol

Z	-3,557 ^b
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

- a. Wilcoxon Signed Ranks Test
 b. Based on negative ranks.

2. Uji analisis data antiproliferasi

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Unstandardized Residual

N		72
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,0000000
	Std. Deviation	8742,588868
		67
Most Extreme Differences	Absolute	,116
	Positive	,069
	Negative	-,116
Test Statistic		,116
Asymp. Sig. (2-tailed)		,018 ^c

- a. Test distribution is Normal.
 b. Calculated from data.
 c. Lilliefors Significance Correction.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ekstrak	Konsentrasi	Waktu	Viabilitas
N		72	72	72	72
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2,50	5,00	2,00	11890,61
	Std. Deviation	1,126	3,131	,822	9746,493
	Most Extreme Differences				
	Absolute	,172	,125	,221	,144
	Positive	,172	,125	,221	,144
	Negative	-,172	-,101	-,221	-,086
Test Statistic		,172	,125	,221	,144
Asymp. Sig. (2-tailed)		,000 ^c	,007 ^c	,000 ^c	,001 ^c

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

Data tidak berdistribusi normal

Viabilitas across Ekstrak

Independent-Samples Kruskal-Wallis Test

Summary

Total N	72
Test Statistic	21,289 ^a
Degree Of Freedom	3
Asymptotic Sig.(2-sided test)	,000

a. The test statistic is adjusted for ties.

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Ekstrak	N	Mean Rank
Viabilitas	Cymodocea rotundata	18	37,28
	Enhalus acoroides	18	39,67
	Taurin	18	50,33
	Doxorubicin	18	18,72
	Total	72	

Test Statistics^{a,b}

Viabilitas	
Kruskal-Wallis H	21,289
df	3
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Ekstrak

Ada perbedaan

Pairwise Comparisons of Ekstrak

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
Doxorubicin- Cymodocea rotundata	18,556	6,976	2,660	,008	,047
Doxorubicin-Enhalus acoroides	20,944	6,976	3,002	,003	,016
Doxorubicin-Taurin	31,611	6,976	4,531	,000	,000
Cymodocea rotundata- Enhalus acoroides	-2,389	6,976	-,342	,732	1,000
Cymodocea rotundata- Taurin	-13,056	6,976	-1,871	,061	,368
Enhalus acoroides- Taurin	-10,667	6,976	-1,529	,126	,758

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same.

Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,05.

a. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

Viabilitas across Konsentrasi**Independent-Samples Kruskal-Wallis Test****Summary**

Total N	72
Test Statistic	39,664 ^a
Degree Of Freedom	11
Asymptotic Sig.(2-sided test)	,000

a. The test statistic is adjusted for ties.

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Konsentrasi	N	Mean Rank
Viabilitas	2000	9	44,89
	1000	9	29,44
	500	9	21,44
	250	9	44,33
	125	9	53,89
	62,5	9	60,56
	20	3	18,33
	10	3	16,33
	5	3	16,00
	2,5	3	19,00
	1,25	3	21,33
	0,625	3	21,33
	Total		72

Test Statistics^{a,b}

Viabilitas	
Kruskal-Wallis	39,664
H	
df	11
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
Konsentrasi

Viabilitas across Waktu**Independent-Samples Kruskal-Wallis Test**

Summary	
Total N	72
Test Statistic	8,437 ^a
Degree Of Freedom	2
Asymptotic Sig.(2-sided test)	,015

a. The test statistic is adjusted for ties.

Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	Waktu	N	Mean Rank
Viabilitas	24 jam	24	45,42
	48 jam	24	36,21
	72 jam	24	27,88
	Total	72	

Test Statistics^{a,b}

Viabilitas	
Kruskal-Wallis	8,437
H	
df	2
Asymp. Sig.	,015

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Waktu

Pairwise Comparisons of Waktu

Sample 1-Sample 2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj. Sig. ^a
72 jam-48 jam	8,333	6,042	1,379	,168	,503
72 jam-24 jam	17,542	6,042	2,904	,004	,011
48 jam-24 jam	9,208	6,042	1,524	,127	,382

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same.

Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,05.

a. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

Wilcoxon Signed Ranks Test

		Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Konsentrasi - Ekstrak	Negative Ranks	9 ^a	12,50	112,50
	Positive Ranks	54 ^b	35,25	1903,50
	Ties	9 ^c		
	Total	72		
Waktu - Ekstrak	Negative Ranks	36 ^d	29,50	1062,00
	Positive Ranks	18 ^e	23,50	423,00
	Ties	18 ^f		
	Total	72		
Waktu - Konsentrasi	Negative Ranks	54 ^g	35,25	1903,50
	Positive Ranks	9 ^h	12,50	112,50
	Ties	9 ⁱ		
	Total	72		

- a. Konsentrasi < Ekstrak
- b. Konsentrasi > Ekstrak
- c. Konsentrasi = Ekstrak
- d. Waktu < Ekstrak
- e. Waktu > Ekstrak
- f. Waktu = Ekstrak
- g. Waktu < Konsentrasi
- h. Waktu > Konsentrasi
- i. Waktu = Konsentrasi

Test Statistics ^a			
	Konsentrasi - Ekstrak	Waktu - Ekstrak	Waktu - Konsentrasi
Z	-6,154 ^b	-2,824 ^c	-6,150 ^c
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,005	,000

- a. Wilcoxon Signed Ranks Test
- b. Based on negative ranks.
- c. Based on positive ranks.