

**AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETANOL LAMUN (*Enhalus
acoroides*) DI PERAIRAN RINGGUNG MELALUI UJI BSLT DAN
SITOTOKSISITAS *IN VITRO* PADA SEL KANKER MELANOMA B16F10**

Skripsi

Oleh

**M. AQWAM NUGRAHA
NPM 2257021010**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2026**

ABSTRAK

AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETANOL LAMUN (*Enhalus acoroides*) DI PERAIRAN RINGGUNG MELALUI UJI BSLT DAN SITOTOKSISITAS *IN VITRO* PADA SEL KANKER MELANOMA B16F10

Oleh

M. AQWAM NUGRAHA

Kanker melanoma B16F10 merupakan jenis kanker kulit mencit yang bersifat agresif dengan tingkat mortalitas tinggi. Salah satu upaya pengembangan terapi alternatif dilakukan melalui eksplorasi senyawa bioaktif dari biota laut, termasuk *Enhalus acoroides*. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi metabolit sekunder, menguji toksisitas awal dengan menentukan nilai LC_{50} , dan menganalisis aktivitas sitotoksitas ekstrak etanol *Enhalus acoroides* terhadap sel kanker melanoma B16F10 dengan menentukan nilai IC_{50} dan viabilitas sel. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan enam konsentrasi perlakuan 62,5–2000 ppm. Ekstrak etanol lamun (*Enhalus acoroides*) dilakukan skrining fitokimia untuk melihat senyawa bioaktif sebagai kandidat antikanker. Uji toksisitas senyawa ekstrak etanol *Enhalus acoroides* menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan uji sitotoksik *in vitro* menggunakan metode WST-8. Berdasarkan data sekunder uji Fitokimia, ekstrak etanol *Enhalus acoroides* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, terpenoid, saponin, dan fenolik. Ekstrak etanol lamun *Enhalus acoroides* memiliki nilai LC_{50} 248.801 ppm yang memiliki aktivitas toksik sedang. Uji sitotoksik terhadap sel kanker melanoma B16F10 dengan ekstrak etanol *Enhalus acoroides* memiliki nilai IC_{50} 591 ppm yang memiliki aktivitas toksik lemah pada sel melanoma B16F10.

Kata kunci: *Enhalus acoroides*, BSLT, WST-8, melanoma B16F10, antikanker

ABSTRACT

ANTI-CANCER ACTIVITY OF SEAGRASS ETHANOL EXTRACT (*Enhalus acoroides*) IN RINGGUNG WATERS THROUGH BSLT AND IN VITRO CYTOTOXICITY TESTS ON B16F10 MELANOMA CANCER CELLS

By

M. AQWAM NUGRAHA

B16F10 melanoma is an aggressive type of murine skin cancer with a high mortality rate. Efforts to develop alternative therapies involve exploring bioactive compounds from marine biota, including *Enhalus acoroides*. This study aims to identify secondary metabolites, test initial toxicity by determining the LC₅₀ value, and analyze the cytotoxic activity of the ethanol extract of *Enhalus acoroides* against B16F10 melanoma cancer cells by determining the IC₅₀ value and cell viability. This study employed a Completely Randomized Design (CRD) with six treatment concentrations ranging from 62.5 to 2000 ppm. Phytochemical screening was conducted on the ethanol extract of seagrass (*Enhalus acoroides*) to detect bioactive compounds as potential anticancer candidates. The toxicity of the *Enhalus acoroides* ethanol extract was evaluated using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method, while *in vitro* cytotoxic activity was assessed using the WST-8 method. Based on secondary phytochemical data, the ethanol extract of *Enhalus acoroides* contains alkaloids, flavonoids, tannins, terpenoids, saponins, and phenolics. The ethanol extract of *Enhalus acoroides* exhibited an LC₅₀ value of 248.801 ppm, indicating moderate toxicity. The cytotoxic test against B16F10 melanoma cells yielded an IC₅₀ value of 591 ppm, indicating weak cytotoxic activity against B16F10 melanoma cells.

Keywords: *Enhalus acoroides*, BSLT, WST-8, B16F10 melanoma, anticancer.

**AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK ETANOL LAMUN (*Enhalus
acoroides*) DI PERAIRAN RINGGUNG MELALUI UJI BSLT DAN
SITOTOKSISITAS *IN VITRO* PADA SEL KANKER MELANOMA B16F10**

Oleh

**M. AQWAM NUGRAHA
2257021010**

**Skripsi
Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

**Jurusan Biologi
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2026**

LEMBAR PENGESAHAN

Judul Skripsi

: **AKTIVITAS ANTIKANKER EKSTRAK
ETANOL LAMUN (*Enhalus acoroides*)
DI PERAIRAN RINGGUNG MELALUI
UJI BSLT DAN SITOTOKSISITAS *IN*
VITRO PADA SEL KANKER
MELANOMA B16F10**

Nama Mahasiswa

: **M. Aqwam Nugraha**

Nomor Pokok Mahasiswa

: 2257021010

Jurusan/Program Studi

: Biologi/S1- Biologi

Fakultas

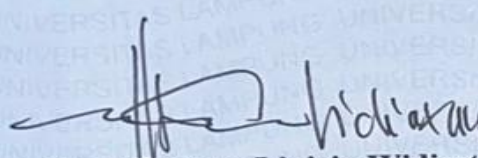
: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

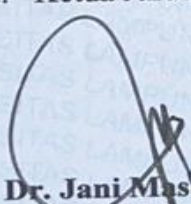
Pembimbing 1

Pembimbing 2


Prof. Endang Linirin Widiastuti, Ph. D
NIP. 196106111986032001


Primasari Pertiwi, S.Pd, M.Si
NIP.199307212022032007

2. Ketua Jurusan Biologi

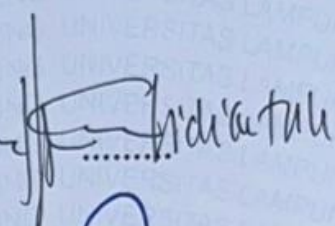

Dr. Jani Master, S.Si, M.Si.
NIP.198301312008121001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

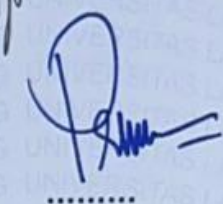
Ketua

: Prof. Endang Linirin Widiastuti, Ph.D.



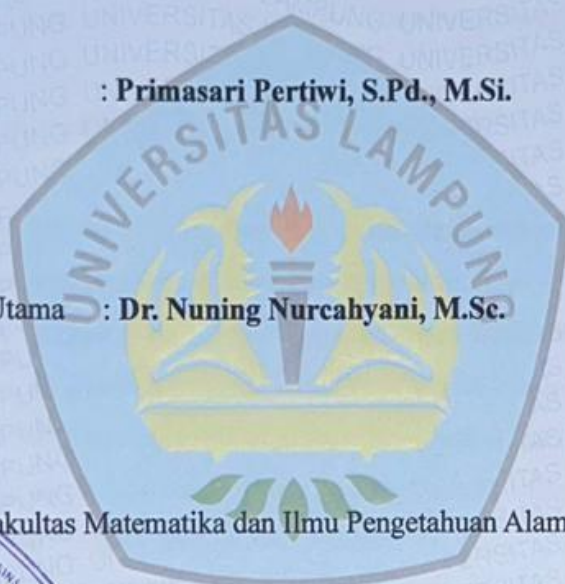
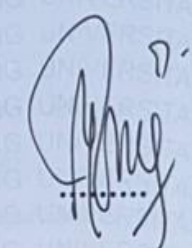
Anggota

: Primasari Pertiwi, S.Pd., M.Si.



Penguji Utama

: Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Aeri Satria, S.Si., M.Si

NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 22 Januari 2026

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN KARYA

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama	M.Aqwam Nugraha
NPM	2257021010
Jurusan	Biologi
Fakultas	Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan tinggi	Universitas Lampung

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul **“Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol Lamun (*Enhalus acoroides*) di Perairan Ringgung melalui Uji Bslt dan Sitotoksisitas *In Vitro* pada Sel Kanker Melanoma B16F10”** adalah hasil karya saya sendiri bukan hasil karya orang lain. Penelitian ini merupakan hibah Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Lampung yang telah mendanai sepenuhnya penelitian ini melalui BLU Funding 2025 Skema Pascasarjana dengan nomor kontrak PH/LRTF/FFUNPAD/VIII/2025/047 dan penelitian ini merupakan kerjasama Fakultas Farmasi, Universitas Padjajaran dan Universitas Lampung. Demikian pernyataan ini dibuat apabila di kemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya tidak benar, maka saya akan siap menerima sanksi akademik yang berlaku.

Bandar Lampung, 26 Januari 2026
Yang menyatakan,



M. Aqwam Nugraha
NPM. 2257021010

RIWAYAT HIDUP

Penulis memiliki nama lengkap M. Aqwam Nugraha, dilahirkan di Palembang pada tanggal 9 Januari 2004. Penulis merupakan anak dari pasangan Bapak Muhammad Wadud dan Ibu Puspita Arianti. Penulis beralamat di Gg. Karya 11, Kafe Rumah Kebun. Riwayat pendidikan formal penulis diawali di SD Muhammadiyah 18 Palembang dan MTsN 2 Palembang Pendidikan menengah atas ditempuh di MAN 3 Palembang dan diselesaikan pada tahun 2022. Selama masa sekolah, penulis aktif berorganisasi sebagai Ketua Bujang Gadis MAN 3 Palembang (2020) dan menorehkan berbagai prestasi, di antaranya Juara 3 Olimpiade Sains dan Matematika Nasional Bidang Kimia (2021), Juara 2 Olimpiade Kompetisi Biologi Nusantara (2021), Juara 3 Olimpiade *Natural Science & Social Competition* (2021), serta Juara Harapan 3 Lomba Band Akustik Provinsi (2021).

Pada tahun 2022, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Program Studi S1 Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Lampung. Selama masa studi, penulis mempertahankan performa akademik yang sangat baik dengan Indeks Prestasi Kumulatif (IPK) 3,75. Rekam jejak prestasi akademik penulis terus meningkat, dimulai dari dinobatkan sebagai Mahasiswa Berprestasi (Mapres) I Jurusan Biologi (2024), Mapres III FMIPA (2024), Mapres I FMIPA Universitas Lampung (2025), hingga berhasil menjadi Mapres tingkat Universitas Lampung. Penulis juga telah mempublikasikan jurnal terakreditasi Sinta 5 (2025) dan memiliki Hak Cipta (*Copyright*) atas video pembelajaran edukasi (2025).

Di kancah internasional, penulis menorehkan prestasi gemilang dengan memenangkan Juara 2 dan 3 pada ajang *International Youth Scientific* di Malaysia. Penulis juga pernah mengikuti program pertukaran pelajar *Student Mobility Programme* di Universiti Malaya, Kuala Lumpur (Juli 2024). Pengalaman akademis penulis semakin diperkaya dengan mengikuti KSTI di ITB Bandung serta terpilih menjadi delegasi KKN Kebangsaan yang diselenggarakan oleh Kemdikti Saintek di Pulau Laiya, Kabupaten Pangkep, Sulawesi Selatan. Penulis memiliki dedikasi tinggi dalam kepemimpinan dan pergerakan mahasiswa. Karier organisasi dimulai di Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) FMIPA Unila, berlanjut menjadi Ketua Umum (*President*) HIMBIO FMIPA Unila (2024), dan saat ini menjabat sebagai Gubernur (*President*) BEM FMIPA Universitas Lampung periode 2025. Penulis juga berperan aktif dalam dinamika sosial politik mahasiswa dengan menjadi Jenderal Aksi demonstrasi pada bulan Agustus serta pernah ditahan sementara oleh pihak kepolisian.

Untuk mengasah jiwa kepemimpinan, penulis aktif mengikuti berbagai pelatihan tingkat nasional yang diselenggarakan oleh Kemdikti Saintek, antara lain Latihan Keterampilan Manajemen Mahasiswa Tingkat Lanjut (LKMM-TL) di Universitas Brawijaya, Malang, serta Forum *Leadership Camp* yang dilaksanakan di Universitas Baiturrahmah, Padang, Sumatera Barat. Selain itu, penulis juga merupakan alumni LKMM-TM tingkat nasional di Universitas Andalas. Dalam bidang akademik dan pengajaran, penulis dipercaya menjadi Asisten Praktikum di berbagai laboratorium (Zoologi, Botani, Ekologi) serta Asisten Dosen mata kuliah Bahasa Inggris. Pengalaman riset penulis meliputi magang bersertifikat di IPB *University* (Mikrobiologi & Toksisitas), magang konservasi Harimau Sumatera di TNBBS bersama WCS, serta berbagai penelitian mandiri terkait potensi antikanker makroalga dan genetika populasi. Penulis juga aktif sebagai pembicara publik di berbagai forum pelatihan dan konferensi internasional. Guna menyelesaikan studi sarjana, penulis menyusun skripsi dengan judul **“Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol Lamun (*Enhalus acoroides*) di Perairan Ringgung melalui Uji BSLT Dan Sitotoksitas *In Vitro* Pada Sel Kanker Melanoma B16F10”**.

MOTTO

“Menjadi Orang yang Lebih Baik tanpa Menjatuhkan Orang Lain.”

“Allah Tidak Membebani Seseorang Melainkan Sesuai dengan Kesanggupannya.”
(QS Al Baqarah: 286)

“A Winner is a Dreamer Who Never Gives Up.”
(Nelson Mandela)

“Manfaatkan Status Mahasiswa Sebaik Baiknya, Manfaatkan Peluang Dan
Ciptakan Momentum Untuk Masa Depan Yang Cerah”
(Aqwam Nugraha)

PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmannirrahim

Dengan menyebut nama Allah SWT yang maha pengasih lagi maha penyayang Kupersembahkan hasil karyaku ini sebagai bakti dan tanggung jawab ku kepada kedua orang tua ku, Bapak Muhammad Wadud dan Ibu Puspita Arianti, Yang selalu memberikan cinta yang tak pernah henti dan memberikan dukungan, nasihat, serta doa disetiap langkahku. Kepada kakak, abang, dan senior yang selalu memberikan doa dan nasihat yang tiada tara.

Almamater Tercinta

SANWACANA

Bismillahirrahmanirrahim.

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh. Puji dan syukur penulis haturkan kepada Allah SWT. karena dengan berkah dan karunia- Nya penulis dapat menyelesaikan Skripsi dengan judul **“Aktivitas Antikanker Ekstrak Etanol Lamun (*Enhalus acoroides*) di Perairan Ringgung melalui Uji BSLT Dan Sitotoksitas *In Vitro* Pada Sel Kanker Melanoma B16F10”**. dapat terselesaikan dengan baik dan tepat pada waktunya karena atas rahmat dan ridho- Nya. Skripsi ini menjadi saksi bisu sebagai hasil penulis selama mengenyam pendidikan di Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung. Penulis menyadari dalam penulisan skripsi ini masih terdapat kesalahan dan kekurangan, dan tidak terlepas pula dari dukungan, motivasi, kritik, saran dan masukan dari berbagai pihak. Dalam hal ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Muhammad Wadud, SE. M.Si, C.F, CDM, CRM, C.MARKOM dan Puspita Arianti, SE Kedua Orang Tua yang selalu mendoakan dan memberi dukungan baik secara moril dan materil;
2. Prof. Endang Linirin Widiastuti, Ph.D selaku Pembimbing Akademik dan Pembimbing 1 skripsi yang selalu memberikan arahan dan motivasi, serta bimbingan kepada penulis;
3. Ibu Primasari Pertiwi, M. Si selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan ilmu-Nya serta membimbing penulis;
4. Ibu Dr. Nuning Nurcahyani M.Sc selaku dosen pembahas yang tidak hentinya memberi nasihat, doa serta motivasi kepada penulis;
5. Bapak Diky Hidayat, MSi sekaligus abang dan mentor saya dalam menjalankan kehidupan berpolitik dan kemahasiswaan;

6. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si.,M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung;
7. Bapak Dr. Junaidi, M. Si selaku wakil dekan kemahasiswaan dan alumni;
8. Dr. Jani Master, M.Si selaku Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung;
9. Dr. Kusuma Handayani, M. Si selaku Ketua Program Studi Biologi FMIPA Universitas Lampung;
10. Lili Chrisnawati, M.Si selaku Pembina HIMBIO FMIPA Unila periode 2024;
11. Rekan rekan penulis Biologi angkatan 2022 dan adek adek biologi;
12. Rekan seperjuangan HIMBIO FMIPA UNILA 2024 dan rekan seperjuangan BEM FMIPA UNILA 2025;
13. Dan kepada rekan paling *supportive* Mutiara Cheisya Nur Qhaniya selaku rekan kerja penulis, sebagai Gubernur Fakultas Kedokteran dan rekan terkasih.

Akhir kata, terima kasih kepada seluruh pihak yang sudah membantu penulis dalam menyusun skripsi ini. Penulis menyadari masih terdapat kesalahan dan kekurangan dalam menulis skripsi ini, sehingga kritik, saran dan masukan sangat penulis butuhkan. Semoga dengan dibuatnya skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi orang yang membaca.

Bandarlampung, 26 Januari 2025

Penulis,

M. Aqwam Nugraha
2257021010

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	ii
ABSTRACT	iii
LEMBAR PENGESAHAN	v
RIWAYAT HIDUP	viii
MOTTO.....	x
PERSEMBAHAN	xi
SANWACANA.....	xii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.3 Kerangka Teoritis	5
1.4 Hipotesis.....	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Kanker.....	7
2.2 Kanker Kulit.....	10
2.2.1 Kanker Melanoma.....	11
2.3 Lamun	14
2.3.1 <i>Enhalus acoroides</i>	16
2.4 Uji Toksisitas dengan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	18
2.5 Uji Sitotoksik dengan Metode WST-8	20
III. METODE PENELITIAN	24
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	24
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	24
3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian	25
3.4 Pelaksanaan Penelitian	28

3.4.1 Preparasi Ekstrak Etanol <i>Enhalus acoroides</i>	28
3.4.2 Pengujian Fitokimia <i>Enhalus acoroides</i>	28
3.4.3 Uji Toksisitas Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	30
3.4.4 Pengujian Sitotoksik Metode WST-8	31
3.4.5 Uji Sitotoksik dengan Metode WST-8	33
3.5 Analisis Data	34
3.5.1 Analisis Data Uji Fitokimia.....	34
3.5.2 Analisis Data Metode BSLT	34
3.5.3 Analisis Data Metode WST-8.....	36
3.6 Diagram Alir.....	37
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	38
4.1 Hasil	38
4.1.1 Determinasi Lamun.....	38
4.1.2 Ekstraksi dan Rendeman	38
4.1.3 Hasil Uji Fitokimia.....	39
4.1.4 Hasil Uji Toksisitas Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	40
4.1.5 Hasil Uji Sitotoksik Metode WST-8	41
4.2 Pembahasan.....	43
4.2.1 Uji Fitokimia Ekstrak Etanol <i>Enhalus acoroides</i>	43
4.2.2 Uji Toksisitas Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	46
4.2.3 Uji Sitotoksik Metode WST-8.....	48
V. SIMPULAN DAN SARAN	53
5.1 Simpulan	53
5.2 Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA.....	55
LAMPIRAN	64

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kebutuhan Rancangan Uji BSLT	26
2. Kebutuhan <i>Well Plate</i>	27
3. Prosedur Pengujian Senyawa Metabolit Sekunder.	29
4. Skema <i>Well Plate</i>	33
5. Hasil Ekstraksi <i>Enhalus acoroides</i>	38
6. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol <i>Enhalus acoroides</i>	39
7. Hasil Uji Toksisitas Metode BSLT	40
8. Hasil Uji Sitotoksik Metode WST-8	42
9. Hasil Uji BSLT Pada Ekstrak Etanol <i>Enhalus acoroides</i>	67
10. Data ANOVA Ekstrak Etanol <i>Enhalus acoroides</i>	67
11. Data LSD Ekstrak Etanol <i>Enhalus acoroides</i>	68
12. Data Analisis Probit Ekstrak Etanol <i>Enhalus acoroide</i>	69
13. Data Viabilitas sel dan IC ₅₀ Ekstrak Etanol <i>Enhalus acoroides</i>	70
14. Data Viabilitas sel dan IC ₅₀ Ekstrak K+ Cisplatin	71

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Perkembangan Kanker	8
2. Transformasi Kanker Melanoma	13
3. <i>Enhalus acoroides</i>	17
4. <i>Artemia salina</i>	19
5. Viabilitas Sel B16F10 Terhadap Sampel Ekstrak Etanol <i>Enhalus acoroides</i>	70
6. Viabilitas Sel B16F10 Terhadap Cisplatin	71
7. Sampling.....	72
8. Simplisia Sampel.....	72
9. Maserasi Sampel.	72
10. Filtrasi Sampel.....	72
11. Pasta Sampel	72
12. Evaporasi Sampel.....	72
13. Hasil Uji Alkaloid	73
14. Hasil Uji Fenolik.	73
15. Hasil Uji Steroid.....	73
16. Hasil Uji Saponin	73
17. Hasil Uji Tanin.	73
18. Hasil Uji Terpenoid	73
19. Hasil Uji Flavonoid	74
20. Uji Fitokimia	74
21. Larutan Stok	74
22. Aquarium Uji.....	74
23. Perlakuan Uji.....	75
24. Uji BSLT	75

25. <i>Artemia</i> Pra-Perlakuan	75
26. <i>Artemia</i> Post Perlakuan	75
27. Inkubator, BSC CO₂.....	76
28. Preparasi Sel B16F10	76
29. Preparasi Media Sediaan	76
30. <i>Seeding</i> Sel	76
31. Spektrofotometri.....	77
32. Hasil 24 Jam.....	77
33. Hasil 24 Jam Hasil 24 Jam 2000 ppm.....	77
34. Hasil 24 Jam Cisplatin.....	77

I. PENDAHULUAN

1.1 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 serta merusak jaringan lainnya. Kanker dapat terbentuk dari sel apapun dalam jaringan tubuh yang digolongkan berdasarkan jaringan dan jenis sel asalnya (Parwata, 2014). Terbentuknya sel kanker karena terdapat 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).

Pada tahun 2020 menurut laporan dari *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), prevalensi kasus kanker di dunia cenderung meningkat sepanjang tahun (Sung *et al.*, 2021) dan apabila tidak ditangani dengan penanganan yang tepat maka kemungkinan pada tahun 2030 akan mengalami peningkatan sebanyak 3 kali lipat (Widiyastuti *et al.*, 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 Asia. Salah satu bentuk kanker kulit yang dikenal paling agresif adalah melanoma, yaitu kanker yang berasal dari sel melanosit dan memiliki kemampuan metastasis tinggi (Hendaria *et al.*, 2013). Tingkat mortalitas melanoma jauh lebih tinggi dibandingkan kanker kulit non-melanoma lainnya

karena resistensinya terhadap terapi konvensional serta potensi rekurensi yang tinggi (Damsky *et al.*, 2014). Oleh sebab itu, penemuan agen antikanker baru yang efektif, selektif, dan aman masih menjadi kebutuhan mendesak dalam bidang onkologi modern.

Melanoma berasal dari transformasi ganas sel melanosit akibat kerusakan DNA, umumnya dipicu oleh paparan sinar ultraviolet (UV). Mutasi yang sering ditemukan antara lain pada gen BRAF (misalnya V600E) yang mengaktifkan jalur MAPK, serta NRAS yang mengaktifkan jalur MAPK dan PI3K/AKT, keduanya berperan dalam peningkatan proliferasi dan survival sel (Hodis *et al.*, 2012). Selain itu, hilangnya fungsi gen supresor tumor PTEN menyebabkan hiperaktivasi PI3K/AKT, sementara inaktivasi CDKN2A (p16, p14) menghilangkan kontrol siklus sel, sehingga sel terus membelah tanpa kendali (Sharpless & Chin, 2003). Mutasi pada TP53 membuat sel gagal menjalani apoptosis, dan aktivasi promotor TERT meningkatkan ekspresi telomerase yang memberi sifat imortalitas pada sel melanoma (Horn *et al.*, 2013). Kombinasi berbagai mutasi tersebut mendorong terjadinya transformasi melanosit normal menjadi sel kanker melanoma yang bersifat ganas dan agresif.

Upaya penemuan senyawa antikanker alami kini banyak diarahkan pada eksplorasi sumber daya hayati laut. Ekosistem laut dikenal kaya akan metabolit sekunder yang unik, yang tidak ditemukan pada organisme darat. Salah satu biota laut yang potensial adalah lamun (*seagrass*), termasuk spesies *Enhalus acoroides*. Lamun telah dilaporkan mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti flavonoid, fenolik, saponin, alkaloid, dan steroid yang memiliki aktivitas farmakologis, termasuk antioksidan dan antimikroba (Suwarny & Syarif. 2024). Pada penelitian yang dilakukan oleh Widiastuti *et al.* (2019) menyebutkan bahwa ekstrak lamun *Enhalus acoroides* berpotensi sebagai antikanker karena bersifat sitotoksik dan mampu menghambat proliferasi sel kanker serviks HeLa. Studi tersebut menunjukkan bahwa lamun memiliki sifat antikanker sehingga dilakukan uji pada sel kanker jenis lain, salah satunya melanoma.

Perairan Ringgung yang terletak di pesisir Teluk Lampung, merupakan salah satu lokasi penting ekosistem lamun di Provinsi Lampung. Penelitian Isnaini & Aryawati (2023) melaporkan bahwa di wilayah ini ditemukan enam jenis lamun, termasuk *Enhalus acoroides*, dengan kerapatan tertinggi tercatat di Pantai Sari Ringgung. Kerapatan lamun di kawasan ini dipengaruhi oleh parameter kualitas air yang mengandung nutrient seperti nitrat (NO_3), fosfat (PO_4), dan salinitas, serta faktor sedimen seperti pasir halus, pasir kasar, dan lumpur lanau (Saputra *et al.*, 2024). Kondisi perairan yang masih mendukung pertumbuhan lamun menjadikan Ringgung sebagai lokasi representatif untuk penelitian bioaktivitas lamun. Selain itu, keberadaan *Enhalus acoroides* yang melimpah memberikan peluang besar untuk mengeksplorasi potensi metabolit sekundernya dalam pengembangan obat antikanker berbasis sumber daya laut lokal.

Meskipun demikian, penelitian mengenai aktivitas antikanker *Enhalus acoroides* masih terbatas, khususnya terhadap sel melanoma B16F10. Hingga saat ini, belum banyak laporan yang secara spesifik mengevaluasi efektivitas ekstrak lamun dalam menghambat pertumbuhan sel melanoma B16F10, padahal jenis kanker ini dikenal paling mematikan dibandingkan kanker kulit lain (Eggermont *et al.*, 2014). Hal ini menjadi celah penelitian yang penting untuk diisi, terutama mengingat kebutuhan terhadap agen antikanker alternatif berbasis bahan alam yang lebih aman dibandingkan terapi konvensional seperti kemoterapi atau radioterapi.

Dari sisi metodologi, pendekatan yang sering digunakan dalam mengevaluasi potensi bioaktivitas suatu ekstrak adalah melalui uji toksisitas. *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan metode sederhana, cepat, dan murah untuk skrining awal toksisitas senyawa bioaktif (Meyer *et al.*, 1982). Nilai LC_{50} yang dihasilkan dapat digunakan sebagai indikator awal aktivitas toksisitas suatu ekstrak. Namun hasil dari BSLT perlu divalidasi lebih lanjut dengan uji sitotoksik *in vitro*, misalnya uji WST-8 pada sel kanker, untuk mendapatkan data kuantitatif berupa IC_{50} dan Viabilitas sel. Metode kombinatif ini penting

agar dapat menilai baik toksisitas umum maupun spesifisitas ekstrak terhadap sel kanker target.

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi potensi ekstrak etanol *Enhalus acoroides* sebagai agen antikanker terhadap sel melanoma B16F10 melalui pendekatan bertingkat dimulai dengan skrining awal toksisitas menggunakan BSLT, dilanjutkan dengan uji sitotoksik *in vitro*. Kebaruan dari penelitian ini terletak pada fokus spesifik terhadap melanoma B16F10 yang belum banyak dieksplorasi menggunakan lamun, khususnya *Enhalus acoroides*. Dengan demikian, penelitian ini diharapkan mampu memberikan kontribusi ilmiah berupa data awal mengenai bioaktivitas lamun sebagai senyawa antikanker, serta pemanfaatan sumber daya laut Indonesia dalam bidang biofarmaka. Selain itu, implikasi penelitian ini juga mendukung dua aspek penting, seperti aspek kesehatan, yaitu membuka peluang pengembangan pengobatan alternatif berbasis bahan alam laut, dan aspek konservasi, yaitu mendorong pemanfaatan berkelanjutan lamun sehingga keberadaan ekosistem laut tetap lestari. Pada akhirnya, hasil penelitian ini diharapkan menjadi pijakan bagi riset lanjutan, baik dalam isolasi senyawa aktif maupun uji mekanisme aksi molekuler pada kanker melanoma B16F10.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak etanol lamun (*Enhalus acoroides*) dari perairan Ringgung yang berpotensi sebagai antikanker.
2. Mengetahui aktivitas toksik ekstrak etanol lamun (*Enhalus acoroides*) melalui uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan menentukan nilai LC_{50} .
3. Menganalisis aktivitas sitotoksik ekstrak etanol lamun (*Enhalus acoroides*) terhadap sel kanker melanoma B16F0 secara *in vitro* dengan menentukan nilai IC_{50} dan persentase viabilitas sel.

1.3 Kerangka Teoritis

Kanker merupakan salah satu penyakit terbesar di dunia yang ditandai dengan pertumbuhan sel abnormal secara tidak terkendali serta kemampuan menyerang jaringan sekitarnya maupun bermetastasis ke organ lain. Salah satu bentuk kanker kulit yang paling berbahaya adalah melanoma dengan jenis B16F10, yang berasal dari sel melanosit mencit. Melanoma B16F10 dikenal sangat agresif karena memiliki kemampuan metastasis cepat, resistensi terhadap terapi konvensional, serta tingkat kekambuhan yang tinggi. Upaya penanganan kanker kulit, khususnya melanoma, terus berkembang seiring keterbatasan terapi konvensional seperti kemoterapi dan radioterapi yang sering menimbulkan efek samping serius. Inovasi terbaru diarahkan pada pengembangan agen antikanker dari sumber daya alam, termasuk tumbuhan laut. Dalam hal ini dilakukan pengujian pada melanoma B16F10 dengan tumbuhan laut kaya akan metabolit sekunder dengan potensi farmakologis yang luas. Salah satu biota laut yang berperan penting adalah lamun (*seagrass*), misalnya *Enhalus acoroides*. Lamun diketahui mengandung berbagai senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antioksidan, antimikroba, bahkan antikanker. Oleh karena itu, eksplorasi lamun menjadi alternatif menjanjikan dalam menemukan kandidat obat kanker berbasis bahan alam.

Langkah awal dalam mengevaluasi potensi antikanker dari lamun adalah melalui skrining fitokimia. Skrining ini bertujuan untuk mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak, seperti flavonoid, fenol, terpenoid, alkaloid, steroid, dan saponin, yang berpotensi berperan dalam aktivitas biologis termasuk sifat sitotoksiknya. Analisis ini menjadi dasar penting untuk menentukan apakah suatu ekstrak layak diuji lebih lanjut. Tahap berikutnya adalah melakukan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Uji ini merupakan metode bioassay sederhana yang menggunakan larva *Artemia salina* untuk menilai toksisitas awal suatu ekstrak. Nilai yang dihasilkan dari uji ini dapat dijadikan indikator potensi sitotoksik, sehingga ekstrak yang memenuhi kriteria dapat dilanjutkan ke tahap uji sel kanker.

Untuk memastikan potensi antikanker, ekstrak yang menunjukkan hasil menjanjikan pada BSLT kemudian dilanjutkan dengan uji toksisitas *in vitro* pada kultur sel kanker melanoma B16F10. Pada penelitian ini, fokus ditujukan pada sel melanoma B16F10, mengingat sifatnya yang agresif. Uji toksisitas *in vitro* digunakan untuk menentukan efektivitas ekstrak dalam menghambat pertumbuhan sel kanker serta menilai tingkat selektivitasnya terhadap sel normal. Dengan demikian, Eksplorasi lamun *Enhalus acoroides* melalui skrining fitokimia, uji BSLT, hingga pengujian toksisitas metode WST-8 pada sel melanoma B16F10 merupakan langkah sistematis untuk mengevaluasi potensi lamun sebagai kandidat antikanker alami.

1.4 Hipotesis

Adapun Hipotesis penelitian ini adalah sebagai Berikut:

1. Ekstrak etanol lamun (*Enhalus acoroides*) dari perairan Ringgung mengandung metabolit sekunder yang memiliki potensi antikanker.
2. Ekstrak etanol lamun (*Enhalus acoroides*) menunjukkan aktivitas toksik terhadap larva *Artemia salina* dalam uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan nilai LC_{50} .
3. Ekstrak etanol lamun (*Enhalus acoroides*) bersifat sitotoksik terhadap sel kanker melanoma B16F0 pada uji *in vitro* dengan nilai IC_{50} dan viabilitas sel.

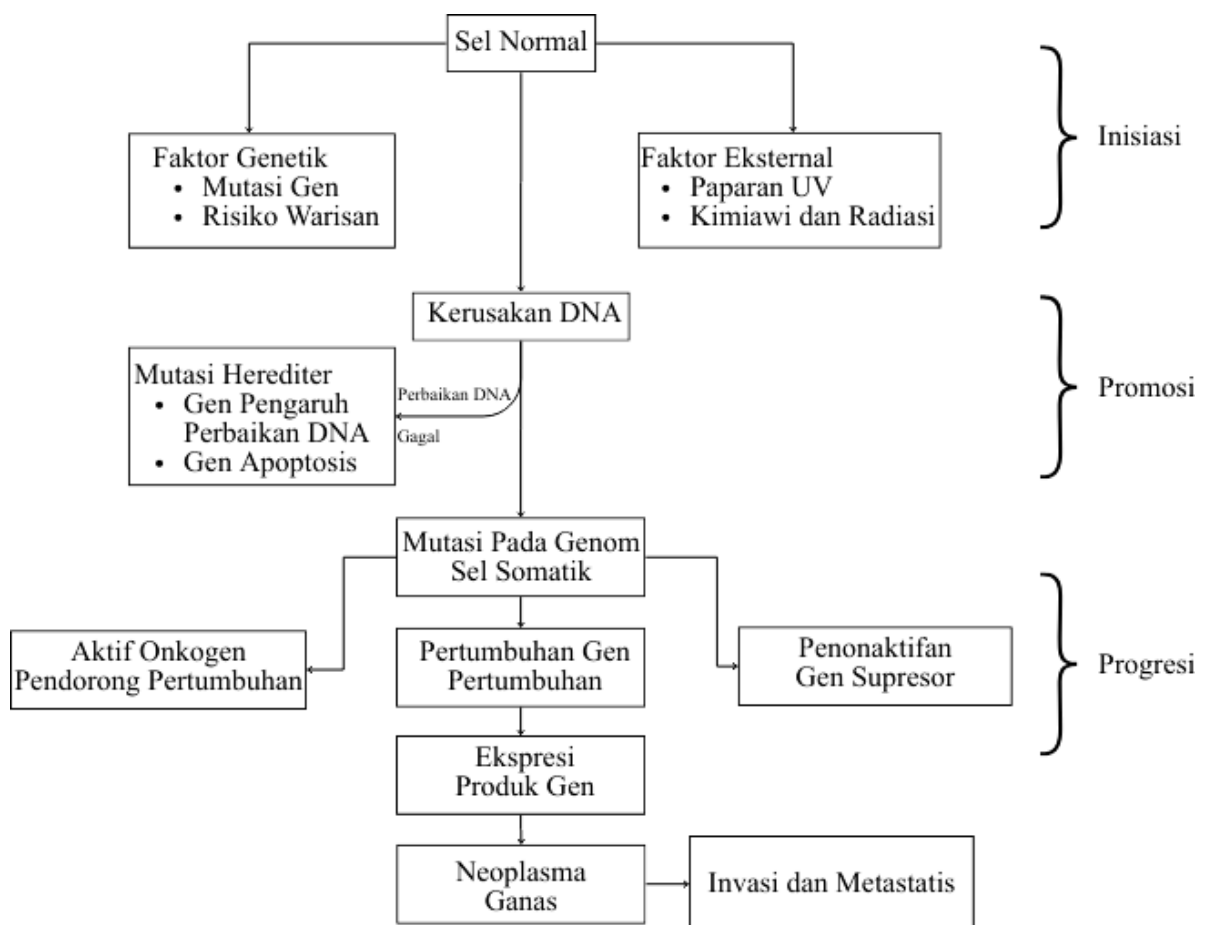
II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker

Kanker adalah salah satu penyakit paling serius di dunia yang ditandai dengan pertumbuhan sel-sel abnormal secara tidak terkendali, kemampuan menginvasi jaringan di sekitarnya, serta potensi untuk menyebar ke organ lain melalui aliran darah maupun sistem limfatik. Kanker tidak seperti tumor jinak yang pertumbuhannya terbatas pada lokasi asal, kanker bersifat progresif dan sering menimbulkan kerusakan sistemik. Keberadaan kanker sebagai penyebab utama morbiditas dan mortalitas menjadikannya ancaman kesehatan global yang memerlukan perhatian serius dari dunia medis. Selain itu, kanker memiliki sifat heterogen, artinya setiap penderita kanker dapat menunjukkan karakteristik biologis dan respons terapi yang berbeda. Perbedaan ini membuat kanker tidak hanya menjadi penyakit seluler, tetapi juga tantangan kompleks dalam sistem kesehatan masyarakat (Sung *et al.*, 2021).

Asal terbentuknya kanker berawal dari perubahan genetik yang terakumulasi dalam sel normal akibat paparan faktor internal maupun eksternal. Mutasi ini bisa berupa aktivasi onkogen yang mendorong proliferasi tanpa kendali, atau hilangnya fungsi gen supresor tumor yang biasanya menjaga stabilitas siklus sel. Proses transformasi ini tidak terjadi secara instan, melainkan melalui tahapan panjang dengan akumulasi berbagai mutasi. Faktor eksternal seperti paparan radiasi, bahan kimia karsinogenik, atau infeksi virus tertentu dapat mempercepat terjadinya kerusakan DNA. Kombinasi perubahan genetik inilah yang mengubah sel normal menjadi klon ganas yang mampu bertahan hidup dan berkembang biak secara tidak terkendali (Hanahan, 2022).

Proses terbentuknya kanker berlangsung melalui serangkaian tahap yang saling berkesinambungan. Tahap pertama adalah inisiasi, yaitu kerusakan DNA yang ditimbulkan oleh faktor karsinogen seperti radiasi ultraviolet atau zat kimia berbahaya. Tahap kedua adalah promosi, ketika sel yang telah mengalami mutasi berkembang biak lebih cepat daripada sel normal, membentuk klon awal yang abnormal. Tahap berikutnya adalah progresi, yang ditandai dengan akumulasi mutasi tambahan dan peningkatan kemampuan sel untuk beradaptasi terhadap lingkungannya. Pada tahap ini, sel kanker tidak hanya bertambah agresif, tetapi juga mampu menembus jaringan sekitar dan masuk ke sirkulasi darah atau limfatik, memulai proses metastasis (Robbins & Cotran, 2021). Tahapan-tahapan tersebut dideskripsikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Perkembangan Kanker

Penyebab kanker tidak dapat dijelaskan oleh satu faktor tunggal karena sifatnya yang multifaktorial. Faktor genetik berperan penting, terutama pada individu dengan riwayat keluarga yang membawa mutasi *germline* pada gen tertentu. Faktor lingkungan juga memberikan kontribusi besar, misalnya paparan radiasi ultraviolet dari matahari, zat kimia industri, dan polusi udara. Selain itu, faktor gaya hidup seperti kebiasaan merokok, konsumsi alkohol, pola makan tinggi lemak, dan kurangnya aktivitas fisik semakin meningkatkan risiko terjadinya kanker. Semua faktor ini berinteraksi satu sama lain, sehingga strategi pencegahan kanker harus bersifat menyeluruh dengan menekankan pada edukasi, perubahan gaya hidup, dan pengendalian paparan lingkungan (Bray *et al.*, 2021).

Solusi pengobatan kanker hingga saat ini berkembang pesat seiring dengan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi medis. Metode konvensional yang masih digunakan meliputi operasi, kemoterapi, dan radioterapi, yang masing-masing memiliki peran penting dalam penanganan pasien. Meskipun demikian, ketiga metode ini sering menimbulkan efek samping signifikan dan tidak selalu efektif terhadap semua jenis kanker. Perkembangan terbaru melahirkan terapi target molekuler dan imunoterapi yang lebih spesifik bekerja pada sel kanker, sehingga menurunkan risiko kerusakan pada sel normal. Inovasi pengobatan ini telah meningkatkan angka harapan hidup pasien, meskipun tantangan tetap ada, terutama pada kasus kanker yang resisten terhadap terapi (Nguyen & Oh, 2022).

Macam-macam pengobatan kanker dapat dikelompokkan berdasarkan tujuan dan pendekatannya. Terapi kuratif bertujuan menghilangkan kanker sepenuhnya, biasanya melalui pembedahan atau kombinasi dengan terapi tambahan. Terapi *adjuvant* diberikan setelah pengobatan utama untuk mencegah kekambuhan, sementara terapi *neoadjuvant* digunakan sebelum tindakan utama guna mengecilkan ukuran tumor. Pada kanker stadium lanjut, terapi paliatif lebih difokuskan pada peningkatan kualitas hidup pasien melalui pengurangan gejala. Selain itu, terapi sistemik seperti kemoterapi,

terapi target, dan imunoterapi menjadi pilar penting untuk menangani kanker yang telah menyebar dan tidak dapat dioperasi (Postow *et al.*, 2018).

Meskipun banyak pilihan terapi tersedia, kegagalan pengobatan kanker masih sering terjadi. Salah satu penyebab utamanya adalah munculnya resistensi sel kanker terhadap obat, baik karena mutasi baru maupun aktivasi jalur molekuler alternatif. Heterogenitas tumor juga berkontribusi, karena dalam satu tumor dapat terdapat berbagai subpopulasi sel yang memiliki respons berbeda terhadap terapi. Selain itu, efek samping berat dari pengobatan konvensional sering kali membatasi dosis yang bisa diberikan kepada pasien. Hal ini mendorong perlunya penelitian berkelanjutan untuk menemukan agen antikanker baru yang lebih efektif, selektif, dan minim efek samping (Vasan *et al.*, 2019).

2.2 Kanker Kulit

Kanker kulit adalah neoplasma ganas yang berkembang dari sel-sel kulit akibat akumulasi kerusakan DNA, terutama akibat paparan radiasi ultraviolet. Jenis kanker ini terdiri dari karsinoma sel basal (BCC), karsinoma sel skuamosa (SCC), dan melanoma yang masing-masing dengan karakteristik klinis yang berbeda. BCC merupakan jenis yang paling sering ditemukan, dengan pertumbuhan lambat dan jarang bermetastasis. SCC lebih agresif, dapat menyebar ke kelenjar getah bening, sementara melanoma bersifat sangat invasif dengan kemampuan metastasis tinggi. Dengan demikian, kanker kulit memiliki spektrum luas dari bentuk relatif jinak hingga yang paling mematikan (Whiteman *et al.*, 2016).

Secara global, kanker kulit menunjukkan tren peningkatan signifikan seiring dengan pola hidup manusia yang banyak terpapar sinar matahari. Menurut GLOBOCAN 2020, terdapat lebih dari 320.000 kasus baru melanoma dengan 57.000 kematian tercatat di seluruh dunia. Kasus kanker kulit non-melanoma juga sangat tinggi, meskipun angka kematiannya lebih rendah. Di Indonesia, insiden kanker kulit relatif lebih rendah dibandingkan negara beriklim subtropis, tetapi kasus melanoma mulai dilaporkan meningkat di wilayah

pesisir dengan intensitas radiasi ultraviolet tinggi. Data ini menegaskan bahwa kanker kulit merupakan masalah kesehatan masyarakat yang perlu perhatian serius, bahkan di negara tropis (Sung *et al.*, 2021).

Jenis kanker kulit terbagi atas tiga kategori utama, yaitu BCC, SCC, dan melanoma. BCC berasal dari sel basal epidermis, biasanya tumbuh perlahan dan jarang bermetastasis, tetapi dapat merusak jaringan lokal secara progresif. SCC berkembang dari sel skuamosa epidermis, lebih agresif dibanding BCC, dengan risiko metastasis ke jaringan regional. Melanoma, yang berasal dari sel melanosit, menempati posisi paling berbahaya karena memiliki kecenderungan metastasis ke organ vital dalam waktu singkat. Pemahaman terhadap jenis kanker kulit ini sangat penting dalam menentukan strategi diagnosis, terapi, dan pencegahan (Apalla *et al.*, 2017).

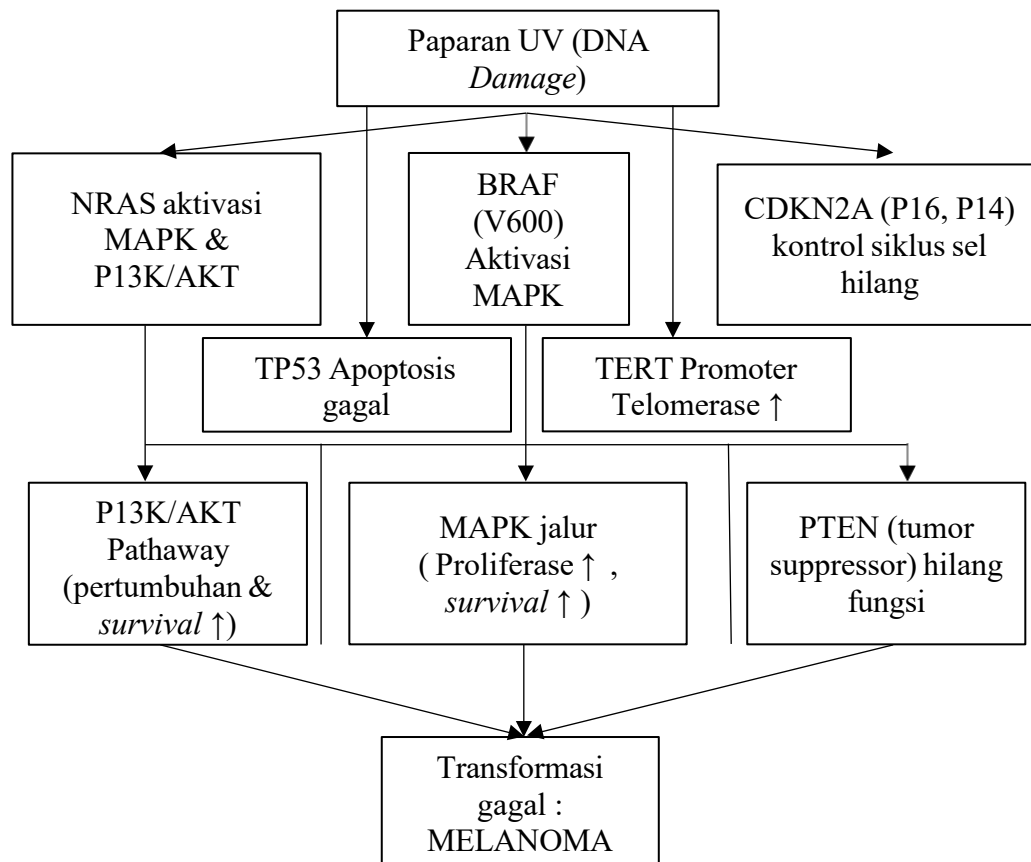
Stadium kanker kulit ditentukan berdasarkan ukuran tumor, kedalaman invasi, keterlibatan nodus limfa, dan adanya metastasis jauh. Pada BCC dan SCC, klasifikasi lebih sederhana karena tingkat keganasannya relatif lebih rendah. Sebaliknya, pada melanoma digunakan sistem *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) yang memperhitungkan ketebalan Breslow, ulserasi, dan keterlibatan metastasis regional maupun jauh. Stadium awal biasanya memiliki prognosis baik, sementara stadium lanjut memiliki angka mortalitas tinggi. Sistem klasifikasi ini penting sebagai pedoman klinis dalam menentukan strategi terapi yang tepat (Gershenwald *et al.*, 2017).

2.2.1 Kanker Melanoma

Melanoma adalah bentuk kanker kulit yang berasal dari transformasi ganas sel melanosit, yaitu sel penghasil melanin pada epidermis. Penyakit ini dikenal sebagai kanker kulit paling agresif karena memiliki kemampuan metastasis yang tinggi ke berbagai organ vital seperti paru-paru, otak, dan hati (Whiteman *et al.*, 2016). Tingkat mortalitas melanoma jauh lebih tinggi dibandingkan kanker kulit non-melanoma akibat resistensi terhadap terapi konvensional. Melanoma dapat berkembang dari tahi lalat (*nevus*) atau muncul *de novo* tanpa lesi kulit

sebelumnya. Oleh sebab itu, melanoma dianggap sebagai kanker kulit paling mematikan dengan tantangan terapi yang kompleks (Narayanan *et al.*, 2020). Melanoma ditandai dengan akumulasi mutasi genetik yang memengaruhi jalur proliferasi dan kelangsungan hidup sel. Mutasi BRAF, khususnya BRAF V600E, ditemukan pada sekitar 50% kasus melanoma dan mengaktifkan jalur MAPK. Mutasi NRAS juga sering muncul dan berperan dalam aktivasi jalur MAPK serta PI3K/AKT, yang mendorong proliferasi dan survival sel. Hilangnya fungsi PTEN menyebabkan hiperaktivasi jalur PI3K/AKT, sementara inaktivasi CDKN2A menghilangkan kontrol siklus sel. Kombinasi mutasi ini menghasilkan sel melanosit yang bertransformasi menjadi ganas dan resisten terhadap apoptosis (Shain & Bastian, 2016). Progresi melanoma dimulai dari fase pertumbuhan radial, ketika sel kanker menyebar lateral di epidermis. Selanjutnya, melanoma memasuki fase pertumbuhan vertikal dengan invasi ke dermis yang meningkatkan risiko metastasis. Pola perkembangan ini menjelaskan mengapa deteksi dini sangat penting dalam meningkatkan angka kesintasan pasien melanoma (Shain & Bastian, 2016).

Klasifikasi melanoma berdasarkan AJCC (*8th edition*) menggunakan parameter ketebalan Breslow, ulserasi, keterlibatan nodus limfa, dan metastasis jauh. Stadium awal memiliki prognosis yang baik dengan terapi pembedahan, sedangkan stadium lanjut sering memerlukan terapi sistemik. Imunoterapi berbasis *checkpoint inhibitor* seperti anti-PD-1 kini menjadi pilihan utama pada melanoma metastatik. Namun, resistensi primer maupun sekunder tetap menjadi hambatan besar dalam manajemen pasien. Oleh sebab itu, studi terus diarahkan pada kombinasi terapi baru untuk meningkatkan hasil pengobatan (Gershenwald *et al.*, 2017). Alur kerusakan DNA yang disebabkan oleh paparan uv memuat sel melanosit bertransformasi ganas menjadi sel kanker melanoma ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Transformasi Kanker Melanoma

Penelitian *in vitro* sangat penting dalam memahami biologi melanoma dan mengevaluasi kandidat obat antikanker. Salah satu model yang sering digunakan adalah kultur sel B16F10, yaitu sel melanoma tikus yang agresif dan digunakan dalam banyak studi praklinis. Sel B16F10 berasal dari tumor kulit spontan pada tikus *Mus musculus* (strain C57BL/6J) dan dikembangkan melalui pemilihan *in vivo* berturut-turut hingga 10 kali untuk meningkatkan kemampuan metastasisnya. Sel ini memiliki morfologi campuran antara *spindle-shaped* dan *epithelial-like*, serta menunjukkan potensi proliferasi dan metastasis yang tinggi, menjadikannya model yang sangat berguna untuk menilai respons terapi antikanker dan mekanisme metastasis melanoma dalam penelitian praklinis (Seob *et al.*, 2022).

B16F10 adalah model sel yang agresif dan mudah dimanipulasi secara *in vitro* dan *in vivo*, garis sel ini banyak dimanfaatkan untuk mengevaluasi efek sitotoksitas senyawa baru serta memahami mekanisme molekuler yang mendasari kematian sel kanker. Misalnya, penelitian-penelitian yang menggunakan B16F10 sering menilai perubahan viabilitas sel, struktur morfologi, dan jalur apoptosis setelah perlakuan dengan biomolekul atau kombinasi obat, sehingga sitotoksitas dari agen uji dapat diukur secara kuantitatif melalui parameter seperti nilai IC_{50} dan pengamatan proses apoptosis (Haqq *et al.*, 2022). Dengan demikian, studi pada B16F10 tidak hanya memberikan informasi tentang potensi antikanker suatu senyawa, tetapi juga membantu dalam pemahaman efek toksik yang spesifik terhadap sel kanker dibandingkan dengan sel normal (Baharara *et al.*, 2016).

2.3 Lamun

Lamun atau *seagrass* adalah tumbuhan berbunga (angiospermae) yang seluruh siklus hidupnya berlangsung di perairan laut dangkal. Lamun memiliki akar, rimpang, daun, bunga, serta menghasilkan biji, sehingga dikategorikan sebagai tumbuhan tingkat tinggi sejati. Lamun mampu berfotosintesis menggunakan klorofil dan menyediakan energi bagi ekosistem pesisir. Padang lamun terbentuk ketika tanaman ini tumbuh rapat, membentuk habitat kompleks di dasar laut. Dengan karakteristik ini, lamun menjadi salah satu komponen ekosistem pesisir yang sangat penting dalam menjaga keseimbangan lingkungan laut (Green & Short, 2016).

Struktur morfologi lamun terdiri atas akar, rimpang, batang, dan daun yang saling berhubungan dalam mendukung kelangsungan hidup di laut. Akar berfungsi menancapkan tanaman ke dalam substrat sekaligus menyerap nutrisi dari sedimen. Rimpang menjalar secara horizontal, memperkokoh posisi tanaman dan membantu proses regenerasi. Daun berbentuk pita panjang muncul dari rimpang dan menjadi organ utama fotosintesis, sekaligus sebagai habitat epifit. Kombinasi struktur ini menjadikan lamun mampu

beradaptasi pada lingkungan laut dengan arus, gelombang, dan salinitas yang bervariasi (Unsworth *et al.*, 2018).

Secara ekologis, lamun memiliki peran yang vital dalam ekosistem pesisir. Lamun berperan sebagai penyerap karbon (*blue carbon*) yang signifikan, sehingga membantu mitigasi perubahan iklim. Akar dan rimpangnya berfungsi mengikat sedimen, mencegah erosi pantai, serta menjaga kejernihan air laut. Padang lamun juga menyediakan habitat, tempat makan, dan daerah asuhan (*nursery ground*) bagi berbagai biota seperti ikan, penyu, dan dugong. Dengan fungsi-fungsi tersebut, lamun tidak hanya menopang ekosistem laut, tetapi juga mendukung sumber daya perikanan yang bernilai ekonomi tinggi (Nordlund *et al.*, 2018).

Indonesia merupakan salah satu pusat keanekaragaman lamun terbesar di dunia dengan sekitar 12 spesies tercatat. Padang lamun tersebar luas di perairan dangkal seperti Teluk Lampung, Kepulauan Riau, Sulawesi, Bali, hingga Papua. Distribusi lamun dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti kedalaman, kejernihan air, serta jenis substrat dasar. Sayangnya, ekosistem lamun di Indonesia menghadapi ancaman serius akibat reklamasi, penangkapan ikan destruktif, sedimentasi, dan pencemaran. Perlindungan padang lamun menjadi krusial untuk menjaga fungsi ekologis sekaligus mendukung perikanan berkelanjutan (Rahmawati *et al.*, 2020).

Perairan Teluk Lampung merupakan salah satu lokasi penting dengan keanekaragaman lamun yang tinggi. Beberapa spesies yang ditemukan di wilayah ini antara lain *Enhalus acoroides*, *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea rotundata*, *Halodule uninervis*, dan *Syringodium isoetifolium*. *Enhalus acoroides* merupakan salah satu spesies dominan dengan kepadatan tinggi di Perairan Ringgung. Faktor lingkungan seperti konsentrasi nitrat, fosfat, salinitas, serta kandungan organik dalam sedimen memengaruhi distribusinya. Dengan kondisi ini, Teluk Lampung menjadi lokasi representatif dan cocok untuk penelitian bioaktivitas lamun, termasuk potensi antikanker (Isnaini dan Aryawati, 2023).

Selain perannya secara ekologis, lamun juga memiliki kandungan nutrisi yang signifikan. Komposisi biokimia lamun mencakup karbohidrat, protein, serat, dan berbagai mineral esensial yang mendukung fungsinya sebagai sumber energi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa lamun dapat digunakan sebagai pakan tambahan bagi biota laut maupun ternak. Lebih penting lagi, lamun mengandung metabolit sekunder yang menjadi sorotan dalam riset farmakologi modern. Dengan demikian, lamun bukan hanya tumbuhan laut yang berfungsi ekologis, tetapi juga berpotensi sebagai sumber daya biofarmaka (Suwarno & Syarif, 2024).

Metabolit sekunder pada lamun berfungsi sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap stres lingkungan, herbivora, dan mikroorganisme patogen. Senyawa-senyawa yang ditemukan meliputi flavonoid, fenolik, terpenoid, alkaloid, dan saponin. Studi farmakologi menunjukkan metabolit sekunder ini memiliki aktivitas biologis seperti antioksidan, antibakteri, antijamur, dan antikanker. Flavonoid, misalnya, mampu menghambat proliferasi sel kanker melalui mekanisme apoptosis. Oleh karena itu, keberadaan metabolit sekunder memperkuat potensi lamun sebagai sumber bahan alam untuk pengembangan obat (Bibi *et al.*, 2020).

2.3.1 *Enhalus acoroides*

Enhalus acoroides merupakan salah satu spesies lamun tropis yang tersebar luas di Indo-Pasifik. Tanaman ini memiliki daun berbentuk pita berwarna hijau terang dengan panjang berkisar 10-40 cm. Daun tumbuh rapat dalam rumpun yang keluar dari rimpang menjalar di substrat pasir atau lumpur. Adaptasi ini membuat *Enhalus acoroides* mampu bertahan pada kondisi lingkungan laut yang dinamis dengan arus kencang, gelombang deras, dan salinitas tinggi. Spesies ini dikenal sebagai lamun tersebar banyak di ekosistem pesisir tropis (Short *et al.*, 2016) *Enhalus acoroides* ditampilkan pada Gambar 3.



Gambar 3. *Enhalus acoroides*

Morfologi *Enhalus acoroides* yang membentuk padang rapat berkontribusi besar terhadap kestabilan ekosistem pesisir. Rimpang yang menjalar memperkuat substrat dasar laut, sementara daunnya yang lebat meningkatkan produktivitas primer ekosistem. Padang lamun ini juga berperan sebagai tempat tinggal bagi berbagai mikroorganisme, invertebrata, dan ikan kecil. Selain itu, *Enhalus acoroides* membantu menahan sedimen, meningkatkan kejernihan air, dan menjaga kualitas lingkungan. Dengan demikian, spesies ini tidak hanya penting secara ekologis, tetapi juga berfungsi sebagai penyangga produktivitas laut (Unsworth *et al.*, 2018). Secara taksonomi, *Enhalus acoroides* diklasifikasikan ke dalam kelompok tumbuhan berbunga laut dalam famili Hydrocharitaceae. Klasifikasi *Enhalus acoroides* adalah sebagai berikut (Linneaus F, Royle. 1839 dalam Rawung *et al.*, 2018).

Tingkatan	Klasifikasi
Kingdom	: Plantae
Phylum	: Tracheophyta
Class	: Liliopsida
Ordo	: Alismatales
Family	: Hydrocharitaceae
Genus	: <i>Enhalus</i>
Species	: <i>Enhalus acoroides</i> (Linneaus F, Royle 1839)

Spesies ini diketahui mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid, fenolik, steroid, dan alkaloid (Nurafni & Rinto 2018). Senyawa-senyawa tersebut berkontribusi dalam aktivitas biologis, termasuk antioksidan, antimikroba, dan antikanker. Dengan demikian, *Enhalus acoroides* memiliki peran ganda, yaitu menjaga ekosistem pesisir sekaligus berpotensi dimanfaatkan dalam bidang farmakologi (Short *et al.*, 2023).

Berdasarkan riset yang telah dilakukan oleh Dewi *et al.* (2012), menghasilkan 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*. Fakta ini memperkuat klaim bahwa *Enhalus acoroides* berpotensi besar sebagai sumber kandidat obat antikanker berbasis bahan alam laut. Oleh sebab itu, spesies ini semakin menarik untuk dieksplorasi dalam riset farmakologi dan biomedis (Widiastuti *et al.*, 2019).

2.4 Uji Toksisitas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji toksisitas merupakan serangkaian uji yang dilakukan untuk melihat potensi dari suatu bahan alam yang ditargetkan memiliki aktivitas toksik terhadap hewan uji. Proses menemukan dosis dalam sebuah senyawa dapat dilakukan uji toksisitas sehingga senyawa dapat dikatakan toksik. Senyawa yang memiliki dosis tinggi dapat menimbulkan efek toksik yang besar dan ketika dosis dikurangkan maka efek toksisitas juga akan berkurang. Oleh karena itu, senyawa yang digunakan dalam kandungan obat perlu dilakukan uji toksisitas (Pohan *et al.*, 2023). Metode yang dilakukan untuk dalam menilai aktivitas toksik suatu senyawa adalah Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode BSLT menggunakan hewan uji *Artemia salina* (Suneka & Manorajan, 2021). *Artemia salina* adalah salah satu jenis krustasea kecil

yang memiliki sifat halofilik dan tersebar pada lingkungan yang memiliki salinitas. Morfologi *Artemia salina* ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. *Artemia salina*

Uji toksisitas dengan metode BSLT menghasilkan nilai *Lethal Concentration 50* (LC_{50}) yang merupakan konsentrasi optimal dari suatu senyawa yang mampu membunuh 50% populasi *Artemia salina*. Nilai LC_{50} menunjukkan sifat toksik dari senyawa, semakin rendah LC_{50} maka semakin tinggi efek toksisitasnya dan sebaliknya. Metode BSLT menggunakan waktu perlakuan selama 24 jam lalu larva dihitung dan hasilnya akan menunjukkan nilai LC_{50} . Tolak ukur dalam penentuan aktivitas biologis yang disebabkan senyawa uji pada *Artemia salina* dengan perhitungan jumlah larva yang mati karena terpapar bahan uji. Pengujian dikatakan efektif jika ekstrak yang diuji mampu menyebabkan kematian larva *Artemia salina* sebesar 50% pada konsentrasi bahan uji kurang dari 1000 ppm. Senyawa dapat dikembangkan sebagai obat antikanker jika nilai LC_{50} berdasarkan uji BSLT memiliki nilai kurang dari 1000 ppm (Lisdawati *et al.*, 2006)

Kista *Artemia salina* merupakan fase dormansi berwarna kecoklatan memiliki diameter 200 sampai 300 mikron. Kista memiliki kualitas tinggi dapat menetas dalam 18 sampai 24 jam. Proses pertumbuhan *Artemia salina* pada tahap pertama yaitu hidrasi, kista kering menyerap air untuk dapat melakukan metabolisme secara aktif. Selanjutnya kista pecah dan naupili

akan keluar, pada awal penetasan, mulut dan anus belum terbentuk dengan sempurna, maka larva *Artemia salina* yang baru menetas tidak makan apapun. Nauplii akan berganti kulit 12 jam setelah menetas dan memasuki tahap larva kedua. Pada tahap ini, larva mulai memakan bakteri, mikroalga dan bahan organik lainnya. Dalam kurun waktu 8 hari, nauplii akan mengalami pergantian kulit sebanyak 15 kali. Ukuran *Artemia salina* dewasa rata-rata 8 mm, namun dapat mencapai ukuran hingga 20 mm pada kondisi yang tepat (Isnansetyo & Kurniastuty, 1995). Selama fase pertumbuhan, yaitu fase instar 1 dan instar 2 *Artemia salina* sangat rentan terhadap toksin. Mekanisme penyerapan senyawa pada dilakukan ketika *Artemia salina* menyerap senyawa melalui mulut larva dan dilanjutkan proses pencernaannya yang menyebabkan terjadinya kerusakan pada reaksi metabolik dalam tubuh larva (Wicaksana *et al.*, 2023).

Proses masuknya senyawa, ketika *Artemia salina* menyerap senyawa melalui mulut larva dan dilanjutkan proses pencernaannya yang menyebabkan terjadinya kerusakan pada reaksi metabolik dalam tubuh larva (Wicaksana *et al.*, 2023). *Artemia salina* memiliki proses sintesis protein, seperti DNA-dependent RNA polymerase juga berfungsi untuk memisahkan kedua untai DNA dan menyusun nukleotida-nukleotida RNA dengan mencocokkannya pada cetakan DNA. Jika suatu senyawa menghambat terjadinya proses ini, DNA tidak dapat mensintesis RNA yang pada akhirnya mengganggu sintesis protein. Hal ini menyebabkan metabolisme akan terhenti dan menyebabkan *Artemia salina* akan mati (Campbell, 2010).

2.5 Uji Sitotoksik dengan Metode WST-8

Sitotoksik merupakan istilah yang digunakan untuk menggambarkan kemampuan suatu senyawa atau agen biologis dalam menyebabkan aktivitas toksik baik merusak struktur maupun fungsi sel yang berujung pada kematian sel (Freshney, 2016). Efek sitotoksik dapat terjadi melalui berbagai mekanisme, antara lain gangguan metabolisme mitokondria, kerusakan membran sel, penghambatan sintesis makromolekul, serta

aktivasi jalur kematian sel terprogram seperti apoptosis atau nekrosis (Klaassen, 2019). Oleh karena itu, sifat sitotoksik suatu bahan menjadi parameter penting dalam penelitian biomedis, khususnya dalam pengembangan kandidat agen antikanker, karena berkaitan langsung dengan kemampuan senyawa tersebut dalam menghambat pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel kanker (Riss *et al.*, 2016).

Pengaruh senyawa toksik pada suatu sel akan menyebabkan efek sitotoksisitas. Sitotoksisitas merujuk pada tingkat atau derajat kemampuan suatu senyawa toksik dalam merusak dan membunuh sel hidup, yang umumnya dinilai melalui pengujian *in vitro* menggunakan kultur sel (Freshney, 2016). Sitotoksisitas diukur secara kuantitatif untuk menggambarkan hubungan antara konsentrasi senyawa uji dan respons biologis sel yang ditimbulkan, terutama dalam bentuk penurunan viabilitas atau proliferasi sel (Riss *et al.*, 2016). Dengan demikian, pengujian toksisitas berfungsi sebagai metode skrining awal untuk menentukan potensi biologis dan keamanan relatif suatu bahan sebelum dikembangkan lebih lanjut dalam pengujian *in vivo* atau uji klinis (Mosmann, 1983).

Dalam praktiknya, evaluasi sitotoksisitas dilakukan melalui uji sitotoksik, yaitu metode eksperimental yang bertujuan untuk menilai dampak suatu senyawa terhadap kelangsungan hidup sel setelah perlakuan pada berbagai konsentrasi tertentu (Riss *et al.*, 2016). Parameter utama yang digunakan dalam uji sitotoksik adalah viabilitas sel, yang didefinisikan sebagai persentase sel hidup yang masih mempertahankan aktivitas metabolisme dibandingkan dengan sel kontrol tanpa perlakuan (Freshney, 2016). Selain itu, nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration 50%*) digunakan sebagai indikator kuantitatif aktivitas sitotoksik, yaitu konsentrasi senyawa yang mampu menurunkan viabilitas sel sebesar 50 % (Sebaugh, 2011). Nilai IC_{50} yang lebih rendah menunjukkan aktivitas sitotoksik yang lebih kuat, sehingga parameter ini banyak digunakan dalam penelitian antikanker sebagai dasar penilaian efektivitas senyawa uji (Mosmann, 1983).

Salah satu metode yang banyak diaplikasikan dalam uji sitotoksik adalah metode WST-8, yang termasuk dalam kelompok uji tetrazolium berbasis aktivitas metabolik sel (Ishiyama *et al.*, 1996). Metode ini memanfaatkan senyawa WST-8 yang akan direduksi oleh enzim dehidrogenase mitokondria pada sel hidup menjadi senyawa formazan yang larut dalam air dan berwarna jingga (Ishiyama *et al.*, 1997). Jumlah formazan yang terbentuk sebanding dengan jumlah sel hidup dan dapat diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang sekitar 450 nm, sehingga mencerminkan tingkat viabilitas sel setelah perlakuan senyawa uji (Riss *et al.*, 2016). Dibandingkan dengan metode tetrazolium konvensional seperti MTT, metode WST-8 memiliki keunggulan berupa sensitivitas yang lebih tinggi, prosedur yang lebih sederhana, serta tidak memerlukan tahap pelarutan kristal formazan, sehingga lebih efisien dan akurat dalam pengujian toksisitas *in vitro* (Ishiyama *et al.*, 1997).

Penurunan kadar WST-8 yang berwarna kuning muda oleh sel yang masih hidup akan menghasilkan produk formazon berwarna jingga (Kamiloglu *et al.*, 2020). Formazon yang terbentuk memiliki absorpsi maksimum Panjang gelombang 450 nm karena reduksi WST-8 oleh NAD(P)H (Chamchoy *et al.*, 2019). Metode ini secara luas diaplikasikan melalui *Cell Counting Kit-8* (CCK-8), yaitu kit komersial yang mengandung reagen WST-8 siap pakai dan dirancang untuk pengukuran viabilitas, proliferasi, serta sitotoksitas sel secara cepat dan sensitif (Dojindo Laboratories, 2020). Secara umum, prosedur uji WST-8 diawali dengan penanaman sel uji ke dalam mikrotiter 96 sumur dan inkubasi hingga sel mencapai kepadatan yang sesuai, kemudian sel dipaparkan dengan senyawa uji pada berbagai konsentrasi tertentu selama periode inkubasi yang ditetapkan (Riss *et al.*, 2016).

Mekanisme kerja metode WST-8 dalam CCK-8 didasarkan pada kemampuan enzim dehidrogenase mitokondria pada sel hidup untuk mereduksi WST-8 menjadi senyawa formazan berwarna jingga melalui proses transfer elektron (Ishiyama *et al.*, 1997). Senyawa yang bersifat toksik terhadap sel akan mengganggu fungsi mitokondria, menurunkan

aktivitas enzim dehidrogenase, atau merusak integritas sel, sehingga mengurangi kemampuan sel dalam mereduksi WST-8 (Klaassen, 2019). Penurunan pembentukan formazan ini tercermin dari menurunnya nilai absorbansi, yang secara langsung berbanding lurus dengan penurunan jumlah sel hidup (Riss *et al.*, 2016). Dengan demikian, metode WST-8 mampu merepresentasikan mekanisme toksik senyawa uji terhadap metabolisme dan viabilitas sel, khususnya melalui gangguan fungsi mitokondria, sehingga sangat relevan digunakan dalam uji sitotoksitas dan penentuan nilai IC_{50} pada sel kanker maupun sel normal (Freshney, 2016).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus-November 2025. Pembuatan ekstrak etanol dan uji fitokimia ekstrak lamun *Enhalus acoroides* dan uji BSLT dilakukan di Laboratorium Biomolekuler Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Pengujian sitotoksik dilakukan di Laboratorium Kultur Sel Sitogenetika dan Genetika Molekuler, Fakultas Farmasi, Universitas Padjajaran Bandung. Penelitian ini merupakan hibah Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Lampung yang telah mendanai sepenuhnya penelitian ini melalui BLU Funding 2025 Skema Pascasarjana dengan nomor kontrak PH/LRTF/FFUNPAD/VIII/2025/047 dan penelitian ini merupakan kerjasama Fakultas Farmasi, Universitas Padjajaran dan Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut peralatan gelas, gelas ukur, spatula, timbangan analitik, oven, blender, kertas saring, gelas corong, *rotary evaporator*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *micropipet*, gelas beaker, pipet tetes, dan *microtips*, inkubator CO₂, sentrifuge, flusk T24, *conical tube*, *microtube* 1,5 mL, *96 well plate*, *clifton*, *laminar air flow cabinet*, *haemocytometer*, cawan petri, vortex, penangas air 37 °C, cover slip, mikroskop elektron, kaca preparat, aquarium, aerator, lampu, erlenmeyer, lampu UV, dan *magnetic stirrer*.

Bahan yang digunakan untuk membuat ekstrak adalah *Enhalus acoroides*, kultur sel B16F10, kista *Artemia salina*, air laut steril, ragi bubuk, etanol fraksi 96%, akuades, media kultur sel *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), asam asetat glasial (CH_3COOH), asam sulfat (H_2SO_4), Besi (III) klorida (FeCl_3), 23 klorofom (CHCl_3), kalium iodida (KI), raksa (II) klorida (HgCl_2), serbuk magnesium (Mg), asam klorida pekat (HCl), Penisillin streptomisin 1% , *fetal bovine serum* (FBS), *trypsin-EDTA* 0,25%, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), Natrium Bikarbonat (NaHCO_3), Tripan Blue 0,4% , larutan Dimetil sulfoxide (DMSO), hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%, *Streptavidin horseradish peroxidase* (HRP), *Aminoethyl Carbazole* (AEC), air distilasi (dH_2O), *Mayer Hans Eberhard* (HE), gelatin 5, *Cell Counting Kit-8* (CCK-8) dan *Doxorubicin*.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang memilih sampel secara acak dan diberi perlakuan konsentrasi bertingkat serta kontrol. Pada penelitian aktivitas antikanker ekstrak etanol *Enhalus acoroides* pada uji toksisitas dan uji sitotoksik dengan menggunakan sampel *Artemia salina* dan sel melanoma B16F10 dengan pemberian Ekstrak etanol *Enhalus acoroides* konsentrasi bertingkat. Pada tahap pertama dilakukan uji toksisitas metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) sebagai skrining awal toksisitas, yang terdiri dari 7 perlakuan yaitu: kontrol negatif (air laut steril tanpa ekstrak), dan 6 tingkat konsentrasi ekstrak etanol *Enhalus acoroides* (62,5 ppm; 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm; 1000 ppm; dan 2000 ppm). Setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali (replikasi), sehingga total terdapat 35 unit percobaan. Larva *Artemia salina* berumur 48 jam (fase instar II) sebanyak 10 ekor dimasukkan ke dalam setiap tabung uji dengan ukuran 5 mL yang telah berisi konsentrasi ekstrak, air laut, dan ragi sesuai perlakuan, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Penempatan tabung uji

dilakukan secara acak untuk menghindari bias lingkungan mikro, dan pengamatan mortalitas larva dilakukan dengan menghitung jumlah larva yang mati (tidak bergerak) dan dilakukan analisis regresi prohibit serta nilai LC₅₀. Adapun penjelasan rancangan uji toksisitas BSLT ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kebutuhan Rancangan Uji BSLT

No	Perlakuan	Keterangan
1.	Kontrol Negatif	5 mL Air laut steril + 10 <i>Artemia salina</i> + 1 tetes ragi
2.	P1 (62,5 ppm)	0,16 mL Ekstrak + 1 tetes ragi + 4,84 mL air laut steril + 10 <i>Artemia salina</i>
3.	P2 (125 ppm)	0,32 mL Ekstrak + 1 tetes ragi + 4,68 mL air laut steril + 10 <i>Artemia salina</i>
4.	P3 (250 ppm)	0,63 mL Ekstrak + 1 tetes ragi + 4,37 mL air laut steril + 10 <i>Artemia salina</i>
5.	P4 (500 ppm)	1,25 mL Ekstrak + 1 tetes ragi + 3,75 mL air laut steril + 10 <i>Artemia salina</i>
6.	P5 (1000 ppm)	2,5 mL Ekstrak + 1 tetes ragi + 2,5 mL air laut steril + 10 <i>Artemia salina</i>
7.	P6 (2000 ppm)	5 mL Ekstrak + 1 tetes ragi + 10 <i>Artemia salina</i>

Tahap kedua adalah uji toksisitas *in vitro* terhadap sel B16F10 yang juga menggunakan rancangan acak lengkap dengan 6 perlakuan yaitu: uji sampel *Enhalus acoroides* (Kultur sel + Media DMEM dan Ekstrak dengan konsentrasi 31,25 ppm; 62,5 ppm; 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm; 1000 ppm), kontrol pelarut (media DMEM + kultur sel dan DMSO 1% tanpa ekstrak), kontrol positif (cisplatin + kultur sel dan media), kontrol sel (kultur sel + medium), kontrol media ekstrak (media + ekstrak), dan kontrol media blanko dan 6 tingkat konsentrasi ekstrak etanol *Enhalus acoroides*, DMSO 1% dan cisplatin (31,25 ppm; 62,5 ppm; 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm; 1000 ppm) (Yang *et al.*, 2019). Kebutuhan larutan bahan uji ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Kebutuhan *Well Plate*

No	Bahan Uji	Kebutuhan konsentrasi/well	Pengulangan	Total/well
1.	Sampel (sel + medium + Ekstrak)	6 Konsentrasi	3 kali	18 well
2.	Kontrol Pelarut (DMSO 1% + Medium + sel)	6 Konsentrasi	2 kali	12 well
3.	Kontrol Positif (cisplatin + sel + medium)	6 Konsentrasi	3 kali	18 well
4.	Kontrol Sel (sel + medium)	1 Konsentrasi	3 kali	3 well
5.	Kontrol Medium Ekstrak (medium + ekstrak)	6 Konsentrasi	2 kali	12 well
6.	Kontrol Medium	1 Konsentrasi	2 kali	3 well
Total				66 well

Setiap perlakuan melalui 3 kali pengulangan dan setiap replikasi biologis diukur secara triplo (replikasi teknis dalam 96 *well plate*). Sel melanoma B16F10 ditanam dengan kepadatan yang telah ditentukan melalui perhitungan *haemocytometer* (sekitar 1×10^4 sel per *well*) dalam 100 μ L media DMEM lengkap, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan 5% CO₂ hingga mencapai *attachment* optimal, kemudian diberi perlakuan ekstrak sebanyak 50 μ L per *well* dan diinkubasi kembali selama 24 jam. Penempatan perlakuan dalam *well plate* dilakukan secara random menggunakan tabel acak untuk mengeliminasi efek posisi dalam inkubator. Pengukuran viabilitas sel dilakukan menggunakan metode WST-8 (*Cell Counting Kit-8*), sel yang hidup akan melakukan metabolisme reagen menjadi formazan berwarna yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 450 nm menggunakan *microplate reader* (Wei *et al.*, 2017). Data yang diperoleh dilanjutkan dengan ANOVA satu arah pada taraf signifikansi 5% jika data berdistribusi normal,

atau uji Kruskal-Wallis jika data tidak normal. Nilai LC_{50} dan IC_{50} dihitung menggunakan analisis probit dengan bantuan software SPSS atau Microsoft Excel, dan *Selectivity Index* (SI) dihitung untuk mengevaluasi selektivitas ekstrak terhadap sel kanker dibandingkan sel normal.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Preparasi Ekstrak Etanol *Enhalus acoroides*

Enhalus acoroides diperoleh dari perairan Sari Ringgung Pesawaran, Provinsi Lampung. Untuk pengambilan sampel lamun dilakukan dengan jarak ± 5 meter dari bibir pantai dengan kedalaman maksimal 0,5 meter pada saat permukaan air laut surut. Selanjutnya sampel *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.

3.4.2 Pengujian Fitokimia *Enhalus acoroides*

Data uji fitokimia pada penelitian ini diperoleh melalui data sekunder yang berasal dari penelitian Khairunnisa *et al.* 2025 yang melaporkan kandungan metabolit sekunder pada *Enhalus acoroides*. Data dipilih berdasarkan kesesuaian objek, metode ekstraksi, dan teknik uji fitokimia yang digunakan. Selanjutnya, data dianalisis secara deskriptif

dan komparatif untuk menggambarkan profil metabolit sekunder yang berpotensi berperan dalam aktivitas biologis sampel penelitian (Tasmin *et al.*, 2014). Pengujian ini diantaranya memeriksa senyawa bioaktif dengan prosedur pengujian pada Tabel 3.

Tabel 3. Prosedur Pengujian Senyawa Metabolit Sekunder

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 g 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 glasial + 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

3.4.3 Uji Toksisitas *Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*

- **Preparasi *Artemia salina***

Kista *Artemia salina* akan menetas setelah 24 jam (fase instar I), pada proses penetasan kista *Artemia salina* kali ini bertujuan untuk memperoleh larva yang berusia 2 x 24 jam (memasuki fase instar II). Penetasan kista *Artemia salina* dilakukan di akuarium kaca yang terbagi menjadi dua bagian yaitu ruang gelap dan ruang terang. Akuarium dibalut menggunakan lakban hitam pada bagian tengah diberikan pemisah menggunakan *styrofoam* hingga menjadi dua bagian. Salah satu bagian, atasnya ditutup menggunakan *styrofoam* yang diberi lakban berwarna hitam. *Styrofoam* pemisah pada bagian bawah diberi lubang dengan maksud, kista yang telah menetas akan menuju tempat yang terang melewati lubang tersebut (Mentor *et al.*, 2014). Akuarium diisi dengan 7 liter air laut steril yang diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Laut Lampung, kemudian pada ruang gelap diisi 700 mg kista *Artemia salina*. Pada tempat yang terang dilengkapi lampu yang dirancang untuk merangsang penetasan. Aerator dipasang pada tempat yang terang dengan maksud membantu larva mendapatkan oksigen saat mereka berpindah ke tempat terang. Setelah 24 jam, kista akan menetas menjadi larva (Hamidi *et al.*, 2014).

- **Uji Toksisitas BSLT**

Larva *Artemia salina* yang memasuki fase instar II sebagai hewan uji pada metode toksisitas BSLT. Ekstrak etanol *Enhalus acoroides* diujikan pada larva *Artemia salina* untuk mengetahui tingkat toksisitasnya. Langkah pertama adalah dengan membuat larutan stock 2000 ppm, ekstrak etanol *Enhalus acoroides* ditimbang sebanyak 0,4 gr 27 kemudian dilarutkan dengan 200 mL etanol 70%. Larutan konsentrasi uji dibuat dengan cara larutan stok dipipet masing-masing 0,16; 0,32; 0,63; 1,25; 2,5; 5 mL ke dalam tabung uji kemudian dikeringanginkan. Kontrol negatif terdiri dari air laut dan *Artemia salina*. Masing masing tabung uji kemudian diisi 1 mL air laut dan

ditambah ragi 1 tetes (3 mg ragi/ 5 mL air laut) sebagai makanan bagi *Artemia salina*. Dalam penelitian ini digunakan 10 ekor larva *Artemia salina* berumur 2 x 24 jam dan dimasukkan ke dalam masing-masing tabung uji, selanjutnya ditambahkan air laut hingga volume 5 mL sehingga setiap tabung uji memiliki konsentrasi 62,5 ppm; 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm; 1000 ppm, dan 2000 ppm (masing masing dilakukan pengulangan 5 kali). Inkubasi dilakukan selama 1 x 24 jam, kemudian dilakukan perhitungan terhadap kematian larva secara langsung menggunakan pipet tetes dan dibantu cahaya. Larva *Artemia salina* yang mati ditandai dengan tidak bergerak secara aktif pada tabung uji. Setelah itu, dihitung persentase kematian larva *Artemia salina* untuk menentukan nilai LC₅₀ (Bareta *et al.*, 2023).

3.4.4 Pengujian Sitotoksik Metode WST-8

- **Preparasi Uji**

Media biakan sel B16F10 dibuat menggunakan media DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles' Medium*) hingga 50 mL. Medium komplet memiliki kandungan, seperti 5 mL larutan *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, 1% L- Glutamat 0,5 mL, dan 1% Pensterp (*Penicillin Streptomycin*) 0,5 mL yang telah dicairkan di ruangan suhu CCRC (2009). Untuk persiapan sampel sebelum uji sitotoksisitas, sebanyak 10 mg ekstrak etanol lamun *Enhalus acoroides* dapat dilarutkan ke dalam 1 mL dimetil sulfoksida (DMSO) 1% dan air dengan rasio perbandingan 1:1. Larutan stok kemudian diencerkan hingga konsentrasi 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, dan 2000 ppm. Larutan ekstrak yang sudah disiapkan dapat diujikan pada sel *line* di dalam *Biological Safety Cabinet* secara aseptis (CCRC, 2009).

- **Pengaktifan Sel (*Pre-Passage*)**

Sel B16F10 dicairkan dalam *Hot Plate* pada suhu 37°C selama dua sampai tiga menit setelah dikeluarkan dari tangki nitrogen cair. Lalu, sel

dipindahkan ke *Biological Safety Cabinet* (BSC) kemudian dimasukkan ke dalam *conical tube* steril dengan 4 mL media kultur DMEM dan diinkubasi pada inkubator CO₂ dengan suhu 36°C sampai *confluent* 80% selama 48 jam (CCRC, 2009).

- **Kultur Sel (*Passage phase*)**

Sel yang telah diaktifkan akan memasuki tahap perkembangan hingga *confluent* 80%, media di buang dan *flusk* di cuci dengan PBS 1%. Trypsin ditambahkan untuk melisiskan dinding sel sebanyak 1 mL dan dimasukan ke inkubator CO₂ selama 3 menit. Berikutnya ditambahkan media komplet sebanyak 1 mL ke dalam flusk lalu dihomogenkan serta dipindahkan ke *conical tube*. Berikutnya dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan sel kanker dari medium, selama 3 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan yang dihasilkan kemudian dibuang dan suspensi sel + medium 1 mL dimasukan ke *dish cultur*. Inkubasi sampai *confluent* 80% selama 48 jam. Setelah mencapai *confluent* diulangi step pencucian dan pemisahan. Suspensi sel dipindahkan sebanyak 10 µL ke dalam *microtube* dan ditambahkan *trypan blue* 10 µL dan dihitung dengan *haemocytometer* 10⁴ kuadran (CCRC, 2009).

- **Perhitungan Sel**

Kultur sel yang didapat dihitung dengan *haemocytometer* dengan rumus penghitungan 4 kuadran (CCRC, 2009). Perhitungan sebagai berikut:

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

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

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

$$\text{Volume panen sel} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel hitung/mL}}$$

- **Pembuatan Sediaan *Seeding***

Sediaan *seeding* dipergunakan untuk pelaksanaan uji viabilitas di dalam *well plate*. Larutan uji dan kontrol yang digunakan ,seperti sampel Ekstrak etanol *Enhalus acoroides*, kultur sel, medium komplit, DMSO 1%, Cisplatin. Setiap *well* mengandung 50 μ L medium dan 50 μ L bahan uji dan larutan kontrol (CCRC, 2009).

3.4.5 Uji Sitotoksik dengan Metode WST-8

- **Skema Bahan Uji dan Larutan dalam *Well Plate***

Kebutuhan uji disesuaikan dengan jumlah *well plate* dan kebutuhan larutan. Adapun kebutuhan terlampir pada Tabel 4.

Tabel 4. Skema *Well Plate*

1000	1000	1000	KP	KP	1000	1000	1000	KM
500	500	500	KP	KP	500	500	500	KM
125	125	125	KP	KP	125	125	125	KS
62,5	62,5	62,5	KP	KP	62,5	62,5	62,5	KS
31,25	31,25	31,25	KP	KP	31,25	31,3	31,25	KS
1000	500	125	62,5	31,25				
1000	500	125	62,5	31,25				

● Sampel ● Kontrol pelarut ● Kontrol Sel
● Kontrol + ● Kontrol Medium ● Kontrol Medium Ekstrak

- ***Treatment Sel***

Pengujian sitotoksik setiap sumuran yang telah tertaman sel dan tidak, diberikan 50 μ L medium dan 50 μ L bahan uji, dengan konsentrasi 31,25 ppm, 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm dan diinkubasi lagi selama 24 jam pada inkubator CO₂ dengan suhu 36°C setelah 24 jam di inkubasi sel yang telah dikultur dikeluarkan kemudian diamati di bawah mikroskop. Selanjutnya sel yang terdapat pada *well plate* diberikan reagen *cell counting kit-8* (CCK) yang

bertujuan agar sel terwarnai pada reagenya. Pemberian *cell counting kit-8* berkisar 10 µL ke dalam plate. Dilakukan inkubasi kembali hingga 2 jam pada suhu 36 °C di inkubator CO₂ sel yang hidup akan bermetabolime. Serapan kemudian dibaca dengan *Nano drop reader* pada panjang gelombang 450 nm (Ace Biolabs, 2018; CCRC, 2013; Dona *et al.*, 2019).

3.5 Analisis Data

3.5.1 Analisis Data Uji Fitokimia

Pengujian Fitokimia menggunakan data sekunder dalam mengevaluasi senyawa aktif. Analisis data dilakukan secara kualitatif dengan prosedur uji dan kemudian hasil yang ditunjukkan akan dianalisis secara deskriptif. Hasil data dilakukan pencocokan dengan hasil positif melalui reagen-reagen uji dengan ekstrak.

3.5.2 Analisis Data Metode BSLT

Perhitungan toksisitas awal dilakukan dengan menghitung jumlah larva yang mati per tabung uji. Perhitungan ditujukan untuk melihat variasi konsentrasi selama 24 jam yang menyebabkan toksik pada larva *Artemia salina*. Perhitungan menggunakan rumus menurut Meyer *et al.* (1982) adalah sebagai berikut :

$$\text{Kematian larva (\%)} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{jumlah larva total}} \times 100\%$$

Jika terdapat *Artemia salina* yang mati pada kontrol maka dapat dilakukan perhitungan rumus abbot menurut Meyer *et al.* (1982) sebagai berikut:

$$\text{Kematian larva} = \frac{\text{Jumlah larva mati-Larva mati dalam kontrol}}{\text{jumlah larva total}} \times 100\%$$

Data yang diperoleh diolah dengan menggunakan Microsoft Office

Excel dengan membuat kurva persamaan hubungan antara nilai probit dan log konsentrasi sehingga menghasilkan persamaan regresi (Meyer *et al.*, 1982) sebagai berikut:

$$y = a + bx$$

Keterangan:

y = nilai probit

a = konsentrasi regresi

x = log konsentrasi

b = kemiringan regresi

Nilai LC₅₀ diperoleh melalui persamaan regresi yang dihasilkan dari analisis data. Pada perhitungan ini, nilai y ditetapkan sebesar 5, yang merupakan nilai probit untuk tingkat mortalitas 50% pada organisme uji (Wihadmadyatami, 2024). Selanjutnya, nilai x yang diperoleh dari persamaan tersebut mewakili log konsentrasi, dan nilai LC₅₀ dihitung dengan melakukan antilog terhadap nilai x. Namun jika regresi tidak dilakukan, alternatif sederhana dilakukan interpolasi antara dua konsentrasi yang berada di bawah dan di atas 50% kematian, perhitungan menurut (Meyer *et al.*, 1982) sebagai berikut:

$$LC_{50} = C_1 + \frac{(50 - M_1)}{(M_2 - M_1)} \times (C_2 - C_1)$$

Keterangan:

C₁ = konsentrasi yang menghasilkan mortalitas di bawah 50%

C₂ = konsentrasi yang menghasilkan mortalitas di atas 50%

M₁ = persentase mortalitas pada konsentrasi C₁

M₂ = persentase mortalitas pada konsentrasi C₂

Berdasarkan kriteria yang dikemukakan oleh Wagner (1993), senyawa dengan nilai LC₅₀ kurang dari 1 ppm tergolong sangat toksik, nilai LC₅₀ antara 1 ppm–100 ppm dikategorikan sebagai toksisitas sedang,

nilai LC₅₀ lebih dari 100 ppm menunjukkan toksisitas rendah, dan senyawa dengan nilai LC₅₀ melebihi 1000 ppm dinyatakan tidak bersifat toksik.

3.5.3 Analisis Data Metode WST-8

Sitotoksik dilakukan menggunakan metode WST-8 untuk menentukan viabilitas sel setelah perlakuan ekstrak. Metode ini bekerja berdasarkan kemampuan enzim dehidrogenase pada sel hidup dalam mereduksi WST-8 menjadi kristal formazan berwarna jingga. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm dengan alat spektrofotometer, di mana nilai absorbansi berbanding lurus dengan jumlah sel yang masih hidup. Persentase inhibisi dan nilai IC₅₀ dihitung untuk menentukan potensi sitotoksik sampel uji. Lalu diukur persentase viabilitas sel dan IC₅₀. Rumus perhitungan viabilitas menurut *Cancer Chermoprevention Research Center* (CCRC, 2013) sebagai berikut.

$$\text{Viabilitas (\%)} = \frac{A_{\text{Sampel}} - A_{\text{blanko}}}{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{blanko}}} \times 100\%$$

Keterangan :

A_{Sampel} : Absorbansi sumur yang diberi ekstrak (perlakuan)

A_{blanko} : Absorbansi sel tanpa perlakuan (kontrol sel/*negative control*)

A_{Kontrol} : Absorbansi media + reagen WST-8 tanpa sel (blanko)

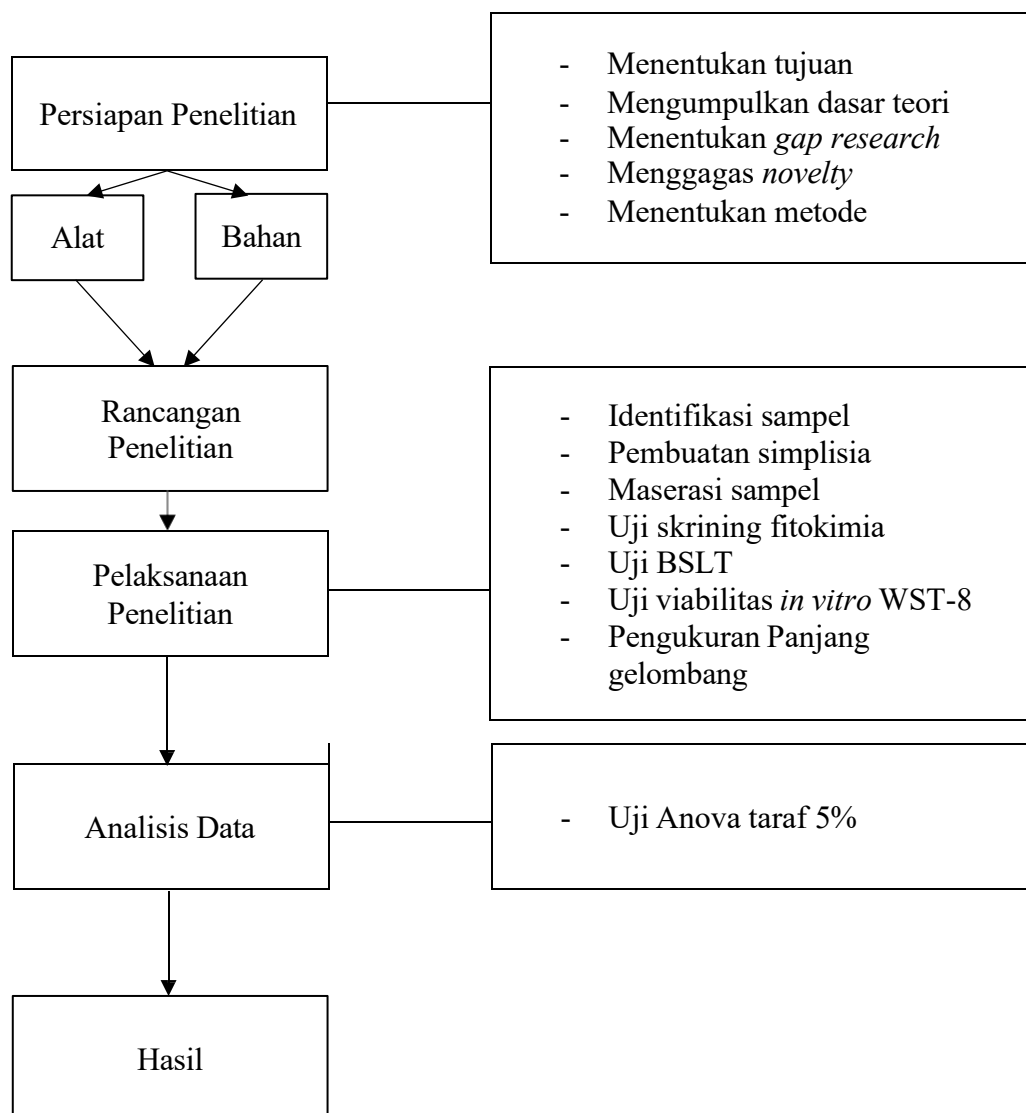
Viabilitas sel (%) : Persentase sel yang tetap hidup setelah perlakuan

Nilai viabilitas menggambarkan kemampuan sel untuk tetap hidup setelah diberi senyawa uji. Semakin rendah, semakin toksik sampel. Hasil persentase viabilitas sel hidup dihitung nilai inhibisi sel (%) dengan rumus menurut Dojindo Laboratories (2020) sebagai berikut.

$$\text{Inhibisi sel (\%)} = 100\% - \text{Viabilitas sel (\%)}$$

Nilai persentase inhibisi sel untuk menentukan nilai IC_{50} . Penentuan dapat dilakukan input di Microsoft excel dengan presentasi viabilitas sel diubah menjadi nilai prohibit. Data yang diperoleh akan dianalisis dengan ANOVA pada taraf 5%, namun jika terdapat perbedaan akan dilanjutkan dengan beda nyata kecil (BNT) pada taraf 5%. Analisis statistik menggunakan aplikasi program IBM-SPSS versi 25.

3.6 Diagram Alir



V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Perolehan data sekunder ekstrak etanol *Enhalus acoroides* dari Perairan Ringgung mengandung metabolit sekunder seperti alkaloid, saponin, flavonoid, fenolik, tanin, dan terpenoid, yang memiliki aktivitas toksisitas dan sitotoksik sehingga menjadi potensi antikanker.
2. Ekstrak etanol *Enhalus acoroides* menunjukkan aktivitas toksik pada uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan nilai LC_{50} yaitu 248.801 ppm yang menunjukkan aktivitas toksik sedang.
3. Ekstrak etanol lamun *Enhalus acoroides* menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker melanoma B16F10 dengan nilai IC_{50} sebesar 591 ppm yang dikategorikan sebagai antikanker rendah.

5.2 Saran

Adapun saran dari penelitian ini adalah Perlu dilakukan fraksinasi dan isolasi senyawa aktif dari ekstrak *Enhalus acoroides* untuk mengetahui komponen bioaktif spesifik yang bertanggung jawab terhadap aktivitas sitotoksik yang ditemukan. Penelitian selanjutnya sebaiknya menggunakan konsentrasi sedikit lebih tinggi dari yang digunakan pada penelitian ini, sehingga akan menghasilkan nilai IC_{50} yang optimal dan viabilitas sel yang optimal. Penelitian lanjutan sebaiknya mencakup analisis jalur molekuler seperti ekspresi p53, Bax, Bcl-2, caspase-3, caspase-9, dan PARP menggunakan metode qRT-PCR atau *Western blot*

untuk mengonfirmasi mekanisme apoptosis yang diduga terlibat. Pengujian *in vivo* pada model hewan direkomendasikan untuk mengevaluasi keamanan, toksisitas sistemik, dan efektivitas biologis ekstrak, sehingga dapat memperkuat peluang pengembangan sebagai agen antikanker. Karena potensi ekstrak masih lebih rendah dibandingkan cisplatin, pengembangan kombinasi terapi (ekstrak + cisplatin/dokorubisin) dapat menjadi strategi potensial untuk meningkatkan efektivitas dan mengurangi efek samping terapi konvensional. Perlu dilakukan standarisasi metode ekstraksi, konsentrasi bahan baku, dan kontrol mutu ekstrak agar hasil dapat direproduksi dan mendekati persyaratan dalam pengembangan fitofarmaka.

\

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelhameed, R. F., Ibrahim, A. K., Yamada, K., & Ahmed, S. A. 2025. Phytochemical screening, toxicity and LC₅₀ determination of seagrass *Enhalus acoroides* methanol extract. *International Journal of Modern Pharmaceutical Research*, 9(1), 6–11.
- Ace Biolabs. *CCK-8 Cell Counting Kit*. Ace Biolabs CO., LTD. Taiwan.
- Alfonso, A. E. B., Maria, M. N. M., & Tukan, D. P. 2025. Identifikasi Senyawa Aktif Lamun *Enhalus Acoroides* Perairan Pasir Putih Pantai Besar Kabupaten Flores Timur. *Jurnal Inovasi Hasil Penelitian dan Pengembangan*. 5(3): P-ISSN : 2809-4042.
- Aktary, Z., Jeremy, H. R., Marie, P., Véronique, D., Valérie, P., & Lionel, L. 2023. Derivation and Use of Cell Lines from Mouse Models of Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* .143, 538e544.
- Anwar, K., Lokana, F. M., & Budiarti, A. 2022. Antioxidant Activity of Dewandaru Leaf (*Euglena uniflora* L) Ethanol Extract and Determination of Total Flavonoid and Phenolic Content. *Jurnal Ilmiah Sains*. 22(2): 161-171.
- Apalla, Z., Lallas, A., Sotiriou, E., Lazaridou, E., & Ioannides, D. 2017. Epidemiological trends in skin cancer. *Dermatology Practical & Conceptual*, 7(2), 1–6.
- Arifudin, M. 2013. Sitotoksisitas Bahan Aktif Lamun dari Kepulauan Spermonde Kota Makasar Terhadap *Artemia salina*. *Skripsi*. Universitas Hassanuddin. Makasar.
- Bareta, A. R., Widiastuti, E.L., & Nurcahyani, N. 2023. Uji Sitotoksisitas Taurin dan Ekstrak Etanol Makroalga Cokelat Dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). *Berita Biologi*. 22(2): 153-157.
- Bibi, Y., Kanwal, S., Ilyas, N., & Chaudhary, M. F. 2020. Bioactive Compounds from Seagrasses and their Pharmacological Significance. *Journal of Applied Phycology*, 32(4), 2581–2595.

- Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E., & Soerjomataram, I. 2021. The ever-Increasing Importance of Cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*, 127(16), 3029–3030.
- Campbell, H. A., & Reece, J. B. 2010. *Biologi jilid I*. Ed. 8. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Cancer Cemoprevention Riset Center (CCRC) Farmasi UGM. 2009. *Prosedur Tetap Kerja In vitro*, Fakultas Farmasi UGM .
- Cancer Cemoprevention Riset Center (CCRC). 2009. *Perhitungan Sel*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.
- Cancer Cemoprevention Riset Center (CCRC). 2009. *Uji Sitotoksik Metode MTT*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.
- Cancer Cemoprevention Riset Center (CCRC). 2013. *Prosedur Uji Sitotoksik dengan Metode MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazoliumbromida*. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Chamcoy, K., Pakotiprapha, D., Pumirat, P., Leartsakulpanich, U., and Booyouen, U. 2019. Application of WST-8 Based Colorimetric NAD(P)H Detection for Quantitative Dehydrogenase Assays for Cancer Drug Screening: Methodological Insight and Considerations for Reliable Assessment in Drug Discovery. *Brazilian Journal of Biology*, 84: 1-13.
- Chaudhry, G. E., M. D., Akim, A., Sung, Y. Y., & Sifzizul, T. M. T. 2022. Cancer and Apoptosis: The Apoptotic Activity of Plant and Marine Natural Products and their Potential as Targeted Cancer Therapeutics. *Front Pharmacol*. 10;13:842376.
- Damsky, W. E., Theodosakis, N., & Bosenberg, M. 2014. Melanoma Metastasis: New Concepts and Evolving Paradigms. *Oncogene*, 33(19), 2413–2422.
- Danciu, C., Alexandra, F., Cristina, D., Codruta, S., Heinfried, R., Lucian, B. T., Florina, B., Simona, C. P., & Melania, F. M. 2013. A Characterization of Four B16 Murine Melanoma Cell Sublines Molecular Fingerprint and Proliferation Behavior. *Cancer Cell International* 2013, 13:75.
- 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.
- Dojindo Laboratories. 2020. *Cell Counting Kit-8 (WST-8) Technical Manual*.
- 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.
- Eggermont, A. M., & Schadendorf, D. 2014. Melanoma Immunotherapy and Personalized Medicine. *Cancer Journal*, 20(2), 117–123.
- Febry, S. I. M., Mohammad, M., Uun Y., & Endang, Y. H. 2020. Evaluation of Phytochemical and Superoxide Dismutase Activities of *Enhalus Acoroides* (L.f.) Royle from coastal waters of North Sulawesi, Indonesia. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916.
- Freshney, R. I. 2016. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (7th ed.)*. John Wiley & Sons.
- Gershenwald, J. E., Scolyer, R. A., & Hess, K. R. 2017. Melanoma Staging: Evidence-based Changes in The American Joint Committee on Cancer Eight Edition Cancer Staging Manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(6), 472–492.
- Green, E. P., & Short, F. T. 2016. *World Atlas of Seagrasses*. University of California Press.
- Hamidi, M. R., Jovanova, B. & Panovska, T. K. 2014. Toxicology Evaluation of The Plan Products Using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*. 60(1): 9-11.
- Hanahan, D. 2022. Hallmarks of Cancer: New dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46.
- Haqq, C., Nosrati M., & Sudin, R. 2022. Molecular Biology of Melanoma: An Update on Tumor Biology, Biomarkers, and Therapeutic Advances. *Seminars in Oncology*, 49(3), 196–210.
- Hendaria, M. P., Asmarajaya, A. A. G. N., & Maliawan, S. 2013. *Kanker Kulit*. Denpasar: Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.
- Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., Imielinski, M., Theurillat, J. P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., Dicara, D., Ramos, A. H., Lawrence, M. S., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Voet, D., Saksena, G., Stransky, N., Onofrio, R. C., Winckler, W., & Chin, L. 2012. A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell*. 150(2), 251–263.
- Horn, S., Figl, A., Rachakonda, P. S., Fischer, C., Sucker, A., Gast, A., & Kumar, R. 2013. TERT Promoter Mutations in Familial and Sporadic Melanoma. *Science*. 339(6122), 959–961.

- Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., Ohkura, Y., & Ueno, K. 2019. A Highly Water-Soluble Disulfonated Tetrazolium Salt as A Chromogenic Indicator for NADH as Well as Cell Viability. *Talanta*. 44, 1299–1305.
- Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., & Ueno, K. 1996. A Combined Assay of Cell Viability and Cytotoxicity with A Highly Water-Soluble Tetrazolium Salt. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19(11), 1518–1520.
- Isnaini, I., & Aryawati, R. 2023. Struktur Komunitas Lamun di Teluk Lampung. *Buletin Oseanografi Marina*, 12(1), 13–22.
- Isnansetyo, A., & Kurniastuty. 1995. *Teknik Kultur Phytoplankton Zooplankton. Pakan Alam Untuk Pembenihan Organisme laut*. Yogyakarta: Kanisius.
- Julyasih, K. S. M. 2022. Senyawa Bioaktif Beberapa Jenis Rumput Laut dan Akriviyas Penghambatan Terhadap Jamur *Aspergillus flavus* pada Tanaman Jagung (*Zea Mays* L.) *Jurnal Perikanan*. 12(3): 450-456.
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. 2020. Guidelines for Cell Viability Assays. *Food Frontiers*. 1: 332-349.
- Kamran, S., Sinniah, A., Abdulghani, M. A. M., & Alshawash, M. A. 2022. Therapeutic Potential of Certain Terpenoids as Anticancer Agents: A Scoping Review. *Cancers*. 14(5): 1-46.
- Khairunnisa. I. 2026. Uji Aktivitas Antikanker Secara *In Vitro* dari Ekstrak Etanol Lamun (*Enhalus Acoroides*) dan Taurin dengan BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) Serta Pada Kultur Sel Line Kanker Payudara MDA-MB-231. Thesis. Universitas Lampung.
- Khairunnisa, I., Widiastuti, E. L., Nurcahyani, N., & Rosa, E. 2025. Unresponsiveness of *Enhalus acoroides* Ethanolic Extract on MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line. *ICSIGER-International Conference on Science and Emerging Technology*. 1(1) 2025.
- Klaassen, C. D. 2019. *Casarett & Doull's toxicology: The basic science of poisons (9th ed.)*. McGraw-Hill Education.
- Lisdawati, V., Wiryowigdagdo, S., dan Kardono, L.B. 2006. Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dari Berbagai Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*). *Bul. Penelitian Kesehatan*. 34(3): 111-118.
- Mahmiah, Sa'adah, N., Sunur, H. N., & Wijayanti, N. 2023. Profil Metabolit Ekstrak Etanol *Enhalus acoroides* (Linn. F) Royle, 1839 dari Nusa Tenggara Timur. *Journal of Marine Research*. 12(1). 151-160.

- Mentor, R. Hamidi, Blagica, J., & Tatjana, K. P. 2014. Toxicological Evaluation of The Plant Products Using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) Model. *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 60 (1) 9 - 18 (2014) ISSN 1409 - 8695 UDC: 615.322.099.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45(5), 31–34.
- Moeljopawiro, S., Elvi, R. P. W., & Ary, K. 2025. Aktivitas Sitotoksik Fraksi Gabungan dan Peran Sinergisme dalam Metabolit Tanaman. *Jurnal Penelitian Sains*, 2025. 18(3): 18320-111.
- Mohamed, S. I. A. M., Ghada H. E., Amgad E. I. S., Shaymaa M.M.Y., & Walaa S. A. M. 2024. Cytotoxic and Apoptotic Potential of *Enhalus acoroides* Against Human Breast Cancer Cell Line MCF-7. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 24, 112.
- Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.
- Narayanan, D. L., Saladi, R. N., & Fox, J. L. 2020. Ultraviolet Radiation And Skin Cancer. *International Journal of Dermatology*, 59(9), 1023–1031.
- Nguyen, T., & Oh, D. Y. 2022. Immunotherapy in Cancer Treatment: Current Status and Future Perspectives. *Journal of Hematology & Oncology*, 15(1), 87.
- Nikmatul, I., Eka J., & Helena, O. H. 2018. Standarisasi Simplisia Daun Tempuyung (*Sonchi folium*) Hasil Budidaya di Ubaya Training Center Trawas Mojokerto. *Journal Of Pharmacy Science And Technology*. Volume 1 No.1. 2614-0993.
- Nordlund, L. M., Koch, E. W., Barbier, E. B., & Creed, J. C. 2018. Seagrass Ecosystem Services and Their Variability Across Genera and Geographical Regions. *PLoS ONE*, 13(10), e0190911.
- Nurafni, & Rinto. M. N. 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.

- Orno, T. G., & Rantesalu, A. 2020. In Vitro Cytotoxicity Assays of Seagrass (*Enhalus acoroides*) Methanol Extract from Soropia Coastal Waters. *Indonesian Journal of Medical Laboratory Science and Technology*, 2(1).
- Parwata, I. M. O. A. 2014. *Kanker dan Antikanker*. Denpasar: Udayana Press.
- 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*. 1(1): 66-72.
- Pohan, D. J., Marantuan, R. S., & Djojoputro, M. 2023. Toxicity Test of Strong Drug using The BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) Method. *Internatioanl Journal of Health Sciences and Research*. 13(2): 203-209.
- Postow, M. A., Sidlow, R., & Hellmann, M. D. 2018. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *New England Journal of Medicine*, 378(2), 158–168.
- Prasticha, Y. D., & Surahmaida. 2024. *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) of 96% Ethanol Extract of Ande-Ande Lumut (*Selaginella doederleineii*) Leaves. *Biospecies*, 17(2).
- Pratiwi, A. R., Willian, N. W., & Pratomo, A. 2025. Analisis Kandungan Logam Berat dan Phytochemical pada *Enhalus acoroides*. *Jurnal Zarah*. 2(1).
- Promega Corporation. 2023. *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (WST-8) Technical Manual*.
- Rahma, S., Masriani, Rahmat, R., Rini, M., & Rody, P. S. 2023. Cytotoxicity and Selectivity of Simpur Air (*Dillenia suffruticosa*) Wood Bark Extract Fractions Against Cancer Cells . *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia*. Vol. 14, No 2, Des 2023, hal 94-103. ISSN: 1979-892X
- Rahmawati, S., Hutomo, M., & Prartono, T. 2020. Status Ekosistem Lamun di Indonesia: Ancaman dan Upaya Pengelolaan. *Ilmu Kelautan: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 25(2), 85–98.
- 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.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. 2016. *Cell viability Assays*. Assay Guidance Manual, National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS).
- Robbins, S. L., & Cotran, R. S. 2021. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease* (10th ed.). Elsevier.

- Rohmawati, A., Widiastuti, E. L., & Nurcahyani, N. 2023. Uji Sitotoksitas Ekstrak Etanol Makroalga dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Berita Biologi*, 22(2).
- Sadeghizade, M., Baharara, J., Salek F., & Amini E. 2021. Assessment the Effect of *Ficus carica* Leaf Extract on B16F10 Melanoma Cancer Cells: The Roles of p53, Caspase-3 & Caspase-9 on Induction of Intrinsic Apoptosis Cascade. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.*;17(2):e117429.
- Saputra, Y. D., Widiastuti, E. L., Berliana, M. I., & Nurcahyani, N. 2024. Potensi Produk Alami Laut dari Ekstrak Etanol *Sargassum duplicatum* dan *Padina australis* secara Sitotoksik terhadap Sel HeLa. *Berita Biologi*, 23(1).
- Sebaugh, J. L. 2011. Guidelines for Accurate EC50/IC50 Estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10(2), 128–134.
- Shafiee, M. A.M., Asri, M. A. M., & Alwi, S. S. S. 2021. Review on The In Vitro Cytotoxicity Assessment in Accordance to The International Organizations for Standardization (ISO). *Mal J Med Health Sci.* 17(2): 261-269.
- Shah, S., Narang, R., Singh, V. J., Pili, G., & Nayak, S. K. 2023. A Review on Anticancer Profile of Flavonoids: Sources, Chemistr, Mechanisms, Structure-Activity Relationship and Anticancer Activity. *Curent Drug Research Reviews.* 15(2): 122-148.
- Shain, A. H., & Bastian, B. C. 2016. From Melanocytes to Melanomas. *Nature Reviews Cancer*, 16(6), 345–358.
- Sharpless, N. E., & Linda, C. 2003. The INK4a/ARF ; Locus and Melanoma. *Oncogene*, 22(20), 3092–3098.
- Short, F. T., Carruthers, T. J. B., Dennison, W. C., & Waycott, M. 2016. Global Seagrass Distribution and Diversity: A Bioregional Model. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 350(1–2), 3–20.
- Siti, M., Effionora, A., Yesi, D., & Siti, S. 2025. Optimizing Ultrasonic Extraction of *Enhalus acoroides* to Enhance Physicochemical Traits and Antioxidant Activity. *Jurnal Jamu Indonesia* (2025) 10(3): 138–144.
- Sitti, M. A., Pakaya, Opir R., & Wiwin, R.sik K. 2019. Deskripsi Pemahaman Mahasiswa Tentang Metabolit Sekunder dari Ekstrak Daun Jure Sebagai Insektisida Nabati Melalui Pembelajaran Berbasis Riset. *Jambura Journal of Educational Chemistry* Vol: 1, No 1, (31-40).
- Solis, P. N. 1993. Microwell Cytotoxicity Assay Using *Artemia salina* (Brine Shrimp). *Planta Med.* 59(3): 250-52.

- Suneka, S. & Manoranjan, T. 2021. Brine Shrimp Lethality Assay with Selected Medicinal Plants Extraxt. *Vingnanam Journal of Science*, 16(2): 14-17.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249.
- Suwarno, S., & Syarif, S. 2024. Potensi Metabolit Sekunder Lamun Sebagai Agen Antikanker. *Jurnal Biologi Laut Indonesia*, 12(2), 101–112.
- Taslina, N., Amudha, P., Vidya, R., & Poojitha, B. N. 2024. Phytochemical Screening, Antioxidant and Cytotoxic Activity of The Seagrass *Enhalus acoroides*. *African Journal of Biological Sciences*, 6(8), 1717–1731.
- Tasmin, N., Erwin., & Irawan, W. K. 2014. Isolasi, Identifikasi, dan Uji Toksisitas Senyawa Flavonoid Fraksi Kloroform dari Daun Terap (*Artocarpus odoratissimus blanco*). *Jurnal Kimia Mulawarman*. 12(1): 45-52.
- Tuapattinaya, P. M. J. & Rumahlatu, D. 2019. Analysis of Flavonoid Levels of *Enhalus acoroides* in Different Coastal Waters in Ambon Island, Indonesia. *Internatioanl Journal of Applied Biology*. 3(1): 70-80.
- Unsworth, R. K. F., Nordlund, L. M., & Cullen-Unsworth, L. C. 2018. Seagrass meadows support global fisheries production. *Conservation Letters*, 12(1), e12566.
- Vakili, S. A., George, A., Ayatollahi, S. A., Martorell, M., Ostrander, E. A., Salehi, B., Martins, N., & Rad, J. S. 2020. Phenolic Compounds, Saponins and Alkaloids on Cancer Progression: Emphasis on p53 Expression and Telomare Length. *Cell Moll Biol*. 66(4): 110-119.
- Vasan, N., Baselga, J., & Hyman, D. M. 2019. A View on Drug Resistance in Cancer. *Nature*, 575(7782), 299–309.
- Wagner, J. G. 1993. *Pharmacokinetics for The Pharmaceutical Scientist*. Lancarter – Basel: Technomic Pub.
- Wei, B. W., Liang, J. L., Hu, J. M., Mi, Y. Y., Ruan, J., Zhang, J. Z., Wang, Z. W., Hu, Q. H., Jiang, H. J., & Ding, Q. D. 2017. *WST-8 Cell Viability Assay*. Bio-Protocol.
- Whiteman, D. C., Green, A. C., & Olsen, C. M. 2016. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations Through 2031. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(6), 1161–1171.

- 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*.
- Widiastuti, R., Lestari, W., & Andayani, R. 2019. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Lamun *Enhalus acoroides* terhadap Sel Kanker HeLa. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 6(2), 123–131.
- Widiastuti, D., Warnasih, S., Mulyati, A. H., Sutanto, S., Triastinurmiatiningsih, T., Sinaga, S. E., Salam, S., Harneti, D., Lesmana, R., Supratman, U., Susianti, S., Agustine, D., & Herlina, E. 2024. Steroid Compounds of *Manihot esculenta* Crantz var. Sao Pedro Petro (Tuber) and Their Cytotoxic Effects on Melanoma Cancer Cells (B16-F10). *Trends in Sciences*, 21(4), 7591
- Wihadmadyatami, H. 2024. *Uji Sitotoksisitas Secara In vitro*. LPPT. UGM.
- Yang, C.-J., Kuo, C.-T., Wu, L.-H., Chen, M.-C., Pangilinan, C.R., Phacharapiyangkul, N., Liu, W., Chen, Y.-H., & Lee, C.-H. 2019. Eicosapentaenoic Acids Enhance Chemosensitivity Through Connexin 43 Upregulation in Murine Melanoma Models. *International Journal of Medical Sciences*, 16(5), 636–643.