

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL SARANG SEMUT (*Myrmecodia
pendens*) TERHADAP APOPTOSISSEL HeLa (Sel Kanker Leher Rahim)**

Karya Tulis Ilmiah

Untuk memenuhi sebagian persyaratan

Mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Oleh :

Didit Fajar Nugroho

01.209.5871

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG**

2013

KARYA TULIS ILMIAH
**PENGARUH EKSTRAK ETANOL SARANG SEMUT (*Myrmecodia*
pendens) TERHADAP APOPTOSIS SEL HeLa (Sel Kanker Rahim)**

Yang dipersiapkan dan disusun oleh:

Didit Fajar Nugroho

01.209.5871

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
pada tanggal 06 Maret 2013
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I

Anggota Tim Penguji I

Dra. Atina Husaana, M.Si. Apt.

Dina Fatmawati, S.Si.

Pembimbing II

Anggota Tim Penguji II

Drs. Israhnanto Isradji, M.Si.

dr. Andriana, Sp.THT-KL.,M.Si.Med

Semarang, Maret 2013
Fakultas Kedokteran
Universitas Islam Sultan Agung
Dekan,

dr. H. Iwang Yusuf, M.Si

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Didit Fajar Nugroho

NIM : 01.209.5871

Dengan ini menyatakan bahwa Karya Tulis Ilmiah yang berjudul :

“PENGARUH EKSTRAK ETANOL SARANG SEMUT (*Myrmecodia pendens*) TERHADAP APOPTOSIS SEL HeLa (Sel Kanker Rahim)”

Adalah benar hasil karya saya dan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil alih seluruh atau sebagian karya tulis orang lain tanpa menyebutkan sumbernya. Jika saya terbukti melakukan tindakan plagiasi, saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan aturan yang berlaku.

Semarang, Maret 2013



(Didit Fajar Nugroho)

KARYA TULIS ILMIAH
PENGARUH EKSTRAK ETANOL SARANG SEMUT (*Myrmecodia pendens*)
TERHADAP APOPTOSIS SEL HeLa (Sel Kanker Rahim)

Yang dipersiapkan dan disusun oleh:

Didit Fajar Nugroho

01.209.5871

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji


pada tanggal 06 Maret 2013

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I

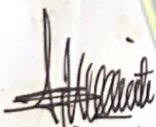
Anggota Tim Penguji I

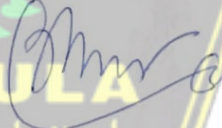

Dra. Atina Husaana, M.Si. Apt.


Dina Fatmawati, S.Si., M.Sc



Pembimbing II

Anggota Tim Penguji II


Drs. Israhanto Isradji, M.Si.


dr. Andriana, Sp.THT-KL..M.Si.Med

Semarang, Maret 2013
Fakultas Kedokteran
Universitas Islam Sultan Agung
Dekan,



dr. H. Iwang Yusuf, M.Si

PRAKATA

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Alhamdulillahirabbil'alamin, segala puji syukur kepada Allah SWT atas limpahan berkah dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah dengan judul, "**PENGARUH EKSTRAK ETANOL SARANG SEMUT (*Myrmecodia pendens*) TERHADAP APOPTOSIS SEL HeLa (Sel Kanker Rahim)**" ini dapat terselesaikan.

Tujuan dari penyusunan karya tulis ilmiah ini adalah untuk memenuhi tugas dan melengkapi syarat dalam menempuh program pendidikan sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang atas selesainya penyusunan karya tulis ilmiah ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Iwang Yusuf, M.Si, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. Dra. Atina Husaana, M.Si., Apt., dan Drs. Israhnanto Isradji, M.Si selaku dosen pembimbing I dan II yang telah dengan sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya Karya Tulis Ilmiah ini.
3. Dina Fatmawati, S.Si., M.Sc. dan dr. Andriana, Sp.THT-KL.,M.Si.Med., selaku dosen penguji yang telah dengan sabar meluangkan waktu dan pikiran untuk mengarahkan dan membimbing penulis hingga terselesaikannya Karya Tulis Ilmiah ini.

4. Staf dan Pengurus Laboratorium Parasitologi Universitas Gajah Mada (UGM) Yogyakarta yang telah membantu dalam penelitian ini.
5. Kedua orangtua saya, ayahanda tercinta (Alm)Drs. Bambang Purwanto. MM., dan Ibunda tercinta Dra. Ernawati. MM., Kedua saudara saya Oktino Valen Dewanto dan Fernanda Julio Caesar , untuk kakek kami tercinta kami Drs. Daliman. M.Pd., dan seluruh keluarga yang telah memberikan doa, dukungan, fasilitas dan motivasi selama penyusunan karya tulis ilmiah ini.
6. Prima Ayu Oktavia tercinta yang selalu mendampingi kami setiap saat dan selalu memberi semangat dan motivasi agar menyelesaikan karya tulis ilmiah ini.
7. Sahabat-sahabat terkasih dan keluarga Mumtaaz 2009 yang telah mendukung penulis dalam menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah ini.

Sebagai akhir kata dari penulis, penulis berharap semoga Karya Tulis Ilmiah ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Semarang, Maret 2013

Penulis

DAFTAR ISI

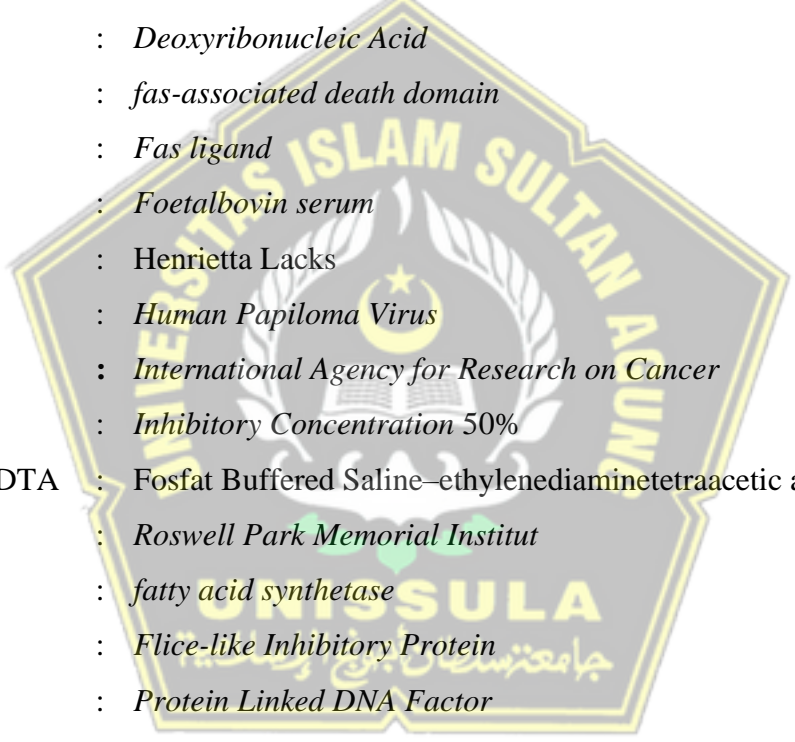
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
SURAT PERNYATAAN.....	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR SINGKATAN	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
INTISARI.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.3.1. Tujuan Umum.....	3
1.3.2. Khusus	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
1.4.1. Manfaat Teoritis	3
1.4.2. Manfaat praktis	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1. Kanker Leher rahim.....	4
2.1.1. Sel HeLa	5

2.1.2. Faktor yang mempengaruhi sel HeLa.....	7
2.2. Apoptosis.....	8
2.2.1. Apoptosis Fisiologis	8
2.2.2. Apoptosis Patologis	9
2.3. Sarang semut (<i>myrmecodia pendens</i>).....	13
2.3.1. Biologi	13
2.3.2. Taksonomi	14
2.3.3. Kandungan sarang semut	14
2.4. Efek Apoptosis sarang semut terhadap Sel HeLa.....	15
2.5. Kerangka Teori	18
2.6. Kerangka Konsep	18
2.7. Hipotesis	18
BAB III METODE PENELITIAN	19
3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian	19
3.2. Variabel dan Definisi Operasional	19
3.2.1. Variabel	19
3.2.2. Definisi Operasional	19
3.3. Populasi dan Sampel	20
3.3.1. Populasi	20
3.3.2. Sampel	20
3.4. Alat dan Bahan Penelitian	20
3.4.1. Alat Penelitian	20
3.4.2. Bahan Penelitian	21

3.5. Cara Penelitian	21
3.5.1. Ekstraksi Sarang Semut	21
3.5.2. Kultur Sel HeLa.....	22
3.5.3. Uji Apoptosis	23
3.6. Tempat dan Waktu	24
3.7. Analisis Hasil.....	24
3.8. Alur Penelitian.....	25
BAB IV HASIL PENELITIAN dan PEMBAHASAN.....	26
4.1. Hasil Penelitian	26
4.2. Pembahasan	32
BAB V KESIMPULAN dan SARAN.....	35
5.1. Kesimpulan.....	35
5.2. Saran	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN.....	38



DAFTAR SINGKATAN



AIF	: <i>apoptosis initiating factor</i>
Apaf-1	: <i>Apoptosis activating factor-1</i>
Bax	: <i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl - 2	: <i>B- cell lymphoma 2</i>
Bcl – XL	: <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
Caspase	: <i>Cysteiny, aspartate-spesific protease</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FADD	: <i>fas-associated death domain</i>
FasL	: <i>Fas ligand</i>
FBS	: <i>Foetalbovin serum</i>
HeLa	: <i>Henrietta Lacks</i>
HPV	: <i>Human Papiloma Virus</i>
IARC	: <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC50	: <i>Inhibitory Concentration 50%</i>
PBS-EDTA	: <i>Fosfat Buffered Saline–ethylenediaminetetraacetic asam</i>
RPMI	: <i>Roswell Park Memorial Institut</i>
Fas	: <i>fatty acid synthetase</i>
FLIP	: <i>Flice-like Inhibitory Protein</i>
PLDB	: <i>Protein Linked DNA Factor</i>
HT-29	: <i>Human colon adenocarcinoma grade II cell line</i>
Caco-2	: <i>Continuous Line of Heterogeneous Human Epithelial Colorectal Adenocarcinoma Cells</i>
MCM-B2	: <i>Canine Mammary Tumour</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
CIN	: <i>Cervical Intra-epithelial Neoplasia</i>

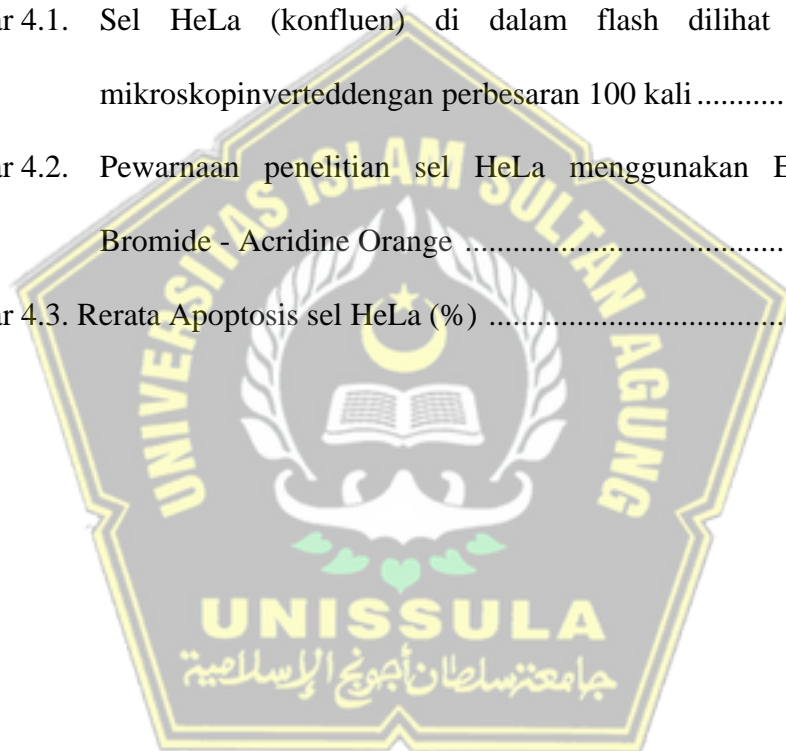
DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Rerata sel yang mengalami apoptosis	29
Tabel 4.2. Data hasil uji Normalitas dan Levene's Test	30
Tabel 4.3. Data Hasil Uji <i>Mann-whitney U</i>	31



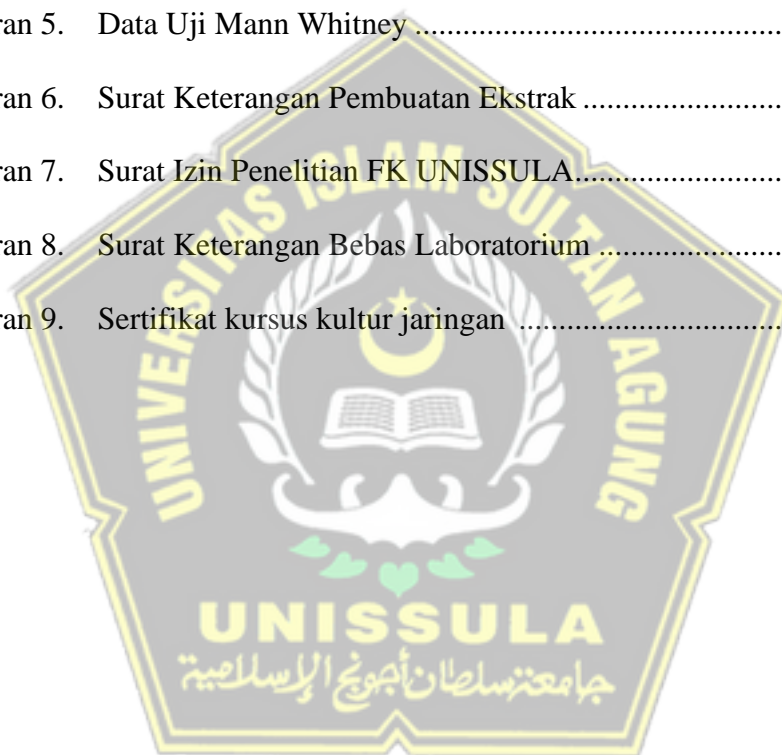
DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Jalur ekstrinsik apoptosis	11
Gambar 2.	Jalur intrinsik apoptosis	12
Gambar 3.	Taksonomi sarang semut	14
Gambar 3.1.	Peta perlakuan pada <i>wheel plate</i>	23
Gambar 4.1.	Sel HeLa (konfluen) di dalam flash dilihat dengan mikroskop inverted dengan perbesaran 100 kali	27
Gambar 4.2.	Pewarnaan penelitian sel HeLa menggunakan Ethidium Bromide - Acridine Orange	28
Gambar 4.3.	Rerata Apoptosis sel HeLa (%)	30



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Data hasil pengamatan.....	38
Lampiran 2.	Data Analisis uji Normalitas	39
Lampiran 3.	Data Analisis <i>Levene's test</i>	40
Lampiran 4.	Data Uji Kruskal-Wallis	41
Lampiran 5.	Data Uji Mann Whitney	41
Lampiran 6.	Surat Keterangan Pembuatan Ekstrak	46
Lampiran 7.	Surat Izin Penelitian FK UNISSULA.....	47
Lampiran 8.	Surat Keterangan Bebas Laboratorium	48
Lampiran 9.	Sertifikat kursus kultur jaringan	49



INTISARI

Kanker servik adalah tumor ganas yang tumbuh di dalam leher rahim, dan pengobatan kanker tergolong mahal dan mempunyai efek samping yang berat. Ekstrak etanol sarang semut diketahui memiliki kandungan senyawa flavonoid dan tanin. Ekstrak etanol sarang semut belum diketahui mekanisme efek sitotoksiknya pada jalur apoptosis sel HeLa. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari efek apoptosis ekstrak etanol sarang semut (*Myrmecodia pendens*) terhadap sel HeLa.

Jenis penelitian quasi eksperimental dengan *design post test only control group design* ini menggunakan Sel HeLa yang dibagi menjadi lima kelompok. Kelompok pertama (Sel HeLa hanya diberimedia kultur), kelompok kedua (Sel HeLa diberimedia kultur dan ekstrak etanol sarang semut konsentrasi 112 µg/ml), kelompok ketiga (Sel HeLa diberimedia kultur dan ekstrak etanol sarang semut konsentrasi 224 µg/ml), kelompok keempat (Sel HeLa diberimedia kultur dan ekstrak etanol sarang semut konsentrasi 448 µg/ml), dan kelompok kelima (Sel HeLa diberimedia kultur dan doksorubisinkonsentrasi 5,6 µg/ml). Uji apoptosis dinilai dengan jumlah perbandingan sel yang mengalami apoptosis dibandingkan dengan jumlah sel seluruhnya dikalikan 100% dengan menggunakan pewarnaan *Ethidium Bromide – Acridine Orange* kemudian dilihat menggunakan mikroskop *Flourescent*.

Rerata apoptosis sel HeLa pada kelompok pertama 0,41%, rerata apoptosis sel HeLa pada kelompok kedua 32,5%, rerata apoptosis sel HeLa pada kelompok ketiga 46,1%, rerata apoptosis sel HeLa pada kelompok keempat 65,07%, rerata apoptosis sel HeLa pada kelompok kelima 31,67%.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etanol sarang semut (*Myrmecodia pendens*) berpengaruh terhadap apoptosis sel HeLa. Rerata prosentase apoptosis kelompok kedua setara dengan kelompok kelima, sedangkan rerata kelompok ketiga dan keempat lebih tinggi.

Kata kunci : Kanker Leher Rahim, sel HeLa, apoptosis, Ekstrak etanol sarang semut (*Myrmecodia pendens*).

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sarang semut (*Myrmecodia pendens*) banyak diteliti sebagai antikanker, penelitian dengan menggunakan ekstrak etanol sarang semut (*Myrmecodia pendens*) memiliki efek sitotoksik terhadap sel HeLa. Ekstrak etanol sarang semut (*Myrmecodia pendens*) dapat berpotensi sebagai antikanker dengan menghambat proliferasi dan meningkatkan apoptosis (Puspitasari, 2012). Sel HeLa merupakan sel epitelial manusia yang berasal dari kanker servik atau kanker leher rahim. Kanker servik adalah tumor ganas yang tumbuh di dalam leher rahim, yaitu suatu daerah pada organ reproduksi wanita yang merupakan pintu masuk ke arah rahim yang terletak antara uterus dengan liang senggama (Soeksmanto *et al*, 2010).

Saat ini prevalensi kanker serviks berada pada urutan ketiga dengan 530.232 kasus baru di dunia pada tahun 2008 (IARC, 2010). Indonesia saat ini diperkirakan terdapat 100 kasus baru setiap 100.000 penduduk pertahun. Prevalensi kanker serviks di Provinsi Jawa Tengah dari tahun ke tahun semakin meningkat, dari 0,02% pada tahun 2006, menjadi 0,03% pada tahun 2007, dan pada tahun 2008 masih tetap 0,03%. Pada tahun 2007, prevalensi tertinggi adalah di Kota Semarang sebesar 0,22% (Depkes, 2009).

Pengobatan konvensional yang umum dilakukan pada penyakit kanker diantaranya dengan pembedahan, kemoterapi dan radioterapi (Apantaku, 2002). semua pengobatan kanker tergolong mahal dan mempunyai efek samping yang berat. Pengobatan kanker juga dapat meningkatkan resiko

pasien kanker terkena infeksi dan dapat mengancam keselamatan pasien (Wan, 2008). Pencarian agen kemoterapi dari bahan alami yang mendasarkan target aksinya pada agen pengatur pertumbuhan sangat diperlukan dalam pengobatan penyakit kanker, alasan tersebut mendasari dilakukannya penelusuran bahan-bahan alami yang berpotensi sebagai antikanker.

Tumbuhan sarang semut (*Myrmecodia pendens*) merupakan keanekaragaman hayati Indonesia yang berpotensi sebagai anti kanker. Berfungsi sebagai anti kanker pada sarang semut (*Myrmecodia pendens*) adalah flavonoid dan tannin (Subroto dan Saputro, 2006). Flavonoid berfungsi sebagai inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis dan diferensiasi, inhibisi angiogenesis, dan pembalikan resistensi multi-obat atau kombinasi dari mekanisme-mekanisme tersebut (Ren *et al.*, 2003). Tanin berfungsi untuk menghambat pertumbuhan sel kanker (Yi *et al.*, 2005). Penelitian yang dilakukan oleh Yi *et al* (2005) melaporkan bahwa fraksi flavonoid dan tanin dapat menghambat 50% pertumbuhan sel kanker pada konsentrasi 70-100 $\mu\text{g/mL}$ pada sel HT-29 dan 50-100 $\mu\text{g/mL}$ pada sel Caco-2. Sarang semut memiliki konsentrasi LC50 sebesar 33,3 $\mu\text{g/mL}$ dinilai dengan menggunakan metode *direct counting* dan konsentrasi 224 $\mu\text{g/mL}$ dengan menggunakan metode *MTT Essay* dan dihitung menggunakan *ellisa reader* (Fitri, 2013).

Penelitian dengan menggunakan ekstrak etanol sarang semut mempunyai efek sitotoksik terhadap sel HeLa dengan konsentrasi LC50 sebesar 224 $\mu\text{g/mL}$. Tujuan dari penelitian ini untuk mempelajari lebih lanjut mengenai prosentase apoptosis ekstrak etanol sarang semut (*Myrmecodia pendens*) terhadap sel HeLa secara *in vitro*.

1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat dibuat perumusan masalah : “Apakah ekstrak etanol sarang semut (*Myrmecodia pendens*) dapat meningkatkan prosentase apoptosis pada sel HeLa?”

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh ekstrak etanol sarang semut (*Myrmecodia pendens*) terhadap apoptosis se HeLa.

1.3.2 Tujuan Khusus

Mengetahui perbedaan rerata prosentase apoptosis sel HeLa dengan menggunakan ekstrak etanol sarang semut (*Myrmecodia pendens*) pada berbagai kelompok konsentrasi.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

1.4.1.1 Hasil penelitian ini dapat meningkatkan bahan kajian mengenai potensi antikanker *Myrmecodia pendens*

1.4.1.2 Sebagai bahan rujukan untuk penelitian lebih lanjut.

1.4.2 Manfaat Praktis

Memanfaatkan sarang semut (*Myrmecodia pendens*) sebagai zat antikanker yang efisien bagi kesehatan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kanker Leher rahim

Pertumbuhan kanker leher rahim membutuhkan beberapa tahun sejak sel-sel leher rahim mengalami perubahan. Sel-sel leher rahim yang abnormal dapat berkembang menjadi kanker leher rahim disebut *cervical intra-epithelial neoplasia* (CIN). CIN juga disebut sebagai sel-sel prekanker jika tidak ditangani lebih lanjut akan berpotensi menjadi kanker, namun tidak semua wanita yang memiliki CIN akan menderita kanker. Keberadaan CIN identik dengan displasia (Heffner and Schust, 2002). Kanker leher rahim adalah tumor ganas yang tumbuh di organ reproduksi wanita pada leher uterus, antara uterus dan vagina. Penyebab utama kanker leher rahim adalah HPV (Human Papiloma Virus), virus ini ditularkan secara seksual. Terdapat 3 golongan HPV menurut risiko terjadinya kanker leher rahim (Puspitasari, 2012).

Fase perkembangan kanker leher rahim meliputi displasia ringan (5 tahun), displasia sedang (3 tahun), displasia berat (1 tahun) sampai menjadi kanker stadium 0. Tahap pra kanker tidak menimbulkan gejala, tahap kanker invasif kanker stadium I sampai stadium IV menimbulkan gejala (Jones, 2007). Insiden kanker serviks berada di bawah kanker payudara dalam tumor ganas pada wanita. Di seluruh dunia setiap tahun terdapat sekitar 500.000 kasus baru atau 5% dari seluruh kasus baru tumor ganas. Insiden kanker

serviks invasif di berbagai negara bervariasi sangat besar. Data akhir tahun 1980 menunjukkan Kolombia merupakan area insidensi tinggi di dunia, insidensi terstandarisasi adalah 48,2/100.000 sedangkan Israel paling rendah. Laporan gabungan mortalitas disesuaikan untuk kanker serviks dari 50 negara selama 1986-1988 yang tertinggi adalah Meksiko(14,7/100.000) merupakan 24,5 kali lipat yang terendah yaitu Thailand (0,6/100.000)(Wan, 2008).

Kanker serviks paling banyak diderita oleh wanita di Indonesia dan angka kematian akibat kanker tersebut di Indonesia pun cukup tinggi. Prevalensi kanker serviks di Provinsi Jawa Tengah dari tahun ke tahun semakin meningkat, dari 0,02% pada tahun 2006, menjadi 0,03% pada tahun 2007, dan pada tahun 2008 masih tetap 0,03%. Pada tahun 2007, prevalensi tertinggi adalah di Kota Semarang sebesar 0,22% (Depkes, 2009).

2.1.1. Sel HeLa

Sel ini pertama kali dikenalkan oleh George Gey di Universitas John Hopkins (1951). Sel ini diisolasi dari sel kanker serviks wanita penderita kanker serviks bernama Henrietta Lacks yang berusia 31 tahun. HeLa bersifat imortal yang tidak dapat mati karena tua dan dapat membelah secara tidak terbatas selama memenuhi kondisi dasar bagi sel untuk tetap hidup masih ada. Strain-strain baru dari sel HeLa telah dikembangkan dalam berbagai macam kultur sel, tetapi semua sel HeLa berasal dari keturunan yang sama. Sel HeLa telah mengalami transformasi akibat infeksi human papillomavirus 18

(HPV 18) dan berbeda dengan sel serviks yang normal (Brendan *et al.*, 2009).

Sel kanker serviks yang diinfeksi HPV ini diketahui mengekspresikan dua onkogen, yaitu E6 dan E7. Protein E6 dan E7 terbukti dapat menyebabkan sifat immortal pada kultur primer keratinosit manusia, tetapi sel yang immortal ini tidak bersifat tumorigenik hingga suatu proses genetik terjadi, jadi viral onkogen tersebut tidak secara langsung menginduksi pembentukan tumor, tetapi menginduksi serangkaian proses deregulasi siklus pertumbuhan sel inang yang pada akhirnya dapat menyebabkan sifat kanker (Goodwin dan DiMaio, 2000).

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

Sebagian besar sel kanker serviks, termasuk sel HeLa, mempunyai gen p53 dan p105Rb dalam bentuk *wild type*, jadi gen pengatur pertumbuhan yang aktif dalam sel normal ini juga terdapat

dalam sel kanker serviks. Aktivitas sel kanker serviks dihambat oleh ekspresi protein E6 dan E7 dari HPV (Goodwin dan DiMaio, 2000).

Sel HeLa dapat tumbuh dengan agresif dalam media kultur. Media yang digunakan adalah media RPMI 1640-serum. Di dalamnya terkandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan, yaitu asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum yang ditambahkan mengandung hormon-hormon yang mampu memacu pertumbuhan sel. Albumin berfungsi sebagai protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral berfungsi sebagai kofaktor enzim (John, 2000).

2.1.2. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan sel HeLa

2.1.2.1. Kontaminasi bakteri

Cara menghindari faktor perancu bakteri maka setiap tindakan yang dilakukan selalu steril, dan penelitian selalu dilakukan di ruangan steril.

2.1.2.2. Suhu

Sel HeLa dapat tumbuh di suhu 0 - 70⁰ C, dan sangat efektif tumbuh pada suhu 37,5⁰ C.

2.1.2.3. pH

Untuk mengatur keasaman maka sel HeLa dimasukkan ke dalam inkubator diatur dengan konsentrasi CO₂ 5% untuk mempertahankan PH antara 7,4-7,7

2.1.2.4. Nutrisi

Sel HeLa membutuhkan nutrisi yang cukup seperti protein, glukosa, vitamin, lipid, albumin, mineral, ion-ion, serta hormon pertumbuhan (Freshney, 2006).

2.2. Apoptosis

Apoptosis adalah tipe kematian sel terprogram yang terjadi pada kondisi fisiologis maupun patologis. Tujuan utama apoptosis adalah membuang sel yang telah rusak atau tidak diperlukan lagi oleh tubuh tanpa menimbulkan kerusakan atau stres terhadap sel tetangganya (Kumar *et al*, 2005).

Apoptosis terutama terjadi pada embriogenesis, pertumbuhan, dan maturasi organ. Apoptosis dapat meningkat atau berkurang pada beberapa penyakit. Apoptosis dapat meningkat pada penyakit neurodegeneratif, trauma iskemik sesudah infark miokard, dan stroke. Apoptosis dapat berkurang pada keadaan *Systemic Lupus Erythematosus*, *rheumatoid arthritis*, dan keganasan (Kumar *et al*, 2005 ; Dash *et al*, 2007).

Apoptosis adalah tipe kematian sel terprogram yang terjadi pada kondisi fisiologis maupun patologis. Kematian sel (apoptosis) ini dibedakan menjadi dua kelompok sebagai berikut :

2.2.1. Apoptosis Fisiologis

Apoptosis fisiologis, yaitu kematian sel yang terprogram (*programmed cell death*). Proses kematian sel ini berkaitan erat dengan suatu enzim yang dikenal dengan telomerase. Pada sel embrional enzim ini mengalami aktivasi, sedangkan pada sel somatik

enzim ini tidak mengalami aktivasi, kecuali sel yang bersangkutan mengalami transformasi menjadi ganas.

Telomer yang terletak pada ujung kromosom merupakan salah satu faktor yang sangat penting dalam melindungi kromosom. Pada sel normal, telomer ini akan mengalami pemendekan pada waktu sel melakukan pembelahan diri. Ukuran telomer dapat mencapai suatu ukuran tertentu (level kritis) sebagai akibat pembelahan berulang, maka sel tersebut tidak dapat melakukan pembelahan diri lagi. Akan terjadi fragmentasi kromosom dan akhirnya sel akan mengalami apoptosis secara fisiologis (Sudiana, 2008).

2.2.2. Apoptosis Patologis

Proses apoptosis dapat dibagi menjadi 2 fase, yaitu fase inisiasi (pengaktifan caspase) dan fase eksekusi (kematian sel oleh caspase aktif) (Kumar *et al*, 2005). Caspase (*cysteinyl, aspartate-specific protease*) adalah keluarga protease yang terdapat di sitosol dalam bentuk inaktif. Menjadi bentuk aktif dengan cara pro-caspase harus dipotong secara proteolitik pada residu-residu aspartat tertentu sehingga menghasilkan enzim yang aktif. Pengaktifan caspase “inisiator” berikatan dengan molekul adaptor yang memfasilitasi proses tersebut. Caspase “inisiator” aktif kemudian mengaktifkan caspase “eksekutor” (Kasibhatla dan Tseng, 2003).

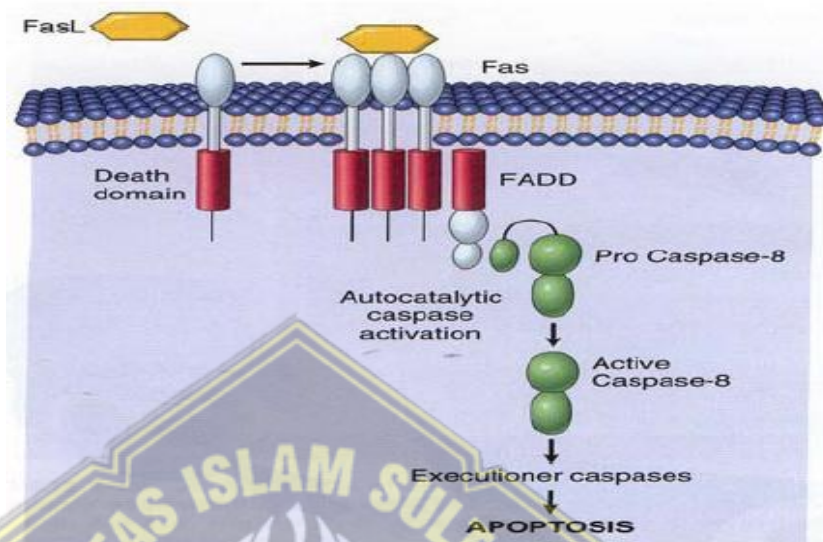
Mekanisme apoptosis dibagi menjadi 2 yaitu

1. Mekanisme ekstrinsik (death receptor – initiated pathways)

2. Mekanisme intrinsic (mitochondrial pathways)

Mekanisme ekstrinsik diawali oleh sel *surface death receptor* dari berbagai macam sel. *Death receptor* adalah anggota dari *tumor necrosis factor receptor family* (TNF). Beberapa TNF receptor family tidak mempunyai *cytoplasmic death domain*, mekanisme apoptosisnya sedikit diketahui. *Death receptor* antara lain adalah Type I TNF receptor (TNFR I) dan protein yang berhubungan disebut Fas (CD95). Mekanisme apoptosis diinduksi oleh death receptor diilustrasikan dengan baik oleh Fas. Diawali *Fas ligand* (FasL) melepaskan *Fas* dari ligandnya. Molekul *Fas* menuju ke sitoplasma yang terdapat death domain, tempat untuk berikatan dengan adapter protein yang juga mempunyai death domain dan disebut FADD (*fas-associated death domain*). *Fas-associated death domain*(FADD) yang dilekatkan pada *death receptors* kembali berikatan dengan inaktif dari *caspase-8* (di manusia, *caspase 10*) melalui *death domain*. Multiple pro *caspase-8* molekul kemudian dibawa ke dekatnya dan mereka saling berikatan untuk mengaktifkan *caspase-8*, yang kemudian enzim tersebut akan mengaktifkan *cascade-caspase* dengan mengikat dan meng-aktifkan *pro-caspase* yang lain serta mengaktifkan enzim yang melaksanakan *execution phase* dari apoptosis. Mekanisme apoptosis dapat dihambat oleh protein yang disebut *Flice-like Inhibitory Protein*(FLIP), yang berikatan dengan *procaspase-8* tetapi tidak dapat berikatan dan mengaktifkan enzim karena kurang mempunyai aktifitas enzim. Beberapa virus dan sel normal memproduksi FLIP dan digunakan

untuk menghambat dan memproteksi infeksi dan memproteksi sel normal dari *Fas mediated apoptosis* (Kumar *et al*, 2005).



Gambar 1 Jalur ekstrinsik apoptosis, diambil dari Kumar, *et al* (2005)

Mekanisme intrinsik diawali dari mitokondria yang disebabkan stimulus internal seperti kerusakan DNA dan stress oksidatif. Jalur intrinsik disebabkan oleh peningkatan permeabilitas mitokondria dan pelepasan molekul *pro apoptotic* ke sitoplasma. Growth factor dan *survival signal* menstimulasi produksi *anti-apoptotic members* dari Bcl-2 family. Bcl-2 family mempunyai lebih dari 20 macam protein, yang semuanya berfungsi regulasi apoptosis.

Dua protein yang berfungsi anti apoptosis adalah Bcl-2 dan Bcl-X. Protein anti-apoptosis dalam keadaan normal berada disekitar membran mitokondria dan sitoplasma. Kemampuan sel hilang untuk mempertahankan diri atau mengalami stress, Bcl-2 dan/atau Bcl-x akan menghilang dari membran mitokondria dan digantikan kelompok protein pro-apoptosis seperti Bax, Bak dan Bim. Ketika Bcl-2/Bcl-x menurun, terjadi peningkatan permeabilitas membrane mitokondria

menyebabkan keluarnya beberapa protein yang akan mengaktifkan *caspase cascade*.

Salah satu dari protein tersebut adalah *cytochrome c*. Didalam cytosol *cytochrome c* berikatan dengan Apaf-1 (apoptosis activating factor-1) dan pro caspase 9 membentuk apoptosome yang akan mengaktifkan *caspase-9*. (Bcl-2 dan Bcl-x secara langsung menghambat aktivasi Apaf-1 dan kemudian menghilang dari sel yang menyebabkan dapat terjadi aktivasi Apaf-1). Protein mitokondria yang lain seperti *apoptosis initiating factor* (AIF) memasuki sitoplasma yang akan berikatan untuk menetralkan berbagai macam inhibitor apoptosis. Hal tersebut akan mengaktifkan *caspase cascade* (Macdonalet *al*, 2004).



Gambar 2 Jalur intrinsik apoptosis, diambil dari Kumar, *et al* (2005)

Fase eksekusi (*the execution phase*), akhir dari fase apoptosis yang dibantu *proteolytic cascade*. *Caspase family* terdiri lebih dari 10 macam yang mempunyai 2 fungsi dasar yaitu *initiator caspase* seperti

caspase-8, caspase-9 dan *executioner caspase* seperti *caspase-3* dan *caspase-6*. *Executioner caspase* bekerja pada komponen sel. Berikatan dengan *cytoskeletal* dan *nuclear matrix proteins* yang menyebabkan gangguan pada *cytoskeleton* dan *breakdown* pada nukleus. Target aktivasi caspase di nukleus antara lain transkripsi, DNA replikasi dan DNA repair (Abbas dan Lichtman, 2005).

2.3. Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*)

2.3.1. Biologi

Tumbuhan Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) merupakan salah satu tumbuhan epifit dari *Hydnophytinae (Rubiaceae)* yang dapat berasosiasi dengan semut. Tumbuhan ini bersifat epifit, artinya tumbuhan yang menempel pada tumbuhan lain, tetapi tidak hidup secara parasit pada inangnya, hanya sebagai tempat menempel. Genus tumbuhan sarang semut dibagi menjadi beberapa spesies berdasarkan struktur umbinya. Ditemukan sebanyak 26 spesies sarang semut. Semua spesies dari tumbuhan tersebut memiliki batang menggelembung dan berongga-rongga serta dihuni oleh semut. Tumbuhan ini dapat ditanam dengan mudah tanpa adanya semut dan tetap membentuk batang menggelembung dan berongga-rongga secara normal (Subroto dan Saputro, 2006).

2.3.2. Taksonomi



Tumbuhan Sarang Semut diklasifikasikan dalam tingkat taksonomi sebagai berikut:

Divisi : *Tracheophyta*

Kelas : *Magnoliopsida*

Subkelas : *Lamiidae*

Ordo : *Rubiales*

Famili : *Rubiaceae*

Genus : *Myrmecodia*

Spesies : *Myrmecodia pendens* Merr. & Perry

(Subroto dan Saputro, 2006).

2.3.3. Kandungan Sarang Semut

Uji penapisan kimia dari tumbuhan Sarang Semut menunjukkan bahwa tumbuhan ini mengandung senyawa-senyawa kimia dari golongan flavonoid dan tanin. Flavonoid merupakan golongan senyawa bahan alam dari senyawa fenolik yang banyak merupakan

pigmen tumbuhan. Saat ini lebih dari 6.000 senyawa yang berbeda masuk ke dalam golongan flavonoid. Flavonoid merupakan bagian penting dari diet manusia karena banyak manfaatnya bagi kesehatan. Fungsi kebanyakan flavonoid dalam tubuh manusia adalah sebagai antioksidan sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker. Manfaat flavonoid antara lain adalah untuk melindungi struktur sel, memiliki hubungan sinergis dengan vitamin C (meningkatkan efektivitas vitamin C), antiinflamasi, mencegah keropos tulang, dan sebagai antibiotik. Flavonoid dapat berperan secara langsung sebagai antibiotik dengan mengganggu fungsi dari mikroorganisme seperti bakteri atau virus. Fungsi flavonoid sebagai antivirus telah banyak dipublikasikan, termasuk untuk virus HIV (AIDS) dan virus herpes. Flavonoid juga dilaporkan berperan dalam pencegahan dan pengobatan beberapa penyakit lain seperti asma, katarak, diabetes, rematik, migren, wasir, dan periodontitis (radang jaringan ikat penyangga akar gigi). Penelitian-penelitian mutakhir telah mengungkap fungsi-fungsi lain dari flavonoid, tidak saja untuk pencegahan, tetapi juga untuk pengobatan kanker (Subroto dan Saputro, 2006).

2.4. Efek Apoptosis sarang semut (*Myrmecodia pendens*) terhadap pertumbuhan Sel HeLa

Kandungan flavonoid dalam sarang semut diketahui mampu menginduksi terjadinya apoptosis. Flavonoid merupakan golongan senyawa

bahan alam dari senyawa fenolik. Fungsi kebanyakan dari flavonoid dalam tubuh manusia adalah sebagai antioksidan dan sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker. Flavonoid juga memiliki efek antikanker dengan mekanisme inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis dan diferensiasi, inhibisi angiogenesis serta pembalikan resistensi multi-obat atau kombinasi dari mekanisme-mekanisme tersebut (Ren *et al*, 2003).

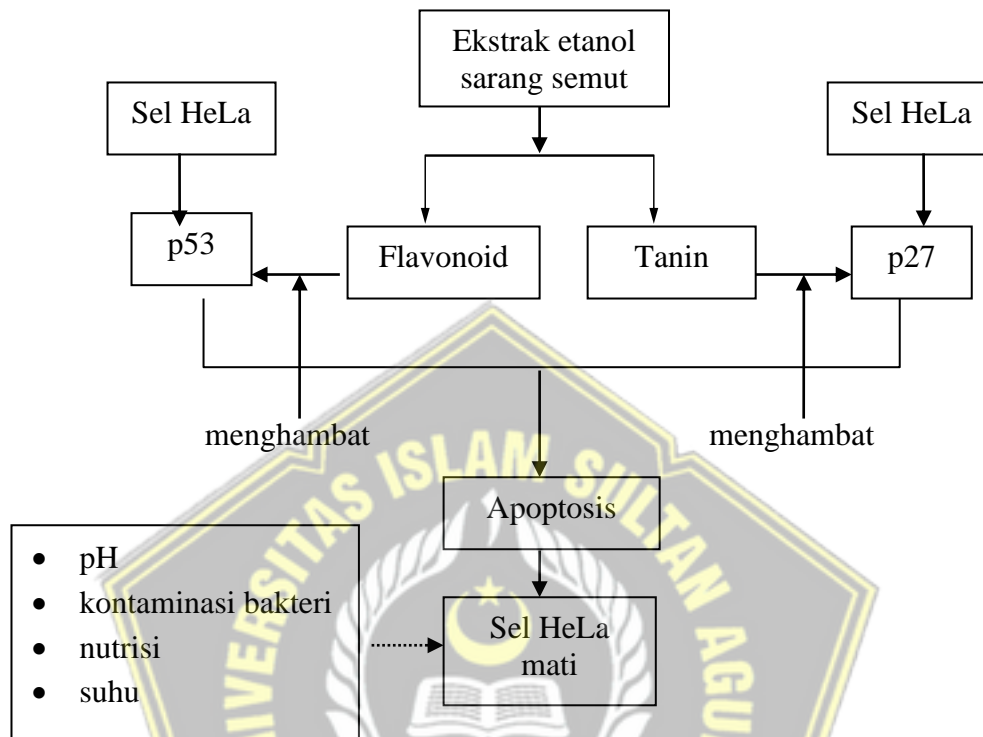
Hasil penelitian yang telah ada menunjukkan bahwa senyawa flavonoid mampu menginduksi terjadinya apoptosis, suatu mekanisme kematian sel terprogram untuk mengeliminasi sel-sel rusak dan tidak dibutuhkan lagi yang berperan penting dalam proses terjadinya kanker. Mekanisme flavonoid dalam menginduksi apoptosis terjadi melalui penghambatan ekspresi enzim topoisomerase I dan topoisomerase II. Aktivitas DNA Topoisomerase dihambat, maka proses terjadinya ikatan antara enzim dengan DNA sel kanker semakin lama. Terbentuk Protein Linked DNA Factor (PLDB), akibatnya terjadi kerusakan DNA sel kanker dan selanjutnya berpengaruh terhadap proses replikasi sel kanker. Gen p53 sebagai supresor tumor akan terakumulasi menghentikan replikasi DNA pada *check point* dan memberi kesempatan kepada DNA untuk memperbaiki diri bila proses perbaikan gagal, p53 akan merangsang mitokondria mengeluarkan sitokrom C ke sitosol dan dalam hal ini akan dihalangi oleh anti-apoptosis member yaitu gen BCL-2. Di dalam sitosol, sitokrom C bersama dengan Apoptosis Protease Activating Factor I (Apaf-I) dan procaspase 9 membentuk caspase 9, kompleks ini disebut apoptosome. Terbentuk caspase 9 sebagai caspase awal akan mengaktifkan caspase eksekutor yaitu caspase 3, 6 dan 7, sehingga

menyebabkan kematian sel secara apoptosis (Puspitasari, 2012).

Flavonoid juga berperan dalam modulasi *signalling pathways*, penurunan Bcl-2 dan Bcl-XL dan peningkatan ekspresi gen Bax dan Bak, serta aktivasi endonuklease merangsang pelepasan ekspresi gen sitokrom C dengan aktivasi caspase-3 dan -9, (Ren *et al*, 2003). Tanin dapat meningkatkan ekspresi p27 yang akan menyebabkan G1 *arrest* serta menginduksi terjadinya apoptosis jalur instrinsik melalui peningkatan ekspresi Bax (Nam *et al.*, 2001) selanjutnya mengaktifkan *downstream apoptotic effectors*, seperti caspase-3 / 7 yang menyebabkan kematian sel terprogram (Rastogi *et al.*, 2009).

Doksorubisin merupakan salah satu obat anti kanker golongan antrasiklin yang dapat berinterkalasi dengan DNA secara langsung yang akan mempengaruhi transkripsi dan replikasi. Doksorubisin mampu membentuk kompleks tripartit dengan topoisomerase II dan DNA. Topoisomerase ini penting dalam replikasi dan perbaikan DNA. Pembentukan kompleks tripartit tersebut akan menghambat penyambungan kembali *strand* DNA sehingga menyebabkan siklus sel berhenti pada fase G1 dan G2 serta memacu terjadinya apoptosis (Minotti *et al.*, 2004)

2.5. Kerangka Teori



2.6. Kerangka Konsep



2.7. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol sarang semut dapat berpengaruh terhadap apoptosis pada sel HeLa.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitianquasi eksperimental dengan rancangan penelitian : ” *Post test only control group design*”

3.2. Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Variabel

3.2.1.1. Variabel bebas

Ekstrak etanol sarang semut (*M. pendens*)

3.2.1.2. Variabel tergantung

Prosentase sel HeLa yang mengalami apoptosis

3.2.2. Definisi Operasional

3.2.2.1. Ekstrak etanol Sarang semut

Ekstrak etanol sarang semut dalam penelitian ini diperoleh dengan soxletasi menggunakan pelarut *etanol*. Ekstrak diberikan dengan konsentrasi 0 μ g/ml; 112 μ g/ml; 224 μ g/ml dan 448 μ g/ml. Dosis ditentukan sesuai dengan konsentrasi LC50 sebesar 224 μ g/ml. Konsentrasi tersebut didapatkan dari pencampuran ekstrak etanol sarang semut dengan media kultur..

Satuan : μ g/ml

Skala : Rasio

3.2.2.2. Apoptosis

Apoptosis dalam penelitian ini ditandai dengan sel HeLa yang menyerap warna etidium bromide, sel yang mengalami apoptosis berwarna orange, dan sel hidup berwarna hijau.

Dihitung dengan cara :

$$(\text{Sel apoptosis} / \text{Total sel}) \times 100\%$$

Satuan : Prosentase

Skala : Rasio

3.3. Populasi dan Sampel

3.1.1. Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah sel HeLa yang telah dikultur di Laboratorium Parasitologi FK UGM.

3.1.2. Sampel Penelitian

Sel HeLa yang ditempatkan pada *24well plate* setelah dikultur dengan kepadatan $10^4/100\mu\text{l}$.

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *flask media*, inkubator, *tissue culture cluster 96*, *nebauer hemocytometer*, mikroskop *flourescent*, labu erlenmeyer, timbangan, oven, alat ekstraksi soxlet, labu distilasi, kertas saring, *micro well*, inkubator dan pipet.

3.4.2. Bahan

Umbi sarang semut 100 gram, etanol 95%, sel HeLa, media RPMI-1640, foetal bovin serum (FBS), fungison 0,5%, penisilin streptomisin 2% atau DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), larutan tripsin, dan larutan etidium bromida acridine orange.

3.5. Cara Penelitian

3.5.1. Ekstraksi Sarang semut

Ekstraksi sarang semut diperoleh dengan cara sarang semut dihaluskans, kemudian sarang semut tersebut ditimbang sebanyak 70 gram lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 45⁰C selama 1 jam. Selanjutnya dimasukkan ke dalam pelarut etanol dan diekstraksi dengan menggunakan alat ekstraksi soxlet ± 16 flooding. Pemanas dihidupkan dan pendingin balik diaktifkan. Waktu nol dari ekstraksi ditentukan pada saat etanol mencapai titik didihnya dan diakhiri pada waktu yang telah ditentukan. Hasil ekstraksi didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring. Filtrat kemudian didestilasi sedangkan residunya dibuang. Filtrat yang diperoleh dari hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam labu distilasi untuk memisahkan ekstrak dari pelarut. Pemanas dihidupkan dan diperoleh hasilnya berupa pelarut dan residu. Residu dikeringkan di dalam oven dengan suhu 40 ⁰C untuk menghilangkan sisa etanol yang masih terdapat dalam ekstrak. Setelah itu dilakukan penimbangan sampai diperoleh berat konstan.

Pembuatan pengenceran dilakukan dengan rumus :

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan:

M = Konsentrasi

V = Volume

3.5.2. Pengkulturan Sel HeLa

Sel HeLa (ATCC) diperoleh dari laboratorium parasit Universitas Gadjah Mada. Kultur sel HeLa disimpan pada *freezing medium* dalam flask yang mengandung campuran FBS dan DMSO dengan perbandingan 9:1.

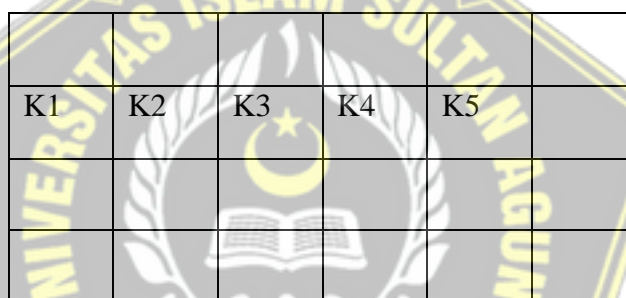
Pengkulturan dan pengsubkulturan sel dengan cara titisan-titisan sel kanker HeLa dikultur dalam medium pertumbuhan DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) yang mengandung 5% *Fetal Bovine Serum*, 1% penisilin-streptomisin, 1% fungizon dan 0,1% miramisin. Diinkubasi dalam inkubator suhu 37⁰C dengan 5% CO₂.

Subkultur dilakukan apabila sel telah mencapai konfluen 70%. Medium lama di dalam flask kultur dibuang dan sel dibasuh dengan PBS-EDTA sebanyak 3 kali. Ditambahkan larutan tripsin 0,025% (0,1 ml/cm²) ke dalam flask kultur dan diinkubasi selama 5 menit dalam inkubator pada suhu 37⁰C dengan 5% CO₂. Sel pada dasar permukaan medium yang tanggal ditambah medium pertumbuhan baru dan dibagikan menjadi beberapa flask kultur baru. Sel dieram kembali di dalam inkubator pada suhu 37⁰C dengan 5% CO₂. Semua kerja pengkulturan dan pengsubkulturan sel dilakukan secara steril di dalam *Biosafety Cabinet* kelas II.

Sel HeLa ditumbuhkan dalam kultur flask media RPMI-1640 dengan 10% FBS. Setelah konfluen 70% media diganti dan satu hari berikutnya dipanen, dikulturkan dalam tube steril, dan disentrifugasi 1200 rpm/5menit. Supernatan dibuang, pelet diresuspensi dengan media penumbuh 2 ml, dihitung kerapatan sel mencapai $10^4/100\mu\text{l}$.

3.5.3. Uji Apoptosis

Pengamatan induksi apoptosis pewarnaan etidium bromide acridine orange. Sel yang mengalami apoptosis berwarna orange, dan sel hidup berwarna hijau dengan pengamatan mikroskop *flourescent*.



K1	K2	K3	K4	K5		

Gambar 3.1. Peta perlakuan pada *micro plate 24*

Ket. : K1 = Kelompok 0 $\mu\text{g/ml}$

K2 = Kelompok 112 $\mu\text{g/ml}$

K3 = Kelompok 224 $\mu\text{g/ml}$

K4 = Kelompok 448 $\mu\text{g/ml}$

K5 = Kelompok doksorubisin 5,6 $\mu\text{g/ml}$

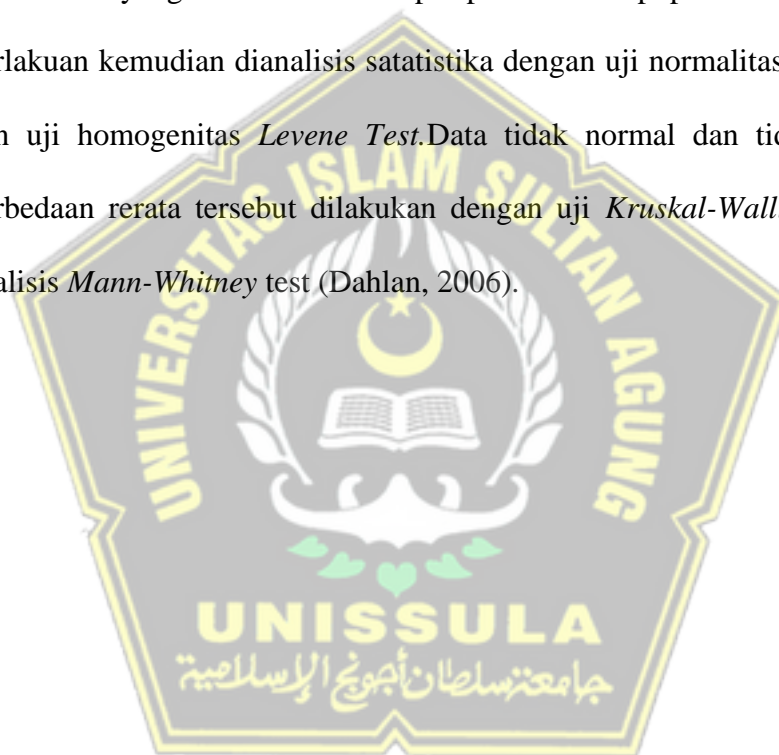
Menghitung Indeks apoptosis dengan cara tiap slide dihitung persentase sel apoptosis dari total sel HeLa pada lima lapang pandang cover slip dengan mikroskop *flourescent*, dengan cara cover slip diberi etidium bromide acridine orange setelah itu dilihat dengan mikroskop *flourescent* dengan difoto terlebih dahulu dengan kamera 12 megapixel. Dinilai dengan rumus: prosentase apoptosis (IA) = (sel apoptosis/total sel) x 100%.

3.6. Tempat dan Waktu

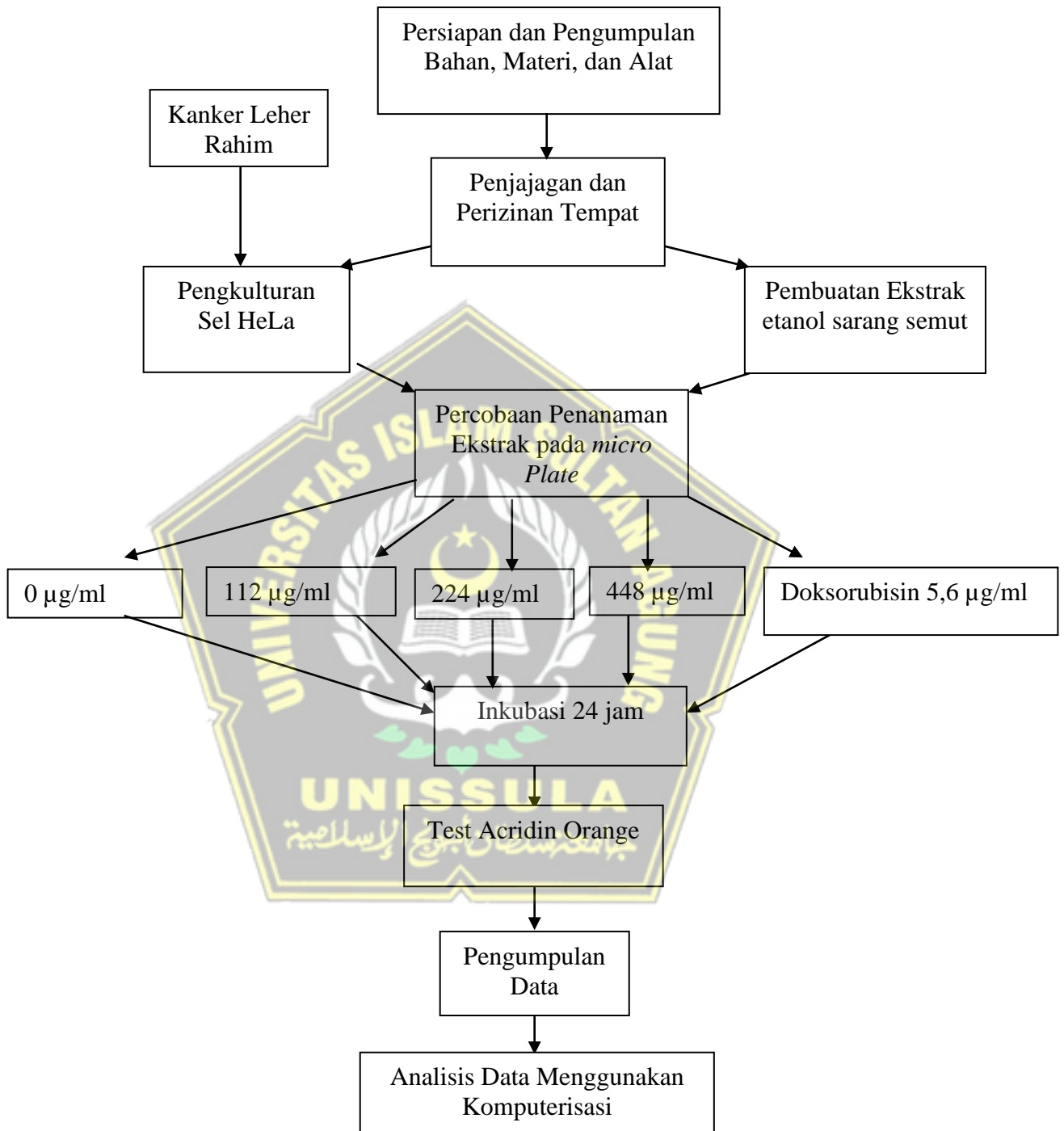
1. Tempat : Laboratorium ParasitFakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada
2. Waktu : Januari-Februari 2013

3.7. Analisa Hasil

Data yang dihasilkan berupa prosentase apoptosis tiap kelompok perlakuan kemudian dianalisis satatistika dengan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levene Test*.Data tidak normal dan tidak homogen, perbedaan rerata tersebut dilakukan dengan uji *Kruskal-Wallis*, dilanjutkan analisis *Mann-Whitney test* (Dahlan, 2006).



3.8. Alur Kerja



BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini menggunakan ekstrak etanol sarang semut dengan menggunakan pelarut etanol 95%. Pelarut etanol 95% dipilih karena diharapkan dapat menarik senyawa polar pada sarang semut, dan diantaranya flavonoid dan tanin (Puspitasari, 2011). Ekstrak sarang semut yang dipakai dalam bentuk padat atau serbuk. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak sarang semut terhadap apoptosis sel HeLa digunakan metode pewarnaan *Ethidium Bromide-Acridine Orange*. Sel HeLa sebelum diberi perlakuan dengan ekstrak etanol sarang semut terlebih dahulu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37,5°C dengan CO₂ 5% agar sel HeLa dapat pulih kembali, dan ditandai dengan sel HeLa menempel di dasar sumuran dilihat menggunakan mikroskop inverted. Gambar 4.1. menunjukkan gambaran sel HeLa normal dilihat dengan menggunakan mikroskop inverted dengan perbesaran 100x.

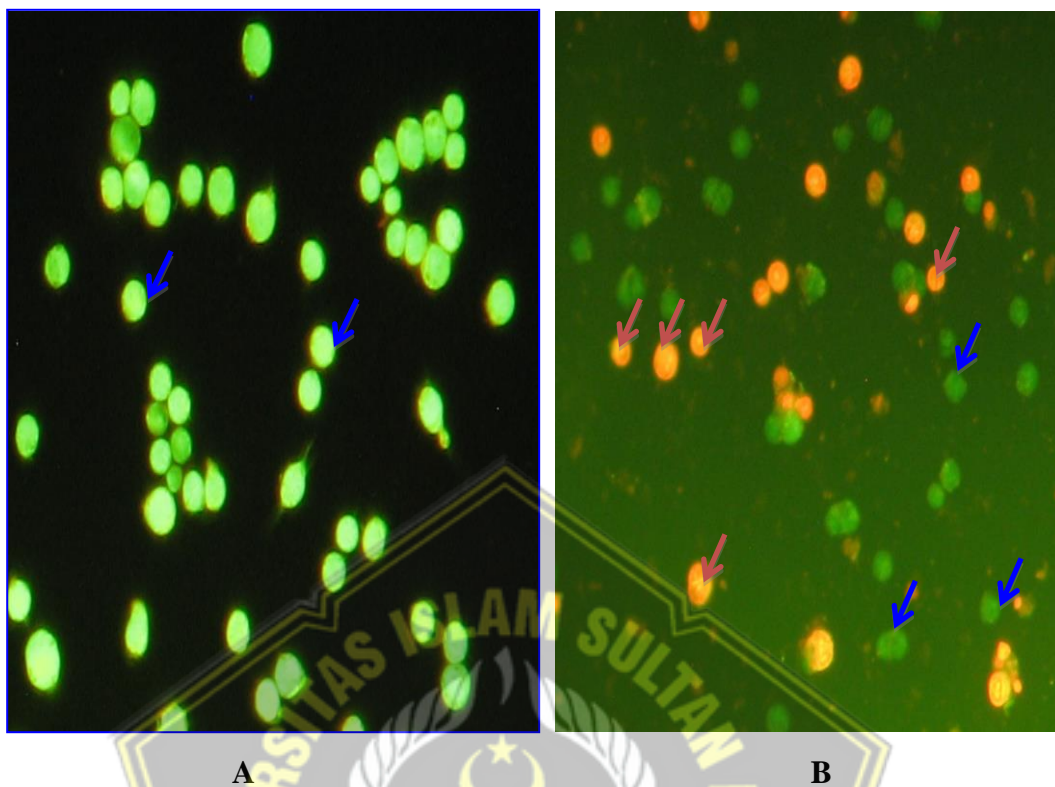
Penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok, kelompok pertama yaitu Sel HeLa yang diberi media kultur, kelompok kedua adalah Sel HeLa yang diberi media kultur dengan ekstrak sarang semut 112µg/ml, dan kelompok ketiga adalah Sel HeLa yang diberi media kultur dengan ekstrak sarang semut 224 µg/ml, kelompok keempat adalah Sel HeLa yang diberi media kultur dengan ekstrak sarang semut 448µg/ml, kelompok kelima adalah Sel HeLa yang diberi media kultur dengan dokсорubisin 5,6µg/ml. Sel yang telah

diberikan perlakuan dengan ekstrak sarang semut maupun doksorubisin diinkubasikan kembali selama 24 jam dengan suhu $37,5^{\circ}\text{C}$ dengan CO_2 5% agar sel dapat pulih kembali dalam keadaan normal.



Gambar 4.1 Sel HeLa (konfluen) di dalam flask dilihat menggunakan mikroskop inverted perbesaran 100 kali. Terlihat gambaran sel HeLa normal.

Pada akhir penelitian masing-masing kelompok dihitung jumlah sel HeLa yang mengalami apoptosis dibandingkan jumlah sel seluruhnya dengan pewarnaan Ethidium Bromide-Acridine Orangedilihat pada cover slip dengan 5 lapang pandang menggunakanmikroskop *flourescent*. Gambar 4.2 adalah gambar pengamatan sel HeLa menggunakan mikroskop *flourescent*.



Gambar 4.2. Sel HeLa yang mendapat perwarnaan menggunakan Ethidium Bromide - Acridine Orange dilihat dengan mikroskop fluorescent. Gambar A adalah kelompok pertama ($0\mu\text{g/ml}$), dan gambar B adalah kelompok ketiga ($224\mu\text{g/ml}$). Keterangan \rightarrow = Sel HeLa hidup, dan \rightarrow = Apoptosis.

Acridine Orange yang bersifat permeabel berbeda dengan *Ethidium Bromide* bersifat impermeabel. Sel yang mati mengalami penurunan integritas membran sel membuat membran sel mampu ditembus *Ethidium Bromide* sehingga inti sel terwarnai orange. Sel hidup mempunyai integritas membran sel utuh, sehingga membran sel tidak mampu ditembus *ethidium bromide*, berbeda dengan *Acridine Orange* yang dapat menembus membran sel sehingga membuat inti sel terwarnai hijau (Puspitasari, 2012).

Dari perhitungan masing-masing kelompok penelitian dengan lima lapang pandang didapatkan data tertulis pada tabel 4.1.

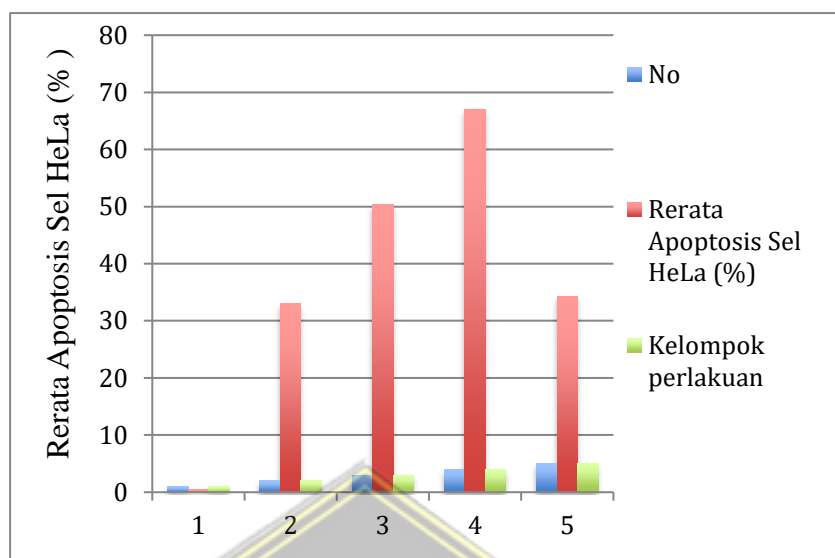
Tabel 4.1. Rerata sel yang mengalami apoptosis

Kelompok	Rerata jumlah apoptosis	Rerata jumlah sel	Prosen apoptosis (%)
Kontrol	0,4	98,6	0,41
E S Semut 1	7,8	24	32,5
E S Semut 2	26	56,4	46,1
E S Semut 3	43,6	67	65,07
Doksorubisin	14	44,2	31,67

Tabel 4.1 merupakan tabel pengamatan uji apoptosis ekstrak sarang semut terhadap sel HeLa. Prosentase sel HeLa yang mengalami apoptosis didapatkan dengan perbandingan sel HeLa yang mengalami apoptosis dibandingkan dengan sel seluruhnya dikalikan dengan 100%.

Grafik sel yang mengalami apoptosis dibandingkan dengan besar konsentrasi ekstrak etanol sarang semut dan doxorubisin sebagai pembanding yang diberikan dapat dilihat pada Gambar 4.4.

Gambar 4.4 merupakan hubungan antara prosentase sel HeLa yang mengalami apoptosis dengan konsentrasi ekstrak etanol sarang semut dan doxorubisin. Dari gambar 4.4. terlihat antara kelompok pertama dengan kelompok kedua, ketiga, keempat dan kelima mempunyai perbedaan yang bermakna.



Gambar 4.4. Rerata Apoptosis sel HeLa (%)

Data kemudian dianalisis secara statistik, sebelum dilakukan uji beda terlebih dahulu dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Uji *Shapiro-Wilk* dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2. Data Hasil Uji Normalitas

	Shapiro-Wilk				Levene's Test Sig
	Dosis	Statistic	df	Sig	
Prosentase Apoptosis Sel HeLa	0	0,773	5	0,048	0,012
	112	0,859	5	0,226	
	224	0,894	5	0,378	
	448	0,904	5	0,431	
doksorubisin	5,6	0,867	5	0,254	

Hasil uji normalitas disajikan pada tabel 4.2. dari uji Shapiro Wilk untuk kelompok kontrol sel diperoleh $p < 0,05$ berarti data kelompok kontrol sel tidak normal. Setelah uji normalitas dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene's Test*. Hasil disajikan pada tabel 4.2. dari uji *Levene's Test* diperoleh $p < 0,05$ berarti data tiap kelompok tidak homogen.

Data tidak normal dan tidakhomogen, Karena data tiap kelompok tidak homogen dan data tidak normal, maka pengujian hipotesis dilanjutkan dengan Uji Kruskal-Wallis dan Uji Mann Whitney pada tabel 4.3.

Tabel 4.3. Data Hasil Uji *Mann-whitney U*

Kelompok	Asymp. Sig. (2-tailed)
1 dengan 2	.008
1 dengan 3	.008
1 dengan 4	.008
1 dengan 5	.008
2 dengan 3	.047
2 dengan 4	.009
2 dengan 5	.754
3 dengan 4	.076
3 dengan 5	.076
4 dengan 5	.009

Hasil uji *Kruskal-Wallis* seperti ditampilkan pada lampiran 4.diperoleh nilai $p = 0,001$ yang berarti nilai $p < 0,05$ maka terdapat perbedaan pada kelompok penelitian.

Mengetahui kelompok mana yang berbeda lebih bermakna pada hasil penelitian, dilakukan uji *Mann Whitney*. Hasil uji *Mann Whitney* kelompok pertama (Sel HeLa hanya diberi media kultur) menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan kelompok perlakuan yang lain dengan nilai $p < 0,05$. Kelompok kedua (Sel HeLa diberi media kultur dan ekstrak etanol sarang semut konsentrasi 112 μ g/ml) menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan kelompok ketiga (Sel HeLa diberi media kultur dan ekstrak etanol sarang semut konsentrasi 224 μ g/ml) dengan nilai $p < 0,05$,Kelompok kedua (Sel HeLa diberi media kultur dan ekstrak etanol sarang semut konsentrasi 112 μ g/ml) menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan kelompok keempat (Sel HeLa diberi media kultur dan ekstrak etanol sarang semut

konsentrasi 448 μ g/ml) dengan nilai $p < 0,05$ dan kelompok kedua (Sel HeLa diberi media kultur dan ekstrak etanol sarang semut konsentrasi 112 μ g/ml) tidak ada perbedaan yang bermakna dengan kelompok kelima (Sel HeLa diberi media kultur dan doksorubisin konsentrasi 5,6 μ g/ml) dengan nilai $p > 0,05$. Pada kelompok ketiga (Sel HeLa diberi media kultur dan ekstrak etanol sarang semut konsentrasi 224 μ g/ml) menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna dengan kelompok keempat (Sel HeLa diberi media kultur dan ekstrak etanol sarang semut konsentrasi 448 μ g/ml) dengan nilai $p > 0,05$, dan kelompok ketiga (Sel HeLa diberi media kultur dan ekstrak etanol sarang semut konsentrasi 224 μ g/ml) menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna dengan kelompok kelima (Sel HeLa diberi media kultur dan doksorubisin konsentrasi 5,6 μ g/ml) dengan nilai $p > 0,05$. Pada kelompok keempat (Sel HeLa diberi media kultur dan ekstrak etanol sarang semut konsentrasi 448 μ g/ml) menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan kelompok kelima (Sel HeLa diberi media kultur dan doksorubisin konsentrasi 5,6 μ g/ml) dengan nilai $p < 0,05$.

4.2. Pembahasan

Pada penelitian ini ekstrak etanol sarang semut terbukti meningkatkan rerata persentase apoptosis pada sel HeLa dan terdapat beda bermakna antar beberapa kelompok penelitian. Penyebab terjadinya apoptosis diduga dari kandungan flavonoid dan tanin dalam sarang semut. Hasil penelitian Soeksmanto, dkk (2010) flavonoid dan tanin yang terdapat di dalam sarang semut mampu menghambat proliferasi sel HeLa dan sel MCM-B2.

Penghambatan pertumbuhan dari sel HeLa diamati dengan menggunakan ekstrak n-butanol dengan dosis 90 ppm pada sel HeLa dan 87,13 ppm pada sel MCM-B2 sedangkan ekstrak etil asetat sarang semut dengan dosis 90-120 ppm pada sel HeLa dan 111,06 pada sel MCM-B2 yang diujikan dengan *Haemocytometer Tiefe Neubauer*.

Mekanisme flavonoid dalam menginduksi apoptosis diduga terjadi melalui penghambatan ekspresi enzim topoisomerase I dan topoisomerase II. Aktivitas DNA Topoisomerase dihambat, maka proses terjadinya ikatan antara enzim dengan DNA sel kanker semakin lama. Terbentuk Protein Linked DNA Factor (PLDB), akibatnya terjadi kerusakan DNA sel kanker dan selanjutnya berpengaruh terhadap proses replikasi sel kanker. Gen p53 sebagai supresor tumor akan terakumulasi menghentikan replikasi DNA pada *check point* dan memberi kesempatan kepada DNA untuk memperbaiki diri bila proses perbaikan gagal, p53 akan merangsang mitokondria mengeluarkan sitokrom C ke sitosol dan dalam hal ini akan dihalangi oleh anti-apoptosis member yaitu gen BCL-2. Di dalam sitosol, sitokrom C bersama dengan Apoptosis Protease Activating Factor I (Apaf-I) dan procaspase 9 membentuk apoptosome kemudian mengaktifkan caspase 9. Terbentuk caspase 9 sebagai caspase awal akan mengaktifkan caspase eksekutor yaitu caspase 3, 6 dan 7, sehingga menyebabkan kematian sel secara apoptosis (Puspitasari, 2012).

Flavonoid juga berperan dalam modulasi signalling pathways, penurunan Bcl-2 dan Bcl-XL dan peningkatan ekspresi gen Bax dan Bak, serta aktivasi endonuklease merangsang pelepasan ekspresi gen sitokrom C

dengan aktivasi caspase-3 dan -9, (Ren *et al.*, 2003). Tanin dapat meningkatkan ekspresi p27 yang akan menyebabkan G1 *arrest* serta menginduksi terjadinya apoptosis jalur instrinsik melalui peningkatan ekspresi Bax (Nam *et al.*, 2001) selanjutnya mengaktifkan *downstream apoptotic effectors*, seperti caspase-3 / 7 yang menyebabkan kematian sel terprogram (Rastogi *et al.*, 2009).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, persentase apoptosis doksorubisin sebagai kontrol positif diperoleh sebesar 31,67 % hasil tersebut lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak sarang semut dosis 448µg/ml. Kenyataan ini menunjukkan bahwa ekstrak sarang semut lebih meningkatkan rerata persentase apoptosis sel HeLa dibanding dengan doksorubisin. Doksorubisin merupakan salah satu obat anti kanker golongan antrasiklin yang dapat berinterkalasi dengan DNA secara langsung yang akan mempengaruhi transkripsi dan replikasi. Doksorubisin mampu membentuk kompleks tripartit dengan topoisomerase II dan DNA. Topoisomerase ini penting dalam replikasi dan perbaikan DNA. Pembentukan kompleks tripartit tersebut akan menghambat penyambungan kembali *strand* DNA sehingga menyebabkan siklus sel berhenti pada fase G1 dan G2 serta memacu terjadinya apoptosis (Minotti *et al.*, 2004).

Penelitian ini, terdapat beberapa keterbatasan yaitu : menghitung sel HeLa yang mengalami apoptosis menggunakan ethidium bromide harus cepat difoto karena apabila lebih dari 5 menit maka semua sel akan terwarnai orange semua. Mengambil cover slip dari micro plate diperlukan keterampilan khusus bertujuan sel HeLa tidak ikut terbunuh pada waktu pengambilan.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Ekstrak etanol sarang semut dapat berpengaruh terhadap apoptosis pada sel HeLa.
2. Rerata prosentase apoptosis pada kelompok pertama (kontrol sel) adalah 0,41 %, kelompok kedua (ekstrak etanol sarang semut konsentrasi 112 $\mu\text{g/ml}$) adalah 32,5 %, kelompok ketiga (ekstrak etanol sarang semut konsentrasi 224 $\mu\text{g/ml}$) adalah 46,1 %, kelompok keempat (ekstrak etanol sarang semut 448 $\mu\text{g/ml}$) adalah 65,07 %, dan kelompok kelima (doxorubisin 5,6 $\mu\text{g/ml}$) adalah 31,67 %. Terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok pertama dengan kelompok yang lainnya. Pada kelompok kedua (ekstrak etanol sarang semut konsentrasi 112 $\mu\text{g/ml}$) rerata apoptosis tidak ada beda dengan kelompok kelima (doxorubisin 5,6 $\mu\text{g/ml}$). Pada kelompok ketiga (ekstrak etanol sarang semut konsentrasi 224 $\mu\text{g/ml}$) dan keempat (ekstrak etanol sarang semut 448 $\mu\text{g/ml}$) rerata apoptosis lebih tinggi dibanding kelompok kelima (doxorubisin 5,6 $\mu\text{g/ml}$).

5.2. Saran

1. Perlu keterampilan khusus untuk pengambilan cover slip dan pada saat mengambil gambar menggunakan mikroskop flourecent .

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., 2005, *Cellular and molecular immunology*, Philadelphia, 16: 391-340.
- Apantaku, LM. 2002. *Breast conseving surgery for breast cancer*. The Chicago Medical School: North Chicago, 2271-2278.
- Brendan P.L., Walter, A., Nelson-Rees, Grover, M.H., 2009, Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination, *Arch Pathol Lab Med* 133: 1463-1467.
- Cotran., Kumar., Collins., 1998, *Robbins Pathologic Basic of Disease*. Philadelphia: W.B Saunders Company. ISBN 0-7216-7335-X.
- Dahlan, MS., 2006. *Statistika untuk Kedokteran dan Kesehatan*. PT Arkans: Jakarta.
- Dash, P. R., McCormick, J., Thomson, M. J., Johnstone, A. P., Cartwright, J. E. and Whitley, G. S., 2007, Fas ligand-induced apoptosis is regulated by nitric oxide through the inhibition of fas receptor clustering and the nitrosylation of protein kinase Cepsilon. *Exp Cell Res*, 313 (16). Pp. 3421-3431. ISSN 0014-4827.
- DeFillippis, R.A., Goodwin, E.C., Wu, L., DiMaio, D., 2003, Endogenous Human Papillomavirus E6 and E7 Proteins Differentially Regulate Proliferation, Senescence, and Apoptosis in HeLa Cervical Carcinoma Cells, *Journal of Virology* 77 (2): 1551-1563.
- Depkes, 2009, *Profil Kesehatan Profinsi Jawa Tengah Tahun 2009*, [int/http://www.depkes.go.id/](http://www.depkes.go.id/) dikutip tanggal 15 November 2010.
- Freshney, R. 2006. *Basic Principle of Cell Culture*. John Wiley and Sons. Inc: New York.
- Goodwin, E.C., DiMaio, D., 2000, Repression of Human Papillomavirus Oncogenes in HeLa Cervical Carcinoma Cells Causes The Orderly Reactivation of Dormant Tumor Suppressor Pathways, *Biochemistry Journal* 97 (23): 2513-12518.
- Heffner, JL., Schust, DJ.2002. *At a Glance Sistem Reproduksi*. Erlangga: Jakarta. Hal. 94-95.
- IARC, 2010, *Cervical Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008*. [Int/http://www.globocan.iarc.fr](http://www.globocan.iarc.fr) diunduh pada 1 Oktober 2010.
- Jones, DL. 2007. *Dasar-dasar Obstetri dan Ginekologi*. Hipocrates: Jakarta. Hal. 232-234.

- Kasibhatla S., Tseng B., 2003, *Why Target Apoptosis in Cancer Treatment?* Mol.Cancer Therap., 2:573-580.
- Kumar V., Abbas, Fausto AK. *Pathologic basis of disease 7th ed.* Philadelphia:Pennsylvania. Elsevier Saunders; 2005. p 26-32, 89-91,812-13, 880-881, 956-59, 1129-38.
- Macdonald, F., Ford, C.H.J.,Casson, A.G., 2004, *Molecular Biology of Cancer*, 2 ed Edition, BIOS Scientific Publishers, London and New York. Hal. 189-204.
- Minotti, G., Menna,P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni., L, 2004, Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity, *Pharmacol Rev* 56:185–229.
- Nam, S., Smith, D.M., Dou, Q.P., 2001, Tannic Acid Potently Inhibits Tumor Cell Proteasome Activity Increase p27 and Bax Expression, and Induces G1 Arrest and Apoptosis, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 10: 1083-1088.
- Puspitasari P Karina. 2012, Efek Sitotoksik Ekstrak Etanol Sarang Semut(*Myrmecodia pendens*) Terhadap Sel HeLa Uji Eksperimental Secara *In Vitro*, *Sains Medika* Vol. 3 No. 2, Issn 2085-1545; 32-36.
- Rastogi, R.P., Richa., Sinha., R.P., 2009, Apoptosis: Molecular Mechanisms and Pathogenicity, *EXCLI Journal* 8: 155-181.
- Ren W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu L., Zhang, L., 2003, Flavonoids: Promising Anticancer Agents, *Medicinal research Reviews*, 23(4) : 519- 534.
- Soeksmanto, A., Subroto, M.A., Wijaya, H., Simanjuntak, P., 2010, Anticancer Activity test for Extract of Sarang Semut Plant(*Myrmecodya Pendens*) to HeLa and MCM-B2 Cells, *Pakistan Journal of Biological Science* 13(3): 148-151.
- Subroto, M.A., Saputro H., 2006, *Gempur Penyakit dengan Sarang Semut*, Penebar Swadaya, Depok, halaman 15-31.
- Sudiana, IK., 2008, Pewarnaan apoptosis. In: *Teknologi Ilmu Jaringan Dan Imunohistokimia*. Jakarta: Sagung Seto. p47-9
- Wan D(ed.), 2008, *Buku Ajar Onkologi Klinis*, Edisi 2, FKUI, Jakarta, halaman 140-176,195.
- Yi, W., Fischer, G., Krewer G., Akoh C.C., 2005, Phenolic Compounds From Blueberries Can Inhibit Colon Cancer Cell Proliferation And Induce Apoptosis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (18): 7320-7329.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data hasil pengamatan

Efektivitas (%)	Kelompok
1.39	1
0.73	1
0	1
0	1
0	1
27.59	2
38.46	2
50	2
23.81	2
25	2
38.75	3
37.72	3
51.35	3
61.76	3
66.67	3
56.04	4
65.26	4
64.52	4
74.47	4
75	4
35.89	5
42.22	5
43.75	5
25.39	5
24.14	5

Lampiran 2. Analisis uji Normalitas

Case Processing Summary

Kelompok	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Efektivitas Kontrol Sel	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
Dosis 112	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
Dosis 224	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
Dosis 448	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%
Doxo 5,6	5	100.0%	0	.0%	5	100.0%

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Efektivitas Kontrol Sel	.351	5	.043	.773	5	.048
Dosis 112	.285	5	.200*	.859	5	.226
Dosis 224	.230	5	.200*	.894	5	.378
Dosis 448	.226	5	.200*	.904	5	.431
Doxo 5,6	.233	5	.200*	.867	5	.254

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

a. Lilliefors Significance Correction

UNISSULA
جامعة سلطان أبوبوع الإسلامية

Lampiran 3. Analisis *Levene's test*

Test of Homogeneity of Variances

Efektivitas			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.246	4	20	.012

Lampiran 4. Uji Kruskal-Wallis

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Efektivitas	25	37.1964	24.24773	.00	75.00
Kelompok	25	3.0000	1.44338	1.00	5.00

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank
Efektivitas	Kontrol Sel	5	3.00
	Dosis 112	5	10.80
	Dosis 224	5	17.40
	Dosis 448	5	22.20
	Doxo 5,6	5	11.60
	Total		25

Test Statistics^{a, b}

	Efektivitas
Chi-Square	19.488
df	4
Asymp. Sig.	.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

Lampiran 5. Uji Mann Whitney

1) Kontrol Sel – Dosis 112

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Efektivitas	Kontrol Sel	5	3.00	15.00
	Dosis 112	5	8.00	40.00
	Total	10		

Test Statistics^b

	Efektivitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.643
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

2) Kontrol Sel – Dosis 224

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Efektivitas	Kontrol Sel	5	3.00	15.00
	Dosis 224	5	8.00	40.00
	Total	10		

Test Statistics^b

	Efektivitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.643
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

3) **Kontrol Sel – Dosis 448**
NPar Tests
Mann-Whitney Test

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Efektivitas	Kontrol Sel	5	3.00	15.00
	Dosis 448	5	8.00	40.00
	Total	10		

Test Statistics^b

	Efektivitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.643
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2* (1-tailed Sig.)]	.008 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

4) **Kontrol Sel – Doxo 5,6**
NPar Tests
Mann-Whitney Test

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Efektivitas	Kontrol Sel	5	3.00	15.00
	Doxo 5,6	5	8.00	40.00
	Total	10		

Test Statistics^b

	Efektivitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.643
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2* (1-tailed Sig.)]	.008 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

5) Dosis 112 – Dosis 224

NPar Tests**Mann-Whitney Test****Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Efektivitas	Dosis 112	5	3.60	18.00
	Dosis 224	5	7.40	37.00
	Total	10		

Test Statistics^b

	Efektivitas
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	18.000
Z	-1.984
Asymp. Sig. (2-tailed)	.047
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.056 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

6) Dosis 112 – Dosis 448

NPar Tests**Mann-Whitney Test****Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Efektivitas	Dosis 112	5	3.00	15.00
	Dosis 448	5	8.00	40.00
	Total	10		

Test Statistics^b

	Efektivitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

7) Dosis 112 – Doxo 5,6

NPar Tests**Mann-Whitney Test****Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Efektivitas	Dosis 112	5	5.20	26.00
	Doxo 5,6	5	5.80	29.00
	Total	10		

Test Statistics^b

	Efektivitas
Mann-Whitney U	11.000
Wilcoxon W	26.000
Z	-.313
Asymp. Sig. (2-tailed)	.754
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.841 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

8) Dosis 224 – Dosis 448

NPar Tests**Mann-Whitney Test****Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Efektivitas	Dosis 224	5	3.80	19.00
	Dosis 448	5	7.20	36.00
	Total	10		

Test Statistics^b

	Efektivitas
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	19.000
Z	-1.776
Asymp. Sig. (2-tailed)	.076
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.095 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

9) Dosis 224 – Doxo 5,6

NPar Tests**Mann-Whitney Test****Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Efektivitas	Dosis 224	5	7.20	36.00
	Doxo 5,6	5	3.80	19.00
	Total	10		

Test Statistics^b

	Efektivitas
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	19.000
Z	-1.776
Asymp. Sig. (2-tailed)	.076
Exact Sig. [2* (1-tailed Sig.)]	.095 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

10) Dosis 448 – Doxo 5,6

NPar Tests**Mann-Whitney Test****Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Efektivitas	Dosis 448	5	8.00	40.00
	Doxo 5,6	5	3.00	15.00
	Total	10		

Test Statistics^b

	Efektivitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2* (1-tailed Sig.)]	.008 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

**LABORATORIUM KIMIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG SEMARANG**

**SURAT KETERANGAN
107/ L.KIM / SA.FK/2013**

Dengan ini kami menerangkan bahwa :

No	Nama	Nim	Pembimbing I
1.	Didit Fajar N.	01.209.5871	Dra.Atina Hussana,M.Si.Apt
2.	Dyah Carano Fitri	01.209.5887	Dra.Atina Hussana,M.Si.Apt

Benar-benar telah melakukan pembuatan ekstrak etanol sarang semut (*Myrmecodia Pendens*) dilaboratorium kimia Fakultas Kedokteran Unissula Semarang pada tanggal 07 Februari 2013. Dengan metode soxletasi dan mendapatkan hasil ekstrak kering.

Demikian surat keterangan ini kami buat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Semarang, 21 Februari 2013

Kepala Bagian Kimia.

Dr. dr. Titiek Sumarawati, M.Kes
NIP. 196104221988112001



**YAYASAN BADAN WAKAF SULTAN AGUNG
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG (UNISSULA)
FAKULTAS KEDOKTERAN**

Jl. Raya Kaligawe Km. 4 PO. Box. 1054 Telp. 6563584 (8 sal) Fax. 6594366 Semarang 50112

No : 231/KTI/SA-K/X/2012
Lampiran :-
Perihal : Permohonan Ijin Penelitian

Kepada : Yth. Kepala Bagian Lab Parasitologi FK UGM
di

YOGYAKARTA

Assalamu'alaikum wr. wb.

Dengan ini kami hadapkan mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung (UNISSULA) Semarang,

Nama : **DIDIT FAJAR NUGROHO**
N.I.M. : **01.209.5871**
Semester : **VII (tujuh)**

Mohon diijinkan untuk melakukan Penelitian sebagai bahan penulisan **Karya**

Tulis Ilmiah dengan judul :

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL SARANG SEMUT
(*Myrmecodiapendens*) TERHADAP APOPTOSIS SEL HELA (SEL
KANKER LEHER RAHIM).**

Dengan Pembimbing I : **Dra. Atina Husaana, M.Si Apt**
II : **Drs. H. Israhanto Israji, M.Si**

Demikian atas bantuan serta kerjasamanya diucapkan terima kasih.

Wassalamu'alaikum wr. wb.

Semarang, 17 Oktober 2012


Dr. H. Fauziq R. Nasihur, M.Kes., Sp.And.



BAGIAN PARASITOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS GADJAH MADA
 Gedung Prof. Drs. R. Radiopoetro Lt. IV Sayap Timur, Sekip, Yogyakarta 55281.
 Telp. (0274) 6492488. Fax. 546215. E-mail : parasitfkugm@yahoo.com

SURAT KETERANGAN
 No. UGM/KU/Prst/037/TL/04/03

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Kepala Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta,
 menerangkan dengan sesungguhnya bahwa :

Nama : DIDIT FAJAR NUGROHO.
 Jabatan : Mahasiswa Fakultas Kedokteran Unissula, Semarang.
 NIM. : 01.209.5871
 Selama : Bulan Februari 2013.

Telah melakukan penelitian di Bagian Parasitologi FK UGM dengan judul :

“ Pengaruh Ekstrak Etanol Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*) terhadap Apoptosis Sel HeLa “;

Yang bersangkutan telah menyelesaikan urusan administrasinya dan telah mengembalikan fasilitas laboratorium yang dipakainya, serta dinyatakan **bebas lab**.

Demikian surat keterangan ini dibuat dengan sesungguhnya, untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 22 Februari 2013.

Kepala Bagian Parasitologi
 Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada,



Prof. Dr. Supargiyono, DTM&H., SU., PhD., SpParK.
 NIP. 19530911 197803 1 001.

SERTIFIKAT

Diberikan kepada

Didit Fajar Nugroho

Fakultas Kedokteran Universitas Sultan Agung Semarang

Yang telah mengikuti Kursus Singkat Kultur Jaringan selama 4 hari (16 jam),
dari tanggal 15 – 18 Januari 2013 di Laboratorium Pusat Kedokteran Tropis
Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Yogyakarta, 18 Januari 2013

Direktur Pusat Kedokteran Tropis

Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada



Prof. dr. Supargiyono, DTM&H., SU., Ph.D., SpPark.

NIP. 195309111978031001