

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR UNTUK
SARJANA UNGGUL
(PMDSU)**



**PENEMUAN OBAT ANTI KANKER BARU BERBASIS *NATURAL
PRODUCT* – *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese**

TAHUN KE – 1 DARI RENCANA 3 TAHUN

Prof. SRI AGUS SUDJARWO, Ph.D

0004095603

Prof. Dr. FEDIK ABDUL RANTAM, drh.

0010035907

ANNISE PROBONINGRAT, drh., M.Si.

061817117305

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 145/SP2H/LT/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR UNTUK
SARJANA UNGGUL
(PMDSU)



KKC
KK
LP 58/19
Sud
P

PENEMUAN OBAT ANTI KANKER BARU BERBASIS *NATURAL*
PRODUCT – *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese

TAHUN KE – 1 DARI RENCANA 3 TAHUN

Prof. SRI AGUS SUDJARWO, Ph.D
Prof. Dr. FEDIK ABDUL RANTAM, drh.
ANNISE PROBONINGRAT, drh., M.Si.

0004095603
0010035907
061817117305

DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 145/SP2H/LT/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018



HALAMAN PENGESAHAN

Judul : PENEMUAN OBAT ANTI KANKER BARU
BERBASIS NATURAL PRODUCT – Pinus merkussi
Jungh. et de Vriese

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : SRI AGUS SUDJARWO,
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0004095603
Jabatan Fungsional : Guru Besar
Program Studi : Sains Veteriner
Nomor HP : 085645000684
Alamat surel (e-mail) : ags158@yahoo.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr. drh. FEDIK ABDUL RANTAM
NIDN : 0010035907
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
Nama Lengkap : Annise Proboningrat
NIDN :
Perguruan Tinggi :

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 60,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 180,000,000



Mengetahui,
Direktur Pascasarjana/Dekan/Ketua
(Prof. Dr. Pndji Srianto, drh., M.Kes.)
NIP/NIK 195601051986011001

Kota Surabaya, 22 - 11 - 2018
Ketua,

(SRI AGUS SUDJARWO,)
NIP/NIK 195609041984031004

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Unair
(Prof. Hery Purnobasuki, Drs., M.Si., Ph.D.)
NIP/NIK 196705071991021001



RINGKASAN

Kanker serviks merupakan kanker kedua yang paling sering terjadi pada wanita di Asia Tenggara, dengan kurang lebih 175.000 diagnosa baru setiap tahunnya. Penyakit kanker serviks terjadi akibat pertumbuhan abnormal dari sel-sel epitel serviks yang utamanya disebabkan oleh infeksi kronis dari *Human Papillomavirus* (HPV). *Drug delivery system* berbasis nanopartikel menawarkan keunggulan dan pendekatan yang menjanjikan untuk terapi kanker lebih dari dua dekade terakhir. Ukuran nanopartikel yang kecil (1-1000 nm) memungkinkan administrasi obat yang lebih mudah dan kemampuan untuk menembus *barrier* di dalam tubuh.

Enkapsulasi obat herbal menggunakan teknologi nanopartikel diketahui mampu mengantarkan obat herbal ke organ spesifik sehingga meningkatkan selektivitas, efektivitas dan keamanan obat. *Pinus merkusii* merupakan tanaman pinus asli dari Asia Tenggara. Beberapa penelitian telah membuktikan kemampuan antikanker berbagai spesies pinus terhadap sel kanker serviks (HeLa), sel kanker payudara (MCF-7), sel kanker ovarium dan sel kanker neuroblastoma (IMR-32).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuat sediaan nanopartikel dari ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) (NEKPP) dan untuk menganalisis aktivitas antikankernya melalui mekanisme sitotoksitas, penghambatan siklus sel, apoptosis dan peningkatan ekspresi protein p53 dan caspase-9 pada kultur sel HeLa secara *in vitro*.

Ekstraksi kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dan preparasi nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus dilakukan dengan metode gelas ionik dan dikarakterisasi menggunakan *particle size analyzer* (PSA). Kemudian, dilakukan skrining fitokimia dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengetahui kandungan fitokimia di dalam sediaan nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus. Uji sitotoksitas dilakukan berdasarkan metode uji MTT terhadap kultur sel HeLa yang telah diberikan terapi nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus dengan konsentrasi 50, 100, 200, 400 dan 800 $\mu\text{g/mL}$. Selanjutnya, analisis *flowcytometry* dilakukan untuk mengevaluasi penghambatan siklus sel dan induksi apoptosis dengan pewarnaan Annexin V/PI pada kultur sel HeLa setelah diberikan terapi nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus dengan konsentrasi IC_{50} , $2IC_{50}$ dan $4IC_{50}$. Selain itu, pewarnaan imunositokimia juga dilakukan untuk mengamati peningkatan ekspresi p53 dan caspase-9 pada kultur sel HeLa yang telah diberikan terapi nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus dengan konsentrasi IC_{50} , $2IC_{50}$ dan $4IC_{50}$. Semua pengujian dilakukan dengan durasi inkubasi terapi nanopartikel selama 24 jam.

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data hasil uji sitotoksitas dianalisis menggunakan analisis regresi linier dengan *Microsoft Excel* untuk mendapatkan nilai IC_{50} . Sedangkan data distribusi siklus sel dan persentase apoptosis dianalisis dengan Analisis Varian (ANOVA) Satu Jalur dan dilanjutkan dengan uji Jarak Berganda Duncan untuk melihat perbedaan di antara kelompok perlakuan. Sementara itu, perhitungan ekspresi p53 dan caspase-9 dilakukan dengan menggunakan metode semikuantitatif H-score dan dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis. Setelah dilakukan uji Kruskal-Wallis yang menunjukkan adanya



signifikansi, dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney untuk membandingkan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) yang dihasilkan memiliki ukuran rata-rata 394,3 nm dan menunjukkan kandungan fitokimia berupa alkaloid, terpenoid, steroid dan saponin. Hasil uji sitotoksitas menunjukkan bahwa terjadi peningkatan sitotoksitas yang bergantung pada konsentrasi dengan persentase penghambatan proliferasi yang paling tinggi sebesar 96,79% pada pemberian 800 $\mu\text{g/mL}$ nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus dan IC_{50} sebesar 384,10 $\mu\text{g/mL}$. Hasil analisis siklus sel menunjukkan bahwa nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus mampu menghambat siklus sel HeLa pada fase G0/G1. Persentase tertinggi dari jumlah sel ($50,52 \pm 0,62\%$) yang terakumulasi pada fase G0/G1 dicapai oleh pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus dengan konsentrasi IC_{50} , sedangkan pada kontrol sel yang tidak diberikan terapi, persentase sel pada fase G0/G1 sebesar $46,84 \pm 0,73\%$. Hal ini menggambarkan bahwa fase G0/G1 adalah fase terlama yang dialami sel dan oleh karena itu sel HeLa terakumulasi pada fase tersebut. Namun, pada pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus dengan konsentrasi 2IC_{50} dan 4IC_{50} , terlihat akumulasi sel HeLa pada fase sub G0/G1 yang menandakan terjadinya apoptosis. Hasil pewarnaan Annexin V/PI menunjukkan bahwa nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus dengan konsentrasi IC_{50} mampu menginduksi fase *early apoptosis* pada sel HeLa secara signifikan, sedangkan pada konsentrasi 2IC_{50} dan 4IC_{50} terjadi penurunan persentase *early apoptosis* secara berurutan. Hal ini mungkin dikarenakan oleh peningkatan konsentrasi nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus telah mencapai titik jenuh, sehingga menurunkan *cellular uptake* dari nanopartikel. Hasil pewarnaan imunositokimia menunjukkan terjadinya peningkatan ekspresi p53 tertinggi pada sel HeLa yang diberi nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus dengan konsentrasi IC_{50} , demikian juga dengan ekspresi caspase-9 yang mengalami peningkatan dengan tingkat yang paling tinggi pada sel HeLa yang diberikan 2IC_{50} nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) memiliki aktivitas antikanker dengan menyebabkan sitotoksitas, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis dan peningkatan ekspresi p53 dan caspase-9.

PRAKATA

Puji syukur Kehadirat Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya yang telah dilimpahkan sehingga penelitian tentang “Penemuan Obat Anti Kanker Baru Berbasis *Natural Product - Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese” dapat terselesaikan.

Kanker adalah sebuah penyakit akibat pertumbuhan tidak normal dari sel-sel jaringan tubuh yang mengalami mutasi dan perubahan struktur biokimia. Kanker merupakan penyebab utama kematian dan disabilitas di seluruh dunia yang berdampak pada lebih dari 14 juta orang setiap tahunnya. Berbagai metode terapi seperti kemoterapi, pembedahan dan radioterapi telah umum digunakan, namun tidak satupun di antaranya membuahkan hasil yang efektif dalam menangani kanker serviks dan memerlukan biaya yang relatif mahal. *Drug delivery system* berbasis partikel (mikropartikel/nanopartikel) mempunyai kelebihan dibandingkan dengan bentuk sediaan obat konvensional. Penelitian tentang aktivitas antikanker ekstrak kulit pohon *Pinus merkusii* terhadap sel kanker serviks HeLa dalam bentuk sediaan nanopartikel masih baru dan belum pernah dilakukan sehingga penulis melakukan penelitian ini sebagai dasar untuk penelitian selanjutnya.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, untuk itu, penulis mengharapkan kritikan dan saran sebagai upaya penyempurnaan tulisan ini. Semoga penelitian ini dapat menjadi informasi yang bermanfaat bagi khalayak umum dan dapat berguna bagi perkembangan ilmu pengetahuan. Akhir kata, penulis mengucapkan terima kasih.

Surabaya, 28 November 2018

Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
RINGKASAN.....	iii
PRAKATA.....	v
DAFTAR ISI.....	vi
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	9
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	10
BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI.....	17
BAB 6 RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA.....	28
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	29
DAFTAR PUSTAKA.....	30
LAMPIRAN.....	36



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker adalah sebuah penyakit akibat pertumbuhan tidak normal dari sel-sel jaringan tubuh yang mengalami mutasi dan perubahan struktur biokimia (Wijaya dan Muchtaridi, 2017). Menurut WHO, kanker merupakan penyebab utama kematian dan disabilitas di seluruh dunia yang berdampak pada lebih dari 14 juta orang setiap tahunnya. Proporsi terbesar dari penyakit ini adalah di negara-negara berpenghasilan rendah dan menengah dimana 57% kasus kanker dan 65% kematian akibat kanker terjadi. Pada tahun 2012, terjadi 4,3 juta kematian dini yang disebabkan oleh kanker dan diperkirakan kematian global akan meningkat sebesar 44% dari tahun 2012 hingga tahun 2030 (WHO, 2016).

Kanker Serviks menempati urutan keempat sebagai penyebab kematian akibat penyakit kanker pada wanita di seluruh dunia, dan lebih dari 85% kasus dan kematiannya terjadi di negara-negara berkembang (Thacker and Karunakaran, 2015). Setiap tahun, lebih dari 500.000 wanita menderita kanker serviks dan 270.000 meninggal dunia akibat penyakit tersebut. Di antara kasus-kasus baru, 70% pasien didiagnosa berada pada stadium lanjut (He *et al.*, 2014). Kanker serviks merupakan kanker kedua yang paling sering terjadi pada wanita di Asia Tenggara, dengan kurang lebih 175.000 diagnosa baru setiap tahunnya (Amfar, 2016). Sementara itu, Kemenkes RI (2015) melaporkan bahwa penyakit kanker serviks mencapai prevalensi tertinggi di Indonesia pada tahun 2013, yaitu sebesar 0,8% atau sekitar 98.692 orang, melebihi prevalensi kanker payudara yang sebesar 0,5% atau sekitar 61.682 orang.

Berbagai metode terapi seperti kemoterapi, pembedahan dan radioterapi telah umum digunakan, namun tidak satupun di antaranya membuahkan hasil yang efektif dalam menangani kanker serviks (Cai *et al.*, 2017) dan memerlukan biaya yang relatif mahal (Wicaksono dan Permana, 2013). Pembedahan dan radioterapi hanya efektif untuk terapi kanker lokal dan non-metastasis, namun tidak efisien apabila kanker telah menyebar ke seluruh tubuh. Pengobatan menggunakan kemoterapi menjadi pilihan utama saat ini karena mampu mencapai setiap organ dalam tubuh melalui sirkulasi darah (Wijaya dan Muchtaridi, 2017). Namun, kemoterapi masih memiliki



kelemahan karena kurangnya selektivitas terhadap sel-sel tumor yang menyebabkan kurang terkonsentrasinya obat pada lokasi tumor, toksisitas sistemik dan munculnya sel tumor yang resisten terhadap obat (Padma, 2015). Selain membunuh sel kanker, kemoterapi juga berpengaruh terhadap sel-sel normal yang memiliki tingkat proliferasi yang cepat, seperti folikel rambut, sumsum tulang dan sel-sel saluran pencernaan sehingga menghasilkan efek samping kemoterapi yang khas (Wijaya dan Muchtaridi, 2017). Di samping itu, obat-obat konvensional bekerja ketika beredar di dalam sirkulasi darah dan konsentrasinya pada situs lesi menentukan efikasi terapeutik obat. Untuk mencapai konsentrasi yang tinggi pada situs lesi, biasanya obat diberikan dengan dosis yang lebih tinggi. Hal ini juga yang menjadi penyebab munculnya efek samping sistemik dan gangguan fungsi organ dan jaringan lainnya (Kou *et al.*, 2013).

Drug delivery system berbasis partikel (mikropartikel/nanopartikel) mempunyai kelebihan dibandingkan dengan bentuk sediaan obat konvensional. Kelebihan tersebut antara lain meningkatkan konsentrasi lokal obat, menurunkan variasi waktu transit pada saluran gastrointestinal, menurunkan variabilitas antar individu, menurunkan resiko penumpukan obat, mengurangi efek samping, memungkinkan berbagai rute administrasi (mis., oral, topikal, nasal, parenteral dan sistemik (intravena)) dan pemuatan (*drug loading*) obat hidrofilik dan hidrofobik, meningkatkan bioavailabilitas dan meminimalisir efek samping atau toksisitas obat. Dari kedua bentuk sediaan partikel tersebut, nanopartikel menawarkan keunggulan dan pendekatan yang menjanjikan untuk terapi kanker lebih dalam dua dekade terakhir (Kou *et al.*, 2013; Cetin and Sahin, 2015).

Nanopartikel adalah partikel yang mempunyai kisaran ukuran antara 1 sampai 1000 nm. Oleh karena ukurannya yang lebih kecil dari mikropartikel, nanopartikel memiliki area permukaan yang lebih luas. Ukuran nanopartikel yang kecil juga memungkinkan administrasi obat yang lebih mudah (Cartaxo, 2016) dan kemampuan menembus hambatan-hambatan (*barriers*) di dalam tubuh, termasuk *blood brain barrier* (Poupot *et al.*, 2018). Di samping itu, mekanisme *cellular uptake* dari nanopartikel yang utamanya melalui endositosis memungkinkannya dapat masuk ke sel-sel spesifik dan berakumulasi di dalamnya (Kou *et al.*, 2013) sehingga mengurangi efek samping dari obat antikanker (Cetin and Sahin, 2015). Nanopartikel juga dapat digunakan untuk mengantarkan obat herbal ke organ spesifik sehingga

meningkatkan selektivitas, *drug delivery*, efektivitas dan keamanan sehingga mengurangi dosis dan meningkatkan kepatuhan pasien (Thapa *et al.*, 2013).

Pinus merkusii merupakan tanaman pinus asli dari Asia Tenggara. Wilayah distribusinya meliputi Burma, Thailand, Laos, Kamboja, Vietnam, Indonesia, dan Filipina (Hidayat and Hansen, 2002). Beberapa penelitian menunjukkan ekstrak dari berbagai bagian dari tanaman pinus memiliki kemampuan sebagai anti-hiperlipidemia dan anti-aterosklerosis (Huseini *et al.*, 2015), anti-inflamasi (Sharma *et al.*, 2016; Tumen *et al.*, 2017), anti *peptic ulcer* (Chaudhary *et al.*, 2014), antioksidan (Ustun *et al.*, 2012), *antiaging* (Chiang *et al.*, 2017), anti-mikroba (da Silva *et al.*, 2014; Leandro *et al.*, 2014; Zeynep *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015), anti-fungi (McMullin *et al.*, 2015), insektisidal (Zeynep *et al.*, 2014), larvasidal (Koutsaviti *et al.*, 2015; Setiawan *et al.*, 2017) dan imunomodulator (Park *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015).

Penelitian mengenai aktivitas antikanker dari beberapa spesies pinus terhadap beberapa sel kanker juga telah dilakukan. Kulit pohon *Pinus merkusii* yang mengandung flavonoid, alkaloid, tannin, saponin, dan triterpenoid (Nisa', 2013; Setiawan *et al.*, 2017), dan *Pinus sylvestrus* (Amalinei *et al.*, 2014) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker serviks (HeLa), *Pinus eldarica* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dan sel kanker payudara (MCF-7) (Sarvmeili *et al.*, 2016), *Pinus massoniana* memiliki kemampuan menghambat migrasi sel HeLa (Li *et al.*, 2016) dan sel kanker ovarium (Liu *et al.*, 2015), dan *Pinus roxburghii* memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan sel kanker neuroblastoma (IMR-32) (Kaushik *et al.*, 2015).

Penelitian tentang aktivitas antikanker ekstrak kulit pohon *Pinus merkusii* terhadap sel kanker serviks HeLa dalam bentuk sediaan nanopartikel masih baru dan belum pernah dilakukan sehingga penulis melakukan penelitian ini sebagai dasar untuk penelitian selanjutnya.

1.2 Permasalahan Penelitian

Tahun I

1. Apakah pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) mempunyai efek sitotoksik pada sel kanker serviks (*HeLa cell line*) secara *in vitro*?

2. Apakah pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) dapat menghambat siklus sel kanker serviks (*HeLa cell line*) secara *in vitro*?
3. Apakah pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) dapat menginduksi apoptosis pada sel kanker serviks (*HeLa cell line*) secara *in vitro*?
4. Apakah pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) dapat meningkatkan ekspresi p53 pada sel kanker serviks (*HeLa cell line*) secara *in vitro*?
5. Apakah pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) dapat meningkatkan ekspresi caspase-9 pada sel kanker serviks (*HeLa cell line*) secara *in vitro*?

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Pinus merkusii*

Pohon pinus atau tusam adalah tanaman yang sering dimanfaatkan sebagai bahan bakar, furnitur, perumahan dan serat kertas, serta bijinya juga sering digunakan sebagai bahan makanan yang bergizi di banyak daerah. Secara ekologis, pohon pinus merupakan komponen utama dari banyak ekosistem hutan di Amerika Utara, Eropa, dan Asia (Richardson, 2002). Menurut Martawijaya dkk. (1989) dalam Sadili (2015), pinus adalah tanaman tropis di kawasan Malesiana dan banyak terdapat di wilayah Asia Tenggara. Di Indonesia, pinus dapat dijumpai di Aceh, Sumatera Utara, Sumatera Barat dan seluruh Jawa. Di alam, pinus tumbuh pada ketinggian 400-1500 m diatas permukaan laut (dpl.), namun juga dilaporkan tumbuh di dataran rendah (± 90 m dpl.) dan pegunungan (± 2000 m dpl.) (Sadili, 2015).

Genus pinus mempunyai lebih dari 110 spesies di seluruh dunia (Sa *et al.*, 2017), salah satunya adalah *Pinus merkusii*. *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese merupakan spesies dari famili Pinaceae yang tumbuh secara alami di Indonesia. *Pinus merkusii* dapat tumbuh dengan baik pada tanah yang kurang subur, misalnya padang alang-alang. Sifatnya yang cepat tumbuh menjadikan pinus tidak memerlukan tempat tumbuh dengan persyaratan khusus (Siregar dan Diputra, 2013).

2.2 Kandungan fitokimia kulit pohon *Pinus merkusii*

Sejak tahun 1990, lebih dari 280 senyawa telah diisolasi dari tanaman genus pinus (Sa *et al.*, 2017). Namun, data mengenai isolasi senyawa murni dari spesies *Pinus merkusii* masih terbatas dan belum banyak digali. Analisis fitokimia kualitatif yang dilakukan oleh Nisa' (2013) dan Setiawan *et al.* (2017) menunjukkan beberapa senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak kulit pohon *Pinus merkusii* seperti flavonoid, alkaloid, tannin, saponin, dan triterpenoid. Semua senyawa metabolit sekunder tersebut diketahui memiliki aktivitas anti-proliferatif, anti-metastasis, dan anti-angiogenesis, anti *multi-drug resistance* (MDR) dan induksi *cell cycle arrest*, apoptosis, autofagi dan kemopreventif pada berbagai sel kanker (Huang *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2016; Raffa *et al.*, 2017). Wiyono *et al.* (2006) juga telah mengidentifikasi minyak terpenin dalam kulit pohon *Pinus merkusii*, antara lain α -pinene, d-camphene, sabinene, β -pinene, myrcene, α -phellandrene, Δ -3-carene, p-

cymene, d-limonene, α -terpineol dan β -caryophyllene.

2.3 Kanker

Kanker adalah sebuah penyakit dimana sekelompok sel abnormal tumbuh secara tidak terkendali dengan mengabaikan regulasi normal dari pembelahan sel. Sel normal selalu patuh terhadap sinyal-sinyal yang diperintahkan, apakah sel tersebut harus membelah, berdiferensiasi menjadi sel lain atau mati. Sel kanker mengembangkan derajat otonomi dari sinyal-sinyal tersebut, sehingga menghasilkan pertumbuhan dan proliferasi yang tidak terkendali. Jika proliferasi tersebut dibiarkan tetap berlanjut dan menyebar dapat mengakibatkan kematian. Faktanya, hampir 90% kematian akibat kanker disebabkan karena penyebaran tumor, yaitu sebuah proses yang disebut metastasis (Hejmadi, 2010).

Tumor diklasifikasikan sebagai tumor jinak dan tumor ganas. Tumor jinak hanya mempunyai resiko rendah terhadap pasien dikarenakan pertumbuhannya yang lambat, kecil, dan terlokalisir, menunjukkan tumor jinak terpisah dari jaringan normal dan tidak mengganggu fungsi normal. Pada umumnya, tumor jinak dinyatakan dengan akhiran *-oma*, sebagai contoh, fibroma yaitu tumor jinak pada jaringan ikat fibrosa dan adenoma yaitu tumor jinak pada kelenjar. Meskipun tumor jinak biasanya tidak berbahaya, sebuah tumor jinak yang besar dapat memblok saluran penting dalam tubuh, seperti kolon atau arteri, atau dapat menekan organ vital sehingga mengganggu fungsinya. Pada umumnya, tumor jinak dianggap lebih ringan daripada tumor ganas. Ciri khas dari sel-sel ganas adalah dapat menginvasi jaringan normal di sekitarnya. Hal tersebut tidak hanya mengganggu fungsi organ, tetapi juga membuat tumor lebih sulit untuk diambil melalui pembedahan. Tumor ganas disusun oleh sel-sel yang tumbuh sangat cepat, sel-sel ini dapat lepas dari tumor primernya dan menyebar atau bermetastasis ke seluruh tubuh untuk membentuk tumor sekunder (Spencer, 2007).

Inisiasi dan progresifitas kanker tergantung baik pada faktor eksternal di lingkungan (tembakau, kimia, radiasi dan organisme infeksius) maupun faktor internal dari dalam sel (warisan mutasi, hormon, kondisi sistem imun dan mutasi yang terjadi akibat metabolisme). Faktor-faktor ini dapat berperan secara bersama atau berurutan, menghasilkan sifat sel yang abnormal dan proliferasi yang berlebihan. Sebagai hasilnya, massa sel tumbuh dan meluas, mempengaruhi jaringan-jaringan

normal di sekitarnya (misalnya otak), dan juga dapat menyebar ke lokasi-lokasi lain di dalam tubuh (metastasis). Namun, kebanyakan kanker membutuhkan waktu hingga berbulan-bulan dan bertahun-tahun bagi suatu mutasi DNA untuk berakumulasi dan menyebabkan sebuah kanker yang dapat dideteksi (Hejmadi, 2010).

2.4 Kanker Serviks

Kanker serviks adalah pertumbuhan abnormal dari sel-sel yang melapisi saluran serviks yang merupakan bagian bawah dari uterus dan berakhir di vagina (Sharma *et al.*, 2016). Kanker serviks umumnya berkembang secara lambat, selama beberapa bulan atau bahkan bertahun-tahun sehingga dengan skrining yang dilakukan secara teratur memungkinkan deteksi dini kanker serviks pada stadium awal sehingga lebih mudah untuk diterapi. Sebelum kanker muncul pada serviks, dapat terjadi perubahan pra-kanker yang khas, yang diketahui sebagai displasia. Perubahan displastik pra-malignan dikarakterisasikan sebagai *cervical intraepithelial neoplasia* (CIN) (Weber, 2007; Spencer, 2007).

2.5 Nanopartikel

Nanopartikel merupakan partikel *ultrafine* dalam ukuran tatanan nanometer. Istilah “nano” adalah sebuah awalan yang menyatakan 10^{-9} , yaitu sepersatu miliar. Hal ini menunjukkan bahwa nanometer (nm) digunakan sebagai satuan panjang. Satu nm panjangnya sangat kecil sesuai dengan sepersatu miliar dari 1 m, sepersejuta dari 1 mm, atau seperseribu dari 1 μm (Yokozama *et al.*, 2012).

Meskipun kisaran ukuran nanometer mencakup semua material dalam rentang 1-1.000 nm, rentang khusus dari 1-100 nm yang mendefinisikan nanoteknologi mempunyai signifikansi tertentu, dimana partikel dalam kisaran ukuran ini memperoleh sifat yang sangat berbeda daripada material mentah. Hal ini terjadi karena dua faktor utama, yaitu peningkatan area permukaan terhadap rasio volume (yang meningkat secara progresif karena material menjadi lebih kecil) dan ukuran partikel memasuki domain dimana efek kuantum mendominasi. Namun pada kasus bahan polimer dan makromolekul, definisi ukuran 1-100 nm tidak dapat digunakan mengingat molekul-molekul tersebut sangat besar. Berat molekul polimer biasanya berkisar dari 10 kDa sampai beberapa ratus kDa, atau bahkan lebih tinggi lagi. Oleh karena itu, untuk pengaplikasian dalam *nanomedicine*, kisaran ukuran formal

nanoteknologi 1-100 nm dikembangkan ke seluruh rentang ukuran nanometer, yaitu 1-1.000 nm (Pande and Bhaskarwar, 2016).

2.6 Kitosan

Kitosan merupakan suatu polimer dari sakarida (polisakarida) yang dihasilkan dari proses deasetilasi senyawa kitin yang terkandung di dalam cangkang *crustacea* seperti udang, kepiting, maupun dinding sel fungi (Gambar 2.19) (Kurniasari dan Atun, 2017; Mohammed *et al.*, 2017). Kitosan merupakan polimer yang populer digunakan dalam sistem nanopartikel (Martien dkk., 2012). Kitosan bersifat kationik, merupakan polimer biokompatibel mukoadhesif dan telah disetujui oleh U.S. FDA untuk *tissue engineering* dan *drug delivery* (Mohammed *et al.*, 2017).

Salah satu metode sederhana untuk pembuatan nanopartikel kitosan adalah dengan metode gelasi ionik. Kitosan dilarutkan dalam larutan dengan pH asam untuk mengubah gugus amina ($-NH_2$) pada kitosan menjadi terionisasi positif ($-NH_3^+$). Gugus yang telah terionisasi positif ini selanjutnya mampu melakukan interaksi ionik dengan obat yang bermuatan negatif. Sistem yang terbentuk cenderung menyisakan gugus ammonium bebas yang akan saling tolak-menolak. Hal ini dapat melemahkan kompleks nanopartikel yang telah terbentuk, sehingga perlu ditambahkan suatu pengikat silang (*crosslinker*) yang mampu menstabilkan muatan positif yang tersisa. Pengikat silang yang digunakan harus berupa poli-anion, salah satunya adalah anion tripolifosfat (TPP) (Gambar 2.20). Meskipun demikian, sistem nanopartikel ini memiliki kelemahan, yaitu stabilitasnya yang sangat dipengaruhi oleh tingkat keasaman (Martien dkk., 2012).

BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

1. Membuktikan bahwa pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) mempunyai efek sitotoksik terhadap sel kanker serviks (*HeLa cell line*) secara *in vitro*.
2. Membuktikan bahwa pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) menghambat siklus sel kanker serviks (*HeLa cell line*) secara *in vitro*.
3. Membuktikan bahwa pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) menginduksi apoptosis pada sel kanker serviks (*HeLa cell line*) secara *in vitro*.
4. Membuktikan bahwa pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) meningkatkan ekspresi p53 pada sel kanker serviks (*HeLa cell line*) secara *in vitro*.
5. Membuktikan bahwa pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) meningkatkan ekspresi caspase-9 pada sel kanker serviks (*HeLa cell line*) secara *in vitro*.

3.2 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai proses antiproliferatif dan apoptosis yang ditunjukkan dengan penghambatan siklus sel dan induksi apoptosis pada sel kanker serviks (*HeLa cell line*) setelah pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese).
2. Sebagai terobosan baru dalam upaya penemuan obat antikanker herbal berbasis teknologi nanopartikel.
3. Sebagai salah satu upaya pendayagunaan keanekaragaman hayati Indonesia mengingat limbah kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) yang sangat berlimpah dan masih belum banyak dimanfaatkan.

BAB 4 MATERI DAN METODE

4.1 Prosedur Penelitian

4.1.1 Ekstraksi kulit pohon pinus

Sebelum dibuat ekstrak, tanaman dideterminasi terlebih dahulu untuk menentukan kebenaran spesies tanaman. Kulit pohon pinus kering yang telah dikoleksi dipotong-potong dan dibuat serbuk (*simplisia*) dengan menggunakan *hammer mill*. Serbuk kulit pohon pinus yang diperoleh (400 g) direndam dengan etanol 96% selama tiga hari. Kemudian dipisahkan maseratnya menggunakan kertas saring Whatmann No. 1.

4.1.2 Pembuatan nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP)

Nanopartikel kitosan-pinus dipreparasi dengan menggunakan metode gelasi ionik, yaitu kompleksasi polielektrolit antara kitosan yang bermuatan positif dengan NaTPP yang bermuatan negatif. Kitosan dilarutkan dalam 100 mL larutan asam asetat glasial 1%. Ekstrak etanol dari kulit pohon pinus seberat 1 gram, dilarutkan dalam 35 mL etanol p.a. dan ditambahkan 15 mL akuades dalam gelas beker 2000 mL. Kemudian larutan pinus tersebut ditambahkan ke dalam larutan kitosan dengan pengadukan magnetik pada suhu kamar. Selanjutnya 350 mL larutan NaTPP dalam akuades diteteskan pada larutan kitosan-pinus secara perlahan dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 1000 rpm selama ± 2 jam. Komposisi perbandingan kitosan dan NaTPP pada larutan yang dibuat adalah 8:1. Suspensi nanopartikel ditunggu hingga terbentuk endapan, kemudian dipisahkan antara endapan dan koloidnya (Laili dkk., 2014; Kurniasari dan Atun, 2017).

4.1.3 Karakterisasi nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP)

4.1.3.1 Particle size analyzer (PSA)

Pemeriksaan ukuran partikel dilakukan dengan metode *Dynamic Light Scattering* (DLS) dengan menggunakan *Particle Size Analyzer* (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) pada rentang 0,1 sampai 10.000 nm.

4.1.4 Skrining fitokimia

4.1.4.1 Skrining alkaloid

Pengujian senyawa golongan alkaloid menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii*) sebanyak

0,2 g dilarutkan dalam 4 mL etanol 96% menggunakan penggetar ultrasonik. Kemudian nanopartikel ekstrak ditotolkan pada pelat KLT sebanyak 4 µl. Uji KLT ini menggunakan Kiesel gel GF 254 sebagai fase diam, kloroform-metanol (9:1) sebagai fase gerak, dan pereaksi Dragendrof sebagai penampak noda. Jika timbul warna jingga menunjukkan adanya alkaloid dalam nanopartikel ekstrak.

4.1.4.2 Skrining flavonoid

Pengujian senyawa golongan flavonoid menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii*) sebanyak 0,2 g dilarutkan dalam 10 mL etanol 96% menggunakan penggetar ultrasonik. Kemudian nanopartikel ekstrak ditotolkan pada pelat KLT sebanyak 25 µl. Uji KLT ini menggunakan Kiesel gel GF 254 sebagai fase diam, kloroform-metanol (9:1) sebagai fase gerak, dan uap ammonia, UV 366 nm dan 254 nm sebagai penampak noda. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya noda berwarna kuning intensif dengan penampak noda uap ammonia.

4.1.4.3 Skrining polifenol

Pengujian senyawa golongan polifenol menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii*) ditotolkan pada pelat KLT sebanyak 5 µl. Uji KLT ini menggunakan Kiesel gel GF 254 sebagai fase diam, etil asetat-metanol-asam formiat (16:4:1) sebagai fase gerak, dan $\text{FeCl}_3 2\%$, UV 366 nm dan 254 nm sebagai penampak noda. Adanya polifenol ditunjukkan dengan timbulnya noda berwarna coklat hingga kehitaman dengan penampak noda FeCl_3 .

4.1.4.4 Skrining terpenoid dan steroid

Pengujian senyawa golongan terpenoid dan steroid menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Sedikit nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii*) ditambah beberapa tetes n-heksana, kemudian divortex selama 3 menit, lalu selanjutnya ditotolkan pada fase diam. Uji KLT ini menggunakan Kiesel gel GF 254 sebagai fase diam, n-heksana-etil asetat (4:1) sebagai fase gerak, dan anisaldehida asam sulfat sebagai penampak noda. Adanya terpenoid/steroid ditunjukkan dengan terjadinya warna merah ungu atau ungu.

4.1.4.5 Skrining saponin

Skrining senyawa golongan saponin menggunakan uji buih. Larutan nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii*) sebanyak 0,3 gram ditambah air 10 mL dan dikocok kuat selama 30 detik. Uji buih positif mengandung saponin bila terjadi buih yang stabil selama lebih dari 30 menit dengan tinggi buih 1-10 cm di atas permukaan dan saat ditambahkan 1 tetes asam klorida 2N, buih tidak hilang.

4.1.5 Kultur sel

Sel kanker serviks (HeLa *cell line*) yang telah dithawing ditumbuhkan dalam media DMEM yang mengandung *fetal bovine serum* (FBS) 10%, antibiotik (*penicillin-streptomycin*) 2%, dan fungizone 0,5%. Kemudian sel diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37 °C.

4.1.6 Uji sitotoksitas dengan metode MTT

Suspensi sel HeLa (1×10^6 sel/10 mL media) ditanam pada *96-well plates* dan diinkubasi 24 jam (37 °C, 5% CO₂). Sebelum dilakukan terapi, media dari semua *well* dibuang terlebih dahulu. Kemudian dilakukan pemberian NEKPP dengan seri konsentrasi (50, 100, 200, 400 dan 800 µg/mL) ke dalam masing-masing *well* dan dibuat replikasi tiga kali (triplo). Setelah itu sel yang telah diterapi diinkubasi selama 24 jam (37 °C, 5% CO₂) (Sarvmeili *et al.*, 2016). Selanjutnya, media yang ada di dalam semua *well* dibuang. Kemudian sebanyak 100 µl larutan MTT (0,5 mg/mL) ditambahkan ke dalam semua *well* dan diinkubasi kembali selama 4 jam. Setelah inkubasi, dilakukan pengamatan kondisi sel dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan *stopper* 100 µl SDS 10%. Kemudian *plate* dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasikan di tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. Absorbansi diukur dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Kemudian dilakukan penentuan persentase inhibisi berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh dan hasil data dapat digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀.

4.1.7 Analisis siklus sel

Suspensi sel HeLa (1×10^6 sel/well) ditanam pada *6-well plates* dan diinkubasi selama semalam (37 °C, 5% CO₂). Setelah itu media sel dibuang dan dilakukan terapi dengan menambahkan 1000 µl NEKPP (IC₅₀, 2IC₅₀, 4IC₅₀) ke dalam masing-masing

well. Untuk kontrol sel, ditambahkan 1000 μ l media kultur ke dalam *well*. Kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam (Putri, 2014).

Media dari setiap sel diambil dan ditransfer ke dalam konikel sesuai konsentrasi NEKPP. Kemudian ditambahkan 1 mL PBS ke dalam masing-masing *well* dan PBS diambil kembali dan ditransfer ke dalam konikel, pencucian dengan PBS dilakukan sebanyak 3 kali. Selanjutnya ditambahkan 500 μ l tripsin-EDTA 0,25 % dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 5 menit. Kemudian sel diresuspensi sampai sel lepas satu per satu dan sel ditransfer ke dalam konikel. Setelah itu dilakukan sentrifugasi konikel dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit dan supernatan dibuang. Kemudian ditambahkan 1 mL PBS ke dalam konikel, dilakukan resuspensi dan transfer PBS berisi sel ke dalam *microtube*. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi kembali (2500 rpm selama 10 menit) dan supernatan dibuang. Selanjutnya dilakukan ditambahkan PBS kembali sebanyak 1 mL ke dalam *microtube*.

Sebanyak 500 μ l alkohol 70% diteteskan (1 tetes/detik) ke dalam konikel yang digoyang perlahan. Kemudian konikel disimpan pada temperatur ruang 37 °C selama 30 menit dan disentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Selanjutnya alkohol dibuang dan ditambahkan 1 mL PBS serta disentrifus kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Kemudian dilakukan pencucian dengan PBS 2 kali. Konikel dibungkus dengan aluminium foil, kemudian ditambahkan reagen *flowcytometry* dan didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya suspensi sel ditransfer ke dalam *flowcyto-tube* dan dilakukan pembacaan dengan *flowcytometer* (FACS Calibur) untuk mengetahui profil *cell cycle* (Putri, 2014).

4.1.8 Uji apoptosis dengan metode *double staining*

Sel HeLa ditanam pada *6-well plates* dengan kepadatan 1×10^6 sel/*well* dan didiamkan selama 24 jam agar melekat pada dasar *plate*. Setelah media kultur dibuang, dilakukan pemberian NEKPP (IC₅₀, 2IC₅₀, 4IC₅₀) sebanyak 1 mL dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Kemudian dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak 3 kali dan semua cairan pencucian ditampung di dalam konikel. Selanjutnya sel dilepaskan dengan larutan 500 mL tripsin-EDTA 0,25 %, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit dan setelah itu dipindahkan ke dalam konikel. Kemudian ditambahkan PBS 1

mL ke dalam konikel, diresuspensi dan dipindahkan ke *microtube*. Sel kemudian disentrifus pada 2500 rpm selama 10 menit. Setelah itu supernatant dibuang dan ditambahkan PBS 1 mL ke dalam *microtube*. Sel disentrifus kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Pellet yang diperoleh diresuspensi dalam PBS pH 7,4 dan disentrifus kembali. Setelah itu pellet sel diresuspensi dalam *Annexin V binding buffer*. Sampel tersebut kemudian diwarnai dengan 5 μ l AV-FITC dan 10 μ l PI, kemudian diinkubasi selama 15 menit dalam ruangan gelap pada suhu 25 °C. Setelah itu sebanyak 250 μ l *Annexin V binding buffer* ditambahkan. Sel dianalisis menggunakan *flowcytometer* (FACS Calibur). Hasil analisis diinterpretasikan dalam sebuah *dot plot* AV-FITC versus PI dalam kuadran. Persentase sel apoptosis ditentukan dengan menggunakan FACSDiva software (Saengkrit *et al.*, 2014).

4.1.9 Pemeriksaan ekspresi p53 dengan metode imunositokimia

Metode imunositokimia menggunakan *24-well plates* yang dilapisi dengan *coverslip*. 50 μ l suspensi sel (2×10^4) ditransfer di atas *coverslip* dan didiamkan selama 10 menit dalam inkubator. Kemudian ditambahkan 100 μ l media kultur ke dalam masing-masing *well* dan diinkubasi selama semalam. Setelah diinkubasi semua media kultur dari *well* dibuang. Setelah itu PBS dibuang dan dimasukkan NEKPP (($1IC_{50}$, $2IC_{50}$, $4IC_{50}$) sebanyak 500 μ l ke dalam masing-masing *well* (Fitriasari, 2010). Kemudian diinkubasi di dalam inkubator CO₂ selama 24 jam.

Setelah inkubasi dihentikan, semua media dibuang, kemudian dilakukan pencucian dengan PBS dan PBS dibuang. Setelah itu fiksasi dengan methanol 500 μ l selama 10 menit. Kemudian sisa methanol dibuang dan dilakukan pencucian menggunakan air kran sebanyak 3 kali. Dilakukan pembilasan kembali dengan PBS. Selanjutnya ditambahkan *blocking solution* (H₂O₂:metanol 1:10) 1 mL dan diinkubasi selama 10 menit. Kemudian dicuci dengan air kran sebanyak 3 kali dan dibilas dengan PBS. Setelah itu *coverslip* diambil dengan menggunakan ujung jarum dengan hati-hati lalu diletakkan di dalam *24-well plate*. Kemudian *blocking serum* (Background Sniper) diteteskan sebanyak 20 μ l di atas *coverslip* dan diinkubasi selama 10 menit di ruang gelap pada suhu kamar. Selanjutnya diteteskan *p53 mouse monoclonal antibody* (p53 Ab-1, Lab Vision) sebanyak 50 μ l dan diinkubasi selama 1 jam di ruang gelap pada suhu kamar. Kemudian dilakukan pencucian dengan PBS selama 2 menit

sebanyak 2 kali. Setelah itu ditambahkan biotin (Trekkie Universal Link, Biocare Medical) sebanyak 50 µl dan diinkubasi di ruang gelap dalam suhu kamar. Kemudian dilakukan pencucian kembali dengan PBS sebanyak 2 kali. Selanjutnya ditetaskan *streptavidine-peroxidase* (TrekAvidin-HRP Label, Biocare Medical) sebanyak 50 µl dan diinkubasi kembali di ruang gelap dalam suhu kamar. Setelah diinkubasi, dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak 2 kali. Kemudian ditetaskan substrat kromogen DAB (Betazoid DAB Chromogen, Biocare Medical) sebanyak 50 µl dan didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan air kran untuk membersihkan sisa-sisa substrat. Setelah itu ditetaskan hematoxylin eosin (HE) secukupnya dan diinkubasi selama 2 menit. Kemudian dilakukan pencucian dengan air kran dan keringkan dalam suhu kamar. Kemudian *slide* direndam dalam alcohol absolut dan dikeringkan dalam suhu kamar. Tahap terakhir adalah dilakukan mounting/pengeleman dan pembacaan hasil dengan mikroskop cahaya.

4.1.10 Pemeriksaan ekspresi caspase-9 dengan metode imunositokimia

Metode imunositokimia menggunakan *24-well plates* yang dilapisi dengan *coverslip*. 50 µl suspensi sel (2×10^4) ditransfer di atas *coverslip* dan didiamkan selama 10 menit dalam inkubator. Kemudian ditambahkan 100 µl media kultur ke dalam masing-masing *well* dan diinkubasi selama semalam. Setelah diinkubasi semua media kultur dari *well* dibuang. Setelah itu PBS dibuang dan dimasukkan NEKPP ((IC_{50} , $2IC_{50}$, $4IC_{50}$) sebanyak 500 µl ke dalam masing-masing *well* (Fitriasari, 2010). Kemudian diinkubasi di dalam inkubator CO₂ selama 24 jam.

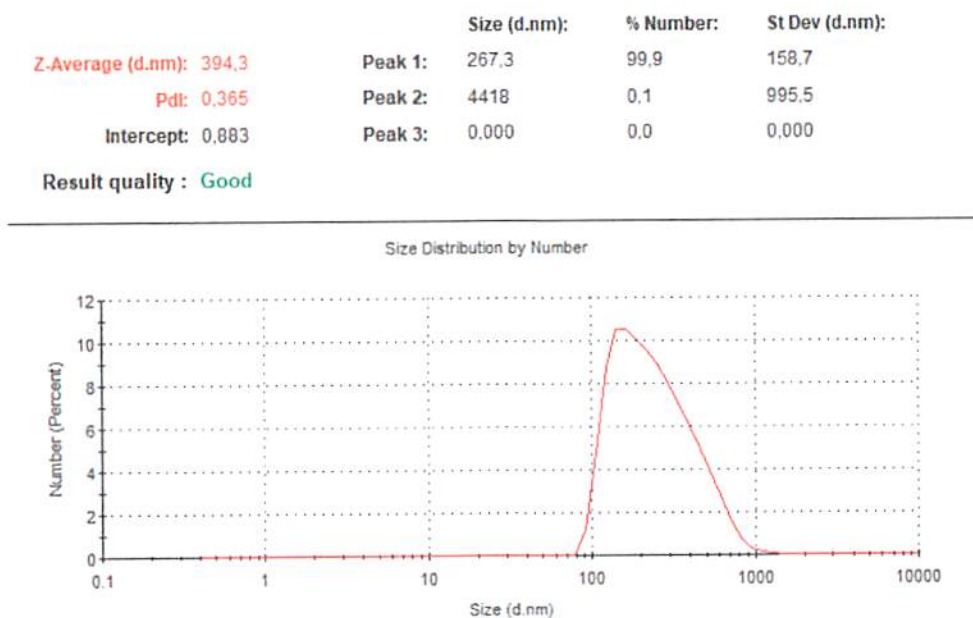
Setelah inkubasi dihentikan, semua media dibuang, kemudian dilakukan pencucian dengan PBS dan PBS dibuang. Setelah itu fiksasi dengan methanol 500 µl selama 10 menit. Kemudian sisa methanol dibuang dan dilakukan pencucian menggunakan air kran sebanyak 3 kali. Dilakukan pembilasan kembali dengan PBS. Selanjutnya ditambahkan *blocking solution* (H₂O:metanol 1:10) 1 mL dan diinkubasi selama 10 menit. Kemudian dicuci dengan air kran sebanyak 3 kali dan dibilas dengan PBS. Setelah itu *coverslip* diambil dengan menggunakan ujung jarum dengan hati-hati lalu diletakkan di dalam *24-well plate*. Kemudian *blocking serum* (Background Sniper, Biocare Medical) ditetaskan sebanyak 20 µl di atas *coverslip* dan diinkubasi selama 10 menit di ruang gelap pada suhu kamar. Selanjutnya ditetaskan *caspase-9 rabbit polyclonal antibody* (FineTest) sebanyak 50 µl dan diinkubasi selama 1 jam di

ruang gelap pada suhu kamar. Kemudian dilakukan pencucian dengan PBS selama 2 menit sebanyak 2 kali. Setelah itu ditambahkan biotin (Trek Universal Link, Biocare Medical) sebanyak 50 μ l dan diinkubasi di ruang gelap dalam suhu kamar. Kemudian dilakukan pencucian kembali dengan PBS sebanyak 2 kali. Selanjutnya ditetaskan *streptavidine-peroxidase* (TrekAvidin-HRP Label, Biocare Medical) sebanyak 50 μ l dan diinkubasi kembali di ruang gelap dalam suhu kamar. Setelah diinkubasi, dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak 2 kali. Kemudian ditetaskan substrat kromogen DAB (Betazoid DAB Chromogen, Biocare Medical) sebanyak 50 μ l dan didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan air kran untuk membersihkan sisa-sisa substrat. Setelah itu ditetaskan hematoxylin eosin (HE) secukupnya dan diinkubasi selama 2 menit. Kemudian dilakukan pencucian dengan air kran dan keringkan dalam suhu kamar. Kemudian *slide* direndam dalam alcohol absolut dan dikeringkan dalam suhu kamar. Tahap terakhir adalah dilakukan mounting/pengeleman dan pembacaan hasil dengan mikroskop cahaya.

BAB 5 HASIL DAN LUARAN PENELITIAN

5.1 Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Kulit Pohon Pinus (NEKPP)

Nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) dikarakterisasi dengan teknik *Dynamic Light Scattering* (DLS) menggunakan *Particle Size Analyzer* (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.) untuk mengetahui ukuran dan distribusi partikel. Dari hasil karakterisasi diperoleh ukuran rata-rata NEKPP adalah 394,3 nm dengan indeks polidispersitas sebesar 0,365. Distribusi ukuran NEKPP dapat dilihat pada Gambar 5.1.



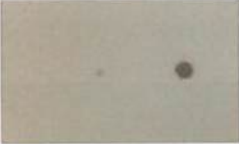




Gambar 5.1 Distribusi ukuran nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP)

5.2 Skrining Fitokimia Nanopartikel Ekstrak Kulit Pohon Pinus (NEKPP)

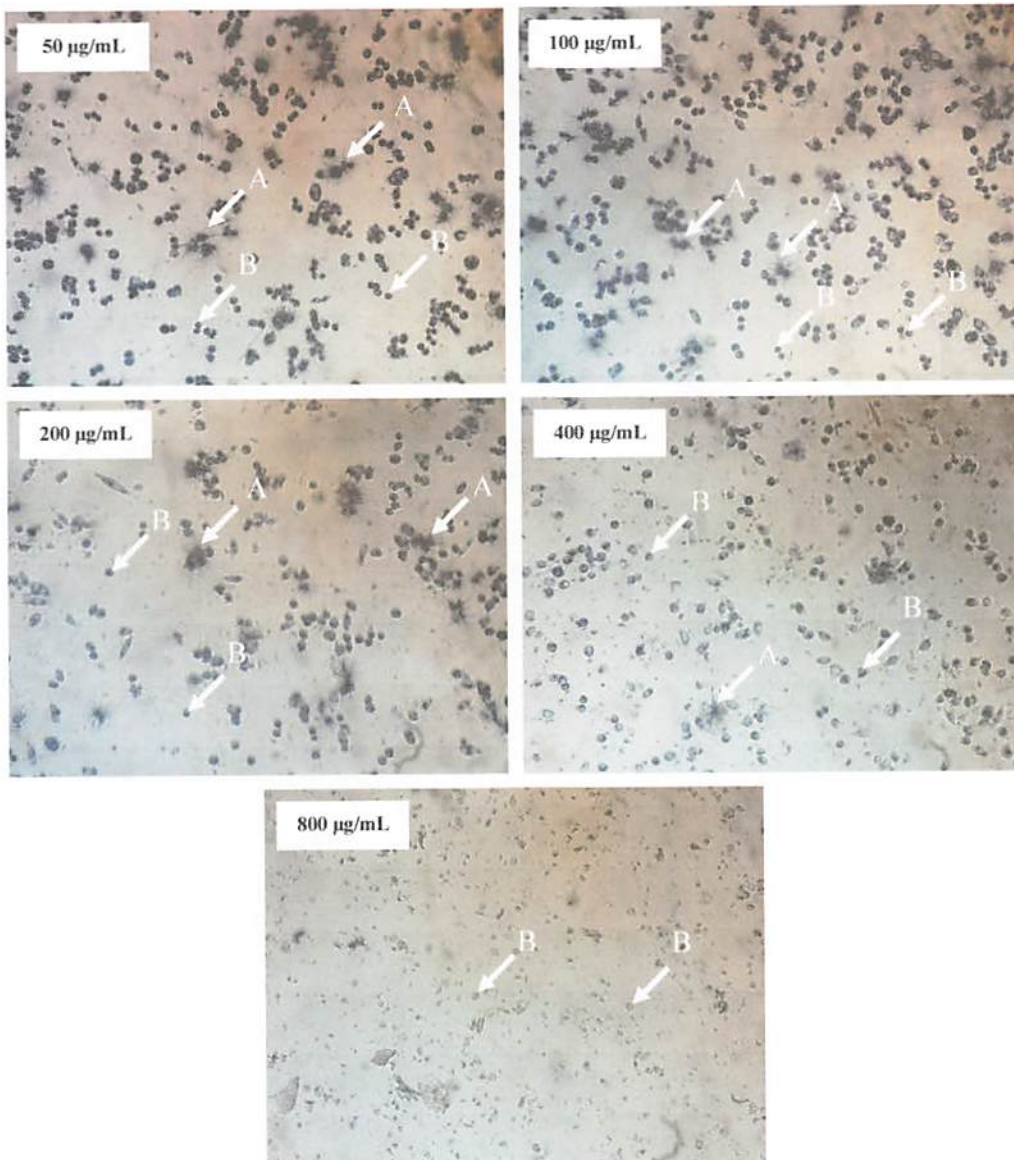
Hasil skrining fitokimia pada nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) ditunjukkan pada Tabel 5.1. Uji fitokimia dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk skrining senyawa alkaloid, flavonoid, polifenol, dan terpenoid/steroid dan uji buih untuk skrining senyawa saponin. Berdasarkan hasil pengujian, NEKPP mengandung senyawa golongan alkaloid, terpenoid, steroid dan saponin.

Tabel 5.1 Kandungan fitokimia nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP)

No.	Senyawa	Pereaksi	Uji Fitokimia	Hasil	Keterangan
1	Alkaloid	Dragendorf		+	Terbentuk noda berwarna jingga
2	Flavonoid	Uap amonia		-	Tidak terbentuk noda berwarna kuning
3	Polifenol	FeCl ₃		-	Tidak terbentuk noda berwarna coklat hingga kehitaman
4	Terpenoid/ Steroid	Anisaldehyda asam sulfat		+	Terbentuk noda berwarna ungu dan merah ungu
5	Saponin	Air + HCl		+	Terbentuk buih setinggi 1-10 cm

5.3 Sitotoksisitas Nanopartikel Ekstrak Kulit Pohon Pinus (NEKPP) terhadap Sel Kanker Serviks (*HeLa Cell Line*)

Uji aktivitas sitotoksik nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) pada sel HeLa menggunakan metode *microculture tetrazolium technique* (MTT). Uji ini dilakukan dengan memberikan reagen yellow tetrazolium MTT [3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] pada sel HeLa yang telah diberikan perlakuan NEKPP selama 24 jam. Yellow tetrazolium (MTT) yang diabsorpsi oleh sel hidup direduksi oleh enzim *NAD(P)H-dependent cellular oxidoreductase* menjadi kristal formazan ((E,Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan) yang berwarna ungu/biru gelap. Intensitas dari warna ungu/biru gelap mengindikasikan viabilitas sel (Liu *et al.*, 1997; Bahuguna *et al.*, 2017).



Gambar 5.2 Gambaran mikroskopis sel HeLa setelah pemberian beberapa konsentrasi NEKPP (50, 100, 200, 400 dan 800 $\mu\text{g/mL}$) selama 24 jam. Keterangan: (A) pembentukan krsital formazan pada sel HeLa yang hidup dan (B) sel HeLa yang mati (*inverted phase contrast microscope* (Axiovert 25, Carl Zeiss Microscopy, LLC, U.S.A.); perbesaran 100x)

Gambar 5.2 menunjukkan bahwa semakin meningkat konsentrasi NEKPP yang diberikan pada sel HeLa maka semakin berkurang kristal formazan yang terbentuk. Hasil uji MTT kemudian dibaca dengan *microplate reader* dan diperoleh nilai absorbansi (*optical density* (OD)) dari sel HeLa yang telah diberi NEKPP dengan beberapa konsentrasi (50, 100, 200, 400 dan 800 $\mu\text{g/mL}$). Pada Tabel 5.2 dapat dilihat

bahwa semakin tinggi konsentrasi NEKPP maka nilai absorbansi warna formazan semakin berkurang. Hal ini menunjukkan bahwa viabilitas sel HeLa semakin menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) yang diberikan.

Tabel 5.2 Hasil uji MTT sel HeLa setelah pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) selama 24 jam

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata OD	Persentase Inhibisi (%)	Inhibition Concentration 50% (IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$))
Nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP)	50	0,708	4,12	384,10
	100	0,667	10,75	
	200	0,566	26,91	
	400	0,330	64,74	
	800	0,131	96,79	

Rerata nilai absorbansi dari sel HeLa kemudian digunakan untuk menghitung nilai persentase inhibisi sel HeLa. Pada Tabel 5.3 juga dapat dilihat bahwa semakin meningkat konsentrasi nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) maka semakin meningkat persentase inhibisi sel HeLa, dengan persentase paling tinggi sebesar 96,79% pada konsentrasi 800 $\mu\text{g/mL}$.

Setelah % inhibisi diperoleh, dilanjutkan dengan membuat kurva linear antara konsentrasi dengan % inhibisi menggunakan program *Microsoft Excel*. Persamaan regresi yang diperoleh dari kurva linear tersebut adalah $y = 0,1262x + 1,5271$ dengan harga $R_f = 0,768$ (Lampiran 6). Nilai IC₅₀ didapatkan dengan memasukkan angka 50 ke dalam persamaan y untuk mendapatkan nilai x yang merupakan nilai IC₅₀. Dari hasil perhitungan, nilai IC₅₀ yang diperoleh adalah 384,10 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 5.2).

5.4 Penghambatan Siklus Sel Kanker Serviks (*HeLa Cell Line*)

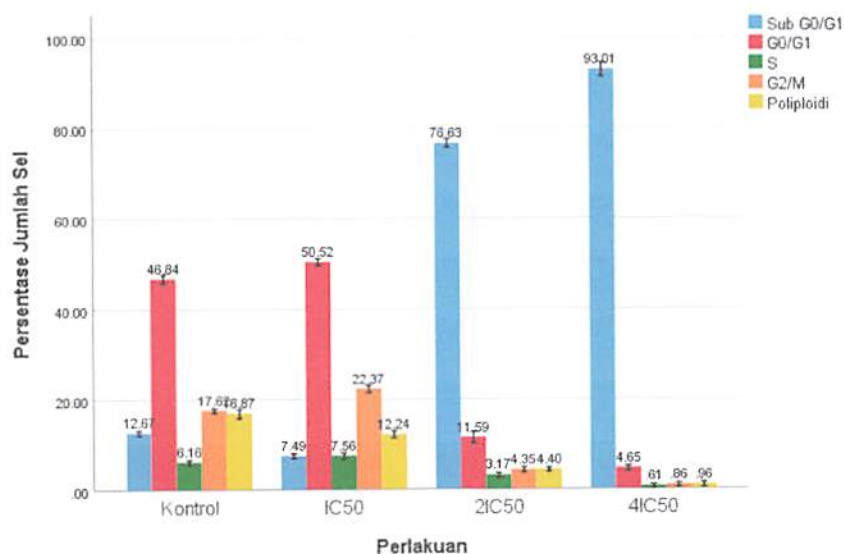
Analisis *flowcytometry* dilakukan untuk mengetahui penghambatan siklus sel pada sel kanker serviks HeLa setelah pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP). Data analisis *flowcytometry* berupa distribusi sel pada fase siklus sel sub G1, G0/G1, S, G2/M dan poliploid. Data tersebut kemudian dianalisis dengan *one-way ANOVA* dan menunjukkan signifikansi yang sangat berbeda nyata ($p < 0,01$) antar kelompok perlakuan. Setelah itu analisis dilanjutkan dengan uji Duncan untuk melihat perbedaan setiap fase siklus sel antar tiap kelompok perlakuan (Tabel 5.3).

Tabel 5.3 Persentase fase siklus sel HeLa setelah pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) dengan masa inkubasi 24 jam

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Persentase Jumlah Sel (%) \pm SD				
		Sub G0/G1	G0/G1	S	G2/M	Poliploidi
Kontrol	0	12,67 \pm 0,43 ^b	46,84 \pm 0,73 ^c	6,16 \pm 0,38 ^e	17,62 \pm 0,41 ^c	16,87 \pm 0,83 ^d
IC ₅₀	384,10	7,49 \pm 0,43 ^a	50,52 \pm 0,62 ^d	7,56 \pm 0,50 ^d	22,37 \pm 0,65 ^d	12,24 \pm 0,64 ^c
2IC ₅₀	768,19	76,63 \pm 0,72 ^c	11,59 \pm 0,99 ^b	3,17 \pm 0,40 ^b	4,35 \pm 0,47 ^b	4,40 \pm 0,36 ^b
4IC ₅₀	1536,38	93,01 \pm 1,29 ^d	4,65 \pm 0,45 ^a	0,61 \pm 0,32 ^a	0,86 \pm 0,36 ^a	0,96 \pm 0,46 ^a

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Pada Gambar 5.3 dapat dilihat grafik rerata akumulasi fase-fase siklus sel HeLa dengan pemberian NEKPP dengan masa inkubasi 24 jam. Perlakuan IC₅₀ NEKPP menunjukkan akumulasi sel HeLa pada fase G0/G1 dan memiliki persentase yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Hal ini terlihat dari hasil uji yang berbeda nyata dengan kontrol, 2IC₅₀ dan 4IC₅₀ NEKPP. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi IC₅₀ nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) dapat menghambat siklus sel HeLa pada fase G1/G0.



Gambar 5.3 Akumulasi fase siklus sel HeLa dengan pemberian berbagai konsentrasi nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) setelah inkubasi 24 jam

Dari Gambar 5.3 juga dapat dilihat bahwa pada perlakuan 2IC₅₀ NEKPP menunjukkan akumulasi sel pada fase sub G0/G1 dan berbeda nyata dengan kelompok kontrol, IC₅₀ dan 4IC₅₀ NEKPP. Selain itu, pada perlakuan 4IC₅₀ NEKPP juga menunjukkan akumulasi fase pada sub G0/G1 yang menunjukkan sel *hypodiploid*

(mengalami fragmentasi DNA) dan memiliki persentase yang paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Tingginya akumulasi sel pada fase sub G0/G1 mungkin dikarenakan kebanyakan sel HeLa telah mengalami apoptosis dengan pemberian kedua konsentrasi tersebut (Noor *et al.*, 2014).

5.5 Persentase Apoptosis Sel Kanker Serviks (*HeLa Cell Line*)

Pengukuran persentase sel apoptosis menggunakan *flowcytometry* dilakukan untuk mengevaluasi apakah pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) selama 24 jam berpengaruh terhadap kematian sel terprogram pada sel HeLa. Pewarnaan Annexin V dan PI yang dilanjutkan dengan analisis *flowcytometry* dapat membedakan antara sel apoptosis dan sel nekrosis. Annexin V berikatan dengan fosfatidilserin yang berpindah dari lapisan dalam membran plasma ke lapisan luar membran pada sel yang mengalami apoptosis awal dan akhir. Konjugasi dengan *fluorescein isothiocyanate* (FITC) meningkatkan afinitas annexin V dengan membran. Propidium iodide (PI) digunakan untuk membedakan sel hidup dan sel mati (nekrosis) dengan cara berpenetrasi hanya pada membran dari sel yang mati dan berikatan dengan DNA (Amalinei *et al.*, 2014).

Data *flowcytometry* selanjutnya dianalisis dengan *one-way* ANOVA. Dari hasil statistik menggunakan ANOVA diketahui bahwa terdapat signifikansi yang sangat berbeda nyata ($p < 0,01$) antar kelompok perlakuan. Setelah itu dilanjutkan dengan uji Duncan untuk melihat perbedaan setiap fase apoptosis sel antar tiap kelompok perlakuan (Tabel 5.4).

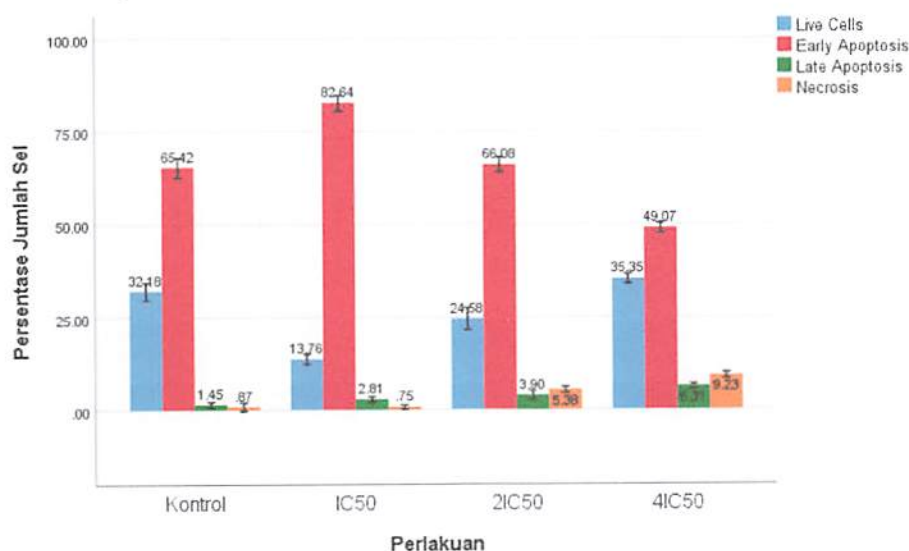
Tabel 5.4 Persentase fase apoptosis sel HeLa setelah pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) dengan masa inkubasi 24 jam

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Persentase Jumlah Sel (%) \pm SD			
		Sel Hidup	Apoptosis Awal	Apoptosis Akhir	Nekrosis
Kontrol	0	32,18 \pm 1,86 ^c	65,42 \pm 2,11 ^b	1,45 \pm 0,58 ^a	0,87 \pm 0,92 ^a
IC ₅₀	384,10	13,76 \pm 1,10 ^a	82,63 \pm 1,68 ^c	2,81 \pm 0,61 ^b	0,75 \pm 0,47 ^a
2IC ₅₀	768,19	24,58 \pm 2,42 ^b	66,08 \pm 1,55 ^b	3,90 \pm 0,88 ^c	5,38 \pm 0,62 ^b
4IC ₅₀	1536,38	35,34 \pm 1,05 ^d	49,07 \pm 1,04 ^a	6,31 \pm 0,55 ^d	9,23 \pm 0,67 ^c

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Pada Gambar 5.4 dapat dilihat bahwa sel HeLa memasuki tahap apoptosis awal setelah 24 jam dari pemberian IC₅₀ NEKPP dan memiliki persentase yang paling tinggi

dan berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol, 2IC₅₀ dan 4IC₅₀ NEKPP. Namun, terjadi penurunan persentase sel HeLa tahap apoptosis awal dengan pemberian 2IC₅₀ dan 4IC₅₀ NEKPP. Hal ini terlihat dari persentase yang lebih rendah antara perlakuan 2IC₅₀ NEKPP dengan IC₅₀ NEKPP, demikian pula ditunjukkan oleh persentase yang lebih rendah pada perlakuan 4IC₅₀ NEKPP dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa persentase apoptosis awal sel HeLa secara efektif diinduksi oleh pemberian IC₅₀ nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP).



Gambar 5.4 Persentase apoptosis pada sel HeLa dengan pemberian berbagai konsentrasi nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) setelah inkubasi 24 jam

Gambar 5.4 juga menunjukkan proporsi sel yang berada pada tahap apoptosis akhir mengalami peningkatan seiring meningkatnya konsentrasi NEKPP (IC₅₀, 2IC₅₀ dan 4IC₅₀) setelah 24 jam. Pada perlakuan IC₅₀ NEKPP menunjukkan perbedaannya yang nyata dengan kontrol, IC₅₀ dan 4IC₅₀ NEKPP, demikian juga dengan perlakuan 2IC₅₀ NEKPP yang memiliki perbedaan yang nyata dengan kontrol dan 4IC₅₀ NEKPP, dan perlakuan 4IC₅₀ NEKPP yang berbeda nyata dengan kontrol. Namun, persentase sel apoptosis akhir tersebut signifikan lebih rendah dibandingkan dengan persentase apoptosis awal sel HeLa dengan pemberian dari ketiga konsentrasi. Hal ini menunjukkan bahwa tahap apoptosis yang dialami kebanyakan sel HeLa setelah inkubasi 24 jam dengan pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) konsentrasi IC₅₀, 2IC₅₀ dan 4IC₅₀ baru berada pada tahap apoptosis awal.

5.6 Ekspresi p53 pada Sel Kanker Serviks (*HeLa Cell Line*)

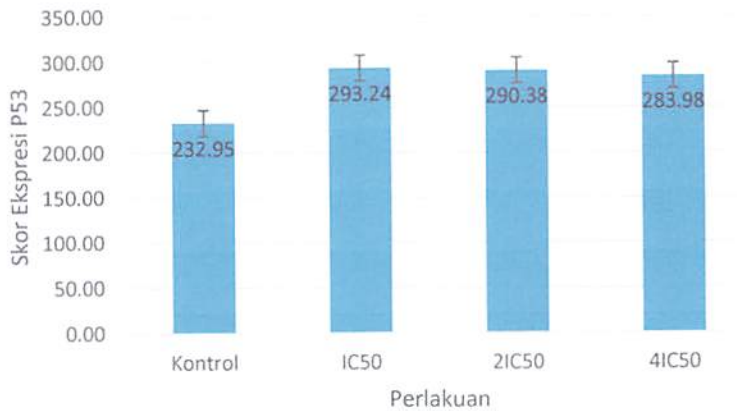
Perhitungan ekspresi P53 pada sel HeLa dilakukan dengan menggunakan metode semikuantitatif H-score (Lampiran 12). Data hasil perhitungan kemudian dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis pada setiap kelompok perlakuan yang mempengaruhi ekspresi p53. Dari hasil uji Kruskal-Wallis didapatkan hasil berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) sehingga dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney pada setiap kelompok perlakuan untuk melihat adanya perbedaan antar dua perlakuan. Adapun hasil uji Mann-Whitney antar dua perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5.5 berikut.

Tabel 5.5 Perbandingan signifikansi ekspresi p53 pada sel HeLa

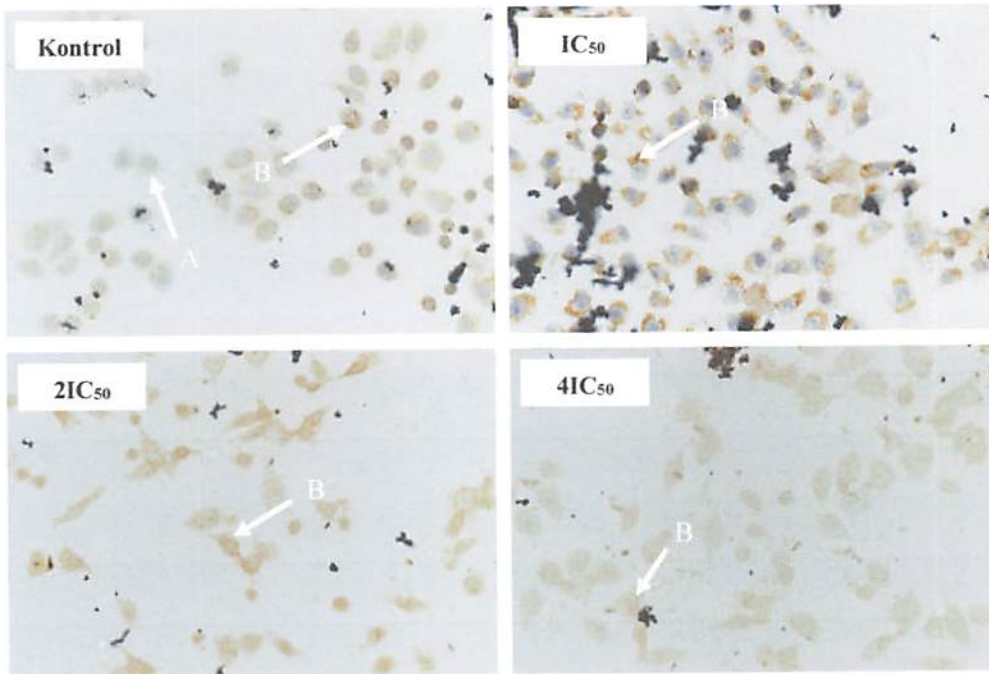
Ekspresi p53	Kelompok	Kelompok Banding	Signifikansi
P53	Kontrol	1C ₅₀	0,000**
		2IC ₅₀	0,000**
		4IC ₅₀	0,000**
P53	IC ₅₀	2IC ₅₀	0,071
		4IC ₅₀	0,001**
P53	2IC ₅₀	4IC ₅₀	0,060

Keterangan: *Signifikansi pada $p < 0,05$; **Signifikansi pada $p < 0,01$

Dari Tabel 5.5 dapat dilihat bahwa pada kelompok kontrol terlihat berbeda sangat nyata dibandingkan dengan semua kelompok perlakuan ($p < 0,01$). Sedangkan perlakuan IC₅₀ NEKPP tidak berbeda nyata dengan perlakuan 2IC₅₀ NEKPP, namun berbeda sangat nyata dengan kelompok 4IC₅₀ NEKPP. Begitu juga dengan kelompok 2IC₅₀ NEKPP terlihat tidak berbeda nyata dengan kelompok 4IC₅₀ NEKPP. Berdasarkan hasil diatas menunjukkan bahwa pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) dapat meningkatkan ekspresi p53 pada sel HeLa setelah inkubasi 24 jam dengan ekspresi yang paling tinggi pada perlakuan IC₅₀ NEKPP dan semakin menurun secara berurutan pada perlakuan 2IC₅₀ dan 4IC₅₀ NEKPP yang dapat dilihat pada Gambar 5.5 dan 5.6.



Gambar 5.5 Rerata skor ekspresi p53 pada sel HeLa dengan pemberian berbagai konsentrasi nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) setelah inkubasi 24 jam



Gambar 5.6 Ekspresi p53 pada sel HeLa pada tiap perlakuan nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP). Keterangan: (A) menunjukkan tidak adanya ekspresi p53 berupa warna kuning kecoklatan dan (B) menunjukkan adanya ekspresi p53 pada perlakuan (Pewarnaan imunositokimia; mikroskop cahaya (Nikon Eclipse Ci, Nikon Corporation, Tokyo, Japan); perbesaran 400x).

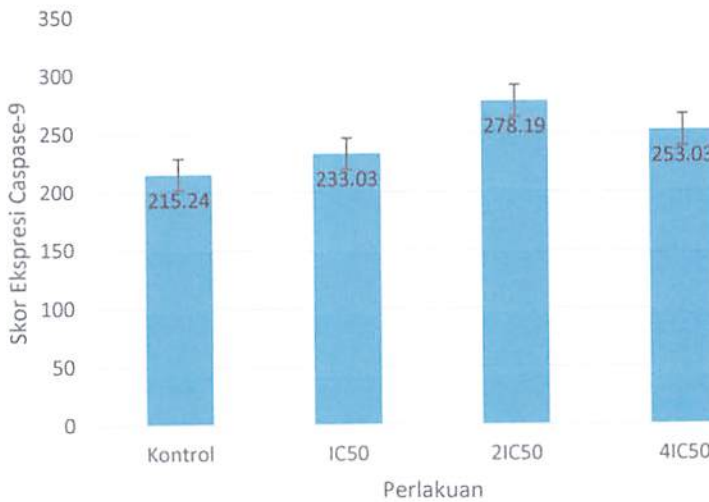
5.7 Ekspresi Caspase-9 pada Sel Kanker Serviks (*HeLa Cell Line*)

Data hasil perhitungan ekspresi Caspase-9 pada sel HeLa menggunakan metode semikuantitatif H-score (Lampiran 12) dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis. Dari hasil uji Kruskal-Wallis didapatkan hasil berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) di antara semua kelompok. Kemudian dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney untuk melihat perbedaan antar dua perlakuan. Adapun hasil uji Mann-Whitney dapat dilihat pada Tabel 5.6 berikut.

Tabel 5.6 Perbandingan signifikansi ekspresi caspase-9 pada sel HeLa

Ekspresi Caspase-9	Kelompok	Kelompok Banding	Signifikansi
Caspase-9	Kontrol	IC ₅₀	0,516
		2IC ₅₀	0,000**
		4IC ₅₀	0,000**
Caspase-9	IC ₅₀	2IC ₅₀	0,000**
		4IC ₅₀	0,000**
Caspase-9	2IC ₅₀	4IC ₅₀	0,000**

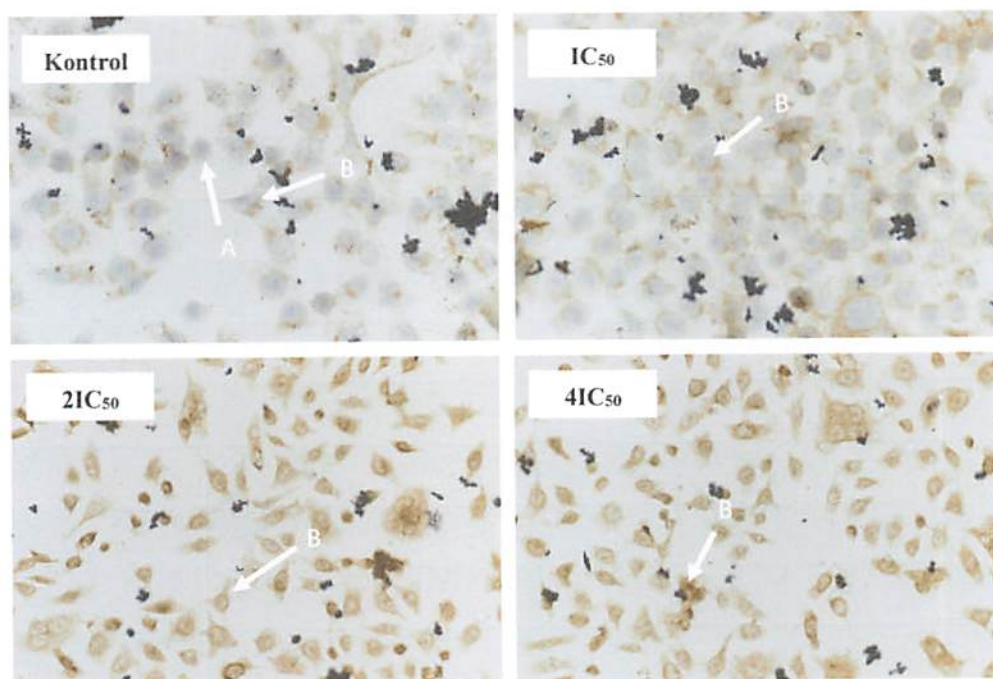
Keterangan: *Signifikansi pada $p < 0,05$; **Signifikansi pada $p < 0,01$



Gambar 5.7 Rerata skor ekspresi caspase-9 pada sel HeLa dengan pemberian berbagai konsentrasi nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) setelah inkubasi 24 jam

Hasil uji Mann-Whitney tidak menunjukkan perbedaan yang sangat nyata antara kontrol dengan perlakuan IC₅₀ NEKPP, namun sangat berbeda nyata dengan

perlakuan $2IC_{50}$ dan $4IC_{50}$ NEKPP. Sedangkan perlakuan IC_{50} NEKPP memiliki perbedaan yang sangat nyata dibandingkan perlakuan $2IC_{50}$ dan $4IC_{50}$ NEKPP. Begitu juga dengan perlakuan $2IC_{50}$ NEKPP yang berbeda sangat nyata dengan perlakuan $4IC_{50}$ NEKPP. Berdasarkan hasil diatas menunjukkan bahwa pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) dapat meningkatkan ekspresi caspase-9 pada sel HeLa setelah inkubasi 24 jam dengan ekspresi yang paling tinggi pada perlakuan $2IC_{50}$ nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP) (Gambar 5.7 dan 5.8).



Gambar 5.8 Ekspresi caspase-9 pada sel HeLa pada tiap perlakuan nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (NEKPP). Keterangan: (A) menunjukkan tidak adanya ekspresi caspase-9 berupa warna kuning kecoklatan dan (B) menunjukkan adanya ekspresi caspase-9 pada perlakuan. (Pewarnaan imunositokimia; mikroskop cahaya (Nikon Eclipse Ci, Nikon Corporation, Tokyo, Japan); perbesaran 400x)

5.8 Luaran Penelitian

5.8.1 Submit Jurnal Internasional

Submitted di jurnal internasional terindeks SCOPUS: Research in Pharmaceutical Sciences.

BAB 6 RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

- 6.1 Fraksinasi ekstrak kulit pohon *Pinus merkusii*
- 6.2 Uji antiproliferatif, induksi apoptosis dan induksi penghambatan siklus sel dari ekstrak dan fraksi kulit pohon *Pinus merkusii* terhadap sel kanker secara *in vitro*



BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) menunjukkan efek sitotoksik pada sel kanker serviks (*HeLa Cell Line*) secara *in vitro*.
2. Pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) menunjukkan penghambatan siklus sel kanker serviks (*HeLa Cell Line*) secara *in vitro*.
3. Pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) menunjukkan peningkatan persentase apoptosis sel kanker serviks (*HeLa Cell Line*) secara *in vitro*.
4. Pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) menunjukkan peningkatan ekspresi p53 pada sel kanker serviks (*HeLa Cell Line*) secara *in vitro*.
5. Pemberian nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) menunjukkan peningkatan ekspresi caspase-9 pada sel kanker serviks (*HeLa Cell Line*) secara *in vitro*.

7.2 Saran

1. Pemberian terapi nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) dengan waktu inkubasi yang lebih lama untuk melihat potensi induksi *late apoptosis* pada sel kanker serviks (*HeLa Cell Line*) secara *in vitro*.
2. Pengujian aktivitas antikanker nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) terhadap sel normal secara *in vitro*.
3. Pengujian aktivitas sitotoksik nanopartikel ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) terhadap sel kanker serviks dan sel kanker lainnya secara *in vitro* dan *in vivo*.
4. Pembuatan nanopartikel fraksi atau isolat senyawa aktif dari ekstrak kulit pohon pinus (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) untuk melihat potensi aktivitas antikankernya terhadap kanker serviks (*HeLa Cell Line*) dan sel lainnya secara *in vitro* dan *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Amalinei, R. L. M., A. Trifan, O. Cioanca, S. D. Miron, C. T. Mihai, P. Rotinberg, and A. Miron. 2014. Polyphenol-Rich Extract from *Pinus sylvestris* L. Bark – Chemical and Antitumor Studies. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat.* 118(2): 551-557.
- Amfar. 2016. *Cervical Cancer, Human Papillomavirus (HPV), and HPV Vaccines in Southeast Asia*. amfAR Public Policy. Washington. 4.
- Araujo, J., P. Santos, R. Martins, M.E.S. Serra, A.S.P. Lourenco, A.M. Abrantes, M.F. Botelho, D. Murtinho. 2018. Synthesis of Cu(II) Complexes Derived from Imidazole and Cytotoxic Activity Evaluation against Breast and Colorectal Cancers [Abstract]. *ESMO Open*. 3(2): A1-A463.
- Aubrey, B. J., G. L. Kelly, A. Janic, M. J. Herold, and A. Strasser. 2017. How Does p53 Induce Apoptosis and How Does This Relate to p53-Mediated Tumor Suppression? *Cell Death and Differentiation*. 1-10.
- Bahuguna, A., I. Khan, V.K. Bajpai and S.C. Kang. 2017. MTT Assay to Evaluate the Cytotoxic Potential of A Drug. *Bangladesh J. Pharmacol.* 12: 115-118.
- Bansal, A., M. P. Singh, and B. Rai. 2016. Human Papillomavirus-Associated Cancers: A Growing Global Problem. *Int. J. Appl. Basic. Med. Res.* 6(2): 84-89.
- Behzadi, S., V. Serpooshan, W. Tao, M.A. Hamaly, M.Y. Alkawareek, E.C. Dreaden, D. Brown, A.M. Alkilany, O.C. Farokhzad and M. Mahmoudi. 2017. Cellular Uptake of Nanoparticles: Journey Inside the Cell. *Chem. Soc. Rev.* 46: 4218-4244.
- Bhatia, S. 2016. *Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants, and Algae*. Springer. Switzerland. 33-93.
- Businsky, R. 2017. *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese – Merkus Pine. <http://botany.cz/en/pinus-merkusii/> [12 Februari 2018].
- Cai, L., R. Yu, X. Hao dan X. Ding. 2017. Folate Receptor-targeted Bioflavonoid Genistein-loaded Chitosan Nanoparticles for Enhanced Anticancer Effect in Cervical Cancers. *Nanosc. Res. Lett.* 12: 509.
- Candrasari. 2013. Aktivitas Antikanker Alfa Terpineol dari Getah *Pinus merkusii* (Jungh, Et de Vriese) pada Siklus Sel, Apoptosis dan Ekspresi Protein (Bcl-2 dan Bax) Sel Lini MCF-7 [Abstrak]. Fakultas Kedokteran. Universitas Gadjah Mada.
- Cetin, M. and S. Sahin. 2016. Microparticulate and Nanoparticulate Drug Delivery Systems for Metformin Hydrochloride. *Drug. Deliv.* 23(8).
- Chaudhary, A. K., S. Ahmad, and A. Mazumder. 2014. Protective Effect of *Cedrus deodara* and *Pinus roxburghii* on Experimentally Induced Gastric Ulcers in Rat. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6(4): 587-591.
- Chen, J., Y. Gao, Y. Jin, S. Li, and Y. Zhang. 2015. Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of the Essential Oil from Needles of *Pinus parviflora* Siebold & Zucc. *TEOP.* 18(5): 1187-1196.
- Chiang, P. S., D. J. Lee, C. G. Whiteley, and C. Y. Huang. 2017. Extracting Antioxidant Phenolic Compounds from Compressional-Puffing Pretreated *Pinus morrisonicola*: Effects of Operational Parameters, Kinetics and Characterization. *J. Taiw. Inst. Chem. Engin.* 15(21).

- Copia. 2015. HeLa Cells: Grown Without Permission, for The Benefit of Medicine. The Copia Institute.
- Da Silva, S. D. C., M. G. M. de Souza, M. J. O. Cardoso, T. da S. Moraes, S. R. Ambrosio, R. C. S. Veneziani, and C. H. G. Martins. 2014. Antibacterial Activity of *Pinus elliottii* against Anaerobic Bacteria Present in Primary Endodontic Infections. *Anaerobe*. 30: 146-152.
- Doorbar, J., N. Egawa, H. Griffin, C. Kranjec, and I. Murakami. 2015. Human Papillomavirus Molecular Biology and Disease Association. *Rev. Med. Virol.* 25(51): 2-23.
- Eberhardt, T.L. 2012. Longleaf Pine Inner Bark and Outer Bark Thickness: Measurement and Relevance. *South. J. Appl. For.* 37(3): 177-180.
- E-Flora. 2018. Lodgepole Pine – *Pinus contorta*. <http://www.eflora.info/Pinus%20contorta.html> [27 Juli 2018].
- He, L., L. Wu, G. Su, W. Wei, L. Liang, L. Han, M. Kebria, P. C. Chen, and Y. Yu. 2014. The Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy in Different Histological Types of Cervical Cancer. *Gynecol. Oncol.* 134(2): 419–425.
- Hein, A. L., M. M. Ouellette, and Y. Yan. 2014. Radiation-Induced Signaling Pathways that Promote Cancer Cell Survival (Review). *Int. J. Oncol.* 45: 1813-1819.
- Hejmadi, M. 2010. *Introduction to Cancer Biology*. 2nd. ed. 7.
- Hidayat, J. and C. P. Hansen. 2002. *Pinus merkusii*. Seed Leaflet. (60).
- Huang, M., J.J. Lu, M.Q. Huang, J.L. Bao, X.P. Chen and Y.T. Wang. 2012. Terpenoids: Natural Products for Cancer Therapy. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 21(12): 1801-1818.
- Huseini, H. F., M. S. Anvari, Y. T. Khoob, S. Rabbani, F. Sharifi, S. M. Arzaghi, and H. Fakhrzadeh. 2015. Anti-Hyperlipidemic and Anti-Atherosclerotic Effects of *Pinus eldarica* Medw. Nut in Hypercholesterolemic Rabbits. *DARU J. Pharm. Sci.* 23: 32.
- Jacob, S.J.P., J.S. 2012. Finub and A. Narayanan. Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Piper longum* Leaf Extracts and Its Cytotoxic Activity against Hep-2 Cell Line. *Coll. & Surf. Biointerfaces*. 91: 212-214.
- Karp, G. 2010. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. 6th. ed. Wiley. Hoboken. 560-569.
- Kaushik, P., S. L. Khokra, A. C. Rana, and D. Kaushik. 2015. Evaluation of Anticancer Activity of *Pinus roxburghii* Sarg. Against IMR-32 Human Neuroblastoma Cancer Cell Line. *Int. J. Pharm. Clin. Res.* 7(1): 105-108.
- Kemendes RI. 2015. Infodatin: Situasi Penyakit Kanker. Pusat Data dan Informasi. Kementerian Kesehatan RI. 1 - 6.
- Khazaei, S., V. Ramachandran, R. A. Hamid, N. M. Esa, A. Etemad, S. Moradipoor and P. Ismail. 2017. Flower Extract of *Allium atroviolaceum* Triggered Apoptosis, Activated Caspase-3 and Down-Regulated Antiapoptotic Bcl-2 Gene in HeLa Cancer Cell Line. *Biomed. Pharm.* 89: 1216-1226.
- Koff, J. L., S. Ramachandiran, and L. Bernal-Mizrachi. 2015. A Time to Kill: Targeting Apoptosis in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 2942-2955.
- Kou, L., J. Sun, Y. Zhai and Z. He. 2013. The Endocytosis and Intracellular Fate of Nanomedicines: Implication for Rational Design. *Asian J. Pharm. Sci.* 8.

- Koutsaviti, K., A. Giatropoulos, D. Pitarokili, D. Papachristos, A. Michaelakis, and O. Tzakou. 2015. Greek *Pinus* Essential Oils: Larvicidal Activity and Repellency against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 114: 583-592.
- Kumar, D., S. Basu, L. Parija, D. Rout, S. Manna, J. Dandapat and P.R. Debata. 2016. Curcumin and Ellagic Acid Synergistically Induce ROS Generation, DNA Damage, p53 Accumulation and Apoptosis in HeLa Cervical Carcinoma Cells. *Biomed. & Pharmacother.* 81: 31-37.
- Kumari, A. and S.K. Yadav. 2011. Cellular Interactions of Therapeutically Delivered Nanoparticles. *Expert Opin. Drug Deliv.* 8(2): 141-151.
- Kurniasari, D. dan S. Atun. 2017. Pembuatan dan Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Etanol Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) pada Berbagai Variasi Komposisi Kitosan. *J. Sains Dasar.* 6(1): 31-35.
- Laili, H. N., L. Winarti, L. O. R. K. Sari. 2014. Preparasi dan Karakterisasi Nanopartikel Kitosan-Naringenin dengan Variasi Rasio Massa Kitosan-Natrium Tripolifosfat. *J. Pust. Kes.* 2(2): 308-313.
- Leandro, L. F., M. J. O. Cardoso, S. D. C. Silva, M. G. M. Souza, R. C. S. Veneziani, S. R. Ambrosio, and C. H. G. Martins. 2014. Antibacterial Activity of *Pinus elliottii* and Its Major Compound, Dehydroabietic Acid, against Multidrug-Resistant Strains. *J. Med. Microbiol.* 63: 1649-1653.
- Li, B., K. Wei, S. Yang, Y. Yang, Y. Zhang, F. Zhu, D. Wang, and R. Zhu. 2015. Immunomodulatory Effects of Taishan *Pinus massoniana* Pollen Polysaccharide and Propolis on Immunosuppressed Chickens. *Microb. Pathog.* 78: 7-13.
- Li, Y. Y., J. Feng, X. L. Zhang, M. Q. Li, and Y. Y. Cui. 2016. Effects of *Pinus massoniana* Bark Extract on the Invasion Capability of HeLa Cells. *J. Funct. Foods.* 24: 520-526.
- Liu, J., J. Bai, G. Jiang, X. Li, J. Wang, D. Wu, L. Owusu, E. Zhang, and W. Li. 2015. Anti-Tumor Effect of *Pinus massoniana* Bark Proanthocyanidins on Ovarian Cancer through Induction of Cell Apoptosis and Inhibition of Cell Migration. *PLoS ONE.* 10(11): 1-15.
- Liu, Y., D.A. Peterson, H. Kimura and D. Schubert. 1997. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *J. Neurochem.* 69: 581-593.
- Lu, J.J, J.L. Bao, X.P. Chen, M. Huang and X.T. Wang. 2012. Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents. *Ev. Bas. Compl. & Alt. Med.* 1-12.
- Ma, L., H. Liu, P. Qin, C. Hu, S. Man, Y. Li, Z. Liu, Z. Liu and A. Diao. 2016. Saponin Fraction Isolated from *Conyza blinii* H.Lev. Demonstrates Strong Anti-Cancer Activity that is due to Its NF- κ B Inhibition. *Biochem. & Biophys. Res. Comm.*
- Martien, R., Adhyatmika, I. D. K. Irianto, V. Farida, dan D. P. Sari. 2012. Perkembangan Teknologi Nanopartikel sebagai Sistem Penghantaran Obat. *Majalah Farmaseutik.* 8(1): 133-144.
- McClendon, A. K., J. L. Dean, and E. S. Knudsen. 2010. Regulation of Pre-RC Assembly: A Complex Symphony Orchestrated by CDKs. In: G. H. Enders (Ed.). *Cell Cycle Deregulation in Cancer.* Humana Press. Philadelphia. 43-57.
- McMullin, D. R., B. D. Green, and J. D. Miller. 2015. Antifungal Sesquiterpenoids and Macrolids from An Endophytic *Lophodermium* Species of *Pinus strobus*. *Phytochem. Lett.* 14: 148-152.

- Miller, M. A., and J. F. Zachary. 2017. Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. *In*: J. F. Zachary (Ed.). Pathologic Basis of Veterinary Disease. 6th. ed. Elsevier. Missouri. 21-22.
- Moghadamtousi, S. Z., H. A. Kadir, H. Karimian, E. Rouhollahi, M. Paydar, and M. Fadeinasab. 2014. *Annoa muricata* Leaves Induce G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis through Mitochondria-Mediated Pathway in Human HCT-116 and HT-29 Colon Cancer Cells. *J. Ethnopharm.* 1-13.
- Mohammed, M. A., J. T. M. Syeda, K. M. Wasan, and E. K. Wasan. 2017. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics.* 9(53): 1-26.
- Myers, R. K., M. D. McGavin, and J. F. Zachary. 2012. Cellular Adaptations, Injury, and Death: Morphologic, Biochemical, and Genetic Bases. *In*: J. F. Zachary and M. D. McGavin (Eds.). Pathologic Basis of Veterinary Disease. 5th. ed. Elsevier. Missouri. 23-26.
- Nadia, L.M.H., P. Suptijah dan B. Ibrahim. 2014. Produksi dan Karakterisasi Nano Kitosan dari Cangkang Udang Windu dengan Metode Gelasi Ionik. *JPHPI.* 17(2): 119-126.
- Newkirk, K. M., E. M. Brannick, and D. F. Kusewit. 2017. Neoplasia and Tumor Biology. *In*: J. F. Zachary (Ed.). Pathologic Basis of Veterinary Disease. 6th. ed. Elsevier. Missouri. 286-294.
- Nisa', K. 2013. Sitotoksitas Ekstrak Kulit Kayu *Pinus merkusii* Jungh. Et de Vriese terhadap Sel Kanker Serviks HeLa [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Noor, R., I. Astuti and Mustofa. 2014. Cytotoxicity of α -Terpineol in HeLa Cell Line and its Effects to Apoptosis and cell Cycle. *J. Med. Sci.* 46(1): 1-9.
- Orwa, C. A., M, R. Kindt, R. S. Jamnadass, and Anthony. 2009. Agroforestry Database: A Tree Reference and Selection Guide Version 4.0.
- Padma, V. V. 2015. An Overview of Targeted Cancer Therapy. *Bio Med.* 5(4): 1-6.
- Pande, M. and A. N. Bhaskarwar. 2016. Nanoparticles: Preparation and Characterization. Momentum Press. New York. 22-23.
- Park, I. J., S. Y. Cha, M. Kang, Y. S. So, H. G. Go, S. P. Mun, K. S. Ryu, and H. K. Jang. 2011. Effect of Proanthocyanidin-Rich Extract from *Pinus radiata* Bark on Immune Response of Specific-Pathogen-Free White Leghorn Chickens. *Poult. Sci.* 90: 977-982.
- Poupot, R., D. Bergozza and S. Fruchon. 2018. Nanoparticle-Based Strategies to Treat Neuro-Inflammation. *Materials.* 11(270): 1-14.
- Prakoeswa, C.R.S. 2008. Peran p53 pada Patogenesis Karsinoma Sel Basal. *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit & Kelamin.* 20(3): 261-265.
- Prasetyo, D., S. Maryono, dan B. Purwanto. 2017. Pengaruh Ekstrak Propolis terhadap Peningkatan Ekspresi p21, Ekspresi Protein *Bax* dan Induksi Apoptosis pada Kultur Sel Kanker Kolon (*Cell Line WiDr*). *Biomed.* 9(1): 14-23.
- Putri, H. 2014. Protokol: Preparasi Sampel untuk Siklus Sel dengan Metode Flowcytometry. CCRC. Fakultas Farmasi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 1-7.
- Raffa, D., B. Maggio, M.V. Raimondi, F. Plescia and G. Daidone. 2017. Recent Discoveries of Anticancer Flavonoids. *Eur. J. Med. Chem.* 15(142): 213-228.

- Ranjit, K. and A. A. Baquee. 2013. Nanoparticle: An Overview of Preparation, Characterization and Application. *Int. Res. J. Pharm.* 4(4): 47-57.
- Ricci, M. S. and W. S. El-Deiry. The Extrinsic Pathway of Apoptosis. In: D. A. Gewirtz, S. E. Holt, and S. Grant (Eds.). Humana Press. New Jersey. 31-53.
- Richardson, D. M. 2002. Ecology and Biogeography of Pinus. In: J. P. Riser II (Ed.). Ecology and Biogeography of Pinus. Systematic Botany. The American Society of Plant Taxonomists. 27(3): 636-637.
- Rogers, M. J., J. C. Crockett, F. P. Coxon, and J. Monkkonen. 2011. Biochemical and Molecular Mechanisms of Action of Biophosphonates. *Bone.* 49(1): 34-41.
- Rosita, A. T., T. R. Wijayanti, E. Widayanti, dan A. Hermawan. 2014. Sel HeLa. Cancer Chemoprevention Research Center. Farmasi. Universitas Gajah Mada. http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/?page_id=1224. [8 Februari 2018]
- Ruddon, R. W. 2007. *Cancer Biology*. 4th. ed. Oxford University Press. New York. 357-359.
- Sadili, A. 2015. Autoekologi Pertumbuhan Pinus (*Pinus merkusii* Junghuhn et de Vriese) Paska Erupsi di Gunung Galunggung, Kabupaten Tasikmalaya-Jawa Barat. *J. Berita Biol.* 14(3): 203-296.
- Saengkrit, N., S. Saesoo, W. Srinuanchai, S. Phunpee, and U. R. Ruktanonchai. 2014. Influence of Curcumin-Loaded Cationic Liposome on Anticancer Activity for Cervical Cancer Therapy. *Coll. Surf. B: Biointerf.* 114: 349-356.
- Samarakoon, S.R., M.K. Ediriweera, C.D.U. Nwokwu, C.J. Bandara, K.H. Tennekoon, P.Piyathilaka, D.N. Karunaratne and V. Karunaratne. 2017. A Study on Cytotoxic and Apoptotic Potential of a Triterpenoid Saponin (3-O- α -L-Arabinosyl Oleanolic Acid) Isolated from *Schumacheria castaneifolia* Vahl in Human Non-Small-Cell Lung Cancer (NCI-H292) Cells. *BioMed. Res. Int.* 1-8.
- Sarvmeili, N., A. Jafarian-Dehkordi, and B. Zolfaghari. 2016. Cytotoxic Effects of *Pinus eldarica* Essential Oil and Extracts on HeLa and MCF-7 Cell Lines. *Res. Pharm. Sci.* 11(6): 476-483.
- Setiawan, Koerniasari, Ngadino, and S. A. Sudjarwo. 2017. Bioinsecticide Effect of *Pinus merkusii* Tree Bark Extract on *Aedes aegypti* Larvae. *J. Young Pharm.* 9(1): 127-130.
- Sharma, A. K. Jyoti, V. Bansal, U. K. Jain, B. Bhushan and J. Madan. 2017. Soluble Telmisartan Bearing Poly (Ethylene Glycol) Conjugated Chitosan Nanoparticles Augmented Drug Delivery, Cytotoxicity, Apoptosis and Cellular Uptake in Human Cervical Cancer Cells. *Mat. Sci. Engin.* 72: 69-76.
- Sharma, A., R. Goyal, and L. Sharma. 2016. Potential Biological Efficacy of Pinus Plant Species against Oxidative, Inflammatory and Microbial Disorders. *BMC. Compl. Alt. Med.* 16: 35.
- Singh, A. K. 2016. Engineered Nanoparticles: Structure, Properties and Mechanisms of Toxicity. Elsevier. London. San Diego. Waltham. Oxford. 6-7.
- Siregar, U. J. dan I. M. M. Diputra. 2013. Keragaman Genetik *Pinus merkusii* Jungh, et de Vriese Strain Tapanuli Berdasarkan Penanda Mikrosatelit. *J. Silvicult. Trop.* 4(2): 88-99.
- Spencer, J. V. 2007. *Deadly Diseases and Epidemics: Cervical Cancer*. Infobase Publishing. New York. 10-14.

- Stenger, M. 2015. Calculating H-Score. <http://www.ascopost.com/issues/april-10-2015/calculating-h-score/> [31 Mei 2018]
- Sumithra, P. S.F. Gricilda, G. Vimala, J. Sathya, V. Sankar, R. Saraswathi and G. Jayapriya. 2014. Anti-cancer Activity of *Annona squamosa* and *Manilkara zapota* Flower Extract against MCF-7 Cell Line. *Der Pharmacia Sinica*. 5(6): 98-104.
- Suryani, R. Martien and H. Ismail. 2015. Preparation of Curcumin Nanoparticles and Cellular Uptake Study on HeLa Cells. *ICLTFBE*. 11-12.
- Taurina, W., R. Sari, U.C. Hafinur, S. Wahdaningsih dan Isnindar. 2017. Optimasi Kecepatan dan Lama Pengadukan terhadap Ukuran Nanopartikel Kitosan-Eksrak Etanol 70% Kulit Jeruk Siam (*Citrus nobilis* L.var Microcarpa). *Trad. Med. J.* 22(1): 16-20.
- Thacker, P. C. and D. Karunakaran. 2015. Curcumin and Emodin Down-Regulate TGF- β Signaling Pathway in Human Cervical Cancer Cells. *PloS ONE* 10(3): e120045.
- Tumen, I., E. K. Akkol, H. Tastan, I. Suntar, and M. Kurtca. 2017. Research on the Antioxidant, Wound Healing, and Anti-Inflammatory Activities and the Phytochemical Composition of Maritim Pine (*Pinus pinaster* Ait). *J. Ethnopharm.*
- Ustun, O., F. S. Senol, m. Kurkuoglu, I. E. Orhan, M. Kartal, and K. H. C. Baser. 2012. Investigation on Chemical Composition, Anticholinesterase and Antioxidant Activities of Extracts and Essential Oils of Turkish *Pinus* Species and Pycogenol. *Ind. Crops Prod.* 38: 115-123.
- Weber, G. F. 2007. *Molecular Mechanisms of Cancer*. Springer. Netherlands. 493-495.
- Weerapreeyakul, N., A. Nonpunya, S. Barustux, T. Thitimetharoch and B. Stipanidkulchai. 2012. Evaluation of the Anticancer Potential of Six Herbs Against a Hepatoma Cell Line. *Chinese Med.* 7(15): 1-7.
- WHO. 2016. *Cancer Control: A Global Snapshot in 2015*.
- Wicaksono, M. H. B. dan S. Permana. 2013. Potensi Fraksi Etanol Benalu Mangga (*Dendrophthoe pentandra*) sebagai Agen Anti Kanker Kolon pada Mencit (*Mus musculus* Balb/c) setelah Induksi Dextran Sulvat (DSS) dan Azoxymethane (AOM). *J. Biotrop.* 1(2): 75-79.
- Wijaya C. A. dan M. Muchtaridi. 2017. Pengobatan Kanker melalui Metode Gen Terapi. *Farmaka*. 15(1): 53-68.
- Wiyono, B., S. Tachibana and D. Tinambunan. 2006. Chemical Composition of Indonesian *Pinus merkusii* Turpentine Oils, Gum Oleoresins and Rosins from Sumatra and Java. *Pakistan J. Biol. Sci.* 9(1): 7-14.
- Xing, X., X. He, J. Peng, K. Wang and W. Tan. 2005. Uptake of Silica-Coated Nanoparticles by HeLa Cells. *Nanosci. & Nanotech.* 5: 1688-1693.
- Xu, X.H., T. Li, C.M.V. Fong, X. Chen, X.J. Chen, Y.T. Wang, M.Q. Huang and J.J. Lu, 2016. Saponins from Chinese Medicines as Anticancer Agents. *Molecules*. 21 (1326): 1-27.
- Zeynep, U., K. Salih, B. Fuat, A. Burhan, E. Selim, C. Menderes, and K. M. Goksin. 2014. Chemical Composition, Antimicrobial, Insecticidal, Phytotoxic and Antioxidant Activities of Mediterranean *Pinus brutia* and *Pinus pinea* Resin Essential Oils. *Chin. J. Nat. Med.* 12(12): 901-910.



LAMPIRAN

1. Bukti submit di Jurnal *Research in Pharmaceutical Sciences*

Journal On Web
Research in Pharmaceutical Sciences

Date Monday, November 26, 2018 7:02:19 AM GMT

Subject Acknowledgment of Online Submission

Message Dear Dr. Sudojarmo,

NOTE: This e-mail is sent to you as one of the contributing authors. If you are not corresponding author, please coordinate with the author designated by your group as the corresponding author for this manuscript.

A manuscript has been submitted to our journal *Research in Pharmaceutical Sciences* by Dr Sudojarmo titled "The signal transduction of Chitosan-based Pluronic®-based extract nanoparticles as anticancer on HeLa Cell Lines via induction of cell cycle arrest and apoptosis". A copy of the acknowledgment mail is attached here with for your reference.

Thanking you,
Editorial Team
Research in Pharmaceutical Sciences

Dear Prof. Sudojarmo,

Research in Pharmaceutical Sciences has received your manuscript entitled "The signal transduction of Chitosan-based Pluronic®-based extract nanoparticles as anticancer on HeLa Cell Lines via induction of cell cycle arrest and apoptosis" for consideration for publication. The reference number for this manuscript is "RPS_200_10". Kindly quote this in correspondence related to this manuscript.

The manuscript is being reviewed for possible publication with the understanding that it is being submitted to the journal, at a time and have not been published, simultaneously submitted, or already accepted for publication elsewhere either as a whole or in part. Online submission of this article implies that the corresponding author has the written consent from all the contributors to act as corresponding author.

You are requested to send the signed copyright contributor form within two weeks. The form can be uploaded as an scanned image from your area. The decision about the manuscript will be conveyed only on receipt of the form. High resolution images are required at the time of acceptance, you should be notified separately for the same. If images uploaded by you are not of printable quality.

The editors will review the submitted manuscripts initially. If found suitable, it will follow a double-blind peer review. We aim to finish this review process within a short time frame. At the end of which a decision on the suitability or otherwise of the manuscript will be conveyed to you via this system. During this process you are free to check the progress of the manuscript through various phases from our online manuscript processing site <http://www.journalonweb.com/jps>.

The journal allows free access (Open Access) to its contents and permits authors to self-archive final accepted version of the articles on any ORCID-compliant Institutional / subject-based repository. Effective from 15 May 2014, authors are asked to pay a fee of 1,000,000 Riak/100 USD for original and review articles, 1,000,000 Riak/100 USD for case reports and short communications, but only if the article is accepted for publication in this journal after peer-review and possible revision of the manuscript. Letters and editorials are free of charge. There are no additional charges for color illustrations. For details of the payment, please refer to the table provided in the instructions to the authors.

We thank you for submitting your valuable work to the Research in Pharmaceutical Sciences.

Yours sincerely,
Editor
Research in Pharmaceutical Sciences