

TUGAS AKHIR - SB 234801

**STUDI PENGARUH PEMBERIAN SENYAWA
TRISINDOLINA-5 TERHADAP EKSPRESI GEN *c-Myc*
DAN *APAF-1* PADA KULTUR SEL HeLa SECARA IN
VITRO**

RAHMA SULISTYANI
NRP 5005211027

Dosen Pembimbing
Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si.
NIP 19700621 199802 2 001

Shabrina Syifa Ghaissani, S.Si., M.Si
NIP

Program Studi S1 Biologi

Departemen Biologi

Fakultas Sains dan Analitika Data

Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Surabaya

2025



TUGAS AKHIR - SB 234801

**STUDI PENGARUH PEMBERIAN SENYAWA TRISINDOLINA-5
TERHADAP EKSPRESI GEN *c-Myc* DAN *APAF-1* PADA
KULTUR SEL HeLa SECARA IN VITRO**

Rahma Sulistyani

NRP 5005211027

Dosen Pembimbing

Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si.

NIP 19700621 199802 2 001

Shabrina Syifa Ghaissani, S.Si., M.Si

NIP

Program Studi S1 Biologi

Departemen Biologi

Fakultas Sains dan Analitika Data

Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Surabaya

2025



FINAL PROJECT - SB 234801

STUDY ON THE EFFECT OF TRISINDOLINE-5 COMPOUND AGAINST *c-Myc* AND *APAF-1* GENE EXPRESSION ON IN VITRO HeLa CELL CULTURE

RAHMA SULISTYANI

NRP 5005211027

Advisor

Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si.

NIP 19700621 199802 2 001

Shabrina Syifa Ghaissani, S.Si., M.Si.

NIP

Undergraduate Study Program

Department of Biology

Faculty of Science and Data Analytics

Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Surabaya

2025

LEMBAR PENGESAHAN

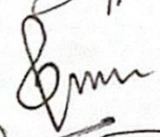
**STUDI PENGARUH PEMBERIAN SENYAWA TRISINDOLINA-5 TERHADAP
EKSPRESI GEN *c-Myc* DAN *APAF-1* PADA KULTUR SEL HeLa SECARA IN VITRO**

TUGAS AKHIR

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat
memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si) pada
Program Studi S-1 Biologi
Departemen Biologi
Fakultas Sains dan Analitika Data
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh : **RAHMA SULISTYANI**
NRP. 5005211027

Disetujui oleh Tim Penguji Tugas Akhir:

- | | | |
|--|---------------|---|
| 1. Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si | Pembimbing |  |
| 2. Shabrina Syifa Ghaissani, S.Si., M.Si | Ko-Pembimbing |  |
| 3. Prof. Dr. Nurul Jadid, S.Si., M.Sc | Penguji I |  |
| 4. Nova Maulidina Ashuri, S.Si., M.Si | Penguji II |  |

Mengetahui
Kepala Departemen Biologi,



(Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si)
NIP. 197006211998022001

SURABAYA
Juli, 2025

APPROVAL SHEET

STUDY ON THE EFFECT OF TRISINDOLINE-5 COMPOUND AGAINST *c-Myc* AND *APAF-1* GENE EXPRESSION ON IN VITRO HeLa CELL CULTURE

FINAL PROJECT

Submitted to fulfill one of the requirements
for obtaining a Bachelor Degree at
Undergraduate Program
Departemen of Biology
Faculty of Science and Data Analyst
Sepuluh Nopember Institute of Technology

By : RAHMA SULISTYANI
NRP. 5005211027

Approved by Final Project Examiner Team:

- | | | |
|--|-------------|---|
| 1. Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si | Advisor |  |
| 2. Shabrina Syifa Ghaissani, S.Si., M.Si | Co-Advisor | |
| 3. Prof. Dr. Nurul Jadid, S.Si., M.Sc | Examiner I |  |
| 4. Nova Maulidina Ashuri, S.Si., M.Si | Examiner II | |

Acknowledged
Head of The Biology Department

(Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si)
NIP. 197008211998022001

SURABAYA
July, 2025

PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama mahasiswa / NRP	: Rahma Sulistyani / 5005211027
Program Studi	: S1 Biologi
Dosen Pembimbing I/ NIP	: Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si 19700621 199802 2 001
Dosen Pembimbing II/ NIP	: Shabrina Syifa Ghaissani, S.Si., M.Si

Dengan ini menyatakan bahwa Tugas Akhir dengan judul “Studi Pengaruh Pemberian Senyawa Trisindolina-5 terhadap Ekspresi Gen *c-Myc* dan *APAF-1* pada Kultur Sel HeLa secara In Vitro” adalah hasil karya sendiri, bersifat orisinal, dan ditulis dengan mengikuti kaidah penulisan ilmiah.

Bilamana di kemudian hari ditemukan ketidaksesuaian dengan pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan ketentuan yang berlaku di Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

Surabaya, 24 Juli 2025

Mengetahui
Dosen Pembimbing I



Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si
NIP. 19700621 199802 2 001

Dosen Pembimbing II



Shabrina Syifa Ghaissani, S.Si., M.Si
NIP.

Mahasiswa



Rahma Sulistyani
NRP. 5005211027

STATEMENT OF ORIGINALITY

The undersigned below:

Name of Student / NRP	: Rahma Sulistyani / 5005211027
Departement	: S1 Biologi
Advisor / NIP	: Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si 19700621 199802 2 001
Co-Advisor / NIP	: Shabrina Syifa Ghaissani, S.Si., M.Si

Hereby declare that the Final Project with the title of "Study on The Effect Of Trisindoline-5 Compound Against *c-Myc* And *APAF-1* Gene Expression On In Vitro HeLa Cell Culture" is the result of my own work, is original, and is written by following the rules of scientific writing.

If in the future there is discrepancy with this statement, then I am willing to accept consequences in accordance with then provisions that apply at Institute of Technology Sepuluh Nopember.

Surabaya, 24 July 2025

Acknowledge by
Advisor I



Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si
NIP. 19700621 199802 2 001

Advisor II



Shabrina Syifa Ghaissani, S.Si., M.Si
NIP.

Student



Rahma Sulistyani
NRP. 5005211027

ABSTRAK

STUDI PENGARUH PEMBERIAN SENYAWA TRISINDOLINA-5 TERHADAP EKSPRESI GEN *c-Myc* DAN *APAF-1* PADA KULTUR SEL HeLa SECARA IN VITRO

Nama Mahasiswa / NRP : Rahma Sulistyani / 5005211027
Departemen : Biologi FSAD - ITS
Dosen Pembimbing : Prof. Dr. Awik Puji Dyah Hurhayati, M.Si.
Shabrina Syifa Ghaissani, S.Si., M.Si.

Abstrak

Ekspresi gen berperan penting dalam perkembangan kanker, seperti peningkatan gen proliferasi *c-Myc* dan penurunan gen pro-apoptosis *APAF-1*. Sel HeLa, berasal dari kanker serviks akibat integrasi HPV-18, digunakan untuk menguji efek Trisindolina-5. Trisindolina-5, senyawa alami golongan indole dan isatin dengan penambahan gugus fluor, diketahui memiliki aktivitas sitotoksik terhadap beberapa sel kanker seperti A549 dan DU-145 tanpa merusak sel normal, namun belum diuji terhadap sel HeLa. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efek sitotoksik Trisindolina-5 terhadap sel HeLa dengan padanan obat Cisplatin sebagai kontrol positif menggunakan MTT assay, serta uji ekspresi gen *APAF-1* dan *c-Myc* menggunakan qPCR untuk mengetahui aktivitas senyawa Trisindolina-5 pada jalur persinyalan apoptosis. Uji MTT assay menunjukkan IC₅₀ Trisindolina-5 sebesar 297,42 µg/mL, lebih tinggi dibanding Cisplatin (3,78 µg/mL), menandakan efektivitas sitotoksik Cisplatin lebih kuat. Namun, analisis qPCR menunjukkan ekspresi *c-Myc* mengalami kenaikan dengan *fold change* 20.11 pada konsentrasi 100 µg/mL dan *fold change* 1.73 pada konsentrasi 200 µg/mL, hal ini berkesinambungan dengan ekspresi gen *APAF-1* yang tidak mengalami peningkatan ekspresi yaitu *fold change* sebesar 0.812 pada konsentrasi 100 µg/mL dan *fold change* sebesar 0.057. Hasil ini diduga akibat sel HeLa mengalami nekrosis akibat stres oksidatif dan peningkatan ROS, bukan apoptosis intrinsik. Penelitian ini menunjukkan bahwa meskipun Trisindolina-5 memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa, mekanisme kematian sel yang terjadi masih perlu ditelusuri lebih lanjut.

Kata kunci: *APAF-1*, *c-Myc*, *Cisplatin*, *HeLa*, *Trisindolina-5*

ABSTRACT

STUDY ON THE EFFECT OF TRISINDOLINE-5 COMPOUND AGAINST *c-Myc* DAN *APAF-1* GENE EXPRESSION ON IN VITRO HELA CELL CULTURE

Student Name / Student ID : Rahma Sulistyani / 5005211027
Department : Biologi FSAD - ITS
Advisor : Prof. Dr. Awik Puji Dyah Hurhayati, M.Si.
Shabrina Syifa Ghaissani, S.Si., M.Si.

Abstract

Gene expression plays a crucial role in cancer development, such as the upregulation of proliferative genes like *c-Myc* and the downregulation of pro-apoptotic genes like *APAF-1*. HeLa cells, derived from cervical cancer caused by HPV-18 integration, were used to examine the effect of Trisindoline-5. Trisindoline-5, a natural compound from the indole and isatin class with a fluorine substituent, has shown cytotoxic activity against cancer cell lines such as A549 and DU-145 without harming normal cells, but has not yet been tested on HeLa cells. This study aimed to evaluate the cytotoxic effect of Trisindoline-5 on HeLa cells, using Cisplatin as a positive control via MTT assay, and to assess *APAF-1* and *c-Myc* gene expression using qPCR to understand the compound's potential activity in the apoptosis signaling pathway. MTT assay results showed that the IC₅₀ of Trisindoline-5 was 297.42 µg/mL, higher than Cisplatin (3.78 µg/mL), indicating that Cisplatin is more cytotoxic. However, qPCR analysis revealed that *c-Myc* expression did not significantly decrease and *APAF-1* expression did not increase as hypothesized. *c-Myc* expression increased with a fold change of 20.11 at a concentration of 100 µg/mL and a fold change of 1.73 at a concentration of 200 µg/mL, this is consistent with the expression of the *APAF-1* gene which did not experience an increase in expression, namely a fold change of 0.812 at a concentration of 100 µg/mL and a fold change of 0.057. This outcome is likely due to HeLa cells undergoing necrosis as a result of oxidative stress and elevated ROS, rather than intrinsic apoptosis. Another possibility is that apoptosis occurs via the extrinsic pathway, which does not involve *APAF-1*. This study indicates that while Trisindoline-5 exhibits cytotoxicity against HeLa cells, the underlying cell death mechanism requires further research.

Keywords: *APAF-1*, *c-Myc*, *Cisplatin*, *HeLa*, *Trisindoline 5*

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan Tugas Akhir yang berjudul “Studi Pengaruh Pemberian Senyawa Trisindolina-5 terhadap Ekspresi Gen *C-Myc* dan *APAF-1* pada Kultur Sel HeLa secara In Vitro” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana pada program studi S1 Biologi, Fakultas Sains dan Analitika Data, Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Penyusunan tugas akhir ini tidak lepas dari dukungan, bantuan, serta doa dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si selaku dosen pembimbing I, dan Ibu Shabrina Syifa Ghaissani S.Si., M.Si selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan dukungan yang sangat berarti sejak awal hingga selesainya penulisan tugas akhir ini.
2. Bapak Prof. Dr. Nurul Jadid, S.Si., M.Sc, selaku Ketua Sidang dan Dosen Penguji I dan Ibu Nova Maulidina Ashuri S.Si., M.Si selaku Dosen Penguji II, atas masukan dan saran yang membangun dalam proses seminar dan sidang tugas akhir.
3. Seluruh dosen dan staf akademik di lingkungan Program Studi S1 Biologi, Fakultas Sains dan Analitika Data, Institut Teknologi Sepuluh Nopember atas ilmu dan bantuan yang telah diberikan selama masa studi.
4. Kedua orangtua penulis, Ibu Suryani, S.E, dan Bapak Heru Widihartomo, S.T, atas segala dukungan baik moral maupun materil, kasih sayang, dan panjatan doa yang tidak pernah putus sepanjang penulis menempuh perjalanan pendidikan ini.
5. Kedua saudara kandung penulis, Mas Tyo dan Mba Rafa, yang senantiasa mendoakan dan mendukung penulis dalam menyelesaikan masa studi ini.
6. Seluruh keluarga besar Waridi dan Salachudin, atas perhatian, semangat, dan motivasi yang selalu diberikan.
7. Rekan seperjuangan penulis, Tiara Yuniar, yang selalu membersamai jejak pendidikan penulis sejak Sekolah Menengah Pertama hingga jenjang perguruan tinggi.
8. Rekan aliansi Asrama ITS Blok J 327-328: Dina Fitri, Danica Fitria, dan Anggun Widyarti, yang meskipun masa kebersamaannya singkat, tetapi momen yang dijalani bersama sangat berarti untuk penulis.
9. Rekan menuju Indonesia emas, Kiw: Anggun Widyarti, Danica Fitria Putri Rahmawati, Ithing Imatus Sholiha, Difa Rizka Fitriani, Quincita Habiba Rizky, Misnia Sintiya Farikha, Rheina Nurhaliza serta Risya Atus Sa'diyah atas kebersamaan baik dalam masa senang maupun sulit, dukungan dan doa baik yang selalu dipanjatkan dalam masa tersulit.
10. Rekan pengurus Departemen Dalam Negeri BEM FSAD 2023/2024 Kabinet Double Helix: Mba Amira, Mba Hani, Mba Thifa, Mas Tata, Bagas, Aiko, Adristy, Syarafina, Rizal, Devi, Mitha, Hamzah, Rayhan, Dwi, Beth, dan Akmal atas kebersamaan selama masa kepengurusan Dagri BEM Fakultas yang cukup singkat, namun menjadi pengalaman yang sangat berharga bagi penulis.
11. Tim riset kanker UGM: Mba Azzah, Mba Alfi, Marifa, dan Haykal atas kerja sama, ilmu, dan dukungan dalam masa riset hingga penulisan Tugas Akhir. *Honorable mention* kepada Mba Syakirah, yang bukan merupakan bagian dari tim riset kanker UGM, tetapi sangat berjasa atas ilmu dan dukungan yang diberikan kepada penulis dalam riset terkait kanker ini.

12. Rekan Biologi ITS angkatan 2021 *Hystrix brachyura*, terkhusus rekan laboratorium Biosains dan Teknologi Hewan atas segala dukungan, doa, serta momen yang dijalani bersama.
13. Serta, semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, atas semua doa dan dukungan dalam penyusunan tugas akhir ini.

Penulis menyadari bahwa tugas akhir ini masih jauh dari kesempurnaan, baik dari segi isi maupun penyajiannya. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun demi perbaikan di masa yang akan datang. Semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi pengembangan ilmu pengetahuan di bidang riset Biologi Kanker.

Surabaya, 30 Juni 2025

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
APPROVAL SHEET	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
ORIGINALITY STATEMENT	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	14
1.1 Latar Belakang	14
1.2 Rumusan Masalah	15
1.3 Batasan Masalah	15
1.4 Tujuan	16
1.5 Manfaat	16
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	17
2.1 HeLa Cell Line	17
2.1.1 Karakteristik sel HeLa	17
2.1.2 Infeksi Human Papilloma Virus (HPV) yang Menyerang sel Epitel Serviks	18
2.1.3 Tahap Karsinogenesis pada Kanker Serviks	19
2.2 Siklus Sel	21
2.2.1 Siklus Sel	21
2.2.2 Kontrol Siklus Sel	22
2.3 Gen <i>C-Myc</i>	23
2.4 Apoptosis	24
2.4.1 Mekanisme Apoptosis	24
2.4.2 Kontrol Gen pada Apoptosis	25
2.5 Gen <i>APAF-1</i>	26
2.6 Senyawa Trisindolina-5	27
2.6.1 Isolasi Trisindolina	27
2.6.2 Sintesis Trisindolina-5	29
	ix

2.6.3 Mekanisme Antikanker dari Trisindolina	30
2.7 Senyawa Antikanker	30
2.7.1 Cisplatin	30
2.7.2 Doxorubicin	32
2.8 Uji Sitotoksitas	33
2.9 Uji Ekspresi Gen	33
2.9.1 Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)	33
2.9.2 Analisis Ekspresi Gen	35
BAB 3 METODOLOGI	36
3.1 Rancangan Penelitian	36
3.2 Waktu dan tempat	36
3.3 Alat dan Bahan	36
3.4 Metode yang Dilakukan	37
3.4.1 Persiapan Kultur Sel HeLa	37
3.4.2 Pembuatan Medium Kultur HeLa	37
3.4.3 <i>Thawing</i> dan Penumbuhan HeLa	37
3.4.4 Pemanenan dan Perhitungan HeLa	37
3.4.5 Preparasi dan Pengenceran Senyawa Uji	38
3.4.6 Uji Sitotoksitas	38
3.4.7 Uji Ekspresi Gen	40
3.4.7.2 Persiapan Sampel RNA HeLa	40
3.4.7.3 Ekstraksi RNA HeLa	40
3.4.7.4 Pengukuran Kemurnian dan Konsentrasi RNA	41
3.4.7.5 Sintesis cDNA	41
3.4.7.6 Amplifikasi Gen	42
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	44
4.1 Hasil	44
4.1.1 Viabilitas Sel HeLa Perlakuan Trisindolina-5	44
4.1.2 Uji Sitotoksitas Trisindolina-5 terhadap Sel HeLa	45
4.1.3 Aktivitas Senyawa Trisindolina-5 terhadap Ekspresi Gen <i>c-Myc</i> HeLa	46
4.1.4 Aktivitas Senyawa Trisindolina-5 terhadap Ekspresi Gen <i>APAF-1</i> HeLa	47
4.2 Pembahasan	47
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	54
5.1 Kesimpulan	54

5.2 Saran	54
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN	67
Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian	67
Lampiran 2. Perhitungan Larutan Stok Trisindolina-5	67
Lampiran 3. Pengenceran Larutan Trisindolina-5 untuk Uji MTT	67
Lampiran 4. Pengenceran Larutan Cisplatin untuk Uji MTT	68
Lampiran 5. Pengenceran Reagen MTT	69
Lampiran 6. Hasil Pembacaan Absorbansi Sel HeLa dengan Perlakuan Trisindolina-5	69
Lampiran 7. Hasil Pembacaan Absorbansi Sel HeLa dengan perlakuan Cisplatin	70
Lampiran 8. Mencari nilai IC50 menggunakan SPSS	71
Lampiran 9. Pengenceran Senyawa Trisindolina-5 untuk Uji qPCR	73
Lampiran 10. Pengenceran Cisplatin untuk Uji qPCR	73
Lampiran 11. Hasil Analisa Data Ekspresi Gen <i>c-Myc</i>	74
Lampiran 12. Hasil Analisa Data Ekspresi Gen <i>APAF-1</i>	74
Lampiran 13. Dokumentasi Penelitian	75
BIOGRAFI PENULIS	82

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi Sel HeLa (A) Sel Hidup, (B) Perubahan morfologi sel setelah perlakuan 100 µg/mL <i>Camellia sinensis</i> 48 Jam perbesaran 40x	17
Gambar 2.2 Sel Kanker Serviks yang ditemukan infeksi HPV	18
Gambar 2.3 Patogenesis HPV pada Kanker Serviks	19
Gambar 2.4 Mekanisme Karsinogenesis pada Kanker Serviks	20
Gambar 2.5 Siklus Sel	21
Gambar 2.6 Kontrol Siklus Sel	22
Gambar 2.7 Mekanisme Apoptosis dengan <i>c-Myc</i>	23
Gambar 2.8 Jalur Intrinsik dan Ekstrinsik dari Apoptosis	25
Gambar 2.9 Regulasi transkripsional apoptosis	26
Gambar 2.10 Struktur Kompleks <i>APAF-1</i> Apoptosom	27
Gambar 2.11 <i>Vibrio</i> sp.	27
Gambar 2.12 <i>Hyrtios</i> sp.	28
Gambar 2.13 Struktur kimia indol, isatin dan dua bentuk regioisomer dari Trisindolina	29
Gambar 2.14 Struktur kimia Trisindolina-5	29
Gambar 2.15 (a) Struktur Kimiawi dari Cisplatin (b) Struktur 3D dari Cisplatin	31
Gambar 2.16 Mekanisme Molekular Sitotoksitas Cisplatin	31
Gambar 2.17 Mekanisme Molekuler Doxorubicin	32
Gambar 2.18 Reaksi reduksi garam kuning tetrazolium menjadi formazan	33
Gambar 2.19 Siklus <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (qPCR)	34
Gambar 2.20 Nilai CT (<i>Cycle Value</i>) pada qPCR	35
Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian	36
Gambar 3.2 Desain 96 well-plate uji Sitotoksitas	39
Gambar 4.1.1 Morfologi Sel HeLa Perlakuan Trisindolina-5 dan Cisplatin	44
Gambar 4.1.2 Kurva log konsentrasi (ppm) dan %Viabilitas Sel Trisindolina-5	46
Gambar 4.1.3 <i>Fold change</i> gen <i>c-Myc</i> HeLa dengan perlakuan Trisindolina-5	46

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Komposisi Reagen Sintesis cDNA	411
Tabel 3.2 Komponen PCR mix	422
Tabel 3.3 Petunjuk Tahapan PCR	422
Tabel 4.1 Pengukuran Absorbansi Sel HeLa pada Perlakuan Senyawa Trisindolina-5	455
Tabel 4.2 Pengukuran Absorbansi Sel HeLa pada Perlakuan Cisplatin	455

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker serviks menjadi penyebab utama kematian nomor urut 2 setelah kanker payudara pada Wanita di Indonesia (Aqmarina et al., 2023). WHO atau *World Health Organization* (2024) menyatakan 95% kanker serviks dapat berasal dari infeksi *Human papilloma virus* (HPV) yang terdapat di serviks. Virus ini menyerang sel epitel serviks melalui mikrolesi atau kerusakan kecil pada mukosa serviks (Mosmann et al., 2021). HPV akan menginfeksi sel basal epitel atau lapisan terdalam dari epitel serviks dengan berintegrasi dengan DNA sel serviks (Jeannot et al., 2021). Pengobatan kanker serviks dengan agen kemoterapi dapat memberi efek samping yang ikut menyerang sel-sel normal (Saputra et al., 2023). Penelitian untuk mencari alternatif pengobatan dari kanker serviks dilakukan oleh banyak peneliti selama beberapa dekade terakhir (Hayani et al., 2012; Ramadhana et al., 2023).

Umumnya, penelitian terkait kanker serviks menggunakan kultur sel HeLa (Hassanshahi et al., 2020). Sel HeLa memiliki seperangkat reseptor permukaan sel yang universal sehingga sel ini banyak digunakan untuk mempelajari berbagai efek senyawa antikanker; sel HeLa dapat dengan mudah dikultur, serta sifatnya yang *immortal* atau dapat bertahan hidup di jangka yang panjang (Lyapun et al., 2019). Sel HeLa merupakan *continuous cell line* yang berasal dari sel epitel kanker serviks penderita kanker serviks di tahun 1951. HeLa menjadi kultur sel pertama dari kanker serviks manusia yang dapat dikultur secara In Vitro (Lin et al., 2019). Oleh karena temuan kultur sel HeLa ini, hasil temuan dari studi yang dilakukan sebelumnya oleh peneliti terdahulu dapat melibatkan pendekatan uji sitotoksitas, penggunaan imunoterapi, hingga terapi gen (Noviardi et al., 2019; Song et al., 2021).

Berbagai gen yang dapat memicu tumor terdapat pada susunan DNA sel HeLa, salah satunya yaitu *APAF-1* (Ma et al., 2021). Gen *apoptotic protease-activating factor 1* (*APAF-1*) merupakan suatu *gen suppressor* bagi tumor (*Tumor Suppressor Gene*), dimana penurunan ekspresi gen *APAF-1* pada suatu sel kanker dapat menghambat proses apoptosis. Hal ini terjadi karena saat regulasi protein *APAF-1* mengalami penurunan dan terjadi overekspresi dari anti- apoptosis Bcl-2, kelangsungan hidup sel akan meningkat dan mengganggu jalannya apoptosis (Christoph et al., 2006). Ekspresi protein *APAF-1* yang diatur dalam tingkat transkripsional dapat meningkatkan regulasi ekspresi dari gen penginduksi apoptosis (Kurayoshi et al., 2021). Overekspresi gen lain yang memiliki dampak signifikan dari proliferasi serta kelangsungan hidup pada sel Hela yaitu gen *c-Myc* (Zhang et al., 2023). Overekspresi dari *c-Myc* dapat meningkatkan proliferasi sel kanker dengan mempercepat siklus sel. *c-Myc* dapat meregulasi transkripsi serta mengatur sekiranya 15% ekspresi dari seluruh gen yang ada pada mamalia termasuk manusia (Duffy et al., 2021). Saat *c-Myc* mengalami overekspresi yang tidak terkontrol hingga mengarah kepada metastasis, *immortality*, serta peningkatan survivalitas dari sel kanker (Chen et al., 2021).

Pengobatan kanker pada umumnya seperti kemoterapi dapat menyebabkan berbagai efek samping karena pengobatan ini juga menyerang sel-sel *non tumor* seperti pada penelitian Saputra et al (2023), yang menyebutkan bahwa Cisplatin sebagai agen antikanker yang diberikan dalam konsentrasi senyawa $> 60 \text{ mg/m}^2$ memiliki efek samping ototoksitas serta nekrosis pada jaringan penunjang organ Corti (Saputra et al., 2023). Sehingga dalam beberapa dekade terakhir para peneliti mulai berinovasi untuk

menggunakan alternatif senyawa alam sebagai alternatif dari pengobatan kanker (van den Boogaard et al., 2022). Pengembangan terapi kanker menggunakan senyawa berbahan dasar alami dijadikan sebagai salah satu alternatif, karena selain bahannya mudah untuk didapatkan, pengobatan dengan bahan alami dinilai mengurangi efek samping dari terapi kanker yang biasa dirasakan oleh pasien kanker (Sauter, 2020).

Trisindolina-5 merupakan senyawa alami hasil modifikasi dari sintesis senyawa trisindolina yang dikembangkan dengan keunggulan tingkatan toksisitas yang tinggi (Wati, 2021). Senyawa ini merupakan turunan dari senyawa Trisindolina yang pertama kali ditemukan pada bakteri *Vibrio sp.* yang hidup bersimbiosis dengan spons *Hyrtios altus* di perairan Okinawa, Jepang (Kobayashi et al., 1994). Melalui penelitian lebih lanjut, senyawa Trisindolina 3,3-Di(3-indolyl)-2-indolone terbukti memiliki aktivitas sitotoksik terhadap berbagai jenis sel kanker, seperti uterin sarkoma MES-SA dengan IC_{50} $3,51 \pm 0,03 \mu M$, kolorektal adenokarsinoma HCT15 sebesar $6,63 \pm 0,43 \mu M$, kanker paru-paru A549 sebesar $18,4 \mu M$, kanker hati HepG2 sebesar $20,4 \mu M$, serta sel normal paru-paru manusia MRC-5 dengan $IC_{50} > 100 \mu M$ (Yoo et al., 2008; Wati et al., 2021). Hal ini menunjukkan potensi Trisindolina sebagai agen antikanker (Wati et al., 2021).

Modifikasi senyawa Trisindolina, disintesis dengan kombinasi gugus floro pada isatin dan gugus metil ester pada indol yaitu Trisindolina-5 dapat meningkatkan toksisitas pada sel kanker neuroblastoma SK-N-SH, kanker hati HepG2, dan kanker prostat DU-145. Menurut Wati (2021), senyawa Trisindolina-5 memiliki aktivitas sitotoksik paling tinggi dibandingkan dengan variasi uji gugus lain dan memiliki sifat toksik terhadap sel kanker paru-paru A549 serta kanker prostat DU-145 dengan nilai IC_{50} masing-masing adalah 25,69 dan 22,23 $\mu g/ml$, tetapi tidak toksis terhadap sel normal H9C2 yaitu sebesar 201,65 $\mu g/ml$. Akan tetapi, tingkat sitotoksitas Trisindolina-5 belum diujikan pada Sel HeLa (Wati, 2021).

Pada penelitian ini akan digunakan senyawa Trisindolina-5 sebagai senyawa tunggal yang akan diujikan terhadap ekspresi gen dari kultur sel HeLa serta obat kemoterapi cisplatin sebagai kontrol positif. Oleh karenanya perlu dilakukan penelitian terkait aktivitas Trisindolina-5 pada uji seluler sitotoksitas dengan MTT assay untuk mengetahui nilai IC_{50} dan level molekuler yaitu ekspresi gen *c-Myc* dan *APAF-1* pada kanker serviks Sel HeLa.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana pengaruh pemberian senyawa Trisindolina-5 terhadap ekspresi gen *c-Myc* dan *APAF-1* pada Kultur Sel In Vitro HeLa?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Model uji In Vitro yang digunakan adalah kultur sel HeLa, kultur sel kanker epitel serviks yang berasal dari Laboratorium Parasitologi, Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
2. Penelitian pada basis kultur sel ini tidak mencerminkan efek senyawa Trisindolina-5 pada organisme hidup secara keseluruhan oleh karena kultur sel yang digunakan merupakan model spesifik kanker serviks

3. Senyawa uji yang digunakan yaitu Trisindolina-5 yang diperoleh dari laboratorium Kimia Bahan Alam dan Sintesis, Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Analitika Data, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS), Surabaya, Jawa Timur.
4. Sitotoksisitas senyawa Trisindolina-5 menggunakan MTT *assay* terhadap kultur sel HeLa, untuk memastikan bahwa sitotoksisitas yang didapat adalah hasil dari perlakuan senyawa Trisindolina-5 digunakan kontrol sel HeLa, kontrol medium RPMI, serta kontrol positif perlakuan senyawa Cisplatin
5. Pengujian ekspresi gen dilakukan dengan metode qPCR, dua gen target yang digunakan ialah gen *C-Myc*, gen *APAF-1*, serta *housekeeping gene* GAPDH

1.4 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh pemberian senyawa Trisindolina-5 terhadap ekspresi gen *c-Myc*, dan *APAF-1* pada kultur sel HeLa.
2. Mengetahui konsentrasi IC₅₀ Trisindolina-5
3. Menganalisis kemampuan senyawa Trisindolina-5 untuk menekan gen yang berperan dalam proliferasi sel yaitu gen *C-Myc* dan apoptosis yaitu gen *APAF-1*

1.5 Manfaat

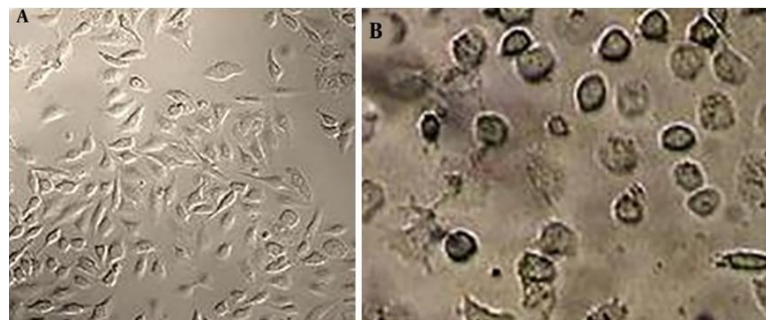
Manfaat dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh senyawa Trisindolina-5 sebagai antikanker melalui jalur apoptosis dengan mengukur ekspresi gen *C-Myc* dan *APAF-1* pada kultur sel HeLa sebagai alternatif dari bidang medis kandidat pengobatan terhadap kanker.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 HeLa Cell Line

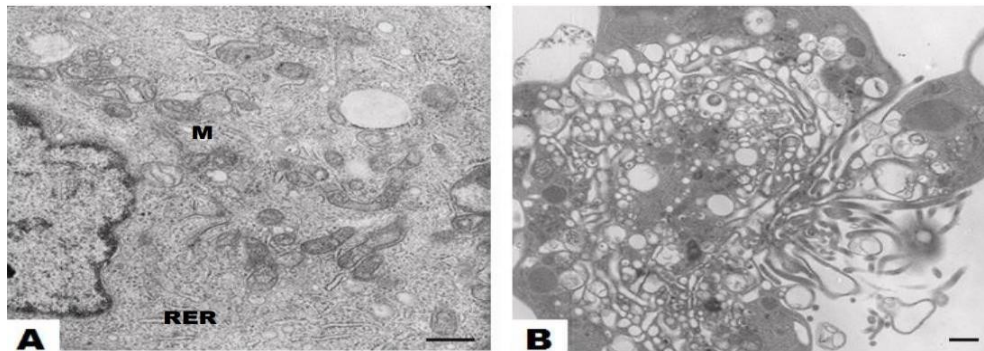
2.1.1 Karakteristik sel HeLa

Sel HeLa merupakan sel kanker leher rahim manusia yang memiliki kemampuan proliferasi tinggi sehingga dapat terus membelah dan tidak mengalami *senescence* atau penuaan sel (Hela & Aguayo-Mazzucato, 2023). *Cell line* ini bersifat *immortal* karena masa hidup biologisnya yang tidak terbatas, hal ini terjadi karena kemampuan dari sel HeLa untuk bermutasi dan menghindari mekanisme regulasi normal. Sehingga sel HeLa umum dan banyak digunakan dalam berbagai penelitian berbasis sel (Song et al., 2021). Sel HeLa memiliki bentuk silindris (oval) dengan permukaan yang halus. Sel epitel kanker ini bersifat *adherent* atau tumbuh dengan melekat pada permukaan substrat kulturnya serta menempel antara satu sel dengan sel yang lain (Shiraishi and Sato, 2024). Sifat menempel antar sel (adhesi sel) ini muncul karena kemampuan proliferasi yang tidak terbatas (Hirai et al., 2022). Proliferasi yang terus menerus ini berasal dari aktivitas telomerase yang tinggi dan dapat mencegah pemendekan telomer. Dimana pemendekan telomer sangat erat kaitannya dengan apoptosis sebagai mekanisme *Programmed Cell Deaths* (Kahl et al., 2020).



Gambar 2.1 Morfologi Sel HeLa (A) Sel Hidup, (B) Perubahan morfologi sel setelah perlakuan 100µg/mL *Camellia sinensis* 48 Jam perbesaran 40x (Jahani et al., 2020)

Jumlah kromosom pada sel HeLa tergolong abnormal, dimana umumnya pada manusia hanya terdapat 46 kromosom, akan tetapi kromosom pada sel HeLa sebanyak 76-80 (Iemura et al., 2021). Selain itu, sel HeLa memiliki aktivitas metabolisme yang meningkat seperti glikolisis anaerobic sehingga sel dapat berkembang di lingkungan yang minim oksigen dan merubahnya menjadi radikal bebas yang dapat menginduksi oksidasi dari asam nukleik (Ramya et al., 2021). Mutasi sel serviks normal >70% disebabkan oleh HPV atau *Human Papillomavirus* (HPV), terlebih tipe HPV-18 dan HPV-16 (Noroozi et al., 2022). HPV-18 dan HPV-16 memiliki potensi onkogenik karena dalam urutan DNA HPV-18 terdapat gen E6 dan E7. Kedua gen tersebut dapat mengkode protein onkogenik dan berinteraksi dengan *Tumor Suppressor Gene* (TSG) yaitu p53 dan pRb dan mempercepat proses transformasi sel normal menjadi sel kanker (Grace et al., 2021).



Gambar 2.2 Sel Kanker Serviks yang ditemukan infeksi HPV

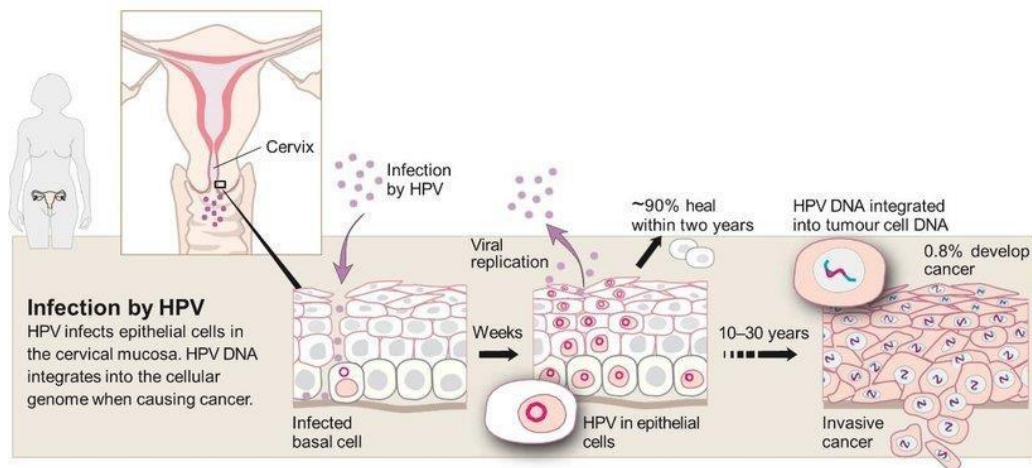
A) Sel HeLa (HPV-18) dan B) Sel SiHa (HPV-16)

(de Queiroz Simões dan Barth, 2017)

Aktivitas seluler yang tinggi ditemukan dalam garis sel HeLa (**Gambar 2.2 A**) pada mitokondria (**M**) dan retikulum endoplasma kasar (**RER**) di sebelah inti sel. Sedangkan pada sel SiHa, ditunjukkan vakuola sel yang representasinya mirip dengan APC atau *Antigen- Presenting Cell* **gambar 2.2 B**. Sifat *immortal* dari model in vitro kedua sel keratinosit manusia tersebut diakibatkan kehadiran dari ekspresi gen E6 dan E7 pada kanker serviks yang merupakan proto-onkogen dari virus *HPV* sedangkan kehadiran kedua gen tersebut tidak ditemukan pada sel keratinosit serviks (Alazawi et al., 2002). Sel keratinosit ektoserviks merupakan sel yang melapisi permukaan luar serviks dari kerusakan jaringan di bawahnya. Sel ini memiliki struktur berlapis yang saling tumpang tindih dengan lapisan basal yang aktif membelah. Keratinosit pada serviks tidak mengalami keratinisasi yang tinggi karena serviks memerlukan fleksibilitas dan kelembapan (Woodworth et al., 1993; Rotondo et al., 2015). Sel ini sering menjadi kontrol sel normal bagi penelitian terhadap kanker serviks. Saat sel keratinosit ini terinfeksi oleh virus seperti HPV, sel ini akan mengalami perubahan ekspresi gen dan aktivitas seluler yang menandakan perubahan sel normal serviks menjadi sel kanker Sehingga melalui penelitian oleh de Queiroz Simões dan Barth (2017) diketahui bahwa aktivitas seluler pada keratinosit pada sel SiHa dan HeLa yang positif terhadap HPV menjadi *marker* yang prognostik bagi kanker serviks (de Queiroz Simões dan Barth, 2017).

2.1.2 Infeksi Human Papilloma Virus (HPV) yang Menyerang sel Epitel Serviks

Pada tahun 80an, ditemukan tipe HPV *Human Papilloma Virus* dan pengembangan prosedur penggunaan asam nukleat (Zur, 2002), dan isolasi jenis HPV pertama dari biopsy kanker serviks yaitu tipe HPV 16 dan HPV18. Saat HPV menyebabkan kanker serviks, DNA virus akan menyatu dengan genom sel inang dan menginfeksi sel epitel mucosa serviks (Stark and Zivkovic, 2018). HPV adalah virus kecil yang mengandung genom DNA beruntai ganda yang dilindungi oleh kapsid dari dua protein akhir, L1 dan L2. Struktur lengkapnya memiliki 72 salinan L1 dan sejumlah salinan L2 yang bervariasi. Struktur HPV membentuk sebuah struktur dengan simetri icosahedra (berukuran 50-60 nm) (Wolff et al., 2012).



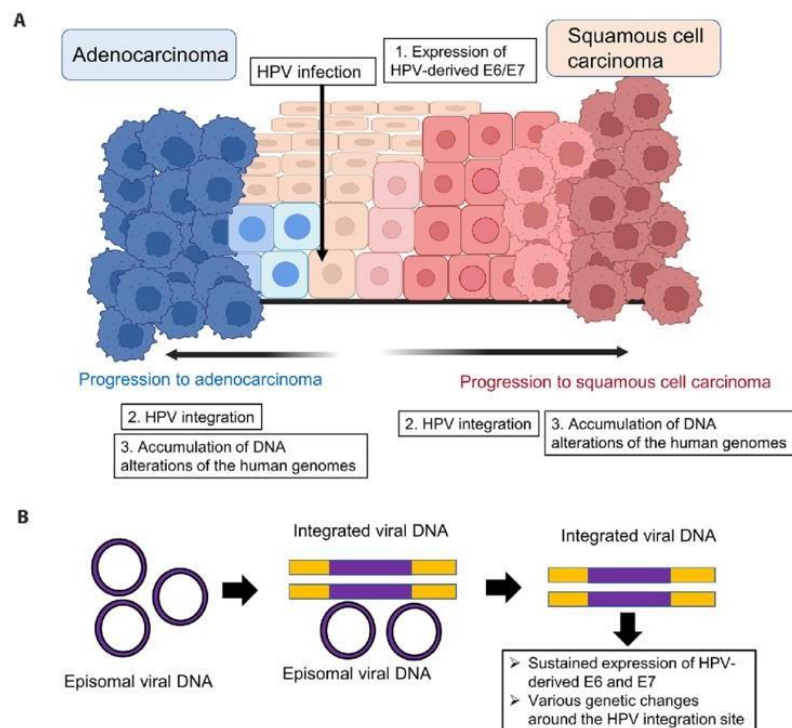
Gambar 2.3 Patogenesis HPV pada Kanker Serviks
(Stark and Zivkovic, 2018)

Lebih dari 150 sub tipe HPV dapat dipisahkan berdasarkan potensi onkogeniknya dari risiko tinggi hingga rendah. HPV risiko rendah jenis, seperti HPV 6 dan HPV 11, dapat menyebabkan penyakit menular seksual kutil, sementara infeksi HPV 16 dan 18 saling berhubungan dengan lesi ganas (Wolff et al., 2012). Bagian virus dari genom HPV terdiri dari antara 6800 – 8000 pasangan basa yang disusun dalam delapan pembacaan terbuka frame: E6, E7, E1, E2, E4, E5, dan L2 dan L1-coding untuk fungsi “awal” atau “akhir”. Setelah 10-30 tahun, infeksi persisten juga terjadi lesi yang tidak diobati berhubungan dengan integrasi genom HPV ke dalam DNA inang, jika terjadi gangguan E2 dan lebih tinggi -regulasi ekspresi onkogen E6 dan E7 (Villain et al., 2007). Setelah HPV pertama kali ditemukan, kelainan dari kanker serviks banyak diteliti. Infeksi HPV persisten yang paling banyak menunjukkan gejala adalah neoplasia intraepitel serviks (CIN) (Stark and Zivkovic, 2018).

Tingkatan berbeda CIN yang telah diketahui yaitu CIN *grade 1*, CIN *grade 2*, dan CIN *grade 3*. Ketiga tingkat CIN, bahkan CIN 3, dianggap masih bisa disembuhkan. CIN 3 dianggap sebagai lesi tingkat tinggi. Hal ini mengacu pada perubahan seluler atipikal yang tampak meliputi lebih dari dua pertiga ketebalan epitel, dan mencakup seluruh ketebalan epitel. Lesi (sebelumnya disebut karsinoma in situ). Dari hasil penelitian di masa lampau, integrasi DNA HPV dianggap sebagai peristiwa yang terlambat dalam perkembangan kanker serviks, namun penelitian yang lebih baru menunjukkan keselarasan dari bentuk integrasi HPV 16 pada wanita dengan CIN 3 dan sejenisnya dengan kanker serviks (Stark and Zivkovic, 2018).

2.1.3 Tahap Karsinogenesis pada Kanker Serviks

Kanker serviks paling banyak disebabkan dari proses karsinogenesis yang bermula dari infeksi *Human Papillomavirus* (HPV), terutama tipe HPV onkogenik seperti HPV-16 dan HPV-18 (Stark and Zivkovic, 2018). Proses karsinogenesis ini melibatkan beberapa tahap transformasi seluler yang dipicu oleh infeksi HPV, perubahan genetik, dan epigenetik yang akhirnya menyebabkan kanker. Tahap karsinogenesis yaitu inisiasi, promosi, progresi, dan metastatis (Pérez-González et al., 2023).



Gambar 2.4 Mekanisme Karsinogenesis pada Kanker Serviks
(Kusakabe et al., 2023)

Tahap awal proses karsinogenesis yaitu inisiasi, terjadi infeksi sel epitel di zona transformasi serviks, area pertemuan antara epitel skuamosa dan epitel kolumnar. HPV memasuki sel-sel basal yang rentan pada serviks melalui mikroabrasions (luka kecil) (Bhat et al., 2022). HPV memiliki dua protein onkogenik utama, yaitu E6 dan E7, yang bertanggung jawab atas transformasi seluler. Protein E6 berikatan dengan protein penekan tumor p53, dan menyebabkan degradasinya, sehingga menghilangkan kemampuan sel untuk memperbaiki DNA yang rusak atau memicu apoptosis. Protein E7 berikatan dengan protein retinoblastoma (pRb), sehingga memungkinkan sel untuk terus berproliferasi secara tidak terkendali (Minoni et al., 2020). Akibat aktivitas E6 dan E7, terjadi gangguan pada kontrol siklus sel, yang mengarah pada perkembangan CIN (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*), yaitu perubahan prakanker pada sel-sel serviks. CIN diklasifikasikan ke dalam tiga level, yaitu:

- CIN 1: Displasia ringan yang biasanya sembuh sendiri, terutama pada individu dengan sistem imun yang sehat.
- CIN 2: Displasia sedang yang memiliki potensi lebih besar untuk berkembang menjadi kanker.
- CIN 3: Displasia berat atau karsinoma in situ, di mana perubahan sel prakanker terjadi di seluruh ketebalan epitel serviks.

(Stark & Zivkovic, 2018)

Pada tahap selanjutnya, yaitu promosi, infeksi HPV bersifat sementara dan dapat diatasi oleh sistem imun. Namun, jika infeksi persisten, terutama dengan tipe HPV risiko tinggi seperti HPV-16 atau HPV-18, risiko progresi menuju lesi prakanker meningkat. Sel-sel prakanker mulai mengakumulasi mutasi tambahan di gen-gen yang mengontrol siklus sel, seperti gen penekan tumor atau onkogen lainnya. Mutasi ini menyebabkan sel-sel

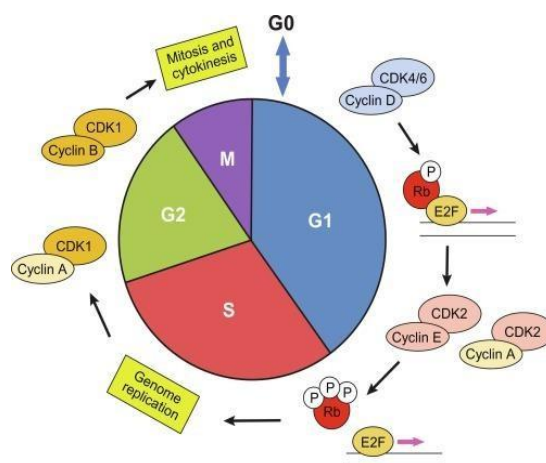
menjadi semakin resisten terhadap mekanisme regulasi normal. Pada tahap ini, sel-sel yang berubah mulai menginduksi pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) untuk mendukung pertumbuhan sel tersebut (Nahand et al., 2020).

Ketika lesi CIN 3 atau karsinoma in situ tidak lagi terbatas pada epitel dan mulai menyerang jaringan dasar serviks, maka dianggap sebagai kanker invasif. Sehingga kanker sudah masuk ke tahap progresi (Stark and Zivkovic, 2018). Pada tahap ini, sel-sel kanker mulai menembus membran basal dan menyerang jaringan di bawahnya. Sel-sel prakanker mengalami transformasi penuh menjadi sel kanker, ditandai dengan proliferasi sel yang tidak terkendali, hilangnya diferensiasi seluler, serta kemampuan untuk menginvasi jaringan sekitarnya dan bermetastasis menyebar ke organ lain. Kanker serviks dapat menyebar melalui sistem limfatik atau darah ke organ lain seperti kelenjar getah bening, paru-paru, hati, atau tulang. kanker dapat bermetastasis ke organ lain, seperti paru-paru, hati, dan tulang. Penyebaran metastasis menandakan tingkat akhir dari kanker dan peluang keberhasilan pengobatan menjadi sangat kecil (Aysal et al., 2022; Liu et al., 2020).

2.2 Siklus Sel

2.2.1 Siklus Sel

Serangkaian peristiwa yang terjadi dalam sel yang menghasilkan pembelahan dan duplikasi dikenal sebagai siklus sel. Siklus ini terbagi menjadi 2 fase, yaitu interfase dan mitosis. Tahap interfase adalah tahap terpanjang dari siklus sel, dan kemudian dapat dibagi menjadi tiga fase: fase G1, fase S, dan fase G2 (Almaki, 2023). Selama fase G1, sel tumbuh dan bersiap untuk sintesis DNA, dan pada fase S, sintesis DNA terjadi, yang mengarah pada replikasi materi genetik (Engeland, 2022), lalu pada fase G2 sel terus berkembang untuk mempersiapkan tahap mitosis. Mitosis merupakan tahap siklus sel saat DNA yang direplikasi terpisah menjadi nuklei yang identik. Fase mitosis sendiri terbagi menjadi 4 fase, yaitu profase, metafase, anafase, dan telofase. Pada saat profase, kromosom mengumpul dan benang *spindle* mulai terbentuk. Kemudian di metafase, kromosom berjajar pada *metaphase plate*. Di anafase, benang spindle akan menarik *sister chromatids* menjauh, memisahkan keduanya menjadi dua set kromosom baru (Barford, 2020). Di tahap terakhir, telofase, kromosom yang telah terdekondensasi akan membentuk selubung membran dan mengakhiri tahap siklus sel (Almaki, 2023).

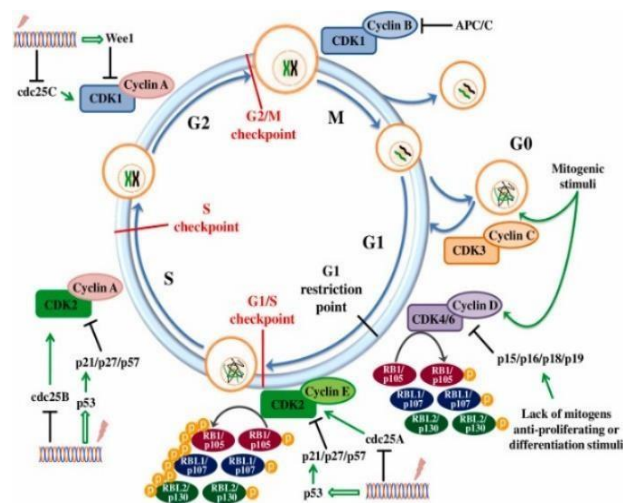


Gambar 2.5 Siklus Sel
(Newton, 2018)

2.2.2 Kontrol Siklus Sel

Pertumbuhan dan pembelahan sel yang tidak terkendali merupakan ciri khas (*Hallmark of Cancer*) dari kondisi kanker, yang dapat mengakibatkan pembentukan tumor atau invasi dan penyebaran sel kanker ke bagian tubuh lain. Perkembangan kanker seringkali disebabkan oleh mutasi atau perubahan gen yang mengontrol siklus sel, sehingga mengganggu regulasi normal pertumbuhan dan pembelahan sel (Alshahat et al., 2023). Mekanisme kontrol siklus sel di fase G1, S, dan G2/M, terbagi menjadi beberapa *checkpoints* sebagai berikut.

- Kontrol fase G1 (Gap 1). Fase ini menjadi fase persiapan sebelum DNA bereplikasi dengan bertumbuh, mensintesis protein serta organel yang diperlukan, serta untuk memastikan lingkungan eksternal mendukung pembelahan sel. Di kontrol fase ini, sel memastikan bahwa DNA tidak rusak dan lingkungan eksternal kondusif untuk replikasi DNA. Jika kerusakan DNA terdeteksi, protein p53 akan diaktifkan. p53 dapat menginduksi ekspresi p21, yang menghambat CDK dan mencegah transisi ke fase S hingga DNA yang mengalami kerusakan diperbaiki (Engeland, 2022).
- Kontrol Fase S (Sintesis) replikasi DNA terjadi, sehingga setiap sel anak menerima satu salinan lengkap dari genom. Titik pemeriksaan akan memastikan proses replikasi DNA berjalan sebagaimana mestinya. *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM) dan ATR protein kinases akan diaktifkan jika terjadi kerusakan DNA selama replikasi (Malumbres, 2020).
- Kontrol Fase G2/M (Gap 2/Mitosis) Di fase ini, sel memeriksa kelengkapan DNA sebelum memulai mitosis, pada *checkpoint* ini Protein kinases seperti ATM/ATR akan mengaktifkan CHK1 dan CHK2 jika kerusakan DNA belum diperbaiki. Ini akan mencegah sel masuk ke mitosis hingga kerusakan diperbaiki (García-Santisteban et al., 2021).
- *Checkpoint spindle* (M) ialah *checkpoint* saat mitosis, khususnya di metafase, sel akan memastikan semua kromosom terikat dengan benar pada *spindle* sebelum dipisahkan kutub. Di titik pemeriksaan ini, transisi dari metafase ke anafase dilakukan dengan bantuan kontrol degradasi protein securin dan *cyclin b* oleh APC/C (*Anaphase Promotor Complex*) (Barford, 2020).

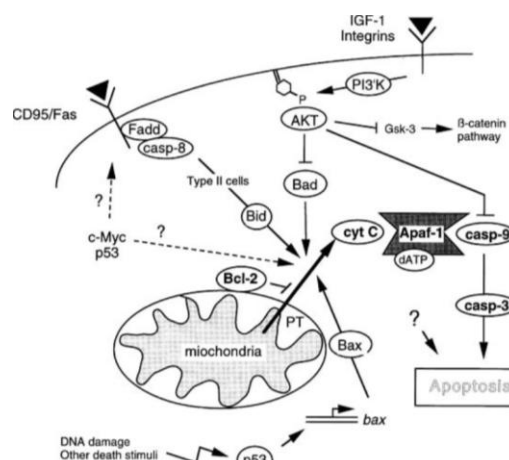


Gambar 2.6 Kontrol Siklus Sel
(Yang & Sheridan, 2014)

Kontrol siklus sel dilakukan untuk memastikan akurasi dari replikasi DNA, karena replikasi DNA di fase S merupakan tahap penting di siklus sel. Saat replikasi DNA tidak akurat, dapat terjadi imutasi, abnormalitas kromosom, hingga kanker (Almaki, 2023). Sehingga protein *cyclin dependent kinases* (CDKs) mengontrol terjadinya siklus sel dan memastikan bahwa tiap tahap berjalan dengan baik sebelum melanjutkan tahap siklus sel selanjutnya (Almaki, 2023; Engeland, 2022).

2.3 Gen *C-Myc*

Proses proliferasi dan apoptosis dalam sel membutuhkan faktor regulasi yang biasa dilakukan oleh protein tertentu. Protein ini adalah *C-Myc* yang memiliki kemampuan dalam meregulasi apoptosis atau *programmed cell death* yang dihasilkan dari koordinasi aktif *C-Myc* dengan protein pasangan seperti *Max* yang akan memfasilitasi *binding* DNA dan mengaktifkan transkripsi (Davis and Jeffery, 2002). Sebagai salah satu bagian dari faktor transkripsi *Myc*, *C-Myc* dikenal sebagai keterlibatannya dalam proses sel, termasuk metabolisme dan diferensiasi sel. Dalam proliferasi sel kanker, *C-Myc* memiliki kemampuan signifikan untuk meregulasi gen yang berkontribusi dalam perbaikan dan *self-renewal* sel itu sendiri. Ekspresi dari *C-Myc* seringkali diasosiasikan dengan tumorigenesis dan metastasis, sehingga *C-Myc* menjadi faktor yang krusial dalam membentuk berbagai macam kanker (Hanahan et al., 2022; Chen et al., 2021). Dengan mengekspresikan gen yang terlibat dalam siklus sel dan menghambat diferensiasi, *C-Myc* dapat mendukung keberlanjutan proliferasi dan kelangsungan hidup dari sel kanker (Novikov et al., 2021; Prendergast, 1999).



Gambar 2.7 Mekanisme Apoptosis dengan *c-Myc* (Prendergast, 1999)

Struktur protein dari *C-Myc* tersusun atas domain *helix-loop-helix-leucine zipper* (bHLH- LZ) yang penting dalam fungsinya sebagai faktor transkripsi (Sammak et al., 2019). Domain ini akan memfasilitasi dimersiasi *C-Myc* dengan protein pasangannya *Max*, dengan menyediakan kompleks untuk berikatan dengan sekuens DNA yang diketahui sebagai *E-Boxes* (CACGTG) pada area promotor dari gen target. Ikatan ini akan mengaktifkan atau menekan transkripsi gen yang terlibat dalam proses sel seperti regulasi siklus sel, apoptosis, dan metabolisme (Sammak et al., 2019; Nie et al., 2020). Struktur dari *C-Myc* termasuk *Trans activation Domain* (TAD) pada N-terminus yang berinteraksi dengan kofaktor transkripsional lain untuk memodulasi ekspresi gen. Regulasi dari

aktivitas *C-Myc* mendisregulasi proliferasi kanker dan sel tidak terkontrol (Rejnowicz et al., 2024).

Overekspresi dari *C-Myc* merupakan penanda dari banyak jenis kanker, termasuk leukemia, lymphoma, kanker payudara, dan kanker kolokteral, Overekspresi ini terbentuk karena amplifikasi gen, translokasi kromosom, serta meningkatnya aktivitas dari transkripsi. Konsekuensi dari overekspresi *C-Myc* akan mengakibatkan terbentuknya pertumbuhan dan pembagian yang tidak terkendali dari sel kanker, meningkatnya aktivitas metabolic, serta lolos dari proses apoptosis (Duffy et al., 2021). Studi atau pendekatan terbaru mengenai interaksi

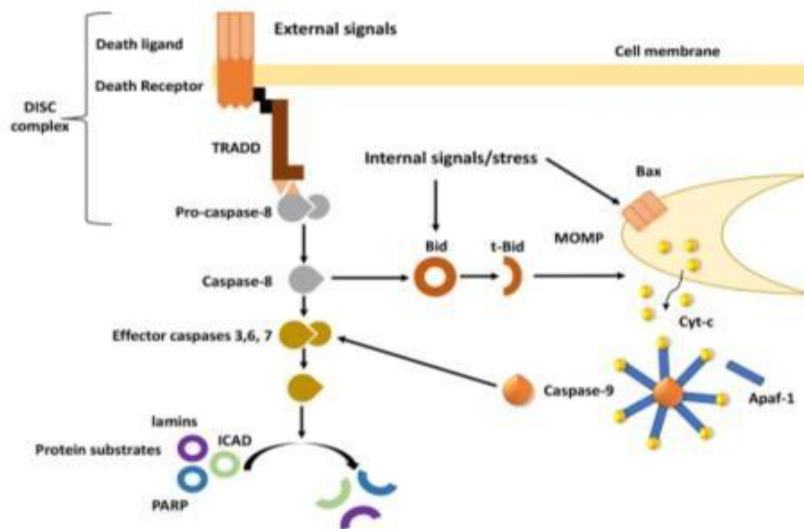
antara *C-Myc* dan *Max* menggunakan inhibitor molekul kecil sehingga menghambat aktivitas transkripsi. Selain itu, interferensi dari RNA dan gen *CRISPR/Cas9-mediated* yang diubah banyak diteliti untuk menurunkan regulasi ekspresi dari *C-Myc* dalam sel kanker, Studi yang telah berkembang terkait target gen *C-Myc* ini berpotensi untuk mengatasi kanker atau tumor dari kemampuannya dalam bermetastasis (Moser et al., 2021).

2.4 Apoptosis

2.4.1 Mekanisme Apoptosis

Istilah Apoptosis sering digunakan bergantian dengan istilah *Programmed Cell Death* atau program kematian sel yang terprogram. Apoptosis menjadi regulasi yang berjalan secara genetic yang terbentuk untuk kematian sel. Berbagai proses biologis seperti embryogenesis, penuaan, serta macam-macam penyakit menjadi ekspresi dari peran apoptosis (Neophytou et al., 2021). Apoptosis (*a-po-toe-sis*) pertama kali digunakan dalam penelitian oleh Kerr, Wyllie, and Currie di tahun 1972 untuk mendeskripsikan kematian sel yang jelas nampak secara morfologis. Seiring berkembangnya penelitian, komponen-komponen apoptosis baru dapat dideskripsikan. Proses apoptosis umumnya terjadi saat masa perkembangan dan penuaan sebagai mekanisme homeostasis untuk menyeimbangkan populasi sel pada jaringan. Apoptosis juga menjadi mekanisme pertahanan seperti pertahanan reaksi imun atau saat sel rusak akibat dari penyakit atau zat berbahaya (Elmore, 2007; Arends and Stanley, 2024).

Apoptosis menjadi respon fisiologis dalam menghilangkan sel-sel yang tidak diinginkan dan digunakan selama embryogenesis untuk membentuk *form* yang telah berkembang seperti anggota tubuh dan jari. Proses ini akan menekan sisa struktur embrio, sehingga *Programmed Cells Death* akan menyediakan ruang bagi sel-sel yang baru selama proses pembaharuan sel (Neophytou et al., 2021). Dibandingkan nekrosis, proses apoptosis terbentuk dengan respon yang minim terhadap inflamasi dan menyusut. Seperti saat apoptosis menghilangkan limfosit yang berdiferensiasi (Yang et al., 2021).

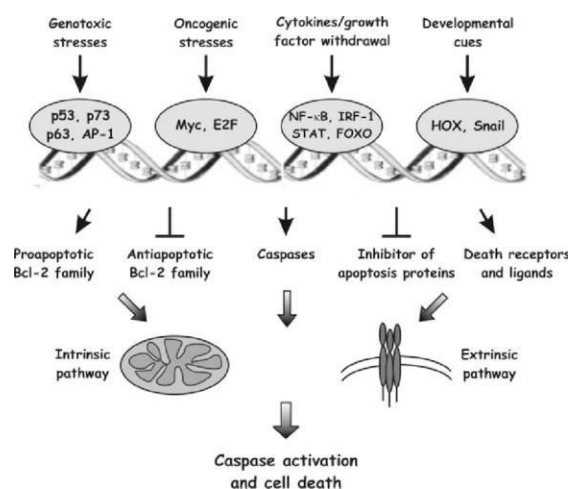


Gambar 2.8 Jalur Intrinsik dan Ekstrinsik dari Apoptosis (Neophytou et al., 2021)

Apabila dibedakan dari fase inisiasinya, apoptosis dibagi menjadi 2, yaitu jalur ekstrinsik yang diaktivasi oleh reseptor, jalur perforin atau granzyme, dan jalur intrinsik atau jalur mitokondria (Neophytou et al., 2021). Jalur ekstrinsik diaktivasi oleh serangkaian proses ekstraseluler melalui ligan larut yang berikatan dengan reseptor koresponding seperti Fas atau FasL yang berasosiasi dengan domain sel yang mati. Jalur perforin atau granzyme sangat penting untuk aktivitas sitotoksik limfosit T. Sedangkan jalur intrinsik sebagian besar diinduksi oleh stress selular seperti kerusakan DNA atau akumulasi lipatan protein dan sangat bergantung pada aktivitas mitokondria (Rodríguez-González & Gutiérrez-Kobeh, 2024).

2.4.2 Kontrol Gen pada Apoptosis

Mutasi sel normal menjadi sel *tumor* karena gagal memasuki fase apoptosis menunjukkan kontrol gen apoptosis sangat penting untuk mengatur proliferasi sel dan mencegah pertumbuhan tumor (Neophytou et al., 2021). Kematian sel terprogram, juga dikenal sebagai apoptosis, menghilangkan sel-sel yang mengalami kerusakan atau mutasi, yang jika dibiarkan dapat menyebabkan kanker. P53 adalah gen penting dalam proses ini karena berfungsi untuk mengidentifikasi kerusakan DNA. Ketika DNA tidak dapat diperbaiki, p53 menghasilkan sinyal yang memicu kematian sel melalui jalur intrinsik yang melibatkan pelepasan sitokrom c dari mitokondria dan aktivasi caspase (Kanamori et al., 2021).



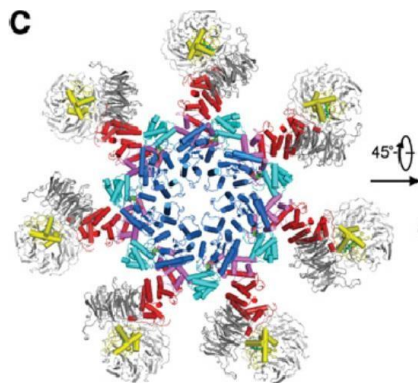
Gambar 2.9 Regulasi transkripsional apoptosis
(Dudgeon et al., 2009).

Dua mekanisme kontrol gen apoptosis atau yang dikenal sebagai jalur apoptosis, yaitu jalur intrinsik dan jalur ekstrinsik. Jalur Intrinsik merupakan mekanisme apoptosis yang diaktifkan oleh sinyal internal seperti kerusakan DNA, yang melibatkan gen pro-apoptosis seperti Bax dan Bak. Ekspresi gen-gen ini dapat ditingkatkan oleh aktivasi p53, yang menyebabkan apoptosom dan aktivasi caspase-9. Sedangkan dalam jalur ekstrinsik, apoptosis akan diaktifkan oleh ikatan ligan dengan reseptor kematian permukaan sel seperti Fas dan TNF- α . Aktivasi reseptor ini mengaktifkan caspase-8, yang juga membantu proses apoptosis (Neophytou et al., 2021). Mutasi pada gen p53 sering menyebabkan kegagalan dalam kontrol genetik; 50-60% kasus kanker menunjukkan mutasi atau kehilangan ekspresi gen p53. Hal ini membuat sel kanker tidak dapat melakukan apoptosis secara efektif, memungkinkan mereka untuk berkembang dan membelah tanpa kendali (Levine, 2020).

2.5 Gen *APAF-1*

Gen *APAF-1* (*Apoptotic Protease Activating Factor 1*) berperan krusial dalam proses apoptosis sebagai mekanisme *Programmed Cell Death* atau proses kematian sel secara alami (Kessler et al., 2020). Mekanisme ini terjadi ketika sel mengalami stres atau kerusakan DNA, *pathway* apoptotik akan diaktifkan untuk menghindari proliferasi sel abnormal yang berpotensi menjadi kanker (Shakeri et al., 2021). Meskipun demikian, beberapa studi telah menunjukkan bahwa regulasi *APAF-1* dapat dinonaktifkan dalam beberapa jenis kanker, termasuk kanker serviks, sehingga memfasilitasi perkembangan dan survival sel kanker. Gen apoptotic protease- activating factor 1 (*APAF-1*) merupakan salah satu gen penekan tumor (*Tumor Suppressor Gene*), penurunan ekspresi gen *APAF-1* dapat menjadi salah satu faktor proliferasi sel yang terjadi pada sel tumor (Shakeri et al., 2021). Hal ini terjadi karena saat regulasi protein *APAF-1* mengalami penurunan dan terjadi overekspresi dari anti-apoptosis Bcl-2, kelangsungan hidup sel akan meningkat dan mengganggu jalannya apoptosis (Christoph et al., 2006). Ekspresi protein *APAF-1* yang diatur dalam tingkat transkripsional dapat meningkatkan regulasi ekspresi dari gen

penginduksi apoptosis seperti E2F1 sebagai respon perkembangan siklus sel abnormal (Kurayoshi et al., 2021).



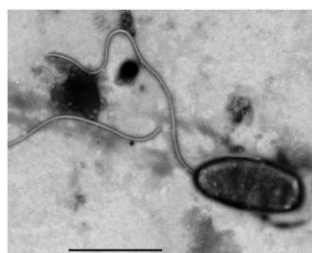
Gambar 2.10 Struktur Kompleks *APAF-1* Apoptosom (Pettersen et al., 2004)

Struktur *APAF-1* tersusun atas beberapa domain yang berperan spesifik dalam proses apoptosis seperti CARD (*Caspase Recruit Domain*) yang memungkinkan pengikatan antara *APAF-1* dan caspase-9 untuk proses aktivasi caspase (Noori et al., 2021; Shakeri et al., 2021), Domain WD40 Repeats yang berada di ujung C-terminal dan berfungsi dalam mengikat sitokrom C yang dilepas mitokondria saat terjadi sinyal apoptosis, Domain NOD (*Nucleotide Oligomerization Domain*) yang penting untuk oligomerisasi *APAF-1* serta mengandung ATP/dATP yang terlibat pada pengikatan nukleotida, serta Domain HEAT repeats yang dapat membantu struktur stabilisasi protein serta fasilitas interaksi antar domain (Noori et al., 2021). Saat terjadi stress oksidatif atau kerusakan DNA, mitokondria akan melepaskan sitokrom C ke sitoplasma. Sitokrom pun berikatan dengan domain WD40 pada *APAF-1* sehingga terjadi pengikatan ATP atau dATP. Pengikatan nukleotida tersebut menyebabkan oligomerisasi *APAF-1* menjadi bentuk heptamer yang membentuk apoptosom (Mountain, 2023).

2.6 Senyawa Trisindolina-5

2.6.1 Isolasi Trisindolina

Trisindolina merupakan metabolit sekunder dari beberapa sumber isolate alami seperti bakteri, spons, dan tanaman (Wati et al., 2021). Senyawa alami ini pertama kali diisolasi dari kultur bakteri *Vibrio* sp. yang mengalami simbiosis mutualisme dengan spons laut *Hyrtios altus* di perairan Okinawa, Jepang (Kobayashi et al., 1994) dan masih berkembang penelitian yang berbasis turunan dari senyawa Trisindolina karena potensinya sebagai agen antikanker (Salsabila et al., 2022).



Gambar 2.11 *Vibrio* sp. (Zhou et al., 2012)

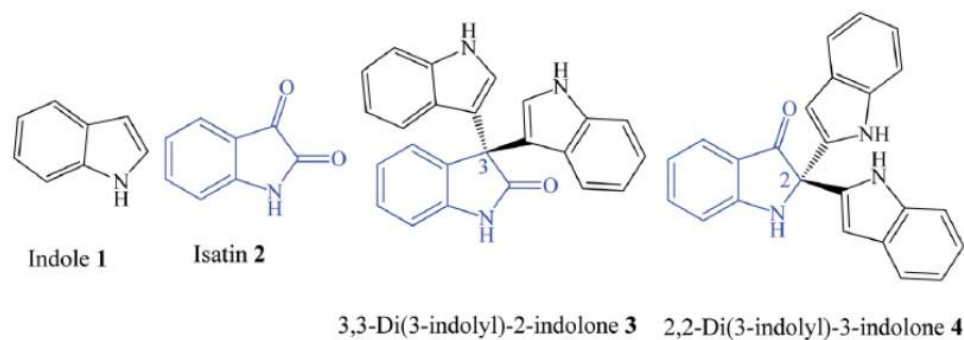


Gambar 2.12 *Hyrtios* sp.
(Elhady et al., 2016)

Kingdom	: Bacteria	Kingdon	: Animalia
Phylum	: Proteobacteria	Phylum	: Porifera
Classis	: Gammproteobacteria	Classis	: Demospongiae
Ordo	: Vibrionales	Ordo	: Dictyoceratida
Familia	: Vibrionaceae	Familia	: Thorectidae
Genus	: <i>Vibrio</i>	Genus	: <i>Hyrtios</i>
(Zhou et al., 2012)		(Elhady et al., 2016)	

Trisindolina memiliki atom nitrogen dalam cincin senyawanya sehingga dikenal sebagai senyawa heterosiklik nitrogen (Vitaku et al., 2014). Senyawa yang tergolong dalam senyawa tersebut ialah indol (C_8H_7N) dengan struktur bisiklik berupa cincin benzena yang menyatu dengan cincin pirol (Wati et al., 2021). Indol banyak ditemukan pada tanaman dan memiliki beragam aktivitas biologis, termasuk sebagai antimalaria, antifungi, antikanker, antibakteri, antihelmintik, dan antidiabetik. Selain itu, indol sering menjadi kerangka dasar dalam sintesis molekul obat seperti indometasin, indoxol, trisindolina, pindolol, sunitinib, indolidan, delavirdin, dan vinblastin (Santoso et al., 2021).

Struktur trisindolina terdiri atas dua molekul indol yang terhubung dengan satu molekul isatin (1H-indol-2,3-dione). Struktur ini membentuk dua jenis regioisomer, yakni 3,3-di(3-indolyl)-2-indolone dan 2,2-di(3-indolyl)-3-indolone. Dari kedua isomer tersebut, trisindolina 3,3-di(3-indolyl)-2-indolone menunjukkan potensi yang lebih besar untuk pengembangan obat dibandingkan isomer lainnya (Kobayashi et al., 1994; Wati et al., 2021). Isatin ($C_8H_5NO_2$), sebagai komponen utama trisindolina, juga berfungsi sebagai kerangka molekul dalam berbagai obat bioaktif seperti sunitinib, nintedanib, dan semaxanib (Nath et al., 2020; Chahal et al., 2019). Bentuk dari senyawa trisindolina diketahui ada 2 jenis, yaitu bentuk simetris serta bentuk asimetris. Bentuk simetris terjadi ketika satu molekul isatin terhubung dengan dua molekul indol yang identik, sementara bentuk asimetris terjadi jika satu molekul isatin terhubung dengan dua molekul indol yang berbeda (Wati et al., 2021). Struktur kimia indol, isatin, serta kedua regioisomer trisindolina dapat dilihat pada **Gambar 2.12**.



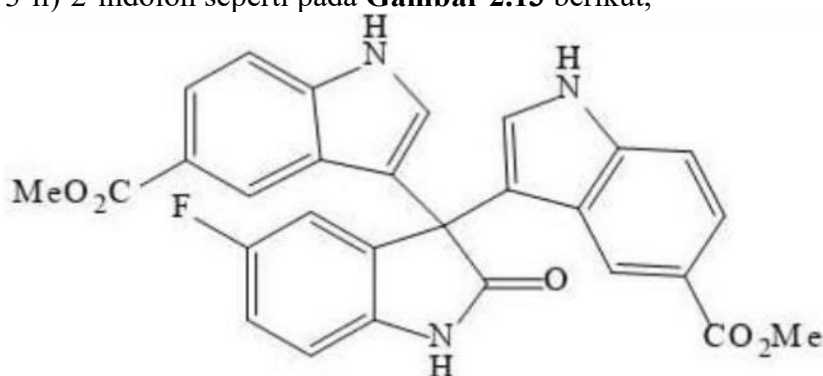
Gambar 2.13 Struktur kimia indol, isatin dan dua bentuk regioisomer dari Trisindolina

(Wati et al., 2021).

Trisindolina berbentuk bubuk amorf tidak berwarna dengan berat molekul 363,4 g/mol (Kobayashi, 1994). Senyawa Trisindolina memiliki aktivitas lain selain sebagai antikanker yaitu sebagai antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Bacillus Subtilis* dengan diberikan sebanyak 10 µg pada masing-masing disk dan zona bening yang terbentuk masing-masing yaitu 16, 17 dan 10 mm (Kobayashi et al., 1994; Praveen et al., 2015).

2.6.2 Sintesis Trisindolina-5

Trisindolina-5 merupakan senyawa sintetis turunan dari senyawa trisindolina dari kelompok senyawa indole dengan struktur kimia yang terdiri dari tiga unit indole. *Indoles* merupakan senyawa metabolit alami yang ditemukan pada tumbuhan serta dikenal karena aktivitasnya sebagai agen biologis dan bersifat *anticancer* (Wati et al., 2021). Struktur dari senyawa Trisindolina-5 memungkinkan terjadinya banyak interaksi dengan target seluler sehingga studi terkait senyawa Trisindolina-5 dalam fungsinya sebagai senyawa terapeutik pada bidang onkologi menarik untuk dikembangkan. Pengembangan senyawa Trisindolina-5 berfokus terhadap aktivitas sitotoksitasnya terhadap sel kanker (Wati et al., 2021; Salispriaji et al., 2024). Struktur kimia Trisindolina-5 yaitu Trisindolina-5-floro-3,3-di((metilindol-5-karboksilat)-3-il)-2-indolon seperti pada **Gambar 2.13** berikut,



Gambar 2.14 Struktur kimia Trisindolina-5

Trisindolina-5-floro-3,3-di((metilindol-5-karboksilat)-3-il)-2-indolon (Wati, 2021)

Dalam studi tersebut, Trisindolina-5 menunjukkan hasil positif terhadap induksi apoptosis (*programmed cell death*) dan interaksi dengan jalur utama yang terlibat dalam proliferasi sel. Potensi disruptif senyawa Trisindolina-5 terhadap siklus sel dinilai dapat berkontribusi terhadap efek antikanker. Penelitian tersebut berfokus pada pemahaman interaksi senyawa Trisindolina-5 dengan sel target seperti DNA dan protein yang terlibat dalam regulasi siklus sel

serta proses apoptosis menggunakan metode *Docking molecular* dan pengujian *in vitro* yang digunakan untuk mengidentifikasi interaksi ini (Nurhayati et al., 2020). Hasil tersebut juga menunjukkan bahwa Trisindolina-5 tidak hanya efektif untuk mengurangi pertumbuhan tumor, tetapi juga aman bagi sel-sel lain selain sel kanker (Wati et al., 2021).

2.6.3 Mekanisme Antikanker dari Trisindolina

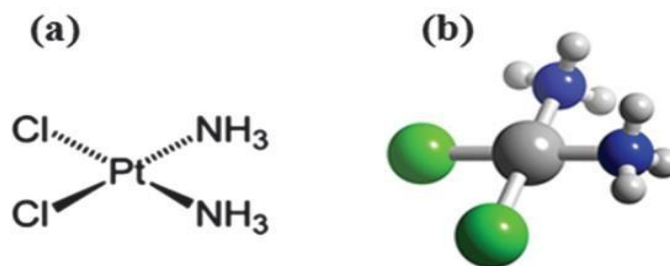
Senyawa alami Trisindolina berperan sebagai antikanker dengan efek sitotoksitasnya yang telah banyak diuji (Wati et al., 2021; Salsabila et al., 2022). Bergantung pada jenis sel kanker yang diserangnya, mekanisme antikanker trisindolina dapat menggunakan berbagai jalur molekuler (Wati et al., 2021). Trisindolina memiliki kemampuan untuk memicu apoptosis, atau kematian sel terprogram, dengan mengaktifkan baik jalur intrinsik maupun ekstrinsik. Pada jalur intrinsik, trisindolina dapat menyebabkan depolarisasi membran mitokondria, yang melepaskan faktor pro-apoptotik seperti sitokrom c, yang kemudian mengaktifkan kaskade kaspase, yang menyebabkan kematian. Di jalur ekstrinsik, Trisindolina-5 memicu aktivasi reseptor kematian di permukaan sel, yang juga memicu aktivasi *caspase*. Pada fase tertentu dari siklus sel, trisindolina memiliki kemampuan untuk menghambat atau menghentikan pertumbuhan dan pembelahan sel kanker. Senyawa ini sering berinteraksi dengan jalur yang mengatur ekspresi protein siklus sel, seperti *Cyclin D* dan CDK, yang penting untuk pertumbuhan sel dalam siklus sel (Nurhayati et al., 2022). Trisindolina dapat menghambat angiogenesis, proses pembentukan pembuluh darah baru, dengan mengurangi ekspresi faktor pertumbuhan yang terlibat dalam angiogenesis, seperti VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Sehingga senyawa ini dinilai dapat mencegah suplai darah ke tumor dan membatasi pertumbuhannya (de Sousa et al., 2021). Selain itu, trisindolina dapat berfungsi melalui jalur sinyal sel yang sangat penting, seperti jalur PI3K/AKT, MAPK, dan NF-B. Jalur-jalur ini memiliki mekanisme pertumbuhan sel, resistensi apoptosis, dan respons inflamasi. Sel kanker dapat menjadi lebih rentan terhadap kematian jika jalur sinyal sel dihambat (Abid et al., 2022).

2.7 Senyawa Antikanker

2.7.1 Cisplatin

Cisplatin (cis-diammine-dichloro-platinum II) pertama kali disintesis oleh seorang ahli kimia asal Italia, Michele Peyrone, pada tahun 1845 (Kauffman et al., 2010). Agen kemoterapi

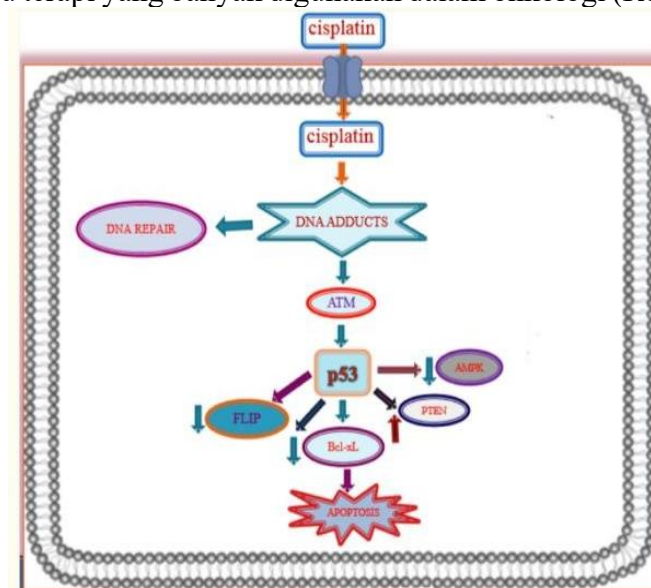
ini merupakan obat kemoterapi jenis logam golongan platinum II yang dapat menyebabkan kerusakan DNA melalui jalur apoptosis atau jalur ROS *reactive oxygen species* (Saputra et al., 2023). Jalur apoptosis tersebut dapat menyebabkan hambatan terhadap sintesis DNA maupun repair DNA (Shoffi & Romdhoni, 2013). Cisplatin menjadi agen kemoterapi platinum pertama yang diperkenalkan oleh Rosenberg dan Cavalieri di tahun 1964 untuk pengobatan kanker dan hingga saat ini telah digunakan secara luas sebagai agen kemoterapi berbagai jenis kanker seperti kanker paru, kanker neuroblastoma, kanker melanoma, serta kanker prostat (Saputra et al., 2023; Hassan et al., 2013).



Gambar 2.15 (a) Struktur Kimiawi dari Cisplatin (b) Struktur 3D dari Cisplatin
(Hassan et al., 2013)

Struktur cisplatin terdiri dari satu atom platinum yang terkoordinasi dengan dua molekul amina (biasanya amina seperti amonium) dan dua ion klorida (Obreshkova et al., 2022). Mekanisme kerja cisplatin melibatkan pembentukan ikatan silang dengan DNA sel kanker dan menempel pada basa guanin, yang menghambat replikasi dan transkripsi DNA, sehingga mencegah pertumbuhan sel kanker (Liazarti, 2022). Cisplatin melekat dengan basa guanin karena guanin merupakan basa nukleotida dengan atom nitrogen (N7) yang letaknya di cincin imidazol, nitrogen bersifat nukleofilik dan cenderung menyumbangkan pasangan elektron bebas sehingga keduanya berikatan secara kovalen. Ketika cisplatin masuk ke dalam sel, ion klorida yang terikat pada platinum II akan disubstitusi oleh molekul air, sehingga sifat elektrofiliknya meningkat (Obreshkova et al., 2022).

Dua ion klorida serta dua ligan amina dalam bentuk cis sehingga saat cisplatin masuk dalam sel unsur Platinum di tengah bersifat elektrofilik dan menarik elektron dan reaksi antara cisplatin dengan molekul dengan gugus nukleofilik (elektron) (Geohagen et al., 2020). Bentuk aktif ini kemudian berikatan dengan DNA, membentuk *adduct* yang menyebabkan pembentukan ikatan silang antara dua helai DNA (Behmand et al., 2020). Proses ini mengganggu replikasi dan transkripsi DNA, yang pada akhirnya mengarah pada kematian sel tumor. Lewat mekanisme ini, cisplatin menghambat pertumbuhan sel kanker dan menjadi salah satu terapi yang banyak digunakan dalam onkologi (Romani et al., 2022).

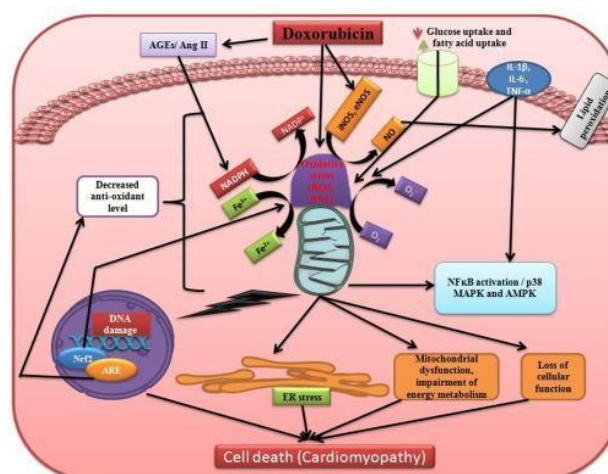


Gambar 2.16 Mekanisme Molekular Sitotoksitas Cisplatin
(Brown et al., 2019)

Penelitian yang menggunakan Cisplatin sebagai senyawa uji bagi sel kanker HeLa dilakukan oleh Artanti et al (2020), menggunakan perbandingan dengan model sel normal Vero yang diisolasi dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dari cisplatin terhadap sel kanker dan sel normal. Melalui penelitian tersebut didapatkan bahwa *half inhibitory concentration* atau IC_{50} dari Cisplatin pada sel HeLa sebesar $12.08 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ dengan tingkat toksik yang tinggi serta sebesar $21.06 \mu\text{g/mL}$ dengan toksisitas yang cukup aktif pada sel Vero. Hal ini menunjukkan bahwa Cisplatin dapat bersifat toksik baik kepada sel kanker maupun sel normal, walaupun cenderung lebih toksik terhadap sel kanker seperti HeLa (Artanti et al., 2020). Sehingga senyawa alami yang dapat bersifat toksik terhadap sel HeLa serta memiliki selektivitas yang tinggi yaitu tidak bersifat toksik terhadap sel normal sangat dibutuhkan untuk menghindari terjadinya kerusakan sel normal sebagai pengobatan kanker yang lebih efektif (Nurdiani et al., 2024).

2.7.2 Doxorubicin

Doxorubicin merupakan antikanker atau obat kemoterapi yang tergolong pada kelas antibiotik antrasiklin (Basuki et al., 2020) serta umum digunakan untuk mengobati berbagai jenis kanker. Doxorubicin berfungsi sebagai antikanker melalui berbagai jalur, seperti interkalasi ke dalam DNA, menghentikan replikasi dan transkripsi sel kanker. Selain itu, Doxorubicin dapat menghambat enzim topoisomerase II, yang menyebabkan pemutusan untai DNA yang tidak dapat diperbaiki, sehingga menyebabkan kematian sel atau *Programmed Cell Death* (Nicoletto & Ofner, 2022). Doxorubicin tidak hanya memiliki kemampuan untuk menghentikan siklus sel pada fase G2/M, tetapi juga memiliki kemampuan untuk memicu reaksi kekebalan terhadap kanker dengan melepaskan antigen dari sel yang telah rusak (Kciuk et al., 2023). Doxorubicin memiliki gugus kuinon dan hidrokuinon pada cincin aromatikannya, yang memungkinkan terjadinya reaksi redoks. Reaksi ini menghasilkan radikal bebas yang merusak DNA, protein, dan membran sel dengan cara mempercepat kematian sel kanker. Akan tetapi, hal ini juga yang membuat Doxorubicin memiliki efek sitotoksik pada sel sehat sebagai efek sampingnya (Dunsmore et al., 2022). Meskipun sangat efektif, mengingat sifat toksik dari Doxorubicin serta efek sampingnya, seperti kardiotoxikitas dan mielosupresi, membuat penggunaan obat ini dalam terapi memerlukan pengawasan yang ketat.

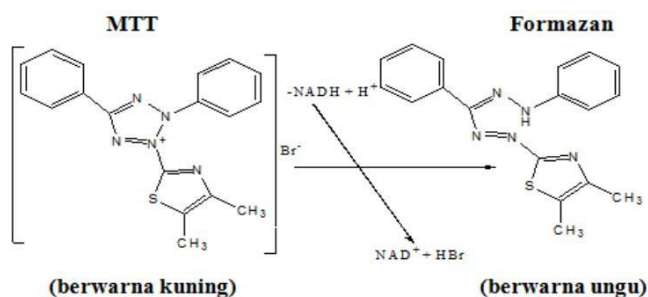


Gambar 2.17 Mekanisme Molekuler Doxorubicin
(Renu et al., 2017)

2.8 Uji Sitotoksitas

Kemampuan suatu senyawa dalam menyebabkan kematian sel hingga menghambat pertumbuhan sel dapat dievaluasi menggunakan prosedur laboratorium yang biasa dikenal sebagai uji sitotoksitas atau *cytotoxicity test*. Tes sitotoksitas ini banyak diterapkan ke berbagai bidang penelitian biomedis, seperti penelitian terkait kanker, pengembangan obat, hingga studi toksikologi (Makvandi et al., 2020). Uji Sitotoksitas ini dapat membantu menentukan potensi efek terapeutik (toksisitas) suatu jenis senyawa pada jenis sel yang berbeda. Metode yang paling umum digunakan untuk menilai tingkat sitotoksitas yaitu dengan menggunakan *MTT assay* (Mazlumoglu, 2023). *MTT assay* dapat mengukur aktivitas metabolisme sel sebagai indikator viabilitas, proliferasi, dan sitotoksitas sel (de Almeida & da Silva, 2021).

MTT assay merupakan uji kolorimetri yang biasa digunakan untuk menentukan sitotoksitas sel dengan prinsip pengamatan terhadap proliferasi sel, viabilitas, dan toksisitas (de Almeida & da Silva, 2021). Uji enzimatis *MTT assay* yang dilakukan akan melibatkan perlakuan sel dengan konsentrasi tertentu dari senyawa uji untuk kemudian ditambahkan dengan reagen *MTT assay*, yaitu [3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolium bromide. Sel yang masih bertahan setelah pengujian secara metabolik akan mereduksi oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium yang terdapat dalam rantai respirasi mitokondria menjadi formazan berupa zat warna ungu (Nurdiani et al., 2024; Doyle & Griffiths, 2000). Jumlah formazan yang dihasilkan akan berbanding lurus dengan jumlah sel yang hidup. Setelah masa inkubasi sesuai, maka kristal formazan pada sel yang terbentuk diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer. Nilai serapan kristal formazan digunakan untuk menghitung persentase viabilitas sel (Ghasemi et al., 2021; Shafiee et al., 2021). Untuk menentukan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi senyawa yang dapat menghambat keberlangsungan hidup sel sebesar 50%, digunakan serangkaian konsentrasi senyawa uji yang berbeda. Data yang dihasilkan dari uji ini kemudian di plot pada kurva *dose-response*, dan nilai IC_{50} yang sesuai akan diperoleh dari kurva (Nga et al., 2020).



Gambar 2.18 Reaksi reduksi garam kuning tetrazolium menjadi formazan menjadi berwarna ungu (Doyle & Griffiths, 2000)

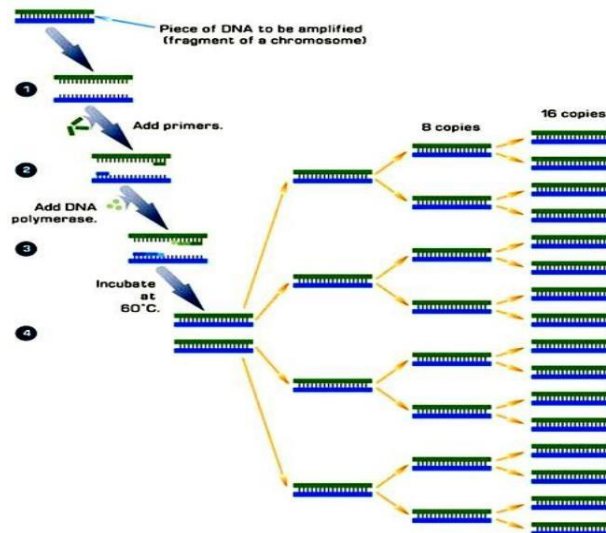
2.9 Uji Ekspresi Gen

2.9.1 Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Metode yang paling umum digunakan untuk mengukur asam nukleat pada RNA dalam biologi molekuler salah satunya adalah *Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) (Adams, 2020). Teknik qPCR yaitu dengan menentukan konsentrasi DNA target dengan menggunakan primer yang dapat mencapai >300 pasang basa (Putra et

al., 2020). Aspek Kuantitatif dari qPCR berasal dari kemampuan pengukuran jumlah asam nukleat target secara *real time*, menggunakan pewarna *fluorescent* atau *probe* yang dapat memancarkan sinyal sebanding dengan jumlah DNA yang dihasilkan dari setiap pengulangan siklus PCR (Harshitha and Arunraj, 2021). qPCR bersifat spesifik dan sensitif, sehingga banyak digunakan untuk meneliti ekspresi gen, mendeteksi patogen, serta validasi terkait hasil studi genom (Adams, 2020).

Prinsip dari PCR berdasarkan oleh siklus *thermal* yang memanfaatkan termodinamika dari interaksi asam nukleat (Putra et al., 2020). Siklus PCR terbagi menjadi 3 langkah berdasarkan temperaturnya (Yusuf, 2010), dimana yang pertama merupakan tahap denaturasi, yaitu proses perubahan dari *double strand* DNA (dsDNA) ke dua *single strand* DNA (ssDNA) dalam temperature 95°C. Kemudian di tahap kedua, yaitu *annealing*, dimana primer menempel pada untai tunggal DNA dari proses sebelumnya (*single-strand* DNA) untuk mempersiapkan penggabungan pasangan basa nitrogen dengan proses pada suhu 55-60°C. Lalu, di tahap terakhir yaitu proses elongasi atau *extension*, basa nitrogen akan memanjang dan dibentuk oleh enzim polimerase dari template DNA pada suhu 72°C (Putra et al., 2020; Yusuf, 2010).



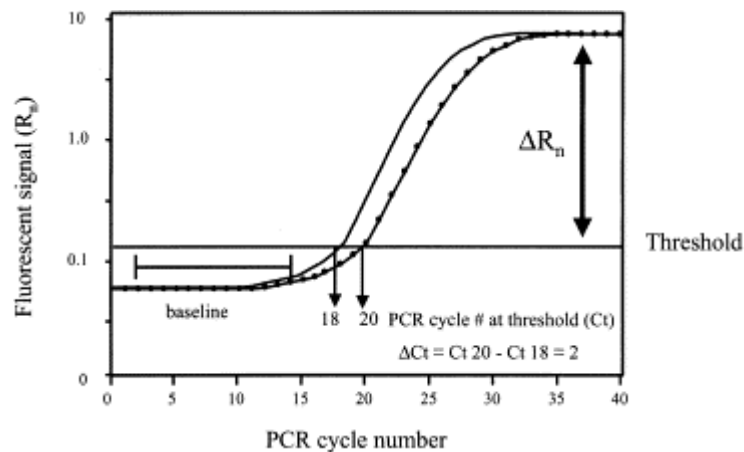
Gambar 2.19 Siklus *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR) (Yusuf, 2010)

Secara signifikan, langkah qPCR dimulai dengan Ekstraksi RNA dengan mengisolasi RNA dari sel atau jaringan target yang diinginkan total dari sampel menggunakan metode ekstraksi yang sesuai. Metode ekstraksi yang dapat digunakan yaitu metode ekstraksi secara manual dan metode ekstraksi secara otomatis (Murwani dan Qurrohman, 2023). Kemudian *Reverse transcription* dilakukan dengan mengubah *Ribonucleic acid* (RNA) yang telah diisolasi kemudian ditranskripsikan secara terbalik menjadi *Complementary DNA* menggunakan enzim *reverse transcriptase* dan primer yang spesifik (Adams, 2020). cDNA akan berfungsi sebagai template amplifikasi PCR selama proses PCR berlangsung. Lalu dilakukan Amplifikasi PCR dimana suatu primer yang spesifik akan menyatu dengan sekuens target pada cDNA, dan DNA polimerase akan memperluas primer untuk mensintesis untai DNA yang baru. Proses ini berlangsung bersamaan dengan penambahan pewarna fluoresens atau probe dengan urutan spesifik untuk mengukur akumulasi produk yang dihasilkan secara *real time*. Langkah terakhir ialah dilakukannya Analisis Data fluorosens untuk menentukan jumlah awal RNA, menggunakan metode kurva standar atau Ct komparatif (*Threshold cycle*) (Al Bayat et al., 2021). Intensitas

fluoresens yang meningkat secara proporsional dengan jumlah DNA yang dihasilkan dapat memungkinkan penghitungan jumlah awal RNA dalam sampel (Adams, 2020; Giadone et al., 2020).

2.9.2 Analisis Ekspresi Gen

Penelitian dengan metode *real time* PCR pada bidang onkologi terus menerus berkembang dalam penelitian profil ekspresi gen, pengidentifikasian biomarker, dan pemahaman mekanisme molekuler yang mendasari perkembangan sel kanker serta respons gen target terhadap terapi (Adams, 2020). Pengukuran ekspresi gen dapat dilakukan dengan mengukur nilai Ct atau *Cycle threshold* yang merupakan jumlah siklus amplifikasi yang dibutuhkan untuk mencapai *threshold* atau batas dimana asam nukleat terdeteksi (Fernanda dan Yuniarti, 2022). CT *value* yang dihasilkan akan berbanding terbalik dengan jumlah asam nukleat dari suatu sample. Nilai CT yang rendah dapat menunjukkan siklus amplifikasi yang dibutuhkan untuk mencapai *threshold* lebih sedikit karena asam nukleat yang terkandung tinggi dalam sample (Fernanda dan Yuniarti, 2022).



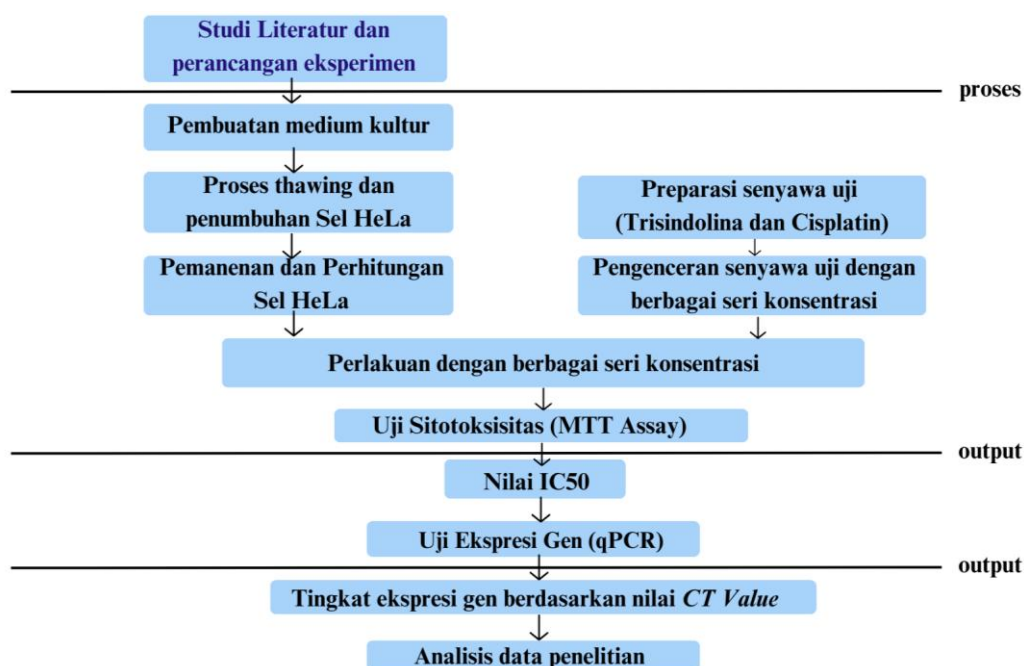
Gambar 2.20 Nilai CT (*Cycle Value*) pada qPCR (Ginzinger, 2002)

Menurut Humaryanto et al (2017), secara kualitatif ekspresi gen dinilai berdasar atas nilai Ct, yaitu nilai kuantifikasi jumlah Salinan ekspresi gen yang melewati garis *threshold* yang telah ditetapkan, digradasikan menjadi overekspresi (<15), terekspresi sangat tinggi (15-20), tinggi (20-25), sedang (25-30), lemah (30-35), dan terekspresi sangat lemah (35-40). Nilai ekspresi ditentukan mulai dari 1 sampai dengan 5, yaitu ekspresi ringan sampai dengan terekspresi tinggi (Humaryanto et al., 2017). Kurva disosiasi seperti pada Gambar 2.19 didapatkan setelah proses amplifikasi yang kemudian dianalisis ekspresi relatifnya dengan menggunakan metode perbandingan atau rasio target Ct dengan nilai referensi yang dipilih, umumnya nilai ekspresi *housekeeping gene*. dengan perhitungan $\Delta Ct = Ct^{\text{target gene}} - Ct^{\text{housekeeping gene}}$. Bila nilai ΔCt memiliki nilai positif maka nilai Ct gen target lebih besar daripada nilai GAPDH (+ ΔCt) dan sebaliknya nilai negatif bila Ct gen target lebih rendah daripada GAPDH (- ΔCt). Kemudian perbandingan level ekspresi didapat dengan menggunakan rumus metode $2^{-\Delta Ct}$.

BAB 3 METODOLOGI

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimental laboratorium yang menggunakan *randomized post test only control group design* sebagai desain penelitian. Kultur sel kanker digunakan sebagai objek penelitian. Kultur sel kanker yang digunakan adalah sel HeLa. Penelitian dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar air flow* dengan kultur sel HeLa yang ditumbuhkan di dalam *96-well plate* dan *6-well plate*. Kultur sel HeLa berada dalam kondisi konfluen dan tidak terkontaminasi agar dapat digunakan dalam penelitian.



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.2 Waktu dan tempat

Penelitian akan dilaksanakan mulai dari 3-21 Februari 2025 di Laboratorium Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada, Gedung Radiopoetro Lt. 4, Yogyakarta, Jawa Tengah, 55284, Indonesia.

3.3 Alat dan Bahan

Pada penelitian ini alat yang akan digunakan yaitu tabung konikel, *culture dish*, *mikropipet*, *white tip*, *blue tip*, *yellow tip*, *96-well plate*, *6-well plate*, *microtube*, *flask*, *haemocytometer*, *centrifuge*, inkubator CO_2 , BSC (*Biological Safety Cabinet*), ELISAReader, *Mikroskop inverted*, *object glass*, LAF *laminar air flow*, *tally counter*, *magnetic stirrer*, filter 0,2 mikron, *rotary evaporator*, mikropipet ukuran 20, 200, dan 1000 μL .

Adapun untuk bahan yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu Trisindolina-5, Cisplatin, metanol, kultur sel HeLa, medium Mammocult, *fetal bovine serum* (FBS), Penicillin-Streptomycin (penstrep), fungizone, PBS 1X, tripsin-EDTA 0,25%, pelarut DMSO, clorafabine, MTT 5 mg/mL (terdiri atas 5 mg MTT dan 1 mL PBS), larutan *stopper* SDS 10% (terdiri atas serbuk SDS, aquabidest, dan 0,1 N HCl), alumunium foil, propidium iodida (PI), *reagen ethidium bromide-acridine orange*, cover slip polystyrene 13 mm steril (melalui radiasi), alkohol 70%, dan spiritus.

3.4 Metode yang Dilakukan

3.4.1 Persiapan Kultur Sel HeLa

Dalam Persiapan kultur sel, sel HeLa (sel kanker leher rahim pada manusia) diperoleh dari ATCC (*American Type Cell Cancer*), merupakan koleksi dari Laboratorium Parasitologi, Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran dan Kesehatan Masyarakat, Yogyakarta, Jawa Tengah.

3.4.2 Pembuatan Medium Kultur HeLa

Medium RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) yang memiliki komposisi (FBS) 10% (Sigma), 100 µg/mL penicillin- streptomisin (Gibco), dan diinkubasi dalam inkubator 5% CO₂ suhu 37°C selama 24 jam.

3.4.3 Thawing dan Penumbuhan HeLa

Kultur HeLa beku diambil dari *cryotube*. Kultur dicairkan pada suhu kamar dan dipindahkan pada tabung konikal berisi medium 10 ml. Suspensi sel disentrifugasi 800 rpm selama 5 menit serta supernatan dibuang. Medium 10 ml ditambahkan. Kultur dipindahkan pada *flask* dan ditumbuhkan hingga 80% konfluen dalam inkubator 37°C kadar CO₂ 5%. Penggantian medium dilakukan setiap 2-3 hari sekali.

3.4.4 Pemanenan dan Perhitungan HeLa

Pemanenan HeLa dilakukan ketika kultur mencapai kondisi 80% konfluen. Sel dicuci dengan membuang medium perlahan dan dibilas 5 ml *phosphate buffer saline* (PBS) (Gibco, Grand Island, NY) 2-3 kali. Selanjutnya, kultur sel ditambahkan tripsin-EDTA (Gibco) 0,25% 2-5 ml dan diinkubasi 5-10 menit hingga sel terlepas dari dinding *flask*. Tripsin-EDTA 0,25% dibuang dan diinkubasi 1 menit. Kemudian, sel diamati di bawah mikroskop *inverted* untuk memastikan sel telah terlepas dari *flask*.

Selanjutnya, 5-7 ml medium ditambahkan untuk menonaktifkan tripsin. Sel diresuspensi hingga sel terlepas dari dinding *flask*. Pengamatan dilakukan kembali di bawah mikroskop *inverted* untuk mengetahui apakah masih terdapat sel yang saling bertumpukan dan belum terlepas dari dinding *flask*. Apabila masih ditemukan kondisi sel yang demikian, maka dilakukan resuspensi kembali hingga dipastikan semua sel telah terlepas. Sel kemudian dipindahkan ke dalam tabung konikal baru yang steril.

Perhitungan sel dilakukan dengan cara 10 µl suspensi sel diletakkan pada kertas parafilm dan ditambahkan 90 µl *trypan blue* (Gibco, USA). Suspensi 10

μl dimasukkan *haemocytometer* dan dihitung dibawah mikroskop inverted dengan bantuan *counter* dengan rumus berikut

$$\text{Jumlah sel terhitung/ ml} = \frac{\text{Jumlah sel dalam 4 bilik} \times 10^4 \text{ sel}}{4}$$

Jumlah sel yang diperlukan yaitu 5×10^5 sel/sumuran dalam volume 100 μl, dimana jumlah sumuran (*96-well plate*) dilebihi menjadi 100. Volume pemanenan yang dibutuhkan dihitung dengan rumus berikut,

$$\text{Volume panen sel yang ditransfer/ml} = \frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel terhitung/ml}}$$

Selanjutnya, diambil panen sel tersebut dan dipindahkan ke tabung konikal baru dan ditambahkan medium komplit sampai total volume yang diperlukan. Perhitungan volume yang diperlukan adalah setiap sumuran akan diisi oleh 100 μl medium komplit berisi sel, maka total volume yang diperlukan untuk menanam sel adalah $100 \mu\text{l} \times 100 \text{ sumuran} = 10 \text{ ml}$ atau 10.000 μl.

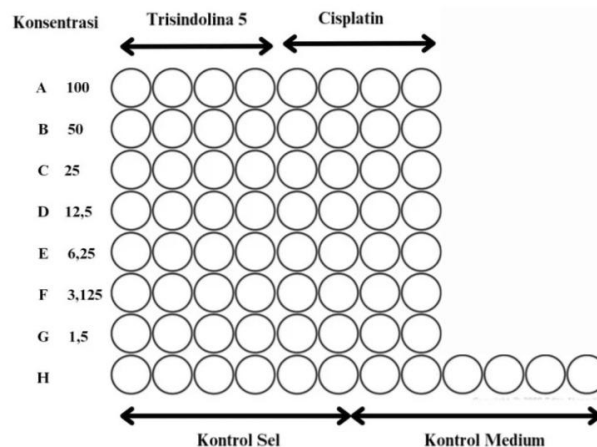
3.4.5 Preparasi dan Pengenceran Senyawa Uji

Pengenceran Trisindolina-5 dan Cisplatin yang akan digunakan yaitu dengan seri konsentrasi 100 μg/ml, 50 μg/ml, 25 μg/ml, 12.5 μg/ml, 6.25 μg/ml, 3.125 μg/ml, dan 1.5 μg/ml. Setiap konsentrasi yang dibuat diletakkan di dalam *microtube* terpisah. Tiap konsentrasi memiliki volume 500 μl dalam masing-masing *microtube*.

3.4.6 Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas dilakukan dengan metode *MTT assay*. Sel HeLa dikultur di dalam flask terpisah. Apabila kultur sel telah berada pada kondisi konfluen, kedua jenis sel masing-masing dipanen menggunakan 500 μL tripsin-EDTA 0,25%. Lalu, suspensi masing-masing sel dilarutkan dengan medium komplet (MK) hingga membentuk suspensi sel. Selanjutnya, jumlah sel dalam suspensi dihitung menggunakan hemositometer. Suspensi sel HeLa yang telah dihitung jumlahnya dikultur di dalam *96 well-plate* dengan kepadatan 1×10^4 sel/100 μL. Tiap perlakuan akan diulang sebanyak 3 kali pada sumuran yang berbeda, berdasarkan desain berikut:

- Kontrol sel: suspensi sel HeLa tidak diberi perlakuan zat uji dan ditumbuhkan dalam medium komplit RPMI
- Kontrol medium: medium komplit RPMI
- Perlakuan Trisindolina-5: suspensi sel HeLa dengan medium komplet RPMI diberi perlakuan zat uji dengan konsentrasi yang tertera pada tabel 3.2 pada waktu 24 jam
- Perlakuan kontrol positif Cisplatin: suspensi sel HeLa dengan RPMI diberi perlakuan zat uji dengan konsentrasi berbeda pada waktu 24 jam



Gambar 3.2 Desain 96 well-plate uji Sitotoksitas

Suspensi sel 100 µl didistribusikan ke dalam sumuran 96-*well-plate* dan diinkubasi selama 24 jam. Apabila suspensi sel telah konfluen dan menempel pada *well-plate*, media yang terdapat pada tiap sumuran dibuang. Kemudian, masing- masing sumuran diberi perlakuan sesuai dengan desain penelitian. Sumuran untuk kontrol media larutan MK. Sumuran untuk perlakuan zat control uji diisi dengan larutan cisplatin dalam MK pada konsentrasi bertingkat sesuai desain penelitian, sedangkan sumuran untuk zat uji diisi dengan larutan zat uji dalam MK pada berbagai konsentrasi sesuai desain penelitian. Suspensi sel yang telah diberi perlakuan kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam.

Pada akhir inkubasi, 96-*well-plate* diamati di bawah mikroskop inverted untuk diamati morfologi selnya dan untuk melihat ada tidaknya kontaminasi. Media kultur yang telah ditambahkan senyawa uji dibuang kemudian ditambahkan 100 µl larutan MTT (Biovision) 0,5 mg/ml. Sel kemudian diinkubasi selama 3-4 jam. Kondisi sel diperiksa dan didokumentasikan terlebih dahulu menggunakan mikroskop *inverted*. Sel yang hidup membentuk warna ungu dan membentuk kristal formazan sebagai hasil reaksi dengan MTT. Apabila terdapat pembentukan kristal formazan, reaksi MTT dihentikan dengan penambahan reagen SDS-*stopper* (Sodium Dodesil Sulfat) sebanyak 100 µl. *Microplate* berisi suspensi sel kemudian dihomogenkan ± 5 menit lalu dibungkus dengan alumunium foil dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Hasil dianalisis dengan ELISA *reader* (Biorad iMarkTM *Microplate Reader*) pada 595 nm. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dikonversi menjadi persen sel hidup menggunakan rumus berikut.

$$Viabilitas\ Sel\ hidup = \frac{(Absorbansi\ rata - rata - Absorbansi\ Kontrol\ Media)}{(Absorbansi\ Kontrol\ Sel - Absorbansi\ Kontrol\ Media)} \times 100\%$$

Setelah diperoleh persentase sel hidup, selanjutnya dihitung persentase hambatan dengan cara mengurangi 100% dengan persentase sel hidup. Kemudian ditentukan nilai IC₅₀ (*inhibitory concentration 50*) yaitu konsentrasi yang dapat menghambat 50% pertumbuhan sel kanker dari populasinya. Nilai IC₅₀ diperoleh menggunakan SPSS dengan metode analisis probit.

3.4.7 Uji Ekspresi Gen

3.4.7.1 Desain Primer

Desain primer akan dilakukan dengan menggunakan *Primer-BLAST* yang dapat diakses secara *online* di *webpage* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Nomor asesi atau sekuens FASTA untuk gen *c-Myc* (NM_002467), dan *APAF-1* (XM_054372583) sebagai gen target diperoleh dari *genebank* di *webpage* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Sementara *housekeeping gene* yang digunakan adalah GAPDH (Ghaffarnia *et al.*, 2021).

Pada menu *database* dalam kolom *primer pair specificity checking parameters*, pilih *refseq representative genomes*. Centang kolom *show results in a new window* dan *use new graphic view*, kemudian pilih menu *get primers*. Di windows baru akan muncul pilihan sekuens genom yang terpilih dari *database*. Centang genom terpilih dan pilih menu *submit*. Setelah beberapa waktu, 10 pasang pilihan primer akan muncul.

3.4.7.2 Persiapan Sampel RNA HeLa

Sel dipanen dari *6-well-plate* dengan konsentrasi $1,2 \times 10^6$ sel tiap sumuran. Sampel yang digunakan terdiri dari 6 variabel yaitu dengan perlakuan Trisindolina-5 1/2IC50, IC50, 2IC50, 4IC50, Cisplatin $4 \mu\text{g/ml}$ dan kontrol sel masing-masing inkubasi 24 jam. Percobaan dilakukan dengan pengulangan minimal 3 kali untuk setiap sampel.

3.4.7.3 Ekstraksi RNA HeLa

Suspensi sel ($5-10 \times 10^6$ sel) dalam tabung konikal disentrifugasi pada 1.900 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang terbentuk dipindahkan ke *microtube*. PBS sebanyak 1 ml ditambahkan dan disentrifugasi pada 300 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet yang tersisa ditambahkan 100 μl reagen *FavorPrepTM Tri-RNA* dan diinkubasi selama 5 menit di suhu ruang. Kloroform sebanyak 50 μl ditambahkan, di *vortex* dan diinkubasi selama 3 menit pada suhu ruang. Kemudian sampel tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C . Sentrifugasi tersebut memisahkan larutan menjadi 3 lapisan, yaitu *lower red organix phase* yang mengandung protein, *interphase* yang mengandung DNA dan *upper aqueous phase* yang mengandung RNA.

Lapisan paling atas/ larutan bening kemudian dipindahkan ke *microtube* baru 1,5 ml dan ditambahkan 50 μl reagen isopropanol, diinkubasi 10 menit pada suhu ruang dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C . Supernatan dibuang, pelet RNA yang diperoleh kemudian ditambahkan dengan 100 μl 70% etanol dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C . Supernatan dibuang dan dikeringkan menggunakan kertas tissue. Kemudian pelet ditambahkan 100 μl *nuclease free water*, diinkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit dan sampel RNA dapat disimpan pada suhu -20°C .

3.4.7.4 Pengukuran Kemurnian dan Konsentrasi RNA

Kemurnian dan konsentrasi RNA diukur secara kuantitatif menggunakan *NanoDropTM 2000 Spectrophotometer* pada panjang gelombang 260, 280 dan 230 nm. Hasil pengukuran *NanoDrop* adalah berupa konsentrasi dan rasio absorbansi A_{260}/A_{280} serta A_{260}/A_{230} . Rasio A_{260}/A_{280} mengindikasikan kontaminasi protein, sedangkan rasio A_{260}/A_{230} mengindikasikan kontaminasi polisakarida atau polifenol (Asif *et al.*, 2000; Manickavelu *et al.*, 2007; Vibhuti *et al.*, 2015). RNA dan DNA yang murni memiliki rasio A_{260}/A_{280} antara 1,8 dan 2,2 dan rasio $A_{260}/A_{230} > 2,0$ (Keer dan Birch, 2008; Bilgin *et al.*, 2009).

Komputer yang terhubung dengan *NanoDrop* dinyalakan dan aplikasi “*NanoDrop 2000*” dibuka. Untuk uji kuantitatif RNA, DNA atau cDNA, dipilih opsi “*Nucleic Acid*”. Kemudian, *routine wavelength verification* akan dilakukan secara otomatis. Setelah itu, tempat sampel *NanoDrop* dibersihkan sebanyak 3 kali dengan meneteskan 3 μ l DEPC.H₂O dan dikeringkan dengan *Kimtech[®] ScienceTM KimwipesTM Delicate Task Wipers*. Selanjutnya, jenis sampel pada aplikasi dipilih berdasarkan jenis sampel yang akan diukur dan satuan konsentrasi yang digunakan berupa ng/ μ l. *Nuclease free water* sebanyak 1 μ l diukur terlebih dahulu sebagai blanko. Kemudian, 1 μ l sampel diteteskan pada tempat sampel *NanoDrop* yang telah terlebih dahulu dibersihkan dengan *Kimtech[®] ScienceTM KimwipesTM Delicate Task Wipers*. Opsi “*Measure*” dipilih pada aplikasi dan *NanoDrop* yang telah terhubung dengan komputer secara otomatis mengukur konsentrasi dan kemurnian sampel. Data hasil pengukuran akan muncul di aplikasi pada layar komputer.

3.4.7.5 Sintesis cDNA

Sintesis cDNA dilakukan menggunakan Kit *TOYOBO ReverTra AceTM qPCR RT Master Mix with gDNA Remover* dengan No. FSQ-301. Langkah pertama dalam tahapan sintesis cDNA yaitu disiapkan campuran 1 pada *microtube* 0,2 ml steril dengan komposisi seperti pada Tabel 3.1,

Tabel 3.1 Komposisi Reagen Sintesis cDNA

Reagen	Volume (μ l)
4X DNA Mastermix (withgDNA remover)	2
RNA Template	2
Nuclease Free Water	Hingga 8
Total	8

Larutan dihomogenkan dengan *spinner*, selanjutnya campuran 1 tersebut diinkubasi pada *thermal cycle* suhu 37°C selama 5 menit. Setelah inkubasi, campuran 2 disiapkan dengan menambahkan 2 μ l *5X RT Mastermix II* pada campuran 1 dan dilanjutkan pada proses inkubasi dengan *thermal cycle* suhu 37°C selama 15 menit, 50°C selama 5 menit dan 98°C selama 5 menit. Setelah inkubasi, sampel cDNA dalam *microtube* siap untuk dianalisis atau disimpan di -20°C untuk analisis selanjutnya.

3.4.7.6 Amplifikasi Gen

Amplifikasi gen *c-Myc*, dan *APAF-1* dilakukan menggunakan *EcoTM Real- Time PCR System*. Mula-mula dilakukan dengan mempersiapkan komponen PCR mix yang terdiri dari *nuclease free water*, *polymerase*, *primer forward*, *primer reverse* dan *cDNA template* seperti pada Tabel 3.2

Tabel 3.2 Komponen PCR mix

Komponen		Volume (μl)
<i>Nuclease free water</i>		7
<i>Polymerase</i>	KAPA SYBR Green 1 FAST <i>qPCR</i> Mastermix (1X)	10
<i>Primer</i>		
<i>Forward c-Myc</i> (5'-3')	TGAGGAGACACCG CCCAC	1
<i>Reverse c-Myc</i> (5'-3')	CAACATCGATTTCTTCCTCATCTTC	1
<i>Forward APAF-1</i> (5'-3')	TTGGGAGAAATCCACACGGG	1
<i>Reverse APAF-1</i> (5'-3')	CTGTTTCCTGATGGCCTCG	1
<i>Forward GAPDH</i> (5'-3')	CTTTGTCAAGCTCATTTCCTGG	1
<i>Reverse GAPDH</i> (5'-3')	TCTTCCTCTTGTGCTCTTGC	1
<i>cDNA template</i>		1
Total per microtube		20

Setelah semua komponen dicampur dalam *microtube* 2 ml maka PCR mix di *subaliquots* ke dalam PCR tube. Pengerjaan dilakukan menggunakan PCR cooler untuk mempertahankan suhu PCR mix agar mencegah *early reaction*. Selanjutnya direaksikan sesuai dengan petunjuk berikut,

Tabel 3.3 Petunjuk Tahapan PCR

Tahapan	Suhu (°C)	Durasi	Siklus
<i>Polymerase activation</i>	95	10 menit	
PCR cycling	95	10 detik	50
	60	30 detik	

Data yang didapatkan berupa nilai *cycle threshold* (C_T) dianalisis menggunakan metode *Livak Schmittgen*. Untuk mendapatkan nilai tingkat ekspresi gen target, langkah penghitungan sebagai berikut:

$$Rasio = 2^{CT \text{ sampel} - CT \text{ Kontrol}}$$

$$Rasio = 2^{\Delta CT}$$

$$Rasio = 2^{-(\Delta CT \text{ sampel} - \Delta CT \text{ Kontrol})}$$

$$Rasio = 2^{-\Delta \Delta CT}$$

Keterangan:

C_T = Siklus dimana sinyal fluoresens pertama kali terdeteksi.

Dalam kuantifikasi gen secara relatif, perubahan tingkat ekspresi relatif (*fold change*) atau kali lipat > 1 menunjukkan adanya peningkatan ekspresi. Sebaliknya jika perubahan tingkat ekspresi < 1 , maka dinilai terjadi penurunan ekspresi. Nilai angka 1 merupakan kuantitas yang disepakati untuk penentuan gen target.

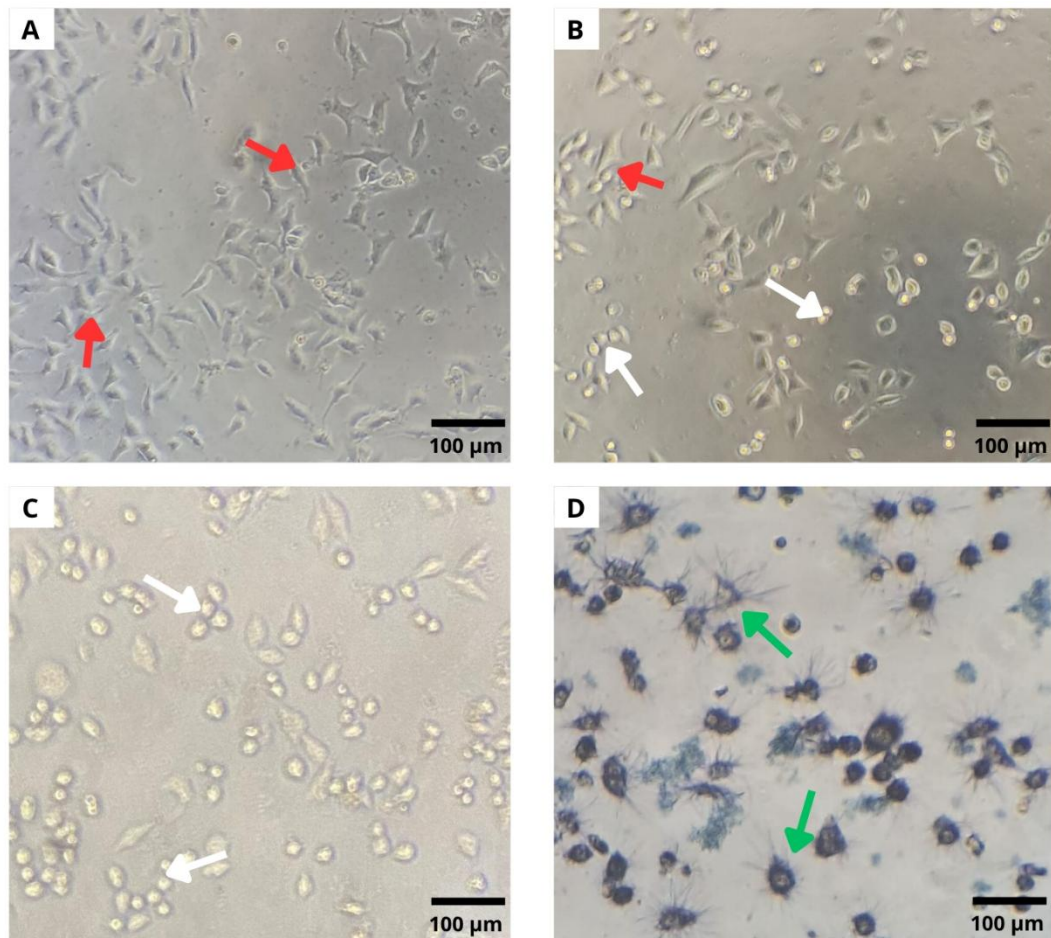
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

Hasil penelitian dari uji MTT, absorbansi sel sebelum dan sesudah perlakuan senyawa Trisindolina-5 serta Cisplatin, nilai IC₅₀ dari uji sitotoksitas, serta ekspresi gen *c-Myc* dan *APAF-1* menggunakan qPCR dapat dijabarkan pada 4.1.1 dan seterusnya.

4.1.1 Viabilitas Sel HeLa Perlakuan Trisindolina-5

Berikut ini merupakan morfologi dari sel HeLa pada serangkaian perlakuan Trisindolina-5 dan Cisplatin yang dilakukan.



Gambar 4.1.1 Morfologi Sel HeLa Perlakuan Trisindolina-5 dan Cisplatin

Keterangan gambar: **A)** Perlakuan Kontrol Sel HeLa; **B)** Perlakuan Sel HeLa dengan paparan senyawa Trisindolina-5; **C)** Perlakuan Sel HeLa dengan paparan Cisplatin; **D)** Kristal Formazan yang terbentuk setelah sel HeLa diberikan MTT assay. Panah berwarna merah mengindikasikan sel HeLa yang masih hidup, panah berwarna putih mengindikasikan perubahan morfologi sel setelah perlakuan, dan panah berwarna hijau mengindikasikan kristal formazan yang terbentuk dari reagen MTT.

4.1.2 Uji Sitotoksitas Trisindolina-5 terhadap Sel HeLa

Pengukuran absorbansi sel HeLa dengan perlakuan senyawa Trisindolina-5 menggunakan panjang gelombang 595 nm dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Pengukuran Absorbansi Sel HeLa pada Perlakuan Senyawa Trisindolina-5

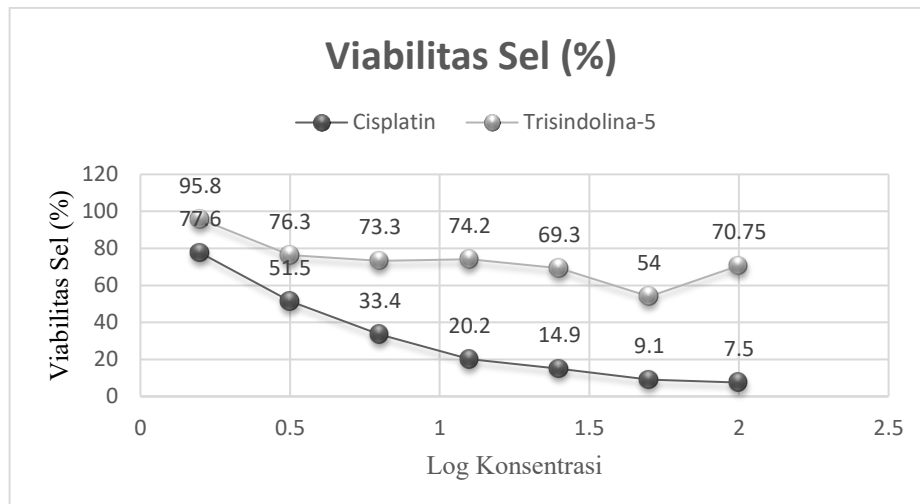
Konsentrasi		Rata-rata Absorbansi	Viabilitas Sel (%)	IC50 (µg/ml)
µg/ml	Log			
1.5	0.2	1.02	95.8	297.42
3.125	0.5	0.82	76.3	
6.25	0.8	0.79	73.3	
12.5	1.1	0.80	74.2	
25	1.4	0.75	69.3	
50	1.7	0.61	54	
100	2.0	0.77	70.75	

Berdasarkan **Tabel 4.1** korelasi antara konsentrasi senyawa Trisindolina-5 dan nilai absorbansi menunjukkan hasil yang sesuai dimana rata-rata absorbansi menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi senyawa Trisindolina-5 yang diberikan, namun pada konsentrasi 50 µg/ml rata-rata nilai absorbansinya lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi paling tinggi yaitu 100 µg/ml. Korelasi tersebut juga dapat digambarkan dalam kurva seperti pada **Gambar 4.1.2**. Seri konsentrasi yang sama pada obat Cisplatin digunakan dalam metode MTT *assay* untuk mengetahui tingkat sitotoksitas dari Cisplatin terhadap sel HeLa.

Tabel 4.2 Pengukuran Absorbansi Sel HeLa pada Perlakuan Cisplatin

Konsentrasi		Rata-rata Absorbansi	Viabilitas Sel (%)	IC50 (µg/ml)
µg/ml	Log			
1.5	0.2	0.81	77.6	3.78
3.125	0.5	0.61	51.5	
6.25	0.8	0.43	33.4	
12.5	1.1	0.30	20.2	
25	1.4	0.26	14.9	
50	1.7	0.19	9.1	
100	2.0	0.17	7.5	

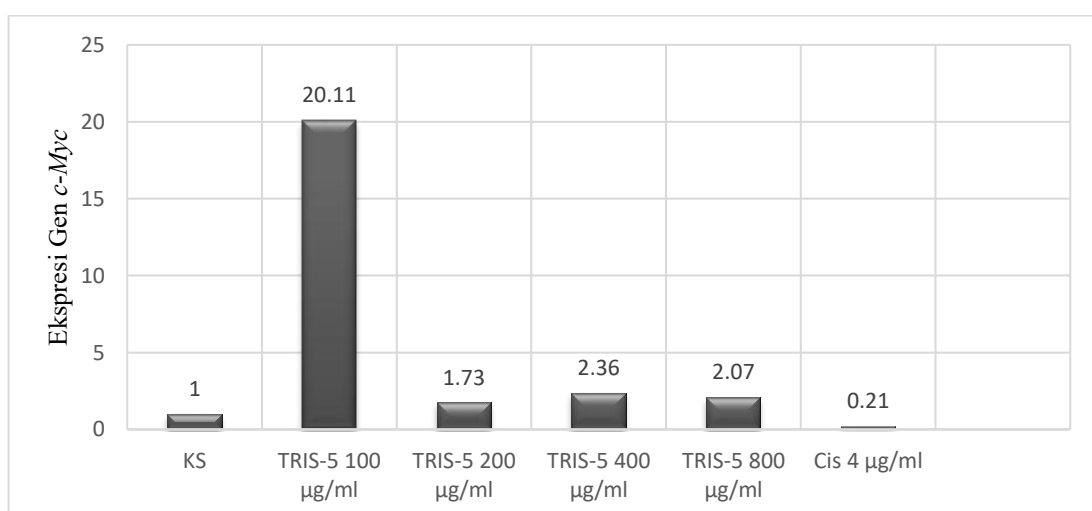
Korelasi antara konsentrasi dari seri konsentrasi Cisplatin yang diberikan dengan persen viabilitas sel HeLa dapat dilihat pada kurva pada **Gambar 4.1.2**.



Gambar 4.1.2 Kurva log konsentrasi (ppm) dan %Viabilitas Sel Trisindolina-5

4.1.3 Aktivitas Senyawa Trisindolina-5 terhadap Ekspresi Gen *c-Myc* HeLa

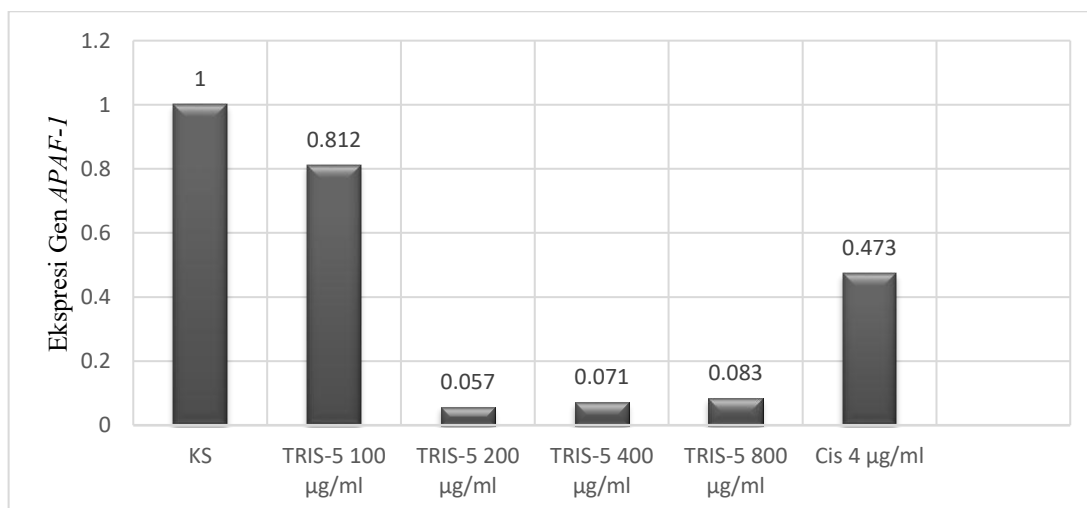
Uji ekspresi gen *c-Myc* pada sel HeLa dengan menggunakan metode quantitative PCR dilakukan untuk mengetahui aktivitas Trisindolina-5 sebagai alternatif antikanker. Melalui uji ini, akan didapatkan nilai *cycle threshold* yaitu parameter yang digunakan berupa siklus fraksional bagi pewarna fluoresens, SYBR green, sebagai reagen campuran untuk melewati ambang batas yang ditetapkan tetapi cukup rendah untuk berada dalam eksponensial kurva amplifikasi. SYBR akan mendeteksi DNA *double-strand* dengan mekanisme interkalasi DNA yaitu dengan masuknya molekul fluoresens ke pasangan basa DNA (Logg et al., 2012). Perubahan tingkat ekspresi relatif (kali lipat) ditunjukkan dengan nilai angka 1 sebagai kuantitas penentuan gen target. Peningkatan ekspresi ditunjukkan dengan perubahan tingkat > 1 , sementara perubahan tingkat ekspresi < 1 menunjukkan adanya penurunan ekspresi. Berikut merupakan *fold change* dari hasil uji ekspresi gen *c-Myc* terhadap perlakuan senyawa Trisindolina-5.



Gambar 4.1.3 *Fold change* gen *c-Myc* HeLa dengan perlakuan Trisindolina-5

4.1.4 Aktivitas Senyawa Trisindolina-5 terhadap Ekspresi Gen *APAF-1* HeLa

Hasil uji ekspresi gen *APAF-1* pada pemberian seri konsentrasi Trisindolina-5 dan Cisplatin menunjukkan bahwa kedua senyawa yang diberikan tersebut menurunkan ekspresi gen *APAF-1* pada sel HeLa. Hasil uji qPCR untuk mengetahui pengaruh seri konsentrasi senyawa Trisindolina-5 terhadap ekspresi gen *APAF-1* pada sel HeLa juga dijabarkan dalam diagram seperti pada **Gambar 4.1.4**



Gambar 4.1.4 Fold change gen *APAF-1* HeLa dengan perlakuan Trisindolina-5

4.2 Pembahasan

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi sel kanker serviks HeLa pada **Gambar 4.1.1** diantara kontrol sel, perlakuan Trisindolina-5 dan Cisplatin, karakteristik sel hidup pada sel HeLa yaitu memiliki bentuk poligonal memanjang dengan sifat cenderung menempel satu sama lain. Hal ini sesuai dengan penelitian oleh Nurrani et al (2016), yang menyatakan bahwa sel HeLa sebelum perlakuan (kontrol), menempel satu sama lain dan memiliki inti sel jelas, berwarna bening keputihan (Nurrani et al., 2016). Pada **Gambar 4.1.1A** kontrol sel, sel HeLa yang belum diberikan perlakuan menunjukkan bentuk sel HeLa yang hidup berupa silinder atau oval dengan sifat *adherent* yang menempel pada permukaan cawan kultur serta saling menempel antara satu sel dengan yang lain (adhesi) (Shiraishi and Sato, 2024). Perlakuan Trisindolina-5 dan Cisplatin dapat menyebabkan perubahan morfologi pada sel HeLa seperti pada **Gambar 4.1.1B** dan **Gambar 4.1.1C**. Sesuai dengan penelitian yang menyatakan bahwa sel HeLa yang mengalami apoptosis atau kematian sel akan mengindikasikan kondensasi kromatin dan fragmentasi nukleus sehingga morfologi sel tampak bulat serta mengalami penyusutan/pengurangan volume sel dan *membrane blebbing* yang merupakan reaksi seluler terhadap perlakuan yang diberikan (Salispriaji et al., 2023; You et al., 2023). Hasil uji MTT *assay* pada **Gambar 4.1.1D** menunjukkan reaksi antara sel yang masih hidup yaitu enzim suksinat tetrazolium reduktase yang ada pada mitokondria sel hidup dengan reagen tetrazolium. Intensitas warna ungu tersebut menyatakan banyaknya sel yang masih hidup, karena enzim mitokondria pada sel aktif akan memetabolisme garam tetrazolium sehingga pemutusan cincin tetrazolium oleh enzim dehidrogenase sehingga tetrazolium tereduksi menjadi formazan yang berwarna ungu (Suhendi et al., 2013; Nurdiani et al., 2024).

Konsentrasi perlakuan senyawa Trisindolina-5 dan Cisplatin terdiri dari beberapa seri konsentrasi mulai dari 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 6.25 µg/ml, 3.175 µg/ml, dan 1.5 µg/ml. Kelompok sel HeLa yang diberikan Cisplatin menunjukkan tingkat kematian yang

lebih efektif secara morfologi sel dibandingkan dengan kelompok sel HeLa yang diberikan perlakuan senyawa Trisindolina-5. Hal ini sejalan dengan berbagai penelitian yang menggunakan Cisplatin sebagai kontrol positif dari perlakuan yang dilakukan karena senyawa antikanker tersebut telah lama digunakan sebagai obat terapi adjuvan bagi kanker serviks (Bafadal et al., 2021; Kregielewski et al., 2023; Uggioni et al., 2022). Konsentrasi Trisindolina-5 sebesar 100 µg/ml tampak sebagian sel HeLa yang mulai membulat dan terjadinya *membrane blebbing* serta sel yang mulai mengambang lepas dari cawan kultur yang menandakan sel telah mengalami kematian. Sedangkan pada seri konsentrasi Cisplatin yang diberikan, pada konsentrasi 100 µg/ml tampak sejumlah sel HeLa yang telah membulat dan mengalami kematian, jumlah sel yang mati meningkat dengan seiring dengan naiknya seri konsentrasi Cisplatin yang diberikan. Setelah sel HeLa dengan perlakuan diinkubasi selama 24 jam, reagen MTT diberikan pada tiap sumuran cawan kultur untuk mendeteksi sel HeLa yang masih hidup setelah perlakuan. Sel yang masih hidup setelah perlakuan menandakan sel tersebut tidak mengalami efek apoptosis ataupun nekrosis, sehingga saat sel yang masih hidup diberikan reagen MTT, akan terjadi pemutusan cincin tetrazolium oleh enzim dehidrogenase sehingga molekul tetrazolium tersebut berubah menjadi garam formazan berwarna ungu yang ada di dalam mitokondria sel hidup akan bereaksi dengan tetrazolium dan membentuk garam formazan berwarna keunguan akibat reaksi reduksi (Ghasemi et al., 2021).

Rata-rata absorbansi dihitung sehingga didapatkan persentase viabilitas sel kemudian dianalisis menggunakan SPSS analisis probit, dan didapatkan nilai IC₅₀ dari senyawa Trisindolina-5 dengan waktu inkubasi selama 24 jam sebesar 297.42 µg/ml seperti pada Tabel 4.1 Nilai IC₅₀ ini tergolong sebagai aktivitas sitotoksitas yang lemah, yaitu berada diantara 201-500 µg/ml, dilansir dari NCI atau *National Cancer Institute* (Widiandani et al., 2023), sehingga Trisindolina-5 dinilai kurang poten sebagai agen antikanker secara signifikan terhadap sel HeLa. Hal ini terjadi diduga karena sel HeLa memiliki sensitivitas yang lemah terhadap senyawa antikanker seperti Trisindolina-5. Sensitivitas sel HeLa terhadap senyawa potensial antikanker ini diketahui lebih rendah dinilai dari nilai IC₅₀ sel apabila dibandingkan dengan sel kanker payudara MCF-7. Pada penelitian oleh Yuliet et al (2024), ekstrak daun *Hibiscus surattensis* L. yang diuji pada sel MCF-7 memiliki IC₅₀ sebesar 1419.83 µg/mL, sedangkan pada sel HeLa nilai IC₅₀ yang ditunjukkan lebih besar yaitu 2050.50 µg/mL. Hal ini menunjukkan ekstrak *H. surattensis* yang digunakan pada sel HeLa memerlukan konsentrasi lebih besar untuk menghambat pertumbuhan sel HeLa dibandingkan pada sel MCF-7 (Yuliet et al., 2024).

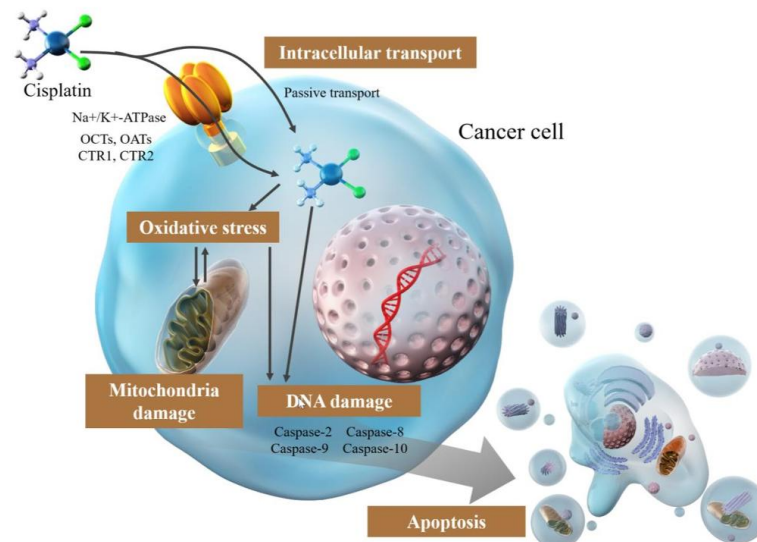
Sensitivitas suatu sel dalam merespon senyawa potensial kanker dipengaruhi oleh regulasi transporter sel yang mampu memompa keluar senyawa dari sel sebelum menjangkau target terapi yang diinginkan. Transporter yang berperan dalam resistensi sel kanker berasal dari keluarga *ATP-Binding Cassette* (ABC), termasuk transporter ABCB1 yang dimiliki oleh sel HeLa (Yuan et al., 2021; Salispriaji et al., 2024). ABCB1 atau yang biasa dikenal sebagai Pgp-1 (*P-glycoprotein*), berfungsi sebagai pemompa bagi berbagai pengobatan antikanker. Proses *efflux* atau pengangkutan aktif berbagai senyawa sitotoksik menuju luar sel, menggunakan energi ATP dengan dua domain pengikat transmembran (TMD) dan dua domain pengikat nukleotida (NBD) yang merupakan susunan protein ABCB1 (Hassanin et al., 2024). Regulasi ekspresi ABCB1 dipengaruhi oleh sinyal PI3K/AKT, dan NF-κB (*Nuclear Factor Kappa B*) yang aktif pada sel kanker seperti sel HeLa, sehingga tingkat resistensi sel terhadap senyawa ikut meningkat (Yuan et al., 2021; Hassanin et al., 2024). Aktivasi mekanisme *efflux* atau pemompaan senyawa keluar dari sel ini dapat dipicu oleh proses hormetic, yaitu proses saat konsentrasi tinggi dari senyawa dapat mengaktifkan jalur survival sementara pada sel sebagai bentuk kompensasi stres seluler (Calabrese, 2005).

Trisindolina-5 merupakan senyawa yang memiliki struktur indole alkaloid dengan modifikasi penambahan gugus samping dalam bentuk gugus fluor dan metil ester yang dapat meningkatkan potensinya sebagai senyawa antikanker (Oktyasti and Nurhayati, 2022; Salispriaji et al., 2024). Gugus fluor terletak pada rantai karbon nomor 5 pada molekul isatin. Molekul isatin merupakan derivat oksidatif dari molekul indol yang dapat menginduksi kematian sel dalam bentuk apoptosis maupun nekrosis. Isatin diketahui dapat menghambat proliferasi sel kanker lewat interaksi dengan ERK (protein kinase *extracellular signal related*) untuk memicu apoptosis, ERK dapat mengaktifkan apoptosis baik pada jalur intrinsik maupun ekstrinsik (Vine et al., 2013). Isatin yang bermuatan positif masuk ke sel akan diikat pada TMD internal, lalu terjadi hidrolisis ATP pada NBD sehingga perubahan konformasi protein dari keadaan *inward facing* menjadi *outward facing*, senyawa yang belum sempat mencapai target terapeutik pun terpompa keluar sel (Abdalla et al., 2021). Mekanisme dari sitotoksitas gugus fluor dalam senyawa Trisindolina-5 masih belum diketahui. Akan tetapi, pada penelitian yang menunjukkan penambahan gugus fluor pada senyawa pengobatan telah terbukti akan mekanisme sitotoksitasnya, seperti obat antitumor 5-fluoracil (5-FU) bekerja dengan mengkonversi metabolit aktif yang menghambat enzim Timidilat Sintase (TS), enzim yang dapat mereduksi sintesis DNA dengan mengkonversi 20-deoksiuridin-50monofosfat (dUMP) menjadi 20-deoksitimidin-50-monofosfat (dTMP) (Ishanbor and O'hagan, 2006; Shah and Westwell, 2007). Sehingga diketahui molekul isatin dan gugus fluor di senyawa Trisindolina-5 dapat bersifat toksik terhadap sel kanker (Salispriaji et al., 2023).

Hasil perlakuan Cisplatin berdasarkan kurva pada **Gambar 4.1.2** menunjukkan senyawa yang digunakan sebagai kontrol positif tersebut berkorelasi negatif terhadap viabilitas sel HeLa, dengan kata lain perlakuan Cisplatin pada sel HeLa diketahui mampu menurunkan persentase viabilitas sel seiring dengan bertambahnya konsentrasi Cisplatin yang diberikan. Pada seri konsentrasi berturut-turut mulai dari konsentrasi yang paling rendah yaitu 1.5 (0.2), 3.125 (0.5), 6.25 (0.8), 12.5 (log 1.1), 25 (log 1.4), 50 (log 1.7), dan 100 µg/ml (log 2) didapatkan persentase viabilitas sel berturut-turut sebesar 77.6, 51.5, 33.4, 20.2, 14.9, 9.1, 7.5. Angka ini menunjukkan perbandingan terbalik antara seri konsentrasi dengan persentase viabilitas sel yang sesuai dengan hipotesis penelitian, dimana semakin besar konsentrasi dari Cisplatin yang diberikan maka persen viabilitas sel semakin menurun. Nilai IC₅₀ obat cisplatin terhadap sel HeLa dihitung menggunakan analisis probit pada SPSS dan didapatkan IC₅₀ sebesar 3.78 µg/ml. Menurut *National Cancer Institute*, nilai IC₅₀ ini dapat dikategorikan sebagai aktivitas sitotoksitas sangat toksik karena nilai IC₅₀ <20 µg/ml (Nurdiani et al., 2024). Pada lini sel kanker manusia, nilai IC₅₀ minimal bagi cisplatin yaitu 0.177 µM pada sel EW-3 sarcoma, sedangkan nilai maksimalnya yaitu 10,373 µM (Kregielewski et al., 2023).

Cisplatin masuk ke dalam tubuh manusia lewat injeksi intravena atau melalui infus intravena. Setelah Cisplatin memasuki tubuh manusia, 68-98% dari Cisplatin dalam darah akan berikatan dengan albumin melalui histidin (His) dan metionin (Met). Mekanisme masuknya cisplatin ke dalam sel dapat melalui mekanisme pasif seperti difusi (Hamaya et al., 2023). Keterlibatan sistem transpor aktif seperti Na⁺ / K⁺-ATPase serta transporter anion organik (OCTs dan OATs) pada jaringan yang sensitif terhadap toksisitas cisplatin seperti ginjal, koklea, dan saraf pendengaran diduga berkontribusi dalam masuknya obat cisplatin ke sel (Makovec, 2019; Eljack et al., 2014). Di darah yang konsentrasi kloridanya tinggi, sekitar 10mM, cisplatin tidak bereaksi dan cenderung stabil. Akan tetapi, saat cisplatin berdifusi ke dalam sel yang konsentrasi klorida rendah, yaitu sekitar 4mM, ligan atom klorida akan mengalami hidrolisis dan disubstitusikan oleh molekul air di dalam sitoplasma (Basu and Krishnamurthy 2010). Hidrolisis cisplatin sangat reaktif, sehingga mengakibatkan elektrofil kuat bereaksi dengan nukleofil seperti atom nitrogen pada asam nukleat. Atom platinum (Pt) dari cisplatin akan membentuk ikatan kovalen dengan atom nitrogen nomor 7 (basa guanin dan

adenin), membentuk ikatan silang dengan dua basa purin yang bersebelahan. Ikatan ini yang menyebabkan DNA *adduct*. Sel kanker yang mengalami kerusakan DNA dari proses DNA adduct, akan mengalami penghambatan replikasi DNA dan siklus selnya terhenti di fase G1, S, dan G2/M (Dasari and Tchounwou, 2014; Hamaya et al., 2023).



Gambar 4.2.1 Mekanisme efek Cisplatin pada sel kanker (Hamaya et al., 2023)

Mitokondria dan nukleus pada sel DNA menjadi target utama Cisplatin untuk menginduksi stress oksidatif. Mitokondria memproduksi ATP melalui sistem transpor elektron, menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS), serta menjadi mediator penting dalam apoptosis. Sehingga kerusakan mitokondria yang diinduksi oleh cisplatin akan memicu apoptosis sel. Hal ini terjadi karena saat kerusakan DNA pada mitokondria akibat DNA *adduct* terjadi, produksi ROS intraseluler meningkat dari menurunnya sintesis protein yang terjadi dan fungsi sistem transfer elektron yang terganggu (Kregielewski et al., 2023). Kerusakan mitokondria memicu produksi ROS tambahan. Sel kanker akan menjaga tingkat ROS di ekuilibrium dengan menyeimbangkan produksi ROS dan sistem *scavenging*. Sistem ini melibatkan enzim *scavenger* seperti *Superoxide dismutase* (SOD) dan katalase, serta non-enzim *scavenger* seperti *Glutathione* (GSH). Kadar ROS berlebihan akan menginduksi apoptosis melalui jalur eksogen dengan reseptor kematian di membran plasma (Fas, TNF-R1, dan TRAIL-R1/2) atau melalui jalur endogen yaitu saat ROS menstimulasi pelepasan *cytochrome c* lewat aktivasi p53 dan JNK, depolarisasi membran mitokondria, serta Bax dan Bak. Tergantung pada jumlah ROS yang dihasilkan, ROS diketahui dapat menyebabkan nekrosis, autofagi, serta apoptosis pada sel kanker (Hamaya et al., 2023). Sehingga untuk mengetahui aktivitas dari senyawa Trisindolina-5 dan Cisplatin pada sel HeLa, dilakukan uji ekspresi gen menggunakan metode qPCR pada gen *c-Myc* dan *APAF-1* yang ekspresinya saling berkaitan dalam proses apoptosis.

Berdasarkan uji ekspresi gen yang dilakukan, data hasil penelitian dapat dianalisis secara deskriptif kuantitatif dengan membandingkan *fold change* atau kali lipat dari ekspresi gen kontrol. Hasil uji pada kurva di **Gambar 4.1.3** menunjukkan bahwa ekspresi gen *c-Myc* mengalami *upregulation/kenaikan* setelah diberikan perlakuan Trisindolina-5. Peningkatan tertinggi dari perlakuan Trisindolina-5 yaitu pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 20.11 kali lipat. Sementara peningkatan terendah dari perlakuan Trisindolina-5 konsentrasi 200 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 1.73 kali lipat. Hasil ini kurang sesuai dengan hipotesis, dimana perlakuan menggunakan senyawa Trisindolina-5 seharusnya menyebabkan penurunan ekspresi gen *c-*

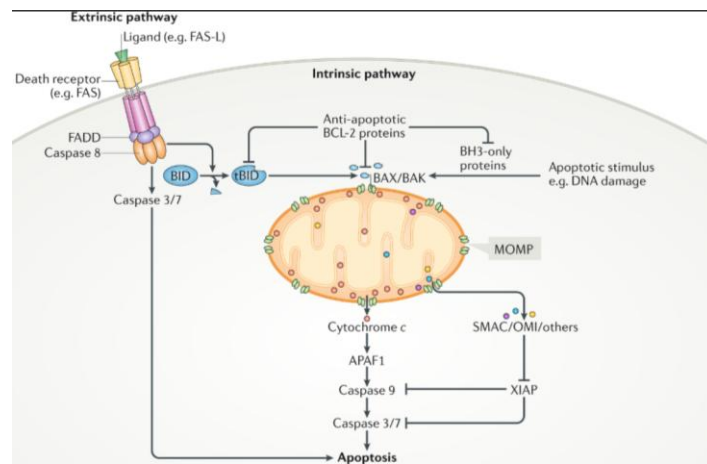
Myc. Melalui kurva tersebut dapat dinyatakan bahwa senyawa Trisindolina-5 belum mampu menghambat ekspresi *c-Myc*. Hal ini diduga karena *c-Myc* sebagai faktor transkripsi yang umumnya berfungsi untuk meregulasi pertumbuhan sel, siklus sel, metabolisme, serta ketahanan hidup sel, dapat menginduksi pembelahan pada sel HeLa dan mengaktifkan jalur survival sementara pada sel setelah paparan senyawa antikanker.

Saat sel mengalami stres seluler serta kerusakan DNA akibat paparan senyawa toksik, sel dapat mengaktifkan jalur survival sementara melalui jalur persinyalan gen *c-Myc*, serta NF- κ B (Fristiohady et al., 2020; Elbadawy et al., 2019). Seperti peningkatan ekspresi reseptor pertumbuhan dengan IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) pada progresi siklus sel dalam sel kanker payudara MCF-7 (Mawson et al., 2005). Peningkatan hingga overekspresi dari *c-Myc* juga mampu menekan aktivator jalur p53 dan mengurangi aktivasi apoptosis yang dimediasi. Hal ini terjadi karena faktor transkripsi p53 dengan perannya dalam menginduksi gen pro-apoptotik, BAX, dihambat oleh *c-Myc* (Pasang et al., 2023). Siklus sel yang diregulasi oleh gen *c-Myc* dan *c-Mycb* akan mengatur progresi siklus sel melalui NF- κ B atau *Nuclear factor kappa b* sebagai aktivator transkripsional, sehingga respon aktivasi jalur ini akan mengakibatkan sel yang telah rusak mampu bertahan hidup dari kerusakan maupun inflamasi (Fristiohady et al., 2020).

Penurunan ekspresi gen *c-Myc* HeLa pada perlakuan Cisplatin diketahui sebesar 0.21 kali lipat pada kurva di **Gambar 4.1.3**, *downregulation* pada ekspresi ini disebabkan karena Cisplatin dapat menyebabkan apoptosis melalui berbagai jalur, umumnya melalui ROS. Hal ini disebabkan saat cisplatin masuk ke dalam sel melalui transpor aktif melalui *Copper Transporter 1* (CTR1), cisplatin dapat memicu respon stres seluler melalui akumulasi di mitokondria yang menyebabkan gangguan pada *Electron Transport Chain* (ETC). Gangguan ini menyebabkan *leakage* pada elektron yang dapat membentuk ROS dengan oksigen, seperti superoksida/O₂⁻, dan hidrogen peroksida/H₂O₂ (Goossens et al., 1999; Kregielewski et al., 2023). Cisplatin dapat membentuk ikatan *crosslink* dengan DNA pada sel target, sehingga mengakibatkan terbentuknya DNA *adduct* yang dapat mengganggu replikasi dan transkripsi DNA, sel kanker akan mengalami penghambatan pertumbuhannya dan mengalami kematian (Romani et al., 2022; Behmand et al., 2020). *Overexpression* dari gen *c-Myc* dapat mempengaruhi peningkatan protein Bcl-2 yang berperan sebagai anti apoptosis. Saat protein Bcl-2 meningkat, maka lepasnya *cytochrome c* dari mitokondria akan terhambat. Hal ini juga akan menghambat terjadinya pembentukan apoptosom yang *subsequent* dari *APAF-1* dan procaspase-9 yang menginisiasi apoptosis jalur intrinsik (Pelengaris et al., 2002; Rahaju dan Joewarini, 2012). Untuk mengetahui aktivitas Trisindolina-5 sebagai alternatif antikanker melalui induksi apoptosis, dilakukan analisa ekspresi gen *APAF-1*.

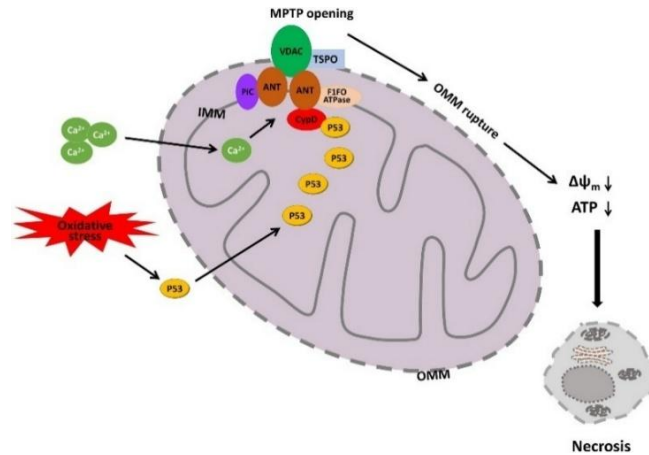
Berdasarkan hasil uji ekspresi pada kurva di **Gambar 4.1.4**, ekspresi *APAF-1* mengalami penurunan setelah diberikan perlakuan Trisindolina-5. Penurunan tertinggi dari ekspresi *APAF-1* terdapat pada perlakuan senyawa Trisindolina-5 dengan konsentrasi 200 μ g/ml sebesar 0.057 kali lipat. Sementara penurunan paling rendah terdapat pada perlakuan dengan konsentrasi 100 μ g/ml sebesar 0.057 kali lipat. Senyawa cisplatin menurunkan ekspresi *APAF-1* sebesar 0.473 kali lipat. Penurunan ekspresi *APAF-1* pada perlakuan Trisindolina-5 dan Cisplatin tidak sesuai dengan hipotesis awal penelitian yang seharusnya mengalami kenaikan. Diduga terdapat beberapa probabilitas akan mengapa ekspresi *APAF-1* pada uji ini mengalami penurunan. Probabilitas tersebut yaitu mekanisme kompensasi jalur apoptosis justru terjadi melalui jalur ekstrinsik yang tidak melibatkan ekspresi gen *APAF-1*, kemungkinan bahwa induksi apoptosis yang seharusnya terjadi setelah terpapar zat toksik terhambat oleh protein inhibitor seperti NF- κ B serta *c-Myc*, serta probabilitas bahwa pada sel HeLa terjadi nekrosis akibat paparan senyawa Trisindolina-5 dengan konsentrasi tinggi.

Jalur apoptosis yang memungkinkan untuk tidak melibatkan keberadaan ekspresi *APAF-1* ialah apoptosis ekstrinsik. Ekstrinsik dimediasi oleh aktivasi reseptor kematian di membran sel yaitu Fas, TNF *receptor* 1 (TNFR), atau TRAIL *receptor*, yang berikatan dengan ligan masing-masing seperti FasL, TNF- α , dan TRAIL. Ikatan ini memicu pembentukan *death-inducing signaling complex* (DISC) yang merekrut adaptor protein FADD (*Fas-associated death domain*) dan memfasilitasi aktivasi *caspase*-8. *Caspase*-8 akan mengaktifkan *caspase*-3 sebagai eksekutor utama apoptosis dan mengaktifkan jalur intrinsik secara tidak langsung melalui proteolisis Bid menjadi tBid yang menstimulasi permeabilitas mitokondria (Bock et al, 2020; Hamaya et al., 2023). Akan tetapi, jika komponen intrinsik apoptosis seperti *APAF-1* tidak terekspresikan, jalur ekstrinsik akan berperan dominan terutama pada sel kanker seperti HeLa yang mengalami disfungsi p53 akibat transformasi E6 dari HPV (Baez-Gonzalez et al., 2023; Shen et al., 2017).



Gambar 4.2.2 Mitokondria Sebagai Pengatur Kematian Sel Multifaset (Bock et al, 2020)

Probabilitas terhambatnya induksi apoptosis akibat protein inhibitor seperti NF- κ B serta *c-Myc* dapat didukung oleh data dari kurva di **Gambar 4.1.3** yang menjelaskan bahwa terjadi peningkatan ekspresi *c-Myc* sebesar 20.11 kali lipat setelah terpapar oleh senyawa Trisindolina-5 dengan konsentrasi sebesar 100 μ g/ml. Aktivitas *c-Myc* dapat mengaktifkan jalur pertahanan hidup dengan bantuan regulasi dari faktor transkripsi anti-apoptotik NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). NF- κ B dapat meningkatkan sensitivitas sel kanker terhadap reaksi apoptosis (Fristiody et al., 2020). Gen-gen yang berperan dalam mendukung kelangsungan hidup sel seperti Bcl-2 dan Bcl-xL akan diaktifkan oleh faktor transkripsi NF- κ B, sehingga apoptosis akan dihambat lewat nonaktivasi *caspase* 3 yang menjadi kunci utama dalam induksi apoptosis (Bock et al., 2020).



Gambar 4.2.3 Mekanisme Pembukaan MPTP pada Regulasi Nekrosis (Zhu and Sun, 2018)

Nekrosis pada sel kanker yang terjadi akibat stres oksidatif seperti paparan konsentrasi zat antikanker dapat terjadi melalui aktivasi jalur MPT (*Mitochondrial Permeability Transition*) yang diinduksi oleh akumulasi ROS secara berlebihan. Peningkatan ROS melampaui equilibrium sistem antioksidan seluler seperti *superoxide dismutase* (SOD), *glutathione peroxidase* (GPx), dan *thioredoxin* (Trx), sehingga stres oksidatif akan menargetkan mitokondria (Hamaya et al., 2023; Zhu and Sun, 2018). ROS akan memicu MPT untuk membuka permukaan di membran dalam mitokondria (mPTPC/mitochondrial permeability transition pore complex) yang tersusun atas komponen seperti VDAC atau *voltage-dependent anion channel* di membran luar mitokondria, ANT (*adenine nucleotide translocase*) di membran dalam, serta CypD atau *cyclophilin D* sebagai regulator utama di matriks mitokondria. Aktivasi mPTPC akan menyebabkan depolarisasi membran mitokondria serta ruptur pada membran sel (Pal, 2023; Zhu and Sun, 2018).

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa senyawa Trisindolina-5 kurang berpengaruh terhadap sel kanker serviks HeLa dengan analisis sebagai berikut.

1. Aktivitas sitotoksik yang rendah dengan nilai IC₅₀ 279,42 µg/ml dengan waktu inhibisi 24 jam mengindikasikan aktivitas sitotoksik yang lemah
2. Penurunan ekspresi gen *APAF-1* sebesar 0.057 kali lipat yang mengindikasikan tidak terjadi apoptosis di jalur intrinsik
3. Peningkatan ekspresi gen *c-Myc* sebesar 1.73 kali lipat yang dapat mengindikasikan *c-Myc* jalur persinyalan antikanker Trisindolina-5 tidak dapat menghambat persinyalan *c-Myc*

5.2 Saran

Melalui penelitian yang telah dilakukan, penulis dapat memberi beberapa saran untuk penelitian kedepannya.

1. Dapat dilakukan uji senyawa Trisindolina-5 dengan parameter waktu (*time course*) inkubasi dengan variasi waktu 24, 48, 72 jam untuk mengetahui pengaruhnya terhadap nilai sitotoksitas
2. Dapat dilakukan uji konfirmasi menggunakan uji protein seperti *Western Blot*, *Flow cytometry* untuk mengetahui persinyalan apoptosis/nekrosis dari sel yang diberi perlakuan senyawa Trisindolina-5 menggunakan *Annexin V/Propidium Iodide* (PI)
3. Dapat dilakukan uji sitotoksitas senyawa Trisindolina-5 ke sel yang memiliki potensi jalur persinyalan apoptosis terhadap senyawa golongan indol isatin
4. Dapat dilakukan uji ekspresi gen inhibitor *APAF-1* seperti NF-κB untuk melihat apakah ada perubahan aktivitas dari senyawa uji Trisindolina-5

DAFTAR PUSTAKA

- Abdalla, A. N., Di Stefano, M., Poli, G., Tuccinardi, T., Bader, A., Vassallo, A., & Alqathama, A. (2021). Co-inhibition of P-gp and Hsp90 by an Isatin-derived compound contributes to the increase of the chemosensitivity of MCF7/ADR-resistant cells to doxorubicin. *Molecules*, 27(1), 90. doi: 10.3390/molecules27010090
- Abid, R., Ghazanfar, S., Farid, A., Sulaman, S. M., Idrees, M., Amen, R. A., Muzammal, M., Shahzad, M. K., Mohamed, M. O., Khaled, A. A., Safir, W., Ghori, I., Elsbali, A. M., & Alharbi, B. (2022). Pharmacological Properties of 4', 5, 7-Trihydroxyflavone (Apigenin) and Its Impact on Cell Signaling Pathways. *Molecules*, 27(13), 4304. <https://doi.org/10.3390/molecules27134304>
- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48-53. DOI:10.1042/BIO20200034
- Al Bayat, S., Mundodan, J., Hasnain, S., Sallam, M., Khogali, H., Ali, D., Alateeg, S., Osama, M., Elberdiny, A., Al-Romaihi, H., Al-Thani, M. H. J., & Al-Thani, M. H. J. (2021). Can the cycle threshold (Ct) value of RT-PCR test for SARS CoV2 predict infectivity among close contacts? *Journal of infection and public health*, 14(9), 1201-1205.
- Almalki, S. G. (2023). The Pathophysiology of the Cell Cycle in Cancer and Treatment Strategies Using Various Cell Cycle Checkpoint Inhibitors. *Pathology-Research and Practice*. 251. ISSN 0344-0338 <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154854>
- Alshahat, M. A., Elgenedy, M. A., Aboushady, A. A., & Williams, M. T. (2023). Cancer Treatment: An Overview of Pulsed Electric Field Utilization and Generation. *Applied Sciences*, 13(18), 10029.
- Aqmarina, S. A., Latief, S., & Kartika, A. V. (2023). Relationship Between Knowledge Level And Attitude With Early Detection Behavior Of Cervical Cancer At Ibnu Sina Hospital Makassar. *Fakumi Medical Journal: Jurnal Mahasiswa Kedokteran*, 3(9), 647-653.
- Arends, M. J., & Stanley, M. (2024). Andrew David Hamilton Wyllie. 24 January 1944—26 May 2022. *Biographical Memoirs Of Fellows Of The Royal Society*, 76, 501-518.
- Artanti, A. N., Pujiastuti, U. H., Prihapsara, F., Rakhmawati, R. (2020). Synergistic Cytotoxicity Effect by Combination of Methanol Extract of Parijoto Fruit (*Medinilla speciosa* Reinw. ex. Bl) and Cisplatin against HeLa Cell Line. *Indones. J. Cancer Chemoprevent*. 11(1), 16-21. e-ISSN: 2355-8989
- Ashrafizadeh, M., Zarrabi, A., Hushmandi, K., Kalantari, M., Mohammadinejad, R., Javaheri, T., & Sethi, G. (2020). Association of the epithelial–mesenchymal transition (EMT) with cisplatin resistance. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 4002.
- Astirin, O. P., Prayitno, A., Artanti, A. N., Herawati, E., Saad, A. N. A., & Firstlia, A. D. (2021). Single-dose and combined-dose of nanoparticles from soursop leaves (*Annona muricata* L.) and sappan wood (*Caesalpinia sappan* L.) induced apoptosis and necrosis in HeLA cells. *Pharmacognosy Journal*, 13(5): 1134-1142. DOI: 10.5530/pj.2021.13.146
- Aysal, A., Gundogdu, B., Pehlivanoglu, B., Ekmekci, S., Topper, M. H., Talu, C. K., Erdogdu, I. H., Gurel, D., Durak, M. G., Ulukus, E. C., Ozkal, S., Tuna, B., Sagol, O., Sarioglu, S., & Skálová, A. (2022). Diagnostic Approach According to More Frequent Metastatic Sites: Liver, Lung, Bone, and Lymph Nodes. *Biomarkers in Carcinoma of Unknown Primary*, 335-379.
- Bai, Y., Sha, J., & Kanno, T. (2020). The role of carcinogenesis-related biomarkers in the Wnt pathway and their effects on epithelial–mesenchymal transition (EMT) in oral squamous cell carcinoma. *Cancers*, 12(3), 555.

- Baez-Gonzalez, A. S., Carrazco-Carrillo, J. A., Figueroa-Gonzalez, G., Quintas-Granados, L. I., Padilla-Benavides, T., & Reyes-Hernandez, O. D. (2023). Functional effect of indole-3 carbinol in the viability and invasive properties of cultured cancer cells. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 35, 101492.
- Bafadal, A., Mutiara, W. O., Malaka, M. H., Fristiohady, A., Yodha, A. W. M., Sadarun, B., Shaidin, I. (2018). Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Petrosia sp. secara In Vitro terhadap Sel Kanker Serviks HeLa. *Jurnal Farmasi Sains dan Praktis*. 7(3): 282-288. eISSN: 2579-4558
- Barati, M., Akhondi, M., Mousavi, N.S. (2021). Pluripotent Stem Cells: Cancer Study, Therapy, and Vaccination. *Stem Cell Rev and Rep* 17, 1975–1992. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10199-7>
- Barford, D. (2020). Structural interconversions of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) regulate cell cycle transitions. *Current opinion in structural biology*, 61, 86- 97.
- Basu, A., and Krishnamurthy, S.(2010) Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J. Nucleic Acids*, 201367.
- Basuki, A. R., Perwitasari, D. A., & Hardiyanto, H. (2020). Adverse Drug Reactions (ADRS) Antikanker pada Pasien Ca Mammæ yang Menjalani Kemoterapi di RSUD Kota Yogyakarta. *Jurnal Health Sains*, 1(6), 349-359.
- Behmand, B., Noronha, A. M., Wilds, C. J., Marignier, J. L., Mostafavi, M., Wagner, J. R., Hunting, D. J., & Sanche, L. (2020). Hydrated electrons induce the formation of interstrand cross-links in DNA modified by cisplatin adducts. *Journal of radiation research*, 61(3), 343-351.
- Bhat, D. (2022). The ‘Why and How’of cervical cancers and genital HPV infection. *Cytojournal*, 19.
- Bock, F. J., Cloix, C., Zerbst, D., & Tait, S. W. (2020). Apoptosis-induced FGF signalling promotes non-cell autonomous resistance to cell death. *bioRxiv*, 2020-07.
- Boice, A., & Bouchier-Hayes, L. (2020). Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1867(6), 118688.
- Brown, A., Kumar, S., & Tchounwou, P. B. (2019). Cisplatin-Based Chemotherapy of Human Cancers. *Journal of cancer science & therapy*, 11(4), 97.
- Calabrese, E. J. (2005) Cancer biology and hormesis: human tumor cell lines commonly display hormetic (biphasic) dose responses. *Crit Rev Toxicol*. 35(6):463-582. doi: 10.1080/10408440591034502. PMID: 16422392.
- Chahal, V., Nirwan, S., and Kakkar, R. (2019), Isatin and Its Derivates: A Survey of Recent Syntheses, Reactions, and Applications, *MedChemComm*, DOI: 10.1039/C8MD00585K.
- Chen, P. Y., Hsieh, P. L., Peng, C. Y., Liao, Y. W., Yu, C. H., & Yu, C. C. (2021). LncRNA MEG3 inhibits self-renewal and invasion abilities of oral cancer stem cells by sponging miR-421. *Journal of the Formosan Medical Association*, 120(4), 1137-1142.
- Chin, T. C., Wilbanks, S. M., & Ledgerwood, E. C. (2024). Altered conformational dynamics contribute to species-specific effects of cytochrome c mutations on caspase activation. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 29(2), 169-176.
- Christoph, F., Weikert, S., Kempkensteffen, C., Krause, H., Schostak, M., Miller, K., & Schrader, M. (2006). Regularly methylated novel pro-apoptotic genes associated with recurrence in transitional cell carcinoma of the bladder. *International journal of cancer*, 119(6), 1396–1402. DOI: 10.1002/ijc.21971

- Costigan, A., Hollville, E., & Martin, S. J. (2023). Discriminating Between Apoptosis, Necrosis, Necroptosis, and Ferroptosis by Microscopy and Flow Cytometry. *Current protocols*, 3(12), e951. <https://doi.org/10.1002/cpz1.951>
- Dasari, S., and Tchounwou, P.B. (2014) Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharm.* 740, 364–378.
- Davis, M. A., and Jeffery, E. H. (2002). *Handbook of Toxicologic*. Elsevier. ISBN: 978-0-12-330215. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-330215-1.X5000-5>
- de Almeida, W. S., da Silva, D. A. (2021). Does polysaccharide quaternization improve biological activity?. *International Journal of Biological Macromolecules*. 7(1), <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.012>
- de Queiroz Simões, R. S., dan Barth, O. M. (2017). Immunological And Structural Analysis Of Hpv-Positive Cervical Carcinoma Cell Lines And Bovine Papillomavirus Virus-Like Particles (BPV-VLP). *International Journal of Advanced Research (IJAR)*, 5(4):1003-1009. ISSN: 2320-5407
- de Sousa, L. H. N., de Araújo, R. D., Sousa-Fontoura, D., Menezes, F. G., & Araújo, R. M. (2021). Metabolites from Marine Sponges of the Genus *Callyspongia*: Occurrence, Biological Activity, and NMR Data. *Marine Drugs*, 19(12), 663.
- Doyle A. and Griffiths. (2000) *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. John Willey and Sons Ltd, Chichester, England.
- Duffy, M. J., O'Grady, S., Tang, M., & Crown, J. (2021). MYC as a target for cancer treatment. *Cancer treatment reviews*, 94, 102154.
- Dudgeon, Crissy & Qiu, Wei & Sun, Quanhong & Zhang, Lin & yu, Jian. (2009). *Transcriptional Regulation of Apoptosis*. 10.1007/978-1-60327-381-7_10.
- Dunsmore, L., Navo, C. D., Becher, J., de Montes, E. G., Guerreiro, A., Hoyt, E., Brown, L., Zelenay, V., Mikutis, S., Cooper, J., Barbieri, I., Lawnrinowitz, S., Siouve, E., Marthin, E., Ruivo, P. R., Rodrigues, T., da Cruz, F., Werz, O., Vassiliou, G., Ravn, p., Jimenez-Oses, G., & Bernardes, G. J. (2022). Controlled masking and targeted release of redox-cycling ortho-quinones via a C–C bond-cleaving 1, 6-elimination. *Nature Chemistry*, 14(7), 754-765.
- Elbadawy, M., Usui, T., Yamawaki, H., & Sasaki, K. (2019). Emerging Roles of *C-Myc* in Cancer Stem Cell-Related Signaling and Resistance to Cancer Chemotherapy: A Potential Therapeutic Target Against Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2340. <https://doi.org/10.3390/ijms20092340>
- Elhady, Sameh & el halawany, Ali & Alahdal, Abdulrahman & Hassanean, Hashim & Ahmed, Samar. (2016). A New Bioactive Metabolite Isolated from the Red Sea Marine Sponge *Hyrrios erectus*. *Molecules*. 21. 82. 10.3390/molecules21010082
- Eljack, N.D., Ma, H.Y., Drucker, J., Shen, C., Hambley, T.W., New, E.J., Friedrich, T., Clarke, R.J. (2014) Mechanisms of cell uptake and toxicity of the anticancer drug cisplatin. *Metallomics*. 6, 2126–2133. <https://doi.org/10.1039/c4mt00238e>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 35(4): 495-516. doi: 10.1080/01926230701320337.
- Engeland, K. (2022). Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death & Differentiation*, 29(5), 946-960.
- Fernanda, D. R., & Yuniarti, L. (2022). Hubungan Rasio CT dan Ekspresi Gen E dengan Kejadian Gagal Napas pada Pasien Covid-19 Rawat Inap di RS X. *Journal Riset Kedokteran*, 2(1): 107-115. DOI: 10.29313/jrk.vli2.563
- Fischer, E. G. (2020). Nuclear morphology and the biology of cancer cells. *Acta cytologica*, 64(6), 511-519.

- Fristiohady, A., Ningsih, M. B., dan Malik, F. (2020). Peran Faktor Transkripsi Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells (NF- κ B) Terhadap sel Kanker Payudara. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 6(2):81-90. DOI : <https://doi.org/10.35311/jmpi.v6i1.59>
- García-Santisteban, I., Llopis, A., Krenning, L., Vallejo-Rodríguez, J., Van den Broek, B., Zubiaga, A. M., & Medema, R. H. (2021). Sustained CHK2 activity, but not ATM activity, is critical to maintain a G1 arrest after DNA damage in untransformed cells. *BMC biology*, 19, 1-13.
- Geohagen, B. C., Weiser, D. A., Loeb, D. M., Nordstroem, L. U., & LoPachin, R. M. (2020). Enolate-forming compounds provide protection from platinum neurotoxicity. *Chemico- biological interactions*, 317, 108961.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12827.
- Giadone, R. M., Mithal, A., Miller, G. J., Matte, T. M., Yeung, A. K., Dowrey, T. W., Dowrey, R. B., Miller, N. S., Andry, C. D., Vanuytsel, K., & Murphy, G. J. (2020). qRT-PCR Platforms for Diagnosing and Reporting SARS-CoV-2 Infection in Human Samples. *STAR protocols*, 1(2), 100102.
- Ginzinger, D. G. (2002). Gene Quantification Using Real-Time Quantitative PCR: An Emerging Technology Hits the Mainstream. *Experimental Hematology*, 30(6): 503-512. DOI: 10.1016/S0301-472X(02)00806-8
- Goossens, V., Stangé, G., Moens, K., Pipeleers, D., & Grooten, J. (1999). Regulation of tumor necrosis factor-induced, mitochondria-and reactive oxygen species-dependent cell death by the electron flux through the electron transport chain complex I. *Antioxidants & redox signaling*, 1(3), 285-295. DOI: 10.1089/ars.1999.1.3-285
- Grace, V. B., Lydia, B., & Wilson, D. D. (2021). The effect of Indian fig fruit extract on human papilloma virus containing cervical cancer cells (HeLa) by decreasing the HPV18 L1 gene load. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 22(3), 785.
- Hamaya, S.; Oura, K., Morishita, A., Masaki, T. (2023) Cisplatin in Liver Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 10858. <https://doi.org/10.3390/ijms241310858>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. PMID: 35022204.
- Handayani, L., PH, M. M., Suharmiati, A. M., & Ayuningtyas, A. (2012). Menaklukkan kanker serviks dan kanker payudara dengan 3 terapi alami. *AgroMedia*.
- Handoko, V. M. (2021). Aktifitas Sitotoksik Ekstrak Buah Jeruk Pameló (Citrus Maxima) Terhadap Sel Kanker Servik. *Parapemikir : Jurnal Ilmiah Farmasi*, 27 - 32.
- Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S. M., Simjee, S. U. (2017). Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 18, 3–9.
- Harshitha, R., & Arunraj, D. R. (2021). Real - time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(5), 800-812.
- Hassan, S., Shah, M., Yoon, S. C., Ullah, I., Kim, M. O., and Yoon, J. (2013). Haptic Guided Virtual Reality Simulation for targeted Drug Delivery Using Nano-Containers Manipulation. *Journal of Biomedics Nanotechnology*, 9(7): 1190-1194
- Hassanin, M. A., Mustafa, M., Hassan, H. A., Beshr, E. A., Elshennawy, A., & Aly, O. M. (2024). Hydantoin derivatives: A review on their anticancer activities. *Octahedron Drug Research*, 4(1), 61-74.

- Hassanshahi, J., Mirzahosseini-Pourranjbar, A., Hajializadeh, Z., & Kaeidi, A. (2020). Anticancer and cytotoxic effects of troxerutin on HeLa cell line: an in-vitro model of cervical cancer. *Molecular Biology Reports*, 47, 6135-6142.
- Hela, F., & Aguayo-Mazzucato, C. (2023). Interaction between Autophagy and Senescence in Pancreatic Beta Cells. *Biology*, 12(9), 1205.
- Hirai, hasanT., Kono, K., Kusakawa, S., Yasuda, S., Sawada, R., Morishita, A., Hata, S., Wakita, A., Kageyama, T., Takahashi, R., Watanabe, S., Shiraishi, N., & Sato, Y. (2022). Evaluation of the reproducibility and positive controls of cellular immortality test for the detection of immortalized cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *Regenerative Therapy*, 21, 540-546.
- Humaryanto, H., Shahib, N., Syukrani, Y. F., Hidayat, N. N. (2017). Profil Ekspresi mRNA Gen *Murine Double Minute 2*, Krüppel-like Factor 4, dan *c-Myc* pada Fibrosarkoma, *Global Medical and Health Communication*, 5(1): 13-18.
- Iemura, K., Yoshizaki, Y., Kuniyasu, K., & Tanaka, K. (2021). Attenuated chromosome oscillation as a cause of chromosomal instability in cancer cells. *Cancers*, 13(18), 4531.
- Ismaryani, A., Salni, S., Setiawan, A., & Triwani, T. (2018). Aktivitas Sitotoksik, Antiproliferasi Dan Penginduksi Apoptosis Daun Salung (*Psychotria Viridifl Ora Reinw. Ex. Blume*) Terhadap Sel Kanker Serviks Hela. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 16(2), 206-213.
- Jahani, S., Heidari, Z., Azami, M., & Moudi, B. (2020). Comparison of anticancer effects of hydroalcoholic extracts of *Camellia sinensis* and *Lepidium sativum* L on hela cell line. *International Journal of Cancer Management*, 13(11).
- Jeannot, E., Latouche, A., Bonneau, C., Calmèjane, M. A., Beaufort, C., Ruigrok-Ritsier, K., Bataillon, G., Cherif, L. L., Dupain, C., Lecerf, C., Papovic, M., de la Rochefordiere, A., Lecuru, F., Fourchette, V., Jordanova, E. S., von der Leyen, H., Tran-Perennou, C., Legrier, M., Dureau, S., Raizonville, L., Roufai, D. B., Le Tourneau, C., Bieche, I., Rouzier, R., berns, E. M. J. J., Kamal, M., & Scholl, S. (2021). Circulating HPV DNA as a marker for early detection of relapse in patients with cervical cancer. *Clinical Cancer Research*, 27(21), 5869-5877.
- Kahl, V. F., Allen, J. A., Nelson, C. B., Sobinoff, A. P., Lee, M., Kilo, T., Vasireddy, R. S., & Pickett, H. A. (2020). Telomere length measurement by molecular combing. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 493.
- Kanamori, Y., Finotti, A., Di Magno, L., Canettieri, G., Tahara, T., Timeus, F., Greco, A., Tirassa, P., Gasparello, J., Fino, P., Di Liegro, C.M., Proira, P., Schiera, G., Di Liegro, I., Gambari, R., & Agostinelli, E. (2021). Enzymatic spermine metabolites induce apoptosis associated with increase of p53, caspase-3 and miR-34a in both neuroblastoma cells, SJNKP and the N-Myc-amplified form IMR5. *Cells*, 10(8), 1950.
- Kauffman, G. B., Pentimalli, R., Doldi, S., Hall, M. D. (2010) Michele Peyrone (1813–1883), Discoverer of Cisplatin. *Platinum Metals Rev.* 54(4): 250–256. doi:10.1595/147106710X534326
- Kciuk, M., Gielecińska, A., Mujwar, S., Kołat, D., Kałuzińska-Kołat, Ż., Celik, I., & Kontek, R. (2023). Doxorubicin—an agent with multiple mechanisms of anticancer activity. *Cells*, 12(4), 659.
- Kessler, E., Bhatia, S., Caviar, M., Cleary, J., Fine, S., Fritz, S., Hayne, G., Husted, R., Johnson, Z., Kessler, J., Kosiborod, S., Looney, G., Malik, R., Markley, E., Monson, L., Smith, G., & Wickoren, E. (2020). Explorations of the Apoptotic Protease Activating Factor 1 (*APAF-1*) in its Formation of the Seven – Spoked Apoptosome Responsible for Programmed Cell Death. *The FASEB Journal*, 34(S1), 1-1.

- Kobayashi, M., Aoki, S., Gato, K., Matsunami, K., Kurosu, M., and Kitagawa, I. (1994), Marine Natural Products. XXXIV. Trisindoline, a New Antibiotic Indole Trimer, Produced by a Bacterium of *Vibrio* sp. Separated from the Marine Sponge *Hyrtios altum*, *Chem. Pharm. Bull*, 42 (12): 2449-2451, DOI: 10.1248/cpb.42.2449
- Konduri, V., Oyewole-Said, D., Vazquez-Perez, J., Weldon, S. A., Halpert, M. M., Levitt, J. M., & Decker, W. K. (2021). CD8+ CD161+ T-cells: cytotoxic memory cells with high therapeutic potential. *Frontiers in immunology*, 11, 613204.
- Kregielewski, K., Fraczek, W., & Grodzik, M. (2023). Graphene oxide enhanced cisplatin cytotoxic effect in glioblastoma and cervical cancer. *Molecules*, 28(17), 6253.
- Kurayoshi, K., Ozono, E., Iwanaga, R., Bradford, A. P., Komori, H., Araki, K., & Ohtani, K. (2018). The key role of E2F in tumor suppression through specific regulation of tumor suppressor genes in response to oncogenic changes. *Gene Expression and Regulation in Mammalian Cells-Transcription Toward the Establishment of Novel Therapeutics*, 143.
- Kusakabe, Misako & Taguchi, Ayumi & Sone, Kenbun & Mori, Mayuyo & Osuga, Yutaka. (2023). Carcinogenesis and management of human papillomavirus-associated cervical cancer. *International journal of clinical oncology*. 28. DOI: 10.1007/s10147-023-02337-7.
- Lakshmanan, I., & Batra, S. K. (2013). Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method. *Bio-protocol*, 3(6), e374. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.374>
- Leo, C., Richter, C., Horn, L. C., Schütz, A., Pilch, H., & Höckel, M. (2005). Expression of *APAF-1* in cervical cancer correlates with lymph node metastasis but not with intratumoral hypoxia. *Gynecologic oncology*, 97(2), 602–606. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.01.044>
- Levine, A. J. (2020). p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nature Reviews Cancer*, 20(8), 471-480. DOI: 10.1038/s41568-020-0262-1
- Liazarti, D. (2022). Mekanisme Resistensi Terhadap Anti Mikroba. *Collaborative Medical Journal (Cmj)*, 5(3), 37-45. DOI: <https://doi.org/10.36341/cmj.v5i3.3274>
- Liu, P., Zhang, C., Liao, Y., Liu, J., Huang, J., Xia, M., Chen, M., Tan, H., He, W., Xu, M., Liu, T., Ooi, S., Du, S., Qin, S., Zhu, Y., Zou, Q., Wang, W., & Yao, S. (2020). High expression of PTPRM predicts poor prognosis and promotes tumor growth and lymph node metastasis in cervical cancer. *Cell Death & Disease*, 11(8), 687.
- Livak, KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 25(4):402–8.
- Logg, C. R., Robbins, J. M., Jolly, D. J., Gruber, H. E., Kasahara, N. (2012). Retroviral Replicating Vectors in Cancer. *Methods in Enzymology*, 507. DOI: 10.1016/B978-0-12-386509-0.00011-9
- Lyapun, I. N., Andryukov, B. G., & Bynina, M. P. (2019). HeLa cell culture: Immortal heritage of henrietta lacks. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 34(4), 195-200.
- Ma, H., Yan, X., Yan, L., Zhao, J., Song, J., Peng, R., Yang, Y., Peng, J., & Liu, K. (2021). Identification and functional analysis of apoptotic protease activating Factor-1 (*APAF-1*) from *Spodoptera litura*. *Insects*, 12(1), 64.
- Madden, S. K., de Araujo, A. D., Gerhardt, M., Fairlie, D. P., and Mason, J. M. (2021), Taking the Myc Out of Cancer: Toward Therapeutics Strategies to Directly Inhibit *c-Myc*, *Molecular Cancer*, 20 (23): 1-18, DOI: 10.1186/s12943-020-01291-6.
- Majidzadeh, H., Araj-Khodaei, M., Ghaffari, M., Jafari, A., Shanehbandi, D., Torbati, M., & Dolatabadi, J. E. N. (2021). The combination of berberine and methotrexate enhances

- anti-cancer effects in HeLa cancer cell line: A morphological study. *Pharmaceutical Sciences*, 27(4), 536-542.
- Makovec, T. (2019) Cisplatin and beyond: Molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol. Oncol.* 53, 148–158. <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0018>
- Makvandi, P., Wang, C. Y., Zare, E. N., Borzacchiello, A., Niu, L. N., & Tay, F. R. (2020). Metal – based nanomaterials in biomedical applications: antimicrobial activity and cytotoxicity aspects. *Advanced Functional Materials*, 30(22), 1910021.
- Malumbres, M. (2020). *Control of the cell cycle*. In Abeloff's Clinical Oncology (pp. 56-73). Elsevier.
- Martins-Neves, S. R., Sampaio-Ribeiro, G., & Gomes, C. M. (2023). Self-renewal and pluripotency in osteosarcoma stem cells' chemoresistance: notch, hedgehog, and Wnt/ β -Catenin interplay with embryonic markers. *International journal of molecular sciences*, 24(9), 8401.
- Mawson, A., Lai, A., Carroll, J. S., Sergio, C. M., Mitchell, C. J., & Sarcevic, B. (2005). Estrogen and insulin/IGF-1 cooperatively stimulate cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of *c-Myc* and cyclin D1. *Molecular and cellular endocrinology*, 229(1-2), 161-173.
- Mazlumoglu, B. Ş. (2023). In Vitro Cytotoxicity Test Methods: MTT and NRU. *International Journal of Pharmata*, 3(2), 50-53.
- Meng, Peng & Ghosh, Rita. (2014). Transcription addiction: Can we garner the Yin and Yang functions of E2F1 for cancer therapy? *Cell death & disease*. 5. e1360. 10.1038/cddis.2014.326.
- Mezu-Ndubuisi, O. J., & Maheshwari, A. (2021). The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatric research*, 89(7), 1619-1626.
- Minoni, L., Romero-Medina, M. C., Venuti, A., Sirand, C., Robitaille, A., Altamura, G., La Calvez-Klem, F., Viarisio, D., Zanier, K., Muller, M., Accardi, R., & Tommasino, M. (2020). Transforming properties of beta-3 human papillomavirus E6 and E7 proteins. *MSphere*, 5(4), 10-1128.
- Mirzayans, R., & Murray, D. (2020). Do TUNEL and other apoptosis assays detect cell death in preclinical studies? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9090.
- Moser, B., Hochreiter, B., Basilio, J., Gleitsmann, V., Panhuber, A., Pardo-Garcia, A., Hoesel, B., Salzmann, M., Resch, U., Noreen, M., & Schmid, J. A. (2021). The inflammatory kinase IKK α phosphorylates and stabilizes *c-Myc* and enhances its activity. *Molecular Cancer*, 20, 1-17.
- Mosmann, J. P., Zayas, S., Kiguen, A. X., Venezuela, R. F., Rosato, O., & Cuffini, C. G. (2021). Human papillomavirus and Chlamydia trachomatis in oral and genital mucosa of women with normal and abnormal cervical cytology. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), 422.
- Mountain, C. (2023). *Investigating the interspecies variation of the cytochrome c-APAF-1 interaction* (Doctoral dissertation, University of Otago).
- Murwani, A., Qurrohman, M. T. (2023). Gambaran Nilai Ct Value qRT-Pcr Sars Cov-2 Dengan Metode Ekstraksi Manual dan Otomatis. Surabaya: *The Journal of Muhammadiyah Medical Laboratory Technologist*, 6(2): 205-212 DOI: 10.30651/jmlt.v6i2.18597
- Nahand, J. S., Esghaei, M., Monavari, S. H., Moghoofei, M., Kiani, S. J., Mostafaei, S., Mirzaei, H., & Bokharaei-Salim, F. (2020). The assessment of a possible link between HPV - mediated inflammation, apoptosis, and angiogenesis in Prostate cancer. *International Immunopharmacology*, 88, 106913.
- Nambisan, P. (2017). An Introduction to Ethical, Safety and Intellectual Property Rights Issues in Biotechnology: Relevance of Intellectual Property Rights in Biotechnology.

- Academic Press*. 291-309. ISBN 9780128092316. DOI: 10.1016/B978-0-12-809231-6.00013-2.
- Nath, R., Pathania, S., Grover, G., and Akhtar, M. J. (2020), Isatin Containing Heterocycles for Different Biological Activities: Analysis of Structure Activity Relationship, *Journal of Molecular Structure* 128900, DOI: 10.1016/j.molstruc.2020.128900.
- Neophytou, C. M., Trougakos, I. P., Erin, N., & Papageorgis, P. (2021). Apoptosis deregulation and the development of cancer multi-drug resistance. *Cancers*, 13(17), 4363.
- Newton, H. B. (2018). Handbook of Brain Tumor Chemotherapy, Molecular Therapeutics, and Immunotherapy. *Academic Press*. ISBN 978-0-12-812100-9. DOI: 10.1016/C2016-0-02355-0
- Nicoletto, R. E., & Ofner III, C. M. (2022). Cytotoxic mechanisms of doxorubicin at clinically relevant concentrations in breast cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 89(3), 285-311.
- Nga, N. T. H., Ngoc, T. T. B., Trinh, N. T. M., Thuoc, T. L., & Thao, D. T. P. (2020). Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. *Analytical biochemistry*, 610, 113937.
- Noori, A. R., Tashakor, A., Nikkhah, M., Eriksson, L. A., Hosseinkhani, S., & Fearnhead, H. O. (2021). Loss of WD2 subdomain of *APAF-1* forms an apoptosome structure which blocks activation of caspase-3 and caspase-9. *Biochimie*, 180, 23-29.
- Noroozi, Z., Shamsara, M., Valipour, E., Esfandyari, S., Ehghaghi, A., Monfaredan, A., Azizi, Z., Motevaseli, E., & Modarressi, M. H. (2022). Antiproliferative effects of AAV-delivered CRISPR/Cas9-based degradation of the HPV18-E6 gene in HeLa cells. *Scientific Reports*, 12(1), 2224.
- Noviardi, H., Yuningtyas, S., & Suwarni, D. (2019). Sitotoksisitas Kombinasi Ekstrak Daun Petai Cina Dan Kulit Jengkol Terhadap Sel Kanker Payudara Dan Serviks (Cytotoxicity of Petai Cina Leaves and Jengkol Pods Combinations Against Breast Cancer Cells and Cervix). *Biopropal Industri*, 10(2), 109-117.
- Nichani, K., Li, J., Suzuki, M., & Houston, J. P. (2020). Evaluation of caspase-3 activity during apoptosis with fluorescence lifetime-based cytometry measurements and phasor analyses. *Cytometry Part A*, 97(12), 1265-1275
- Nie, Z., Guo, C., Das, S. K., Chow, C. C., Batchelor, E., Simons, S. S., & Levens, D. (2020). Dissecting transcriptional amplification by MYC. *Elife*, 9, e52483.
- Novikov, N. M., Zolotaryova, S. Y., Gautreau, A. M., & Denisov, E. V. (2021). Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. *British journal of cancer*, 124(1), 102-114.
- Nurdiani, E., Rasmawan, R., Maharini, R., Sartika, R. P. (2024). Sitotoksisitas Dan Selektivitas Fraksi Kayu Batang Simpung Air (*Dillenia Suffruticosa* (Griff.) Martelli) Terhadap Sel Kanker Payudara. *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi*, 17(1), 190-200. E-ISSN: 2502-6720
- Nurhayati, A. P. D., Fadlan, A., & Sukma, C. M. (2020). Molecular docking alkaloids compound (Trisindoline and SA2014) towards mutated 273 residue p53 protein. *Annals of Biology*, 36(2): 168-172
- Nurhayati, A. P. D., Rihandoko, A., Fadlan, A., Ghaissani, S. S., Jadid, N., & Setiawan, E. (2022). Anti-cancer potency by induced apoptosis by molecular docking P53, caspase, cyclin D1, cytotoxicity analysis and phagocytosis activity of trisindoline 1, 3 and 4. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 30(9), 1345-1359.
- Obreshkova, D., Ivanova, S., & Yordanova-Laleva, P. (2022). Influence of chemical structure and mechanism of hydrolysis on pharmacological activity and toxicological profile of approved platinum drugs. *Pharmacia*, 69, 645-653.

- Oktyasti, E. N., & Nurhayati, A. P. D. (2022). Molecular Docking Simulation of Trisindolina 1 Compound Against Pi3k Protein in Hepatocellular Carcinoma. *Advances in Biological Science Research*, 268-277. DOI: 10.2991/absr.k.220406.038
- Pal, C. (2023). Mitochondria-targeted metallo-drugs against cancer: a current mechanistic perspective. *Results in Chemistry*, 6, 101149.
- Prendergast, G. (1999) Mechanisms of apoptosis by *c-Myc*. *Oncogene* 18, 2967–2987 <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202727>
- Pasang, A. A., Rahniayu, A., Kurniasari, N., Sudiana, I. K., Sandhika, W., Rahaju, A. S., ... & Bintoro, S. U. Y. (2023). Correlation between *C-MYC* and BAX expression with various Ann Arbor stages in B-cell large cell type of Non-Hodgkin lymphoma. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 16(2), 597-602.
- Patel, S., Gheewala, N., Suthar, A., & Shah, A. (2009). In-vitro cytotoxicity activity of Solanum nigrum extract against Hela cell line and Vero cell line. *Int J Pharm Pharm Sci*, 1(1), 38-46.
- Pelengaris, S., Khan, M. & Evan, G (2002). *c-Myc*: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2, 764–776. <https://doi.org/10.1038/nrc904>
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, GreenblattDM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25: 1605–1612.
- Pérez-González, A., Bévant, K., & Blanpain, C. (2023). Cancer cell plasticity during tumor progression, metastasis and response to therapy. *Nature cancer*, 4(8), 1063-1082.
- Praveen, P., Parameswaran, P., and Majik, M. (2015), Bis(indolyl)methane Alkaloids: Isolation, Bioactivity, and Syntheses, *Synthesis*, 47 (13): 1827–1837, DOI :10.1055/s-0034-1380415.
- Putra, L. A. G., Yonathan, C. J., Niedhatrata, N. I., Firdaus, M. H. R, Yoewono, J. R. (2020). A Review of the Development of Polymerase Chain Reaction Technique and Its Uses in Scientific Field. *Stannum: Jurnal Sains dan Terapan Kimia*, 2 (1): 17-30.
- Rahaju, A. S., & Joewarini, E. (2012). Ekspresi Protein *C-MYC* dan *BCL2* pada Karsinoma Nasofaring Jenis Undifferentiated, Hubungannya dengan T-stage dan N-stage. *Majalah Patologi Indonesia*, 21(2).
- Ramadhana, A., Dewi, S. U., Susilowati, I., & Nuraini, T. (2023). Akupresur sebagai alternatif untuk mengurangi nyeri pasien kanker serviks: Studi kasus. *Jurnal Persatuan Perawat Nasional Indonesia (JPPNI)*, 7(3).
- Ramya, V., Madhu-Bala, V., Prakash-Shyam, K., Gowdhami, B., Sathiya-Priya, K., Vignesh, K., Vani, B., & Kadalmani, B. (2021). Cytotoxic activity of Indigofera aspalathoides (Vahl.) extracts in cervical cancer (HeLa) cells: Ascorbic acid adjuvant treatment enhances the activity. *Phytomedicine Plus*, 1(4), 100142.
- Rejnowicz, E., Batchelor, M., Leen, E., Ahangar, M. S., Richards, M. W., Kalverda, A., & Bayliss, R. (2024). Exploring the dynamics and interactions of the N-myc transactivation domain through solution NMR. *bioRxiv*, 2024-05.
- Renu, K., Abilash, V. G., tirupathi, P. P. B., Arunachalam, S. (2017). Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update. *European Journal of Pharmacology*, 818: 241-253. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.10.043
- Reunanen N, Kähäri VM. (2000-2013) Matrix Metalloproteinases in Cancer Cell Invasion. In: *Madame Curie Bioscience Database*. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000- 2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6598/>
- Rodríguez-González, J., & Gutiérrez-Kobeh, L. (2024). Apoptosis and its pathways as targets for intracellular pathogens to persist in cells. *Parasitology Research*, 123(1), 60.
- Romani, A. M. (2022). Cisplatin in cancer treatment. *Biochemical pharmacology*, 206, 115323.

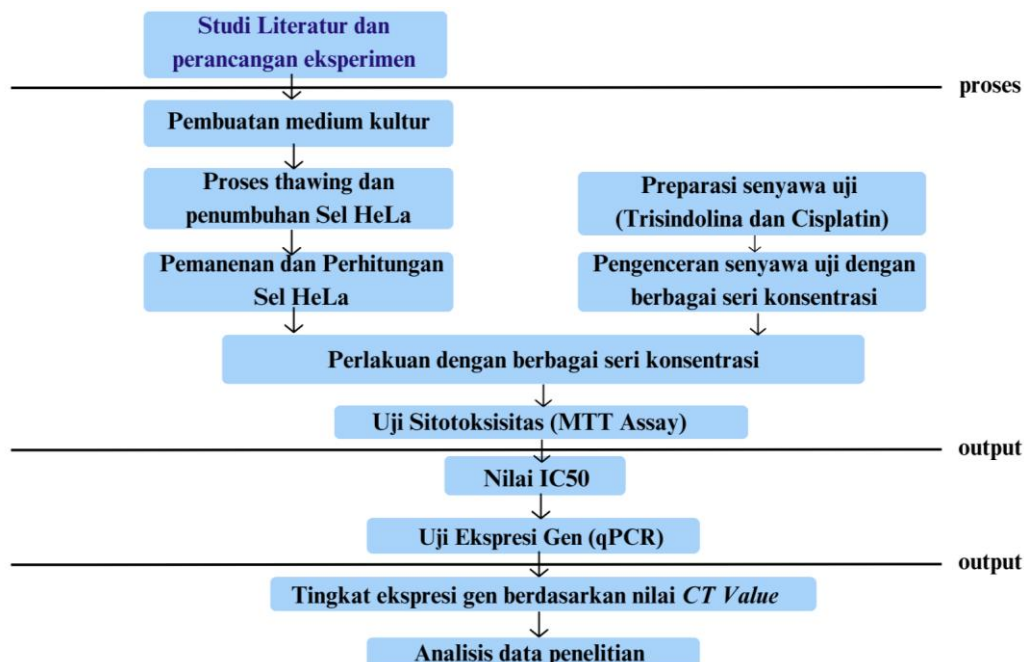
- Rotondo, J. C., Bosi, S., Bassi, C., Ferracin, M., Lanza, G., Gafà, R., Magri, E., Selvatici, R., Torresani, S., Marci, R., Garutti, P., Negrini, M., Tognon, M., & Martini, F. (2015). Gene expression changes in progression of cervical neoplasia revealed by microarray analysis of cervical neoplastic keratinocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 230(4), 806-812.
- Salispriaji, S., Nurhayati, A. P. D., Santoso, M., Wati, F. A. (2024). Effect of Trisindolina-5 Compound on Cancer Stem Cell (CSC) Proliferation in-Vitro. *BIO Web of Conference* 89, 01005, DOI: 0.1051/bioconf/20248901005
- Salsabila, Y. I., Azhaar, N., Fatoni, M., Nurhayati, A. P. D., Shabrina, S., GVinda, A. N. A., * Martah, F. (2022). Upregulation of p53 gene expression on breast cancer stem cells treated with trisindoline 5 compound. *International Journal of Cell and Biomedixal Science*, 1(2): 70-7
- Sammak, S., Hamdani, N., Gorrec, F., Allen, M.D, Freund, S. M. V., Bycroft, M., and Zinzalla, G. (2019). Crystal Structure and Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Apo Form of the C-Myc:Max bHLHZip Complex Reveal a Helicak Basic Region in the Absence of DNA. *Biochemistry*, 58(29):3144-3154 <https://doi/10.1021/acs.biochem.9b00296>
- Santoso, M., Lin, O. L., Aijijiyah, N. P., Wati, F. A., Azminah, A., Annuur, R. M., Fadlan, A., Mustikasari, K., Huda, N., and Judeh, Z. M. A. (2021), Synthesis, α -glucosidase Inhibition, α -amylase Inhibition and Molecular Docking Studies of 3,3-di(indolyl)indolin-2-ones, *Research Square Preprints*, DOI: 10.21203/rs.3.rs-486324/v1.
- Saputra, R., Rosalinda, R., Rahman, S., Aliska, G. (2023). Ototoksisitas akibat Penggunaan Cisplatin dan Pendekatan Otoprotektif untuk Pencegahannya. *Jurnal Otorinolaringologi Kepala dan Leher Indonesia*, 2(1):75-87.
- Sauter, E. R. (2020). Cancer prevention and treatment using combination therapy with natural compounds. *Expert review of clinical pharmacology*, 13(3), 265-285.
- Sell, S. (2004). *Stem cell origin of cancer and differentiation therapy*. Critical reviews in oncology/hematology, 51(1), 1-28.
- Shafiee, M. A. M., Asri, M. A. M., & Alwi, S. S. S. (2021). Review on the In Vitro Cytotoxicity Assessment in Accordance to the International Organization for Standardization (ISO). *Malaysian Journal of Medicine & Health Sciences*, 17(2).
- Shahib, N. M., Budiman, B., Feranty, Z. A. (2015) Studies on gene expression at the RNA level associated with the senile lens change in human lens cataract. *DJMMS*. 2(3):11–8.
- Shakeri, R., Kheirollahi, A., & Davoodi, J. (2021). Contribution of *APAF-1* to the pathogenesis of cancer and neurodegenerative diseases. *Biochimie*, 190, 91-110.
- Shams, M. J., Talukdhar, S. K., Nargis, M. H., Ghosh, M., Rahman, M. M., Hasan, M. Z., ... & Bhuiyan, M. Z. R. (2023). Comparative outcome of cisplatin-capecitabine regimen with oxaliplatin-capecitabine regimen in advanced gastric carcinoma: a quasi-experimental study. *Bangabandhu Sheikh Mujib Medical University Journal*, 15(3), 180-185.
- Shiraishi, T., & Sato, K. (2024). Real-time imaging of intracellular deformation dynamics in vibrated adherent cell cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 121(10), 3034-3046.
- Shoffi N, Romdhoni A. (2013) Peran Cisplatin Pada Kejadian Senescence Sel Kanker. *J THT-KL*. 6:125–33.
- Singh, S. (2013). Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radic. Biol. Med.* 56, 89–101.

- Song, X., Liu, C., Wang, N., Huang, H., He, S., Gong, C., & Wei, Y. (2021). Delivery of CRISPR/Cas systems for cancer gene therapy and immunotherapy. *Advanced drug delivery reviews*, 168, 158-180.
- Stark, Holger & Zivkovic, Aleksandra. (2018). HPV Vaccination: Prevention of Cervical Cancer in Serbia and in Europe. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 35. 5-16. 10.2478/afmnai-2018-0001.
- Tu, H. C., Ren, D., Wang, G. X., Chen, D. Y., Westergard, T. D., Kim, H., & Cheng, E. H. Y. (2009). The p53-cathepsin axis cooperates with ROS to activate programmed necrotic death upon DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(4), 1093-1098.
- Uggioni, M. L. R., Feuser, P. E., Possato, J. C., de Melo, M. E., De Pieri, E., Cercena, R., & Machado-de-Avila, R. A. (2022). Synergic effect of paclitaxel and cisplatin associated with gold nanoparticles on HeLa cervical cells. *Gold Bulletin*, 55(1), 65-75.
- van den Boogaard, W. M., Komninos, D. S., & Vermeij, W. P. (2022). Chemotherapy side-effects: not all DNA damage is equal. *Cancers*, 14(3), 627.
- Villain E. W. C, Collins, S., Young, C., Young, L.S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues - ProQuest. *Nat Rev Cancer* 7:11–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2050>
- Vine, L. K., Matesic, L., Locke, J. M., dan Scropteta, D. (2013). Recent highlights in the development of isatin-based anticancer agents. *Advanced in Anticancer agents in medicinal chemistry*, 127; 303-319
- Vitaku, E., Smith, D. T., and Njardarson, J. T. (2014), Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among U.S. FDA Approved Pharmaceuticals, *Journal of Medicinal Chemistry* 57 (24): 10257–10274, DOI :10.1021/jm501100b.
- Wati, F. A., Santoso, M., Moussa, Z., Fatmawati, S., Fadlan, A., and Judeh, Z. M.A. (2021), Chemistry of Trisindolines: Natural Occurrence, Synthesis and Bioactivity, *RSC Advances* 11: 25381-25421, DOI: 10.1039/d1ra03091d.
- Wang, R., Sun, Q., Wang, P., Liu, M., Xiong, S., Luo, J., Huang, H., Du, Q., Geller, D. A., & Cheng, B. (2016). Notch and Wnt/ β -catenin signaling pathway play important roles in activating liver cancer stem cells. *Oncotarget*, 7(5), 5754.
- Wang A, Tian X, Yu J, Mi J, Liu H, Wang R. (2012) Celecoxib Radiosensitizes the Human Cervical Cancer HeLa Cell Line via a Mechanism Dependent on Reduced Cyclo-Oxygenase-2 and Vascular Endothelial Growth Factor C Expression. *Journal of International Medical Research*. 40(1):56-66. doi:10.1177/147323001204000106
- Wang, X., Zou, C., Zhang, Y., Li, X., Wang, C., Ke, F., Chen, J., Wang, W., Wang, D., Xu, Y., Xie, L., & Zhang, Y. (2021). Prediction of BRCA gene mutation in breast cancer based on deep learning and histopathology images. *Frontiers in Genetics*, 12, 661109.
- Wati, F. A. (2021). *Pengembangan Senyawa-senyawa Heterosiklik Nitrogen sebagai Antituberkulosis dan Antikanker* (Doctoral dissertation, Institut Teknologi Sepuluh Nopember).
- Wati, F. A., Santoso, M., Moussa, Z., Fatmawati, S., Fadlan, A., & Judeh, Z. M. (2021). Chemistry of trisindolines: natural occurrence, synthesis and bioactivity. *RSC advances*, 11(41), 25381-25421.
- Weigelin, B., den Boer, A. T., Wagena, E., Broen, K., Dolstra, H., de Boer, R. J., ... & Friedl, P. (2021). Cytotoxic T cells are able to efficiently eliminate cancer cells by additive cytotoxicity. *Nature communications*, 12(1), 5217.
- Wolff, G. S. V. J, de Medeiros, F. TAA. (2012). Human Papillomavirus: Biology and Pathogenesis. In: Broeck DV (ed), Human Papillomavirus and Related Diseases - From

- Bench to Bedside - A Clinical Perspective. ISBN 978-953-307-860-1, *InTech*. 3–40. <https://doi.org/10.5772/27154>
- Woodworth, C. D., & Simpson, S. (1993). Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines. *The American journal of pathology*, 142(5), 1544.
- World Health Organization (WHO). (2024). Cervical Cancer Awareness Month 2024. *Health Topics*.
- Wu, D., Li, Y., Xu, P., Fang, Q., Cao, F., Lin, H., ... & Liu, X. (2024). Neoadjuvant chemo-immunotherapy with camrelizumab plus nab-paclitaxel and cisplatin in resectable locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a pilot phase II trial. *Nature communications*, 15(1), 2177.
- Yang, N. & Sheridan, A. M. (2014). *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, 753-758. DOI: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00273-6
- You, W., Zhou, T., Knoops, K., Berendschot, T. T., van Zandvoort, M. A., Germeraad, W. T., & Gorgels, T. G. (2023). Stressed neuronal cells can recover from profound membrane blebbing, nuclear condensation and mitochondrial fragmentation, but not from cytochrome c release. *Scientific reports*, 13(1), 11045.
- Yuan, T., Sun, J., Tian, J., Hu, J., Yin, H., & Yin, J. (2021). Involvement of ABC transporters in the detoxification of non-substrate nanoparticles in lung and cervical cancer cells. *Toxicology*, 455, 152762
- Yuliet, Y., Lestari, L., Putri, D. M., Kaerati, K., Ihwan, I. (2024). Toxicity and anticancer analysis of Hibiscus surattensis L. Leaf extract. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 1(2): 401-407.
- Yusuf, Z. K. (2010). Polymerase Chain Reaction. *Saintek* 5(6):7-18
- Yoo, M., Choi, S., Choi, K. Y., Yon, G. H., Chae, J., Kim, D., Zylstra, G. J., and Kim, E. (2008). Trisindoline Synthesis and Anticancer Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376: 96-99, DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.08.092.
- Zhang, T., Li, N., Sun, C., Jin, Y., & Sheng, X. (2020). MYC and the unfolded protein response in cancer: synthetic lethal partners in crime? *EMBO Molecular Medicine*, 12(5), e11845.
- Zhou, Junfang & Fang, Wenhong & Yang, Xianle & Zhou, Shuai & Hu, Linlin & Li, Xincang & Qi, Xinyong & Su, Hang & Xie, Layue. (2012). A Nonluminescent and Highly Virulent *Vibrio harveyi* Strain Is Associated with “Bacterial White Tail Disease” of *Litopenaeus vannamei* Shrimp. *PloS one*. 7. e29961. 10.1371/journal.pone.0029961.
- Zhou, X. (2024). Recent advances of tryptanthrin and its derivatives as potential anticancer agents. *RSC Medicinal Chemistry*, 15(4), 1127-1147.
- Zhu, H., and Sun, A. (2018). Programmed Necrosis in Heart Disease: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 116; 125-134. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.01.018
- Zhu, Y., Kang, E., Wilson, M., Basso, T., Chen, E., Yu, Y., & Li, Y. R. (2022). 3D tumor spheroid and organoid to model tumor microenvironment for cancer immunotherapy. *Organoids*, 1(2), 149-167
- Zur Hausen H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev*. 2(5):342–50. <https://doi.org/10.1038/nrc798>

LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian



Lampiran 2. Perhitungan Larutan Stok Trisindolina-5

Larutan stok trisindolina 5 dengan konsentrasi 100.000 µg/ml dibuat dengan melarutkan serbuk trisindolina 5 sebanyak 20 mg dengan 100 µl pelarut DMSO dalam *microtube*. Volume DMSO yang dibutuhkan dihitung dengan cara sebagai berikut,

- Konsentrasi larutan stok trisindolina 5 = 100.000 µg/ml
- Massa trisindolina 5 = 20 mg = 0,02 g.
- Mr trisindolina 5 = 497,47 g/mol

Lampiran 3. Pengenceran Larutan Trisindolina-5 untuk Uji MTT

Pengenceran stok larutan trisindolina dilakukan dengan pengenceran bertingkat dua kali lipat, dimana setiap seri pengenceran dibutuhkan 100 µl/sumuran, sehingga:

Volume yang dibutuhkan = 100 µl/sumuran x 4 ulangan
= 400 µl ≈ 500 µl (dibuat lebih)

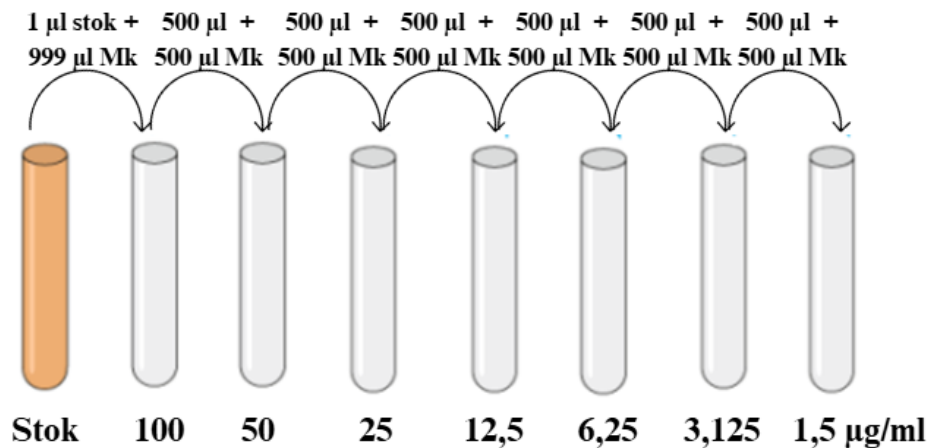
Karena 2 kali lipat maka = 500 µl x 2 = 1000 µl

Sementara untuk pengenceran dihitung dari konsentrasi paling tinggi yakni 100 µg/ml dengan volume yang diinginkan adalah 1000 µl. Berikut perhitungan menggunakan rumus:

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

- $V1 \times 100.000 \mu\text{g/ml} = 1000 \mu\text{l} \times 100 \mu\text{g/ml}$
- $V1 = 100.000 / 100.000$
- $V1 = 1 \mu\text{l}$
-

Sehingga untuk membuat larutan stok dengan konsentrasi $100 \mu\text{g/ml}$, dilarutkan $1 \mu\text{l}$ larutan stok Trisindolina-5 dalam $999 \mu\text{l}$ medium komplet RPMI. Pengenceran berseri dari larutan Trisindolina-5 dengan volume yang akan digunakan dalam penelitian ini dapat diilustrasikan sebagai berikut.



Komposisi Medium RPMI 1640 (MK) mengandung zat pereduksi *glutathione* serta biotin, vitamin B12, dan PABA yang merupakan vitamin. Selain itu, media RPMI 1640 mengandung vitamin inositol dan kolin dalam konsentrasi tinggi. Media ini biasanya dilengkapi dengan serum sapi janin (FBS). Larutan *buffer* yang digunakan dalam RPMI 1640 memungkinkan pemeliharaan pH fisiologis dalam lingkungan CO_2 5%

Lampiran 4. Pengenceran Larutan Cisplatin untuk Uji MTT

Pengenceran stok larutan cisplatin dilakukan dengan pengenceran bertingkat dua kali lipat, dimana setiap seri pengenceran dibutuhkan $100 \mu\text{l}$ /sumuran, sehingga:

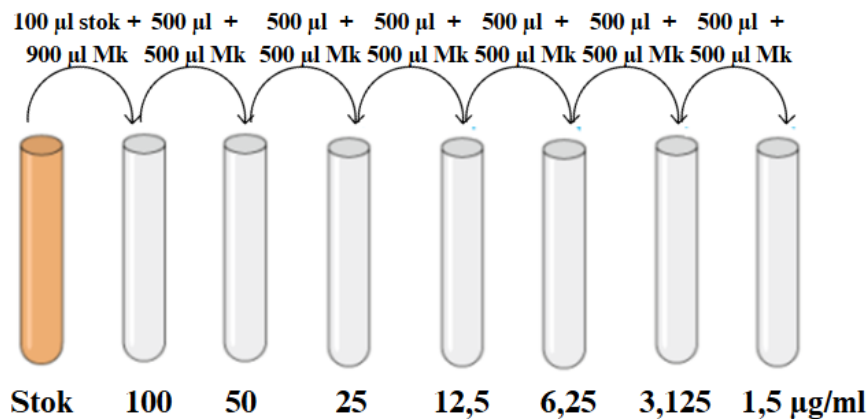
- Volume yang dibutuhkan ($V2$) = $100 \mu\text{l}$ (kali 4 untuk tiap sumuran = $100 \times 4 = 400 \mu\text{l}$)
- $400 \mu\text{l} \approx 500 \mu\text{l}$ (digenapkan)
- Dibuatkan larutan stok ($M1$), sehingga $500 \mu\text{l} \times 2 = 1000 \mu\text{l}$
- Konsentrasi Cisplatin ($V1$) = $1000 \mu\text{l}$

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

Dengan menggunakan rumus di atas, dihitung volume cisplatin yang akan digunakan untuk membuat larutan stok.

- $V1 \times 1000 \mu\text{l} = 1000 \mu\text{l} \times 100 \mu\text{g/ml}$
- $V1 = 100.000 / 1000$
- $V1 = 100 \mu\text{l}$

Sehingga didapatkan $100 \mu\text{l}$ untuk dilarutkan ke dalam $900 \mu\text{l}$ medium komplet RPMI untuk membuat larutan stok, kemudian seri pengenceran dibuat seperti ilustrasi dibawah.



Lampiran 5. Pengenceran Reagen MTT

Perlakuan dengan reagen MTT membutuhkan 100 µl reagen/*well*. Maka volume total yang dibutuhkan untuk 68 (≈ 70) sumuran adalah:

- Volume total = $100 \times 70 = 7000 \mu\text{l}$
- Konsentrasi reagen MTT *assay* yang tersedia (M_1) = $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
- Konsentrasi yang dibutuhkan dalam uji MTT (M_2) = 0.5

sementara perlakuan yang dibutuhkan adalah MTT dengan konsentrasi 0,5 mg/ml sehingga perhitungan pengenceran dilakukan dengan rumus.

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

- $V_1 \times 5 = 7000 \times 0,5$
- $V_1 = 700 \mu\text{l}$ larutan stok dalam 300 µl medium

Lampiran 6. Hasil Pembacaan Absorbansi Sel HeLa dengan Perlakuan Trisindolina-5 Inkubasi 24 Jam

Rata-Rata Absorbansi	% Sel Hidup	Hambatan	Maksimal	SD
0,7285	66,6667	33,3333	100	0,0049
0,7370	67,5748	32,4252	100	0,0000
0,7557	69,5691	30,4309	100	0,1318
0,7893	73,1660	26,8340	100	0,1366
0,8320	77,7244	22,2756	100	0,0904
0,8585	80,5556	19,4444	100	0,0064
0,9830	93,8568	6,1432	100	0,0410

Well Plate	Absorbansi Trisindolina-5			
Konsentrasi	1	2	3	4
100	0,865	0,732	0,725	0,745
50	0,737	0,549	0,57	0,584
25	0,904	0,746	0,652	0,711
12,5	0,944	0,828	0,739	0,685
6,25	0,936	0,788	0,666	0,772
3,175	0,863	0,854	0,776	0,783
1,5	1,019	0,954	1,012	1,021

Lampiran 7. Hasil Pembacaan Absorbansi Sel HeLa dengan perlakuan Cisplatin inkubasi 24 jam

Rata-Rata Absorbansi	% Sel Hidup	Hambatan	Maksimal	SD
0,1763	7,6745	92,3255	100	0,0055
0,1920	9,3483	90,6517	100	0,0125
0,2610	16,7201	83,2799	100	0,0910
0,2938	20,2190	79,7810	100	0,0405
0,4277	34,5264	65,4736	100	0,0339
0,6090	53,8996	46,1004	100	0,0151
0,8150	75,9081	24,0919	100	0,0028

Well Plate	Absorbansi Cisplatin			
Konsentrasi	1	2	3	4
100	0,18	0,17	0,168	0,179
50	0,188	0,182	0,182	0,206
25	0,192	0,205	0,366	0,212
12,5	0,271	0,252	0,343	0,309

6,25	0,386	0,464	0,397	0,422
3,175	0,52	0,597	0,604	0,626
1,5	0,86	0,813	0,833	0,817

Lampiran 8. Mencari nilai IC50 menggunakan SPSS

1. Nilai absorbansi yang didapatkan (4 kali replikasi) dihitung nilai rata-ratanya
2. Rata-rata absorbansi selanjutnya digunakan untuk menentukan persen sel hidup dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Sel hidup} = \frac{(\text{Absorbansi rata - rata senyawa uji} - \text{Absorbansi kontrol media})}{(\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media})} \times 100\%$$

- 3.
4. Setelah didapatkan persen sel hidup, dihitung persen penghambatan dengan cara mengurangi 100% dengan persentase sel hidup
5. Untuk mencari nilai IC50 digunakan aplikasi SPSS dengan memasukkan data konsentrasi, persen penghambatan dan maksimal (100)
6. Selanjutnya pilih *Analyze*, pilih *Regression* kemudian pilih *Probit*
7. Data persen penghambatan dimasukkan kedalam *Response Frequency*, data maksimal dimasukkan kedalam *Total Observed* dan data konsentrasi senyawa dimasukkan kedalam *Covariate*. Selanjutnya klik *Transform* dan pilih *Log base 10*.
8. Nilai IC50 diperoleh dengan cara mencocokkan nilai persen penghambatan dengan tabel probit

TRISINDOLINA HELA			
Confidence Limits			
95% Confidence Limits for Konsentrasi			
Probability		Estimate	Lower Bound Upper Bound
PROBIT*	.010	25093828.688	
	.020	6642327.964	
	.030	2858089.640	
	.040	1515529.512	
	.050	904601.053	
	.060	583051.035	
	.070	396694.045	
	.080	280997.501	
	.090	205356.235	
	.100	153865.259	
	.150	46567.870	
	.200	18011.859	
	.250	7973.452	
	.300	3835.503	
	.350	1946.754	
	.400	1022.936	
	.450	548.865	
	.500	297.419	
	.550	161.166	
	.600	86.475	
	.650	45.439	
	.700	23.063	
	.750	11.094	
	.800	4.911	
	.850	1.900	
	.900	0.575	
	.910	0.431	
	.920	0.315	
	.930	0.223	
	.940	0.152	
	.950	0.098	
	.960	0.058	
	.970	0.031	
	.980	0.013	
	.990	0.004	

a. A heterogeneity factor is used.

No.	Senyawa	IC50 (µg/ml)	R ²
1	Trisindolina-5	297.42	0.234
2	Cisplatin	3.78	0.457

Lampiran 9. Pengenceran Senyawa Trisindolina-5 untuk Uji qPCR

Perhitungan seri konsentrasi Trisindolina-5 diawali dengan membuat larutan stok awal dengan konsentrasi 800 μM (4 IC₅₀) sebagai berikut.

- Konsentrasi awal Trisindolina-5 (M_1) = 100.000
- Konsentrasi yang diinginkan (M_2) = 800 μM
- Volume akhir yang diinginkan (V_2) = 10 ml / 10.000 μl
- $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$
- $V_1 \times 100.000 = 10.000 \mu\text{l} \times 800$
- $V_1 = 80 \mu\text{l}$

Untuk membuat larutan stok Trisindolina-5 sebanyak 10 ml dengan konsentrasi 800 μM , dibutuhkan sebesar 80 μL senyawa Trisindolina-5 untuk dilarutkan ke 9980 μL medium komplit pada tabung pertama sebagai larutan stok. Sehingga, untuk membuat konsentrasi 400 μM (2 IC₅₀), 200 μM (IC₅₀), dan 100 μM (1/2IC₅₀), akan dilarutkan sebanyak 5 mL dari tube larutan stok ke tube berikutnya yang sudah diisi dengan 5 mL medium komplit RPMI, lalu disuspensikan. Tahap tersebut direpetisi shingga ke tabung terakhir yang ke-empat.

Lampiran 10. Pengenceran Cisplatin untuk Uji qPCR

Konsentrasi Cisplatin yang digunakan dalam uji qPCR sesuai dengan hasil uji sitotoksisitas (IC₅₀) yaitu 3.78 $\mu\text{g/ml}$ digenapkan menjadi 5 $\mu\text{g/ml}$. Sehingga dilakukan perhitungan untuk mendapatkan volume Cisplatin yang harus ditambahkan dalam 5 ml medium komplit sebagai berikut.

- Konsentrasi awal Cisplatin (M_1) = 1000 μM
- Konsentrasi yang diinginkan (M_2) = 5 μM
- Volume akhir yang diinginkan (V_2) = 5 mL / 5.000 μL
- $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$
- $V_1 \times 1000 = 5.000 \times 5$
- $V_1 = 25 \mu\text{L}$

Sehingga, untuk membuat larutan senyawa Cisplatin dengan konsentrasi 5 μM diperoleh dengan menambahkan 25 μL Cisplatin dengan 5 mL medium komplit. Kemudian keduanya disuspensikan.

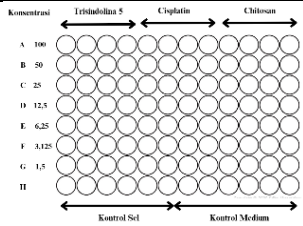
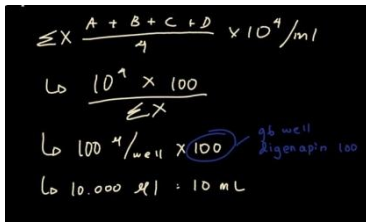
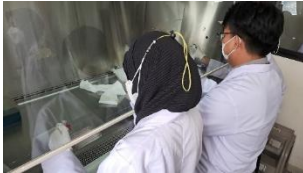
Lampiran 11. Hasil Analisa Data Ekspresi Gen *c-Myc*

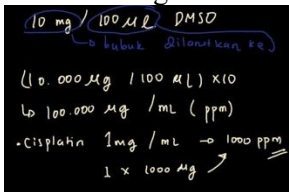
Sampel	GAPDH Ct	Gen Target	Gen Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	<i>Normalized Target Gene Relative to GAPDH 2-$\Delta\Delta Ct$</i>
Kontrol Sel	18.60	<i>C-Myc</i>	32.37	13.77	0	1
$\frac{1}{2}$ IC ₅₀	20.17	<i>C-Myc</i>	29.61	9.44	-4.33	20.11
IC ₅₀	17.08	<i>C-Myc</i>	30.06	12.98	-0.79	1.73
2 IC ₅₀	17.72	<i>C-Myc</i>	30.25	12.53	-1.24	2.36
4 IC ₅₀	17.90	<i>C-Myc</i>	30.62	12.72	-1.05	2.07
Cisplatin	18.90	<i>C-Myc</i>	34.95	16.05	-2.28	0.21

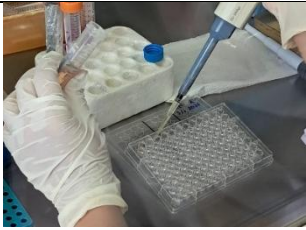
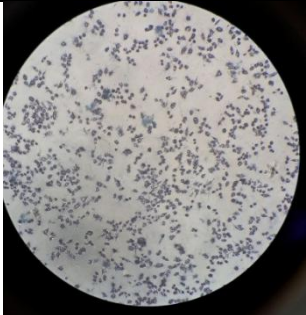
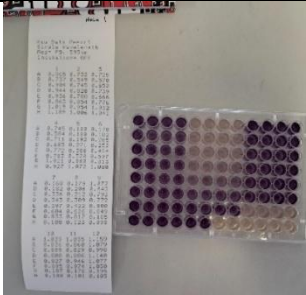
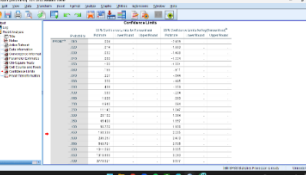
Lampiran 12. Hasil Analisa Data Ekspresi Gen *APAF-1*

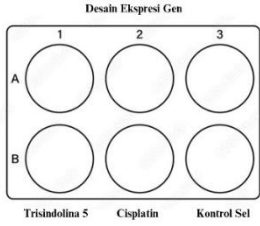
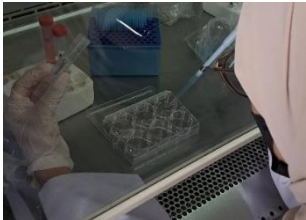
Sampel	GAPDH Ct	Gen Target	Gen Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	<i>Normalized Target Gene Relative to GAPDH 2-$\Delta\Delta Ct$</i>
Kontrol Sel	18.60	<i>APAF-1</i>	25.54	6.94	0	1
$\frac{1}{2}$ IC ₅₀	17.90	<i>APAF-1</i>	28.43	10.53	3.59	0.083
IC ₅₀	17.72	<i>APAF-1</i>	28.47	10.75	3.81	0.071
2 IC ₅₀	17.08	<i>APAF-1</i>	28.14	11.06	4.12	0.057
4 IC ₅₀	20.17	<i>APAF-1</i>	27.41	7.24	0.3	0.812
Cisplatin	18.90	<i>APAF-1</i>	24.76	5.84	1.08	0.473

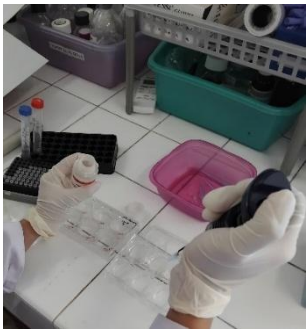
Lampiran 13. Dokumentasi Penelitian

Tanggal	Dokumentasi	Keterangan
3 Februari 2025		Design Well Plate Sel HeLa perlakuan Trisindolina-5 dan Cisplatin
		Panen sel HeLa dilakukan dengan, tahap berikut: 1. Medium pada cawan petri dibuang, kemudian sel dibilas dengan PBS (Phosphate Buffer Serum) untuk menghilangkan sisa medium pada cawan petri 2. Diberikan Tripsin EDTA 500 µl untuk melepaskan sel dari cawan petri 3. Inkubasi 3-5 menit untuk melepaskan sel 4. Tripsin dibuang, ditambahkan medium RPMI (Medium Roswell Park Memorial Institute) sampai permukaan capet tertutup
		Dilakukan perhitungan sel dengan langkah sbg berikut: 1. Ambil 10 µl sel dan diletakkan di haemocytometer 2. Hitung menggunakan hand tally counter 3. Rumus 
		Sel dipindahkan ke dalam 96 wellplate: 1. Sel dalam tabung konikal 10 ml dipindahkan ke dalam 1 plate wellplate yang isinya 100 µl (sel+media) 2. Wellplate di Inkubasi 12-24 jam

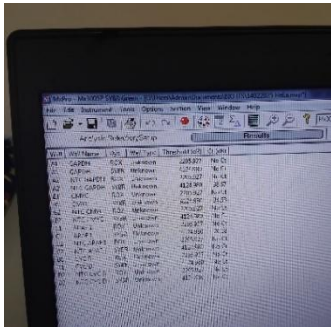
		3. Dilakukan preparasi senyawa uji dengan pengenceran menggunakan DMSO dihitung dengan rumus sebagai berikut: 
4 Februari 2025		Pengenceran melalui larutan stok dilakukan dengan cara sebagai berikut: 1. <i>Cryovial tube</i> disiapkan ke wadah <i>cryovial</i> 2. Medium Komplit (MK) dituang ke tabung konikal sampai tabung konikal penuh 3. Microtube sampel disejajarkan 4. Sebanyak 500 µl MK dipipet ke masing-masing <i>cryovial tube</i> 5. Ditambahkan lagi sebanyak 500 µl MK ke masing-masing <i>cryovial tube</i> (kecuali sampel cisplatin) 6. Pada <i>cryovial tube</i> sampel cisplatin, ditambahkan 400 µl MK 7. Larutan sampel diencerkan dengan mensuspensikan dari konsentrasi tinggi ke rendah (Sampel diambil sebanyak: Trisindolina-5 1 µl, Cisplatin 100 µl)
		Perlakuan paparan sel menggunakan senyawa uji dilakukan dengan sbg berikut: Diambil wellplate berisi sel Hela & T47D yang telah diinkubasi selama 24 jam Media dibuang ke wadah pembuangan Dari masing-masing <i>cryovial tube</i> berisi sampel yang telah disiapkan, diambil 100 µl sampel berdasarkan dari pengenceran rendah ke tinggi dan dilakukan 4 kali pengulangan
5 Februari 2025		Pengamatan morfologi sel menggunakan mikroskop inverted
		MTT Assay dilakukan dengan sebagai berikut:

		1. Medium pada <i>wellplate</i> dibuang dan dibersihkan dengan tisu kering 2. Disiapkan larutan homogen 1 ml MTT dengan 9 ml medium (RPMI) pada <i>falcon tube</i> 3. Setelah homogen, larutan MTT diambil 100 μl untuk dimasukkan di setiap well pada <i>wellplate</i> 4. <i>Wellplate</i> ditutup dan diinkubasi selama 4 jam
		Pengamatan Morfologi sel setelah diberikan MTT <i>assay</i> serta pengamatan terhadap terbentuknya kristal formazan
		Dilakukan pemberian SDS <i>stopper</i> setiap well pada 96 sumuran <i>wellplate</i> sebanyak 100 μ l
		Dilakukan inkubasi di tempat gelap dengan suhu ruang dengan meletakkan 96 Wellplate tempat gelap dengan suhu ruang selama semalam
6 Februari 2025		Dilakukan pembacaan absorbansi sel menggunakan elisa reader.
		IC50 dihitung menggunakan SPSS analisis probit

10 Februari 2025	 Desain Ekspresi Gen 1 2 3 A B Trisindolina 5 Cisplatin Kontrol Sel	Dibuat design 6 wellplate untuk ekspresi gen dengan perlakuan Trisindolina-5 konsentrasi 4 IC50, 2IC50, IC50, dan ½ IC50
		Sel HeLa yang telah konfluen dipanen untuk pengujian ekspresi gen
		Plating sel HeLa dilakukan dengan menambahkan 500 µl Sel HeLa ke dalam 6 wellplate, serta 2 mL Medium Komplit RPMI
		Dilakukan inkubasi dengan menaruh wellplate ke dalam oven dengan suhu 37°C dan konsentrasi CO2 5%
12 Februari 2025		Pengenceran senyawa uji untuk paparan dilakukan dengan: Flacon disiapkan ke wadah flacon Medium RPMI dituang ke tabung flacon hingga 10 ml pada flacon 1 dan 5 ml pada flacon 2,3, dan 4 Flacon 1 diisi 80 µl Trisindolina dan di suspensi Sebanyak 500 µl medium RPMI+ senyawa dipipet ke masing-masing flacon untuk dilakukan pengenceran Pada flacon sampel cisplatin, ditambahkan 5 µl cisplatin Larutan sampel disuspensi
		Diambil 6 wellplate berisi sel Hela dan medium yang telah diinkubasi selama 24 jam Media dibuang ke wadah pembuangan dan di lap tisu Dari masing-masing flacon berisi sampel yang telah disiapkan, diambil 2 ml sampel

		berdasarkan dari pengenceran rendah ke tinggi dan dilakukan 2 kali pengulangan Wellplate ditutup dan diberi label kemudian wellplate diinkubasi
13 Februari 2025		Morfologi Sel HeLa (Kontrol Sel dan Perlakuan) diamati dibawah mikroskop inverted dengan perbesaran 100x
		Preparasi Isolasi RNA dari kultur sel dilakukan dengan: 1. Disiapkan kit Isolasi RNA menggunakan merk <i>Kit GENAID</i>. 2. Area kerja disterilkan menggunakan alkohol dan dilap menggunakan tissue
	 	Ekstraksi RNA dilakukan dengan mempersiapkan 6 mikrotube: 1. Medium dalam wellplate berisi sampel sel dibuang ke wadah buangan 2. Sampel dalam tiap sumuran dibilas menggunakan PBS sebanyak 1 mL untuk menghilangkan sisa-sisa media, lalu dibuang kembali ke wadah buangan 3. Sebanyak 400 μl RB Buffer + 4 μl <i>Merapto</i> di pipetkan ke dalam tiap sumuran, kemudian disuspensikan untuk melisiskan membran sel 4. Inkubasi selama 5' menit 5. Diberikan masing-masing tiap sumuran 400 μl Ethanol untuk mengikat RNA 6. Dari tiap sumuran, larutan sampel dipindahkan ke RB column dan diberi kode 7. RB Column berisi sampel dicentrifuge dengan rpm 10.000 selama 2 menit 8. Ditambahkan larutan W1 buffer sebanyak 400μl

		9. sampel dicentrifuge dengan rpm 10.000 selama 1 menit, larutan bagian bawah RB column dibuang 10. Ditambahkan larutan Wash buffer sebanyak 600µl 11. sampel dicentrifuge dengan rpm 10.000 selama 1 menit, larutan bagian bawah RB column dibuang 12. Ditambahkan larutan wash buffer sebanyak 600µl 13. sampel dicentrifuge dengan rpm 10.000 selama 4 menit, larutan bagian bawah RB column dibuang 14. Bagian atas RB column dipindahkan ke tube 1,5 mL baru 15. Ditambahkan elution buffer sebanyak 50µl lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit 16. Sampel dicentrifuge selama 1 menit dengan 10.000 rpm
		6 Sampel dilakukan pembacaan RNA yang ditambahkan <i>elution buffer</i> pada alat NanoDrop. Hasil yang didapatkan berupa nilai absorbansi untuk uji ekspresi gen
		Sintesis Kit Protokol SensiFAST cDNA menggunakan alat PCR T100 Thermal Cycler Bio-Rad dilakukan dengan: 1. Mempersiapkan master mix diatas es 2. Larutan disentrifuge untuk mencampurkan larutan sebagai berikut: - mRNA 2 µl - 5X TransAmp Buffer 28 µl - Reverse transcriptase 7 µl - Nuclease Free Water 91 µl 3. Disuspensikan dengan vorteks 4. Menyiapkan alat PCR T100 <i>Thermal Cycler</i> - <i>Bio-Rad</i> dengan mengatur suhu dan lama waktu sebagai berikut : - 25°C selama 10 menit (<i>annealing</i>) - 42°C selama 15 menit (<i>reverse transcription</i>) - 85°C selama 5 menit (inaktivasi)

		Persiapan Kit Sintesis Primer dilakukan dengan: 1. Menata primer forward dan <i>reverse</i> pada wadah serta diberi label 2. Menyiapkan tube kecil ukuran 1,5 ml untuk dilakukan pengenceran primer dengan penambahan NFW (<i>Nuclease Free Water</i>) sesuai dengan lembar yang tercantum 3. Tube ditutup dan disimpan di kulkas dengan suhu -20°C
14 Februari 2025	 	Ditambahkan template primer: 1. Disiapkan 8 mikrotube sebanyak 4 untuk DNA kontrol sel dan 4 berisi NTC (<i>no template control</i>) berisi <i>nuclease free water</i> 2. Diambil sampel SYBR sebanyak 10 µl dan dimasukkan di 8 mikrotube 3. Dimasukkan sampel <i>Forward</i> 1 µl dan <i>reverse</i> 1 µl pada setiap 8 mikrotube 4. Dimasukkan DNA kontrol sel 2 µl pada 4 <i>microtube</i> sebagai kontrol sel 5. Dimasukkan DHO/ NTC pada 8 mikrotube sebagai larutan pengencer dan pembanding 6. Setelah semua tercampur maka di sentrifuse agar larutan tercampur sempurna 7. Jika sudah mix sempurna maka dipindahkan sebanyak 20 µl ke tube strip PCR dan diberi label Tube strip siap dimasukkan ke mesin PCR
		Running mesin PCR dengan: 1. Mencari literatur referensi suhu PCR masing-masing sampel primer 2. Buka aplikasi PCR dan Pilih plateau 1 3. Atur thermal profile status dengan menyesuaikan suhu serta lama waktu saat proses PCR 4. Pilih <i>running-start</i> dan tunggu hingga keluar hasil analisis nilai Ct

BIOGRAFI PENULIS



Penulis dilahirkan di Jakarta Utara, pada tanggal 22 Desember 2003. Penulis memulai pendidikan pada jenjang Sekolah Dasar di SD 05 Semper Barat, SMPN 84 Jakarta, dan SMAN 52 Jakarta. Penulis melanjutkan pendidikan S1 Biologi, Fakultas Sains dan Analitika Data, Institut Teknologi Sepuluh Nopember tahun 2021 dengan bidang minat Zoologi (Onkologi). Penulis aktif mengikuti organisasi mahasiswa tingkat fakultas seperti BEM FSAD ITS Kabinet Double Helix 2023/2024 sebagai Staf Divisi Harmonisasi, Departemen Dalam Negeri dan memegang peran sebagai ketua pelaksana pada program kerja internalisasi pengurus BEM FSAD. Penulis juga aktif mengikuti berbagai kepanitiaan dalam acara yang diselenggarakan pada lingkup fakultas seperti pameran keilmiahan FSAD FAIR 2022, dan AKSI NIRWASITA 2.0.

Penulis pernah melaksanakan penelitian di Laboratorium Parasitologi, Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran dan Kesehatan Masyarakat, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta pada tahun 2025. Penulis dapat dihubungi untuk kegiatan penelitian di alamat email rahmastyan@gmail.com.