

**UTILITAS SENYAWA *FLAVONOID* KULIT DURIAN (*DURIO
ZIBETHINUS MURR.*) SEBAGAI STIMULATOR APOPTOSIS
PADA SEL *HELA* KANKER SERVIKS:
STUDI *IMMUNOFLUORESCENCE***

SKRIPSI



Oleh:

**ADITYA SOFYANSYAH HERMAYA
(2108260124)**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
MEDAN
2025**

**UTILITAS SENYAWA *FLAVONOID* KULIT DURIAN (*DURIO
ZIBETHINUS MURR.*) SEBAGAI STIMULATOR APOPTOSIS
PADA SEL *HELA* KANKER SERVIKS:
STUDI *IMMUNOFLUORESCENCE***

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh kelulusan
Sarjana Kedokteran**



Oleh:

**ADITYA SOFYANSYAH HERMAYA
(2108260124)**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
MEDAN
2025**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertandatangan dibawah ini menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan benar

Nama : Aditya Sofyansyah Hermaya
NPM : 2108260124
Judul Skripsi : Utilitas Senyawa *Flavonoid* Kulit Durian (*Durio Zibethinus Murr.*) Sebagai Stimulator Apoptosis Pada Sel *Hela* Kanker Serviks : Studi *Immunofluorescence*

Demikianlah pernyataan ini saya perbuat, untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Medan, 17 Februari 2025



Aditya Sofyansyah Hermaya



MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI, PENELITIAN & PENGEMBANGAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Gedung Arca No. 53 Medan 20217 Telp. (061) 7350163 – 7333162 Ext.20 Fax. (061) 7363488
Website : fk@umsu.ac.id



HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Aditya Sofyansyah Hermaya

NPM : 2108260124

Judul : : Utilitas Senyawa *Flavonoid* Kulit Durian (*Durio Zibethinus Murr.*) Sebagai Stimulator Apoptosis Pada Sel *Hela* Kanker Serviks : Studi *Immunofluorescence*

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

DEWAN PENGUJI

Pembimbing,

(Assoc. Prof. Dr. dr. Humairah Medina Liza Lubis, M.Ked(PA), Sp.PA)

NIDN: 0115077401

Mengetahui,



(dr. Siti Mashana Siregar, Sp.THT-KL (K))

NIDN: 0106098201

Ketua Program Studi
Pendidikan Dokter FK UMSU

(dr. Desi Isnayanti, M.Pd.Ked)

NIDN: 0112098605

Ditetapkan di : Medan
Tanggal : 17 Februari 2025

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullah Wabarakatuh

Segala puji bagi Allah yang telah memberikan kemudahan dan petunjuk dalam setiap langkah perjalanan ini. Tak terhitung rasa syukur atas segala nikmat yang menyertai hingga skripsi ini dapat terselesaikan. Shalawat dan salam juga penulis haturkan kepada Nabi Muhammad SAW, teladan sepanjang zaman yang membawa cahaya ilmu dan kebaikan.

Skripsi ini bukan hanya hasil dari usaha sendiri, melainkan juga berkat doa, dukungan, serta bantuan dari banyak pihak. Oleh karena itu, dengan penuh rasa hormat, penulis ingin mengungkapkan apresiasi dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. dr. Siti Masliana Siregar Sp. T.H.T.B.K.L., Subsp.Rino(K)., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara
2. dr. Desi Isnayanti, M.Pd. Ked., selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara
3. Assoc. Prof. Dr. dr. Humairah Medina Liza Lubis, M.Ked(PA), Sp.PA., selaku dosen pembimbing yang selalu memberikan pendampingan dan bimbingan yang sangat berharga, terutama selama penulis menjadi mahasiswa di FK UMSU
4. Ir. Hermawan dan Maya Gusnizar, selaku orang tua kandung penulis yang telah menjadi motivasi terbesar dan selalu memberikan doa, dukungan, dan semua hal yang paling berharga bagi penulis
5. Shafira Hermaya, selaku kakak saya tercinta yang senantiasa mendukung baik secara fisik dan finansial serta memberikan doa-doa kepada saya
6. Untuk teman seperjuangan penulis, Nur Cantika Syafira yang menyertai setiap langkah yang saya lewati selama masa preklinik dan memberikan makna yang dalam. Terima kasih telah menjadi bagian penting dari perjalanan ini
7. Rekan rekan PIMNAS 36 Bandung, UMSU SEHAT, K5, SADBOR, PROTON 21 dan lain sebagainya yang telah memberikan dukungan baik secara moral dan akal kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini

8. Seluruh rekan-rekan sejawat TBM FK UMSU atas segala dukungan dan semangatnya
9. Seluruh rekan-rekan UKM KARATE UMSU atas segala dukungan dan semangatnya
10. Seluruh civitas akademika FK UMSU yang telah memberikan pelayanan kepada penulis selama menjadi mahasiswa di Fakultas Kedokteran UMSU
11. Pihak lain yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu

Harapan besar tertanam dalam hati, semoga skripsi ini memberi manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan kemaslahatan masyarakat. *“Last but not least, I want to thank me for believing in me, I want to thank me for doing all this hard work. I want to thank me for having no days off, I want to thank me for never quitting. I want to thank me for always being a giver and trying to give more than I receive.”*. Saya menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, ibarat sungai yang takkan jernih jika tak mengalir. Oleh karena itu, setiap kritik dan saran yang membangun amat saya hargai, bak benih yang disemai untuk tumbuh lebih subur di masa depan.

Medan, 17 Februari 2025



Aditya Sofyansyah Hermaya

**PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI SKRIPSI UNTUK
KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademika Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Aditya Sofyansyah Hermaya

NPM : 2108260124

Fakultas : Pendidikan Dokter

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara Hak Bebas Royalti Noneksklusif atas skripsi saya yang berjudul: “Utilitas Senyawa *Flavonoid* Kulit Durian (*Durio Zibethinus Murr.*) Sebagai Stimulator Apoptosis Pada Sel *Hela* Kanker Serviks : Studi *Immunofluorescence* ”. Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan).

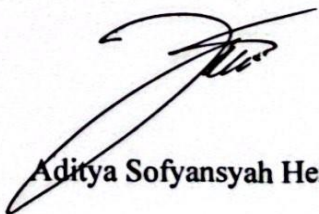
Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Medan

Pada tanggal: 17 Februari 2025

Yang Menyatakan,


Aditya Sofyansyah Hermaya

ABSTRAK

Pendahuluan: Kanker serviks adalah kanker dengan tingkat prevalensi terbesar keempat di dunia. Penyebab perkembangan kanker serviks adalah kegagalan dari proses apoptosis normal yang juga berdampak pada kegagalan kemoterapi dan radioterapi. Untuk menginduksi apoptosis dapat digunakan senyawa *flavonoid* (*apigenin* dan *luteolin*) melalui rute pensinyalan yang dikendalikan protein *Bcl-2*. **Tujuan:** Riset ini bertujuan untuk mengevaluasi kemampuan senyawa *flavonoid* berupa *apigenin* dan *luteolin* kulit durian dalam menghambat proliferasi sel kanker jalur *Bcl-2*. **Metode:** Dilakukan studi *Immunofluorescence* dengan menginduksi sel *HeLa* kanker serviks yang dikultur untuk menilai apoptosis dengan menggunakan pewarnaan *Bcl-2* dengan *treatment* kulit durian. Aktivitas pada penelitian ini meliputi identifikasi tanaman, preparasi dan meserasi, uji fitokimia, *GC-MS*, *in-vitro*, dan *immunofluorescence*. **Hasil:** Uji *in vitro* menunjukkan perubahan morfologi dan terbentuk kristal formazan setelah dilakukan *treatment* senyawa *MTT*. Hasil perhitungan *IC50* menunjukkan ekstrak kulit durian menunjukkan aktivitas antikanker aktif dengan nilai $44,14 \pm 18,69$. Persentase kelangsungan hidup menurun secara signifikan sebesar $p < 0,05$ pada konsentrasi tertinggi (300 $\mu\text{g/ml}$). Efek pada 1x dosis *IC50*, sel *HeLa* dengan *treatment* kulit durian dapat menghambat dan menginaktivasi antiapoptosis *Bcl-2* sehingga merangsang munculnya apoptosis kembali. **Kesimpulan:** Senyawa *flavonoid* pada kulit durian dapat dipertimbangkan menjadi agen antikanker serviks yang potensial dengan cara menstimulasi apoptosis.

Kata Kunci: *Durio zibethinus*, kanker serviks, *flavonoid*, apoptosis, sel *HeLa*

ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer is the cancer with the fourth largest prevalence rate in the world. The cause of the development of cervical cancer is the failure of the normal apoptosis process which also has an impact on the failure of chemotherapy and radiotherapy. To induce apoptosis, flavonoid compounds (apigenin and luteolin) can be used through the Bcl-2 protein-controlled signaling route. **Objective:** This research aims to evaluate the ability of flavonoid compounds in the form of apigenin and luteolin in durian peel in inhibiting the proliferation of Bcl-2 cancer cells. **Methods:** An Immunofluorescence study was carried out by inducing cultured cervical cancer HeLa cells to assess apoptosis using Bcl-2 staining with durian skin treatment. Activities in this study include plant identification, preparation and messe, phytochemical tests, GC-MS, in-vitro, and Immunofluorescence. **Results:** In vitro tests showed morphological changes and the formation of formazan crystals after MTT compound treatment. The results of the IC₅₀ calculation showed that durian peel extract showed active anticancer activity with a value of 44.14 ± 18.69 . The survival percentage decreased significantly by $p < 0.05$ at the highest concentration (300 $\mu\text{g/ml}$). The effect of 1x dose of IC₅₀, HeLa cells with durian peel treatment can inhibit and activate the antiapoptosis of Bcl-2 so as to stimulate the reappearance of apoptosis. **Conclusion:** Flavonoid compounds in durian peel can be considered as potential anticancer agents for cervical by stimulating apoptosis.

Keywords: Durio zibethinus, kanker serviks, flavonoid, apoptosis, HeLa cell

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	I
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	II
LEMBAR PENGESAHAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
KATA PENGANTAR.....	IV
PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI SKRIPSI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	VI
ABSTRAK	VII
<i>ABSTRACT</i>	VIII
DAFTAR ISI	IX
DAFTAR TABEL.....	XI
DAFTAR GAMBAR	XII
DAFTAR LAMPIRAN	XIII
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat bagi peneliti	5
1.4.2 Manfaat bagi institusi pendidikan	5
1.4.3 Manfaat bagi masyarakat.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Kanker Serviks	7
2.1.1 Definisi	7
2.1.2 Klasifikasi Stadium	7
2.1.3 Etiologi	8
2.1.4 Faktor Risiko	8
2.2 Tanaman Durian (<i>Durio zibethinus Murr.</i>).....	9
2.3 Senyawa <i>Flavonoid</i>	10
2.3.1 Klasifikasi <i>Flavonoid</i>	10
2.3.2 Aktivitas Antikanker.....	11
2.4 Protein <i>Bcl-2</i>	11
2.3.1 Definisi	11
2.3.2 Mutasi Gen <i>p53</i> dan <i>Bcl-2</i> pada Apoptosis	12
2.3.3 Kinerja <i>Flavonoid</i> dalam Menghambat Mutasi Gen pada Kanker Serviks	12
2.5 Studi <i>Immunofluorescence</i>	13
2.6 Kerangka Teori.....	13
2.7 Kerangka Konsep	14
2.8 Hipotesis.....	14

BAB 3 METODE PENELITIAN.....	15
3.1 Definisi Operasional.....	15
3.2 Jenis Penelitian.....	15
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian.....	15
3.4 Populasi dan Sampel Penelitian	16
3.3.1 Populasi Penelitian	16
3.3.2 Sampel Penelitian	16
3.5 Teknik Pengumpulan Data	16
3.5.1 Alat dan Bahan	16
3.5.1.1 Alat.....	16
3.5.1.2 Bahan.....	16
3.5.2 Cara Kerja.....	17
3.5.2.1 Preparasi Sampel dan Meserasi.....	17
3.5.2.2 Analisis Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS) ..	17
3.5.2.3 In-vitro.....	17
3.5.2.4 Studi Immunofluorescence	18
3.6 Pengolahan dan Analisis Data	18
3.6.1 Pengolahan Data.....	18
3.6.2 Analisis Data	19
3.7 Alur Penelitian	20
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	21
4.1 Hasil Penelitian	21
4.1.1 Hasil Identifikasi Tanaman	21
4.1.2 Hasil Uji Kulit Durian	21
4.1.3 Hasil Analisis <i>Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS)</i> ..	22
4.1.4 Hasil Analisis <i>In Vitro</i> dengan <i>Treatment</i> Kulit Durian.....	23
4.1.5 Hasil Analisis Apoptosis dengan <i>Immunofluorescence</i>	24
4.2 Pembahasan Penelitian.....	25
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	28
5.1 Kesimpulan	28
5.2 Saran.....	28
DAFTAR PUSTAKA	29

DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1 Definisi Operasional.....	15
Tabel 4. 1 Hasil parameter simplisia dan organoleptik ekstrak.....	21
Tabel 4. 2 Hasil rendemen ekstrak	21
Tabel 4. 3 Hasil Uji Fitokimia.....	22

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 <i>Durio zibethinus</i> Murr. ²²	9
Gambar 2. 3 Struktur kimia <i>Flavonoid</i> ²³	10
Gambar 2. 3 Klasifikasi <i>Flavonoid</i> ²⁵	11
Gambar 2. 6 Kerangka Teori	13
Gambar 2. 7 Kerangka Konsep	14
Gambar 3. 1 Alur Penelitian.....	20
Gambar 4. 1 <i>Chromatogram</i> hasil analisis <i>GC-MS</i> kulit buah durian	22
Gambar 4. 2 (A) Sel HeLa sebelum perlakuan (kepala panah merah menunjukkan sel hidup), (B) Kematian sel setelah perlakuan (kepala panah kuning),(C) Pembentukan kristal formazan (kepala panah merah)	23
Gambar 4. 3 <i>Inhibition rate</i> pada sel <i>HeLa</i> dengan pemberian kulit durian.....	24
Gambar 4. 4 Sel HeLa yang diberi treatment dengan kulit durian. (A) 0.5x dosis IC50, (B) Perubahan morfologi klasik mengindikasikan apoptosis (kepala panah merah) pada 1x dosis IC50, (C) 2x dosis IC50, (D) Inti sel dengan pewarnaan DAPI.....	25

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Ethical Approval	33
Lampiran 2 Surat hasil identifikasi tanaman.....	34
Lampiran 3 Surat peminjaman tempat penelitian laboratorium biokimia Fakultas Kedokteran UMSU.....	35
Lampiran 4 Surat permohonan izin penelitian ke Laboratorium Mega Global Safety Indonesia	36
Lampiran 4 Surat Izin Riset dari Laboratorium Klaster <i>Stem Cells & Tissue Engineering Research Center</i>	37
Lampiran 5 Dokumentasi kegiatan	37
Lampiran 7 Hasil Analisis <i>GC-MS</i> Kulit Buah Durian.....	41
Lampiran 8 <i>Chromatogram</i> hasil analisis <i>GC-MS</i> kulit buah durian.....	44
Lampiran 9 Hasil Uji Statistik.....	45
Lampiran 10 Daftar riwayat hidup	47
Lampiran 11 Artikel Penelitian	48

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker serviks adalah kanker wanita keempat yang paling umum ditemukan di seluruh dunia ^{1,2}. Secara global tingkat prevalensi kanker serviks terdapat sekitar 604.000 kasus baru kanker serviks dan 342.000 kematian pada tahun 2020, yang menyebabkan beban yang signifikan dari kanker ini ^{3,4}. Sedangkan di Indonesia menurut data *Global Burden of Cancer Study* dan *World Health Organization (WHO)*, kasus kanker serviks merupakan penyumbang kanker terbanyak kedua dengan jumlah kasus sebanyak 36.633 kasus ^{5,6}.

Kanker serviks disebabkan oleh karena tidak terkendalinya proliferasi sel dalam jaringan serviks akibat dari infeksi *Human Papillomavirus (HPV)*. Sebagian besar infeksi *HPV* akan difagositosis oleh sistem imun tubuh tetapi beberapa subtype dari *HPV* tidak terfagositosis seperti *HPV-16* dan *HPV-18* yang mengekspresikan onkogen virus *E6* dan *E7*. Onkogen virus *E6* akan menginaktivasi dan mendegradasi *p53 tumor suppressor protein* dengan membentuk kompleks enzim *ubiquitin ligase*, sedangkan onkogen virus *E7* akan menginaktivasi dan mendegradasi *retinoblastoma tumor suppressor protein (pRB)*. Hal ini menyebabkan ketidakstabilan dalam genom, akumulasi mutasi somatik, dan integrasi *HPV* ke dalam genom serta mengganggu proses apoptosis ⁷.

Pilihan pengobatan untuk kanker serviks meliputi operasi serta kemoterapi dan terapi radiasi secara bersamaan bahkan imunoterapi, menunjukkan tingkat kesembuhan yang rendah dan munculnya efek samping yang merugikan berupa efek resistensi pengobatan. Hal ini terjadi karena sel kanker memiliki cara untuk menghindari dari apoptosis. Apoptosis merupakan suatu mekanisme kematian sel yang terprogram dengan mendegradasikan kromatin pada inti sel yang telah tua dan abnormal. Dua jalur utama apoptosis adalah jalur intrinsik dan ekstrinsik.

Jalur intrinsik meliputi pemberian kode yang memicu proses pelepasan sitokrom c tergantung mitokondria dan mengaktifkan *caspase-9* yang menstimulasi proteolisis protein sel sehingga terjadi kematian sel. Sedangkan jalur ekstrinsik meliputi pengaktifan reseptor kematian (*death receptor, DR*). Maka tujuan dari apoptosis yaitu untuk mengontrol jumlah sel yang sudah matur dan tidak normal, sehingga pada kejadian kanker kematian sel tidak akan terjadi ⁸.

Bcl-2 merupakan salah satu regulator utama dalam proses apoptosis (antiapoptosis) yang diimplementasikan melalui jalur intrinsik. Fungsi biologis utama dari protein *Bcl-2* adalah mencegah apoptosis dengan meningkatkan resistensi terhadap faktor yang dapat merangsang apoptosis sehingga kematian sel dapat dihambat. Protein *Bcl-2* memiliki peran utama dalam melindungi sel kanker dari kematian dengan cara meningkatkan ketahanan terhadap faktor-faktor yang memicu proses apoptosis, sehingga menghambat terjadinya kematian sel. Saat terjadi ketidakstabilan genetik pada sel-sel kanker, mutasi pada gen apoptosis seperti *Bcl-2* akan menyebabkan peningkatan ekspresi protein antiapoptosis. Hal ini akan mendorong evolusi dan pertumbuhan tumor, serta kegagalan/resistensi pengobatan. Ditemukan juga bahwa ekspresi berlebihan *Bcl-2* dapat menghambat penangkapan *G1* yang dimediasi *p53*. Pada sel kanker di bawah kondisi ketidakstabilan genetik dan dengan adanya mutasi pada gen apoptosis termasuk *Bcl-2* akan mengakibatkan peningkatan ekspresi protein antiapoptosis *Bcl-2* yang merupakan penanda perkembangan proses neoplastik ⁹.

Dari studi literatur didapatkan penghambatan apoptosis dapat merangsang terjadinya resistensi kemoterapi dan kegagalan terapi kanker yang terjadi melalui jalur mekanisme mutasi, penghapusan salah satu produk gen *p53* yaitu *Bcl-2* dan inaktivasi regulator *p53*, seperti *caspase-9* dan kofaktornya serta faktor pengaktif protease apoptosis 1 (*Apaf-1*). Untuk mengatasi resistensi pengobatan, kekambuhan penyakit dan munculnya metastasis yang mematikan, strategi saat ini memerlukan

penggunaan terapi kombinasi, dengan menargetkan jalur alternatif untuk kematian sel ¹⁰.

Banyak riset yang dilakukan tertuju langsung pada target sel kanker untuk menghindarkan kegagalan pengobatan, tidak terkecuali pada pengembangan bahan alam. Riset mengenai komponen bioaktif kulit durian (*Durio zibethinus Murr.*) masih terbatas untuk pengobatan kanker. Senyawa yang berperan sebagai induktor *Bcl-2* pada beberapa jenis kanker termasuk kulit, saluran napas dan paru telah diteliti, tetapi pada kanker serviks masih sulit didapatkan literatur yang mendukung.

Dari studi literatur yang telah didapatkan, masih banyak riset yang dilakukan tertuju langsung pada target sel kanker untuk menghindarkan kegagalan pengobatan, tidak terkecuali pada pengembangan bahan alam. Riset mengenai komponen bioaktif kulit durian (*Durio zibethinus Murr.*) masih terbatas untuk pengobatan kanker. Riset pada kulit durian hanya terbatas pada aktivitas sitotoksik dan antioksidan terhadap antikanker secara umum, tetapi tidak membahas bagaimana perannya pada jalur apoptosis *Bcl-2*.

Kulit durian mengandung tiga senyawa *Flavonoid* utama yaitu *flavanon*, *flavonol* dan *flavon*. *Flavon* memiliki aktivitas antikanker yang lebih efektif karena lipofilisitasnya yang tinggi. Zat yang terkandung dalam *flavon* salah satunya adalah *apigenin* bekerja dengan cara menghambat pertumbuhan beberapa sel kanker dan *luteolin* memiliki efek toksik pada *DNA topoisomerase* yang berfungsi sebagai senyawa antikanker yang potensial. Fokus pada riset ini adalah pada senyawa *apigenin* dan *luteolin* dimana *apigenin* bekerja dengan menekan berbagai jenis kanker melalui berbagai efek biologis, seperti memicu apoptosis sel dan autofagi, menginduksi penghentian siklus sel, menekan migrasi dan invasi sel, dan merangsang respon imun ¹¹. Sementara *luteolin* meningkatkan ekspresi berbagai gen proapoptosis, termasuk *APAF1*, *BAX*, *BAD*, *BID*, *BOK*, *BAK1*, *TRADD*, *FADD*, *FAS*, dan *Caspases 3* dan *9*, serta menurunkan ekspresi gen antiapoptosis, termasuk *NAIP*, *MCL -1*,

Bcl-xL dan *Bcl-2*. Hasilnya menunjukkan bahwa pemahaman tentang mekanisme apoptosis yang diinduksi *luteolin* mungkin berguna dalam terapi kanker¹².

Berdasarkan fakta-fakta tersebut, saya melakukan riset dengan studi *in silico* (*molecular docking*) untuk mengetahui keterikatan antara senyawa *apigenin* dan *luteolin* terhadap protein *Bcl-2* pada kanker serviks. Kemudian dilakukan uji *in vitro* dan imunofluoresensi untuk membuktikan potensi senyawa bioaktif yang terkandung pada kulit durian dalam menstimulasi apoptosis melalui jalur *Bcl-2* yang dapat memperbaiki resistensi pengobatan, dan dapat menjadi salah satu pertimbangan senyawa alternatif dari bahan alam yang bermanfaat dalam terapi klinis kanker serviks di masa depan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam riset ini adalah

1. Apakah senyawa aktif *flavonoid* dalam kulit durian (*Durio zibethinus Murr.*) mampu menstimulasi apoptosis melalui jalur *Bcl-2* pada sel *HeLa* kanker serviks?
2. Apakah senyawa *flavonoid* yang terdapat dalam kulit durian dapat dipertimbangkan sebagai terapi tambahan dalam pengobatan kanker serviks?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum riset ini adalah: Mengevaluasi potensi senyawa *flavonoid* yang diekstrak dari kulit durian (*Durio zibethinus Murr.*) sebagai stimulator apoptosis pada sel *HeLa* kanker serviks menggunakan pendekatan *imunofluorescents*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengidentifikasi kandungan senyawa *flavonoid* dalam ekstrak kulit durian (*Durio zibethinus Murr.*) yang berpotensi sebagai agen bioaktif terhadap sel kanker.
2. Menganalisis efek senyawa *flavonoid* dari kulit durian terhadap induksi apoptosis pada sel *HeLa* kanker serviks menggunakan metode *Immunofluorescence*.
3. Mengamati mekanisme molekuler yang terlibat dalam proses apoptosis sel *HeLa* setelah perlakuan dengan senyawa *flavonoid* dari kulit durian

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat bagi peneliti

Penelitian ini memberikan manfaat besar bagi peneliti dalam Memperkaya ilmu mengenai mekanisme apoptosis yang dipicu oleh senyawa *flavonoid*, sehingga dapat menjadi landasan untuk studi lanjutan dalam pengobatan kanker serviks berbasis bahan alam.

1.4.2 Manfaat bagi institusi pendidikan

Riset ini memberikan manfaat kontribusi pada ilmu pengetahuan mengenai senyawa golongan apigenin dan luteolin dari kulit durian dan aktivitasnya sebagai kandidat terapi adjuvan kanker serviks yang lebih spesifik, efektif, dan memiliki efek samping minimal dibandingkan kemoterapi konvensional dengan menarget protein *Bcl-2* melalui studi *in vitro* dan *Immunofluorescence*.

Riset ini memberikan kontribusi pada literatur ilmiah mengenai hubungan antara senyawa *flavonoid* dan apoptosis sel kanker. Pengetahuan ini tidak hanya bermanfaat bagi pengembangan ilmu onkologi, tetapi juga relevan untuk bidang bioteknologi, khususnya dalam aplikasi teknologi *Immunofluorescence*.

1.4.3 Manfaat bagi masyarakat

Penelitian ini berpotensi menghasilkan terapi berbasis bahan alami yang lebih terjangkau dibandingkan dengan terapi kanker konvensional. Dengan pemanfaatan kulit durian yang melimpah dan berbiaya rendah, masyarakat dapat memperoleh akses terhadap pengobatan yang lebih ekonomis, terutama di wilayah dengan akses terbatas ke obat-obatan *modern*. Pemanfaatan kulit durian, yang biasanya dianggap sebagai limbah, dapat membantu mengurangi dampak lingkungan dari sisa produksi durian. Hal ini sekaligus mendukung masyarakat dalam menciptakan lingkungan yang lebih bersih dan berkelanjutan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Serviks

2.1.1 Definisi

Kanker serviks adalah kanker paling umum keempat paling umum pada wanita di seluruh dunia dan kanker ginekologi yang paling umum secara global terutama tetap menjadi masalah kesehatan global pada negara-negara berpenghasilan rendah karena kesenjangan yang lebar dalam cakupan vaksinasi HPV dan akses terhadap intervensi pencegahan.¹³ Hampir semua kasus kanker serviks (95%) disebabkan oleh infeksi HPV risiko tinggi yang terus-menerus. Pada sel epitel skuamosa yang bermetastasis menjadi karsinoma sel skuamosa (80%) dan adenokarsinoma (20%).¹⁴ Penyakit ini merupakan neoplasma maligna yang berasal dari sel epitel skuamosa dan menyerang serviks, yaitu segmen inferior uterus yang berfungsi sebagai penghubung antara uterus dan vagina.¹⁵

2.1.2 Klasifikasi Stadium

Klasifikasi stadium kanker serviks menurut FIGO 2018 (Federasi Internasional Ginekologi dan Obstetri) membagi penyakit ini ke dalam empat fase utama berdasarkan luasnya invasi dan penyebaran. Diameter lesi pada Stadium I berkisar dari mikroskopis hingga lebih dari 4 cm, dan pertumbuhan neoplasma terbatas pada serviks uteri saja. Stadium III merupakan perkembangan penyakit dengan keterlibatan sepertiga distal vagina, dinding panggul, dan potensi hidronefrosis atau disfungsi ginjal akibat obstruksi ureter. Stadium II menunjukkan perluasan tumor ke jaringan di luar serviks tanpa mencapai dinding panggul atau sepertiga bagian distal vagina. Stadium lanjut Stadium IV ditandai dengan penyebaran tumor ke struktur ekstra-panggul seperti kandung kemih dan rektum, serta potensi metastasis jauh ke organ-organ seperti hati dan paru-paru.¹³

2.1.3 Etiologi

Infeksi *human papillomavirus* (HPV) merupakan penyebab utama kanker serviks karena mempengaruhi perkembangan sel pada epitel serviks. Penelitian terbaru dalam bidang epidemiologi dan biologi molekuler telah menetapkan infeksi HPV sebagai penyebab utama metastase kanker serviks. Risiko Relatif (RR) untuk hubungan antara infeksi HPV dan kanker serviks bervariasi antara 20 hingga 70, menurut penelitian yang menggunakan metode kasus-kontrol dan kohort.¹⁵

Sebagian besar infeksi HPV akan difagositosis oleh sistem imun tubuh tetapi beberapa sub tipe dari HPV tidak terfagositosis seperti HPV-16 dan HPV-18 yang mengekspresikan onkogen virus E6 dan E7. Onkogen virus E6 akan menginaktivasi dan mendegradasi *p53 tumor suppressor protein* dengan membentuk kompleks enzim *ubiquitin ligase*, sedangkan onkogen virus E7 akan menginaktivasi dan mendegradasi *retinoblastoma tumor suppressor protein* (pRB). sel yang tidak terkendali, yang dapat menyebabkan displasia dan munculnya perkembangan sel abnormal pada epitel skuamosa yang menyebabkan kanker serviks.¹⁶

2.1.4 Faktor Risiko

Faktor risiko yang mendasari terjadinya kanker serviks bisa dipengaruhi oleh usia hubungan seksual pertama, jumlah pasangan seksual, paritas, penggunaan kontrasepsi oral, dan jangka panjang merokok. Penelitian ini juga mencatat pengetahuan pasien tentang pencegahan kanker serviks, riwayat vaksinasi HPV. Kanker serviks merupakan hasil dari interaksi multifaktor yang melibatkan aspek hormonal, imunologis, genetik, dan lingkungan.¹⁷

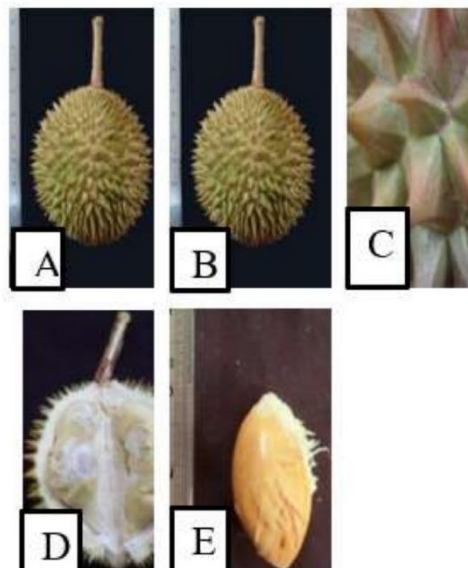
Wanita dengan paritas tinggi, atau mereka yang telah melahirkan lebih dari tiga kali, memiliki risiko 4,55 kali lipat lebih tinggi karena pergeseran hormon yang berulang dan kerusakan jaringan serviks selama kehamilan dan persalinan. Meskipun mekanisme yang tepat membutuhkan penelitian lebih lanjut, penggunaan kontrasepsi oral selama lebih dari lima tahun meningkatkan kepekaan

terhadap infeksi HPV. Orang yang mengidap HIV/AIDS lebih rentan terhadap HPV karena tubuh mereka kurang mampu melawan virus tersebut.¹⁸⁻¹⁹

2.2 Tanaman Durian (*Durio zibethinus Murr.*)

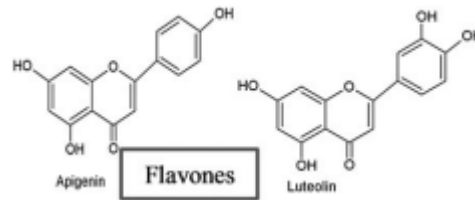
Durian (*Durio zibethinus Murr.*) adalah buah tropis asli yang berasal dari Asia Tenggara, khususnya Indonesia. Di antara delapan pusat variasi genetik tanaman di dunia, Indonesia sangat terkenal dengan buah-buahan tropis seperti durian. Dari 28 varietas durian, tujuh di antaranya tersebar di seluruh Sumatera, dan 18 di antaranya ditemukan di Kalimantan. Karena panen durian bertepatan dengan musim panen berbagai buah lainnya, durian sering disebut sebagai Raja Buah.²⁰

Taksonomi *Durio zibethinus Murr.* adalah sebagai berikut: (1) *Kingdom*: *Plantae*; (2) *Divisio*: *Spermatophyte*; (3) *Classis*: *Dikotil*; (4) *Ordo*: *Malvales*; (5) *Famili*: *Malvaceae*; (6) *Genus*: *Durio*; (7) *Species*: *Durio zibethinus Murr.*²¹



Gambar 2. 1 *Durio zibethinus Murr.*²²

2.3 Senyawa *Flavonoid*



Gambar 2. 2 Struktur kimia *Flavonoid* ²³

Flavonoid adalah termasuk dalam kelas metabolit sekunder tanaman yang memiliki struktur polifenol, yang banyak ditemukan dalam buah-buahan, sayuran dan minuman tertentu. Mereka memiliki berbagai macam manfaat efek biokimia dan antioksidan yang terkait dengan berbagai penyakit seperti kanker, penyakit *Alzheimer* (AD), aterosklerosis. *Flavonoid* dikaitkan dengan spektrum yang luas efek yang meningkatkan kesehatan dan merupakan komponen yang sangat diperlukan dalam berbagai nutraceutical, farmasi, obat-obatan dan aplikasi kosmetik. Ini karena antioksidan, antiinflamasi, anti-mutagenik dan anti-karsinogenik dan juga kinerja dalam memodulasi seluler utama fungsi enzim. Mereka juga dikenal sebagai penghambat yang kuat untuk beberapa enzim, seperti *xantin oksidase* (XO), *siklo-oksigenase* (COX), *lipoksigenase* dan *fosfoinositida 3-kinase*. ²⁴

2.3.1 Klasifikasi *Flavonoid*

Serial no.	Flavonoid	Class	Dietary sources
1	Quercetin	Flavonols	Vegetables, fruits and beverages, spices, soups, fruit juices
2	Rutin	Flavonols	Green tea, grape seeds, red pepper, apple, citrus fruits, berries, peaches
3	Macluraxanthone	Xanthones	<i>Maclura tinctoria</i> (Hedge apple), Dyer's mulberry
4	Genistein	Isoflavone	Fats, oils, beef, red clover, soyabeans, psoralea, lupin, fava beans, kudzu, psoralea
5	Scopoletin	Coumarin	Vinegar, dandelion coffee
6	Daidzein	Isoflavone	Soyabeans, tofu
7	Taxifolin	Flavanonol	Vinegar
8	Naringenin	Flavanone	Grapes
9	Abyssinones	Flavanone	French bean seeds
10	Rutin	Flavonol	Citrus fruits, apple, berries, peaches
11	Eriodictyol	Flavanone	Lemons, rosehips
12	Fisetin	Flavonol	Strawberries, apples, persimmons, onions, cucumbers
13	Theaflavin	Catechins	Tea leaves, black tea, oolong tea
14	Peonidin	Anthocyanidin	Cranberries, blueberries, plums, grapes, cherries, sweet potatoes
15	Diosmetin	Flavone	Vetch
16	Tricin	Flavone	Rice bran
17	Biochanin	Isoflavone	Red clover, soya, alfalfa sprouts, peanuts, chickpeas (<i>Cicer arietinum</i>), other legumes
18	Hesperidin	Flavanone	Bitter orange, petit grain, orange, orange juice, lemon, lime
19	Epicatechin	Flavan-3-ols	Milk, chocolate, commercial, reduced fat
20	Myricetin	Flavonols	Vegetables, fruits, nuts, berries, tea, red wine
21	Taxifolin	Flavanonol	Citrus fruits
22	Kaempferol	Flavonols	Apples, grapes, tomatoes, green tea, potatoes, onions, broccoli, Brussels sprouts, squash, cucumbers, lettuce, green beans, peaches, blackberries, raspberries, spinach
23	Luteolin	Flavones	Celery, broccoli, green pepper, parsley, thyme, dandelion, onion, chamomile, tea, nasturtium, etc.

Gambar 2. 3 Klasifikasi *Flavonoid* ²⁵

2.3.2 Aktivitas Antikanker

Flavonoid seperti *flavon* (*apigenin* dan *luteolin*), sebuah *flavon* alami, memiliki aktivitas antikanker melalui berbagai mekanisme molekuler. Senyawa ini berperan dalam menekan peradangan serta menghambat proliferasi, migrasi, dan invasi sel kanker. Efek antikanker *flavonoid* dikaitkan dengan kemampuannya dalam menginduksi kematian sel melalui jalur apoptosis dan autofagi. Selain itu, *flavonoid* berperan dalam modulasi lingkungan mikro tumor dengan mengatur proses dalam perkembangan kanker. ²⁶

Senyawa ini juga memiliki aktivitas antiangiogenik dengan menghambat pembentukan pembuluh darah baru yang mendukung pertumbuhan tumor. Mekanisme ini dilakukan melalui penurunan ekspresi faktor pro-angiogenik, seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Pada tingkat molekuler, *luteolin* mempengaruhi beberapa jalur pensinyalan utama, termasuk *PI3K/AKT/mTOR*, *MAPK*, dan *NF-κB*, yang berperan dalam regulasi pertumbuhan, migrasi, invasi, serta resistensi apoptosis sel kanker. Selain itu, *luteolin* menginduksi ekspresi gen pro-apoptotik, seperti *Bax* dan *Bak*, serta menekan ekspresi gen anti-apoptotik, seperti *Bcl-2* dan *Bcl-xL*, sehingga menghasilkan efek antikanker yang sinergis dan terfokus. ²⁶

2.4 Protein *Bcl-2*

2.3.1 Definisi

Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) adalah suatu protein regulator apoptosis yang termasuk dalam keluarga *Bcl-2* dan berperan sebagai faktor utama dalam mekanisme kelangsungan hidup sel. Protein ini memiliki massa molekul sekitar

26 kDa dan dikodekan oleh gen yang terletak pada kromosom 18. Sebagai protein anti-apoptotik, *Bcl-2* berfungsi dalam mempertahankan integritas mitokondria dengan membentuk heterodimer bersama BAX, sehingga menghambat pelepasan faktor pro-apoptotik. Mekanisme anti-apoptotiknya juga berkontribusi terhadap peningkatan kelangsungan hidup sel tumor dan dapat memfasilitasi transformasi seluler menuju fenotipe maligna.²⁷

2.3.2 Mutasi Gen *p53* dan *Bcl-2* pada Apoptosis

Mutasi pada *p53 tumor suppressor gene* diduga sebagai penyebab terjadinya kanker serviks. Produk dari gen *p53* yaitu protein antiapoptosis *Bcl-2* memainkan peran penting dalam proses apoptosis pada sel normal dan tumor. Peningkatan ekspresi regulator apoptosis *Bcl-2* memengaruhi fungsi dari *caspase* pada keadaan neoplasma. *Bcl-2* adalah salah satu penghambat utama apoptosis. *Bcl-2* juga bekerja menghambat apoptosis dengan mengikat protein proapoptosis dari *family Bcl-2* yang berintegrasi ke dalam membran intraseluler termasuk retikulum endoplasma dan menjadi gen pemacu pertumbuhan onkogenik, sehingga mengarah ke perkembangan kanker agresif.²⁸

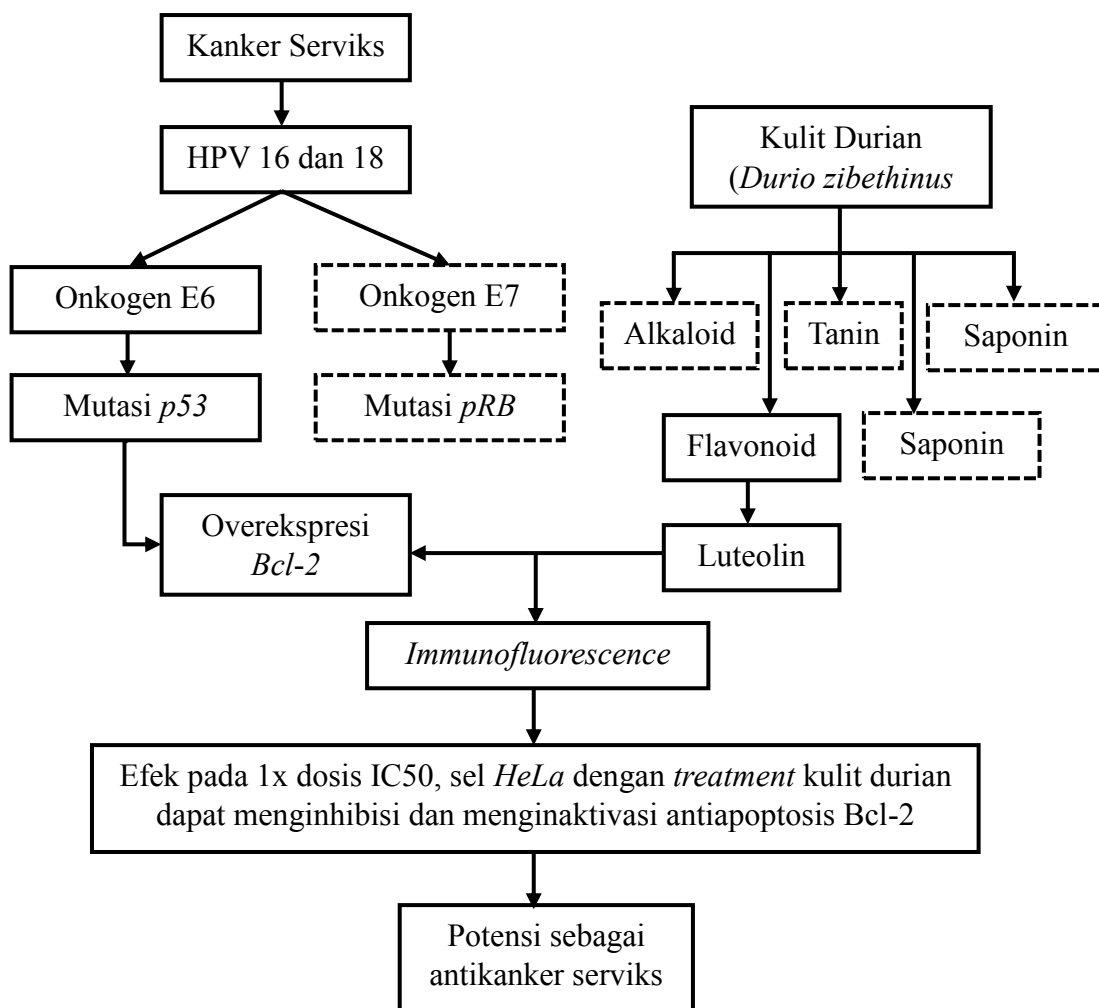
2.3.3 Kinerja *Flavonoid* dalam Menghambat Mutasi Gen pada Kanker Serviks

Regulasi *flavonoid* dalam menghambat mutasi gen pada kanker serviks seperti *apigenin* menunjukkan aktivitas yang secara signifikan mengurangi jumlah *Bcl-2* yang meningkat pada sel *HeLa*. Hasil ini memperlihatkan bahwa *apigenin* menyebabkan penghentian fase *G2/M* dan apoptosis sel *HeLa* melalui *cyclin B1/CDK1* dan *p21cip1*, sehingga menghasilkan efek antikanker pada kanker serviks²⁹. Sementara *luteolin* menunjukkan aktivitas dalam menghambat proliferasi dan apoptosis sel kanker pada jalur pensinyalan *Wnt/β-catenin* dan menginduksi penghentian siklus sel pada fase *G2/M*. Aktivitas ini akan mensupresi level ekspresi *Bcl-2*^{12,30}

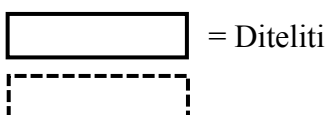
2.5 Studi *Immunofluorescence*

Metode berbasis imunofluoresensibertujuan untuk mengidentifikasi tahapan siklus sel, memberikan resolusi *single-cell* dan identifikasi yang tepat untuk G1, S awal, S akhir, G2 awal, G2 akhir, dan setiap sub-tahap fase M menggunakan mikroskop fluoresensi. Metode ini mengidentifikasi protein yang berpotensi digunakan sebagai alternatif untuk, atau kombinasi dengan *flow cytometry* tradisional untuk membedakan subtahapan siklus sel yang terperinci dalam berbagai *cell lines*.³¹

2.6 Kerangka Teori

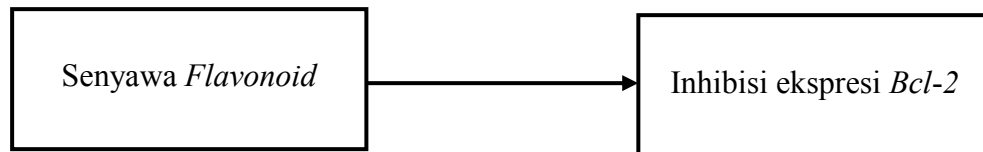


Gambar 2. 4 Kerangka Teori



= Tidak diteliti

2.7 Kerangka Konsep



Gambar 2. 5 Kerangka Konsep

2.8 Hipotesis

- a. H1 = Senyawa *flavonoid* dari kulit durian (*Durio zibethinus Murr.*) tidak memiliki efek sebagai stimulator apoptosis pada sel *HeLa* kanker serviks.
- b. H0 = Senyawa *flavonoid* dari kulit durian (*Durio zibethinus Murr.*) berperan sebagai stimulator apoptosis pada sel *HeLa* kanker serviks.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Definisi Operasional

Tabel 3. 1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Ekstrak Kulit Durian	Ekstrak kulit durian mengandung senyawa bioaktif sub kelas <i>flavonoid</i> dari ekstrak kulit durian (<i>Durio zibethinus Murr.</i>) yang memiliki potensi sebagai agen antioksidan, antimikroba, dan antikanker	Observasi <i>Immunofluorescence</i>	Tingkatan Dosis IC50 : 1. 0,5x Dosis 2. 1x Dosis IC50 3. 2x Dosis IC50	Ordinal
Sel <i>HeLa</i> Kanker Serviks	Sel kanker serviks manusia yang diperoleh dari jaringan tumor. Sel <i>HeLa</i> memiliki kromosom yang teratur dan menunjukkan ciri khas kanker serviks, termasuk invasi jaringan dan proliferasi tak terkendali.	Visualisasi <i>Immunofluorescence</i>	Nilai aktivitas IC50	Nominal

3.2 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional deskriptif menganalisis kemampuan senyawa *flavonoid* dengan menggunakan studi imunofluoresensi pada sel *HeLa* kanker serviks dan kulit durian (*Durio zibethinus Murr.*).

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian Pelaksanaan riset selama bulan Juli – November tahun 2023. Identifikasi dan karakterisasi senyawa *flavonoid* (*apigenin* dan *luteolin*) dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Departemen Biologi FMIPA dan Fakultas Farmasi USU dan PT Multi Global Safety Indonesia. Serta studi *in*

vitro dan imunofluoresensi dilakukan di Laboratorium Klaster *Stem Cells & Tissue Engineering Research Center* Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Riset dilakukan dengan protokol kesehatan yang ketat sesuai standar laboratorium.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu aktivitas apoptosis sel *HeLa* Kanker Serviks yang diinduksikan dengan ekstrak kulit durian (*Durio zibethinus Murr.*)

3.3.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah Dosis dari ekstrak kulit durian (*Durio zibethinus Murr.*) dengan sediaan 0,5x dosis , 1x dosis, dan 2x dosis

3.5 Teknik Pengumpulan Data

3.5.1 Alat dan Bahan

3.5.1.1 Alat

Rotary evaporator, vacuum filtration, kertas saring Whatman no. 40. inkubator CO₂, laminar air flow (LAF), mikropipet, centrifuge, automated cell counter, mikroskop inverted, mikroskop fluoresensi atau confocal dan juga Plate reader.

3.5.1.2 Bahan

Kulit durian, etanol 96%, kloroform, asam sulfat, reagen Wagner, reagen Dragendorff, serbuk magnesium (Mg), HCl pekat, amyl alkohol, FeCl₃ 1%, HCl 2N, dan reagen Liebermann-Burchard. sel kultur (sel *HeLa*), media kultur seperti *DMEM* atau *RPMI* yang diperkaya dengan serum (*FBS*) dan antibiotik, formaldehida atau metanol, Triton X-100, larutan *blocking* (*BSA* atau serum), antibodi primer yang spesifik, antibodi sekunder berlabel fluorokrom, *DAPI*..

3.5.2 Cara Kerja

3.5.2.1 Preparasi Sampel dan Meserasi

Kulit durian yang diperoleh kemudian diidentifikasi dan ditentukan jenis tanamannya. Sebanyak 2500 gram kulit durian dipotong kecil-kecil, dikeringkan, dan dihaluskan. Simplisia tersebut direndam dalam etanol 96% dengan perbandingan 1:10 selama tiga hari, sambil sesekali diaduk dan disimpan di tempat gelap. Setelah itu, larutan disaring menggunakan filtrasi vakum dan kertas saring *Whatman* no. 40, lalu diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 55°C dan tekanan 80 mBar. Ekstrak kental yang dihasilkan dapat dianalisis lebih lanjut untuk mengidentifikasi kandungan fitokimia seperti *alkaloid*, *fenolic*, dan *terpenoid* menggunakan metode kromatografi atau spektroskopi.

3.5.2.2 Analisis *Gas Chromatography and Mass Spectroscopy* (GC-MS)

Sampel cair diinjeksikan ke dalam injektor dan segera diuapkan dalam suhu tinggi. Uap sampel kemudian dibawa oleh gas pembawa, seperti helium atau hidrogen, menuju kolom kromatografi untuk dipisahkan berdasarkan perbedaan titik didih dan polaritas masing-masing komponen. Setelah melewati kolom, komponen-komponen terpisah memasuki ruang ionisasi, di mana mereka dibombardir oleh elektron berenergi tinggi, menyebabkan ionisasi dan fragmentasi molekul. Ion yang terbentuk kemudian diarahkan ke detektor untuk dianalisis lebih lanjut. Hasil ionisasi menghasilkan spektrum massa yang khas untuk setiap senyawa, yang dibandingkan dengan database standar seperti *SRM* (*Standard Reference Material*) menggunakan perangkat lunak komputer. Proses ini memungkinkan identifikasi yang akurat dan kuantifikasi komponen dalam sampel.

3.5.2.3 *In-vitro*

Cara kerja *in vitro* adalah sebagai berikut: 1) Sel *HeLa* disisipkan pada 96 sumuran dengan konsentrasi 1x10⁴ sel/sumuran; 2) Setelah 24 jam, sel dicuci dua kali dengan 100 µl medium bebas serum dan dipuasakan selama satu jam pada suhu 37°C; 3) Setelah starvasi, sel diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol *Durio zibethinus* (100, 150, 200, 250, dan 300 µg/ml) selama 24 jam; 4) Pada akhir perlakuan, sel diinkubasi dengan 100 µl *DMEM* yang

mengandung *MTT* (0,5 mg/ml) selama 4 jam pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂; 5) Media yang mengandung *MTT* dibuang dan kemudian sel dicuci dengan *PBS* (200 µl); 6) Kristal dilarutkan dengan menambahkan 100 µl larutan pelarut dan dicampur dengan benar dengan cara dipipet ke atas dan ke bawah; 7) Absorbansi spektrofotometri dari pewarna formazan ungu-biru diukur pada pembaca lempeng mikro pada panjang gelombang 540 nm.

3.5.2.4 Studi *Immunofluorescence*

Setelah dilakukan analisis *in vitro* dengan *treatment* kulit durian menggunakan laju inhibisi yang dihitung dari persentase setiap *plate-well* dan perhitungan IC₅₀. Hasil dinyatakan dengan *means value* ± *standard deviation*. Signifikansi statistik dinyatakan sebagai $p < 0,05$. Analisis *Immunofluorescence* dilihat pada gambaran apoptosis dengan penurunan ekspresi *Bcl-2*. Bertujuan untuk mendeteksi dan memvisualisasikan antigen dalam sel atau jaringan menggunakan antibodi yang berlabel fluorokrom. Prosesnya dimulai dengan fiksasi dan permeabilisasi sampel untuk mempertahankan struktur sel dan memungkinkan antibodi masuk. Selanjutnya, dilakukan blokade untuk mengurangi ikatan non-spesifik, diikuti dengan penambahan antibodi primer yang mengenali antigen target

3.6 Pengolahan dan Analisis Data

3.6.1 Pengolahan Data

a. *Editing*

Editing merupakan proses memeriksa dan memperbaiki data untuk memastikan bahwa informasinya akurat dan diformat sesuai dengan standar yang telah ditetapkan.

b. *Coding*

Coding merupakan memberikan kode atau label pada data baik kualitatif maupun kuantitatif-untuk mengkategorikan dan mempermudah analisis tambahan.

c. *Entry data*

Entry data merupakan mengacu pada proses memasukkan data atau informasi ke dalam perangkat lunak atau sistem komputer untuk pemrosesan dan analisis tambahan.

d. *Cleaning*

Cleaning merupakan tahap dalam pengolahan data yang bertujuan untuk mendeteksi dan menghapus kesalahan, duplikasi, atau data yang tidak relevan, sehingga dataset menjadi bersih dan siap untuk dianalisis.

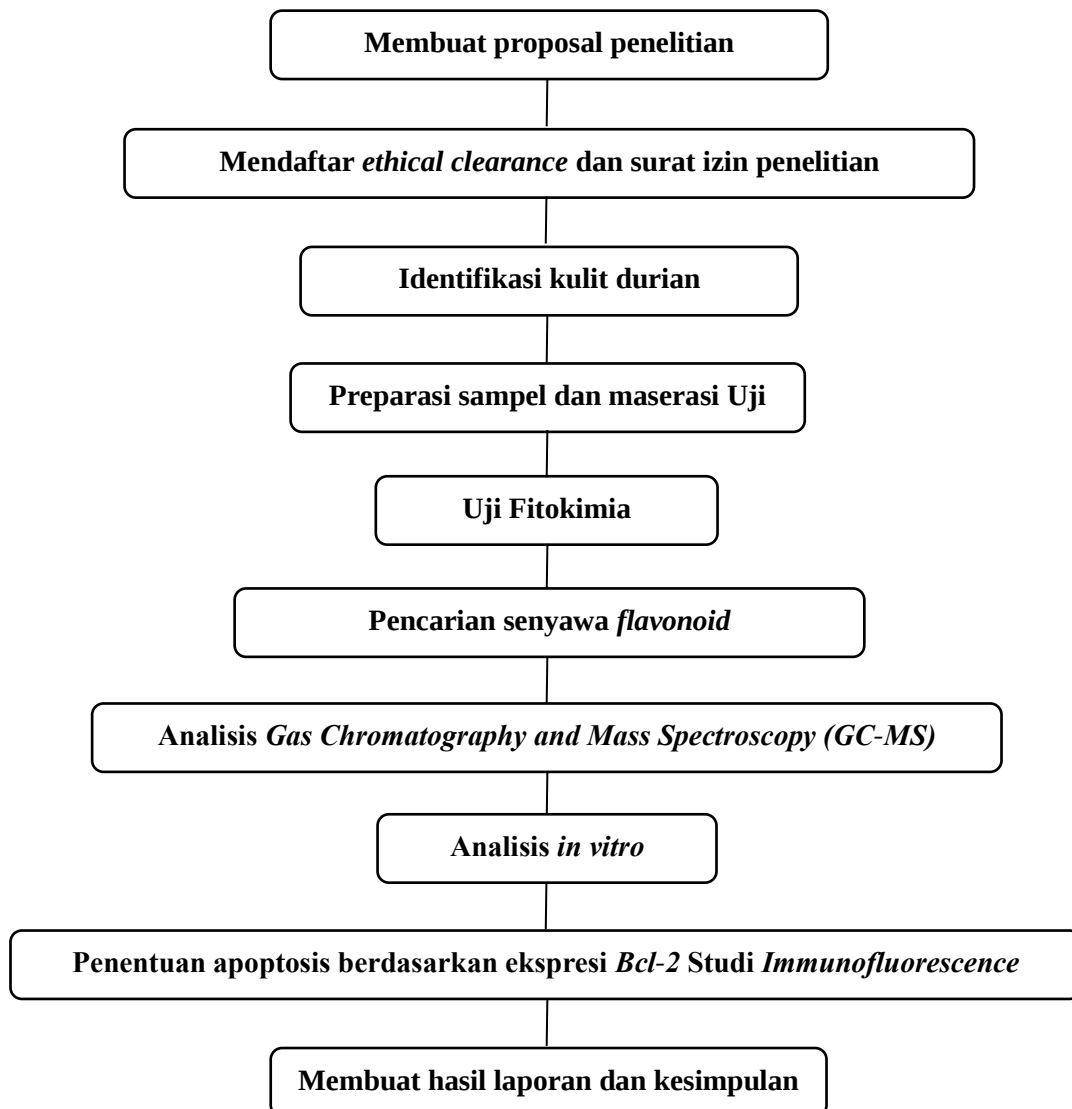
e. *Saving*

Saving merupakan prosedur untuk menyimpan data di penyimpanan lokal dan berbasis *cloud* dalam format yang sesuai untuk menjamin integritas dan aksesibilitasnya di masa mendatang.

3.6.2 Analisis Data

Data hasil analisis *in vitro* dievaluasi dengan menggunakan analisis statistik dilakukan dengan *Microsoft Excel* dan *one-way analysis of variance (ANOVA)* dilanjutkan dengan uji *post-hoc Games-Howell*. Analisis data *Immunofluorescence* pada sel *HeLa* kanker serviks dilakukan dengan mengamati ekspresi dan distribusi protein target menggunakan mikroskop fluoresensi atau *confocal* dengan penyesuaian dosis perlakuan. Intensitas fluoresensi dianalisis untuk menentukan perubahan ekspresi protein tertentu yang terkait dengan proliferasi, apoptosis, atau respon terhadap perlakuan eksperimen yang digunakan untuk menilai bioavailabilitas dan potensi toksisitas senyawa kandidat.

3.7 Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur Penelitian

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Hasil Identifikasi Tanaman

Identifikasi tanaman dari daun kale dilakukan pada Laboratorium Sistematika Tumbuhan Herbarium Medanense FMIPA Universitas Sumatera Utara dengan surat permohonan izin penelitian No: 919/IL.3.AU/UMSU-08/F/2023.

Hasil identifikasi tanaman dari kulit durian didapatkan hasil dengan *Kingdom: Plantae, Divisi: Spermatophyta, Kelas: Dicotyledoneae, Ordo: Malvales, Famili: Malvaceae, Genus: Durio, Spesies: Durio zibethinus Murray*, Nama Lokal: Kulit Durian.

4.1.2 Hasil Uji Kulit Durian

Tabel 4. 1 Hasil parameter simplisia dan organoleptik ekstrak

Hasil Parameter Simplisia	Hasil Organoleptik Ekstrak
Kadar air kulit durian = 8.7%	Ekstrak etanol 96% serbuk kulit durian dengan metode maserasi berbentuk kental, berwarna coklat, tidak memiliki cita rasa, berbau khas

Menurut Tabel 4.1, kandungan air dalam kulit durian mencapai 8,7%. Ekstrak kental hasil maserasi dengan etanol 96% dari kulit durian memiliki warna coklat, tidak memiliki rasa, serta mengeluarkan aroma khas.

Tabel 4. 2 Hasil rendemen ekstrak

Metode Ekstraksi	Berat Serbuk yang diekstraksi	Total Berat Ekstrak Hasil Ekstraksi	Nilai Rendemen
Maserasi	2526.4 gram	206.7 gram	12.22%

Menurut Tabel 4.2, proses maserasi menghasilkan ekstrak dengan rendemen tertentu. Dari total 2526,4 gram serbuk yang digunakan dalam ekstraksi, diperoleh 206,7 gram ekstrak, dengan persentase rendemen mencapai 12,22%

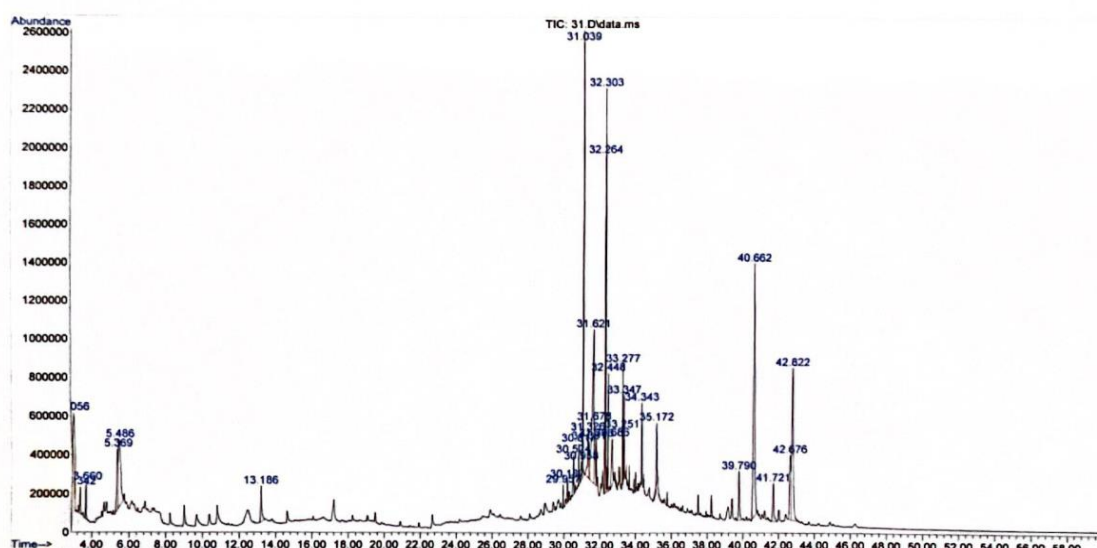
Tabel 4. 3 Hasil Uji Fitokimia

No	Parameter	Reaksi	Pengamatan
1	Alkaloid	+	Terbentuk warna jingga
2	<i>Flavonoid</i>	+	Terbentuk warna jingga kemerahan
3	Saponin	+	Terbentuk busa
4	Tanin	+	Terbentuk warna hijau kehitaman
5	Triterpenoid	+	Terbentuk warna coklat kemerahan

Menurut hasil uji fitokimia yang tercantum pada Tabel 4.3, reaksi positif (+) terdeteksi pada lima parameter, yaitu *alkaloid*, *flavonoid*, *saponin*, *tanin*, dan *triterpenoid*, dengan pengamatan spesifik sebagai berikut: *alkaloid* menunjukkan terbentuknya warna jingga, *flavonoid* menghasilkan warna jingga kemerahan, *saponin* ditandai dengan terbentuknya busa, *tanin* menghasilkan warna hijau kehitaman, dan *triterpenoid* memperlihatkan warna coklat kemerahan.

4.1.3 Hasil Analisis *Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS)*

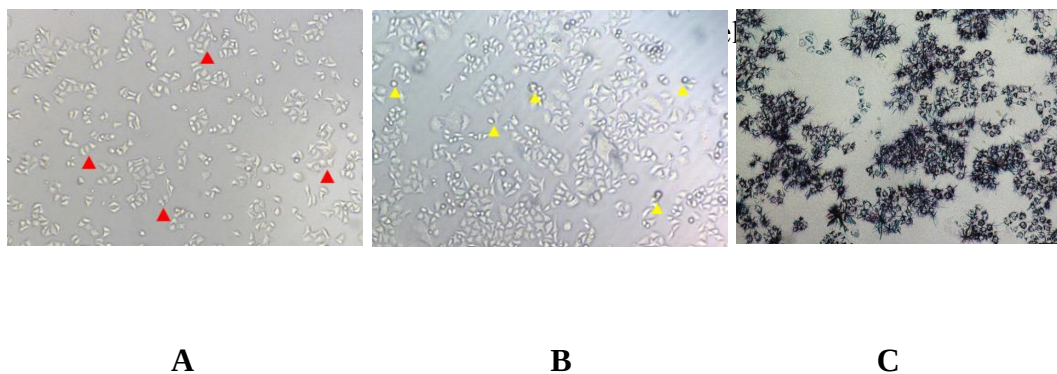
Data hasil GC-MS menunjukkan bahwa diperoleh sebanyak lebih dari 93 senyawa bioaktif dengan nilai RT dan area yang terbagi dalam 31 kelompok mulai 3.059 sampai dengan 42.824 untuk RT dan 0.37 sampai dengan 15.91% untuk area kelimpahan. Hasil GC-MS dapat dilihat pada chromatogram kulit buah durian dapat dilihat pada gambar dibawah ini.

Gambar 4. 1 *Chromatogram* hasil analisis GC-MS kulit buah durian

Dari hasil analisis GC-MS didapatkan berbagai senyawa organik seperti seperti asam lemak, ester, dan senyawa aromatik. Kandungan senyawa bioaktif dari kulit buah durian dengan persen area terendah adalah senyawa *nonanoic acid*, 9-*oxo*-, *methyl ester* ($C_{10}H_{18}O_3$) dengan berat molekul 186.25 g/mol dan persen area tertinggi adalah *gamma-sitosterol* ($C_{29}H_{50}O$) dengan berat molekul 414.7 g/mol. Beberapa Senyawa kunci seperti 2-Methoxy-4-vinylphenol (1,83%). Senyawa 8,11-Octadecadienoic acid, *methyl ester* (4,12%), *n*-Hexadecanoic acid (11,29%) dan Hexadecanoic acid, *methyl ester* (7,34%).

4.1.4 Hasil Analisis *In Vitro* dengan *Treatment* Kulit Durian

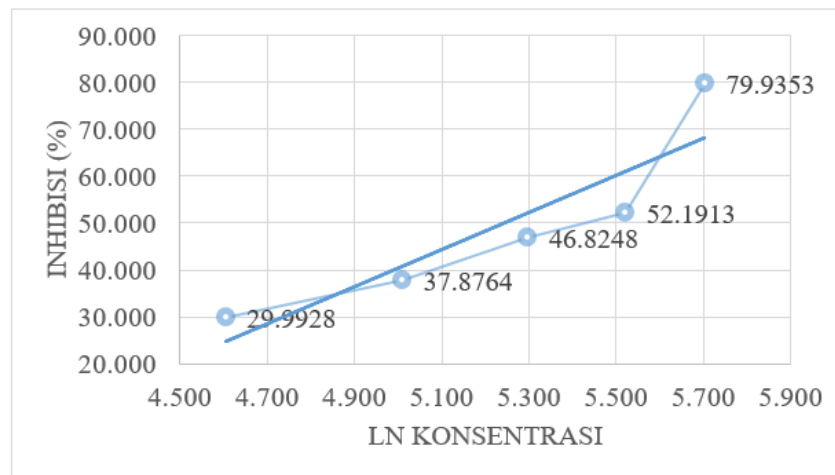
Sel hidup dan mati berbeda secara morfologis. Gambar 4.3 (A) menunjukkan sel *HeLa* sebelum perlakuan yang berbentuk bulat dan dikelilingi oleh membran sel yang jernih. Setelah *treatment*, sel kanker tersebut mengalami perubahan morfologi, menjadi tidak bulat (gambar 4.3 (B)), dan pembentukan kristal formazan setelah pemberian senyawa MTT (gambar 4.3 (C)). Aktivitas sitotoksik setiap perlakuan dievaluasi berdasarkan nilai IC50. Nilai IC50 diperoleh dengan membuat *plot log* konsentrasi perlakuan



Gambar 4. 2 (A) Sel *HeLa* sebelum perlakuan (kepala panah merah menunjukkan sel hidup), (B) Kematian sel setelah perlakuan (kepala panah kuning), (C) Pembentukan kristal formazan (kepala panah merah)

Hasil uji sitotoksik kulit durian pada sel *HeLa* kanker serviks didapatkan nilai 5.92 (aktif) yang dibandingkan dengan obat standar doxorubicin dengan nilai

1.59. Acuan penilaian adalah sebagai berikut: aktivitas IC50 sangat aktif= 5µg/ml; aktif= 5-10 µg/ml; sedang= 11-30 µg/ml; tidak aktif= >30 µg/ml.



Gambar 4. 3 *Inhibition rate* pada sel *HeLa* dengan pemberian kulit durian

Hasil perhitungan IC50 menunjukkan bahwa ekstrak kulit durian menunjukkan aktivitas aktif sebagai antikanker secara *in vitro* dengan nilai 44.14 ± 18.69 . Persentase kelangsungan hidup menurun secara signifikan $p < 0.05$ pada konsentrasi tertinggi (300 µg/ml). Hasil analisis statistik dapat dilihat pada lampiran 16. Sedangkan pada *doxorubicin* sebagai obat standar pengobatan kanker menunjukkan aktivitas sangat aktif, tetapi memiliki kelemahan berupa karsinogenitasnya yang sangat tinggi.

4.1.5 Hasil Analisis Apoptosis dengan *Immunofluorescence*

Kulit durian memiliki sitotoksitas pada sel *HeLa* kanker serviks dengan menginduksi apoptosis dan bekerja dalam menurunkan ekspresi antiapoptosis *Bcl-2*.



A

B

C

D

Gambar 4. 4 Sel HeLa yang diberi treatment dengan kulit durian. (A) 0.5x dosis IC50, (B) Perubahan morfologi klasik mengindikasikan apoptosis (kepala panah merah) pada 1x dosis IC50, (C) 2x dosis IC50, (D) Inti sel dengan pewarnaan DAPI

Efek yang diamati pada sel *HeLa* dengan *treatment* kulit durian dapat dijelaskan yaitu dengan menghambat dan menginaktivasi antiapoptosis *Bcl-2* sehingga merangsang munculnya apoptosis kembali pada 1x dosis *IC50*. Sedangkan pada 0.5x dan 2x dosis *IC50* tidak menunjukkan perubahan. Hasil riset ini menunjukkan bahwa *treatment* kulit durian dikaitkan dengan penurunan ekspresi *Bcl-2* yang bergantung pada tingkatan dosis.

4.2 Pembahasan Penelitian

Kanker serviks merupakan salah satu jenis keganasan yang paling sering dijumpai pada wanita di tingkat global. Pada stadium awal, penanganan standar meliputi kemoterapi, terapi radiasi, dan pembedahan. Meskipun ketiga metode tersebut memiliki efektivitas dalam pengobatan kanker serviks, penerapannya sering kali disertai dengan efek samping yang berpotensi menurunkan kualitas hidup pasien.³² Pemanfaatan bahan alami dengan potensi terapeutik, seperti yang terkandung dalam kulit durian (*Durio zibethinus Murr.*), menjadi salah satu strategi yang menjanjikan dalam mengatasi karsinogenesis. Penelitian yang dilakukan oleh Vadivel Saminthan (2020) melaporkan bahwa ekstrak kulit durian pada konsentrasi 50 µg/mL mampu menghambat pertumbuhan garis sel epitel skuamosa kolorektal hingga 74%, menunjukkan aktivitas sitotoksik yang signifikan. Temuan ini mengindikasikan bahwa ekstrak kulit durian berpotensi dikembangkan sebagai agen antikanker yang prospektif..³³

Pada uji fitokimia menunjukkan bahwa sampel mengandung lima jenis metabolit sekunder, yaitu *alkaloid*, *flavonoid*, *saponin*, *tanin*, dan *triterpenoid*. Kehadiran senyawa-senyawa ini mengindikasikan potensi farmakologis yang dapat dikembangkan lebih lanjut dalam penelitian dan aplikasi medis. Analisis menggunakan GC-MS berhasil mengidentifikasi beberapa senyawa kunci dalam sampel, termasuk senyawa fenolik dan asam lemak dengan potensi terapeutik. Senyawa *2-Methoxy-4-vinylphenol* (1,83%) diketahui berperan sebagai

antioksidan sekaligus memberikan aroma khas.³⁴ Selain itu, *8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester* (4,12%) merupakan ester dari asam linoleat yang memiliki berbagai manfaat kesehatan. Senyawa *n-Hexadecanoic acid* (11,29%) dan *Hexadecanoic acid, methyl ester* (7,34%), yang dikenal sebagai asam palmitat, merupakan asam lemak jenuh yang menunjukkan aktivitas antiinflamasi dan antimikroba. Selain senyawa tersebut, analisis GC-MS juga mengidentifikasi keberadaan *flavonoid* dalam kulit durian, yang berperan dalam pengelolaan karsinogenesis melalui mekanisme induksi apoptosis, penghambatan siklus sel, serta mitigasi proses angiogenesis, metastasis, dan proliferasi sel kanker.³⁵

Flavonoid telah banyak dikaji sebagai eksekutor potensial dalam terapi kanker karena kemampuannya dalam menginduksi apoptosis melalui modulasi berbagai protein pengatur kematian sel, seperti *Bcl-2*.³⁶ Berdasarkan hasil *immunofluorescence* menunjukkan efek yang diamati pada sel *HeLa* dengan *treatment* kulit durian dapat dijelaskan yaitu dengan menginhibisi dan menginaktivasi antiapoptosis *Bcl-2* sehingga merangsang munculnya apoptosis kembali pada 1x dosis *IC50*. Hasil *Immunofluorescence* menunjukkan temuan penelitian ini konsisten dengan penelitian sebelumnya yang memaparkan kemampuan *flavonoid* untuk menekan ekspresi *Bcl-2*. Menurut penelitian Muhammad Imran dkk. (2019), *flavonoid* menunjukkan aksi sitotoksik dengan menghambat ekspresi *Bcl-2* dan menekan produksi onkogen E6 dan E7 pada kanker serviks.³⁷ Temuan ini selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Shifana C. Sadiq et al. (2024), yang mengungkapkan bahwa luteolin berpotensi sebagai agen terapeutik dalam pengobatan kanker serviks melalui mekanisme penghambatan ekspresi onkogen HPV E6 dan E7.³⁸

Potensi *flavonoid* sebagai agen antikanker, khususnya pada kanker serviks, semakin diperkuat oleh kemampuannya dalam menurunkan ekspresi *Bcl-2*. Penurunan ekspresi *Bcl-2* menjadi langkah awal dalam mekanisme induksi apoptosis oleh *flavonoid* melalui jalur *Bcl-2*. Berkurangnya ekspresi *Bcl-2* menyebabkan peningkatan permeabilitas membran mitokondria, yang selanjutnya

memicu pelepasan sitokrom c ke dalam sitoplasma, sehingga mengaktifkan proses apoptosis pada sel kanker serviks.⁴⁰ Kaskade aktivasi *caspase-3* dipicu oleh *caspase-9*, yang selanjutnya diaktifkan oleh pelepasan sitokrom c ke dalam sitoplasma. Pemecahan beberapa protein struktural dan enzimatik, yang pada akhirnya mengakibatkan hilangnya komponen seluler yang vital dan memulai kematian sel terprogram (apoptosis), difasilitasi oleh aktivasi *caspase-3*. Oleh karena itu, dengan merangsang jalur intrinsik apoptosis dan mengurangi ekspresi *Bcl-2*, *flavonoid* secara efektif menginduksi apoptosis pada sel kanker serviks.⁴¹

Dari senyawa *flavonoid* yang dianalisis menunjukkan potensi terbaik sebagai kandidat terapi kanker serviks dengan efektivitas yang lebih terarah pada sel target. Namun, hasil penelitian ini hanya mengevaluasi mekanisme molekuler yang berperan dalam proses apoptosis sel *HeLa* setelah perlakuan dengan senyawa *flavonoid* dari kulit durian, tanpa menilai dampak pemberian senyawa tersebut secara menyeluruh. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut dengan agen kemoterapi lain juga diperlukan untuk mengoptimalkan strategi terapi kanker serviks berbasis modulasi apoptosis.

Penelitian ini memberikan bukti ilmiah bahwa senyawa *flavonoid* aktif dari kulit durian (*Durio zibethinus* Murr.) mampu menstimulasi apoptosis melalui jalur *Bcl-2* pada sel *HeLa* kanker serviks. Temuan ini akan ditindaklanjuti dengan studi *in vivo* menggunakan hewan coba yang telah diinduksi kanker serviks. Selain itu, penelitian ini menunjukkan potensi *flavonoid* dari kulit durian untuk dikembangkan sebagai alternatif pengobatan berbasis tanaman alami dengan target protein spesifik, yang perlu dikonfirmasi lebih lanjut melalui uji praklinis dan klinis yang valid. Hal yang menarik dari riset ini adalah pemanfaatan kulit durian sebagai salah satu sumber limbah terbesar di Sumatera Utara. Oleh karena itu, sebagai bahan bernilai medis yang berpotensi digunakan sebagai terapi adjuvant dalam pengobatan kanker serviks.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil dan pembahasan penelitian, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa :

1. Kulit durian (*Durio zibethinus* Murr.) mengandung senyawa bioaktif seperti *flavonoid* , alkaloid, terpenoid, tanin, dan saponin yang terdeteksi melalui uji fitokimia.
2. Pada uji *GC-MS* ditemukannya senyawa kunci pada *flavonoid* kulit durian.
3. Pemeriksaan *in vitro* sel *HeLa* dengan metode *MTT assay* didapatkan ekstrak kulit durian dengan konsentrasi 300µg/ml menunjukkan aktivitas aktif sebagai antikanker dengan nilai sitotoksisitas *IC50* 5.92 dan 44.14±18.69. Persentase kelangsungan hidup menurun secara signifikan $p < 0.05$ pada konsentrasi tertinggi (300 µg/ml).
4. Pada uji *Immunofluorescence* , terlihat daya sitotoksisitas pada sel *HeLa* kanker serviks dengan menginduksi apoptosis dan bekerja dalam menurunkan ekspresi antiapoptosis *Bcl-2* yang ditunjukkan dengan terstimulasinya apoptosis yang dapat dilihat pada perubahan morfologi klasik apoptosis pada 1x dosis *IC50*.
5. Senyawa flavanoid apigenin pada kulit durian memiliki potensi sebagai terapi adjuvant kanker serviks.

5.2 Saran

Riset lebih lanjut dengan *in vivo* dibutuhkan untuk menentukan jalur kematian sel melalui *Bcl-2* dengan *treatment* senyawa aktif *apigenin* dan *luteolin* dari kulit durian. Selain itu protein lain selain *Bcl-2* seperti *APAF1*, *BAX*, *BAD*, *BID*, *BOK*, *BAK1*, *TRADD*, *FADD*, *FAS*, *Caspases 3* dan *9*, *NAIP*, *MCL -1*, dan *Bcl-xL* yang juga berperan dalam keganasan terutama kanker serviks juga perlu teliti sehingga nantinya dapat dikembangkan menjadi produk terapi adjuvan masa depan

DAFTAR PUSTAKA

1. Ferrall L, Lin KY, Roden RBS, Hung CF, Wu TC. Cervical cancer immunotherapy: Facts and hopes. *Clin Cancer Res*. 2021;27(18):4953-4973. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-2833
2. Small W, Bacon MA, Bajaj A, et al. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer*. 2017;123(13):2404-2412. doi:10.1002/cnccr.30667
3. World Health Organization. *Global Strategy to Accelerate the Elimination of Cervical Cancer as a Public Health Problem and Its Associated Goals and Targets for the Period 2020 – 2030*. Vol 2.; 2021.
4. The Global Cancer Observatory. Cancer Incident in Indonesia. *Int Agency Res Cancer*. 2020;858:1-2.
5. Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Heal*. 2020;8(2):e191-e203. doi:10.1016/S2214-109X(19)30482-6
6. Sultanov M, Zeeuw J de, Koot J, et al. Investigating feasibility of 2021 WHO protocol for cervical cancer screening in underscreened populations: PREvention and SCReening Innovation Project Toward Elimination of Cervical Cancer (PRESCRIP-TEC). *BMC Public Health*. 2022;22(1):1-10. doi:10.1186/s12889-022-13488-z
7. Johnson CA, James D, Marzan A, Armaos M. Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. *Semin Oncol Nurs*. 2019;35(2):166-174. doi:10.1016/j.soncn.2019.02.003
8. Bhattacharjee R, Das SS, Biswal SS, et al. Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer: Molecular pathways and targeted therapeutic strategies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2022;174(March):103675. doi:10.1016/j.critrevonc.2022.103675
9. Khalissa D, Abdelhalim K, Xie X, Li Y, Soraya O, Abbes M. Immunohistochemical expression of p53 and *Bcl-2* in Algerian cervical carcinoma. *Biomed Pharmacol J*. 2018;11(1):67-75. doi:10.13005/bpj/1348
10. Housman G, Byler S, Heerboth S, et al. Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers (Basel)*. 2014;6(3):1769-1792.

doi:10.3390/cancers6031769

11. Yan X, Qi M, Li P, Zhan Y, Shao H. Apigenin in cancer therapy: Anti-cancer effects and mechanisms of action. *Cell Biosci.* 2017;7(1):1-16. doi:10.1186/s13578-017-0179-x
12. Raina R, Pramodh S, Rais N, et al. Luteolin inhibits proliferation, triggers apoptosis and modulates Akt/mTOR and MAP kinase pathways in HeLa cells. *Oncol Lett.* 2021;21(3):1-14. doi:10.3892/ol.2021.12452
13. Prawirohardjo S, Wiknjastro H. *Ilmu Kandungan*. Edisi 3. PT. Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo; 2011.
14. Caruso G, Wagar MK, Hsu HC, et al. Cervical cancer: a new era. *Int J Gynecol Cancer.* 2024;(August):ijgc-2024-005579. doi:10.1136/ijgc-2024-005579
15. Frianto D, Diantini A, Suwantika A, Setiawan D. *Wanita & Kanker Serviks*. 1st ed. CV Phika Media; 2021.
16. Bain CM, Burton K, Mcgavigan CJ. *Ngynaecology Illustrated*. 6th ed. Elsevier; 2011.
17. Agustiansyah P, Rizal Sanif, Siti Nurmaini, Irfannuddin, Legiran. Epidemiology and Risk Factors for Cervical Cancer. *Biosci Med J Biomed Transl Res.* 2021;5(7):624-631. doi:10.32539/bsm.v5i7.326
18. Zhang S, Xu H, Zhang L, Qiao Y. Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. *Chinese J Cancer Res.* 2020;32(6):720-728. doi:10.21147/j.issn.1000-9604.2020.06.05
19. American Cancer Society. Cervical cancer causes, risk factors, and prevention risk factors. *Am Cancer Soc.* Published online 2019:2.
20. Pratiwi N. Identification of morphological characteristic of durian (*Durio zibethinus* Murr.) in Tigalingga and Pegagan Hilir districtsDairi regency North Sumatra. 2018;6(2):200-208.
21. Aziz NAA, Jalil AMM. Bioactive compounds, nutritional value, and potential health benefits of indigenous durian (*Durio zibethinus* Murr.): A review. *Foods.* 2019;8(3). doi:10.3390/foods8030096

22. Pratiwi N, Hanafiah DS, Siregar LAM. Identifikasi Karakter Morfologis Durian(*Durio Zibethinus Murr*) di Kecamatan Tigalingga dan Pegagan Hilir Kabupaten Dairi Sumatera Utara. *J Agroekoteknologi FP USU*. 2018;6(2):200-208.
23. Almatroodi SA, Almatroudi A, Alharbi HOA, Khan AA, Rahmani AH. Effects and Mechanisms of Luteolin, a Plant-Based *Flavonoid* , in the Prevention of Cancers via Modulation of Inflammation and Cell Signaling Molecules. *Molecules*. Published online 2024:1-32.
24. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. *Flavonoid* s: An overview. *J Nutr Sci*. 2016;5:1-15. doi:10.1017/jns.2016.41
25. Rauf A, Wilairatana P, Joshi PB, et al. Revisiting luteolin: An updated review on its anticancer potential. *Heliyon*. 2024;10(5):1-14. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e26701
26. Tuli HS, Rath P, Chauhan A, et al. Phloretin, as a Potent Anticancer Compound: From Chemistry to Cellular Interactions. *Molecules*. 2022;27(24):1-30. doi:10.3390/molecules27248819
27. Qian S, Wei Z, Yang W, Huang J, Yang Y, Wang J. The role of *BCL-2* family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front Oncol*. 2022;12(October):1-16. doi:10.3389/fonc.2022.985363
28. Ekundina VO, Omon EA. Genomic analysis of BAX and *Bcl-2* gene mutations in human papilloma virus-associated squamous cell carcinoma of the cervix. *Surg Exp Pathol*. 2024;7(1). doi:10.1186/s42047-024-00153-5
29. Chen YH, Wu JX, Yang SF, Yang CK, Chen TH, Hsiao YH. Anticancer Effects and Molecular Mechanisms of Apigenin in Cervical Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2022;14(7):1-20. doi:10.3390/cancers14071824
30. Liao Y, Xu Y, Cao M, et al. Luteolin Induces Apoptosis and Autophagy in Mouse Macrophage ANA-1 Cells via the *Bcl-2* Pathway. *J Immunol Res*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/4623919
31. Adolph R. ImmunoCellCycle-ID: A high-precision immunofluorescence. Published online 2019:1-23.

32. Patel D, Tayade S, Singh Thakur A, Singh S. Revolutionizing Early-Stage Cervical Cancer Treatment: A Comprehensive Review of Radical Trachelectomy as a Minimally Invasive Approach. *Cureus*. 2024;16(2):1-10. doi:10.7759/cureus.53958
33. Saminathan V, Doraiswamy R. Phytochemical analysis, antioxidant and anticancer activities of durian (*Durio zibethinus murr.*) fruit extract. *J Res Pharm*. 2020;24(6):882-892. doi:10.35333/jrp.2020.247
34. Prasher P, Sharma M, Singh SK, et al. Luteolin: a *flavonoid* with a multifaceted anticancer potential. *Cancer Cell Int*. 2022;22(1):1-11. doi:10.1186/s12935-022-02808-3
36. Mod Razif MRF, Chan SY, Chew YL, et al. Recent Developments in Luteolin-Loaded Nanoformulations for Enhanced Anti-Carcinogenic Activities: Insights from In Vitro and In Vivo Studies. *Sci*. 2024;6(4). doi:10.3390/sci6040068
37. Imran M, Rauf A, Abu-Izneid T, et al. Luteolin, a *flavonoid* , as an anticancer agent: A review. *Biomed Pharmacother*. 2019;112(September 2018). doi:10.1016/j.biopha.2019.108612
38. Sadiq SC, Joy MP, Aiswarya SU, et al. Unlocking nature ' s pharmacy : an in-depth exploration of phytochemicals as potential sources of anti-cancer and anti- inflammatory molecules. *Explor Drug Sci*. 2024;2:744-784. doi:10.37349/eds.2024.00073
39. Chen YH, Wu JX, Yang SF, Hsiao YH. Synergistic Combination of Luteolin and Asiatic Acid on Cervical Cancer In Vitro and In Vivo. *Cancers (Basel)*. 2023;15(2):1-24. doi:10.3390/cancers15020548
40. Rahman N, Khan H, Zia A, et al. *Bcl-2* modulation in p53 signaling pathway by *flavonoid* s: A potential strategy towards the treatment of cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21). doi:10.3390/ijms222111315
41. Pei SN, Lee KT, Rau KM, Lin TY, Tsai TH, Hsu YC. Luteolin (LUT) Induces Apoptosis and Regulates Mitochondrial Membrane Potential to Inhibit Cell Growth in Human Cervical Epidermoid Carcinoma Cells (Ca Ski). *Biomedicines*. 2024;12(10):1-10. doi:10.3390/biomedicines12102330

Lampiran 1 Surat Keterangan Lolos Kaji Etik



UMSU
Unggul | Cerdas | Terpercaya

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
FACULTY OF MEDICINE UNIVERSITY OF MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
DESCRIPTION OF ETHICAL APPROVAL
"ETHICAL APPROVAL"
No : 1026/KEPK/FKUMSU/2023

Protokol penelitian yang diusulkan oleh :
The Research protocol proposed by

Peneliti Utama : Ainur Rofiq
Principal in investigator

Anggota : M. Dian Islami, Muhammad Zihni Baihaqi, Aditya Sofyansyah Hermaya
Member Tristan Kanginan, Humairah Medina Liza Lubis

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara
Name of the Institution Faculty of Medicine University of Muhammadiyah Sumatera Utara

Dengan Judul
Title

"AKTIVITAS KULIT DURIAN (*Durio zibethinus*) SEBAGAI STIMULATOR APOPTOSIS JALUR Bcl-2: KAJIAN IN VITRO DAN IMUNOSITOKIMIA PADA SEL HeLa KANKER SERVIKS"

"THE ACTIVITY OF DURIAN PEEL (*Durio zibethinus*) AS A STIMULATOR OF APOPTOSIS OF THE Bcl-2 PATHWAY: IN VITRO AND IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDIES ON CERVICAL CANCER HeLa CELLS"

Dinyatakan layak etik sesuai 7 (tujuh) Standar WHO 2011, yaitu 1) Nilai Sosial, 2) Nilai Ilmiah
3) Pemerataan Beban dan Manfaat, 4) Resiko, 5) Bujukan / Eksploitasi, 6) Kerahasiaan dan Privacy, dan
7) Persetujuan Setelah Penjelasan, yang merujuk pada Pedoman CIOMS 2016. Hal ini seperti yang ditunjukkan oleh terpenuhinya indikator setiap standar.

Declared to be ethically appropriate in accordance to 7 (seven) WHO 2011 Standards, 1) Social Values, 2) Scientific Values, 3) Equitable Assessment and Benefits, 4) Risks, 5) Persuasion / Exploitation, 6) Confidentiality and Privacy, and 7) Informed Consent, referring to the 2016 CIOMS Guidelines. This is as indicated by the fulfillment of the indicator of each standard

Pernyataan Etik ini berlaku selama kurun waktu tanggal 26 Juni 2023 sampai dengan tanggal 26 Juni 2024
The declaration of ethics applies during the periode Juni 26, 2023 until Juni' 26, 2024



Medan, 26 Juni 2023

[Signature]
Dr.dr.Nurfadly,MKT

Lampiran 2 Surat Hasil Identifikasi Tanaman



**LABORATORIUM SISTEMATIKA TUMBUHAN
HERBARIUM MEDANENSE
(MEDA)**

UNIVERSITAS SUMATERA UTARA

JL. Bioteknologi No.1 Kampus USU, Medan – 20155
Telp. 061 – 8223564 Fax. 061 – 8214290 E-mail.nursaharapasaribu@yahoo.com

Medan, 03 Juli 2023

No. : 1235/MEDA/2023
Lamp. : -
Hal : Hasil Identifikasi

Kepada YTH,

No.	Nama	NIM
1.	Ainur Rofiq	2108260045
2.	M. Dian Islami	2108260148
3.	Muhammad Zihni Baihaqi	2108260092
4.	Aditya Sofyansyah Hermaya	2108260124
5.	Tristan Kanginan	2108260053

Instansi : Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

Dengan hormat,

Bersama ini disampaikan hasil identifikasi tumbuhan yang saudara kirimkan ke Herbarium Medanense, Universitas Sumatera Utara, sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Kelas : Dicotyledoneae
Ordo : Malvales
Famili : Malvaceae
Genus : *Durio*
Spesies : *Durio zibethinus* Murray.
Nama Lokal: Kulit Durian

Demikian, semoga berguna bagi saudara.

Kepala Herbarium Medanense.

Dr. Etti Sartina Siregar S.Si., M.Si.
NIP. 197211211998022001

Lampiran 3 Surat Peminjaman Tempat Penelitian Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran UMSU



Nomor : 1256/IL3.AU/UMSU-08/F/2023
Lampiran : -
Perihal : **Peminjaman Tempat Penelitian**

Medan, 19 Shafar 1445 H
04 September 2023 M

Kepada Yth.
Kepala Bagian Biokimia
Fakultas Kedokteran UMSU
di-
Tempat

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Dengan hormat, teriring salam dan do'a kami sampaikan semoga Bapak/Ibu berada dalam keadaan sehat wal'afiat, serta senantiasa sukses dalam menjalankan tugas sehari-hari.

Sehubungan dengan surat permohonan peminjaman tempat untuk melakukan penelitian Program Kretifitas Mahasiswa (PKM) Tahun 2023 pada Laboratorium di Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, yaitu:

No	Nama	NPM	Jabatan
1.	Ainur Rofiq	2108260045	Ketua
2.	M. Dian Islami	2108260148	Anggota
3.	Muhammad Zihni Baihaqi	2108260092	Anggota
4.	Aditya Sofyansyah Hermaya	2108260124	Anggota
5.	Tristan Kanginan	2108260053	Anggota

No	Nama	NIDN	Keterangan
1.	Dr. dr. Humairah Medina Liza Lubis, M.Ked.(PA), Sp.PA	0115077401	Dosen Pendamping

maka kami memberikan izin kepada yang bersangkutan, untuk melakukan penelitian di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara. Selama proses pemakaian laboratorium, jika terdapat pemakaian alat yang rusak maka akan menjadi tanggungjawab peneliti dan pemakaian Bahan Habis Pakai (BHP) ditanggung oleh peneliti. Peneliti wajib mengikuti peraturan yang berlaku di Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.

Demikian kami sampaikan, atas perhatian kami ucapkan terima kasih.

Wassalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh




Dekan,
dr. Siti Masliana Siregar, Sp.THT-KL(K)
NIDN: 0106098201

Tembusan Yth :
1. Peringgal



Lampiran 4 Surat Permohonan Izin Penelitian Ke Laboratorium Mega Global Safety Indonesia



Nomor : 1194/IL3.AU/UMSU-08/F/2023
 Lampiran : -
 Perihal : **Permohonan Izin Penelitian**

Medan, 09 Shafar 1445 H
 25 Agustus 2023 M

Kepada Yth.
PT. Multi Global Safety Indonesia
 di-
 Medan

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Dengan hormat, teriring salam dan do'a kami sampaikan semoga Bapak/Ibu berada dalam keadaan sehat wal'afiat, serta senantiasa sukses dalam menjalankan tugas sehari-hari.

Sehubungan dengan proses penelitian pada Program Kretifitas Mahasiswa (PKM) Tahun 2023, maka kami bermaksud mengajukan permohonan izin untuk melakukan penelitian di PT. Multi Global Safety Indonesia, dengan judul penelitian "Aktivitas Kulit Durian (*Durio zibethinus*) sebagai Stimulator Apoptosis Jalur Bcl-2: Kajian In Vitro dan Imunositokimia pada sel HeLa Kanker Serviks"

Penelitian ini dilaksanakan oleh Mahasiswa FK UMSU sebagai berikut :

No	Nama	NPM	Jabatan
1.	Ainur Rofiq	2108260045	Ketua
2.	M. Dian Islami	2108260148	Anggota
3.	Muhammad Zihni Baihaqi	2108260092	Anggota
4.	Aditya Sofyansyah Hermaya	2108260124	Anggota
5.	Tristan Kanginan	2108260053	Anggota

No	Nama	NIP/NIDN	Keterangan
1.	Dr. dr. Humairah Medina Liza Lubis, M.Ked.(PA)., Sp.PA	197407152008012003/ 0115077401	Dosen Pendamping

Selanjutnya kami bermaksud mengajukan permohonan izin agar Mahasiswa tersebut di atas dapat melakukan penelitian di PT. Multi Global Safety Indonesia.

Demikian permohonan ini kami sampaikan, atas perhatian serta kerjasamanya kami ucapkan terima kasih.

Wassalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh



Dekan,
dr. Siti Masliana Siregar, Sp.THT-KL(K)
 NIDN: 0106098201

Tembusan:
 1. Wakil Dekan I dan III;
 2. Peringgal



Lampiran 5 Surat Izin Riset dari Laboratorium Klaster *Stem Cells & Tissue Engineering Research Center*



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Gedung Fakultas Kedokteran UI
Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 10430
PO.Box 1358
T. 62.21.3912477, 31930371, 31930373,
3922977, 3927360, 3153236
F. 62.21.3912477, 31930372, 3157288
E. humas@fk.ui.ac.id, office@fk.ui.ac.id
fk.ui.ac.id

NOTA DINAS

Nomor : ND-114/UN2.F1.IMERI/SCTERC/PPM.00.02/2023

Kepada Yth. : Terlampir
Dari : Ketua Klaster *Stem Cells & Tissue Engineering Research Center*
Perihal : Technical Lab Meeting ke-13

Dengan hormat,
Bersama surat ini kami mengundang Bapak/Ibu untuk mengikuti kegiatan *Technical Lab Meeting* yang akan diselenggarakan pada:

Hari & tanggal : Senin, 28 Agustus 2023
Waktu : 13.00 – 15.00 WIB
Kegiatan : Presentasi Rencana Penelitian dan Kuliah Aseptik

No	Nama	Institusi	Judul
1	Ainur Rofiq	S1 – Pendidikan Dokter, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara	Aktifitas Kulit Durian (<i>Durion zibethinus</i>) sebagai Stimulator Apoptosis Jalur Bcl-2: Kajian in vitro dan imunositokimia pada sel HeLa Kanker Serviks
2	Farhan Abdullah Rizal	S1 – Pendidikan Dokter, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara	Modulasi Efek Warburg pada Sel Kanker Serviks dengan Pemberian <i>Indole-3 Carbinol</i> Daun Kale (<i>Brassica oleracea L</i>)
3	Nesya Alya Fayyaza	S1 – Pendidikan Dokter, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara	Aktifitas Anti Kanker Serviks dari γ -Tokotrienol Minyak Kelapa Sawit (<i>Elaeis guineensis Jacq.</i>): Studi in siliko dan in vitro dari sel HeLa

Pimpinan Rapat : Prof. dr. Jeanne A Pawitan, MS, PhD
Platform : ZOOM Meeting
Meeting ID : 952 5084 3597
Passcode : 662539
Link :
<https://zoom.us/j/95250843597?pwd=WmcxbWNEZ0ZTeFhScXM4eTJQUXlScDZ09>

Demikian kami sampaikan, atas perhatian dan kerjasamanya kami ucapkan terima kasih.

Jakarta, 25 Agustus 2023
Ketua Klaster *Stem Cells & Tissue Engineering* IMERI

Prof. Dr. dr. Ismail H. Dilogu, SpOT(K)
NIP UI BHMN. 0106050068

Prepararasi sampel, meserasi, fitokimia



Pengumpulan sampel kulit durian



Dicuci/dibersihkan



Di iris-iris kulit durian yang telah dicuci



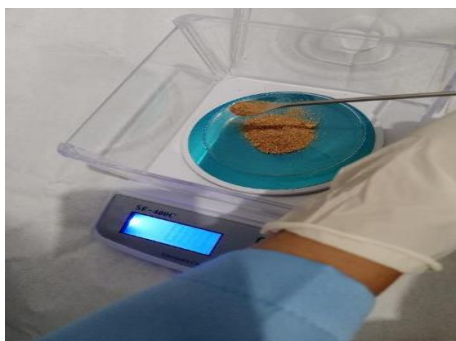
Setelah diiris



Dikeringkan



Kering dan ditimbang



Dihaluskan diperoleh hasil simplisia



Proses maserasi dengan etanol 96%



Perendaman dengan beberapa kali diaduk, tempat gelap



Proses penyaringan, tampak hasil berwarna coklat bening



Pemindahan filtrat maserasi untuk dievaporasi



Evaporasi



Proses penguapan dan dikentalkan dengan *waterbach*



Hasil ekstrak



Alkaloid (+)



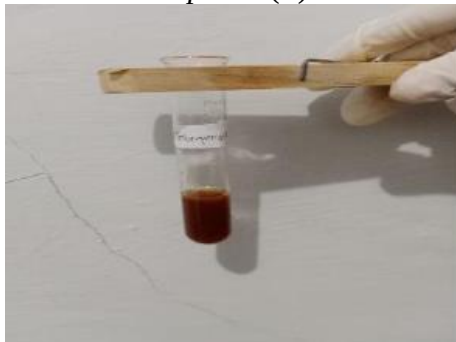
Flavonoid (+)



Saponin (+)



Tanin (+)



Triterpenoid (+)

Lampiran 7 Hasil Analisis GC-MS Kulit Buah Durian

Library Search Report						
Data Path : C:\msdchem\1\data\230911-A\						
Data File : 31.D						
Acq On : 13 Sep 2023 00:13						
Operator : eva						
Sample : 2.3/2986 Ekstrak Kulit Durian						
Misc :						
ALS Vial : 13 Sample Multiplier: 1						
Search Libraries: C:\Database\NIST2020.L				Minimum Quality: 100		
Unknown Spectrum: Apex						
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e						
Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	3.059	4.62	C:\Database\NIST2020.L Butanoic acid, 2-methyl- Butanoic acid, 2-methyl- Hexanoic acid, 2-methyl-	4831 4817 15431	000116-53-0 000116-53-0 004536-23-6	86 72 72
2	3.342	0.72	C:\Database\NIST2020.L 1H-Pyrazole-3,4-diamine 2-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy- 4H-1,2,4-Triazol-3-amine, 4-methyl	3397 3508 3402	016461-98-6 010493-98-8 016681-76-8	59 49 47
3	3.659	0.76	C:\Database\NIST2020.L (S)-Methyl 2,3-dihydroxypropanoate 3-Thietanol Thiourea, methyl-	10486 2556 2514	010303-88-5 010304-16-2 000598-52-7	83 78 45
4	5.369	2.44	C:\Database\NIST2020.L Azetidine, 1-methyl- Azetidine, 2-methyl- 2H-Pyran-2-one, tetrahydro-	700 699 4174	004923-79-9 019812-49-8 000542-28-9	64 64 52
5	5.486	7.39	C:\Database\NIST2020.L 2H-Pyran-2-one, tetrahydro- 2H-Pyran-2-one, tetrahydro- 2H-Pyran-2-one, tetrahydro-	4178 4174 4176	000542-28-9 000542-28-9 000542-28-9	86 72 72
6	13.188	1.83	C:\Database\NIST2020.L 2-Methoxy-4-vinylphenol 2-Methoxy-4-vinylphenol Phenol, 5-ethenyl-2-methoxy-	28294 28303 28346	007786-61-0 007786-61-0 000621-58-9	95 94 83
7	29.958	0.37	C:\Database\NIST2020.L Nonanoic acid, 9-oxo-, methyl este Pentadecanoic acid, methyl ester Methyl 9-methyltetradecanoate	60452 143571 143550	001931-63-1 007132-64-1 213617-69-7	46 46 46
8	30.185	0.57	C:\Database\NIST2020.L 6,7-Dioxabicyclo[3.2.1]octane, 1-m ethyl- 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl Eicosyl propyl ether	14131 158590 249106	1000142-18-0 000502-69-2 1000406-28-1	38 35 27
9	30.523	1.13	C:\Database\NIST2020.L Thiazole, 2,4,5-trimethyl- (3,4-Difluorophenyl)methanethiol, S-(2-methylpropionyl)- trans-2-Decen-1-ol, methyl ether	13522 110929 45425	013623-11-5 1000463-00-9 1000352-66-3	27 22 20
10	30.820	0.87	C:\Database\NIST2020.L 9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)- 6-Pentadecenoic acid, 13-methyl-, (6Z)-, O-methyl 9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	158438 158459 158446	001120-25-8 1000505-96-4 001120-25-8	93 93 93
11	30.958	0.63	C:\Database\NIST2020.L			

			Dihydrosyringenin	89344	020736-25-8	96
			Diphenylmethane	43623	000101-81-5	56
			5-(3-Hydroxypropyl)-2,3-dimethoxyphenol	89359	063543-12-4	52
12	31.040	7.34	C:\Database\NIST2020.L			
			Hexadecanoic acid, methyl ester	161203	000112-39-0	99
			Hexadecanoic acid, methyl ester	161211	000112-39-0	98
			Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	161236	005129-60-2	98
13	31.323	1.79	C:\Database\NIST2020.L			
			Ribitol	29643	000488-81-3	86
			Galactitol	57131	000608-66-2	86
			D-Arabinitol	29644	000488-82-4	64
14	31.392	1.14	C:\Database\NIST2020.L			
			Sorbitol	57128	000050-70-4	91
			Galactitol	57131	000608-66-2	90
			D-Arabinitol	29644	000488-82-4	70
15	31.619	11.29	C:\Database\NIST2020.L			
			n-Hexadecanoic acid	143511	000057-10-3	96
			n-Hexadecanoic acid	143508	000057-10-3	95
			n-Hexadecanoic acid	143509	000057-10-3	89
16	31.682	2.81	C:\Database\NIST2020.L			
			Galactitol	57131	000608-66-2	76
			Sorbitol	57128	000050-70-4	64
			Xylitol	29641	000087-99-0	64
17	31.799	1.02	C:\Database\NIST2020.L			
			Isopropyl palmitate	197283	000142-91-6	92
			Isopropyl palmitate	197285	000142-91-6	83
			Octadecanoic acid	179089	000057-11-4	68
18	32.261	4.12	C:\Database\NIST2020.L			
			8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester	191899	056599-58-7	99
			9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	191917	000112-63-0	99
			Methyl 9-cis,11-trans-octadecadienoate	191892	013058-52-1	99
19	32.302	5.82	C:\Database\NIST2020.L			
			9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	194438	000112-62-9	99
			9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-	194445	001937-62-8	99
			9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	194441	000112-62-9	99
20	32.447	1.39	C:\Database\NIST2020.L			
			Methyl stearate	197277	000112-61-8	99
			Methyl stearate	197276	000112-61-8	99
			Methyl stearate	197271	000112-61-8	99
21	32.688	2.29	C:\Database\NIST2020.L			
			6-Octadecenoic acid	176211	1000336-66-8	99
			9-Octadecenoic acid, (E)-	176224	000112-79-8	97
			trans-13-Octadecenoic acid	176229	000693-71-0	96
22	33.254	0.53	C:\Database\NIST2020.L			
			cis-Z-.alpha.-Bisabolene epoxide	99244	1000131-71-2	90
			Z,Z-10,12-Hexadecadien-1-ol acetate	173594	1000130-89-5	89
			12-Methyl-E,E-2,13-octadecadien-1-ol	173711	1010130-90-4	89
23	33.274	1.27	C:\Database\NIST2020.L			
			Cyclododecyne	39755	001129-90-4	93
			Methyl 9-cis,11-trans,13-trans-octadecatrienoate	189450	1000336-42-6	92
			Cyclooctene, 3-ethenyl-	18069	002213-60-7	90

```

24  33.350  0.97 C:\Database\NIST2020.L
      Oxiraneoctanoic acid, 3-octyl-, me 214785 002500-59-6 81
      thyl ester
      1-Eicosene 173727 003452-07-1 53
      cis-7,cis-11-Hexadecadien-1-yl ace 173597 052207-99-5 53
      tate

25  34.343  1.44 C:\Database\NIST2020.L
      16-Hexadecanoyl hydrazide 161003 002619-88-7 83
      Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hy 236864 023470-00-0 76
      droxymethyl)ethyl ester
      Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hy 236865 023470-00-0 70
      droxymethyl)ethyl ester

26  35.171  0.85 C:\Database\NIST2020.L
      1-cis-Vaccenoylglycerol 265791 020379-67-3 97
      9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 263921 003443-82-1 95
      2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl e
      ster
      9-Octadecenoic acid (Z)-, 2-hydrox 266037 003443-84-3 90
      y-1-(hydroxymethyl)ethyl ester

27  39.790  2.14 C:\Database\NIST2020.L
      Stigmasterol 309443 000083-48-7 99
      Stigmasterol 309444 000083-48-7 99
      Stigmasterol 309445 000083-48-7 91

28  40.659  15.91 C:\Database\NIST2020.L
      .gamma.-Sitosterol 310597 000083-47-6 99
      .gamma.-Sitosterol 310599 000083-47-6 99
      .beta.-Sitosterol 310595 000083-46-5 95

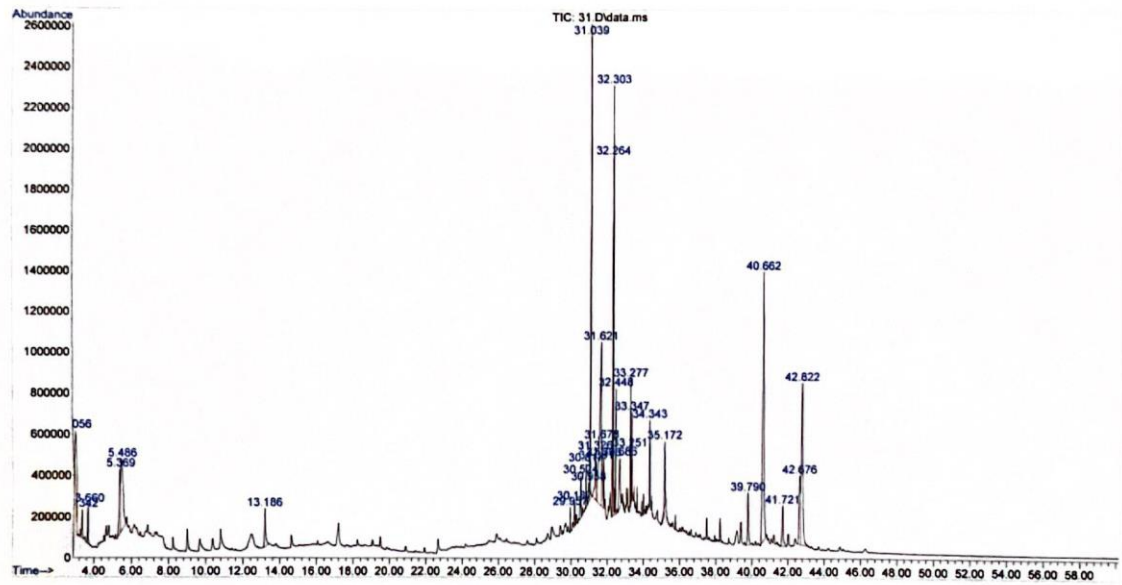
29  41.721  2.13 C:\Database\NIST2020.L
      4,22-Stigmastadiene-3-one 308239 020817-72-5 99
      4,22-Stigmastadiene-3-one 308240 020817-72-5 99
      Spinasterone 308234 023455-44-9 99

30  42.673  3.72 C:\Database\NIST2020.L
      Vitamin E 318346 000059-02-9 97
      6-Methoxy-2,7,8-trimethyl-2-(4,8,1 318374 079306-82-4 96
      2-trimethyltridecyl)chroman
      dl-.alpha.-Tocopherol 318351 010191-41-0 95

31  42.824  10.70 C:\Database\NIST2020.L
      Stigmast-4-en-3-one 309452 001058-61-3 95
      .gamma.-Sitostenone 309453 084924-96-9 95
      Cholest-5-en-3-one, 4,4-dimethyl- 309457 002220-42-0 55

```

BALITRO1.M Fri Sep 15 09:42:59 2023

Lampiran 8 *Chromatogram* hasil analisis *GC-MS* kulit buah durian

Lampiran 9 Hasil Uji Statistik

Tests of Normality

	Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Pengulangan	300	.214	3	.	.990	3	.805
	250	.304	3	.	.907	3	.408
	200	.277	3	.	.941	3	.533
	150	.242	3	.	.973	3	.683
	100	.313	3	.	.895	3	.370

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Pengulangan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.829	4	10	.039

ANOVA

Pengulangan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.268	4	.067	225.581	.000
Within Groups	.003	10	.000		
Total	.271	14			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Pengulangan

Games-Howell

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
300	250	-.2171333 [*]	.0142289	.001	-.286082	-.148185
	200	-.2591333 [*]	.0121678	.005	-.345029	-.173238
	150	-.3291667 [*]	.0120640	.003	-.417403	-.240931
	100	-.3908667 [*]	.0206143	.000	-.487901	-.293833
250	300	.2171333 [*]	.0142289	.001	.148185	.286082
	200	-.0420000	.0081254	.080	-.094117	.010117
	150	-.1120333 [*]	.0079692	.011	-.166845	-.057221
	100	-.1737333 [*]	.0185180	.013	-.276741	-.070725

200	300	.2591333 [*]	.0121678	.005	.173238	.345029
	250	.0420000	.0081254	.080	-.010117	.094117
	150	-.0700333 [*]	.0030168	.000	-.083990	-.056076
	100	-.1317333 [*]	.0169856	.045	-.256646	-.006821
150	300	.3291667 [*]	.0120640	.003	.240931	.417403
	250	.1120333 [*]	.0079692	.011	.057221	.166845
	200	.0700333 [*]	.0030168	.000	.056076	.083990
	100	-.0617000	.0169114	.192	-.188463	.065063
100	300	.3908667 [*]	.0206143	.000	.293833	.487901
	250	.1737333 [*]	.0185180	.013	.070725	.276741
	200	.1317333 [*]	.0169856	.045	.006821	.256646
	150	.0617000	.0169114	.192	-.065063	.188463

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 Lnkonsentrasi - Inhibisi	44.1362467520	18.6915066567	8.3590958973	67.3448176398	20.9276758642	-5.280	4	.006

Utility of Durian Peel *Flavonoid* Compounds (Durio Zibethinus Murr.) As A Stimulator Of Apoptosis In Cervical Cancer Hela Cells : A Study Of Immunofluorescence

Aditya Sofyansyah Hermaya¹, Humairah Medina Liza Lubis²

1. Medical Education, Faculty of Medicine, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, Medan, Indonesia
2. Department of Anatomical Pathology, Faculty of Medicine, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, Medan, Indonesia

Corresponding author: aditya552003@gmail.com

Abstract

Introduction: Cervical cancer is the cancer with the fourth largest prevalence rate in the world. The cause of the development of cervical cancer is the failure of the normal apoptosis process which also has an impact on the failure of chemotherapy and radiotherapy. To induce apoptosis, *flavonoid* compounds (apigenin and luteolin) can be used through the *Bcl-2* protein-controlled signaling route. **Objective:** This research aims to evaluate the ability of *flavonoid* compounds in the form of apigenin and luteolin in durian peel in inhibiting the proliferation of *Bcl-2* cancer cells. **Methods:** An Immunofluorescence study was carried out by inducing cultured cervical cancer HeLa cells to assess apoptosis using *Bcl-2* staining with durian skin treatment. Activities in this study include plant identification, preparation and messe, phytochemical tests, GC-MS, in-vitro, and Immunofluorescence. **Results:** In vitro tests showed morphological changes and the formation of formazan crystals after MTT compound treatment. The results of the IC50 calculation showed that durian peel extract showed active anticancer activity with a value of 44.14 ± 18.69 . The survival percentage decreased significantly by $p < 0.05$ at the highest concentration (300 $\mu\text{g/ml}$). The effect of 1x dose of IC50, HeLa cells with durian peel treatment can inhibit and activate the antiapoptosis of *Bcl-2* so as to stimulate the reappearance of apoptosis. **Conclusion:** *Flavonoid* compounds in durian peel can be considered as potential anticancer agents for cervical by stimulating apoptosis.

Keywords: Durio zibethinus, kanker serviks, *flavonoid*, apoptosis, HeLa cell

Introduction

Cervical cancer is the fourth most common female cancer found worldwide (Small *et al.*, 2017; Ferrall *et al.*, 2021), and one of the top three cancers affecting women under the age of 45. Globally there were approximately 604,000 new cases of cervical cancer and 342,000 deaths in 2020, leading to a significant burden of these cancers (Arbyn *et al.*, 2020; Sultanov *et al.*, 2022).

Treatment approaches and outcomes for cervical cancer patients are highly dependent on the stage of disease, with a 5-year survival rate ranging >90% if diagnosed at an early stage and localized to <20% if diagnosed at an advanced or metastatic stage (American Cancer Society, 2022). Treatment options for early-stage and locally invasive cervical cancer include radical hysterectomy or radical trachelectomy with pelvic lymphadenectomy as well as concomitant chemotherapy and radiation therapy. For distantly metastatic cervical cancer, treatment focuses on systemic therapy (Serkies and Jassem, 2018). With low cure rates for advanced disease and side effects of current therapies, new therapeutic options for cervical cancer patients are urgently needed.

Both chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy also have disadvantages in the treatment of cervical cancer with the emergence of treatment resistance effects. This happens because cancer cells also have a way to evade apoptosis which is a homeostasis mechanism to maintain cell populations in tissues. Apoptosis is the process of regulation of physiological cell

death to control the number of old and abnormal cells (Bhattacharjee *et al.*, 2022).

Bcl-2 is one of the main inhibitors in the process of apoptosis (anti-apoptosis). *Bcl-2* protein has a major role in protecting cells from death by increasing resistance to factors that trigger the process of apoptosis, thereby inhibiting cell death. When there is genetic instability in cancer cells, mutations in apoptotic genes such as *Bcl-2* will cause increased expression of anti-apoptotic proteins. This will drive tumor evolution and growth, as well as treatment failure (Khalissa *et al.*, 2018). As a result, the efficacy of cancer treatment depends largely not only on the cell damage it causes, but also on the ability of the cell to activate its apoptotic program.

To overcome treatment resistance, disease recurrence and the emergence of lethal metastases, current strategies require the use of combination therapies, targeting alternative pathways for cell death. Much research has been done focused directly on the target of cancer cells to avoid treatment failure, including the development of natural materials. Research on the bioactive components of durian peels (*Durio zibethinus* Murr.) is still limited to cancer treatment. Compounds that act as *Bcl-2* inhibitors in several types of cancer including peels, airway and lung have been studied but in cervical cancer it is still difficult to obtain supporting literature.

From the literature studies we have obtained, research on durian peels is

only limited to cytotoxic and antioxidant activity against anticancer in general (Pratiwi, Syafnir and Alhakimi, 2021), but does not discuss how it plays a role in the *Bcl-2 apoptosis pathway*. Therefore, one of the objectives of this research is to examine the activity of durian peels bioactive compounds which are expected to produce

the latest findings and become alternative treatment candidates cervical cancer in the prevention of chemotherapy resistance and failure of cancer therapy through apoptotic regulators i.e. *Bcl-2 pathway*.

Durian peels contains three *main flavonoid* compounds namely *flavanones*, *flavonols* and *flavones*. *Flavones* have more effective anticancer activity due to their high lipophilicity. The substances contained in *flavones* are *apigenin* and *luteolin*. *Apigenin* works by suppressing various types of cancer through various biological effects, such as triggering cell apoptosis and autophagy, inducing cell cycle termination, suppressing cell migration and invasion, and stimulating immune responses (Yan *et al.*, 2017). While *luteolin* increases the expression of various *pro-apoptotic genes*, including APAF1, BAX, BAD, BID, BOK, BAK1, TRADD, FADD, FAS, and *Caspases 3 and 9*, it decreases the expression of *anti-apoptotic genes*, including NAIP, MCL-1, Bcl-xL and Bcl-

2. The results suggest that an understanding of the mechanism of luteolin-induced apoptosis may be useful in cancer therapy (Raina *et al.*, 2021).

From the background above, this research

was conducted to prove the mechanism of apoptosis inhibitors that work through the *Bcl-2 pathway* in cervical cancer and examine the possible effectiveness of durian peels in improving treatment resistance, so that it can be one of the considerations of alternative compounds from natural ingredients that are useful in cervical cancer clinical therapy in the future.

Materials and Methods

Materials

Materials for extraction and matching are drip pipettes, spatulas, 2500 mL dark glass bottles, micro pipettes, a series of rotary evaporator tools, test tubes, glass containers, measuring flasks, beakers, split funnels, stirring rods, test tube racks, hot plates, measuring cups, filter paper, tissues, cotton, aluminum foil, plastic wrap and label paper. Ingredients used durian bark, methanol, n-hexane, ethyl acetate, aquadest, mayer reagent, wagner, and dragendroff, chloroform, Mg powder, H₂SO₄(p), HCl(p), FeCl₃ 1%, H₂SO₄(p) solution, HNO₃, glacial acetic acid, cerium sulfate, DPPH.

Materials for in vitro studies using 96- well culture plate, disposable serological pipette 10 ml, micropipette tips 10 ul, micropipette tips 100 ul, micropipette tips 100 ul, cell culture flask 75 cm, microcentrifuge tube 2ml, microcentrifuge tube 50 ml, microcentrifuge tube 15 ml, microcentrifuge tube 10 ml. Then we use *phosphate buffer saline (PBS)* to dissolve the extract that we will induce in cervical cancer HeLa cells.

For culture media we use a combination of *fetal bovine serum (FBS)* and *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)* as a complete medium. For

Immunofluorescence is seen on the apoptosis picture with decreased *Bcl-2* expression.

Methods

Sample preparation and maceration

Two thousand five hundred grams of durian peel cut into small pieces, dried and mashed. Simplisia soaked 96% ethanol (1:10) for 3 days with several stirs in a dark storage place. Filtered with *vacuum filtration* and *Whatman* filter paper no. 40, evaporated with *rotary evaporator* $T=55^{\circ}\text{C}$, $P=80\text{ mBar}$.

Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS)

The sample in the form of liquid is injected into the injector and then evaporated. The sample in the form of steam is carried by the carrier gas to the column for the separation process. Once separated, each component will go through an ionizing chamber and be bombarded by electrons so that ionization occurs. After that, data processing is carried out with computer software that stores standard SRM (*Standard Reference Material*) analysis data

In vitro analysis with durian peels treatment and MTT assay

The way it works *in vitro* is as follows: 1) HeLa cells are inserted in 96 wells with a concentration of 1×10^4 cells/contribution; 2) After 24 hours, cells were washed twice with 100 μl of serum- free medium and satisfied for one hour at 37°C ; 3) After starvation,

cells were treated with varying concentrations of *D.zibethinus* ethanol extract (100, 150, 200, 250, and 300 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours; 4) At the end of treatment, cells were incubated with

100 μl of *Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)* containing MTT (15 ml) for 4 hours at 37°C in a CO_2 incubator; 5) The media containing MTT was removed and the cells were washed with PBS (200 μl); 6) The crystals formazan are dissolved by adding 100 μl of solvent solution and mixed properly by pipettes up and down; 7) Absorbance spectrophotometry of the purple-blue formazan dye was measured on a microplate reader at a wavelength of 540 nm.

Determination of apoptosis based on Bcl-2 expression

HeLa cells were grown on a cover glass in a culture dish and left attached for 24 hours before adding durian bark extract. After the cell has been incubated with extracts for 24 hours, the cover is washed once in a *phosphate-buffered saline* solution and fixed in *object glass*. The *treated cells* were stained with primary antibodies *Bcl-2* and *fluorescein isothiocyanate (FITC)* and nuclear dye with *DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)* and visualized with fluorescence microscopy. Then identified living cells (green), and apoptosis (bright green).

Result

Results of simplisia and organoleptic parameters of extracts

Table 1. Results of simplisia and organoleptic parameters of extracts

Simplisia Parameter Result	Organoleptic Result of Extract
Durian peel moisture content = 8.7%	96% ethanol extract of durian peel powder with maceration method is thick, brown in color, has no taste, has a distinctive odor.

According to Table 1, The water content in durian peels reaches 8.7%. The thick extract from maceration with ethanol 96% of the durian peel has a brown color, has no taste, and emits a distinctive aroma.

Table 2. Extract maseration results

Phytochemical tests were carried out and the following results were obtained :

Extraction Method	Weight of Extracted Powder	Total Weight of Extract	Maseration Result
Maseration	2526.4 gram	206.7 gram	12.22%

According to Table 2, the maceration process produces extracts with a specific yield. Of the total 2526.4 grams of powder used in the extraction, 206.7 grams of extract were obtained, with a percentage of yield of 12.22%

Table 3. Phytochemical results

No	Parameter	Reaction	Observation
1	Alkaloid	+	Orange color
2	<i>Flavonoid</i>	+	Reddish orange color
3	Saponin	+	Foam
4	Tanin	+	Blackish-green color
5	Triterpenoid	+	Reddish-brown color

According to the results of phytochemical tests listed in Table 3, positive (+) reactions were detected on five parameters, namely alkaloids, *flavonoids*, *saponins*, *tannins*, and *triterpenoids*, with the following specific observations: *alkaloids* showed the formation of orange color, *flavonoids* produced reddish-orange colors, *saponins*

characterized by the formation of foam, *tannins* produce a blackish-green color, and *triterpenoids* exhibit a reddish-brown color

Results of Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS)

GC-MS data showed that more than 93 bioactive compounds were obtained with RT and area values divided into 31 groups ranging from 3.059 to 42.824 for RT and 0.37 to 15.91% for abundance area. *chromatogram of GC-MS analysis results of durian fruit peel.*

Results of in vitro analysis with durian peelextact treatment

Live and dead cells are morphologically different. Figure 5 (A) shows HeLa cells before treatment which are round and surrounded by a clear cell

membrane. After treatment, the cancer cells undergo morphological changes, becoming non-spherical (Figure 5 (B)), and the formation of formazan crystals after MTT compound treatments (Figure 5 (C)). The cytotoxic activity of each treatment was evaluated based on the IC₅₀ value. The IC₅₀ value was obtained by plotting the log concentration of the treatment versus the % live cells.

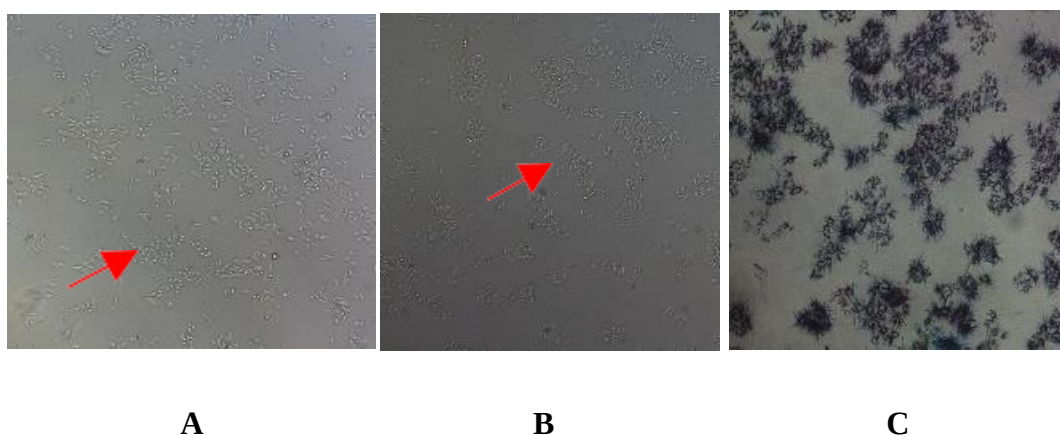


Figure 5. (A) HeLa cells before treatment, (B). Cell death after treatment, (C) Formazan crystal formation

Table 7. Cytotoxic Test Results

No	Extract Name	Test Cells	IC ₅₀ (µg/mL)	Activity
1	Durian peel	HeLa Cells	5.92	Active
2	Doxorubicin		1.59	Highly active

IC₅₀ activity is highly active = 5 µg/ml; active = 5-10 µg/ml; moderate = 11-30 µg/ml; inactive = >30 µg/ml.

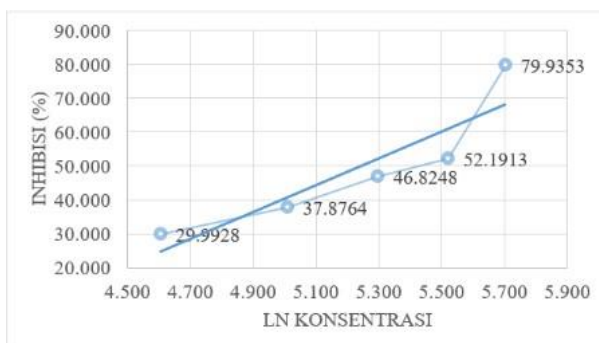


Figure 6. Inhibition rate in HeLa cells with durian peel treatment

Results of Apoptosis Analysis by Immunofluorescence

Durian peel has cytotoxicity on cervical cancer HeLa cells by inducing apoptosis and works in decreasing the expression of anti-apoptotic *Bcl-2* (Figure 7).

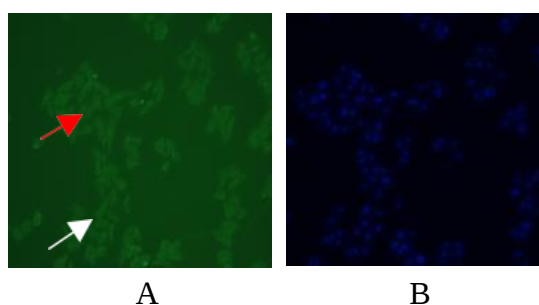


Figure 7. HeLa cells treated with durian peel. A. Classic morphological changes indicate apoptosis (red arrows), while HeLa cells that are still alive are marked with white arrows. B. Cell nucleus with DAPI staining

Discussion

Phytochemicals

Phytochemical tests show that the sample contains five types of secondary metabolites, namely alkaloids, flavonoids, saponins, tannins, and triterpenoids. Flavonoids produce a reddish-orange color in phytochemical tests. The presence

of these compounds indicates pharmacological potential that can be further developed in medical research and applications.

Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS)

Based on the data on the results of the analysis, it can be seen that the durian fruit peel contains a lot of bioactive compounds, which shows the great potential of durian fruit peel to be utilized as an alternative source of antioxidants. The content of bioactive compounds from durian fruit peels with the lowest percent area is a compound of nonanoic acid, 9-oxo-, methyl ester ($C_{10}H_{18}O_3$) with a molecular weight of 186.25 g/mol and the highest percent area is gamma-sitosterol ($C_{29}H_{50}O$) with a molecular weight of 414.7 g/mol.

In vitro

IC50 calculation results showed that flavonoid compounds of durian peel extract are active as anticancer in vitro with a value of 44.14 ± 18.69 . The percentage of survival decreased significantly $p < 0.05$ at the highest concentration (300 $\mu\text{g/ml}$). While doxorubicin as a standard drug for cancer treatment showed very active activity, but has the disadvantage of very high carcinogenicity.

Immunofluorescence

The effect observed in HeLa cells with durian peel treatment can be explained by inhibiting the anti-apoptotic *Bcl-2*, thus stimulating apoptosis again. The results showed

that durian peel treatment was associated with a dose-dependent decrease in *Bcl-2* expression.

Cervical cancer HeLa cells respond to compounds in durian peel by inactivating *Bcl-2* and inducing apoptosis.

References

- Allouche, A. (2012) 'Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares', *Journal of computational chemistry*, 32, pp. 174–182.
- American Cancer Society (2022) 'Cervical Cancer Survival Rates | Cancer 5Year Survival Rates', *American Cancer Society*.
- Arbyn, M. *et al.* (2020) 'Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis', *The Lancet Global Health*, 8(2), pp. e191–e203
- Bhattacharjee, R. *et al.* (2022) 'Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer: Molecular pathways and targeted therapeutic strategies', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 174(March), p. 103675.
- Ferrall, L. *et al.* (2021) 'Cervical cancer immunotherapy: Facts and hopes', *Clinical Cancer Research*, 27(18), pp. 4953–4973.
- Khalissa, D. *et al.* (2018) 'Immunohistochemical expression of p53 and *Bcl-2* in Algerian cervical carcinoma', *Biomedical and Pharmacology Journal*, 11(1), pp.67–75.
- O'Boyle, N. M. *et al.* (2011) 'Open Babel: An open chemical toolbox.', *Journal of cheminformatics*, 3(33), p. 33.
- Pratiwi, A. A., Syafnir, L. and Alhakimi, T. A. (2021) 'Penelusuran Pustaka Uji Aktivitas Ekstrak Kulit Buah Durian (*Durio zibethinus* Murray) sebagai Antibakteri terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* dan Bakteri *Staphylococcus epidermidis*', *Prosiding Farmasi*, pp. 53–59.
- Raina, R. *et al.* (2021) 'Luteolin inhibits proliferation, triggers apoptosis and modulates Akt/mTOR and MAP kinase pathways in HeLa cells', *Oncology Letters*, 21(3), pp. 1–14.
- Serkies, K. and Jassem, J. (2018) 'Systemic therapy for cervical carcinoma – current status', *Chinese Journal of Cancer Research*, 30(2), pp. 209–221.
- Small, W. *et al.* (2017) 'Cervical cancer: A global health crisis', *Cancer*, 123(13), pp. 2404–2412.
- Sultanov, M. *et al.* (2022) 'Investigating feasibility of 2021 WHO protocol for cervical cancer screening in underscreened populations: PREvention and SCReening Innovation Project Toward Elimination of Cervical Cancer (PRESCRIP-TEC)', *BMC Public Health*, 22(1), pp. 1–10.
- Yan, X. *et al.* (2017) 'Apigenin in cancer

- therapy: Anti-cancer effects and mechanisms of action', *Cell and Bioscience*, 7(1), pp. 1–16
- Prasiska Wulandari R, Gabriel K, Aulia Nurdin H, et al. Indonesian Journal of Chemical Science In Silico Study of Secondary Metabolite Compounds in Parsley (*Petroselinum crispum*) as a Drug Therapy for Blood Cancer (Myeloproliferative Neoplasm (MPN)) targeting JAK-2. *Indones J Chem Sci*. 2023;12(2):216-228.
- Tassinari M, Mottotese N, Galvani G, et al. Luteolin Treatment Ameliorates Brain Development and Behavioral Performance in a Mouse Model of CDKL5 Deficiency Disorder. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15). doi:10.3390/ijms23158719
- Hakkola J, Hukkanen J, Turpeinen M, Pelkonen O. *Inhibition and Induction of CYP Enzymes in Humans: An Update*. Vol 94. Springer Berlin Heidelberg; 2020. doi:10.1007/s00204-020-02936-7
- Kurniawati EY, Pramono N, Hidayat ST, Mahati E. In Silico Pharmacokinetic and Toxicity Analysis on Clitoria Ternatea Flower. *J Farm Indones*. 2023;20(2):124-135. doi:10.31001/jfi.v20i2.2190
- Zhang X, Wu C. In Silico, In Vitro, and In Vivo Evaluation of the Developmental Toxicity, Estrogenic Activity, and Mutagenicity of Four Natural Phenolic *Flavonoid* s at Low Exposure Levels. *ACS Omega*. 2022;7(6):4757-4768. doi:10.1021/acsomega.1c04239
- Koleva Y, Miteva M, Trifonova V, Stancheva K, Dobрева A. Skin sensitization evaluation of a flavanol from processed rose wastewater for cosmetic application. *BIO Web Conf*. 2024;122:1-7. doi:10.1051/bioconf/202412201016
- Gendrisch F, Esser PR, Schempp CM, Wölfl U. Luteolin as a modulator of skin aging and inflammation. *BioFactors*. 2021;47(2):170-180. doi:10.1002/biof.1699
- Listyani TA, Addawiyah M, Raharjo D. Uji In Silico Toksisitas Senyawa Derivat *Flavonoid* beserta Modifikasi Senyawa Baru. *J Farm dan Kesehat*. 2024;3(2):197-210.
- Li WF, Wang X, Wang TH, et al. Application Potential of Luteolin in the Treatment of Viral Pneumonia. *J Food Biochem*. Published online 2023. doi:10.1155/2023/1810503
- Owumi SE, Nwozo SO, Arunsi UO,

- Oyelere AK, Odunola OA. Co-administration of Luteolin mitigated toxicity in rats' lungs associated with doxorubicin treatment. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2021;411(November 2020):115380. doi:10.1016/j.taap.2020.115380
- Imran M, Rauf A, Abu-Izneid T, et al. Luteolin, a *flavonoid*, as an anticancer agent: A review. *Biomed Pharmacother.* 2019;112(September 2018). doi:10.1016/j.biopha.2019.108612
- Sadiq SC, Joy MP, Aiswarya SU, et al. Unlocking nature's pharmacy: an in-depth exploration of phytochemicals as potential sources of anti-cancer and anti-inflammatory molecules. *Explor Drug Sci.* 2024;2:744-784. doi:10.37349/eds.2024.00073
- Chen YH, Wu JX, Yang SF, Hsiao YH. Synergistic Combination of Luteolin and Asiatic Acid on Cervical Cancer In Vitro and In Vivo. *Cancers (Basel).* 2023;15(2):1-24. doi:10.3390/cancers15020548
- Zhu M, Sun Y, Su Y, et al. Luteolin: A promising multifunctional natural *flavonoid* for human diseases. *Phyther Res.* 2024;38(7):3417-3443. doi:10.1002/ptr.8217
- Wu L, Lin Y, Gao S, et al. Luteolin inhibits triple-negative breast cancer by inducing apoptosis and autophagy through SGK1-FOXO3a-BNIP3 signaling. *Front Pharmacol.* 2023;14(June):1-14. doi:10.3389/fphar.2023.1200843
- Pei SN, Lee KT, Rau KM, Lin TY, Tsai TH, Hsu YC. Luteolin (LUT) Induces Apoptosis and Regulates Mitochondrial Membrane Potential to Inhibit Cell Growth in Human Cervical Epidermoid Carcinoma Cells (Ca Ski). *Biomedicines.* 2024;12(10):1-10. doi:10.3390/biomedicines12102330

