

**ANALISIS JALUR KEMATIAN SEL KANKER PARU A-549  
SECARA *IN VITRO* PADA PEMBERIAN ISOLAT  
ANDROGRAFOLID MELALUI JALUR INTRINSIK  
MENGUNAKAN METODE *IN CELL WESTERN***

**SKRIPSI**

**GITA NURHALIZA**

**A201013**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA  
YAYASAN HAZANAH  
BANDUNG  
2024**

**ANALISIS JALUR KEMATIAN SEL KANKER PARU A-549  
SECARA *IN VITRO* PADA PEMBERIAN ISOLAT  
ANDROGRAFOLID MELALUI JALUR INTRINSIK  
MENGUNAKAN METODE *IN CELL WESTERN***

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

**GITA NURHALIZA**

**A201013**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA  
YAYASAN HAZANAH  
BANDUNG**

**ANALISIS JALUR KEMATIAN SEL KANKER PARU A-549 SECARA *IN VITRO* PADA PEMBERIAN ISOLAT ANDROGRAFOLID MELALUI JALUR INTRINSIK MENGGUNAKAN METODE *IN CELL WESTERN***

**GITA NURHALIZA  
A201013**

**Oktober 2024**

**Disetujui oleh:**

**Pembimbing**



**Prof. Dr. apt. A. Hanafiah WS**

**Pembimbing**



**apt. Maria Ulfah, M. Si.**

Kutipan atau saduran baik sebagian ataupun seluruh naskah, harus menyebut nama pengarang, dan sumber aslinya, yaitu Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

*Skripsi ini saya persembahkan dengan penuh rasa syukur kepada Allah SWT, orang tua tercinta, serta semua pihak yang telah memberikan dukungan dan bimbingan dalam perjalanan akademik saya*

## ABSTRAK

Andrografolid merupakan senyawa aktif yang berasal dari tanaman sambiloto [*Andrographis paniculata* (Burm.F.)] telah dikenal memiliki berbagai aktivitas farmakologis, termasuk potensi sebagai agen anti-kanker. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis jalur kematian sel kanker paru A-549 yang diinduksi oleh isolat andrografolid menggunakan metode *In-Cell Western*. Dalam penelitian ini, andrografolid diuji pada sel kanker paru A-549 untuk mengukur aktivitas apoptosis melalui peningkatan ekspresi *Caspase-3*, sebuah enzim kunci dalam jalur kematian sel terprogram. Variasi dosis yang digunakan adalah sebanyak 4 dosis, dimulai dari dosis  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ ,  $1 \times IC_{50}$ ,  $2 \times IC_{50}$  dan  $3 \times IC_{50}$ . Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian andrografolid mampu meningkatkan ekspresi *Caspase-3*, terutama pada dosis  $2 \times IC_{50}$  sebanyak  $95,56 \mu\text{g/mL}$  dan  $3 \times IC_{50}$  sebanyak  $141,84 \mu\text{g/mL}$  yang menunjukkan aktivitas jalur apoptosis yang signifikan. Selain itu, perubahan morfologi sel yang diamati mengkonfirmasi adanya kematian sel pada konsentrasi andrografolid yang lebih tinggi, serupa dengan efek agen kemoterapi doxorubicin-HCl. Dengan demikian, andrografolid menunjukkan potensi besar sebagai agen anti-kanker melalui induksi apoptosis pada sel kanker paru A-549.

**Kata kunci:** andrografolid, sel kanker paru A-549, apoptosis, kaspase-3, In-Cell Western.

## **ABSTRACT**

*Andrographolide, an active compound derived from the *Andrographis paniculata* (Burm.F.) plant, is known for its various pharmacological activities, including its potential as an anti-cancer agent. This study aims to analyze the cell death pathway of A-549 lung cancer cells induced by andrographolide isolate using the In-Cell Western method. In this research, andrographolide was tested on A-549 lung cancer cells to measure apoptosis activity through the increased expression of Caspase-3, a key enzyme in the programmed cell death pathway. Four dosage variations were used, starting from  $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ ,  $1 \times IC_{50}$ ,  $2 \times IC_{50}$ , and  $3 \times IC_{50}$ . The results showed that the administration of andrographolide significantly increased Caspase-3 expression, particularly at doses of  $2 \times IC_{50}$  (95.56  $\mu\text{g/mL}$ ) and  $3 \times IC_{50}$  (141.84  $\mu\text{g/mL}$ ), indicating significant activation of the apoptosis pathway. Additionally, the observed changes in cell morphology confirmed cell death at higher andrographolide concentrations, similar to the effects of the chemotherapeutic agent doxorubicin HCl. Thus, andrographolide shows great potential as an anti-cancer agent by inducing apoptosis in A-549 lung cancer cells.*

**Keywords:** *andrographolide, A-549 lung cancer cells, apoptosis, Caspase-3, In-Cell Western.*

## KATA PENGANTAR

*Bismillahirrahmanirrahim,*

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala berkah rahmat dan ridho-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “**Analisis Jalur Kematian Sel Kanker Paru A-549 Pada Pemberian Isolat Andrografolid Menggunakan Metode *In Cell Western***”.

Penelitian dan penulisan skripsi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat untuk mendapatkan gelar sarjana pada Program Studi Sarja Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing Prof. Dr. apt. A. Hanafiah Ws. dan apt. Maria Ulfah, M. Si. dan Dr. apt. Irma Erika Herawati, M.Si atas bimbingan, nasihat, dukungan, serta pengorbanan yang diberikan. Pada kesempatan ini, tidak lupa penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. apt. Adang Firmansyah, M. Si., selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
2. Dr. apt. Diki Prayugo, M. Si., selaku Wakil Ketua I Bidang Akademik,
3. Dr. apt. Wiwin Winingsih, M. Si., selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,
4. apt. Nela, M. Farm., selaku Dosen Wali yang telah banyak memberikan bimbingan dan arahan,
5. Seluruh staf dosen, staf administrasi, serta karyawan Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
6. Kedua orang tua yang selalu memberikan doa, dukungan dan kasih sayang yang tiada henti,
7. Serta teman-teman, khususnya Intan Afiatin dan Hilda Ramadhoni selaku teman selama perkuliahan yang selalu memberikan semangat dan bantuan selama masa perkuliahan.

Dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kesalahan dan kekurangan karena pengetahuan yang masih sangat terbatas. Oleh karena itu, dengan kerendahan hati diharapkan masukan berupa kritik dan saran yang bersifat membangun untuk perbaikan di masa yang akan datang. Penulis berharap semoga tugas akhir ini akan memberikan manfaat bagi penulis sendiri dan juga bagi pihak lain yang berkepentingan.

Bandung, Oktober 2024  
Penulis



## DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN .....	i
KUTIPAN.....	ii
PERSEMBAHAN .....	iii
ABSTRAK.....	iv
<i>ABSTRACT</i> .....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
BAB I    PENDAHULUAN.....	1
1.1    Latar Belakang.....	1
1.2    Identifikasi Masalah.....	2
1.3    Tujuan Penelitian .....	3
1.4    Kegunaan Penelitian .....	3
1.5    Waktu Dan Tempat Penelitian .....	3
BAB II    TINJAUAN PUSTAKA .....	4
2.1    Kanker.....	4
2.2    Kanker Paru .....	4
2.3    Tatalaksana Kanker Paru .....	4
2.4    Tanaman Sambiloto .....	5
2.4    Isolat Andrografolid.....	6
2.5    Siklus Sel .....	6
2.6    Kematian Sel.....	7
2.7 <i>Caspase</i> .....	9
2.8 <i>In cell western</i> .....	9
2.9    Doxorubicin HCl.....	10
2.10   Lini sel -549 .....	10
BAB III   TATA KERJA.....	12
3.1    Alat.....	12

3.2	Bahan .....	12
3.2	Metode penelitian .....	12
3.2.1	Prosedur Penelitian .....	12
BAB IV	HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....	21
4.1	Kultur sel.....	21
4.2	Hasil Analisis Hemositometer .....	21
4.3	Hasil Perlakuan Sel Kanker Dengan Isolat Andrografolid.....	23
BAB V	SIMPULAN DAN ALUR PENELITIAN SELANJUTNYA.....	29
5.1	Simpulan .....	29
5.2	Alur Penelitian selanjutnya.....	29
	DAFTAR PUSTAKA.....	30
	LAMPIRAN.....	33

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4 1 Hasil perhitungan jumlah sel yang tersedia .....	22
4 2 Perhitungan volume pengenceran suspensi sel .....	22

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2. 1 Tanaman Sambiloto .....	5
2. 2 Struktur Molekul Andrografolid .....	6
2. 3 Mekanisme Kematian Sel .....	8
2. 4 Struktur Kimia Doxorubicin HCl.....	10
2. 5 Lini Sel Kanker A-549.....	10
3. 1 Kolom Hemositometer.....	15
3. 2 Pemetaan Plating Sel Dalam 96-Well Plate .....	16
3. 3 Pengaturan <i>Software Image Studio</i> .....	19
4. 1 Hasil Visualisasi Konfluen Sel A-549 .....	21
4. 2 Hasil Visualisasi Hemositometer Terhadap Stok Suspensi Sel A-549 .....	32
4. 3 Visualisasi Mikroskopik setelah Perlakuan Sampel Terhadap Sel A-549 pada Perbesaran 20x.....	23
4. 4 Hasil Visualisasi Pemindaian 96-Wellplate Dengan <i>Instrument Li-Cor</i> .....	24

## DAFTAR PUSTAKA

- Abcam plc. (2023). Counting Cells Using a Hemocytometer. Cambridge, UK :  
Abcam Protokol, pp. 1-3.
- American Type Culture Collection (ATCC). (2022a) 'A-549:CCL-185 Product  
Sheet', <https://www.atcc.org/products/ccl-185>. University Boulevard  
Manassas, pp. 1-7.
- Banerjee, M., Chattopadhyay, S., Choudhuri, T., Bera, R., Kumar, S., Chakraborty,  
B., & Mukherjee, S. K. (2016). Cytotoxicity and cell cycle arrest induced by  
andrographolide lead to programmed cell death of MDA-MB-231 breast  
cancer cell line. *Journal of Biomedical Science*, 23(1).  
<https://doi.org/10.1186/s12929-016-0257-0>
- Carl Zeiss Microscopy GmbH. (2019). Principles of Fluorescence and Fluorescence  
Microscopy. Technology Note, 1–7.
- Cancer Chemoprevention Research Center (2012). Peran Mitokondria dalam  
Apoptosis. [https://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/peran-mitokondria-dalam-  
apoptosis](https://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/peran-mitokondria-dalam-apoptosis). Diakses pada tanggal 24 Desember 2023.
- Dalimunthe, A. 2009. Interaksi Sambiloto [*Andrographis paniculata* (Burm.F.)].  
*Jurnal Departemen Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Sumatera  
Utara*. Medan. P. 34-35.
- Freshney, Ian. (2010). Culture of animal cells : a manual basic technique and  
specialized applications. Edisi IV, USA: Wiley-Blackwell Publication, pp. 1-  
659.
- Fritsch, M., Günther, S.D., Schwarzer, R. et al. Caspase-8 is the molecular switch  
for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. *Nature* 575, 683–687 (2019).  
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1770-6>
- John C. Reed, Mechanisms of Apoptosis, *The American Journal of Pathology*,  
Volume 157, Issue 5, 2000, Pages 1415-1430, ISSN 0002-9440,  
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64779-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64779-7).
- Kemenkes. 2023. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor  
Hk.01.07/Menkes/1438/2023 Tentang Pedoman Nasional Pelayanan  
Kedokteran Tata Laksana Kanker Paru. 31-58.
- Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on  
proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines.  
*Eur J Nutr* 1999;38:133-42

- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.* 2005 Oct;115(10):2665-72. doi: 10.1172/JCI26252. PMID: 16200200; PMCID: PMC1236692.
- Lu LD, Salvino JM. The In-Cell Western immunofluorescence assay to monitor PROTAC mediated protein degradation. *Methods Enzymol.* 2023;681:115-153. doi: 10.1016/bs.mie.2022.08.012. Epub 2022 Oct 3. PMID: 36764754; PMCID: PMC10315175.
- Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull.* 2017 Sep;7(3):339-348. doi: 10.15171/apb.2017.041. Epub 2017 Sep 25. PMID: 29071215; PMCID: PMC5651054.
- Muliani. 2016. Siklus sel. Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.
- National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 5318517, Andrographolide. Retrieved February 12, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Andrographolide>.
- NMP, Susanti, dkk. Aktivitas Antihiperlipidemia Andrografolid dari Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Ness) secara In Silico. *Jurnal Farmasi Udayana* , [SI], jan. 2017. ISSN 2622-4607.
- Prakosa T, Askanandar B, Fauziah D. 2013. Ekspresi p53 Mutan dan Caspase 3 sebagai Faktor Prediksi terhadap Operabilitas Kanker Serviks IIB setelah Mendapat Kemoterapi Neoajuvan. *Indonesian Journal of Cancer* Vol. 7, No. 62.
- Pusat Informasi Bioteknologi Nasional (2024). Ringkasan Senyawa PubChem untuk CID 5460033, Doxorubicin HCl . Diakses pada 10 Februari 2024 dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5460033>.
- Purba, Ardina Filindri. 2015. Pola Klinis Kanker Paru Di RSUP Dr. Kariadi Semarang Periode Juli 2013 – Juli 2014. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang.
- Rahmawan, Heru. 2010. Gambaran Reaksi Orang Tua Perokok Ketika Diminta Untuk Tidak Merokok di Dalam Rumah Di Dusun Kweden Desa Trirenggo Kecamatan Bantul Kabupaten Bantul Kota Yogyakarta. 76 Poltekkes Kemenkes Yogyakarta Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Yogyakarta.
- R. D. Ratnani, I. Hartati, L. Kurniasari. 2012. Potensi Produksi Andrographolide Dari Sambiloto (*Andrographis Paniculata* Nees) Melalui Proses Ekstraksi Hidrotropi. Vol. 8, No. 1, April 2012 : 6- 7
- Riadi, M. (2016). Pertumbuhan Mikroorganisme. Kaji. Pustaka, 1-47.

- Sanbe Farma, PT. (2019). Doxorubicin Hydrochloride 2mg/mL – Leaflet. Bandung: PT. Sanbe Farma.
- Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia (STFI). (2023). Certificate of Analysis – Andrographolide. Bandung: Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.
- Sahoo, G., Samal, D., Khandayataray, P. et al. A Review on Caspases: Key Regulators of Biological Activities and Apoptosis. *Mol Neurobiol* 60, 5805–5837 (2023). <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03433-5>
- Sari, L. M. (2018). Apoptosis: Mekanisme Molekuler Kematian Sel. *Cakradonya Dental Journal*, 10(2), 65–70. <https://doi.org/10.24815/cdj.v10i2.11701>
- Shofa, A. F., Alam, T., & Nuralih, N. (2022). Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Polar, Semipolar, dan Non-Polar Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap Sel Kanker Hati (HepG2). *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 12(1), 25–30. <https://doi.org/10.22435/jki.v0i0.4875>
- Suparna, K., & Sari, L. M. K. K. S. (2022). Kanker Payudara: Diagnostik, Faktor Risiko, Dan Stadium. *Ganesha Medicine*, 2(1), 42–48. <https://doi.org/10.23887/gm.v2i1.47032>
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 Jan;70(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21590. Epub 2020 Jan 8. PMID: 31912902.
- Sudewo, B. (2012). *Basmi Kanker dengan Herbal*. Jakarta: Visi Media Pustaka.
- Utami, Sri. "Peran Kaspase Pada Apoptosis Sebagai Salah Satu Usaha Dalam Kemoterapi Kanker." *Maranatha Journal of Medicine and Health*, vol. 7, no. 1, 2007.
- World Health Organization (WHO). *Global Cancer Report 2020*. World Health Organization; 2020.
- Yanti, Y.N., Mitika, S., 2017. Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *J. Ilm. Ibnu Sina JIIS Ilmu Farm. Dan Kesehatan*. 2, 158–168.