

AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 70% KULIT BUAH DELIMA (*Punica granatum* L.) TERHADAP EKSPRESI PROTEIN KI-67 PADA JARINGAN KANKER KOLON MENCIT

**Skripsi
Untuk Melengkapi Syarat-syarat guna Memperoleh Gelar
Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi**

**Disusun oleh:
Andini Rifaisya
1404015028**



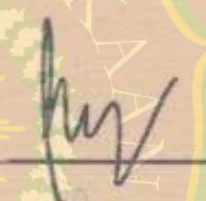





**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI DAN SAINS
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA
JAKARTA
2020**

Skripsi dengan Judul

AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 70% KULIT BUAH DELIMA (*Punica granatum L.*) TERHADAP EKSPRESI PROTEIN KI-67 PADA JARINGAN KANKER KOLON MENCIT

Telah disusun dan dipertahankan di hadapan penguji oleh:
Andini Rifaisya, NIM 1404015028

	Tanda Tangan	Tanggal
Ketua <u>Wakil Dekan I</u> Drs. apt. Inding Gusmayadi, M.Si.		<u>7/10/21</u>
<u>Penguji I</u> Dr. apt. Siska, M.Farm.		<u>07 November 2020</u>
<u>Penguji II</u> Dr. H. Priyo Wahyudi, M.Si.		<u>15 Desember 2020</u>
<u>Pembimbing I</u> Dr. Kusmardi, M.Sc.		<u>19 Desember 2020</u>
<u>Pembimbing II</u> apt. Numlil Khaira Rusdi, M.Si.		<u>20 Desember 2020</u>
Mengetahui:		
Ketua Program Studi apt. Kori Yati, M.Farm.		<u>6/1/2021</u>

Dinyatakan lulus pada tanggal: **07 Oktober 2020**

ABSTRAK

AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 70% KULIT BUAH DELIMA (*punica granatum L.*) TERHADAP EKSPRESI PROTEIN Ki-67 PADA JARINGAN KANKER KOLON MENCIT

**Andini Rifaisya
1404015028**

Kanker kolon di Indonesia menempati urutan nomor tiga. Salah satu tanaman yang dapat dikembangkan potensinya sebagai antikanker yaitu kulit buah delima (*Punica granatum L.*) Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol 70% kulit buah delima terhadap penurunan ekspresi protein Ki-67 pada sel kanker kolon mencit. Uji ini dilakukan dengan metode imunohistokimia pada jaringan tersimpan yang telah diinduksi DSS 2% sebelumnya dan dibagi dalam 6 kelompok perlakuan yaitu Normal, DSS, Aspirin, Elagat, dosis 240 mg/kgBB/hari dan dosis 480 mg/kgBB/hari. Persentase sel ekspresi protein Ki-67 dihitung dengan IHC *profiler* dan dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis dan uji Mann-Whitney. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dosis 240 mg/kgBB/hari dan dosis 480 mg/kgBB/hari juga memiliki aktivitas antikanker dengan mekanisme menghambat Ki-67 yang sama dengan Aspirin dan Elagat. Dosis 240 mg/kgBB/hari menunjukkan aktivitas menurunkan ekspresi protein Ki-67 lebih baik terhadap kelompok DSS. Disimpulkan bahwa kulit buah delima memiliki aktivitas penurunan ekspresi protein Ki-67 dengan parameter proliferasi pada jaringan kanker kolon mencit.

Kata Kunci: Kulit Buah Delima, Ki-67, Kanker Kolon, Imunohistokimia.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamin. Segala puji bagi dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya. Yang tiada henti mengalir dalam kehidupan ini sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Selawat serta salam semoga senantiasa tercurah kepada nabi Muhammad SAW beserta keluarga, sahabat dan para pengikutnya hingga akhir zaman. Skripsi dengan judul **UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 70% KULIT BUAH DELIMA (*Punica granatum L.*) TERHADAP EKSPRESI PROTEIN Ki-67 PADA JARINGAN KANKER KOLON MENCIT** ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Farmasi di Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. HAMKA Jakarta.

Penulisan skripsi ini dimaksudkan untuk memenuhi tugas akhir sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana farmasi pada Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. HAMKA, Jakarta.

Terselesaikannya penelitian dan skripsi ini tidak lepas dari dorongan dan urulan tangan berbagai pihak, terimakasih kepada yang terhormat:

1. Bapak Dr. apt. Hadi Sunaryo, M.Si., selaku Dekan Fakultas Farmasi dan Sains UHAMKA, Jakarta.
2. Bapak Drs. apt. Inding Gusmayadi, M.Si., selaku Wakil Dekan I FFS UHAMKA.
3. Ibu Dra. Sri Nevi Gantini, M.Si., selaku Wakil Dekan II FFS UHAMKA.
4. Ibu apt. Ari Widayanti, M.Farm., selaku Wakil Dekan III FFS UHAMKA.
5. Bapak Anang Rohwiyono, M.Ag., selaku Wakil Dekan IV FFS UHAMKA.
6. Ibu apt. Kori Yati, M.Farm., selaku Ketua Program Studi Farmasi FFS UHAMKA.
7. Ibu apt. Yudi Srifiana, M.Farm., atas bimbingan dan nasihatnya selaku Pembimbing Akademik, dan para dosen yang telah memberikan ilmu dan masukan-masukan yang berguna selama kuliah dan selama penulisan skripsi ini.
8. Bapak Dr. Drs. Kusmardi, M.Sc., selaku pembimbing I yang telah banyak membantu dan mengarahkan penulis sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.
9. Ibu apt. Numlil Khaira Rusdi, M.Si., selaku pembimbing II yang telah banyak membantu dan mengarahkan penulis sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.
10. Seluruh dosen Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. HAMKA yang telah memberikan begitu banyak ilmu selama perkuliahan dan penulisan skripsi ini.
11. Seluruh staf Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang telah membantu selama proses penelitian.
12. Kedua orangtua tercinta atas doa dan dorongan semangatnya kepada penulis, baik moril maupun materi, serta Keluarga besar H. Tafsirudin dan keluarga Alm. H. Munir Masyir atas doa dan dukungannya selama perkuliahan dan selama proses penulisan skripsi ini.
13. Teman-teman angkatan '14 yang tidak dapat disebutkan satu persatu, serta sahabat-sahabatku yang secara langsung maupun tidak langsung telah memberikan bantuan dan dorongan semangatnya.

14. Pimpinan dan seluruh staf kesekretariatan yang telah membantu segala administrasi yang berkaitan dengan skripsi ini dan telah banyak membantu dalam penelitian.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih memiliki banyak kekurangan karena keterbatasan ilmu dan kemampuan penulis. Untuk itu saran dan kritik dari pembaca sangat penulis harapkan. Penulis berharap skripsi ini dapat berguna bagi semua pihak yang memerlukan.

Jakarta, Oktober 2020

Penulis



DAFTAR ISI

	Hlm.
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Permasalahan Penelitian	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Landasan Teori	5
1. Kanker	5
2. Kanker Kolon	6
3. Proliferasi	8
4. Protein Ki-67	8
5. Imunohistokimia	9
6. Deskripsi Tanaman Delima	10
7. Kandungan Fitokimia Ekstrak	11
8. Simplisia	12
9. Ekstrak	12
10. Ekstraksi	13
11. <i>Dextrase Sodium Sulfate</i> (DSS)	13
12. Asam Elagat	14
13. Aspirin	15
B. Kerangka Berpikir	15
C. Hipotesis	16
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	17
A. Tempat dan Waktu Penelitian	17
1. Tempat Penelitian	17
2. Waktu Penelitian	17
B. Bahan dan Alat Penelitian	17
1. Bahan Penelitian	17
2. Alat Penelitian	17
C. Prosedur Penelitian	17
1. Pembagian Kelompok Perlakuan	17
2. Prosedur Pewarnaan Imunohistokimia	18
3. Pengukuran Ekspresi Ki-67	20
D. Analisis Data	20
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	21
A. Hasil Pengamatan Ekspresi Protein Ki-67 dengan Mikroskop Perbesaran 400X	21
B. Hasil HScore Ekspresi Protein Ki-67	23

BAB V SIMPULAN DAN SARAN	29
A. Simpulan	29
B. Saran	29
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN	35



DAFTAR GAMBAR

	Hlm
Gambar 1. Pohon Delima	10
Gambar 2. Buah Delima	10
Gambar 3. Struktur Kimia Asam Elagat	15
Gambar 4. Gambaran Ekspresi Ki-67 dari Jaringan Kolon Mencit dengan Pewarnaan Imunohistokimia	21
Gambar 5. Rerata Nilai Skor Ekspresi Protein Ki-67	23



DAFTAR LAMPIRAN

	Hlm.
Lampiran 1. Skema Penelitian	35
Lampiran 2. Tanaman Delima (<i>Punica granatum L.</i>)	36
Lampiran 3. Alat-alat yang Digunakan	37
Lampiran 4. Bahan-bahan yang Digunakan	40
Lampiran 5. Sediaan yang Digunakan	41
Lampiran 6. Hasil Perhitungan dengan Menggunakan IHC Profiler	42
Lampiran 7. Ekspresi Ki-67 Setiap Kelompok	44
Lampiran 8. Uji Kruskal-Wallis Rerata Skor Histologi Ekspresi Ki-67	46
Lampiran 9. Uji Mann-Whitney Rerata Skor Histologi Ekspresi Ki-67 Kelompok Obat Uji dan Obat Kontrol dengan Kelompok DSS	47
Lampiran 10. Uji Mann-Whitney Rerata Skor Histologi Ekspresi Ki-67 Kelompok Obat Uji dan Obat Kontrol dengan Kelompok Positif	52
Lampiran 11. Hasil HScore Ekspresi Protein Ki-67	56



BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kanker adalah penyakit yang melibatkan pertumbuhan sel abnormal dengan potensi untuk menyerang atau menyebar ke bagian tubuh lainnya. Di negara berkembang, 15% kanker disebabkan oleh infeksi seperti *Helicobacter pylori*, hepatitis B, hepatitis C, infeksi human papillomavirus, virus Epstein-Barr dan human immunodeficiency virus (HIV). Kanker dapat dideteksi dengan tanda dan gejala tertentu atau tes skrining (WHO, 2018). Penyakit kanker masih menjadi masalah kesehatan serius di Indonesia. Kementerian Kesehatan (Kemkes) menyebutkan prevalensi penyakit kanker mengalami peningkatan dalam lima tahun terakhir. Menurut Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) prevalensi kanker di Indonesia mencapai 1.79 per 1000 penduduk, naik dari tahun 2013 sebanyak 1.4 per 1000 penduduk (Kemenkes RI, 2018). Menurut *World Health Organization* (WHO) bahwa jumlah kematian yang disebabkan oleh kanker pada tahun 2015 mencapai 8,8 juta jiwa. Jumlah kematian yang disebabkan oleh kanker ini diperkirakan mengalami peningkatan hingga mencapai 21 juta pada tahun 2030 (WHO, 2018).

Kanker kolon adalah keganasan yang berasal dari jaringan usus besar (Kemenkes RI, 2018). Kanker kolon biasanya dimulai dengan pembengkakan seperti kancing pada permukaan lapisan usus (kelenjar getah bening didekatnya juga bisa terkena). Karena darah dari dinding usus dibawa ke hati, kanker kolon biasanya menyebar (metastase) ke hati segera setelah menyebar ke kelenjar getah bening di dekatnya (Sastrosudarmo, 2011). Menurut data WHO pada tahun 2013, kanker kolon menempati peringkat ketiga di dunia dengan total kematian 495.000 orang. Insiden kanker kolon di Indonesia adalah 12,8 per 100.000 penduduk usia dewasa, dengan mortalitas 9,5% dari seluruh kasus kanker. Di Indonesia, kanker kolon menempati urutan nomor tiga (Kemenkes RI, 2017). Kenaikan tajam yang diakibatkan oleh perubahan pada diet orang Indonesia, baik sebagai konsekuensi peningkatan kemakmuran serta cara makan orang barat (westernisasi) yang lebih tinggi serta rendah lemak (Kemenkes RI, 2018).

Secara keseluruhan risiko untuk mendapatkan kanker kolon adalah 1 dari 20 orang (5%). Risiko penyakit cenderung lebih sedikit pada wanita dibandingkan pada pria. Banyak faktor lain yang dapat meningkatkan risiko individu untuk terkena kanker kolon (Kemenkes RI, 2018). Pengobatan terapi yang komprehensif untuk mengatasi kanker kolon sangat diperlukan untuk menekan jumlah kematian penderita. Pengobatan yang paling umum untuk kanker kolon dilakukan dengan cara pembedahan, kemoterapi dan radiasi (Dipiro, 2015). Pengobatan menggunakan bahan alami sebagai obat tradisional menjadi salah satu pilihan pengobatan alternatif yang masih diminati, karena dinilai lebih ekonomis serta memiliki efek samping yang relatif rendah. (Cancer Council, 2016).

Salah satu tanaman yang dapat dikembangkan potensinya sebagai antikanker yaitu kulit buah delima. Delima (*Punica granatum* L.) adalah tanaman buah yang berasal dari daerah Himalaya lalu menyebar ke Afrika, Asia, Eropa, dan Amerika. Tanaman ini masuk ke Indonesia pada tahun 1416 oleh pedagang dari Persia. Di Indonesia sendiri terdapat tiga jenis delima yaitu delima merah, delima putih dan delima ungu atau hitam. Dari ketiga jenis delima tersebut, delima putih paling banyak dimanfaatkan sebagai obat. Delima memiliki banyak khasiat bagi kesehatan. Buah delima digunakan untuk membantu menurunkan berat badan, tekanan darah tinggi (hipertensi), mengurangi resiko serangan jantung dan stroke, dapat mencegah anemia, mencegah dan mengobati kanker (Marhari dan Dewi, 2014). Buah delima juga dapat mencegah kerusakan tulang (Sasongkawati, 2013). Kulit buah delima memiliki kandungan kimia antara lain asam galat, asam elagat, asam kafeat, Saponin, antosianidin (Flavonoid), elagitanin (Tanin), Flavan-3-ol, flavonol, flavon, flavonon (Flavonoid) (Jurenka, 2008).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Machmud Kholifa (2010) tentang pengaruh konsentrasi ekstrak buah delima terhadap sel kanker lidah (SP-C1). Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Ekstrak etanol buah delima memiliki potensi meningkatkan apoptosis pada sel karsinoma skuamosa lidah manusia yang ditandai dengan semakin besar persentase apoptosis yang

terjadi. Konsentrasi 250 µg/ml ekstrak etanol buah delima mempunyai persentase apoptosis sebesar 67% terhadap sel SP-C1.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Machmud Kholifah (2016) tentang induksi apoptosis pada tikus putih *sprague dawley* sebagai hewan model kanker lidah dengan ekstrak etanol biji buah delima dapat disimpulkan bahwa ekstrak biji buah delima dapat penurunan ukuran tumor sel kanker lidah, sehingga rata-rata ukuran volume tumor antara semua kelompok perlakuan tidak identik yang berarti terdapat perbedaan bermakna rata-rata ukuran volume tumor antara tiap kelompok perlakuan dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol biji delima berpotensi meningkatkan semakin besar konsentrasi ekstrak etanol biji delima yang diberikan maka akan semakin besar pula penurunan ukuran tumor yang terjadi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Kusmardi *et al* (2017) tentang Potensi ekstrak etanol kulit buah delima (*Punica granatum L.*) sebagai agen anti inflamasi pada kolon mencit yang diinduksi oleh *Dextran Sodium Sulfate*: fokus pada ekspresi *cyclooxygenase-2* dan *iNOS*, selain itu ekstrak etanol kulit buah delima memiliki efektivitas yang sama dengan aspirin dan asam elagat.

Salah satu parameter untuk melihat penurunan proliferasi sel pada kanker dapat digunakan protein Ki-67. Dengan menggunakan Ki-67 proliferasi sel akan dapat terdeteksi, karena Ki-67 ini hanya akan terekspresi pada sel yang proliferasi (Afiati dan Hernowo. 2013). Protein Ki-67 merupakan suatu protein yang terikat kuat di nukleus dan terlihat pada saat sel membelah. Protein ini dapat ditemukan pada semua sel proliferasi, baik sel normal maupun sel tumor, sehingga protein ini dapat digunakan sebagai penanda dari kecepatan proliferasi sel pada pertumbuhan sel.

Ekspresi Ki-67 berhubungan erat dengan proliferasi sel. Proliferasi adalah peningkatan sejumlah sel sebagai hasil dari pertumbuhan dan pembelahan sel. Deregulasi proliferasi merupakan salah satu faktor utama yang berkontribusi pada perkembangan tumor. Pada sel normal faktor pertumbuhan dan penghambatan pertumbuhan berada dalam kontrol keseimbangan. Selama tahap perkembangan tumor, sel kanker akan berproliferasi dengan cepat dan menunjukkan hilang kontrol pertumbuhan. Apabila terjadi mutasi pada gen yang

berperan dalam apoptosis mengakibatkan sel dengan DNA yang rusak tetap hidup, terus membelah, dan pada akhirnya berkembang menjadi sel kanker (Hanahan dan Weinberg. 2011).

Protein Ki-67 akan terekspresi pada sel yang proliferasif, Untuk melihat ekspresi Protein Ki-67 digunakan metode imunohistokimia. Imunohistokimia diartikan sebagai suatu metode untuk mendeteksi suatu molekul yang ada dalam jaringan dengan menggunakan antibodi poliklonal atau monoklonal terhadap molekul yang akan dideteksi (merupakan reaksi antigen antibodi) dan dapat memberikan gambaran kualitatif dari intensitas warna yang terbentuk maupun gambaran kuantitatif. Imunohistokimia diartikan juga sebagai metode yang digunakan untuk identifikasi unsur-unsur (antigen) yang terdapat dalam sel atau jaringan yang memanfaatkan interaksi antara antibodi dan antigen (Bancroft dan Gamble. 2008)

Berdasarkan latar belakang di atas dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol 70% ekstrak kulit buah delima (*Punica granatum L.*) sebagai antikanker kolon dengan melihat ekspresi protein Ki-67 sebagai salah satu penanda proliferasi dengan metode imunohistokimia.

B. Permasalahan Penelitian

Apakah ekstrak etanol 70% kulit buah delima memiliki aktivitas terhadap penurunan proliferasi dilihat dari ekspresi protein Ki-67 pada sel kanker kolon mencit?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol 70% kulit buah delima terhadap penurunan ekspresi protein Ki-67 pada sel kanker kolon mencit.

D. Manfaat Penelitian

Hasil yang diperoleh dapat memberikan informasi lebih lanjut kepada masyarakat mengenai penurunan proliferasi sel pada jaringan kolon mencit menggunakan ekstrak kulit buah delima dengan pewarnaan imunohistokimia Ki-67.

DAFTAR PUSTAKA

- Afiati, Hernowo BS. 2013. Hubungan Ekspresi Ki-67 dengan *Grading* Histopatologi Liposarkoma. Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung
- American Cancer Society. 2018. Cancer Facts & Figures 2018. Tersedia online <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf>.
- Bachran. 2014. *Preclinical Studies of Saponins for Tumor Therapy, Recent advance in medical chemistry*,1,272-302.
- Balqis U., Darmawi., E.Handharyani., M.Hambal. 2011. Deteksi Keberadaan Antigen pada Kutikula *Ascaridia galii* dengan Imunoglobulin Yolok Melalui Metode Imunohistokimia. Proceeding: CheSA, FT Unsyiah Banda Aceh
- Bellik Y, Boukraa L, Alzahrani HA, Bakhotmah BA, Abdellah F, Hammoudi SM. 2012. *Molecular Mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals*: 18:322-53.
- Bancroft JD, Gamble M. 2008. *Theory and Practice of Histological Techniques : Immunohistochemical Techniques*. United State. Churchil Livingstone Elsevier p.433-53.
- Cabral JP. 2010. *Water Microbiology Bacterial pathogens and water Int J Environ Research Public Health*. ;7: 3657-703.
- Cancer Council. 2016. *Optimal Care Pathway for People with Colorectal Cancer*. Cancer Council Australia. Austrlia. Hlm. 20-21.
- Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. 2014. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-induced colitis in mice. ;104:1-16
- Departemen Kesehatan RI 2002. *Buku Panduan Teknologi Ekstrak. Direktorat Jendral Pengawas dan Makanan Departemen Kesehatan Republik Indonesia*. Jakarta. Hlm.171-175.
- Departemen Kesehatan RI 2008. *Farmakope Herbal Indonesia Jilid IX Departemen Kesehatan Republik Indonesia*. Jakarta. Hlm.170-174.
- Desmiaty, 2008. Penentuan Jumlah Tanin Total Pada Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia Lank*) dan Daun Sambang Darah (*excoecaria bicolor hassk*) Secara Kolorimetri Dengan Pereaksi Biru Prusia. *Ortocarpus*, 8, 106-109

- Dipiro CV. 2015. *Oncologic Disorders*. In: Dipiro JT, Wells BG, Dipiro CV, Schiwinghammer TL. *Pharmachotherapy Handbook 9th Edition*. Mc Graw Hill Companies. Inc New York. Hlm 632.
- Garcia-Albeniz X, Chan AT. 2011. Aspirin for the prevention of colorectal cancer. *Best Practice Research Clinical Gastroenterol.* ;**25**:461–72.
- Garcia-Nino WR, Zazueta C. 2015. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. *Pharmacological Research.* ;**97**:84–103.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* **144**(5): 646-674.
- Hanani E, Munim A, Sekarin R. 2005. *Identifikasi senyawa antioksidan dalam spons callyspongia sp dari kepulauan seribu*, Dalam : Majalah ilmu kefarmasian. **2**(3): 127-133.
- Handayani R, Sulisty J. 2008. Sintesis senyawa flavonois-a-glikosida secara reaksi transglikosilasi enzimatik dan aktivitasnya sebagai antioksidan, Dalam Biodiversitas. **9** (1) : 1-4.
- Harbone JB, 2006. *Metode Fitokimia : penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*, terjemahan : Padmawinata K, soediro I, penerbit ITB. Bandung, Hlm. 47-238.
- Itoh K, Narushima S. 2005. Intestinal flora of animal models of human diseases as an environmental factor. *Curr Issues Intest Microbiol.* **6**:9-15.
- Jonat W, Arnold N. 2011. *Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use*. *Annals of Oncol;* **22**(3): 500-2
- Jurenka J. 2008. *Therapeutic applications of pomegranate (Punica granatum L.) : A review*. *Alternative Medical Review* ;**13**: 128-144
- Kausch I, Lingnau A, Endl E. 2003. *Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo*. *Int J Cancer.* **105**:710–716. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI.
- Kementerian kesehatan RI Badan Penelitian Dan Pengembangan. 2017. Hasil Utama Riset Kesehatan Dasar. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kementerian kesehatan RI. 2019. *Hari kanker sedunia 2019*. <http://www.depkes.go.id/resources/download/info-terkini/hasil-riskesdas-2018.pdf> (diakses pada 25 agustus 2019).
- Kementerian kesehatan RI Badan Penelitian Dan Pengembangan. 2018. Hasil Utama Riset Kesehatan Dasar. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.

- Kholifa M. 2016. *Induksi Apoptosis Pada Tikus Putih Sprague Dawley Sebagai Hewan Model Kanker Lidah Dengan Ekstrak Etanol Biji Buah Delima*. Surakarta. ISSN 2407-9189. The 3rd Univesty Research Colloquium.
- Kholifa M. 2010. *Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Etanol Buah Delima (Punica Granatum L.) Terhadap Peningkatan Apoptosis Sel Kanker Lidah Manusia Sp-C1 In Vitro*. Surakarta. Biomedika, vol. 2 No. 2.
- Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. 2000. *Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights*. *Exp Anim.*; **49**: 9-15.
- Kusmardi K, Hemanto D, Estuningtyas A, Tedjo A, Priosoeryanto BP, 2017. *The Potency Of Indonesia's Pomegranate Peel Ethanol Extract (Punica Granatum LINN.) As Anti-Inflammatory Agent In Mice Colon Induced By Dextran Sodium Sulfate Focus On Cyclooxygenase-2 And INOS Expressions*. Jakarta. *Asian Journal Pharmaceurical and Clinical Research*, **10(12)**: 370-375
- Lansky EP, Newman RA. 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol.* **109**:177-206.
- Latief A. 2012. *Obat tradisional*. Penerbit buku kedokteran EGC. Jakarta Hlm : 67-69
- Leake R, Barnes D, Pinder S, Ellis I, Anderson L, Anderson T, Adamson R, Rhodes T, Miller K, Walker R, Building D. 2000. Immunohistochemical detection of steroid receptors in breast cancer : a working protocol. *UK NEQAS, Journal Clinical Pathologic.* **53**:634-635.
- Lian Tao Li, Guan Jiang, Qian Chen, Jun Nian Zheng. *Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis in cancer (review)*. 2010 November 10.1566-1572
- Lin MX, Wen ZF, Feng ZY, He D. 2008. Expression and significance of Bmi-1 and Ki67 in colorectal carcinoma tissues. *Ai Zheng.* **27(12)**:1321-6.
- Liya D, Mahmuda. 2018. *Uji efektivitas etanol 96% daun salam (eugenia polyantha wight.) terhadap proliferasi sel kanker serviks (HeLa)*. *Skripsi*. Fakultas farmasi dan sains, universitas muhammadiyah Prof.Dr. Hamka. Jakarta.
- Marhari, O.Y, Dewi, K.K. 2014. *Khasiat Ajaib Delima*. Jakarta: Padi Halaman 3, 14-18, 21-24, 34.
- Marzouk MM. 2016. *Flavonoid constituents and cytotoxic activity of eucaria hispanica L. druce groing wild in egypt*. *Arabian journal of chemistry*, **9**: 411-415

- Meiyanto E, Susidarti RA, Handayani S, 2008 ekstrak etanolik biji buah pinang (*areca catechu L.*) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptosis sel MCF-7. majalah farmasi indonesia. **19 (1)** : 12-19
- Nabi U, Nagi AH, Sami W. Ki-67 proliferating index and histological grade, type and stage of colorectal carcinoma. J Ayub Med Coll Abbottabad. 2008;20(4):44–8
- Novak G, Parker CE, Pai RK, MacDonald JK, Feagan BG, Sandborn WJ, D'Haens G, Jairath V, Khanna R.2017. Alat pengukur an histologi untuk penilaian aktiviti penyakit dalam penyakit Crohn. <https://www.cochrane.org/ms/CD012351/IBD> (diakses pada tanggal 26 sept 2020. 18:20 WIB).
- Nurhidayat. 2002. *deteksi bahan aktif dengan metode immunohistokimia*. Fakultas kedokteran hewan. Universitas airlangga. Surabaya.
- Patrono C, Rodirguez LA, Landolfi R, Baigent C. 2005. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. N Engl Journal Medicine. 353:2373-83.
- Perse M, Cerar A, 2012 *Dextran sodium sulphate colitis mouse model: Traps and tricks*. J Biomed Biotechnol.Hlm : 1-13.
- Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H. 2002. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. J Agric Food Chem. ;50:2200–6.
- Pusat studi biofarmaka LPPM IPB & gugus ulung. 2014. Sehat alami dengan herbal 250 tanaman herbal berkhasiat obat. Ed ke-1. Jakarta: Gramdia. : 122-3
- Ramos-vara JA. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. Vet. Prathol Vol 42 : 405-426
- Rantam FA. 2003. *Metode imunologi*. Airlangga University Press. Surabaya
- Rosillo MA, Sanchez-Hidalgo M, Cardeno A, de la Lastra CA. 2011. *Protective Effect of Ellagic Acid, a Natural Polyphenolic Compound, in a Murine Model of Crohn's Disease*. Biochem Pharmacol. ; 82:737–45.
- Saifudin A, Rahayu V, Teruma HY, 2011. *Standarisasi bahan obat alam edisi pertama*. Graha ilmu. Yogyakarta
- Sasongkawati, R. 2013. *13 Terapi Buah Sakti Penghancur Penyakit*. Cetakan I. Yogyakarta: Indoliterasi. Halaman 57,58,62.
- Sastrodarmo WH. 2011. *Kanker The Silent Killer Edisi I*. Jakarta: Graha Media. Hlm : 3, 108.
- Shah JS, Patel JR. 2012. *Short communication : anti-ulcer activity of ulcer againts experimentally induced gastric ulcer in rats*. Ayu J ; 443-53.

- Siswandono. 2016. Kimia Medisinal Edisi II, Airlangga University Press. Surabaya. Hlm : 185-217.
- Sreekumar S, Sithul H, Muraleedharan P, Azeez JM, Sreeharshan S. 2014. *Pomegranate Fruti as a Rich Source Biologically Active Compounds*. Biomed Res. Int. : 1-12
- Seeram N.P., Adams L.S., Henning S.M., Niu Y., Zhang Y., Nair M.G., Heber D. 2005. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice.16:360–367. doi: 10.1016/j.jnutbio. 01.006.
- Sudjijo. 2010. *Sekilas tanaman delima dan manfaatnya*. Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika. Sumatera Barat. Hlm 40-43.
- Tadanobu S , Shusuke T, Natalia L. Komarova C. Richard B, Dominik W, Ajay G. 2020. *A comprehensive in vivo and mathematic modelingbased kinetic characterization for aspirin-induced chemoprevention in colorectal cancer*. Carcinogenesis, 1–10
- Tjitrosoepomo G. 2002. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Cetakan VII. Gajah mada University press. Yogyakarta.
- Utami Isti. 2005. *Daya antifungi kombinasi infus kulit buah delima putih (punica granatum L.) dan infus buah kemukus (piper cubeba L.) terhadap jamur candida albicans secara in vitro : aplikasi metode simplex lattice design*. Skripsi. Fakultas farmasi universitas sanata dharma, yogyakarta.
- Wang Q, Jin J, Dai N, Han N, 2016. Science Direct Antiinflammatory Effects Nuclear Magnetic Resonance Identification and High Performance Liquid Chromatography Isolation Of the Total Flavonoids From Artemisia Frigida. *Journal of Food and Drug Analysis*. 4-10
- World Health Organization. 2014. pp. Chapter 1.1. *World Cancer Report 2014*. ISBN 978-92-832-0429-9.
- World Health Organization. 2018. Cncer Burden Rises to 18.1 Million New Cses and 9.6 Million Cancer Deaths in 2018. *International Agency for Research on Cancer. 1*
- Yang C, Zhang J, Ding M, Xu K, Li L, Mao L, Zheng J. 2018. *Ki67 targeted strategies for cancer therapy*.
- Yulianti H, Hernowo Bethy S. 2013. Hubungan antara Imunoekspresi Ki-67 dan Risiko Agresivitas Tumor pada *Gastrointestinal Stromal Tumor*. Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung.