

Aktivitas Antikanker Pektin Kulit Buah Kakao Terhadap Jumlah Sel Goblet Kolon

Kinanthi P. Rizki, Wahyu W. Rochmah, Nandan G. Cempaka, Sugi Hartono, Fifteen A. Fajrin

Laboratorium Biologi Farmasi dan Biomedik, Fakultas Farmasi, Universitas Jember, Jember, Jawa Timur, Indonesia

Abstrak

Jumlah penderita kanker kolon yang tinggi mendorong penelitian akan pengobatan yang lebih efektif dan mengurangi efek samping dari pengobatan masa kini, salah satunya adalah dengan pengobatan secara herbal. Kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) memiliki kandungan pektin yang diketahui dapat menekan pertumbuhan sel kanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi aktivitas antikanker kolon dari pektin kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) pada tikus yang diinduksi dengan 7,12-dimethylbenzen(α)anthrasena (DMBA) dengan dosis 20 mg/kgBB. Tikus dikelompokkan menjadi empat kelompok yaitu kelompok I kontrol negatif, kelompok II pektin dosis 8 mg/kgBB, kelompok III pektin dosis 12 mg/kgBB, dan kelompok IV pektin dosis 16 mg/kgBB. Hasil penelitian menunjukkan dosis uji tertinggi, yaitu 16 mg/kgBB memberikan aktivitas terbaik dalam memulihkan kembali sel goblet yang rusak akibat induksi dari senyawa karsinogen. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa pektin kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) memiliki potensi aktivitas antikanker kolon pada dosis uji.

Kata kunci: DMBA, kulit buah kakao, pektin, sel goblet

Anticancer Activity of Cacao Pod Husk Pectin toward Amount of Colon Goblet Cells

Abstract

The high incident of patient with colon cancer, promotes the research for more effective treatments and reduce side effects of treatment today, one of them is with herbal treatment. Cacao pod husk (*Theobroma cacao*) has a pectin which is known to suppress the growth of cancer cells. This study aims to determine the potential anticancer activity of the extract cocoa pod husk (*Theobroma cacao*) in the colon of rat induced by 7,12-dimethylbenzen (α) anthrasena (DMBA) at a dose of 20 mg/kg. The rat were grouped into four groups: group I as control negative, group II given diet pectin dose of 8 mg/kgBW, group III given diet pectin dose 12 mg/kgBW, and group IV given diet pectin dose 16 mg/kgBW. The results showed the pectin dose 16 mg/kgBW, the highest dose gives the best activity to recovering goblet cell that damaged by induction of compound carcinogens. Thus it can be concluded that cacao pod husk (*Theobroma cacao*) has potential anticancer activity of the colon at that dose.

Keywords: Cacao pod husk, DMBA, goblet cells, pectin

Pendahuluan

Kanker kolon merupakan salah satu penyakit neoplasma yang tumbuh di dalam struktur saluran usus besar. Kanker kolon umumnya ditemukan pada usia di atas 40 tahun, namun ternyata dapat menyerang pada pasien dengan komplikasi penyakit sindrom Gardner, sindrom Turcot, kolitis ulseratif, kolitis granulomatosa, serta pada poliposis multipel familial.¹ Pada tahun 2003–2007 jumlah pasien kanker kolon di bawah umur 40 tahun di Indonesia rata-rata mencapai 28,71%.² Kanker kolon merupakan kanker urutan ketiga yang lebih banyak menyerang pria daripada wanita dari seluruh penderita kanker di dunia.

Faktor yang memiliki pengaruh dalam perkembangan kanker kolon yaitu interaksi dari faktor lingkungan serta faktor genetik. Kanker kolon terjadi karena abnormalitas sel yang diakibatkan oleh mutasi DNA. Sel yang termutasi akan membentuk klon dan berproliferasi secara tidak normal. Jaringan abnormalitas sel pada kanker kolon terlihat dari beberapa ekspresi protein contohnya *nitrotyrosine* dan *Nitric Oxide Synthases* (iNOS) yang menunjukkan bahwa terdapat inflamasi pada perkembangan sel kanker kolon.²

Salah satu pengobatan yang dilakukan pasien kanker kolon adalah kemoterapi. Beberapa dari obat kemoterapi memiliki mekanisme kerja dengan menginduksi sitotoksitas seperti dengan memengaruhi transkripsi replikasi DNA, aktivasi sinyal reseptor kematian, serta aktivasi jalur mitokondria. Mekanisme tersebut dapat menyebabkan apoptosis sel kanker dan mencegah metastasis. Di samping itu, obat kemoterapi mempunyai efek samping salah satunya adalah dapat mengganggu kinerja tubuh seperti toksisitas renal atau supresi tulang rawan.³ Upaya untuk mengurangi efek samping tersebut adalah dengan mengembangkan sediaan obat herbal yang dapat menggantikan peran obat kemoterapi sintesis dan relatif lebih efektif dalam meningkatkan daya tahan tubuh pasien kanker.

Salah satu bagian tanaman yang berpotensi sebagai antikanker adalah kulit buah kakao (*Theobroma cacao*). Kulit buah kakao adalah limbah dari pengolahan biji kakao yang tidak dimanfaatkan. Bila tidak dimanfaatkan, kulit buah kakao dapat menimbulkan pencemaran lingkungan.

Kakao atau pohon coklat merupakan komoditas perkebunan yang berperan tinggi dalam meningkatkan perekonomian nasional seperti penyedia lapangan kerja dan sumber pendapatan dan devisa negara. Pada tahun 2002, Indonesia merupakan produsen coklat terbesar kedua setelah Pantai Gading (*Cote d'Ivoire*). Kabupaten Jember adalah salah satu kota penghasil kakao yang bertempat di Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia (Puslitkoka). Berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian RI No.786/Kpts/Org/9/1981 tanggal 20 Oktober 1981, Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia di Kabupaten Jember adalah lembaga nonprofit yang mendapat mandat untuk melakukan penelitian dan pengembangan komoditas kopi dan kakao secara nasional serta sebagai penyedia data dan informasi yang berhubungan dengan kopi dan kakao. Pada tahun 2010, tercatat produksi buah kakao di Jember rata-rata sebesar 400 kg/ha/tahun yang mengalami peningkatan sebesar 2 kali lipat dari tahun sebelumnya yaitu 120 kg/ha/tahun.⁴

Kulit buah kakao merupakan salah satu sumber pektin dengan kandungan pektin sekitar 6–12% pektin tiap berat kering.⁵ Pektin adalah senyawa polisakarida yang larut dalam air dan merupakan asam-asam pektinat yang mengandung gugus-gugus metoksil.⁶ Banyak penelitian menyatakan bahwa pemberian pektin dapat mengurangi resiko kanker atau dapat menghentikan perkembangan kanker.

Fragmen pektin dapat menginduksi kematian sel kanker yang ditunjukkan dengan hasil analisis *Western Blot* pada sel kanker yang diinkubasi dengan fragmen pektin mengalami apoptosis dan autofagi.⁷ Penelitian ini berusaha menelaah aktivitas antikanker pektin dari kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) secara *in vivo* dengan

menggunakan tikus putih galur Wistar yang diinduksi oleh senyawa karsinogenik 7,12-dimetilbenz(α)antrasena.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengukur aktivitas antikanker kolon dari pektin kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) dengan menghitung jumlah sel goblet kolon tikus. Penelitian ini juga berusaha untuk membandingkan pengaruh perbedaan dosis dari pektin kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) dalam menekan perkembangan kanker. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi pektin kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) sebagai anti kanker kolon dan sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya.

Metode

Hewan uji yang digunakan adalah 24 ekor tikus putih jantan galur Wistar umur 8 minggu yang diperoleh dari Malang. Kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) yang digunakan berasal dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao hasil pemanenan di Kebun Renteng, Jember. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah DMBA (7,12-dimetilbenzen (α)antrasena), alkohol 96%, formalin (mengandung larutan dapar fosfat dan berasal dari Laboratorium Farmakologi, Farmasi Universitas Jember), asam sitrat, eter, dan larutan Na CMC (*sodium carboxymethylcellulose*) 1,0%. Bahan pendukung dalam penelitian ini meliputi minyak jagung, akuades, label, alat-alat bedah, alat tulis, pakan tikus (berasal dari Laboratorium Farmakologi, Farmasi Universitas Jember), *bedding* hewan uji (sekam), peralatan bedah, dan kertas saring.

Alat-alat yang digunakan adalah ultrasonik, *hot plate*, neraca Ohaus, *syringe* 5 mL (Luer LokTM), *vortex*, *stirrer*, timbangan untuk hewan, kandang, sonde, pengaduk, masker, kacamata, *handscoon*, pompa vakum, alat-alat gelas, oven, alat kebersihan, serta botol minuman.

Tahapan penelitian meliputi ekstraksi pektin, penyiapan sampel uji, pengondisian

dan pengelompokan hewan uji, penyiapan larutan karsinogen, induksi karsinogen pada tikus galur wistar, uji aktivitas antikanker kolon, pengukuran berat badan, nekropsi tikus, serta analisa data.

Ekstraksi pektin diawali dengan persiapan kulit kakao. Buah kakao dicuci dengan air untuk menghilangkan tanah, pasir, dan kotoran. Buah kakao dipotong menjadi dua bagian kemudian biji kakao dipisahkan dari kulitnya. Kulit buah kakao dipotong tipis dengan ukuran ± 2 mm menggunakan pisau *stainless steel*. Kulit buah kakao kemudian dikeringkan di ruang terbuka. Kulit buah kakao yang telah kering dihaluskan dan diayak dengan ukuran 50 mesh. Setelah itu, ekstraksi pektin dilakukan dengan menimbang 80 g serbuk kulit buah kakao dimasukkan ke dalam gelas kimia. Ekstraksi dilakukan menggunakan ultrasonik pada suhu 80 °C selama 120 menit. Pelarut yang digunakan adalah larutan asam sitrat 1:12 sehingga diperoleh pH<3. Setelah proses ekstraksi dihentikan, bubur kulit kakao disaring dengan menggunakan kain saring dan diperas sampai filtrat keluar. Sisa endapan disaring kembali dengan corong buchner. Filtrat pektin yang diperoleh kemudian diendapkan dengan alkohol asam (1:1,5) selama 18 jam. Endapan pektin basah disaring menggunakan corong buchner. Pektin basah kemudian dimurnikan dengan cara dicuci menggunakan pelarut alkohol 96% sebanyak tiga kali atau sampai pH netral. Pektin basah hasil pencucian lalu dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50 °C selama 6 jam.

Sampel uji disiapkan dengan membuat suspensi pektin kering dari kulit buah kakao dalam Na CMC 1%. Pembuatan Na CMC yaitu dengan pemanasan campuran Na CMC dan akuades disertai pengadukan. Selanjutnya campuran Na CMC dan pektin kering dihomogenkan dengan *vortex*.

Selanjutnya dilakukan pengondisian dan pengelompokan hewan uji. Semua tikus mengalami aklimatisasi di dalam kandang percobaan selama seminggu. Semua tikus diberikan pakan komersial

dan air secara *ad libitum* (bebas). Alas tikus berasal dari sekam padi dan selama induksi karsinogen tidak boleh diganti namun saat uji aktivitas dengan kulit buah kakao diganti tiap 2 kali dalam seminggu.

Tikus jantan galur Wistar sejumlah 24 ekor dibagi acak dalam 4 kandang. Setiap kandang berisi 6 ekor tikus. Tiap kandang dibagi dalam 4 kelompok perlakuan antara lain kelompok kontrol negatif, dosis 8 mg/kgBB, dosis 12 mg/kgBB, dan dosis 16 mg/kgBB. Tikus kelompok kontrol negatif merupakan kelompok perlakuan di mana tikus diinduksi DMBA namun tikus tidak diberikan larutan uji. Tikus kelompok dosis 1 merupakan kelompok perlakuan di mana tikus diinduksi DMBA dan diberikan larutan uji ekstrak kulit buah kakao dengan dosis 8 mg/kgBB. Tikus kelompok dosis 2 merupakan kelompok perlakuan di mana tikus diinduksi DMBA serta diberikan larutan uji ekstrak kulit buah kakao dengan dosis 12 mg/kgBB. Tikus kelompok dosis 3 merupakan kelompok perlakuan dimana tikus diinduksi DMBA dan diberikan larutan uji ekstrak kulit buah kakao dengan dosis 16 mg/kgBB.

Pembuatan larutan karsinogen yaitu dengan melarutkan 1 g serbuk DMBA ke dalam 250 mL larutan minyak jagung sehingga diperoleh dosis 20 mg/kgBB.⁸ Selanjutnya dilakukan proses homogenasi diaduk dengan pengaduk vortex selama lebih kurang 15 menit sampai homogen.

Induksi karsinogen dilakukan pada tikus jantan galur Wistar dengan DMBA sebagai agen karsinogen. Dosis induksi yang diberikan adalah 20 mg/kgBB.⁸ Rancangan penelitian dilakukan dengan enam kali replikasi untuk masing-masing perlakuan. Proses induksi dilakukan secara berkelanjutan 2 minggu sekali selama 4,5 minggu. DMBA diberikan secara peroral dengan sejumlah volume (mL) DMBA sesuai dosis.

Uji aktivitas antikanker kolon pada tikus galur Wistar yang diinduksi dengan senyawa karsinogen DMBA selama 4,5 minggu kemudian diberi 4 perlakuan yaitu kontrol negatif, dosis 8 mg/kgBB, dosis 12

mg/kgBB, serta dosis 16 mg/kgBB. Pemberian ekstrak dilakukan setiap hari selama 15 hari.

Tikus ditimbang saat akan dilakukan induksi dan pengobatan. Tikus ditimbang menggunakan neraca Ohaus sebelum diberi perlakuan. Penimbangan dilakukan dari adaptasi hingga selesai pengobatan.

Nekropsi dilakukan pada hari ke-16 diawali pembiusan dengan pemberian eter dalam wadah tertutup. Setelah pingsan, tikus kemudian didislokasi leher. Tikus lalu dibedah dengan hati-hati. Bagian yang diambil adalah kolon tikus. Kolon tikus diawetkan dalam larutan dapar formalin 10% (yang mengandung larutan penyangga fosfat pH 7,4). Setelah itu hasil dari proses pengawetan dibuat preparat untuk sampel pengamatan histopatologi.

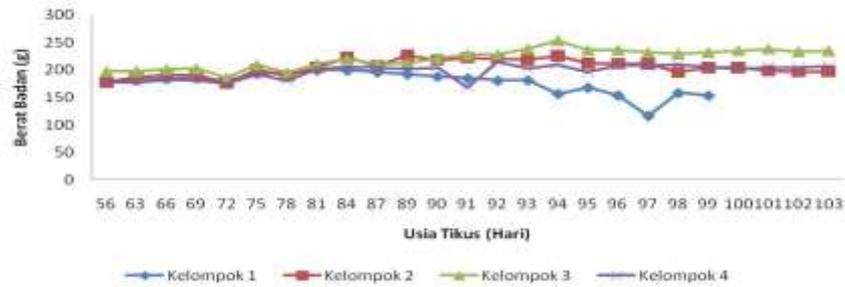
Perhitungan berat badan tikus dihitung dengan rata-rata berat badan tikus dan dibandingkan antar kelompok secara deskriptif. Pengamatan histopatologi dengan pewarnaan Hematoxilin-Eosin dengan perbesaran 400x yang digunakan untuk menghitung jumlah sel goblet pada kolon yang diamati secara deskriptif dan diuji statistik menggunakan *One way Anova*.

Hasil

Ekstrak kulit buah *Theobroma cacao* dengan pelarut asam sitrat menghasilkan rendemen sebanyak 0,33%. Perkembangan berat badan tikus dapat dilihat pada Gambar 1 dan potongan melintang organ kolon tikus galur wistar dengan pewarnaan hematoxilin-eosin dapat dilihat pada Gambar 2. Jumlah sel goblet dari tiap kelompok uji dapat dilihat pada Gambar 3.

Pembahasan

Ekstrak kulit buah *Theobroma cacao* dengan pelarut asam sitrat menghasilkan rendemen sebanyak 0,33%. Rendemen yang dihasilkan lebih kecil dari yang dihasilkan.⁹ Berat bersih yang didapat oleh Edahwati, dkk (2013) dengan pelarut asam



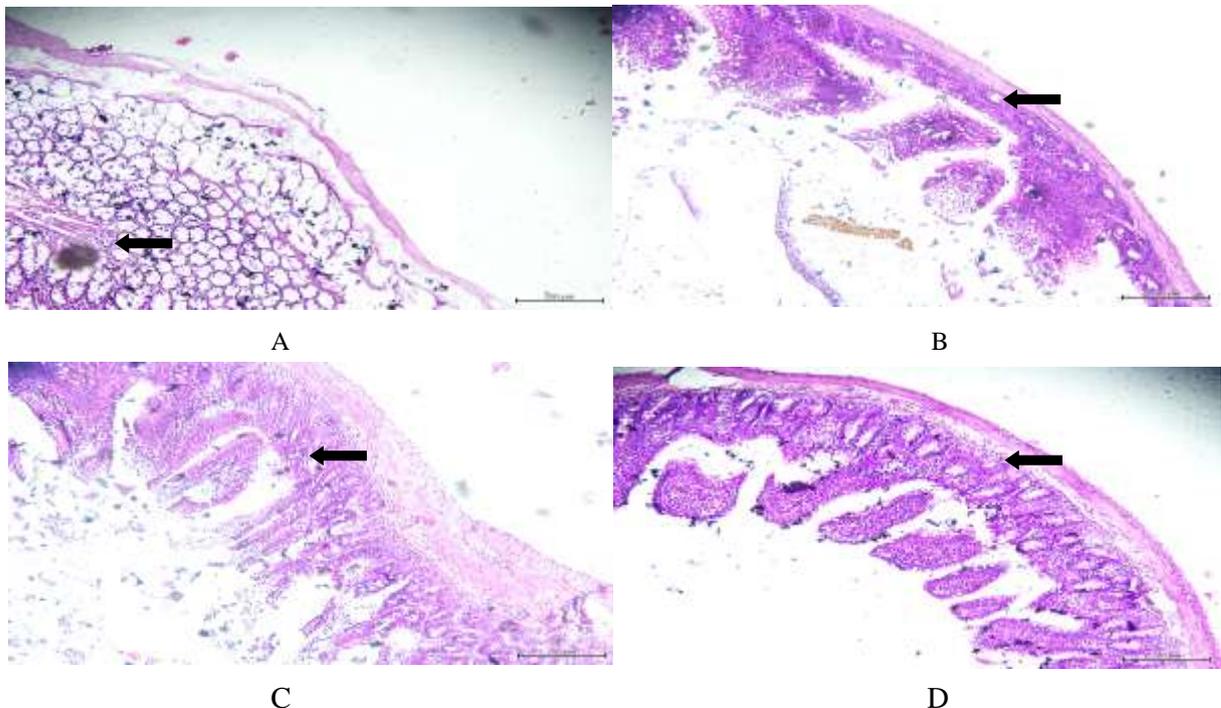
Gambar 1 Perkembangan Berat Badan Antar Kelompok Perlakuan

sitrat adalah sebesar 16,23%. Laporan penelitian yang ditulis oleh Edahwati, dkk (2013) tidak memuat metode ekstraksi maupun alat yang digunakan sehingga tidak dapat diperbandingkan dengan penelitian ini. Pada laporan Edahwati, dkk (2013) menggunakan perbandingan asam sitrat 1:12 namun perbandingan pelarut untuk mengendapkan filtrat pektin tidak dijelaskan sehingga pada penelitian ini digunakan perbandingan alkohol:asam sitrat 1:1,5 dari hasil penelitian Susilowati (2013).^{6,9}

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan dari beberapa

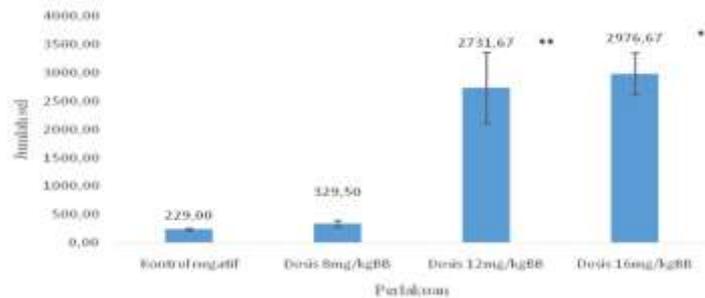
penelitian sehingga hasil yang didapatkan berbeda dengan penelitian yang digunakan. Ekstraksi kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) pada penelitian Akhmalludin dan Arie (2009) dilakukan dengan pelarut asam klorida. Asam klorida tidak digunakan untuk pelarut ekstraksi karena bersifat asam kuat sehingga pada saat penetralan akan membutuhkan alkohol yang lebih banyak. Pemilihan pelarut asam sitrat lebih dipilih karena lebih efisien dan efektif sehingga tidak membutuhkan banyak alkohol untuk menetralkan pektin asam.¹⁰

Uji aktivitas tidak memerlukan banyak alkohol untuk menetralkan pektin asam.¹⁰



Gambar 2 Potongan Melintang Organ Kolon Tikus Galur Wistar dengan Pewarnaan Hematoxilin-Eosin dan Perbesaran 400x

Keterangan: A: Kontrol negatif (CMC-Na 1%), B: Pektin kulit *Theobroma cacao* 8 mg/kgBB, C: Pektin kulit *Theobroma cacao* 12 mg/kgBB, D: Pektin kulit *Theobroma cacao* 16 mg/kgBB



Gambar 3 Jumlah Sel Goblet Antar Kelompok Perlakuan

Keterangan : **: Berbeda signifikan dengan nilai $p < 0,05$

Uji aktivitas antikanker dilakukan dengan induksi DMBA sebanyak 9 kali dengan dosis 20 mg/kgBB tikus. Induksi dilakukan seminggu 2 kali dimulai pada saat tikus berumur 8 minggu. Pemilihan dari dosis DMBA sebesar 20 mg/kgBB berdasarkan penelitian Hendris dan Ishwayudi (2013) di mana pada dosis tersebut menunjukkan kejadian kanker tercepat.⁸

DMBA adalah senyawa karsinogen dengan rumus empiris $C_{20}H_{16}$ yang bersifat toksik bagi tubuh. Dalam tubuh hewan pengerat akan bereaksi dengan sitokrom P-450 dengan membentuk ikatan kovalen dengan DNA sel yang aktif sehingga menyebabkan DNA *adducts*. Gejala klinis yang ditimbulkan senyawa DMBA antara lain gangguan pada proses pencernaan, gangguan proses pernapasan, serta dapat menimbulkan iritasi pada kulit, dan mata.¹¹

Pada gambar 1 menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara peningkatan berat badan tikus antara kelompok yang diberikan ekstrak (dosis 1– 3) terhadap kelompok kontrol negatif. Pada Gambar 3 menunjukkan ada beberapa hari di mana terjadi penurunan rata-rata berat badan tikus pada umur tikus 69 hari sampai 72 hari. Kenyataan ini diduga karena tingkat stres yang dialami tikus yang diinduksi DMBA. Stres menyebabkan penurunan nafsu makan yang dapat berakibat terhadap penurunan berat badan. Pada kelompok 1 menjelang akhir masa perlakuan tidak terdapat data berat badan disebabkan karena semua tikus pada kelompok perlakuan tersebut sudah nekropsis atau kematian.

Pada pemeriksaan histopatologi sel usus memperlihatkan adanya perbedaan jumlah sel goblet usus. Sel goblet adalah sel yang berfungsi sebagai sekresi mukus di usus besar dan melindungi usus dari sekresi asam lambung yang berlebihan. Secara normal, distribusi sel goblet dalam epitel kolon tersebar merata dan memiliki bentuk elips dan teratur. Pada Gambar 2A terlihat pada penampang melintang kolon tikus kelompok kontrol negatif memiliki distribusi jumlah sel goblet yang sedikit dan tidak terlihat. Pada Gambar 2B menunjukkan distribusi jumlah sel goblet lebih banyak dibanding dengan kelompok kontrol negatif. Sedangkan pada Gambar 2C dan 2D menunjukkan distribusi jumlah sel goblet tersebar merata meskipun pada gambar 2C jumlah granula dari sel goblet tidak merapat.

Berdasarkan analisis secara kuantitatif, pengaruh pektin kulit buah kakao terhadap jumlah sel goblet usus dapat dilihat pada Gambar 3 menunjukkan adanya penurunan jumlah sel goblet pada kelompok kontrol negatif. Peningkatan jumlah sel goblet dialami oleh kelompok tikus III dan IV. Berdasarkan hasil analisis dapat dikatakan bahwa pektin dari kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) mempunyai pengaruh dalam peningkatan jumlah sel goblet di usus besar hewan coba. Pektin mampu menghambat metastasis kanker sehingga sel kanker tidak dapat menyebar ke seluruh bagian tubuh.¹¹

Hasil pemeriksaan secara makroskopik usus tikus dari 4 kelompok yaitu kelompok I kontrol negatif, kelompok II dosis ekstrak

8 mg/kgBB, kelompok III dosis ekstrak 12 mg/kgBB, dan kelompok IV dosis ekstrak 16 mg/kgBB memperlihatkan bahwa terdapat perbedaan. Pada kelompok I kontrol negatif terlihat ada benjolan pada permukaan usus lebih banyak dibanding dengan benjolan pada kelompok perlakuan lain. Hal tersebut dikarenakan efek dari senyawa karsinogen DMBA menyebabkan abnormalitas dari usus kelompok I kontrol negatif lebih tinggi daripada kelompok perlakuan lain.

Gambar 3 menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan antara jumlah sel goblet kelompok yang diberikan ekstrak (dosis 2 dan dosis 3) terhadap kelompok perlakuan lain (kontrol negatif dan dosis 1). Pada penelitian ini menunjukkan bahwa adanya peningkatan jumlah sel goblet pada pemberian ekstrak dosis 12 mg/kgBB dan 16 mg/kgBB. Berdasarkan penelitian Hartati dan Kurniasari (2011), pektin mempunyai struktur polisakarida rantai panjang dan mengandung galektin.¹¹ Galektin berada pada permukaan sel yang berfungsi sebagai komunikasi seluler, membuat sel dapat mengirim pesan satu dengan lainnya dan membuat mereka berikatan. Proses ini umumnya terjadi di sel normal, di mana jumlah galektin relatif sedikit. Jumlah galektin pada sel kanker tidak proporsional khususnya galektin-3. Untuk mengurangi kemampuan dari sel kanker, maka koneksi antar sel harus diputus sehingga sel tersebut tidak dapat berkembang. Struktur molekul pektin dapat menghambat proses perkembangan kanker dengan mengikat galektin pada permukaan sel kanker sehingga akan dapat memutus kemampuan komunikasi antar sel kanker.¹²

Simpulan

Perlakuan pemberian pektin kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) dapat menekan pertumbuhan kanker kolon pada tikus putih galur Wistar dan dapat memulihkan kembali sel goblet pada kolon tikus. Ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma*

cacao) mempunyai potensi aktivitas antikanker tertinggi pada dosis 16 mg/kgBB. Pemberian ekstrak pada dosis tertinggi dapat meningkatkan *recovery* jumlah sel goblet.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih sebesar-besarnya penulis ucapkan kepada Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan yang telah membiayai penelitian ini berdasarkan surat nomor 0074/E5.3/KPM/2015.

Daftar Pustaka

1. Sander MA. Profil penderita kanker kolon dan rektum di RSUP Hasan Sadikin Bandung (skripsi). Malang; Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah; 2009.
2. Wicaksono MH, Permana S. Potensi fraksi etanol benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) sebagai agen antikanker kolon pada mencit (*Mus musculus* Balb/c) setelah induksi dextran sulfat (DSS) dan azoxymethane (AOM). Jurnal Biotropika. 2013;1(2):75–79.
3. Florea A, Busselber D. Cisplatin as an antitumor drug: Cellular mechanism of activity, drug resistance and induced side effect. Cancer (basel). 2011;3(1): 1351–1371.
4. Dinas Perkebunan Jawa Timur. Statistik dishub [diunduh 21 September 2014]. Tersedia dari: <http://www.disbun.jatimprov.go.id>.
5. Spillane, James JD. Komoditi kakao. Yogyakarta: Kanisius; 1995.
6. Susilowati, Munandar S, Edahwati L, Harsini L. Ekstraksi pektin dari kulit buah coklat dengan pelarut asam Sitrat (skripsi). Yogyakarta: Fakultas Teknologi Industri UPN. 2013;11(1): 27–30.
7. Leclere L, Cote F, Pino JCC, Cutsem PV, Michiel C. Characterization of the cell death pathway induced by hydrolyzed pectin in HepG2 and A549

- cells. Belgia: University of Namur FUNDP; 2013.
8. Hendris, Ishwayudi. Induksi kanker pada tikus putih *Sprague Dawley* sebagai hewan model dalam penelitian radiofarmaka. Prosiding Seminar Nasional sains dan Teknologi Nuklir; 2013 Juli 4; Bandung, Indonesia: 319–326.
 9. Edahwati L, Susilowati, Harsini, Tutuk. Produksi pektin dari kulit buah coklat (*Theobroma cacao*) (skripsi). Yogyakarta: Universitas Pembangunan Nasional. 2013;121–124.
 10. Akhmalludin, Arie. Pembuatan pektin dari kulit coklat dengan metode ekstraksi (skripsi). Semarang: Universitas Diponegoro; 2009.
 11. Hartati I, Kurniasari L. Enzymatic extraction of low methoxyl pectin as a potential anticancer agent from green cincau (*Premna Oblongifolia Merr.*). Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi ke-2. Semarang, Indonesia: 2011; 33–38.
 12. Makker PN, Hogan V, Yuichiro H, Baccarini S, Tait L, Bresalier R, et al. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude by oral intake of modified citrus pectin. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94 (24):185–1862.