



**UJI SITOTOKSISITAS DAN APOPTOSIS EKSTRAK ETANOL DAUN
KAYU KUNING (*Arcangelisia flava* L. Merr.) TERHADAP KULTUR
SEL KANKER KOLON WiDr *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:

Moh Sulthon Habibi

NIM 112210101031

UNIVERSITAS JEMBER

FAKULTAS FARMASI

2015



**UJI SITOTOKSISITAS DAN APOPTOSIS EKSTRAK ETANOL DAUN
KAYU KUNING (*Arcangelisia flava* L. Merr.) TERHADAP KULTUR
SEL KANKER KOLON WiDr *IN VITRO***

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi syarat untuk menyelesaikan Studi Farmasi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh:

Moh Sulthon Habibi

NIM 112210101031

UNIVERSITAS JEMBER

FAKULTAS FARMASI

2015

PERSEMBAHAN

Alhamdulillah dengan sepenuh hati dan jiwa saya persembahkan skripsi ini untuk:

1. Kedua orang tua tercinta, Ibu Nurul Lailin dan Bapak Suroso
2. Kedua adik penulis, Hikmatul Q. Jamil dan Andini Rihadatul Aisy
3. Guru-guru penulis sejak TK Perwanida Kalisat, SD Negeri 1 Kalisat, SMP Negeri 1 Kalisat, SMK Farmasi Jember dan Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember
4. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

“Barang siapa bersungguh-sungguh, sesungguhnya kesungguhannya itu adalah untuk dirinya sendiri”

(Q.S. Al- Ankabut : 6)

“Education is the most powerful weapon which you can use to change the world”

(Nelson Mandela)

“Di sekitar kita ada kawan yang selalu hadir sebagai pahlawan”

(Andrea Hirata)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Moh Sulthon Habibi

NIM : 1122101010313

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Uji Sitotoksitas dan Apoptosis Ekstrak Etanol Daun Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* L. Merr.) terhadap Kultur Sel Kanker Kolon WiDr *In vitro*” adalah benar – benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 30 Juli 2015

Yang menyatakan,

Moh Sulthon Habibi

NIM 112210101031

SKRIPSI

**UJI SITOTOKSISITAS DAN APOPTOSIS EKSTRAK ETANOL DAUN
KAYU KUNING (*Arcangelisia flava* L. Merr.) TERHADAP KULTUR
SEL KANKER KOLON WiDr *IN VITRO***

Oleh :

Moh Sulthon Habibi

NIM 102210101058

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Endah Puspitasari S. Farm., M.Sc., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Evi Umayah Ulfa S.Si., M.Si., Apt.

PENGESAHAN

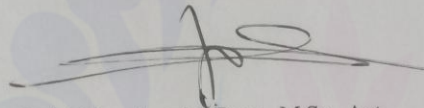
Skripsi berjudul “Uji Sitotoksitas dan Apoptosis Ekstrak Etanol Daun Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* L. Merr.) terhadap Kultur Sel Kanker Kolon WiDr *In Vitro*” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Kamis, 30 juli 2015

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

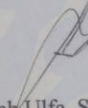
Tim Pembimbing

Pembimbing Utama,



Endah Puspitasari S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP. 198107232006042002

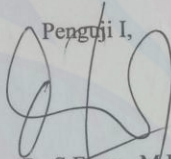
Pembimbing Anggota,



Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 197807282005012001

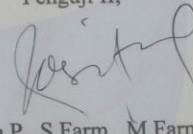
Tim Penguji

Penguji I,



Dian Agung P., S.Farm., M.Farm., Apt.
NIP. 1984100820081210004

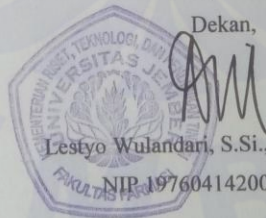
Penguji II,



Ayik Rosita P., S.Farm., M.Farm., Apt.
NIP. 198102012006042001

Mengesahkan

Dekan,

Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt.
NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Uji Sitotoksisitas dan Apoptosis Ekstrak Etanol Daun Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* L. Merr) terhadap Kultur Sel Kanker Kolon WiDr *In Vitro*; Moh Sulthon Habibi; 112210101031; 2015; 54 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Prevalensi kanker kolon yang terus meningkat baik di dunia maupun di Indonesia, menjadikan kanker kolon menjadi permasalahan kesehatan global yang perlu segera ditangani. Kayu kuning (*Arcangelisia flava*) merupakan salah satu tumbuhan yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen kemoprevensi kanker kolon karena adanya kandungan alkaloida berberin di dalamnya yang diduga memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker, serta memiliki potensi dalam menginduksi apoptosis sel. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak etanol daun *A. flava* terhadap kultur sel kanker kolon WiDr, serta mengetahui kemampuan ekstrak dalam memacu apoptosis.

Penelitian ini merupakan penelitian *eksperimental laboratories*, menggunakan sel kanker kolon WiDr yang dikultur dalam media RPMI. Untuk uji sitotoksisitas, kultur sel WiDr diberi perlakuan ekstrak etanol daun *A. flava* menggunakan 5 seri konsentrasi yaitu 100, 200, 300, 400, dan 500 µg/ml kemudian dilakukan pembacaan absorbansi sel dengan menggunakan ELISA *reader* untuk mengetahui persen sel hidup setelah diberi perlakuan ekstrak. Hasil dari persen sel hidup, dianalisis dengan menggunakan program probit dan diperoleh nilai IC_{50} sebesar 308 ± 83 µg/ml.

Pada penelitian ini juga dilakukan uji apoptosis sel untuk mengetahui kemampuan ekstrak dalam memacu apoptosis sel. Kultur sel WiDr diberi perlakuan ekstrak dengan konsentrasi IC_{50} dan $1,5 IC_{50}$ yaitu 310 µg/ml dan 460 µg/ml kemudian dilakukan pengecatan DNA sel menggunakan etidium bromida- akridin oranye. Hasil pengecatan dilihat di bawah mikroskop fluoresen untuk melihat sel yang hidup, sel yang mengalami apoptosis, dan sel yang mengalami nekrosis.

Berdasarkan hasil uji apoptosis, diperoleh ekstrak etanol daun *A. flava* dengan konsentrasi 310 µg/ml dapat memacu apoptosis sel sebesar 94,57 %, sedangkan pada konsentrasi 460 µg/ml, ekstrak etanol daun *A. flava* dapat memacu apoptosis sel sebesar 90,34 %.

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah ekstrak etanol daun *A. flava* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker kolon WiDr dengan nilai IC_{50} sebesar 308 ± 83 µg/ml dan diduga aktivitas sitotoksik tersebut terjadi melalui kemampuan ekstrak dalam memacu apoptosis sel.

PRAKATA

Bismillahirrohmanirohim

Puji syukur kehadirat ALLAH SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Sitotokisitas dan Uji Apoptosis Ekstrak Etanol Daun Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr.) terhadap Kultur Sel Kanker Kolon WiDr *In Vitro*”. Sholawat dan salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya.

Dengan terselesaikannya skripsi ini, penulis menyadari dan mengakui bahwa upaya, doa, arahan, bimbingan, dan dukungan dari keluarga maupun dosen pembimbing serta pihak-pihak lainnya sangat membantu dalam terselesaikannya skripsi ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini dengan sepuh hati penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember, Ibu Lesty Wulandari S.Si., M.Farm., Apt., atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini serta sebagai dosen pembimbing akademik penulis yang selalu membimbing penulis dalam menempuh pendidikan;
2. Ibu Endah Puspitasari S.Farm., M.Sc., Apt., selaku dosen pembimbing utama dan Ibu Evi Umayah Ulfa S.Si., M.Si., Apt., selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatiannya dalam membantu dan membimbing penulis hingga akhir penyusunan skripsi ini;
3. Bapak Dian Agung Pangaribowo, S. Farm., M. Farm., Apt. dan Ibu Ayik Rosita Puspaningtyas, S.Farm., M.Farm., Apt. yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan mengevaluasi skripsi ini;
4. Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang tanpa lelah telah mengamalkan ilmunya dan memperluas ilmu pengetahuan serta wawasan penulis selama menempuh masa kuliah;

5. Pimpinan dan para karyawan Fakultas Farmasi Universitas Jember atas bantuannya selama penulis belajar di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
6. Kedua orang tua penulis, Bapak Suroso dan Ibu Nurul Lailin, atas doa yang tiada henti, semangat tiada surut, dan kasih sayang yang tidak pernah padam. Semoga keberhasilanku ini dapat menjadi kebanggaan dan kebahagiaan bapak dan ibu sekalian, agar aku bisa berarti di mata kalian untuk bisa melukiskan kebahagiaan di wajah kalian.
7. Kedua Adik penulis: Hikmatul Q. Jamil dan Andini Rihadatul Aisy atas kasih sayang, doa, dan semangat yang tiada henti kalian berikan.
8. Saudara penulis, Bima Segara Sakti atas dukungan, semangat, dan motivasinya sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini.
9. Sahabat seperjuangan Vita Ariati atas semangat kerja keras, dan kekompakan selama pengerjaan skripsi dan penelitian ini;
10. Sahabat – sahabat terbaik di kampus: Vita, Yora, Indarto, Alan, Arif, dan Putra yang selalu mensupport, memberikan dukungan, dan semangat.
11. Sahabat–sahabat skripsi tempat berkeluh kesah: Iik, yek, mely, yuni, rere, estika, prisma, fia, meyladia, puspita, nur, ika, risty, pipit, lintang, defitri, zuhro atas kebersamaan, bantuan, dan semangatnya dalam menyelesaikan penelitian ini.
12. Bu Widi dan Mbak Anggra selaku teknisi laboratorium Biologi atas bantuannya;
13. Mbak Rumbi selaku teknisi Laboratorium Parasitologi FK UGM
14. Sahabat-sahabat seangkatan Fakultas Farmasi Universitas Jember, “Farmasi 2011, ASMEF BISA !!!”
17. Serta semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu atas bantuan dan perhatiannya baik langsung maupun tidak langsung serta inspirasi bagi penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 30 juli 2015

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN BIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Tanaman <i>A. flava</i>	6
2.1.1 Klasifikasi Tanaman	6
2.1.2 Morfologi Tanaman	7
2.1.3 Ekologi dan Penyebaran Tanaman	6
2.1.4 Kandungan Kimia dan Manfaatnya	6
2.2 Tinjauan Kanker Kolon	7
2.2.1 Definisi Kanker Kolon	7
2.2.2 Patofisiologi	7

2.2.3 Gejala Klinis.....	10
2.2.4 Prevalensi Kanker dan Kanker Kolon	10
2.2.5 Tinjauan Sel WiDr.....	12
2.3 Tinjauan Kemoprevensi	13
2.4 Tinjauan Uji Sitotoksisitas dengan Metode MTT	14
2.5 Tinjauan Uji Apoptosis dengan Metode <i>Double Staining</i>	16
BAB III. METODE PENELITIAN	
3.1 Jenis Penelitian	19
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.3 Rancangan Penelitian.....	19
3.3.1 Rancangan Operasional	19
3.3.2 Definisi Operasional	19
3.3.3 Rancangan Percobaan.....	20
3.3.4 Alur Penelitian.....	21
3.4 Alat dan Bahan	21
3.4.1 Alat	21
3.4.2 Bahan	22
3.5 Variabel Penelitian	22
3.5.1 Variabel Bebas	22
3.5.2 Variabel Terikat.....	22
3.5.3 Variabel Terkendali	22
3.6 Prosedur Kerja.....	23
3.6.1 Pembuatan Ekstrak Etanol <i>A. flava</i>	23
3.6.2 Pembuatan Media Kultur	23
3.6.3 Preparasi Kultur Sel.....	24
3.6.4 Preparasi Sampel	25
3.6.5 Uji Sitotoksisitas menggunakan metode MTT.....	25
3.6.6 Uji Apoptosis Sel dengan Metode <i>Double Staining</i>	26

3.7 Analisa Data	27
3.7.1 Analisa Data Uji Sitotoksitas	27
3.7.2 Analisa Data Uji Apoptosis.....	27
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Hasil Ekstraksi	29
4.2 Hasil Uji Sitotoksitas	30
4.3 Hasil Uji Apoptosis	31
4.4 Pembahasan	32
BAB 5. PENUTUP	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	44

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Daun <i>A. flava</i>	6
2.2 Anatomi saluran pencernaan manusia	8
2.3 Lapisan dinding kolon manusia	9
2.4 Jumlah kasus baru dan jumlah kematian akibat kanker	11
2.5 Jumlah kasus baru dan jumlah kematian akibat kanker kolon.....	12
2.6 Sel WiDr	13
2.7 Mekanisme reaksi uji MTT.....	15
2.8 Sel yang mengalami apoptosis	18
3.1 Alur penelitian.....	21
3.2 Perhitungan sel menggunakan <i>haemocytometer</i>	24
4.1 Morfologi sel WiDr setelah perlakuan ekstrak	30
4.2 Pengaruh konsentrasi ekstrak terhadap % sel hidup	29
4.3 Hasil uji apoptosis dengan metode <i>double staining</i>	31
4.4 Persentase hasil uji apoptosis.....	32

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Perhitungan Rendemen Ekstrak	44
B. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Etanol Daun <i>A. flava</i>.....	44
C. Perhitungan Penanaman Sel WiDr	45
D. Perhitungan Hasil Uji Sitotoksitas.....	47
E. Perhitungan Persen Apoptosis, Nekrosis, dan Sel Hidup.....	54

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan salah satu penyakit yang prevalensinya terus meningkat setiap tahunnya. Pada tahun 2008, terdapat 12,7 juta kasus baru dengan angka kematian akibat kanker mencapai 7,6 juta jiwa di seluruh dunia. Pada tahun 2012, terdapat kenaikan jumlah kasus baru dan angka kematian yaitu mencapai 14,1 juta kasus baru dengan angka kematian 8,2 juta jiwa di seluruh dunia. Jumlah penderita kanker yang masih hidup dalam 5 tahun sebelum tahun 2012 adalah sebanyak 32,5 juta jiwa. Diperkirakan akan terjadi peningkatan kasus baru dalam lima tahun ke depan sekitar 32,6 juta (IARC, 2013).

Kanker kolon menempati urutan ketiga jumlah kasus kanker terbanyak di dunia setelah kanker paru dan kanker payudara. Pada tahun 2002, jumlah kasus baru kanker kolon sebesar 1,023 juta kasus dengan angka kematian akibat kanker kolon sebesar 0,529 juta jiwa (Ferlay *et al.*, 2005). Selanjutnya di tahun 2008, terjadi peningkatan kasus yaitu terdapat 1,233 juta kasus baru kanker kolon yang terdiri dari 0,663 juta kasus dengan angka kematian akibat kanker kolon sebanyak 0,608 juta jiwa, (Ferlay *et al.*, 2010). Pada tahun 2012, jumlah kasus baru kanker kolon mencapai 1,36 juta kasus dengan angka kematiannya mencapai 0,694 juta jiwa (IARC, 2013). Di Indonesia, jumlah penderita kanker kolon mencapai 1,8 penderita tiap 100.000 penduduk (Tedja *and* Abdullah, 2013).

Salah satu bentuk pengobatan kanker adalah dengan kemoterapi yaitu pengobatan dengan menggunakan senyawa kimia. Namun demikian, pengobatan dengan kemoterapi memiliki efek samping yang cukup serius antara lain: mual, muntah, kerontokan rambut, menopause dini, kelelahan, luka pada mulut dan tenggorokan, kehilangan berat badan secara drastis, serta gangguan ingatan. Pembedahan dan radioterapi merupakan bentuk pengobatan lain yang lebih aman dari

pada kemoterapi karena efek kerjanya yang lokal atau bekerja hanya pada bagian yang terkena kanker. Namun demikian, kedua bentuk pengobatan tersebut hanya untuk jenis kanker yang terlokalisir sehingga tidak dapat mengobati penyakit kanker yang sudah meluas. Di samping itu, memerlukan biaya yang cukup besar dibanding kemoterapi, sehingga tidak semua penderita mampu melakukan pengobatan dengan metode tersebut (ACS, 2015).

Pencarian agen-agen kemoprevensi kanker, yaitu suatu senyawa baik senyawa alam, sintesis, atau agen biologis kimia untuk mencegah, menekan, atau membalikkan progresi karsinogenesis dari tahap inisiasi sampai inisif terus dilakukan (Tsao *et al.*, 2004). Agen kemoprevensi umumnya memiliki aktivitas penghambatan terhadap perkembangan sel kanker serta dapat meningkatkan kesembuhan dan mengurangi rasa sakit pada penderita kanker (ASCO, 2012). Dengan kekayaan alam Indonesia yang melimpah, yaitu memiliki kurang lebih 30.000 spesies flora dan 1.260 spesies di antaranya memiliki khasiat obat, sehingga eksplorasi agen kemoprevensi kanker yang berasal dari bahan alam dapat dengan mudah dilakukan di Indonesia (Hasanah, 2013).

Salah satu tumbuhan yang memiliki potensi sebagai agen kemoprevensi adalah *Arcangelisia flava*. Penelitian yang dilakukan oleh Keawpradub *et al* (2005), diketahui bahwa ekstrak metanol *A. flava* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF 7 dengan nilai IC_{50} sebesar 7,7 $\mu\text{g/ml}$. Bila dibandingkan dengan ekstrak kloroform, petroleum eter dan ekstrak airnya, ekstrak metanol memiliki efek sitotoksik yang paling baik. Aktivitas sitotoksik tersebut diduga disebabkan oleh kandungan berberin di dalamnya (Keawpradub *et al.*, 2005). Berberin memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan sel leukimia WEHI-3 *in vivo*, mampu menginduksi G1 *arrest* dan gliblastoma T98G maupun p53, serta mampu menghambat produksi agen antiapoptosis (Yu *et al.*, 2007; Eom *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2008). Ekstrak etanol *A. flava* juga menunjukkan efek penghambatan terhadap proliferasi sel kanker serviks HeLa dengan nilai IC_{50} sebesar 49,96 $\mu\text{g/ml}$ (Febrinasari *et al.*, 2012).

Di samping itu, berberin memiliki aktivitas antioksidan dengan mengurangi stres oksidatif (Shirwaikar, 2006) serta memiliki efek anti inflamasi salah satunya dengan jalan mengurangi produksi siklooksigenase-2 (COX-2) yang merupakan agen inflamasi. Di samping sebagai agen inflamasi, diketahui bahwa COX-2 merupakan agen promotor pada terjadinya kanker kolon. Peningkatan ekspresi COX-2 dapat menyebabkan aktivasi agen antiapoptosis dan menginaktivasi tumor supresor faktor (Markowitz, 2007).

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, diketahui bahwa tanaman *A. flava* memiliki aktivitas yang baik untuk menghambat perkembangan sel kanker payudara MCF-7, sel kanker serviks HeLa serta memiliki kemampuan antioksidan dan menekan ekspresi COX-2 yang merupakan agen pencetus kanker kolon, sehingga peneliti menduga *A. flava* memiliki aktivitas sitotoksik yang sama terhadap sel kanker kolon. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksitas ekstrak etanol *A. flava* dalam pemakaian tunggal *in vitro* yang meliputi uji sitotoksitas dan uji apoptosis terhadap sel kanker kolon WiDr. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar awal penggunaan tanaman *A. flava* sebagai agen kemoprevensi untuk pengobatan kanker kolon yang lebih efektif dan efisien.

1.2 Perumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini meliputi:

- a. Apakah ekstrak etanol *A. flava* memiliki efek kemoprevensi yang dilihat melalui kemampuan sitotoksitasnya terhadap sel kanker kolon WiDr?
- b. Apakah ekstrak etanol *A. flava* dapat memacu apoptosis pada sel kanker kolon WiDr?

1.3 Tujuan Penelitian

Sesuai dengan rumusan masalah, penelitian ini mempunyai tujuan sebagai berikut:

- a. Untuk mengetahui efek kemoprevensi yang dilihat melalui kemampuan sitotoksitas ekstrak etanol *A. flava* terhadap sel kanker kolon WiDr.
- b. Untuk mengetahui efek ekstrak etanol *A. flava* dalam memacu apoptosis pada sel kanker kolon WiDr.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini antara lain:

- a. Memberikan informasi yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah mengenai khasiat dan manfaat tanaman *A. flava* sebagai anti kanker kolon.
- b. Dapat digunakan sebagai dasar untuk penelitian dan pengembangan tanaman *A. flava* sebagai agen kemoprevensi kanker kolon.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tanaman *A. flava*

2.1.1. Klasifikasi

Klasifikasi tumbuhan *A. flava* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Sub kingdom	: Tracheophyta
Super divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Magnoliidae
Ordo	: Ranunculales
Famili	: Menispermaceae
Genus	: <i>Arcangelisia</i>
Spesies	: <i>Arcangelisia flava</i> (L.) Merr (NCBI, 2013).
Nama Indonesia	: Akar kuning, tali kuning
Nama daerah	: ki koneng (sunda), sirawan (jawa), daun bulan (maluku)

2.1.2 Morfologi Tanaman

A. flava merupakan tanaman yang berukuran besar, berkayu, tidak berbulu, termasuk tanaman liana hingga panjang 20 m dan batangnya berukuran sampai 5 cm (Gambar 2.1). *A. flava* hidup pada dataran rendah sampai 800 m di atas permukaan laut (dpl). Daunnya tebal, berbentuk oval, tumpul tidak tajam, lebar daun 7 cm sampai 20 cm, permukaan atas mengkilap dan tangkainya panjang. Bunganya berumah dua dengan ukuran kecil-kecil tersusun dalam rangkaian berupa *glabrous* 20 cm sampai 50 cm, tajuk bercuping putih kehijauan atau putih kekuningan (Widyatmoko and Zick 1998).



Gambar 2.1 Daun *A. flava* (L.) Merr.

2.1.3 Ekologi dan Penyebaran Tanaman

Tanaman ini banyak ditemukan di pantai, sungai, atau di tepi hutan pada ketinggian 100 m – 800 m di atas permukaan laut. Secara luas didistribusikan dari Cina, Indo-China, Thailand, Semenanjung Malaysia, Sumatera, Jawa, Kalimantan, Sulawesi, Maluku sampai Filipina (Padua, 2003).

2.1.4 Kandungan Kimia dan Manfaatnya

Tanaman *A. flava* mengandung alkaloid isokuinolin seperti jatrorizin, palmatin dan berberin klorida. Di samping itu, juga terdapat beberapa alkaloid minor seperti kolumbamin, dehidrokoralmin, homoaromolin dan talifendin. Di antara jenis alkaloid isokuinolin yang terkandung di dalamnya, kandungan terbesar adalah berberin (Keawpradub *et al.*, 2005).

Ekstrak metanol *A. flava* menunjukkan aktivitas antioksidan dan sitotoksik terhadap larva udang dan sel kanker payudara MCF-7 terbesar dibandingkan ekstrak petroleum eter, kloroform, dan airnya, maupun jika dibandingkan dengan ekstrak *Coscinium blumeanum* dan *Fibraurea tinctoria*. Nilai IC_{50} ekstrak etanol *A. flava* sebesar 7,7 ug/ml; ekstrak kloroform sebesar 8,6 ug/ml; ekstrak petroleum eter dan ekstrak airnya memiliki nilai IC_{50} di atas 50 ug/ml. Aktivitas ini diduga disebabkan oleh kandungan berberin di dalamnya (Keawpradub *et al.*, 2005). Ekstrak etanol *A.*

flava juga mampu meningkatkan sistem imun tikus yang diberi doksorubisin (Puspitasari and Ulfa, 2013).

Berberin sendiri memiliki banyak aktivitas yang mendukung sebagai antikanker. Senyawa ini mampu menghambat pertumbuhan sel leukemia WEHI-3 *in vivo* (Yu *et al.*, 2007), menginduksi G1 *arrest* dan apoptosis pada sel glioblastoma T98G melalui jalur mitokondria/caspase (Eom *et al.*, 2008) maupun p53 (Katiyar *et al.*, 2009), serta menghambat produksi gen antiapoptosis (Pandey *et al.*, 2008). Berberin mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7 dan MDA-MB-231 (Kim *et al.*, 2008). Penelitian yang dilakukan oleh Febrinasari *et al.*, 2012, diketahui bahwa ekstrak etanol *A. flava* menunjukkan efek penghambatan terhadap proliferasi sel kanker serviks HeLa yang tergantung dari dosis yang dipakai dengan $IC_{50} = 49,96$ ug/ml. Tidak hanya digunakan dalam terapi tunggal, berberin juga menunjukkan hasil yang baik saat diaplikasikan dalam bentuk kombinasi dengan radioterapi (Li *et al.*, 2010). Berberin juga memiliki kemampuan antioksidan dan anti inflamasi. Mekanisme kerja berberin sebagai anti oksidan adalah dengan mereduksi atau mengurangi stres oksidatif. Sedangkan aktivitas anti inflamasinya bekerja dengan mengurangi TNF- α , IL-6, IL-1 β , *matrix metalloprotease 9* (MMP9), *cyclooxygenase-2* (COX2), *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), *C-reaction protein* (CRP) dan haptoglobin (HP) (Wang, 2013).

2.2 Tinjauan Kanker Kolon

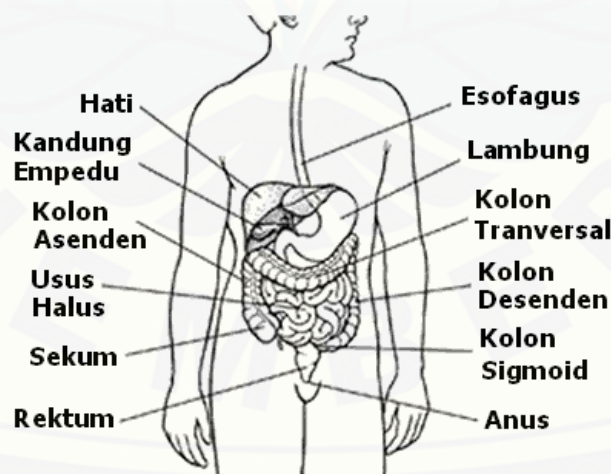
2.2.1 Definisi

Kanker kolon adalah suatu pertumbuhan tumor yang bersifat ganas dan merusak sel DNA dan jaringan sehat di sekitar kolon (usus besar) dan rektum serta muncul dari jaringan epitel kolon (Cappel, 2004).

2.2.2 Patofisiologi

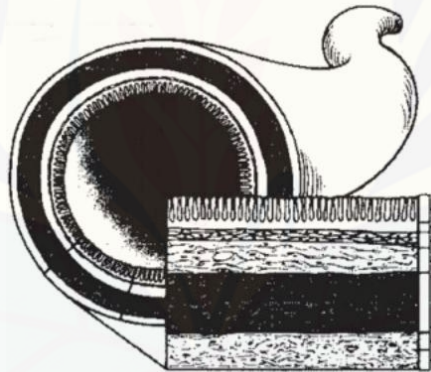
Tubuh terdiri dari triliunan sel hidup. Sel tubuh normal tumbuh, membagi sel menjadi sel-sel baru, dan mati dengan cara yang teratur. Pada usia muda, sel-sel normal membelah lebih cepat untuk membantu proses perkembangan tubuh sedangkan pada usia dewasa, kebanyakan sel membelah hanya untuk menggantikan sel yang rusak, mati atau untuk memperbaiki saat cedera. Kanker dimulai ketika pembelahan sel-sel di bagian tubuh tertentu di luar kendali sehingga terjadi abnormalitas sel (ACS, 2015).

Kanker kolon merupakan kanker yang terjadi di bagian kolon. Kolon adalah bagian sistem pencernaan atau yang disebut juga sistem gastrointestinal (GI) (Gambar 2.2). Kolon terdiri dari 4 bagian utama yaitu *ascending colon* (kolon asenden) yaitu dimulai dari kantong kecil (sekum) di mana usus kecil menempel pada usus besar dan memanjang ke atas di sisi kanan perut. Sekum juga bagian dimana usus buntu menempel pada usus besar. Bagian kedua dari kolon disebut *transverse colon* (kolon transversal). Melintang dari sisi kanan sampai ke sisi kiri perut di bagian atas. Bagian ketiga adalah *descending colon* (kolon desenden) yaitu bagian kolon yang menurun di sisi kiri perut, bagian terakhir dari kolon adalah kolon sigmoid yaitu kolon yang berbentuk sigmoid (ACS, 2015).



Gambar 2.2 Anatomi saluran pencernaan manusia
(Sumber: <http://www.cancer.org>)

Dinding kolon terdiri dari beberapa lapisan (Gambar 2.3). Kanker kolon dimulai dari lapisan yang paling dalam dan dapat berkembang ke semua lapisan. Kebanyakan kanker kolon berkembang perlahan-lahan selama beberapa tahun. Sebelum kanker berkembang, pertumbuhan jaringan atau tumor biasanya dimulai sebagai polip non kanker pada lapisan dalam kolon. Jaringan tumor abnormal dapat bersifat jinak (bukan kanker) atau bersifat ganas (kanker). Tumor yang jinak adalah tumor bukan kanker. Beberapa polip dapat berubah menjadi kanker tetapi tidak semuanya. Hal tersebut tergantung dari jenis polipnya yaitu: polip adenoma yaitu polip yang dapat berubah menjadi kanker atau disebut juga kondisi prekanker. Jenis polip yang lain adalah polip hiperplastik dan polip inflamasi, umumnya bukan prekanker (Cappel, 2004).



Gambar 2.3 Lapisan dinding kolon (Sumber: www.cancer.org)

Hampir semua kanker kolon berasal dari jenis adenokarsinoma. Peningkatan resiko kanker kolon meningkat seiring dengan peningkatan jumlah polip adenoma. Jenis kanker kolon lainnya yang dimulai dari tumor tetapi jarang terjadi antara lain: tumor karsinoid, limfoma, dan sarkoma (ACS, 2015).

Karakteristik pada kanker kolon adalah terjadinya peningkatan ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2), yaitu enzim yang berperan dalam metabolisme arakhidonat. Enzim COX-2 dapat terinduksi dengan cepat apabila terjadi reaksi

inflamasi pada sel dan pada tumor oleh sitokin dan tumor promoter. Ekspresi COX-2 akan menginduksi pembentukan prostaglandin (PGE_2) dari asam arakhidonat. Ekspresi COX-2 dan prostaglandin berhubungan dengan regulasi proliferasi sel, diferensiasi, dan tumorigenesis (Turini and Dubois, 2002). COX-2 lebih berperan dalam proses promosi tumor dibandingkan pada inisiasi tumor. Peningkatan ekspresi COX-2 diketahui dapat meningkatkan ekspresi dan aktivasi protein antiapoptosis serta inaktivasi tumor supresor faktor dan protein proapoptosis. Dengan demikian, penghambatan pada ekspresi dan aktivitas COX-2 dapat menjadi target kemoprevensi pada kanker kolon (Markowitz, 2007).

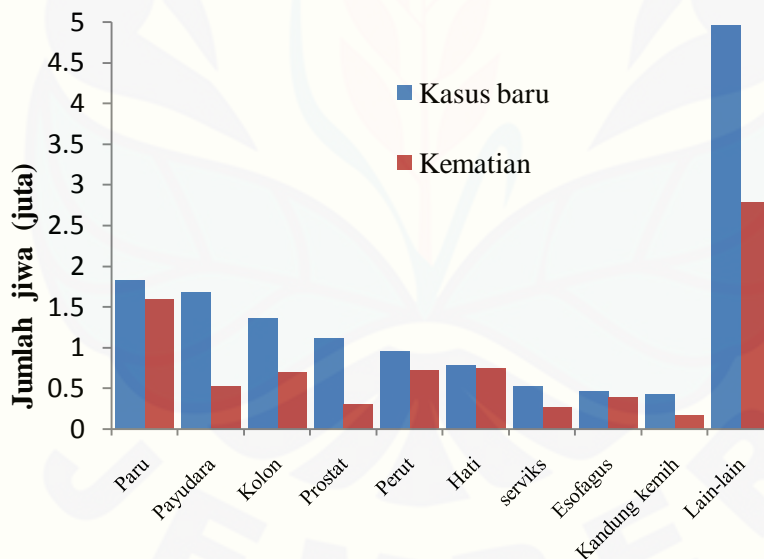
Aktivitas COX-2 diketahui berperan dalam promosi tumor dan proses karsinogenesis. Ekspresi berlebih COX-2 pada sel kanker diketahui berkaitan dengan aktivasi NF- κ B. Aktivasi NF- κ B sangat berkontribusi dalam proses inflamasi pada *gut mucosa* (Wang *et al.*, 2009). Jalur utama aktivasi NF- κ B yaitu melalui fosforilasi I κ B, suatu inhibitor protein yang terikat dengan NF- κ B, oleh IKK (I κ B kinase). Aktivasi NF- κ B berkaitan erat dengan terjadinya kemoresisten pada sel kanker. Penghambatan NF- κ B terbukti dapat menekan tumorigenesis dan metastasis serta menurunkan ekspresi VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) pada beberapa sel kanker. Oleh karena itu, penghambatan aktivasi NF- κ B pada karsinogenesis melalui penghambatan aktivitas IKK atau COX-2 dapat menjadi salah satu target spesifik pada kemoprevensi kanker (Huang, 2001).

2.2.3 Gejala Klinis

Beberapa gejala yang mungkin timbul pada penderita kanker kolon antara lain: perubahan kebiasaan buang air besar, seperti diare, sembelit, atau penyempitan tinja yang berlangsung beberapa lama; pendarahan pada rektal; adanya bercak darah pada tinja; nyeri perut; kelelahan; dan terjadi penurunan berat badan. Gejala lain yang jarang timbul/tidak umum terjadi pada penderita kanker kolon adalah mual, muntah, anoreksia, dan distensi abdomen (Cappel, 2004).

2.2.4 Prevalensi Kanker dan Kanker Kolon

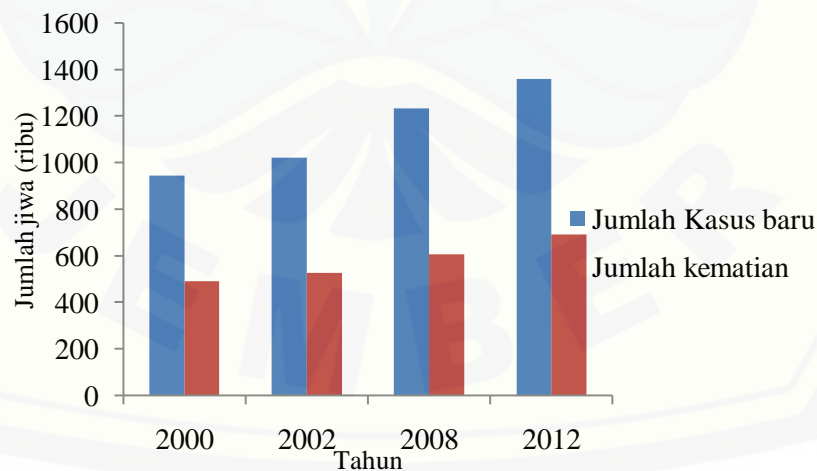
Total jumlah kasus kanker pada tahun 2012 adalah 14,1 juta yang terdiri dari kanker paru, kanker payudara, kanker kolon, kanker prostat, kanker hati, dan jenis kanker lainnya dengan jumlah kematian total akibat kanker sebesar 8,2 juta (Gambar 2.4). Angka tersebut mengalami kenaikan dari tahun 2008 yaitu 12,7 juta kasus kanker dengan jumlah kematian sebesar 7,6 juta. Jenis kasus kanker yang paling banyak adalah kanker paru sebanyak 1,825 juta kasus dengan jumlah kematian sebesar 1,590 juta jiwa. Kemudian disusul oleh kanker payudara yaitu sebesar 1,677 juta kasus baru dengan jumlah kematian sebesar 0,522 juta jiwa. Sedangkan kanker kolon menempati urutan ketiga yaitu sebesar 1,361 juta kasus baru dengan jumlah kematian sebesar 0,694 juta jiwa. Diperkirakan jumlah kasus baru dan kematian akibat kanker akan terus meningkat, pada tahun 2030 diperkirakan akan terjadi 23,6 juta kasus kanker baru setiap tahunnya (IARC, 2013).



Gambar 2.4 Jumlah kasus baru dan kematian akibat kanker (sumber: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)

Prevalensi kanker kolon sendiri mengalami peningkatan setiap tahunnya (Gambar 2.5). Pada tahun 2000, jumlah kasus baru kanker kolon sebesar 0,9448 juta kasus yang terdiri dari 0,4988 juta kasus pada pria dan 0,446 juta kasus pada wanita. Sedangkan angka kematian akibat kanker kolon sebanyak 0,4924 juta jiwa yang terdiri dari 0,2548 juta jiwa pria dan 0,2376 juta jiwa wanita. Jumlah penderita kanker kolon yang masih hidup 5 tahun sebelumnya sebanyak 2,379 juta jiwa (Globocan, 2001). Pada tahun 2002, jumlah kasus baru kanker kolon meningkat yaitu sebesar 1,023 juta kasus yang terdiri dari 0,550 juta kasus pada pria dan 0,473 kasus pada wanita. Angka kematian akibat kanker kolon sebesar 0,529 juta jiwa yang terdiri dari 0,278 juta jiwa pria dan 0,251 juta jiwa wanita (Globocan, 2005).

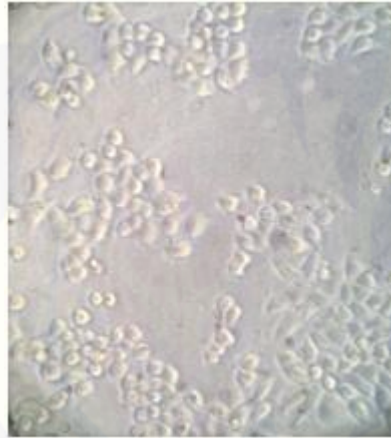
Selanjutnya di tahun 2008, kembali terjadi peningkatan kasus yaitu terdapat 1,233 juta kasus baru kanker kolon yang terdiri dari 0,663 juta kasus pada pria dan 0,57 juta kasus pada wanita. Angka kematian akibat kanker kolon sebanyak 0,608 juta jiwa, terdiri dari 0,32 juta jiwa pria dan 0,288 juta jiwa wanita (Globocan, 2010). Pada tahun 2012, jumlah kasus baru kanker kolon mencapai 1,36 juta kasus yang terdiri dari 0,746 kasus pada pria dan 0,614 juta kasus pada wanita. Angka kematiannya mencapai 0,694 juta jiwa yang terdiri dari 0,374 juta jiwa pria dan 0,320 juta jiwa wanita (IARC, 2013).



Gambar 2.5 Jumlah kasus baru dan kematian akibat kanker kolon (Sumber: Globocan)

2.2.5 Tinjauan Sel WiDr

Sel WiDr (Gambar 2.7) merupakan sel kanker kolon manusia yang diisolasi dari kolon seorang wanita berusia 78 tahun. Sel WiDr merupakan turunan sel kanker kolon yang lain yakni sel HT-29 (Chen *et al.*, 1987). Sel WiDr memproduksi antigen karsinoembrionik dan memerlukan rentang waktu sekitar 15 jam untuk dapat menyelesaikan 1 daur sel. Salah satu karakteristik dari sel WiDr ini adalah ekspresi siklooksigenase-2 (COX-2) yang tinggi yang memacu proliferasi sel WiDr (Palozza *et al.*, 2005).



Gambar 2.6 Sel WiDr (perbesaran 700x di bawah mikroskop *inverted*)

WiDr merupakan salah satu sel yang memiliki sensitivitas yang rendah terhadap perlakuan dengan 5-fluorouracil (5-FU), agen kemoterapi golongan antimetabolit. Transfeksi WiDr dengan p53 normal pun tidak menyebabkan peningkatan sensitivitasnya terhadap 5-FU (Giovannetti *et al.*, 2007). Resistensi sel WiDr terhadap 5-FU salah satunya diperantarai dengan terjadinya peningkatan ekspresi enzim timidilat sintetase yang merupakan target penghambatan utama dari 5-FU (Sigmond *et al.*, 2003). P-glikoprotein (Pgp) pada sel WiDr tidak diekspresikan tinggi sehingga kemungkinan terdapat mekanisme lain yang memperantarai resistensi WiDr terhadap 5-FU. Secara keseluruhan, sel WiDr merupakan sel yang sesuai untuk digunakan sebagai model dalam skrining suatu senyawa baru sebagai agen kokemoterapi dengan 5-FU (Jansen, 1997).

2.3 Tinjauan Kemoprevensi

Kemoprevensi kanker adalah penggunaan senyawa alam, sintesis atau agen biologis kimia untuk membalikkan, menekan atau mencegah progresi karsinogenesis sejak tahap promosi sampai tahap invasi (Tsao *et al.*, 2004). Penelitian dan pengembangan senyawa kemopreventif terus dilakukan, beberapa senyawa yang diduga memiliki aktivitas kemopreventif antara lain aspirin, suplemen folat dan kalsium, dan terapi pengganti hormon pasca menopause (Janne *et al.*, 2000).

Aspirin dan obat-obat anti inflamasi nonsteroid merupakan agen kemoprevensi yang paling banyak diteliti. Mekanisme dari obat tersebut adalah menghambat enzim COX-1 dan COX-2 yang merupakan promotor dari terjadinya kanker kolon (Janne, 2000). Senyawa alam yang juga diketahui memiliki aktivitas kemoprevensi terhadap kanker kolon adalah senyawa kurkumin. Penelitian yang dilakukan oleh Yulianti (2013), diketahui bahwa pemberian kurkumin, GVT-0, PGV-0, dan HGV-0 selama 15 minggu efektif menurunkan jumlah dan volume nodul kanker kolorektal melalui mekanisme penghambatan ekspresi COX-2. Aktivitas kemoprevensi kurkumin dan analognya diduga melalui penghambatan faktor transkripsi NF- κ B (Yulianti, 2013).

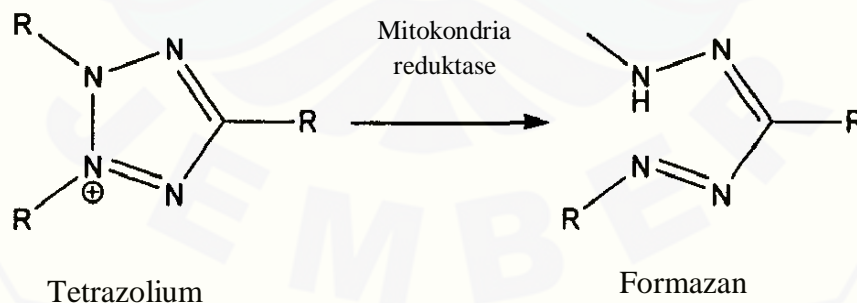
Beberapa mekanisme yang menjadi strategi kemoprevensi antara lain: *blocking agent* yaitu dengan mencegah terbentuknya proses karsinogenesis dan agen pencetus tumor. *Blocking agent* meliputi aktivitas anti oksidan, induksi perbaikan DNA, blokade senyawa karsinogen, sedangkan agen penekan tumor meliputi alterasi pada ekspresi gen, penghambatan proliferasi sel, induksi apoptosis, serta modulasi sinyal transduksi (Steward *and* Brown, 2013).

2.4 Tinjauan Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT

Dasar dari uji sitotoksik adalah kemampuan sel untuk bertahan hidup karena adanya senyawa toksik. Kemampuan sel untuk bertahan hidup dapat diartikan sebagai tidak hilangnya metabolik atau proliferasi dan dapat diukur dari bertambahnya jumlah sel, naiknya jumlah protein, atau DNA yang disintesis. Salah satu metode yang umum digunakan untuk menetapkan jumlah sel adalah metode

MTT. Uji MTT adalah uji yang sensitif, kuantitatif, dan terpercaya. Reaksi MTT merupakan reaksi reduksi selular yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium MTT berwarna kuning menjadi kristal formazan yang berwarna biru keunguan. Metode perubahan warna tersebut digunakan untuk mendeteksi adanya proliferasi sel. Sel yang mengalami proliferasi, mitokondria sel akan menyerap reagen MTT sehingga akan terbentuk kristal tetrazolium (kristal formazan) yang berwarna ungu (ATCC, 2010).

Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase (Gambar 2.9). Enzim mitokondria reduktase pada sel bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan berwarna ungu. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup, sehingga semakin banyak sel yang hidup maka intensitas warna ungu semakin besar, dan sebaliknya semakin sedikit jumlah sel yang hidup, intensitas warna ungu semakin memudar. Kristal formazan yang terbentuk bersifat impermeabel pada membran sel dan tidak larut dalam air. Penambahan reagen stopper (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal formazan sehingga dapat diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 490 sampai 570 nm. Nilai absorbansi menunjukkan tingkat daya proliferasi sel sebagai manifestasi tingkat kekebalan sel (Liu *et al.*, 1997).



Gambar 2.7. Mekanisme uji MTT
(Sumber: Doyle and Griffiths, 2000)

Hasil yang diperoleh dari uji sitotoksik berupa nilai IC_{50} yang menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan penghambatan proliferasi sel 50% serta menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Dimana semakin besar nilai IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik karena membutuhkan konsentrasi yang besar untuk dapat menghambat pertumbuhan sel, begitu pula sebaliknya semakin kecil nilai IC_{50} maka potensi ketoksikannya terhadap sel semakin besar karena konsentrasi yang dibutuhkan kecil. Uji sitotoksik dapat memberikan informasi mengenai konsentrasi obat/senyawa yang masih memungkinkan sel untuk dapat bertahan hidup (Doyle and Griffiths, 2000).

2.6 Tinjauan Uji Apoptosis dengan Metode *Double Staining*

Apoptosis adalah kematian sel terprogram yang menghasilkan perubahan karakteristik morfologi dan biokimia sel. Stimulasi proses apoptosis meliputi kerusakan DNA, adanya TNF (*Tumor Necrosis Factor*) atau tidak adanya faktor pertumbuhan. Apoptosis ditandai dengan adanya membran *blebbing* tanpa hilangnya integritas membran, kondensasi dan fragmentasi kromatin, pepadatan organel sitoplasma, dilatasi dari retikulum endoplasma, penurunan volume sel dan pembentukan badan apoptosis (Carson, 1993).

Pada proses apoptosis terjadi pengerutan sel dimana sel berukuran lebih kecil, sitoplasmanya padat, meskipun organelnya masih normal tetapi tampak padat. Kemudian terjadi kondensasi kromatin (piknotik), kromatin mengalami agregasi dipefer di bawah selaput dinding inti menjadi masa padat dalam berbagai bentuk dan ukuran. Intinya sendiri dapat pecah membentuk 2 fragmen atau lebih. Selanjutnya terjadi pembentukan tonjolan sitoplasma dan apoptosis dimana sel apoptosis mula-mula menunjukkan *blebbing*, permukaan yang luas kemudian mengalami fragmentasi menjadi sejumlah badan apoptosis yang berikatantan dengan membran yang disusun oleh sitoplasma dan organella padat atau tanpa fragmen inti. Selanjutnya akan terjadi proses fagositosis badan apoptosis oleh sel-sel sehat di sekitarnya, baik sel parenkim maupun makrofag. Badan apoptosis dapat didegradasi di dalam lisosom dan sel yang

berdekatan bermigrasi atau berproliferasi untuk menggantikan ruangan sebelumnya yang diisi oleh sel apoptosis yang hilang (Cotran, 1999).

Kematian sel juga dapat terjadi melalui nekrosis. Berbeda dengan apoptosis, pada nekrosis terjadi kematian sel yang tidak terkontrol yang dapat disebabkan oleh jejas maupun infeksi. Sel yang mati secara nekrosis akan membesar, kemudian hancur dan lisis pada satu daerah yang merupakan respon terhadap inflamasi (Goepel, 1996). Perbedaan antara apoptosis dan nekrosis dapat dilihat pada Tabel 2.1 yang dilihat dengan menggunakan mikroskop elektron.

Tabel 2.1 Perbedaan antara apoptosis dan nekrosis

Gambaran	Apoptosis	Nekrosis
Penyebab	Fisiologi dan patologi	Patologi
Keterlibatan	Satu sel	Sekelompok sel
Proses biokimia	Energi oleh DNA	Homeostatis
Keutuhan sel membran	Diperbaiki	Lisis
Morfologi	Sel mengkerut dan pecah	Hilang
Proses Peradangan	Tidak ada	Sering
Proses kematian sel	Diserap atau pagositosis sel tetangganya	Diserap oleh netropil dan makrofag

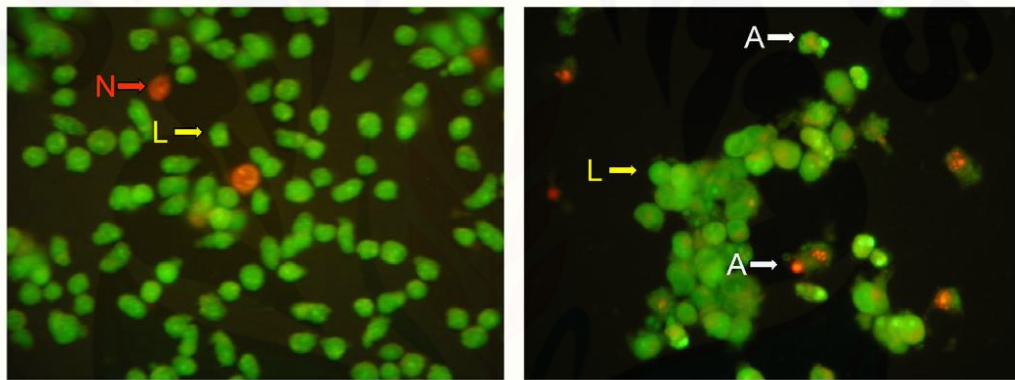
(Sumber : Goepel, 1996)

Proses apoptosis berlawanan dengan nekrosis karena apoptosis tidak menimbulkan inflamasi sehingga lebih sulit untuk dideteksi secara histologis (Cotran, 1999). Apoptosis memiliki peranan penting dalam pengaturan homeostatis normal, proses ini menghasilkan keseimbangan jumlah sel melalui eliminasi sel yang rusak dan proliferasi fisiologis sehingga memelihara agar fungsi jaringan tetap normal (Carson, 1993). Oleh karena itu kematian sel secara apoptosis lebih diharapkan dari pada secara nekrosis.

Apoptosis sel dapat dideteksi dengan pengecatan akridin oranye – etidium bromida. Metode ini berdasarkan pada perbedaan fluoresensi DNA pada sel yang hidup dan mati karena pengikatan akridin oranye – etidium bromida. Akridin oranye akan menembus seluruh bagian sel dan nukleus akan tampak berwarna hijau. Sedangkan etidium bromid hanya dapat berinterkalasi dengan sel yang membrannya

sudah rusak dan nukleus akan berwarna merah. Warna yang ditimbulkan oleh etidium bromida pada sel mati lebih dominan jika dibandingkan dengan akridin oranye sehingga nukleus pada sel mati akan berwarna oranye. Sel hidup dengan membran yang masih utuh memiliki nukleus dengan warna hijau yang seragam. Selama sel mengalami proses apoptosis dan membran *blebbing* mulai terjadi, etidium bromida dapat masuk ke dalam sel dan memberikan warna oranye (Anggriati, 2008).

Sel yang berfluoresen hijau menunjukkan sel yang hidup, sedangkan sel yang berfluoresen merah menunjukkan sel yang mati. Sel utuh berfluoresen merah menunjukkan sel nekrosis sedangkan sel yang terfragmentasi menunjukkan sel yang mengalami apoptosis (Gambar 2.8).



Gambar 2.8 Sel hidup (L), sel yang mengalami apoptosis (A), sel nekrosis (N),
(Sumber: Ribble *et al.*, 2005).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini berupa penelitian eksperimental laboratoris (*true experimental laboratories*) yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksitas ekstrak etanol *A. flava* terhadap sel kanker kolon WiDr.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan September 2014 bertempat di Laboratorium Fitokimia Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk pembuatan ekstrak etanol *A. flava*, dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajahmada Yogyakarta untuk uji sitotoksitas *in vitro* dan uji apoptosis.

3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Rancangan Operasional

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap sebagai berikut:

- a. Pembuatan simplisia daun *A. flava*.
- b. Ekstraksi daun *A. flava*.
- c. Uji sitotoksitas
- d. Uji apoptosis

3.3.2 Definisi Operasional

- a. Simplisia daun *A. flava* dibuat dengan cara mengeringkan daun *A. flava*. Daun yang digunakan adalah daun tua, empat helai dari ujung tangkai daun, dari tanaman yang telah berbunga penuh. Diperoleh dari koleksi Taman Nasional Meru Betiri, Jember.
- b. Tahap awal ekstraksi adalah *defatting* atau penghilangan lemak dengan menggunakan pelarut n-heksana. Proses ekstraksi dilakukan secara bertingkat

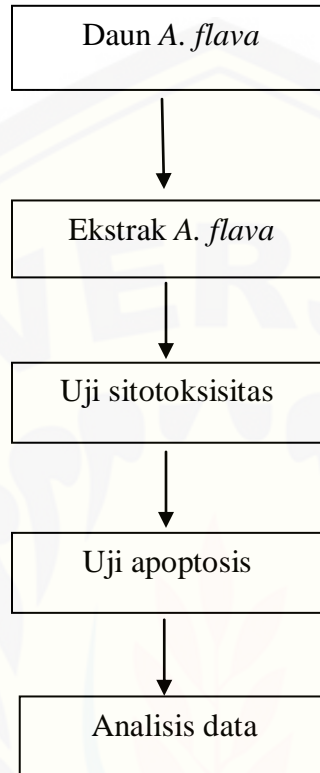
yaitu menggunakan pelarut kloroform, dilanjutkan dengan etanol 70% secara maserasi.

- c. Uji sitotoksitas dilakukan dengan menggunakan metode MTT terhadap sel kanker kolon WiDr.
- d. Uji apoptosis dilakukan dengan menggunakan metode *double staining*.

3.3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian uji sitotoksitas ekstrak etanol *A. flava* terhadap sel kanker kolon WiDr dilakukan *in vitro*. Tahap awal adalah melakukan ekstraksi *A. flava* secara bertingkat masing masing 3 kali ulangan dengan menggunakan metode maserasi. Ekstraksi pertama dilakukan dengan menggunakan pelarut n-heksana, untuk penghilangan lemak, kemudian dilanjutkan dengan menggunakan kloroform. Ampasnya diekstraksi kembali dengan menggunakan etanol 70% hingga diperoleh ekstrak kental. Tahapan selanjutnya adalah melakukan uji sitotoksitas ekstrak etanol dengan menggunakan 5 macam konsentrasi uji yang berbeda terhadap sel kanker kolon WiDr dengan menggunakan metode MTT hingga diperoleh nilai IC_{50} . Tahap akhir dari penelitian ini adalah melakukan uji apoptosis sel berdasarkan nilai IC_{50} yang sudah diperoleh dengan menggunakan metode *double staining*.

3.3.2 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Diagram alur penelitian uji Sitotoksitas dan uji apoptosis ekstrak etanol *A. flava* terhadap sel kanker kolon WiDr.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Pembuatan ekstrak etanol membutuhkan seperangkat alat gelas, *rotary evaporator* (Heidolph), dan oven. Penelitian uji sitotoksitas *in vitro* membutuhkan *inverted microscope*, inkubator CO₂ (Heraceus), sentrifus, *autoclave* (ALP), *haemocytometer*, *cell counter*, mikrotube, mikropipet, *96 well plate* (Nunc), dan *ELISA reader* (SLT 240 ATC). Uji apoptosis membutuhkan *cover slip* (Nunc), pinset, *24 well plate* dan mikroskop fluoresen (Zeiss MC 80).

3.4.2 Bahan

- a. Bahan utama adalah daun *A. flava*
- b. Bahan ekstraksi daun *A. flava* adalah n-heksana, kloroform dan etanol (bahan yang digunakan untuk ekstraksi adalah derajat teknis).
- c. Bahan uji *in vitro*
 1. Kultur sel *WiDr* ditumbuhkan dalam media kultur RPMI (Gibco). Media kultur mengandung fetal bovine serum (FBS) 10% (v/v) (Gibco) dan antibiotika penisilin-streptomisin 1 % (v/v). Semua sel ditumbuhkan pada suhu 37°C dan 5 % CO₂. Sel dipanen dari *tissue culture dish* menggunakan tripsin-EDTA 0,25% (Gibco) untuk membantu melepaskan sel.
 2. Bahan uji sitotoksitas menggunakan *MTT assay* membutuhkan pereaksi MTT (Sigma) dan pereaksi *stopper* (Sigma) yang mengandung natrium dodesil sulfat (SDS) 10% dalam 0,1 N HCl.
 3. Bahan uji apoptosis meliputi akridin oranye, etidium bromida (jika tidak dinyatakan lain, bahan yang digunakan untuk uji *in vitro* adalah derajat pro analisis atau *molecular grade*).

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol *A. flava*.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah nilai viabilitas sel *WiDr*, dan hasil uji apoptosis.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah perlakuan sel.

3.6 Prosedur Kerja

3.6.1 Pembuatan ekstrak etanol *A. flava*

Daun *A. flava* disortir dan dijemur dengan diangin-anginkan hingga kering, kemudian diserbuk dan diayak. Sebanyak 100 g serbuk daun kering diekstraksi dengan n-heksana sebanyak 3 kali ulangan dengan perbandingan serbuk : pelarut (1:3). Ampas dari ekstraksi menggunakan n-heksana diekstraksi kembali menggunakan kloroform sebanyak 3 kali ulangan dengan perbandingan serbuk : pelarut (1:3). Ampas dari hasil ekstraksi kloroform diekstraksi kembali menggunakan etanol 70% dengan perbandingan serbuk : pelarut (1:3). Ekstrak etanol kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Ekstrak etanol *A. flava* selanjutnya dibuat sediaan suspensi dalam DMSO 1 % untuk uji *in vitro*.

3.6.2. Pembuatan Media Kultur

a. Pembuatan Media Cair

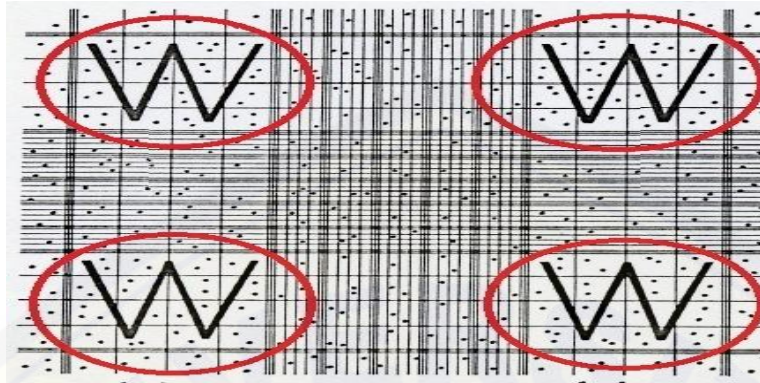
Sebanyak 950 ml akuabides steril dimasukkan ke dalam gelas beker di dalam LAF. Media RPMI dimasukkan kedalam gelas beker yang berisi akuabides steril kemudian diaduk rata. Selanjutnya ditambahkan 2,2 g NaHCO₃ untuk setiap liter media yang dibuat kemudian diaduk rata. Selanjutnya ditambahkan dengan akuabides steril sampai volume 1000 ml. Campuran diaduk dengan menggunakan magnetik stirer hingga semua komponen menjadi larut. Tahap selanjutnya dilakukan penyesuaian pH (seharga 0,2 – 0,3 di bawah pH yang diinginkan yaitu 7,4 – 7,6) dengan penambahan NaOH 1 N atau HCl 1 N. Setelah diperoleh larutan sesuai dengan pH yang diinginkan, larutan difiltrasi dengan menggunakan filter ukuran 0,2 mikron dan filtrat ditampung ke dalam botol duran 1000 ml. Botol diberi penandaan dan disimpan pada suhu 4°C (CCRC, 2012).

b. Pembuatan Media Kultur Lengkap

FBS (*Fetal Bovine Serum*) dan penisilin - streptomisin dicairkan terlebih dahulu pada suhu kamar sebelum digunakan. Sebanyak 10 ml FBS dan 1 ml penisilin – streptomisin dituangkan ke dalam botol duran 100 ml. Selanjutnya ditambahkan dengan media cair yang sudah dibuat sebelumnya sampai volume 100 ml. Sebelum disimpan, botol diberi penandaan berupa nama media dan tanggal pembuatan media kultur lengkap RPMI (CCRC, 2012).

3.6.3 Preparasi Kultur Sel

Sel WiDr diambil dari tangki nitrogen cair, kemudian segera dicairkan. Ampul disemprot dengan etanol 70% dan dimasukkan ke dalam LAF. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam *conical tube* steril baru yang berisi media kultur. Suspensi sel disentrifugasi dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit, supernatan yang dihasilkan kemudian dibuang. Media kultur yang baru ditambahkan pada endapan sel dan disuspensikan perlahan hingga homogen. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam *tissue culture dish* dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C. Dua puluh empat jam kemudian dilakukan penggantian media kultur, selanjutnya sel ditumbuhkan hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian. Setelah sel konfluen, media dibuang dan sel dicuci dengan PBS dua kali. Sel ditambah tripsin 0,25% untuk melepas sel dari *tissue culture dish* dan dilakukan inkubasi selama 3 menit dalam inkubator CO₂ 5%. Media ditambahkan ke dalam *tissue culture dish* dan sel diresuspensi hingga terlepas semua dari dinding *tissue culture dish*. Suspensi sel kemudian dipindahkan ke dalam *conical tube* steril baru. Sel dihitung dengan *haemocytometer* (Gambar 3.2) dan *cell counter* lalu dibuat suspensi sel dengan konsentrasi sel sesuai dengan kebutuhan.



Gambar 3.2 Perhitungan sel yang dibutuhkan dengan menggunakan *haemocytometer* (Sumber: CCRC)

Terdapat 4 kamar hitung yang ditandai oleh huruf W, setiap kamar hitung terdiri dari 16 kotak. Sel yang gelap (mati) dan sel yang berada di batas luar sebelah atas dan sebelah kanan tidak ikut dihitung. Sel di batas kiri dan batas bawah ikut dihitung (Persamaan 1).

$$\text{Jumlah sel yang terhitung} = \sum \frac{W1 + W2 + W3 + W4}{4} \dots\dots\dots (1)$$

Kemudian dihitung volume sel yang ditransfer dari hasil perhitungan jumlah sel dengan menggunakan Persamaan 2.

$$\text{Volume sel yang ditransfer} = \frac{(1 \times 10^4 \text{ sel}) \times \text{jumlah sumuran}}{\text{jumlah sel terhitung} \times 10^4} \dots\dots\dots (2)$$

Selanjutnya ditambahkan dengan media kultur sampai tanda 10 ml (CCRC, 2012).

3.6.4 Preparasi sampel

Ditimbang 10 mg sampel dengan seksama menggunakan neraca analitik di dalam microtube, kemudian dilarutkan menggunakan DMSO 0,1 ml dengan bantuan vortex hingga diperoleh konsentrasi induk 100.000 ppm. Setelah diperoleh konsentrasi induk, selanjutnya dibuat seri konsentrasi sampel dengan pengenceran konsentrasi induk sampai diperoleh seri konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, dan 500 ppm.

3.6.5 Uji Sitotoksitas Menggunakan *MTT assay*

Sel (1×10^4 sel/sumuran) ditumbuhkan ke dalam 96 *well plate*. Sel diisikan ke dalam sumuran masing-masing 100 μ l. 15 sumuran berisi sel untuk perlakuan dengan ekstrak, 3 sumuran hanya berisi sel sebagai kontrol sel (tidak diberi perlakuan), dan 3 sumuran hanya berisi media sebagai kontrol media (tidak diisi sel). Keadaan sel diamati terlebih dahulu di bawah mikroskop untuk melihat distribusi sel, kemudian didokumentasikan. Selanjutnya sel diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi sampel yang dibutuhkan. *Plate* yang berisi sel diambil dari inkubator kemudian media sel dibuang dengan membalikkan *plate* 180 derajat di atas tempat buangan, kemudian secara perlahan *plate* ditekan di atas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan. Sebanyak 100 μ l PBS dimasukkan ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian PBS dibuang dengan cara membalikkan *plate* kembali dan sisa cairan ditiriskan dengan tisu. Seri konsentrasi sampel dimasukkan ke dalam sumuran secara triplo sampai selesai kemudian kembali diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam.

Menjelang akhir waktu inkubasi, kondisi sel didokumentasikan untuk setiap perlakuan. Setelah masa inkubasi selesai, media sel dibuang kemudian dicuci dengan 100 μ l PBS dan ditambahkan reagen MTT 100 μ l ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). Selanjutnya sel diinkubasi kembali selama 2-4 jam di dalam inkubator sampai terbentuk kristal formazan. Jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan 100 μ l reagen *stopper* SDS 10% dalam 0,1 N HCl. Pemberian *stopper* ini tidak perlu dilakukan di dalam LAF. Setelah itu, *plate* dibungkus dengan kertas atau aluminium foil dan diinkubasi di tempat gelap (suhu ruangan) selama 24 jam (tidak diletakkan di inkubator). Setelah selesai, pembungkus *plate* dibuka dan dimasukkan ke dalam ELISA *reader* untuk membaca absorbansi masing-masing sumuran dengan $\lambda=595$ nm (CCRC, 2012).

3.6.6 Uji Apoptosis Sel dengan *Double Staining Method*

Cover slip dimasukkan ke dalam sumuran (*24 well plate*) menggunakan pinset dengan hati-hati. Sebanyak 5×10^4 sel/ sumuran ditumbuhkan di atas *cover slip* dengan mentransfer suspensi sel sebanyak 500 μl . Setiap akan mengisi sumuran, sel diresuspensi kembali. Selanjutnya, keadaan sel diamati di bawah mikroskop untuk melihat distribusi sel. Selanjutnya sel diinkubasi di dalam inkubator CO_2 5% selama 24 jam. Setelah diinkubasi, sampel disiapkan 2 seri konsentrasi yaitu konsentrasi IC_{50} dan $1,5 \text{ IC}_{50}$. *24 well plate* diambil dari inkubator, semua media kultur dibuang dengan pipet pasteur secara perlahan dan masing-masing diisikan dengan PBS 500 μl . PBS kemudian dibuang dengan pipet pasteur secara perlahan dan sampel dimasukkan ke dalam sumuran. Kontrol sel yang tidak diberi perlakuan juga dimasukkan kemudian diinkubasi di dalam inkubator CO_2 5% selama 24 jam. Setelah diinkubasi, kondisi sel didokumentasikan terlebih dahulu kemudian semua media dibuang dengan pipet pasteur dan dicuci dengan PBS 500 μl . PBS dibuang kemudian *cover slip* diambil dengan pinset dengan bantuan ujung jarum secara hati-hati. *Cover slip* diletakkan di atas gelas objek yang sudah diberi label dengan posisi sel berada di atas permukaan *coverslip*. 10 μl reagen etidium bromida-akridin oranye diteteskan di atas *cover slip* dan diratakan dengan cara menggoyang secara perlahan kemudian diamati di bawah mikroskop fluoresen. Jika pewarnaan belum optimal, ditunggu beberapa menit dan diamati kembali. Kamera diset dengan setting khusus untuk fluoresen kemudian didokumentasikan. Setelah selesai, *cover slip* dibuang dan gelas objek dicuci kembali (CCRC, 2012).

3.7 Analisis Data

3.7.1 Analisis Data Uji Sitotoksitas

Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran kemudian dikonversi ke dalam persen viabilitas sel. Persentase viabilitas sel dihitung menggunakan Persamaan 3:

$$\text{Viabilitas sel (\%)} = \frac{\text{Absorbansi sel dengan perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100\% \dots (3)$$

Grafik konsentrasi senyawa uji *versus* viabilitas sel disajikan sebagai rata-rata \pm SD dari 3 eksperimen. Data yang berupa viabilitas sel kemudian dianalisis dengan program probit untuk memperoleh nilai IC₅₀.

3.7.2 Analisis Data Uji Apoptosis

Data apoptosis berupa data kualitatif yang diperoleh dari hasil pengamatan morfologi sel menggunakan mikroskop flouresen. Sel yang mengalami apoptosis akan memiliki inti sel berwarna orange dengan bentuk inti terkondensasi dan terfragmentasi. Sel yang mengalami nekrosis akan tampak memiliki inti sel berwarna oranye namun bentuk inti sel normal. Selanjutnya persen apoptosis, nekrosis, dan persen sel hidup dihitung secara manual dengan bantuan *cell counter* yang ada dalam aplikasi *Image-j*. Tujuan penggunaan *cell counter* ini adalah sebagai penanda sel yang sudah dihitung sehingga sel yang sudah dihitung tidak terhitung kembali.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

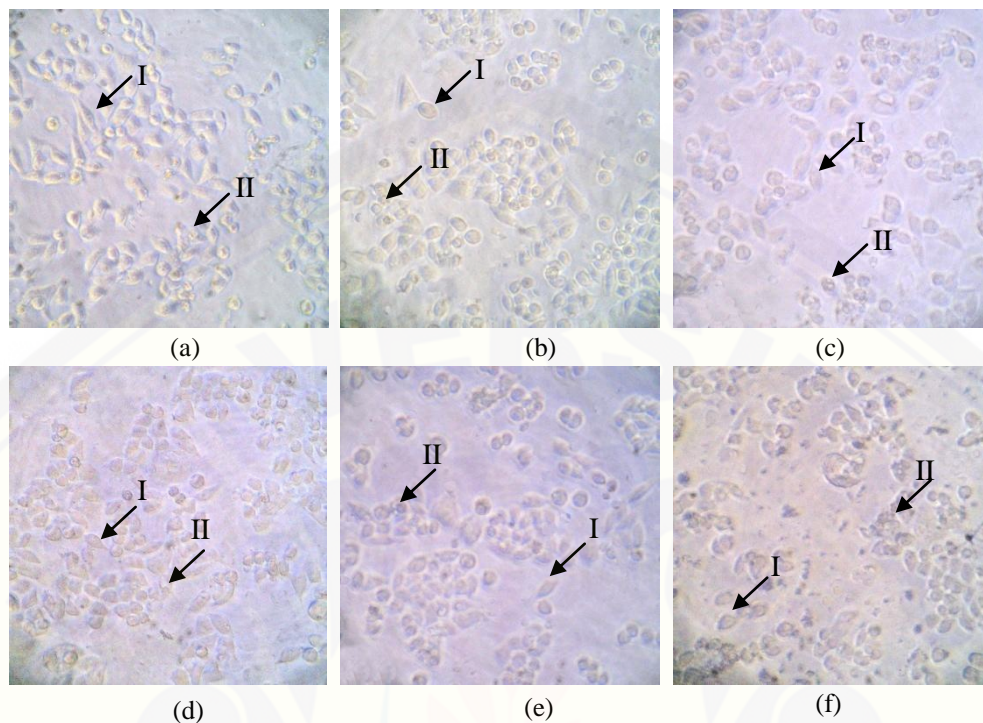
4.1 Hasil Ekstraksi Daun *A. flava*

Ekstrak kental yang diperoleh dari 100 g serbuk yang diekstraksi berturut-turut dengan pelarut n-heksana, kloroform, dan etanol adalah 3,07 g ekstrak kental. Rendemennya adalah sebesar 3,07 % b/b.

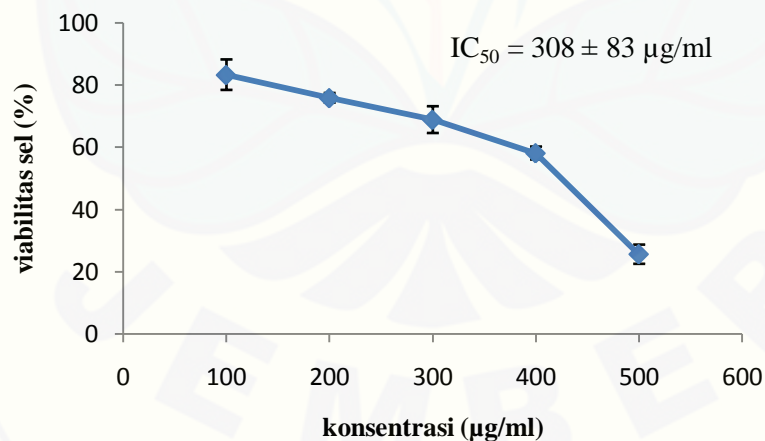
4.2 Hasil Uji Sitotoksitas

Hasil uji sitotoksitas menunjukkan bahwa perlakuan ekstrak etanol daun *A. flava* memberikan pengaruh terhadap morfologi sel WiDr. Sel yang hidup tampak berbentuk panjang dan melekat di dasar sumuran, sedangkan sel yang mati berbentuk bulat kecil dan mengapung di atas sumuran (Gambar 4.1). Pemberian ekstrak etanol daun *A. flava* terhadap sel WiDr juga memberikan hasil berupa penurunan sel hidup seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak (Gambar 4.2). Pada perlakuan ekstrak dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 µg/ml, jumlah sel yang hidup berturut-turut adalah 83,27%; 75,82%; 68,82%; 58,08%; dan 25,56 %. Hal tersebut menunjukkan fenomena *dose dependent*. Semakin tinggi konsentrasi, semakin kecil jumlah sel yang hidup. Sebaliknya, semakin rendah konsentrasi, semakin tinggi jumlah sel yang hidup.

Nilai IC_{50} dihitung dengan analisis probit berdasarkan data konsentrasi ekstrak etanol daun *A. flava* dan viabilitas sel yang diperoleh dari 3 eksperimen. Nilai IC_{50} yang diperoleh sebesar 308 ± 83 µg/ml dengan nilai CV sebesar 26,9 %. Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi yang dibutuhkan untuk dapat menghambat pertumbuhan sel kanker kolon WiDr sebesar 50% dari total populasi.



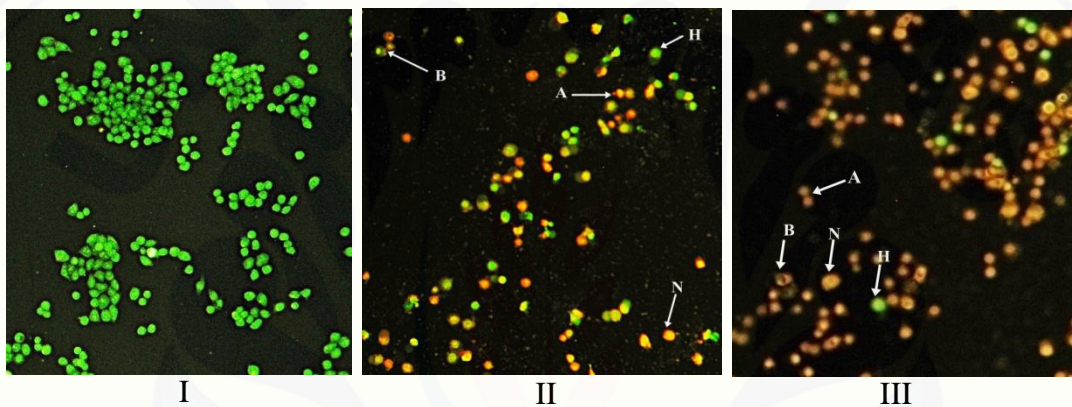
Gambar 4.1 Morfologi sel WiDr setelah inkubasi 24 jam dengan perbesaran 700x. Sel tanpa perlakuan (a), sel dengan perlakuan ekstrak etanol daun *A. flava* konsentrasi 100 µg/ml (b), 200 µg/ml (c), 300 µg/ml (d), 400 µg/ml (e), dan 500 µg/ml (f) . Sel hidup (I), dan sel mati (II)



Gambar 4.2 Kurva pengaruh konsentrasi ekstrak etanol *A. flava* terhadap % sel WiDr hidup. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, dan 500 µg/ml menggunakan metode MTT dan inkubasi 24 jam dalam inkubator CO₂ 5% suhu 37°C.

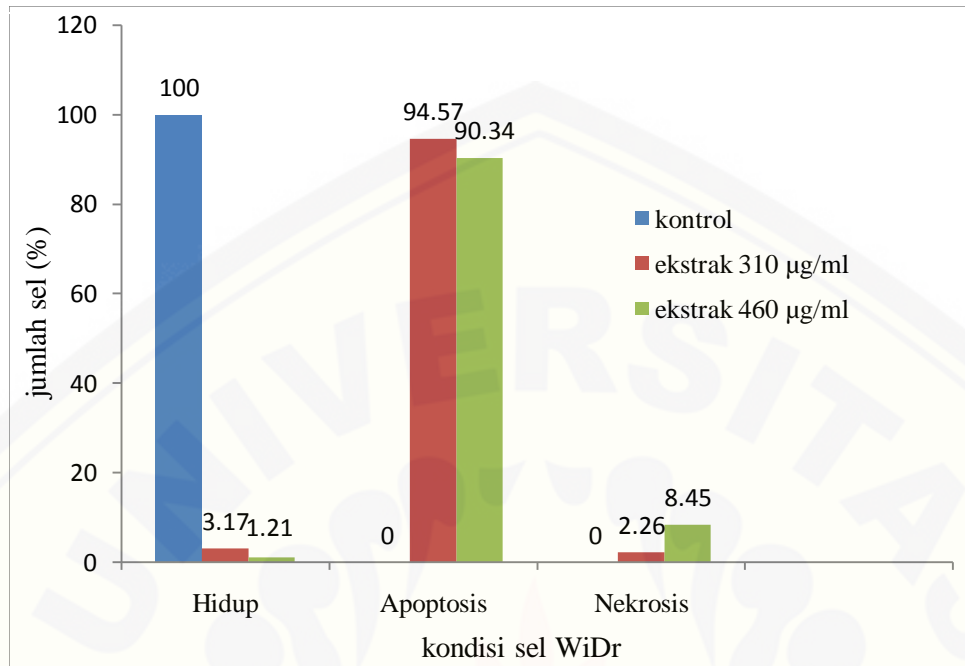
4.3 Hasil Uji Apoptosis

Uji apoptosis dilakukan dengan memberikan perlakuan ekstrak etanol daun *A. flava* menggunakan konsentrasi IC_{50} yaitu 308 $\mu\text{g/ml}$ yang dibulatkan menjadi 310 $\mu\text{g/ml}$ dan konsentrasi 1,5 x IC_{50} yaitu 460 $\mu\text{g/ml}$. Dari hasil uji apoptosis, terlihat seluruh kontrol sel yang tidak diberikan perlakuan ekstrak berfluorosensi hijau terang yang menandakan sel dalam keadaan hidup. Sel yang diberi perlakuan dengan konsentrasi 310 $\mu\text{g/ml}$ dan 460 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan hasil sebagian besar sel berfluoresensi oranye yang menandakan sel dalam keadaan mati (Gambar 4.2).



Gambar 4.3 Pengamatan apoptosis sel dengan pengecatan akridin oranye - etidium bromida dibawah mikroskop fluoresen dengan perbesaran 100x. kontrol sel yang tidak diberi perlakuan (I), sel dengan perlakuan ekstrak 310 $\mu\text{g/ml}$ (II), dan sel dengan perlakuan ekstrak 460 $\mu\text{g/ml}$ (III). Sel yang hidup berfluorosensi hijau (H), sel apoptosis (A), sel nekrosis (N), dan sel mengalami blebbing (B).

Hasil persentase kematian sel menunjukkan bahwa pada sel yang tidak diberi perlakuan ekstrak, seluruh sel adalah hidup. Pada perlakuan ekstrak dengan konsentrasi 310 $\mu\text{g/ml}$, terdapat 94,57% sel yang mengalami apoptosis, 2,26% sel mengalami nekrosis, dan 3,17% sel dalam keadaan hidup. Selanjutnya pada perlakuan ekstrak dengan konsentrasi 460 $\mu\text{g/ml}$, terdapat 90,34% sel yang mengalami apoptosis; 8,45% nekrosis; dan 1,21% sel hidup (Gambar 4.3).



Gambar 4.4 Perbandingan persentase hasil uji apoptosis terhadap sel WiDr menggunakan metode *double staining* yang diberi perlakuan ekstrak etanol daun *A. flava* dengan konsentrasi IC_{50} (310 µg/ml) dan konsentrasi 1,5 IC_{50} (460 µg/ml), serta kontrol sel yang tidak diberi perlakuan ekstrak.

4.4 Pembahasan

Uji sitotoksitas ekstrak etanol daun *A. flava* terhadap sel kanker kolon WiDr dilakukan dengan menggunakan metode MTT. Penggunaan metode uji MTT dikarenakan metode ini sensitif, kuantitatif, dan terpercaya yang digunakan untuk mengukur aktivitas metabolit kultur sel *in vitro* berdasarkan reaksi pembentukan kristal formazan yang berwarna ungu. Prinsip dari metode ini adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT oleh enzim suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat pada mitokondria sel hidup membentuk kristal formazan yang berwarna ungu dan tidak larut dalam air. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Semakin tinggi intensitas warna ungu, semakin banyak jumlah sel yang hidup dan semakin rendah intensitas warna ungu, semakin sedikit pula jumlah sel yang hidup (Mosmann, 1983).

Berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh dari uji sitotoksitas yaitu 308 ± 83 $\mu\text{g/ml}$, maka ekstrak etanol daun *A. flava* dikatakan memiliki potensi sebagai senyawa sitotoksik pada sel kanker kolon WiDr karena nilai IC_{50} yang diperoleh tidak lebih dari 500 $\mu\text{g/ml}$. Suatu ekstrak dianggap tidak memiliki efek sitotoksik jika nilai IC_{50} nya lebih dari 500 $\mu\text{g/ml}$ (Machana *et al.*, 2011). Semakin kecil nilai IC_{50} suatu senyawa, maka senyawa tersebut semakin poten karena hanya membutuhkan dosis kecil untuk dapat memberikan efek sitotoksik. Sebaliknya, semakin besar nilai IC_{50} suatu senyawa, maka semakin kecil tingkat kepotenannya karena membutuhkan dosis yang besar untuk dapat memberikan efek (Doyle and Griffiths, 2000). Nilai CV dari rata-rata 3 eskperimen ini sebesar 26,9 % yang mana nilai tersebut memenuhi rentang yang dipersyaratkan yaitu tidak lebih dari 30 % (Vanderperren *et al.*, 2004).

Selanjutnya dilakukan uji apoptosis untuk mengetahui kemungkinan mekanisme aksi dari ekstrak etanol daun *A. flava* dalam menghambat pertumbuhan sel WiDr setelah diberi perlakuan ekstrak. Pada hasil pengecatan DNA terlihat adanya fluoresensi hijau terang pada kontrol sel yang menandakan sel dalam keadaan hidup. Pada sel yang mendapat perlakuan dengan ekstrak etanol daun *A. flava* menunjukkan warna yang tidak seragam yaitu warna hijau bercampur oranye yang menunjukkan sel mengalami membran *blebbing* yang mengindikasikan terjadinya apoptosis sel. Beberapa sel mengalami kondensasi inti yang ditunjukkan dengan adanya warna kekuningan pada nukleus. Warna kuning pada nukleus juga mengindikasikan bahwa sel mengalami *early apoptosis*. Sedangkan sel yang berwarna orange merata dengan bentuk normal mengindikasikan sel mengalami nekrosis (Ribble *et al.*, 2005).

Pada perlakuan ekstrak dengan konsentrasi 310 $\mu\text{g/ml}$, jumlah sel yang mengalami apoptosis mencapai 94,57 % dan sel yang diberi perlakuan ekstrak dengan konsentrasi 460 $\mu\text{g/ml}$ mencapai 90,34 %. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol *A. flava* dapat memacu apoptosis. Pada konsentrasi perlakuan yang lebih tinggi, terjadi penurunan jumlah sel yang mengalami apoptosis dan terdapat peningkatan jumlah sel yang mengalami nekrosis. Hal tersebut dikarenakan adanya

paparan suatu senyawa dengan konsentrasi tinggi dapat menyebabkan sel mengalami stress sehingga sel mengalami kematian secara nekrosis. Di samping itu, faktor lingkungan seperti suhu penyimpanan yang tidak sesuai juga dapat menjadi faktor yang menyebabkan nekrosis sel (Meiyanto *and* Septisetyani, 2005). Berdasarkan hasil bahwa semakin tinggi konsentrasi, semakin tinggi jumlah sel yang mengalami nekrosis, maka dapat disimpulkan bahwa keamanan dari ekstrak juga dipengaruhi oleh konsentrasi atau dosis ekstrak sehingga perlu dilakukan uji toksisitas untuk mengetahui keamanan dari ekstrak etanol daun *A. flava*.

Apoptosis sel terjadi karena adanya aktivasi endoprotease yaitu caspase yang diaktifkan melalui proteolisis dari bentuk prekursor inaktifnya (zymogen). Beberapa anggota dari famili caspase yang terlibat dalam apoptosis dibagi menjadi dua golongan. Golongan pertama adalah inisiator yang menginisiasi proses kematian sel terdiri dari caspase 8, caspase 9, dan caspase 10. Golongan ke dua adalah efektor terdiri dari caspase 3, caspase 6, dan caspase 7 yang membelah berbagai substrat yang mati yang pada akhirnya menyebabkan terjadinya perubahan morfologi dan biokimia yang tampak pada sel yang mengalami apoptosis (Hongmei, 2012).

Pengaktifan endoprotease caspase dapat terjadi melalui dua jalur yaitu jalur intrinsik dan jalur ekstrinsik. Pada jalur ekstrinsik, apoptosis sel dimulai dari adanya pelepasan molekul sinyal atau ligan oleh sel lain yang bukan merupakan target apoptosis. Ligan tersebut berikatan dengan *death receptor* yang terletak pada transmembran sel target yang menginduksi apoptosis. *Death receptor* yang ada di permukaan sel adalah reseptor *tumor necrosis factor* (TNF) yang meliputi TNF-R1, CD 95 (Fas), dan *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL)-R1 dan R2. Ligan yang berikatan dengan reseptor tersebut mengakibatkan aktivasi caspase 8 yang merupakan inisiator dari apoptosis (Hongmei, 2012).

Pada jalur intrinsik, proses apoptosis melibatkan mitokondria. Stress mitokondria yang menginduksi apoptosis dapat disebabkan oleh senyawa kimia atau hilangnya faktor pertumbuhan yang menyebabkan terjadinya gangguan pada mitokondria dan terjadi pelepasan sitokrom c yang merupakan faktor pro apoptosis

dari intermembran mitokondria. Sitokrom c akan berikatan dengan protein sitoplasmatis yang disebut Apaf-1 sehingga akan mengaktifkan suatu inisiator apoptosis yaitu *caspase 9* di sitoplasma. Selanjutnya *caspase 9* akan mengaktifkan *procaspase 3* menjadi *caspase 3* yang merupakan *caspase* efektor yang melaksanakan apoptosis. Perubahan membran sel terjadi ketika *caspase 3* memecah gelsolin yaitu protein yang terlibat dalam pemeliharaan morfologi sel. Gelsolin yang terpecah akan membelah filamen aktin di dalam sel. Di samping itu, *caspase 3* juga mengaktifkan PAK2 yaitu protein yang dibutuhkan dalam membentuk badan apoptosis (Hongmei, 2012).

Tahap akhir dari apoptosis adalah pembersihan sel yang mengalami apoptosis melalui fagositosis. Sel yang mengalami perubahan pada membran yang akan mempromosikan fagositosis. Makrofag mengenali fosfatidilserin yang terdapat pada sel. Dalam kondisi normal, fosfatidilserin berada dibagian dalam membran plasma, sedangkan pada sel yang mengalami apoptosis, fosfatidilserin akan berada diluar karena terjadinya fragmen dari sel. Akibatnya, fosfatidilserin akan segera dikenali oleh makrofag dan akan terjadi proses fagositosis. Selain itu, badan apoptosis akan mengekspresikan glikoprotein adhesif yang dikenali oleh fagosit sehingga akan terjadi proses pembersihan atau fagositosis (kumar *et al.*, 2007).

Dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ariati (2015) mengenai efek sitotoksik ekstrak kloroform daun *A. flava* terhadap sel WiDr, ekstrak kloroform daun *A. flava* memiliki kemampuan sitotoksik yang lebih tinggi terhadap sel WiDr dengan nilai IC_{50} sebesar 122 $\mu\text{g/ml}$ sedangkan ekstrak etanol *A. flava* memiliki kemampuan sitotoksik dengan IC_{50} sebesar $308 \pm 83 \mu\text{g/ml}$. Namun dari uji apoptosis, menunjukkan bahwa ekstrak kloroform *A. flava* tidak lebih baik dalam memacu apoptosis sel WiDr. Perlakuan ekstrak kloroform daun *A. flava* dengan konsentrasi IC_{50} memacu apoptosis sebesar 67,9% dan pada perlakuan dengan konsentrasi 1,5 IC_{50} memacu apoptosis sebesar 82,15%, sedangkan ekstrak etanol daun *A. flava* dengan konsentrasi IC_{50} dapat memacu apoptosis sampai 94,57 % dan konsentrasi 1,5 IC_{50} memacu apoptosis sampai 90,34 %. Sehingga perlu dilakukan

pengujian dengan parameter yang lain seperti uji selektivitas maupun uji toksisitas untuk mengetahui efektivitas dan keamanan dari ekstrak etanol daun *A. flava*.

Uji apoptosis yang digunakan dalam penelitian ini belum dapat mendeteksi apoptosis pada tahap yang lengkap (kondensasi kromatin, *membrane blebbing*, maupun pembentukan *apoptotic bodies*) sehingga ada kemungkinan jumlah sel yang terdeteksi mengalami apoptosis lebih sedikit dari pada jumlah apoptosis sebenarnya. Kekurangan lain dari metode ini adalah ketidakmampuan mengenali apoptosis pada sel yang berada pada fase G2 yang mempunyai kandungan DNA rendah, maka perhitungan sel yang apoptosis menjadi kurang akurat (Eisel *et al.*, 2003). Disamping itu, dikhawatirkan terdapat sel yang menumpuk satu sama lain, sehingga ada kemungkinan sel yang tertutupi oleh sel lain dan tidak terhitung ketika dilakukan penghitungan secara manual. Hal tersebut dapat menyebabkan hasil perhitungan menjadi kurang akurat.

Efek sitotoksik dan apoptosis dari ekstrak etanol *A. flava* ini diduga disebabkan oleh senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman *A. flava* yaitu berberin. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Keawpradub *et al* (2005), Ekstrak metanol *A. flava* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 yang diduga disebabkan oleh kandungan berberin yang ada didalamnya. Mekanisme berberin dalam memacu apoptosis adalah dengan menginduksi sinyal kematian sel. Berberin juga berperan dalam penurunan Bcl-2 yang merupakan agen anti apoptosis, sehingga jika Bcl-2 ditekan, maka akan meningkatkan kemungkinan sel untuk mengalami apoptosis (Xu *et al.*, 2012).

Di samping itu, berberin diketahui mampu menekan karsinogenesis dengan mekanisme penghambatan terhadap enzim siklooksigenase-2 (COX-2) yang merupakan karakteristik atau ekspresi dari kanker kolon (Sun *et al.*, 2009). COX-2 yang terbentuk akan menyebabkan inflamasi atau peradangan yang mana pada saat inflamasi akan terbentuk *reactive oxygen species* (ROS) yang merupakan agen penekan *apoptotic induction factor* (AIF). Jika produksi AIF dihambat, maka proses apoptosis akan terhambat. Penghambatan COX-2 akan menekan terbentuknya ROS,

sehingga AIF akan tetap terbentuk dan akan memicu terjadinya apoptosis (Wang, *et al.*, 2013). Namun demikian, belum diketahui secara pasti mengenai mekanisme ekstrak etanol daun *A. flava* dalam memacu apoptosis sehingga perlu ditelusuri lebih lanjut mengenai mekanisme apoptosis tersebut.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, diduga aktivitas sitotoksik ekstrak etanol *A. flava* terhadap sel WiDr dan kemampuan dalam memacu apoptosis juga disebabkan oleh adanya senyawa berberin di dalam tanaman *A. flava*. Hasil penelitian Puspitasari *and* Ulfa (2013) menunjukkan, kadar berberin dalam ekstrak etanol *A. flava* adalah 0,14% b/b. Dikarenakan penelitian ini menggunakan ekstrak, sehingga tidak menutup kemungkinan terdapat banyak senyawa lain yang terkandung didalamnya. Senyawa yang terkandung dalam ekstrak metanol *A. flava* antara lain berberin, jatorizin, dan palmatin. Ketiga senyawa tersebut memiliki kemampuan sitotoksik terhadap sel kanker MCF-7 dengan kemampuan sitotoksik paling kuat dimiliki oleh berberin (Keawpradub *et al.*, 2005). Sehingga diduga senyawa-senyawa tersebut juga terkandung dalam ekstrak etanol daun *A. flava* dan berperan dalam efek sitotoksik dan apoptosis terhadap sel kanker kolon WiDr.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak etanol daun *A. flava* memiliki potensi sebagai agen kemoprevensi dilihat dari aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker kolon WiDr dengan nilai IC_{50} sebesar $308 \pm 83 \mu\text{g/ml}$.
2. Ekstrak etanol daun *A. flava* memiliki kemampuan dalam menginduksi apoptosis sel kanker kolon WiDr dengan mekanisme yang belum diketahui.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan peneliti antara lain:

1. Perlu dilakukan uji imunositokimia untuk mengetahui mekanisme ekstrak etanol daun *A. flava* dalam memicu apoptosis sel kanker kolon WiDr.
2. Perlu dilakukan uji selektivitas ekstrak etanol daun *A. flava* untuk mengetahui selektivitasnya terhadap sel normal.
3. Perlu dilakukan uji toksisitas ekstrak etanol daun *A. flava* untuk mengetahui tingkat keamanannya.

DAFTAR PUSTAKA

- ACS (*American Cancer Society*). 2015. *Colorectal Cancer*. <http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/detailedguide/colorectal-cancer-what-is-colorectal-cancer> [10 Januari 2015].
- Ariati, V. 2015. Uji Sitotoksisitas dan Uji Apoptosis Ekstrak Kloroform Daun Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr.) terhadap Kultur Sel Kanker Kolon WiDr In Vitro. Fakultas Farmasi Universitas Jember
- ASCO (*American Society of Clinical Oncology*). 2012. *Chemoprevention, Navigating Cancer Care/Prevention and Healthy Living*. National Cancer Institute.
- ATCC (*American Type Culture Collection*). 2011. *MTT Cell Proliferation Assay*. USA: Manassas, VA 20108.
- Carson, DA., Riberto, JM. 1993. *Apoptosis and Disease*. *The Lancet*: 341; 1251-1254.
- Chen, T.R., Drabkowski, D., Hay, R.J., Macy, M. and Peterson, W. Jr. 1987. *WiDr is a Derivative of Another Colon Adenocarcinoma Cell Line, HT-29*. *Cancer Genet Cytogenet.*, 27 (1): 125-34.
- Cotran, RS. Kumar, V., Collins, T. 1999. *Patologic Basis of Disease*. 6th ed. Tokyo-London-Sydney: WB Saunders Company.
- Doyle, A. and Griffiths, J. B. 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. John Willey and Sons, Ltd. New York.
- Eom, K.S., Hong, J.M., Youn, M.J., So, H.S., Park, R., Kim, J.M., and Kim, T.J. 2008. *Berberine Induces G1 Arrest and Apoptosis in Human Glioblastoma T98G Cells through Mitochondrial/Caspases Pathway*. *Biol Pharm Bull*, 31 (4): 558-562.
- Ferbrinasari, P., Wasita, B., and Wiyono, N. 2012. *Potensi Ekstrak Kayu Kuning (Arcangelisia flava L. Merr) sebagai Antikanker Leher Rahim*. Laporan Penelitian Hibah Bersaing BOPTN Fakultas Kedokteran UNS.
- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., and Parkin, D.M. 2001. Estimating The World Cancer Burden:: GLOBOCAN 2000. *Int. J. Cancer*: 94, 153–156.

- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., and Parkin, DM. 2005. Global Cancer Statistic. 2002: GLOBOCAN 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74–108.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D.M., 2010, Estimates of worldwide burden of cancer 2008: GLOBOCAN 2008, *Int.J. Cancer*, 127 (12): 2893-917.
- Giovannetti, E., Backus, H.H.J., Wouters, D., Ferreira, C.G., van Houten, V.M.M. and Brakenhoff, R.H. 2007, *Changes in the Status of p53 Affect Drug Sensitivity to Thymidylate Synthase (TS) Inhibitors by Altering TS Levels. British J. Can*, 96: 769-775.
- Goepel JR. 1996. *Responses to celluler injury. In : Underwood JCE. General and systematic pathology. 2nd ed.* New York: Churchill livingstone.
- Hasanah, M. 2013. Penelaahan terhadap Plasma Nutfah Khusus: Tanaman Obat. *Komisi Nasional Sumber Daya Genetik*, http://indoplasma.or.id/artikel/artikel_2005_penelaahan_pn_khusus.htm [2 November 2014].
- Hongmei, Z. 2012. *Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review*. Intech. Doi; 10.5772/50129.
- Huang, S., Pettaway, C.A., Uehara, H., Bucana, C.D., and Fidler, I.J., 2001, Blockade of NF- κ B activity in human prostate cancer cells associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis, *Oncogene*: 20: 4188-4197.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 2013. *World Cancer Factsheet, world cancer burden in 2012*. UK 93: World Health Organization.
- Janne P.A. and Mayer R.J. 2000. *Chemoprevention of Colorectal Cancer*. Boston: Massachusetts Medical Society.
- Jansen, W.J.M., Zwart, B., Hulscher, S.T.M., Giaccone, Pinedo, H.M. and Boven, E. 1997. CPT-11 in Human Colon-Cancer Cell Lines and Xenografts: Characterization of Cellular Sensitivity Determinants. *Int. J. Cancer*, 70: 335-340.
- Katiyar, S.K., Meeran, S.M., Katiyar N., and Akhtar, S. 2009. p53 Cooperates Berberine-induced Growth Inhibition and Apoptosis of Non-Small Cell Human Lung Cancer Cells in vitro and Tumor Xenograft Growth in vivo. *Mol Carcinog*, 48 (1): 24-37.

- Keawpradub, N., Dej-adisai, S., and Yuenyongsawad, S. 2005. Antioxidant and Cytotoxic Activities of Thai Medicinal Plants Named Khaminkhruea: *Arcangelisia flava*, *Cosciniu blumeinum*, and *Fibraurea tinctoria*. *Songklanakar J. Sci. Technol.* 27 (Suppl. 2): 455-467.
- Kim, J.B., Lee., K.M., Ko, E., Han, W., Lee, J.E., Baw, J.Y., Kim, S., and Noh, D.Y. 2008. Berberine Inhibits Growth of the Breast Cancer Cell Lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Planta Medica*, 74 (1): 39-42.
- Kumar, V., Abbas, K.A., Fausto, N., and Michell, R. 2007. *Robbins Basic Pathology; Cell Injury, Cell Death, and Adaptation 8th*. China: Saunders Elsevier;2007. P.19-22.
- Levrero, M., Laurenzi, V. De, Constanzo, A., Sabatini, S., Gong, J., Wang, J.Y.J. and Melino, G. 2000. The p53/p63/p73 Family of Transcription Factors: Overlapping and Distinct Functions. *Journal of Cell Science*, 113: 1661-1670.
- Li, G.H., Wang, D.L., Hu, Y.D., Pu, P, Li, D.Z., Wang, W.D., Zhu, B., Hao, P., Wang, J., Xu, X.Q., Wan, J.Q., Zhou, Y.B., and Chen, Z.T. 2010. Berberine Inhibits Acute Radiation Intestinal Syndrome in Human with Abdomen Radiotherapy. *Med Oncol.* 27 (3): 919-925.
- Liu, Y., Peterson D.A., Kimura H., and Schubert D. 1997. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. Philadelphia; *Journal of Neurochemistry.* 69: 581 —593.
- Machana, S., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S., Nonpunya, A., Sripanidkulchai, B., Thitimetharoch, T. 2011. *Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line*. *BioMed Central*; Center for Research and Development of Herbal Health Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon kaen University Thailand, 40002.
- Markowitz S.D., 2007, Aspirin and Colon Cancer - Targeting Prevention. *N. Engl. J. Med.*, 356 (21): 2195-2198.
- McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboubi, M., Shi, Y., Mogil, R. J., Nishioka, W. K., Green, D. R., 1995, *The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro*, in: Schwartz, L. M., Osborne, B. A., *Cell Death, Methods In Cell Biology*, Vol. 46, Academic Press, San Diego.

- Meiyanto, E., and Septisetyani, E.P., 2005. Efek Antiproliferasi dan Apoptosis Fraksi Fenolik Ekstrak Etanolik Daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. Terhadap Sel HeLa. *Artocarpus*, (5) 2: 74-80
- Mosmann. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival; Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol.* 65; 55-63.
- NCBI. 2013. *Arcangelisia flava*, Classification. *NCBI Taxonomy*. <http://ecatdev.gbif.org/usage/106277616> [12 Januari 2014].
- Noguchi, P., Wallace, R., Johnson, J., Early, E.M., O'Brien, S. and Ferrone, S. 1979. Characterization of the WiDr: a Human Colon Carcinoma Cell Line. *In Vitro.* 15 (6): 401-408.
- Padua, L.S. Bunyapraphatsara, N., and Lemmens, R.H.M .J. 2003. Medical and poisonous Plant I. Plant Resources of South-east Asia no 12 (1). *Phytochemistry.* 53 (5): 619-620.
- Palozza, P., Serini, S., Maggiano, N., Giuseppe, T., Navarra, P. and Ranelletti, F.O. 2005. Carotene Downregulates the Steady-State and Heregulin-a-Induced COX-2 Pathways in Colon Cancer Cells. *J.Nutr.*, 135: 129-136.
- Pandey, M.K., Sung, B., Kunnumakkara, A.B., Sethi, G., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. 2008. Berberine Modifies Cystein 179 of IkappaBalpha Kinase, Suppresses Nuclear Factor-kappaB-regulated Antiapoptotic Gene Products, and Potentiates Apoptosi. *Cancer Res.*, 68 (13): 5370-5379.
- Puspitasari, E. and Ulfa, E.U. 2013. *Pengembangan Ekstrak Etanol Arcangelisia flava Terstandar sebagai Agen Pendamping Kemoterapi Doxorubicin untuk Pengobatan Kanker*. Laporan Tahunan Penelitian Hibah Bersaing. Universitas Jember.
- Ribble, D., Goldstein, NB., Norris, DA., and Shellman, YG. 2005. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnology.* 5:12 doi:10.1186/1472-6750-5-12.
- Shirwaikar, A., Shirwaikar, K., Rajendran, I., and Punitha. 2006. In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 29 (9): 1906–1910.

- Sigmond, J., Backus, H.H., Wouters, D., Temmink, O.H., Jansen, G. and Peters, G.J. 2003. *Induction of Resistance to the Multitargeted Antifolate Pemetrexed (ALIMTA) in WiDr Human Colon Cancer Cells is Associated with Thymidilate Synthase Overexpression*. *Biochem. Pharmacol.*
- Singh, S. and Khar, A. 2006. Biological Effects of Curcumin and Its Role in Cancer Chemoprevention and Therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistr.* 6 (3): 259-270.
- Steward, WP., Brown, K. 2013. Cancer Chemoprevention: A Rapidly Evolving Field. *British Journal of Cancer.* 109, 1–7 | doi: 10.1038/bjc.2013.280
- Tsao, AS., Kim, ES and Hong, WK. 2004. Chemoprevention of Cancer. *CA Cancer. J Clin;* 54: 150–180.
- Turini, M.E. and Dubois, R.N. 2002. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Ann Rev v Med,* 53: 35-57.
- Vanderperren, H., Wouwe, V.N., Behets, S., Windal, I., Overmeire, V.I., Fontaine, A. 2004. TEQ-Value Determination of Animal Feed; Emphasis on the CALUX Bioassay Validation. *Talanta.* Doi; 10.1016/j.talanta.2004.05.027.
- Wang, Y. 2013. Attenuation of berberine on lipopolysaccharide-induced inflammatory and apoptosis responses in β -cells via TLR4-independent JNK/NF- κ B pathway. *Pharmaceutical Biology*
- Widyatmoko, D., and Zick, F. 1998. *The flora of Bukit Tiga Puluh National Park, Kerumutan Sanctuary and Mahato Protective Reserv.,. Riau, Indonesia.* Jakarta; National Library Indonesia.
- Xu, NL., Lu, NB., Hu, MM., Xu, WY., Han, X., Qi, Y., Peng, YJ. 2012. Mechanism involved in The Cytotoxic Effects of Berberine on Human Colon Cancer Cells. *Biocell;* 36 (3); 113-120.
- Yu, F.S., Yang, J.S., Lin, H.J., Yu, C.S., Tan, T.W., Lin, Y.T., Lin, C.C., Lu, H.E., and Chung, J.G. 2007. Berberine Inhibits WEHI-3 Leukemia Cells in vivo; *in Vivo,* 21 (2): 407-412.
- Yulianty, R. 2013. Aktivitas Kemoprevensi Senyawa Kurkumin Dan Analognya (GVT-0, PGV-0, DAN HGV-0): Studi Mekanisme *In Vitro* dan *In Vivo* pada Model Kanker Kolorektal; *Universitas Gajah Mada.*

Lampiran A. Perhitungan Rendemen Ekstrak

$$\begin{aligned}
 \text{Serbuk kering} &= 100 \text{ g (a)} \\
 \text{Berat gelas kosong} &= 123,64 \text{ g (b)} \\
 \text{Berat gelas + ekstrak} &= 126,71 \text{ (c)} \\
 \text{Berat ekstrak} &= b - c \\
 &= 126,71 \text{ g} - 123,64 \text{ g} \\
 &= 3,07 \text{ g} \\
 \text{Persen rendemen Ekstrak} &= \frac{c-b}{a} \times 100\% \\
 &= \frac{3,07 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= 3,07 \% \text{ b/b}
 \end{aligned}$$

Lampiran B. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Etanol Daun *A. flava***B1. Pembuatan larutan uji sitotoksitas**

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi Induk} &: \frac{10 \text{ mg ekstrak}}{0,1 \text{ ml DMSO}} \times 1000 = 10.000 \text{ } \mu\text{g}/0,1 \text{ ml} \\
 &= 100.000 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}
 \end{aligned}$$

Pengenceran

$$\text{a. Konsentrasi } 500 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml} : \frac{x}{1000 \text{ } \mu\text{l media}} \times 100.000 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$$

$$x = 5 \text{ } \mu\text{l} \rightarrow \text{dilarutkan dalam } 995 \text{ } \mu\text{l media}$$

$$\text{b. Konsentrasi } 400 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml} : \frac{x}{1000 \text{ } \mu\text{l media}} \times 100.000 \text{ ppm}$$

$$x = 4 \text{ } \mu\text{l} \rightarrow \text{dilarutkan dalam } 996 \text{ } \mu\text{l media}$$

$$\text{c. Konsentrasi } 300 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml} : \frac{x}{1000 \text{ } \mu\text{l media}} \times 100.000 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$$

$$x = 3 \text{ } \mu\text{l} \rightarrow \text{dilarutkan dalam } 997 \text{ } \mu\text{l media}$$

$$\text{d. Konsentrasi } 200 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml} \text{ (menggunakan stok } 400): \frac{x}{1000 \text{ } \mu\text{l media}} \times 400 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$$

$$x = 500 \text{ } \mu\text{l} \rightarrow \text{dilarutkan dalam } 500 \text{ } \mu\text{l media}$$

e. Konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ (menggunakan stok 200): $\frac{x}{1000 \mu\text{l media}} \times 200 \mu\text{g/ml}$

$x = 500 \mu\text{l} \rightarrow$ dilarutkan dalam 500 μl media

B2. Pembuatan larutan uji double staining

Konsentrasi Induk : $\frac{10 \text{ mg ekstrak}}{0,1 \text{ ml DMSO}} \times 1000 = 100.000 \mu\text{g/ml}$

$\frac{\text{dipipet } 10 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l media}} \times 100.000 \mu\text{g/ml} = 1000 \mu\text{g/ml}$

Pengenceran

a. Konsentrasi 310 $\mu\text{g/ml}$: $\frac{x}{1000 \mu\text{l media}} \times 1000 \mu\text{g/ml}$

$x = 310 \mu\text{l} \rightarrow$ dilarutkan dalam 670 μl media

b. Konsentrasi 400 $\mu\text{g/ml}$: $\frac{x}{1000 \mu\text{l media}} \times 100.000 \mu\text{g/ml}$

$x = 410 \mu\text{l} \rightarrow$ dilarutkan dalam 590 μl media

Lampiran C. Perhitungan Penanaman Sel

Jumlah sel yang terhitung = $\sum \frac{W1 + W2 + W3 + W4}{4}$

Volume sel yang ditransfer = $\frac{\text{jumlah sel yang diinginkan} \times \text{jumlah sumuran}}{\text{jumlah sel terhitung} \times 10^4}$

C1. Perhitungan sel untuk uji sitotoksik

a. Ekperimen 1:

Jumlah sel terhitung : $\frac{189 + 178 + 184 + 190}{4} = 185$

volume ditransfer : $\frac{(1 \times 10^4) \times 100}{185 \times 10^4} = 0,54 \text{ ml} + \text{media } 9,46 \text{ ml}$

b. Ekperimen 2:

$$\text{Jumlah sel terhitung : } \frac{139 + 142 + 145 + 139}{4} = 142$$

$$\text{volume ditransfer : } \frac{(1 \times 10^4) \times 100}{142 \times 10^4} = 0,7 \text{ ml} + \text{media } 9,3 \text{ ml}$$

c. Ekperimen 1:

$$\text{Jumlah sel terhitung : } \frac{159 + 170 + 148 + 163}{4} = 160$$

$$\text{volume ditransfer : } \frac{(1 \times 10^4) \times 100}{160 \times 10^4} = 0,63 \text{ ml} + \text{media } 9,37 \text{ ml}$$

C2. Perhitungan sel untuk uji apoptosis

$$\text{Jumlah sel terhitung : } \frac{158 + 169 + 181 + 155}{4} = 166$$

$$\text{volume ditransfer : } \frac{(5 \times 10^4) \times 24}{166 \times 10^4} = 0,72 \text{ ml} + \text{media } 11,28 \text{ ml}$$

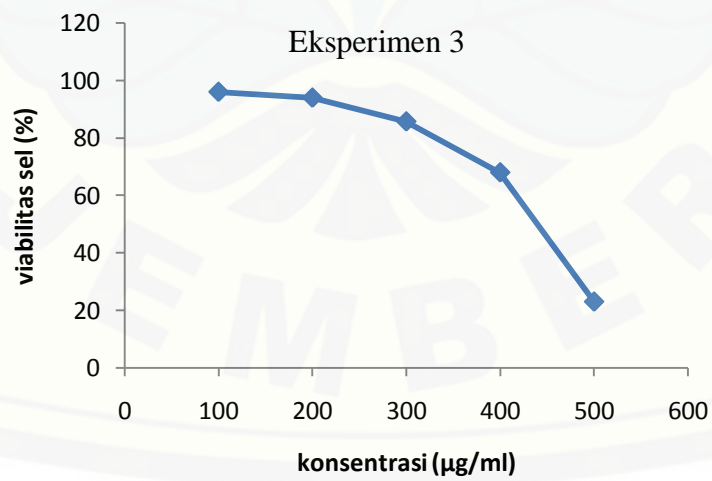
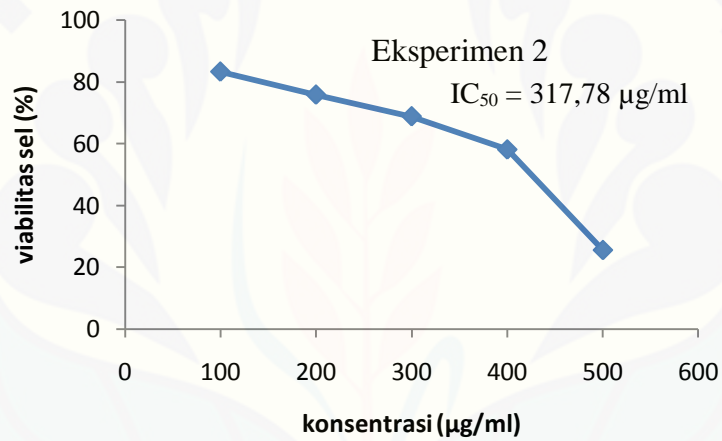
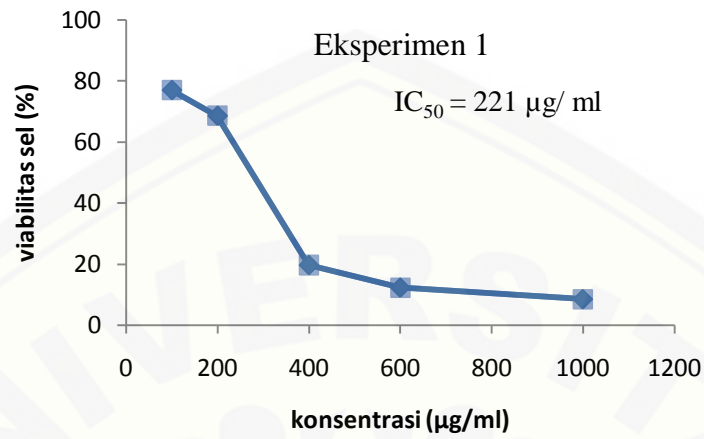
Lampiran D. Perhitungan hasil uji sitotoksitas**D1. Perhitungan persen (%) sel hidup**

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{Absorbansi sel perlakuan} - \text{absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Data	Konsentrasi (uM)	Absorbansi			Viabilitas sel (%)			rata-rata	SD
		a1	a2	a3	v1	v2	v3		
1	100	0,66	0,447	0,627	89,49	56,74	84,42	76,88	17,63
	200	0,41	0,535	0,625	51,05	70,27	84,11	68,48	16,60
	400	0,221	0,248	0,148	21,99	26,14	10,76	19,63	7,95
	600	0,133	0,189	0,151	8,46	17,07	11,23	12,25	4,40
	1000	0,129	0,136	0,134	7,84	8,92	8,61	8,46	0,55
Kontrol Sel		0,787	0,759	0,639				0,728	
Kontrol Media		0,08	0,072	0,082				0,078	

Data	Konsentrasi (uM)	Absorbansi			Viabilitas sel (%)			rata-rata	SD
		a1	a2	a3	v1	v2	v3		
2	100	0,964	0,867	0,917	88,11	78,32	83,37	83,27	4,90
	200	0,825	0,854	0,848	74,07	77,00	76,40	75,82	1,55
	300	0,729	0,776	0,814	64,38	69,12	72,96	68,82	4,30
	400	0,684	0,672	0,644	59,83	58,62	55,79	58,08	2,07
	500	0,31	0,356	0,368	22,05	26,70	27,91	25,56	3,09
Kontrol Sel		1,067	1,082	1,096				1,082	
Kontrol Media		0,09	0,091	0,094				0,092	

Data	Konsentrasi (uM)	Absorbansi			Viabilitas sel (%)			rata-rata	SD
		a1	a2	a3	v1	v2	v3		
3	100	1,01	0,977	1,02	96,81	93,33	97,86	96,00	2,37
	200	0,985	0,964	1,00	94,17	91,96	95,75	93,96	1,90
	300	0,886	0,896	0,932	83,75	84,80	88,59	85,71	2,55
	400	0,735	0,729	0,746	67,85	67,22	69,01	68,02	0,91
	500	0,284	0,328	0,319	20,36	24,99	24,04	23,13	2,45
Kontrol Sel		0,981	1,09	1,05				1,040	
Kontrol Media		0,078	0,091	0,103				0,091	

D2. Profil viabilitas sel setelah perlakuan ekstrak etanol daun *A. flava*

D3. Perhitungan IC₅₀ dengan Program Probit

a. Eksperimen 1

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi			95% Confidence Limits for log(Konsentrasi) ^b			
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
PROBI T ^a	0.01	1656.999	599.260	2.453E15	3.219	2.778	15.390
	0.02	1311.487	523.424	6.204E13	3.118	2.719	13.793
	0.03	1130.650	479.257	6.032E12	3.053	2.681	12.780
	0.04	1011.244	447.793	1.046E12	3.005	2.651	12.020
	0.05	923.480	423.191	2.520E11	2.965	2.627	11.401
	0.06	854.806	402.876	7.510E10	2.932	2.605	10.876
	0.07	798.807	385.486	2.601E10	2.902	2.586	10.415
	0.08	751.787	370.208	1.007E10	2.876	2.568	10.003
	0.09	711.432	356.522	4.254E9	2.852	2.552	9.629
	0.1	676.202	344.072	1.926E9	2.830	2.537	9.285
	0.15	547.970	293.374	7.330E7	2.739	2.467	7.865
	0.2	463.637	252.599	5582420.001	2.666	2.402	6.747
	0.25	401.709	215.256	632655.762	2.604	2.333	5.801
	0.3	353.179	177.443	94068.090	2.548	2.249	4.973
	0.35	313.459	135.976	17550.397	2.496	2.133	4.244
	0.4	279.906	89.471	4211.955	2.447	1.952	3.624
	0.45	250.866	44.395	1423.268	2.399	1.647	3.153
	0.5	221.075	15.331	710.890	2.353	1.186	2.852
	0.55	202.214	3.976	472.846	2.306	.599	2.675
	0.6	181.234	.861	366.064	2.258	-.065	2.564
	0.65	161.835	.163	305.244	2.209	-.788	2.485
	0.7	143.634	.027	264.137	2.157	-1.570	2.422

0.75	126.282	.004	232.714	2.101	-2.426	2.367
0.8	109.415	.000	206.305	2.039	-3.389	2.315
0.85	92.576	.000	182.191	1.966	-4.518	2.261
0.9	75.020	.000	158.088	1.875	-5.945	2.199
0.91	71.305	.000	153.010	1.853	-6.291	2.185
0.92	67.477	.000	147.759	1.829	-6.666	2.170
0.93	63.505	.000	142.277	1.803	-7.080	2.153
0.94	59.345	.000	136.480	1.773	-7.541	2.135
0.95	54.932	.000	130.249	1.740	-8.068	2.115
0.96	50.165	.000	123.393	1.700	-8.687	2.091
0.97	44.867	.000	115.575	1.652	-9.449	2.063
0.98	38.680	.000	106.095	1.587	-10.462	2.026
0.99	30.615	.000	92.944	1.486	-12.061	1.968

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

b. Eksperimen 2

Confidence Limits

	Proba bility	95% Confidence Limits for Konsentrasi			95% Confidence Limits for log(Konsentrasi) ^b		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBI T ^a	0.01	5400.909	.	.	3.732	.	.
	0.02	3969.862	.	.	3.599	.	.
	0.03	3265.521	.	.	3.514	.	.
	0.04	2819.314	.	.	3.450	.	.
	0.05	2501.726	.	.	3.398	.	.
	0.06	2259.756	.	.	3.354	.	.

0.07	2066.931	.	.	3.315	.	.
0.08	1908.283	.	.	3.281	.	.
0.09	1774.597	.	.	3.249	.	.
0.1	1659.833	.	.	3.220	.	.
0.15	1258.492	.	.	3.100	.	.
0.2	1009.969	.	.	3.004	.	.
0.25	836.260	.	.	2.922	.	.
0.3	705.883	.	.	2.849	.	.
0.35	603.286	.	.	2.781	.	.
0.4	519.756	.	.	2.716	.	.
0.45	401.964	.	.	2.653	.	.
0.5	317.781	.	.	2.592	.	.
0.55	305.783	.	.	2.530	.	.
0.6	293.292	.	.	2.467	.	.
0.65	252.683	.	.	2.403	.	.
0.7	215.957	.	.	2.334	.	.
0.75	182.288	.	.	2.261	.	.
0.8	150.935	.	.	2.179	.	.
0.85	121.129	.	.	2.083	.	.
0.9	91.841	.	.	1.963	.	.
0.91	85.901	.	.	1.934	.	.
0.92	79.883	.	.	1.902	.	.
0.93	73.752	.	.	1.868	.	.
0.94	67.459	.	.	1.829	.	.
0.95	60.934	.	.	1.785	.	.
0.96	54.070	.	.	1.733	.	.
0.97	46.682	.	.	1.669	.	.
0.98	38.399	.	.	1.584	.	.

0.99	28.225	.	.	1.451	.	.
------	--------	---	---	-------	---	---

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

c. Eksperimen 3

Confidence Limits

	Prob ability	95% Confidence Limits for Konsentrasi			95% Confidence Limits for log(Konsentrasi) ^b		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBI	0.01	1651.223	.	.	3.218	.	.
T ^a	0.02	1414.787	.	.	3.151	.	.
	0.03	1282.652	.	.	3.108	.	.
	0.04	1191.450	.	.	3.076	.	.
	0.05	1122.069	.	.	3.050	.	.
	0.06	1066.207	.	.	3.028	.	.
	0.07	1019.520	.	.	3.008	.	.
	0.08	979.455	.	.	2.991	.	.
	0.09	944.386	.	.	2.975	.	.
	0.1	913.216	.	.	2.961	.	.
	0.15	794.739	.	.	2.900	.	.
	0.2	711.641	.	.	2.852	.	.
	0.25	647.311	.	.	2.811	.	.
	0.3	594.512	.	.	2.774	.	.
	0.35	549.438	.	.	2.740	.	.
	0.4	509.831	.	.	2.707	.	.
	0.45	477.231	.	.	2.676	.	.
	0.5	386.811	.	.	2.645	.	.

0.55	384.257	.	.	2.614	.	.
0.6	382.540	.	.	2.583	.	.
0.65	354.964	.	.	2.550	.	.
0.7	328.052	.	.	2.516	.	.
0.75	301.294	.	.	2.479	.	.
0.8	274.057	.	.	2.438	.	.
0.85	245.402	.	.	2.390	.	.
0.9	213.565	.	.	2.330	.	.
0.91	206.516	.	.	2.315	.	.
0.92	199.122	.	.	2.299	.	.
0.93	191.296	.	.	2.282	.	.
0.94	182.920	.	.	2.262	.	.
0.95	173.813	.	.	2.240	.	.
0.96	163.692	.	.	2.214	.	.
0.97	152.053	.	.	2.182	.	.
0.98	137.852	.	.	2.139	.	.
0.99	118.113	.	.	2.072	.	.

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

D4. Hasil IC₅₀ dari 3 eksperimen

Data	IC ₅₀ (µg/ml)	Rata ± SD	CV
1	221	308 ± 83 µg/ml	26,9 %
2	317,78		
3	386,69		

Lampiran E. Perhitungan persen apoptosis, nekrosis, dan sel hidup**1. Konsentrasi 310 µg/ml**

Keterangan	Lapang pandang 1	Lapang pandang 1	Jumlah	Persentase (%)
Apoptosis	111	98	209	94,57
Nekrosis	2	3	5	2,26
Hidup	3	4	7	3,17
Total Sel			221	

2. Konsentrasi 460 µg/ml

Keterangan	Lapang pandang 1	Lapang pandang 1	Jumlah	Persentase (%)
Apoptosis	267	107	374	90,34
Nekrosis	8	27	35	8,45
Hidup	4	1	5	1,21
Total Sel			414	