



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

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**Vita Ariati**

**NIM 112210101019**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2015**



**UJI SITOTOKSISITAS DAN APOPTOSIS EKSTRAK KLOROFORM  
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:**

**Vita Ariati**

**NIM 112210101019**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2015**

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT dan Nabi Muhammad SAW;
2. Orang tua tercinta, Ibu Iin Winarti dan Alm. Bapak Kelik Karyanto;
3. Kakak–kakakku Ika Indriati dan Ninuk Andhini;
4. Guru–guruku TK Kartika V 80 Malang, SDN Bunulrejo 1 Malang, SMPN 5 Malang, SMAN 1 Malang, serta dosen-dosen Universitas Jember terhormat;
5. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

**MOTTO**

*Allah akan meninggikan orang-orang beriman di antaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah Maha Mengetahui apa yang kamu kerjakan*

**(Terjemahan Q.S. Al-Mujadilah: 11)**

*Orang-orang hebat di bidang apapun bukan baru bekerja karena mereka terinspirasi, namun mereka menjadi terinspirasi karena mereka lebih suka bekerja. Mereka tidak menyia-nyiakan waktu hanya untuk menunggu inspirasi*

**(Ernest Newman)**

*Tak peduli seberapa membahagiakan atau menyedihkan, hidup harus terus berlanjut, waktulah yang selalu menepati janji dan berbaik hati mengobati segalanya*

**(Tere Liye)**

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Vita Ariati

NIM : 112210101019

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Uji Sitotoksitas dan Apoptosis Ekstrak Kloroform 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, Agustus 2015

Yang menyatakan,

Vita Ariati

NIM. 112210101019

**SKRIPSI**

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

Oleh:

**Vita Ariati**

**112210101019**

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 Sitotoksisitas dan Apoptosis Ekstrak Kloroform Daun Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* L. Merr) terhadap Kulur Sel Kanker Kolon WiDr *In Vitro*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Senin, 10 Agustus 2015

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

**Tim Pembimbing**

Pembimbing Utama,

Pembimbing Anggota,

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

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

**Tim Penguji**

Penguji I,

Penguji II,

Dian Agung P., S.Farm., M.Farm., Apt.  
NIP 198410082008121004

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

Mengesahkan  
Dekan,

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

## RINGKASAN

**Uji Sitotoksisitas dan Apoptosis Ekstrak Kloroform Daun Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* L. Merr) terhadap Kultur Sel Kanker Kolon WiDr *In Vitro***; Vita Ariati; 112210101019; 2015; 51 halaman Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kanker menjadi salah satu penyebab kematian utama dengan jumlah penderita yang terus bertambah setiap tahun. Kanker kolon menduduki urutan insiden ketiga dengan angka kematian mencapai 690 ribu jiwa. Pengobatan kanker secara konvensional dilakukan dengan pembedahan, radiasi dan kemoterapi yang pada umumnya belum mampu memberikan hasil efektif, maka perlu pengembangan dan penemuan obat antikanker baru. Tanaman pada umumnya memiliki zat aktif dalam bentuk metabolit sekunder yang memiliki efek farmakologi sebagai agen kemoprevensi. Salah satu tumbuhan yang memiliki potensi untuk terapi antikanker adalah *Arcangelisia flava* atau lebih dikenal dengan kayu kuning karena terdapat senyawa berberin di dalamnya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas kemoprevensi dan potensi pemacuan apoptosis ekstrak kloroform daun *A. flava* terhadap kultur sel kanker kolon WiDr.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris, menggunakan metode uji sitotoksik MTT *assay* dan uji apoptosis *double staining method*. Pada uji sitotoksik, dilakukan penanaman sel pada *96 well plate* dengan kelompok kontrol dan perlakuan. Pada kelompok kontrol, sel hanya diberi media kultur, sedangkan kelompok perlakuan masing-masing diberi ekstrak kloroform daun *A. flava* dengan 5 seri konsentrasi yaitu 50, 100, 200, 300, dan 400 µg/ml secara triplo dengan replikasi sebanyak 3 kali. Reagen MTT ditambahkan untuk membentuk kristal formazan berwarna ungu yang kemudian dibaca absorbansinya dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm. Data absorbansi sel dikonversi menjadi viabilitas sel dan dianalisis dengan

program probiotik untuk memperoleh nilai  $IC_{50}$ . Nilai rata-rata  $IC_{50}$  dari tiga eksperimen sebesar  $121,637 \pm 20,065 \mu\text{g/ml}$ . Berdasarkan nilai  $IC_{50}$ , ekstrak kloroform daun *A. flava* dikatakan memiliki potensi sebagai senyawa sitotoksik pada sel kanker kolon WiDr karena nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan tidak lebih dari  $500 \mu\text{g/ml}$ .

Uji apoptosis *double staining method* dilakukan dengan menanam sel pada *24 well plate* dengan kelompok kontrol dan perlakuan. Pada kelompok perlakuan, diberi ekstrak kloroform daun *A. flava* dengan konsentrasi  $IC_{50}$  yaitu  $120 \mu\text{g/ml}$  dan  $1,5 IC_{50}$  yaitu  $180 \mu\text{g/ml}$ . Sel hidup akan tampak memiliki inti sel dengan bentuk normal dan berwarna hijau. Sel yang mengalami apoptosis akan memiliki inti sel berwarna oranye dengan bentuk yang terkondensasi atau terfragmentasi. Sedangkan sel yang mengalami nekrosis akan tampak memiliki inti sel berwarna oranye namun dalam bentuk inti sel normal. Pada kelompok kontrol sel, diperoleh hasil 100% sel dalam keadaan hidup. Pada sel yang diberi perlakuan ekstrak dengan konsentrasi  $120 \mu\text{g/ml}$  menunjukkan sebagian besar sel mengalami kematian dimana 67,975% mengalami apoptosis dan 4,539% mengalami nekrosis. Efek yang lebih nyata ditunjukkan oleh kelompok sel yang diberi perlakuan dengan konsentrasi ekstrak  $180 \mu\text{g/ml}$  dimana hampir seluruh sel mengalami kematian yaitu 82,153% sel mengalami apoptosis dan 11,802% mengalami nekrosis.

Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa ekstrak kloroform daun *A. flava* memiliki potensi memicu apoptosis sel kanker kolon WiDr. Efek sitotoksik dan apoptosis ini dapat disebabkan oleh senyawa berberin yang terkandung dalam tanaman *A. flava*. Mekanisme berberin dalam memacu apoptosis adalah melalui jalur ekstrinsik dengan menginduksi sinyal kematian sel serta induksi gen apoptosis.

## PRAKATA

### **Bismillahirrohmanirohim**

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

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, dukungan, dan bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Ibu Lestyo Wulandari S.Si., M.Farm., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menuntut ilmu di kampus tercinta;
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, dan tenaganya dalam membantu dan membimbing penulis hingga akhir penyusunan skripsi ini;
3. Ibu Ayik Rosita Puspaningtyas, S.Farm., M.Farm., Apt. dan Bapak Dian Agung Pangaribowo, S.Farm., M.Farm., Apt. yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan mengevaluasi skripsi ini;
4. Bapak Nuri S.Si., M.Si., Apt., Bapak Moch. Amrun Hidayat, S. Si., Apt., M.Farm., dan Ibu Indah Purnama Sary, S.Farm., Apt., M.Farm. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;

5. Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memperluas ilmu pengetahuan serta wawasan penulis selama menempuh masa kuliah;
6. Kedua orang tuaku, Alm. Bapak Kelik Karyanto dan Ibu In Winarti, atas doa yang terus mengalir dan kasih sayang yang tidak pernah padam. Semoga selalu bisa menjadi kebanggaan dan kebahagiaan kalian;
7. Bapak Madun Muhadi dan Mama Tri Agustini, atas doa dan kasih sayang yang diberikan;
8. Kakak-kakakku tersayang Ika Indriati dan Ninuk Andhini, atas kasih sayang, doa, bimbingan dan semangat yang tiada henti kalian berikan;
9. Keponakan-keponakan tersayangku Kania, Davina, Davian dan Devan, atas kehadiran kalian dalam kehidupanku;
10. Sahabat seperjuanganku Moh. Sulthon Habibi, atas semangat kerja keras, kebersamaan dan kekompakan selama masa kuliah dan pengerjaan skripsi dan penelitian ini;
11. Sahabat-sahabat terbaik di kampus Habibi, Indarto, Yora, Alan, Arif dan Putra atas semangat, dukungan, motivasi, bantuan dan kebersamaannya selama aku menempuh kuliah ini;
12. Teman-teman kost Mbak Rizka, Mbak Bino, Dewi, Dian, Nurul, Dina, Dini, Mimi, Citra, Renny, Della, Widya atas kebersamaan, semangat, bantuan, dan kekompakan kalian selama aku menempuh kuliah ini;
13. Mbak Dinik dan Mbak Indri selaku teknisi laboratorium Farmasi Klinik, Bu Widi dan Mbak Anggra selaku teknisi laboratorium Biologi serta Mbak Rumbi selaku teknisi laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada atas bantuannya;
14. Sahabat-sahabat seangkatan dan seperjuangan Fakultas Farmasi Universitas Jember 2011 Orin, Fitria, Risti, Iik, Mey, Prisma, Alifia, Tiwi, dan teman-teman “ASMEF” yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih atas kebersamaan dan pengalaman luar biasa yang kalian berikan, Farmasi 2011.. BISA!!;

15. Sahabat terbaik semasa hidup Gis, Havizh, Ridho, dan Vhia, atas semangat, dukungan, dan motivasi selama ini;
16. Sahabat-sahabat KKN kelompok 119 Kecamatan Arjasa Fitri, Anang, Sujat, Mas Yudha, Yoga, Mas Zai, Arifin, Nado dan Vonny atas kebersamaan kalian selama kurang lebih 40 hari di posko;
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, Juni 2015

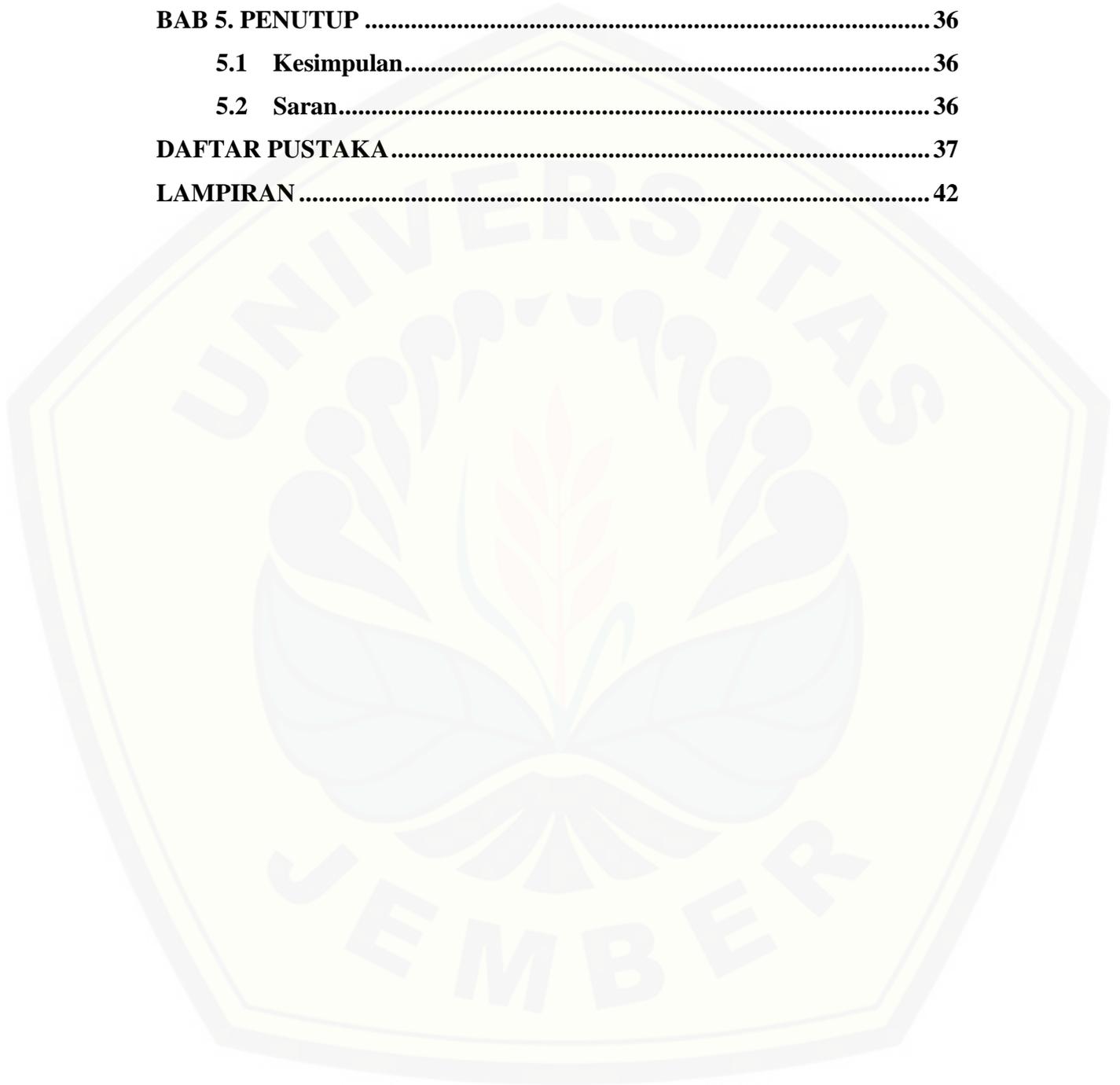
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN.....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN MOTTO .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN BIMBINGAN.....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>vi</b>
<b>RINGKASAN.....</b>	<b>vii</b>
<b>PRAKATA .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xvi</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Perumusan Masalah.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian .....</b>	<b>4</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Tinjauan Tanaman <i>A. flava</i> .....</b>	<b>5</b>
2.1.1 Klasifikasi .....	5
2.1.2 Nama Lain.....	5
2.1.3 Morfologi Tanaman.....	5
2.1.4 Ekologi dan Distribusi Tanaman.....	6
2.1.5 Kandungan Kimia dan Manfaat .....	6
<b>2.2 Tinjauan Kanker Kolon.....</b>	<b>7</b>
2.2.1 Definisi .....	7
2.2.2 Patofisiologi .....	8
2.2.3 Gejala Klinis .....	8

2.2.4	Prevalensi Kanker Kolon .....	9
<b>2.3</b>	<b>Tinjauan Sel WiDr .....</b>	<b>11</b>
<b>2.4</b>	<b>Tinjauan Kemoprevensi.....</b>	<b>12</b>
<b>2.5</b>	<b>Tinjauan Uji Sitotoksitas.....</b>	<b>12</b>
<b>2.6</b>	<b>Tinjauan Uji Apoptosis .....</b>	<b>14</b>
<b>BAB 3.</b>	<b>METODE PENELITIAN.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Jenis Penelitian.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Tempat dan Waktu Penelitian.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3</b>	<b>Alat dan Bahan.....</b>	<b>18</b>
3.3.1	Alat .....	18
3.3.2	Bahan.....	18
<b>3.4</b>	<b>Rancangan Penelitian .....</b>	<b>20</b>
<b>3.5</b>	<b>Variabel Penelitian.....</b>	<b>21</b>
3.5.1	Variabel Bebas .....	21
3.5.2	Variabel Terikat .....	21
3.5.3	Variabel Terkendali.....	21
<b>3.6</b>	<b>Definisi Operasional.....</b>	<b>21</b>
<b>3.7</b>	<b>Pelaksanaan Penelitian .....</b>	<b>22</b>
3.7.1	Pembuatan Ekstrak Kloroform <i>A. flava</i> .....	22
3.7.2	Pembuatan Media Cair RPMI.....	22
3.7.3	Pembuatan Media Kultur Lengkap .....	22
3.7.4	Preparasi Kultur Sel.....	23
3.7.5	Preparasi Sampel.....	24
3.7.6	Uji Sitotoksitas Menggunakan MTT Assay .....	24
3.7.7	Uji Apoptosis Sel dengan <i>Double Staining Method</i> .....	25
<b>3.8</b>	<b>Analisa Data .....</b>	<b>26</b>
3.8.1	Analisa Data Uji Sitotoksitas .....	26
3.8.2	Analisa Data Uji Apoptosis .....	27
<b>3.9</b>	<b>Alur Penelitian .....</b>	<b>27</b>
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Hasil.....</b>	<b>28</b>

4.1.1 Hasil Uji Sitotoksitas .....	28
4.1.2 Hasil Uji Apoptosis .....	30
<b>4.2 Pembahasan.....</b>	<b>31</b>
<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>	<b>36</b>
5.1 Kesimpulan.....	36
5.2 Saran.....	36
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>37</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>42</b>



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 2.1 Daun <i>A. flava</i> L. Merr .....	6
Gambar 2.2 Struktur kimia senyawa berberin .....	7
Gambar 2.3 Anatomi kolon, polip, dan kanker kolon.....	8
Gambar 2.4 Diagram jumlah kasus baru akibat kanker .....	9
Gambar 2.5 Diagram jumlah kasus dan kematian akibat kanker kolon.....	10
Gambar 2.6 Kultur sel kanker kolon WiDr .....	11
Gambar 2.7 Mekanisme uji MTT .....	14
Gambar 2.8 Sel setelah diwarnai dengan akridin orange-etidium bromida ..	17
Gambar 3.1 Diagram uji sitotoksitas <i>in vitro</i> .....	20
Gambar 3.2 Haemocytometer dilihat di bawah mikroskop <i>inverted</i> .....	23
Gambar 3.3 Cara menghitung sel menggunakan hemositometer .....	24
Gambar 3.4 Diagram alur penelitian.....	27
Gambar 4.1 Morfologi sel WiDr .....	29
Gambar 4.2 Hasil uji sitotoksitas .....	30
Gambar 4.3 Sel kanker kolon WiDr di bawah mikroskop fluoresensi .....	30
Gambar 4.4 Kondisi sel setelah uji apoptosis.....	31

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
A. PERHITUNGAN .....	42
1. Rendemen Ekstrak.....	42
2. Kepadatan Penanaman Sel untuk Uji Sitotoksisitas .....	42
3. Kepadatan Penanaman Sel untuk Uji Apoptosis .....	43
4. Konsentrasi Ekstrak untuk Perlakuan Uji Sitotoksisitas .....	43
5. Konsentrasi Ekstrak untuk Perlakuan Uji Apoptosis .....	45
B. DATA HASIL UJI SITOTOKSIK.....	45
1. Data Absorbansi dan Viabilitas Sel.....	45
2. Grafik Konsentrasi vs Viabilitas Sel .....	45
3. Analisis Probit .....	47
C. DATA HASIL UJI APOPTOSIS.....	51

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyakit dengan insiden tinggi yang disebabkan oleh abnormalitas sel karena adanya mutasi pada DNA. Kanker menjadi salah satu penyebab kematian utama dengan jumlah penderita yang terus bertambah setiap tahun. *Union of International Cancer* (UICC) memperkirakan peningkatan kasus kanker pertahun mencapai seratus kasus baru dari 100.000 penduduk dunia (UICC, 2012). Pada tahun 2008 terdapat 12,7 juta kasus kanker dengan angka kematian sebesar 7,6 juta jiwa (Bray *et al.*, 2012). Terjadi peningkatan kasus pada tahun 2012, yaitu mencapai 14,1 juta kasus baru dengan angka kematian 8,2 juta jiwa di seluruh dunia (IARC, 2013).

Jenis kanker yang paling banyak didiagnosis di seluruh dunia pada tahun 2012 adalah kanker paru yaitu 1,825 juta kasus dengan angka kematian sebesar 1,59 juta. Jenis kanker berikutnya adalah kanker payudara yaitu sebanyak 1,677 juta kasus dengan angka kematian sebesar 522 ribu jiwa. Kanker kolon dan rektum menduduki urutan ketiga dengan 1,361 juta kasus baru dengan angka kematian mencapai 690 ribu jiwa (IARC, 2013). *Indonesian Study Group of Colorectal Adenocarcinoma* menyebutkan bahwa kejadian *Colorectal Cancer* (CRC) di Indonesia adalah 1,8 dari 100.000 populasi (Tedja dan Abdullah, 2013).

Beberapa faktor risiko penyebab kanker kolon adalah kurangnya aktivitas fisik, usia, obesitas (Giovannucci *et al.*, 1995), kurangnya konsumsi serat, buah-buahan dan sayur, serta dari faktor genetis (Cappel *et al.*, 2005). Faktor risiko lain datang dari kebiasaan sehari-hari seperti merokok dan konsumsi alkohol (Anderson *et al.*, 2003).

Pengobatan kanker secara konvensional dilakukan dengan pembedahan, radiasi dan kemoterapi yang pada umumnya belum mampu memberikan hasil efektif. Pembedahan dilakukan dengan mengangkat sebagian organ yang

mengandung sel kanker, sehingga tidak menutup kemungkinan adanya sel kanker yang masih tertinggal, juga adanya kemungkinan kerusakan pada jaringan sehat atau organ tertentu (Kintizios dan Barberaki, 2004). Pengobatan dengan radiasi atau disebut juga dengan radioterapi menggunakan prinsip penyinaran dengan sinar X intensitas tinggi yang menyebabkan kematian pada sel kanker (apoptosis). Pengobatan ini bersifat lokal, sehingga tidak dapat digunakan untuk membunuh sel kanker yang menyebar (metastasis). Pengobatan menggunakan radiasi memiliki efek samping, diantaranya neurotoksisitas (Kintizios dan Barberaki, 2004).

Agen kemoterapi untuk pengobatan kanker kolon yang sering digunakan sebagai *first line* adalah kombinasi infus 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin, dan oxaliplatin dengan bevacizumab (Bisset *et al.*, 2000). Sel kanker kolon WiDr diketahui resisten terhadap 5-FU (Sigmond *et al.*, 2003). 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 (ACS, 2013).

Berdasarkan data tersebut, maka perlu pengembangan dan penemuan obat antikanker baru. Kemoprevensi kanker adalah penggunaan senyawa alam, sintesis atau agen biologis kimia untuk mencegah, menekan atau mengembalikan fungsi normal pada perkembangan kanker dari tahap inisiasi hingga invasi (Tsao *et al.*, 2004). Tanaman pada umumnya memiliki zat aktif dalam bentuk metabolit sekunder yang memiliki efek farmakologi sebagai agen kemoprevensi (Ramawat, 2008). Eksplorasi agen kemoprevensi kanker yang berasal dari bahan alam dapat dengan mudah dilakukan di Indonesia, sebab Indonesia merupakan negara yang kaya akan sumber daya alam, baik flora maupun fauna. Kekayaan flora Indonesia banyak terdapat dalam hutan hujan tropika yaitu sekitar 30.000 spesies dan 1.260 spesies di antaranya berkhasiat obat (Hasanah, 2013).

Salah satu tumbuhan yang memiliki potensi untuk terapi antikanker adalah *Arcangelisia flava* atau lebih dikenal dengan kayu kuning (Keawpradub *et al.*, 2005). Ekstrak etanol total *A. flava* menunjukkan efek penghambatan terhadap proliferasi kultur sel kanker serviks HeLa dengan  $IC_{50}$  sebesar 49,96  $\mu\text{g/ml}$

(Febrinasari *et al.*, 2012). Ekstrak kloroform *A. flava* juga diketahui memiliki aktivitas antioksidan dan sitotoksik terhadap larva udang dan sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai  $LC_{50}$  and  $IC_{50}$  sebesar 210-278 dan 8-12  $\mu\text{g/ml}$ . Ekstrak kloroform *A. flava* diketahui mengandung alkaloid isokuinolin dengan kandungan terbanyak adalah berberin yang berpengaruh terhadap aktivitas sitotoksiknya (Keawpradub *et al.*, 2005). Salah satu sifat alkaloid adalah dalam bentuk bebasnya, alkaloid tidak larut dalam air, tetapi larut dalam kloroform, eter, dan pelarut organik lain yang bersifat relatif non polar atau semipolar (Rogers dan Wink, 1998).

Berberin memiliki berbagai aktivitas yang mendukung sebagai antikanker. Senyawa ini mampu menghambat pertumbuhan sel leukemia WEHI-3 (Yu *et al.*, 2007), menginduksi apoptosis pada sel glioblastoma T98G (Eom *et al.*, 2008), serta menghambat produksi gen antiapoptosis (Pandey *et al.*, 2008). Berberin juga mampu menekan karsinogenesis dengan cara menghambat enzim *cyclooxygenase-2* (COX-2) yang merupakan karakteristik atau ekspresi dari kanker kolon (Sun *et al.*, 2009).

Ekstrak kloroform *A. flava* memiliki kandungan berberin yang memiliki aktivitas untuk membunuh sel kanker dengan mekanisme penghambatan terhadap enzim COX-2, sehingga peneliti menduga ekstrak kloroform *A. flava* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker kolon. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas kemoprevensi ekstrak kloroform *A. flava* berdasarkan efek sitotoksitas terhadap sel kanker kolon WiDr. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar awal penggunaan tanaman *A. flava* sebagai agen kemoprevensi untuk mengobati kanker kolon yang lebih efektif dan efisien.

## 1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka permasalahan yang dapat dirumuskan adalah sebagai berikut:

- a. Apakah ekstrak kloroform daun *A. flava* memiliki aktivitas kemoprevensi berdasarkan efek sitotoksiknya terhadap sel kanker kolon WiDr?

- b. Apakah ekstrak kloroform daun *A. flava* dapat memacu apoptosis pada sel kanker kolon WiDr?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah:

- a. Untuk mengetahui aktivitas kemoprevensi ekstrak kloroform daun *A. flava* berdasarkan efek sitotoksiknya terhadap sel kanker kolon WiDr.
- b. Untuk mengetahui potensi ekstrak kloroform daun *A. flava* dalam memacu apoptosis sel kanker kolon WiDr.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini antara lain:

- a. Dapat memberikan informasi yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah mengenai khasiat dan manfaat tanaman *A. flava* sebagai agen kemoprevensi kanker kolon.
- b. Dapat digunakan sebagai dasar bagi penelitian lanjutan yang lebih mendalam sebagai usaha pengembangan penelitian agen kemoprevensi kanker.

## 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	: Magnolidae
Ordo	: Ranunculales
Famili	: Menispermaceae
Genus	: Arcangelisia
Spesies	: <i>Arcangelisia flava</i> (L.) Merr (NCBI, 2013).

#### 2.1.2 Nama Lain

*A. flava* dikenal dengan beberapa nama daerah, di antaranya Areuy ki koneng (Sunda); Oyod sirawan, Sirawan susu, Peron (Jawa). Pada daerah Ambon dikenal dengan Wali atau Wari bulan dan Gumi modoku atau Mololeya gumini di Halmahera (Heyne, 1987).

#### 2.1.3 Morfologi Tanaman

*A. flava* tumbuh dengan dengan batang yang bulat, berkulit kasar dan berdiameter 2-7 cm, merupakan tumbuhan memanjat dengan panjang mencapai 20 m. Bagian dalam batang berwarna kuning dan rasanya pahit. Bentuk daun bundar telur, tebal dan kaku, permukaan daun adaksial mengkilap dan tangkai daun panjang (Gambar 2.1). Bunga berbentuk malai, berumah dua, hitam dan

kecil tersusun dalam rangkaian 20 cm sampai 50 cm, tajuk bercuping kehijauan (Supriadi *et al.*, 2001).



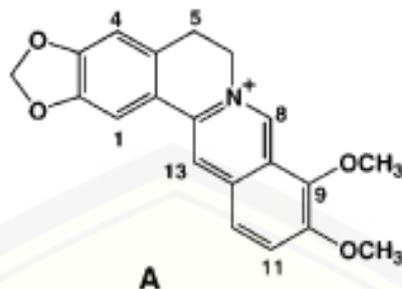
Gambar 2.1 Daun *A. flava* (L.) Merr.

#### 2.1.4 Ekologi dan Distribusi Tanaman

*A. flava* hidup pada dataran rendah hingga ketinggian 800-1000 m di atas permukaan laut. Tanaman ini banyak ditemukan di daerah pantai, hutan sekunder dan semak belukar. Di Sulawesi, kayu kuning tumbuh di tanah berkapur. Daerah persebaran *A. flava* meliputi Jawa, Sumatera, Kalimantan Sulawesi, Halmahera, Irian, Filipina, Thailand, Indocina dan Malaya (Setyowati dan Wardah, 2007).

#### 2.1.5 Kandungan Kimia dan Manfaat

*A. flava* mengandung alkaloid isokuinolin, yaitu alkaloid yang mengandung inti isokuinolin dalam struktur kimianya seperti jatrorizin, palmatin dan berberin. Di samping itu, juga terdapat beberapa alkaloid minor seperti kolumbamin, dehidrokoridaamin, homoaromolin dan talifendin. Kandungan alkaloid golongan isokuinolin terbesar adalah berberin dengan struktur kimia seperti pada gambar (Gambar 2.2) (Keawpradub *et al.*, 2005).



Gambar 2.2 Struktur kimia senyawa berberin (Sumber : Bhowmik *et al.*, 2012)

Ekstrak etanol total *A. flava* menunjukkan efek penghambatan terhadap proliferasi sel kanker serviks HeLa dengan  $IC_{50}$  sebesar 49,96  $\mu\text{g/ml}$  (Febrinasari *et al.*, 2012). Ekstrak kloroform *A. flava* menunjukkan sitotoksitas terhadap larva udang dan sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai  $LC_{50}$  dan  $IC_{50}$  sebesar 210-278 dan 8-12  $\mu\text{g/ml}$  (Keawpradub *et al.*, 2005). Ekstrak kloroform *A. flava* diketahui memiliki kandungan alkaloid terbesar adalah berberin yaitu sebesar 388 mg dalam 3,0 g ekstrak (Keawpradub *et al.*, 2005). Penelitian lain dilakukan oleh Baroroh (2014), kadar berberin dalam ekstrak kloroform *A. flava* adalah 0,0423 % b/b. Berberin sendiri memiliki banyak aktivitas yang mendukung sebagai antikanker. Senyawa ini mampu menekan karsinogenesis dengan cara menghambat produksi gen antiapoptosis (Pandey *et al.*, 2008) dan menghambat enzim *cyclooxygenase-2* (COX-2) merupakan karakteristik atau ekspresi dari kanker kolon (Sun *et al.*, 2009).

## 2.2 Tinjauan Kanker Kolon

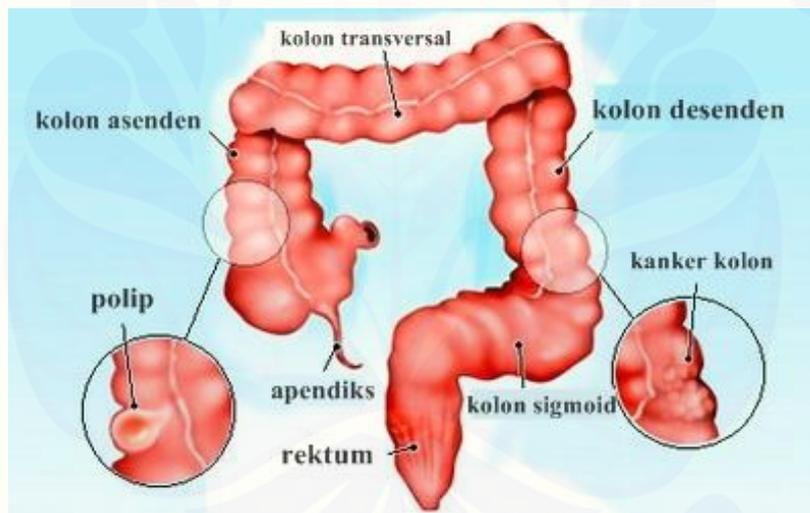
### 2.2.1 Definisi

Kanker kolon (usus besar) adalah suatu pertumbuhan tumor yang bersifat ganas dan merusak sel DNA dan jaringan sehat di sekitar kolon dan rektum. Proses terbentuknya kanker kolon ini melibatkan akumulasi dari defek genetik, modifikasi protein dan interaksi sel dengan matriks pada sel epitel kolon. Inflamasi kronik diduga berperan pada karsinogenesis dengan menghambat apoptosis, merusak DNA, dan menstimulasi proliferasi mukosa secara kronik. Perubahan pada populasi mikroba usus, baik pada spesies tertentu ataupun pada

komposisinya secara keseluruhan, juga dapat menyebabkan inflamasi kronik (Tedja dan Abdullah, 2013).

### 2.2.2 Patofisiologi

Kanker kolon berkembang perlahan selama beberapa tahun. Sebelum kanker berkembang, pertumbuhan jaringan atau tumor biasanya dimulai dengan adanya polip pada lapisan mukus kolon (Gambar 2.3). Polip dapat bersifat jinak atau bersifat ganas. Beberapa polip dapat berubah menjadi kanker bergantung dari jenis polip, yaitu: polip adenoma yaitu polip yang dapat berubah menjadi kanker. Jenis polip yang lain adalah polip hiperplastik dan polip inflamasi. Peningkatan resiko kanker kolon meningkat seiring dengan peningkatan jumlah polip adenoma (Cappell, 2005) .



Gambar 2.3 Anatomi kolon, polip dan kanker kolon (Sumber: Stoppler, 2013)

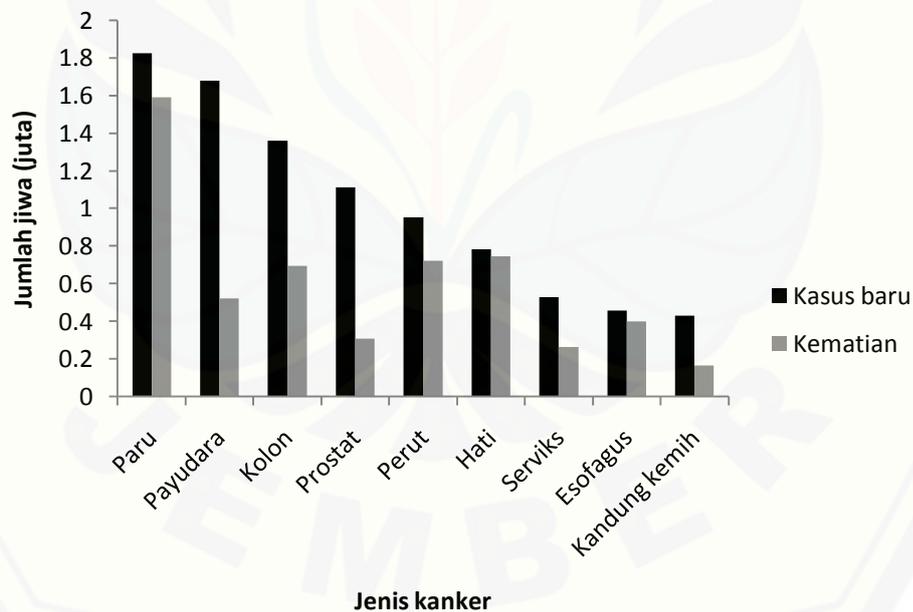
### 2.2.3 Gejala Klinis

Gejala umum dari kanker kolon meliputi nyeri perut, pendarahan rektum, perubahan kebiasaan pada pola buang air besar (seperti diare atau sembelit), dan penurunan berat badan. Gejala lain berupa mual dan muntah, malaise, anoreksia, dan ditensi abdomen. Munculnya gejala bergantung pada lokasi kanker, ukuran kanker dan metastasis. Letak kanker kolon di sebelah kiri lebih dapat

menyebabkan obstruksi usus parsial atau seluruhnya karena lumen kolon sebelah kiri lebih sempit. Obstruksi parsial dapat mengakibatkan sembelit, mual, perut kembung dan nyeri perut (Cappell, 2005).

#### 2.2.4 Prevalensi Kanker Kolon

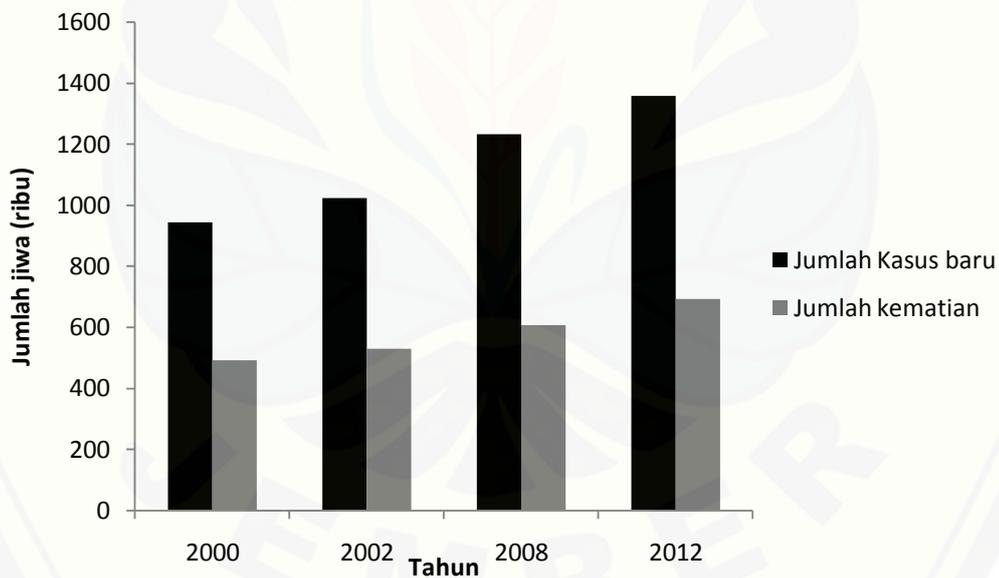
Total kasus kanker pada tahun 2012 adalah 14,1 juta yang terdiri dari kanker paru, kanker payudara, kanker kolon, kanker prostat, kanker hati, dan jenis kanker lainnya dengan jumlah kematian total akibat kanker sebesar 8,2 juta (Gambar 2.4). Angka tersebut mengalami kenaikan dari tahun 2008 yaitu 12,7 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. Kanker kolon dan rektum menempati urutan ketiga yaitu sebesar 1,361 juta kasus baru dengan jumlah kematian sebesar 0,694 juta jiwa (IARC, 2013).



Gambar 2.4 Diagram jumlah kasus baru dan jumlah kematian akibat kanker (Sumber : IARC, 2013)

Prevalensi kanker kolon mengalami peningkatan setiap tahunnya (Gambar 2.5). Pada tahun 2000, jumlah kasus baru kanker kolon sebesar 0,944 juta kasus. Angka kematian akibat kanker kolon sebanyak 0,492 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. 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 (Bray *et al.*, 2012).

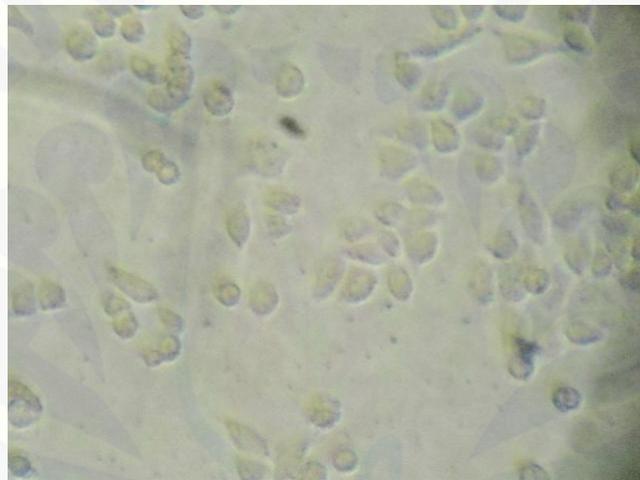
Pada tahun 2008, terjadi peningkatan kasus kanker kolon menjadi 1,233 juta kasus baru dengan angka kematian akibat kanker kolon sebanyak 0,608 juta jiwa, terdiri dari 0,32 juta jiwa pria dan 0,288 juta jiwa wanita (Bray *et al.*, 2012). Pada tahun 2012, jumlah kasus baru kanker kolon mencapai 1,36 juta kasus dan angka kematiannya mencapai 0,694 juta jiwa (Bray *et al.*, 2012).



Gambar 2.5 Diagram data jumlah kasus dan kematian akibat kanker kolon (Sumber : Bray *et al.*, 2012)

### 2.3 Tinjauan Sel WiDr

Sel WiDr (Gambar 2.4) 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 Kultur sel kanker kolon WiDr di bawah mikroskop *inverted* dengan perbesaran 700x

Agen kemoterapi untuk pengobatan kanker kolon yang sering digunakan sebagai *first line* adalah kombinasi infus 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin, dan oxaliplatin dengan bevacizumab (Bisset *et al.*, 2000). 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 (Jansen, 1997).

#### 2.4 Tinjauan Kemoprevensi

Kemoprevensi kanker (*cancer chemoprevention*) adalah penggunaan bahan alam atau sintetik baik tunggal maupun kombinasi, untuk mencegah (*prevent*), menekan (*supress*), dan mengembalikan fungsi normal (*reverse*) perkembangan kanker dari tahap inisiasi sampai invasi (Tsao *et al.*, 2004). Agen kemopreventif pada umumnya memiliki aktivitas penghambatan perkembangan kanker serta dapat meningkatkan kemungkinan kesembuhan dan menurunkan rasa sakit yang dialami oleh penderita kanker (*American Society of Clinical Oncology*, 2012).

Agen kemopreventif menargetkan setiap langkah termasuk strategi anti-inisiasi (misalnya: perbaikan DNA, detoksifikasi, pencegahan radikal bebas dan metabolisme karsinogen) dan anti-promosi / strategi anti-progresi (misalnya: radikal bebas, supresi proliferasi, induksi diferensiasi, peningkatan kekebalan, mengurangi peradangan, peningkatan apoptosis, perubahan ekspresi gen dan penurunan angiogenesis) (Ramawat, 2008).

Agen kemoprevensi dari bahan alam diharapkan tidak memiliki efek samping / toksisitas. Beberapa senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas kemoprevensi adalah kurkumin, genistein, isoflavonoid, resveratrol, gingerol, isoflavon,  $\beta$ -karoten, fitosterol dan flavonoid (Ramawat, 2008).

#### 2.5 Tinjauan Uji Sitotoksitas

Pengujian sitotoksitas *in vitro* dilakukan sebagai langkah awal penapisan senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antikanker. 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. Pengujian *in vitro* menggunakan kultur sel (*cell line*) memberikan kelebihan dibandingkan pengujian

*in vivo* yaitu lebih ekonomis karena bahan uji yang dibutuhkan lebih sedikit, lebih aman, dan waktu pengujian relatif lebih singkat. Sitotoksitas ditentukan untuk mendapatkan informasi awal mengenai potensi toksisitas suatu senyawa (Wilson, 2000).

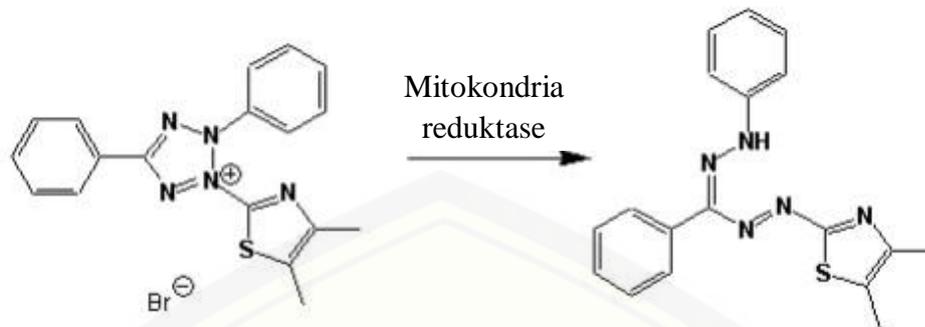
Dua metode uji umum yang digunakan untuk menentukan aktivitas sitotoksik adalah:

a. Metode perhitungan langsung (*direct counting*)

Pada metode perhitungan langsung (*direct counting*) dilakukan dengan menambahkan larutan *trypan blue* pada setiap sumuran agar dapat membedakan sel hidup dan sel mati. Sel yang mati akan terlihat berwarna biru, karena mengalami lisis sehingga protein dalam plasmanya akan berikatan dengan *trypan blue*. Pengamatan sel dilakukan di bawah mikroskop dengan cara menghitung prosentase sel hidup secara langsung dengan bilik hitung (Doyle dan Griffith, 2000).

b. Metode MTT

Metode uji MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) didasarkan pada pengurangan mitokondria garam tetrazolium oleh sel-sel hidup melalui sistem reduktase (Gambar 2.7). Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan reagen *stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader*. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup (Mosmann, 1983). Pada penelitian ini, digunakan metode uji MTT karena memiliki kelebihan yaitu relatif cepat, sensitif dan akurat (Doyle dan Griffith, 2000).



Gambar 2.7 Mekanisme uji MTT (Sumber : Mosmann, 1983)

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, begitupula sebaliknya. Uji sitotoksik dapat memberikan informasi mengenai konsentrasi obat/senyawa yang masih memungkinkan sel untuk dapat bertahan hidup (Doyle dan Griffiths, 2000). Suatu ekstrak dikatakan memiliki aktivitas sitotoksik apabila nilai  $IC_{50} < 500 \mu\text{g/ml}$  (Machana *et al.*, 2011)

## 2.6 Tinjauan Uji Apoptosis

Apoptosis adalah program kematian sel sebagai respon fisiologis sel untuk mengeliminasi sel-sel yang tidak dibutuhkan tubuh. Apoptosis berperan secara esensial dalam embriogenesis dengan mengeliminasi sel-sel yang jumlahnya berlebihan. Apoptosis juga berperan dalam memantau perubahan pada sel-sel kanker. Apoptosis menjadi garis pertahanan pertama untuk melawan mutasi dengan membersihkan sel-sel DNA abnormal yang dapat menjadi ganas. Dengan demikian apoptosis merupakan bagian dari sistem imun dan juga untuk mengontrol populasi sel normal dalam tubuh (Rang *et al.*, 2003).

Secara fisiologis, apoptosis berlangsung melalui 2 jalur utama yakni jalur ekstrinsik atau jalur *death reseptor*, dan jalur intrinsik atau jalur mitokondria. Pada jalur ekstrinsik, apoptosis dimulai setelah reseptor kematian pada membran

plasma berikatan dengan protein Fas yang diproduksi oleh limfosit T atau makrofag yang mengalami sensitasi. Reaksi ini akan berlangsung melalui jalur apoptosis dan diikuti oleh aktivitas enzim caspase 8 dan 10, selanjutnya menstimulasi efektor apoptosis. Proses apoptosis jalur ekstrinsik ini dapat dipicu oleh stimulasi hormonal, toksin, dan masuknya  $\text{Ca}^{2+}$  ke dalam sel (Kroemer *et al.*, 1997).

Pada jalur intrinsik, aktivasi apoptosis dapat terjadi intraseluler, yaitu inisiasi apoptosis muncul akibat produksi biokimia yang berasal dari stres intraseluler seperti stres oksidatif, perubahan redoks, ikatan kovalen kimia, dan peroksidasi lipid (Reed, 1997). Zat-zat tersebut memberikan sinyal terhadap mitokondria sehingga menyebabkan perubahan mitokondria, dimulai dengan terbentuknya membran bagian luar yang diikuti pembengkakan matriks dan hilangnya potensial membran. Hal ini menyebabkan keluarnya protein-protein mitokondria termasuk sitokrom c sebagai aktivator caspase 9 untuk menggerakkan efektor apoptosis (Green, 1998).

Apoptosis akan menghasilkan badan apoptosis yang terdiri dari fragmen sisa-sisa sel, yang difagositosis oleh sistem retikuloendotelial di sekitarnya. Regulasi apoptosis adalah untuk mempertahankan homeostasis normal, menjaga keseimbangan proliferasi dan kematian di dalam organ multiseluler. Salah satu fungsi apoptosis adalah mencegah kanker dengan cara mengeliminasi sel-sel kanker (Kroemer *et al.*, 1997).

Beberapa metode diketahui dapat mengetahui apoptosis dari sel, diantaranya metode *fluorescent/flowcytometry annexin V – PI*, *Chromogenic Caspase Substrate Based assay*, *TUNEL assay*, dan *double staining* (Zeng *et al.*, 2015). Pada metode Annexin, untuk membedakan antara sel mati dan sel apoptosis, propidium iodida (PI) ditambahkan pada suspensi sel. PI merupakan penanda DNA yang bersifat membran impermeabel, sehingga sel apoptosis dan sel mati dapat dibedakan dengan pelabelan ganda annexin V dan PI. Selanjutnya dapat dianalisis dengan *flowcytometer* atau mikroskop fluoresensi (Plasier *et al.*, 1999). Metode ini merupakan metode yang dapat menghasilkan data kuantitatif, namun terdapat beberapa kekurangan, seperti: keterbatasan sumber daya, alat

yang mahal serta terjadi interaksi nonspesifik pada bagian sel yang memproduksi sinyal tinggi (Zeng *et al.*, 2015).

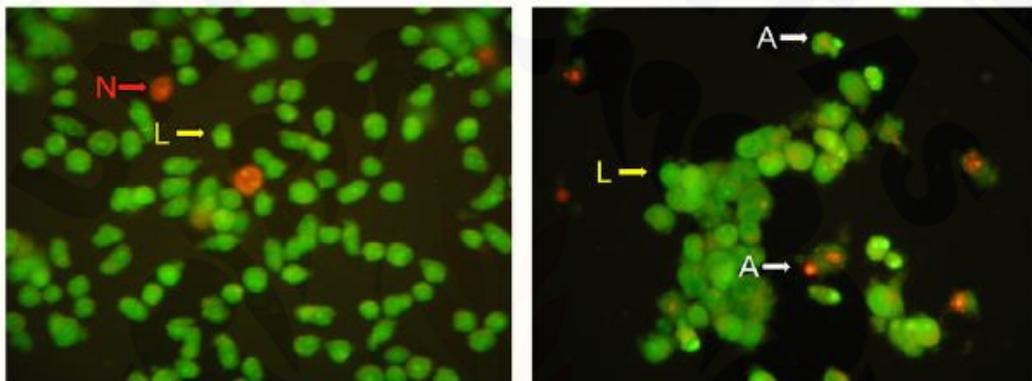
Pada *Chromogenic Caspase Substrate Based assay* data yang dihasilkan berupa data kuantitatif dalam mendeteksi apoptosis. Caspase memiliki peran sentral dalam proses apoptosis, sehingga digunakan inhibitor caspase untuk mendeteksi dini apoptosis. Peptida DEVD dan pewarna DNA NucView 488 digunakan dalam metode ini dengan bantuan mikroskop optik. Peptida DEVD bermuatan negatif melekat pada pewarna DNA sehingga tidak dapat menghasilkan fluoresensi. Substrat dapat menembus membran sel dan menuju sitoplasma, dibelah oleh caspase-3 untuk melepas afinitas tinggi pewarna DNA, kemudian bermigrasi ke inti sel dengan fluoresensi hijau terang. Metode ini tidak dapat digunakan untuk mendeteksi sel atau jaringan spesifik (Zeng *et al.*, 2015). Metode *TUNEL assay (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling)* DNA fragmentasi digunakan sebagai indikator apoptosis. Metode ini memiliki beberapa kekurangan yaitu mahal, membutuhkan banyak waktu serta dapat menghasilkan data yang positif palsu (Zeng *et al.*, 2015).

Metode penentuan apoptosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah *double staining* DNA dengan menggunakan etidium bromida-akridin oranye. Kedua macam zat warna ini digunakan secara bersamaan karena dapat menghasilkan warna kontras, sehingga mempermudah pengamatan dibawah mikroskop fluoresensi. Pengamatan terhadap morfologi sel harus dilakukan dengan segera karena jika larutan *double staining* terlalu lama berinteraksi dengan sel, maka sel yang hidup akan mati. Hal ini disebabkan karena etidium bromide bersifat toksik, sehingga dalam penelitian hanya digunakan konsentrasi yang sangat kecil 5-10  $\mu$ l (Ribble *et al.*, 2005).

Etidium bromida-akridin oranye mampu menembus membran sel dan berinteraksi dengan DNA, sedangkan akridin oranye mengandung gugus kation sehingga dapat berinteraksi dengan DNA sel hidup yang bersifat anionik membentuk garam terdisosiasi akridin oranye dapat memasuki sel dan mewarnai inti sel menjadi hijau. Etidium bromida hanya dapat memasuki sel yang

mengalami kerusakan membran dan mewarnai inti sel menjadi oranye (Ribble *et al.*, 2005).

Pewarnaan dengan metode *double staining* menggunakan akridin oranye dan etidium bromida dapat membedakan sel yang hidup, sel apoptosis, dan sel nekrosis (Gambar 2.8). Sel hidup akan tampak memiliki inti sel dengan bentuk normal hijau. Sel yang mengalami apoptosis akan memiliki inti sel berwarna oranye dengan bentuk inti terkondensasi dan terfragmentasi. Sel yang mengalami nekrosis akan tampak memiliki inti sel berwarna oranye namun bentuk inti sel normal (Ribble *et al.*, 2005).



Gambar 2.8 Sel setelah diwarnai dengan akridin oranye-etidium bromida di bawah mikroskop fluoresensi perbesaran 100 x, (A) sel mengalami apoptosis, (N) sel nekrosis, (L) sel normal/sel hidup (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 efek sitotoksitas dan apoptosis ekstrak kloroform kayu kuning (*A. flava*) terhadap kultur sel kanker kolon WiDr.

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Agustus 2014 bertempat di Laboratorium Fitokimia Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk pembuatan ekstrak kloroform *A. flava*, Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Jogjakarta untuk uji sitotoksitas *in vitro* dan Laboratorium Pusat Penelitian Terpadu UGM untuk uji apoptosis.

### 3.3 Alat dan Bahan

#### 3.3.1 Alat

Pembuatan ekstrak kloroform membutuhkan seperangkat alat gelas, *rotary evaporator* (Heidolph-4000), corong *buchner* dan oven. Penelitian uji sitotoksitas *in vitro* membutuhkan *inverted microscope* (Zeiss), *autoclave*, *class II biosafety cabinet*, *haemocytometer*, *cell counter*, *cryotube*, *microtube*, mikropipet, *ELISA reader* (SLT 240 ATC), inkubator CO<sub>2</sub> (Heraceus), *96 well plate* (Nunc) dan sentrifuge. Uji apoptosis membutuhkan *24 well plate* (Nunc), *cover slip* (Nunc), dan mikroskop fluoresensi (Zeiss MC 80).

### 3.3.2 Bahan

1) Bahan utama: daun *A. flava*, daun yang digunakan adalah daun yang tua, empat helai dari ujung tangkai daun, dari tumbuhan yang telah berbunga penuh, diperoleh dari koleksi Taman Nasional Meru Betiri.

2) Bahan ekstraksi daun *A. flava* : n-heksana dan kloroform (Sigma Aldrich) (jika tidak dinyatakan lain, bahan yang digunakan untuk ekstraksi adalah derajat teknis).

3) Bahan uji *in vitro*:

Ekstrak *A. flava* dilarutkan dalam DMSO (Gibco). Kultur sel WiDr ditumbuhkan dalam media kultur RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (Gibco) . Media kultur mengandung *fetal bovine serum* (Gibco) 10% (v/v) dan antibiotika penisilin-streptomisin (Gibco) 1 % (v/v). Semua sel ditumbuhkan pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub>. Sel dipanen dari *tissue culture dish* menggunakan tripsin-EDTA 0,25% untuk membantu melepaskan sel dan PBS (Sigma) untuk mencuci sel.

a. Bahan uji sitotoksisitas dengan *MTT assay* membutuhkan pereaksi berikut:

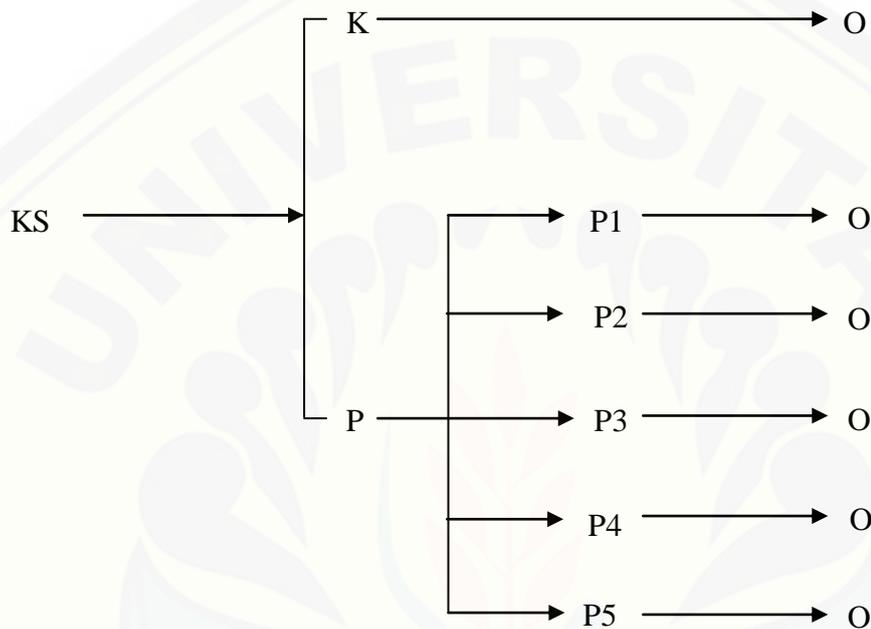
1. Pereaksi MTT 5mg/ml PBS (Sigma). Larutan uji MTT: 1 ml MTT ditambah dengan media kultur RPMI 10 ml.

2. Pereaksi *stopper*. Pereaksi mengandung natrium dodesil sulfat (SDS) (Sigma) 10% dalam 0,1 N HCl (Merck).

b. Bahan uji apoptosis: akridin oranye (Bio-Rad) dan etidium bromida (Bio-Rad) (jika tidak dinyatakan lain, bahan yang digunakan untuk uji *in vitro* adalah derajat pro analisis atau *molecular grade*).

### 3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian merupakan suatu strategi untuk mencapai tujuan penelitian yang telah ditetapkan serta berperan sebagai pedoman peneliti pada seluruh proses penelitian. Secara skematis rancangan penelitian dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 3.1 Diagram uji sitotoksitas *in vitro*

Keterangan :

KS : Kultur sel

K : Kelompok kontrol (tanpa perlakuan)

P : Kelompok dengan perlakuan ekstrak kloroform *A. flava*

P1 : Kelompok dengan perlakuan ekstrak kloroform *A. flava* 50 µg/ml

P2 : Kelompok dengan perlakuan ekstrak kloroform *A. flava* 100 µg/ml

P3 : Kelompok dengan perlakuan ekstrak kloroform *A. flava* 200 µg/ml

P4 : Kelompok dengan perlakuan ekstrak kloroform *A. flava* 300 µg/ml

P5 : Kelompok dengan perlakuan ekstrak kloroform *A. flava* 400 µg/ml

O : Penentuan viabilitas sel

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak kloroform *A. flava* dengan 5 seri konsentrasi.

#### 3.5.2 Variabel Terikat

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

#### 3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi, jenis sel kanker, dan perlakuan terhadap sel.

### 3.6. Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini adalah:

- a. Simplisia dibuat dengan cara mengeringkan daun kayu kuning.
- b. Serbuk dibuat dengan cara menghaluskan simplisia dengan blender sehingga didapatkan ukuran partikel yang lebih kecil.
- c. *Defatting*, merupakan proses menghilangkan lemak yang terkandung dalam daun kayu kuning menggunakan pelarut n-heksana.
- d. Ekstraksi merupakan proses pengambilan senyawa aktif dalam daun kayu kuning menggunakan pelarut kloroform secara maserasi.
- e. Uji sitotoksitas dilakukan dengan menggunakan metode MTT terhadap sel kanker kolon WiDr dan inkubasi selama 24 jam.
- f. Uji apoptosis dilakukan dengan menggunakan *double staining method* dengan waktu inkubasi 24 jam.

### 3.7 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.7.1 Pembuatan Ekstrak Kloroform *A. flava*

Metode berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Keawpradub *et al.*, (2005) dengan modifikasi: 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 masing-masing selama 2 x 24 jam. Ampas dari ekstraksi menggunakan n-heksana diekstraksi kembali menggunakan kloroform sebanyak 3 kali ulangan masing masing selama 2 x 24 jam (volume pelarut yang digunakan sebanyak 3x dari berat serbuk daun). Maserat kemudian dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* dan dikeringkan dengan oven pada 30°C. Ekstrak kloroform *A. flava* selanjutnya dibuat sediaan suspensi dalam DMSO 1 % untuk uji *in vitro*.

#### 3.7.2 Pembuatan Media Cair RPMI

Menyiapkan serbuk RPMI 1640 dan 950 ml akuabides steril dalam gelas beker 1000 ml dalam LAF. Kemudian serbuk dituang ke dalam akuabides steril dalam gelas beker, diaduk rata. Bagian dalam pembungkus media serbuk dibilas dengan akuabides, dan cairan kembali dituang pada gelas beker. Selanjutnya ditambahkan 2,2 g NaHCO<sub>3</sub> untuk setiap liter media yang dibuat. Akuabides steril ditambahkan hingga volume 1000 ml kemudian diaduk dengan magnetik stirrer hingga semua media padat dan NaHCO<sub>3</sub> dapat larut. Kemudian dilakukan *adjust* pH seharga 0,2 – 0,3 dibawah pH yang diinginkan (7,0 hingga 7,4) dengan menambahkan NaOH 1 N atau HCl 1 N. Kemudian dilakukan filtrasi media dengan filter 0,22 mikron, ditampung ke dalam botol duran 1000 ml media disimpan pada kulkas dengan suhu 4°C.

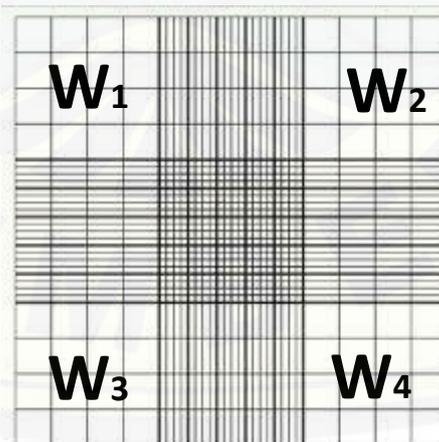
#### 3.7.3 Pembuatan Media Kultur Lengkap

FBS (*fetal bovine serum*) dan penisilin-streptomisin dicairkan pada suhu kamar sebelum digunakan, kemudian diambil 10 ml FBS dan dituang kedalam botol duran. Diambil 1 ml penisilin-streptomisin dan dituang ke dalam botol

duran. Media cair ditambahkan hingga 100 ml dan diberi penandaan pada botol berupa nama media, serta tanggal pembuatan media kultur lengkap.

#### 3.7.4 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  $\pm 5$  ml suspensi sel ditumbuhkan dalam *tissue culture dish* dan diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37 °C dan aliran CO<sub>2</sub> 5 %. Dua puluh empat jam kemudian dilakukan penggantian media kultur dengan cara membuang media melalui pipet dan mencuci sel dengan PBS dua kali. Sel ditambah dengan tripsin 0,25 % untuk melepas sel dari *tissue culture dish* dan dilakukan inkubasi selama kurang lebih 5 menit dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Sebanyak  $\pm 5$  ml media ditambahkan ke dalam *tissue culture dish* dan sel diresuspensi hingga terlepas semua dari dinding *tissue culture dish*. Sel kemudian dipindahkan ke dalam *conical tube* steril baru. Sebanyak 10  $\mu$ l sel dihitung dengan *haemocytometer* dan *cell counter* lalu dibuat suspensi sel dengan konsentrasi 10.000 sel tiap plate.



Gambar 3.2 *Haemocytometer* dilihat di bawah mikroskop *inverted*

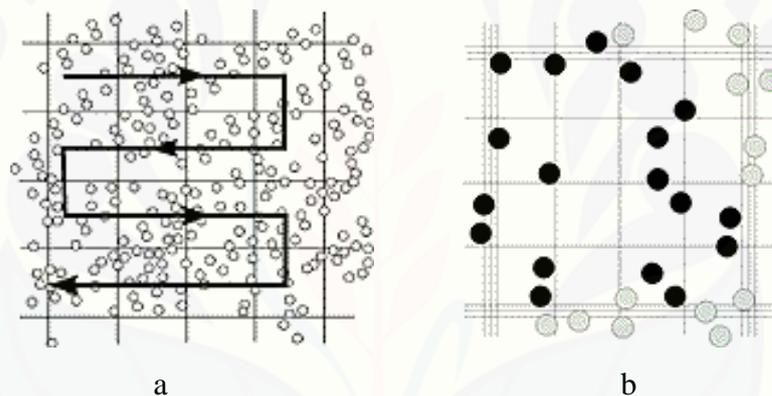
Terdapat 4 kamar hitung yang ditandai oleh huruf W, setiap kamar hitung terdiri dari 16 kotak (Gambar 3.2). Sel yang gelap (mati) dan sel yang berada dibatas luar sebelah bawah dan sebelah kanan tidak dihitung. Sel dibatas kiri dan batas atas dihitung (Gambar 3.3) dan dimasukkan pada Persamaan 1.

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

Kemudian menghitung jumlah (ml) sel yang dipanen menggunakan Persamaan 2.

$$\text{Jumlah (ml) sel yang dipanen} = \frac{1.10^4 \times \sum \text{sumuran}}{\text{jumlah sel terhitung} \times 10^4} \quad \dots (2)$$

Kemudian ditambahkan dengan media kultur sampai tanda 10 ml.



Gambar 3.3 Cara menghitung sel menggunakan hemositometer (a)Alur perhitungan sel (b)cara perhitungan sel (●) menunjukkan sel yang dihitung, (○) menunjukkan sel yang tidak dihitung (Tim QC APH Golongan Jamur, 2009)

### 3.7.5 Preparasi sampel

Ditimbang sampel 10 mg dengan seksama menggunakan neraca analitik di dalam *microtube*, kemudian dilarutkan dalam 0,1 ml DMSO dengan bantuan vortex sebagai konsentrasi induk. Setelah diperoleh konsentrasi induk, selanjutnya dibuat seri konsentrasi sampel dengan pengenceran konsentrasi induk menggunakan media kultur sampai diperoleh 5 seri konsentrasi, yaitu 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml dan 400 µg/ml.

### 3.7.6 Uji Sitotoksitas Menggunakan *MTT assay*

Sel ( $1 \times 10^4$  sel/sumuran) ditumbuhkan ke dalam 96 *well plate*. Sel ditransfer ke dalam sumuran, masing-masing 100  $\mu$ l. Setiap kali mengisi sumuran, diresuspensi kembali sel agar tetap homogen, disisakan 3 sumuran kosong atau tidak diisi dengan sel sebagai kontrol media. Keadaan sel diamati pada mikroskop untuk melihat distribusi sel. Selanjutnya sel diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam agar sel pulih kembali setelah panen. *Plate* yang berisi sel diambil dari inkubator kemudian media sel dibuang dengan cara membalikkan *plate* 180° diatas tempat buangan, kemudian *plate* ditekan secara perlahan diatas tisu makan untuk meniriskan sisa cairan. *Plate* dicuci dengan cara memasukkan 100  $\mu$ l PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian PBS dibuang dengan cara membalikkan *plate* kembali dan sisa cairan ditiriskan dengan tisu. Seri konsentrasi sampel (50, 100, 200, 300 dan 400  $\mu$ g/ml) dimasukkan ke dalam sumuran masing-masing secara triplo sebanyak 100  $\mu$ l kemudian kembali diinkubasi di dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 24 jam. Pada akhir waktu inkubasi, kondisi sel didokumentasikan untuk setiap perlakuan di bawah mikroskop *inverted* (Pebriana *et al.*, 2008).

Media sel dibuang kemudian dicuci dengan PBS 1x dan ditambahkan larutan uji MTT 110  $\mu$ l ke setiap sumuran, termasuk kontrol media. Sel diinkubasi kembali selama 4 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> sampai terbentuk kristal formazan. Kondisi sel diperiksa kembali dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan *stopper* SDS 10% dalam 0,1 N HCl. Pemberian *stopper* ini tidak perlu dilakukan di dalam LAF. Setelah itu, *plate* dibungkus dengan kertas atau alumunium foil dan diinkubasikan ditempat gelap (suhu ruangan) selama semalam. Setelah selesai, ELISA *reader* dihidupkan, ditunggu proses *progressing* hingga selesai. Pembungkus *plate* dan tutup *plate* dibuka, kemudian dimasukkan ke dalam ELISA *reader* dan absorbansi masing-masing sumuran dibaca dengan ELISA *reader* dengan  $\lambda=595$  nm (Pebriana *et al.*, 2008).

### 3.7.7 Uji Apoptosis Sel dengan *Double Staining Method*

Disiapkan 24 *well plate* dan *cover slip*, satu *cover slip* dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran menggunakan pinset secara seksama. Sebanyak 1000  $\mu\text{l}$  suspensi sel dengan kepadatan  $5 \times 10^4$  sel ditransfer ke atas *cover slip*. Setiap akan mengisi sumuran sel diresuspensi kembali. Keadaan sel diamati pada mikroskop untuk melihat distribusi sel. Sel diinkubasi di dalam inkubator  $\text{CO}_2$  pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Setelah diinkubasi, dibuat 2 konsentrasi sampel yaitu konsentrasi  $\text{IC}_{50}$  dan  $1,5 \text{ IC}_{50}$ . Kemudian diambil 24 *well plate* dari inkubator  $\text{CO}_2$ , semua media kultur dibuang dengan pipet pasteur secara perlahan dan diisikan dengan PBS masing masing 300  $\mu\text{l}$ . PBS dibuang dengan pipet pasteur secara perlahan dan sampel dimasukkan ke dalam sumuran. Kontrol media juga dimasukkan dan diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam. Setelah diinkubasi, kondisi sel didokumentasikan kemudian semua media dibuang dengan pipet pasteur dan cuci dengan PBS 500  $\mu\text{l}$  kemudian PBS dibuang. *Cover slip* diambil dengan pinset dengan bantuan ujung jarum secara hati-hati dan diletakkan di atas gelas obyek, posisi sel harus berada di atas kemudian beri label. Diteteskan sebanyak 10  $\mu\text{l}$  reagen etidium bromida-akridin oranye di atas *cover slip* dan diratakan dengan cara digoyang secara perlahan kemudian diamati dibawah mikroskop fluoresensi dengan perbesaran 100 x. Jika pewarnaan belum optimal, ditunggu beberapa menit dan diamati kembali. Kemudian didokumentasikan dengan cara set kamera dengan *setting* khusus untuk mikroskop fluoresensi (Pebriana *et al.*, 2008).

## 3.8 Analisis Data

### 3.8.1 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.

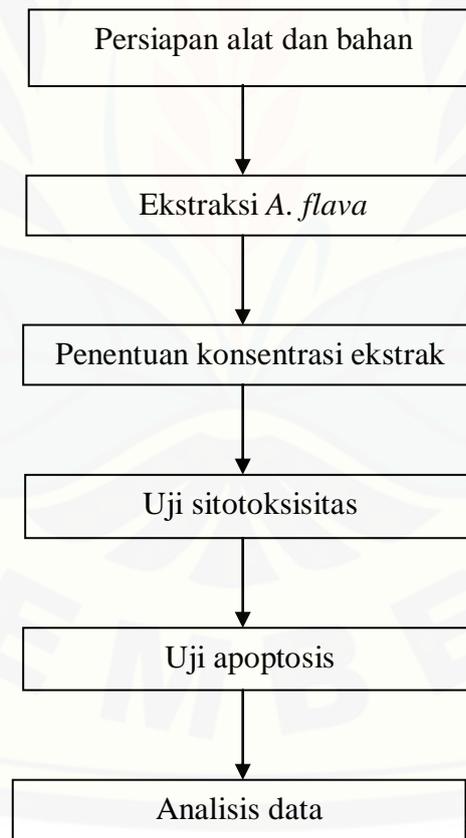
$$\text{viabilitas sel} = \frac{\text{Abs. sel perlakuan} - \text{abs. kontrol media}}{\text{Abs. sel kontrol} - \text{abs. kontrol media}} \times 100\% \quad \dots (3)$$

Grafik konsentrasi senyawa uji vs viabilitas sel disajikan sebagai rata-rata  $\pm$  SD (*Standard Deviation*) dari 3 eksperimen. Data yang berupa viabilitas sel kemudian dianalisis dengan program probit untuk memperoleh nilai  $IC_{50}$ .

### 3.8.2 Analisis Data Uji Apoptosis

Data apoptosis berupa data semi-kuantitatif yang diperoleh dari hasil pengamatan morfologi sel menggunakan mikroskop flouresensi. Sel yang hidup akan berflouresen hijau dengan akridin oranye dan sel yang mati akan berflouresens oranye dengan etidium bromida. Kemudian dilakukan perhitungan sel hidup, apoptosis dan nekrosis dengan bantuan *cell counter* pada aplikasi Image-J agar sel yang telah dihitung tidak terhitung kembali.

### 3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.4 Diagram alur penelitian

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil

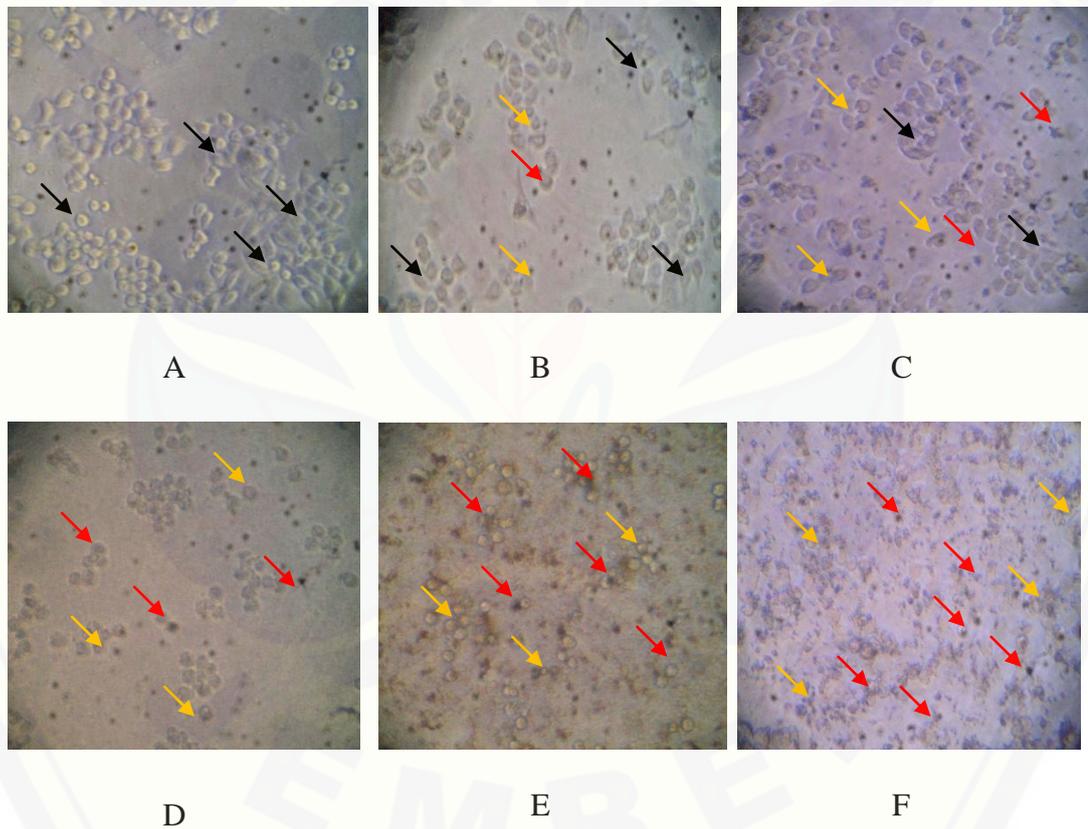
Pada penelitian ini, didapatkan ekstrak kloroform *A. flava* dengan rendemen sebesar 1,16% b/b dari 100 gram simplisia. Ekstrak kloroform *A. flava* diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker kolon WiDr pada berbagai konsentrasi. Selanjutnya dilakukan uji apoptosis berdasarkan nilai  $IC_{50}$  dari hasil uji sitotoksik, serta dilakukan analisis semikuantitatif untuk melihat potensi ekstrak dalam memacu apoptosis.

#### 4.1.1 Hasil Uji Sitotoksitas

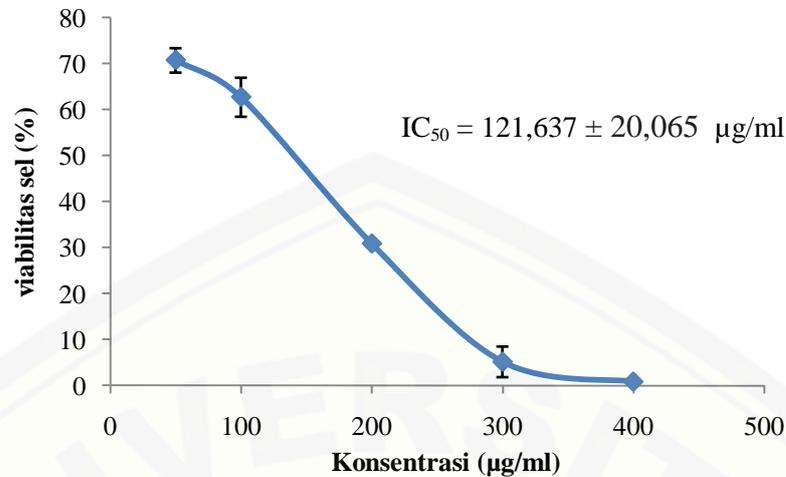
Pengamatan morfologi sel dilakukan di bawah mikroskop *inverted*. Pemaparan ekstrak kloroform daun *A. flava* memberikan pengaruh terhadap morfologi sel WiDr. Gambar 4.1 menunjukkan adanya perbedaan morfologi pada sel kanker kolon WiDr dengan semakin tingginya konsentrasi ekstrak yang diberikan. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka semakin banyak pula sel yang mengalami kematian. Sel yang hidup berbentuk panjang dan melekat di dasar *plate*, sedangkan sel yang mati berbentuk bulat kecil dan mengapung.

Uji sitotoksik ekstrak kloroform daun *A. flava* terhadap sel kanker kolon WiDr memberikan hasil berupa penurunan viabilitas sel (% sel hidup) seiring dengan peningkatan kadar. Sensitivitas sel WiDr terhadap ekstrak kloroform *A. flava* bersifat *dose-dependent*. Semakin tinggi konsentrasi, maka semakin rendah viabilitas sel (Gambar 4.2). Pada konsentrasi larutan uji 50  $\mu\text{g/ml}$  menunjukkan viabilitas sel sebesar 70,77%; 100  $\mu\text{g/ml}$  sebesar 62,76 %, 200  $\mu\text{g/ml}$  sebesar 30,91 %; 300  $\mu\text{g/ml}$  sebesar 5,22 %; dan 400  $\mu\text{g/ml}$  sebesar 0,91 %.

Nilai  $IC_{50}$  dihitung dengan analisis probit berdasarkan data konsentrasi ekstrak kloroform daun *A. flava* dan viabilitas sel yang diperoleh dari 3 eksperimen. Nilai  $IC_{50}$  rata-rata dari 3 eksperimen yaitu sebesar  $121,637 \pm 20,065$   $\mu\text{g/ml}$  dengan nilai CV sebesar 16,49 %. Penyimpangan ini dapat terjadi karena setiap eksperimen dilakukan pada waktu yang berbeda, sehingga memungkinkan adanya perbedaan suhu saat perlakuan. Batasan nilai CV maksimal yang diperbolehkan untuk uji menggunakan sel adalah sebesar 30 %. 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 di bawah mikroskop *inverted* dengan perbesaran 700x (A) sel WiDr tanpa perlakuan setelah inkubasi 24 jam, (B) pada perlakuan ekstrak kloroform *A. flava* 50  $\mu\text{g/ml}$ , (C) 100  $\mu\text{g/ml}$ , (D) 200  $\mu\text{g/ml}$ , (E) 300  $\mu\text{g/ml}$ , (F) 400  $\mu\text{g/ml}$  setelah inkubasi 24 jam. Keterangan: sel hidup ( $\rightarrow$ ), sel mati ( $\rightarrow$ ), sel apoptosis dengan terlihatnya membran *blebbing* ( $\rightarrow$ ).

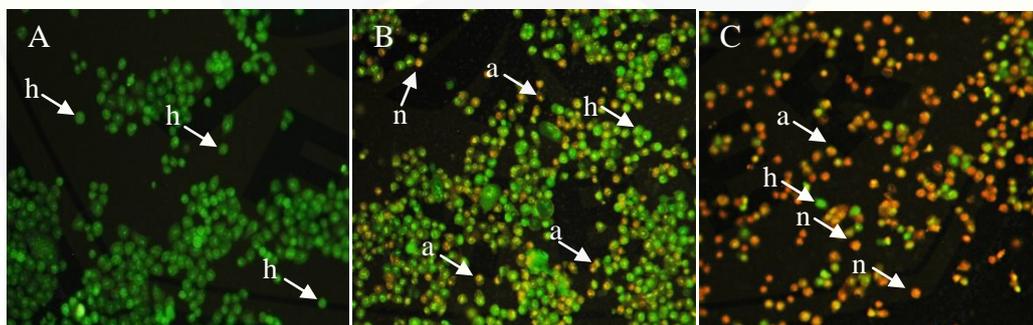


Gambar 4.2 Hasil uji sitotoksitas ekstrak kloroform *A. flava* terhadap sel kanker kolon WiDr dengan metode MTT dan inkubasi selama 24 jam, data disajikan dari rata-rata  $\pm$  SD ( $n=3$ )

#### 4.1.2 Hasil Uji Apoptosis

Konsentrasi ekstrak pada uji apoptosis dibuat berdasarkan nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan pada uji sitotoksitas, yaitu dengan nilai  $IC_{50}$  dan  $1,5 IC_{50}$ . Didapatkan nilai  $IC_{50}$  adalah sebesar  $122 \mu\text{g/ml}$ , sehingga diperoleh konsentrasi uji untuk apoptosis sebesar  $120 \mu\text{g/ml}$  dan  $180 \mu\text{g/ml}$ .

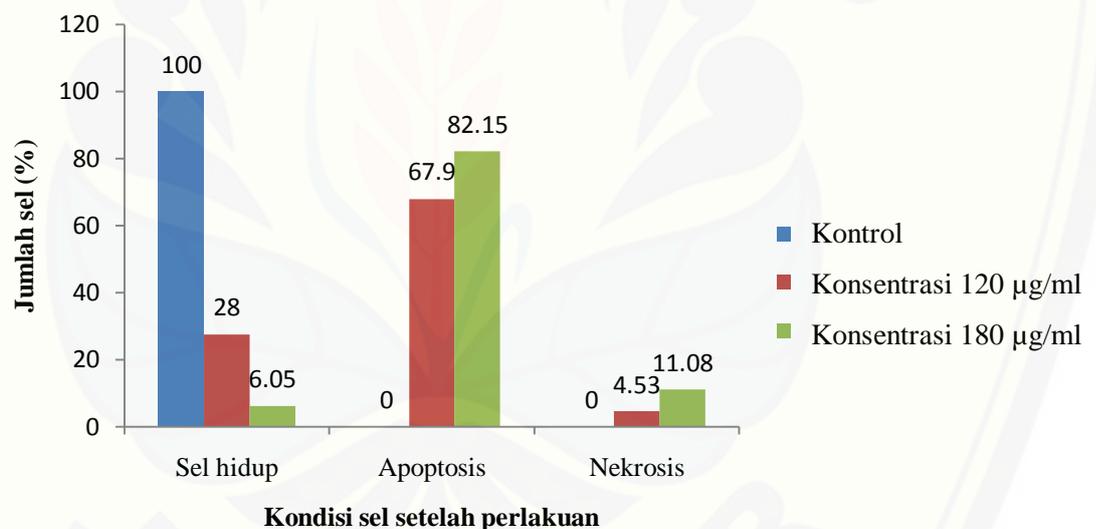
Berdasarkan hasil uji apoptosis, terlihat seluruh sel berfluoresensi hijau terang pada kontrol sel. Sel dengan perlakuan  $120 \mu\text{g/ml}$  dan  $180 \mu\text{g/ml}$  menunjukkan sebagian besar berfluoresensi oranye dan semakin sedikit sel berfluoresensi hijau seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Sel kanker kolon WiDr di bawah mikroskop fluoresensi perbesaran 100x setelah pemberian larutan *staining* (A) kontrol sel; (B) ekstrak  $120 \mu\text{g/ml}$ ; (C) ekstrak  $180 \mu\text{g/ml}$ . (h) sel hidup; (n) sel nekrosis; (a) sel apoptosis.

Pada kelompok perlakuan, hampir semua sel mengalami kematian secara apoptosis yang terlihat dengan adanya fragmentasi DNA. Terdapat pula sel yang berwarna hijau namun terfragmentasi, sel tersebut mengalami *blebbing* yang merupakan tahap awal apoptosis sel. Selanjutnya dilakukan analisis semi-kuantitatif yaitu dengan menghitung sel hidup, apoptosis dan nekrosis menggunakan *cell counter* aplikasi *Image-J* untuk mengetahui potensi pemicuan apoptosis dari ekstrak kloroform daun *A. flava* (Gambar 4.4).

Berdasarkan hasil analisis semi-kuantitatif, diketahui bahwa ekstrak kloroform dapat memicu apoptosis seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Terjadi peningkatan nekrosis pula dengan semakin tingginya konsentrasi ekstrak.



Gambar 4.3 Kondisi sel setelah diberi perlakuan berupa kontrol, ekstrak dengan konsentrasi 120 µg/ml dan 180 µg/ml. Inkubasi selama 24 jam dan dilakukan uji apoptosis metode *double staining*.

## 4.2 Pembahasan

Uji sitotoksitas dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik ekstrak kloroform daun *A. flava in vitro* terhadap sel kanker kolon WiDr. Metode uji yang

digunakan adalah metode *microculture tetrazolium technique* (MTT). Metode uji MTT merupakan metode yang sensitif, kuantitatif dan terpercaya yang digunakan untuk mengukur aktivitas metabolit kultur sel *in vitro* berdasarkan pembentukan kristal formazan yang berwarna ungu. Prinsip dari metode ini adalah reduksi MTT menjadi garam formazan pada mitokondria dalam keadaan aktif. Reduksi dalam sel melibatkan reaksi enzimatik NADH atau NADPH yang dihasilkan oleh sel hidup sehingga menghasilkan endapan yang tidak larut. Pemecahan MTT terjadi pada mitokondria sel yang hidup oleh enzim suksinat dehidrogenase. Absorbansi yang dihasilkan sebanding dengan konsentrasi formazan yang larut dalam SDS. Semakin tinggi intensitas warna ungu, maka semakin banyak jumlah sel hidup (Mosmann, 1983).

Berdasarkan hasil uji sitotoksik ini, diperoleh nilai rata-rata  $IC_{50}$  dari tiga eksperimen sebesar  $121,637 \pm 20,065 \mu\text{g/ml}$ . Nilai  $IC_{50}$  ini menunjukkan konsentrasi yang dibutuhkan untuk dapat menghambat pertumbuhan sel kanker WiDr sebesar 50% dari populasi. Artinya, dengan konsentrasi ekstrak  $122 \mu\text{g/ml}$  dapat menghambat pertumbuhan sel WiDr sebanyak 50% dari total populasi. Berdasarkan nilai  $IC_{50}$ , ekstrak kloroform daun *A. flava* dikatakan memiliki potensi sebagai senyawa sitotoksik pada sel kanker kolon WiDr karena nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan tidak lebih dari  $500 \mu\text{g/ml}$ . Suatu ekstrak dianggap memiliki efek sitotoksik apabila nilai  $IC_{50} < 500 \mu\text{g/ml}$  (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 dan Griffiths, 2000).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Habibi (2015) mengenai aktivitas sitotoksik ekstrak etanol *A. flava* terhadap sel kanker kolon WiDr, ekstrak etanol daun *A. flava* mampu memberikan efek sitotoksitas terhadap sel kanker kolon WiDr dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $308 \mu\text{g/ml}$ . Ekstrak kloroform daun *A. flava* menghasilkan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $122 \mu\text{g/ml}$ . Berdasarkan nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh, diketahui ekstrak kloroform *A. flava* memiliki aktivitas sitotoksik lebih

baik dibandingkan dengan ekstrak etanol *A. flava* dalam menghambat sel kanker kolon WiDr. Hal ini disebabkan karena solven yang digunakan saat ekstraksi. *A. flava* mengandung alkaloid isokuinolin, yaitu alkaloid yang mengandung inti isokuinolin dalam struktur kimianya seperti jatrorizin, palmatin dan berberin yang dapat memberikan aktivitas sitotoksik (Keawpradub *et al.*, 2005). Salah satu sifat alkaloid adalah dalam bentuk bebasnya, alkaloid tidak larut dalam air, tetapi larut dalam kloroform, eter, dan pelarut organik lain yang bersifat relatif non polar atau semipolar (Rogers dan Wink, 1998).

Selanjutnya dilakukan uji apoptosis untuk melihat adanya kemungkinan lain dalam penghambatan proliferasi sel. Induksi apoptosis merupakan salah satu efek yang diinginkan dari senyawa antikanker. Proses kematian sel melalui mekanisme apoptosis penting digunakan sebagai indikasi selektifitas ekstrak kloroform *A. flava* sebagai agen kemopreventif. Selektivitas menjadi titik tangkap yang penting dalam pengobatan kanker. Proses kematian sel melalui apoptosis tidak menimbulkan respon inflamasi (Gewies, 2003) dan mengurangi efek samping pada pasien (Herbert, 2003).

Pengamatan adanya apoptosis dilakukan dengan pemberian akridin oranye dan etidium bromida (*double staining*). Konsentrasi larutan uji yang digunakan sebesar 120 µg/ml dan 180 µg/ml. Dengan konsentrasi tersebut, larutan uji dapat memberikan efek yang lebih nyata. Inkubasi dilakukan selama 24 jam. Rentang waktu ini ditetapkan berdasarkan profil kinetika proliferasi sel. Pada jam ke-24 diperoleh nilai absorbansi minimum (Meiyanto *et al.*, 2005). Sel hidup akan tampak memiliki inti sel dengan bentuk normal dan berwarna hijau. Sel yang mengalami apoptosis akan memiliki inti sel berwarna oranye dengan bentuk yang terkondensiasi atau terfragmentasi. Sedangkan sel yang mengalami nekrosis akan tampak memiliki inti sel berwarna oranye namun dalam bentuk inti sel normal (Ribble *et al.*, 2005). Pengamatan secara morfologi sel WiDr menunjukkan adanya perbedaan morfologi antara sel yang hidup dan sel yang mati. Hal tersebut dikarenakan adanya interaksi antara DNA sel dengan reagen (McGahon *et al.*, 1995).

Pada kelompok kontrol sel yang tidak diberi perlakuan ekstrak, diperoleh hasil 100% sel dalam keadaan hidup yang ditandai dengan fluoresensi hijau, bentuk normal, dan tidak terfragmentasi. Pada sel yang diberi perlakuan ekstrak dengan konsentrasi 120 µg/ml menunjukkan sebagian besar sel mengalami kematian yang ditandai dengan fluoresensi sel yang berwarna oranye dimana 67,975% mengalami apoptosis dan 4,539% mengalami nekrosis. Efek yang lebih nyata ditunjukkan oleh kelompok sel yang diberi perlakuan dengan konsentrasi ekstrak 180 µg/ml. Hampir seluruh sel mengalami kematian yaitu 82,153% sel mengalami apoptosis dan 11,802% mengalami nekrosis. Semakin tinggi dosis yang diberikan maka semakin tinggi pula % apoptosis yang dihasilkan, hal ini disebabkan karena senyawa kimia yang terkandung di dalam ekstrak juga semakin tinggi sehingga dapat lebih menghambat proliferasi dari sel kanker. Semakin tinggi konsentrasi yang diberikan dalam perlakuan maka semakin banyak pula sel yang mengalami nekrosis. Nekrosis dapat terjadi karena terjadi stres yang menyebabkan sel kemudian mati (Meiyanto *et al.*, 2005).

Pada sel hidup, fluoresensi hijau terang disebabkan karena adanya interaksi antara DNA sel dengan akridin oranye. Akridin oranye mengandung gugus kation sehingga dapat berinteraksi dengan sel hidup yang bersifat anionik dan membentuk garam terdisosiasi dan dapat memasuki sel sehingga mewarnai DNA sel menjadi hijau. Sedangkan pada sel yang mati, terjadi penurunan integritas membran sel sehingga membran sel dapat ditembus oleh etidium bromida dan mewarnai DNA sel menjadi oranye. Proses apoptosis sel dimulai dengan terjadinya pengerutan sel sehingga sel berukuran lebih kecil. Kemudian terjadi kondensasi kromatin dan menunjukkan terjadinya membran *blebbing* yang mana permukaan sel mengalami fragmentasi menjadi sejumlah badan apoptosis (Ribble *et al.*, 2005).

Aktivitas sitotoksik dan apoptosis yang dimiliki oleh ekstrak kloroform *A. flava* disebabkan oleh senyawa yang terkandung dalam tumbuhan *A. flava*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Keawpradub *et al* (2005), senyawa yang terkandung dalam ekstrak kloroform *A. flava* antara lain berberin, jatrorizin, dan palmatin. Ketiga senyawa tersebut memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel

kanker MCF-7 dengan aktivitas terbesar dimiliki oleh berberin. Kadar berberin dalam ekstrak kloroform daun *A. flava* adalah 0,0423% b/b (Baroroh, 2014). Berberin diketahui mampu menekan karsinogenesis dengan mekanisme penghambatan terhadap enzim siklooksigenase-2 (COX-2) (Sun *et al.*, 2009). Salah satu karakteristik dari sel WiDr adalah ekspresi COX-2 yang tinggi sehingga dapat memacu proliferasi sel WiDr (Palozza *et al.*, 2005). Berdasarkan data tersebut, maka diduga aktivitas sitotoksik ini disebabkan oleh kandungan berberin.

Mekanisme berberin dalam memacu apoptosis adalah melalui jalur ekstrinsik dengan menginduksi sinyal kematian sel. Sinyal kematian dihubungkan dengan pelaksanaan apoptosis oleh tahap integrasi atau pengaturan. Pada tahap ini terdapat molekul regulator positif atau negatif yang dapat menghambat, memacu, mencegah apoptosis sehingga menentukan apakah sel tetap hidup atau mengalami apoptosis (mati). Apoptosis diperantarai oleh famili protease yang disebut caspase, yang diaktifkan melalui proteolisis dari bentuk prekursor inaktifnya. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Wang *et al.*, (2012), berberin dapat menstimulasi mediator *caspase-independent cell death*, merilis faktor induksi apoptosis (AIF) dari mitokondria dan translokasi sel saat produksi *reactive oxygen species* (ROS). Ameliorasi berberin menstimulasi atau produksi ROS atau mensupresi ekspresi AIF untuk menginduksi kematian sel. Apoptosis akan menghasilkan *apoptotic bodies* yang terdiri dari fragmen sel, yang akan difagositosis oleh sistem retikuloendotelial di sekitarnya. Penelitian lain yang dilakukan oleh Pandey *et al.*, (2008) berberin mampu menghambat produksi gen antiapoptosis.

Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa ekstrak kloroform daun *A. flava* memiliki potensi memicu apoptosis sel kanker kolon WiDr. Efek sitotoksik dan apoptosis ini disebabkan oleh senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman *A. flava*. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Keawpradub *et al* (2005), ekstrak kloroform *A. flava* memiliki kemampuan sitotoksik terhadap sel kanker MCF-7 yang dapat disebabkan oleh kandungan alkaloida berberin yang ada di dalamnya. Mekanisme berberin dalam memacu

apoptosis adalah melalui jalur ekstrinsik dengan menginduksi sinyal kematian sel serta transduksi sinyal dan induksi gen apoptosis. Namun, belum diketahui secara pasti mengenai mekanisme ekstrak kloroform *A. flava* dalam memacu apoptosis, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme apoptosis. Penelitian ini menggunakan ekstrak, sehingga tidak menutup kemungkinan terdapat senyawa lain yang juga berpotensi memiliki efek sitotoksik dan memacu apoptosis sel.



## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak kloroform *A. flava* memiliki potensi sebagai agen kemoprevensi berdasarkan aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker kolon WiDr dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar  $121,637 \pm 20,065 \mu\text{g/ml}$ .
2. Ekstrak kloroform *A. flava* dapat memicu apoptosis sel kanker kolon WiDr.

### 5.2 SARAN

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

1. Perlu dilakukan uji selektivitas ekstrak kloroform daun *A. flava* terhadap sel normal.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme kemampuan ekstrak kloroform *A. flava* dalam memicu apoptosis sel kanker kolon WiDr.

**DAFTAR PUSTAKA**

- ACS (American Cancer Society), 2015, Colorectal Cancer, <http://www.cancer.org/colonandrectumcancer/detailedguide/colorectal-cancer-what-is-colorectal-cancer> [diakses 10 Februari 2015]
- American Society of Clinical Oncology, 2012, Chemoprevention, Navigating Cancer Care/Prevention and Healthy Living, *National Cancer Institute*.
- Anderson, J.C., Attam, R., Alpern, Z., Messina, C.R., Hubbard, P., Grimson, R., 2003, Prevalence of Colorectal Neoplasia in Smokers, *Am J Gastroenterol*, 98: 2777–83.
- Baroroh, R.K., 2014, Pengaruh Ekstrak Kloroform Akar Kuning (*Arcangelisia flava* Merr.) terhadap sistem Imun Tikus Jantan Putih Galur Wistar yang Dipejani Doxorubicin, Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Bhowmik, D., Hossain, M., Buzzetti, F., Auria, R., Lombardi, P., Kumar, G. S., 2012, Biophysical Studies on the Effect of the 13 Position Substitution of the Anticancer alkaloid Berberine on Its DNA Binding. *J. Phys. Chem. B*, 116: 2314-2324.
- Bisset, D., Ahmed, F., McLeod, H. L., Cassidy, J., Cunningham, D., Haller, D. G., Miles, A., 2000, *The Effective Management of Colorectal Carcinoma*, London: Aesculapius Med. Press, 51-62.
- Bray F., Jemal A., Grey N., 2012, Global cancer Transitions According to the Human Development Index (2008-2030): A Population-based Study, *Lancet Oncol*, 13: 790-801
- Cappell, Mitchell S., 2005, The Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis of Colon Cancer and Adenomatous Polyps, *Med Clin N Am*, 89: 1–42.
- 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.
- 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.
- Febrinasari, R. P., Wasita, B., Wiyono., Nanang., 2012, Ekstrak Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* L. Merr) Sebagai Antikanker Leher Rahim, *Penelitian Hibah Bersaing 2012*, UNS.
- Gewies, Andreas., 2003, Introduction to Apoptosis, *ApoReview*, 3(1): 1-26.
- 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.
- Giovannucci, E., Ascherio A., Rimm E.B., Colditz G.A., Stampfer M.J., Willett W.C., 1995, Physical Activity, Obesity and Risk of Colon Cancer and Adenoma in Men, *Ann Intern Med.*, 122: 327-347.
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998, Mitochondria and Apoptosis, *Science*, 281: 1309-1312.
- Habibi, M. S., 2015, Uji Sitotoksitas dan Apoptosis Ekstrak Etanol Daun Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* L. Merr) terhadap Kultur Sel Kanker Kolon WiDr *In Vitro*, Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Handoko, F. F., Martuti, A. A., Rivanti, E., Putri, D. D P., Meiyanto, E., 2011, Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanolik Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) terhadap Sel Kanker Serviks HeLa dan Sel Kanker Kolon WiDr, *Majalah Kesehatan PharmaMedika* (3): 1.
- Hasanah, M., 2013, Penelaahan terhadap Plasma Nutfah Khusus: Tanaman Obat, *Komisi Nasional Sumber Daya Genetik*. [http://indoplasma.or.id/artikel/artikel\\_2005\\_penelahaan\\_pn\\_khusus.htm](http://indoplasma.or.id/artikel/artikel_2005_penelahaan_pn_khusus.htm). diakses 10 September 2014.
- Herbert, S., 2003, Advances in Breast Cancer Therapy and Chemoprevention: Current Strategies and New Approaches, *Cancer Therapy*, 1: 363-371.
- Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid I-III, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta, 1852 hal.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 2013, Latest World Cancer Statistics. Global Cancer Burden Rises to 14.1 Million New Cases in 2012: Marked Increase in Breast Cancers must be Addressed, *Press Release* No. 223, World Health Organization.

- 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.
- 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*., Songklanakarin J. *Sci. Technol.*, 27(2): 455-467.
- Kintzois, S. and Barberaki, M., 2004, *Plants that Fight Cancer*, U.S. CRC Press.
- 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.
- 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, *Chinese Medicine*, 6: 39.
- McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R.P., Mahboubi, M., Shi, Y., Mogil, R., Nishioka, W. K., Green, D. R., 1995, *The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro in Cell Death*. San Diego: Academic Press.
- Meiyanto, E., Septisetyani, E.P., 2005, Efek Antiproliferatif dan Apoptosis Fraksi Fenolik Ekstrak Etanolik Daun *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. Terhadap Sel HeLa, *Artocarpus*, 2(5): 74-80.
- Mosmann, 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65: 55–63.
- NCBI, 2013, *Arcangelisia flava*, Classification, NCBI Taxonomy, <http://ecatdev.gbif.org/usage>, [diakses pada 20 Februari 2015].

- 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.
- Pebriana, R. B., Wardhani, B. W. K., Widayanti, Esti., Wijayanti, N. L. S., Wijayanti, T. R., Riyanto, S., Meiyanto, E., 2008, Apoptotic effect of Kenikir Leaves (*Cosmos caudatus* Kunth.) Methanolic Extract on Breast Cancer Cell Line, *Cancer Chemoprevention Research Center (CCRC)*, Fakultas Farmasi UGM.
- Pandey, M. K., Sung., B., Kunnumakkara, A. B., Sethi, G., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B.B., 2008, Berberine Modifies Cystein 179 of I $\kappa$ B $\alpha$  Kinase, Suppresses Nuclear Factor- $\kappa$ B-Regulated Antiapoptotic Gene Products, and Potentiates Apoptosis, *Cancer Res*, 68: 5370-5379.
- Ramawat, K.G., 2008, *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, ISBN: 9778-3-540-79115-7.
- Ribble, D., Goldstein, N. B., Norris, D. A., Shellman, Y. G., 2005, A Simple Technique for Quantifying Apoptosis in 96-Well Plates, *BMC Biotechnology*; 5: 12.
- Rogers, M.F., Wink, M., 1998, *Alkaloid: Biokimia, Ekologi, dan Obat-Obatan Aplikasi*, Plenum Press, 2-3.
- Setyowati, Fransisca Murti dan Wardah, 2007, Diversity of Medicinal Plant by Talang Mamak Tribe in Surrounding of Bukit Tiga Puluh National Park, Riau; *Biodiversitas.*, 8 (3) : 228-232.
- 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.*
- Supriadi, 2001, *Tumbuhan Obat Indonesia: Penggunaan dan Khasiatnya*, Pustaka Populer Obor, Jakarta, 145 hal.
- Sun, Y., Xun, K., Wang, Y., Chen, X., 2009, A Systematic review of the Anticancer Properties of Berberine. A Natural Product from Chinese Herbs. *Anti-Cancer Drugs*, 20: 757-769.
- Stoppler, Melissa Conrad., 2013, Understanding Cancer of the Colon, [http://www.medicinenet.com/colorectal\\_cancer\\_pictures\\_slideshow/article.htm](http://www.medicinenet.com/colorectal_cancer_pictures_slideshow/article.htm) [diakses tanggal 08 April 2015].

- Tedja, Irwin; and Abdullah, Murdani; 2013, Chronic Inflammation in Colorectal Carcinogenesis : Role of Inflammatory Mediators, Intestinal Microbes, and Chemoprevention Potency, *Ind J. Gastro*, 1(14): 29-34.
- Tim QC APH Golongan Jamur, 2009, *Modul Quality Control (QC) APH Golongan Jamur*, Surabaya, Balai Besar Pembenuhan dan Proteksi Tanaman Perkebunan (BPPTP).
- Tsao, Anne S.; Kim, Edward; Hong, Waun Ki; 2004, *Chemoprevention of Cancer, CA Cancer J Clin*, 54 : 150-180.
- UICC, 2012, Cancer Declaration, <http://www.cing.ac.cy/images/media/file/UICC%20Cancer%20declaration.pdf>, [diakses tanggal 02 April 2015].
- Wang, L., Liu, L., Shi, Y., Cao, H., Chaturvedi, R., Calcutt, M.W., Yan, F., 2012, Berberine Induces Caspase-Independent Cell Death in Colon Tumor Cells through Activation of Apoptosis-Inducing Factor, *PloS ONE*, 7(5).
- Wilson, A.P., 2000, *Cytotoxicity and Viability Assays*, Oxford University Press, 263-272.
- 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.
- Zeng, W., Wang, X., Xu, P., Liu, G., Eden, H. S., Chen, X., 2015, Molecular Imaging of Apoptosis : from Micro to Macro, *Theranostics*, 5(6): 559-582.

## LAMPIRAN

## A. PERHITUNGAN

## 1. Rendemen Ekstrak

Bobot serbuk kering <i>A. flava</i>	= 100 gram
Volume kloroform yang digunakan	= 900 ml
Ekstrak kental	= 1,16 gram
Rendemen yang diperoleh	= $\frac{1,16 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\%$
	= 1,16 % b/b

## 2. Kepadatan Penanaman Sel untuk Uji Sitotoksitas

Kepadatan sel =  $10^4$  sel tiap sumuran

## a. Replikasi 1

$$\text{jumlah sel} = \frac{189 + 178 + 184 + 190}{4} = \frac{741}{4} = 185 \text{ sel}$$

$$\text{jumlah sel (ml)} = \frac{10^4 \times 100}{185 \times 10^4} = 0,54 \text{ ml}$$

0,54 ml suspensi sel + 9,46 ml media kultur

## b. Replikasi 2

$$\text{jumlah sel} = \frac{139 + 142 + 145 + 139}{4} = \frac{565}{4} = 142 \text{ sel}$$

$$\text{jumlah sel (ml)} = \frac{10^4 \times 100}{142 \times 10^4} = 0,7 \text{ ml}$$

0,7 ml suspensi sel + 9,3 ml media kultur

## c. Replikasi 3

$$\text{jumlah sel} = \frac{159 + 170 + 148 + 163}{4} = \frac{640}{4} = 160 \text{ sel}$$

$$\text{jumlah sel (ml)} = \frac{10^4 \times 100}{160 \times 10^4} = 0,63 \text{ ml}$$

0,63 ml suspensi sel + 9,37 ml media kultur

### 3. Kepadatan Penanaman Sel untuk Uji Apoptosis

$$\text{jumlah sel} = \frac{158 + 169 + 181 + 155}{4} = \frac{663}{4} = 166 \text{ sel}$$

$$\text{jumlah sel (ml)} = \frac{5 \cdot 10^4 \times 24}{166 \times 10^4} = 0,72 \text{ ml}$$

0,72 ml suspensi sel + 11,28 ml media kultur

### 4. Konsentrasi Ekstrak untuk Perlakuan Uji Sitotoksisitas

a. Pembuatan larutan induk 100.000  $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{10 \text{ mg}}{0,1 \text{ ml}} \times 1000 = 100.000 \mu\text{g/ml}$$

b. Konsentrasi 400  $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{4 \mu\text{l}}{1000} \times 100.000 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 400 \mu\text{g/ml}$$

4  $\mu\text{l}$  larutan induk 100.000  $\mu\text{g/ml}$  + 996  $\mu\text{l}$  media kultur

- Konsentrasi 200  $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{500 \mu\text{l}}{1000} \times 400 \mu\text{g/ml} = 200 \mu\text{g/ml}$$

500  $\mu\text{l}$  larutan uji konsentrasi 400  $\mu\text{g/ml}$  + 500  $\mu\text{l}$  media kultur

- Konsentrasi 100  $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{500 \mu\text{l}}{1000} \times 200 \mu\text{g/ml} = 100 \mu\text{g/ml}$$

500  $\mu\text{l}$  larutan uji konsentrasi 200  $\mu\text{g/ml}$  + 500  $\mu\text{l}$  media kultur

- Konsentrasi 50  $\mu\text{g/ml}$

$$\frac{500 \mu\text{l}}{1000} \times 100 \mu\text{g/ml} = 50 \mu\text{g/ml}$$

500  $\mu\text{l}$  larutan uji konsentrasi 100  $\mu\text{g/ml}$  + 500  $\mu\text{l}$  media kultur

c. Konsentrasi 300 µg/ml

$$\frac{3 \mu\text{l}}{1000} \times 100.000 \mu\text{g/ml} = 300\mu\text{g/ml}$$

3 µl larutan induk 100.000 µg/ml + 997 µl media kultur

## 5. Konsentrasi Ekstrak untuk Perlakuan Uji Apoptosis

a. Pembuatan larutan induk 100.000 µg/ml

$$\frac{10 \text{ mg}}{0,1 \text{ ml}} \times 1000 = 100.000 \mu\text{g/ml}$$

b. Pembuatan larutan induk 10.000 µg/ml

$$\frac{100 \mu\text{l}}{1000} \times 100.000 \mu\text{g/ml} = 10.000 \mu\text{g/ml}$$

Konsentrasi IC<sub>50</sub> = 120 µg/ml

$$\frac{12 \mu\text{l}}{1000} \times 10.000 \mu\text{g/ml} = 120\mu\text{g/ml}$$

12 µl induk 10.000 µg/ml + 988 µl media kultur.

Konsentrasi 1,5 IC<sub>50</sub> = 180 µg/ml

$$\frac{18 \mu\text{l}}{1000} \times 10.000 \mu\text{g/ml} = 180\mu\text{g/ml}$$

18 µl induk 10.000 µg/ml + 982 µl media kultur.

## B. DATA HASIL UJI SITOTOKSIK

### 1. Data Absorbansi dan Viabilitas Sel

$$\text{Viabilitas sel} = \frac{\text{abs.sel dengan perlakuan} - \text{abs.kontrol media}}{\text{abs.kontrol sel} - \text{abs.kontrol media}} \times 100\%$$

Data 1

No	Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi				Viabilitas sel (%)				
		a1	a2	a3	$\bar{x}$	v1	v2	v3	$\bar{x}$	SD
1	100	0,505	0,519	0,532	0,519	65,66	67,81	69,81	67,76	2,08
2	200	0,369	0,281	0,370	0,340	44,75	31,21	44,90	40,29	7,86
3	400	0,078	0,077	0,077	0,077	0,00	-0,15	-0,15	-0,10	0,09
4	600	0,078	0,071	0,073	0,074	0,00	-1,08	-0,77	-0,62	0,55
5	1000	0,070	0,070	0,076	0,072	-1,23	-1,23	-0,31	-0,92	0,53
		Kontrol sel				Kontrol media				
		1	2	3	$\bar{x}$	1	2	3	$\bar{x}$	
		0,787	0,759	0,639	0,728	0,08	0,072	0,082	0,078	

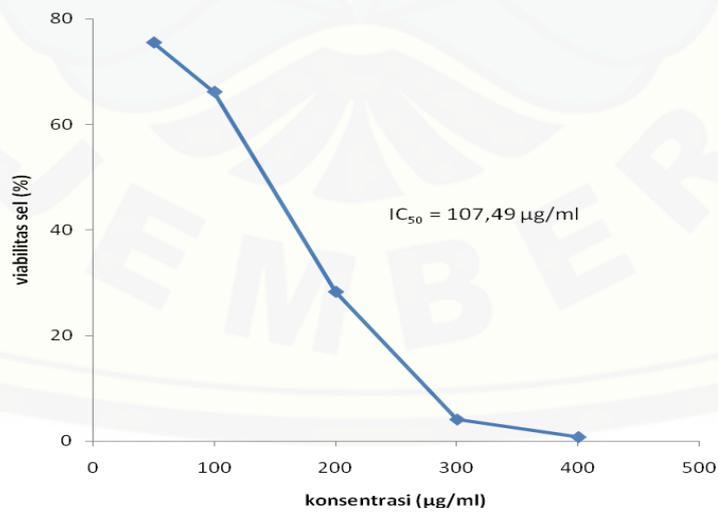
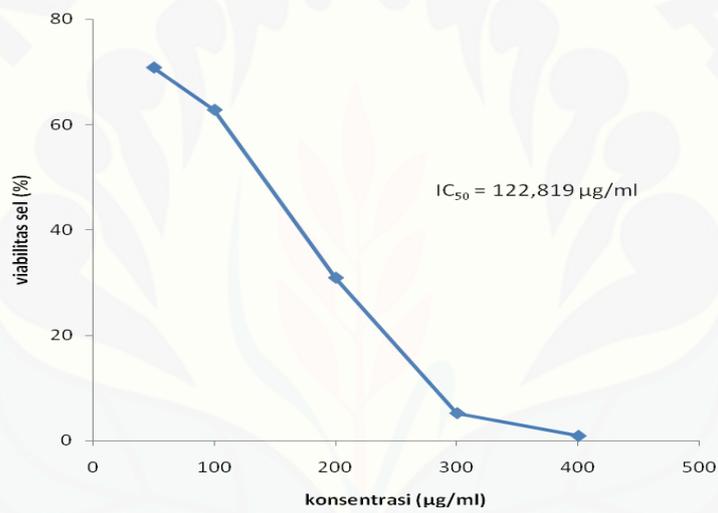
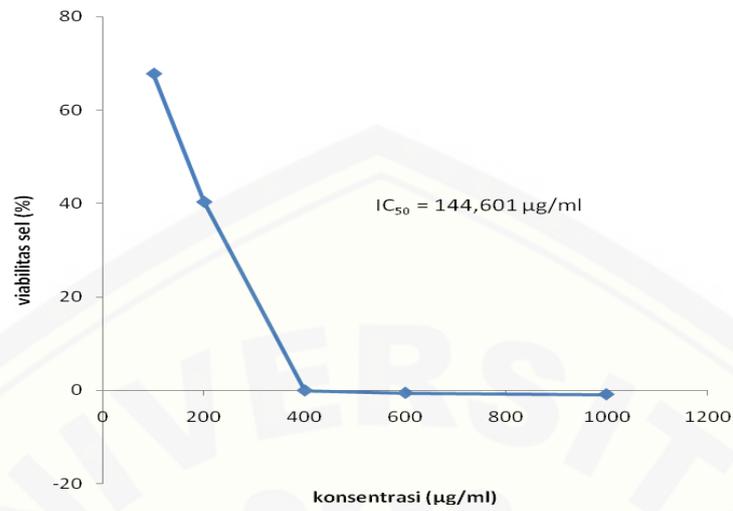
Data 2

No	Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi				Viabilitas sel (%)				
		a1	a2	a3	$\bar{x}$	v1	v2	v3	$\bar{x}$	SD
1	50	0.762	0.808	0.807	0.792	67.71	72.36	72.26	70.77	2.65
2	100	0.671	0.713	0.755	0.713	58.52	62.76	67.00	62.76	4.24
3	200	0.396	0.404	0.393	0.398	30.74	31.55	30.44	30.91	0.57
4	300	0.181	0.12	0.129	0.143	9.02	2.86	3.77	5.22	3.33
5	400	0.098	0.107	0.097	0.101	0.64	1.55	0.54	0.91	0.56
		Kontrol sel				Kontrol media				
		1	2	3	$\bar{x}$	1	2	3	$\bar{x}$	
		1,067	1,082	1,096	1,082	0,09	0,091	0,094	0,092	

Data 3

No	Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi				Viabilitas sel (%)				
		a1	a2	a3	$\bar{x}$	v1	v2	v3	$\bar{x}$	SD
1	50	0.745	0.826	0.851	0.807	68.90	77.43	80.06	75.47	5.83
2	100	0.698	0.704	0.754	0.719	63.95	64.58	69.85	66.13	3.24
3	200	0.373	0.321	0.383	0.359	29.73	24.25	30.78	28.26	3.51
4	300	0.104	0.159	0.125	0.129	1.40	7.20	3.62	4.07	2.92
5	400	0.088	0.112	0.093	0.098	-0.28	2.25	0.25	0.74	1.33
		Kontrol sel				Kontrol media				
		1	2	3	$\bar{x}$	1	2	3	$\bar{x}$	
		0,981	1,091	1,05	1,040	0,078	0,091	0,103	0,091	

## 2. Grafik Konsentrasi vs Viabilitas Sel



### 3. Analisis Probit

Data 1

		Confidence Limits					
Probability	Estimate	95% Confidence Limits for Konsentrasi			95% Confidence Limits for log(Konsentrasi) <sup>a</sup>		
		Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
PROBIT	0.01	3094.101	1778.033	7508.674	3.491	3.250	3.876
	0.02	2193.734	1342.055	4793.106	3.341	3.128	3.681
	0.03	1763.705	1121.966	3607.511	3.246	3.050	3.557
	0.04	1496.728	980.106	2914.469	3.175	2.991	3.465
	0.05	1309.664	877.753	2451.008	3.117	2.943	3.389
	0.06	1168.980	798.871	2115.681	3.068	2.902	3.325
	0.07	1058.119	735.373	1860.107	3.025	2.867	3.270
	0.08	967.808	682.653	1657.972	2.986	2.834	3.220
	0.09	892.383	637.855	1493.605	2.951	2.805	3.174
	0.1	828.162	599.095	1357.032	2.918	2.777	3.133
	0.15	607.884	460.852	914.907	2.784	2.664	2.961
	0.2	475.431	372.383	671.928	2.677	2.571	2.827
	0.25	385.053	308.544	518.287	2.586	2.489	2.715
	0.3	318.633	259.032	412.985	2.503	2.413	2.616
	0.35	267.357	218.738	336.954	2.427	2.340	2.528
	0.4	226.353	184.866	279.971	2.355	2.267	2.447
	0.45	192.677	155.820	235.944	2.285	2.193	2.373
	0.5	144.061	130.665	200.952	2.216	2.116	2.303
	0.55	140.326	108.807	172.350	2.147	2.037	2.236
	0.6	119.448	89.807	148.327	2.077	1.953	2.171
	0.65	101.129	73.295	127.624	2.005	1.865	2.106
	0.7	84.855	58.936	109.354	1.929	1.770	2.039
	0.75	70.218	46.426	92.864	1.846	1.667	1.968
	0.8	56.869	35.495	77.629	1.755	1.550	1.890
	0.85	44.478	25.889	63.160	1.648	1.413	1.800

0.9	32.648	17.359	48.853	1.514	1.240	1.689
0.91	30.298	15.756	45.929	1.481	1.197	1.662
0.92	27.937	14.181	42.955	1.446	1.152	1.633
0.93	25.552	12.628	39.912	1.407	1.101	1.601
0.94	23.129	11.093	36.773	1.364	1.045	1.566
0.95	20.645	9.567	33.498	1.315	.981	1.525
0.96	18.064	8.038	30.027	1.257	.905	1.478
0.97	15.330	6.488	26.255	1.186	.812	1.419
0.98	12.325	4.878	21.971	1.091	.688	1.342
0.99	8.738	3.110	16.603	.941	.493	1.220

a. Logarithm base = 10.

Data 2

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi			95% Confidence Limits for log(Konsentrasi) <sup>b</sup>		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup>	0.01	722.289	323.786	48963.862	2.859	2.510	4.690
	0.02	574.454	278.919	22629.989	2.759	2.445	4.355
	0.03	496.768	253.098	13902.854	2.696	2.403	4.143
	0.04	445.332	234.856	9653.654	2.649	2.371	3.985
	0.05	407.448	220.686	7185.155	2.610	2.344	3.856
	0.06	377.752	209.051	5594.841	2.577	2.320	3.748
	0.07	353.501	199.142	4497.705	2.548	2.299	3.653
	0.08	333.111	190.478	3702.933	2.523	2.280	3.569
	0.09	315.590	182.752	3105.701	2.499	2.262	3.492
	0.1	300.278	175.755	2643.907	2.478	2.245	3.422
	0.15	244.395	147.660	1374.812	2.388	2.169	3.138
	0.2	207.499	125.794	835.616	2.317	2.100	2.922
	0.25	180.318	106.888	559.133	2.256	2.029	2.748
	0.3	158.957	89.622	401.613	2.201	1.952	2.604

0.35	141.429	73.593	305.721	2.151	1.867	2.485
0.4	126.587	58.938	244.415	2.102	1.770	2.388
0.45	113.711	46.012	203.375	2.056	1.663	2.308
0.5	112.819	35.078	174.489	2.010	1.545	2.242
0.55	92.068	26.160	153.030	1.964	1.418	2.185
0.6	82.703	19.092	136.211	1.918	1.281	2.134
0.65	74.024	13.609	122.352	1.869	1.134	2.088
0.7	65.861	9.428	110.396	1.819	.974	2.043
0.75	58.059	6.291	99.633	1.764	.799	1.998
0.8	50.454	3.981	89.522	1.703	.600	1.952
0.85	42.837	2.320	79.553	1.632	.365	1.901
0.9	34.865	1.168	69.048	1.542	.067	1.839
0.91	33.173	.988	66.782	1.521	-.005	1.825
0.92	31.428	.824	64.425	1.497	-.084	1.809
0.93	29.616	.675	61.950	1.472	-.171	1.792
0.94	27.714	.540	59.319	1.443	-.268	1.773
0.95	25.695	.418	56.479	1.410	-.379	1.752
0.96	23.509	.310	53.342	1.371	-.509	1.727
0.97	21.075	.214	49.755	1.324	-.670	1.697
0.98	18.225	.131	45.399	1.261	-.884	1.657
0.99	14.494	.060	39.360	1.161	-1.222	1.595

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

Data 3

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi			95% Confidence Limits for log(Konsentrasi) <sup>b</sup>		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT <sup>a</sup> 0.01	623.544	308.681	11466.850	2.795	2.490	4.059
0.02	507.459	268.608	6503.268	2.705	2.429	3.813

0.03	445.285	245.391	4547.783	2.649	2.390	3.658
0.04	403.587	228.918	3480.103	2.606	2.360	3.542
0.05	372.566	216.087	2802.669	2.571	2.335	3.448
0.06	348.048	205.530	2333.326	2.542	2.313	3.368
0.07	327.882	196.526	1988.690	2.516	2.293	3.299
0.08	310.819	188.646	1724.929	2.493	2.276	3.237
0.09	296.074	181.617	1516.700	2.471	2.259	3.181
0.1	283.119	175.251	1348.293	2.452	2.244	3.130
0.15	235.246	149.746	836.191	2.372	2.175	2.922
0.2	203.042	130.089	581.080	2.308	2.114	2.764
0.25	178.951	113.356	432.507	2.253	2.054	2.636
0.3	159.763	98.319	338.011	2.203	1.993	2.529
0.35	143.824	84.459	274.439	2.158	1.927	2.438
0.4	130.172	71.631	229.882	2.115	1.855	2.362
0.45	118.198	59.887	197.521	2.073	1.777	2.296
0.5	107.490	49.331	173.158	2.031	1.693	2.238
0.55	97.753	40.026	154.112	1.990	1.602	2.188
0.6	88.761	31.964	138.629	1.948	1.505	2.142
0.65	80.336	25.074	125.548	1.905	1.399	2.099
0.7	72.321	19.248	114.069	1.859	1.284	2.057
0.75	64.566	14.364	103.612	1.810	1.157	2.015
0.8	56.905	10.302	93.699	1.755	1.013	1.972
0.85	49.115	6.949	83.853	1.691	.842	1.924
0.9	40.810	4.207	73.397	1.611	.624	1.866
0.91	39.025	3.724	71.132	1.591	.571	1.852
0.92	37.173	3.261	68.771	1.570	.513	1.837
0.93	35.239	2.817	66.285	1.547	.450	1.821
0.94	33.197	2.391	63.639	1.521	.379	1.804
0.95	31.012	1.983	60.773	1.492	.297	1.784
0.96	28.629	1.590	57.599	1.457	.201	1.760

0.97	25.948	1.212	53.958	1.414	.083	1.732
0.98	22.769	.844	49.515	1.357	-.074	1.695
0.99	18.530	.476	43.314	1.268	-.322	1.637

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

### C. DATA HASIL UJI APOPTOSIS

#### Analisis Semi-Kuantitatif Apoptosis Sel

Perlakuan	Jumlah sel (%)								
	Sel hidup			Apoptosis			Nekrosis		
	1	2	rata2	1	2	Rata	1	2	rata
Kontrol	100	100	100	0	0	0	0	0	0
120 µg/ml	29.2	27	28.1	66.79	68.95	67.87	3.97	5.09	4.53
180 µg/ml	5.02	7.08	6.05	80.12	84.18	82.15	12.09	10.08	11.085