



**UJI SITOTOKSISITAS DAN SELEKTIVITAS EKSTRAK
ETANOL DAUN *Arcangelisia flava* PADA SEL KANKER
PAYUDARA MCF-7**

SKRIPSI

Oleh :

Ika Yanuar Isparnaning

NIM 112210101079

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015



**UJI SITOTOKSISITAS DAN SELEKTIVITAS EKSTRAK
ETANOL DAUN *Arcangelisia flava* PADA SEL KANKER
PAYUDARA MCF-7**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Sarjana Farmasi (S1) dan gelar Sarjana Farmasi

Oleh :

Ika Yanuar Isparnaning

NIM 112210101079

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT dan Nabi Muhammad SAW;
2. Orang tua tercinta, Ibu Istilawati dan Bapak Suparno, yang selalu memberikan doa, bimbingan, semangat, pengorbanan, kasih sayang serta pembelajaran tentang arti hidup untuk menjadi seseorang yang lebih baik.
3. Adik-adikku tersayang, Dwiki Primadita Rosanti dan Tri Valda Gilby Renata, yang selalu memberikan semangat serta kasih sayang demi kesuksesan saya.
4. Para pengajar sejak Taman Kanak-kanak hingga Perguruan Tinggi yang terhormat, yang telah memberikan ilmunya dan membimbing kepada saya dengan penuh ketulusan;
5. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

“Hai orang-orang mukmin, jika kamu menolong (agama) Allah, niscaya
Dia akan menolongmu dan meneguhkan kedudukanmu”

(QS Muhammad : 7)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ika Yanuar Isparnaning

NIM : 112210101079

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “*Uji Sitotoksitas dan Selektivitas Ekstrak Etanol Daun Arcangelisia flava pada Sel Kanker payudara MCF-7*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggungjawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 28 Desember 2015

Yang menyatakan

Ika Yanuar Isparnaning
NIM. 112210101079

SKRIPSI

**UJI SITOTOKSISITAS DAN SELEKTIVITAS EKSTRAK
ETANOL DAUN *Arcangelisia flava* PADA SEL KANKER
PAYUDARA MCF-7**

Oleh

Ika Yanuar Isparnaning

112210101079

Pembimbing:

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

Dosen Pembimbing Anggota : Dian Agung Pangaribowo S. Farm., M.
Farm., Apt.

PENGESAHAN

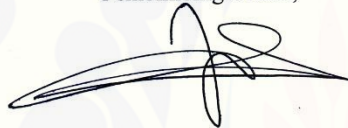
Skripsi berjudul “Uji Sitotoksisitas dan Selektivitas Ekstrak Etanol Daun *Arcangelisia flava* pada Sel Kanker payudara MCF-7” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Senin, 28 Desember 2015

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Pembimbing Utama,



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

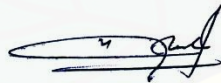
Pembimbing Anggota,



Dian Agung Pangaribowo S. Farm., M. Farm., Apt.
NIP 198410082008:21004

Tim Penguji

Penguji I,



Indah Yulia Ningsih S.Farm., M.Farm.,Apt.
NIP 198407122008122002

Penguji II,



Siti Muslichah S.Si., M.Sc., Apt.
NIP 197305132005012001



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

RINGKASAN

Uji Sitotoksitas dan Selektivitas Ekstrak Etanol Daun *Arcangelisia flava* pada Sel Kanker payudara MCF-7: Ika Yanuar Isparnaning, 112210101079; 2015, 51 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Menurut Badan Internasional Penelitian Kanker, kasus penderita kanker mengalami peningkatan dari 12,7 juta pada tahun 2008 menjadi 14,1 juta pada tahun 2012. Salah satu jenis kanker yang terjadi hampir seluruhnya pada wanita adalah kanker payudara. Penyakit kanker payudara di Indonesia memiliki presentase tertinggi pada tahun 2012, yaitu sebesar 43,3% dan persentase kematian akibat kanker payudara sebesar 12,9%..

Saat ini terapi yang sering digunakan untuk mengobati penyakit kanker adalah kemoterapi dan radiasi. Kegagalan terapi pada kanker dapat disebabkan karena resistensi obat dan toksisitas. Bentuk toksisitas dari obat kanker adalah menurunnya imunitas tubuh. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengembangan obat baru yang memiliki efek samping yang relatif kecil serta selektif terhadap sel kanker, salah satunya yaitu dengan melakukan skrining bahan alam. Salah satu tumbuhan yang memiliki potensi untuk terapi antikanker adalah kayu kuning (*Arcangelisia flava*). Bagian daun pada tumbuhan *A. flava* memiliki kandungan senyawa golongan alkaloid protoberberin, yang terdiri dari berberin, palmatin, dan jatrorrhizin. Berberin memiliki banyak aktivitas yang mendukung sebagai antikanker.

Hasil uji sitotoksitas sel kanker payudara MCF-7 sebesar $135,74 \pm 16,82$ $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7 sebesar 50% dari populasi. Hasil uji sitotoksitas sel normal Vero sebesar $2.699,22 \pm 841,45$ $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan sel

normal Vero sebesar 50% dari populasi. Berdasarkan hasil uji sitotoksitas didapatkan hasil selektivitas sebesar 19,89. Berdasarkan nilai SI tersebut, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun *A. flava* selektif terhadap sel kanker payudara MCF-7 karena nilai $SI > 3$.

Berdasarkan nilai IC_{50} , dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol daun *A. flava* berpotensi sebagai senyawa sitotoksik pada sel kanker payudara MCF-7 karena nilai IC_{50} yang didapatkan tidak lebih dari 500 $\mu\text{g/ml}$. Penggunaan pelarut etanol total ekstrak daun *A. flava* diduga mempunyai pengaruh besar terhadap nilai IC_{50} yang didapatkan. Dari beberapa senyawa yang terdapat didalam ekstrak etanol daun *A. flava*, senyawa golongan alkaloid protoberberin diduga merupakan senyawa utama yang dapat menghasilkan efek sitotoksik pada sel kanker payudara. Maka dari itu perlu dipastikan dengan adanya penelitian lebih lanjut mengenai total kandungan berberin yang terdapat di dalam ekstrak etanol daun *A. flava*. Menurut Puspitasari *et al* (2015), ekstrak etanol total *A. flava* memiliki kemampuan sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7, kemungkinan dapat disebabkan oleh kandungan berberin yang ada di dalamnya.

Pada penelitian sebelumnya menggunakan ekstrak kulit batang *A. flava*, sedangkan penelitian kali ini menggunakan ekstrak daun *A. flava*. Hal ini dimungkinkan, kandungan senyawa berberin lebih besar terdapat pada kulit batang *A. flava* yaitu sebesar 6,27%. Meskipun potensi sitotoksitas ekstrak daun *A. flava* lebih kecil dari ekstrak kulit batang *A. flava*, namun pada penelitian ekstrak kulit batang *A. flava* belum diketahui data selektivitas, sehingga belum diketahui bagaimana keamanan ekstrak kulit batang *A. flava* terhadap sel normal ketika digunakan. Sedangkan pada penelitian ini, ekstrak daun *A. flava* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 serta memiliki data selektivitas ekstrak daun *A. flava* terhadap sel normal ketika digunakan. Namun pada penelitian kali ini belum jelas bagaimana mekanisme molekulernya. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme molekuler sitotoksitas ekstrak etanol daun *A. flava* terhadap sel kanker payudara MCF-7.

PRAKATA

Bismillahirrohmanirohim

Puji syukur ke hadirat ALLAH SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Sitotoksisitas dan Selektivitas Ekstrak Etanol Daun *Arcangelisia flava* pada Sel Kanker payudara MCF-7”. Sholawat dan salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya.

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

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember, Ibu Lestyo Wulandari S.Si., Apt., M.Farm atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
2. Ibu Endah Puspitasari S.Farm., M.Sc., Apt selaku dosen pembimbing utama dan Bapak Dian Agung Pangaribowo S. Farm., M. Farm., Apt. selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatiannya dalam membantu dan membimbing penulis hingga akhir penyusunan skripsi ini;
3. Ibu Indah Yulia Ningsih S.Farm., M.Farm.,Apt. dan Ibu Siti Muslichah S.Si., M.Sc., Apt. yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan masukan dalam skripsi ini;

4. Ibu Ayik Rosita Puspaningtyas, S.Farm., M.Farm., Apt. selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswi;
5. Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu dan memperluas ilmu pengetahuan serta wawasan penulis selama menempuh masa kuliah;
6. Kedua orang tua tercinta, Ibu Istilahwati dan Bapak Suparno, serta adik dita dan adik gilby yang tak pernah lelah memberikan doa, dukungan, motivasi, kasih sayang dan pengorbanan yang tiada padam selama ini;
7. Seluruh keluarga besar yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu;
8. Rekan kerja dan Sahabat seperjuangan Estika, Icha, Prisma, Rara, Fia, Lintang, Puspita, Mey, Ama, Tika, Eva, Agisan, Aisyah dan Lail yang telah memberikan semangat, kebersamaan, kekompakan, dan bantuan selama ini;
9. Bu Widi dan Mbak Anggra selaku teknisi laboratorium Biologi FFUJ, serta Mbak Rumbi, Mbak Juju, Mbak Azizah, Mey dan Mas Farid selaku teknisi laboratorium Parasitologi FK UGM, terimakasih atas semangat dan bantuannya dalam menyelesaikan skripsi ini;
10. Sahabat-sahabat nge-lab di Laboratorium Biologi Yora, Vita, Habibi, Fitria, Elisa, Okta, Lili, Iik, Zuhro, Liza, dan Liyas atas kebersamaan, bantuan dan kekompakan kalian selama pengerjaan penelitian ini;
11. Teman-teman KKN 122 Desa Grujungan Bondowoso Deshinta, Desy, Kiki, Niko, Ikhlas, Zaky, Fahmi, Denny, dan Eko terimakasih atas dukungan, bantuan dan motivasi selama ini;
12. Sahabat dan keluarga Farmasi Angkatan 2011 “ASMEF”
13. Serta semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu atas bantuan dan perhatiannya baik langsung maupun tidak langsung 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, 28 Desember 2015

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan tentang <i>A. flava</i>	5
2.1.1 Taksonomi <i>A. flava</i>	5
2.1.2 Morfologi <i>A. flava</i>	5
2.2 Kandungan Senyawa Beberin pada <i>A. flava</i>	6
2.3 Kandungan Senyawa Palmatin pada <i>A. flava</i>	7
2.4 Tinjauan tentang Kanker	8
2.5 Tinjauan tentang Kanker Payudara	9
2.5.1 Definisi	9
2.5.2 Jenis kanker payudara	9
2.6 Tinjauan tentang Sel MCF-7.....	11
2.7 Tinjauan tentang Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT	12
2.8 Tinjauan tentang Uji Selektivitas	12
BAB 3. METODE PENELITIAN	14
3.1 Jenis Penelitian	14
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	14
3.3 Alat dan Bahan yang Digunakan	14

3.3.1	Alat	14
3.3.2	Bahan	14
3.4	Rancangan Penelitian	15
3.5	Variabel Penelitian	16
3.5.1	Variabel Bebas	16
3.5.2	Variabel Terikat	16
3.5.2	Variabel Terkendali	16
3.6	Definisi Operasional	16
3.7	Pelaksanaan Penelitian	17
3.7.1	Pembuatan ekstrak etanol <i>A. flava</i>	17
3.7.2	Penelitian <i>in vitro</i>	17
3.7.3	Preparasi sampel	18
3.7.4	Uji sitotoksik metode MTT	19
3.8	Analisis data	19
3.8.1	Uji sitotoksisitas menggunakan MTT <i>assay</i>	19
3.8.2	Uji Selektivitas	20
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	21
4.1	Hasil Ekstraksi Daun <i>A. flava</i>	21
4.2	Hasil Uji Sitotoksisitas Sel Kanker Payudara MCF-7	21
4.3	Hasil Uji Sitotoksisitas Sel Normal Vero	23
4.4	Uji Pengamatan Selektivitas Sel Kanker Payudara terhadap Sel Normal	25
BAB 5.	KESIMPULAN DAN SARAN	28
5.1	Kesimpulan	28
5.2	Saran	28
DAFTAR PUSTAKA		
LAMPIRAN		

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Arcangelisia flava</i>	6
Gambar 2.2 Senyawa berberin.....	7
Gambar 2.3 Jaringan duktal karsinoma in situ	10
Gambar 2.4 Jaringan lobulus karsinoma in situ.....	10
Gambar 2.5 Sel kanker MCF-7.....	11
Gambar 2.6 Mekanisme MTT	12
Gambar 3.1 Diagram uji sitotoksisitas <i>in vitro</i>	15
Gambar 3.2 Penampang <i>Haemocytometer</i>	18
Gambar 4.1 Morfologi sel MCF-7.....	22
Gambar 4.2 Hasil uji sitotoksisitas sel MCF-7	22
Gambar 4.3 Morfologi sel Vero.....	24
Gambar 4.4 Hasil uji sitotoksisitas sel Vero.....	25

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia (Kementrian Kesehatan RI, 2015). Menurut Badan Internasional Penelitian Kanker, kasus penderita kanker mengalami peningkatan dari 12,7 juta pada tahun 2008 menjadi 14,1 juta pada tahun 2012. Angka kematian akibat kanker juga meningkat dari 7,6 juta kasus pada tahun 2008 menjadi 8,2 juta kasus pada tahun 2012. Diperkirakan, dalam jangka waktu lima belas tahun ke depan, terdapat sekitar 32,6 juta lebih penderita kanker di dunia (IARC, 2013).

Salah satu jenis kanker yang terjadi hampir seluruhnya pada wanita adalah kanker payudara. Kanker payudara merupakan tumor ganas yang memulai pertumbuhannya pada sel-sel payudara (ACS, 2015). Penyakit kanker payudara di Indonesia memiliki presentase tertinggi pada tahun 2012, yaitu sebesar 43,3% dan persentase kematian akibat kanker payudara sebesar 12,9% (Kementrian Kesehatan RI, 2015).

Saat ini terapi yang sering digunakan untuk mengobati penyakit kanker adalah kemoterapi dan radiasi. Kemoterapi adalah penggunaan obat-obatan untuk membunuh sel-sel kanker. Obat kemoterapi beredar dalam aliran darah dan merusak sel-sel kanker yang aktif tumbuh dan membelah lebih cepat dari sel normal. Penggunaan kemoterapi juga dapat memberikan efek samping yaitu adanya kerusakan sel-sel normal (ASCO, 2015). Terapi radiasi menggunakan radiasi energi tinggi yang berfungsi untuk mengecilkan tumor dan membunuh sel-sel kanker. Terapi radiasi juga dapat merusak sel-sel normal yang terdapat di sekitar sel kanker (NCI, 2010). Kegagalan terapi pada kanker dapat disebabkan karena resistensi obat dan toksisitas (Andalusia, 2015). Bentuk toksisitas dari obat kanker adalah menurunnya imunitas tubuh. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengembangan obat baru yang memiliki efek samping yang relatif kecil serta

selektif terhadap sel kanker, salah satunya yaitu dengan melakukan skrining bahan alam (Mangan, 2013).

Indonesia merupakan negara kedua yang memiliki keanekaragaman hayati terbesar setelah Brasilia. Indonesia ditumbuhi sekitar 37.000 jenis tumbuhan tinggi dari 155.475-183.025 tumbuhan yang ada di dunia. Berdasarkan jumlah tersebut, sekitar 14.800-18.500 tumbuhan merupakan tumbuhan endemik Indonesia. Beberapa diantaranya dimanfaatkan sebagai bahan obat (Bakosurtanal, 2001). Salah satu tumbuhan yang memiliki potensi untuk terapi antikanker adalah kayu kuning (*Arcangelisia flava*) (Keawpradub *et al.*, 2005). Menurut Hidayat dan Risna (2007), tumbuhan ini merupakan jenis tumbuhan dengan kategori rawan dan langka. Meskipun dalam jumlah yang sedikit, tumbuhan ini sudah mulai dieksploitasi. Walaupun langka, *A. flava* dapat ditemukan di Taman Nasional Meru Betiri, Jember (Sholichah dan Purnomo, 2010).

Bagian daun pada tumbuhan *A. flava* memiliki kandungan senyawa golongan alkaloid protoberberin, yang terdiri dari berberin, palmatin, dan jatrorrhizin. Berberin memiliki banyak aktivitas yang mendukung sebagai antikanker. Senyawa ini mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7 dan MDA-MB-231 (Kim *et al.*, 2010), memberikan efek penghambatan pada proliferasi dan reproduksi mikroorganisme tumorigenik tertentu, memiliki inhibitor enzim yang dapat mempengaruhi N-asetiltransferase, siklooksigenase-2, dan topoisomerase pada ekspresi gen/protein serta menurunkan pertumbuhan tumor dan metastasis sel (Sun *et al.*, 2009). Berberin juga mampu memberikan beberapa penghambatan pada mitokondria kompleks I dan interaksi dengan adenin nukleotida *translocator* (Diogo *et al.*, 2015). Efek antiproliferasi berberin terhadap sel MCF-7 mempunyai IC_{50} sebesar $20 \mu\text{mol/l}$ (Sun *et al.*, 2009).

Senyawa lain yang berpotensi sebagai anti kanker yaitu senyawa palmatin. Senyawa ini berpotensi sebagai antikanker pada kulit tikus albino Swiss (Ali dan Dixit, 2013). Selain itu kelompok 13-n-alkil palmatin memiliki efek sitotoksik yang kuat pada tikus dengan S180 sarkoma xenograf *in vivo* (Zhang *et al.*, 2012).

Pada penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa ekstrak metanol kulit batang *A. flava* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 dengan IC_{50}

sebesar $7,7 \pm 0,6$ $\mu\text{g/ml}$ (Keawpradub *et al.*, 2005). Ekstrak etanol tumbuhan *A. flava* juga dapat memberikan efek penghambatan terhadap proliferasi sel HeLa dengan IC_{50} sebesar 49,96 $\mu\text{g/ml}$ (Febrinasari, 2012).

Pada penelitian sebelumnya, bagian kayu tumbuhan *A. flava* sering digunakan sebagai bahan obat, dengan cara menebang keseluruhan dari pohonnya, sehingga terjadi peningkatan kepunahan *A. flava*. Apalagi pertumbuhannya lambat, sehingga regenerasinya tidak terjamin (Setyowati dan Wardah, 2007). Oleh karena itu, dalam penelitian kali ini digunakan daun *A. flava* sebagai bahan utama. Karena daun *A. flava* memiliki kandungan yang mirip dengan batang, yaitu mengandung senyawa berberin (Larisu, 2011), serta tersedia dalam jumlah yang cukup banyak daripada batang dan akar (BAU, 2014).

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi obat alternatif antikanker yang lebih efektif dengan dasar dilakukannya uji sitotoksitas. Selain itu juga diharapkan memiliki nilai selektivitas yang tinggi, agar tidak merusak pertumbuhan sel normal yang terdapat di sekitar sel kanker dengan dasar dilakukannya uji selektivitas.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah ekstrak etanol daun *A. flava* memiliki potensi sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7?
2. Apakah ekstrak etanol daun *A. flava* selektif terhadap sel kanker payudara MCF-7?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui potensi ekstrak etanol daun *A. flava* sebagai agen antikanker dalam penggunaan tunggal melalui uji sitotoksitas.
2. Mengetahui selektivitas ekstrak etanol daun *A. flava* terhadap sel kanker payudara MCF-7.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dalam penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi tentang adanya potensi *A. flava* sebagai agen antikanker.
2. Memberikan sumbangan yang bermakna kepada ilmu pengetahuan mengenai penemuan alternatif obat antikanker dari ekstrak daun *A. flava*



BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang *A. flava*

2.1.1 Taksonomi *A. flava*

A. flava memiliki klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Magnoliidae
Ordo	: Ranunculales
Famili	: Menispermaceae
Genus	: <i>Arcangelisia</i>
Spesies	: <i>Arcangelisia flava</i> Merr (Plantamor, 2012).

2.1.2 Morfologi *A. flava*

Morfologi tumbuhan *A. flava* ini meliputi bagian batang, daun, bunga, buah, biji, dan akar. Batangnya berbentuk bulat, membelit, kasar, berwarna coklat kehitaman, dan kayunya berwarna kuning cerah. Daunnya tunggal, tersebar, berseling, tangkai silindris, pangkal membulat, panjang 10-20 cm, lebar 10-16 cm, bentuk oval, ujung runcing, pangkal tumpul, tepi rata, pertulangan menjari, permukaan licin, kaku, hijau cerah, dan mengkilat (Gambar 2.1). Bunganya majemuk, terletak di ketiak daun, bentuk malai, dengan daun penumpu, bunga sempurna, berkelamin ganda, kelopak (berlepasan, bentuk segitiga, panjang 2-8 mm, hijau), benangsari jumlah 6 dengan kepala sari bulat, kepala putik beruang 3 dan berwarna kuning, mahkota (berlepasan, bentuk asimetris, 6 helai,

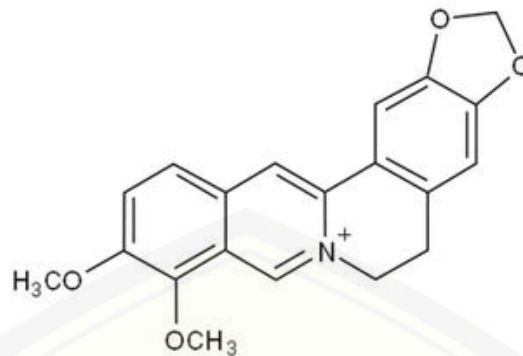
halus, dan bewarna kuning). Buah berbentuk kotak, berusuk 3, bulat, permukaan berbulu, dan berwarna hijau. Biji bulat, tunggal, kasar, kecil, dan berwarna coklat. Sedangkan akarnya tunggang dan berwarna coklat kehitaman (BAU, 2014).



Gambar 2.1 *Arcangelisia flava*(Plantamor, 2012).

2.2 Kandungan Senyawa Berberin pada *A. flava*

Berberin dikenal sebagai alkaloid isokuinolin dengan nama lama 2,3-metilendioksi-9,10-dimetoksi-protoberberin. Berberin telah diisolasi dari berbagai tanaman meliputi tumbuhan Papaveraceae, Berberidaceae, Fumariaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae, Rutaceae, dan Annonaceae. Berberin adalah garam amonium kuartener dari kelompok protoberberin alkaloid isokuinolin. Alkaloid protoberberin memiliki aktivitas sebagai inhibitor pertumbuhan sel-sel Ehrlich dan lymphoma acites tumor (Mandiaet al, 1999). Senyawa protoberberin memiliki keterkaitan dengan dihidroberberin. Kedua senyawa tersebut memiliki efek yang sama dengan berberin hanya saja dalam dosis yang lebih rendah. Dihidroberberin ditemukan secara alami dalam tanaman *A. flava*. Dihidroberberin lebih efektif pada parameter utama berberin bila digunakan *in vitro* (Scientific Research, 2015). Struktur kimia senyawa berberin dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Senyawa berberin 2,3-dimetoksi-9,10-dihidroprotoberberin (Scientific Research, 2015).

Berberin merupakan sebuah alkaloid protoberberin yang menunjukkan aktivitas antiproliferasi dan antikanker (Sun *et al.*, 2009). Pada penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa senyawa berberin dapat menghambat pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7 dan MDA-MB-231 (Kim *et al.*, 2010), memberikan efek penghambatan pada proliferasi dan reproduksi mikroorganisme tumorigenik tertentu, memiliki inhibitor enzim yang dapat mempengaruhi N-asetiltransferase, siklooksigenase-2, dan topoisomerase pada ekspresi gen/protein serta menurunkan pertumbuhan tumor dan metastasis sel (Sun *et al.*, 2009).

Pada ekstrak metanol kulit batang *A. flava*, berberin memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 dengan IC_{50} sebesar $7,7 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ (Keawpradub *et al.*, 2005). Efek antiproliferasi berberin terhadap sel MCF-7 mempunyai IC_{50} sebesar $20 \mu\text{mol/l}$ (Sun *et al.*, 2009). Ekstrak etanol tumbuhan *A. flava* juga dapat memberikan efek penghambatan terhadap proliferasi sel HeLa dengan IC_{50} sebesar $49,96 \mu\text{g/ml}$ (Febrinasari *et al.*, 2012). Selain itu, ketika ekstrak kloroform *A. flava* dan doxorubicin dikombinasikan maka dapat memiliki aktivitas imunomodulator (Baroroh, 2014). Selain terdapat pada batang, senyawa berberin juga terdapat di dalam daun tumbuhan *A. flava* (Larisu, 2011).

2.3 Kandungan Senyawa Palmatin pada *A. flava*

Palmatin adalah isokuinolin alkaloid yang memiliki rumus molekul $C_{12}H_{22}NO_4$ dengan bobot molekul m/z 352,4 (Chen *et al.*, 1999). Beberapa

penelitian telah membuktikan bahwa palmatin merupakan alkaloid yang memiliki berbagai aktivitas farmakologi yang cukup baik. Senyawa ini berpotensi sebagai antikanker pada kulit tikus albino Swiss (Ali dan Dixit, 2013). Selain itu kelompok 13-n-alkil palmatin juga dapat memberikan efek sitotoksik yang kuat pada tikus dengan S180 sarkoma xenograf *in vivo* (Zhang *et al.*, 2012). Palmatin juga dapat menjadi agen sitotoksik kuat dengan invasi tumor dan bersifat menghambat, serta memiliki potensi terapi kanker (Hambright *et al.*, 2014).

2.4 Tinjauan tentang Kanker

Kanker adalah penyakit genetik yang disebabkan oleh perubahan gen yang mengontrol fungsi sel-sel manusia, terutama saat sel membelah. Tubuh terdiri dari triliunan sel hidup. Sel-sel tubuh yang normal selalu tumbuh dan membelah dengan cepat menjadi sel baru. Ketika seseorang menjadi dewasa, sel-sel tersebut membelah hanya untuk menggantikan sel yang usang, sel yang mati, atau untuk memperbaiki bagian tubuh yang cedera. Pertumbuhan sel kanker berbeda dari pertumbuhan sel normal (ACS, 2015).

Sel-sel kanker dapat tumbuh dan menyebar ke bagian tubuh yang lain. Berbagai jenis kanker mempunyai karakteristik yang berbeda-beda. Pasien kanker tersebut membutuhkan pengobatan tertentu sesuai jenis kankernya. Berikut jenis-jenis utama dari kanker, yaitu kanker paru, kanker perut, kanker kolorektal, kanker hati, dan kanker payudara. Lebih dari 30 % kanker disebabkan oleh beberapa risiko perilaku dan lingkungan, seperti: merokok, minum minuman keras, dan makan makanan yang memiliki kelebihan kalori, lemak tinggi, dan rendah serat. Penggunaan tembakau merupakan salah satu penyebab terbesar dari penyakit kanker. Ilmu epidemiologi telah mengidentifikasi bahwa populasi tertinggi yang berisiko kanker adalah pengguna produk tembakau (WHO, 2009). Faktor lain yang dapat meningkatkan risiko kanker adalah berkaitan dengan kontak seksual, genetik, dan paparan sinar matahari (NCI, 2015).

2.5 Tinjauan tentang Kanker Payudara

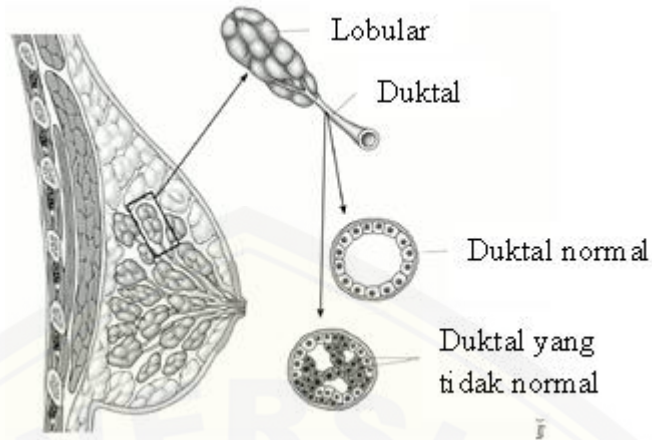
2.5.1 Definisi

Kanker payudara adalah tumor ganas yang tumbuh di sel-sel payudara. Tumor ganas merupakan sekelompok sel kanker yang dapat tumbuh menjadi jaringan sekitarnya atau menyebar (metastasis) ke organ tubuh lain. Penyakit ini terjadi hampir seluruhnya pada wanita, dan sebagian kecil pada pria (ACS, 2015). Menurut Weinstein (1988), terdapat tiga tahapan peningkatan keganasan sel kanker, yaitu tahap inisiasi, tahap promosi, dan tahap perkembangan.

Kanker payudara merupakan kanker yang terbentuk di jaringan payudara. Jenis yang paling umum dari kanker payudara adalah karsinoma duktal, yang dimulai pada lapisan saluran susu (tabung tipis yang membawa susu dari lobulus payudara ke puting susu). Tipe lain dari kanker payudara adalah lobular *carcinoma*, yang dimulai dalam lobulus (kelenjar susu) payudara. Kanker payudara invasif adalah kanker payudara yang telah menyebar mulai dalam saluran payudara atau lobulus menuju jaringan normal di sekitarnya. Kanker payudara terjadi pada pria dan wanita, meskipun kanker payudara pada laki-laki jarang terjadi (ASC, 2015).

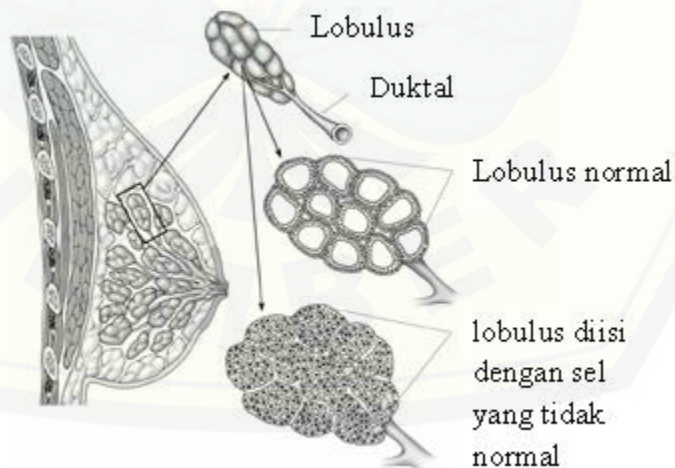
2.5.2 Jenis kanker payudara

Terdapat dua jenis abnormalitas kanker payudara yaitu karsinoma duktal in situ dan karsinoma lobular in situ. Karsinoma duktal in situ (DCIS, juga dikenal sebagai karsinoma intraduktal) disebut sebagai kanker non-invasif atau kanker payudara pra-invasif. DCIS berarti sel-sel yang berjajar di saluran. Perbedaan antara DCIS dan kanker invasif adalah sel-sel belum menyebar (menginvasi) melalui dinding duktus ke sekitar jaringan payudara. Karena belum menyerang, DCIS tidak dapat menyebar (metastasis) di luar payudara. DCIS dianggap sebagai pra-kanker karena beberapa sel ada yang dapat menjadi kanker invasif. Abnormalitas sel karsinoma duktal dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Jaringan duktal karsinoma in situ (ACS, 2015).

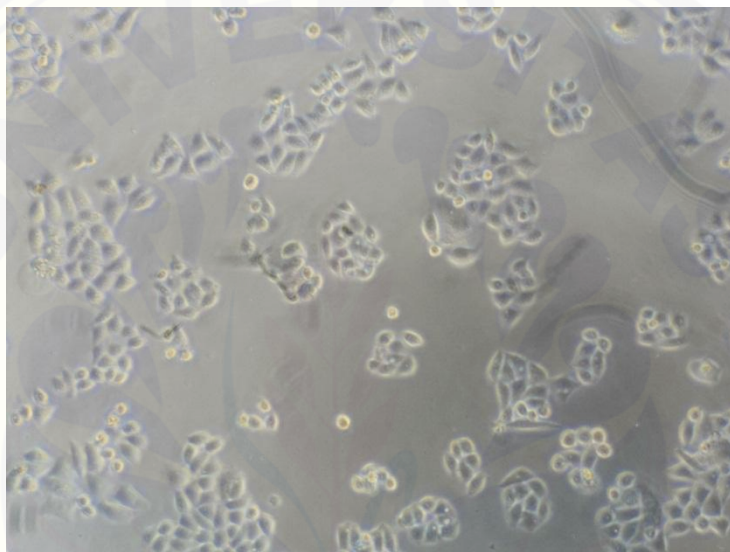
Karsinoma lobular in situ (LCIS), sel yang terlihat seperti sel-sel kanker yang tumbuh di lobulus kelenjar penghasil susu dari payudara, tetapi sel-sel kanker tidak tumbuh melalui dinding dari lobulus. LCIS (juga disebut lobular neoplasia) kadang-kadang dikelompokkan dengan duktal karsinoma in situ (DCIS) sebagai kanker payudara non-invasif, tetapi berbeda dari DCIS yang apabila tidak diobati menjadi kanker invasif (ACS, 2015). Abnormalitas sel karsinoma duktal dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Jaringan lobulus karsinoma in situ (ACS, 2015).

2.6 Tinjauan tentang Sel MCF-7

Sel MCF -7 (Gambar 2.5) merupakan kultur sel (*cell line*) yang diambil dari jaringan pleural kanker payudara seorang pasien wanita Kaukasian berumur 69 tahun dengan golongan darah O dan Rh positif. Sel MCF-7 pertama kali dikembangkan di *Michigan Cancer Foundation* pada tahun 1970 dan telah menjadi model standar untuk berbagai pengujian di seluruh dunia. Sel MCF-7 mengekspresikan reseptor ER- α yang diekspresikan oleh 80% kanker payudara, bersifat adhesif dan memiliki *doubling time* selama 29 jam (NCI, 2015).



Gambar 2.5 Sel kanker MCF-7 di bawah mikroskop *inverted* dengan perbesaran 400x

Media dasar penumbuh sel MCF-7 adalah media DMEM. Untuk memperoleh media kompleks, maka ditambahkan 0,01 mg/ml insulin bovine dan FBS hingga konsentrasi akhir FBS dalam media menjadi 10%. Sel ditumbuhkan pada suhu 37°C dan dengan kadar CO₂ 5% (ATCC, 2012). Sel MCF-7 resisten terhadap doxorubicin, dan tidak mengekspresikan caspase-3. Karakteristik tersebut membedakannya dengan sel kanker payudara lain, seperti sel T47D (NCI, 2015).

2.8 Tinjauan tentang Uji Selektivitas

Indeks selektivitas atau *Selectivity Indeks* (SI) menunjukkan selektivitas sitotoksik dari ekstrak kasar terhadap sel kanker dibandingkan sel normal, dihitung dari IC_{50} sampel kasar pada sel normal terhadap sel kanker. Nilai $SI > 3$ menunjukkan selektivitas tinggi (Machana *et al*,2011).

Nilai SI dihitung dari perbandingan IC_{50} sel Vero dibandingkan sel MCF-7. Nilai SI menunjukkan selektivitas sampel terhadap sel yang diuji. Selektivitas efek sitotoksik ekstrak etanol terhadap sel kanker dibandingkan terhadap sel normal dihitung dengan Persamaan 1.

$$SI = \frac{IC_{50} \text{ sel Normal Vero}}{IC_{50} \text{ sel Kanker Payudara MCF-7}} \times 100 \% \quad (1)$$

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris (*true experimental laboratories*) yang bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksisitas ekstrak etanol *A. flava* terhadap kultur sel kanker payudara (MCF-7).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Februari sampai dengan bulan Agustus 2015 bertempat di Laboratorium Fitokimia Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk pembuatan ekstrak etanol *A. flava*, dan Laboratorium parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Jogjakarta untuk uji sitotoksisitas *in vitro*.

3.3 Alat dan Bahan yang Digunakan

3.3.1 Alat

Pembuatan ekstrak etanol *A. flava* membutuhkan seperangkat alat gelas, *rotary evaporator* (Heidolph-4000), oven, dan corong *buchner*. Penelitian uji sitotoksisitas *in vitro* membutuhkan *inverted microscope* (Zeiss), *autoclave*, *class II biosafety cabinet*, *haemocytometer*, *cellcounter*, mikropipet, dan *ELISA reader* (SLT 240 ATC), inkubator CO₂ (Heraceus), 96 well plate (Nunc) dan *sentrifuge*.

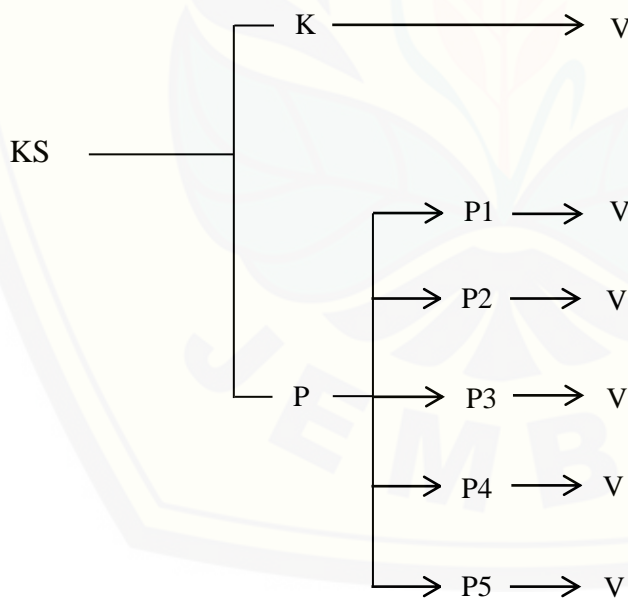
3.3.2 Bahan

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* : senyawa kimia etanol 70%
3. Bahan uji *in vitro* : ekstrak *A. flava* dilarutkan dalam 0,1 ml DMSO (Gibco) sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan. Kultur sel

kanker payudara (sel MCF-7) dan kultur sel normal (sel Vero). Kultur sel MCF-7 ditumbuhkan dalam media kultur *Dulbecco's Modified Eagle Media high glucose* (Gibco). Sel Vero ditumbuhkan dalam media kultur M199 (Gibco). Media kultur mengandung *fetal bovine serum* (Gibco) 10% (v/v) dan antibiotika penisilin-streptomisin 1% (Gibco). Semua sel ditumbuhkan pada suhu 37°C dan 5% CO₂. Sel dipanen dari *tissue culture dish* menggunakan tripsin-EDTA 0,25% (Gibco) untuk membantu melepaskan sel dan PBS (Sigma) untuk mencuci sel.

4. Bahan uji sitotoksisitas dengan *MTT assay* membutuhkan pereaksi berikut: Pereaksi MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida] (Sigma) dan pereaksi *stopper* yang mengandung natrium dodesil sulfat (SDS) (Sigma) 10% dalam 0,1 N HCl (Merck).

3.1 Rancangan Penelitian



Gambar 3.1 Diagram uji sitotoksisitas *in vitro*

Keterangan :

KS : Kultur sel

K : Kelompok kontrol (tanpa perlakuan)

- P : Kelompok dengan perlakuan ekstrak etanol total *A. flava*
P1 : Kelompok dengan perlakuan ekstrak etanol total *A. flava* 100 µg/ml
P2 : Kelompok dengan perlakuan ekstrak etanol total *A. flava* 200 µg/ml
P3 : Kelompok dengan perlakuan ekstrak etanol total *A. flava* 400 µg/ml
P4 : Kelompok dengan perlakuan ekstrak etanol total *A. flava* 700 µg/ml
P5 : Kelompok dengan perlakuan ekstrak etanol total *A. flava* 1000 µg/ml
V : Penentuan viabilitas sel

3.5 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah 5 macam konsentrasi ekstrak etanol daun *A. flava*.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah viabilitas sel MCF-7 dan hasil Indeks selektivitas (SI) pada uji selektivitas.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi, jenis sel kanker, dan perlakuan terhadap sel kanker payudara (sel MCF-7).

3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Ekstraksi merupakan proses pengambilan senyawa aktif dalam daun *A. flava* menggunakan pelarut etanol secara maserasi.
- b. Uji sitotoksitas dilakukan dengan menggunakan metode MTT terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan inkubasi selama 24 jam.
- c. Uji selektivitas dilakukan dengan cara membandingkan efek sitotoksik ekstrak etanol *A. flava* dari sel kanker payudara (sel MCF-7) terhadap sel normal (sel Vero).

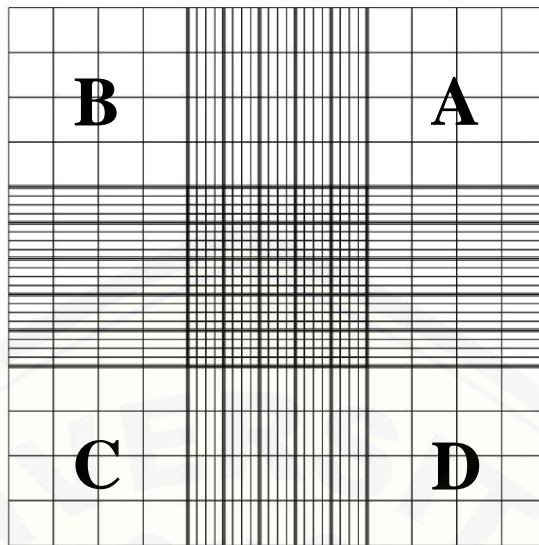
3.7. Pelaksanaan Penelitian

3.7.1. Pembuatan ekstrak etanol *A. flava*

Pada penelitian ini, daun *A. flava* disortir dan dijemur dengan diangin-anginkan hingga kering, kemudian dijadikan serbuk dan diayak. Sebanyak 250 g serbuk daun kering diekstraksi dengan etanol sebanyak 3 kali ulangan. Ekstrak etanol kemudian dipekatan menggunakan *rotary evaporator* dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Ekstrak etanol *A. flava* selanjutnya dibuat sediaan suspensi dalam 0,1 ml DMSO untuk uji *in vitro*.

3.7.2 Preparasi kultur sel

Sel diambil dari tangki nitrogen cair, kemudian sel tersebut dicairkan. Menyemprot ampul dengan etanol 70% dan dimasukkan ke dalam LAF. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam *conical tube* steril baru yang berisi media kultur. Cairan sel disentrifugasi dengan kecepatan 600 rpm selama 5 menit, dan supernatan yang dihasilkan kemudian dibuang. Media kultur yang baru ditambahkan pada endapan sel dan disuspensikan perlahan hingga homogen. Selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa buah *tissue culture dish* dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C dan aliran CO₂ 5%. Dua puluh empat jam kemudian dilakukan penggantian media kultur, selanjutnya sel ditumbuhkan hingga merata, dan jumlahnya cukup untuk penelitian. Setelah sel merata, media dibuang dan sel dicuci dengan 100 µg/ml PBS dua kali. Sel ditambah tripsin 0,25% untuk melepas sel dari *tissue culture dish* dan dilakukan inkubasi selama 3 menit dalam inkubator CO₂. Media DMEM ditambahkan ke dalam *tissue culture dish* dan sel diresuspensi hingga terlepas semua dari dinding *tissue culture dish*. Suspensi sel kemudian dipindahkan ke dalam *conical tube* steril baru. Sel dihitung dengan *haemocytometer* dan *cell counter* lalu dibuat suspensi sel dengan konsentrasi sel sesuai dengan kebutuhan. Alat *Haemocytometer* dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Penampang *Haemocytometer* dilihat dibawah mikroskop *inverted*

Hemacytometer terdiri dari 4 kamar hitung yang ditandai oleh huruf A, B, C, dan D terdiri dari 16 kotak. Sel yang gelap (mati) dan sel yang terdapat di batas luar sebelah atas dan sebelah kanan tidak ikut dihitung. Sel di batas kiri dan batas bawah ikut dihitung dan dimasukkan pada Persamaan 2.

$$\frac{\Sigma \text{ sel kamar A} + \Sigma \text{ sel kamar B} + \Sigma \text{ sel kamar C} + \Sigma \text{ sel kamar D} \times 10^4}{4} \quad (2)$$

Jumlah ml panen sel yang ditransfer ke dalam plate = $\frac{\text{Jumlah total sel yang diperlukan}}{\text{Jumlah sel terhitung/ml}}$, kemudian ditambahkan media kultur sampai sejumlah yang diperlukan.

3.7.3 Preparasi sampel

Sampel ditimbang lebih kurang 20 mg dengan seksama di dalam *microtube*. Sampel tersebut ditambahkan 0,1 ml DMSO (200.000 $\mu\text{l/ml}$) dan dilarutkan dengan bantuan vortex. Dari larutan dengan kadar 200.000 $\mu\text{l/ml}$ di atas, dibuat seri kadar sampel dengan konsentrasi 100 $\mu\text{l/ml}$, 200 $\mu\text{l/ml}$, 400 $\mu\text{l/ml}$, 700 $\mu\text{l/ml}$, dan 1000 $\mu\text{l/ml}$ dan diencerkan dalam DMSO.

3.7.4 Uji sitotoksik metode MTT

Sel kanker payudara MCF-7 yang telah diambil dari inkubator CO₂ diamati kondisinya menggunakan mikroskop. Setelah itu, sel dipanen dan dihitung jumlah selnya untuk dapat membuat pengenceran sel dengan media kultur sesuai dengan penghitungan sel. Sel ditransfer ke dalam sumuran, masing-masing sumuran sebesar 100 µl. Setiap kali mengisi 12 sumuran, cairan sel dan media kultur diresuspensi kembali agar tetap homogen, serta mengosongkan 3 sumuran kosong sebagai kontrol media. Keadaan sel diamati menggunakan mikroskop untuk melihat distribusi sel. Sel diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam. Perlakuan sel dengan sampel dilakukan setelah sel kembali pada keadaan normal. Setelah sel kembali pada keadaan normal, kemudian dibuat seri konsentrasi sebesar 100 µl/ml, 200 µl/ml, 400 µl/ml, 700 µl/ml, dan 1000 µl/ml. Plate yang telah terisi sel MCF-7 dari inkubator dibuang media selnya dan dimasukkan 100 µl PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian PBS dibuang. Sisa cairan dalam sumuran ditiriskan dengan tisu. Setelah itu dimasukkan seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran secara triplo dan diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam. Kemudian, media sel dibuang, dicuci PBS 1 kali, dan ditambahkan reagen MTT sebesar 100 µl ke setiap sumuran, termasuk kontrol media. Sel diinkubasi selama 2-4 jam di dalam inkubator (sampai terbentuk formazan). Kondisi sel diamati dengan menggunakan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, ditambahkan *stopper* SDS 10% dalam 0,1 N HCl. Setelah itu *plate* dibungkus dengan kertas dan diinkubasi di tempat gelap dengan suhu ruangan. Masing-masing sumuran dibaca absorbansinya dengan menggunakan ELISA reader $\lambda=595$ nm (Sinaga, 2011).

3.8 Analisis data

3.8.1. Uji sitotoksitas menggunakan MTT assay

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

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

Aktivitas sitotoksik dinyatakan dengan IC_{50} (konsentrasi yang menyebabkan kematian 50 % populasi sel) yang dianalisis dengan analisis probit. IC_{50} merupakan konsentrasi yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan 50% populasi sel sehingga dapat diketahui potensi sitotoksitasnya (Doyle dan Griffiths, 2000).

3.8.2. Uji Selektivitas

Penentuan selektivitas dilakukan dengan uji sitotoksik terhadap sel kanker MCF-7 dan sel Vero pada kadar yang sama dengan metode MTT. IC_{50} terpilih yang dipandang selektif berdasarkan uji sitotoksitas dikarakterisasi menggunakan pembacaan absorbansi dengan menggunakan ELISA (Mudyantini dan Rakhmawati, 2010). Selektivitas efek sitotoksik ekstrak etanol *A. flava* terhadap sel kanker dibandingkan terhadap sel normal dihitung dengan Persamaan 1.