



**UJI SITOTOKSISITAS KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN
KI KONENG (*Arcangelisia flava* L. Merr.) DAN DOXORUBICIN
TERHADAP KULTUR SEL KANKER KOLON WiDr**

SKRIPSI

Oleh:

Muhammad Bayu Sanjaya

NIM 122210101053

UNIVERSITAS JEMBER

JEMBER

2017



**UJI SITOTOKSISITAS KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN
KI KONENG (*Arcangelisia flava* L. Merr.) DAN DOXORUBICIN
TERHADAP KULTUR SEL KANKER KOLON WiDr**

SKRIPSI

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

Oleh:

Muhammad Bayu Sanjaya

NIM 122210101053

UNIVERSITAS JEMBER

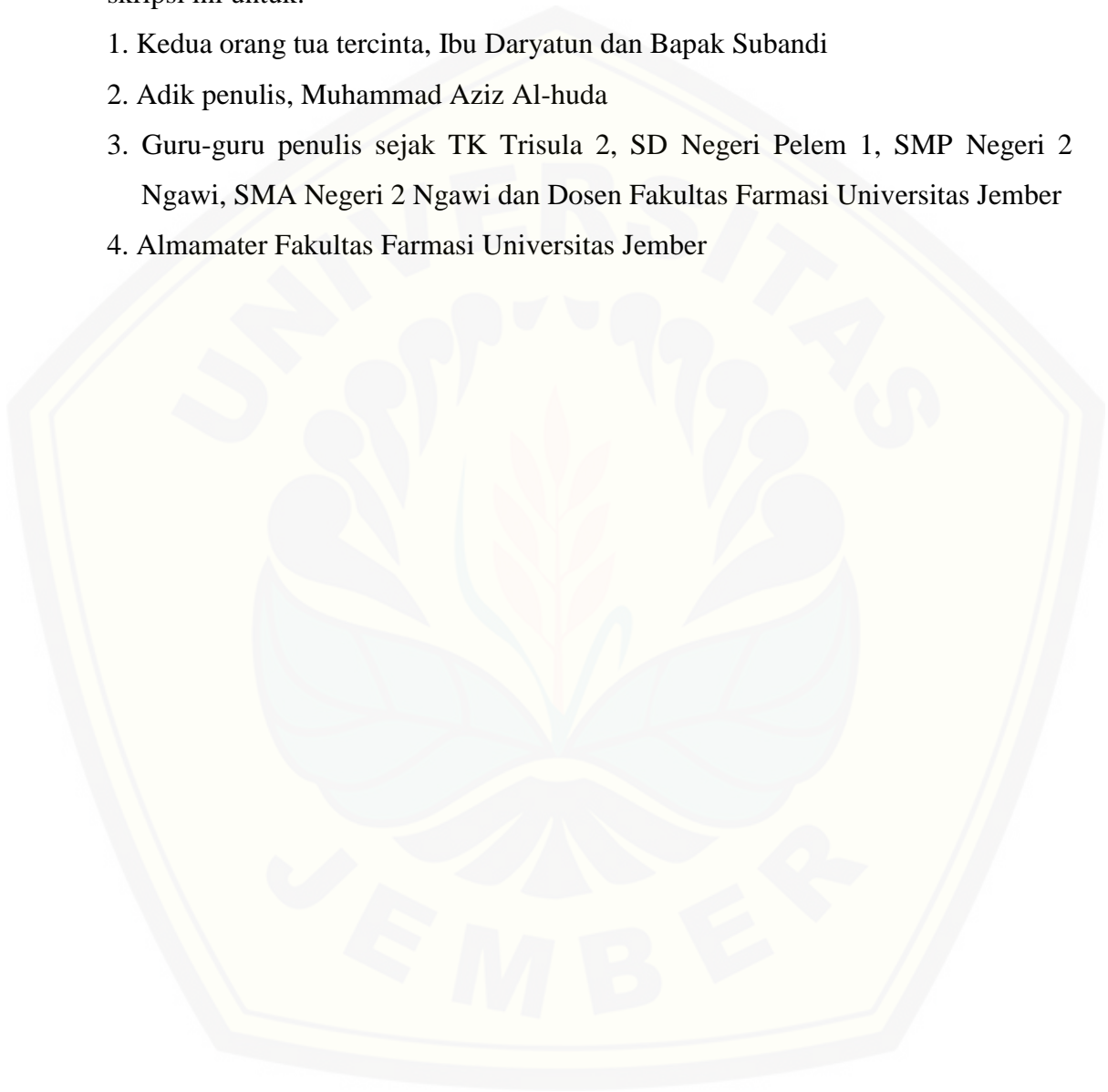
JEMBER

2017

PERSEMBAHAN

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

1. Kedua orang tua tercinta, Ibu Daryatun dan Bapak Subandi
2. Adik penulis, Muhammad Aziz Al-huda
3. Guru-guru penulis sejak TK Trisula 2, SD Negeri Pelem 1, SMP Negeri 2 Ngawi, SMA Negeri 2 Ngawi dan Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember
4. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember



MOTTO

“Berdoalah (mintalah) kepadaKu (Allah SWT), pastilah aku kabulkan untukmu”

(Q.S. Al-Mukmin : 60)

*“Your life will not be change by fate, but be transformed by the changes that you
did”*

(Jim Rohn)

“Usaha akan membuahkan hasil ketika seseorang tidak menyerah”

(Napoleon Hill)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Bayu Sanjaya

NIM : 122210101053

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Uji Sitotoksisitas Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Ki Koneng (*Arcangelisia flava* L. Merr.) dan Doxorubicin terhadap Kultur Sel Kanker Kolon WiDr” 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 dan bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 12 Januari 2017

Yang menyatakan,

Muhammad Bayu Sanjaya

NIM 122210101053

SKRIPSI

**UJI SITOTOKSISITAS KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN
KI KONENG (*Arcangelisia flava* L. Merr.) DAN DOXORUBICIN
TERHADAP KULTUR SEL KANKER KOLON WiDr**

Oleh:

Muhammad Bayu Sanjaya

NIM 122210101053

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 Sitotoksitas Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Ki Koneng (*Arcangelisia flava* L. Merr.) dan Doxorubicin terhadap Kultur Sel Kanker Kolon WiDr” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Kamis, 12 Januari 2017

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Pembimbing Utama,

Pembimbing Anggota,

Endah Puspitasari, S.Farm., MSc., Apt.
NIP. 198107232006042002

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

Tim Penguji

Penguji I,

Penguji II,

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

Dwi Koko P, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP. 198504282009121004

Mengesahkan

Dekan,

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

RINGKASAN

Uji Sitotoksitas Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Ki Koneng (*Arcangelisia flava* L. Merr.) dan Doxorubicin terhadap Kultur Sel Kanker Kolon WiDr; Muhammad Bayu Sanjaya; 122210101053; 2017; 63 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kanker kolon merupakan salah satu penyakit yang memiliki prevalensi tinggi dengan jumlah angka kematian yang terus bertambah setiap tahunnya, sehingga menjadikan kanker kolon permasalahan kesehatan global yang perlu ditangani. Ki koneng (*Arcangelisia flava* L. Merr.) merupakan salah satu tumbuhan yang memiliki potensi untuk terapi antikanker karena adanya senyawa berberin di dalamnya. Ekstrak etanol daun *A. flava* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker kolon WiDr namun lebih memacu sel untuk mengalami nekrosis dibandingkan apoptosis, sehingga dibutuhkan upaya untuk mengurangi kejadian nekrosis salah satunya dengan penggunaan ko-kemoterapi. Doxorubicin merupakan agen kemoterapi kanker yang pada penggunaannya dalam dosis tinggi dapat menyebabkan kardiomiopati, sehingga dibutuhkan upaya untuk pengurangan efek samping doxorubicin namun terapi tetap efektif salah satunya dengan penggunaan ko-kemoterapi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas ko-kemoterapi kombinasi ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin berdasarkan efek sitotoksiknya terhadap sel kanker kolon WiDr.

Penelitian ini merupakan penelitian *eksperimental laboratories* menggunakan sel kanker kolon WiDr yang ditumbuhkan dalam media RPMI dan metode uji sitotoksitas MTT *assay*. Untuk uji sitotoksitas tunggal, kultur sel WiDr diberi perlakuan ekstrak etanol daun *A. flava* menggunakan 5 seri konsentrasi yaitu 200, 300, 400, 600, dan 700 µg/ml serta doxorubicin dengan konsentrasi 0,5; 1; 6; 8; dan 10 µg/ml secara triplo dengan replikasi masing-masing sebanyak 3 kali. Reagen MTT ditambahkan untuk membentuk kristal formazan yang berwarna ungu, kemudian dibaca absorbansinya dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm. Data absorbansi dikonversi menjadi

viabilitas sel dan dianalisis dengan program probit untuk memperoleh nilai IC_{50} . Nilai rata-rata IC_{50} dari tiga eksperimen untuk ekstrak etanol daun *A. flava* yaitu $449,271 \pm 18,113 \mu\text{g/ml}$, sedangkan pada doxorubicin yaitu $5,781 \pm 0,599 \mu\text{g/ml}$.

Uji sitotoksitas kombinasi dilakukan dengan memberikan perlakuan kombinasi ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin pada konsentrasi di sekitar dan di bawah nilai IC_{50} . Berdasar uji sitotoksitas kombinasi didapatkan hasil yaitu kombinasi ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin mampu menurunkan viabilitas sel kanker kolon WiDr. Kombinasi yang membutuhkan dosis kecil namun memiliki efikasi yang besar terdapat pada kombinasi antara ekstrak etanol daun *A. flava* pada konsentrasi $56,25 \mu\text{g/ml}$ dan doxorubicin pada konsentrasi $3 \mu\text{g/ml}$. Viabilitas sel WiDr akibat pemberian kombinasi tersebut sebesar 51,91 %. Hasil ini lebih baik jika dibandingkan dengan perlakuan ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin pada konsentrasi yang sama ketika diberikan dalam bentuk tunggal, yaitu secara berurutan masing-masing menghasilkan viabilitas sel sebesar 102,40 % dan 67,38 %.

Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa kombinasi ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin memiliki potensi sebagai agen ko-kemoterapi dilihat dari aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker kolon WiDr. Saran yang dapat diberikan peneliti antara lain perlu pengujian mekanisme kematian sel akibat kombinasi ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin serta perlu dilakukan penelusuran jalur kematian sel dan mekanisme yang memerantarainya.

PRAKATA

Bismillahirrohmanirohim

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Sitotoksitas Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Ki Koneng (*Arcangelisia flava* L. Merr.) dan Doxorubicin terhadap Kultur Sel Kanker Kolon WiDr”. Sholawat dan salam senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabatnya.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, dukungan, dan bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan 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 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 Bapak Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc., Apt., yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan mengevaluasi skripsi ini;
4. Bapak dan Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang tanpa lelah mengamalkan ilmunya dan memperluas ilmu pengetahuan serta wawasan penulis selama menempuh masa perkuliahan;
5. Pimpinan dan para karyawan Fakultas Farmasi Universitas Jember atas bantuannya selama penulis belajar di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
6. Kedua orang tua penulis, Bapak Subandi dan Ibu Daryatun atas doa, semangat, kasih sayang yang tidak pernah berhenti. Semoga keberhasilanku ini dapat menjadi kebanggaan dan kebahagiaan bapak dan ibu;

7. Adik penulis, Muhammad Aziz Al-huda atas semangat dan doa yang telah diberikan;
8. Zumatul Amilin selaku orang yang sudah memberikan dukungan, motivasi, dan doa selama pengerjaan skripsi dan penelitian ini;
9. Sahabat-sahabat seperjuangan Nandan dan Balinda atas semangat kerja keras, dan kekompakan selama pengerjaan skripsi dan penelitian ini;
10. Sahabat-sahabat terbaik di kampus: Nico, Tsabit, Umam, Ozi, Helmi, Angga, Adin, Agus, Arjun, Arya, Hafidi, Yodi, Dhani, Prima atas kebersamaan, bantuan, dan semangatnya dalam menyelesaikan penelitian ini;
11. Bu Widi dan Mbak Parka selaku teknisi laboratorium Biologi atas bantuannya;
12. Mbak Juju, Mbak Rumbi, dan Mas Farid selaku teknisi FK UGM;
13. Sahabat-sahabat seangkatan Fakultas Farmasi Universitas Jember, “Farmasi 2012, Keep spirit and fighting !!!”;
14. Sahabat-sahabat di SD Negeri Pelem 1 Ngawi, SMP Negeri 2 Ngawi (kelas H), dan SMA Negeri 2 Ngawi (Phobia);
15. 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, 12 Januari 2017

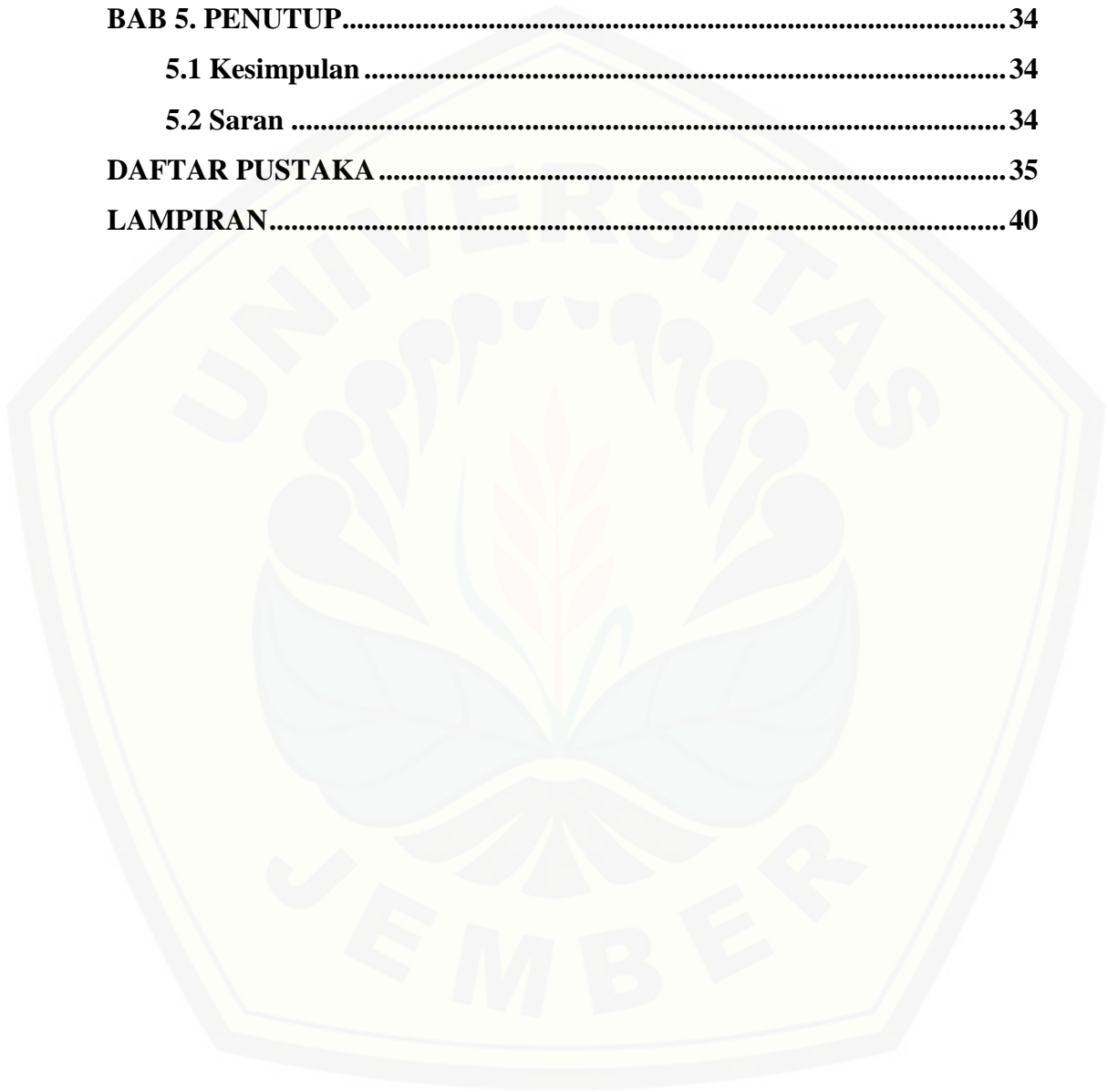
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN BIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tinjauan Tumbuhan <i>A. flava</i>.....	5
2.1.1 Klasifikasi	5
2.1.2 Morfologi	5
2.1.3 Ekologi dan Penyebaran.....	6
2.1.4 Kandungan Kimia dan Penelitian Pendahuluan	6
2.2 Tinjauan Doxorubicin.....	7
2.3 Tinjauan Kanker Kolon	8
2.3.1 Pengertian Kanker Kolon.....	8
2.3.2 Prevalensi Kanker Kolon	8
2.3.3 Patofisiologi	9

2.3.4 Gejala Kanker Kolon	10
2.3.5 Terapi Kanker Kolon	11
2.4 Tinjauan Sel WiDr	11
2.5 Tinjauan Kemoprevensi	12
2.6 Tinjauan Kombinasi Kemoterapi (Ko-Kemoterapi)	13
2.7 Tinjauan Uji Sitotoksitas	14
BAB 3. METODE PENELITIAN	16
3.1 Jenis Penelitian	16
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	16
3.3 Alat dan Bahan	16
3.3.1 Alat	16
3.3.2 Bahan	16
3.4 Variabel Penelitian	17
3.4.1 Variabel Bebas	17
3.4.2 Variabel Terikat	17
3.4.3 Variabel Terkendali	18
3.5 Rancangan Penelitian	18
3.5.1 Rancangan Operasional	18
3.5.2 Definisi Operasional	18
3.5.3 Rancangan Percobaan	18
3.5.4 Alur Penelitian	19
3.6 Cara Kerja Penelitian	19
3.6.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun <i>A. flava</i>	19
3.6.2 Penelitian <i>In vitro</i>	20
3.6.3 Preparasi Sampel	22
3.6.4 Uji Sitotoksitas Tunggal Menggunakan Metode MTT	22
3.6.5 Uji Sitotoksitas Kombinasi Menggunakan Metode MTT	23
3.7 Analisis Data	24
3.7.1 Analisis Data Uji Sitotoksitas Tunggal	24
3.7.2 Analisis Data Uji Sitotoksitas Kombinasi	24
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	25

4.1 Hasil Ekstraksi Daun <i>A. flava</i>	25
4.2 Hasil Uji Sitotoksisitas Tunggal.....	25
4.3 Hasil Uji Sitotoksisitas Kombinasi	28
4.4 Pembahasan.....	29
BAB 5. PENUTUP.....	34
5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN.....	40



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Tumbuhan <i>A. flava</i> (L.) Merr.....	6
2.2 Diagram data jumlah kasus dan kematian akibat kanker kolon.....	9
2.3 Anatomi kolon, polip, dan kanker kolon.....	10
2.4 Sel WiDr	12
2.5 Mekanisme MTT.....	15
3.1 Alur penelitian.....	19
3.2 <i>Haemocytometer</i> dilihat di bawah mikroskop <i>inverted</i>	21
4.1 Morfologi sel WiDr setelah perlakuan EEAfL	25
4.2 Morfologi sel WiDr setelah perlakuan doxorubicin.....	26
4.3 Kurva pengaruh konsentrasi EEAfL terhadap sel WiDr.....	27
4.4 Kurva pengaruh konsentrasi doxorubicin terhadap sel WiDr.....	27
4.5 Morfologi sel WiDr setelah perlakuan kombinasi	28
4.6 Mekanisme kerja EEAfL dan doxorubicin dalam menginduksi apoptosis.	32

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. PERHITUNGAN RENDEMEN EKSTRAK.....	40
B. PERHITUNGAN DAN HASIL UJI SITOTOKSISITAS TUNGGAL	40
1. Kepadatan Penanaman Sel Uji Sitotoksitas Tunggal <i>A. flava</i>	40
2. Kepadatan Penanaman Sel Uji Sitotoksitas Tunggal Doxorubicin.....	40
3. Konsentrasi Ekstrak <i>A. flava</i> Uji Sitotoksitas Tunggal.....	40
4. Konsentrasi Doxorubicin Uji Sitotoksitas Tunggal	42
5. Data Absorbansi dan Viabilitas Uji Sitotoksitas Tunggal <i>A. flava</i>	43
6. Analisis Probit Uji Sitotoksitas Tunggal <i>A. flava</i>	45
7. Data Absorbansi dan Viabilitas Uji Sitotoksitas Tunggal Doxorubicin ..	49
8. Analisis Probit Uji Sitotoksitas Tunggal Doxorubicin	52
C. PERHITUNGAN DAN HASIL UJI SITOTOKSISITAS KOMBINASI....	55
1. Kepadatan Penanaman Sel.....	55
2. Konsentrasi Ekstrak <i>A. flava</i>	56
3. Konsentrasi Doxorubicin	57
4. Data Absorbansi dan Viabilitas	58
5. Data Hasil Analisis Statistik	59

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan penyakit dengan prevalensi tinggi yang disebabkan karena pertumbuhan sel yang abnormal dan dapat menyebabkan kematian bila penyebarannya tidak terkendali. Di Indonesia, terjadi peningkatan penderita kanker dari tahun ke tahun. Berdasarkan data *International Agency for Research on Cancer* (2013), pada tahun 2008 terdapat 12,7 juta kasus dengan angka kematian mencapai 7,6 juta jiwa akibat kanker di seluruh dunia. Pada tahun 2012, jumlah kasus baru dan angka kematian mengalami peningkatan mencapai 14,1 juta kasus baru dengan angka kematian mencapai 8,2 juta jiwa di seluruh dunia.

World Health Organization (WHO, 2014) menyebutkan angka kematian yang disebabkan oleh kanker di Indonesia mencapai 195.300 orang dengan jumlah kematian paling banyak terjadi pada laki-laki sebanyak 103.100 orang dan perempuan 92.200 orang. Beberapa jenis penyakit kanker yang menyebabkan kematian pada laki-laki di Indonesia yaitu kanker trakea, bronkus, paru-paru, hati, kolon, prostat, mulut, dan orofaring, sedangkan jenis kanker yang dapat menyebabkan kematian pada perempuan di Indonesia yaitu kanker payudara, serviks, trakea, bronkus, dan paru-paru. Di Indonesia, penderita kanker kolon mencapai 1,8 penderita setiap 100.000 orang (Tedja dan Abdullah, 2013).

Pengobatan kanker secara konvensional dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi yang pada umumnya belum mampu memberikan hasil efektif. Kemoterapi dengan obat antikanker memiliki efek samping yang banyak, antara lain mual, muntah, kerontokan rambut, menopause dini, kelelahan, luka pada mulut dan tenggorokan, kehilangan berat badan secara drastis, dan gangguan ingatan (ACS, 2015). Radioterapi dan pembedahan merupakan pengobatan lain yang lebih aman daripada kemoterapi karena memiliki efek kerja lokal yang bekerja pada bagian yang terkena kanker, namun

tidak semua penderita dapat melakukan pengobatan tersebut karena memerlukan biaya yang cukup besar dibanding kemoterapi (ACS, 2015).

Berdasarkan data tersebut, perlu dilakukan pencarian dan pengembangan agen kemoprevensi kanker. Kemoprevensi kanker adalah suatu senyawa alam, sintesis, atau agen biologis kimia yang berperan dalam mencegah, menekan, atau mengembalikan fungsi normal perkembangan kanker dari tahap inisiasi hingga invasi (Tsao *et al.*, 2004). Indonesia merupakan negara yang kaya akan sumber daya alam, maka eksplorasi agen kemoprevensi kanker yang berasal dari bahan alam dapat dengan mudah dilakukan baik flora maupun fauna. Kekayaan flora Indonesia sekitar 30.000 spesies yang banyak terdapat dalam hutan hujan tropik dan 1.260 spesies di antaranya memiliki khasiat sebagai obat (Hasanah, 2013).

Salah satu tumbuhan yang berpotensi sebagai agen kemoprevensi adalah *Arcangelisia flava*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Keawpradub *et al* (2005), ekstrak metanol *A. flava* mempunyai aktivitas sitotoksik yang paling baik terhadap sel kanker payudara MCF-7 bila dibandingkan dengan ekstrak kloroform, petroleum eter dan ekstrak airnya dengan nilai IC₅₀ sebesar 7,7 µg/ml. Aktivitas sitotoksik di dalam *A. flava* diduga disebabkan oleh kandungan berberin (Keawpradub *et al.*, 2005). Kadar berberin dalam ekstrak kloroform *A. flava* sebesar 0,106 mg dalam 250 mg ekstrak (Baroroh, 2014). Penelitian Puspitasari dan Ulfa (2013) menyebutkan bahwa ekstrak etanol *A. flava* mampu meningkatkan sistem imun tikus yang diberi doxorubicin, selain itu penelitian Puspitasari *et al* (2015) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *A. flava* memiliki aktivitas sitotoksik yang selektif terhadap sel kanker kolon WiDr dengan nilai IC₅₀ sebesar 213 ± 79 µg/ml (Puspitasari *et al.*, 2015), namun ekstrak etanol daun *A. flava* lebih memacu sel untuk mengalami nekrosis dibandingkan apoptosis (Puspitasari *et al.*, 2016). Sel yang mengalami nekrosis akan melepaskan mediator inflamasi ke jaringan sekitar akibatnya proliferasi sel kanker menjadi lebih banyak, sedangkan apoptosis merupakan mekanisme kematian sel yang terprogram yang tidak menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi (Hanahan dan Weinberg, 2011), oleh karena itu mekanisme kematian sel melalui apoptosis lebih diinginkan dalam pengobatan kanker.

Ko-kemoterapi merupakan penggunaan agen kemoprevensi kanker dengan agen kemoterapi yang bertujuan untuk meningkatkan efektivitas dan mengurangi efek samping terapi. Agen kemoterapi kanker yang digunakan dalam penelitian ini adalah doxorubicin. Berdasarkan penelitian Meiyanto *et al* (2008), kombinasi ekstrak etanolik biji buah pinang dan fraksi kloroformnya dengan doxorubicin dapat meningkatkan efek apoptosis pada sel kanker kolon WiDr, selain itu uji sitotoksisitas kombinasi ekstrak metanolik daun sirih merah dan doxorubicin dapat meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin terhadap sel kanker kolon WiDr (Wulandari, 2015).

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, peneliti menduga bahwa pada pengujian sitotoksisitas ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin memiliki aktivitas ko-kemoterapi terhadap sel kanker kolon WiDr. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ko-kemoterapi ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin berdasarkan efek sitotoksiknya pada sel kanker kolon WiDr. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar penggunaan ekstrak etanol daun *A. flava* yang digunakan secara kombinasi dengan doxorubicin sebagai agen ko-kemoterapi untuk mengobati kanker kolon yang lebih efektif dan efisien.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka permasalahan yang dapat dirumuskan adalah apakah kombinasi ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin memiliki aktivitas ko-kemoterapi berdasarkan efek sitotoksiknya terhadap sel kanker kolon WiDr?

1.3 Tujuan

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas ko-kemoterapi kombinasi ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin berdasarkan efek sitotoksiknya terhadap sel kanker kolon WiDr.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian kali ini memiliki beberapa manfaat, antara lain:

1. Memanfaatkan kombinasi ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin sebagai agen ko-kemoterapi kanker kolon.
2. Memberikan informasi yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah mengenai khasiat dan manfaat dari *A. flava* dan doxorubicin.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tumbuhan *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	: <i>Arcangelisia</i>
Spesies	: <i>Arcangelisia flava</i> (L.) Merr. (NCBI, 2016).
Nama Indonesia	: Akar kuning, tali kuning
Nama daerah	: ki koneng (Sunda), sirawan (Jawa), daun bulan (Maluku)

2.1.2. Morfologi

A. flava (Gambar 2.1) merupakan tumbuhan yang dapat tumbuh hingga panjang 20 m, hidup pada dataran rendah sampai 800 m di atas permukaan laut (dpl). Daunnya tebal dan kuat seperti kulit, berbentuk oval, lebar daun 7 cm sampai 20 cm, pada permukaan atas daun mengkilap dan tangkainya panjang. Memiliki bentuk bunga berumah dua dengan ukuran kecil-kecil tersusun dalam rangkaian berupa *glabrous* 20 cm sampai 50 cm, tajuk bercuping putih kehijauan atau putih kekuningan (Widyatmoko dan Zich, 1998).



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

2.1.3. Ekologi dan Penyebaran

Tumbuhan ini hidup di dataran rendah, sering ditemukan di pantai, sungai atau tepi hutan pada ketinggian 100-800 m di atas permukaan laut. Secara luas didistribusikan dari Cina, Indo-China, Semenanjung Malaysia, Thailand, Sumatera, Jawa, Kalimantan, Sulawesi, Maluku hingga Filipina (Padua *et al.*, 2000).

2.1.4. Kandungan Kimia dan Penelitian Pendahuluan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Keawpradub *et al* (2005), ekstrak metanol *A. flava* mempunyai aktivitas sitotoksik yang paling baik terhadap sel kanker payudara MCF-7 bila dibandingkan dengan ekstrak kloroform, petroleum eter dan ekstrak airnya dengan nilai IC_{50} sebesar 7,7 $\mu\text{g/ml}$. Aktivitas sitotoksik di dalam *A. flava* diduga disebabkan oleh kandungan berberin (Keawpradub *et al.*, 2005). Kadar berberin dalam ekstrak kloroform *A. flava* sebesar 0,106 mg dalam 250 mg ekstrak (Baroroh, 2014). Penelitian Puspitasari dan Ulfa (2013) menyebutkan bahwa ekstrak etanol *A. flava* mampu meningkatkan sistem imun tikus yang diberi doxorubicin. Penelitian Habibi (2015) menunjukkan bahwa ekstrak etanol *A. flava* partisi memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker kolon WiDr dengan nilai IC_{50} sebesar $308 \pm 83 \mu\text{g/ml}$, sedangkan penelitian Puspitasari *et al* (2015) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *A. flava* memiliki

aktivitas sitotoksik yang selektif terhadap sel kanker kolon dengan nilai IC_{50} sebesar $213 \pm 79 \mu\text{g/ml}$, namun ekstrak etanol daun *A. flava* lebih memacu sel untuk mengalami nekrosis dibandingkan apoptosis (Puspitasari *et al.*, 2016). Sel yang mengalami nekrosis akan melepaskan mediator inflamasi ke jaringan sekitar akibatnya proliferasi sel kanker menjadi lebih banyak, sedangkan apoptosis merupakan mekanisme kematian sel yang terprogram yang tidak menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi (Hanahan dan Weinberg, 2011), oleh karena itu mekanisme kematian sel melalui apoptosis lebih diinginkan dalam pengobatan kanker.

A. flava memiliki kandungan alkaloid isokuinolin, yaitu alkaloid yang mengandung inti isokuinolin dalam struktur kimianya seperti jatrorizin, palmatin, dan berberin. Selain itu, juga terdapat beberapa alkaloid minor seperti kolumbamin, dehidrokoralmin, homoaromolin, dan talifendin. Di antara kandungan alkaloid golongan isokuinolin terbesar adalah berberin (Keawpradub *et al.*, 2005).

Berberin memiliki banyak aktivitas yang berperan sebagai senyawa antikanker. Senyawa ini dapat menghambat pertumbuhan sel leukemia WEHI-3 *in vivo* (Yu *et al.*, 2007), menginduksi G1 *arrest* dan apoptosis pada sel glioblastoma T98G melalui jalur mitokondria/caspase (Eom *et al.*, 2008) serta p53 (Katiyar *et al.*, 2009), dan juga dapat menghambat produksi gen antiapoptosis (Pandey *et al.*, 2008). Tidak hanya digunakan dalam terapi tunggal, berberin menunjukkan hasil yang baik bila diaplikasikan dalam bentuk kombinasi dengan radioterapi (Li *et al.*, 2010).

2.2 Tinjauan Doxorubicin

Doxorubicin merupakan metabolit sekunder dari *Streptomyces peucetius* var *Caesius* bersama dengan epirubicin, daunorubicin, idarubicin (Nafrialdi dan Sulistia, 2009). Doxorubicin adalah antibiotik antrasiklin yang sering digunakan dalam mengobati penyakit kanker seperti kanker sel darah putih atau leukimia, perut, limfoma, payudara dan ovarium, tumor tulang (Childs *et al.*, 2002).

Doxorubicin adalah agen kemoterapi yang memiliki efek samping antara lain yaitu mual, muntah, ekstrasvasasi (kebocoran obat dari vena ke jaringan sekitar yang sehat selama pemberian obat kemoterapi), penurunan sumsum tulang, dan kerontokan rambut (BNF 58, 2009). Penggunaan jangka panjang dapat menimbulkan kardiomiopati dan gagal jantung serta dapat melemahkan sistem imun (imunopresi) (Martindale, 2009). Pada umumnya doxorubicin digunakan kombinasi dengan agen antikanker lain seperti siklofosfamid, cisplatin, dan 5-FU. Peningkatan respon klinis dan pengurangan efek samping cenderung lebih baik pada penggunaan kombinasi dengan agen lain dibandingkan penggunaan doxorubicin tunggal (Bruton *et al.*, 2005). Maka, pengembangan agen kemoterapi dengan efek samping yang rendah maupun agen ko-kemoterapi yang dapat meningkatkan efektivitas atau menurunkan efek samping doxorubicin perlu dilakukan.

2.3 Tinjauan Kanker Kolon

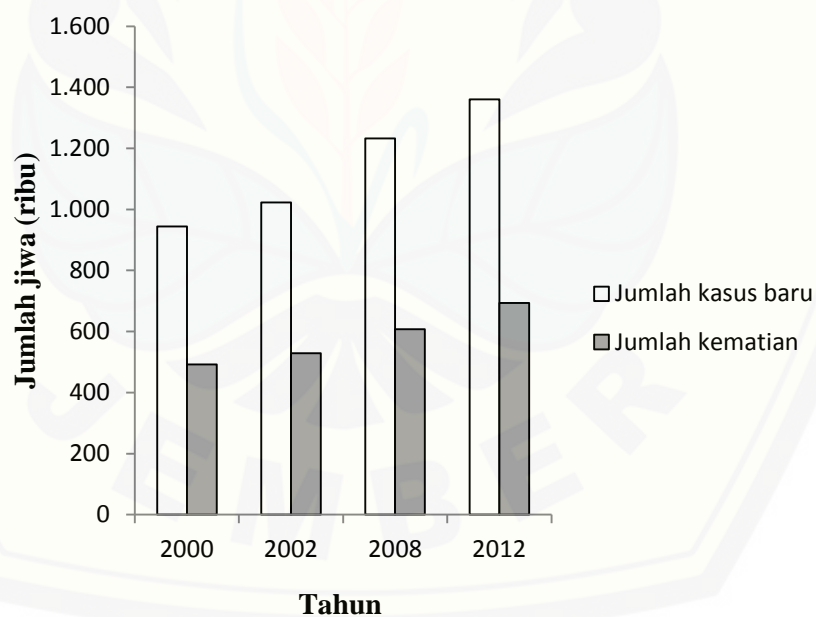
2.3.1 Pengertian Kanker Kolon

Kanker terjadi pada jaringan yang sel-selnya membelah secara aktif salah satunya yaitu kolon. Kanker kolon adalah suatu pertumbuhan tumor yang bersifat ganas dan dapat merusak sel DNA juga jaringan sehat di sekitar kolon dan rektum. Proses terbentuknya kanker kolon melibatkan akumulasi dari efek genetik, interaksi sel dengan matriks pada sel epitel kolon dan modifikasi protein. Inflamasi kronik diduga berperan dalam 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).

2.3.2 Prevalensi Kanker Kolon

Pada tahun 2012, total kasus kanker di seluruh dunia sebanyak 14,1 juta kasus baru yang terdiri dari kanker paru, kanker payudara, kanker

kolorektal dan jenis kanker lainnya dengan jumlah total kematian sebanyak 8,2 juta (IARC, 2013). Prevalensi kanker kolon mengalami kenaikan setiap tahunnya di dunia (Gambar 2.2). 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. Pada tahun 2002, jumlah kasus baru kanker mencapai 1,023 juta kasus dengan angka kematian sebesar 0,529 juta jiwa (Bray *et al.*, 2012). Sedangkan pada tahun 2008, terjadi peningkatan kasus baru kanker kolon yang mencapai 1,233 juta kasus dengan angka kematian sebesar 0,608 juta jiwa. Pada tahun 2012, jumlah kasus baru kanker kolon mencapai 1,36 juta kasus dengan jumlah kematian akibat kanker kolon yang mencapai 0,694 juta jiwa (IARC, 2013). Di Indonesia, penderita kanker kolon mencapai 1,8 penderita setiap 100.000 orang (Tedja dan Abdullah, 2013).



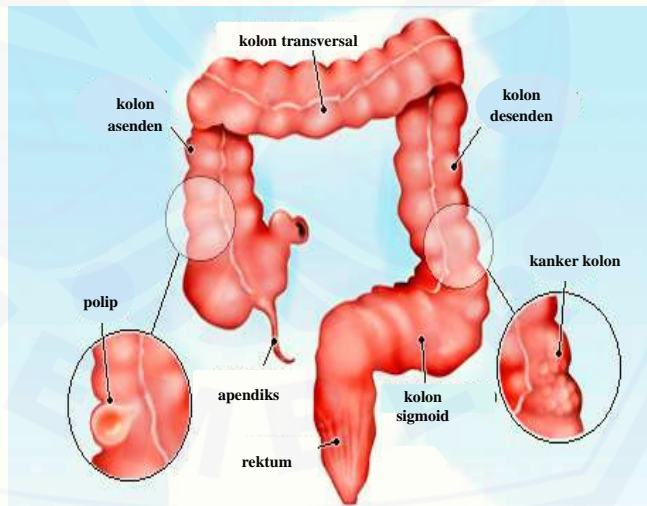
Gambar 2.2 Diagram data jumlah kasus dan kematian akibat kanker kolon (sumber: Bray *et al.*, 2012)

2.3.3 Patofisiologi

Kanker kolon merupakan kanker yang terjadi di bagian kolon. Kolon memiliki 4 bagian utama yaitu kolon asenden yaitu dimulai dari kantong

kecil (sekum) yang merupakan tempat menempelnya usus buntu pada usus besar dan memanjang ke atas di sisi kanan perut. Bagian kedua dari kolon disebut kolon transversal. Bagian ini melintang dari sisi kanan sampai ke sisi kiri perut di bagian atas. Bagian ketiga adalah kolon desenden yaitu merupakan bagian kolon yang menurun di sisi kiri perut, bagian terakhir dari kolon adalah kolon sigmoid yaitu kolon yang memiliki bentuk sigmoid (ACS, 2015).

Kanker kolon berkembang selama beberapa tahun. Sebelum kanker berkembang, pertumbuhan jaringan atau tumor diawali dengan adanya polip pada lapisan mukus kolon (Gambar 2.3). Polip bersifat jinak atau bahkan dapat bersifat ganas. Beberapa polip dapat berubah menjadi kanker bergantung dari jenisnya, seperti polip adenoma yaitu polip yang dapat berubah menjadi kanker, selain itu ada polip hiperplastik dan polip inflamasi. Jumlah polip adenoma menjadi indikasi peningkatan risiko kanker kolon (Cappell, 2005).



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

2.3.4 Gejala Kanker Kolon

Beberapa gejala umum yang dapat dialami penderita kanker kolon antara lain nyeri perut, pendarahan rektal, perubahan kebiasaan buang air besar, seperti diare atau sembelit, dan terjadi penurunan berat badan. Gejala yang jarang timbul atau tidak umum terjadi pada penderita kanker kolon

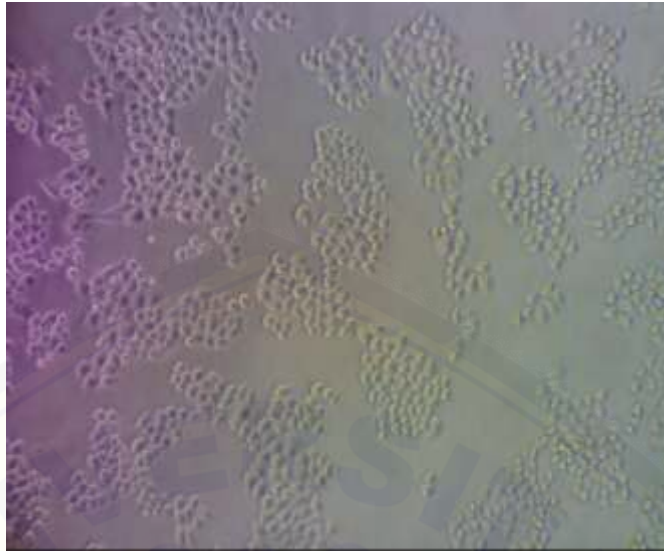
yaitu mual, muntah, anoreksia, dan distensi abdomen. Munculnya gejala bergantung pada lokasi kanker, ukuran kanker, dan metastasis. Letak kanker kolon di sebelah kiri lebih dapat menyebabkan obstruksi usus parsial atau seluruhnya karena lumen kolon sebelah kiri lebih sempit. Obstruksi parsial dapat mengakibatkan sembelit, mual, perut kembung, dan nyeri perut (Cappell, 2005).

2.3.5 Terapi Kanker Kolon

Terapi kanker kolon dapat dilakukan dengan pembedahan, radioterapi, dan kemoterapi. Pembedahan pada kanker kolon yang belum menyebar dapat dilakukan dengan *polypectomy* (pengangkatan polip) atau eksisi lokal menggunakan kolonoskop sedangkan pada kanker kolon invasif yang menembus dinding usus besar dilakukan dengan mengangkat kanker bersama-sama dengan usus di kedua sisi tumor dan kelenjar getah bening didekatnya. Radioterapi dilakukan dengan menggunakan x-ray berenergi tinggi untuk membunuh sel karsinoma. Radioterapi memiliki efek kerja lokal yang bekerja pada bagian yang terkena kanker. Kemoterapi merupakan pengobatan sistemik yang dapat membunuh sel kanker tetapi juga merusak beberapa sel normal. Salah satu agen kemoterapi yang digunakan dalam pengobatan kanker kolorektal adalah 5-fluorouracil (5-FU) yang memiliki efek samping diare, mual dan muntah, serta rambut rontok (ACS, 2015).

2.4 Tinjauan Sel WiDr

Sel WiDr (Gambar 2.4) adalah sel kanker kolon manusia yang diisolasi dari kolon wanita berusia 78 tahun. Sel WiDr adalah turunan sel kanker kolon yang lain yakni sel HT-29 (Chen *et al.*, 1987). Sel WiDr memproduksi antigen karsinoembrionik dan agar dapat menyelesaikan satu daur sel membutuhkan rentang waktu sekitar 15 jam. Sel WiDr memiliki karakteristik yaitu dapat mengekspresi siklooksigenase-2 (COX-2) yang tinggi yang memacu pembelahan sel WiDr (Palozza *et al.*, 2005).



Gambar 2.4 Sel WiDr (perbesaran 400x di bawah mikroskop *inverted*)

WiDr merupakan salah satu sel yang memiliki sensitivitas yang rendah apabila diberi perlakuan dengan 5-fluorouracil (5-FU), agen kemoterapi golongan antimetabolit. Transfeksi WiDr dengan p53 normal pun tidak meningkatkan sensitivitasnya terhadap 5-FU (Giovannetti *et al.*, 2007). Resistensi sel WiDr terhadap 5-FU salah satunya disebabkan oleh terjadi peningkatan ekspresi enzim timidilat sintetase yang menjadi target penghambatan utama dari 5-FU (Sigmond *et al.*, 2003).

2.5 Tinjauan Kemoprevensi

Kanker merupakan penyakit yang memiliki prevalensi kematian tinggi, oleh karena itu dibutuhkan agen kemoprevensi kanker. Kemoprevensi kanker merupakan penggunaan suatu senyawa alam, sintesis atau agen biologis kimia untuk mencegah berkembangnya kanker dan mengurangi risiko terkena kanker (Tsao *et al.*, 2004). Beberapa senyawa yang berpotensi memiliki aktivitas kemopreventif antara lain aspirin, suplemen folat dan kalsium, dan juga terapi pengganti hormon saat pasca menopause (Janne dan Mayer, 2000).

Agen kemopreventif dari bahan alam diharapkan tidak mempunyai efek toksik. Kurkumin, gingerol, dan flavonoid merupakan contoh senyawa

bioaktif yang memiliki aktivitas kemoprevensi (Ramawat, 2008). Strategi dalam kemoprevensi meliputi mekanisme sebagai berikut antara lain *blocking agent* yaitu mencegah terbentuknya proses karsinogenesis dan agen pencetus tumor. *Blocking agent* meliputi aktivitas antioksidan, induksi perbaikan DNA, blokade senyawa karsinogen, sedangkan agen penekan tumor meliputi alterasi pada ekspresi gen, penghambatan proliferasi sel, induksi apoptosis, dan modulasi sinyal transduksi (Steward dan Brown, 2013).

2.6 Tinjauan Kombinasi Kemoterapi (Ko-Kemoterapi)

Penggunaan ko-kemoterapi yaitu penggunaan senyawa kemoprevensi yang bersifat non-toksik atau lebih tidak toksik yang dikombinasikan dengan agen kemoterapi. Keuntungan dari penggunaan ko-kemoterapi yaitu mampu meningkatkan sensitivitas terhadap sel kanker serta efikasi kemoterapi dengan penurunan toksisitas terhadap jaringan normal (Jenie dan Meiyanto, 2007). Penggunaan kombinasi kemoterapi lebih baik dibandingkan dengan penggunaan agen kemoterapi standar. Penggunaan agen kemoprevensi kanker dalam bentuk kombinasi dengan agen kemoterapi merupakan salah satu cara untuk meningkatkan efektivitas dan mengurangi efek samping. Berdasarkan penelitian Meiyanto *et al* (2008), kombinasi ekstrak etanolik biji buah pinang dan fraksi kloroformnya dengan doxorubicin dapat meningkatkan efek apoptosis pada sel kanker kolon WiDr dengan mekanisme peningkatan ekspresi Bax dan penurunan ekspresi Bcl-2, sedangkan penelitian Wulandari (2015) menunjukkan bahwa uji sitotoksitas kombinasi ekstrak metanolik daun sirih merah dan doxorubicin dapat meningkatkan efek sitotoksik doxorubicin terhadap sel kanker kolon WiDr.

Agen kemopreventif merupakan senyawa yang dapat menghambat dan menekan proses karsinogenesis sehingga dapat membantu mencegah pertumbuhan kanker (Nugraheni, 2011). Beberapa senyawa kemopreventif mempunyai aktivitas menghambat COX-2 yang akan menurunkan

transformasi sel malignan (Setiawati *et al.*, 2007). Kombinasi kemoterapi memberikan hasil yang lebih efektif dibandingkan ketika diberikan dalam bentuk agen tunggal. Kombinasi yang menggunakan doxorubicin lebih efektif dibandingkan dengan agen kemoterapi lain (Sharma *et al.*, 2004).

2.7 Tinjauan Uji Sitotoksitas

Pengujian sitotoksitas *in vitro* digunakan untuk memilih senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antikanker. Dasar dari uji sitotoksitas adalah kemampuan sel untuk bertahan hidup karena adanya senyawa toksik. Kemampuan sel untuk bertahan hidup dapat diartikan sebagai tidak hilangnya proliferasi sel dan dapat diukur dari bertambahnya jumlah sel, naiknya jumlah protein, atau DNA yang disintesis. Pengujian *in vitro* menggunakan kultur sel memberikan kelebihan dibandingkan pengujian *in vivo* yaitu lebih ekonomis karena bahan uji yang dibutuhkan lebih sedikit, lebih aman, dan waktu pengujian 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:

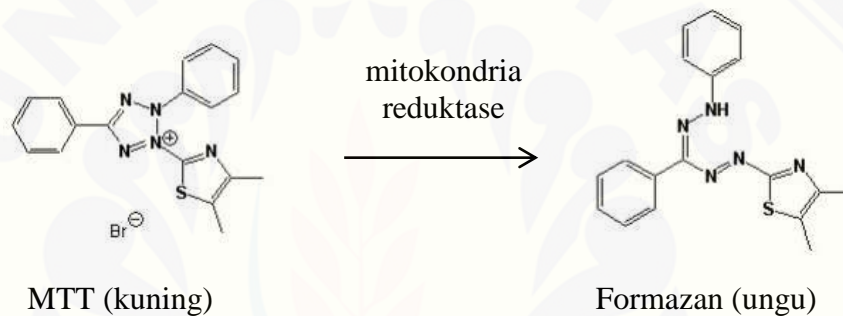
a. Metode perhitungan langsung (*direct counting*)

Pada metode perhitungan langsung 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 persentase sel hidup secara langsung dengan bilik hitung (Doyle dan Griffith, 2000).

b. Metode MTT

Prinsip metode MTT adalah terjadi penurunan garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) oleh sistem reduktase (Gambar 2.5). Enzim mitokondria reduktase pada sel

bereaksi dengan MTT yang akan membentuk kristal formazan berwarna ungu. Intensitas warna ungu yang terbentuk menggambarkan jumlah sel hidup, sehingga semakin banyak sel yang hidup maka intensitas warna ungu semakin besar, dan sebaliknya semakin sedikit jumlah sel yang hidup, intensitas warna ungu semakin memudar (Mosmann, 1983). Penambahan reagen stopper akan melarutkan kristal formazan sehingga dapat diukur absorbansinya menggunakan ELISA reader. Nilai absorbansi yang didapat menunjukkan tingkat data proliferasi sel sebagai manifestasi tingkat kekebalan sel (Liu *et al.*, 1997). Kelebihan dari metode ini yaitu relatif cepat, sensitif, dan akurat (Doyle dan Griffiths, 2000).



Gambar 2.5 Mekanisme MTT (sumber: Mosmann, 1983)

Hasil yang diperoleh dari uji sitotoksitas berupa nilai IC_{50} yang menunjukkan nilai konsentrasi suatu senyawa yang menghasilkan penghambatan proliferasi sel sebesar 50% dan juga potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar nilai IC_{50} suatu senyawa maka senyawa tersebut semakin tidak toksik karena membutuhkan konsentrasi yang besar agar dapat menghambat pertumbuhan sel, sebaliknya semakin kecil nilai IC_{50} maka potensi ketoksikannya terhadap sel semakin besar karena konsentrasi yang dibutuhkan kecil. Uji sitotoksitas dapat memberikan informasi mengenai konsentrasi suatu senyawa yang masih memungkinkan sel untuk bertahan hidup (Doyle dan Griffiths, 2000).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Uji sitotoksisitas kombinasi ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin merupakan jenis penelitian *eksperimental laboratories (true experimental laboratories)* yang bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik kombinasi ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin terhadap kultur sel kanker kolon WiDr.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan November 2016, bertempat di Laboratorium Fitokimia Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk pembuatan ekstrak etanol daun *A. flava* dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta untuk uji sitotoksisitas *in vitro*.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak etanol daun *A. flava* antara lain seperangkat alat gelas, mikropipet, *rotary evaporator* (Heidolph-4.000), corong buchner, hotplate, dan oven. Uji sitotoksisitas *in vitro* membutuhkan *inverted microscope* (Zeiss), *autoclave*, *class II biosafety cabinet*, *haemocytometer*, *cell counter*, *cryotube*, *microtube*, mikropipet, *ELISA reader* (SLT 240ATC), inkubator CO₂ (Heraceus), dan *96 well plate* (Nunc).

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak etanol daun *A. flava* antara lain:

a. Bahan utama:

1. Daun *A. flava*, daun yang digunakan adalah daun yang sudah tua, ditandai dengan daun berwarna hijau tua, tidak berwarna kuning atau hijau kekuningan, tulang daun dapat menopang helai daun, diperoleh pada bulan April 2016 dari koleksi Taman Nasional Meru Betiri.
2. Doxorubicin HCl 2 mg/ml yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

b. Bahan ekstraksi daun *A. flava*: etanol teknis redistilasi

c. Bahan untuk pengujian *in vitro*:

1. Kultur sel WiDr ditumbuhkan dalam media kultur RPMI 1640 (Gibco). Media kultur mengandung fetal bovine serum (FBS) 10% (v/v) (Gibco) dan antibiotika penisilin-streptomisin 1 % (v/v). Semua sel ditumbuhkan pada suhu 37°C dan 5 % CO₂. Sel dipanen dari *tissue culture dish* menggunakan tripsin-EDTA 0,25 % (Gibco).
2. Uji sitotoksisitas dengan metode MTT membutuhkan pereaksi antara lain: pereaksi MTT 5mg/ml PBS (Sigma). Larutan uji MTT 0,5 mg/ml (1 ml MTT ditambah dengan media kultur RPMI 9 ml), pereaksi *stopper* yaitu pereaksi yang mengandung sodium dodesil sulfat (SDS) (Sigma) 10 % dalam 0,1 N HCl (Merck) (jika tidak dinyatakan lain, bahan yang digunakan untuk uji *in vitro* adalah derajat pro analisis atau *molecular grade*).

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi kombinasi ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah nilai viabilitas sel WiDr.

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dari penelitian ini adalah metode ekstraksi dan perlakuan sel.

3.5 Rancangan Penelitian

3.5.1 Rancangan Operasional

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap antara lain:

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

3.5.2 Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini adalah:

- a. Daun *A. flava* yang digunakan adalah daun yang sudah tua, ditandai dengan daun berwarna hijau tua, tulang daun dapat menopang helai daun, tidak berwarna kuning atau hijau kekuningan, diperoleh pada bulan April 2016 dari koleksi Taman Nasional Meru Betiri.
- b. Ekstraksi *A. flava* merupakan proses pengambilan senyawa aktif dari daun *A. flava* dengan pelarut etanol teknis redestilasi secara maserasi.
- c. Uji sitotoksitas dilakukan dengan menggunakan metode MTT terhadap sel kanker kolon WiDr selama 24 jam.

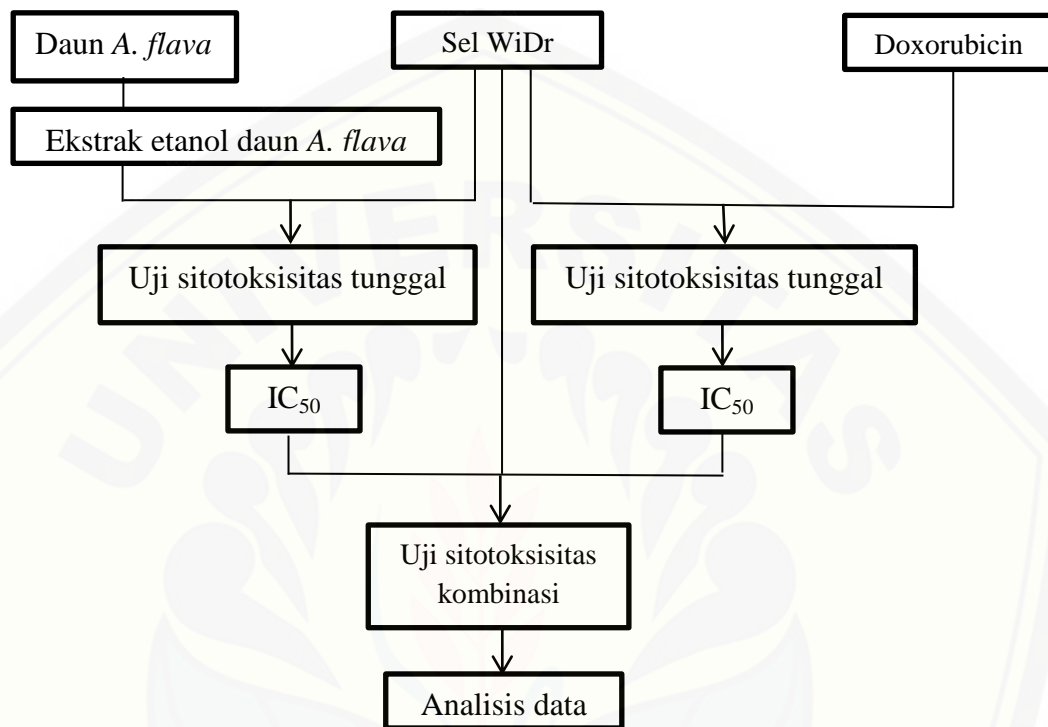
3.5.3 Rancangan Percobaan

Penelitian uji sitotoksitas kombinasi ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin terhadap sel kanker kolon WiDr dilakukan *in vitro*. Tahap awal adalah melakukan ekstraksi daun *A. flava* menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol teknis redestilasi hingga diperoleh ekstrak kental, selanjutnya adalah uji sitotoksitas tunggal yang dilakukan terhadap ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin menggunakan metode MTT terhadap sel kanker kolon WiDr, lalu diperoleh nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} yang diperoleh digunakan untuk uji sitotoksitas kombinasi ekstrak etanol daun

A. flava dan doxorubicin menggunakan metode MTT terhadap sel kanker kolon WiDr.

3.5.4 Alur Penelitian

Alur penelitian ini dapat dilihat ini dapat dilihat pada (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Diagram alur penelitian uji sitotoksitas kombinasi ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin terhadap sel kanker kolon WiDr

3.6 Cara Kerja Penelitian

3.6.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *A. flava*

Ekstrak etanol daun *A. flava* dibuat dengan metode maserasi. Daun *A. flava* yang diperoleh disortasi kemudian dicuci dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan terhindar dari sinar matahari langsung. Daun yang sudah kering disortasi kembali, selanjutnya daun digerus menjadi serbuk halus dan diayak. Sejumlah 100 g serbuk direndam dalam 1.250 ml etanol teknis redestilasi, diaduk, dan didiamkan selama 24 jam, selanjutnya disaring dengan alat penyaring. Sisa penyaringan dimaserasi kembali dengan menambahkan 750 ml etanol teknis redestilasi, diaduk, dan didiamkan 24 jam, selanjutnya disaring dengan alat penyaring. Sisa

penyaringan dimaserasi kembali dengan menambahkan 750 ml etanol teknis redistilasi, diaduk, dan didiamkan 24 jam, selanjutnya disaring dengan alat penyaring. Maserat yang diperoleh dipekatkan menggunakan rotavapour pada suhu 50°C, dengan kecepatan 150 rpm, kemudian ekstrak disimpan dalam oven bersuhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental.

3.6.2 Penelitian *In Vitro*

a. Pembuatan media cair RPMI

Sebanyak 950 ml akuabides steril dimasukkan ke dalam gelas beker di dalam LAF. Media RPMI dimasukkan ke dalam gelas beker yang berisi akuabides steril kemudian diaduk rata, selanjutnya ditambahkan 2,2 g NaHCO₃ untuk setiap liter media yang dibuat. Akuabides steril ditambahkan hingga volume 1.000 ml kemudian diaduk dengan magnetik stirer hingga semua komponen larut. Tahap berikutnya dilakukan penyesuaian pH seharga 0,2-0,3 di bawah pH yang diinginkan (7,0 hingga 7,4) dengan menambahkan NaOH 1 N atau HCl 1 N. Setelah diperoleh larutan sesuai dengan pH yang diinginkan, larutan difiltrasi menggunakan filter 0,22 mikrometer dan filtrat ditampung ke dalam botol 1.000 ml. Botol diberi penandaan dan disimpan pada suhu 4°C.

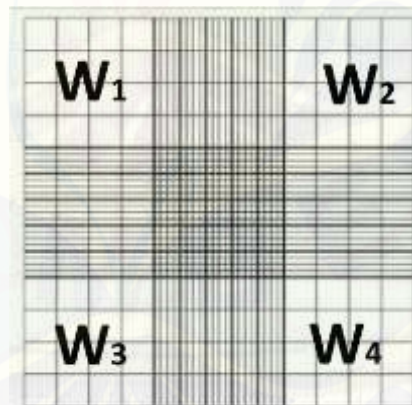
b. Pembuatan media kultur lengkap

FBS (*fetal bovine serum*) dan penisilin-streptomisin dicairkan pada suhu kamar sebelum digunakan, kemudian diambil 10 ml FBS dan dituang ke dalam botol. Diambil 1 ml penisilin-streptomisin dan dituang ke dalam botol. Media cair ditambahkan hingga volume 100 ml dan diberi penandaan pada botol berupa nama media, serta tanggal pembuatan media kultur lengkap RPMI.

c. 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 *cryotube* 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. 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 konfluen, dan jumlahnya cukup untuk penelitian. Setelah sel konfluen, media dibuang dan sel dicuci dengan PBS dua kali. Sel ditambah tripsin 0,25 % untuk melepaskan sel dari *tissue culture dish* dan dilakukan inkubasi selama 3 menit dalam inkubator CO₂. Media ditambahkan ke dalam *tissue culture dish* dan sel diresuspensi hingga terlepas semua dari dinding *tissue culture dish*. Suspensi sel kemudian dipindahkan ke dalam *cryotube* steril baru. Sel dihitung dengan *haemocytometer* (Gambar 3.2) dan *cell counter* lalu dibuat suspensi sel dengan konsentrasi sel sesuai dengan kebutuhan.



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

Terdapat 4 kamar hitung yang ditandai oleh huruf W, setiap kamar hitung terdiri dari 16 kotak. Sel yang gelap (mati) dan sel yang berada dibatas luar sebelah bawah dan sebelah kanan tidak dihitung. Sel dibatas kiri dan batas atas dihitung kemudian dimasukkan ke dalam Persamaan 1, kemudian jumlah (ml) sel yang dipanen dihitung menggunakan Persamaan 2, setelah itu, ditambahkan media kultur hingga tanda 10 ml.

$$\text{Jumlah sel terhitung} = \sum \frac{(W_1+W_2+W_3+W_4)}{4} \dots\dots\dots(1)$$

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

3.6.3 Preparasi Sampel

Ditimbang 100 mg *A. flava* dengan seksama menggunakan neraca analitik dalam *microtube*, kemudian dilarutkan dengan menggunakan DMSO 1 ml dengan bantuan vortex hingga diperoleh konsentrasi induk sebesar 100.000 µg/ml, setelah itu dibuat seri konsentrasi *A. flava* dengan pengenceran konsentrasi induk hingga diperoleh seri konsentrasi 200, 300, 400, 600, dan 700 µg/ml. Seri konsentrasi doxorubicin dibuat dengan pengenceran konsentrasi 0,5; 1; 6; 8; dan 10 µg/ml. Seri konsentrasi yang digunakan untuk uji sitotoksitas kombinasi adalah konsentrasi di sekitar nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin dan beberapa konsentrasi di bawahnya (kisaran 1/8, 1/4, 1/2, dan 1 dari IC₅₀).

3.6.4 Uji Sitotoksitas Tunggal Menggunakan Metode MTT

Sel (1×10^4 sel/sumuran) ditumbuhkan ke dalam 96 *well plate*. Sel ditransfer ke dalam sumuran masing-masing sebanyak 100 µl. Setiap kali mengisi sumuran, diresuspensi kembali sel agar tetap homogen, disisakan 3 sumuran kosong 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° di atas tempat buangan, kemudian *plate* ditekan secara perlahan di atas tisu untuk meniriskan sisa cairan. Seri konsentrasi ekstrak etanol daun *A. flava* (200, 300, 400, 600, dan 700 µg/ml), seri konsentrasi doxorubicin (0,5; 1; 6; 8; dan 10 µg/ml) dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran secara triplo sebanyak 100 µl, kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam di dalam inkubator CO₂.

Media sel dibuang dan ditiriskan kembali dengan tisu, kemudian ditambahkan larutan uji MTT sebanyak 100 µl ke setiap sumuran termasuk kontrol media. Sel diinkubasi kembali selama 4 jam dalam inkubator CO₂ 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 dan diinkubasikan di tempat gelap (suhu ruangan) selama semalam. Setelah selesai, pembungkus *plate* dan tutup *plate* dibuka kemudian *plate* dibaca dengan ELISA *reader* pada λ 595 nm (Meiyanto *et al.*, 2008).

3.6.5 Uji Sitotoksisitas Kombinasi Menggunakan Metode MTT

Sel (1×10^4 sel/sumuran) ditumbuhkan ke dalam 96 *well plate*. Sel ditransfer ke dalam sumuran masing-masing sebanyak 100 μ l. Setiap kali mengisi sumuran, diresuspensi kembali sel agar tetap homogen, disisakan 3 sumuran kosong 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° di atas tempat buangan, kemudian *plate* ditekan secara perlahan di atas tisu untuk meniriskan sisa cairan. Seri konsentrasi yang digunakan untuk uji sitotoksisitas kombinasi adalah konsentrasi di sekitar nilai IC_{50} ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin dan beberapa konsentrasi di bawahnya (kisaran 1/8, 1/4, 1/2, dan 1 dari IC_{50}) dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran secara triplo sebanyak 100 μ l, kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam di dalam inkubator CO₂.

Media sel dibuang dan ditiriskan kembali dengan tisu, kemudian ditambahkan larutan uji MTT sebanyak 100 μ l ke setiap sumuran termasuk kontrol media. Sel diinkubasi kembali selama 4 jam dalam inkubator CO₂ 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 dan diinkubasikan di tempat gelap (suhu ruangan) selama semalam. Setelah selesai, pembungkus *plate* dan tutup *plate* dibuka kemudian *plate* dibaca dengan ELISA *reader* pada λ 595 nm (Meiyanto *et al.*, 2008).

3.7 Analisis Data

3.7.1 Analisis Data Uji Sitotoksitas Tunggal

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

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

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

3.7.2 Analisis Data Uji Sitotoksitas Kombinasi

Berdasarkan nilai IC₅₀ yang diperoleh pada uji sitotoksitas tunggal, konsentrasi yang digunakan untuk uji sitotoksitas kombinasi adalah konsentrasi di sekitar nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin dan beberapa konsentrasi di bawahnya (kisaran 1/8, 1/4, 1/2, dan 1 dari IC₅₀). Data yang diperoleh berupa absorbansi masing-masing sumuran yang dikonversi ke dalam viabilitas sel. Viabilitas sel dihitung menggunakan Persamaan 3. Data yang berupa viabilitas sel kemudian dianalisis statistik.

Analisis dilakukan dengan menggunakan *Kruskal Wallis*, dilanjutkan dengan *post hoc (Mann-Whitney)*. Perbedaan dianggap bermakna apabila nilai signifikansi kurang dari 0,05.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa kombinasi ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin memiliki potensi sebagai agen ko-kemoterapi dilihat dari viabilitas sel kanker kolon WiDr. Kombinasi yang membutuhkan dosis kecil namun memiliki efikasi yang besar adalah kombinasi ekstrak etanol daun *A. flava* pada konsentrasi 56,25 µg/ml dan doxorubicin pada konsentrasi 3 µg/ml dengan viabilitas sebesar 51,91 %. Hasil ini lebih baik jika dibandingkan dengan perlakuan ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin pada konsentrasi yang sama ketika diberikan dalam bentuk tunggal yaitu secara berurutan masing-masing menghasilkan viabilitas sebesar 102,4 % dan 67,38 %.

5.2 Saran

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

1. Perlu dilakukan pengujian mekanisme kematian sel akibat kombinasi ekstrak etanol daun *A. flava* dan doxorubicin
2. Perlu dilakukan penelusuran jalur kematian sel dan mekanisme yang memerantarainya.

DAFTAR PUSTAKA

- American Cancer Society (ACS). 2015. Colorectal Cancer. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/acspc-042280>. [Diakses pada 24 Oktober 2016].
- Baroroh, R.K. 2014. Berberin Content Determination in Chloroform Extracts of *Arcangelisia flava* Leaves. *Indonesian Protein Society (IPS) International Seminar and Workshop 2014*. Hal 79.
- BNF 58. 2009. *British National Formulary 58*. London: RPS Publishing.
- Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., dan Forman, D. 2012. Global Cancer Transitions According to the Human Development Index (2008-2030): A Population-Based Study. *Lancet Oncology*. **13**(8): 790-801.
- Bruton, L., Lazo, J. S., dan Parker, K. L. 2005. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th Edition. New York : McGrawHill.
- Cappell, M.S. 2005. The Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis of Colon Cancer and Adenomatous Polyps. *Medical Clinics of North America*. **89**(1): 1-42.
- Chen, T. R., Drabkowski, D., Hay, R.J., Macy, M., dan Peterson, W.J. 1987. WiDr is a Derivative of Another Colon Adenocarcinoma Cell Line, HT-29. *Cancer Genet Cytogenet*. **27**(1): 125-134.
- Childs, A.C., Phaneuf, S.L., Dirks, A.J., Phillips, T., dan Leeuwenburgh, C. 2002. Doxorubicin Treatment *In Vivo* Causes Cytochrome C Release and Cardiomyocyte Apoptosis, as well as Increased Mitochondrial Efficiency, Superoxide Dismutase Activity, and Bcl-2:Bax Ratio. *Cancer Research*. **62**(16). 4592-4598.
- Doyle, A., dan Griffiths, J.B. 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. New York: John Wiley and Sons Ltd.
- Eom, K.S., Hong, J.M., Youn, M.J., So, H.S., Park, R., Kim, J.M., dan Kim, T.J. 2008. Berberine Induces G1 Arrest and Apoptosis in Human Glioblastoma T98G Cells Through Mitochondrial/Caspases Pathway. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **31**(4): 558-562.
- Giovannetti, E., Backus, H. H. J., Wouters, D., Ferreira, C. G., van Houten, V.M.M., dan Brakenhoff, R.H. 2007. Changes in the Status of p53 Affect Drug Sensitivity to Thymidylate Synthase (TS) Inhibitors by Altering TS Levels. *British Journal of Cancer*. **96**(5): 769-775.

- Habibi, M.S. 2015. Uji Sitotoksik dan Apoptosis Ekstrak Etanol Daun Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* L. Merr.) terhadap Kultur Sel Kanker Kolon WiDr *In Vitro*. *Skripsi*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Hanahan, D., dan Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. Hal 646-674.
- 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. [Diakses pada 22 Oktober 2016].
- 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. https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf. [Diakses pada 22 Oktober 2016].
- Jamal, Y., dan Semiadi, G. 1997. Kandungan Senyawa Alkaloida, Tanin serta Nilai Nutrisi beberapa Jenis Hijauan yang diberikan pada Ternak di Pulau Timor. *Berita Biologi*. **4**: 9-14.
- Janne, P.A., dan Mayer, R.J. 2000. *Chemoprevention of Colorectal Cancer*. Boston: Massachusetts Medical Society.
- Jenie, R.I., dan Meiyanto, E. 2007. Ko-kemoterapi Ekstrak Etanolik Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) dan Doxorubicin pada Sel Kanker Payudara. *Majalah Farmasi Indonesia*. **18**(2): 81-87.
- Keawpradub, N., Dej-adisai, S., dan Yuenyongsawad, S. 2005. Antioxidant and Cytotoxic Activities of Thai Medicinal Plants Named Kham Khrua: *Arcangelisia flava*, *Cosciniu blumeinum*, and *Fibraurea tinctoria*. *Songklanakarin Journal Science Technology*. **27**(2): 455-467.
- 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., dan Chen, Z. T. 2010. Berberine Inhibits Acute Radiation Intestinal Syndrome in Human with Abdomen Radiotherapy. *Medical Oncology*. **27**(3): 919-925.
- Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H., dan Schubert, D. 1997. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry*. **69**: 581-593.
- Machana, S., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S., Nonpunya, A., Sripanidkulchai, B., Thitimetharoch, T. 2011. Cytotoxic and Apoptotic Effects of Six Herbal Plants Against the Human Hepatocarcinoma (HepG2) Cell Line. *Chinese Medicine*. Hal 1-8.

- Martindale. 2009. *Martindale: The Complete Drug Reference*. London: Pharmaceutical Press.
- Meiyanto, E., Handayani, S., Susidarti, R.A., dan Jenie, R.I. 2008. Ekstrak Etanolik Biji Buah Pinang dan Fraksi Kloroformnya Meningkatkan Efek Apoptosis Doxorubicin pada Sel Kanker Kolon (WiDr). *Jurnal Bahan Alam Indonesia*. **6**(5):169-175.
- Mosmann. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal Immunology*. **65**: 55-63.
- Nafrialdi dan Sulistia. 2009. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- NCBI. 2016. *Arcangelisia flava*, Classification. NCBI Taxonomy. <http://www.gbif.org/species/3830318>. [Diakses pada 24 Oktober 2016].
- Nugraheni, M. 2011. Potensi Ekstrak Kentang Hitam (*Coleus tuberosus*) sebagai Antioksidan dan Anti-proliferasi Sel Kanker Ppayudara (MCF-7) *In Vitro*. <http://etd.ugm.ac.id>. [diakses 26 Oktober 2016].
- Padua, L.S., Bunyaphatsara, N., dan Lemmens, R.H.M.J. 2000. Medical and Poisonous Plant I. Plant Resources of South East Asia. *Journal Phytochemistry*. **53**(5): 619-620.
- Palozza, P., Serini, S., Maggiano, N., Giuseppe, T., Navarra, P., dan Ranelletti, F.O. 2005. Carotene Downregulates the Steady-State and Heregulin-a-Induced COX-2 Pathway in Colon Cancer Cells. *Journal Nutrition*. **135**: 129-136.
- Pandey, M.K., Sung, B., Kunnumakkara, A.B., Sethi, G., Chaturvedi, M.M., dan Aggarwal, B.B. 2008. Berberine Modifies Cysteine 179 of I kappa B kinase, Suppresses Nuclear Factor-KappaB-Regulated Antiapoptotic Gene Products, and Potentiates Apoptosis. *Cancer Research*. **68**(13): 5370-5379.
- Puspitasari, E., Pangaribowo, D.A., Isparnaning, I.Y., dan Utami, Y. 2015. Ethanolic Extract of *Arcangelisia flava* Leaves is Cytotoxic and Selective Against Breast and Colon Cancer Cell Lines. *Proceeding of The 1st University of Muhammadiyah Purwokerto - Pharmacy International Conference*. Hal 82-86.
- Puspitasari, E., Pangaribowo D.A., Utami, Y., dan Isparnaning, I.Y. 2016. *Arcangelisia flava* Leaves Ethanolic Extract Suppresses Cancer Cell Lines via Non Apoptotic Pathway. *1st International Conference on Medicine and Health Sciences*. Hal 37-41.

- Puspitasari, E., dan Ulfa, E.U. 2013. Pengembangan Ekstrak Etanol *Arcangelisia flava* Terstandar sebagai Agen Pendamping Kemoterapi Doxorubicin untuk Pengobatan Kanker. *Laporan Tahunan Penelitian Hibah Bersaing*. Universitas Jember.
- Ramawat, K.G. 2008. *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine*. Berlin: Spinger-Verlag Heidelberg.
- Setiawati, A., Septistyani, E.P., Wijayanti, T.R., dan Rochman, M.R. 2007. Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* (L.) Merr.) sebagai Agen Kemopreventif. <http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id>. [Diakses pada 26 Oktober 2016].
- Shargel, L. 2005. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, 5th Edition*. New York : McGrawHill.
- Sharma, G., Tyagi, A.K., Singh, R.P., Chan, D.C.F., dan Agarwal, R. 2004. Synergistic Anti-Cancer Effect of Grape Seed Extract and Conventional Cytotoxic Agent Doxorubicin Against Human Breast Carcinoma Cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. **85**(1):1-12.
- Sigmond, J., Backus, H.H., Wouters, D., Temmink, O.H., Jansen, G., dan Peters, G.J. 2003. Induction of Resistance to the Multitargeted Antifolate Pemetrexed (ALIMTA) in WiDr Human Colon Cancer Cells is Associated with Thymidylate Synthase Overexpression. *Biochemical Pharmacology*. **66**(3):431-438.
- Steward, W.P., dan Brown, K. 2013. Cancer Chemoprevention: A rapidly Evolving Field. *British Journal of Cancer*. **109**: 1-7.
- Stoppler, M.C. 2013. Understanding Cancer of the Colon. http://www.medicinenet.com/colorectal_cancerpictures_slideshow/article.htm. [Diakses pada 24 Oktober 2016].
- Sun, Y., Xun, K., Wang, Y., dan Chen, X. 2009. A Systematic Review of the Anticancer Properties of Berberine. A Natural Product from Chinese Herbs. *Anti-Cancer Drugs*. **20**: 757-769.
- Tedja, I., dan Abdullah, M. 2013. Chronic Inflammation in Colorectal Carcinogenesis: Role of Inflammatory Mediators, Intestinal Microbes, and Chemoprevention Potency. *Indian Journal of Gastroenterology*. **1**(14): 29-34.
- Tsao, A.S., Kim, E.S., dan Hong, W. K. 2004. Chemoprevention of Cancer. *CA: Cancer Journal for Clinicians*. **54**(3): 150-180.

- Tyagi, A.K, Aguwal, C., Chan, D.C.F., dan Aguwal, R. 2004. Synergistic Anti-Cancer Effects of Silibinin with Conventional Cytotoxic Agents Doxorubicin, Cisplatin and Carboplatin Against Human Breast Carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 Cells. *Oncology Reports*. **11**:493-499.
- Vanderperren, H., Wouwe, V.N., Behets, S., Windal, I., Overmeire, V.I., Fontaine, A. 2004. TEQ-value Determination of Animal Feed; Emphasis on the CALUX Bioassay Validation. *Talanta*. Hal 1277-1280.
- Wattanapitayakul, S.K., Chularojmontri, L., Herunsalee, A., Charuchongkolwongse, S., Niumsukul, S., dan Bauer, J.A. 2005. Screening of Antioxidants from Medicinal Plants for Cardioprotective Effect Against Doxorubicin Toxicity. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. **96**(1): 80-87.
- Widyatmoko, D., dan Zich, F. 1998. *The Flora of Bukit Tiga Puluh National Park, Kerumutan Sanctuary and Mahato Protective Reserve, Riau, Indonesia*. Jakarta: National Library Indonesia.
- Wilson, A.P. 2000. *Cytotoxicity and Viability Assays*. Oxford: Oxford University Press.
- World Health Organization (WHO). 2014. Cancer Country Profiles. http://www.who.int/cancer/country-profiles/idn_en.pdf. [Diakses pada 1 November 2016].
- Wulandari, N. 2015. Peningkatan Efek Sitotoksik Kombinasi Doxorubicin dan Ekstrak Metanolik Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) pada Sel Kanker Kolon WiDr melalui Induksi Apoptosis *In Vitro*. *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.
- Yu, F.S., Yang, J.S., Lin, H.J., Yu, C.S., Tan, T.W., Lin, Y.T., Lin, C.C., Lu, H.E., dan Chung, J.G. 2007. Berberine Inhibits WEHI-3 Leukemia Cells *In Vivo*. *In Vivo*. **21**(2): 407-412.

LAMPIRAN

A. PERHITUNGAN RENDEMEN EKSTRAK

Bobot serbuk kering <i>A. flava</i>	= 100 gram
Volume etanol yang digunakan	= 2750 ml
Ekstrak kental	= 12,46 gram
Rendemen yang diperoleh	= $\frac{12,46 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} \times 100 \%$
	= 12,46 % b/b

B. PERHITUNGAN DAN HASIL UJI SITOTOKSISITAS TUNGGAL

1. Kepadatan Penanaman Sel untuk Uji Sitotoksisitas Tunggal *A. flava*

Kepadatan sel= 10^4 sel tiap sumuran

$$\text{Jumlah sel} = \frac{50+44+55+63}{4} = \frac{212}{4} = 53 \text{ sel}$$

$$\text{Jumlah sel (ml)} = \frac{10^4 \times 100}{53 \times 10^4} = 1,89 \text{ ml}$$

1,89 ml suspensi sel + 8,11 ml media kultur

2. Kepadatan Penanaman Sel untuk Uji Sitotoksisitas Tunggal

Doxorubicin

Kepadatan sel= 10^4 sel tiap sumuran

$$\text{Jumlah sel} = \frac{89+103+96+118}{4} = \frac{406}{4} = 102 \text{ sel}$$

$$\text{Jumlah sel (ml)} = \frac{10^4 \times 100}{102 \times 10^4} = 0,98 \text{ ml}$$

0,98 ml suspensi sel + 9,12 ml media kultur

3. Konsentrasi Ekstrak *A. flava* untuk Perlakuan Uji Sitotoksisitas

Tunggal

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

$$\frac{100 \mu\text{g/ml}}{1 \text{ ml}} \times 1000 = 100.000 \mu\text{g/ml}$$

Pengenceran larutan induk 10.000 µg/ml

$$\frac{20 \mu\text{l}}{200 \text{ ml}} \times 100.000 = 10.000 \mu\text{g/ml}$$

20 µl larutan induk 100.000 µl + 180 µl media kultur

Pengenceran larutan induk 1.000 µg/ml

$$\frac{150 \mu\text{l}}{1500 \text{ ml}} \times 10.000 = 1.000 \mu\text{g/ml}$$

150 µl larutan induk 10.000 µl + 1350 µl media kultur

b. Pembuatan Seri Konsentrasi Uji

1) Konsentrasi 700 µg/ml

$$\frac{280 \mu\text{l}}{400 \text{ ml}} \times 1.000 = 700 \mu\text{g/ml}$$

280 µl larutan induk 1.000 µl + 120 µl media kultur

2) Konsentrasi 600 µg/ml

$$\frac{240 \mu\text{l}}{400 \text{ ml}} \times 1.000 = 600 \mu\text{g/ml}$$

240 µl larutan induk 1.000 µl + 160 µl media kultur

3) Konsentrasi 400 µg/ml

$$\frac{160 \mu\text{l}}{400 \text{ ml}} \times 1.000 = 400 \mu\text{g/ml}$$

160 µl larutan induk 1.000 µl + 240 µl media kultur

4) Konsentrasi 300 µg/ml

$$\frac{120 \mu\text{l}}{400 \text{ ml}} \times 1.000 = 300 \mu\text{g/ml}$$

120 µl larutan induk 1.000 µl + 280 µl media kultur

5) Konsentrasi 200 µg/ml

$$\frac{80 \mu\text{l}}{400 \text{ ml}} \times 1.000 = 200 \mu\text{g/ml}$$

80 µl larutan induk 1.000 µl + 320 µl media kultur

6) Konsentrasi 100 µg/ml

$$\frac{40 \mu\text{l}}{400 \text{ ml}} \times 1.000 = 100 \mu\text{g/ml}$$

40 µl larutan induk 1.000 µl + 360 µl media kultur

4. Konsentrasi Doxorubicin untuk Perlakuan Uji Sitotoksisitas Tunggal

a. Pembuatan larutan induk 2.000 µg/ml

$$\frac{2 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} \times 1000 = 2.000 \text{ µg/ml}$$

Pengenceran larutan induk 20 µg/ml

$$\frac{10 \text{ µl}}{1000 \text{ ml}} \times 2.000 = 20 \text{ µg/ml}$$

10 µl larutan induk 2.000 µl + 990 µl media kultur

b. Pembuatan Seri Konsentrasi Uji

1) Konsentrasi 10 µg/ml

$$\frac{200 \text{ µl}}{400 \text{ ml}} \times 20 = 10 \text{ µg/ml}$$

200 µl larutan induk 20 µl + 200 µl media kultur

2) Konsentrasi 8 µg/ml

$$\frac{160 \text{ µl}}{400 \text{ ml}} \times 20 = 8 \text{ µg/ml}$$

160 µl larutan induk 20 µl + 240 µl media kultur

3) Konsentrasi 6 µg/ml

$$\frac{120 \text{ µl}}{400 \text{ ml}} \times 20 = 6 \text{ µg/ml}$$

120 µl larutan induk 20 µl + 280 µl media kultur

4) Konsentrasi 2 µg/ml

$$\frac{40 \text{ µl}}{400 \text{ ml}} \times 20 = 2 \text{ µg/ml}$$

40 µl larutan induk 20 µl + 360 µl media kultur

5) Konsentrasi 1 µg/ml

$$\frac{20 \text{ µl}}{400 \text{ ml}} \times 20 = 1 \text{ µg/ml}$$

20 µl larutan induk 20 µl + 380 µl media kultur

6) Konsentrasi 0,5 µg/ml

$$\frac{10 \text{ µl}}{400 \text{ ml}} \times 20 = 0,5 \text{ µg/ml}$$

10 µl larutan induk 20 µl + 390 µl media kultur

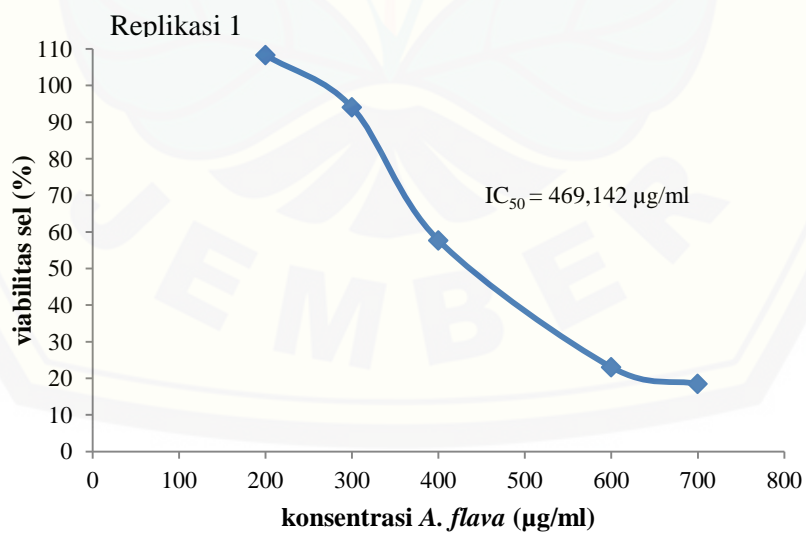
5. Data Absorbansi dan Viabilitas Sel Uji Sitotoksitas Tunggal *A. flava*

$$\text{Viabilitas sel (\%)} = \frac{\text{absorbansi sel perlakuan} - \text{absorbansi media}}{\text{absorbansi control sel} - \text{absorbansi media}} \times 100\%$$

Replikasi 1

No	Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi			Viabilitas sel (%)					
		A1	A2	A3	\bar{x}	v1	v2	v3	\bar{x}	SD
1	200	0,75	0,808	0,785	0,781	103,30	112,60	108,91	108,27	4,68
2	300	0,659	0,712	0,705	0,692	88,703	97,204	96,082	94	4,62
3	400	0,444	0,486	0,467	0,466	54,216	60,953	57,905	57,69	3,37
4	600	0,251	0,231	0,267	0,250	23,26	20,05	25,82	23,04	2,89
5	700	0,224	0,224	0,216	0,221	18,927	18,927	17,644	18,50	0,74

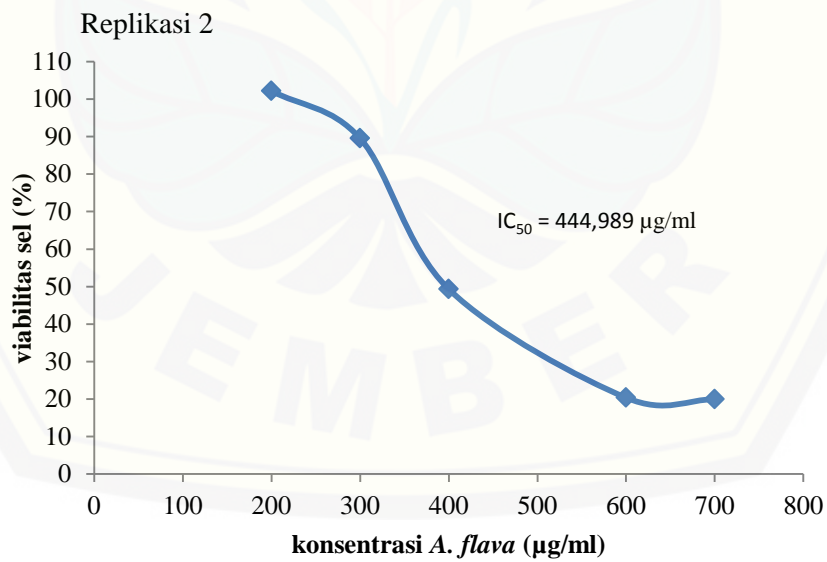
Kontrol sel		\bar{x}	Kontrol media		\bar{x}
0,621	0,6	0,609	0,729	0,105	0,108
0,746	0,744	0,726			0,106
0,717	0,723	0,702			
0,722	0,742	0,748			
0,732	0,783	0,809			
0,773	0,825	0,737			
0,78	0,762	0,717			



Replikasi 2

No	Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi				Viabilitas sel (%)				
		A1	A2	A3	\bar{x}	v1	v2	v3	\bar{x}	SD
1	200	0,768	0,737	0,724	0,743	106,19	101,21	99,13	102,18	3,63
2	300	0,701	0,666	0,625	0,664	95,44	89,83	83,25	89,51	6,10
3	400	0,436	0,39	0,414	0,413	52,93	45,55	49,40	49,30	3,69
4	600	0,251	0,221	0,227	0,233	23,258	18,446	19,409	20,37	2,55
5	700	0,246	0,224	0,221	0,230	22,456	18,928	18,446	19,94	2,19

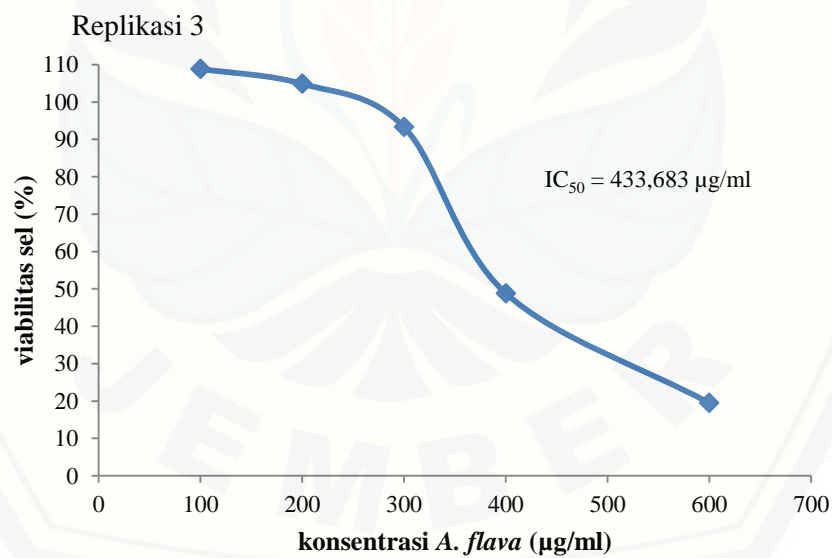
Kontrol sel		\bar{x}	Kontrol media		\bar{x}
0,621	0,6	0,609	0,729	0,105	0,105
0,746	0,744	0,726			
0,717	0,723	0,702			
0,722	0,742	0,748			
0,732	0,783	0,809			
0,773	0,825	0,737			
0,78	0,762	0,717			



Replikasi 3

No.	Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi				Viabilitas sel (%)				
		A1	A2	A3	\bar{x}	v1	v2	v3	\bar{x}	SD
1	100	0,82	0,771	0,763	0,785	114,53	106,67	105,38	108,86	4,95
2	200	0,753	0,797	0,729	0,760	103,781	110,839	99,931	104,85	5,53
3	300	0,68	0,692	0,691	0,688	92,07	94,00	93,84	93,30	1,07
4	400	0,422	0,413	0,396	0,410	50,69	49,24	46,52	48,82	2,12
5	600	0,227	0,229	0,226	0,227	19,41	19,73	19,25	19,46	0,25

Kontrol sel			\bar{x}	Kontrol media			\bar{x}
0,621	0,6	0,609	0,729	0,105	0,105	0,108	0,106
0,746	0,744	0,726					
0,717	0,723	0,702					
0,722	0,742	0,748					
0,732	0,783	0,809					
0,773	0,825	0,737					
0,78	0,762	0,717					



6. Analisis Probit Uji Sitotoksitas Tunggal *A. flava*

Replikasi 1

Probability		95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^b		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	0.01	1113.022	742.297	17450.701	3.047	2.871	4.242
	0.02	1005.862	696.880	11422.775	3.003	2.843	4.058
	0.03	943.287	668.945	8737.220	2.975	2.825	3.941
	0.04	898.793	648.300	7145.955	2.954	2.812	3.854
	0.05	864.153	631.694	6070.615	2.937	2.801	3.783
	0.06	835.723	617.661	5285.818	2.922	2.791	3.723
	0.07	811.566	605.410	4683.219	2.909	2.782	3.671
	0.08	790.529	594.463	4203.496	2.898	2.774	3.624
	0.09	771.871	584.509	3811.116	2.888	2.767	3.581
	0.1	755.086	575.334	3483.354	2.878	2.760	3.542
	0.15	689.387	536.867	2409.391	2.838	2.730	3.382
	0.2	641.273	504.961	1808.822	2.807	2.703	3.257
	0.25	602.681	475.628	1424.750	2.780	2.677	3.154
	0.3	570.008	446.681	1160.328	2.756	2.650	3.065
	0.35	541.315	416.572	970.510	2.733	2.620	2.987
	0.4	515.424	384.162	831.382	2.712	2.585	2.920
0.45	491.554	348.907	728.714	2.692	2.543	2.863	
	0.5	469.142	311.176	652.804	2.671	2.493	2.815
	0.55	447.752	272.238	596.157	2.651	2.435	2.775
	0.6	427.016	233.716	552.806	2.630	2.369	2.743
	0.65	406.592	196.950	518.240	2.609	2.294	2.715
	0.7	386.125	162.731	489.246	2.587	2.211	2.690
	0.75	365.192	131.362	463.554	2.563	2.118	2.666
	0.8	343.214	102.808	439.438	2.536	2.012	2.643
	0.85	319.261	76.816	415.288	2.504	1.885	2.618
	0.9	291.482	52.940	388.932	2.465	1.724	2.590
	0.91	285.144	48.357	383.069	2.455	1.642	2.576
	0.92	278.414	43.816	376.886	2.445	1.642	2.576
	0.93	271.197	39.304	370.290	2.433	1.594	2.569
	0.94	263.358	34.803	363.155	2.421	1.542	2.560
	0.95	254.693	30.287	355.290	2.406	1.481	2.551
	0.96	244.878	25.715	346.387	2.389	1.410	2.540
	0.97	233.327	21.019	335.893	2.368	1.323	2.526
	0.98	218.811	16.067	322.629	2.340	1.206	2.509
	0.99	197.745	10.510	303.109	2.296	1.022	2.482

Replikasi 2

Probability		95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^b		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	0.01	1185.624	714.618	7.170E14	3.074	2.854	14.855
	0.02	1057.002	669.076	2.213E13	3.024	2.825	13.345
	0.03	982.730	640.928	2.439E12	2.992	2.807	12.387
	0.04	930.318	620.021	4.646E11	2.969	2.792	11.667
	0.05	889.754	603.116	1.206E11	2.949	2.780	11.082
	0.06	856.624	588.751	3.832E10	2.933	2.770	10.583
	0.07	828.591	576.134	1.402E10	2.918	2.761	10.147
	0.08	804.271	564.788	5.705E9	2.905	2.752	9.756
	0.09	782.773	554.400	2.519E9	2.894	2.744	9.401
	0.1	763.493	544.753	1.187E9	2.883	2.736	9.075
	0.15	688.591	503.212	5.310E7	2.838	2.702	7.725
	0.2	634.339	466.486	4551177.474	2.802	2.669	6.658
	0.25	591.214	429.190	563256.795	2.772	2.633	5.751
	0.3	554.992	386.180	88956.570	2.744	2.587	4.949
	0.35	523.410	329.408	17100.288	2.719	2.518	4.233
	0.4	495.106	245.188	4131.718	2.695	2.389	3.616
0.45	469.179	131.053	1469.884	2.671	2.117	3.167	
	0.5	444.989	44.094	852.874	2.648	1.644	2.931
	0.55	422.046	11.106	661.056	2.625	1.046	2.820
	0.6	399.945	2.431	574.210	2.602	.386	2.759
	0.65	378.317	.480	522.538	2.578	-.318	2.718
	0.7	356.789	.085	485.760	2.552	-1.072	2.686
	0.75	334.930	.013	456.118	2.525	-1.892	2.659
	0.8	312.160	.002	429.830	2.494	-2.810	2.633
	0.85	287.566	.000	404.428	2.459	-3.883	2.607
	0.9	259.354	.000	377.359	2.414	-5.237	2.577
	0.91	252.966	.000	371.404	2.403	-5.564	2.570
	0.92	246.205	.000	365.141	2.391	-5.920	2.562
	0.93	238.978	.000	358.483	2.378	-6.311	2.554
	0.94	231.158	.000	351.302	2.364	-6.749	2.546
	0.95	222.551	.000	343.410	2.347	-7.247	2.536
	0.96	212.847	.000	334.502	2.328	-7.833	2.524
	0.97	201.495	.000	324.035	2.304	-8.554	2.511
	0.98	187.337	.000	310.849	2.273	-9.513	2.493
	0.99	167.014	.000	291.520	2.223	-11.024	2.465

Replikasi 3

Probability		95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^b		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	0.01	908.123	.	.	2.958	.	.
	0.02	832.786	.	.	2.921	.	.
	0.03	788.262	.	.	2.897	.	.
	0.04	930.318	.	.	2.879	.	.
	0.05	756.344	.	.	2.864	.	.
	0.06	710.704	.	.	2.852	.	.
	0.07	693.093	.	.	2.841	.	.
	0.08	677.694	.	.	2.831	.	.
	0.09	663.988	.	.	2.822	.	.
	0.1	651.616	.	.	2.814	.	.
	0.15	602.798	.	.	2.780	.	.
	0.2	566.622	.	.	2.753	.	.
	0.25	537.321	.	.	2.730	.	.
	0.3	512.301	.	.	2.710	.	.
	0.35	490.158	.	.	2.690	.	.
	0.4	470.032	.	.	2.672	.	.
0.45	451.347	.	.	2.655	.	.	
	0.5	433.683	.	.	2.637	.	.
	0.55	416.710	.	.	2.620	.	.
	0.6	400.145	.	.	2.602	.	.
	0.65	383.715	.	.	2.584	.	.
	0.7	367.129	.	.	2.565	.	.
	0.75	350.035	.	.	2.544	.	.
	0.8	331.934	.	.	2.521	.	.
	0.85	312.013	.	.	2.494	.	.
	0.9	288.638	.	.	2.460	.	.
	0.91	283.260	.	.	2.452	.	.
	0.92	277.530	.	.	2.443	.	.
	0.93	271.365	.	.	2.434	.	.
	0.94	264.640	.	.	2.423	.	.
	0.95	257.174	.	.	2.410	.	.
	0.96	248.671	.	.	2.396	.	.
	0.97	238.602	.	.	2.378	.	.
	0.98	225.845	.	.	2.354	.	.
	0.99	207.109	.	.	2.316	.	.

Rata-rata nilai IC₅₀ *A. flava*

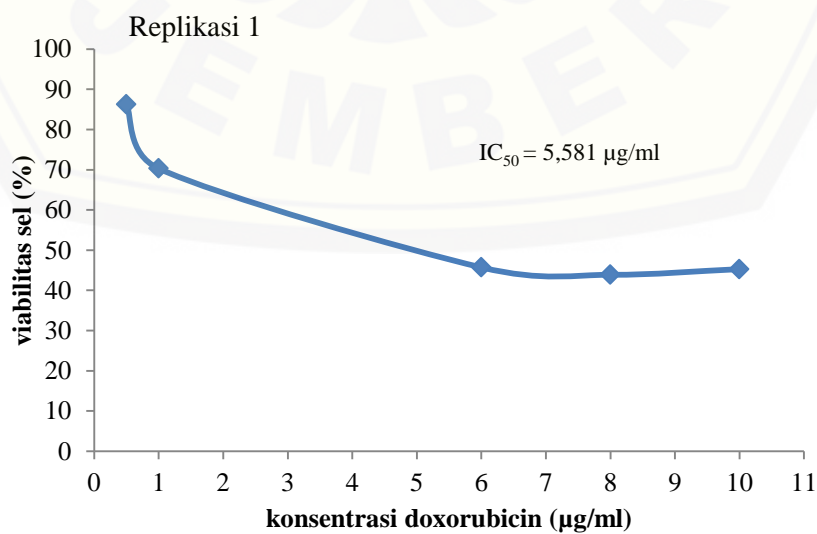
Replikasi	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ Rata-rata ± SD (µg/ml)	CV (%)	Konsentrasi IC ₅₀ untuk Kombinasi (µg/ml)
1	469,142	449,271 ± 18,113	4,03	450
2	444,989			
3	433,683			

7. Data Absorbansi dan Viabilitas Sel Uji Sitotoksitas Tunggal Doxorubicin

Replikasi 1

No.	Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi				Viabilitas sel (%)				
		A1	A2	A3	\bar{x}	v1	v2	v3	\bar{x}	SD
1	10	0,388	0,362	0,38	0,377	47,107	42,922	45,819	45,28	2,14
2	8	0,374	0,357	0,373	0,368	44,853	42,12	44,69	43,89	1,54
3	6	0,396	0,364	0,378	0,379	48,394	43,24	45,50	45,71	2,58
4	1	0,532	0,521	0,543	0,532	70,284	68,51	72,05	70,28	1,77
5	0,5	0,635	0,619	0,64	0,631	86,862	84,29	87,67	86,27	1,77

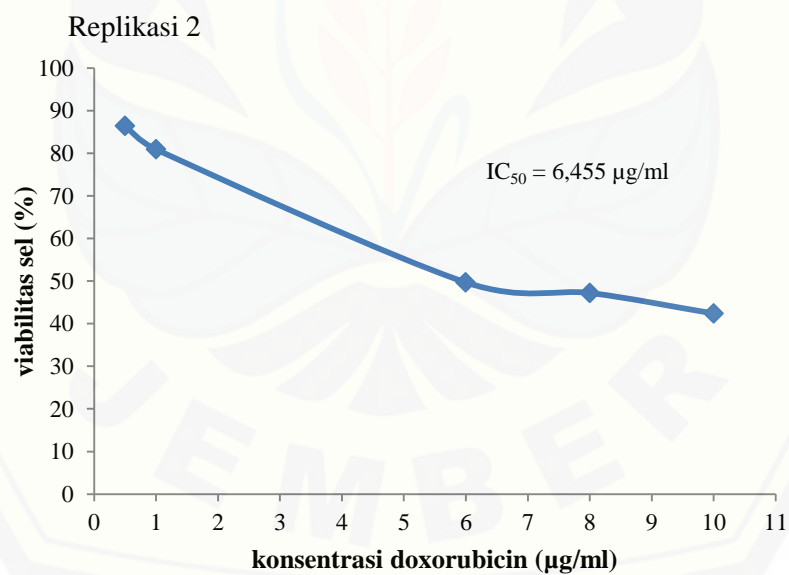
kontrol sel		\bar{x}	kontrol media		\bar{x}
0,732	0,714	0,694	0,717	0,096	0,094
0,711	0,707	0,707			0,096
0,733	0,744	0,745			
0,712	0,747	0,737			
0,732	0,742	0,713			
0,666	0,738	0,798			
0,701	0,695	0,581			



Replikasi 2

No	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi				Viabilitas sel (%)				
		A1	A2	A3	\bar{x}	v1	v2	v3	\bar{x}	SD
1	10	0,373	0,36	0,343	0,359	44,692	42,6	39,864	42,39	2,42
2	8	0,379	0,384	0,403	0,389	45,658	46,463	49,521	47,21	2,04
3	6	0,404	0,394	0,414	0,404	49,682	48,072	51,291	49,68	1,61
4	1	0,596	0,581	0,617	0,598	80,586	78,17	83,97	80,1	2,91
5	0,5	0,646	0,632	0,619	0,632	88,633	86,38	84,29	86,43	2,17

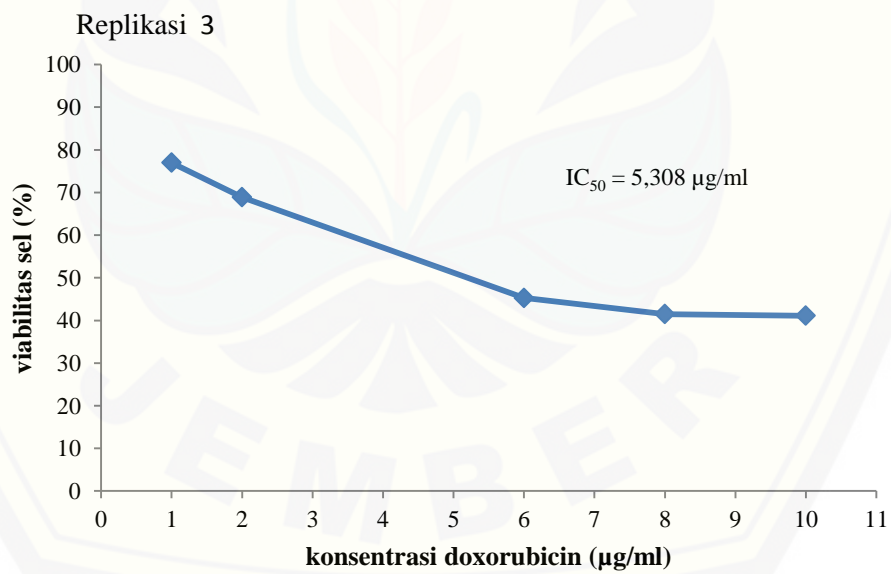
kontrol sel		\bar{x}	kontrol media		\bar{x}
0,732	0,714	0,694	0,717	0,096	0,094
0,711	0,707	0,707			
0,733	0,744	0,745			
0,712	0,747	0,737			
0,732	0,742	0,713			
0,666	0,738	0,798			
0,701	0,695	0,581			



Replikasi 3

No	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi				Viabilitas sel (%)				
		A1	A2	A3	\bar{x}	v1	v2	v3	\bar{x}	SD
1	10	0,374	0,349	0,329	0,351	44,853	40,829	37,61	41,1	3,63
2	8	0,368	0,353	0,338	0,353	43,887	41,473	39,059	41,47	2,41
3	6	0,365	0,393	0,372	0,377	43,405	47,911	44,531	45,28	2,34
4	2	0,536	0,507	0,527	0,523	70,928	66,26	69,48	68,9	2,39
5	1	0,592	0,56	0,569	0,574	79,942	74,79	76,24	76,99	2,66

	kontrol sel		\bar{x}	kontrol media		\bar{x}
0,732	0,714	0,694	0,717	0,096	0,094	0,096
0,711	0,707	0,707				
0,733	0,744	0,745				
0,712	0,747	0,737				
0,732	0,742	0,713				
0,666	0,738	0,798				
0,701	0,695	0,581				



8. Analisis Probit Uji Sitotoksitas Tunggal Doxorubicin Replikasi 1

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi			95% Confidence Limits for log(Konsentrasi) ^a		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	0.01	2261.592	584.383	21957.721	3.354	2.767	4.342
	0.02	1119.048	332.899	8540.596	3.049	2.522	3.931
	0.03	716.106	232.850	4693.264	2.855	2.367	3.671
	0.04	511.841	177.901	2992.240	2.709	2.250	3.476
	0.05	389.497	142.889	2075.302	2.591	2.155	3.317
	0.06	308.696	118.553	1520.183	2.490	2.074	3.182
	0.07	251.766	100.634	1157.261	2.401	2.003	3.063
	0.08	209.761	86.889	906.611	2.322	1.939	2.957
	0.09	177.676	76.016	726.214	2.250	1.881	2.861
	0.1	152.499	67.206	592.135	2.183	1.827	2.772
	0.15	81.004	40.292	254.741	1.909	1.605	2.406
	0.2	48.993	26.762	130.642	1.690	1.428	2.116
	0.25	31.827	18.784	73.881	1.503	1.274	1.869
	0.3	21.605	13.621	44.441	1.335	1.134	1.648
	0.35	15.089	10.065	27.878	1.179	1.003	1.445
	0.4	10.733	7.504	18.027	1.031	.875	1.256
	0.45	7.720	5.594	11.937	.888	.748	1.077
	0.5	5.581	4.131	8.069	.747	.616	.907
	0.55	4.035	2.990	5.565	.606	.476	.746
	0.6	2.902	2.099	3.914	.463	.322	.593
	0.65	2.064	1.418	2.793	.315	.152	.446
	0.7	1.442	.917	2.003	.159	-.038	.302
	0.75	.979	.562	1.424	-.009	-.250	.153
	0.8	.636	.322	.986	-.197	-.492	-.006
	0.85	.385	.167	.649	-.415	-.778	-.188
	0.9	.204	.072	.386	-.690	-1.141	-.413
	0.91	.175	.059	.341	-.756	-1.229	-.467
	0.92	.149	.047	.298	-.828	-1.325	-.525
	0.93	.124	.037	.257	-.908	-1.431	-.590
	0.94	.101	.028	.218	-.996	-1.549	-.661
	0.95	.080	.021	.181	-1.097	-1.683	-.743
	0.96	.061	.014	.145	-1.216	-1.842	-.838
	0.97	.043	.009	.111	-1.362	-2.037	-.956
	0.98	.028	.005	.077	-1.555	-2.296	-1.111
	0.99	.014	.002	.044	-1.861	-2.706	-1.356

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 2

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi			95% Confidence Limits for $\log(\text{Konsentrasi})^a$		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0.01	1219.174	396.062	7333.466	3.086	2.598	3.865
0.02	659.704	240.032	3300.450	2.819	2.380	3.519
0.03	446.814	174.627	1989.507	2.650	2.242	3.299
0.04	333.293	137.428	1359.831	2.523	2.138	3.133
0.05	262.590	113.074	998.023	2.419	2.053	2.999
0.06	214.359	95.763	767.114	2.331	1.981	2.885
0.07	179.417	82.767	609.140	2.254	1.918	2.785
0.08	152.993	72.627	495.569	2.185	1.861	2.695
0.09	132.355	64.480	410.822	2.122	1.809	2.614
0.1	115.829	57.785	345.719	2.064	1.762	2.539
0.15	66.679	36.653	169.466	1.824	1.564	2.229
0.2	42.991	25.470	96.367	1.633	1.406	1.984
0.25	29.502	18.595	59.515	1.470	1.269	1.775
0.3	21.038	13.980	38.715	1.323	1.145	1.588
0.35	15.379	10.694	26.083	1.187	1.029	1.416
0.4	11.424	8.255	18.015	1.058	.917	1.256
0.45	8.568	6.385	12.674	.933	.805	1.103
0.5	6.455	4.913	9.049	.810	.691	.957
0.55	4.864	3.733	6.544	.687	.572	.816
0.6	3.648	2.777	4.786	.562	.444	.680
0.65	2.710	2.007	3.531	.433	.303	.548
0.7	1.981	1.398	2.612	.297	.146	.417
0.75	1.412	.932	1.917	.150	-.031	.283
0.8	.969	.585	1.376	-.014	-.233	.139
0.85	.625	.337	.945	-.204	-.473	-.025
0.9	.360	.167	.594	-.444	-.779	-.226
0.91	.315	.140	.532	-.502	-.853	-.274
0.92	.272	.117	.471	-.565	-.934	-.327
0.93	.232	.095	.413	-.634	-1.023	-.384
0.94	.194	.075	.357	-.711	-1.122	-.448
0.95	.159	.058	.302	-.799	-1.236	-.521
0.96	.125	.043	.248	-.903	-1.370	-.606
0.97	.093	.029	.195	-1.030	-1.534	-.711
0.98	.063	.018	.141	-1.200	-1.754	-.849
0.99	.034	.008	.086	-1.466	-2.100	-1.068

a. Logarithm base = 10.

Replikasi 3

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi			95% Confidence Limits for $\log(\text{Konsentrasi})^a$		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	0.01	894.508	261.400	8282.096	2.952	2.417	3.918
	0.02	490.530	163.752	3556.393	2.691	2.214	3.551
	0.03	335.059	121.665	2080.779	2.525	2.085	3.318
	0.04	251.529	97.276	1390.628	2.401	1.988	3.143
	0.05	199.200	81.078	1002.135	2.299	1.909	3.001
	0.06	163.332	69.423	758.375	2.213	1.842	2.880
	0.07	137.237	60.583	594.033	2.137	1.782	2.774
	0.08	117.431	53.622	477.404	2.070	1.729	2.679
	0.09	101.911	47.982	391.385	2.008	1.681	2.593
	0.1	89.445	43.312	326.008	1.952	1.637	2.513
	0.15	52.112	28.306	153.179	1.717	1.452	2.185
	0.2	33.921	20.138	84.240	1.530	1.304	1.926
	0.25	23.470	14.996	50.575	1.371	1.176	1.704
	0.3	16.860	11.467	32.101	1.227	1.059	1.507
	0.35	12.409	8.897	21.171	1.094	.949	1.326
	0.4	9.277	6.941	14.371	.967	.841	1.157
	0.45	7.002	5.396	9.995	.845	.732	1.000
	0.5	5.308	4.134	7.121	.725	.616	.853
	0.55	4.024	3.087	5.207	.605	.489	.717
	0.6	3.037	2.227	3.902	.482	.348	.591
	0.65	2.270	1.549	2.971	.356	.190	.473
	0.7	1.671	1.037	2.271	.223	.016	.356
	0.75	1.200	.664	1.720	.079	-.178	.236
	0.8	.831	.401	1.273	-.081	-.397	.105
	0.85	.541	.222	.902	-.267	-.655	-.045
	0.9	.315	.104	.588	-.502	-.981	-.231
	0.91	.276	.087	.530	-.558	-1.060	-.275
	0.92	.240	.071	.474	-.620	-1.146	-.324
	0.93	.205	.057	.420	-.688	-1.241	-.377
	0.94	.172	.045	.366	-.763	-1.347	-.436
	0.95	.141	.034	.313	-.849	-1.468	-.504
	0.96	.112	.025	.261	-.951	-1.610	-.583
	0.97	.084	.016	.209	-1.075	-1.785	-.681
	0.98	.057	.010	.155	-1.241	-2.017	-.810
	0.99	.031	.004	.097	-1.502	-2.384	-1.013

a. Logarithm base = 10.

Rata-rata Nilai IC₅₀ Doxorubicin

Replikasi	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ Rata-rata ± SD (µg/ml)	CV (%)	Konsentrasi IC ₅₀ untuk Kombinasi (µg/ml)
1	5,581	5,781 ± 0,599	10,36	6
2	6,455			
3	5,308			

C. PERHITUNGAN DAN HASIL UJI SITOTOKSISITAS KOMBINASI**1. Kepadatan Penanaman Sel untuk Uji Sitotoksitas Kombinasi**

Kepadatan sel= 10⁴ sel tiap sumuran

$$\text{Jumlah sel} = \frac{189+176+199+209}{4} = \frac{773}{4} = 193 \text{ sel}$$

$$\text{Jumlah sel (ml)} = \frac{10^4 \times 100}{193 \times 10^4} = 0,52 \text{ ml}$$

0,52 ml suspensi sel + 9,48 ml media kultur

2. Konsentrasi Ekstrak *A. flava* untuk Perlakuan Uji Sitotoksitas Kombinasi

a. Pembuatan larutan induk 100.000 µg/ml

$$\frac{100 \text{ µg/ml}}{1 \text{ ml}} \times 1.000 = 100.000 \text{ µg/ml}$$

Pengenceran larutan induk 10.000 µg/ml

$$\frac{30 \text{ µl}}{300 \text{ ml}} \times 100.000 = 10.000 \text{ µg/ml}$$

30 µl larutan induk 100.000 µl + 270 µl media kultur

b. Pembuatan Konsentrasi Uji

1) Konsentrasi $\frac{1}{4}$ IC₅₀ *A. flava* (untuk konsentrasi 56,25 µg/ml)

$$\frac{1}{4} \times 450 = 112,5 \text{ µg/ml}$$

$$\frac{11,25 \text{ µl}}{1000 \text{ ml}} \times 10.000 = 112,5 \text{ µg/ml}$$

11,25 µl larutan induk 10.000 µl + 988,75 µl media kultur

2) Konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC₅₀ *A. flava* (untuk konsentrasi 112,5 µg/ml)

$$\frac{1}{2} \times 450 = 225 \text{ µg/ml}$$

$$\frac{22,5 \text{ µl}}{1000 \text{ ml}} \times 10.000 = 225 \text{ µg/ml}$$

22,5 µl larutan induk 10.000 µl + 977,5 µl media kultur

3) Konsentrasi IC₅₀ *A. flava* (untuk konsentrasi 225 µg/ml)

$$\text{IC}_{50} \text{ } A. \text{ flava} = 450 \text{ µg/ml}$$

$$\frac{45 \text{ µl}}{1000 \text{ ml}} \times 10.000 = 450 \text{ µg/ml}$$

45 µl larutan induk 10.000 µl + 955 µl media kultur

4) Konsentrasi 2IC₅₀ *A. flava* (untuk konsentrasi 450 µg/ml)

$$2 \times \text{IC}_{50} \text{ } A. \text{ flava} = 2 \times 450 = 900 \text{ µg/ml}$$

$$\frac{90 \text{ µl}}{1000 \text{ ml}} \times 10.000 = 900 \text{ µg/ml}$$

90 µl larutan induk 10.000 µl + 910 µl media kultur

3. Konsentrasi Doxorubicin untuk Perlakuan Uji Sitotoksisitas Kombinasi

a. Pembuatan larutan induk 2.000 µg/ml

$$\frac{2 \text{ mg}}{1 \text{ ml}} \times 1.000 = 2.000 \text{ µg/ml}$$

Pengenceran larutan induk 100 µg/ml

$$\frac{15 \text{ µl}}{300 \text{ ml}} \times 2.000 = 100 \text{ µg/ml}$$

15 µl larutan induk 2.000 µl + 285 µl media kultur

b. Pembuatan Konsentrasi Uji

1) Konsentrasi $\frac{1}{4}$ IC₅₀ doxorubicin (untuk konsentrasi 0,75 µg/ml)

$$\frac{1}{4} \times 6 = 1,5 \text{ µg/ml}$$

$$\frac{15 \text{ µl}}{1000 \text{ ml}} \times 100 = 1,5 \text{ µg/ml}$$

15 µl larutan induk 100 µl + 985 µl media kultur

2) Konsentrasi $\frac{1}{2}$ IC₅₀ doxorubicin (untuk konsentrasi 1,5 µg/ml)

$$\frac{1}{2} \times 6 = 3 \text{ µg/ml}$$

$$\frac{30 \text{ µl}}{1000 \text{ ml}} \times 100 = 3 \text{ µg/ml}$$

30 µl larutan induk 100 µl + 970 µl media kultur

3) Konsentrasi IC₅₀ doxorubicin (untuk konsentrasi 3 µg/ml)

IC₅₀ doxorubicin = 6 µg/ml

$$\frac{60 \text{ µl}}{1000 \text{ ml}} \times 100 = 6 \text{ µg/ml}$$

60 µl larutan induk 100 µl + 940 µl media kultur

4) Konsentrasi 2IC₅₀ doxorubicin (untuk konsentrasi 6 µg/ml)

2 x IC₅₀ doxorubicin = 2 x 6 = 12 µg/ml

$$\frac{120 \text{ µl}}{1000 \text{ ml}} \times 100 = 12 \text{ µg/ml}$$

120 µl larutan induk 100 µl + 880 µl media kultur

4. Data Absorbansi dan Viabilitas Sel Uji Sitotoksisitas Kombinasi

Konsentrasi *A. flava*

Konsentrasi µg/ml	Absorbansi			Viabilitas sel (%)		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
56,25	0,612	0,626	0,608	101,77	104,36	101,03
112,5	0,532	0,556	0,6	86,96	91,4	99,55
225	0,491	0,472	0,448	79,36	75,84	71,4
450	0,175	0,161	0,172	20,84	18,24	20,28

Konsentrasi Doxorubicin

Konsentrasi µg/ml	Absorbansi			Viabilitas sel (%)		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
0,75	0,501	0,54	0,542	81,21	88,43	88,81
1,5	0,5	0,507	0,515	81,03	82,32	83,81
3	0,405	0,442	0,433	63,43	70,29	68,62
6	0,348	0,347	0,363	52,88	52,69	55,66

Konsentrasi Kombinasi

Konsentrasi µg/ml	Absorbansi			Viabilitas sel (%)		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
56,25 A + 0,75 D	0,54	0,469	0,522	88,41	75,23	85,07
56,25 A + 1,5 D	0,53	0,529	0,536	86,56	86,37	87,67
56,25 A + 3 D	0,348	0,341	0,341	52,78	51,48	51,48
56,25 A + 6 D	0,208	0,17	0,2	26,79	19,74	25,3

Konsentrasi µg/ml	Absorbansi			Viabilitas sel (%)		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
112,5 A + 0,75 D	0,564	0,571	0,571	92,87	94,17	94,17
112,5 A + 1,5 D	0,573	0,531	0,461	94,54	86,74	73,75
112,5 A + 3 D	0,229	0,229	0,245	30,69	30,69	33,66
112,5 A + 6 D	0,143	0,153	0,137	14,73	16,58	13,61

Konsentrasi µg/ml	Absorbansi			Viabilitas sel (%)		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
225 A + 0,75 D	0,35	0,268	0,258	53,15	37,93	36,07
225 A + 1,5 D	0,242	0,202	0,169	33,1	25,68	19,55
225 A + 3 D	0,099	0,092	0,094	6,56	5,26	5,63
225 A + 6 D	0,101	0,101	0,103	6,93	6,93	7,3

Konsentrasi µg/ml	Absorbansi			Viabilitas sel (%)		
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
450 A + 0,75 D	0,123	0,124	0,118	11,01	11,2	10,08
450 A + 1,5 D	0,125	0,119	0,119	11,38	10,27	10,27
450 A + 3 D	0,12	0,117	0,117	10,46	9,9	9,9
450 A + 6 D	0,123	0,115	0,115	11,01	9,53	9,53

Keterangan: Konsentrasi *A. flava* (A), Konsentrasi doxorubicin (D)

kontrol sel			\bar{x}	kontrol media			\bar{x}
0,625	0,639	0,652	0,602	0,064	0,061	0,066	0,063
0,629	0,617	0,592					
0,619	0,645	0,582					
0,643	0,632	0,586					
0,63	0,593	0,591					
0,571	0,587	0,539					
0,564	0,571	0,544					

5. Hasil Analisis Statistik Uji Sitotoksitas Kombinasi *A. flava* dan Doxorubicin

1) Uji Normalitas

Tests of Normality						
Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Viabilitas 450	.309	3	.	.901	3	.388
225	.197	3	.	.996	3	.873
112.5	.243	3	.	.972	3	.678
56.25	.304	3	.	.908	3	.411
6	.365	3	.	.798	3	.109
3	.295	3	.	.919	3	.450
1.5	.184	3	.	.999	3	.929
0.75	.370	3	.	.786	3	.082
56.25+0.75	.291	3	.	.925	3	.470
56.25+1.5	.336	3	.	.857	3	.259
56.25+3	.385	3	.	.750	3	.000
56.25+6	.309	3	.	.900	3	.386
112.5+0.75	.385	3	.	.750	3	.000
112.5+1.5	.232	3	.	.980	3	.727
112.5+3	.385	3	.	.750	3	.000
112.5+6	.243	3	.	.973	3	.682
225+0.75	.349	3	.	.831	3	.190
225+1.5	.192	3	.	.997	3	.895
225+3	.276	3	.	.942	3	.534
225+6	.385	3	.	.750	3	.000
450+0.75	.326	3	.	.873	3	.304
450+1.5	.385	3	.	.750	3	.000
450+3	.385	3	.	.750	3	.000
450+6	.385	3	.	.750	3	.000

3. Lilliefors Significance Correction

Keterangan: Data normal jika nilai $p > 0,05$

Kesimpulan: Data tidak normal sehingga dilakukan transformasi data

Hasil transformasi data

Tests of Normality

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
tran_ln 450	.313	3	.	.894	3	.366
225	.204	3	.	.993	3	.845
112.5	.236	3	.	.977	3	.712
56.25	.303	3	.	.909	3	.416
6	.364	3	.	.799	3	.112
3	.299	3	.	.914	3	.431
1.5	.182	3	.	.999	3	.938
0.75	.371	3	.	.785	3	.079
56.25+0.75	.297	3	.	.916	3	.440
56.25+1.5	.335	3	.	.858	3	.261
56.25+3	.385	3	.	.750	3	.000
56.25+6	.319	3	.	.885	3	.338
112.5+0.75	.385	3	.	.750	3	.000
112.5+1.5	.246	3	.	.970	3	.665
112.5+3	.385	3	.	.750	3	.000
112.5+6	.230	3	.	.981	3	.734
225+0.75	.342	3	.	.845	3	.228
225+1.5	.178	3	.	1.000	3	.960
225+3	.265	3	.	.953	3	.583
225+6	.385	3	.	.750	3	.000
450+0.75	.329	3	.	.868	3	.290
450+1.5	.385	3	.	.750	3	.000
450+3	.385	3	.	.750	3	.000
450+6	.385	3	.	.750	3	.000

a. Lilliefors Significance Correction

Keterangan: Data normal jika nilai $p > 0,05$

Kesimpulan: Data tetap tidak normal

2) Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Viabilitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.263	23	48	.000

Keterangan: Data homogen jika nilai signifikansi $> 0,05$

Kesimpulan: Data tidak homogen (0,000) sehingga dilakukan transformasi data

Hasil transformasi data

Test of Homogeneity of Variances

tran_log

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.242	23	48	.000

Keterangan: Data homogen jika nilai signifikansi $> 0,05$

Kesimpulan: Data tetap tidak homogen (0,000). Data tidak normal atau tidak homogen maka data dianalisis menggunakan uji *Kruskall Wallis*

3) Hasil Uji *Kruskal Wallis***Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank
Viabilitas	450	3	24.33
	225	3	48.33
	112.5	3	64.00
	56.25	3	71.00
	6	3	39.83
	3	3	44.00
	1.5	3	52.67
	0.75	3	58.83
	56.25+0.75	3	54.83
	56.25+1.5	3	57.67
	56.25+3	3	37.50
	56.25+6	3	26.67
	112.5+0.75	3	66.00
	112.5+1.5	3	57.67
	112.5+3	3	31.33
	112.5+6	3	20.00
	225+0.75	3	36.67
	225+1.5	3	27.67
	225+3	3	2.00
	225+6	3	5.00
	450+0.75	3	14.50
	450+1.5	3	14.33
	450+3	3	11.00
450+6	3	10.17	
Total		72	

Test Statistics^{a,b}

	Viabilitas
Chi-Square	69.468
df	23
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Keterangan: Jika nilai Asymp. Sig > 0,05 maka berhenti di analisis *Kruskal Wallis*Jika nilai Asymp. Sig < 0,05 maka dilanjutkan analisis *post hoc**Mann-Whitney*Kesimpulan: Nilai Asymp. Sig < 0,05 maka dilanjutkan analisis *post hoc**Mann-Whitney*

4) Contoh Hasil Uji Statistik dengan *Mann-Whitney*

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Viabilitas	56.25	3	5.00	15.00
	56.25+3	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics ^b	
	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Keterangan: Jika nilai Asymp. Sig. < 0,05 berarti ada perbedaan yang bermakna.

Kesimpulan: Nilai Asymp. Sig= 0,046 sehingga ada perbedaan yang bermakna antara perlakuan kombinasi EEAfL konsentrasi 56,25 µg/ml dan doxorubicin konsentrasi 3 µg/ml dengan pemberian EEAfL tunggal konsentrasi 56,25 µg/ml.

Ranks				
	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Viabilitas	3	3	5.00	15.00
	56.25+3	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics ^b	
	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Perlakuan

Keterangan: Jika nilai Asymp. Sig. < 0,05 berarti ada perbedaan yang bermakna

Kesimpulan: Nilai Asymp. Sig= 0,046 sehingga ada perbedaan yang bermakna antara perlakuan kombinasi EEAfL konsentrasi 56,25 µg/ml dan doxorubicin konsentrasi 3 µg/ml dengan pemberian doxorubicin tunggal konsentrasi 3 µg/ml.